



Araştırma/Research

Anadolu Tarım Bilim. Derg./Anadolu J Agr Sci, 31 (2016)

ISSN: 1308-8750 (Print) 1308-8769 (Online)

doi: 10.7161/omuanajas.260981



Farklı sitokinin ve şeker türlerinin alev ağacı bitkisinin
in vitro çoğaltımına olan etkileri

Hülya Akdemir^a, Tuğçe Akbulak^a, Veysel Süzerer^{ab}, Doğa Kayıhan^a,
İbrahim Koç^a, Yelda Özden Çiftçi^{ac*}

^aGebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kocaeli, ^bBingöl Üniversitesi, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Bingöl, ^cGebze Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Kocaeli, Türkiye

*Sorumlu yazar/corresponding author: ozden@gtu.edu.tr

Geliş/Received: 01/04/2016

Kabul/Accepted: 08/06/2016

ÖZET

Dünyada süs bitkilerine olan talep gün geçtikçe artmaktadır. Ancak, ticari bir süs bitkisi olan alev ağacının vejetatif yollar ile çoğaltılmasında kullanılan çeliklerde köklenme sorunlarına rastlanılmaktadır. Vejetatif üretimde karşılaşılan bu zorlukların aşılmasında birçok türde bitki doku kültürü tekniklerinden yararlanılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın amacı ekonomik değere sahip olan alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı için uygun bitki büyüme düzenleyicisi içeriğinin yarı-katı kültür sisteminde belirlenmesidir. Çalışmada farklı sitokinin tipleri [BA (6-benziladenin), KIN (Kinetin); TDZ (Tidiazuron); 2-iP (2 –izopentiladenin)] ve miktarları (0, 1, 2, 4 mg l⁻¹) ile birlikte çeşitli karbon kaynakları (sukroz ve glikoz) ve miktarları (0, 15, 30 g l⁻¹) yarı-katı besi ortamında denenmiştir. Alev ağacına ait gövde uçlarından en yüksek çoğaltım (%100) ve eksplant başına en fazla gövde oluşumu (3.7), 2 mg l⁻¹ BA ve 30 g l⁻¹ sukroz ile desteklenen yarı-katı MS besi ortamında elde edilmiştir. Oluşan gövdelerde en yüksek köklenme (%40) 4 mg l⁻¹ IBA ile desteklenen yarı-katı besi ortamında 1 hafta kültürlenme ve sonrasında oksin içermeyen besi ortamına aktarıma ile sağlanmıştır. Köklenen gövdeler daha sonra *in vivo* koşullara başarıyla iklimlerilmiştirlerdir.

Anahtar Sözcükler:

6-benziladenin

2-izopentiladenin

Kinetin

Photinia fraseri

Tidiazuron

Influences of different types of cytokinin and sugar on *in vitro* proliferation of fraser photinia

ABSTRACT

There is an increasing demand to ornamental plants in the World. However, problems faced with the rooting of cuttings in the propagation of ornamental fraser photinia plants. Plant tissue culture techniques are used in several plant species to overcome such difficulties of vegetative production. Therefore, the aim of this study concerns the identification of optimum plant growth regulator content in semi-solid culture for the micropropagation of economically important fraser photinia. Thus, different cytokinin types [BA (6-benzyladenine), KIN (Kinetin); TDZ (Thidiazuron); 2-iP (2 –isopentyl adenine)] and amounts (0, 1, 2, 4 mg l⁻¹) together with various carbon sources (sucrose and glucose) and amounts (0, 15, 30 g l⁻¹) were assessed in semi-solid medium. The highest proliferation rate (100%) and the maximum number of shoots proliferated per explant (3.7) were obtained in shoot tips of fraser photinia on semi-solid MS medium supplemented with 2 mg l⁻¹ BA and 30 g l⁻¹ sucrose. The highest rooting (40%) was achieved in proliferated shoots on semi-solid medium supplemented with 4 mg l⁻¹ IBA for 1 week followed by transfer of the microshoots to auxin-free medium. Rooted shoots were then successfully acclimatized to *in vivo* conditions.

Keywords:

6-benzyladenine

2-isopentyladenin

Kinetin

Photinia fraseri

Thidiazuron

© OMU ANAJAS 2016

1. Giriş

Alev ağacı (*Photinia* × *fraseri* Dress.) her dem yeşil olan ve 3-5 metreye kadar uzayabilen odunsu bir süs bitkisidir. *Rosaceae* ailesinin bir üyesi olan bu tür, Japonya kökenli *Photinia glabra* ve Çin kökenli *Photinia serrulata* arasında yapılan bir hibrit bitkidir (Larraburu et al., 2007). *P. fraseri* etkileyici yaprak

özellikleri, renkleri, hızlı büyüme özelliği ile fidecilikte çok tercih edilen bir süs bitkisidir (Kane, 1987). Uzun, düz ve parlak olan yaprakları soğuk koşullara dirençlidir ve sahip olduğu yoğun kırmızı rengi nedeniyle en uçtaki yapraklar oldukça dikkat çekicidir. *Photinia*, park ve bahçelerde, yol kenarlarında çit ya da süs bitkisi olarak kullanılır. Hava kirliliğine, zayıf drenaja, kurak topraklara sahip şehir alanlarında bile yetişebilen bir

bitkidir. Etkileyici yaprakları ve olumsuz çevre şartlarına olan direnci ile türün ekonomik ve çevresel değeri her geçen gün artmaktadır.

Alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı için günümüze kadar yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır (örneğin, Kane et al., 1987; Leifert et al., 1992; Akdemir et al., 2010). Türün *in vivo* köklenmesinde karşılaşılan sorunlar nedeniyle son zamanlarda daha çok *in vitro* çoğaltılan gövdelerin yüksek derişimde oksin (IBA; 3-indol bütrik asit) kullanılarak, uyarılması ve besi ortamına floroglukinol (PG) gibi fenolik bileşenler (Ramirez-Malagón et al., 1997) veya bitkilerin köklenmesini teşvik eden ve bitkinin rizosferinde kolonize olan rizobakterilerin eklenmesi (Larraburu et al., 2007) ile köklenmenin iyileştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bitki büyümesini uyarıcı Rhizobakteriler (PGPR) olarak bilinen bu mikroorganizmalar başlıca *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* türlerini içermektedir. Doku kültüründe PGPR kullanımının mikroçoğaltım ile elde edilen gövdelerin köklendirilmesine olan etkisinin alev ağacı bitkisinde denendiği çalışmada (Larraburu et al., 2007), gövde uçlarının köklenmesi kültür besi ortamına hem oksin hem de *Azospirillum brasilense* ve *Azotobacter chroococcum* inoküle edilerek, arttırılmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bakteriyel inokülasyon alev ağacı gövdelerinin daha erken köklenmesini sağlamıştır. Özellikle *A. brasilense* ile beraber yapılan 49.2 µM IBA kullanımı kökün taze ve kuru ağırlığını (sırasıyla %105 ve %137), kök yüzey alanını (%65) ve gövdenin taze ve kuru ağırlığını (sırasıyla %32 ve %62) belirgin olarak arttırdığı rapor edilmiştir. Köklenmeye ek olarak, gövdelerin çoğaltımı için MS besi ortamının farklı derişimlerde (0.0; 2.2; 4.4; 8.0; 44.4 µM) BA büyüme düzenleyicisi eklenmiş ve en yüksek çoğaltım oranı (4.3) 4.4 µM BA içeren besi ortamında elde edilmiştir. Ramirez-Malagon et al. (1997) alev ağacı bitkisinden gövdelerin uyarılması için 4.4 µM BA kullanımının en iyi sonucu verdiğini rapor etmesine karşın, Kane et al. (1987) ve Leifert et al. (1992) sırasıyla 8.0 ve 2.2 µM derişimin kullanılmasını önermiştir.

Hızlı bir şekilde klonal çoğaltıma olanak tanıyan ve bir bitki doku kültürü yöntemi olan mikroçoğaltım tekniğinin alev ağacı bitkisi için geliştirilmesinin bu türün önemli bir genetik değışikliğe uğramadan hızlı çoğaltımını sağlama potansiyeli bulunmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı önemli bir ekonomik değere sahip olan alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı için uygun besi ortamı ve bitki büyüme düzenleyicisi içeriğinin yarı-katı kültür sisteminde belirlenmesidir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitki materyali

Çalışmada kullanılan *Photinia×fraseri* Dress. bitkisine ait 1 yıl boyunca *in vitro* koşullarda 1 mg l⁻¹ 6-benziladenin (BA) ile desteklenen MS (Murashige ve

Skoog, 1962) besi ortamında çoğaltılan yaklaşık 20 mm'lik sürgünler, Vivai Battistini fidanlığında (Cesena, İtalya) alınmış ve GTÜ, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda düzenli zaman aralıklarında *in vitro* koşullarda alt kültürlenerek, yaşatılmıştır. Çalışma kapsamında eksplant olarak; *in vitro* kültürde geliştirilen bitkilerden aseptik şartlarda sadece tepe sürgünlerinden gövde uçları çıkartılarak kullanılmıştır.

2.2. Farklı sitokinlerin *in vitro* çoğaltıma olan etkilerinin belirlenmesi

MS besi ortamına farklı sitokin büyüme düzenleyicileri [BA, kinetin (KIN), tidiazuron (TDZ) ve 2-izopentiladenin (2-iP)] çeşitli miktarlarda (1, 2, 4 mg l⁻¹) eklenerek, bu sitokinlerin alev ağacı gövde uçlarının proliferasyonuna olan etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak, eksplanttan en yüksek çoğaltımı sağlayan sitokin türü ve miktarı optimize edilmiştir. MS besi ortamı içerik olarak aynı şekilde hazırlanmıştır, ancak sitokinlerden TDZ ve 2-iP hormonlarının yüksek sıcaklıklarda yapısı bozulduğu için bu bitki büyüme düzenleyicileri besi ortamı otoklav edildikten sonra filtre ile steril edilerek, eklenmiştir. Diğer iki sitokin BA ve KIN'ler ise hazırlanan besi ortamına otoklavdan önce ilave edilmiştir. Farklı sitokinlere sahip besi ortamı gövde uçları aktarıldıktan sonra eksplantlar çoğaltım için bitki büyüme odasında 4 hafta bekletilmişlerdir.

2.3. Farklı karbon kaynaklarının *in vitro* çoğaltıma olan etkilerinin belirlenmesi

In vitro koşullarda geliştirilen bitki kültürlerinin heterotrofik olması nedeniyle alev ağacına ait gövde uçlarının çoğaltımı için çeşitli karbon kaynakları (glukoz ve sükröz) farklı miktarlarda (0, 15, 30 mg l⁻¹) optimize edilen besi ortamına aktarılmış ve ilgili şekerlerin çoğaltımına olan etkileri belirlenmiştir. Yine eksplant olarak alınan gövde uçları 4 hafta çoğaltımı için bitki büyüme odasına aktarılmıştır.

2.4. Gövdelerinde *novo* köklendirilmeleri ve *in vivo* koşullara iklimlendirilmeleri

In vitro çoğaltılan gövdeler uygun besi ortamında düzenli aralıklarla (her 4 haftada bir) altkültürlendikten sonra en az 10 mm olan gövdeler *in vitro* köklendirilmeleri için farklı oksin çeşitleri [indol bütrik asit (IBA) ve indol asetik asit (IAA)] farklı miktarlarda (0, 1, 2, 5 mg l⁻¹) denenmiştir. Köklendirme işlemi için farklı miktarlarda IBA ve IAA içeren besi ortamları steril şartlarda hazırlanarak, bebek maması kaplarına konulmuş ve her bir kaba 15 adet aynı uzunlukta bitkicikler aktarılmıştır. Mikrogövdeler 1 hafta boyunca muamele edildikten sonra oksin içermeyen MS besi ortamına aktarılmışlardır. Besi ortamında bulunan şekerden arındırmak için bitkicik kökleri distile su ile

köklere zarar vermeden yıkanmıştır. Daha sonra suların süzülmesi için kökler kurutma kağıdına aktarılmış ve bir süre bekletilmiştir. Kurutma kağıdında suyu süzülen bitkicikler önceden otoklavda steril edilen torflarla birlikte küçük saksılara aktarılmıştır ve üzeri plastik örtü ile kapatılarak yüksek nem altında gelişmeleri izlenmiştir. Daha sonra nem içeriği aşamalı olarak plastik örtü üzerinde her gün 2 delik açılması yoluyla düşürülmüş ve en sonunda örtü tamamen kaldırılarak, *in vivo* koşullara alıştırılmaları sağlanmıştır.

2.5. Verilerin toplanması ve istatistiksel analizi

Her eksplantten oluşan gövde çoğaltımı (%), eksplant başına oluşan gövde sayısı ve ortalama gövde boyu (mm), besi ortamında eksplantların $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 16 saat aydınlık (3000 lüks) ve 8 saat karanlık koşullar altında 4 hafta kültürleme sonrası kaydedilmiştir. Çoğaltılan gövdeler köklenme besi ortamına aktarılıp, köklenen bitkilere ait veriler (köklenme yüzdesi, gövde başına oluşan kök sayısı ve kök uzunluğu) besi ortamına aktarımdan en az 4 hafta sonra kaydedilmiştir. Her bir deneme en az 25 eksplant ile yapılmış ve 2 kez tekrarlanmıştır. Bunun yanı sıra, gövde oluşturma kapasitesi (G.O.K. indeksi) Lambardi et al. (1993) rapor ettikleri formüle göre hesaplanmıştır:

G.O.K indeksi= Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı \times rejenere olan eksplant yüzdesi / 100

Mikroçoğaltım sonrasında elde edilen veriler değerlendirilirken, oransal veriler arasındaki farklılıklar

X^2 testi ile, üç veya daha fazla yüzdeler arasındaki farklılıklar ise Post hoc çoklu karşılaştırma testine göre yapılmıştır (Marascuilo ve McSweeney, 1977). Farklı verilerin karşılaştırılması için, varyans analizleri (ANOVA) takiben ortalamaları karşılaştırmak için $P \leq 0.05$ olacak şekilde anlamlı en az farklılık (LSD) testi kullanılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Sitokininlerin *in vitro* çoğaltımına olan etkilerinin belirlenmesi

Alev ağacına ait gövde uçlarının mikroçoğaltımı için MS besi ortamına 4 farklı sitokinin türü (BA, KIN, TDZ ve 2-iP) 3 farklı miktarda (0, 1, 2, 4 mg l^{-1}) eklenmiştir. Sitokinin içermeyen MS besi ortamında ve 4 mg l^{-1} BA hariç denenen 4 farklı sitokinin türünde de %100 çoğaltım elde edilmiştir (Çizelge 1). Eksplant başına oluşan gövde sayısında ise besi ortamına eklenen sitokinin türü ve miktarının önemli etkileri olduğu görülmüştür. Zira besi ortamına sitokinin eklenmediğinde çoklu gövde oluşumu çok azdır (1.20). Eksplant başına en fazla gövde oluşumu 2 mg l^{-1} BA içeren MS besi ortamında elde edilmiştir. BA miktarının 4 mg l^{-1} 'e çıkartılması ise hem çoğaltım yüzdesini hem de eksplant başına oluşan gövde sayısını azaltmıştır. BA'dan sonra en fazla çoklu gövde oluşumu besi ortamına TDZ eklenmesi ile sağlanmıştır. 1 mg l^{-1} TDZ

Çizelge 1. Alev ağacı gövde uçlarının farklı miktarlarda sitokinin içeren MS besi ortamında çoğaltım sonuçları^a

| Sitokinin (mg l^{-1}) | Çoğaltım ^b (%) | Gövde/eksplant ^b (Ort \pm S.H.) ^d | G.O.K. İndeksi ^c | Gövde boyu ^b (Ort \pm S.H.) ^d (mm) |
|-------------------------------------|------------------------------|--|-----------------------------|---|
| BA^e | | | | |
| 0 | 100a | 1.20 \pm 0.05h | 1.20 | 2.80 \pm 0.07h |
| 1 | 100a | 2.58 \pm 0.11d | 2.58 | 4.89 \pm 0.14d |
| 2 | 100a | 3.66 \pm 0.08a | 3.66 | 3.17 \pm 0.14g |
| 4 | 98b | 3.60 \pm 0.08a | 3.58 | 3.04 \pm 0.07g |
| KIN^e | | | | |
| 1 | 100a | 2.10 \pm 0.05e | 2.10 | 3.77 \pm 0.01f |
| 2 | 100a | 2.02 \pm 0.04e | 2.02 | 3.10 \pm 0.07g |
| 4 | 100a | 2.42 \pm 0.07d | 2.42 | 4.71 \pm 0.12d |
| TDZ^e | | | | |
| 1 | 100a | 2.51 \pm 0.05d | 2.51 | 4.35 \pm 0.10e |
| 2 | 100a | 2.96 \pm 0.04c | 2.96 | 4.53 \pm 0.07d |
| 4 | 100a | 3.32 \pm 0.04b | 3.32 | 4.43 \pm 0.06de |
| 2-iP^e | | | | |
| 1 | 100a | 1.42 \pm 0.03f | 1.42 | 6.59 \pm 0.10c |
| 2 | 100a | 1.32 \pm 0.03g | 1.32 | 6.87 \pm 0.10b |
| 4 | 100a | 1.36 \pm 0.03fg | 1.36 | 7.69 \pm 0.10a |

^a Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 25 eksplant kullanılarak yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^b Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

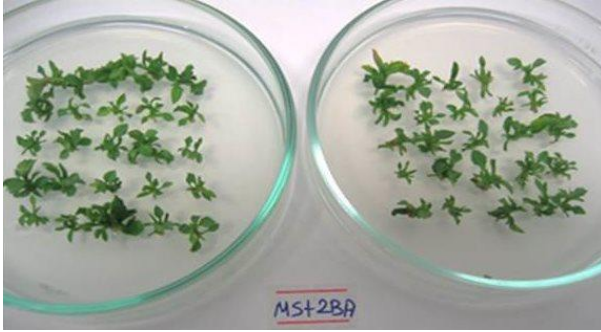
^cG.O.K= Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı \times Rejenere olan eksplant yüzdesi / 100 formülü (Lambardi et al.,1993) kullanılarak, hesaplanmıştır.

^dSH: Standart hata.

^e BA: 6-benziladenin, KIN: kinetin, TDZ: tidiazuron, 2-iP:2-izopentil adenin.

içeren besi ortamında eksplant başına 2.5 gövde elde edilirken, TDZ miktarının artması ile oluşan gövde sayısında iyileşmeler görülmüş ve 4 mg l^{-1} TDZ içeren besi ortamında 3.3 gövde elde edilmiştir. KIN içeren besi ortamında BA ve TDZ ile desteklenen besi ortamlarına görece daha düşük gövde/eksplant oranı görülmüştür ancak yine de denenen en yüksek KIN miktarında (4 mg l^{-1}) eksplant başına 2.4 gövde oluşmuştur. Denenen sitokininler içerisinde eksplant başına en az gövde besi ortamına 2-iP eklenmesi ile elde edilmiştir. 2-iP'nin eklendiği besi ortamında gövde/eksplant oranı en fazla 1.4'tür.

Besi ortamına BA'nın eklenmesinin çoklu gövde oluşumuna olan olumlu etkisi nedeniyle en fazla gövde oluşturma kapasitesi (3.7) gövde/eksplant oranının en yüksek olduğu 2 mg l^{-1} BA içeren besi ortamında elde edilmiştir (Şekil 1). 4 mg l^{-1} TDZ içeren besi ortamında sağlanan gövde oluşturma kapasitesi de BA dışında denenen diğer sitokininlere görece daha fazladır (3.3). Besi ortamına 2-iP'nin eklenmesi, en düşük gövde/eksplant oranını verdiği için bu bitki büyüme düzenleyicisinin alev ağacına ait gövde uçlarında gövde oluşturma kapasitesi de düşüktür (1.3-1.4). Bununla birlikte, daha uzun gövdeler ($>6.5 \text{ mm}$) 2-iP içeren besi ortamında elde edilmiştir. En uzun gövde (7.7 mm) 4 mg l^{-1} 2-iP ile desteklenen besi ortamında belirlenirken, en kısa gövde (3 mm) 4 mg l^{-1} BA içeren besi ortamında kaydedilmiştir. Bu sonuç, besi ortamına 4 mg l^{-1} BA eklenmesinin gövde büyümesinden çok gövde çoğaltımını uyardığını göstermektedir (Gitonga et al., 2008).



Şekil 1. 2 mg l^{-1} BA içeren yarı-katı MS besi ortamında gövde uçlarından elde edilen çoğaltım

Ticari olarak kullanılan çoğu süs bitkisi oksin ve sitokinin ile desteklenen doku kültürü besi ortamlarında çoğaltılmaktadır (Rout ve Jain, 2004). Bununla birlikte, kültür besi ortamına sadece sitokinin eklenmesinin de birçok bitkide gövde oluşumunu uyardığı rapor edilmiştir (Rout et al., 2006). Bu nedenle, çalışma kapsamında 4 farklı sitokinin alev ağacının mikroçoğaltımı için denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çoğaltımı en iyi sağlayan bitki büyüme düzenleyicisi bir adenin türevi olan BA'dır. BA ile mikroçoğaltım *Ficus benjamina* (Rzepka-Plevne ve Kurek, 2001), *Rosa hybrida* (Hasegawa, 1980; Wulster

ve Sacalis, 1980), *Rosa indica* (Avramis et al., 1982) gibi farklı süs bitkilerinde ve alev ağacı gibi odunsu bitkiler olan *Bupleurum kaoi* (Chen et al., 2006) ve *Celastrus paniculatus* Willd.'da (Rao ve Purohit, 2006) rapor edilmiştir.

BA'ya ek olarak, alev ağacında çoğaltımı iyi sağlayan diğer sitokininin bir türevi olan TDZ'dir. Bazı bitkilerde (örneğin; *Humulus lupulus*, Roy et al., 2001; *Andrographis neesiana*, Karuppusamy ve Kalimuthu, 2010). TDZ'nin aksiler ve adventitatif gövde oluşumunun uyarılmasında adenin türevi bileşiklerden daha etkin olduğu rapor edilse de (Gaspar et al., 1996), TDZ'nin biyokimyasal aksiyonu tamamen anlaşılammıştır. Buna ek olarak, TDZ içeren ortamda oluşan gövdelerin yeterince uzayamadıkları da önceki çalışmalarda (Gaspar et al., 1996) rapor edilmiştir. Kısa gövdelerin oluşması alev ağacına ait gövde uçlarından gelişen gövdelerde gözlenmemiştir. Her ne kadar, en uzun gövdeler 2-iP ile desteklenen besi ortamında elde edilse de TDZ ile oluşan gövdelerin boyu BA ve KIN ile oluşan gövdelerin boyları ile karşılaştırılabilir seviyededir. Besi ortamına 2-iP eklenmesinin ise gövde uzamasına olan olumlu etkisi alev ağacı bitkisinin gövdelerinde olduğu gibi *Elliottia racemosa* (Woo ve Wetzstein, 2008) bitkisinde de gözlenmiştir.

3.2. Farklı karbon kaynaklarının in vitro çoğaltıma olan etkilerinin belirlenmesi

Alev ağacına ait gövde uçları karbon kaynağı içermeyen besi ortamında %60 canlılık ve çoğaltım göstermiştir (Çizelge 2). Canlılık ve çoğaltım, besi ortamına karbon kaynağının eklenmesi ile %100'e ulaşmıştır ve bu sonuç besi ortamına eklenen karbon kaynağının tipi ve miktarından bağımsızdır. Denenen karbon kaynaklarının gövde uçlarını üzerindeki etkisi belirgin olarak eksplant başına oluşan gövde sayısında görülmektedir (Şekil 2). Eksplant başına en yüksek gövde sayısı (3.7) besi ortamına 30 g l^{-1} sükröz eklenmesi ile elde edilmiştir. Genel olarak, besi ortamına sükröz eklenmesi denenen diğer karbon kaynağı olan glikoza göre daha fazla gövde/eksplant oranını sağlamıştır. Yine de 15 g l^{-1} glikoz ile desteklenen besi ortamında eksplant başına 3 gövde oluşmuştur. Besi ortamında glikoz miktarının 30 g l^{-1} 'e çıkartılması ise eksplant başına oluşan gövde sayısını azaltmıştır. İki karbon kaynağının besi ortamına eşit miktarda eklenmesi ise, besi ortamının sadece sükröz ile desteklenmesine göre daha düşük gövde/eksplant oranını sağlamıştır.

G.O.K indeksleri karşılaştırıldığında en yüksek değer (3.7) yine 30 g l^{-1} sükröz ile desteklenen besi ortamında elde edilmiştir. En düşük G.O.K indeksi (0.6) ise herhangi bir karbon kaynağı eklenmeyen besi ortamında görülmüştür. Ancak bu besi ortamında görece uzun gövdeler (7 mm) elde edilmiştir. Genel olarak,

Çizelge 2. Alev ağacı gövde uçlarının farklı miktarlarda şeker ve 2 mg l⁻¹ BA içeren MS besi ortamında gösterdikleri çoğaltım sonuçları^a

| Şeker türü (g l ⁻¹) | Canlılık ^{bc} (%) | Çoğaltım ^b (%) | Gövde/eksplant ^b (Ort±S.H.) ^e | G.O.K. İndeksi ^d | Gövde boyu ^b (Ort±S.H.) ^e (mm) |
|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|---|-----------------------------|--|
| Sukroz | | | | | |
| 0 | 60.0b | 60.0b | 1.04±0.03e | 0.62 | 7.04±0.30a |
| 15 | 100.0a | 100.0a | 3.34±0.08b | 3.34 | 3.93±0.11c |
| 30 | 100.0a | 100.0a | 3.66±0.07a | 3.66 | 3.17±0.11d |
| Glikoz | | | | | |
| 0 | 60.0b | 60.0b | 1.04±0.03e | 0.62 | 7.04±0.30a |
| 15 | 100.0a | 100.0a | 3.06±0.07c | 3.06 | 4.85±0.10b |
| 30 | 100.0a | 100.0a | 2.64±0.07d | 2.64 | 4.65±0.08b |
| Sukroz + Glikoz | | | | | |
| 15 + 15 | 100.0a | 98.0a | 2.90±0.06c | 2.84 | 4.87±0.10b |

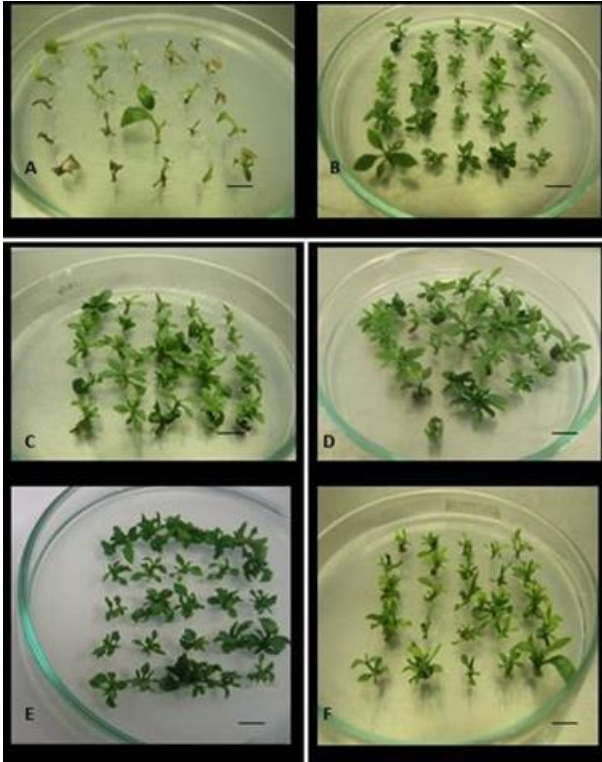
^a Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 25 eksplant kullanılarak yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^b Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark (P≤0.05) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^c 4 haftalık kültür sonucunda kahverengi eksplantler ölü, yeşil eksplantler canlı sayılmış ve yeşil eksplantlerden oluşan gövdeler ise çoğaltım olarak sayılmıştır.

^d G.O.K= Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı x Rejenere olan eksplant yüzdesi / 100 formülü (Lambardi et al., 1993) kullanılarak hesaplanmıştır.

^e Ortalama±standart hata



Şekil 2: Farklı şeker oranlarında çoğaltım. A) MS + 2 mg l⁻¹ BA-0 şeker, B) MS + 2 mg l⁻¹ BA-15 g l⁻¹ sukroz, C) MS + 2 mg l⁻¹ BA-15 g l⁻¹ glikoz, D) MS + 2 mg l⁻¹ BA-15 g l⁻¹ glikoz + 15g l⁻¹ sukroz, E) MS + 2 mg l⁻¹ BA-30 g l⁻¹ sukroz, F) MS + 2 mg l⁻¹ BA-30 g l⁻¹ glikoz.

>4.5 mm ve >3 mm) gövdeler oluşmuştur. Gövde uzunluğu haricinde sukroz ile desteklenen besi

ortamlarında daha fazla gövde/eksplant oranı elde glikoz ile desteklenen besi ortamlarında sukrozun eklendiği besi ortamlarına göre daha uzun (sırasıyla >4.5 mm ve >3 mm) gövdeler oluşmuştur. Gövde uzunluğu haricinde sukroz ile desteklenen besi ortamlarında daha fazla gövde/eksplant oranı elde edildiğinden sonraki denemelerde kullanılmak üzere besi ortamı 30 g l⁻¹ sukroz ile desteklemiştir.

In vitro koşullarda gelişen bitki dokularında fotosentetik aktivite düşük ışık yoğunluğu, sınırlı gaz alışverişi ve yüksek bağıl nem nedenleriyle azaldığından besi ortamına ekzojen olarak karbon kaynağının eklenmesi gerekmektedir (Kozai, 1991). Farklı bitki türlerinin *in vitro* morfogenezini besi ortamına eklenen karbon kaynağının etkilediğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Biahoua ve Bonneau, 1999; Fuentes et al., 2000). Karbonhidratlar enerji kaynağı olarak kullanılmalarının yanı sıra hücre duvarının özelliğini (esnekliği, içeriği vb.) belirleyen ozmotik potansiyeli değiştirme yoluyla da morfogenezini etkilemektedir (Pritchard et al., 1991). Besin gereksinimi bitki türleri arasında oldukça farklılık göstermektedir. Dahası, bitki dokularının karbonhidratları kullanma kapasitesi türler ve eksplantlar arasında değişmekte ve türlerin karbonhidrat tercihi özgün karbon kaynağının moleküllerini absorbe ve metabolize etme kapasitelerine göre değişmektedir (Mezzetti et al., 1991). Bu nedenle, karbonhidrat gereksinimi her tür/genotip ve eksplant için mikroçoğaltım protokollerinin geliştirilmesinde optimize edilmelidir.

Çalışma kapsamında sukroz ve glikoz gibi farklı karbon kaynaklarının alev ağacına ait gövde uçlarının *in vitro* koşullarda çoğaltımına olan etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak da

Çizelge 3. Alev ağacına ait mikrogövdelerin farklı miktarlarda oksin içeren besi ortamında 1 hafta kültürlenme ve sonrasında oksin içermeyen MS besi ortamına aktarılmaları ile gösterdikleri köklenme sonuçları^a

| Oksin türü (mg l ⁻¹) | Köklenme (%) ^b | Kök/Gövde ^b (Ort±SH) ^c | Kök boyu(cm) ^b (Ort±SH) ^c |
|-------------------------------------|------------------------------|---|--|
| IBA | | | |
| 1 | 6.0 b | 1.00±0.00 c | 2.60±1.00 a |
| 2 | 3.0 c | 1.00±0.00 c | 1.00±0.00 b |
| 4 | 40.0 a | 1.58±0.15 b | 3.29±0.41 a |
| IAA | | | |
| 1 | 0.0 d | 0.00±0.00 d | 0.00±0.00 d |
| 2 | 3.3 c | 1.00±0.00 c | 1.00±0.00 b |
| 4 | 3.3 c | 3.00±0.00 a | 0.66±0.00 c |

^a Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 15 eksplant kullanılarak yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^b Her bir sütdünde yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark (P≤0.05) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^c SH: Standart hata.

ekzojen olarak eklenen bir karbon kaynağı olmadığında, hem çoğaltım yüzdesinin hem de eksplant başına oluşan gövde sayısının diğer denemelere göre daha düşük olduğunu göstermiştir. Dışarıdan eklenen bir karbon kaynağının olmadığı durumda endojen olarak bulunan karbonhidratlar bazı gövdelerde gelişimi sağlamakta, ancak endojen karbon kaynağı tamamen tükendiğinde gövde gelişimi muhtemelen temel metabolik yollar için yeterli enerji/karbon olmadığı için durmaktadır.

Denenen karbon kaynakları arasında 30 g l⁻¹ sükrözün daha fazla sayıda eksplant başına gövde oluşturması bakımından en etkin olduğu görülmüştür. Yine besi ortamına bu miktarda eklenen sükrözün en etkin çoğaltım sağladığı daha önce pek çok çalışmada (Hung et al., 2006; Ghimire et al., 2010; Koç, 2011) rapor edilmiştir. Hagen et al. (1991) ve Mezzetti et al. (1991) tarafından yapılan çalışmalardan otoklavlama sırasında sükrözün %5'nin glikoz ve fruktoza hidroliz edildiği bilinmektedir. Yine Ślesak et al. (2004) tarafından yapılan çalışmadan da besi ortamında kademeli olarak sükröz miktarı azalırken, glikoz ve fruktoz içeriğinin arttığı görülmektedir. Sükröz hücre duvarına bağlı invertaz enzimi tarafından glikoz ve fruktoza hidroliz edilmekte ve hücre içine alınmaktadır. Çalışma kapsamında yapılan denemelerde besi ortamı sadece glikoz ile desteklendiğinde de çoklu gövde oluşumu gerçekleşmiştir. Ancak, bu oluşumun sükröz ile desteklenen besi ortamında daha fazla olması alev ağacına ait gövde uçlarının çoğaltımında sükrözün parçalanması ile oluşan glikozun yanı sıra yine adı geçen disakkaritin parçalanma ürünü olan fruktoza da gereksinim duyduğunu göstermektedir.

3.3. *In vitro* köklenme ve *in vivo* koşullara iklimlendirme

Gövdeler 1 hafta farklı miktarlarda (1, 2 ve 4 mg l⁻¹) IBA ve IAA içeren yarı-katı MS besi ortamında kültürlenmiş ve sonrasında oksin içermeyen MS besi ortamına aktarılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 4 mg l⁻¹ IBA içeren besi ortamında 1 hafta kültürlenme



Şekil 3. Köklenme ve *in vivo* koşullara iklimlendirme aşamaları. A) Köklendirme besi ortamındaki köklenmiş bitkiciklerin besi ortamından çıkarılması, B) Su ile köklenmiş bitkiciklerin köklerinin yıkanması ve kurutma kağıdında sularının süzülmesi. C) Bitkiciklerin steril torf içeren viollere dikilmesi ve sulanması, D) Üzerinin plastik bir örtü ile örtülmesi, E) Her hafta plastik örtüde iki delik açılarak nem oranlarının düşürülmesi, F) Adapte olan bitkilerin saksılara aktarımı

sonrasında, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamına aktarılan gövdelerde tüm köklenme denemeleri içinde en fazla köklenme (%40, Çizelge 3, Şekil 3) elde edilmiştir.

Bu besi ortamında gövde başına 1.6 kök oluşmuştur. Her ne kadar kök/gövde oranı 4 mg l⁻¹ IAA içeren ortamında görece yüksekse de (3.00), bu besi ortamında

köklenme oldukça düşüktür (%3.3). Köklenme denemeleri arasında en uzun kök boyu (3.3 cm) yine 1 hafta 4 mg l⁻¹ IBA ile desteklenmiş MS besisi ortamında elde edilmiştir. Köklenen bitkilerin hepsi başarıyla sera koşullarına iklimlendirilmiştir (Şekil 3).

IBA ve IAA'nın besisi ortamına denature olmaya eğilimli olduğu ve bitki dokuları tarafından hızla metabolize edildiği bilinmektedir (Gaspar et al., 1996). Hızlı metabolize edilme nedeniyle kısa süreli ama görece yüksek miktarda IBA içeren besisi ortamında en fazla köklenme elde edilmiş olabilir. Kısa süreli düşük miktarda IBA veya fazla miktarda IAA ile besisi ortamının desteklenmesi ise görece daha düşük köklenmeye neden olmuştur.

4. Sonuç

Denenen 4 farklı sitokinin içinde alev ağacının *in vitro* koşullarda çoğaltımını en iyi sağlayan bitki büyüme düzenleyicisi bir adenin türevidir olan BA'dır. Yüksek çoğaltım ve çoklu gövde oluşumu için alev ağacı gövde uçları bir karbon kaynağına gereksinim duymaktadır. Denenen karbon kaynakları arasında 30 g l⁻¹ sükrozun daha fazla sayıda eksplant başına gövde oluşturma bakımından en etkin olduğu görülmüştür. *In vitro* çoğaltılan gövdelerde en fazla köklenme (%40), 4 mg l⁻¹ IBA ile desteklenen yarı-katı MS besisi ortamında 1 hafta kültürlenme sonrasında oksin içermeyen besisi ortamına aktarım ile sağlanmıştır. Köklenen gövdeler, başarılı bir şekilde *in vivo* koşullara aktarılmış ve iklimlendirilmişlerdir. Çalışma kapsamında geliştirilen *in vitro* çoğaltım yöntemi, bu bitki türünde gelecekte yapılması planlanan gen aktarım teknikleri ile transgenik bitki üretimi ve bu bitkilerin hızlı çoğaltımını sağlama potansiyeli bakımından da önemlidir.

Kaynaklar

Akdemir, H., Kaya, E., Ozden, Y., 2010. *In vitro* proliferation and minimum growth storage of fraser photinia: Influences of different medium, sugar combinations and culture vessels. *Sci. Hortic.*, 126: 268-275.

Avramis, T., Hugard, J., Jonard, R., 1982. La multiplication *in vitro* du Rosier portegreffé *Rosa indica major*. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 294: 63-68.

Biahoua, A., Bonneau, L., 1999. Control of *in vitro* somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. *Plant Cell Rep.*, 19: 185-190.

Chen, U., Hsia, C., Yeh, M., Agrawai, D., Tsay, H., 2006. *In vitro* micropropagation and ex vitro acclimation of bupleurum kaoi- an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 42: 128-133.

Fuentes, S.R.L., Calheiros, M.B.P., Manetti-Filho, J., Vieira, L.G.E., 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 60: 5-13.

Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M., Thorpe, T.A., 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 32: 272-289.

Ghimire, B.K., Seong, E.S., Goh, E.J., Kim, N.Y., Kang, W.H., Kim, E.H., Yu, C.Y., Chung, I.M., 2010. High-frequency direct shoot regeneration from *Drymaria cordata* Willd. leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 100: 209-217.

Gitonga, L., Kahangi, E., Gichuki, S., Ngamau, K., Muigai, A., Njeru, E., Njogu, N., Wepukhulu, S., 2000). Factors influencing *in vitro* shoot regeneration of *Macadamia integrifolia*. *Afr. J. Biotech.*, 7 (22): 4202-4207.

Hagen, S.R., Muneta, P., Augustin, J., Letoumeau, D., 1991. Stability and utilization of picloram, vitamins and sucrose in a tissue culture medium. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 25: 45-48.

Hasegawa, P.M., 1980. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose tips. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 105(2): 216-220.

Hung, C.D., Johnson, K., Torpy, F., 2006. Liquid culture for efficient micropropagation *Wasabia japonica* (Miq.) Matsumura. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 42: 548-552.

Kane, M.E., Sheehan, T.J., Philman, N.L. 1987. A micropropagation protocol using fraser Photinia for mutation induction and new cultivar selection. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 100: 334-337.

Karuppusamy, S., Kalimuthu, K., 2010. Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis neesiana*: a valuable endemic medicinal plant. *Adv. in Biol. Res.*, 4(4): 211-216.

Koç, İ., 2011. Sakız ağacının (*Pistacia lentiscus* L.) *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı ve saklanması. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kocaeli.

Lambardi, M., Sharma, K.K., Thorpe, T.A., 1993. Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 29: 189-199.

Larraburu, E.E., Carletti, S.M., Rodríguez Cáceres, E.A., Llorente, B.E., 2007. Micropropagation of Photinia employing rhizobacteria to promote root development. *Plant Cell Rep.*, 26: 711-717.

Leifert, C., Pryce, S., Lumsden, P.J., Waites, W.M., 1992. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 30: 171-179.

Marascuilo, L.A., McSweeney, M., 1977. Post-Hoc Multiple Comparisons in sample preparations for test of homogeneity. In: McSweeney, M., Marascuilo, L.A. (Eds.) *Non-Parametric and Distribution Free Methods the Social Science*. Books/Cole Publication, Belmont CA, pp. 141-147.

Mezzetti, B., Coute, L.S., Rosati, P., 1991. *Actinidia deliciosa in vitro* II. Growth and exogenous carbohydrate utilization by explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 26: 153-160.

Murashige, T., Skoog, M., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.

Pritchard, J., Wyn-Jones, R.G., Tomos, A.D., 1991. Turgor, growth and rheological gradients in wheat roots following osmotic stress. *J. Exp. Bot.*, 42: 1043-1049.

Ramirez-Malagón, R., Borodanenko, A., Barrera-Guerra, J.L., Ochoa-Alejo, N., 1997. Micropropagation for fraser photinia (*Photinia fraseri*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 48: 219-222

Rao, M.S., Purohit, S.D., 2006. *In vitro* shoot bud differentiation and plantlet regeneration in *Celastrus paniculatus* Willd. *Biol. Plantarum*, 50: 501-506.

Rout, G.R., Jain, S.M. 2004. Micropropagation of ornamental

- plants-cut flowers. Prop. Orn. Plants, 4(2): 3-28.
- Rout, G.R., Mohapatra, A., Jain, S.M. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotech. Adv., 24: 531-560.
- Roy, A.T., Leggett, G., Koutoulis, A., 2001. Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). *In Vitro* Cell. Dev. Biol-Plant, 37: 79-83.
- Rzepka-Plevnes, D., Kurek, J., 2001. The influence of media composition on the proliferation and morphology of *Ficus benjamina* plantlets. Acta Hortic., 560: 473-476.
- Slesak, H., Skoczowski, A., Przywara, L., 2004. Exogenous carbohydrate utilisation by explants of *Brassica napus* cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 79: 45-51.
- Woo, S.M., Wetzstein, H.Y., 2008. An efficient tissue culture regeneration system for Georgia Plume, *Elliottia racemosa*, a threatened Georgia endemic. Hort. Sci., 43(2): 447-453
- Wulster, G., Sacalis, J., 1980. Effects of auxins and cytokinins on ethylene evolution and growth of rose callus tissue in sealed vessels. Hortic. Sci., 15: 736-737.