

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Lavandula angustifolia MILLER SUBSP. *angustifolia* MILLER VE *L. stoechas* L.
SUBSP. *L. stoechas* BİTKİLERİNDE DOKU KÜLTÜRÜ VE GEN AKTARIM
ÇALIŞMALARININ OPTİMİZASYONU

Sam MOKHTARZADEH

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2011

Her hakkı saklıdır

ÖZET
Doktora Tezi

Lavandula angustifolia MILLER SUBSP. *angustifolia* MILLER VE *L. stoechas* L. SUBSP. *L. stoechas* BİTKİLERİNDE DOKU KÜLTÜRÜ VE GEN AKTARIM ÇALIŞMALARININ OPTİMİZASYONU

Sam MOKHTARZADEH

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Lamiaceae familyasının önemli bir tıbbi ve aromatik cinsi olan, Lavanta (*Lavandula* L.), farmokoloji ve parfümeri sanayisinde önemli rol oynamakta olup, uçucu yağ üretiminde ve süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren MS besin ortamı kullanılarak, *L. angustifolia* için kotiledon boğum ve meristematik ucu eksplantı ve *L. stoechas* için kotiledon boğum, meristematik ucu, yukardan 1., 2. ve 3. koltuk altı meristem ve epikotil koltuk altı meristem eksplantlarında yüksek oranda sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. *L. angustifolia* bitkisinde eksplant başına ortalama en fazla 8.07 adet sürgün, kotiledon boğum eksplantından ve 2.00 mg/l BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir. *L. stoechas* bitkisinde ise eksplant başına ortalama en fazla 5.60 adet sürgün, kotiledon boğum eksplantından ve 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında görülmüştür. Elde edilen *L. angustifolia* sürgünleri 1.25 mg/l IBA ve *L. stoechas* sürgünleri ise 1.00 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmiş olup, torfta adaptasyon sağladıktan sonra tarlaya şaşırtılmıştır. Hem *L. angustifolia* hem de *L. stoechas* bitkileri için yapılan gen aktarımı çalışmalarda *Agrobacterium tumefaciens*'nin GV2260::p35 gus int ve LBA 4404::pRGGbar hatları kullanılmış olup, mikroçoğaltım için *L. angustifolia*'da meristematik ucu ve *L. stoechas*'da kotiledon boğum eksplantları kullanarak, sürgün elde edilmiştir. Ayrıca, *L. angustifolia* sürgünleri 1.25 mg/l IBA, 50 mg/l kanamisin ve 500 mg/l Augmentin içeren MS ortamı ve *L. stoechas* sürgünleri ise 1.00 mg/l IBA, 50 mg/l kanamisin ve 500 mg/l Augmentin içeren MS ortamında köklendirilmiş olup, torfta adaptasyon sağladıktan sonra tarlaya şaşırtılmıştır. Daha sonra, transgenik aday bitkilerden yaprak örnekleri alınarak GUS pozitif sonuç elde edilmiştir.

Aralık 2011, 114 sayfa

Anahtar Kelimeler: *L. angustifolia*, *L. stoechas*, doku kültürü, gen aktarım, *Agrobacterium tumefaciens*, adaptasyon.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

OPTIMISATION OF TISSUE CULTURE AND GENETIC TRANSFORMATION IN
Lavandula angustifolia MILLER SUBSP. *angustifolia* MILLER AND *L. stoechas* L.
SUBSP. *L. stoechas*

Sam MOKHTARZADEH

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Genus *Lavandula* L. belongs to family Lamiaceae and is an important medicinal and aromatic plant. It has its uses in pharmacology and perfume industry. It is also used for obtaining essential oil and is cultivated as ornamental plant. This study reports effects of MS medium containing various concentrations of BAP-NAA on regeneration from cotyledon node and meristematic shoot tip explants of *L. angustifolia* and cotyledon node, shoot meristem, 1st, 2nd and 3rd node from upper side and epicotyl nodes of *L. stoechas*. Maximum number of 8.07 shoots per explant was recorded on cotyledon node explant of *L. angustifolia* on MS medium containing 2 mg/l BAP. Whereas, maximum number of 5.60 shoots per explant was recorded on cotyledon node of *L. stoechas* on MS medium containing 0.25 mg/l BAP. Well developed shoots of *L. angustifolia* and *L. stoechas* were rooted on MS medium containing 1.25 and 1.00 mg/l IBA respectively and acclimatized in peat before transfer to the fields. For genetically transformed shoots, *Agrobacterium tumefaciens* strains GV2260 p35 gus int and LBA 4404 pRGGbar were used in the genetic transformation of *L. angustifolia* and *L. stoechas* were rooted on MS medium containing 1.25 mg/l IBA, 50 mg/l kanamycin and 500 mg/l Augmentin and 1.00 mg/l IBA, 50 mg/l kanamycin and 500 mg/l Augmentin in MS medium respectively and acclimatized in peat before transfer to the fields. Thereafter, the leaf samples were taken from the putative transgenic plants and the GUS analysis showed positive results.

December 2011, 114 pages

Key Words: *L. angustifolia*, *L. stoechas*, tissue culture, genetic transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, acclimatization

TEŞEKKÜR

Lavandula angustifolia MILLER SUBSP. *angustifolia* MILLER ve *L. stoechas* L. SUBSP. *L. stoechas* bitkilerinde doku kültürü ve gen aktarım çalışmalarının optimizasyonu adlı araştırmayı doktora tezi olarak veren, tezin her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek, engin fikirleriyle gelişmeye katkıda bulunan ve tez yazımında bile yardımcı olan, danışman hocam sayın Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'a (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi) saygılarımı sunarım. Çalışmalarında beni yönlendiren, tez izleme komitesindeki değerli hocalarım, Prof. Dr. Neşet ARSLAN (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi) ve Prof. Dr. Orhan ARSLAN'a (Gazi Üniversitesi, Eğitim Fakültesi), desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Bilal GÜRBÜZ (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi) ve Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi), ayrıca, bölüm başkanı, sevgili hocam Prof. Dr. Nilgün BAYRAKTAR'a (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi), tezin tarla aşamasında destek veren tarla personeli, özellikle sayın Arslan ÖKSEL'e ve doğrudan veya dolaylı katkıda bulunan tüm arkadaşlarıma özellikle sevgili Solmaz EINI ve Mohsen MIRZAPOUR'a teşekkür ederim. Ayrıca, hayatımın bu aşamasına kadar birçok fedakarlıklar göstererek, manevi ve maddi destekleriyle, hep yanımda olan değerli anne ve babama ve biricik kardeşim, Sanaz'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Sam MOKHTARZADEH

Ankara, Aralık 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
2.1 Doku Kültürü Çalışmaları.....	9
2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile Bitkilere Gen Aktarımı Çalışmaları.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1 Bitki Materyali	20
3.2 Besin Ortamı ve Kültür Koşulları.....	20
3.3 Tohum Canlılık Testi	21
3.4 Tohumların <i>In vitro</i> Koşullarda Sterilizasyonu.....	21
3.5 Eksplant Seçimi	22
3.6 Sürgünlerin Köklendirilmesi.....	24
3.7 Elde Edilen Köklenmiş <i>L. angustifolia</i> ve <i>L. stoechas</i> Bitkilerin Dış Şartlara Alıştırılması.....	24
3.7.1 Daimi daldırma sistemi.....	24
3.7.2 Killi toprak ve hayvan gübre karışımı.....	24
3.7.3 Kum	25
3.7.4 Perlit	25
3.7.5 Kil ve torf karışımı.....	25
3.7.6 Torf	25
3.8 Meteorolojik Gözlemler.....	26
3.9 Bakteri Materyali.....	27
3.10 Bakteri Kültürlerinin Saflaştırılması ve Büyütülmesi.....	28

3.11	Antibiyotikler.....	28
3.12	Bakteri Kùltürlerinin Kısa ve Uzun Süreli Korunması	29
3.13	Gen Aktarılmış Bitkilerin Belirlenmesi.....	30
3.14	PCR	30
3.15	Transgenik Aday <i>L. angustifolia</i> ve <i>L. stoechas</i> Bitkilerin Adaptasyonu ve Tarlaya şaşıtılması	30
3.16	Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	31
4.	ARAşTIRMA BULGULARI.....	33
4.1	<i>L. angustifolia</i> Bitkisinin Yüzey Sterilizasyon.....	33
4.2	<i>L. angustifolia</i> Bitkisinin Doku Kùltürü Çalışmaları.....	35
4.2.1	Farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının <i>L. angustifolia</i> bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu	35
4.2.2	Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri.....	38
4.2.3	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin Hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri.....	40
4.2.4	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif komür dozlarının etkileri.....	42
4.2.5	Farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozları ile aktif kömürün <i>L. angustifolia</i> bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu	44
4.2.6	Farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamda <i>L. angustifolia</i> bitkisinin kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım.....	46
4.2.7	Farklı oranda IBA içeren MS ortamlarının kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi	48
4.2.8	Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu.....	49
4.3	<i>L. angustifolia</i> Bitkisinde Gen Aktarım Çalışmaları.....	52
4.3.1	<i>A. tumefaciens</i> 'nin GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı.....	52
4.3.2	<i>A. tumefaciens</i> 'nin LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı..	53

4.3.3	PCR sonuçları	55
4.4	<i>L. stoechas</i> Bitkisinde Yüzey Sterilizasyon.....	56
4.5	<i>L. stoechas</i> Bitkisinde Doku Kültürü Çalışmaları.....	57
4.5.1	<i>L. stoechas</i> bitkisinde Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri.....	57
4.5.2	Hipokotil eksplantından farklı BAP ve NAA dozları ile adventif sürgün rejenerasyonu.....	60
4.5.3	Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri.....	62
4.5.4	Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri.....	64
4.5.5	Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri.....	67
4.5.6	Hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri.....	69
4.5.7	Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif komür dozlarının etkileri..	71
4.5.8	Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif komür dozlarının etkileri..	73
4.5.9	Kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri.....	73
4.5.10	Meristematik ucu, yukardan 1., 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamda mikroçoğaltım.....	75
4.5.11	Kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirmek için kullanılan farklı dozlarda IBA'nin etkisi.....	78
4.5.12	Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu.....	79
4.6	<i>L. stoechas</i> Gen Aktarım Çalışmaları.....	82
4.6.1	<i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı.....	82
4.6.2	<i>A. tumefaciens</i> LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı.....	84
4.6.3	PCR sonuçları	84
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	86

KAYNAKLAR.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	112

SİMGELER DİZİNİ

2,4-D	2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit
AdS	Adenine Hemisülfat
AS	Acetosyringone
BAP	6- Benzilaminopurin
CPPU	N-(2-Chloro-4-Pyridyl)-N'-Phenylurea
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EMS	Etil Metan-Sülfonat
g, mg	Gram, Miligram
g/l	Gram/litre
GA3	Gibberillik Asit
GUS	β -Glukuronidaz
HCl	Hidroklorik Asit
IAA	Indol- 3-Asetik Asit
IBA	Indol-3- Bütirik Asit
l, ml, μ l	Litre, Mililitre, Mikrolitre
mg l^{-1} , mg/l	Miligram/litre
MS	Murashige Ve Skoog Bazal Besin Ortam
NAA	Naftalenasetik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
NB	Nutrient Broth
T-DNA	Transfer DNA
TDZ	Thidiazuron, N-(2-Chloro-4-Pyridyl)-N'-Phenylurea
X-Gluc	5-Bromo-4chloro-3indolyl- β -d-glucuronide
μM , mM, M	Mikro Molar, Mili Molar, Molar
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Lavanta türlerinin dünya'daki yayılış alanları.....	3
Şekil 1.2	<i>L. angustifolia</i> türünün bulunduğu iller.....	4
Şekil 1.3	Hakiki lavanta. a. Doğal koşullarda bulunan <i>L. angustifolia</i> , b. <i>L. angustifolia</i> çiçeği.....	5
Şekil 1.4	<i>L. angustifolia</i> tohumu.....	6
Şekil 1.5	<i>L. stoechas</i> türünün bulunduğu iller.....	6
Şekil 1.6	Karabaş otu. a. Doğal koşullarda bulunan <i>L. stoechas</i> , b. <i>L. stoechas</i> çiçeği.....	7
Şekil 1.7	<i>L. stoechas</i> tohumu.....	8
Şekil 3.1	<i>L. angustifolia</i> 30 günlük bitkisinden adventif sürgün rejenerasyonu için kotiledon yaprak, primer yaprak, hipokotil ve mikroçoğaltım için kotiledon boğumu eksplantların seçimi.....	23
Şekil 3.2	<i>L. stoechas</i> : a. 10 günlük bitkisinden adventif sürgün rejenerasyonu için kotiledon yaprak, primer yaprak, hipokotil ve mikroçoğaltım için kotiledon boğumu eksplantların seçimi, b. 30 günlük bitkisinden mikroçoğaltım için koltuk altı meristemleri ve meristematik uc eksplantların seçimi.....	23
Şekil 3.3	pRGGbar gen haritası.....	28
Şekil 4.1	MS ortamında çimlenen <i>L. angustifolia</i> tohumları.....	33
Şekil 4.2	Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri. a. 0.25 mg/l BAP, 0.75 mg/l NAA ve 1 mg/l GA ₃ içeren MS ortamında kahve renkli kallus oluşumu ve b. 0.25 mg/l BAP, 1.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA ₃ içeren MS ortamında kahve-yeşil renkli kallus oluşumu.....	37
Şekil 4.3	Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri. a. 0.25 mg/l BAP, 1.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA ₃ içeren MS ortamında kahve renkli kallus oluşumu ve b. 1.50 mg/l BAP, 0.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA ₃ içeren MS ortamında nekroz oluşumu.....	39
Şekil 4.4	Hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri. a. 0.25 mg/l BAP, 1.25	

	mg/l NAA ve 1 mg/l GA ₃ içeren MS ortamında kahve renkli kallus oluşumu ve b. 0.25 mg/l BAP, 2.00 mg/l NAA ve 1 mg/l GA ₃ içeren MS ortamında kahve-yeşil renkli kallus oluşumu.....	41
Şekil 4.5	Kotiledon yaprak eksplantından farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif komür içeren ortamlarında yukarıda belirtilmiş gibi sürgün uçların oluşumu.....	43
Şekil 4.6	Primer yaprak eksplantından farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif komür içeren ortamlarında yukarıda belirtilmiş gibi sürgün uçların oluşumu....	45
Şekil 4.7	Kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım. a. 2.00 mg/l BAP içeren MS ortamında <i>L. angustifolia</i> bitkisinde kotiledon boğum eksplantı üzerinde sürgün rejenerasyonu ve b. 0.50 mg/l BAP içeren MS ortamında sürgün ve kahve renkli kallus oluşumu ile sürgün rejenerasyonu.....	47
Şekil 4.8	Kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirmek için kullanılan farklı IBA dozlarının etkisi. a, b. 1.25 mg/l IBA içeren MS ortamında gelişen bitkiler.....	49
Şekil 4.9	Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu. a. Daimi daldırma sistem, b. Torf, c. Killi toprak ve hayvan gübre karışımı, d. Kum, e. Perlit, f. Kil ve torf karışımı.....	51
Şekil 4.10	Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu, tarladaki <i>L. angustifolia</i> bitkileri.....	52
Şekil 4.11	<i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı. a. GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarılmış, köklenen bitkilerin adaptasyonu, b. yaprak örnekleri alınarak yapılan <i>GUS</i> analizi sonucu.....	53
Şekil 4.12	<i>A. tumefaciens</i> LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı. a. LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarılmış, köklenen bitkilerin adaptasyonu, b. yaprak örnekleri alınarak yapılan <i>GUS</i> analizi sonucu.....	55
Şekil 4.13	<i>A. tumefaciens</i> LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı, saksıda ve tarladaki transgenik aday <i>L. angustifolia</i> bitkiler.....	55
Şekil 4.14	MS ortamında çimlenen <i>L. stoechas</i> tohumları	56
Şekil 4.15	Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozların etkileri. a. 0.25 mg/l BAP, 0.75 mg/l NAA içeren MS ortamında kahve-yeşil renkli kallus oluşumu ve b. 0.25 mg/l BAP, 1.25 mg/l NAA içeren MS ortamında yeşil renkli kallus oluşumu	59

Şekil 4.16	Hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri, a. 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında kahve renkli kallus ve b. 1.25 mg/l BAP, 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında yeşil renkli kallus oluşumu.....	62
Şekil 4.17	Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri. a. 0.25 mg/l BAP, 1.25 mg/l NAA içeren MS ortamında kahve-yeşil renkli kallus oluşumu ve b. 0.25 mg/l BAP, 1.50 mg/l NAA içeren MS ortamında yeşil renkli kallus oluşumu.....	64
Şekil 4.18	Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri. a. 0.25 mg/l BAP ve 1 mg/l GA ₃ içeren MS ortamında sürgün oluşumu ve b. 0.25 mg/l BAP, 1.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA ₃ içeren MS ortamında sürgün uçları ve kahverenkli kallus oluşumu.....	66
Şekil 4.19	Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri. a. 0.25 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 1 mg/l GA ₃ içeren MS ortamında kahve renkli kallus oluşumu ile sürgün uçların gelişmesi, b. 0.25 mg/l BAP, 1.75 mg/l NAA ve 1 mg/l GA ₃ içeren MS ortamında yeşil renkli kallus oluşumu ile sürgün uçların gelişmesi.....	68
Şekil 4.20	Hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA, GA ₃ ve Aktif kömür dozlarının etkileri. a. 0.25 mg/l BAP ve 1 mg/l GA ₃ içeren MS ortamında kahve renkli kallus oluşumu ve b. 1.50 mg/l BAP, 0.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA ₃ içeren MS ortamında kahve-yeşil kallus oluşumu.....	70
Şekil 4.21	Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri, 0.25 mg/l BAP, 1 mg/l GA ₃ ve 4 g/l aktif karbon içeren MS ortamında kahve yeşil renkli kallus oluşumu	72
Şekil 4.22	Sekiz hafta sonra farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif kömür dozları içeren MS ortamında primer yaprak eksplantlar üzerinde kıvrımlar.....	73
Şekil 4.23	Kotiledon boğum eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için farklı BAP ve NAA dozların etkileri. a. 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında <i>L. stoechas</i> bitkisinde kotiledon boğum eksplantı üzerinde sürgün oluşumu ve b. 0.75 mg/l BAP içeren MS ortamında sürgün ve kahve kallus oluşumu.....	75
Şekil 4.24	Meristematik ucu, yukardan 1., 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamda mikroçoağltım. a,b. epikotil koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonu.....	77

Şekil 4.25	Kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirmek üzerine farklı dozlarda IBA'nin etkisi, köklendirilen <i>L. stoechas</i> bitkileri.....	79
Şekil 4.26	Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu. a. Perlit, b. Torf, c. Killi toprak ve hayvan gübre karışımı, d. Kum, e. Daimi daldırma sistem, f. Kil ile torf karışımı.....	81
Şekil 4.27	Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu, tarladaki <i>L. stoechas</i> bitkileri.....	81
Şekil 4.28	<i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı. a. GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarılmış, köklenen bitkilerin adaptasyonu, b. yaprak örnekleri alınarak yapılan <i>GUS</i> analizi sonucu.....	83
Şekil 4.29	<i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı, saksıda ve tarladaki transgenik aday <i>L. stoechas</i> bitkiler.....	83
Şekil 4.30	<i>A. tumefaciens</i> LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı. a. LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarılmış, köklenen bitkilerin adaptasyonu, b. yaprak örnekleri alınarak yapılan <i>GUS</i> analizi sonucu.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Lavanta bitkisinden elde edilen farklı ucucu yağ bileşenleri.....	2
Çizelge 1.2	<i>L. angustifolia</i> ve <i>L. stoechas</i> türlerinin bulunduğu iller.....	8
Çizelge 3.1	MS ortamında bulunan makro, mikro elementler ve vitaminlerin konsantrasyonları.....	21
Çizelge 3.2	Kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüleri ve saklama koşulları.....	21
Çizelge 3.3	2000-2010 yıllarının, aylık ortalama sıcaklık ile ilgili meteorolojik veriler.....	27
Çizelge 3.4	2011 (Ocak-Temmuz)'in aylık ortalama en düşük, en fazla ve ortalama sıcaklık, nisbi nem ve toplam yağış ile ilgili meteorolojik veriler.....	27
Çizelge 3.5	<i>A. tumefaciens</i> hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları.....	29
Çizelge 3.6	Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları.....	29
Çizelge 4.1	Farklı çamaşır suyu oran ve uygulama süreleri sonucunda <i>L. angustifolia</i> tohumlarının çimlenme ve bulaşıklığı ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları.....	34
Çizelge 4.2	Farklı çamaşır suyu oran ve uygulama süreleri sonucunda <i>L. angustifolia</i> tohumlarının çimlenme ve bulaşıklığı ile ilgili sonuçları.....	34
Çizelge 4.3	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	36
Çizelge 4.4	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri.....	37
Çizelge 4.5	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	38

Çizelge 4.6	<i>L. angustifolia</i> , kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri.....	39
Çizelge 4.7	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	40
Çizelge 4.8	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri	41
Çizelge 4.9	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif kömür dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	42
Çizelge 4.10	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri.....	43
Çizelge 4.11	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif kömür dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	44
Çizelge 4.12	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri.....	45
Çizelge 4.13	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin kotiledon boğum eksplantından mikro çoğaltım için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	46
Çizelge 4.14	<i>L. angustifolia</i> bitkisinin kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri.....	47
Çizelge 4.15	<i>L. angustifolia</i> , kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünleri köklendirmek için kullanılan farklı IBA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	48
Çizelge 4.16	<i>L. angustifolia</i> , kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünleri köklendirmek için kullanılan farklı IBA dozlarının etkileri.....	49
Çizelge 4.17	<i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarılmış köklenen <i>L. angustifolia</i> bitkilerinin oortalama	

	verileri.....	53
Çizelge 4.18	<i>A. tumefaciens</i> LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarılmış köklenen <i>L. angustifolia</i> bitkilerinin ortalama verileri.....	55
Çizelge 4.19	Farklı çamaşır suyu oranı ve uygulama süreleri sonucunda <i>L. stoechas</i> bitkisi tohumlarının çimlenme ve bulaşıklığı ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları.....	57
Çizelge 4.20	Farklı çamaşır suyu oran ve uygulama süreleri sonucunda <i>L. stoechas</i> tohumlarının çimlenme ve bulaşıklığı ile ilgili sonuçları.....	57
Çizelge 4.21	<i>L. stoechas</i> bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	58
Çizelge 4.22	<i>L. stoechas</i> bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri.....	59
Çizelge 4.23	<i>L. stoechas</i> bitkisinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	61
Çizelge 4.24	<i>L. stoechas</i> bitkisinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri.....	61
Çizelge 4.25	<i>L. stoechas</i> bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	63
Çizelge 4.26	<i>L. stoechas</i> bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri.....	63
Çizelge 4.27	<i>L. stoechas</i> bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	65
Çizelge 4.28	<i>L. stoechas</i> bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri.....	66
Çizelge 4.29	<i>L. stoechas</i> bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz	

	sonuçları	67
Çizelge 4.30	<i>L. stoechas</i> bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri.....	68
Çizelge 4.31	<i>L. stoechas</i> bitkisinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	69
Çizelge 4.32	<i>L. stoechas</i> bitkisinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ dozlarının etkileri.....	70
Çizelge 4.33	<i>L. stoechas</i> bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif kömür dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	71
Çizelge 4.34	<i>L. stoechas</i> bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA ₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri.....	72
Çizelge 4.35	<i>L. stoechas</i> bitkisinin kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	74
Çizelge 4.36	<i>L. stoechas</i> bitkisinin kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri.....	75
Çizelge 4.37	<i>L. stoechas</i> bitkisinin meristematik ucu, yukardan 1, 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantlarından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamındaki mikroçoğaltım ile ilgili verilerin varyans analiz sonuçları.....	76
Çizelge 4.38	<i>L. stoechas</i> bitkisinin meristematik ucu, yukardan 1, 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamındaki mikroçoğaltım sonuçları.....	77
Çizelge 4.39	<i>L. stoechas</i> kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünleri köklendirmek için kullanılan farklı IBA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.....	78
Çizelge 4.40	<i>L. stoechas</i> kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünleri köklendirmek için kullanılan farklı IBA dozlarının etkileri.....	78
Çizelge 4.41	<i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen	

	aktarılmış köklenen <i>L. stoechas</i> bitkilerinin oortalama verileri.....	83
Çizelge 4.42	<i>A. tumefaciens</i> LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarılmış Köklenen <i>L. stoechas</i> bitkilerinin oortalama verileri.....	84

1. GİRİŞ

Son yıllarda bitkisel kökenli ilaçların tedavi amacıyla rağbet görmesi, kokulu bitkilerin parfümeri, gıda ve kozmetik sanayinin esas hammaddesini oluşturması ve yeni kullanım alanlarının ortaya çıkması, tıbbi ve aromatik bitkilere olan talebi arttırmıştır. Bu bitkilerden elde edilen hammaddeler son zamanlarda gıda başta olmak üzere, boya, süs, insektisit vb gibi endüstri sektörlerinde kullanılmaktadır ve gittikçe yayılmaya başlamıştır (Kan vd. 2006).

Lamiaceae (Labiatae) familyası dünyada yaklaşık 224 cins ve 5600 tür ile temsil edilmekte olup (Hickey ve King, 1997), Türkiye, Lamiaceae familyası için önemli gen merkezlerinden birini oluşturmaktadır. Ayrıca, Türkiye’de bu familya ait 45 cins, 565 tür ve 735 takson bulunmaktadır (Güner vd. 2000). Lamiaceae familyasına ait bitkiler hemen hemen bütün habitatlarda ve yüksekliklerde yetişmekte olup, Kutuplar'dan Himalayalara, Güney Dogu Asya'dan, Havai ve Avustralya'ya, hatta Afrika ve Amerika'ya kadar geniş bir alanda yayılış göstermektedir (Heywood, 1996). Bu familyanın tıbbi ve aromatik özelliği olan önemli cinsleri: Nane (*Mentha*), kekik (*Thymus*), mercanköşk (*Origanum*), adaçayı (*Salvia*), dağçayı (*Sideritis*), oğulotu (*Melissa*) biberiye (*Rosmarinus*) ve lavanta (*Lavandula*) ile oluşmaktadır (İpek 2007).

Lavanta türleri uçucu ve aromatik yağ içermelerinden dolayı farmokoloji ve parfümeri sanayisinde önemli rol oynamakta olup, eterik yağ üretiminde ve süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir (Seçmen vd. 2000). Lavanta uçucu yağı; dünyada en fazla üretilen 15 uçucu yağdan biri olup, ilaç sanayisinde özellikle çiçekli dal uçları; parfümeri ve kozmetik, sanayi için ise, kısmen kurutulmuş çiçek ve yaprakları kullanılmaktadır. İlaç sanayisinde bazı preperatlara koku vermede, merkezi sinir sistemini düzenleyici ilaçların bileşiminde, sivilceler, astım, bronşit, saç dökülmeleri, kadın hastalıkları, sinir hastalıkları ve heyecan yatıştırıcı olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla bazı sakinleştirici, uykusuzluk giderici, ağrı kesici, hücre yenileyici cilt hastalıkları, akciğer hastalıkları, romatizma, tenya, öksürük ve baş dönmesine karşı kullanılan ilaçların bileşimine girmektedir. Ayrıca sanayide bünyelerindeki linalol ve linalil asetatdan dolayı, parfümeri ve kozmetikte cilt temizleyici losyon, kokulu banyo sabunu ve köpüklerinin

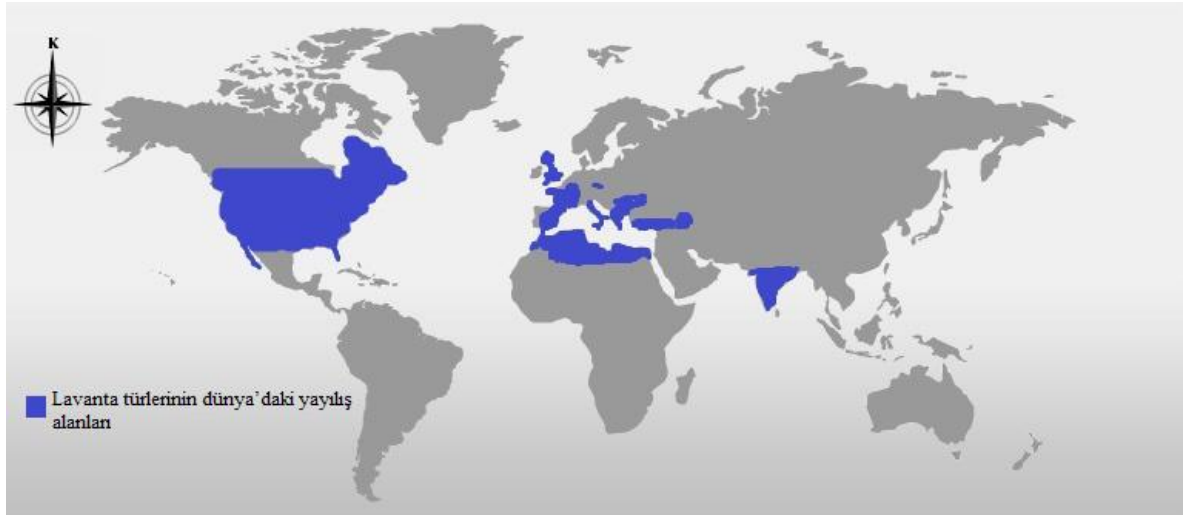
yapımında kullanılmaktadır (Davis 1982, Baytop 1984, Gilani vd. 2000). Lavanta yağı aromaterapide en çok kullanılan yağlardan biri bilinmektedir; özellikle bergamot, neroli, ıtır ve gül esansları ile iyi bir karışım yapmaktadır. Lavanta çiçeklerinin en önemli etken maddesini, renksiz veya hafif sarı renkte olan uçucu yağlar oluşturmaktadır. Lavanta çiçeklerinde uçucu yağ oranı %1-3 arasında değişmektedir (Baydar, 2007, Hassiotis vd 2010). Lavanta yağının en önemli uçucu yağı bileşenleri linalil asetat, linalool, sineol ve kafur olup, özellikle linalil asetat, lavanta yağının kalitesini belirleyen en önemli bileşeni olmakta ve parfüm sanayisinde kullanılacak lavanta yağında en az %30 oranında bulunması istenmektedir (Çizelge 1.1)(Hui vd. 2010).

Lavantadan, uçucu yağ dışında konkret ve absöü de elde edilmektedir. Lavanta konkriti, taze lavanta materyalinden hekzan, toluen ve petrol eteri gibi solventler yardımıyla ekstraksiyonla elde edilmektedir. Lavanta konkriti önce etanol ile ekstrakte edilir ve ardından soğutulup filtre edildikten sonra etanol uçurulacak olursa lavanta absölüsü elde edilmektedir. Genelde konkritten absölüye dönüşümde %50 oranında verim kaybı olmaktadır (Baydar 2007). Lavanta türleri dünyada en fazla Güney Avrupa'nın ve Kuzey Afrika'nın Akdenize komşu olan ülkelerinde yayılış göstermektedir. Fransa, Bulgaristan, İspanya, İtalya, Yunanistan, İngiltere, ABD, Avusturya ve Kuzey Afrika ülkelerinde yoğun olarak kültürü yapılmaktadır. Ayrıca Kanarya adalarından Akdeniz kıyılarına ve oradan Hindistan'a kadar uzanan bölgelerde yabani olarak yaklaşık 25 lavanta türü bulunmaktadır (Şekil 1.1)(Bailey 1969, Baydar 2007).

Çizelge 1.1 Lavanta bitkisinden elde edilen farklı uçucu yağ bileşenleri (Bienvenu 1995)

Ucucu Yağ	Oran (%)
Kafur (camphor)	0.5-1
Kariyofilin (caryophyllene)	3-12
Sineol (cineole)	1-2
Linalol (linalool)	30-49
Linalil asetat (linalyl acetate)	30-45
Okimin (ocimene)	2.5-6

Lavandula türleri çoğu zaman popüler bir ekonomik önemi olan tıbbi bitki olup, dünyada her yıl 300'den fazla uçucu yağ bitkisinden yaklaşık 50 bin ton kadar uçucu yağ elde edilmekte, yıllık üretim 500 ton üzerinde olan 15 uçucu yağ toplam üretimin yaklaşık %90 nını karşılamaktadır. Bu 15 önemli uçucu yağdan birisi de lavanta yağıdır. Dünyada her yıl 1.8 – 2 milyar dolar arasında uçucu yağ ihracatı yapılmakta, bu miktarın yaklaşık 50 milyon dolarını lavanta yağı oluşturmaktadır (Baydar 2007, Boelens 1995). Türkiye'nin lavanta yağı ithalatı ise her geçen yıl artmaktadır. Türkiye istatistik kurumunun değerlerine göre lavanta bitkisinden elde edilen terpeni alınmamış uçucu yağın 8419 kg (para değeri, 209409 US \$) ve terpeni alınmış uçucu yağın 75 kg (para değeri, 3541 US \$) kadarı ithal edilmektedir (Anonim 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009).



Şekil 1.1 Lavanta türlerinin dünya'daki yayılış alanları (Bailey 1969, Baydar 2007, <http://www.uerkal.com/Posts/Res/p58-DunyaHaritasi.gif>; değiştirilerek)

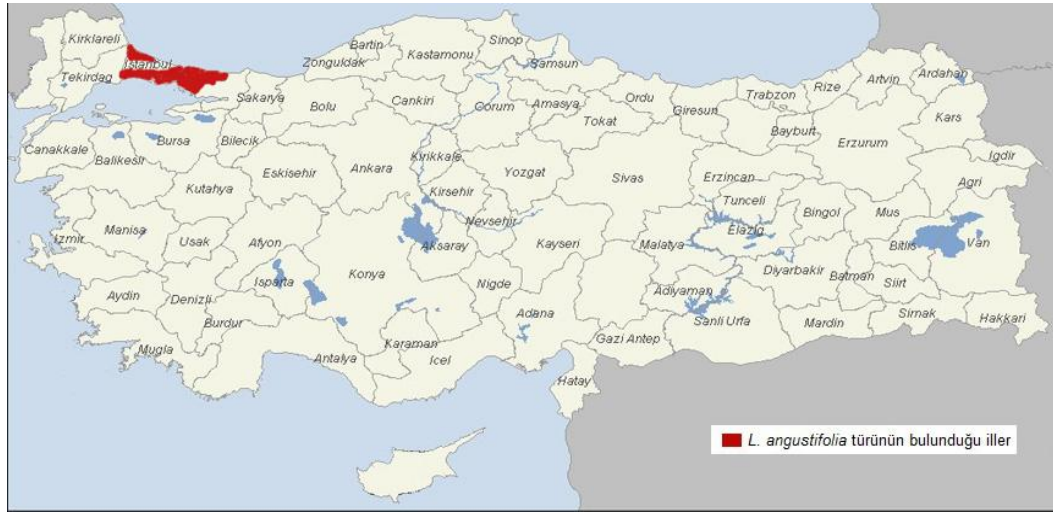
Türkiye'de değeri yüksek olan iki önemli lavanta türü bulunmaktadır (<http://www.weski.tubitak.gov.tr/tubives>. 2011) :

- Hakiki lavanta: *Lavandula angustifolia* Miller subsp. *angustifolia* Miller (syn. *L. officinalis* ve *L. vera*)

- Karabaş otu (Fransız lavantası): *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* L.

Hakiki lavanta

En iyi kalite lavanta yağının elde edildiği, çoğunlukla hakiki lavanta veya İngiliz lavantası olarak adlandırılan lavender, Fransa, İspanya, İsviçre, İtalya, Korsika ve Kuzey Afrika bölgelerini içine alan Akdeniz çanağında doğal olarak yetişmektedir. Ayrıca bu bitki serin ve yüksek rakımlara (700-1800 m) daha iyi uyum sağlamaktadır (Lis-Balchin, 2002). Hakiki lavanta Türkiye’de İstanbul illinde az da olsa doğal olarak bulunmaktadır (Çizelge 1.2, Şekil 1.2) (Anonim 2011).



Şekil 1.2 *L. angustifolia* türünün bulunduğu iller (Anonim 2011, <http://www.canakkaleili.com/wp-content/uploads/2009/10/Turkiye-%C4%B0ller-Haritasi.bmp>; değiştirerek)

Hakiki lavanta, yarı çalimsı formda, çok yıllık bir bitkidir. Yaşlandıkça alttan üste doğru odunlaşmaya başlayan, ortalama 50 cm, en fazla 1 m’ye kadar boylanan çok sayıda dalları oluşmaktadır. Dallar üzerinde karşılıklı olarak 2-6 cm uzunlukta, çok kısa saplı, grimsi yeşil renkte yapraklar bulunmakta olup, Çiçekler, başak şeklindeki 15-20 cm uzunluğundaki sapların ucunda toplanmaktadır. Her bir başakta ortalama 5 çiçek kümesi ve her kümede de 5-15 adet çiçek bulunmaktadır. Çiçek kümeleri karşılıklı iki yaprak tarafından korunmaktadır. Çok kısa saplı olan hakiki lavanta çiçekleri gri-mavi renkte, içi düz ve parlak ve dışı tüylü olan 5 mm uzunluktaki çanak yapraklar tarafından sarılmaktadır. Çanak yapraklar, çiçeği boru gibi sararak uçta 4 adet küçük sivri dişle son bulmaktadır. Maviden viyoleye kadar değişen taç yaprakları arasında 4 adet erkek organ yer almaktadır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Hakiki lavanta.

a. Doğal koşullarda bulunan *L. angustifolia*, b. *L. angustifolia* çiçeği. (http://everything-lavender.com/pictures/450px-Lavandula_angustifolia_003byH-Zell.jpg)

Hakiki lavanta nektarı özellikle bal arıları için son derece cazip edici olmaktadır. Çanak yaprağın dış kenarlarında çok sayıda küçük, sapları tek hücreleri olan ve uçucu yağ depolayan drüze tüyleri yer almaktadır. Hakiki lavanta tohumları 2 mm boyunda ve 1 mm genişliğinde olup, şekilleri uzunumsu-oval, renkleri parlak koyu kahve rengi ve 1000 tane ağırlığı 1 gr'dan daha az olmaktadır (Şekil 1.4)(Lis-Balchin 2002).

Hakiki lavanta kireççe zengin, süzek ve pH'sı 5.8-8.3 olan kuru ve kalkerli topraklarda çok iyi gelişme göstermektedir. Aşırı nemli, taban suyu yüksek ve organik maddesi çok olan topraklarda daha az uçucu yağ üretmektedir. Akdeniz orijinli olduğu için kurağa ve sığağa oldukça dayanıklı olmaktadır. Ancak soğuğa olan dayanımı kurağa olan dayanımı kadar yüksek değildir. Kışı çok sert geçen bölgelerde bazen soğuk zararı olabilmektedir. Güneye bakan, hakim rüzgara kapalı, eğimli alanlarda soğuk zararı daha az olmaktadır. Ancak eğimli alanlarda, dikim yönü eğime dik gelecek şekilde planlanmaktadır (Baydar 2007, Lis-Balchin 2002).



Şekil 1.4 *L. angustifolia* tohumu (orijinal)

Karabaş otu

Karabaş otu olarak tanınan *L. stoechas* Türkiye’de Aydın, Bursa, İstanbul, İzmir ve Muğla da az da olsa bulunmaktadır (Çizelge 1.2, Şekil 1.5)(Anonim 2011).



Şekil 1.5 *L. stoechas* türünün bulunduğu iller (Anonim 2011, <http://www.canakkaleili.com/wp-content/uploads/2009/10/Turkiye-%C4%B0ller-Haritasi.bmp>; değiştirerek)

Karabaş otunun yaprakları kısa saplı, dar ve uzunca tüylü, beyazımsı-grimsi-yeşil renklere olup, Kökten çıkan birkaç dalın üzerinde biberiye benzeri sivri yapraklar oluşmaktadır. Daha sonra bu dallar uzayıp, lavantadan daha büyük mor bir çiçeğe dönüşmektedir. Ancak hakiki lavanta gibi büyük çalı formunda gelişmemektedir.

Karabaş otu çiçekleri, kara duta benziyip, üzerinde sonradan çıkan eflatun minik çiçekleri ise üzerine konmuş kelebekleri andırmaktadır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 Karabaş otu.

a. Doğal koşullarda bulunan *L. stoechas*, b. *L. stoechas* çiçeği.
(<http://www.hear.org/starr/images/images/plants/full/starr-080103-1281.jpg>)

Bu bitkinin meyvesi açık kahve renkli olmaktadır (Şekil 1.7). Karabaş otunun ekonomik olarak kullanılan kısmı çiçekleridir (Lis-Balchin, 2002). Karabaş otu habitat olarak kuru tepelerde, açık ormanlarda, kireçtaşlı ve granitli topraklarda yaşamaktadır. Bununla beraber, hemen hemen her çeşit toprakta, özellikle kuru ve çok asidik olmayan topraklarda yetişmektedir. Güneşli pozisyonda, nötralden alkaliye doğru bir toprağı tercih eden bu bitki, kireçli toprakta da iyi yetişmektedir. Ayrıca bu bitki sıcak ve kuru ortamları sever, kuraklığa ve -5°C ile -10°C arasındaki soğuğa tolerans göstermektedir (Yenici, 1999). Türkiye’de doğal olarak bulunan karabaş otu, mikrop öldürücü özelliği nedeniyle geleneksel tedavi sisteminde boğaz ve idrar yolu hastalıkları ile yara tedavisinde kullanılmaktadır. Çiçekli ve yapraklı dallarından karabaş yağı denen uçucu bir yağ damıtılmakta, bu yağ yara iyileştirici özelliği nedeniyle merhemlere katılmaktadır. Karabaş otunun ikinci yıldan itibaren taze saplı çiçek verimi 75 – 150 kg/da, saplı kuru çiçek verimi 35 – 75 kg/da, sapsız kuru tomurcuk verimi 15 – 30

kg/da, ucucu yağ verimi 1.5 – 3 kg/da ve ucucu yağ oranı %1 – 2 arasında değişmektedir. Genellikle 50 – 75 kg/da taze hasat edilmiş saplı lavantadan, su buharı distilasyonu ile 1 kg kadar lavanta yağı elde edilmektedir (Başer 1993, Baydar 2007, Hui vd. 2010).



Şekil 1.7 *L. stoechas* tohumu (orijinal)

Çizelge 1.2 *L. angustifolia* ve *L. stoechas* türlerinin bulunduğu iller

Bitki Türü	Yayılış Alanları
<i>L. angustifolia</i>	İstanbul
<i>L. stoechas</i>	Aydın- Bursa- İstanbul- İzmir- Muğla

Klasik bitki ıslahı ile istenen tüm özelliklerin bir bitkide toplanması oldukça güç ve zaman alıcı bir işlemdir. Lamiaceae familyası özellikle *L. angustifolia* ve *L. stoechas*'da bitki rejenerasyonu ve gen aktarımı genotip ve eksplantından etkilenmekte olup, gen aktarım oranı oldukça düşüktür (Dronne vd. 1999). Rejenerasyon yeteneğinin düşük olmasına rağmen değişik araştırmacılar her 2 türde gen aktarılmış bitkiler elde etmişlerdir (Nebauer vd. 2000) Gen aktarımında başarılı sonuçlar elde edilmesinde tekrarlanabilecek sürgün rejenerasyon sistemlerinin geliştirilmesi çok önemlidir (Calvo ve Segura 1998, Mokhtarzadeh vd. 2011). *L. angustifolia* ve *L. stoechas*'da Türkiye'de *in vitro* rejenerasyon ve gen aktarımı çalışmaları bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı; her iki türde yüksek oranda sürgün rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi ve buradan yola çıkarak *A. tumefaciens* aracılığıyla transgenik bitkiler elde etmektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Doku Kültürü Çalışmaları

Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki üretmek, yani; mikroçoğaltım bir çok bitki türünde olduğu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerin de vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilmesine olanak sağlayan bir üretim şeklidir (Dilik 2006). Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır (Mansuroglu ve Gürel 2001, Dudu 2006). Mikroçoğaltım bitki yetiştiriciliği ve genetiği yönünden önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu avantajlar; hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi ve kitlesel üretimde üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerlik (homojenite) olmasına neden olmaktadır. Ayrıca alışlagelen yöntemlerden daha kısa kültür süresine ihtiyaç duyulması ve zor üretilen türlerin daha kolay üretiminde önemli rol oynamaktadır. Seçilen belirli ve üstün genotiplerin hızlı üretimi, ayrıca, kısa sürede fazla bitkinin elde edilebilmesi de diğer bir avantajdır (Mansuroglu ve Gürel 2001).

Quazi (1980), iki tür Lavanta (*L. angustifolia* ve *L. latifolia*) bitkisinin kallus oluşum ve koltuk altı meristem çoğaltımı üzerinde yaptığı denemede, sterilizasyon için, eksplantları %70'lik etanol da 30 saniye bekletilmiş; ayrıca 20 dk, %0.32'lik sodyum hipoklorid'ile muamele yaptıktan sonra distile saf su'ile durulama yapmıştır. Bu denemede 20 gr/l sakroz, %10 hindistan cevizi sütü, %0.7 agar ve farklı oranda oksin (NAA ve 2,4-D) ve BAP içeren tuzlu MS ve B₅ (pH 5.5) ortamları kullanılmıştır. Tüm kültürler 25°C ve 16 saat, 10000 lux floresant ışığı altında konulmuştur. *L. angustifolia* bitkisinden alınan 120 koltuk altı meristem eksplantı 12 farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Yeşil renkli kallus oluşumu 2 mg/l (2 ppm) 2,4-D ve 4 mg/l (4 ppm) BAP içeren MS ortamında görülmüştür.

Panizza ve Tognoni (1988), Lavandin (*Lavandula officinalis* Chaix x *Lavandula latifolia* Villars) çeşidi 'Grosso'nun *in vitro* çoğaltım için, gövde boğumu kültüre

alınarak 30 g/l sukroz, 7,5 g/l agar ve 0.2 mg l⁻¹ BAP (ortam A) ile 0.2 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ GA₃ (ortam B) içeren Linsmaier ve Skoog kültür ortamı kullanmıştır. Ayrıca, bu çalışmada eksplantları 10 mg/l BAP içeren MS ortamda (Ortam C) 15 gün ön muamele yapılmış olup, yukarıda belirtilmiş A veya B ortamına aktarılmıştır. Tüm ortamlarda sürgün çoğaltımda benzerlik görülmüştür, ancak, farklı kaynaklardan elde edilen sürgünlerin 1 mg l⁻¹ NAA (Ortam F) içeren ortamda, kök gelişiminde farklılık, belirgin olarak saptanmıştır. En fazla köklenme ortam A'da gelişen sürgünlerde görülmüştür. Daha sonra başka bir denemede çiçek parçaları (tomurcuk ve kaliks), yaprak, gövde koltuk altı ve sürgün ucu eksplantı kullanarak 1 mg l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid + 0.5 mg l⁻¹ kinetin içeren ortamda kallus oluşumu incelenmiştir. En az kallus oluşumu gövde koltuk altı meristem eksplantında görülmüştür. Kallus gelişimi için çiçek parçaları (tomurcuk, çanak), yaprak, gövde nodu ve sürgün ucu kullanılmıştır. Köklendirmek için 0.5 mg l⁻¹ NAA kullanılmıştır. En fazla sürgün ve kök oluşumu gövde koltuk altı eksplantlarından gelişen kalluslarda görülmüştür. Köklenen bitkiler başarıyla dış koşullarına alıştırmış olup, büyütülmüştür.

Calvo ve Segura (1988), bu çalışmada in vitro koşullarda yetiştirilmiş *L. latifolia* ve *L. stoechas* türlerine ait bitkiciklerin kotiledon, hipokotil ve kök eksplantlarından sürgün oluşumu için, farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonlarda IAA, NAA ya da 2,4-D ile BAP ya da Kinetin içeren ortamlar kullanılmıştır. Tüm ortamlarda kallus oluşumu gözlenirken en iyi kök oluşumu, IAA ya da NAA içeren ortamlarda gözlenmiştir. Tüm ortamlarda *L. stoechas*'tan sürgün oluşumu gözlenmiştir. *L. latifolia*'dan alınan hipokotil ve kotiledon eksplantlarında ise, yüksek oranda sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Panizza ve Tognoni (1991), çalışmalarında *L. angustifolia* tohumlarında zayıf çimlenme olduğu için çeliklerle vejetatif çoğaltım yapmışlardır. Yaşlı bitkilerin kök tacı eksplantlarından hem köklü, hem de köksüz sürgünler/çelikleri üretim materyali olarak hazırlanmış olup, 3.0 mg l⁻¹ IBA ile muamele ederek köklendirilmiştir.

Kumari ve Saradhi (1992), *Origanum. vulgare* L.'nin kallus kültüründen bitki rejenerasyonunu ve hızlı çoğaltımını araştırmışlardır. Çalışmada aseptik koşullarda kültüre alınan 15 günlük fidelerden alınan kotiledon, hipokotil ve kök segmentleri

eksplant olarak kullanılmıştır. Bu eksplantlar ayrı ayrı 2,4-D, NAA ve BAP'ın farklı kombinasyonlarını (0, 10^{-7} , 10^{-6} ve 10^{-5} M) içeren Gamborg B5 ortamlarında kültüre alınmışlardır. En yüksek kallus oluşumu (% 90) 10^{-7} M 2,4-D içeren ortamdan elde edilmiştir. Kallus oluşumu için en uygun eksplant kaynağının kotiledon olduğu belirlenmiştir. Kotiledon eksplantları yalnızca 10^{-6} M BAP veya 10^{-7} M veya 10^{-6} M NAA + 10^{-6} M BAP kombinasyonlarında kültüre alındığında sürgün oluşumu meydana gelmiştir. Bununla birlikte 10^{-5} M NAA tamamıyla BAP'ın sürgün oluşturmaya olumsuz etki yapmıştır. En iyi sürgün oluşumu 10^{-6} M BAP+ 10^{-6} M NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. elde edilen 15-20 mm'lik sürgünler 10^{-6} M IBA ve ya 10^{-6} M NAA içeren ½ GamborgB₅ sıvı ortamında köklendirilmiş olup, dış koşullara adaptasyon sağlanmıştır.

Portilla vd. (1995), yaptıkları denemede *L. angustifolia in vitro* mikroçoğaltımı için koltuk altı meristemleri kullanılmıştır. Çoğaltım için NAA, BA ve farklı oranda kombinasyonları hindistan cevizi sütü içeren ve içermeyen MS ortamlarında incelenmiştir. Kùltürler, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyotta $45 \text{ m E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde kültüre alınmıştır. 1.15 ve 3.15 mg l^{-1} BAP içeren ortamlarda en iyi gelişme sağlanmıştır. Bununla birlikte, 3,15 mg/L BAP içeren ortamdaki sürgünler 0.5 cm^2 'den küçük yapraklı sürgünler sıkılaştırılmış buket şeklinde bir oluşum görülmüştür. Sürgünler kesilip hormonsuz MS ortamına aktarıldıklarında, 45 gün sonra yaprak ve gövdeler de önemli büyüme sağlanmıştır. Daha sonra, sürgünler 0.2- 0.4 mg l^{-1} IBA içeren 1/2 oranda MS makro, mikro elementler bulunduran ortamda köklendirilmiştir. Daha sonra, elde edilen bitkiler saksılara şaşırılmış olup, serada dış koşullara adapte edilmiştir.

Nobre (1996), yaptığı çalışmada Akdeniz yöresinde bulunan karabaş otu (*L. stoechas*)'nın *in vitro* klonal çoğaltımı için dış ortamda yetişmiş bitkilerden alınan koltuk altı meristem eksplant olarak kullanılmıştır. Çalışmada, *in vitro* ortamda gelişen sürgünlerde hiperhidrisiti azaltmak amacıyla optimizasyon yapılmıştır. Sonuç olarak, 4-5 hafta sonra sürgün rejenerasyon $217.2 \text{ } \mu\text{M}$ adenine hemisülfat (AdS) ve $0.05 \text{ } \mu\text{M}$ NAA içeren Margara N30K tuzları ile oluşan ortamdan elde edilmiş olup, $5.4 \text{ } \mu\text{M}$ NAA içeren ortamda köklendirilmiş, %100 adaptasyon sağlanmıştır.

Sanchez-Gras vd. (1996), başlangıçta *L. latifolia* bitkisinin koltuk altı meristem eksplantlarını iki değişik macro besin maddeleri, BAP, kinetin ve NAA içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Daha sonra eksplantlar %20 hindistan ceviz sütü, 0.57 μM IAA ve 8.88 μM BAP içeren MS ortamına aktarılmıştır. En iyi sürgün oluşum 5 μM BAP içeren MS ortamında görülmüştür. Sürgünlerin köklendirilmesi için ½ miktarda makro ve mikro besin madde içeren MS ortamı kullanılmış olup, bitkiler toprağa şaşırtılmıştır.

Jordan vd. (1998), *L. dentata* bitkisinin koltuk altı meristem eksplantların, BAP, KIN ve NAA içeren MS ortamında, mikroçoğaltım yapmışlardır. En yüksek sürgün oluşum oranı 5.0 μM BAP veya 20 μM KIN içeren MS ortamında gelişen ve daha sonra 8.8 μM BAP ve %15 hindistan cevizi sütü içeren MS ortamında elde edilmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi için ½ makro besin maddeleri içeren MS ortamı kullanılmış olup, bitkiler başarılı şekilde toprağa şaşırtılmıştır.

Andrade vd. (1999), *Lavandula vera* DC (synonym *L. angustifolia*) bitkisinde farklı oranda TDZ ve BAP içeren MS ortamda boğum eksplantından sürgün rejenerasyon ve köklendirme üzerinde büyüme düzenleyicilerin etkisini araştırmışlardır. En fazla sürgün rejenerasyon 2.25 μM TDZ ve ya 2 μM BAP içeren MS ortamda görünmüştür. Bu dozlarda eksplantlar üzerinde yüksek oranda hiperhidrisiti görülmüştür. Köklendirmek için 0-1 mg/l IBA, 0.2-1 mg/l NAA ¼ , ½ ve tam konsantrasyonlarda MS besi ortam ve ¼ konsantrasyonda MS ile aktif kömür içeren ortamda köklendirilmiştir. En yüksek oranda kök oluşumu 1 mg/l BAP ve 1 mg/l NAA içeren ¼ konsantrasyonlu MS ortamda görülmüştür. Elde edilen bitkiler başarıyla dış koşullara alıştırmış olup, büyütülmüştür. Bitkilerde her hangi anormalliğe rastlanmamıştır.

Tsuro vd. (1999), *L. angustifolia*'nın yaprak eksplantlarından kallus oluşumu ve daha sonra adventif sürgün rejenerasyon için purine veya Üre-tip citokinler kullanılmış olup, eksplantları 25°C sıcaklığı ve ışık altında inkübe edilmiştir. Sonuçlarına göre, 4.4×10^{-5} M BAP içeren MS ortamında kallus eksplantları üzerinde yeşil noktaların gösterdiği yerlerde %55.3 sürgün oluşmu görülmüştür. TDZ veya CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea) içeren ortamlarda kallus yüzeylerinde kompaktlığı ve

yeşillenme görülmüştür. 4.0×10^{-7} M CPPU içeren ortamında %52 sürgün oluşumu kayıtlı edilmiştir. BAP içeren ortamlarda gelişen sürgünler 9.9×10^{-7} M IBA içeren ½ MS ortamında köklendirilmiş olup, seralarda adaptasyon sağlanmıştır. Buna karşı TDZ veya CPPU içeren ortamlarda gelişen sürgünler köklendirilememiştir.

Tsuro vd. (2000), *L. angustifolia* yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyon çalışmalarında 1 cm veya daha uzun sürgün elde etmiştir. Dört hafta sonra elde edilen sürgünler 1.0×10^{-6} M IAA, 1.0×10^{-6} M NAA ve 1.0×10^{-6} M IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. En iyi köklenme (%74) IAA içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Dias vd. (2002), *L. viridis* bitkisinin koltuk altı meristem eksplantların $0.44 \mu\text{M}$ BAP içeren MS ortamında mikroçoğaltım yapılmıştır. Eksplant başına en fazla 11.69 adet sürgün $0.67 \mu\text{M}$ BAP içeren ½ konsantrasyonlu MS ortamında gözlenmiştir. Sürgünler Gresshoff ve Doy ortamında köklenmişlerdir. Şeker konsantrasyonunun 58.4 mM 'dan 87.6 mM 'a çıkarılması sonucunda köklenme oranında önemli bir artış görülmüştür. Elde edilen %80 bitkiler başarılı bir şekilde dış ortama şaşırtılmıştır ve gelişen bitkilerde normal büyüme gözlenmiştir.

Echeverrigaray vd. (2005), çalışmasında tarla koşullarda gelişen *L. dentata* bitkisinin koltuk altı tomurcuklardan *in vitro* hızlı çoğaltımı yapılmıştır. En yüksek sürgün oluşumu $2.2 \mu\text{M}$ BAP ve $2.5 \mu\text{M}$ IBA içeren MS ortamında görülmüştür. Kök gelişimi için $2.5 \mu\text{M}$ NAA içeren MS ortamı kullanılmıştır. Köklenen bitkiler başarılı bir şekilde toprağa aktarılmıştır. Elde edilen bitkilerde Kısa vadede (6 ay) normal gelişme gözlenirken, uzun vadede (1 yıldan fazla) bitkilerde düşük frekanslarda ve kalıtsal olmayan morfolojik değişiklikler belirlenmiştir.

Chishti vd. (2006), yaptıkları çalışmada *L. officinalis* sürgün eksplantını kullanarak, en verimli hızlı çoğaltım protokolünü geliştirmek amacıyla farklı oranda BAP, Kinetin ve IAA içeren MS ortamı kullanmışlardır. Bu denemede 4 hafta sonra en iyi adventif sürgün oluşumu (%80), 2 mg/l BAP içeren MS ortamında gerçekleşmiştir. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için 1 mg/l IBA içeren, ½ MS ortamı kullanılmış olup, 4 hafta sonra %80 köklenme görülmüştür. Daha sonra köklenen bitkiler kum, kil

ve vermikülit karışımı (1:1:1) içeren karışımına şaşırtılmış 25 °C sıcaklıkta ve %60 nem oranında dış koşullarına alıştırmıştır.

Orhan (2007), *L. stoechas* üzerinde yaptığı denemede çimlendirme, sürgün oluşumu ve gelişimi ile köklendirme için uygun besin ortamlarını belirlemiştir. En iyi çimlendirmeler (%97), 1.00 mg^l⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında gerçekleştirilmiştir. Çimlendirilen karabaş otu tohumundan elde edilen bitkiciklere ait sürgün nod eksplantlarında, 0.1 mg^l⁻¹ NAA içeren MS ortamda ortalama 3.6 sürgün/eksplant ile 8.44 nod/eksplant ve 0.5 mg^l⁻¹ IBA içeren MS ortamında ise ortalama 3.44 sürgün/eksplant ile 8.62 nod/eksplant elde edilmiştir. En iyi köklenmeler ise 1 mg^l⁻¹ NAA (ortalama 3.44 kök/eksplant) ve 0.5 mg^l⁻¹ NAA (ortalama 2.29 kök/eksplant) içeren MS ortamında gözlenmiştir.

Falk vd. (2009) *L. angustifolia* bitkisinin rejenerasyonu için, genç yaprak eksplantını, karanlıkta ve 9 µM TDZ ve ya 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. İki hafta sonra eksplantlarda kallus oluşumu gözlenmiş olup, 4 hafta sonra eksplantlar üzerinde sürgün rejenerasyon görülmüştür. Altı ve sekiz hafta sonra eksplantlar üzerinde sürgün oluşumunda artış gözlenmiştir. TDZ içeren ortamda, eksplantlar üzerinde her hangi sürgün oluşumu gözlenmemiştir. Daha sonra, sürgünler IBA ile muamele edilerek köklendirme yapılmış ve 1-4 hafta arası %100 köklenen 400 adet bitki elde edilmiş olup, dış şartlara adaptasyon sağlanmıştır. Daha sonra, protokolu kullanarak EMS muamelesi ile mutasyon yapıp, bitkiler elde edilmiştir. Bir mutant bitkisindeki yağ içerikleri geriye kalan yabani bitkilerdeki yağ içeriklerden belirgin farklılık görülmüştür. Mutasyon çalışmaları, mono ve sekiterpin üretim çalışmalarında önemli rol oynayabilmektedir.

Ghiorghita vd. (2009), *L. angustifolia* bitkisinde sürgün ucu, gövde koltu altı meristemi, enternodlar ve yaprak eksplantını kullanarak MS ortamı ve NAA, BAP, IAA ve kinetin + NAA içeren MS ortamında mikroçoğaltım yapmışlardır. Gövde, koltu altı meristemi ve enternodlar 2 mg l⁻¹ IAA içeren MS ortamında krem renkli kallus oluşumu görülmüştür. Daha sonra, 0.2-0.5 mg^l⁻¹ BAP içeren MS ortamında sürgün rejenerasyonu görülmüştür.

Peyvandi vd. (2009), *L. vera* bitkisinde yaptıkları çalışmada, 2 mg/l BAP içeren MS ortamında en iyi adventif sürgün gelişimi görülmüştür; ayrıca, 1-2 mg/l 2iP ve ya 1-2 mg/l BAP içeren MS ortamında adventif sürgün oluşumuyla beraber köklenme görülmüştür. Bu denemede 1 mg/l BAP içeren MS ortamında en iyi köklenme oranı elde edilmiştir.

Zuzarte vd. (2010), *in vitro* koşullarında *L. pedunculata* yayılımı için güvenilir bir protokol geliştirmek ve bu bitkilerin uçucu yağ üretiminde endüstriyel uygulama potansiyelini değerlendirmek amacıyla yola çıkmışlardır. Bu denemede, mikroçoğaltım için farklı BAP oranlarını içeren MS ortamı kullanılmış olup, en iyi sürgün oluşum oranı 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi için oksin kullanılmıştır.

Machado vd. (2011), *L. angustifolia*'nın Provence Blue, English ve Elegance Ice çeşitlerinin köklendirilmesinde farklı oranda (0, 2.5, 5.0 ve 10 mM) IBA kullanmışlardır. Bu denemede 5.0 mM IBA'da 'Provence Blue' çeşidinde en fazla köklenme görülmüş olup, Köklenen bitkiler 82% -100% oranda dış şartlara adaptasyon sağlamaktadır.

Arrebola ve Socorro (1997), Genç ve yaşlı adaçayı (*Satureja obovata* Lag.) bitkisinden eksplant olarak mikroçoğaltımını araştırmışlardır. Çalışmada tohumlar 0.57 µM gibberellik asit (GA3) ile muamele edilerek, embriyo dormansisi ortadan kaldırılmış, ancak GA3 uygulaması kontrole göre *in vitro* koşullarda çimlenme oranında önemli etki yapmamıştır. *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yetiştirilen bitkilerden alınan tek boğum eksplantlarından optimum sürgün rejenerasyonu 2.22 µM BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. Genç kaynaktan alınmış sürgünlerin köklendirilmesi, sürgünlerin 3 gün süreyle 4.92 µM IBA içeren MS besin ortamında kültüre alınıp, MS ortamına transfer edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Dış koşullara alıştıran bitkilerin yaşama oranının % 95'ten daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Zhao vd. (2003), Fabaceae'ye ait tıbbi bir bitki olan *Sophora flavescens*' in *in vitro* koşullarda çoğaltımını çalışmışlardır. ½ MS ortamında kültüre alınan tohumlardan fideler elde edilmiştir. Fidelerden alınan tek boğum eksplantları farklı

konsantrasyonlardaki TDZ, BAP ve NAA kombinasyonlarını içeren 30 gr/l sukroz ve 7 gr/l agar ilave edilmiş MS ortamlarında, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında kültüre alınmıştır. Oluşan sürgünler de farklı konsantrasyonlarda NAA, IAA ve IBA içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. En iyi sürgün oluşumu 8.88 mg^l⁻¹ BA ve 2.69 mg^l⁻¹ NAA kombinasyonu içeren MS ortamında ve en iyi kök oluşumu ise 5.37 mg^l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamında gerçekleşmiştir. Sürgün oluşum oranı % 93.4, kök oluşum oranı ise % 82.4 olarak tesbit edilmiştir. Eksplant başına 4.2 adet sürgün oluşmuştur. Oluşan sürgünler sürgün oluşumunu arttırmak için aynı ortamda 6 kez alt kültüre alınmış ve köklendirilmiş bitkicikler dış koşullarada adaptasyon sağlamıştır.

Miachir vd. (2004), Zingiberaceae'ye ait tıbbi ve ticari açıdan önemli olan *Curcuma zedoaria* Roscoe'(Zedoary) nın mikroçoğaltımını, kallus oluşumunu ve sekonder metabolit üretim çalışmışlardır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlardaki (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ve 3.0 mg^l⁻¹) BAP ve (0.0, 0.2, 0.5 ve 1.0 mg^l⁻¹) NAA ayrı ayrı, ya da kombinasyonlarını içeren, 8.0 gr/l agar ve 30 gr/l sukroz ilave edilmiş MS besin ortamında yetiştirilen bitkilerin rizomlarının sürgün uçları ve meristemleri kullanılmıştır. 2mg/l BAP içeren MS ortamlarda sürgün ucu eksplantları % 72.3 oranında sürgün oluşumu gözlenmiştir. Kallus indüksiyonu ve gelişimi kök parçalarının 1 mg^l⁻¹ NAA içeren MS ortamında karanlık ve 25±2 °C'de kültüre alınmasıyla sağlanmıştır. Bitkicikler başarıyla serada dış koşullara alıştırmıştır. Endomycorrhiza muamelesi dış koşullara alıştırmaya ve kök oluşumuna yardımcı olmuştur.

2.2 *Agrobacterium tumefaciens* ile Bitkilere Gen Aktarımı Çalışmaları

Gen aktarımı; tam bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerin kromozomlarına istenilen genleri taşıyan bir DNA parçasının yerleştirilmesi ve gen aktarılmış hücrelerden yeni bitkilerin elde edilmesidir (Sağlam 2010). Bitkilere gen aktarımı, doğrudan (en yaygın kullanılanları elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve biyolistik) ve dolaylı (*A. tumefaciens* ile gen aktarımı) olmak üzere iki grup altında toplanabilmektedir (Arı 2001). *Agrobacterium* toprakta bulunan tümör oluşumuna neden olan veya enfekte olmuş bitkilerde gelişen bakteriyel bir bitki patojenidir. Bitki

patojen bakterisi *Agrobacterium tumefaciens* doğal Ti plazmidinin bir kısmını (T-DNA) bitkiye transfer ederek bitkileri genetik olarak transforme etmektedir (Wang 1984).

Dronne vd. (1998), *in vitro* koşullarında yapılan denemede, beş lavandin çeşidini kullanarak, rejenerasyon ve gen aktarımı optimizasyonu yapmışlardır. Bu denemede 4 ay sonra '37-70' çeşidinde, her eksplanttan ortalama 7, diğer çeşitlerde 0.5-3.5 sürgün elde edilmiştir. *Agrobacterium*-mediated gen aktarım metodunda β -glucuronidase ve neomycin phosphotransferase II genleri kullanılmış olup, altı hafta sonra yaprak eksplantlarda, β -glucuronidase geninin ekspresyonu doğrulanmıştır. Ayrıca, kanamycine dayanıklı ortamda 6 hafta sonra kallus oluşumu görülmüştür. Certitude ve '41-70' and 'B-110' çeşidinde transformasyon frekans sırasıyla %3 ve %89 olarak kayıtlı edilmiştir.

Dronne vd. (1999), Lavandin bitkisinde *A. tumefaciens*'nin AGL1/GI, EHA105/GI and C58/GI hatları ile gen transferi ve ko-kültivasyon süresi uzatma denemesinde bir optimizasyon çalışması yapmışlardır. Sürgünler 150 mg/l⁻¹ kanamisinli ortamda köklendirilmiştir. Bu denemede 41 adet transgenik bitki elde edilmiştir. Transgenik bitkilerin teyidi gus analiz, pcr ve RT-PCR ile yapılmıştır.

Mishiba vd. (2000), *A. tumefaciens*'nin LBA4404 (pTOK233) hattıyla, yaptıkları gen aktarımı çalışmasında, *Lavandula latifolia* bitkisinin yaprak eksplantlarını 500 mg/l sefataksim içeren MS ortamında 7 gün bekletilmiş olup, daha sonra 50 mg/l higromisin ve 200 mg/l sefataksim içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Bu denemede higromisin'e dayanıklılık testi X-Gluc ile, histokimiyosal GUS analizi yapılmış; %90 başarı elde edilmiştir. Ayrıca sonuçların teyidi için PCR ve Southern blot analizi yapılmıştır.

Nebauer vd. (2000), *Lavandula latifolia* üzerinde yaptıkları denemede, 35-40 günlük yaprak ve hipokotil explantlarına, *A. tumefaciens*'nin EHA105 hattı ve *nptII* ile *gus int* genleri taşıyan kullanarak gen aktarım çalışmaları yapılmıştır. Bu denemede GUS, PCR ve southern hibridizasyon testi ile 24 bitkide gen aktarımının teyidi yapılmıştır.

Li vd. (2001), geniş spektrumlu herbisit glufosinate daynıklı nane bitkisi elde etmek amacıyla OCS-upstream-activating sekans (UAS)'nın trimer ile bağlı MAS promoter/activator region[(OCS)3MAS] içeren nopaline synthase (NOS) veya kimerik promoter taşıyan *A. tumefaciens* hattı kullanarak glufosinate-ammonium veya fosfinothricin (PPT)i inaktive yapan fosfonitricin asetiltransferaz (PAT) geni aktarmıştır. Araştırıcılar toplam 142 transgenik nane (cv. Black Mitcham) bitki elde etmiştir. İnceleme sonucunda, glufosinate herbicide Liberty sprey ile muamele edilmiş transgenik bitkiler, transgenik olmayan bitkilere göre daha az zarar görmüşlerdir. Elde edilen bitkilerden rasgele seçilmiş 35 bitkide PCR ile bar pozitif sonuç doğrulanmıştır.

Xing vd. (2006), *L. angustifolia* bitkisi rejenerasyon çalışmasında, *A. tumefaciens*'ile gen aktarımı optimizasyonu için hipokotil eksplantı 100 µM/L AS içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Daha sonra ko-kultivasyon yapmak için eksplantları 2-3 gün normal MS ortamında bekletilmiş olup, 200 mg/L sefataksim içeren MS ortamında gelişmeler takip edilmiştir. Aktarılan genlerin teyidi *GUS*, *GFP* ve PCR analizi ile yapılmış olup, %40 oranda başarı sağlanmıştır.

Munoz vd. (2008), nane (*Mentha spicata*) bitkisinden izole edilen ve geranyl difosfatdan limonen'ile katalize edilen *limonene synthase (LS)* genini *Lavandula latifolia* bitkisine aktarmışlardır. Bu denemede T₀ jenerasyondaki bitkilerin yapraklar ve ieklerde *LS* genin ekspresiyonu monoterpene pro. Le üretim üzerinde her hangi etki yapmamaktadır. Transgenik ve transgenik olmayan bitkilerin farklı büyüme aşamalarında toplanan yaprak örneklerde, geç yapraklarda yaşlı yapraklara göre daha fazla uc yağ oranı kayıd edilmiştir. Fakat her 2 bitki kıyaslayınca transgenik bitkilerde uc yağ oranında %450 artış gözlenmiştir. Başka monoterpenlerde belirgin miktarda farklılık görülmüştür. Kendilenen T₀ bitkilerden 2 yıl sonra T₁ bitki tohumu elde edilmiştir. *LS* geni ile transformasyona uğramış yüksek limonen taşıyan fenotipleri elde edilmiştir.

Tsuro vd. (2009), Lavandin bitkisinde yaptıkları gen aktarımı çalışmasında *Agrobacterium rhizogenes* içeren *pIG121-Hm* genini kullanmışlardır. Bu denemede ko-kultivasyonun beşinci gününde, yaprak ve kallus oluşturan yaprak eksplantları

alınarak, *p-Glucronidase (GUS)* analizi yapılmıştır ve kallus oluşturan yaprak eksplantlarında *GUS* analiz sonucu pozitif görülmüştür. En yüksek adventif sürgün oluşum oranı (%77.5), bitki büyüme düzenleyicilerine bağlı olarak, 0.02 mg/L CPPU içeren MS ortamında elde edilmiştir. Ayrıca bu denemede saçak kök eksplantında gen aktarımı yapmak için *A. rhizogenes* (%20.6) kullanmak, *A. tumefaciens*'den (%3.3) daha verimli olmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bitki Materyali

Bitki materyali olarak kullanılan *L. angustifolia* Miller subsp. *angustifolia* Miller ve *L. stoechas* L. subsp. *stoechas* L. bitkilerin tohumları Prof. Dr. Neşet ARSLAN, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölüm'ünden temin edilmiştir.

3.2 Besin Ortamı ve Kültür Koşulları

Hem *L. angustifolia*, hem de *L. stoechas* bitkisi için yapılan denemelerde %3 sukroz ve %0.65'lik agar (Duchefa, Holanda) ile katılaştırılan MS ortamı (Murashige ve Skoog 1962)(Çizelge 3.1) kullanılmıştır. Ortamların hazırlığında bidistile saf su kullanılmış olup, deneme ihtiyacına göre besin ortamlarına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, IAA, NAA, IBA, GA₃ ve Askorbik asit) ilave edilmiştir. Besin ortamlarının pH'ı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6–5.8'e ayarlanmış olup, Hirayama (Japon) markalı otoklavda 118 kPa basınç altında ve 121°C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Büyüme düzenleyicilerin stok solüsyonları uygun çözücülerde çözüldükten sonra bidistile saf su ile istenen miktarlarda ve oranlarda hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). Tüm kültürler 20000 lüks beyaz floresan ışığında (Philips daylight markası ve 36 w) 16 saat ışık fotoperiyodunda 24°C'de tutulmuştur. Sterilizasyon ve tüm doku kültürü işlemleri steril kabin içinde yürütülmüştür. Her muamele için, içerisinde 5 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü petri kutuları (100 x 10 mm) ya da magentalar (GA⁷) kullanılmıştır. Ortamların, magenta kaplarının ve saf suyun sterilizasyonu Hirayama (Japon) markalı otoklavda 118 kPa basınç altında ve 121°C'de 20 dakika tutularak yapılmıştır. Petri kutuları 160°C'de 2 saat Memmert (Almanya) markalı etüvde steril edilmiştir.

Çizelge 3.1 MS ortamında bulunan makro, mikro elementler ve vitaminlerin konsantrasyonları

Ortamda bulunan Makro Elementler	Kons. (mg l ⁻¹)	Ortamda bulunan Mikro Elementler	Kons. (mg l ⁻¹)	Ortamda bulunan Vitaminler	Kons. (mg l ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650	KI	0.83	Myo-Inositol	100.000
KNO ₃	1900	H ₃ BO ₃	6.20	Nicotinic Acid	0.500
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.300	Pyrotinic Acid	0.500
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.600	Thiamine-HCl	0.100
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250	Glycine	2.000
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025		
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025		
		FeSO ₄ .7H ₂ O	27.850		
		Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.250		

Çizelge 3.2 Kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüler ve saklama koşulları

Büyüme Düzenleyicileri	Çözücü	Saklama Koşulları (°C)
BAP	1 N NaOH	+4
IAA	1 N NaOH	+4
NAA	1 N NaOH	+4
IBA	1 N NaOH	+4
GA ₃	1 N NaOH	+4
Askorbik asit	H ₂ O	+4

3.3 Tohum Canlılık Testi

Hem *L. angustifolia*, hem de *L. stoechas* tohumları, 1 mg/ml hesabıyla hazırlanmış tetrazoliyom chloride çözeltisi ile muamele ederek 24 saat karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra tohumların kırmızı rengi incelenerek tohum canlılığı tespit edilmiştir. Canlılık testi için her 2 türden 200 tohum kullanılmıştır.

3.4 Tohumların *In vitro* Koşullarda Sterilizasyonu

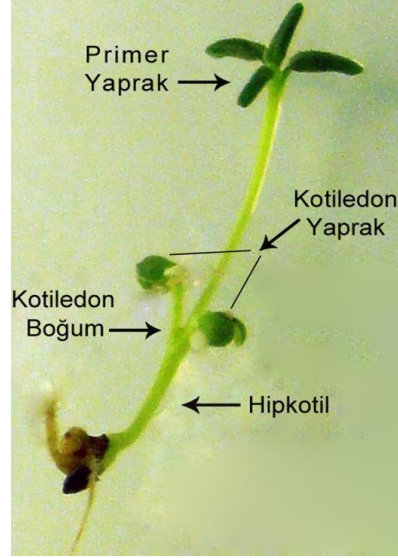
Hem *L. angustifolia* hemde *L. stoechas* tohumlarının yüzey sterilizasyonu, ticari çamaşır suyunun (Ace, Türkiye) % 5, 10, 15 ve 20'lik dozu ve her biri 3 farklı sürede (4, 7, 10 dk), oda sıcaklığında uygulanmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 5'er dk, 3 kez durulanmıştır. Tohum sterilizasyonu, steril edilmiş beher

ve manyetik karıştırıcı kullanarak yapılmıştır. Steril edilen 200'er adet tohum steril petri kapları içerisinde %3 sukroz içeren ve %0.65 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık fotoperiyodunda çimlendirilmiştir.

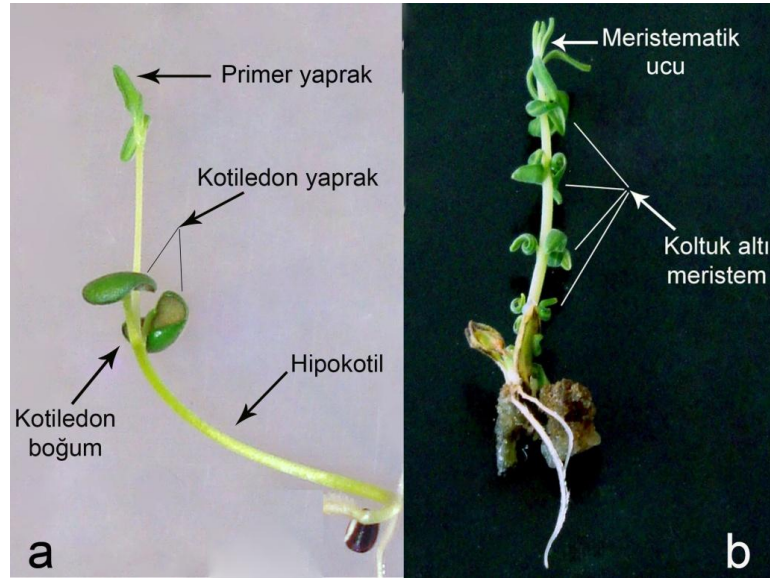
Ancak, *L. angustifolia* türünün çimlenmesinde güç görüldüğü için tohum çimlendirmek için ayrıca, 2 deneme kurulmuştur. Birinci denemede *L. angustifolia* tohumları steril ederek 24 saat, oda sıcaklığında 1 mg l^{-1} GA₃ içeren steril saf su içinde bekletilmiş olup, steril petri kapları içerisinde %3 sukroz içeren ve %0.65 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık fotoperiyodunda (Philips daylight markası ve 36 w) çimlendirilmiştir. İkinci denemede ise *L. angustifolia* tohumları steril edildikten sonra, kabinde kabuklarında çizgiler oluşturarak, steril petri kapları içerisinde %3 sukroz içeren ve %0.65 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık fotoperiyodunda çimlendirmeye alınmıştır.

3.5 Eksplant Seçimi

Steril edilen tohumlardan *L. stoechas* 5-6 gün sonra ve *L. angustifolia* bitkisi ise 23-25 gün sonra çimlenmiştir. Çimlendikten 10 gün sonra elde edilen *L. stoechas* ve *L. angustifolia* bitkiciklerinin adventif sürgün rejenerasyonu için primer yaprak, kotiledon yaprak ve hipokotil eksplantları ve mikroçoğaltım için kotiledon boğum, yukardan birinci, ikinci, üçüncü koltuk altı meristemleri ve meristematik ucu eksplantları kullanılmıştır (Şekil 3.1-3.2).



Şekil 3.1 *L. angustifolia* 10 günlük bitkisinden adventif sürgün rejenerasyonu için kotiledon yaprak, primer yaprak, hipokotil ve mikroçoğaltım için kotiledon boğumu eksplantlarının seçimi (orijinal)



Şekil 3.2 *L. stoechas*: a. 10 günlük bitkisinden adventif sürgün rejenerasyonu için kotiledon yaprak, primer yaprak, hipokotil ve mikroçoğaltım için kotiledon boğumu eksplantların seçimi, b. 40 günlük bitkisinden mikroçoğaltım için koltuk altı meristemleri ve meristematik uc eksplantların seçimi (orijinal)

3.6 Sürgünlerin Köklendirilmesi

In vitro koşullarda gelişen *L. stoechas* bitkilerin sürgünleri 5–6 cm uzunluğa geldiklerinde kesilerek, steril Magenta® kutuları içinde 1.00 mg^l⁻¹ IBA içeren MS ortamda köklendirilmiştir.

Buna karşı, *in vitro* koşullarda 5-6 cm gelişen *L. angustifolia* bitki sürgünleri kesilerek, steril Magenta® kutuları içinde 1.25 mg^l⁻¹ IBA içeren MS ortamda köklendirilmiştir.

Hem *L. angustifolia* hem de *L. stoechas* transgenik aday bitkileri yukarıda belirtilmiş ortamlara ilave olarak 50 mg^l⁻¹ kanamisin monosülfat ve 500 mg^l⁻¹ Augmentin kullanarak köklendirilmiştir.

3.7 Elde Edilen Köklenmiş *L. angustifolia* ve *L. stoechas* Bitkilerin Dış Şartlara Alıştırılması

3.7.1 Daimi daldırma sistemi

Bu çalışmada *in vitro* koşullarda çoğaltılmış bitkilerin kökleri, delinmiş ambalaj köpükleri içerisinden geçirilmiş olup, pH'sı 5.7-5.8 olan 200 ml sıvı MS ortam veya 1 mg/l GA₃, 1 mg/l IBA ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamında ayrı ayrı daldırılmıştır. Küflenme ve ortam eskilenmesini önlemek için sıvı kültür ortamları haftada bir kere yenilenmiştir. Ayrıca her deneme kabı içinde 10 adet bitki aktarılmış olup, 4 tekerrürlü şekilde 24±2°C altında ve yaklaşık 4000 lux 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda tutulmuştur.

3.7.2 Killi toprak ve hayvan gübre karışımı

Killi toprak ve hayvan gübresi 1:1 şekil de karıştırılmış olup, 160°C sıcaklığa, 2 saat steril edilmiştir. Bu karışım, alt kısımlarında drenaj için delikler bulunduran saksılara doldurulmuştur. Tüm saksılar tarla kapasitesine kadar sulanmış olup, her saksı

içerisinde 8 adet bitki, 5 tekerrürlü şekilde şaşırtılmıştır. Deneme $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ altında ve yaklaşık 4000 lux, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda yapılmıştır.

3.7.3 Kum

Kum, 160°C sıcaklıkta, 2 saat süre ile steril edilmiştir ve daha sonra saksılara aktarılmış olup, köklendirilmiş bitkiler şaşırtılmıştır. Her saksının alt kısmında drenaj için bir delik açılmıştır ve tarla kapistesine kadar sulanmıştır. Her saksı içinde 5 adet bitki olup, 8 tekerrürlü şekilde $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ altında ve yaklaşık 4000 lux, 16 saat ışık fotoperiyodunda tutulmuştur.

3.7.4 Perlit

Perlit yüksek oranda su emme özelliğine sahip olup, yüksek sıcaklıklarda hafifce hacimlenmektedir. Çalışmada kullanılacak perlit, 160°C sıcaklıkta, 2 saat süreyle steril edilmiş, drenaj için altında delikler bulunduran plastik saksılara aktarılmıştır. Daha sonra tarla kapistesine kadar sulanmıştır. Ayrıca, her saksı içinde 5 adet bitki olup, 8 tekerrürlü şekilde $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ altında ve yaklaşık 4000 lux, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda bırakılmıştır.

3.7.5 Kil ve torf karışımı

Kil ve torf 1:1 oranda karıştırılmış olup, 160°C sıcaklıkta ve 2 saat süreyle steril edilmiştir ve daha sonra plastik saksılara doldurulmuştur. Her saksının alt kısmında drenaj için delikler bulundurulmuş olup tarla kapistesine kadar sulanma yapılmıştır. Ayrıca, her saksı içinde 5 adet bitki olup, 8 tekerrürlü şekilde $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ altında ve yaklaşık 4000 lux, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda bırakılmıştır.

3.7.6 Torf

Torf 160°C sıcaklıkta 2 saat süre ile steril edilmiş ve daha sonra saksılara doldurulmuştur. Ayrıca saksılarda drenaj için delikler açılmış olup, her saksı tarla

kapistesine kadar sulanmıştır. Her saksı içinde 5 adet bitki olup, 8 tekerrürlü şekilde $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ altında ve yaklaşık 4000 lux, 16 saat ışık fotoperiyodunda tutulmuştur. Saksılara aktarılan bitkileri korumak amacıyla üzerinden şeffaf polietilen torbalar geçirilmiş olup, bitki adaptasyonu sağlanmıştır. Polietilen torbalar sürekli olarak her gün bir kaç dakika küf önlemek ve havalandırma amacıyla açılmıştır. Ayrıca, aşırı bitki transpirasyonunu önlemek amacıyla saksılar direk güneş ışığından uzak tutulmuş, iklim odasında $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Daha sonra, gelişen bitkiler poşetten çıkartılmış olup, %45 nem ve oda sıcaklığında 4 hafta büyümeleri takip edilmiştir.

Bitkiler şaşırtılmadan önce, bitki yatağının 8 farklı yerinden rastgele 15-30 cm derinlikten toprak örnekler alınmış, temiz plastik kovada karıştırılmıştır. Daha sonra, karıştırılmış topraktan 1 kg örneği Ankara, Yenimahalle, Toprak Gübre Araştırma Enstitüsüne toprak analizi için gönderilmiştir. Ayrıca bitki yatağı önerilen şekilde hazırlanmış olup, yabancı otlar el ile temizlenmiştir. Daha sonra, toprak tırmıkla düz hale getirilip ve çizgili çapa ile 40×40 cm olarak sıra arası ve sıra üstü mesafe tutulmuştur. İklim odasında gelişen bitkileri tarlaya şaşırtmak için 15 cm genişlik ve 20 cm derinlikte olan delikler açılmış olup, deliklerin içine tarla kapistesine kadar su doldurulmuştur ve toprak 2-3 saat bekletilmiştir. İklim odasında gelişen bitkilerin tarlaya şaşırtılırken bitkileri dikmek amacıyla açılan deliklerin derinlik ve genişlikle beraber toprağının tarla kapistesinde olduğu kontrol edilmiştir. Daha sonra bitkiler dik şekilde konulmuş olup, dikilmiştir. Ayrıca, bitkiler toprağa şaşırtılırken köklere zarar vermemeye çalışılmıştır. Bitkileri dikildikten sonra, etrafında buharlaşmayı engellemek için saman örtüsü konulmuştur. Sulama ilk 10 gün her akşam ve daha sonra bitkilerdeki gelişme ve büyüme dikkate alınarak her 7 günde bir yapılmıştır. Bitkilerin gelişmesini sağlamak ve toprağın havandırılması için iki haftada bir yabancı ot mücadelesi yapılmıştır.

3.8 Meteorolojik Gözlemler

Hem transgenik hem de transgenik olmayan bitkilerin, alıştırma sürecine uzun yılların (2000-2010) ortalama sıcaklık (Çizelge 3.3) ve 2011 (Ocak-Temmuz) 'in aylık ortalama

en düşük, en fazla ve ortalama sıcaklık, nisbi nem ve toplam yağış (Çizelge 3.4) ile ilgili meteorolojik gözlemler Meteoroloji Genel Müdürlüğü Ankara'dan alınmıştır.

Çizelge 3.3 2000-2010 yıllarının, aylık ortalama sıcaklık ile ilgili meteorolojik veriler *

YIL/AY	Ock	Şub	Mar	Nis	May	Haz	Tem	Ağu	Eyl	Eki	Kas	Ara
2000	-3.4	-1.1	4.5	13.0	15.5	19.8	26.5	22.8	18.9	12.2	8.7	2.2
2001	3.0	4.1	11.5	12.6	14.8	21.9	26.3	24.7	20.8	13.2	6.9	2.5
2002	-3.8	5.0	8.6	10.4	16.7	20.8	24.8	22.5	18.3	13.3	8.0	-0.8
2003	5.4	-0.3	3.2	10.3	19.0	22.6	23.5	24.3	18.0	14.4	8.0	1.9
2004	0.2	2.4	7.2	11.5	15.8	20.0	23.6	22.9	19.3	14.2	7.2	2.3
2005	3.5	2.5	6.1	11.6	16.6	19.5	25.0	25.4	18.7	10.8	6.1	3.0
2006	-1.7	0.4	7.5	13.1	16.6	21.6	23.2	27.2	18.2	13.6	5.6	1.1
2007	1.2	2.5	7.3	9.6	21.0	23.1	27.3	26.7	21.2	***	***	2.0
2008	-3.9	0.2	10.3	14.0	16.0	22.3	25.2	27.2	20.1	13.3	8.7	2.1
2009	2.6	4.2	5.5	11.4	16.2	22.6	24.0	23.7	18.5	16.6	7.4	5.4
2010	3.1	6.5	8.5	12.2	18.4	21.5	26.2	28.4	22.5	12.2	11.2	6.1

* Meteoroloji Genel Müdürlüğü, Ankara

Çizelge 3.4 2011 (Ocak-Temmuz) 'in aylık ortalama en düşük, en fazla ve ortalama sıcaklık, nisbi nem ve toplam yağış ile ilgili meteorolojik veriler *

	Aylık en düşük sıcaklık ortalamaları	Aylık en fazla sıcaklık ortalamaları	Ortalama sıcaklık	Ortalama nisbi nem	Toplam yağış
Ocak	-0.1	5.4	2.4	78.5	42.0
Şubat	-1.0	7.9	3.2	69.8	24.3
Mart	1.2	11.2	6.0	67.1	57.5
Nisan	5.6	15.0	10.0	65.6	50.1
Mayıs	9.8	21.2	15.2	62.3	73.1
Haziran	13.1	26.4	19.7	55.4	44.4
Temmuz	17.2	32.5	25.6	42.7	10.7

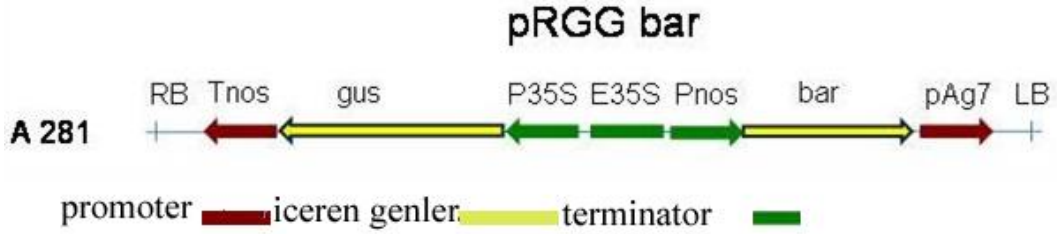
* Meteoroloji Genel Müdürlüğü, Ankara

3.9 Bakteri Materyali

Hem *L. angustifolia* hem de *L. stoechas* bitkileri için yapılan gen aktarımı çalışmalarında *Agrobacterium tumefaciens*'nin GV2260::p35 gus int ve LBA 4404::pRGGbar hatları kullanılmıştır.

A. tumefaciens GV2260 (p35S GUS-INT): *NPT-II* geni NOS promotör ve terminatör, GUS intron geni ise 35S promotör ve terminatör dizileri tarafından kontrol edilmektedir.

A. tumefaciens LBA 4404 pRGGbar: hem gus hem de bar geni taşımaktadır. GUS gen Tnos promotör ve P35S terminator ve BAR geni ise pAg7 promotör ve Pnos terminator tarafından kontrol edilmektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 pRGGbar gen haritası

3.10 Bakteri Kültürlerinin Saflaştırılması ve Büyütülmesi

Sıvı bakteri kültürlerinin çoğaltılmasına, NA besin ortamında büyütülmüş olan bireysel kolonilerden başlanmış, tek koloniler steril lup ile alındıktan sonra gerekli antibiyotikleri içeren NB (Sigma Chemical Co St Lo, Mo) bakteri büyütme ortamına konulmuştur. Daha sonra bakteri kültürleri çalkalamalı inkübatörde, 190 devir/d (rpm: revolution per minute) ve 28°C'lik sıcaklıkta 1 ya da 2 gün süreyle büyütülmüştür. Bu kültürler daha sonra gen aktarımında kullanılmıştır. Yeniden bireysel koloniler elde edebilmek için çok az miktarda bakteri kültürü agarlı besin ortamı üzerine steril bir lupla yayılmış, bu kültürleri içeren petri kutuları ters çevrilerek 28°C'de inkübe edilmiş olup, 2 gün içinde kolonilerin oluştuğu gözlenmiştir. Herhangi bir bulaşmayı önlemek için bütün bakteriyel çalışmalar laminar flow kabin içerisinde yapılmıştır.

3.11 Antibiyotikler

Bakteri büyütme ortamlarına ilave edilmeden önce her antibiyotik, 0.45µ Millex şırınga ile kullanılan mikro filtreler (Millipore, MA, ABD) kullanılarak steril edilmiş ve

otoklavdan çıktıktan sonra ısısı 40–45°C'ye düşmüş olan ortamlara ilave edilmiştir. Bu amaçla kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonlar çizelge 3.5 ve 3.6'de verilmiştir. GV2260 p35GUS-INT ve LBA 4404 pRGGbar bakteri hatları büyütülürken ortama 50 mg/l rifampisin, 50 mg/l kanamisin monosülfat eklenmiştir. Rifampisin, metanol, kanamisin monosülfat ise su ile çözüldükten ve filtre sterilizasyonundan sonra stok çözeltiler -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.5 *A. tumefaciens* hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları

Antibiyotikler	Kullanım oranları (mg/l)	Stok (mg/ml)	Çözücüler	Saklama koşulları (°C)
Rifampisin*	100	50	Metanol	-20
Kanamisin monosülfat**	100	50	su	-20

*, ** Sigma-Aldrich Chemical Co, St Lo MO

Çizelge 3.6 Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları

Antibiyotikler	Stok solüsyon (mg/l)	Kullanılan konsantrasyon	Çözücü	Saklama koşulları (°C)
Kanamisin monosülfat	50	50	Su	-20
Augmentin*	100	500	Su	-20

*Glaxo-SmithKline İstanbul, Türkiye

3.12 Bakteri Kültürlerinin Kısa ve Uzun Süreli Korunması

A. tumefaciens kültürleri, seçici antibiyotikler içeren 5–10 ml NB (Lab-Lemco Powder 1.0 g/l; maya özü (yeast extract) 2.0 g/l; Pepton 5.0 g/l; Sodyum klorit 5.0 g/l) ortamında bir gece 28°C'de 150 devir/d (rpm)'da inkübatörde (Lab-therm-İsviçre) büyütülmüştür. Kısa süre için kullanılmak amacıyla NA (Nutrient Agar - Sigma Aldrich chemical Co. St. Lo. Mo) içeren ortamda çizilerek 28°C'de büyütülmüştür ve daha sonra elde edilen bakteri kültürleri streç film ile sarılmış, ters çevrilen petri kutularında 4°C'de 6 hafta korunmuştur.

Daha uzun süreli muhafaza işlemi eşit miktarda bakteri kültürü ve %40 gliserol içeren NB (Nutrient Broth - Sigma Aldrich chemical Co. St. Lo. Mo), 2 ml'lik kriyogenik tüplerde karıştırıldıktan sonra sıvı azotla hızlı bir şekilde dondurulup, -80°C'de muhafaza edilmiştir. Bu yolla bakteri kültürlerinin canlılığını 10 yıl boyunca muhafaza etmek mümkündür (Frank ve Simione, 1998).

3.13 Gen Aktarılmış Bitkilerin Belirlenmesi

Seçici rejenerasyon ortamlarında gelişen transgenik aday *L. angustifolia* ve *L. stoechas* bitkilerinin sürgünleri, kanamisin monosülfat içeren besin ortamında köklendirildikten sonra saksılara aktarılmıştır. Bu bitkilerin transgenik olup, olmadıkları histokimyasal GUS analizi ile teyit edilmiştir.

Histokimyasal GUS analizi Jefferson (1987)'in tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Bitki dokuları 100 mM sodyum fosfat (pH=7.0), 10 mM EDTA, %0.1 Triton X-100 ve 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) içeren solüsyonda 37°C'de 12-24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler %95 etanolda yıkanmış olup, transgenik dokularında mavi renk ve bölgeleri gözlenmiştir.

3.14 PCR

Dış koşullarda alıştırılmış *L. angustifolia* ve *L. stoechas* bitkilerinden örnekler alınarak, DNA izolasyonu ve GUS için PCR, Xing vd. (2006)'nin yaptığı yöntem ile yapılmıştır.

3.15 Transgenik Aday *L. angustifolia* ve *L. stoechas* Bitkilerin Adaptasyonu ve Tarlaya Şaşırtılması

Transgenik olmayan bitkilerin adaptasyonunu yaparken torfun en iyi substrat olduğu belirlendiği için transgenik aday bitkilerin adaptasyonunda da, torf 160°C sıcaklıkta 2 saat süre ile steril edilmiş, saksılara doldurulmuştur. Ayrıca saksılarda drenaj için delikler açılarak, tarla kapistesine kadar sulanmıştır. Her saksı içinde 5 adet bitki olup, 8 tekerrürlü şekilde 24±2°C altında ve yaklaşık 4000 lux, 16 saat ışık fotoperiyodunda

tutulmuştur. Saksılara aktarılan transgenik aday bitkileri korumak amacıyla üzerinden şeffaf polietilen torbalar geçirilmiş olup, adaptasyon sağlanmıştır. Polietilen torbalar sürekli olarak her gün bir kaç dakika küf önlemek ve havalandırma amacıyla açılmıştır. Ayrıca, aşırı bitki transpirasyonunu önlemek amacıyla saksılar direk güneş ışığından uzak tutulmuş, iklim odasında $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Daha sonra, gelişen transgenik aday bitkiler pöşetten çıkartılmış olup, %40-45 nem ve oda sıcaklığında 4 hafta büyümeleri takip edilmiştir. Transgenik aday bitkiler şaşırtılmadan önce, bitki yatağının 8 farklı yerinden rastgele 15-30 cm derinlikten toprak örnekler alınmış, temiz plastik kovada karıştırılmıştır. Daha sonra, karıştırılmış topraktan 1 kg örneği Ankara, Yenimahalle, Toprak Gübre Araştırma Enstitüsüne, toprak analizi için gönderilmiştir. Ayrıca bitki yatağı önerilen şekilde hazırlanmış olup, yabancı otlar el ile temizlenmiştir. Daha sonra, toprak tırmıkla düz hale getirilip ve çizgili çapa ile 40×40 cm olarak sıra arası ve sıra üstü mesafe tutulmuştur. İklim odasında gelişen transgenik aday bitkileri tarlaya şaşırtmak için 15 cm genişlik ve 20 cm derinlikte olan delikler açılmış olup, deliklerin içine tarla kapistesine kadar su doldurulmuştur ve toprak 2-3 saat bekletilmiştir. İklim odasında gelişen bitkilerin tarlaya şaşırtılırken bitkileri dikmek amacıyla açılan deliklerin derinlik ve genişlikle beraber toprağının tarla kapistesinde olduğu kontrol edilmiştir. Daha sonra, transgenik aday bitkiler dik şekilde konularak, dikilmiştir. Ayrıca, transgenik aday bitkiler toprağa şaşıtırılırken köklere zarar vermemeye çalışılmıştır. Bitkileri dikildikten sonra, etrafında buharlaşmayı engellemek için saman örtüsü konulmuştur. Sulama ilk 10 gün her akşam ve daha sonra transgenik aday bitkilerdeki gelişme ve büyüme dikkate alınarak her 7 günde bir yapılmıştır. Transgenik aday bitkilerin gelişmesini sağlamak ve toprağın havandırılması için iki haftada bir yabancı ot mücadelesi yapılmıştır.

3.16 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Hem *L. angustifolia* hem de *L. stoechas* bitkisi için yapılan rejenerasyon ve köklenme denemeleri 3 tekerrürlü olarak Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre kurulmuştur.

Her iki türün transgenik olmayan ve transgenik aday bitkilerin adaptasyon denemelerinde ise 8 tekerür ve her tekerürde 5 bitki kullanılmıştır. Elde edilen verilerin varyans analizi

için SPSS for Windows 17 bilgisayar programı kullanılmıştır. Gerektiğinde, muamele ortamlarını karşılaştırmak amacıyla MSTAT-C bilgisayar programı kullanılmıştır. Muamele ortamlarının (değişkenlerin) 3-6 arası olduğunda LSD, 7-15 arasında Duncan ve ≤ 16 için ise Tukeys'b testi kullanılmıştır. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce arcsin değerlerine çevirilmiştir (Snedecor ve Cochran, 1967).

Çizelge 4.1 Farklı çamaşır suyu oran ve uygulama süreleri sonucunda *L. angustifolia* tohumlarının çimlenme ve bulaşıklığı ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları

VK	SD	Çimlenme oranı (%)	
		KO	F
Uygulama Süresi x Çamaşır Suyu Oranı	11	100.00	1.50
Hata	24	66.67	
Genel Toplam	35		

Çizelge 4.2 Farklı çamaşır suyu oranı ve uygulama süreleri sonucunda *L. angustifolia* tohumlarının çimlenme ve bulaşıklığı ile ilgili sonuçları

Muamele		Çimlenme oranı (%)
Süre (dk)	Çamaşır suyu oranı (%)	
10	20	0.00
7	20	0.00
4	20	6.67
10	15	6.67
7	15	0.00
4	15	0.00
10	10	0.00
7	10	6.67
4	10	13.33
10	5	13.33
7	5	0.00
4	5	13.33

Tetrazolium testi

Tetrazolium testi, doku kültürü çalışmalarını kolayca devam ettirmek için, ayrıca, yüksek miktarda tohum çimlenmesi ve fazla miktarda steril bitki elde etmesinde, kolaylık sağlamaktadır. Yukarıda belirtilmiş sonuçlarda *L. angustifolia* bitkisinin tohumlarında düşük çimlenme rastlanmıştır. Dolayısıyla, tohumların canlılığı tespit etmek amacıyla tetrazolium testi sonucunda tohumlarda %90-95 canlılığı tespit edilmiştir. Yüze steril edilmiş tohumlardaki çimlenme düşüklüğün sebebi tohumlarda dormansi olduğu düşünülmüştür ve dormansi kırmak amacıyla iki deneme kurulmuştur. Birinci denemede *L. angustifolia* tohumları steril edilerek 24 saat, oda sıcaklığında 1 mg^l-1 GA₃ içeren steril saf su içinde bekletilmiş olup, steril petri kapları içerisinde %3

sukroz içeren ve %0.65 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık fotoperiyodunda çimlendirilmiştir. Ancak, her hangi çimlenme görülmemiştir.

İkinci denemede ise *L. angustifolia* tohum kabuklarını çizerek, steril petri kapları içerisinde %0.65 agar ile katılaştırılan, %3 sukroz içeren MS besin ortamında $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık fotoperiyodunda çimlendirmiştir. Deneme sonucunda tohum çimlenme yüzdesinde belirgin artış görülmemiş olup, çimlenme %10-15 arasında değişmiştir.

Dolayısıyla, denemede kullanılacak tohumların çimlenmesi için çizilmemiş tohumlar kullanmış olup, MS ortam tercih edilmiştir.

4.2 *L. angustifolia* Bitkisinin Doku Kültürü Çalışmaları

4.2.1 Farklı BAP, NAA ve GA_3 dozların *L. angustifolia* bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *L. angustifolia*'nın *in vitro* koşullarda 3-4 haftada çimlenen 10 günlük bitkiciklerden elde edilen primer yaprak eksplantları kullanılmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta adventif sürgün rejenerasyonu görülmemiş olup, kallus oluşumu ve sürgün primordiaları gözlenmiştir. Ancak, kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüşlerdir. On iki hafta sonra, primordialar üzerinde her hangi bir gelişme gözlenmemiştir. Ayrıca, eksplantların taban kısımlarında nekrosis izlenmiştir. Elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelge'de görüldüğü gibi ortamların kahve yeşil ve kahve renkli kallus oluşum oranları üzerinde ortamlar arasında 0.01 düzeyinde farklı etki görülmüştür. Nekrotik kallus oluşum oranı üzerinde ortamların her hangi etkisi bulunmamıştır. Farklılığın önem düzeyini tespit etmek amacıyla Tukey's-b testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar çizelge 4.4'de verilmiştir. *L. angustifolia*, primer yaprak eksplantı rejenerasyonundan elde edilen kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-60.00 arası görülmüş olup, en fazla %60 kahve-yeşil renkli kallus oluşum oranı 0.25 mg/l BAP, 1.25 mg/l NAA ve 1.00 mg/l GA_3 (Şekil 4.2.a) içeren MS ortamında gözlenmiştir.

Ayrıca, çizelgeye göre farklı oranlarda NAA, BAP ve GA₃ içeren MS ortamında kahve renkli kallus oluşum oranı %26.67-100.00 arası değişmiştir. En fazla %100 kahve renkli kallus oluşum oranı, 0.25 mg/l BAP- 1 mg/l GA₃; 0.25 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA- 1 mg/l GA₃; 0.25 mg/l BAP- 0.50 mg/l NAA- 1 mg/l GA₃; 0.25 mg/l BAP- 0.75 mg/l NAA- 1 mg/l GA₃ (Şekil 4.2.b); 0.25 mg/l BAP- 1 mg/l NAA- 1 mg/l GA₃; 1.25 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA- 1 mg/l GA₃; 1.50 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA- 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamlarında görülmüştür.

Çizelge 4.3 *L. angustifolia* bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

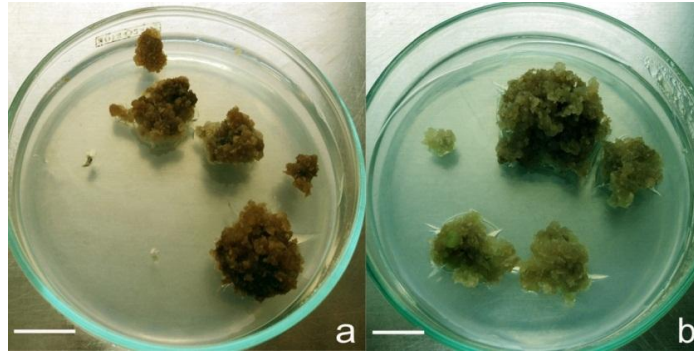
VK	SD	Kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)		Nekrotik kallus oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	17	1427.45	3.71**	1647.06	3.59**	59.69	0.89
Hata	36	385.18		459.26		66.67	
Genel Toplam	53						

** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.4 *L. angustifolia* bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Ortam			Kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)**	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)**	Nekrotik kallus oluşum oranı (%)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)			
0.25	0.00	1.00	0.00 e	100.00 a	0.00
0.25	0.25	1.00	0.00 e	100.00 a	0.00
0.25	0.50	1.00	0.00 e	100.00 a	0.00
0.25	0.75	1.00	0.00 e	100.00 a	0.00
0.25	1.00	1.00	0.00 e	100.00 a	0.00
0.25	1.25	1.00	60.00 a	26.67 d	13.34
0.25	1.50	1.00	40.00 abcd	53.34 bcd	6.67
0.25	1.75	1.00	40.00 abcd	60.00 abcd	0.00
0.25	2.00	1.00	53.34 ab	46.67 cd	0.00
0.00	0.25	1.00	13.34 cde	86.67 abc	0.00
0.25	0.25	1.00	0.00 e	100.00 a	0.00
0.50	0.25	1.00	0.00 e	86.67 abc	13.34
0.75	0.25	1.00	46.67 abc	53.34 bcd	0.00
1.00	0.25	1.00	6.67 de	93.34 ab	0.00
1.25	0.25	1.00	0.00 e	100.00 a	0.00
1.50	0.25	1.00	0.00 e	100.00 a	0.00
1.75	0.25	1.00	0.00 e	93.34 ab	0.00
2.00	0.25	1.00	20.00 bcde	80.00 abc	0.00

** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.2 Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri.

a. 0.25 mg/l BAP, 0.75 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında kahve-yeşil renkli kallus oluşumu ve b. 0.25 mg/l BAP, 1.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında kahve renkli kallus oluşumu (bar a, b ≈1.43 cm)

4.2.2 Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *L. angustifolia*'nın *in vitro* koşullarda 3-4 haftada çimlenen 10 günlük bitkiciklerden elde edilen kotiledon yaprak eksplantları kullanılmıştır. Sekiz hafta sonra farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ içeren MS kültür ortamlarından elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir. Ancak, kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüşlerdir. Elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.5'de verilmiştir. Çizelge de görüldüğü gibi ortamların kahve renkli kallus ve nekrotik kallus oluşum oranı üzerinde 0.01 düzeyinde farklı etkiler görülmüştür. Farklılık derecesini tespit etmek amacıyla Tukey's b testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelgeye göre farklı oranlarda NAA, BAP ve GA₃ içeren MS ortamlarında kahve renkli kallus oluşum oranı %26.67-100.00 arasında değişmiştir. En fazla (%100) kahve renkli kallus oluşum oranı, 0.25 mg/l BAP- 1.75 mg/l NAA- 1 mg/l GA₃ ve 1.50 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA- 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamları dışında, her ortamda görülmüştür (Şekil 4.3.a). Ayrıca, eksplantlarda nekroz oluşum oranı %0-73.33 arası değişmiş olup, sadece 1.50 mg/l BAP, 0.25 mg/l NAA ve 1.00 mg/l GA₃ içeren MS ortamında görülmüştür (Şekil 4.3.b).

Çizelge 4.5 *L. angustifolia* bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

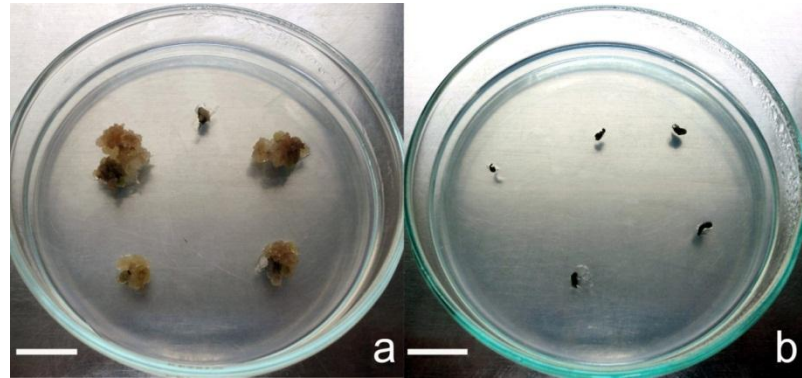
VK	SD	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)		Nekroz oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Ortam	17	894.12	60.35**	896.30	121.00**
Hata	36	14.81		7.41	
Genel Toplam	53				

** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.6 *L. angustifolia*, kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Ortam			Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)**	Nekroz oluşum oranı (%)**
BAP(mg/l)	NAA(mg/l)	GA(mg/l)		
0.25	0.00	1.00	100.00 a	0.00 b
0.25	0.25	1.00	100.00 a	0.00 b
0.25	0.50	1.00	100.00 a	0.00 b
0.25	0.75	1.00	100.00 a	0.00 b
0.25	1.00	1.00	100.00 a	0.00 b
0.25	1.25	1.00	100.00 a	0.00 b
0.25	1.50	1.00	100.00 a	0.00 b
0.25	1.75	1.00	93.34 a	0.00 b
0.25	2.00	1.00	100.00 a	0.00 b
0.00	0.25	1.00	100.00 a	0.00 b
0.25	0.25	1.00	100.00 a	0.00 b
0.50	0.25	1.00	100.00 a	0.00 b
0.75	0.25	1.00	100.00 a	0.00 b
1.00	0.25	1.00	100.00 a	0.00 b
1.25	0.25	1.00	100.00 a	0.00 b
1.50	0.25	1.00	26.67 b	73.33 a
1.75	0.25	1.00	100.00 a	0.00 b
2.00	0.25	1.00	100.00 a	0.00 b

** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.3 Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri.

a. 0.25 mg/l BAP, 1.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında kahve renkli kallus oluşumu ve b. 1.50 mg/l BAP, 0.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında nekroz oluşumu (bar a, b ≈1.66 cm)

4.2.3 *L. angustifolia* bitkisinin Hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyon için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 3-4 haftada çimlenen 10 günlük bitkiciklerden elde edilen hipokotil eksplantları kullanılmıştır. Sekiz hafta sonra farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ içeren MS ortamında eksplantlar üzerinde her hangi adventif sürgün rejenerasyonu görülmemiştir. Ancak, kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüşlerdir. Elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.7’de verilmiştir. Çizelge’de görüldüğü gibi kahve-yeşil ve kahve renkli kallus oluşum oranı bakımından ortamlar 0.01 düzeyine farklılık göstermişlerdir. Fark düzeyini tespit etmek amacıyla yapılan Tukey’s-b testi sonuçlar çizelge 4.8’da verilmiştir. Sonuçlara göre kahve-yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-13.33 arasında gözlenmiş olup, en fazla %13.33 kahve-yeşil renkli kallus oluşumu, 0.25 mg/l BAP, 2.00 mg/l NAA ve 1.00 mg/l GA₃ içeren MS ortamında görülmüştür (Şekil 4.4.b). Ayrıca, kahve renkli kallus oluşum oranı %86.67-100.00 arası değişmiş olup, 0.25 mg/l BAP - 0.50 mg/l NAA - 1 mg/l GA₃ ve 0.25 mg/l BAP - 2 mg/l NAA - 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamları dışında tüm ortamlarda %100 kahve renkli kallus oluşum görülmüştür (Şekil 4.4.a).

Çizelge 4.7 *L. angustifolia* bitkisinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

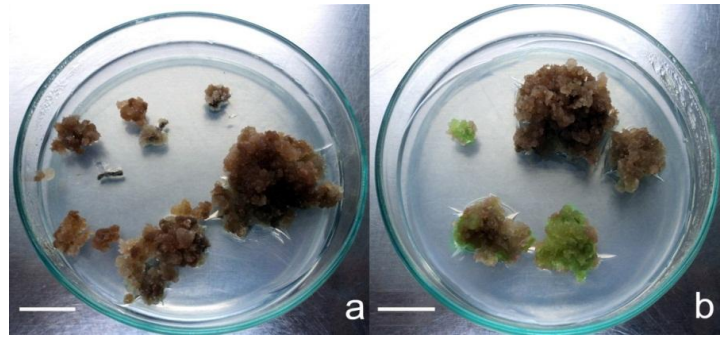
VK	SD	Kahve-Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Ortam	17	35.29	2.38**	35.29	2.38**
Hata	36	14.81		14.81	
Genel Toplam	53				

** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.8 *L. angustifolia* bitkisinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Ortam			Kahve-Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)**	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)**
BAP(mg/l)		GA(mg/l)		
0.25	0.00	1.00	0.00 b	100.00 a
0.25	0.25	1.00	0.00 b	100.00 a
0.25	0.50	1.00	6.67 b	93.33 a
0.25	0.75	1.00	0.00 b	100.00 a
0.25	1.00	1.00	0.00 b	100.00 a
0.25	1.25	1.00	0.00 b	100.00 a
0.25	1.50	1.00	0.00 b	100.00 a
0.25	1.75	1.00	0.00 b	100.00 a
0.25	2.00	1.00	13.33 a	86.67 b
0.00	0.25	1.00	0.00 b	100.00 a
0.25	0.25	1.00	0.00 b	100.00 a
0.50	0.25	1.00	0.00 b	100.00 a
0.75	0.25	1.00	0.00 b	100.00 a
1.00	0.25	1.00	0.00 b	100.00 a
1.25	0.25	1.00	0.00 b	100.00 a
1.50	0.25	1.00	0.00 b	100.00 a
1.75	0.25	1.00	0.00 b	100.00 a
2.00	0.25	1.00	0.00 b	100.00 a

** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.4 Hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri.

a. 0.25 mg/l BAP, 1.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında kahve renkli kallus oluşumu ve b. 0.25 mg/l BAP, 2.00 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında kahve-yeşil renkli kallus oluşumu (bar a, b ≈1.66 cm)

4.2.4 *L. angustifolia* bitkisinin Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyon için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri

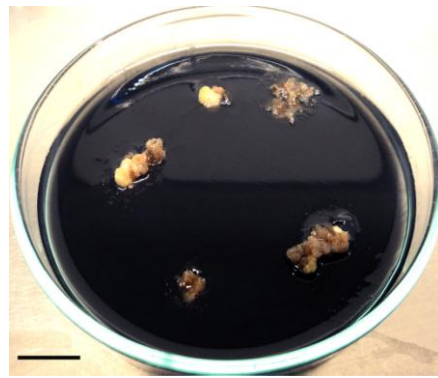
Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 3-4 haftada çimlenen 10 günlük bitkiciklerden elde edilen kotiledon yaprak eksplantları farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiş olup, bazı ortamlarda gelişmeyen sürgün uçlar görülmüştür (Şekil 4.5). Ancak, kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüşlerdir. Elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.9’de verilmiştir. Çizelge de görüldüğü gibi ortamların hem yeşil renkli kallus oluşum oranı, hem de kahve renkli kallus oluşum oranlar üzerinde farklı etkileri bulunmamıştır. Çizelge 4.10’da görüldüğü gibi yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-33.33 arası değişmiştir. Ayrıca, kahve renkli kallus oluşum oranı %66.67-100.00 arası değişmiştir.

Çizelge 4.9 *L. angustifolia* bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

VK	SD	Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Ortam	17	490.20	0.88	490.20	0.88
Hata	36	555.56		555.56	
Genel Toplam	53				

Çizelge 4.10 *L. angustifolia* bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri

Ortam				Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)
BAP(mg/l)	NAA(mg/l)	GA(mg/l)	Aktif kömür (g/l)		
0.50	0.00	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	1.00	1.00	4.00	33.33	66.67
0.50	1.50	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	2.00	1.00	4.00	33.33	66.67
0.50	2.50	1.00	4.00	33.33	66.67
0.50	3.00	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	3.50	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	4.00	1.00	4.00	0.00	100.00
0.00	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
1.00	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
1.50	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
2.00	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
2.50	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
3.00	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
3.50	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
4.00	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00



Şekil 4.5 Kotiledon yaprak eksplantından farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür içeren ortamlarında yukarıda belirtildiği gibi sürgün uçların oluşumu (bar ≈1.66 cm)

4.2.5 Farklı BAP, NAA ve GA₃ dozları ile aktif kömürün *L. angustifolia* bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu

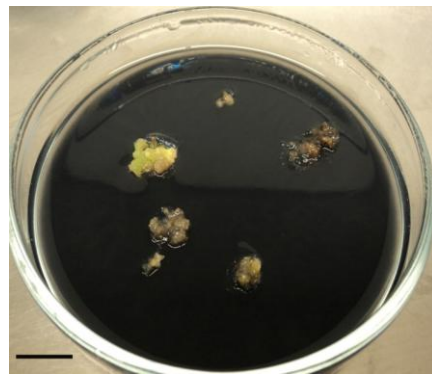
Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 3-4 haftada çimlenen 10 günlük bitkiciklerden elde edilen primer yaprak eksplantları farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlarda kallus oluşum gözlenmiş olup, nekroz oluşum başlamıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiş olup, bazı ortamlarda gelişmeyen sürgün uçlar görülmüştür (Şekil 4.6). Elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.11’de verilmiştir. Hemen hemen tüm ortamlarda yeşil renkli kallus oluşumu veya kahve renkli kallus oluşum üzerinde ortamların benzer etkisi bulunmuş olup, her hangi farklılık görülmemiştir. Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-33.33 arası ve kahve renkli kallus oluşum oranı %66.67-100.00 arası değişmiştir.

Çizelge 4.11 *L. angustifolia* bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

VK	SD	Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Ortam	17	347.28	0.92	347.28	0.92
Hata	36	377.78		377.78	
Genel Toplam	53				

Çizelge 4.12 *L. angustifolia* bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri

Ortam				Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)
BAP(mg/l)		GA(mg/l)	Aktif kömür (g/l)		
0.50	0.00	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	1.00	1.00	4.00	33.33	66.67
0.50	1.50	1.00	4.00	33.33	66.67
0.50	2.00	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	2.50	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	3.00	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	3.50	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	4.00	1.00	4.00	0.00	100.00
0.00	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
0.50	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
1.00	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
1.50	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
2.00	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
2.50	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
3.00	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00
3.50	0.50	1.00	4.00	6.67	93.33
4.00	0.50	1.00	4.00	0.00	100.00



Şekil 4.6 Primer yaprak eksplantından farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür içeren ortamlarında yukarıda belirtildiği gibi sürgün uçların oluşumu (bar ≈1.66 cm)

4.2.6 Farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamda *L. angustifolia* bitkisinin kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım

Farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamda mikroçoğaltım yapmak amacıyla *in vitro* koşullarda 3-4 haftada çimlenen 10 günlük bitkiciklerden elde edilen kotiledon boğum eksplantları kullanılmıştır. Tüm eksplantlarda kallus oluşumu gözlenmiştir, ancak, sekiz hafta sonra kalluslar üzerinde farklı oranda kahveleşme görülmüştür. Sekiz hafta sonra elde edilmiş verilerinden yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.13’de verilmiştir. Çizelgeye göre sürgün oluşum oranı ve kahve renkli kallus oluşum oranı bakımından ortamlar arasında 0.05 düzeyine farklılık görülmüş olup, gelişen sürgünler arasında bir farklılık görülmemiştir. Bu farklılığın önem düzeyini tespit etmek amacıyla Tukey’s-b testi sonuçları çizelge 4.14’te verilmiştir. Sonuçlara göre kahve renkli kallus oluşum oranı %0-86.67 arası değişmiştir. En fazla %86.67 kahve renkli kallus oluşum oranı, hem 2.00 mg/l BAP- 0.02 mg/l NAA hem de 3.00 mg/l BAP- 0.02 mg/l NAA içeren MS ortamlarında görülmüştür. Kotiledon boğum eksplantı rejenerasyonundan elde edilen sürgün oluşum oranı %13.34-100 arası gözlenmiş olup, en fazla %100 sürgün oluşum oranı 2.00 mg/l BAP içeren MS ortamında görülmüştür (Şekil 4.7. a,b). Ayrıca, ortalama sürgün sayısı 1.84-8.07 adet arası ve ortalama sürgün uzunluğu 0.47-1.39 cm arasında değişmiştir.

Çizelge 4.13 *L. angustifolia* bitkisinin kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

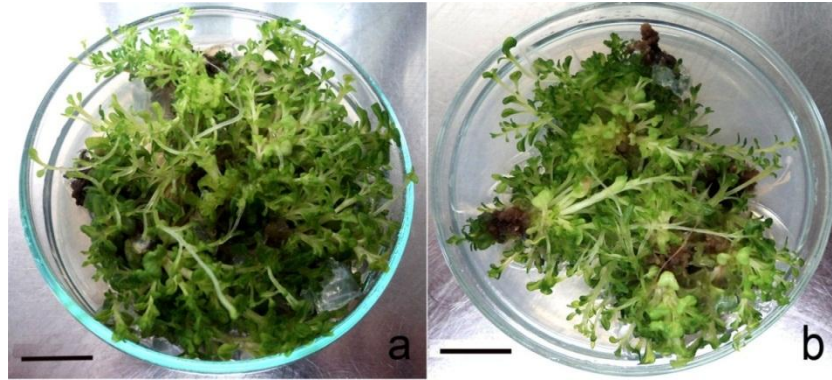
VK	SD	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)		Ortalama sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	14	1559.36	2.22*	850.16	2.29*	12.64	1.19	0.26	1.04
Hata	30	702.22		371.22		10.62		0.25	
Genel Toplam	44								

* p<0.05 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.14 *L. angustifolia* bitkisinin kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri

Ortam		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)*	Sürgün oluşum oranı (%)*	Eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)	Ortalama sürgün uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)				
0.50	0.00	26.67 bc	73.34 ab	8.00	1.33
0.50	0.01	46.67 abc	53.34 abc	4.00	1.39
0.50	0.02	60.00 ab	40.00 bc	3.78	0.90
1.00	0.00	46.67 abc	53.34 abc	4.67	1.15
1.00	0.01	53.34 ab	46.67 bc	7.50	1.16
1.00	0.02	40.00 abc	60.00 abc	7.90	1.36
2.00	0.00	0.00 c	100.00 a	8.07	1.13
2.00	0.01	53.34 ab	46.67 bc	5.84	1.23
2.00	0.02	86.67 a	13.34 c	1.84	0.47
3.00	0.00	53.34 ab	46.67 bc	5.92	1.29
3.00	0.01	46.67 abc	53.34 abc	7.39	1.15
3.00	0.02	86.67 a	13.34 c	2.50	0.55
4.00	0.00	60.00 ab	40.00 bc	5.34	0.81
4.00	0.01	73.34 ab	26.67 bc	3.78	0.82
4.00	0.02	80.00 a	20.00 c	4.34	0.73

* Aynı sütun daki harfler 0.05 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.7 Kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım.

a. 2.00 mg/l BAP içeren MS ortamında *L. angustifolia* bitkisinde kotiledon boğum eksplantı üzerinde sürgün rejenerasyonu ve b. 0.50 mg/l BAP içeren MS ortamında sürgün ve kahve renkli kallus oluşumu ile sürgün rejenerasyonu (bar a, b ≈1.66 cm)

4.2.7 Farklı oranda IBA içeren MS ortamlarının kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi

L. angustifolia bitkisinin kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için farklı oranda IBA içeren MS ortam kullanılmıştır. Sekiz hafta sonra köklenme ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları çizelge 4.15’de verilmiştir. Çizelge’de görüldüğü gibi kök oluşum oranı bakımından ortamlar arasında 0.05 düzeyinde farklılık görülmüşken, kök uzunluğu ve bitki boyu bakımından ortamlar arasında her hangi farklılık görülmemiştir. Farklı oranlarda IBA içeren MS ortamında elde edilen kök oluşum oranı %33.34-91.67 arası değişmiştir (Çizelge 4.16). En fazla %91.67 kök oluşum oranı (%), 1.25 mg/l IBA içeren MS ortamında görülmüştür. Ayrıca kök uzunluğu sonucu elde edilen veriler 1.35- 2.33 cm arası değişmiş olup, 2.33 cm’lik en uzun kök 1.25 mg/l IBA içeren MS ortamında görülmüştür. Kök gelişimi bitki boyunu da etkilemiştir ve istatistiksel olarak önemsiz olmasına rağmen en uzun bitki boyu 3.07-5.70 cm arası değişmiştir. Ortalama en uzun bitkiler 5.70 cm olup, 1.25 mg/l IBA içeren MS ortamında görülmüştür (Şekil 4.8. a,b).

Çizelge 4.15 *L. angustifolia*, kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünleri köklendirmek için kullanılan farklı IBA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

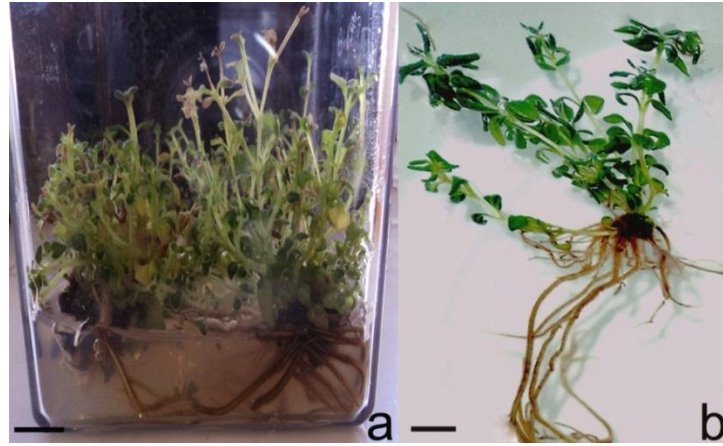
VK	SD	Kök oluşum oranı (%)		Kök uzunluğu (cm)		Bitki boyu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	2	2986.11	4.78*	0.83	4.16	5.29	1.41
Hata	6	625.00		0.20		3.77	
Genel Toplam	8						

* p<0.05 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.16 *L. angustifolia*, kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünleri köklendirmek için kullanılan farklı IBA dozlarının etkileri

Ortam IBA (mg/l)	Kök oluşum oranı (%)*	Kök uzunluğu (cm)	Bitki boyu (cm)
0.75	33.34 b	1.35 b	3.07
1.00	41.67 b	1.50 ab	4.06
1.25	91.67 a	2.33 a	5.70

* Aynı sütun daki harfler 0.05 düzeyinde LSD testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.8 Kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirmek için kullanılan farklı IBA dozlarının etkisi.

a, b. 1.25 mg/l IBA içeren MS ortamında gelişen bitkiler (bar a, b \approx 1.5 cm)

4.2.8 Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu

1) Daimi daldırma sistem

Denemede 40 bitki kullanılmıştır. Doku kültürü koşullarında geliştirilmiş bitkiler 200 ml sıvı MS veya 1 mg/l GA₃ ve 1 mg/l IBA içeren sıvı MS ortama dik şekilde tutulması bitkilerde olumsuz etki göstermiş olup, gelişmelerine engel olmuştur. Ayrıca bitkilerin taban kısmında kararırma ve çürüme gözlenmiş olup, tüm bitkiler 10-30 gün içinde ölmüştür (Şekil 4.9.a).

2) Killi toprak ve hayvan gübre karışımı

Denemede 40 bitki kullanılmıştır. Killi ve hayvan gübresinin 1:1 karışımında şaşırılan tüm bitkilerin köklerinde, ilk önce yanma ve daha sonra bitkilerin nekrozla berber ölümü görünmüştür (Şekil 4.9.c).

3) Kum

Denemede 40 bitki kullanılmıştır. Kumun su tutma kapasitesi çok düşük olmasından dolayı köklendirilmiş bitkiler besin maddeleri ve su eksikliğinden gelişmemiş olup ölmüşlerdir. (Şekil 4.9.d).

4) Perlit

Denemede 40 bitki kullanılmıştır. Perlit, genel olarak süs bitkileri ve yarı çalimsı bitkileri köklendirmek için en uygun ortam olarak değerlendirilmektedir. Bu denemede bitkiler aktarıldıktan sonra perlit ıslatılmış olup ve güneşin direkt etkisinden uzak tutulmuştur; fakat elde edilen tüm bitkiler 6-7 gün içerisinde kararmayla berber ölmüşlerdir (Şekil 4.9.e).

5) Kil ve torf karışımı

Denemede 40 bitki kullanılmıştır. Kil ve torf karışımına aktarılan tüm bitkiler 3-6 gün içerisinde ölmüştür. Torpakta yüksek miktarda su birikimi, bitkilerin alt kısmında kahveleşme, kararma ve daha sonra tüm bitkilerin ölümüne sebep olmuş olarak düşünülmektedir (Şekil 4.9.f).

6) Torf

Denemede 40 bitki kullanılmıştır. Bu çalışmada torf, bitki şaşirtmak için en uygun ortam olarak değerlendirilmiştir. 160°C sıcaklıkta ve 2 saat süre ile steril edilmiş torfta en iyi gelişimi sağlayan bitkilerin, oda sıcaklığında ve poşet içerisinde gelişmeleri takip edilmiştir. Daha sonra, poşetten çıkartılmış olup, %45 nem ve oda sıcaklığında büyümesini 4 hafta takip ederek (Şekil 4.9.b), 40 bitkiden 23 bitki tarlaya şaşirtılmıştır. Bitkileri şaşirtmadan önce bitki yatağının 8 farklı yerinden rastgele 15-30 cm derinlikten toprak örnekler alınmış, temiz plastik kovada karıştırılmıştır. Daha sonra, karıştırılmış topraktan 1 kg örneği Ankara, Yenimahalle, Toprak Gübre Araştırma

Enstitüsüne analiz için gönderilmiş olup, Sonuçlarına göre su ile doymuşluk %53.00, EC 1.24 ds/m, toplam tuz %0.04, su ile doymuş toprakta pH 7.56, kireç %5.18, fosfor 13.73 kg/da, potasyum 174.67 kg/da, organik madde %1.34, toplam azot %0.07 ve organik karbon %0.78 olarak bulunmuştur.

İklim odasında gelişen bitkileri tarlaya şaşırtılırken, dikmek amacıyla açılan deliklerin derinlik ve genişlikle beraber toprağının tarla kapistesinde olduğu kontrol edilmiştir. Bitkiler dikildikten sonra, etrafında buharlaşmayı engellemek için saman ortusu konulmuştur. İlk 10 gün her akşam verilen su, bitkiler üzerinde olumlu etki yapmıştır ve bitkiler hızlı şekilde büyümeye başlamışlardır. Daha sonra, her 7 günde bir sulamanın, bitki gelişmesinde herhangi olumlu etkisi görülmemiştir. Benzer şekilde bitkilerin gelişmesini sağlamak ve toprağın havandırılması için iki haftada bir yabancı ot mücadelesinin de bitkiler üzerinde pozitif etkileri görülmüştür. Tüm adaptasyon denemeleri için toplam 240 *L. angustifolia* bitkisi kullanılmıştır. Ancak, adaptasyon sağladığı ve şaşırtılmış 23 bitkiden 18 bitki halen tarla koşullarında yaşamaya devam etmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.9 Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu.

a. Daimi daldırma sistem, b. Torf, c. Killi toprak ve hayvan gübre karışımı, d. Kum, e. Perlit, f. Kil ve torf karışımı



Şekil 4.10 Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu, tarladaki *L. angustifolia*

4.3 *L. angustifolia* Bitkisinde Gen Aktarım Çalışmaları

4.3.1 *A. tumefaciens*'nin GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı

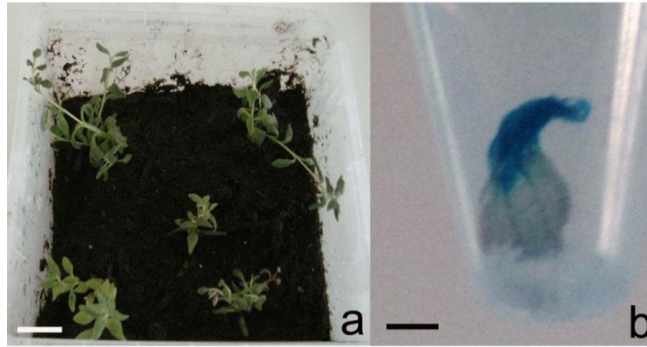
In vitro koşullarda gelişen 5 haftalık *L. angustifolia* bitkiciklerden alınan meristematik ucu eksplantları *A. tumefaciens*'in GV2260 p35 GUS INT hattı ile 30 dk muamele edildikten sonra 24 saat MS ortamda kokültivasyon yapılmıştır. Daha sonra, eksplantlar 50 mg/l kanamisin monosülfat ile 500 mg/l Augmentin içeren MS seleksiyon ortamına kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra, elde edilen sürgünler 1.25 mg/l IBA, 50 mg/l kanamisin monosülfat ve 500 mg/l Augmentin içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Sekiz hafta sonra transgenik aday sürgünlerde köklenme görülmüştür. Bu denemede toplam 8 magenta ve her magentada 5 eksplant kullanılmış olup, elde edilen 40 bitki ortalama kök oluşumu, kök uzunluğu ve bitki boyu verileri çizelge 4.17'de verilmiştir. Daha sonra, köklenen transgenik aday bitkiler 160°C sıcaklıkta ve 2 saat süre ile steril edilmiş torf içeren saksılara aktarılmış olup, (Şekil 4.11.a) oda sıcaklığında ve poşet içerisinde gelişmeleri takip edilmiştir. Bitkilerde belirgin gelişmeler gözlemlendiğinde poşetler uzaklaştırılmış olup, %45 nem ve oda sıcaklığında adaptasyonuna bırakılmıştır. Adaptasyon sonucunda, 40 adet transgenik aday bitkilerden yalnız 5 adet bitki gelişmiş olup, tarlaya şaşırtılmıştır. Şaşırtmadan önce bitki yatağının toprak analizi Ankara, Yenimahalle, Toprak Gübre Araştırma Enstitüsü'nden yaptırılmıştır. Sonuçlara göre su ile doymuşluk %67.00, EC 1.18 ds/m, toplam tuz %0.05, su ile doymuş toprakta pH

7.82, kireç %4.60, fosfor 9.63 kg/da, potasyum 224.79 kg/da, organik madde %1.13, toplam azot %0.06 ve organik karbon %0.66 olarak bulunmuştur.

Tarlaya şaşırtılmış 5 transgenik aday bitkiden, 3 bitki zayıf olduğundan, ayrıca bitki yatağı azot oranının az olması ve uyumsuz hava koşullarından dolayı ölmüştür; 2 bitki halen tarla da yaşamaya devam etmektedir. Yaklaşık 2 ay sonra tarladaki bitki yatağında gelişen bitkilerden yaprak örnekleri alınarak yapılan *GUS* analizi sonucunda, üzerinde mavi renk veya bölgeler tespit edilmiştir (Şekil 4.11.b).

Çizelge 4.17 *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarılmış köklenen *L. angustifolia* bitkilerinin ortalama verileri

Gen hatları	Toplam kullanılan eksplant sayısı (adet)	Ortalama kök oluşum oranı (%)	Ortalama kök uzunluğu (cm)	Ortalama bitki boyu (cm)
GV2260 p35 GUS INT	40	75	2.09	4.08



Şekil 4.11 *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı. a. köklenen transgenik aday bitkilerin adaptasyonu, b. yaprak örnekleri alınarak yapılan *GUS* analizi sonucu (bar a \approx 1.66, b \approx 1 cm)

4.3.2 *A. tumefaciens*'nin LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı

In vitro koşullarda gelişen 5 haftalık *L. angustifolia* bitkiciklerden alınan meristematik ucu eksplantları *A. tumefaciens*'in LBA 4404 pRGGbar hattı ile 30 dk muamele

edildikten sonra 24 saat MS ortamda kokültivasyon yapılmıştır. Daha sonra, eksplantlar 50 mg/l kanamisin monosülfat, 2.5 mg/l fosfotrisin ile 500 mg/l Augmentin bakteriostatik içeren MS seleksiyon ortamına kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra, elde edilen sürgünler 1.25 mg/l IBA, 50 mg/l kanamisin monosülfat, 2.5 mg/l fosfotrisin ve 500 mg/l Augmentin içeren MS ortamında köklendirilmiştir. İki hafta sonra, sürgünlerde belirgin şekilde adventif kök oluşumu gözlenmiştir. Bu denemede toplam 8 magenta ve her magentada 5 eksplant kullanılmış olup, elde edilen 40 bitki ortalama kök oluşumu, kök uzunluğu ve bitki boyu verileri çizelge 4.18'de verilmiştir. Daha sonra, köklenen transgenik aday bitkiler 160°C sıcaklıkta ve 2 saat süre ile steril edilmiş torf içeren saksılara aktarılmış olup, oda sıcaklığında ve poşet içerisinde gelişmeleri takip edilmiştir. Bitkilerde belirgin gelişmeler gözlemlendiğinde poşetler uzaklaştırılmış olup, %45 nem ve oda sıcaklığında adaptasyona bırakılmıştır. Adaptasyon sonucunda, 40 adet transgenik aday bitkilerden 13 adet bitki gelişmiş olup, tarlaya şaşırtılmıştır (Şekil 4.12.a).

Şaşırtmadan önce bitki yatağının toprak analizi Ankara, Yenimahalle, Toprak Gübre Araştırma Enstitüsü'nden yaptırılmıştır. Sonuçlara göre su ile doymuşluk %67.00, EC 1.18 ds/m, toplam tuz %0.05, su ile doymuş toprakta pH 7.82, kireç %4.60, fosfor 9.63 kg/da, potasyum 224.79 kg/da, organik madde %1.13, toplam azot %0.06 ve organik karbon %0.66 olarak bulunmuştur.

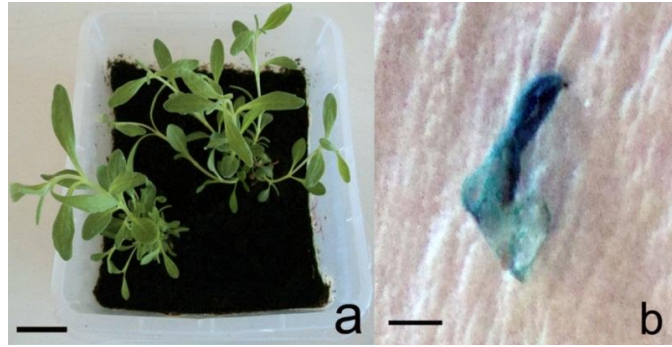
Tarlaya şaşırtılmış 13 transgenik aday bitkiden, 8 bitki zayıf olduğundan, ayrıca bitki yatağı azot oranının az olması ve uyumsuz hava koşullarından dolayı ölmüştür; 5 bitki halen tarlada yaşamaya devam etmektedir (Şekil 4.13.b). Yaklaşık 2 ay sonra tarladaki bitki yatağında gelişen bitkilerden yaprak örnekleri alınarak yapılan *GUS* analizi sonucunda, üzerinde mavi renk veya bölgeler tespit edilmiştir (Şekil 4.12.b).

Çizelge 4.18 *A. tumefaciens* LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarılmış köklenen *L. angustifolia* bitkilerinin ortalama verileri

Gen hatları	Toplam kullanılan eksplant sayısı (adet)	Ortalama kök oluşum oranı (%)	Ortalama kök uzunluğu (cm)	Ortalama bitki boyu (cm)
LBA 4404 pRGGbar	40	85	2.23	4.91

4.3.3 PCR sonuçları

Elde edilen bitkilerde PCR ile GUS geni, pozitif sonucu doğrulanmamıştır. Bunun sebebi aktarılan genlerin ekstra kromozomal olup, kromozomlarla entegrasyonunun sağlanmamasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.12 *A. tumefaciens* LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı. a. köklenen transgenik aday bitkilerin adaptasyonu, b. yaprak örnekleri alınarak yapılan GUS analizi sonucu (bar a \approx 1.66, b \approx 1 cm)



Şekil 4.13 *A. tumefaciens* LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı, saksıda ve tarladaki transgenik aday *L. angustifolia* bitkiler

4.4 *L. stoechas* Bitkisinde Yüzey Sterilizasyon

Tohumlarının yüzey sterilizasyon için 4, 7, 10 dk süre ve % 5, 10, 15 ve 20 oranda ticari çamaşır suyu (Ace, Türkiye) kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 5'er dk, 3 kez durulanmış olup, 200'er adet tohum steril petri kapları içerisinde %3 sukroz içeren ve %0.65 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık 8 saat karanlık fotoperiyodunda inkübe edilmiştir. İki hafta sonra tohumlar üzerinde gelişen mantar veya bakteri bulaşıklığı ve çimlenme oranı ile ilgili verilerin varyans analizi yapılmıştır (Şekil 4.14, Çizelge 4.19).



Şekil 4.14 MS ortamında çimlenen *L. stoechas* tohumları (bar ≈ 1.2 cm)

L. stoechas bitkisinde yapılan one way varyans analizi sonucunda farklı muameleler (uygulama süresi x çamaşır suyu oranı) sonucunda tüm uygulamalar arasında çimlenme oranı bakımından 0.05 düzeyinde farklılık görülürken, bulaşıklık oranı bakımından herhangi farklılığı görülmemiştir. Farklılık derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.20'de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi farklı muameleler sonucundan elde edilen çimlenme oranı %46.67–100.00 arasında değişmiştir (Şekil 4.14). En fazla (%100) çimlenme 7 dk, %20 çamaşır suyu ve 10 dk, %5 çamaşır suyu muamele sonucunda elde edilmiştir. En fazla %40 bulaşık oranı 4 dk, %20 çamaşır suyu ve 10 dk, %10 çamaşır suyu ile sterilizasyon sonucunda görülmüştür. Çizelge'de görüldüğü gibi hem tohumların çimlenme, hem de bulaşıklık oranında bir tutarsızlık görülmektedir. Tutarsızlığın sebebi yüzey sterilizasyonundan ziyade, tohumların fizyolojik durumundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.19 Farklı çamaşır suyu oran ve uygulama süreleri sonucunda *L. stoechas* bitkisi tohumlarının çimlenme ve bulaşıklığı ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları

VK	SD	Çimlenme oranı (%)		Bulaşıklığın oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Uygulama Süresi x Çamaşır Suyu	11	1417.17	2.45*	714.14	1.84
Hata	24	577.78		388.89	
Genel Toplam	35				

* p<0.05 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.20 Farklı çamaşır suyu oran ve uygulama süreleri sonucunda *L. stoechas* tohumlarının çimlenme ve bulaşıklığı ile ilgili sonuçları

Muamele		Çimlenme oranı (%)*	Bulaşık oranı (%)
Süre (dk)	Çamaşır suyu oranı (%)		
10	20	80.00 ab	20.00 ab
7	20	100.00 a	0.00 b
4	20	46.67 b	40.00 a
10	15	46.67 b	33.33 ab
7	15	86.67 ab	13.33 ab
4	15	60.00 ab	33.33 ab
10	10	53.33 ab	40.00 a
7	10	46.67 b	26.67 ab
4	10	93.33 ab	0.00 b
10	5	100.00 a	0.00 b
7	5	93.33 ab	6.67 ab
4	5	80.00 ab	20.00 ab

* Aynı sütun daki harfler 0.05 düzeyinde Duncan testine göre farklı grupları göstermektedir

4.5 *L. stoechas* Bitkisinde Doku Kültürü Çalışmaları

4.5.1 *L. stoechas* bitkisinde Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyon için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerinden elde edilen primer yaprak eksplantları farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta adventif sürgün rejenerasyonu

görülmemiş olup, kallus oluşumu ve sürgün primordiaları gözlenmiştir. Ayrıca, kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüşler. On iki hafta sonra, primordialar üzerinde her hangi gelişme gözlenmemiştir. Elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.21’de verilmiştir. Sonuçlara göre yeşil renkli kallus, kahve-yeşil renkli kallus ve kahve renkli kallus oluşum oranı bakımından ortamlar arasında 0.01 düzeyinde farklılık gözlenmiş olup, derecesini tespit etmek amacıyla Tukey’s-b testi yapılmıştır (Çizelge 4.22). Sonuçlara göre, farklı oranlarda NAA ve BAP içeren MS ortamında elde edilen Yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-100 arası değişmiş olup, en fazla yeşil renkli kallus oluşumu 0.25 mg/l BAP- 1.25 mg/l NAA (Şekil 4.15.b), 0.25 mg/l BAP- 1.50 mg/l NAA; 0.25 mg/l BAP- 2.00 mg/l NAA; 0.50 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA; 0.75 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA; 1.25 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA; 2.00 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında görülmüştür. Ayrıca, eksplantlar üzerinde kahve-yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-93.34 arası görülmüş olup, en fazla kahve-yeşil renkli kallus oluşumu 0.25 mg/l BAP ve 0.75 mg/l NAA içeren MS ortamında gözlenmiştir (Şekil 4.15.a). Kahve renkli kallus oluşum oranı ise %0-66.67 arasında değişmiştir. En fazla %66.67 kahve renkli kallus oluşumu, 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında görülmüştür.

Çizelge 4.21 *L. stoechas* bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

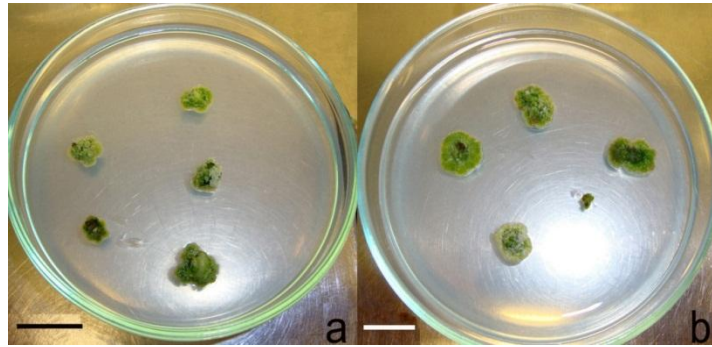
VK	SD	Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve-Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	17	2694.99	9.33**	1447.06	97.67**	1603.49	5.55**
Hata	36	288.89		14.81		288.89	
Genel Toplam	53						

** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.22 *L. stoechas* bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri

Ortam		Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)**	Kahve-Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)**	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)**
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)			
0.25	0.00	40.00 bc	0.00 b	60.00 ab
0.25	0.25	33.34 c	0.00 b	66.67 a
0.25	0.50	80.00 a	0.00 b	20.00 c
0.25	0.75	0.00 d	93.34 a	6.67 c
0.25	1.00	66.67 ab	0.00 b	33.34 bc
0.25	1.25	100.00 a	0.00 b	0.00 c
0.25	1.50	100.00 a	0.00 b	0.00 c
0.25	1.75	93.34 a	6.67 b	0.00 c
0.25	2.00	100.00 a	0.00 b	0.00 c
0.00	0.25	40.00 bc	0.00 b	60.00 ab
0.25	0.25	33.34 c	0.00 b	66.67 a
0.50	0.25	100.00 a	0.00 b	0.00 c
0.75	0.25	100.00 a	0.00 b	0.00 c
1.00	0.25	80.00 a	0.00 b	20.00 c
1.25	0.25	100.00 a	0.00 b	0.00 c
1.50	0.25	93.34 a	0.00 b	6.67 c
1.75	0.25	86.67 a	0.00 b	13.34 c
2.00	0.25	100.00 a	0.00 b	0.00 c

** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.15 Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri

a. 0.25 mg/l BAP, 0.75 mg/l NAA içeren MS ortamında kahve-yeşil renkli kallus oluşumu ve b. 0.25 mg/l BAP, 1.25 mg/l NAA içeren MS ortamında yeşil renkli kallus oluşumu (bar a, b ≈1.85 cm)

4.5.2 Hipokotil eksplantından farklı BAP ve NAA dozları ile adventif sürgün rejenerasyonu

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen hipokotil eksplantları farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta adventif sürgün rejenerasyonu görülmemiş olup, kallus oluşumu ve sürgün primordiaları gözlenmiştir. Ayrıca, kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüşler. On iki hafta sonra, primordialar üzerinde her hangi gelişme gözlenmemiştir. Elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.23’de verilmiştir. Sonuçlar incelediğinde, yeşil renkli kallus, kahve yeşil renkli kallus ve kahve renkli kallus oluşum oranı bakımından ortamlar arasında 0.01 düzeyinde farklılık gözlenmiştir. Farklılık düzeyini tespit etmek amacıyla Tukey’s-b testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar çizelge 4.24’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamından elde edilen yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-100 arası değişmiş olup, en fazla %100 yeşil renkli kallus oluşum oranı 0.25 mg/l NAA; 0.50 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA; 0.75 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA; 1.00 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA; 1.25 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA (Şekil 4.16.b), 1.50 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA; 1.75 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA; 2.00 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında görülmüştür. Ayrıca, kahve-yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-100 arası görülmüş olup, en fazla %100 kahve-yeşil renkli kallus oluşum oranı 0.25 mg/l BAP- 0.50 mg/l NAA; 0.25 mg/l BAP- 0.75 mg/l NAA; 0.25 mg/l BAP- 1.00 mg/l NAA; 0.25 mg/l BAP- 1.25 mg/l NAA; 0.25 mg/l BAP- 1.75 mg/l NAA içeren MS ortamında gözlenmiştir. Kahve renkli kallus oluşum oranı ise %0-80.00 arası değişmiştir. En fazla %80.00 kahve renkli kallus oluşumu 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında görülmüştür (Şekil 4.16.a).

Çizelge 4.23 *L. stoechas* bitkisinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

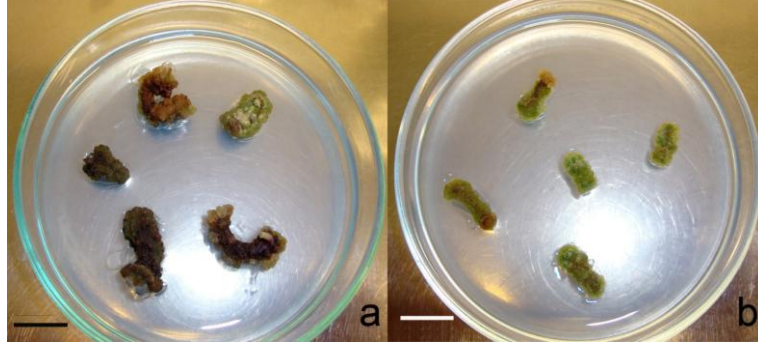
VK	SD	Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve-Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	17	6200.00	26.16**	6203.47	29.91**	1702.83	57.47**
Hata	36	237.04		207.41		29.63	
Genel Toplam	53						

** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.24 *L. stoechas* bitkisinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri

Ortam		Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)**	Kahve-Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)**	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)**
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)			
0.25	0.00	20.00 cd	0.00 d	80.00 a
0.25	0.25	33.34 c	0.00 d	66.67 b
0.25	0.50	0.00 d	100.00 a	0.00 c
0.25	0.75	0.00 d	100.00 a	0.00 c
0.25	1.00	0.00 d	100.00 a	0.00 c
0.25	1.25	0.00 d	100.00 a	0.00 c
0.25	1.50	40.00 c	60.00 b	0.00 c
0.25	1.75	0.00 d	100.00 a	0.00 c
0.25	2.00	66.67 b	33.34 c	0.00 c
0.00	0.25	100.00 a	0.00 d	0.00 c
0.25	0.25	33.34 c	0.00 d	66.67 b
0.50	0.25	100.00 a	0.00 d	0.00 c
0.75	0.25	100.00 a	0.00 d	0.00 c
1.00	0.25	100.00 a	0.00 d	0.00 c
1.25	0.25	100.00 a	0.00 d	0.00 c
1.50	0.25	100.00 a	0.00 d	0.00 c
1.75	0.25	100.00 a	0.00 d	0.00 c
2.00	0.25	100.00 a	0.00 d	0.00 c

** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.16 Hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri.
a. 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında kahve renkli kallus ve b. 1.25 mg/l BAP, 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında yeşil renkli kallus oluşumu (bar a, b ≈1.66 cm)

4.5.3 Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyon için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen kotiledon yaprak eksplantı farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre tüm eksplantlar üzerinde kallus oluşumu gözlenmiş olup bazı eksplantlar üzerinde sürgün uçları gözlenmiştir. Ayrıca kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüşlerdir. On iki hafta sonra, sürgün uçları üzerinde her hangi gelişme gözlenmemiştir. Elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.25’de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi yeşil renkli kallus, kahve-yeşil renkli kallus ve kahve renkli kallus oluşum oranı bakımından ortamlar arasında 0.01 düzeyinde farklılık görülmüş olup, düzeyini ispat etmek amacıyla Tukey’s-b testi yapılmıştır (Çizelge 4.26). Çizelgeye göre farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamlarından elde edilen yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-100 arası değişmiş olup, en fazla %100 yeşil renkli kallus oluşumu 0.25 mg/l BAP- 1.50 mg/l NAA (Şekil 4.17.b), 0.50 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA, 1.00 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA, 1.25 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA, 1.50 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA, 1.75 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA, 2.00 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında görülmüştür. Kahve-yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-100 arası görülmüş olup, en fazla %100 kahve-yeşil renkli kallus oluşumu 0.25 mg/l BAP- 0.50 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP- 1.00 mg/l NAA,

0.25 mg/l BAP- 1.25 mg/l NAA (Şekil 4.17.a) içeren MS ortamında gözlenmiştir. Kahve renkli kallus oluşum oranı ise %0-66.67 arası değişmiştir. En fazla %66.67 kahve renkli kallus oluşum oranı, 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamlarında görülmüştür.

Çizelge 4.25 *L. stoechas* bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

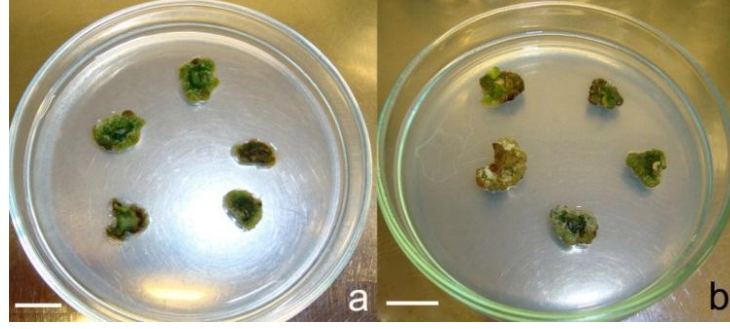
VK	SD	Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve-Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	17	6046.62	12.18**	5039.22	7.24**	761.66	3.81**
Hata	36	496.30		696.30		200.00	
Genel Toplam	53						

** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.26 *L. stoechas* bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri

Ortam		Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)**	Kahve-Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)**	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)**
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)			
0.25	0.00	0.00 d	33.34 cde	66.67 a
0.25	0.25	0.00 d	86.67 ab	13.34 b
0.25	0.50	0.00 d	100.00 a	0.00 b
0.25	0.75	0.00 d	86.67 ab	13.34 b
0.25	1.00	0.00 d	100.00 a	0.00 b
0.25	1.25	0.00 d	100.00 a	0.00 b
0.25	1.50	100.00 a	0.00 e	0.00 b
0.25	1.75	46.67 bc	53.34 abcd	0.00 b
0.25	2.00	86.67 ab	13.34 de	0.00 b
0.00	0.25	26.67 cd	73.34 abc	0.00 b
0.25	0.25	0.00 d	86.67 ab	13.34 b
0.50	0.25	100.00 a	53.34 abcd	0.00 b
0.75	0.25	46.67 bc	0.00 e	0.00 b
1.00	0.25	100.00 a	0.00 e	0.00 b
1.25	0.25	100.00 a	0.00 e	0.00 b
1.50	0.25	100.00 a	0.00 e	0.00 b
1.75	0.25	100.00 a	0.00 e	0.00 b
2.00	0.25	100.00 a	0.00 e	0.00 b

** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.17 Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri.
a. 0.25 mg/l BAP, 1.25 mg/l NAA içeren MS ortamında kahve-yeşil renkli kallus oluşumu ve b. 0.25 mg/l BAP, 1.50 mg/l NAA içeren MS ortamında yeşil renkli kallus oluşumu (bar a, b ≈1.66 cm)

4.5.4 Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyon için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacı ile *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen primer yaprak eksplantı farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre yalnız 0.25 mg/l BAP ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında eksplantlar üzerinde kallus ve adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Ayrıca, kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüşlerdir. Varyans analizi (Çizelge 4.27) sonuçlarında görüldüğü gibi sürgün oluşum oranı, sürgün ucu oluşum oranı, eksplant başına ortalama sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasında 0.01 düzeyinde ve kahve renkli kallus ve yeşil renkli kallus oluşum oranı bakımından ortamlar arasında 0.05 düzeyinde farklılık gözlenmiştir. Çizelge 4.28’de görüldüğü gibi primer yaprak eksplantından elde edilen yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-66.67 arası görülmüş olup, en fazla %66.67 yeşil renkli kallus oluşumu 0.25 mg/l BAP, 0.75 mg/l NAA ve 1.00 mg/l GA₃ içeren MS ortamlarında görülmüştür. Kahve renkli kallus oluşum oranı ise %0-60.00 arası değişmiştir. En fazla %60 kahve renkli kallus oluşumu, 0.25 mg/l NAA ve 1.00 mg/l GA₃ içeren MS ortamında görülmüştür. Ayrıca, primer yaprak eksplantlarından sadece 0.25 mg/l BAP ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında %26.67 sürgün oluşum görülmüştür (Şekil 4.18.a). Bunun dışında her hangi ortamda sürgün oluşumu görülmemiştir. Sürgün ucu oluşum oranı %0-100 arası değişmekte olup, %100 sürgün ucu oluşumu 1.25 mg/l

BAP, 0.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında görülmüştür (Şekil 4.18.b). Sadece 0.25 mg/l BAP ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında ortalama 2.19 cm uzunluğunda 2.17 adet sürgün gözlenmiş olup geri kalan tüm ortamlarda her hangi sürgün oluşumu not edilmemiştir.

Çizelge 4.27 *L. stoechas* bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

VK	SD	Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	17	1619.61	2.02*	1377.34	1.88*	118.52	16.00**
Hata	36	800.00		733.33		7.41	
Genel Toplam	53						
VK	SD	Sürgün ucu oluşum oranı (%)		Eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)		Ortalama sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	17	2172.11	2.99**	0.78	8.89**	0.80	26.73**
Hata	36	725.93		0.09		0.03	
Genel Toplam	53						

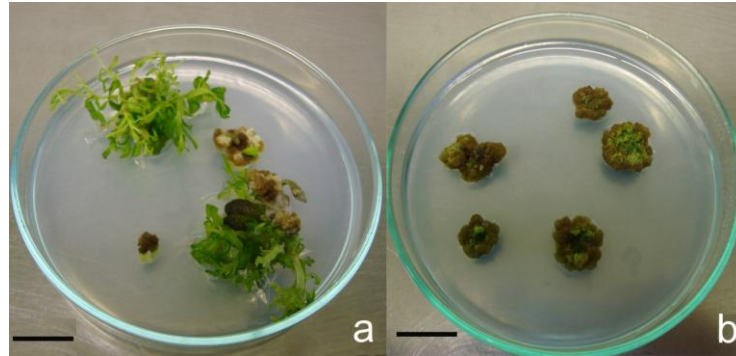
* p<0.05 düzeyinde önemlidir; ** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.28 *L. stoechas* bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Ortam			Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)*	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)*	Sürgün oluşum oranı (%)**	Sürgün ucu oluşum oranı (%)**	Eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)**	Ortalama sürgün uzunluğu (cm)**
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)						
0.25	0.00	1.00	0.00 b	53.34 ab	26.67 a	20.00 c	2.17 a	2.19 a
0.25	0.25	1.00	60.00 a	20.00 ab	0.00 b	0.00 c	0.00 b	0.00 b
0.25	0.50	1.00	20.00 ab	53.34 ab	0.00 b	26.67 bc	0.00 b	0.00 b
0.25	0.75	1.00	66.67 a	6.67 b	0.00 b	0.00 c	0.00 b	0.00 b
0.25	1.00	1.00	53.34 ab	0.00 b	0.00 b	20.00 c	0.00 b	0.00 b
0.25	1.25	1.00	13.34 ab	13.34 ab	0.00 b	73.34 ab	0.00 b	0.00 b
0.25	1.50	1.00	46.67 ab	0.00 b	0.00 b	53.34 abc	0.00 b	0.00 b
0.25	1.75	1.00	40.00 ab	0.00 b	0.00 b	46.67 bc	0.00 b	0.00 b
0.25	2.00	1.00	53.34 ab	0.00 b	0.00 b	20.00 c	0.00 b	0.00 b
0.00	0.25	1.00	0.00 b	60.00 a	0.00 b	13.34 c	0.00 b	0.00 b
0.25	0.25	1.00	60.00 a	20.00 ab	0.00 b	0.00 c	0.00 b	0.00 b
0.50	0.25	1.00	40.00 ab	6.67 b	0.00 b	20.00 c	0.00 b	0.00 b
0.75	0.25	1.00	33.34 ab	13.34 ab	0.00 b	26.67 bc	0.00 b	0.00 b
1.00	0.25	1.00	46.67 ab	26.67 ab	0.00 b	0.00 c	0.00 b	0.00 b
1.25	0.25	1.00	0.00 b	0.00 b	0.00 b	100.00 a	0.00 b	0.00 b
1.50	0.25	1.00	13.34 ab	26.67 ab	0.00 b	26.67 bc	0.00 b	0.00 b
1.75	0.25	1.00	33.34 ab	40.00 ab	0.00 b	6.67 c	0.00 b	0.00 b
2.00	0.25	1.00	0.00 b	53.34 ab	0.00 b	20.00 c	0.00 b	0.00 b

* Aynı sütun daki harfler 0.05 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir

** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.18 Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri.

a. 0.25 mg/l BAP ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında sürgün oluşumu ve b. 0.25 mg/l BAP, 1.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında sürgün uçları ve kahve renkli kallus oluşumu (bar a, b ≈1.67 cm)

4.5.5 Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyon için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen kotiledon yaprak eksplantları farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiş olup, eksplantlarda kararma (nekroz) görülmüştür. Ayrıca, eksplantlar üzerindeki sürgün uçları olumsuz şekilde etkilenmeye başlamıştır. Ancak, kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüşlerdir. Elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.29’de verilmiştir. Çizelge’de görüldüğü gibi kahve renkli kallus oluşum oranı ve yeşil renkli kallus oluşum oranı bakımından ortamlar arasında sırasıyla 0.01 ve 0.05 düzeyinde farklılık görülmüştür. Ancak, sürgün ucu oluşum oranı bakımından ortamlar arasında istatistiksel olarak farklılığı görülmemiştir. Yapılmış Tukey’s-b testi (Çizelge 4.30) sonuçlarına göre yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-86.67 arası görülmüş olup, en fazla %86.67 yeşil renkli kallus oluşumu 0.25 mg/l BAP- 1.75 mg/l NAA- 1 mg/l GA₃ (Şekil 4.19.b), 1.25 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA- 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında görülmüştür. Ayrıca, kahve renkli kallus oluşum oranı %0-100.00 arası değişmiş olup, en fazla %100 kahve renkli kallus oluşum oranı, 0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l GA₃ (Şekil 4.19.a) ve 0.25 mg/l NAA ve 1.00 mg/l GA₃ içeren MS ortamında görülmüştür. Sürgün ucu oluşum oranı ise %0-20.00 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.29 *L. stoechas* bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

VD	SD	Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)		Sürgün ucu oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	17	2220.48	2.50*	2513.29	3.36**	148.58	0.61
Hata	36	888.89		748.15		244.44	
Genel Toplam	53						

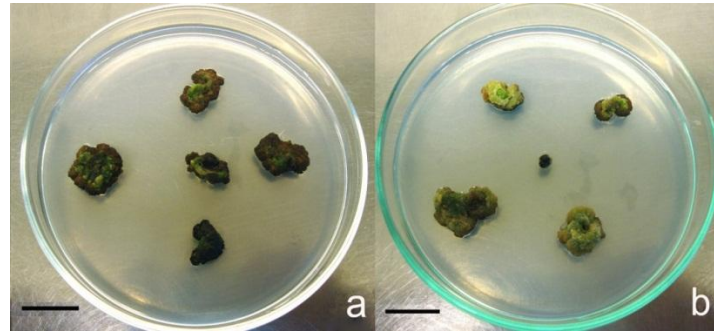
* p<0.05 düzeyinde önemlidir; ** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.30 *L. stoechas* bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Ortam			Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%) [*]	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%) ^{**}	Sürgün ucu oluşum oranı (%)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)			
0.25	0.00	1.00	0.00 c	100.00 a	0.00
0.25	0.25	1.00	6.67 bc	80.00 ab	13.34
0.25	0.50	1.00	26.67 bc	60.00 abcd	13.34
0.25	0.75	1.00	33.34 abc	60.00 abcd	6.67
0.25	1.00	1.00	26.67 bc	40.00 bcde	13.34
0.25	1.25	1.00	40.00 abc	46.67 bcde	13.34
0.25	1.50	1.00	60.00 ab	20.00 cde	20.00
0.25	1.75	1.00	86.67 a	0.00 e	0.00
0.25	2.00	1.00	53.34 abc	33.34 bcde	13.34
0.00	0.25	1.00	0.00 c	100.00a	0.00
0.25	0.25	1.00	6.67 bc	80.00 ab	13.34
0.50	0.25	1.00	20.00 bc	80.00 ab	0.00
0.75	0.25	1.00	53.34 abc	40.00 bcde	6.67
1.00	0.25	1.00	6.67 bc	80.00 ab	13.34
1.25	0.25	1.00	86.67 a	13.34 de	0.00
1.50	0.25	1.00	33.34 abc	66.67 abc	0.00
1.75	0.25	1.00	26.67 bc	73.34 ab	0.00
2.00	0.25	1.00	60.00 ab	40.00 bcde	0.00

* Aynı sütun daki harfler 0.05 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir

** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.19 Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri.
a. 0.25 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında kahve renkli kallus oluşumu ile sürgün uçların gelişmesi, b. 0.25 mg/l BAP, 1.75 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında yeşil renkli kallus oluşumu ile sürgün uçların gelişmesi (bar a, b ≈1.66 cm)

4.5.6 Hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyon için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

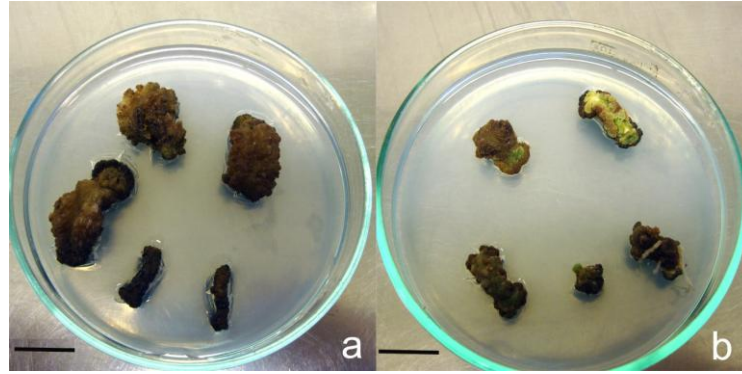
Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacı ile *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen hipokotil eksplantı farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiş olup, eksplantlarda kararma (nekroz) görülmüştür. Ancak, kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüşlerdir. Ayrıca, eksplantlar üzerinde gelişen sürgün uçları olumsuz şekilde etkilenmeye başlamıştır. Elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.31’de verilmiştir. Sonuçlara göre hem kahve renkli kallus oluşum oranı hem de kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı bakımından ortamlar arası her hangi farklılık görülmemiştir (Çizelge 4.32). Çizelge’de görüldüğü gibi kahve-yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-40 arası (Şekil 4.20.b) ve kahve kallus oluşum oranı ise, %60.00-100.00 arası değişmiştir. (Şekil 4.20.a)

Çizelge 4.31 *L. stoechas* bitkisinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

VK	SD	Kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Ortam	17	598.26	1.24	598.26	1.24
Hata	36	481.48		481.48	
Genel Toplam	53				

Çizelge 4.32 *L. stoechas* bitkisinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Ortam			Kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)
BAP (mg/l)		GA ₃ (mg/l)		
0.25	0.00	1.00	0.00	100.00
0.25	0.25	1.00	13.34	86.67
0.25	0.50	1.00	40.00	60.00
0.25	0.75	1.00	0.00	100.00
0.25	1.00	1.00	0.00	100.00
0.25	1.25	1.00	20.00	80.00
0.25	1.50	1.00	33.34	66.67
0.25	1.75	1.00	40.00	60.00
0.25	2.00	1.00	13.34	86.67
0.00	0.25	1.00	13.34	86.67
0.25	0.25	1.00	13.34	86.67
0.50	0.25	1.00	0.00	100.00
0.75	0.25	1.00	13.34	86.67
1.00	0.25	1.00	13.34	86.67
1.25	0.25	1.00	20.00	80.00
1.50	0.25	1.00	40.00	60.00
1.75	0.25	1.00	13.34	86.67
2.00	0.25	1.00	0.00	100.00



Şekil 4.20 Hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA, GA₃ ve Aktif kömür dozlarının etkileri.

a. 0.25 mg/l BAP ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında kahve renkli kallus oluşumu ve b. 1.50 mg/l BAP, 0.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında kahve-yeşil kallus oluşumu (bar a, b ≈1.66 cm)

4.5.7 Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyon için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen kotiledon yaprak eksplantı farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ ile 4 g/l aktif kömür içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre tüm eksplantlarda kararlaşma görülmüş olup, gelişen sürgün uçları ciddi şekilde zarar görmüşlerdir. Ancak, kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüşlerdir. Elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.33'de verilmiştir. Çizelgeye göre kahve renkli kallus ve kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı bakımından ortamlar arasında 0.01 düzeyinde farklılık görülmüştür. Çizelge 4.34'de görüldüğü gibi kahve-yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-93.34 arası görülmüş olup, en fazla %93.34 kahve-yeşil renkli kallus oluşum oranı 0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l GA₃ ile 4.00 g/l aktif kömür içeren MS ortamlarında görülmüştür (Şekil 4.21). Ayrıca, kahve renkli kallus oluşum oranı %6.67-100.00 arası değişmiştir. En fazla %100 kahve renkli kallus oluşum oranı, 0.25 mg/l BAP ve 1 mg/l GA₃ ile 4 g/l aktif karbon, 0.25 mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ ile 4 g/l aktif karbon, 0.25 mg/l BAP- 0.50 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ ile 4 g/l aktif karbon, 0.25 mg/l BAP- 1 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ ile 4 g/l aktif karbon, 0.25 mg/l BAP- 1.25 mg/l NAA ve 1 mg/l GA₃ ile 4 g/l aktif karbon, içeren MS ortamları dışında, tüm diğer ortamlarda görülmüştür.

Çizelge 4.33 *L. stoechas* bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

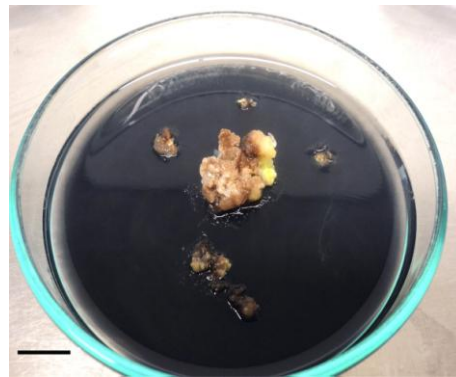
VK	SD	Kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Ortam	17	2909.37	3.21**	2543.35	3.54**
Hata	36	903.70		718.52	
Genel Toplam	53				

** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.34 *L. stoechas* bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri

Ortam				Kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)**	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)**
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)	Aktif kömür (g/l)		
0.25	0.00	1.00	4.00	93.34 a	6.67 c
0.25	0.25	1.00	4.00	66.67 ab	33.34 bc
0.25	0.50	1.00	4.00	33.34 bc	66.67 ab
0.25	0.75	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a
0.25	1.00	1.00	4.00	33.34 bc	66.67 ab
0.25	1.25	1.00	4.00	60.00 ab	40.00 bc
0.25	1.50	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a
0.25	1.75	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a
0.25	2.00	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a
0.00	0.25	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a
0.25	0.25	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a
0.50	0.25	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a
0.75	0.25	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a
1.00	0.25	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a
1.25	0.25	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a
1.50	0.25	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a
1.75	0.25	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a
2.00	0.25	1.00	4.00	0.00 c	100.00 a

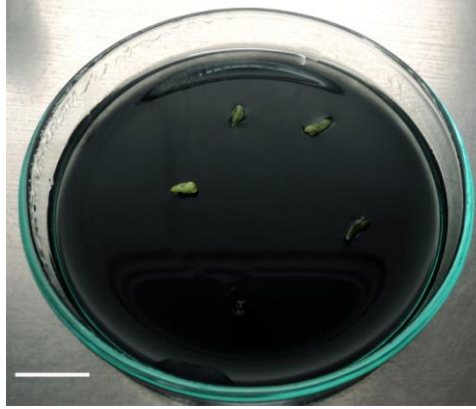
** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.21 Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri, 0.25 mg/l BAP, 1 mg/l GA₃ ve 4 g/l aktif karbon içeren MS ortamında kahve yeşil renkli kallus oluşumu (bar ≈1.66 cm)

4.5.8 Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyon için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif komür dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacı ile *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen primer yaprak eksplantı farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ ile aktif komür içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre tüm eksplantlarda ne adventif sürgün rejenerasyonu ne de kallus oluşumu gözlenmemiştir. Ancak, eksplant doku hücrelerin çoğaltımı sonucunda eksplantlarda önemsiz derecede kıvrırma görülmüştür (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 Sekiz hafta sonra farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif komür dozları içeren MS ortamında primer yaprak eksplantlar üzerinde kıvrımlar (bar ≈1.6 cm)

4.5.9 Kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım için kullanılan farklı BAP ve NAA dozların etkileri

Mikroçoğaltım amacı ile *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen kotiledon boğum eksplantı farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamında kültüre alınmış olup, eksplantlar üzerinde 8-12 gün sonra sürgün uçları ve daha sonra sürgün oluşum başlamıştır. Ayrıca, kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüşlerdir. Sekiz hafta sonra elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi (Çizelge 4.35) sonuçlarına göre yeşil renkli kallus oluşum oranı ve sürgün oluşum oranı bakımından ortamlar arası 0.01 düzeyinde ve kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı

bakımından ortamlar arası 0.05 düzeyinde farklılık görülmüştür. Ancak, kahve renkli kallus oluşum oranı ve ortalama sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasında fark bulunmamaktadır. Farklılık derecesini tespit etmek amacıyla Tukey's-b testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar çizelge 4.36'de verilmiştir. Sonuçlarda görüldüğü gibi yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-100.00 arası gözlenmiş olup, en fazla %100 yeşil renkli kallus oluşum oranı 0.75 mg/l BAP ve 0.10 mg/l NAA içeren MS ortamında görülmüştür. Kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı %0-66.67 arası değişim gözlenmiş olup, en fazla %66.67 kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı 0.25 mg/l BAP ve 0.10 mg/l NAA içeren MS ortamında görülmüştür. Kahve renkli kallus oluşum oranı ise %0-26.67 arası değişmiştir. Ayrıca, sürgün oluşum oranı %0-93.34 arası değişmiş olup, en fazla %93.34 sürgün oluşum oranı, 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamlarında görülmüştür (Şekil 4.23.a,b). Eksplant başına ortalama sürgün sayısı 0-5.60 sürgün arası değişmiştir ve en fazla 5.60 sürgün 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında gözlenmiştir. Ortalama sürgün uzunluğu ise 0.00-1.60 cm arası gözlenmiştir.

Çizelge 4.35 *L. stoechas* bitkisinin kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

VK	SD	Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve -Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	11	4366.67	14.03**	1135.35	2.92*	487.88	1.16
Hata	24	311.11		388.89		422.22	
Genel Toplam	35						
VK	SD	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)		Ortalama sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	11	2662.63	4.28**	7.61	2.21*	0.77	1.87
Hata	24	622.22		3.44		0.41	
Genel Toplam	35						

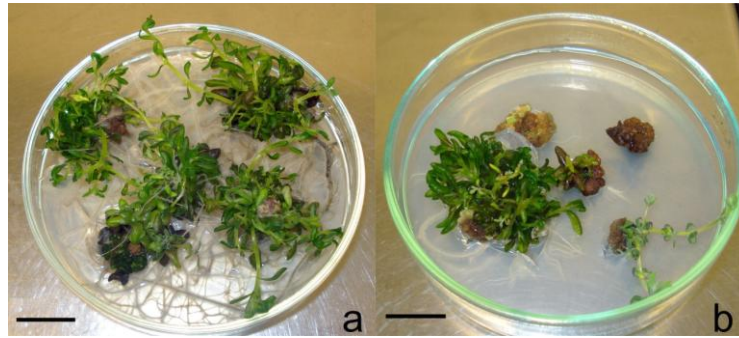
* p<0.05 düzeyinde önemlidir; ** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.36 *L. stoechas* bitkisinin kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri

Ortam		Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)**	Kahve Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)*	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)	Sürgün oluşum oranı (%)**	Eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)*	Ortalama sürgün uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)						
0.25	0.00	0.00 d	6.67 b	0.00	93.34 a	5.60 a	1.60 a
0.25	0.05	13.34 d	0.00 b	20.00	66.67 ab	1.67 b	1.19 abc
0.25	0.10	0.00 d	66.67 a	33.34	0.00 e	0.00 b	0.00 c
0.50	0.00	86.67 a	0.00 b	0.00	13.34 cde	2.67 ab	1.09 abc
0.50	0.05	26.67 cd	0.00 b	20.00	53.34 abcd	3.56 ab	1.32 ab
0.50	0.10	20.00 cd	20.00 b	0.00	60.00 abc	2.39 ab	1.10 abc
0.75	0.00	46.67 bc	0.00 b	26.67	26.67 bcde	2.37 ab	0.67 abc
0.75	0.05	66.67 ab	0.00 b	0.00	33.34 bcde	0.67 b	0.67 abc
0.75	0.10	100.00 a	0.00 b	0.00	0.00 e	0.00 b	0.00 c
1.00	0.00	80.00 a	0.00 b	0.00	20.00 bcde	1.67 b	0.67 abc
1.00	0.05	93.34 a	0.00 b	0.00	6.67 de	1.00 b	0.34 bc
1.00	0.10	86.67 a	0.00 b	0.00	13.34 cde	1.00 b	1.00 abc

* Aynı sütun daki harfler 0.05 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir

** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Tukey's-b testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.23 Kotiledon boğum eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri.

a. 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında *L. stoechas* bitkisinde kotiledon boğum eksplantının üzerinde sürgün oluşumu ve b. 0.75 mg/l BAP içeren MS ortamında sürgün ve kahve kallus oluşumu (bar a, b ≈2.5 cm)

4.5.10 Meristematik ucu, yukardan 1., 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamda mikroçoğaltım

Mikroçoğaltım amacıyla *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen 40 günlük bitkilerden meristematik ucu, yukardan 1., 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltukaltı meristem eksplantını 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantlar

üzerinde 7-10 gün sonra sürgün uçları ve daha sonra sürgün oluşum başlamıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçları varyans analizine tabii tutulmuştur ve çizelge 4.37’de verilmiştir. Sonuçlara göre sürgün oluşum oranı bakımından eksplantlar arasında 0.01 düzeyinde ve ekplant başına ortalama sürgün sayısı bakımından ise eksplantlar arasında 0.05 düzeyinde farklılık görülmüştür. Ancak, nekrotik kallus oluşum oranı ve kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı bakımından eksplantlar istatistiksel olarak benzerlik göstermişlerdir. Eksplantlar arasında farklılığın önem düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar çizelge 4.38’de verilmiştir. Çizelgeye göre kahve-yeşil renkli kallus oluşum oranı ve nekrotik kallus oluşum oranı ise sırasıyla %0-73.34 ve %0-40.00 arası gözlenmiştir. Sürgün oluşum oranı %13.34-80.00 arası değişmiş olup, en fazla %80.00 sürgün oluşumu epikotil koltuk altı meristemi eksplantından elde edilmiştir. Ayrıca, ekplant başına ortalama sürgün sayısı 1.00-5.34 adet arası değişmiştir. Eksplantlar karşılaştırılınca, epikotil koltuk altı meristemi eksplantından en fazla 5.34 adet sürgün elde edilmiştir (Şekil 4.24). Farklı eksplantlarda ortalama sürgün uzunluğu 0.8-1.29 cm arasında değişmiştir.

Çizelge 4.37 *L. stoechas* bitkisinin meristematik ucu, yukardan 1, 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantlarından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamındaki mikroçoğaltım ile ilgili verilerin varyans analiz sonuçları

VK	SD	Kahve-Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Nekrotik kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Eksplantlar	4	2160.00	3.11	666.67	1.25	2626.67	24.62**
Hata	10	693.33		533.33		106.67	
Genel Toplam	14						
VK	SD	Explant başına ortalama sürgün sayısı (adet)		Ortalama sürgün uzunluğu (cm)			
		KO	F	KO	F		
Eksplantlar	4	7.78	4.14*	0.12	0.91		
Hata	10	1.88		0.13			
Genel Toplam	14						

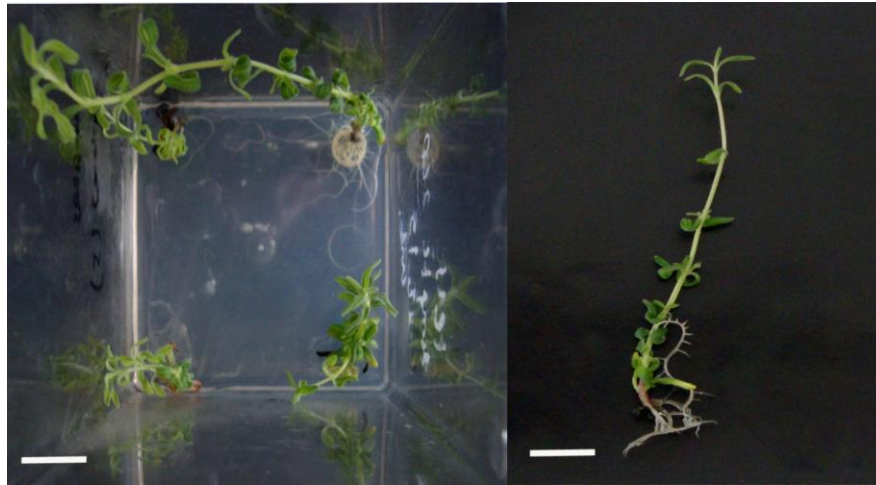
* p<0.05 düzeyinde önemlidir; ** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.38 *L. stoechas* bitkisinin meristematik ucu, yukardan 1, 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamındaki mikroçoğaltım sonuçları

Ortam		Kahve Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)	Nekrotik kallus oluşum oranı (%)	Sürgün oluşum oranı (%)**	Explant başına ortalama sürgün sayısı (adet)*	Ortalama sürgün uzunluğu (cm)
Explant	BAP					
Meristematik uç	0.25	40.00 ab	0.00	60.00 a	3.05 ab	1.24
Yukardan 1. Koltuk altı merstemi	0.25	40.00 ab	40.00	20.00 c	3.00 ab	1.00
Yukardan 2. koltuk altı merstemi	0.25	73.34 a	13.34	13.34 c	2.00 b	0.80
Yukardan 3. koltuk altı merstemi	0.25	53.34 a	26.64	20.00 c	1.00 b	1.00
Epikotil koltuk altı meristemi	0.25	0.00 b	20.00	80.00 a	5.34 a	1.29

* Aynı sütun daki harfler 0.05 düzeyinde Duncan testine göre farklı grupları göstermektedir

** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Duncan testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.24 Meristematik ucu, yukardan 1., 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamda mikroçoğaltım (bar \approx 1 cm)

4.5.11 Kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirmek için kullanılan farklı dozlarda IBA'nin etkisi

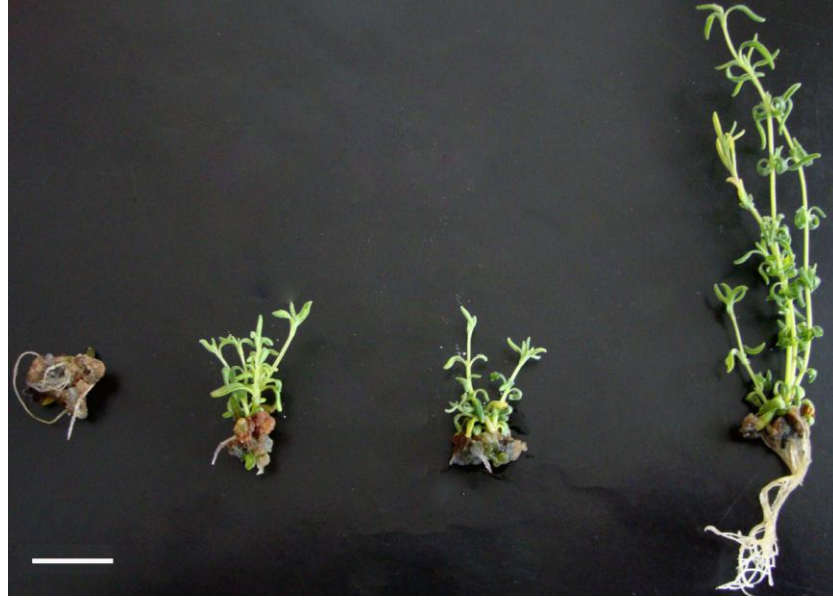
L. stoechas kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi amacı ile eksplantlar farklı oranda IBA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantlar üzerinde 6-8 gün sonra kök uçları ve daha sonra kök oluşum başlamıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.39'de verilmiştir. Çizelgeye göre kök oluşum oranı, kök uzunluğu ve bitki boyu bakımından ortamlar arasında istatistiksel olarak olmazsa da rakamsal olarak farklılık görülmüştür. Çizelge 4.40'de görüldüğü gibi, farklı oranlarda IBA içeren MS ortamından elde edilen kök oluşum oranı %25-75 arası değişmiştir. En fazla %75 kök oluşumu 0.50 ve 1.00 mg/l IBA içeren MS ortamlarında görülmüştür. Kök uzunluğu ise 1.167- 1.930 cm arası gözlenmiş olup, en uzun kök 1.930 cm olarak 1.00 mg/l IBA içeren MS ortamında görülmüştür. Köklenen sürgünlerinin boyu ise 3.00-5.37 cm arası gözlenmiş olup, en uzun sürgün boyu 5.37 cm olarak 1.00 IBA içeren MS ortamında görülmüştür (Şekil 4.25).

Çizelge 4.39 *L. stoechas* kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünleri köklendirmek için kullanılan farklı IBA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları

VK	SD	Kök oluşüm oranı (%)		Kök uzunluğu (cm)		Bitki boyu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	3	1875.00	2.77	0.32	0.58	2.82	0.73
Hata	8	677.00		0.55		3.87	
Genel Toplam	11						

Çizelge 4.40 *L. stoechas* kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünleri köklendirmek için kullanılan farklı IBA dozlarının etkileri

Ortam IBA (mg/l)	Kök oluşüm oranı (%)	Kök uzunluğu (cm)	bitki boyu (cm)
0.25	41.66	1.62	4.11
0.50	75.00	1.40	4.06
0.75	25.00	1.17	3.00
1.00	75.00	1.93	5.37



Şekil 4.25 Kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirmek üzerine farklı dozlarda IBA'nin etkisi, köklendirilen *L. stoechas* bitkileri (bar \approx 1 cm)

4.5.12 Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu

1) Daimi daldırma sistem

Denemede 40 bitki kullanılmıştır. Doku kültürü koşullarında geliştirilmiş bitkiler 200 ml sıvı MS veya 1 mg/l GA₃ ve 1 mg/l IBA içeren sıvı MS ortama dik şekilde tutulması bitkilerde olumsuz etki göstermiş olup, gelişmelerine engel olmuştur. Ayrıca bitkilerin taban kısmında kararma ve çürüme gözlenmiş olup, tüm bitkiler 10-30 gün içinde ölmüştür (Şekil 4.26.e).

2) Killi toprak ve hayvan gübre karışımı

Denemede 40 bitki kullanılmıştır. Killi ve hayvan gübresinin 1:1 karışımında şaşırılan tüm bitkilerin köklerinde, ilk önce yanma ve daha sonra bitkilerin nekrozla beraber ölümü görünmüştür (Şekil 4.26.c).

3) Kum

Denemede 40 bitki kullanılmıştır. Kumun su tutma kapasitesi çok düşük olmasından dolayı köklendirilmiş bitkiler besin maddeleri ve su eksikliğinden gelişememiş olup ölmüşlerdir. (Şekil 4.26.d).

4) Perlit

Denemede 40 bitki kullanılmıştır. Perlit, genel olarak süs bitkileri ve yarı çalimsı bitkiler köklendirmek için en uygun ortam olarak değerlendirilmektedir. Bu denemede bitkiler aktarıldıktan sonra perlit ıslatılmış olup ve güneşin direkt etkisinden uzak tutulmuştur; fakat elde edilen tüm bitkiler 6-7 gün içerisinde kararmayla beraber ölmüşlerdir (Şekil 4.26.a).

5) Kil ve torf karışımı

Denemede 40 bitki kullanılmıştır. Kil ve torf karışımına aktarılan tüm bitkiler 3-6 gün içerisinde ölmüştür. Torpakta yüksek miktarda su birikimi, bitkilerin alt kısmında kahveleşme, kararma ve daha sonra tüm bitkilerin ölümüne sebep olmuş olarak düşünülmektedir (Şekil 4.26.f).

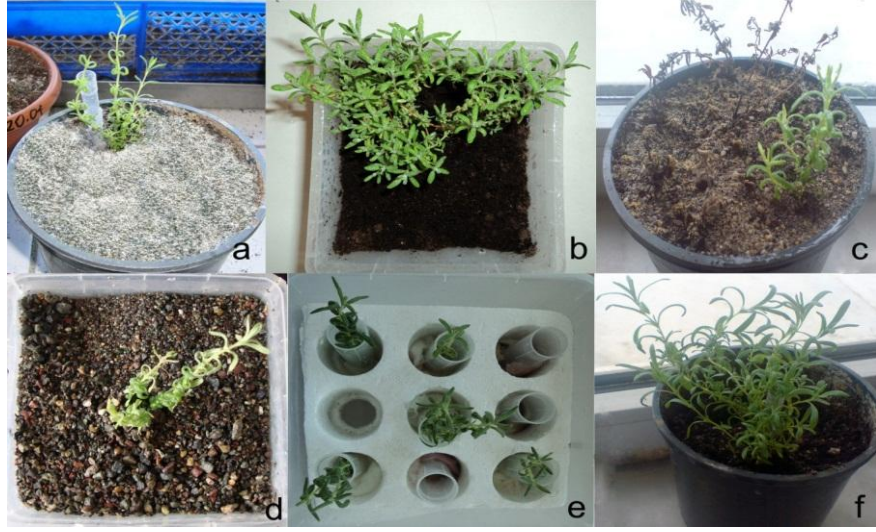
6) Torf

Denemede 40 bitki kullanılmıştır. Bu çalışmada torf, bitki şaşırtmak için en uygun ortam olarak değerlendirilmiştir. 160°C sıcaklıkta ve 2 saat süre ile steril edilmiş torfta en iyi gelişimi sağlayan bitkilerin, oda sıcaklığında ve poşet içerisinde gelişmeleri takip edilmiştir. Daha sonra, poşetten çıkartılmış olup (Şekil 4.26.b), %45 nem ve oda sıcaklığında büyümesini 4 hafta takip ederek, 40 bitkiden 15 bitki tarlaya şaşırtılmıştır. Bitkileri şaşırtmadan önce bitki yatağının 8 farklı yerinden rastgele 15-30 cm derinlikten toprak örnekler alınmış, temiz plastik kovada karıştırılmıştır. Daha sonra, karıştırılmış topraktan 1 kg örneği Ankara, Yenimahalle, Toprak Gübre Araştırma Enstitüsüne analiz için gönderilmiş olup, Sonuçlara göre su ile doymuşluk %53.00, EC 1.24 ds/m, toplam tuz %0.04, su ile doymuş toprakta pH 7.56, kireç %5.18, fosfor 13.73 kg/da, potasyum 174.67 kg/da, organik madde %1.34, toplam azot %0.07 ve organik karbon %0.78 olarak bulunmuştur.

İklim odasında gelişen bitkileri tarlaya şaşırtılırken, dikmek amacıyla açılan deliklerin derinlik ve genişlikle beraber toprağının tarla kapistesinde olduğu kontrol edilmiştir. Bitkiler diktikten sonra, etrafında buharlaşmayı engellemek için saman ortusu konulmuştur. İlk 10 gün her akşam verilen su, bitkiler üzerinde olumlu etki yapmış olup ve bitkiler hızlı şekilde büyümeye başlamışlardır. Daha sonra her 7 günde bir sulamanın,

bitki gelişiminde herhangi olumlu etkisi görülmemiştir. Benzer şekilde bitkilerin gelişmesini sağlamak ve toprağın havandırılması için iki haftada bir yabancı ot mücadelesinin de bitkiler üzerinde pozitif etkileri görülmüştür.

Tüm adaptasyon denemeleri için toplam 240 *L. stoechas* bitkisi kullanılmış olup, tarlaya şaşırtılmış 15 bitkiden 9 bitki halen tarla koşullarında yaşamaya devam etmektedir (Şekil 4.27) .



Şekil 4.26 Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu,
a. Perlit, b. Torf, c. Killi toprak ve hayvan gübre karışımı, d. Kum, e. Daimi daldırma sistem, f. Kil ile torf karışımı



Şekil 4.27 Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu, tarladaki *L. stoechas* bitkileri

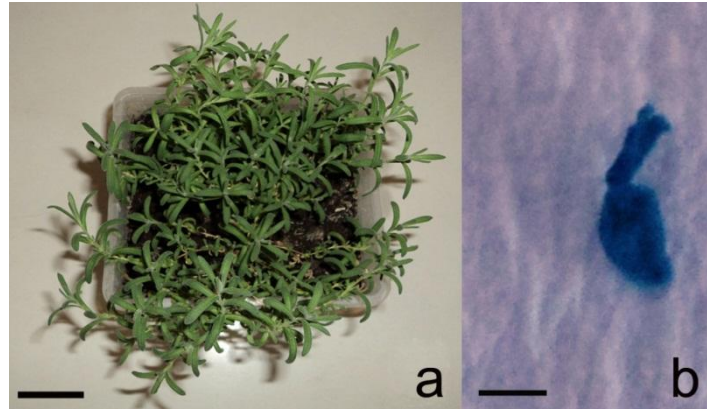
4.6 *L. stoechas* Gen Aktarım Çalışmaları

4.6.1 *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı

In vitro koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden alınan kotiledon boğum eksplantları *A. tumefaciens*'in GV2260 p35 GUS INT hattı ile 30 dk muamele edildikten sonra 24 saat MS ortamda kokültivasyon yapılmıştır. Daha sonra, eksplantlar 0.25 mg/l BAP 50 mg/l kanamisin monosülfat ile 500 mg/l Augmentin içeren MS seleksiyon ortamına kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra, elde edilen sürgünler 1.00 mg/l IBA, 50 mg/l kanamisin monosülfat ve 500 mg/l Augmentin içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Sekiz hafta sonra transgenik aday sürgünlerde köklenme görülmüştür. Bu denemde toplam 8 tekrür ve her tekrürde 5 eksplant kullanılmış olup, elde edilen 40 bitkinin ortalama kök oluşum oranı, kök uzunluğu ve bitki boyu ile ilgili verileri çizelge 4.41'de verilmiştir. Daha sonra, köklenen transgenik aday bitkiler 160°C sıcaklıkta ve 2 saat süre ile steril edilmiş torf içeren saksılara aktarılmış olup, (Şekil 4.28.a) oda sıcaklığında ve poşet içerisinde gelişmeleri takip edilmiştir. Bitkilerde belirgin gelişmeler gözlemlendiğinde poşetler uzaklaştırılmış olup, %45 nem ve oda sıcaklığında adaptasyonuna bırakılmıştır. Adaptasyon sonucunda, 40 adet transgenik aday bitkilerden yalnız 5 adet bitki gelişmiş olup, tarlaya şaşırtılmıştır (Şekil 4.29). Şaşırtmadan önce bitki yatağının toprak analizi Ankara, Yenimahalle, Toprak Gübre Araştırma Enstitüsü'nden yaptırılmıştır. Sonuçlara göre su ile doymuşluk %67.00, EC 1.18 ds/m, toplam tuz %0.05, su ile doymuş toprakta pH 7.82, kireç %4.60, fosfor 9.63 kg/da, potasyum 224.79 kg/da, organik madde %1.13, toplam azot %0.06 ve organik karbon %0.66 olarak bulunmuştur. Tarlaya şaşırtılmış 5 transgenik aday bitkiden, 4 bitkinin zayıf olduğundan, ayrıca bitki yatağı azot oranının az olması ve uyumsuz hava koşullarından dolayı bir bitki halen tarla da yaşamaya devam etmektedir. Yaklaşık 2 ay sonra tarladaki bitki yatağında gelişen bitkilerden yaprak örnekleri alınarak yapılan *GUS* analizi sonucunda, üzerinde mavi renk veya bölgeler tespit edilmiştir (Şekil 4.28.b).

Çizelge 4.41 *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarılmış köklenen *L. stoechas* bitkilerinin ortalama verileri

Gen hatları	Toplam kullanılan eksplant sayısı (adet)	Ortalama kök oluşum oranı (%)	Ortalama kök uzunluğu (cm)	Ortalama bitki boyu (cm)
GV2260 p35 GUS INT	40.00	85.00	1.94	4.26



Şekil 4.28 *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı.
a. GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarılmış, köklenen bitkilerin adaptasyonu,
b. yaprak örnekleri alınarak yapılan *GUS* analizi sonucu (bar a \approx 2.5, b \approx 1 cm)



Şekil 4.29 *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı, saksıda ve tarladaki transgenik aday *L. stoechas* bitkiler

4.6.2 A. tumefaciens LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı

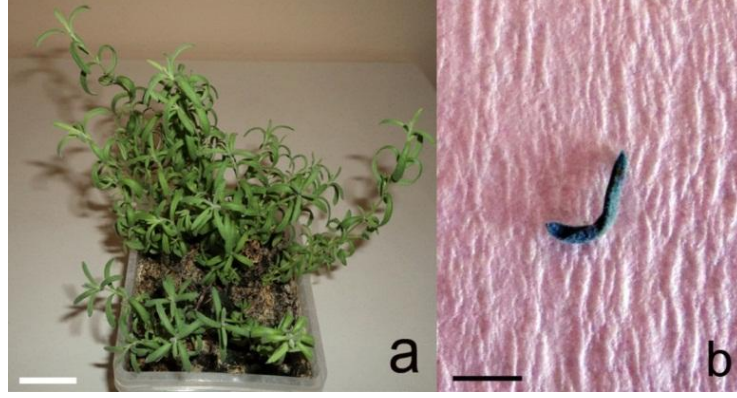
In vitro koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden alınan kotiledon boğum eksplantları *A. tumefaciens*'in LBA 4404 pRGGbar hattı ile 30 dk muamele edildikten sonra 24 saat MS ortamda kokültivasyon yapılmıştır. Daha sonra, eksplantlar 0.25 mg/l BAP, 50 mg/l kanamisin monosülfat, 2.5 mg/l fosfinotrisin ile 500 mg/l bakteriyostatik Augmentin içeren MS seleksiyon ortamına kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra, elde edilen sürgünler 1.00 mg/l IBA, 50 mg/l kanamisin monosülfat, 2.5 mg/l fosfinotrisin ve 500 mg/l Augmentin içeren MS ortamında köklendirilmiştir. İki hafta sonra, sürgünlerde belirgin şekilde adventif kök oluşumu gözlenmiştir. Bu denemde toplam 8 magenta ve her magentada 5 eksplant kullanılmış olup, Elde edilen 40 bitkinin ortalama kök oluşumu, kök uzunluğu ve bitki boyu verileri çizelge 4.42'de verilmiştir. Daha sonra köklenen transgenik aday bitkiler, saksılara aktarılmış olup, (Şekil 4.30.a) gelişmeler takip edilmiştir. Steril edilmiş torfta, oda sıcaklığında aktarılan transgenik aday bitkiler, fiziksel olarak zayıf olduğundan dolayı gelişmemiş olup, 2 ay sonra ölmüşlerdir. Ayrıca, bitkiler ölmeden yaprak örnekleri alınarak yapılan *GUS* analizi sonucunda mavi renk ve bölgeler tespit edilmiştir (Şekil 4.30.b).

Çizelge 4.42 *A. tumefaciens* LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarılmış Köklenen *L. stoechas* bitkilerinin ortalama verileri

Gen hatları	Toplam kullanılan eksplant sayısı (adet)	Ortalama kök oluşum oranı (%)	Ortalama kök uzunluğu (cm)	Ortalama bitki boyu (cm)
LBA 4404 pRGGbar	40.00	90.00	2.58	4.83

4.6.3 PCR sonuçları

Elde edilen bitkilerde PCR ile *GUS* geni, pozitif sonucu doğrulanmamıştır. Bunun sebebi aktarılan genlerin ekstra kromozomal olup, kromozomlarla entegrasyonunun sağlanmamasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.30 *A. tumefaciens* LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı.
a. köklenen bitkilerin adaptasyonu, b. yaprak örnekleri alınarak yapılan *GUS* analizi sonucu
(bar a \approx 2.5, b \approx 1 cm)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

L. angustifolia Yüzey Sterilizasyonu

Doku kültürü çalışmalarında, kullanılan bitki eksplantlarının yüzey sterilizasyonu olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için uygun dezenfektan türleri, konsantrasyonları ve kullanım süreleri, birbirinden farklılık göstermektedir. Bu nedenle, bir sterilizasyon çalışmasında amaç en etkili ve en düşük seviyede dezenfektan dozunun belirlenmesidir (Bhatti, 2001).

L. angustifolia tohumlarının yüzey sterilizasyonu, ticari çamaşır suyunun (Ace, Türkiye) % 5, 10, 15 ve 20'lik dozu ve her biri 4, 7, 10 dk, oda sıcaklığında uygulanmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda çamaşır suyu muameleleri ve uygulama süreleri arasında istatistiksel olarak farklılığı olmadığı tespit edilmiştir. Denemede tüm uygulama süreleri ve çamaşır suyu oranlarının muamele sonucunda her hangi bulaşıklığı görülmemiştir. En fazla %13.33 çimlenme %10 çamaşır suyu, 4 dk; %5 çamaşır suyu, 4 dk ve %5 çamaşır suyu, 10 dk sterilizasyon uygulaması ile elde edilmiştir. Tohumların canlılığı tespit, etmek amacıyla tetrazolium testi yapılmıştır. Tetrazolium testi sonucunda tohumlarda %90-95 canlılığı tespit edilmiştir. Yüzey steril edilmiş tohumlardaki çimlenme düşüklüğün sebebi tohumlarda dormansi olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar Chavangat (1978)'in sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Araştırmacı laboratuvar çalışmalarda *Lavandula* L. bitkisinin tohumlarında heterogeniti tespit etmiş olup, heterogeniti, düzeylerinin tohum çimlenmesine etkili olduğu tespit etmiştir. Tez kapsamında yapılmış birinci denemede *L. angustifolia* tohumları 1 mg⁻¹ GA₃ içeren steril saf su içinde bekletildiğinde, çimlendirilememiştir. İkinci denemede ise *L. angustifolia* tohum kabuklarını çizerek, steril Petri kapları içerisinde %0.65 agar ile katılaştırılan, %3 sukroz içeren MS besin ortamında 24±2°C'de 16 saat ışık fotoperiyotunda çimlendirilmiştir. Deneme sonucunda tohum çimlenme yüzdesinde belirgin artış olmamış, çimlenme %10-15 arasında değişmiştir. Buna karşı, Chavangat (1978) 3-5°C sıcaklığında 200 ppm (200 mg/l) GA₃ muamelesinin tohum dormansisini kırmak için uygun görmüş olup, yüksek miktarda GA₃ muamelesi ve soğuk uygulamasının önemini vurgulamaktadır.

Dolayısıyla, denemede kullanılacak tohumların çimlenmesi için çizilmemiş tohumlar kullanmış olup, MS ortamı tercih edilmiştir.

***L. angustifolia* Bitkisinin Doku Kültürü Çalışmaları**

Farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının L. angustifolia bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *L. angustifolia*'nın *in vitro* koşullarda 3-4 haftada çimlenen 10 günlük bitkiciklerden elde edilen primer yaprak eksplantları kullanılmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta farklı oranlarda BAP, NAA ve GA₃ içeren MS ortamda adventif sürgün rejenerasyonu görülmemiş olup, kallus oluşumu ve sürgün primordiaları gözlenmiştir. Ancak, kalluslar ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renklerine dönüşmüş olup üzerinde farklı oranda nekroz görülmüştür. Bu çalışmadaki sonuçları, Tsuro vd. (1999), çalışmasına kısmen benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar, *L. angustifolia*'nın yaprak eksplantlarından kallus oluşumu ve sırasıyla 4.4×10^{-5} M BAP ve 4.0×10^{-7} M CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea) içeren MS ortamında kallus üzerinde %55.3 ve %52 sürgün oluşmu görmüşlerdir. Benzer şekilde, Falk vd. (2009) *L. angustifolia* bitkisinin rejenerasyonu için, genç yaprak eksplantını, karanlıkta ve 9 µM TDZ ve ya 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. İki hafta sonra eksplantlarda kallus oluşum gözlenmiş olup, 4 hafta sonra eksplantlar üzerinde sürgün rejenerasyon görülmüştür. TDZ içeren ortamda, eksplantlar üzerinde her hangi sürgün oluşumu gözlenmemiştir. Tez kapsamındaki çalışma, Ghiorghita vd. (2009), nın çalışmasına uyum sağlamamaktadır. Araştırmacılar, *L. angustifolia* bitkisinde yaprak eksplantını kullanarak MS ortamı ve NAA, BAP, IAA ve kinetin + NAA içeren MS ortamında sürgün rejenerasyon yapmışlardır. Bunun sebebi her iki çalışmada kullanılmış materyalin farklı kaynaklardan olduğu tahmin edilmektedir.

Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *L. angustifolia*'nın *in vitro* koşullarında 3-4 haftada çimlenen 10 günlük bitkiciklerden elde edilen kotiledon

yaprak eksplantları kullanılmıştır. Sekiz hafta sonra farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ içeren MS kültür ortamlarından elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiş olup, farklı oranda kahve renkli kallus ve nekrotik kallus oluşum gözlenmiştir. Buna karşı, Tsuro vd. (1999) ve Falk vd. (2009) *L. angustifolia*'nın yaprak eksplantlarından farklı oranda BAP ve TDZ içeren MS ortamlarda kallus oluşumu daha sonra üzerinde sürgün oluşumu görmüşlerdir. Benzer şekilde Ghiorghita vd. (2009), *L. angustifolia* bitkisinde yaprak eksplantı kullanarak farklı oranda NAA, BAP, IAA ve kinetin + NAA içeren MS ortamında sürgün rejenerasyon elde etmiştir. Bunun sebebi, yukarıda belirtilmiş çalışmaların ve bu tez kapsamında kullanılmış eksplantın farklılığından tahmin edilmektedir.

L. angustifolia bitkisinin Hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 3-4 haftada çimlenen 10 günlük bitkiciklerden elde edilen hipokotil eksplantlar üzerinde farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ içeren MS ortamın etkisi olmayıp, adventif sürgün rejenerasyonu görülmemiştir. Fakat farklı oranda kahve ve kahve-yeşil renkli kallus oluşum görülürken sürgün rejenerasyon görülmemiştir. Buna karşı, Calvo ve Segura (1988), *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş *L. latifolia* ve *L. stoechas* türlerine ait bitkiciklerin hipokotil eksplantından farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonlarda IAA, NAA ya da 2,4-D ile BAP ya da Kinetin içeren ortamlarda kallus ve sürgün oluşumu gözlenmiştir. Bunun nedeni, her iki çalışmada kullanılmış türlerin ve hormonların farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

L. angustifolia bitkisinin Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 3-4 haftada çimlenen 10 günlük bitkiciklerden elde edilen kotiledon yaprak eksplantları farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiş olup, farklı oranda kallus oluşum ve bazı ortamlarda gelişmeyen sürgün uçlar görülmüştür. Buna karşı, Tsuro vd. (1999) ve Falk vd. (2009)

L. angustifolia'nın yaprak eksplantlarından farklı oranda BAP ve TDZ içeren MS ortamlarda kallus ve sürgün oluşmu görmüşlerdir. Benzer şekilde Ghiorghita vd. (2009), da *L. angustifolia* bitkisinde yaprak eksplantı kullanarak farklı oranda NAA, BAP, IAA ve kinetin + NAA içeren MS ortamında sürgün rejenerasyon elde etmişlerdir. Bunun sebebi, yukarıda belirtilmiş çalışmaların ve bu tez kapsamında kullanılmış eksplantın ve ortamların farklılığından tahmin edilmektedir.

Farklı BAP, NAA ve GA₃ dozları ile aktif kömürün L. angustifolia bitkisinin primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 3-4 haftada çimlenen 10 günlük bitkiciklerden elde edilen primer yaprak eksplantları farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre tüm eksplantlarda farklı oranda kallus üzerinde nekroz ve bazı ortamlarda eksplantlar üzerinde gelişmeyen sürgün uçlar görülmüştür. Tsuro vd. (1999), *L. angustifolia*'nın yaprak eksplantlarından kallus oluşumu ve sırasıyla 4.4×10^{-5} M BAP ve 4.0×10^{-7} M CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea) içeren MS ortamında kallus üzerinde %55.3 ve %52 sürgün oluşmu görmüşlerdir. Benzer şekilde, Falk vd. (2009) *L. angustifolia* bitkisinin rejenerasyonu için, genç yaprak eksplantını, karanlıkta ve 9 µM TDZ ve ya 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. İki hafta sonra eksplantlarda kallus oluşum gözlenmiş olup, 4 hafta sonra eksplantlar üzerinde sürgün rejenerasyon görülmüştür. TDZ içeren ortamda, eksplantlar üzerinde her hangi sürgün oluşumu gözlenmemiştir. Ghiorghita vd. (2009), *L. angustifolia* bitkisinde yaprak eksplantını kullanarak MS ortamı ve NAA, BAP, IAA ve kinetin + NAA içeren MS ortamında sürgün rejenerasyon yapmışlardır. Çalışmalarda kullanılmış bitki materyali ve ortam farklı olduğu için farklı tepki verildiği düşünülmektedir.

Farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamda L. angustifolia bitkisinin kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım

Farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamda mikroçoğaltım yapmak amacıyla *in vitro* koşullarda 3-4 haftada çimlenen 10 günlük bitkiciklerden elde edilen kotiledon boğum eksplantları kullanılmıştır. Sekiz hafta sonra, alınmış verilere göre tüm

eksplantlarda farklı oranda kallus oluşumu, nekroz ve sürgün rejenerasyon görülmüştür. Ayrıca, en fazla %100 sürgün oluşum oranı 2.00 mg/l BAP içeren MS ortamında görülmüştür. Çalışmada, ortalama sürgün sayısı 1.84-8.07 adet arası ve ortalama sürgün uzunluğu 0.47-1.39 cm arasında değişmiştir. Benzer şekilde, Portilla vd. (1995), yaptıkları denemede *L. angustifolia*'nın *in vitro* mikroçoğaltımı için koltuk altı meristemleri kullanılmış olup, farklı konsantrasyonda NAA, BA kombinasyonları ve Hindistan cevizi sütü içeren ve içermeyen MS ortamlarında sürgün rejenerasyon elde etmişlerdir. Andrade vd. (1999), ve Echeverrigaray vd. (2005), sırasıyla *L. angustifolia* bitkisinde farklı oranda BAP içeren MS ortamında boğum ve koltuk altı tomurcuk eksplantından sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir.

Farklı oranda IBA içeren MS ortamlarının kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi

L. angustifolia bitkisinin kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için farklı oranda IBA içeren MS ortamı, kök oluşum oranı bakımından etki gösterirken, kök uzunluğu ve bitki boyu bakımından her hangi etki yapmamıştır. Benzer şekilde, Panizza ve Tognoni (1991), çalışmalarında *ex vitro* koşullarda *L. angustifolia*'nın çeliklerini 3.0 mg l⁻¹ IBA ile; Portilla vd. (1995), ise *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünleri 0.2- 0.4 mg l⁻¹ IBA içeren 1/2 oranda MS makro, mikro elementler bulduran ortamda köklendirmişlerdir. Ayrıca, Machado vd. (2011), da *L. angustifolia*'nın Provence Blue, English ve Elegance Ice çeşitlerinin köklendirilmesinde IBA kullanmışlardır. Buna karşı, Andrade vd. (1999), köklendirmek için 0-1 mg/l IBA ve 0.2-1 mg/l NAA ¼ , ½ ve tam konsantrasyonlarda MS besin ortam ve ¼ konsantrasyonda MS ile aktif kömür içeren ortam kullanmıştır.

Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu

In vitro koşullarda geliştirilmiş bitkilerin bir çoğu seralar veya tarla koşullarında düşük oranda nisbi nem (Brainerd ve Fuchigami 1981), yüksek yoğunlukta ışık ve çevre koşullarından kaynaklanan biyotik ve abiyotik faktörlerin etkisi ile strese girip, yaşamını yitirmektedirler (Misra ve Dutta 2001). Bitki doku kültürü çalışmalarında her bitki için adaptasyon şartları farklı olup, onların seralar ve tarlaya şaşırtmadan önce kullanılacak

toprak tipi ve iklim koşullarına adaptasyon optimizasyonu çok önem taşımaktadır. Bazen *in vitro* koşullarda gelişmiş bitkilerde foto-ototrofik yapısının olmadığından adaptasyonda zorluk görünmektedir (Fujiwara vd. 1988). Sonuçta, doku kültürü çalışmalarında her zaman adaptasyona en büyük sorun olarak rastlanmaktadır ve doku kültürü ile çoğaltılmış bitkilerin yaygınlaştırılmasında bir engel ve güç olarak görülmektedir. Her bitkiyi alıştırmak için farklı koşullara gerekebilmektedir, ancak, tüm araştırmacılar, *in vitro* koşullarda geliştirilmiş bitkilerin fizyolojik ve anatomik olarak çok narin olduğundan dış koşullara alıştırmaya çalışmaları bitkilerin şaşırtılmış toprağın uygun olmasını ve yavaş yavaş alıştırılmasının adaptasyonda etkili olduğu vurgulanmaktadır (Hazarika 2003). Doku kültür çalışmalarında dış koşullarına adaptasyon büyük bir sorundur ve bazen olumsuz koşullardan dolayı elde edilen bitkilerin dış koşullara alıştırmak çok zor olmaktadır. Bu tez kapsamında her substratta 40 bitki kullanılmıştır. Doku kültürü koşullarında geliştirilmiş bitkilerin dış şartlara alıştırılması için daimi daldırma sisteminde, sıvı MS veya 1 mg/l GA₃ ve 1 mg/l IBA içeren ortamda büyümeleri takip edilmiştir. Ayrıca, killi toprak ve hayvan gübre karışımı, kil ve torf karışımı, kum ve perlit kullanarak geliştirilmiş bitkilerin dış koşullarına alıştırmaya çalışılmıştır; ancak, torf dışı, tüm substratların bitki gelişmelerinde çeşitli şekilde engel olduğundan bitkiler alıştırmadan ölmüşlerdir. Torf da ise, oda sıcaklığında ve poşet içerisinde gelişen 40 adet bitkiden 23 bitki alıştırılmış olup tarlaya şaşırtılmıştır. Elde edilmiş sonuçlar, bitkilerin normal ve foto-ototrofik hayat geliştirmek için, uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bitkilerin benzer koşullarda gelişmesine rağmen yalnız torf içeren ortamda alıştırılması, çevre koşulları ile beraber toprak tipinin önemini de vurgulamaktadır. Buna karşı, Tsuru vd. (1999), *L. angustifolia*'nın yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyon ile elde edilmiş bitkileri IBA içeren ½ MS ortamda köklendirilmiş olup, adaptasyon için sera koşullarında vermikülit kullanmıştır. Benzer şekilde, Falk vd. (2009), 400 adet *L. angustifolia* bitkisi *in vitro* koşullarda geliştirilmiş olup, dış şartlara adaptasyonunu sağlamak için potting soil/saksı toprağı (organik maddeler, kum, ve perlit) kullanmışlardır. Machado vd. (2011), ise *L. angustifolia*'nın Provence Blue, English ve Elegance Ice çeşitlerinden elde edilen köklenen bitkilerde, %82-%100 oranda belirtilmemiş substrat kullanarak dış şartlara adaptasyon sağlamaktadır.

***L. angustifolia* bitkisinde Gen Aktarım Çalışmaları**

A. tumefaciens'nin GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı

In vitro koşullarda gelişen 5 haftalık *L. angustifolia* bitkiciklerden alınan meristematik ucu eksplantları *A. tumefaciens*'in GV2260 p35 GUS INT hattı ile 30 dk muamele edildikten sonra 24 saat MS ortamında kokültivasyon yapılmıştır. Daha sonra, eksplantlar 50 mg/l kanamisin monosülfat ile 500 mg/l Augmentin içeren MS seleksiyon ortamına kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra, elde edilen sürgünler 1.25 mg/l IBA, 50 mg/l kanamisin monosülfat ve 500 mg/l Augmentin içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Sekiz hafta sonra transgenik aday sürgünlerde köklenme görülmüştür. Daha sonra, köklenen transgenik aday bitkiler torf içeren saksılara aktarılmış olup, oda sıcaklığında ve poşet içerisinde gelişmeleri takip edilmiştir. Adaptasyon sonucunda, 40 adet transgenik aday bitkilerden yalnız 5 adet bitki gelişmiş olup, tarlaya şaşırtılmıştır. Yaklaşık 2 ay sonra tarladaki bitki yatağında gelişen bitkilerden yaprak örnekleri alınarak yapılan GUS analizi sonucunda, üzerinde mavi renk veya bölgeler tespit edilmiştir. Dronne vd. (1998), *in vitro* koşullarında yapılan denemede, beş lavandin çeşidini kullanarak, rejenerasyon ve gen aktarımı optimizasyonu yapmışlardır. Bu denemede 4 ay sonra '37-70' çeşidinde, her eksplanttan ortalama 7, diğer çeşitlerde 0.5-3.5 sürgün elde edilmiştir. *Agrobacterium* vasıtasıyla gen aktarım metodunda β -glucuronidase ve neomycin phosphotransferase II genleri kullanılmış olup, altı hafta sonra yaprak eksplantlarda, β -glucuronidase geninin varlığı doğrulanmıştır. Ayrıca kanamycin dayanıklı ortamda 6 hafta sonra kallus oluşumu görülmüştür. Certitude, '41-70' ve 'B-110' çeşidinde transformasyon frekans sırasıyla %3 ve %89 olarak belirlenmiştir.

A. tumefaciens'nin LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı

In vitro koşullarda gelişen 5 haftalık *L. angustifolia* bitkiciklerden alınan meristematik ucu eksplantları *A. tumefaciens*'in LBA 4404 pRGGbar hattı ile 30 dk muamele edildikten sonra 24 saat MS ortamında kokültivasyon yapılmıştır. Daha sonra, eksplantlar 50 mg/l kanamisin monosülfat, 2.5 mg/l fosfinotrisin ile 500 mg/l Augmentin

bakteriostatik içeren MS seleksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra, elde edilen sürgünler 1.25 mg/l IBA, 50 mg/l kanamisin monosülfat, 2.5 mg/l fosfinotrisin ve 500 mg/l Augmentin içeren MS ortamında köklendirilmiştir. İki hafta sonra, sürgünlerde belirgin şekilde adventif kök oluşumu gözlenmiştir. Daha sonra, köklenen transgenik aday bitkiler torf içeren saksılara aktarılmış olup, oda sıcaklığında ve poşet içerisinde gelişmeleri takip edilmiştir. Adaptasyon sonucunda, 40 adet transgenik aday bitkilerden 13 adet bitki şaşırtılmış olup, 5 adet bitki tarla koşullarında halen yaşamaktadır. Yaklaşık 2 ay sonra tarladaki bitki yatağında gelişen bitkilerden yaprak örnekleri alınarak yapılan *GUS* analizi sonucunda, üzerinde mavi renk veya bölgeler tespit edilmiştir. Lavanta bitkisinin her hangi türde herbisitlere dayanıklı biki elde etmek için çalışma bulunmamaktadır. Ancak, Li vd. (2001), aynı familyasına ait nane bitkisinde geniş spektrumlu herbisit glufosinate dayanlı bitki elde etmek amacıyla OCS-upstream-activating sekans (UAS)'nın trimer ile bağlı MAS promoter/activator region[(OCS)3MAS] içeren nopaline synthase (NOS) veya kimerik promoter taşıyan *A. tumefaciens* hattı kullanarak glufosinate-ammonium veya phosphinothricin (PPT)i inaktive yapan fosfonitricin asetiltransferaz (PAT) geni aktarmıştır. Araştırmacılar toplam 142 transgenik nane (cv. Black Mitcham) bitki elde etmiştir. İnceleme sonucunda, glufosinate herbisit Liberty sprey ile muamile edilmiş transgenik bitkiler, transgenik olmayan bitkilere göre daha az zarar görmüşlerdir. Elde edilen bitkilerden rasgele seçilmiş 35 bitkide PCR ile bar pozitif sonuç doğrulanmıştır. Benzer şekilde Mishiba vd. (2000), *A. tumefaciens*'in LBA4404 (pTOK233) hattıyla ve Nebauer vd. (2000), *L. latifolia*'da *A. tumefaciens*'nin EHA105 hattı ve *nptII* ile *gus int* taşıyan genleri kullanarak başarıyla transgenik bitkiler elde etmişlerdir.

***L. stoechas* Yüzey Sterilizasyon**

L. stoechas bitkisinin tohumlarından bakteri, mantar ve benzeri organizmaların temizlenebilmesi için yüzey sterilizasyon yapılmıştır. Tohumların yüzey sterilizasyon için en düşük seviyede çamaşır suyu dozu ve en az süre belirlenmiştir (Bhatti, 2001).

Tohumlarının yüzey sterilizasyon için 4, 7, 10 dk süre ve % 5, 10, 15 ve 20 oranda ticari çamaşır suyu (Ace, Türkiye) kullanılmıştır. Farklı muameleler (uygulama Süresi

x çamaşır suyu Oranı) sonucunda en fazla %100.00 çimlenme 7 dk, %20 çamaşır suyu ve 10 dk, %5 çamaşır suyu muamele sonucunda elde edilmiştir. Benzer şekilde, Quazi (1980), iki tür Lavanta (*L. angustifolia* ve *L. latifolia*) bitkisinin sterilizasyonu için, eksplantları %70'lik etanol da 30 saniye bekletilmiş; ayrıca 20 dk, %0.32'lik sodyum hipoklorid'ile muamile yaptıktan sonra distile saf su'ile durulama yapmıştır.

***L. stoechas* bitkisinde Doku Kültürü Çalışmaları**

L. stoechas bitkisinde Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri

In vitro koşullarda 1 haftada çimlenen, 10 günlük bitkiciklerin primer yaprağından sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamı kullanılmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre, tüm ortamlarda primer yaprak eksplantı üzerinde adventif sürgün rejenerasyonu görülmemiş olup, kallus oluşumu ve sürgün primordiaları gözlenmiştir. BAP ve NAA'nın farklı konsantrasyonlar kallus oluşum ve nekroz oluşumuna farklı oranda etki göstermişlerdir. Elde edilen sonuçlarına göre konsantrasyon olarak 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamlar nekrozdan en fazla ve 0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA ve üzere nekroz oluşumundan, az etkilenmişlerdir. Tez kapsamında yapılan çalışma, Tsuro vd. (1999)'nin çalışmasına kallus oluşum bakımından benzerlik göstermesine rağmen, sürgün oluşum bakımından benzerlik göstermemektedir. Araştırmacılar, *L. angustifolia*'nın yaprak eksplantlarından kallus oluşumu ve sırasıyla 4.4×10^{-5} M BAP ve 4.0×10^{-7} M CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea) içeren MS ortamında kallus üzerinde %55.3 ve %52 sürgün oluşumu görmüşlerdir. Benzer şekilde, Falk vd. (2009), çalışmasında, *L. angustifolia* bitkisinin rejenerasyonu için kullanılan genç yaprak eksplantı üzerinde, karanlıkta ve 9 µM TDZ ve ya 2,4-D içeren MS ortamında iki hafta sonra kallus oluşum gözlenmiş olup, sürgün rejenerasyon görülmüştür. TDZ içeren ortamda ise araştırmacılar, eksplantlar üzerinde her hangi sürgün oluşumu görmemişlerdir. Ghiorghita vd. (2009), *L. angustifolia* bitkisinde yaprak eksplantını kullanarak MS ortamı ve NAA, BAP, IAA ve kinetin + NAA içeren MS ortamında sürgün rejenerasyon yapmışlardır. Tez kapsamındaki çalışmalarda ve daha önce yukarıda belirtilmiş sonuçlar arasındaki farklılığı, kullanılmış materyalin ve ortamlardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Hipokotil eksplantından farklı BAP ve NAA dozları ile adventif sürgün rejenerasyonu

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen hipokotil eksplantları farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kallus üzerinde farklı oranda nekroz oluşum görülmüş olup; sürgün uç oluşmasına rağmen her hangi gelişeme gözlenmemiştir. Buna karşı, Calvo ve Segura (1988), çalışmalarında, *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş *L. latifolia* ve *L. stoechas* türlerine ait bitkiciklerin hipokotil eksplantından farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonlarda IAA, NAA ya da 2,4-D ile BAP yada Kinetin içeren ortamlarda kallus ve sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen kotiledon yaprak eksplantı farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlar üzerinde farklı oranda kallus ve sürgün uçları görünmüş olup, kallus ve nekroz oluşumu nedeni her hangi adventif sürgün gözlenmemiştir. Buna karşı, Tsuru vd. (1999) ve Falk vd. (2009) *L. angustifolia*'nın yaprak eksplantlarından farklı oranda BAP ve TDZ içeren MS ortamlarda kallus oluşumu ve daha sonra üzerinde sürgün oluşumu görmüşlerdir. Benzer şekilde Ghiorghita vd. (2009), *L. angustifolia* bitkisinde yaprak eksplantı kullanarak farklı oranda NAA, BAP, IAA ve kinetin + NAA içeren MS ortamında sürgün rejenerasyon elde etmiştir.

Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacı ile *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen primer yaprak eksplantı farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sonuçlara göre yalnız 0.25 mg/l BAP ve 1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında eksplantlar üzerinde

adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Diğer ortamlarda sürgün uçu oluşmasına rağmen ortamda bulunan BAP-NAA konsantrasyonların olumsuz etkilerinden dolayı gelişmeler görülmemiştir. Bu çalışmadaki sonuçları, Tsuro vd. (1999), çalışmasına kısmen benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar, *L. angustifolia*'nın yaprak eksplantlarından kallus oluşumu ve sırasıyla 4.4×10^{-5} M BAP ve 4.0×10^{-7} M CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea) içeren MS ortamında kallus üzerinde %55.3 ve %52 sürgün oluşmu görmüşlerdir. Benzer şekilde, Falk vd. (2009) *L. angustifolia* bitkisinin rejenerasyonu için, genç yaprak eksplantını, karanlıkta ve 9 µM TDZ ve ya 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. İki hafta sonra eksplantlarda kallus oluşum gözlenmiş olup, 4 hafta sonra eksplantlar üzerinde sürgün rejenerasyon görülmüştür. TDZ içeren ortamda, eksplantlar üzerinde her hangi sürgün oluşumu gözlenmemiştir. Ghiorghita vd. (2009), *L. angustifolia* bitkisinde yaprak eksplantını kullanarak MS ortamı ve NAA, BAP, IAA ve kinetin + NAA içeren MS ortamında sürgün rejenerasyon yapmışlardır.

Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen kotiledon yaprak eksplantları farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiş olup, eksplantlarda kararma (nekroz) görülmüştür. Ayrıca, eksplantlar üzerindeki sürgün uçları olumsuz şekilde etkilenmeye başlamıştır. Buna karşı, Tsuro vd. (1999) ve Falk vd. (2009) *L. angustifolia*'nın yaprak eksplantlarından farklı oranda BAP ve TDZ içeren MS ortamlarda kallus oluşumu daha sonra üzerinde sürgün oluşumu görmüşlerdir. Benzer şekilde Ghiorghita vd. (2009), *L. angustifolia* bitkisinde yaprak eksplantı kullanarak farklı oranda NAA, BAP, IAA ve kinetin + NAA içeren MS ortamında sürgün rejenerasyon elde etmiştir.

Hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacı ile *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen hipokotil eksplantı farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre her hangi eksplantta adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiş olup, eksplantlarda kararma (nekroz) görülmüştür. Buna karşı, Calvo ve Segura (1988), *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş *L. latifolia* ve *L. stoechas* türlerine ait bitkiciklerin hipokotil eksplantından farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonlarda IAA, NAA ya da 2,4-D ile BAP ya da Kinetin içeren ortamlarda kallus ve sürgün oluşumunu teyit etmişlerdir.

Kotiledon yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen kotiledon yaprak eksplantı farklı oranda BAP, NAA ve GA₃ ile 4 g/l aktif kömür içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre tüm eksplantlarda kararma görülmüş olup, gelişen sürgün uçları ciddi şekilde zarar görmüşlerdir. Buna karşı, Tsuro vd. (1999) ve Falk vd. (2009) *L. angustifolia* 'nın yaprak eksplantlarından farklı oranda BAP ve TDZ içeren MS ortamlarda kallus ve sürgün oluşmu görmüşlerdir. Benzer şekilde Ghiorghita vd. (2009), da *L. angustifolia* bitkisinde yaprak eksplantı kullanarak farklı oranda NAA, BAP, IAA ve kinetin + NAA içeren MS ortamında sürgün rejenerasyon elde etmişlerdir. Bunun nedeni, yukarıda belirtilmiş çalışmaların ve bu tez kapsamında kullanılmış eksplantın ve ortamların farklılığından tahmin edilmektedir.

Primer yaprak eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı BAP, NAA ve GA₃ ile aktif kömür dozlarının etkileri

Adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacı ile *in vitro* koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen primer yaprak eksplantı farklı

oranda BAP, NAA ve GA₃ ile aktif komür içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçlara göre tüm eksplantlarda ne adventif sürgün rejenerasyonu ne de kallus oluşumu gözlenmemiştir. Ancak, eksplant doku hücrelerin çoğaltımı sonucunda eksplantlarda önemsiz derecede kıvrıma görülmüştür. Buna karşı, Tsuro vd. (1999), *L. angustifolia*'nın yaprak eksplantlarından kallus oluşumu ve sırasıyla 4.4×10^{-5} M BAP ve 4.0×10^{-7} M CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea) içeren MS ortamında kallus üzerinde %55.3 ve %52 sürgün oluşmu görmüşlerdir. Benzer şekilde, Falk vd. (2009) de yaptıkları çalışmada, *L. angustifolia* bitkisinin rejenerasyonu için, genç yaprak eksplantını kullanarak, karanlıkta ve 9 µM TDZ ve ya 2,4-D içeren MS ortamında kallus oluşum ve sürgün rejenerasyon görmüşlerdir. Ghiorghita vd. (2009), ise *L. angustifolia* bitkisinde yaprak eksplantını kullanarak MS ortamı ve NAA, BAP, IAA ve kinetin + NAA içeren MS ortamında sürgün rejenerasyon yapmışlardır.

Kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri

In vitro koşullarda 1 haftada steril edilmiş tohumlardan çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden elde edilen kotiledon boğum eksplantı farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamında kültüre alınmış eksplantlar üzerinde ilk önce kallus oluşum ve 8-12 gün sonra sürgün uçları başlamıştır. Daha sonra, gelişen kalluslarda kahveleşme ile nekroz görülmesine rağmen sürgün oluşumu da görülmüştür. En fazla %93.34 sürgün oluşum oranı ise, 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamlarında görülmüş olup, en fazla 5.60 sürgün 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında gözlenmiştir. Ortalama sürgün uzunluğu ise 0.34-1.60 cm arası değişmiştir. Nobre (1996), yaptığı çalışmada, Akdeniz yöresinde bulunan karabaş otu (*L. stoechas*)'nın *in vitro* klonal çoğaltımı için, dış ortamda yetişmiş bitkilerden alınan koltuk altı meristem eksplantını kullanmıştır. Sonuç olarak, 4-5 hafta sonra sürgün rejenerasyonu 217.2 µM adenine hemisülfat (AdS) ve 0.05 µM NAA içeren Margara N30K tuzları ile oluşan ortamında elde edilmiştir. Portilla vd. (1995), yaptıkları denemede *L. angustifolia*'nın *in vitro* mikroçoğaltımı için koltuk altı meristemleri kullanılmış olup, farklı konsantrasyonda NAA, BA kombinasyonları ve Hindistan cevizi sütü içeren ve içermeyen MS ortamlarında sürgün rejenerasyon elde etmişlerdir. Benzer şekilde, Dias vd. (2002), *L. viridis* bitkisinin koltuk altı meristem eksplantların 0.44 µM BAP içeren MS ortamında mikroçoğaltım yapılmıştır. Eksplant

başına en fazla 11.69 adet sürgün 0.67 µM BAP içeren ½ konsantrasyonlu MS ortamında gözlenmiştir.

Meristematik ucu, yukardan 1., 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamda mikroçoğaltım

Mikroçoğaltım amacıyla *L. stoechas* bitkiciklerden 1 haftada steril edilmiş tohumlardan çimlenen 40 günlük bitkilerden meristematik ucu, yukardan 1., 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltukaltı meristem eksplantı 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantlar üzerinde 7-10 gün sonra sürgün uçları ve daha sonra sürgün oluşum başlamıştır. Her beş eksplant arasında kıyaslama sonucunda en fazla sürgün oluşumu ve eksplant başına sürgün sayısı epikotil koltuk altı meristemi eksplantından elde edilmiştir. Nobre (1996), yaptığı çalışmada, Akdeniz yöresinde bulunan karabaş otu (*L. stoechas*)'nın *in vitro* klonal çoğaltımı için dış ortamda yetişmiş bitkilerden alınan koltuk altı meristem eksplantını kullanmıştır. Sonuç olarak, 4–5 hafta sonra sürgün rejenerasyonu 217.2 µM adenine hemisülfat (AdS) ve 0.05 µM NAA içeren Margara N30K tuzları ile oluşan ortamında elde edilmiştir. Andrade vd. (1999) ve Echeverrigaray vd. (2005), sırasıyla *L. angustifolia* bitkisinin boğum ve koltuk altı tomurcuk eksplantından farklı oranda BAP içeren MS ortamında sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir.

Kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirmek için kullanılan farklı dozlarda IBA'nin etkisi

L. stoechas kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi amacı ile eksplantlar farklı oranda IBA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantlar üzerinde 6-8 gün sonra kök uçları ve daha sonra kök oluşum başlamıştır. Kök oluşum oranı, kök uzunluğu ve sürgün boyu bakımından ortamlar arasında istatistiksel olarak ne kadar olmasada rakamsal olarak farklılık görülmüştür. Nobre (1996), yaptığı çalışmada, Akdeniz yöresinde bulunan karabaş otu (*L. stoechas*)'nın *in vitro* klonal çoğaltımı için dış ortamda yetişmiş bitkilerden alınan koltuk altı meristem eksplantını kullanmış olup, sürgün rejenerasyonundan elde edilen bitkileri 5.4 µM NAA içeren ortamda köklendirmiştir. Benzer şekilde, Panizza ve Tognoni (1991), çalışmalarında *ex vitro* koşullarda *L. angustifolia*'nın çeliklerini 3.0 mg l⁻¹ IBA ile;

Portilla vd. (1995), ise *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünleri 0.2-0.4 mgI⁻¹ IBA içeren ½ oranda MS makro, mikro elementler bulunduran ortamda köklendirmişlerdir.

Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu

In vitro koşullarda geliştirilmiş bitkilerin bir çoğun seralar veya tarla koşullarında düşük oranda nisbi nem (Brainerd ve Fuchigami 1981), yüksek yoğunlukta ışık ve çevre koşullarından kaynaklanan biyotik ve abiyotik faktörlerin etkisi ile strese girip, yaşamını yirtmaktadırlar (Misra ve Dutta 2001). Bitki doku kültürü çalışmalarında her bitki için adaptasyon şartlar farklı olup, onların seralar ve tarlaya şaşırtmadan önce kullanılacak toprak tipi ve iklim koşullarına adaptasyon ve optimizasyon çok önem taşımaktadır. Bazen *in vitro* koşullarda gelişmiş bitkilerde foto ototrofik yapısının olmadığından adaptasyonda zorluk görünmektedir (Fujiwara vd. 1988). Sonuçta, doku kültürü çalışmalarında her zaman adaptasyona en büyük sorun olarak rastlanmaktadır ve doku kültürü ile çoğaltılmış bitkilerin yaygınlaştırmada bir engel ve güç olarak değerlendirilmektedir. Her bitkiyi alıştırmak için farklı koşullar gerekebilmektedir, ancak, tüm araştırmacılar, *in vitro* koşullarda geliştirilmiş bitkilerin fizyolojik ve anatomik olarak çok narin olduğundan dış koşullara alıştırmada bitkilerin şaşırtılmış toprağın uygun olmasını ve yavaş yavaş alıştırılmasının adaptasyonunda etki olduğunu vurgulamaktadırlar (Hazarika 2003). Doku kültür çalışmalarında dış koşullarına adaptasyon büyük bir sorundur ve bazen olumsuz koşullardan dolayı elde edilen bitkilerin dış koşullara adaptasyon sağlamak çok zor olmaktadır. Bu tez kapsamında her substratta 40 bitki kullanılmıştır. Elde edilen bitkilerin dış şartlara alıştırılması için daimi daldırma sisteminde, doku kültürü koşullarında geliştirilmiş bitkiler, sıvı MS veya 1 mg/l GA₃ ve 1 mg/l IBA içeren ortamda büyümeleri takip edilmiştir. Ayrıca, killi toprak ve hayvan gübre karışımı, kum, perlit ve kil ile torf karışımı kullanarak geliştirilmiş bitkilerin dış koşullarına alıştırmaya çalışılmıştır; ancak, torf dışı, tüm substratların bitki gelişmelerinde çeşitli şekilde engel olduğundan bitkiler alıştırmadan ölmüşlerdir. Torf da ise, oda sıcaklığında ve poşet içerisinde gelişen 40 adet bitkiden 15 bitki alıştırılmış olup tarlaya şaşırtılmıştır. Elde edilmiş sonuçlar, bitkilerin normal ve foto ototrofik hayat geliştirmek için uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bitkilerin benzer koşullarda gelişmesine rağmen yalnız torf

içeren ortamda alıştırılmasında çevre koşullarla beraber toprak tipinin önemini de vurgulamaktadır. Nobre (1996), yaptığı çalışmada, Akdeniz yöresinde bulunan karabaş otu (*L. stoechas*)'nın *in vitro* klonal çoğaltımı için dış ortamda yetişmiş bitkilerden alınan koltuk altı meristem eksplantından elde edilmiş sürgünleri, 5.4 µM NAA içeren ortamda köklendirmiş olup, %100 adaptasyon sağlamıştır. Tsuru vd. (1999), *L. angustifolia*'nın yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyon ile elde edilmiş bitkileri IBA içeren ½ MS ortamda köklendirilmiş olup, adaptasyon için sera koşullarında vermikülit kullanmıştır. Falk vd. (2009), 400 adet *L. angustifolia* bitkisinin *in vitro* koşullarda geliştirilmiş olup, dış şartlara adaptasyonunu sağlamak için potting soil/saksı toprağı (organik maddeler, kum, ve perlit) kullanmışlardır.

***L. stoechas* Bitkisinde Gen Aktarım Çalışmaları**

A. tumefaciens GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı

In vitro koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden alınan kotiledon boğum eksplantları *A. tumefaciens*'in GV2260 p35 GUS INT hattı ile 30 dk muamele edildikten sonra 24 saat MS ortamda kokültivasyon yapılmıştır. Daha sonra, eksplantlar 0.25 mg/l BAP 50 mg/l kanamisin monosülfat ile 500 mg/l Augmentin içeren MS seleksiyon ortamına kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra, elde edilen sürgünler 1.00 mg/l IBA, 50 mg/l kanamisin monosülfat ve 500 mg/l Augmentin içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Sekiz hafta sonra transgenik aday sürgünlerde köklenme görülmüştür. Daha sonra, köklenen transgenik aday bitkiler torf içeren saksılara aktarılmış olup, oda sıcaklığında ve poşet içerisinde gelişmeleri takip edilmiştir. Adaptasyon sonucunda, 40 adet transgenik aday bitkilerden yalnız 5 adet bitki gelişmiş olup, tarlaya şaşırtılmıştır. Yaklaşık 2 ay sonra tarladaki bitki yatağında gelişen bitkilerden yaprak örnekleri alınarak yapılan *GUS* analizi sonucunda, üzerinde mavi renk tespit edilmiştir. Dronne vd. (1998), *in vitro* koşullarında yapılan denemede, beş lavandin çeşidini kullanarak, rejenerasyon ve gen aktarımı optimizasyonu yapmışlardır. Bu denemede 4 ay sonra '37-70' çeşidinde, eksplant başına 7 ve diğer çeşitlerde ise 0.5-3.5 sürgün elde edilmiştir. *Agrobacterium* vasıtasıyla gen aktarımında *β-glucuronidase* ve *neomycin phosphotransferase II* genleri kullanılmış olup, altı hafta sonra yaprak eksplantlarda, *β-glucuronidase* geninin olduğu tespit etmişlerdir. Ayrıca,

kanamisine dayanıklı ortamda 6 hafta sonra kallus oluşumu görülmüştür. Certitude, '41-70' ve 'B-110' çeşidinde transformasyon frekans sırasıyla %3 ve %89 olarak kayıtlanmıştır.

A. tumefaciens LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı

In vitro koşullarda 1 haftada çimlenen 10 günlük *L. stoechas* bitkiciklerden alınan kotiledon boğum eksplantları *A. tumefaciens*'in LBA 4404 pRGGbar hattı ile 30 dk muamele edildikten sonra 24 saat MS ortamda kokültivasyon yapılmıştır. Daha sonra, eksplantlar 0.25 mg/l BAP, 50 mg/l kanamisin monosülfat, 2.5 mg/l fosfotrisin ile 500 mg/l bakteriyostatik Augmentin içeren MS seleksiyon ortamına kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra, elde edilen sürgünler 1.00 mg/l IBA, 50 mg/l kanamisin monosülfat, 2.5 mg/l fosfotrisin ve 500 mg/l Augmentin içeren MS ortamında köklendirilmiştir. İki hafta sonra, sürgünlerde belirgin şekilde adventif kök oluşumu gözlenmiştir. Daha sonra köklenen transgenik aday bitkiler, saksılara aktarılmış olup, gelişmeler takip edilmiştir. Steril edilmiş torfta, oda sıcaklığında aktarılan transgenik aday bitkiler, fiziksel olarak zayıf olduğundan dolayı gelişmemiş olup, 2 ay sonra ölmüşlerdir. Ayrıca, bitkiler ölmeden yaprak örnekleri alınarak yapılan *GUS* analizi sonucunda mavi renk tespit edilmiştir. Lavanta bitkisinin her hangi türde herbisitlere dayanıklı biki elde etmek için çalışma bulunmamaktadır. Ancak, Li vd. (2001), aynı familyasına ait nane bitkisinde geniş spektrumlu herbisit glufosinate dayanıklı bitki elde etmek amacıyla OCS-upstream-activating sekans (UAS)'nın trimer ile bağlı MAS promoter/activator region [(OCS)₃MAS] içeren nopaline synthase (NOS) veya kimerik promoter taşıyan *A. tumefaciens* hattı kullanarak glufosinate-ammonium veya fosfotrisin (PPT) i inaktive yapan fosfotrisin asetiltransferaz (PAT) geni aktarmıştır. Araştırmacılar toplam 142 transgenik nane (cv. Black Mitcham) bitki elde etmiştir. İnceleme sonucunda, glufosinate herbisit Liberty sprey edilmiş transgenik bitkiler, transgenik olmayan bitkilere göre daha az zarar görmüşlerdir. Transgenik aday bitkilerden rasgele seçilmiş 35 bitkide PCR ile bar pozitif sonuç doğrulanmıştır. Benzer şekilde Mishiba vd. (2000), *A. tumefaciens*'nin LBA4404 (pTOK233) hattıyla ve Nebauer vd. (2000), *L. latifolia*'da *A. tumefaciens*'nin EHA105 hattı ve *nptII* ile *gus int* taşıyan genleri kullanarak başarıyla transgenik bitkiler elde etmiş olup, 24 bitkide *GUS*, PCR ve southern hibridizasyon testi ile gen aktarımı doğrulanmıştır.

Sonuçlar ve Öneriler

1. Doku kültürü çalışmalarında sterilizasyon, çimlenmeyi doğrudan etkilemekte olup, önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmalarda *L. angustifolia* için 4 dk, %5 çamaşır suyu ve *L. stoechas* için 7 dk, %20 çamaşır suyu ile sterilizasyon uygun görülmüştür.

2. Hem *L. angustifolia* hem de *L. stoechas* denemelerinde sürgün rejenerasyonu için kullanılan hipokotil, primer yaprak ve kotilodon yaprak eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiş olup, kallus oluşumu ve sürgün primordiaları görülmüştür. Bir sonraki çalışmalarda, sürgün uçlarının sürgüne dönüştürülmemesine ve kalluslardaki nekroz oluşumuna ait sebeplerin araştırması vurgulanmaktadır.

3. Denemelerde *L. angustifolia* bitkisinin mikroçoğaltımı için kotiledon boğum ve meristematik ucu eksplantı kullanırken, *L. stoechas* bitkisi için kotiledon boğum, meristematik ucu, yukardan 1., 2. ve 3. koltuk altı meristem ve epikotil koltuk altı meristem eksplantlar kullanılmış olup, yüksek oranda sürgün rejenerasyon sağlanmıştır. Her iki tür de, sürgün rejenerasyonu ve deneme süresi bakımından en iyi eksplant kotiledon boğum olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, transgenik bitki elde etmek için kullanılan *A. tumefaciens* hatlarıyla gen aktarım çalışmalarında *L. angustifolia* için meristematik ucu ve *L. stoechas* için kotiledon boğum kullanılmıştır.

4. Elde edilen aday transgenik ve transgenik olmayan *L. angustifolia* sürgünleri 1.25 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Ayrıca, elde edilen aday transgenik ve transgenik olmayan *L. stoechas* sürgünlerinin köklendirilmesi ise 1.00 mg/l IBA içeren MS ortamında görülmüştür.

5. Bitki doku kültürü çalışmalarında her bitki için adaptasyon şartları farklı olup, onların sera ve tarlaya şaşırtmadan önce kullanılacak toprak tipi ve iklim koşullarına adaptasyon optimizasyonu çok önem taşımaktadır. Ayrıca, doku kültür çalışmalarında dış koşullarına adaptasyon büyük bir sorundur ve bazen olumsuz koşullardan dolayı elde edilen bitkilerin dış koşullara adaptasyon sağlamsı çok zor olmaktadır. Tez kapsamında, *in vitro* koşullarında geliştirilmiş bitkiler, Mayıs ve Eylül ayları arası

tarlaya şaşırtılmıştır. Şaşırtma sonucunda bitki adaptasyonu için aşağıdaki öneriler önemle tavsiye edilmektedir.

- a) Bitkileri MS ortamından çıkarttıktan sonra, köklerin su ile iyice yıkanması ve en az 30 dk temiz kova içinde suda dalmış şekilde bekletilmesi.
- b) Bitki köklerinin hassas olduğundan dolayı, su tutma kapasitesi az olan bir substrat, özellikle torfun kullanılması. Ayrıca, substratın, drenaj için delikler bulunduran saksılara doldurulması.
- c) Bitkilerin hem saksı hem de tarlaya şaşırtılmadan önce bitki yatağının tarla kapasitesinde olması.
- d) Saksıya şaşırtılmış bitkilerde gelişme görülünceye kadar sadece yapraklar el püskürtücü ile sulanması ve saksıların şafaf poşet ile kapatılması.
- e) Bitkilerin saksılara şaşırtmasından 7 gün sonra poşetlerde delikler açılması ve 7 gün daha gelişmeleri takip ederek, 14'üncü gün poşetin tamamen çıkartılması.
- f) 2-3 günde bir saksıların sulanması yanısıra, bitki yapraklarının el püskürtücü ile sulandırılması.
- g) Yaklaşık bir ay daha bitki gelişimini takip ederek, besin madde ve mineraller bakımından toprak analizi yapılmış tarlaya aktarılması ve tarladaki rutin işlerin yapılması.
- h) Ayrıca, bitkilerin tarlaya şaşırtma zamanının nisan-mayıs ayları arasında olması.

Transgenik bitkiler içinde yukardaki sorunlar yaşanmakta olup, bitkiler daha hassas olduğu için daha fazla bakıma ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak tez çalışmasında Türkiye ve dünya için ekonomik önemi olan *L. angustifolia* ve *L. stoechas*'in *in vitro* sürgün ve kök oluşumu, ayrıca gen aktarımı çalışmaları ve daha sonra elde edilen bitkilerin *ex vitro* adaptasyon açısından, önemli bulgular elde edilmiş olup, bitkilerin çoğaltılmasına yönelik protokol optimize edilmiştir. Bu protokoldan yola çıkarak diğer Lamiaceae familyasına ait tıbbi ve aromatik bitkilerde yapılacak doku kültürü ve gen aktarımı çalışmalarında kullanılması ile olumlu sonuçlara varılacağı inanılmaktadır. Ayrıca, bu çalışmada kullanılan her iki

türün doku kültürü ve gen aktarımı ile ilgili çalışmalarının, dünyada nadir olmasından, Türkiye ve dünya literatürüne önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Andrade, L.B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G.F and Rota, L. 1999. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). Plant cell, Tissue and organ culture, Vol. 56 pp.79-83.
- Anonim. 2004. Türkiye istatistik kurumu 2004 yılı Ocak – Aralık dönemi dış ticaret verileri.
- Anonim. 2005. Türkiye istatistik kurumu 2005 yılı Ocak – Aralık dönemi dış ticaret verileri.
- Anonim. 2006. Türkiye istatistik kurumu 2006 yılı Ocak – Aralık dönemi dış ticaret verileri.
- Anonim. 2007. Türkiye istatistik kurumu 2007 yılı Ocak – Aralık dönemi dış ticaret verileri.
- Anonim. 2008. Türkiye istatistik kurumu 2008 yılı Ocak – Aralık dönemi dış ticaret verileri.
- Anonim. 2009. Türkiye istatistik kurumu 2009 yılı Ocak – Haziran dönemi dış ticaret verileri.
- Anonim. 2011. <http://www.eski.tubitak.gov.tr/tubives>. 15/10/2011
- Arı, 2001. Doğrudan gen aktarım teknikleri, bitki biyoteknolojisi 11, genetik mühendisliği ve uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, s. 160-169.
- Arrebola, M.L and Socorro, O. 1997. Micropropagation of *Satureja obovata* Lag. HortScience, Vol. 32 pp. 1278-1280.
- Bailey, L.H. 1969. Manual of cultivated plants most commonly grown in the continental United States and Canada, by L. H. Bailey and the staff of the Bailey Hortorium at Cornell University. MacMillan in New York, 1116 p.
- Başer, K.H.C. 1993. Essential Oils Of Anatolian Lamiaceae: A. Profile. Acta Horti, Vol. 333 pp. 217–238.
- Baydar, H. 2007. Tıbbi, aromatik ve keyif bitkileri bilimi ve teknolojisi (Genişletilmiş II baskı). Süleyman Demirel Üniversitesi (ziraat fakültesi), Vol. 51 pp. 205–212.
- Baytop, T. 1984. In: Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present) 3255. Publications of the Istanbul University, 316 p.

- Bhatti, K. M. K. 2001. Mercimek (*Lens culinaris* Medik.)’te Doku Kültürü Çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, YÖK Tez No: 120164, Ankara.
- Bienvenu, F. 1995. Lavender growing for oil production. Agriculture notes, Ovens Research Station, Myrtleford, ISSN 1329-8062.
- Boelens, M.H. 1995. Chemical and sensory evaluation of *Lavandula* oils. Perfum Flavour, Vol. 20 pp. 23-51.
- Brainerd, K.E and Fuchigami, L.H. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low humidity. J. Am. Soc. Hortic. Sci. Vol. 106 pp. 515–518.
- Calvo, M.C and Segura, J. 1988. *In vitro* morphogenesis from explants of *Lavandula latifolia* and *Lavandula stoechas* seedlings. Sci Hortic-Amsterdam, Vol. 36 pp. 131-137.
- Chavagnat, A. 1978. Lavender seed dormancy and germination. Acta Hort. (ISHS) Vol. 83 pp.147-154.
- Chishti, N., Kaloo, Z.A., Shawl, A.S and Phalirsteen, S. 2006. Rapid *in vitro* clonal propagation of *Lavandula officinalis* chaix a multipurpose plant of industrial importance. Pakistan journal of biological science, Vol. 9 pp. 514-518.
- Davis, P.H. 1982. In: Flora of Turkey. Edinburgh University Press, 76 p.
- Dias, M.C., Almeida, R and Romano, A. 2002. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L’Hér through *in vitro* axillary shoot proliferation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 68 pp. 99-102.
- Dilik, M. 2006. Şemdinli lalesi (*fritillaria imperialis* l.) ve adıyaman Lalesi (*f.persica* l.)’nin doku kültürüyle çoğaltılması. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 99 s.
- Dronne, S., Moja, S., Jullien, F., Berger, F and Caissard, J.C. 1999. *Agrobacterium*-mediated transformation of lavandin (*Lavandula x intermedia Emeric ex Loiseleur*). Kluwer Academic Publishers, Vol. 8 pp. 335–347.
- Dronne, S., Colson, M., Moja, S and Faure, O. 1998. Plant regeneration and transient *GUS* expression in a range of lavandin (*Lavandula x intermedia emeric ex loiseleur*) cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 55 pp. 193-198.
- Dudu, Ö. 2006. Kekik (*origanum minutiflorum*) ve adaçayı (*sideritis stricta*)’nin doku kültürü yoluyla çoğaltımı üzerinde araştırmalar. Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Doktora Tezi, 105 s.

- Echeverrigaray, S., Basso, R and Andrade, L. 2005. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. *Biologia Plantarum*, Vol. 49 pp. 439-442.
- Falk, L., Biswas, K., Boeckelmann, A., Lane, A and Mahmoud, S.S. 2009. An efficient method for the micropropagation of lavender regeneration of a unique mutant. *Journal of essential oil research*, Vol. 21 pp. 225-228.
- Frank P and Simione, M.S. 1998. Cryopreservation Manual. Nalge Nunc International Corp, <http://www.nalgenelabware.com/techdata/technical/cryo.pdf>
- Fujiwara, K., Kozai, T and Watanabe, I. 1988. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stage. *Acta Horti*, Vol. 230 pp. 153–158.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell Res*, Vol. 50 pp. 151-158.
- Ghiorghita, G., Maftei, D.E and Nicuta, D. 2009. Some aspects concerning the *in vitro* reaction of *Lavandula angustifolia* L. *Propagation of Ornamental Plants*, Vol. 9 pp. 47-49.
- Gilani, A.H., Aziz, N., Khan, M.A., Shaheen, F., Jabeen, Q., Siddiqui, B.S and Herzig, J.W. 2000. Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L. *J Ethnopharmacol*, Vol. 71 pp. 161–167.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T and Baser, K.H.C. 2000. Flora of Turkey and East Aegean Islands. Supplement II. *Edinburgh Univ*, Vol. 11 pp. 618-619.
- Hassiotis, C.N., Tarantilis, P.A., Daferera, D and Polissiou, M.G. 2010. Etherio, a new variety of *Lavandula angustifolia* with improved essential oil production and composition from natural selected genotypes growing in Greece. *Ind Crop Prod*, Vol. 32 pp. 77-82.
- Hazarika, B.N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plant. *Current Science*, Vol. 85 (12) pp. 1704-1712.
- Heywood, V.H. 1996. *Flowering Plants of the World*. BT Batsford Ltd, 239 p.
- Hickey, M and King, C. 1997. *Common Families of Flowering Plants*. Cambridge Univ, pp 119-127.
- Hui, L., He, L., Huan, L., XiaoLan, L and Aiguo, Z. 2010. Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitis-related bacteria. *Afr J Microbiol Res*, Vol. 4 pp. 309-313.

- İpek, A. 2007. Tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis*) hatlarında azotlu gübrelemenin Herba verimi ve bazı özellikler üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim dalı Doktora Tezi, 109 s.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* Vol. 5 pp. 387-405.
- Jordan, A.M., Calvo, M.C and Segura, J. 1998. Micropropagation of adult *Lavandula dentata* plants. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, Vol. 73 pp. 93-96.
- Kan, Y., Arslan, N., Altun, L ve Kartal, M. 2006. Türkiye’de tıbbi ve aromatik bitkilerin kültürünün ekonomik önemi. 15. Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı bildiri kitabı, cilt. 3 s. 213-219.
- Kumari, N and Saradhi, P.P. 1992. Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgare* L. *Plant Cell Rep*, Vol. 11 pp. 476-479.
- Li, X., Gong, Z., Koiwa, H., Niu, X., Espartero, J., Zhu, X., Veronese, P., Ruggiero, B., Bressan, R.A., Weller, S.C and Hasegawa, P.M. 2001. Bar-expressing peppermint (*Mentha × Piperita* L. var. Black Mitcham) plants are highly resistant to the glufosinate herbicide Liberty. *Molecular Breeding*, Vol. 8 pp. 109–118.
- Lis-Balchin, M. 2002. Lavender. Taylor & Francis, 283 p.
- Machado, M.P., Santos, G.D., Deschamps, C and Biasi, L.A. 2011. Rooting of *Lavandula angustifolia* microcuttings. *Ciencia Rural*, Vol. 41 pp. 767-772.
- Mansuroglu, S ve Gürel, E. 2001. Mikroçoğaltım, bitki biyoteknolojisi I, doku kültürü ve uygulamaları. S. Ü. Vakfı Yayınları, ISBN 975-6652-04-7 s. 262-281.
- Miachir, J.I., Romani, V.L.M., de Campos Amaral, A.F., Mello, M.O., Crocomo, O.J and Melo, M. 2004. Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoaria* Roscoe. *Sci Agric*, Vol. 61 pp. 427-432.
- Mishiba, K.I., Ishikawa, K., Tsujii, O and Mii, M. 2000. Efficient transformation of lavender (*Lavandula latifolia* Medicus) mediated by *Agrobacterium*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, Vol. 75 pp. 287-292.
- Misra, P and Dutta, S.K. 2001. Acclimatization of Asiatic hybrid lilies under stress condition after propagation through tissue culture. *Curr. Sci*, Vol. 81 pp. 1530–1533.
- Mokhtarzadeh, S., Khawar, K.M ve Ozcan, S. 2011. Karabaş otu (*lavandula stoechas* L.)’nın *in vitro* mikroçoğaltımı. Uluslararası katılımlı 1. ali numan kıraç tarım kongresi ve fuarı, cilt. 3 s.2689-2692.

- Munoz, B.J., Ros R., Arrillaga, I and Segura, J. 2008. Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. *Metabolic Engineering*, Vol. 10 pp. 166-177.
- Murashige, T and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, Vol.15 pp. 473-497.
- Nebauer, S.G., Arrillaga, I., Agudo, L.C and Segura, J. 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the aromatic shrub *Lavandula latifolia*. Kluwer Academic Publishers, Vol. 6 pp. 539-552.
- Nobre, J. 1996. *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from fieldgrown plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 46 pp. 151-155.
- Orhan, S. 2007. Karabaş otu (*lavandula stoechas* L.) bitkisinin farklı *in vitro* besin ortamlarında kültüre alınması.. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 64 s.
- Panizza, M and Tognoni, F. 1988. Clonal propagation, callus formation and plant regeneration of lavandin. *Sci Horti*, Vol. 37 pp. 157-163.
- Panizza, M and Tognoni, F. 1991. Micropropagation of Lavandin (*Lavandula officinalis* Chaix _ *Lavandula latifolia* Villars cv. Grosso). In: YPS Bajaj (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-tech and micropropagation III*. Springer-Berlin, Heidelberg-New York, Vol. 19 pp. 295-305.
- Peyvandi, M., Kazemi, L and Majd, A. 2009. Callogenesis and organogenesis of *Lavandula vera* DC. *Journal on Plant Science Researches*, Vol. 15(3) pp. 57-64.
- Portilla, G., Eltran, J.B and Vega, A. 1995. Micropropagation of lavender (*Lavandula angustifolia*) from axillary buds *Investigacion Agricola*, Vol. 15 pp. 55-60.
- Quazi, M.H. 1980. *In vitro* multiplication of *Lavandula* spp. *Ann Bot*, vol .45 pp. 361-362.
- Sağlam, S. 2010. Tohum böceklerine (*Bruchidae coleoptera*) dayanıklı transgenik fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkilerinin elde edilmesine yönelik araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 101 s.
- Sanchez-Gras, M.C and Calvo, M.D.C. 1996. Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 45 pp. 259-261.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L ve Leblebici, E. 2000. Tohumlu Bitkiler Sistematığı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116. İzmir.

- Snedecor, G.W and Cochran, W.G. 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa. USA.
- Tsuro, M., Koda, M and Inoue, M. 1999. Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC). *Sci Hortic*, Vol. 81 pp. 331-333.
- Tsuro, M., Koda, M and Inoue, M. 2000. Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system” . *Sci Hortic*, Vol. 86 pp. 81-88.
- Tsuro, M., Ikedo, H and Kato, H. 2009. Efficient genetic transformation in lavandin using *Agrobacterium rhizogenes* as vector. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* , Vol. 78 pp. 236-241.
- Wang, K., Herrera-Estrella, M., Van Montagu, M and Zambryski, P. 1984. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline TDNA is essential fo , and determines the direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to plant genome. *Cell*, Vol. 38 pp. 35-41.
- Xing, W. C., Yun, Q., Zhao, M. A and Cao, X. 2006. Genetic transformation of *Lavandula angustifolia* cv. munstead by way of cold-inducible protein gene (scp) from saussurea involucreta mediated by agrobacterium. *Plant Physiology Communications*, Vol. 42 pp. 862-866.
- Yenici, N. 1999. *Lavandula stoechas* bitkisinin özellikleri ve fibrinolitik sisteme etkisinin araştırılması yüksek lisans tezi. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 37 s.
- Zhao, D.L., Guo, G.Q., Wang, X.Y and Zheng, G.C. 2003. *In vitro* micropropagation of a medicinal plant species *Sophora flavescens*. *Biol Plantarum*, Vol. 47 pp. 117-120.
- Zuzarte, M.R., Dinis, A.M., Cavaleiro, C., Salgueiro, L.R and Canhoto, J.M. 2010. Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, Vol. 32 pp. 580-587.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sam MOKHTARZADEH
Doğum Yeri: İRAN-KHOY
Doğum Tarihi: 21/09/1979
Medeni Hali: Bekar
Yabancı Dili: Türkçe

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Kouchari lisesi, Khoy-İran (1992-1996)
Lisans: Islamic Azad University, Khoy Branch. Khoy-İran (1998-2002)
Yüksek Lisans: Islamic Azad University, Esfahan (Khorasgan) Branch. Esfahan-İran (2002-2004)

Yayımları (SCI expanded)

•Nazirzadeh, A., Zarifi, E., **Mokhtarzadeh, S** and Er, C. 2009. Caryologic study and caryotypic analysis of two species (*Artemisia fragrans* Willd, *A. absinthium* L.) belonging to genus *Artemisia*. Tarım Bilimleri Dergisi, Ankara Üniversitesi, 15(1): 31-37.

Ulusal Kongreler

•**Mokhtarzadeh, S.**, Khawar, K.M., Özcan, S. 2011. Karabaş otu (*Lavandula stoechas* L.) 'nin *in vitro* mikroçoğaltımı. Uluslararası Katılımlı 1. Ali Numan Kıraç Kongresi, Eskişehir. s 2689- 2692.

•**Mokhtarzadeh, S.**, Hajyzadeh, M., Ahmed, H.A., Çetin, G., Khawar, K.M., Özcan, S. 2011. Farklı oranlarda sitokinin ve oksinlerin ingiliz lavantası (*L. angustifolia* Miller)' nin mikroçoğaltım üzerinde etkileri. Uluslararası Katılımlı 1. Ali Numan Kıraç Kongresi, Eskişehir. s 2685- 2688.

•Hajyzadeh, M., **Mokhtarzadeh, S.**, Ahmed, H.A., Khawar, K.M., Özcan, S. 2011. Nohut bitkisinde (*Cicer arietinum* L.) pulmula eksplantlarından *in vitro* koşullarda sürgün rejenerasyonu. Uluslararası Katılımlı 1. Ali Numan Kıraç Kongresi, Eskişehir. s 2729- 2732.

•Ahmed, H.A., **Mokhtarzadeh, S.**, Hajyzadeh, M., Khawar, K.M. 2011. Irak ta yaygın olarak yetiştirilen iki pamuk çeşidinde *in vitro* koşullarında rejenerasyon

optimizasyon çalışmaları. Uluslararası Katılımlı 1. Alı Numan Kırac Kongresi, Eskişehir. s 2703- 2706.

•Çetin, G., **Mokhtarzadeh, S.**, Hajyzadeh, M., Khawar, K.M., Özcan, S. 2011. Bakla (*Vicia faba* L.) ‘ nin Eresen 87 çeşidinin plumula eksplantlarında *in vitro* koşullarında adventif sürgün rejenerasyonu. Uluslararası Katılımlı 1. Alı Numan Kırac Kongresi, Eskişehir. s 2717- 2721.

•Hajyzadeh, M., Nofouzi, F., **Mokhtarzadeh, S.**, Ahmed, H.A., Aasim, M., Khawar, K.M., Özcan, S. 2011. Nohut bitkisinde (*Cicer arietinum* L.) embriyonik eksen eksplantlarından *in vitro* koşullarda sürgün rejenerasyonu. IX. Tarla Bitkileri Kongresi, Uludağ Üniversitesi, Bursa.(Baskı altında)

•**Mokhtarzadeh, S.**, Hajyzadeh, M., Ahmed, H.A., Khawar, K.M. 2011. Karabaş otu (*Lavandula stoechas* L.)’in *in vitro* koşullarında sürgün rejenerasyonu ve köklendirilmesi. IX. Tarla Bitkileri Kongresi, Uludağ Üniversitesi, Bursa.(Baskı altında)

•Ahmed, H.A., Hajyzadeh, M., **Mokhtarzadeh, S.** 2011. Bakla (*Vicia Faba* L.)’nın Sevilla ve Sakız çeşitlerinde kaolin uygulamasının verim ve verim öğeler üzerinde etkileri. IX. Tarla Bitkileri Kongresi, Uludağ Üniversitesi, Bursa.(Baskı altında)

•Hajyzadeh, M., Ahmed, H.A., **Mokhtarzadeh, S.**, Khawar, K.M., Özcan, S. 2011. Nohut (*Cicer Arietinum* L.) Gökçe çeşidinin *in vitro* köklendirmesi üzerinde GA₃ ’ün etkileri. 25. Ulusal Kimiya Kongresi. Erzurum-Türkiye.

Uluslararası Kongreler

•Hajyzadeh, M., Ahmed, H.A., **Mokhtarzadeh, S.**, Bakhsh, A., Khawar, K.M. 2011. Genetic transformation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cv. Ciftci under *in vitro* conditions using mature embryo explants. Third Congress of Biosafety and Genetic Engineering, Tehran- Iran.

•**Mokhtarzadeh, S.**, Hajyzadeh, M., Ahmad, H.A., Khawar, K.M. 2011. The problems in acclimatisation of *in vitro* multiplied plants of *Lavandula angustifolia* miller. under field conditions. 5th International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants, Nebraska City, Nebraska-USA. (Baskı altında).

Kitap Bölümü

- Aasim, M., Khawar, K.M., Daneshvar-Royandezagh, S., **Mokhtarzadeh, S.**, Hajyzadeh, M., Ahmed, H.A., Özcan, S. 2010. Grain Legume Research: Tissue Culture, Biotechnology and Genetic Engineering, (chapter 9: *In vitro* tissue culture and *Agrobacterium* mediated genetic transformation in Vetches (*Vicia* sp.)). Bioscience Publications. pp 73-82.