

Doğu Mazısının (*Thuja orientalis* L.) Embriyo Kültürü İle Çoğaltımı

Mehmet SEZGİN^{1*}, Mustafa KAHYA²

¹Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çankırı

²Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Çankırı

*Sorumlu Yazar: sezgin@karatekin.edu.tr

Geliş Tarihi: 04.01.2021 Düzeltme Geliş Tarihi: 19.03.2021 Kabul Tarihi: 07.04.2021

Öz

Cupressaceae familyasına ait Doğu mazısı (*Thuja orientalis* L.), peyzaj açısından kullanımıyla birlikte kereste ve odun üretimi için önemli bir orman ağacı türüdür. Bununla birlikte tıbbi olarak kullanımı maziye oldukça önemli bitkiler sınıfına sokmaktadır. Çalışmada, Doğu mazısı (*Thuja orientalis* L.) bitki biyoteknolojisinin önemli tekniklerinden biri olan embriyo kültürü tekniği ile çoğaltarak oldukça önemli sonuçlar elde edilmiştir. Sakkarozun farklı dozları ile birlikte, Woody Plant Medium (WPM) temel besin ortamına 6-benziladenin (BA)'in (0, 1, ve 2 mg l⁻¹) ile 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) veya Indol-3-bütirik asit (IBA)'in (0, 0.5 ve 1 mg l⁻¹) dozları kombine edilerek besin ortamına ilave edilmiştir. BA (1 mg l⁻¹) + IBA (0.5 mg l⁻¹) büyüme düzenleyici madde (BDM) kombinasyonuna 30 g l⁻¹ sakkaroz ilave edilmiş ortamda çimlenme başarısı %100 oranında meydana gelmiş, maksimum sürgün uzunluğu (4.8 cm) ve kök sayısı (7.6) elde edilmiştir. BA (1 mg l⁻¹) + 2,4-D (0.5 mg l⁻¹) BDM kombinasyonuna 45 g l⁻¹ sakkaroz eklenmiş ortamda ise maksimum kök uzunluğu 2.4 cm olarak belirlenmiştir. Aklimatizasyon uygulaması yapılan bitkilerden %69'u dış koşullara uyum göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Aklimatizasyon, Doku kültürü, Embriyo kültürü, *Thuja orientalis* L., Sakkaroz

Micropropagation of Oriental Arborvitae (*Thuja orientalis* L.) via Embryo Culture

Abstract

Oriental arborvitae (*Thuja orientalis* L.), which belongs to the *Cupressaceae* family, is an important forest tree species for timber and wood products with its use in landscaping. However, its medicinal use puts oriental arborvitae in the class of very important plants. In the study, very important results have been obtained by propagation with the embryo culture technique, which is one of the important techniques of plant biotechnology. Along with different doses of sucrose, Woody Plant Medium (WPM) is added with doses of 6-benzyladenine (BA) (0, 1, and 2 mg l⁻¹) and 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) or Indole-3-butyric acid (IBA) (0, 0.5, and 1 mg l⁻¹) were combined and added to the medium. In the medium, 30 g l⁻¹ sucrose was added to the BA (1 mg l⁻¹) + IBA (0.5 mg l⁻¹) growth regulator combination (BDM), and the germination success was 100%, while the maximum shoot length (4.8 cm) and root number (7.6). In the medium 45 g l⁻¹ sucrose was added to BA (1 mg l⁻¹) + 2,4-D (0.5 mg l⁻¹) BDM combination, maximum root length (2.4 cm) was determined. 69% of the plants with acclimatization have adapted to external conditions.

Key words: Acclimatization, Embryo culture, *Thuja orientalis* L., Tissue culture, Sucrose.

Giriş

Odunun hammadde olarak kullanımı, tüm toplumlarda ve dünya ekonomisinde hayati önem taşımaktadır. Fakat insanoğlunun gelişmesi ile

orman ve orman ürünlerine olan talebin giderek artmasına karşın dünya çapında doğal ormanların giderek yok edilmesi de büyük bir tezat olarak karşımıza çıkmaktadır (Victor ve Ausubel, 2000; Libby, 2001; Rambabu ve ark., 2006). Ormanların

korunması ve ekosistemin devamlılığı açısından ağaçların çoğaltılması bir zorunluluktur. Biyoteknolojik tekniklerinden biri olan *in vitro* çoğaltım teknikleri, ormanların rehabilitasyonunda ve çoğaltılmasında en önemli yöntemlerden biridir (Trevor ve Gershenzon, 2002; Yer ve Ayan, 2014). Yüksek bitkilerin tohum ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek, belli besin ortamlarında kültüre alınması embriyo kültürü olarak tanımlanmaktadır (Bürün ve Gürel 2002). Zigotik embriyo kültürü, fiziksel ve biyotik müdahalenin üstesinden gelmek ve aynı zamanda nesli tükenmekte olan orman ağacı türlerinin hızla *in vitro* çoğaltılmasında önemli bir rol oynar. Zigotik embriyo hücreleri, hali hazırda ifade edilen indüksiyon işlemi için gerekli olan genlerin birçoğu ile "embriyogenik potansiyeli" ifade etmektedir.

Cupressaceae familyasına ait bir tür olan *Thuja orientalis* L. (Doğu mazısı), diğer *Thuja* sp. türlerinin içinde en küçüğüdür (5-12 m) ve genellikle çok gövdeli olup, dikey bir düzlemde yayılan dalları vardır. Kozalakları diğer mazı türlerinden daha büyük (1-1.5 cm) çapta ve geriye doğru kıvrık mahmuzludur. *T. orientalis* park ve bahçelerde çok güzel canlı çit oluşturan, makaslanabilen ve ana türden başka çok değerli formları bulunan bir türdür. Genel olarak cinsin, ince ve pullu kabuklu ve düzleştirilmiş yaprak benzeri dallara sahip, her dem yeşil, aromatik ve reçineli ağaç karakteristik özelliklerini taşımaktadır. Ormancılık, bahçe bitkileri ve peyzaj açısından oldukça değerli bir ağaçtır (Johnson, 1973; Krüssman, 1985; Anşin ve Özkan, 1997; Ahn ve ark., 2019). Kereste olarak direk, inşaat kazığı, travers, müzik aleti ve uzak doğuda kano yapımında kullanılmaktadır. Aynı zamanda tıbbi amaçlı olarak, homeopati ve bronşiyal nezle, enürezis, sistit, sedef hastalığı, uterus karşı nomaları, romatizma ve zona gibi hastalıkların tedavisinde, geleneksel ilaçların çeşitli formlarında bir kullanımı vardır (Hosie, 1979; Bucur, 1995; Baytop, 1999; Mitra, 2003; Biswas ve ark., 2011). Yaprakları mantar enfeksiyonlarını, kanseri, benleri ve parazitik kurtları tedavi etmek için kullanılan uçucu yağları içermektedir. Yapraklardan elde edilen uçucu yağ zehirlidir (Hold ve ark., 2000; Kamal ve ark., 2016).

Öz odun içindeki *thujaplicin* adlı madde, kerestesini dayanıklı ve çürümeye karşı dirençli kılmaktadır (Jin ve ark., 1988) ve bu keresteden yapılmış olan 250 yıldan uzun zamandır kullanılan ahşap ve ahşap ürünler bulunmaktadır.

Mazının, pek çok alanda doğal yolla çoğaltım başarısızlığına karşı ve tohum/fide oranının yüksek olması fidanlık tekniğini üzerinde durulması fikrini ortaya çıkarmıştır. Mazı kendisi ile aynı familyada yer alan diğer türlere göre arasında

yüksek bir çimlenme yüzdesine sahip olsa da fide ölüm oranı son derece yüksektir (Ahn ve ark., 2019). Patojenik mantarlar, kuşlar, böcekler ve kuruma gibi faktörler de, fidelerin düşük hayatta kalma yüzdesine katkıda bulunur. Tüm bu çerçevede çalışmada, biyoteknolojik çoğaltım tekniklerinden embriyo kültürü yardımıyla, *T. orientalis*'in çoğaltılması amacıyla bir protokol geliştirilmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Metot

Bitki materyali ve sterilizasyonu: Çalışmada kullanılan tohumlar, Çankırı Kenbağ Orman Fidanlığı içerisinde bulunan *T. orientalis* üzerinden toplanan kozalaklardan elde edilmiştir.

Fidanlıktan laboratuvar ortamına getirilen tohumlar, öncelikle yüzey sterilizasyonu için akan musluk suyu altında 20 dk yıkandıktan sonra %70'lik EtOH'de 3 dk bekletilmiştir. %15 klor içeren ticari NaOCl'nin birkaç damla Tween 20 ilave edilmiş %20'lik solüsyonunda, 10 dakika boyunca sterilize edilmiş ve ardından NaOCl'nin dokulardan uzaklaşması için 3 defa 5'er dakika süre ile steril saf su ile aseptik koşullarda çalkalanmıştır (Sezgin ve Dumanoglu, 2014). Tohumlar bu sterilizasyon işleminden sonra içerisinde steril saf su bulunan ECO2 Box (Duchefa®) kaplarında tohum kabuğunun kolaylıkla soyulabilmesi ve olası bir fenolik salgı ile karşılaşmamak amacıyla 48 sa boyunca bekletilmiştir (Şekil 1a-1b). Ardından laminar hava akışlı kabin içerisinde bistüri ve skapel yardımıyla kabuklarından ayrılan tohumlar birer eksplant olarak dikime hazır hale getirilmiştir.

Kültür şartları: *T. orientalis* tohumları *in vitro* çoğaltım tekniklerinden biri olan embriyo kültürü tekniği ile çoğaltılmak amacıyla kültüre alınmıştır. Bu amaçla besin ortamı olarak Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd ve McCown, 1981) ortamı kullanılmıştır. Oksin ve sitokin grubu büyüme düzenleyici maddelerden (BDM) 6-benziladenin (BA)'in (0, 1, ve 2 mg l⁻¹) dozları ile 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve İndol-3-bütirik asit (IBA)'in (0, 0.5 ve 1 mg l⁻¹) dozları kombine edilerek besin ortamına ilave edilmiştir. *T. orientalis* için temel besin ortamına, 3 sitokin doz ve 6 oksin dozunun BDM olarak yer aldığı 18 farklı kombinasyonda hazırlanan besin ortamlarına; katılaştırıcı olarak Gelrite (2.1 g l⁻¹), organik madde kaynağı olarak pridoksin HCl (5 mg l⁻¹) ve sakkarozun (15, 30 ve 45 g l⁻¹) dozları ilave edilerek ortamın pH'sı 5.7'ye ayarlanmıştır. Besin ortamlarında, eksplantların dikiminden sonra oluşabilecek kontaminasyonu önlemek amacı ile PPM (Plant Preservative Mixture-(Duchefa®)) 2 ml l⁻¹ olarak ilave edilmiştir. Besin ortamlarının sterilizasyonu dijital kontrollü otoklav ile 121°C ve 1.2atm basınç altında 20 dk süreyle yapılmıştır.

Otoklavdan çıkarılan besin ortamları laminar hava akışlı kabin içerisinde katılaşmasından hemen önce steril tüplere (130x10 mm) 10'ar ml olarak dağıtılmıştır. Her tüpte 1 adet eksplant olacak şekilde tüm kombinasyonlar 10'ar tekerrür halinde hazırlanmıştır (Sezgin ve Dumanoglu, 2014).

Rejenerasyon kapsamında tüm kültürler $25\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 16 saat aydınlık ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 8 saat karanlık koşullara sahip iklim kabininde 4 hafta süreyle inkübe edilmiştir (Şekil 1e). Başlangıç aşamasından sonra eksplantlar yine aynı kombinasyonlar içeren ortamlarda 4 hafta sonra alt kültüre alınmıştır. Bu sayede taze ortamdan yararlanmaları sağlanmıştır (Şekil 1c-1d).

Bitkilerin aklimatizasyonu: Sürgün ve kök gelişimi gösteren bitkiler aklimatizasyon aşamasına alınmıştır. Bu aşamada besin ortamından çıkarılan bitkiler, köklerindeki besin ortamı bulaşığından arındırılmak için öncelikle saf su ile yıkanmıştır. Bitkiler daha sonra hacimce (3:1:1 v/v) oranında çiçek toprağı, kum, perlit karışımından oluşan ve topraktan geçebilecek herhangi bir kontaminasyonu önlemek amacıyla önceden otoklav ile 121°C ve 1.2 atm basınç altında 90 dk süreyle steril edilen karışıma dikilmiştir. Bitkiler $25\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 16 saat aydınlık ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 8 saat karanlık koşullara sahip iklim kabininde 4 hafta muhafaza edilmiştir (Bürün ve Gürel, 2002; Kamal ve ark., 2016; Ahn ve ark., 2019). Bu aşamada saksılar gūnaşırı olmak üzere sulanmıştır.

İstatistik Analiz: Çalışmada denemelerin tamamı "Tesadüf Parselleri Deneme Deseni"ne göre kurulmuştur. Çalışmada embriyolara, 3 sitokinin dozu x 6 oksin dozu x 3 sakkaroz dozu x 10 tekerrür x 1'er adet tohum ile toplamda 540 adet tohum 540 adet tüpe dikilmiştir. Çimlendirme denemelerinden elde edilen veriler yinelemelerin ortalaması olarak varyans analizi yöntemi (ANOVA) ile Graphs Pad Prism Paket Programı ile Tukey testine göre kontrol edilmiştir ($P < 0.05$).

Bulgular ve Tartışma

Bitki *Thuja orientalis* L. embriyoları büyüme düzenleyici madde ve sakkarozun farklı dozlarının ilave edildiğı WPM besin ortamında kültüre alınmıştır. Bu dikim işleminden 4 hafta sonra neredeyse farklı sakkaroz dozlarında çimlenme başarısı gösteren mazi tohumları, %10-100 oranlarda çimlenme başarısı göstermiştir (Çizelge 1). Bu orandaki değışkenlik besin ortamı içerisine ilave edilen BDM dozlarına göre farklılık göstermiştir. Sakkaroz dozlarından 30 g l^{-1} dozu

diğer 15 ve 45 g l^{-1} dozuna göre çimlenme yüzdesinde daha yüksek sonuçlar vermiştir. BDM ilave edilmemiş ortamda aynı zamanda sakkaroz konsantrasyonunun da düşük olması sebebiyle herhangi bir çimlenme meydana gelmemiştir. Bu da gösteriyor ki sakkaroz dozu *T. orientalis* embriyolarının çimlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Embriyoların gelişerek bitkiye dönüşmesi aşamasında BDM'lerin ve dozlarının etkisi oldukça fazladır. İstatistik anlamda da BA (1 mg l^{-1}) + IBA (0.5 mg l^{-1}) BDM kombinasyonuna 30 g l^{-1} sakkaroz ilave edilmiş ortamda çimlenme %100 oranında olurken maksimum sürgün uzunluğu (4.8 cm) ve kök sayısı (7.6) elde edilmiştir. BA (1 mg l^{-1}) + 2,4-D (0.5 mg l^{-1}) BDM kombinasyonuna 45 g l^{-1} sakkaroz eklenmiş ortamda ise maksimum kök uzunluğu (2.4 cm) elde edilmiştir (Şekil 1f). Büyüme düzenleyici maddelerden BA'nın 1 mg l^{-1} dozu 0 ve 2 mg l^{-1} dozlarına göre çimlenme yüzdesi, sürgün ve kök uzunlukları ile kök sayısında, besin ortamına birlikte eklenen IBA ve 2,4-D'nin 0.5 ve 1 mg l^{-1} dozları ile birlikte istatistik olarak aynı grup içerisinde yer alarak en iyi sonuçları vermiştir (Çizelge 1). Doku kültüründe büyüme düzenleyicileri, bitki büyümesi ve gelişmesinde düşük konsantrasyonlarda etki eder (Cid ve Teixeira, 2014). Bu gerçek, *T. orientalis* ile eksplantlarında gözlenmiştir. BA'nın yüksek dozu (2 mg l^{-1}) ile oksin grubu BDM'lerin konsantrasyonunda meydana gelen etkileşim ile embriyoların çimlenme oranı düşük sitokinin oranına göre daha az olarak meydana gelmiştir. Aynı zamanda bu durum çimlenen embriyolar üzerinde de gelişimi kısıtlayıcı bir etken olarak karşımıza çıkmıştır. BA'nın yalnız başına kullanıldığı kombinasyonlarda da çimlenme oranı, sürgün ve kök oluşumu kısıtlı olmuştur. Bu durum sitokinin ile birlikte kombine edilerek kullanıldığı zaman, sitokininlerin, *in vitro* çoğaltımda eksplantlarda hücre bölünmesinden, apikal dormansinin ortadan kaldırılması ve aksiler tomurcuk proliferasyonunun indüklenmesinden sorumludur (Miransari ve Smith 2014; Sezgin ve Dumanoglu, 2014) tezini bir kez daha onaylamaktadır (Şekil 1).

Sürgün ve kök gelişimi gösteren bitkiler aklimatizasyon aşamasına alınmıştır. Başlangıç aşamasında 540 adet embriyonun kullanıldığı çalışmada 222 adet embriyo çimlenmiştir. Gelişimleri iyi durumda olan 200 tanesi öncelikle aklimatizasyon için hazırlanmıştır. Önceden otoklav

Çizelge 1. *T. orientalis* zigotik embriyolarının çimlenmesi ve bitkiye dönüşümlerinde büyüme düzenleyici madde (BDM) kombinasyonları ile sakarozun farklı konsantrasyonlarının etkileri (P < 0.05).

| | BDM | | | Sakaroz (g l ⁻¹) | Çimlenme (%) | Sürgün uzunluğu (cm) | Kök sayısı (Adet) | Kök uzunluğu (cm) |
|----|--|-----|-------|---------------------------------|-----------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| | Kombinasyonları (mg l ⁻¹) | | | | | | | |
| | BA | IBA | 2,4-D | | | | | |
| 1 | 0 | 0 | - | 15 | - | - | - | - |
| 2 | 0 | 0 | - | 30 | 10 | 0.5±0.0c* | 0.1±0.0c | 0.1±0.0c |
| 3 | 0 | 0 | - | 45 | 10 | 0.4±0.0c | 0.4±0.0c | 0.1±0.0c |
| 4 | 0 | 0.5 | - | 15 | 10 | 0.5±0.0c | 3.1±0.0bc | 0.2±0.0c |
| 5 | 0 | 0.5 | - | 30 | 30 | 0.5±0.0c | 4.0±0.0b | 0.2±0.0c |
| 6 | 0 | 0.5 | - | 45 | 20 | 0.4±0.0c | 4.0±0.0b | 0.2±0.0c |
| 7 | 0 | 1 | - | 15 | 10 | 0.7±0.0c | 5.2±0.0ab | 0.4±0.0c |
| 8 | 0 | 1 | - | 30 | 40 | 1.2±0.0c | 5.5±0.0ab | 0.5±0.0c |
| 9 | 0 | 1 | - | 45 | 20 | 0.6±0.0c | 4.7±0.0b | 0.5±0.0c |
| 10 | 0 | - | 0 | 15 | - | - | - | - |
| 11 | 0 | - | 0 | 30 | 10 | 0.4±0.0c | 0.3±0.0c | 0.1±0.0c |
| 12 | 0 | - | 0 | 45 | 10 | 0.4±0.0c | 0.3±0.0c | 0.1±0.0c |
| 13 | 0 | - | 0.5 | 15 | 10 | 0.6±0.0c | 3.5±0.0bc | 0.2±0.0c |
| 14 | 0 | - | 0.5 | 30 | 40 | 1.2±0.0c | 3.7±0.0bc | 0.5±0.0c |
| 15 | 0 | - | 0.5 | 45 | 20 | 0.6±0.0c | 4.0±0.0b | 0.2±0.0c |
| 16 | 0 | - | 1 | 15 | 20 | 0.7±0.0c | 5.5±0.0ab | 0.7±0.0c |
| 17 | 0 | - | 1 | 30 | 30 | 0.7±0.0c | 6.1±0.0a | 1.0±0.1bc |
| 18 | 0 | - | 1 | 45 | 20 | 0.6±0.0c | 5.7±0.0ab | 0.9±0.0c |
| 19 | 1 | 0 | - | 15 | 30 | 1.0±0.0c | 4.2±0.0b | 0.8±0.0c |
| 20 | 1 | 0 | - | 30 | 50 | 1.4±0.1c | 4.7±0.1b | 1.1±0.1b |
| 21 | 1 | 0 | - | 45 | 40 | 1.4±0.0c | 4.7±0.1b | 0.8±0.0c |
| 22 | 1 | 0.5 | - | 15 | 50 | 1.6±0.1c | 6.2±0.1a | 0.8±0.0c |
| 23 | 1 | 0.5 | - | 30 | 100 | 4.8±0.2a | 7.6±0.1a | 2.2±0.1a |
| 24 | 1 | 0.5 | - | 45 | 80 | 4.4±0.2a | 7.5±0.1a | 2.2±0.1a |
| 25 | 1 | 1 | - | 15 | 30 | 1.2±0.0c | 6.5±0.1a | 1.5±0.1ab |
| 26 | 1 | 1 | - | 30 | 80 | 4.4±0.2a | 7.4±0.1a | 2.1±0.1a |
| 27 | 1 | 1 | - | 45 | 70 | 2.8±0.2b | 6.2±0.1a | 1.9±0.1a |
| 28 | 1 | - | 0 | 15 | 40 | 1.5±0.0c | 4.2±0.0b | 1.0±0.0bc |
| 29 | 1 | - | 0 | 30 | 60 | 2.0±0.1bc | 4.4±0.0b | 1.1±0.1bc |
| 30 | 1 | - | 0 | 45 | 30 | 0.9±0.0d | 4.5±0.0b | 0.9±0.0c |
| 31 | 1 | - | 0.5 | 15 | 60 | 2.1±0.1bc | 5.8±0.1ab | 1.1±0.1bc |
| 32 | 1 | - | 0.5 | 30 | 100 | 4.5±0.2a | 6.5±0.1a | 2.3±0.1a |
| 33 | 1 | - | 0.5 | 45 | 90 | 4.3±0.2a | 7.4±0.1a | 2.4±0.1a |
| 34 | 1 | - | 1 | 15 | 40 | 1.3±0.0c | 5.0±0.1ab | 1.8±0.1ab |
| 35 | 1 | - | 1 | 30 | 80 | 4.4±0.2a | 6.3±0.1a | 1.8±0.1a |
| 36 | 1 | - | 1 | 45 | 80 | 4.1±0.2a | 6.2±0.1a | 1.9±0.1a |
| 37 | 2 | 0 | - | 15 | 30 | 1.1±0.0c | 4.0±0.0b | 0.9±0.0c |
| 38 | 2 | 0 | - | 30 | 60 | 2.2±0.1bc | 4.3±0.0b | 1.1±0.1bc |
| 39 | 2 | 0 | - | 45 | 30 | 1.0±0.0c | 4.2±0.0b | 0.9±0.0c |
| 40 | 2 | 0.5 | - | 15 | 40 | 1.2±0.0c | 5.3±0.0ab | 1.2±0.0bc |
| 41 | 2 | 0.5 | - | 30 | 70 | 3.0±0.2b | 5.8±0.1ab | 1.5±0.1ab |
| 42 | 2 | 0.5 | - | 45 | 70 | 2.9±0.2b | 4.9±0.0b | 1.2±0.0bc |
| 43 | 2 | 1 | - | 15 | 30 | 1.1±0.0c | 4.8±0.0b | 0.9±0.0c |
| 44 | 2 | 1 | - | 30 | 40 | 1.0±0.0c | 4.8±0.0b | 1.2±0.1b |
| 45 | 2 | 1 | - | 45 | 50 | 1.5±0.1c | 4.7±0.0b | 1.2±0.1b |
| 46 | 2 | - | 0 | 15 | 30 | 0.9±0.0d | 3.9±0.0bc | 1.0±0.0bc |
| 47 | 2 | - | 0 | 30 | 40 | 1.2±0.0c | 4.2±0.0b | 1.2±0.1b |
| 48 | 2 | - | 0 | 45 | 30 | 0.8±0.0d | 4.2±0.0b | 1.2±0.0b |
| 49 | 2 | - | 0.5 | 15 | 40 | 1.0±0.0c | 5.4±0.1ab | 1.6±0.0ab |
| 50 | 2 | - | 0.5 | 30 | 70 | 3.1±0.2b | 5.5±0.1ab | 1.6±0.0ab |
| 51 | 2 | - | 0.5 | 45 | 50 | 1.8±0.1c | 5.0±0.0ab | 1.6±0.0ab |
| 52 | 2 | - | 1 | 15 | 30 | 1.0±0.0c | 4.5±0.0b | 1.2±0.0b |
| 53 | 2 | - | 1 | 30 | 50 | 1.5±0.1c | 4.6±0.0b | 1.4±0.0b |
| 54 | 2 | - | 1 | 45 | 40 | 0.9±0.0c | 4.8±0.0b | 1.4±0.0b |

* Her uygulama için yapılan iki tekrerin ortalama standart hatasını ifade eder.



Şekil 1. *Thuja orientalis* L. embriyo kültürü aşamaları **a)** Sterilizasyon sonrası tohumların saf su içinde bekletilmesi, **b)** tohum kabuğunun çatlayarak embriyoların ortaya çıkması, **c)** tüp içerisine yan olarak yerleştirilmiş embriyonun gelişimi WPM BA (1 mg l⁻¹) + IBA (0.5 mg l⁻¹) + sakkaroz (30 g l⁻¹), **d)** embriyonun gelişimi WPM BA (1 mg l⁻¹) + 2,4-D (0.5 mg l⁻¹) + sakkaroz (30 g l⁻¹), **e)** embriyoların inkübatör içinde gelişimleri, **f)** 2 haftalık embriyoların gelişimi **g)** aklimatizasyonun 4. haftası bitkilerin gelişimi, **h)** 16 haftalık bitki

yapılmış hacimce (3:1:1 v/v) oranında çiçek toprağı, kum, perlit karışımdan oluşan toprağı dikilmiştir. Dikim sonrasında bitkiler piset ile güneşirli yaklaşık 50 ml sulanmıştır. 13 x 8 cm ebatlarındaki saksılara dikilen bitkilerin üzeri nem kaybını önlemek amacıyla streç filmle sarılmış ve üzeri birkaç yerinden delinmiştir. Bitkiler 25°C sıcaklık ve 16 saat aydınlık (35 µmol.m⁻².s⁻¹), 8 saat karanlık koşullara sahip iklim kabininde 8 hafta muhafaza edilmiştir (Bürün ve Gürel, 2002; Kamal ve ark., 2016; Ahn ve ark., 2019). Saksıların üzerindeki streç film bu 4 haftalık süre içerisinde bitki gelişimi gözlenerek aşamalı olarak açılmıştır. Bu aşamada

saksılar güneşirli olmak üzere sulanmıştır. Dört hafta sonra bitkiler dış ortamda saksılara alınmıştır. Aklimatizasyon için hazırlanan toplam 200 adet embriyodan 138 tanesi bitkiye dönüşümlerini tamamlayarak dış koşullara uyum göstermiştir (Şekil 1g-1h).

T. orientalis'in çoğaltılması amacıyla yapılan çalışmada, biyoteknolojik çoğaltım tekniklerinden biri olan embriyo kültürü aracılığıyla bir protokol geliştirilmeye çalışılmıştır. Doku kültüründe kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri, bitkinin büyümesi ve gelişmesinde düşük konsantrasyonlarda en etkili sonucu vermektedir

(Cid ve Teixeira, 2014). Bu gerçek, *T. orientalis* eksplantlarında da gözlenmiştir. Zigotik embriyoların ve meydana gelen sürgünlerin en yüksek rejenerasyon oranı düşük BA konsantrasyonlarında (1 mg l^{-1}) elde edilmiştir. Bu durum farklı çalışmalarla da doğrulanmıştır (Rambau ve ark., 2006; Elhiti ve Stasolla, 2011; Da Silva ve ark., 2018; Ahn ve ark., 2019). BA (1 mg l^{-1}) konsantrasyonuna ilave edilen 0.5 mg l^{-1} IBA veya 2,4-D çimlenme ve rejenerasyon miktarının artmasına Miransari ve Smith (2014)'in aksine olumlu yönde etki etmiştir. Bitki doku kültürü çalışmalarında şekerler en önemli bileşenlerdendir (Bürün ve Gürel, 2002). Dokular yeterli miktarda karbonhidrat sentezi yapamadıklarından ortama şeker ilave edilir. Karbon kaynağı olarak kullanılan sakkarozun konsantrasyonu da zigotik embriyoların çimlenmesinde doğrudan etkili olmuştur. Bitkiye dönüşen ve aklimatizasyon uygulaması yapılan embriyolardan %69'unun dış koşullara uyum göstermiş olması oldukça başarılı olarak değerlendirilebilir.

Sonuç ve Öneriler

Çalışmada, *Thuja orientalis* L. bitkisinin embriyo kültürü ile çoğaltılması bu tekniğin, ziraat, orman ve peyzaj açısından önemlerinin yanı sıra aynı zamanda sekonder metabolit kapasitesi ve özellikleri bakımından önemli olan diğer türlerin de bu teknikle çoğaltılabilmesi yolunda bir ışık olacaktır.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynaklar

Ahn, C., Heo, H.K., Park, H.S. ve Choi, Y.E. 2019. In vitro propagation and cryopreservation of *Thuja koraiensis* Nakai via somatic embryogenesis. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 55: 605–614.

Anşin, R. ve Özkan, Z. 1997. Tohumlu Bitkiler. Karadeniz Teknik Üniversitesi Orman Fakültesi Yayını No:167, Trabzon, 567s.

Baytop, T. 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün. Nobel Tıp Kitabevleri, II. Baskı ISBN: 975-420-021-1. İstanbul, 480s.

Biswas, R., Mandal, S.K, Dutta, S., Bhattacharyya, S.S., Boujedaini, N. ve Khuda-Bukhsh, A.R. 2011. Thujone-rich fraction of *Thuja occidentalis* demonstrates major anti-cancer potentials: evidences from in vitro studies on A375 cells. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*. eCAM, 568148. <https://doi.org/10.1093/ecam/neaq042>

Bucur, V. 1995. *Acoustics of Wood*. Boca Raton: CRC Press. 298s.

Bürün, B. ve Gürel, A. 2002. Embriyo kültürü. “Alınmıştır: Bitki Biyoteknolojisi I. (ed) Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S., Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, Türkiye, 324-344.

Cid, L.P.B. ve Teixeira, J.B. 2014. Explante, meionutritivo, luz e temperatura. “Alınmıştır: Cultivo in vitro de plantas. (ed) Cid L.P.B., Embrapa, Brasília, 17-52.

Da Silva, D., Imakawa, A.M., De Souza Costa, S.ve Sampaio, P.T.B. 2018. In vitro culture of zygotic embryos and seeds of *Caesalpinia ferrea* Martius. *Hoehnea* 45(4): 663-668.

Elhiti, M. ve Stasolla, C. 2011. The use of zygotic embryos as explants for in vitro propagation. “Alınmıştır: Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. (ed) Thorpe, T.A. ve Yeung, E.C. Springer Science+Business Media, LLC vol. 710, DOI 10.1007/978-1-61737-988-8_17, 229-255.

Hold, K.M., Sirisoma, N.S., Ikeda, T., Narahashi, T. ve Casida, J.E. 2000. Alpha-thujone (the active component of absinthe): gamma-amino butyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 3826–3831.

Hosie, R.C. 1979. *Native trees of Canada*. Fitzhenry & Whiteside, Don Mills, Ontario, Canada, 461s.

Jin, L., Wilson, J.W. ve Swan, E.P. 1988. Thujin, a novell act one isolated from the discolored heartwood of *Thuja pilicata* Donn., *Canadian Journal of Chemistry*, 66: 51-53.

Johnson, H. 1973. *The international book of trees*. Bonanza Books, New York, 423s.

Kamal, H., Shahin, H., Mohamed-Yasseen, Y. ve El-Hela, A.A. 2016. Callus induction treatments influence antimicrobial effect of tissue culture-derived *Thuja orientalis* L., *Journal of Scientific and Innovative Research*, 5(3): 79-82.

Krüssman, G. 1985. *Manual of cultivated conifers*. Timber, Portland, Oregon, USA, 509s.

- Libby, W. J. 2001. Some thoughts on plantations and global cooling. *Unasylva*, 52:28-32.
- Lloyd, G. ve 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.
- Miransari, M. ve Smith, D.L. 2014. Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99: 110-121.
- Mitra, E. 2003. In vitro propagation of *Thuja orientalis* by shoot tip culture. *Iranian Journal of Rangel and Sand Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 11(1): 1-15.
- Rambabu, M., Upender, M., Ujjwala, D., Ugandhar, T., Praveen, M. ve Swamy Rama, N. 2006. In vitro zygotic embryo culture of an endangered forest tree *Givotia rottleriformis* and factors affecting its germination and seedling growth. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 42: 418-421.
- Sezgin, M. ve Dumanoglu, H. 2014. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 50(1): 58-68.
- Trevor, M. F. ve Gershenzon, J. 2002. Where will the wood come from? Plantation forest and the role of biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 20: 291–296.
- Victor, D. J. ve Ausubel, J. H. 2000. Restoring the forests. *Foreign Affairs*, 79: 127-144.
- Yer, E. N. ve Ayan, S. 2014. Utilization of biotechnology on some forest trees in Turkey. *Seefor*, 5(2): 93-102.