

Hüsamettin Aycan ALP<sup>2</sup>  
Eftal DÜZYAMAN<sup>3</sup>  
Ercan ÖZZAMBAK<sup>4</sup>

<sup>2</sup> Zir. Yük. Müh., MAY Tohumculuk, Samanlı  
Mh., Yiğitler Cd., No: 28, 16280 Bursa  
e-posta: aycan\_alp@yahoo.com

<sup>3</sup> Doç. Dr., Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi  
Bahçe Bitkileri Bölümü 35100  
Bornova-İzmir

<sup>4</sup> Prof. Dr., Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi  
Bahçe Bitkileri Bölümü 35100  
Bornova-İzmir

## ***In Vitro*'da Kültüre Alınan Enginar Sürgün Uçlarında Sağlıklı Gelişim Oranını Arttırma Olanakları Üzerinde Bir Araştırma<sup>1</sup>**

A research on the possibilities of increasing the amount of healthy shoot tips in *in vitro* grown artichoke

<sup>1</sup> Bu çalışma, 2006-ZRF-035 nolu BAP projesi tarafından desteklenen birinci yazarın yüksek lisans tezinin bir bölümüdür.

Alınış (Received): 02.04.2009

Kabul tarihi (Accepted): 08.09.2009

### **Anahtar Sözcükler:**

*Cynara cardunculus* L. var.  
*scolymus*, *Cynara scolymus*,  
*in vitro*, sterilizasyon ajanları,  
antibiyotik

### **Key Words:**

*Cynara cardunculus* L. var.  
*scolymus*, *Cynara scolymus*,  
*in vitro*, sterilization agents,  
antibiotics

### **ÖZET**

Bu çalışma, *in vitro*'da kültüre alınan enginar sürgün uçlarında gerek enfeksiyon gerekse kararmalarla meydana gelen kayıpları azaltmak amacıyla düzenlenmiştir. Sterilizasyon işlemine ek bir aşama olarak fungisit uygulanması ile sağlıklı gelişen eksplant oranını arttırmak mümkün olmuştur ( $p \leq 0.01$ ). Sterilizasyon işlemine ek olarak, MS besin ortamına gümüş nitratin doğrudan katılması da sağlıklı sürgün gelişimini arttırmaktadır ( $p \leq 0.01$ ). Bu çalışmaya göre, 10'ar dakika süreyle %6'lık Captan ve ardından %0.5 sodyum hipoklorit uygulaması ile sterilize edilen enginar sürgün uçlarının 100 mgI<sup>-1</sup> gümüş nitrat içeren ortama dikilmeleri ile en fazla sayıda sağlıklı gelişen bitkicik (%61) elde edilebilmektedir ( $p \leq 0.01$ ).

### **ABSTRACT**

This study was conducted to decrease the losses due to infections and browning in *in vitro* grown artichoke shoot tips. It was possible to increase the ratio of healthy explants when an additional step of fungicide application was included to the sterilization procedure ( $p \leq 0.01$ ). The addition of silver nitrate directly to the MS medium has also increased the ratio of healthy shoots ( $p \leq 0.01$ ). According to these results, artichoke shoot tips planted in MS containing 100 mgI<sup>-1</sup> silver nitrate after being treated with 6% Captan and %0.5 sodium hypochlorite (both for 10 minutes) gave the highest number (61%) of healthy plantlets ( $p \leq 0.01$ ).

### **GİRİŞ**

Enginar (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) Akdeniz havzasının önemli kültür bitkilerinden biri olarak kabul edilmektedir (Eser ve ark. 2006). Enginar üretimi ile ilgili kayıtların M.Ö. 300'e dayandığı bu havzada dünya enginar üretiminin %85'inin gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Bu üretimde %43 payla İtalya başta olmak üzere, İspanya (%15) ve Fransa (%11) en önemli üretici ülkeler olarak dikkat çekmektedirler (FAOSTAT, 2007).

Artan ilgiye de bağlı olarak, son 10-15 yıl içerisinde enginar, Akdeniz havzası dışında da yoğun olarak yetiştirilmeye başlanmıştır. Günümüzde; Arjantin ve Peru gibi bazı Güney Amerika ülkeleri, Mısır ve Fas gibi bazı Afrika ülkeleri ve Asya'dan da Çin önemli enginar üreticisi ülkeler olarak kabul görmektedirler. ABD, Yunanistan ve Türkiye ise yıllık 30-40.000 ton arasında değişen üretim miktarları ile bu sıralamada daha geride yer almaktadırlar (FAOSTAT, 2007).

Yıllık üretimi 30.000 ton'a yaklaşan Türkiye'de enginar üretimi özellikle Ege Bölgesi'nde yoğunlaşmıştır. Bu bölgenin tek başına Türkiye'de üretilen enginarların %80'inden fazlasını karşıladığı tahmin edilmektedir. Ege Bölgesi'ni üretimde %16 payı bulunan Marmara ve %4 pay ile Akdeniz Bölgeleri izlemektedir. Ege Bölgesi içerisinde ise İzmir ili, üretimde tek başına sahip olduğu %76'lık bir pay ile Türkiye'de enginar kültürünün en yaygın yapıldığı ildir. Bu bölgede üretim özellikle de erkencilik yönü ile ön plana çıkan İzmir'in Karaburun ilçesinde yoğunlaşmıştır. Ancak enginar üretiminin son yıllarda İzmir dışında Aydın'da da yaygınlaştığı bilinmektedir. Marmara bölgesinde ise enginar üretimi, Pendik-İzmit arasında kalan Marmara Denizi kıyılarındaki yamaçlarla, Bursa/Yalova'da ve Balıkesir dolaylarında gerçekleştirilmektedir (Eser ve ark. 2006).

Theophratus henüz M.Ö. 371-287 yıllarında, enginarın çiğ ve haşlanmış olarak yenilebildiğini belirtmiştir (Eser ve ark. 2006). Ancak günümüzde enginar taze tüketiminin yanı sıra sanayide, özellikle de konserve ve dondurulmuş olarak işlenmektedir (Eser ve ark. 2006). Ayrıca enginar; kozmetik, içki, yem ve boya sanayinde de kullanılmaktadır. Ancak enginara olan ilginin artmasının esas nedeni, son yıllarda tıbbi bitki olarak kabul görmeye başlamasıdır (Eser ve ark. 2006). Literatür incelendiğinde, 1700'lü yıllardan günümüze enginarın tıbbi özelliklerini konu alan birçok eserin bulunduğu görülmektedir. Bu yazılarda bu bitkinin özellikle idrar söktürücü, böbrek taşlarını düşürücü, safra salgısını kolaylaştırıcı, ödem giderici yönlerine değinilmektedir (Eser ve ark. 2006). Ancak enginarın

tıbbi bitki olarak kabul görmesi; kafeik asit, bunun türevleri olan kloregenik asit ve cynarin ve glikosid türevi olan cynaropicrin içeriği ile yakından ilgilidir (Eser ve ark. 2006). Bunlara ek olarak luteolin içeriği sayesinde enginar, peroksidatif zararlanmaları engelleyen antioksidant özelliğe de sahiptir (Eser ve ark. 2006). Bu özelliklerinden dolayı enginar, kolesterol düşürücü ve karaciğeri temizleyici ilaç olarak eczanelerde yerini almıştır.

Yukarıda anlatılanlardan da anlaşılacağı gibi enginar, dünyada ve Türkiye'de gittikçe önem kazanan bir kültür bitkisidir. Ancak birçok ülkede olduğu gibi Türkiye'de de bir örnek ve sağlıklı enginar üretim materyalinden söz etmek pek mümkün değildir (Moncousin, 1981). Bu durum enginar ürünleri ile ilgili dış ticaretin gelişmesini de olumsuz yönde etkilemektedir (Eser ve ark. 2006).

Enginar üretimi ile ilgili yaşanan bu sorunlara bağlı olarak, birçok kültür bitkisinde olduğu gibi, *in vitro* teknikleri önemli bir destekleyici potansiyele sahiptir. Özellikle de mikroçoğaltım çok sayıda sağlıklı ve birörnek üretim materyalinin elde edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Moncousin, 1981). Bununla beraber enginar, *in vitro* üretimde problemler kategorisinde yer almaktadır. Özellikle de enginar üretiminde kullanılan dip sürgünleri, geçmişte toprakta bulunmuş olmalarından dolayı, steril koşullara alındıklarında önemli enfeksiyon sorunlarının yaşanmasına neden olmaktadır (Ancora, 1986; Rossi ve de Paoli, 1992). Diğer yandan, enginar dokularında yoğun olarak bulunan fenolik bileşikler, *in vitro* da yapılan sterilizasyon, kesim gibi işlemler sırasında dokuların kararmasına neden olmaktadır (Ancora ve ark. 1981; Block ve Lankes, 1995). Her iki sorun belirli ölçüde çözülmüş olsa da, henüz sadece kısmi bir başarıdan söz edilebilmektedir.

Bu çalışma, enginar doku kültüründe, topraktan alınan dip sürgünlerinden steril koşullarda gerek enfeksiyon ve gerekse kararmaların önüne geçilerek daha fazla sayıda sağlıklı bitkiciğin elde edilebilmesi amacıyla düzenlenmiştir. Çalışma, enginar dip sürgünlerinin sterilizasyonu için en uygun sterili-

zantın belirlenmesi ve sterilizasyon sırasında elimine edilemeyen patojenlerin kültür süresince gelişimlerinin baskılanması konularını kapsamaktadır.

## **MATERYAL VE YÖNTEM**

Yukarıda sözü edilen amaca ulaşmak için iki ayrı çalışma tasarlanmıştır. Öncelikle, sürgün uçlarının steril besin ortamına dikilmelelerinden önce sterilizasyon amacıyla uygulanan farklı sterilizantlar karşılaştırılmıştır. Kültür ortamına geçmesi muhtemel bakteriyel ve fungal hastalık etmenlerinin eliminasyonunu amaçlayan bu çalışma "**Deneme 1**" olarak adlandırılmıştır. Bundan sonra, Deneme 1'den elde edilen olumlu sonuçların da kullanıldığı ikinci bir deneme (**Deneme 2**) kurularak, besin ortamına doğrudan ilave edilen enfeksiyon gelişimini engelleyici bazı maddelerin, sterilizasyon sırasında elimine edilemeyen patojenlerin kültür süresince gelişimlerinin baskılanması bakımından etkinlikleri araştırılmıştır.

Araştırmada, MS ortamı esas alınarak hazırlanmış besin ortamları kullanılmıştır (Murashige ve Skoog, 1962). Ancak glycine otoklavda ayrıştığı için tüm ortamlara bu bileşiğin yerine 500 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> kazein ilave edilmiştir (Reustle ve Natter, 1994). Ayrıca sürgün gelişimini teşvik etmek için tüm ortamlara 1.0 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA (benzyl adenin) ve 20 g sakaroz ilave edilmiştir (Iapichino, 1996). Deneme 1'de kullanılan ortamlar başka bir madde içermemektedir. Ancak Deneme 2'de kullanılan ortamlar a) sodyum hipoklorit (NaClO) (2.5 ppm), b) Huwasan® [570g<sup>l</sup><sup>-1</sup> hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) + 0,36g<sup>l</sup><sup>-1</sup> kolloit gümüş] (2.5 ppm), c) rifampicin (antibiyotik) (30 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) ve d) gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) (100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) maddelerinden birini içerecek şekilde hazırlanmıştır (Keskitalo, 1999; Cassells, 2001; Teixeira ve ark. 2006). Bu denemede son grubu herhangi bir sterilizant içermeyen e) kontrol MS ortamları oluşturmaktadır. Tüm ortamların pH'sı 0.1 N potasyum hidroksit ve sitrik asit kullanılarak 5.8 olarak ayarlanmıştır (Puchooa, 2004).

Kullanım kolaylığı sağlaması bakımından çalışmalarda 200 ml'lik cam kavanozlar tercih edilmiştir. Gelişmesi muhtemel enfeksiyon-

ların daha çabuk görülmesi için tüm ortamlar sıvı hazırlanmış ve dikilen sürgün uçlarının ortamlarla temasını optimum düzeyde tutmak için ortamlara Keskitalo (1999)'nun önerdiği şekilde pamuk destekler yerleştirilmiştir. Her cam kavanoza 30-35 ml besin ortamı konmuş ve kavanozlar hava almayacak şekilde kapatılarak, otoklavda 121°C'de 20 dakika bekletilmek suretiyle steril hale getirilmişlerdir. Sterilizasyon işleminden sonra ortamların tümü oda sıcaklığında ve karanlıkta muhafaza edilmişlerdir.

Her iki denemede de materyal olarak, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü bahçesinde, 2000 yılında kurulmuş olan koleksiyon parselindeki enginar klonları kullanılmıştır (İlbi ve ark. 2007). Bu amaç için, 7 Ağustos 2006'da uyandırılarak aktif büyümeye geçmesi sağlanan koleksiyon bitkilerinden, çalışma süresince Sakız tipini iyi gösteren sağlıklı dip sürgünleri alınmıştır.

Laboratuvara getirilen sürgünler önce 3-4 yapraklı ve toprak altı gövdesi 1cm kadar kalacak şekilde fazla yapraklarından ve köklerinden arındırılmışlardır. Ardından anti-bakteriyel sabunla ve bol suyla yıkanan sürgünler, sterilizasyon işlemine geçmeden önce 6-8 saat süre ile akmakta olan çeşme suyunda bekletilmişlerdir. Bundan sonra sürgünler 20 saniye süreyle %70'lik etil alkolde ıslatılmışlar ve ardından da bol steril saf su ile iyice (toplam 3 kez) durulanmışlardır (Ancora ve ark. 1981). Ancak bu aşamadan sonra Deneme 1 ve Deneme 2 için ayrı yollar izlenmiştir.

Dikim öncesi uygulanan farklı sterilizantların karşılaştırıldığı Deneme 1'de öncelikle sürgünlerin yarısı (toplam 165 sürgün) 10 dakika süre ile %6'lık Captan uygulaması (etkin madde: %50 Captan) görmüş (Schneider, 2005), diğer yarısı ise bu uygulamayı görmemiştir. Bu uygulamadan sonra Captan muamelesi gören ve görmeyen sürgünler, her biri %0.5 konsantrasyonlarında hazırlanmış; a) sodyum hipoklorit, b) Huwasan® veya c) hidrojen peroksit çözeltilerinde 10 dakika sürelerle sterilize edilmişlerdir (Cassells, 2001). Doğrudan besin ortamına katılan farklı sterilizasyon ajanlarının denendiği Deneme 2'de ise sürgünlerin tamamı (toplam 127 sürgün)

öncelikle 10 dakika süre ile %6'lık Captan uygulaması görmüşler (Moncousin, 1981; Schneider, 2005), ardından da, %0.5 konsantrasyonunda hazırlanmış sodyum hipoklorit çözeltisinde 10 dakika süreyle sterilize edilmişlerdir.

Sterilizasyon işleminden sonra hem Deneme 1 ve hem de Deneme 2 de aynı yol izlenmiştir. Sürgünler öncelikle üç kez steril saf su ile iyice durulanmış ve yaprakları meristem +1 yaprak kalacak şekilde kesilmiştir. Besin ortamına dikilen eksplantların, kavanozların streç film ile kapatılmasıyla, dış ortamla ilişkileri kesilmiştir. Her bir kavanozda sadece bir sürgün ucu yer almıştır.

Sürgün uçlarının dikim sırasında yapılan kesimlerden kaynaklanan kararmalarını engellemek amacıyla, tüm kültürler dikimden sonra 2 gün boyunca sürekli karanlıkta bekletilmişlerdir (Block ve Lankes, 1995). Daha sonra tüm kültürler, 8 saat karanlık ve 16 saat ışığın sağlandığı koşullara alınmış ve kültür süresi boyunca (2 hafta) burada bekletilmişlerdir (Peñalver ve ark. 1994; Cassells, 2001). Kültür odasında sıcaklık  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , ışık şiddeti ise 2300-2500 lüks olarak ayarlanmıştır (Rossi ve de Paoli, 1992).

Çalışmada yapılan uygulamaların etkinliğini belirlemek amacıyla 2 haftalık kültür süresi sonunda her bir kültürde gözlemsel olarak "enfeksiyon oranı" (%) belirlenmiştir (Akıncı, 1990). Ancak, çalışma sadece enfeksiyon sorununun çözümü ile sınırlandırılmamış, aynı zamanda bu uygulamaların kararmaya neden olup olmamaları da dikkate alınmıştır. Bu nedenle kültürlerde yine Akıncı (1990)'ya göre "kararma oranı" (%) belirlenmiştir. Son olarak da, hem enfeksiyon geliştirmeyen ve hem de kararmayan kültürlerin ortak bir ifadesi olan "sağlıklı gelişen bitki sayısı" belirlenmiştir (Akıncı, 1990).

Çalışmalarda tek bir bitkiciğin yer aldığı her bir kavanoz bir tekerrürün bir parçası olarak kabul edilmiş ve her tekerrür 8-10 kavanozdan oluşturulmuştur. Tekerrürlerde yapılan gözlemler oransal verilere dönüştürülmüş ve varyans analizinin varsaydığı eşit dağılım eğrisine daha iyi uyabilmeleri için bu verilerde

varyans analizi öncesi karekök transformasyonu yapılmıştır. İstatistiksel bakımdan önemli bulunan uygulamalarda gruplar arasındaki farklar "Duncan Testi" ile belirlenmiştir. Tüm istatistiksel analizler SPSS (13.0 versiyonu) kullanılarak yapılmıştır.

## ARAŞTIRMA BULGULARI

Laboratuvarda daha önce yapılan bir ön çalışmada, doğrudan aydınlık koşullarda kültüre alınan enginar sürgün uçlarının %68'i kararırken, kültürünün ilk iki gününü karanlık koşullarda geçiren sürgün uçlarının sadece %51'inin karardığı belirlenmiştir. Diğer bir ifadeyle, kültürlerinin ilk iki gününü karanlık koşullarda geçiren enginarların dokuları bu süreyi aydınlıkta geçirenlere göre %25 oranında daha az kararmaktadırlar (yayınlanmamış veriler). Bu ön bulgulardan dolayı çalışılan tüm sürgün uçları kültürün ilk iki gününü karanlık koşullarda geçirmişlerdir.

Dikim öncesi uygulanan farklı sterilizasyon ajanlarının etkinliğinin araştırıldığı Deneme 1'in sonuçları Çizelge 1'de yer almaktadır. Uygulanan sterilizantların neden olduğu etkiler göz ardı edildiğinde, deneme genelinde yer alan sürgün uçlarının %56'sında enfeksiyon geliştiği (165 sürgünden 92'sinde), %59'unun karardığı (97 sürgün) ve bunlara bağlı olarak da sürgün uçlarının ancak %34'ünün (56 sürgün) sağlıklı geliştiği söylenebilmektedir.

Ana sterilizasyona geçmeden önce sürgünlerin Captan fungusiti ile muamele edilmeleri ile enfeksiyona uğrayan sürgün uçlarının oranını düşürmek mümkün olmuştur. Uygulanan sterilizantların etkilerini dikkate almayacak olursak, kültür sırasında Captan'la muamele edilmeyen sürgün uçlarının %61'inde enfeksiyon gelişimi gözlenirken, Captan'la muamele edilen sürgünlerin yalnızca %52'sinde enfeksiyon gelişmiştir. Enfeksiyon oranındaki bu düşüş istatistiksel anlamda  $p\leq 0.01$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Captan uygulaması ile kararma oranı da düşmüştür ( $p\leq 0.05$ ). Bu her iki değişkene bağlı olarak "Sağlıklı Gelişen Bitki Oranı" da Captan uygulanmayan örneklerde %31'de kalırken, Captan uygulaması ile %37'ye çıkmıştır ( $p\leq 0.01$ ).

Çizelge 1. Dikim öncesi uygulanan Captan fungusiti ve bazı sterilizantların enginar sürgün uçlarında enfeksiyon gelişimi, kararma ve sağlıklı gelişen bitki oranı üzerine etkileri.

Fungisit	Sterilizant	Enfeksiyon gelişimi (%)	Kararma (%)	Sağlıklı gelişen bitki (%)
Captan (+)	Sodyum hipoklorit	53	43	40
	Huwasan®	53	57	39
	Hidrojen peroksit	50	66	33
	<b>Ortalama</b>	<b>52 b</b>	<b>55 b</b>	<b>37 a</b>
Captan (-)	Sodyum hipoklorit	59	63	32
	Huwasan®	62	65	32
	Hidrojen peroksit	62	62	28
	<b>Ortalama</b>	<b>61 a</b>	<b>63 a</b>	<b>31 b</b>
<b>Genel ortalama</b>	Sodyum hipoklorit	56 (öd)	53 b	36 a
	Huwasan®	58	61 a	36 a
	Hidrojen peroksit	56	64 a	31 b
	<b>Genel ortalama</b>	<b>56</b>	<b>59</b>	<b>34</b>

Sodyum hipoklorit, Huwasan® ve hidrojen peroksit uygulamaları tek başlarına veya Captan ile kombine edilerek uygulandıklarında (fungisit × sterilizant interaksiyonları) kültürlerde gelişen enfeksiyonları engellemek bakımından istatistiksel anlamda önemli bir fark yaratmamışlardır. Uygulanan sterilizantların tümü kültürlerdeki enfeksiyon oranını %56-58 seviyesine düşürmüşlerdir. Ancak dokular, uygulanan sterilizanta bağlı olarak farklı seviyelerde kararmışlar ve bu farklılık istatistiksel anlamda  $p \leq 0.05$  seviyesinde önemli bulunmuştur. Sodyum hipoklorit en az seviyede kararmaya neden olurken (%53), Huwasan® ve hidrojen peroksitin bu konudaki etkileri birbirlerine benzer olmuştur (sırasıyla %61 ve %64). Fungisit × sterilizant interaksiyonu ise yine önemsiz bulunmuştur.

Enfeksiyon oranı ve kararma ile ilgili bulgular kombine edildiklerinde, sodyum hipoklorit ve Huwasan® istatistiksel olarak hidrojen peroksite göre daha fazla sayıda sağlıklı bitkiciğin elde edilmesine olanak sağlamışlardır ( $p \leq 0.05$ ). "Sağlıklı Gelişen Bitki Oranı", sodyum hipoklorit ve Huwasan® uygulandığında %36 düzeyindeyken, hidrojen peroksit uygulamalarıyla %31'e gerilemiştir. Yine, sterilizantları Captan ile kombine etmek veya etmemek, bu etki bakımından farklı bir sterilizantın ön plana çıkmasını sağlamamıştır, diğer bir anlatımla interaksiyonlar önemli değildir.

Çalışmada tüm sterilizasyon süreleri 10 dakika ile sınırlandırılmıştır. Bu kararın alınmasında, laboratuvarında daha önce toplam 100 enginar sürgün ucu ile yapılan bir ön çalışma etkili olmuştur. Bu ön çalışmada, sürgünlere sterilizasyon amaçlı uygulanan sodyum hipokloritin 10 ve 15 dakikalık uygulama sürelerinin sağlıklı gelişen bitki sayısı bakımından bir fark yaratmadığı belirlenmiştir (sürgün uçlarının sırasıyla %38 ve %41'i sağlıklı gelişmiştir). Ancak sterilizasyon süresinin bu sürelerin dışında artması veya azalması sağlıklı gelişen bitki oranını düşürmüştür. Sterilizasyon süresinin düşmesi ile (5 dakikaya) sağlıklı gelişen bitki sayısı enfeksiyondan kaynaklanan kayıplar nedeniyle düşmektedir. Bu durumda %67 oranında enfeksiyon gelişimi görülmüştür. Sterilizasyon süresinin arttırılmasıyla ise (20 dakikaya çıkarılması ile) enfeksiyonlar azalmaktadır (%20'ler seviyesine düşmektedir) ancak bu sefer de kayıplar, kararmalar yüzünden olmaktadır (dokuların %60 kadarı kararmaktadır). Bu ön bulgulardan ötürü bu çalışmada tüm sürgünler 10 dakika süre ile sterilize edilmişlerdir.

Deneme 1'den elde edilen olumlu bulgular (önce Captan ardından sodyum hipoklorit uygulaması) kullanılarak bir diğer deneme kurulmuş ve burada, dikim öncesi uygulanan sterilizasyon işlemi haricinde, enfeksiyon gelişimini engelleyen bazı maddeler doğrudan sürgün uçlarının dikildiği besin ortamlarına ilave

edilmiştir. Bu denemenin sonuçları Çizelge 2’de yer almaktadır. Kültür ortamına ilave edilen enfeksiyon gelişimini engelleyen maddelerin tek tek etkilerini göz ardı ettiğimizde, deneme genelinde sürgün uçlarının %41’inde (toplam 127 sürgün ucundan 52’sinde) enfeksiyon gelişmiş ve %59’u (75 sürgün ucu) kararmıştır. Sürgün uçlarının %36’sı (toplam 46 sürgün ucu) ise sağlıklı gelişmiştir.

Besin ortamına doğrudan katılan enfeksiyon gelişimini engelleyici maddelerin enfeksiyon gelişimi, kararma ve sağlıklı gelişen bitki sayıları üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. İncelenen her üç bağımlı değişkende de uygulamalara bağlı olarak istatistiksel anlamda  $p < 0.01$  önem düzeyinde farklılıklar meydana gelmiştir. Bunun da ötesinde, değişkenlerde oldukça geniş bir yüzde aralığı dikkati çekmektedir. Diğer bir ifadeyle uygulamalar enfeksiyon gelişimi, kararma ve sağlıklı gelişen bitki oranları üzerinde büyük ve farklı etkiler yapmışlardır.

En çok enfeksiyon gelişimi, denemede kontrol olarak yer alan ve herhangi bir enfeksiyon gelişimini engelleyici madde ilave edilmemiş olan MS besin ortamında olmuştur (bu ortamlarda bulunan sürgün uçlarının %74’ünde enfeksiyon gelişmiştir). Bununla birlikte enfeksiyon gelişimini engelleyici madde içermeyen bu ortam aynı zamanda en az kararmaların görüldüğü ortam olmuştur (%42). Ancak buna rağmen enfeksiyonların fazlalığından dolayı sağlıklı gelişen bitki sayısı en düşük ortamdır (%21).

Besin ortamında sodyum hipoklorit ve Huwasan® ilave edildiğinde enfeksiyon oranları düşmüş (sırasıyla %33 ve %22), ancak kararmalar çok yüksek düzeyde seyrettiği için (sırasıyla %78 ve %83) sağlıklı gelişen bitki oranları yine de düşük kalmıştır (sırasıyla %22 ve %23). MS besin ortamlarına sodyum hipoklorit ve Huwasan® katılmasıyla enfeksiyon gelişimini kontrole göre önemli ölçüde azaltmak mümkündür. Ancak kararmalardan meydana gelen kayıplar da dikkate alındığında, sodyum hipoklorit ve Huwasan®’lı ortamlarda sağlıklı gelişen bitki oranları temel MS içeren kontrol besin ortamlarındaki kadar

düşük kalmaktadır (Sodyum hipoklorit, Huwasan® ve temel MS ortamlarında sağlıklı gelişen bitki oranları aynı istatistik gruptadır). Diğer bir ifadeyle, temel MS ortamlarındaki kayıplar büyük ölçüde enfeksiyon gelişiminden dolayı meydana gelirken, sodyum hipoklorit ve Huwasan®’lı ortamlardaki kayıplar, enfeksiyon gelişimlerinden çok kararmalara atfedilebilmektedir.

Çizelge 2. Kültür ortamına doğrudan ilave edilen enfeksiyon gelişimini engelleyici bazı maddelerin enginar sürgün uçlarında enfeksiyon gelişimi, kararma ve sağlıklı gelişen bitki oranı üzerine etkileri.

Ortam	Enfeksiyon gelişimi (%)	Kararma (%)	Sağlıklı gelişen bitki (%)
Rifampicin	43 b	50 b	51 b
Sodyum hipoklorit	33 c	78 a	22 c
Huwasan®	22 d	83 a	23 c
Gümüş nitrat	33 c	44 c	61 a
MS <sub>(kontrol)</sub>	74 a	42 c	21 c
<b>Genel ortalama</b>	<b>41</b>	<b>59</b>	<b>36</b>

Çalışmada gümüş nitrat katılan besin ortamları, sadece %33 enfeksiyon gelişimi ile denemenin en az enfeksiyon gelişimi gözlenen ortamlarından olmuştur (bu konuda Huwasan®’lı besin ortamları kadar olmasa da sodyum hipokloritli ortamlar kadar başarılıdır). Ancak gümüş nitratlı ortamlar sodyum hipokloritli ve Huwasan®’lı besin ortamlarının aksine kararma sorunlarının da en düşük seviyede kaldığı ortamlardır (gümüş nitratlı ortamlar, temel MS kontrol besin ortamı ile bu bakımdan aynı istatistiksel grupta yer almışlardır). Gümüş nitratlı besin ortamları, %61 sağlıklı gelişen bitki sayısı ile denemede en fazla sayıda sağlıklı bitkicığın elde edilmesine olanak veren ortamlar olarak belirlenmiştir.

Gümüş nitrat katılan ortamlar kadar olmasa da, çalışmada sağlıklı bitkiciklerin elde edilmesi bakımından başarılı olan diğer bir ortam ise rifampicin’li ortamlardır. Bu antibiyotigin bulunduğu besin ortamlarında, sodyum hipoklorit, Huwasan® veya temel MS içeren besin ortamlarının aksine, daha fazla sayıda sağlıklı bitkicikler elde edilmiştir.

Sodyum hipoklorit ve Huwasan®'lı ortamlardaki kayıplar kararmalara atfedilebilirken, rifampicin ve gümüş nitrattlı ortamlarda meydana gelen kayıplar, hem enfeksiyonlara hem de kararmalara atfedilebilmektedir.

## **TARTIŞMA**

Çalışma kapsamında yürütülen Deneme 1 ve Deneme 2'nin birbiri ile kombine edilmeyip ayrı ayrı yürütülmesinin iki ana nedeni vardır. Öncelikle, Deneme 1 ve Deneme 2'de uygulanan faktörlerin bütün kombinasyonlarda denenmesinin bir gerekliliğinin olmadığına kanaat getirilmiştir. Çünkü sterilizasyon aşamasında yapılan işlemler orada bitmekte ve etkileri daha sonraki aşamada kültür ortamındaki enfeksiyonları engellemeye kadar gitmemektedir. Sterilize edildikten sonra sürgünler steril saf su ile iyice durulandıktan sonra, sterilizasyon işleminin etkilerinin ileriki aşamalara yansımaları beklemek gerçekçi değildir (Ancora ve ark. 1981). İlk denemenin amacı enfeksiyon gelişimine neden olan canlıların yok edilmesi iken, Deneme 2'nin konusu, -varsa- kalan patojenlere müdahale etmek ve bunların kültür ortamında kendilerini göstermelerini engellemektir. Bu bakımdan, Deneme 1'den elde edilen olumlu bulguların (%6'lık Captan uygulamasının ardından %0.5'lik sodyum hipoklorit ile sterilizasyon) Deneme 2'de kullanılması ile enfeksiyon gelişiminin daha da aşağı çekilebileceği düşünülmüştür. İki ayrı deneme kurulmasının diğer bir nedeni ise, her iki deneme kombine edildiklerinde; kültür, yer, zaman, iş gücü ve masraflar bakımından meydana gelen büyük artıştır.

Doku kültürü yöntemi kültür bitkilerine ait ticari çeşitlerin çok sayıda ve birörnek çoğaltımı için büyük avantajlar sağlamaktadır (Moncousin, 1981). Bununla birlikte bu tekniğin uygulama aşamasında enginar da dahil olmak üzere bazı bitkilerde özellikle enfeksiyon ve kararma problemleri büyük sorun yaratmaktadır. Birçok araştırmacı besin ortamında enfeksiyon gelişimlerine neden olan sayısız mikroorganizmadan söz etmektedir (Moncousin, 1981; Ancora, 1986; Rossi ve de Paoli, 1992) ve bunların büyük çoğunluğunun ekim sırasında yapılan hatalarla değil,

başlangıç materyali ile besin ortamına taşındığı bilinmektedir (Cassells, 2001). Peñalver ve ark. (1994) besin ortamında sorun yaratan bakteri türlerinin büyük çoğunluğunun kültürün daha başlangıç aşamalarında kendilerini belli eden gram-negatif bakteriler olduğunu bildirmektedirler. Buna karşın aseptik kültürlerde çok daha seyrek gözlenen gram-pozitif bakteriler, genellikle kültürün ilerleyen safhalarında, alt kültürle birlikte görülmektedir (Leifert ve Cassells, 2001). Bu bilgi aynı zamanda, bu çalışmada kültür süresinin iki hafta ile sınırlandırılmasının da nedenidir.

Bu çalışmada, dokulardaki kararma olayını göz ardı ettiğimizde, Deneme 1 genelinde %44 oranında temiz bitkiciklerin elde edilmesi Rossi ve de Paoli (1992)'nin yine enginardaki bulgularına çok benzemektedir. Ancak bu araştırmacılar, bu oranda enfeksiyonsuz enginar bitkiciği elde edebilmek için sürgünleri, bize göre daha yüksek konsantrasyonda (%2-3) ve daha uzun süre (20 dakika) sodyum hipoklorit çözeltisi ile muamele etmişlerdir. Ayrıca yine bu denemede sodyum hipoklorit, Huwasan® ve hidrojen peroksitin toprakta büyümüş enginar sürgünlerinin *in vitro* kültüründe enfeksiyonları engellemek bakımından yakın etkilerde bulunmuş olmaları, enginar dışında bazı türlerde çalışan araştırmacıları desteklemektedir (Block ve Lankes, 1995; Cassells, 2001; Puchooa, 2004; Teixeira ve ark. 2006). Diğer bazı çalışmalarda da olduğu gibi, bu çalışmada da aşırı derecede çevre kirliliğine neden olması bakımından civa kloride sterilizant olarak yer verilmemiştir (Xu ve ark. 2004).

Başlangıç materyalinin geçmişinde yetiştiği yerde toprakla temas etmiş olması steril besin ortamında enfeksiyon çıkma riskini daha da arttırmaktadır (Iapichino, 1996). Bu bakımdan Josekutty ve ark. (2003) muz bitkisi üzerine gerçekleştirdikleri çalışmalarında toprak kaynaklı materyalin henüz daha bahçedeyken düzenli pestisit ile muamele edilmesinin yararından söz etmektedir. Araştırmacılar bu şekilde *in vitro* kültür ortamında %90 seviyesinde seyreden enfeksiyon oranını %50'lere kadar düşürebildiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada benzer bir etkiye bahçede değil ama sterilizasyon işlemi sırasında ek bir

aşama olarak Captan fungisiti uygulanması ile ulaşılmıştır (Schneider, 2005). Bu çalışma sonuçlarına göre, tarlada herhangi bir fungusit uygulaması yapmadan bütün işlemleri doku kültürüne aktarmanın mümkün olacağı gösterilmiştir.

Steril besin ortamında karşılaşılan enfeksiyonların çoğu endofitik bakterilerden yada yüzey dezenfeksiyonuna dayanıklı olan mikroorganizmalarla bulaşık olan başlangıç materyallerinden kaynaklanmaktadır (Peñalver ve ark. 1994; Cassells, 2001). Her iki sorunla da, ne kadar şiddetli yapılırsa yapılsın sürgünlerin sterilizasyonu aşamasında baş etmek mümkün değildir ve bir kısım patojenler mutlaka kültür ortamına geçmektedirler. Bu bilgilerden hareketle, başlangıç aşamasında sterilizasyon işleminin daha şiddetli yapılmasının da bir anlamı yoktur. Çünkü bu işlemi daha şiddetli hale getirmek, dokularda daha büyük bir hasar yaratmaktan öteye gitmeyecektir. Bu da dokuların, enfeksiyondan olmasa da kararmalardan dolayı canlılığını yitirmesi anlamına gelmektedir. Bu durum ayrıca, bu konuda mevcut tekniklerle daha büyük bir ilerlemenin sağlanamayacağına da işaret etmektedir.

Edinilen bu bilgiler ışığında, ortamda bulunsalar dahi enfeksiyonların gelişimlerini engelleyici bazı maddelerin doğrudan kültür ortamına katıldıkları Deneme 2'nin kurulmasına karar verilmiştir. Antibiyotik ve sterilizant gibi maddelerin doğrudan ortama ilave edilerek kullanımlarının enfeksiyonlara karşı başvurulmuş etkin bir yöntem olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Keskitalo, 1999; Cassells, 2001). Ortama ilave edilen bu maddeler, enfeksiyon kaynağını yok etmektense, bunu baskılayarak kültür bitkilerinin sağlıklı bir şekilde büyümesine olanak sağlamaktadırlar. Ancak antibiyotik ve gümüş nitrat gibi, etkinlikleri belli bir süre ile sınırlı olan maddelerin bu sürenin aşılması ile birlikte ortamlarda enfeksiyon gelişimine rastlanıldığı da bilinmektedir (Keskitalo, 1999; Teixeira ve ark. 2006).

Deneme 2'de en çok enfeksiyon gelişiminin, denemenin kontrolü olan temel MS besin

ortamında gerçekleşmesi (bu ortamlardaki sürgün uçlarının %74'ünde enfeksiyon gelişmiştir), ortama enfeksiyon gelişimini engelleyen bir maddenin ilave edilmesinin gerekliliğinin de bir göstergesi olmuştur. Ayrıca, en az kararmaların temel MS besin ortamında görülmesi (%42), ortama ilave edilen her bir maddenin sürgün uçlarında yeni bir stres kaynağı olduğunun da bir göstergesidir. *In vitro*'da meydana gelen kararmalar, enginar da dahil olmak üzere ananas, muz gibi fenolik bileşikler bakımından zengin birçok türlerde dokuların canlılığını yitirmesine neden olmaktadır (Ancora ve ark. 1981; Block ve Lankes, 1995; Josekutty ve ark. 2003; Puchooa, 2004; Teixeira ve ark. 2006).

Bu çalışmanın sonuçlarına göre kararmalar dikkate alındığında, enginar sterilizasyonunda kullanılması daha anlamlı iki sterilizantın sodyum hipoklorit ve kısmen de Huwasan® olduğu sonucuna varılmıştır. Her iki sterilizant uygulanmasıyla elde edilen sağlıklı bitki sayıları bakımından bir fark görülmemiştir (%36). Bununla birlikte, mevcut çalışmada Deneme 2'ye geçildiğinde kullanılmaya devam edilen sterilizasyon ajanı sodyum hipoklorit olmuştur. Bunun nedeni bu bileşiğin piyasada kolaylıkla bulunabilmesidir. Ayrıca, sterilizasyon için özel olarak geliştirilmiş bir ticari bir preparat olan Huwasan®'ın temin edilmesi de masraflıdır.

Araştırmacılar özellikle antibiyotik kullanımının fitotoksik etkilerinden ve dokularda kararmayı arttırdığından söz etmektedirler (Ancora ve ark. 1981; Moncousin, 1981; Block ve Lankes, 1995). Ancak bizim çalışmamızda, dokularda önemli ölçüde kararmaya neden olmakla beraber (rifampicin içeren ortamdaki sürgün uçlarının %50'si kararmıştır), en çok strese ve kararmaya neden olan ortamlar antibiyotikli ortamlar değildir. Deneme 2'nin sonuçları incelendiğinde, sodyum hipoklorit ve Huwasan®'lı ortamlarda dokuların antibiyotikli ortama göre çok daha fazla karardıkları görülmüştür (bu ortamlarda sürgün uçlarında sırasıyla %78 ve %83 kararma olmuştur). Denemede en az kararmanın ve en çok sayıda sağlıklı bitki gelişiminin gümüş nitrat kullanımı ile elde edilmiş olması (kararma oranı



%42, sağlıklı gelişen bitki %61), ananas, elma gibi farklı türlerden elde ettikleri bulgularla uyum içerisinde (Keskitalo, 1999; Block ve Lankes, 1995; Cassells, 2001; Josekutty ve ark. 2003; Teixeira ve ark. 2006).

Ticari Huwasan® sterilizantı, gümüş nitrat ve hidrojen peroksit içermekte olan bir bileşime sahiptir (Cassells, 2001; Teixeira ve ark. 2006). Bulgulardan anlaşılacağı gibi gümüş nitratın ortama ilave edilerek kullanıldığı Deneme 2'de herhangi bir fitotoksit etkiye rastlanmamıştır. Bu durum, çalışmada Huwasan® kullanımında artan kararma oranının büyük ölçüde Huwasan®'ın içerdiği hidrojen peroksit bileşimine bağlı olduğunu düşündürmüştür. Sonuçta kararma olayı fenolik maddelerin oksitlenmesine bağlı olarak gelişen bir olaydır ve oksijen içeriğine sahip olan sterilizant maddelerin bu oksitlenme olayını hızlandırarak dokulardaki kararmayı arttırdığı düşünülmektedir. Puchooa (2004)'da hidrojen peroksitin sodyum hipoklorit'e göre dokularda daha büyük bir hasara neden olduğunu ve buna bağlı olarak kararmaların arttığını belirtmektedir. Ayrıca hidrojen peroksitin dokulardan yıkanması da kolay değildir (Puchooa, 2004).

## **SONUÇ**

Bu çalışmaya göre, 10 dakika süreyle %6'lık Captan ve ardından yine 10 dakika süreyle %0.5'lik sodyum hipoklorit uygulaması ile sterilize edilen enginar sürgün uçlarının 100 mg l<sup>-1</sup> gümüş nitrat içeren ortama dikilmeleri sağlıklı gelişen bitkiciklerin elde edilmesi bakımından en iyi sonucu vermektedir. Bu çalışmanın bulgularına göre, bu yol izlenerek steril koşullarda kültüre alınan enginar sürgün uçlarının %61'i sağlıklı bitkicikler oluşturmuştur.

## **KAYNAKLAR**

- Akinci, İ.E., 1990. Enginarın (*Cynara scolymus* L.) *in vitro* vegetatif çoğaltılmasında besi ortamına ilave edilen NAA ve Kinetin'in sürgün verimi ve kalitesine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ç.Ü. Zir. Fak.
- Ancora, G. M. Belli-Donni and L. Couzzo, 1981. Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropropagation, *Scientia Horticulture* 14: 207-213.
- Ancora, G., 1986. Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 2: Crops 1 Berlin, p. 471-484.
- Block, R. and C. Lankes, 1995. Reasons for tissue browning of explants of the apple rootstock M9 during *in vitro* establishment. *Gartenbauwissenschaft* 60: 276-279.

Bu başarı, incelenen literatürde rastlanan en yüksek rakamdır. Ancak buna rağmen henüz mükemmel bir prosedürden söz etmek mümkün değildir. Üstelik birçok araştırmacının, kültürlerde görülen enfeksiyonların endofitik yada yüzey sterilizasyonuna dayanıklı bakterilerden kaynaklandığı konusundaki uyarıları dikkate alınacak olursa, mevcut yöntemlerle enfeksiyon sorununun bitkilere zarar vermeden daha da düşürülmesine olanak yoktur. Bu nedenle gelecekte daha inovatif yaklaşımların denenmesi yerinde olacaktır.

Ayrıca çalışmada, ortama katılan farklı maddelerin tek başlarına etkilerine bakılmış ancak bunların bir kombinasyonunun denenmesi yoluna gidilmemiştir. Huwasan®'ın hidrojen peroksit (570g l<sup>-1</sup>) ve kolloit gümüş (0,36g l<sup>-1</sup>) içeren ticari değerinde bir karışım olduğu göz önüne alınırsa, böyle bir yaklaşımın yeni bulguların elde edilmesine olanak verebileceği göz ardı edilmemelidir. Ayrıca polivinyl pyrolidone (PVP) ve aktif karbon (AC) gibi bazı fenol tutucuların da polifenol bileşiklerini tutarak ve sentezlenmelerini yavaşlatarak doku kararmalarının önüne geçtiği bilinmektedir. Ancak bu bileşikler, ortama katılan enfeksiyon gelişimini engelleyici maddelerin dokularda neden oldukları stresi maskeleyenleri söz konusu olduğundan mevcut bu çalışmada kullanılmamıştır. Bununla beraber, besin ortamına bu bileşiklerin de katılmasıyla, kararma sorunundan kaynaklanan kayıpların daha da düşürülmesinin mümkün olacağı tahmin edilmektedir.

## **Teşekkür**

Araştırmacılar, Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Türküsay'a çalışma boyunca yaptıkları katkılarından dolayı teşekkür etmeyi bir borç bilirdik.

- Cassells, A.C., 2001. Contamination and its impact in tissue culture. *Acta Hort.* 560, pp.117-121.
- Eser, B.H. İlbi ve A. Uğur, 2006. Enginar Yetiştiriciliği, Hasat Yayıncılık, Ekim 2006, s. 7.
- FAOSTAT, 2007. Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). Statistical Database- Agriculture. <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>, Erişim: Temmuz 2008.
- İlbi, H. E. Düzyaman ve B. Eser, 2007. Assessment of genetic variation among local artichoke varieties by RAPDs and morphological characters. *Acta Horticulturae*, 729:105-109.
- Iapichino, G., 1996. Micropropagation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) from underground dormant buds (Ovoli). World Congress on *In Vitro* Biology, San Francisco, CA , ETATS-UNIS (22 Haziran 1996), vol. 32, n° 4, pp. 305-315.
- Josekutty, P.C., S.S. Cornelius and T.N. Kilafwasru, 2003. Micropropagation of four banana cultivars in micronesia. *Micronesica Supplement* 7: 77-81, 2003.
- Keskitalo, M.K., 1999. Exploring Biodiversity to Enhance Bioactivity in The Genus *Tanacetum* Through Protoplast Fusion. University of Helsinki, Finland. ISBN 951-45-8965-3. pp. 34-40.
- Leifert, C. and A.C. Cassells, 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:133-138.
- Moncousin, C., 1981. Rapid vegetative propagation of *Cynara scolymus* L. II. Improvement of the various techniques. *Hort. Abstr.* 51: 6926.
- Murashige, T. and T. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15, 473-497.
- Peñalver, R., N. Durán-Vila and M.M. López, 1994. Characterization and pathogenity of bacteria from shoot tips of the globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Annals of Applied Biology* 125: 501-513.
- Puchooa, D., 2004. *In vitro* regeneration of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) *African Journal of Biotechnology*, vol. 3, No 11:576-584.
- Reustle, G. and I. Natter, 1994. Effect of polyvinylpyrrolidone and activated charcoal on formation of microcallus from grapevine protoplasts (*Vitis* sp.). *Vitis* 33, 117-121.
- Rossi, V. and G. de Paoli, 1992. Micropropagation of Artichoke (*Cynara scolymus* L.). In: Bajaj, Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry: High-Tech and Micropropagation II*, vol 19. Springer-Verlag, Berlin, pp.118-134.
- Schneider, F., 2005. Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa sp.* L.) and globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) Ph. D.Thesis, Technische Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt Department für Pflanzen-wissenschaften Lehrstuhl für Zierpflanzenbau.
- Teixeira, S.L., J.M. Ribeiro and M.T. Teixeira, 2006. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86:375-378.
- Xu, T., L. Zhang X. Sun and K. Tang, 2004. Efficient *in vitro* plant regeneration of *Pinellia Ternata* (Thunb) Breit. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 2005, 47/2:27-32.