



T.C.  
BATMAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALCI ASPİR (*Carthamus tinctorius* L.)  
ÇEŞİDİNİN MİKROÇOĞALTIMI

Atike HAMİDİ BİRECİKLİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Nisan-2018  
BATMAN  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ KABUL VE ONAYI

Atike BİRECİKLİ tarafından hazırlanan “Balcı Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Çeşidinin Mikroçoğaltımı” adlı tez çalışması 27/04/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOLOJİ Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

**Başkan**  
Prof.Dr.Hasan Çetin ÖZEN

**Danışman**  
Doç.Dr.Filiz AKBAŞ

**Üye**  
Doç.Dr.Emine AYAZ TILKAT

İmza


Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Doc. Dr. Bahattin İSÇAN  
FBE Müdürü



## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all materials and results that are not original to this work.

İmza  
Atike HAMİDİ BİRECİKLİ  
Tarih:

# ÖZET

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

### BALCI ASPİR (*Carthamus tinctorius* L.) ÇEŞİDİNİN MİKROÇOĞALTIMI

Atike HAMİDİ BİRECİKLİ

Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Filiz AKBAŞ

2018, 61 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN

Doç. Dr. Filiz AKBAŞ

Doç. Dr. Emine AYAZ TILKAT

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.), gerek beslenme gerekse de biyoyakıt üretiminde öne çıkan yağlı tohumlu bitkilerin başında gelmektedir. Bu tez çalışmasında, 2011 yılında tescil edilen ve linoleik tipte olan Balcı aspir çeşidinin olgun tohumlarından itibaren optimum mikroçoğaltım prosedürünün oluşturulması amaçlandı.

Aspir bitkisinin *in vitro* yetiştirme koşullarını belirlemek amacıyla, ilk olarak tohumların sterilizasyonunun sağlanması için sodyum hipokloritte (NaOCI) bekletme süreleri test edildi. %5'lik NaOCI'in farklı sürelerinde (10, 15, 20, 25, 30, 40,50, 60 dk) ayrı ayrı bekletilen tohumlar çatlatılan ve çatlatılmayan olmak üzere 2 farklı şekilde kültüre alındı. Enfeksiyon riskinin azaltılması için tohumların %5'lik NaOCI'de minimum 60 dakika bekletilmesi gerektiği belirlendi. Çatlatılmış tohumların tamamının çimlendiği, çatlatılmamış tohumların ise çok az sayıda (%16.6) çimlendiği görüldü. *In vitro* çimlenme için tohumların mutlaka çatlatıldıktan sonra kültüre bırakılması gerektiği tespit edildi.

Aspir tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesine, MS gücünün (kontrol, 1/1, 1/2, ve 1/4), karbon kaynağının (30 g/L sakkaroz, maltoz ve fruktoz) ve ışığın (karanlık ve aydınlık -16/8 fotoperiyod) etkisi ayrı ayrı incelendi. MS besi ortamındaki tohumların kontrol grubuna (MS içermeyen) göre daha iyi geliştiği ve morfolojik gelişimde gözönünde bulundurulduğunda 1/4 MS'in en uygun besi ortamı olduğu belirlendi. Bununla birlikte besi ortamında kullanılan şeker çeşidinin etkili olduğu ve sakkarozun diğer şekerlerden daha iyi sonuç verdiği saptandı. Aspirin hem aydınlık hem de karanlık ortamda çimlendiği ancak çimlenen tohumların aydınlık ortamda daha iyi gelişme gösterdiği belirlendi. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, tohumlar için en iyi çimlenme koşulları; 30 g sakkaroz ile desteklenmiş 1/4 MS besi ortamında ve aydınlıkta (16/8 fotoperiyod) kültüre alınan çatlatılmış tohumlarda olduğu tespit edildi.

Mikroçoğaltma çalışmalarında, *in vitro* koşullarda çimlendirilen tohumlardan elde edilen steril fideler kullanıldı. Sürgün çoğaltılmasında BAP ve Kinetinin (Kin) farklı konsantrasyonlarının (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L) etkisi araştırıldı. Sitokinin içermeyen kontrol grubu dışında test edilen BAP ve Kin oranlarının tümünde yeni sürgün oluşumu gözlemlendi. BAP konsantrasyonları arasında en iyi sürgün çoğaltımı, eksplant başına yaklaşık 5.33 adet sürgün ile 0.5 mg/L BAP'lı ortamdan elde edilirken, Kin uygulamalarında sırasıyla 3.75 - 3.33 adet sürgün ile 0.5 ve 4.0 mg/L Kin içeren ortamdan elde edildi. Ancak BAP uygulamalarının genelinde ve 4.0 mg/L Kin uygulamasında oluşan sürgünlerde vitrifikasyon olduğu belirlendi. Bu nedenle, vitrifikasyonun olmadığı köklenmeye uygun sağlıklı sürgünlerin geliştiği

0.5 mg/L Kin ile desteklenmiş MS besi ortamının balcı aspir çeşidinin *in vitro* sürgün çoğaltımı için en ideal ortam olduğu tespit edildi.

*In vitro* sürgünlerin köklendirilmesi amacıyla MS besi ortamına NAA (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) ve IAA (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) in farklı konsantrasyonları ilave edildi. 0.5 mg/L NAA ve IAA hariç tüm gruplarda sürgünlerin köklendiği ve en iyi kök oluşumunun, eksplant başına 20 adet ile 2.0 mg/L NAA içeren ortamda kültüre alınan sürgünlerde olduğu tespit edildi. Elde edilen köklü fideler torf – perlit karışımı içeren saksılara dikilerek toprağa adaptasyonu sağlandı.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, Balcı aspir (*Carthamus tinctorius* L.) çeşidinin olgun tohumlarından itibaren *in vitro* çimlenme, sürgün çoğaltımı ve köklendirilme için ideal bir protokol oluşturuldu.

**Anahtar Kelimeler:** *Carthamus tinctorius*, Balcı, *in vitro*, çimlenme, mikroçoğaltma, köklenme



## ABSTRACT

## MS THESIS

### MICROPROPAGATION OF BALCI SAFFLOWER (*Carthamus tinctorius* L.) Atike HAMİDİ BİRECİKLİ

#### THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF BATMAN UNIVERSITY THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE OF BIOLOGY

Advisor: Assoc. Prof.Dr. Filiz AKBAŞ

2018, 61 pages

Jury

Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN

Assoc.Prof. Dr Filiz AKBAŞ

Assoc.Prof.Dr. Emine AYAZ TILKAT

Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) is at the beginning of oilseed crops that are important both in biofuel production and nutritionally. In this thesis study, it was aimed to establish an optimum microproduction process from the mature seeds of Balci safflower variety which is linoleic type and was registered in 2011.

In order to determine the optimum conditions for *in vitro* growth, the safflower seeds were separately kept at different times (10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 min) in 5% sodium hypochlorite (NaOCl) and were cultured in two different applications with their seeds broken or unbroken. It was observed that all of broken seeds were germinated and only a small part of the unbroken seeds (16.6%) were germinated. For this reason, it was determined that seeds should definitely be cultured for *in vitro* germination after brokening. It was also determined that the seeds should be kept at 5% NaOCl for a minimum of 60 minutes to reduce the risk of infection.

The effects of MS strength (control, 1/1, 1/2, and 1/4), carbon source (30 g/L sucrose, maltose and fructose) and light (dark and light-16/8 photoperiod) on *in vitro* germination of safflower seeds were separately examined. It was determined that seeds in the MS medium were better developed than the control group (without MS) and 1/4 MS is the optimal medium for the morphological development of the seeds. However, it was found that sugar content used in the medium was effective and sucrose was better than other sugars. It has been determined that safflower is germinated in both light and dark conditions, but germinated seeds are better developed in the light conditions. When all these results were evaluated, it was determined that the best germination rate of seeds was in 1/4 MS medium supplemented with 30 g sucrose and in broken seeds cultured in light (16/8 photoperiod).

In the micropropagation studies, sterile seedling were used as a material which obtained from seeds germinated in *in vitro* conditions. The effects of different concentrations of BAP and Kinetin (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L) on shoot multiplication were investigated. New shoot formation was observed in all of the BAP and kinetin concentrations tested except the control group (without cytokine). The best shoot multiplication was obtained from medium with 0.5 mg/L BAP with approximately 5.33 shoots per

explant among BAP applications. On the other hand 3.75 - 3.33 shoots per explant were obtained from medium containing 0.5 and 4.0 mg/L Kin in kinetin applications, However, vitrification was observed in shoots at all of the BAP and 4.0 mg/L Kinetin applications. Therefore, MS medium supplemented with 0.5 mg/L Kin was determined the optimum medium (rooting-suitable, healthy shoots, without vitrification) for *in vitro* shoot propagation of Balçı safflower.

Different concentrations of NAA (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) and IAA (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) were added to the MS medium for rooting *in vitro* shoots. Generally all shoots were rooted in all applications except 0.5 mg/L NAA and IAA. The best root formation was observed in medium containing 2.0 mg/L NAA with 20 roots to per explant. The soil adaptation of the obtained rooted seedlings was provided with planted in pots containing a mixture of peat and perlite.

As a result in this thesis study, an optimum protocol was established for *in vitro* germination, shoot propagation and rooting from mature seeds of Balçı safflower (*Carthamus tinctorius* L.) variety.

**Key words:** *Carthamus tinctorius*, Balçı, *in vitro*, germination, micropropagation, rooting



## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca tezimin planlanması, yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen ve her konuda bilimsel bilgi, beceri ve deneyimleri ile her türlü desteği büyük bir özveri ile gösteren değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Filiz Akbaş'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Batman Üniversitesi Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi Dr. İbrahim Selçuk Kuru'ya ve Batman Üniversitesi Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi Dr. Pınar ORCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın laboratuvar aşamasında her zaman destek ve yardımlarını esirgemeyen Şerife Aydınarış'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda ve her türlü konuda maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen iyi, kötü günümde her zaman yanımda olan aileme teşekkür ediyorum.

Ayrıca tezimin ve hayatımın her aşamasında yanımda olduğunu hissettiğim her koşulda beni destekleyen canım kardeşim M.Ali HAMİDİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Atike HAMİDİ BİRECİKLİ  
BATMAN-2018

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ .....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xi
i	
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xivi
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Bitki materyali.....	13
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. <i>İn vitro</i> kültür koşulları.....	14
3.2.1.1. Cam malzeme ve filtre kağıtlarının sterilizasyonu .....	14
3.2.1.2. Pens ve bisturilerin hazırlanması ve sterilizasyonu.....	14
3.2.1.3. Röpikaj ve kültür odalarının hazırlanması ve sterilizasyonu.....	14
3.2.1.4. Besi ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu.....	15
3.2.2. Sterilizasyon tekniğinin geliştirilmesi çalışmaları.....	17
3.2.3. Çimlendirme çalışmaları.....	18
3.2.3.1. Tohumların çimlenmesine MS kuvvetinin etkisi.....	18
3.2.3.2. Tohumların çimlenmesine karbon kaynağının etkisi.....	18
3.2.3.3. Tohumların çimlenmesine ışığın etkisi.....	18
3.2.4. Mikroçoğaltma çalışmaları.....	19
3.2.5. Köklendirme çalışmaları.....	19
3.2.6. Toprağa adaptasyon (Aklimatizasyon).....	20
3.2.7. İstatistiksel analizler.....	20
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	21
4.1. Balcı Aspir ( <i>Carthamus tinctorius</i> L) tohumlarının çimlendirilmesi.....	21

4.1.1. Sterilizasyon tekniğinin geliştirilmesi .....	21
4.1.2. Tohumların çimlenmesine MS kuvvetinin etkisi .....	23
4.1.3. Tohumların çimlenmesine karbon kaynağının etkisi .....	25
4.1.4. Tohumların çimlenmesine ışığın etkisi.....	27
4.2. Mikroçoğaltma çalışmaları.....	28
4.3.Köklendirme çalışmaları.....	33
4.4.Toprağa adaptasyon(Aklimatizasyon).....	35
<b>5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>38</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>42</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>49</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AgNO <sub>3</sub>	:	Gümüş nitrat
atm	:	Atmosfer
BA	:	6-Benziladenin
BAP	:	Benzil amino pürin
BBD	:	Bitki büyüme düzenleyicisi
B5	:	Bazal 5 besi ortamı
CaCl <sub>2</sub>	:	Kalsiyum klorür
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	:	Kalsiyum klorür dihidrat
Ca (OCl) <sub>2</sub>	:	Kalsiyum hipoklorit
cm	:	Santimetre
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	:	Kobalt klorür hegzahidrat
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	:	Bakır sülfat pentahidrat
da	:	Dekar
dk	:	Dakika
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	:	Demir sülfat heptahidrat
g	:	Gram
GA3	:	Giberellik asit
GA7	:	Magenta kabı
HCl	:	Hidroklorik asit
HgCl <sub>2</sub>	:	Civa (II) klorür
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrojen peroksit
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	:	Borik asit
IAA	:	Indol asetik asit
IBA	:	Indol-3-butirik Asit
Kg	:	Kilogram
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	:	Potasyum dihidrojen fosfat
KI	:	Potasyum iyodür
Kin	:	Kinetin
KNO <sub>3</sub>	:	Potasyum nitrat
L	:	Litre
LS	:	Linsmainer ve Skoog Besi Ortamı
M	:	Molar
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	:	Magnezyum sülfat heptahidrat
Mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
mm	:	Milimetre
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	:	Magnezyum sülfat tetrahidrat
MS	:	Murashige & Skoog
NAA	:	Naftalen asetik asit
NaOCl	:	Sodyum hipoklorit
Na <sub>2</sub> EDTA	:	Sodyum etilen daimin tetra asetik asit
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	:	Sodyum molibdat dihidrat
NaOH	:	Sodyum hidroksit
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	:	Amonyum nitrat
nm	:	Nanometre

N6	:	Nutrient medium
pH	:	Asitlik derecesi
ppm	:	Milyonda bir birim
SA	:	Salisilik Asit
TDZ	:	Thidiazuron
v/v	:	Hacim/Hacim
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	:	Çinko sülfat heptahidrat
W	:	Watt
w/v	:	Ağırlık/Hacim
%	:	Yüzde
°	:	Derece
°C	:	Derece santigrat
µm	:	Mikrometre
2,4-D	:	2,4-diklorofenoksi asetik asit
2-IP	:	Dimetil allil aminopurin



## 1.GİRİŞ

Beslenme zinciri içerisinde mutlaka yer alması gereken yağlar, ana besin maddelerinden bir tanesidir. Dünya nüfusundaki artışa paralel olarak gıda maddeleri tüketimi artmakta ve dolayısıyla bitkisel yağ tüketimi de artmaktadır. Bitkisel yağlar; yabani veya kültür formundaki yağlı tohumlu bitkilerden elde edilmektedir. Yeryüzünde tohumlarında yağ içeren çok sayıda bitki olmasına rağmen, bugün sanayide işlenerek tohumlarından yağ elde edilen bitkilerin başında; soya, ayçiçeği, kolza, susam, aspir, keten, kenevir, mısır, zeytin, gelmektedir (Arıoğlu ve ark., 2010). Aspir, hem beslenme hemde biyoyakıt üretiminde öne çıkan yağlı tohumlu bitkilerin başında yer almaktadır (Culpan, 2015).

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.), *Asteraceae* (papatyagiller) familyasının, *Carthamus* cinsine ait bir bitki türüdür. Bu bitkininde üyesi olduğu *Asteraceae*, çiçekli bitkilerin en büyük familyasıdır ve çiçek durumundan dolayı “*Compositae* familyası” olarak da isimlendirilmektedir. *Carthamus* cinsinin dünya üzerinde yetişmekte olan 25 yabani türü bulunmakta (Babaoğlu, 2006) ve bu türlerden *C. tinctorius* L., *C. lanatus* L., *C. dentatus* Vahl. ve *C. persicus* Willd.’un içinde bulunduğu 8 *Carthamus* türü ülkemizde yetişmektedir (Akman ve ark., 2007).

Aspir, dünya genelinde yetiştirildiği bölge halkı tarafından farklı şekillerde isimlendirilmekte (Dajue ve Mündel, 1996) ve bu durum ülkemiz için de söz konusudur. Aspir bitkisi ülkemizin bazı yöresinde yalancı safran olarak bilinmesinin yanı sıra dikenli ayçiçeği, zerdeçal, haspir, kır safranı, papağan yemi, Amerikan safranı ve boyacı aspiri gibi isimlerle de anılmaktadır.

Aspir (*C.tinctorius* L.) bitkisi, yalancı safran olarak da bilinen sarı, turuncu, kırmızı, krem ve beyaz çiçeklere sahip, çalimsı formda tek yıllık dikotil bir bitkidir. Tohumlarında %30-50 arasında yağ bulunduran, olgunluk evresinde genellikle 80-100 cm’e kadar boylanabilen bir gövdeye sahiptir (Babaoğlu, 2005; 2007).

Aspir bitkisinin gelişim evreleri kök, gövde uzaması ve dallanmaya göre 6 evreye ayrılmaktadır. Gelişimin ilk evresi çimlenme, daha sonraki safha ise rozet evresidir. İki veya üç hafta süren bu evrede, gövde uzaması olmaz ve yapraklar yüzeye yakın olarak gelişir (Oelke ve ark., 2000). Bitkide dallanmanın olmadığı bu evrede, güçlü kazık kök sistemi gelişerek toprağın derinlerine doğru ilerler (Dajue ve Mündel, 1996) ve takip eden evrelerde gövde uzaması ve dallanmalar gözlenir. Bu gelişim safhasında, gövde uzaması oldukça hızlı olup 45 ile 75 cm boya ulaşan kuvvetli dallar gelişir (Mündel ve ark.,2004).

Ortadoğu ülkelerinde yaygın olarak kullanılan aspir, tıbbi potansiyeli oldukça yüksek olması sebebiyle son dönemde pek çok araştırmaya konu olmuştur. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda aspir bitkisinin, akut istemik inme tedavisinde, kadınların regl dönemlerinde, kalp-damar rahatsızlıklarında, travma sonucu oluşan

şişliklerin ve ağrıların tedavisinde, ateş düşürmede ve kabızlığa karşı başarılı olduğu tespit edilmiştir (Ihara, 1998; Lin ve ark., 2014; İşler, 2014). Ayrıca, aspir tohumlarının osteoporoz, romatoid artrit ve ateroskleroz riski üzerine olumlu etkileri olduğu saptanmıştır (Yu ve ark., 2013).

Aspir tohumundan elde edilen yağ, sabun, boya, vernik ve cila üretiminde ve yemeklik yağ olarak da kullanılmaktadır (Karaaslan ve Hakan, 2007). Oleik asit ve insanlar için esansiyel olan linoleik asidi yüksek oranda içermesi nedeniyle aspir yağı beslenmede önemli bir yere sahiptir (Konar ve ark., 2010). %16-20 oleik asit (omega-9) ve %71-75 linoleik asit (omega-6) miktarı ile aspir (Cöşge ve ark.,2007) mısır, fındık, zeytin gibi diğer yağ bitkilerine oranla daha yüksek yağ içeriğine sahiptir (Oelke ve ark., 2000). Antioksidan etkisi sayesinde aspir yağı, kalp ve damar hastalarının uyguladıkları diyetlerde de bulunur (Uysal ve ark., 2006).

Aspir bitkisinin sadece tohumları değil, yaprak ve çiçekleri de çok farklı alanlarda değerlendirilmektedir. Yaprakları çay yapımında kullanılırken (Dajue ve Mündel, 1996), çiçek petallerinden kırmızı renkli “karthamin” ve sarı renkli “karthamidin” maddesi elde edilmektedir. Bu maddeler, kozmetik (Karaaslan ve Hakan, 2007), gıda ve tekstil sanayisinde boya maddesi olarak kullanılmaktadır (Smith ve Jimmerson, 2005; Babaoğlu, 2006). Ayrıca, bu bitkinin çiçekleri çeşitli yemeklerin renklendirilmesinde ve tatlandırılmasında da kullanılmaktadır (Pahlavani ve ark., 2004). Örneğin; Diyarbakır ili ve çevresinde sarı renkli aspir çiçekleri pilavlarda kullanılarak pilavın sarı renkli olması sağlanır (Babaoğlu, 2006).

Bu kullanım alanları dışında aspir bitkisinin dikensiz varyeteleri kesme çiçek olarak Batı Avrupa, Japonya ve Latin Amerika’da kullanılmaktadır (Dajue ve Mündel, 1996). Bitki, yeşilken çit yapımında kullanılmasının yanında hayvanların otlatılması için uygun ortam oluşturur ve bu şekilde hayvan yemi olarak kullanılır (Babaoğlu, 2006).

Aspir, kuru ve sıcak çevresel koşullara adapte olabilen, genellikle nötr ve uzun gün bitkisi olarak değerlendirilir (Dajue ve Mündel, 1996; Pahlavani ve ark., 2004) ve iklimsel/jeolojik koşullar açısından seçici olmayan bu bitki, kurak arazilerde bile rahatlıkla yetiştirilebilmektedir (Angın ve Şensöz, 2006). Sıcaklığın az olduğu, kuru rüzgarların estiği, ekim öncesinde toprağın yeterli derecede nemli olduğu bölgeler ile 300 mm yağış alan veya yeterli derecede sulanan bölgelerde aspir bitkisinden daha iyi verim elde edilebilmektedir (Mündel ve ark., 2004). Derin, verimli, yüksek su tutma kapasitesine sahip iyi drenajlı, tınlı toprakların aspir tarımı için ideal olduğu tespit edilmiştir (Dajue ve Mündel, 1996; Babaoğlu, 2005; Berglund ve ark., 2007).

Dünyanın en eski yağlı tohumlu bitkilerinden biri olan aspir bitkisinin anavatanının Güney Asya olduğu düşünülmektedir (Babaoğlu, 2006). Mısırdaki yapılan arkeolojik kazılarda 4000 yıllık mumyaların tabutlarında aspir tohumları ve süs için kullanılan çiçekleri bulunmuş (Dajue ve Mündel, 1996; Smith ve Jimmerson, 2005) ve eldeki kaynaklara göre, bu bitki Çin’de yaklaşık 2200 yıl önce kullanılmıştır (Smith ve Jimmerson, 2005). Aspir bitkisinin üretimi, Çin’in dışında Hindistan, yakın doğu ve kuzey Afrika’da da uzun bir tarihi sürece sahiptir (Knights, 2007). Avrupa kıtasında orta çağ döneminde, Amerika kıtasında ise Amerika’nın keşfinden sonra aspir bitkisinin tarımına başlanmıştır (Babaoğlu, 2006). Dünyadaki aspir ekiliş alanı 816.588 hektar, üretimi 670.318 ton ve verimi ise 82 kg/da’dır. Türkiye’deki ekiliş alanı ise 44.000 hektar, üretimi 62.000 ton ve verimi 140 kg/da’dır (Anonim, 2014). En fazla ekim alanına sahip ülkeler arasında Kazakistan, Hindistan, ABD, Meksika ve Arjantin bulunmaktadır (Anonim, 2013).

Aspir bitkisinin Türkiye’ye girmesi ve tarımının yapılması, Bulgaristan’dan gelen göçmenler aracılığı ile Marmara Bölgesi’nde (Balıkesir yöresine) başlamıştır.

Daha sonraları Eskişehir, Ankara, Konya, Şanlıurfa, Balıkesir ve Afyon illerine yayılmıştır. Bazı kaynaklara göre ise yabancı formlarına yurdumuzda rastlandığı ve yıllar önce Türkler tarafından Orta Asya'dan getirildiği belirtilmektedir (Koç, 2001).

Ülkemizde aspir ile ilgili çalışmalara 1930'lu yıllarda Eskişehir Ziraî Araştırma Enstitüsü'nde başlanmış olup (Demirci ve ark., 2003), 1931 yılında ilk tescil edilen çeşit Yenice olmuştur. Aspir ile ilgili çalışmalara uzun süre çeşitli sebeplerle ara verilmesinin ardından Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından Dinçer 1977 yılında, Remzibey-05 2005 yılında, Balcı 2011 yılında; Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından Linas 2013 yılında, Olas 2015 yılında tescil edilmiş aspir çeşitleridir. Ayaz ise Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nce geliştirilen ve 2013 yılında üretim izni alan aspir çeşididir. Bu çeşitlerden Yenice, Dinçer, Balcı ve Linas linoleik tip, Remzibey-05 ve Olas çeşitleri oleik tiptir (Birben, 2015).

Günümüzde bitki biyoteknolojisi; bitki fizyolojisi, biyokimya ve moleküler çalışmalarda en sık başvurulan yöntem ve araçlar arasında bulunmakta ve bitki bilimlerinin farklı alanlarında hızla kullanılmaktadır. Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki veya hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus kültürleri), doku (çeşitli bitki kısımları) yada organ (apikal meristem, kök, vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya çeşitli bitkisel ürünlerin (sekonder metabolitler vb.) üretilmesidir (Babaoğlu ve ark.,2001). Bitki doku kültürlerinin kullanım amaçları içinde, var olan çeşitlerde genetik çeşitliliği oluşturmak, yeni çeşit geliştirmek ve yokolmakta olan türlerin korunması ve çoğaltılması yer almaktadır (Babaoğlu ve ark., 2002).

Bitki doku kültür çalışmalarında ilk deneysel araştırmalar 1900'lü yıllarda başlamış ve Haberlandt'ın totipotensi (toplam güç teorisi) görüşü doku kültürünün temelini teşkil etmiştir. Bu görüşe göre her bitki bir zigot hücresinden meydana gelmekte ve her zigot hücresinin komple bir bitkiyi meydana getirebilme potansiyeli bulunmaktadır. Ayrıca bu durum o bitkinin tüm canlı hücreleri içinde geçerlidir. Daha sonra 1930'lu yıllarda keşfedilen bitki hormonlarının doku kültüründe kullanılması büyük kolaylıklar sağlamış ve doku kültürünün gelişimine önemli katkı yapmıştır (Kocaçalışkan, 2002). Türkiye'de biyoteknoloji çalışmaları 1970'li yılların ikinci yarısında başlamıştır ve ilk yıllarda ağırlıklı olarak doku kültürü çalışmalarına yer verilmiştir. Moleküler ve genetik bilimlerinin yardımı ile doku kültürü çalışmaları günümüze kadar artarak devam etmiş ve yaygınlaşmıştır (Abak ve ark., 2001).

Ülkemizde yıllardır kültürü yapılan aspir çeşitlerinin adaptasyon yetenekleri iyi olmakla birlikte, en önemli dezavantajları yağ oranı ve tohum veriminin düşük olmasıdır (Birben, 2015). Yeni geliştirilmiş aspir çeşitleri olan Balcı, Linas ve Olas çeşitlerinin yağ oranları artırılmış olsa da aspirin bölgemizde ekonomik olarak diğer yağ bitkileri (ayçiçeği, kanola) ile rekabet edebilmesi için en az onlar kadar tohum verimi ve yağ oranı yüksek olan yeni aspir çeşitleri geliştirilmelidir (Kanar, 2016). Bununla birlikte bitkinin yabancı döllenenmesi nedeniyle kullanılan çeşitlerin özellikleri zamanla bozulabilir. Bunun için yeni çeşitlerle adaptasyon ve verimlilik çalışmalarına her zaman ihtiyaç duyulmaktadır (Öztürk, 1994).

Günümüzde klasik ıslah çalışmalarına oranla daha kısa sürede sonuç vermesi bakımından bitki doku kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun için, her tür veya her genotip için ortam koşullarının belirlenmesine yönelik *in vitro* kültür çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Aspir bitkisi ile ilgili ilk doku kültürü çalışmaları George ve Rao tarafından hint çeşitleri üzerinde 1982 yılında yapılmıştır. Daha sonra, bazı araştırmacılar tarafından, 27 Hint, 2 Amerikan, 1 Türk, 1 İran, 1 Çin ve 2 Avusturya çeşidi ile ilgili doku kültürü ve

sürgün rejenerasyon protokolü rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda sürgün rejenerasyonu ya direk tomurcuktan ya da kallustan itibaren elde edilmiştir. Kullanılan eksplant kaynakları ise genellikle kotiledon, hipokotil, yaprak, kök, gövde, anter gibi bitki kısımları olmuştur (Fan ve Guo, 2013).

Yaptığımız literatür taramasında, aspir bitkisinin *in vitro* kültürü üzerine ülkemizde geliştirilen yerli çeşitlerle ilgili çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bunlarda sürgün rejenerasyonu genellikle *in vitro* sürgünlerin çeşitli kısımları kullanılarak kallustan sürgün rejenerasyonu elde etmeye yöneliktir. Bu nedenle tez çalışmasında, 2011 yılında tescil edilen ve linoleik tipte olan Balcı aspir (*C. tinctorius* L.) çeşidinin olgun tohumlarından itibaren *in vitro* çimlenme ve elde edilen sürgünlerin çoğaltılması ve köklendirilmesi için optimum prosedürün oluşturulması amaçlanmıştır.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Doku kültürü teknikleri kullanılarak, özellikle tıbbi ve aromatik bitkilerin mikroçoğaltımında son yıllarda önemli ilerleme kaydedilmiştir. Mikroçoğaltımın birçok avantajı bulunmaktadır. Bunların arasında; hastalık ve zararlılardan arındırılmış homojen bitkisel materyal elde edilmesi, klasik yöntemlerle üretilmesi zor olan türlerin kolay üretilmesi, seçilen üstün genotiplerin hızlı üretilmesi, geniş alanlara ve iş gücüne ihtiyaç duymadan ve mevsime bağlı kalmadan her dönemde üretime imkan tanınması yer almaktadır (Bajaj ve ark., 1988).

Aspir bitkisinin bitki doku kültürü yoluyla mikroçoğaltım çalışmalarının, düşük frekansta olması ve çoğu aspir varyetesi için uygun etkili bir protokolün olmaması bu bitki ile ilgili yapılacak genetik modifikasyon çalışmalarının devamını ciddi şekilde kısıtlamaktadır. Son zamanlarda bilim adamları bu sorunu çözmek için farklı eksplant çeşidi, besi ortamı ve kültür koşullarını deneyerek bazı genotiplerde başarı oranını %30' dan %90'lara çıkarmayı başarmışlardır (Fan ve Guo, 2013).

George ve Rao (1982), üç farklı aspir varyetesinin (Th-10 black, NP-9 black ve Partial hull black) kotiledon ve hipokotil kısımlarından kallus oluşturma ve sürgün proliferasyonu potansiyelini araştırmıştır. Farklı konsantrasyonlarda BA, kinetin, 2-IP ve zeatin (0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L) ilave edilmiş MS besi ortamına aldığı hipokotil eksplantlarından her üç varyetede sürgün rejenerasyonu elde edilmezken, 0.2 mg/L BA içeren MS besi ortamında kültüre alınan, Th-10 black ve NP-9 black'ın kotiledon eksplantlarından %65-70 oranında sürgün elde edilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, her üç varyetenin hem hipokotil hem de kotiledon kısımlarından BA + NAA içeren MS besi ortamında kallus oluşumu ve kallustan sürgünlerin meydana geldiğini ancak bu sürgünlerin gelişemeyerek öldüğünü bildirmişlerdir.

Prasad ve ark. (1991) 10 farklı aspir genotipinin (Mangira, Tara, 18-66-18, 9-51, NS115-1, EC46984, A-1, S-4, JL-40, EC47006) *in vitro* kültürlerini kurmak için 5 farklı besi ortamı (MS, LS, N6, B5 ve Chaleff'in) kullanmışlar ve en iyi kallus oluşumunun %48.6 oranı ile MS besi ortamında yerli çeşit olan Mangira'da elde edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca BAP (2.0 mg/L) ve NAA (0.5 mg/L) ilave edilmiş MS ortamında sürgün rejenerasyonu gözlendiğini ve ½ MS + 0.1 mg/L NAA'lı besi ortamında da köklenme görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Orlikowska ve Dyer (1993), Montola ve Centennial aspir varyetelerinin olgun tohumlarını *in vitro* ortamda çimlendirerek elde ettikleri sürgünlerin çoğaltımına oksin (NAA) ve sitokininlerin (BAP, TDZ, Kinetin, 2-IP) etkisini araştırmışlardır. 0,1 mg/L NAA ile kombine edilen 0,5 mg/L BAP yada 0,1 mg/L TDZ içeren MS besi ortamının direk sürgün rejenerasyonu için optimum olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, 1 cm uzunluğundaki internodlardan 1 mg/L 2-IP içeren ortamda çok sayıda sürgün elde etmişlerdir. Her iki varyeteden elde ettikleri sürgünleri 1 mg/L NAA içeren MS besi ortamında köklendirerek başarılı bir şekilde seraya aktarmışlardır.

Nikam ve Shitole (1999), Bhima aspir (*C. tinctorius* L.) çeşidinin, kök, hipokotil, kotiledon ve yaprak eksplantlarını *in vitro* ortamda kültüre alarak, kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonu üzerine besi ortamı (MS, SH-M ve B5) ve büyüme düzenleyicilerinin (2,4-D, IAA, NAA, BA ve Kinetin) etkisini araştırmışlardır. Sonuçta, ortama bir oksin ilavesi ile Sitokinin oranı > 1 olduğunda kallus oluşumunun arttığını, özellikle 2,4-D nin tüm eksplantlarda kallus oluşumunda etkili olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca, BA (4.43 µM) – kazein hidrolizat içeren MS besi ortamında hipokotil ve kotiledon eksplantlarında çok sayıda sürgün oluşumu elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Mandal ve ark. (2001), aspirde direk organogenesis ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında, genotip, eksplant yaşı, karbon kaynağı ve etilenin etkisini 8 farklı genotipte test etmişlerdir. Test edilen 8 çeşitten 7'sinde değişen oranlarda embriyojenik kallus elde ettiklerini ve somatik embriyoların oluşması ve olgunlaşmasında eksplant yaşının önemli olduğunu tespit etmişlerdir.

Mandal ve Gupta (2003), aspir yapraklarından somatik embriyo elde etme üzerinde farklı büyüme düzenleyicilerinin etkilerini araştırmışlardır. Somatik embriyoların sayısı kadar embriyojenik kallus frekansının da oksin türüne ve konsantrasyonuna göre değiştiğini ve en yüksek somatik embriyo frekansının 2 mg/L NAA içeren ortamda elde edildiğini bildirmişlerdir.

Radhika ve ark. (2006), farklı aspir (*C. tinctorius* L.) genotiplerinin (A-1, Manjira ve HUS-305) kök, hipokotil, kotiledon ve primer yaprak eksplantlarından itibaren adventif sürgün rejenerasyonuna bitki büyüme düzenleyicilerinin (IBA, NAA, BA, Kinetin ve TDZ) farklı kombinasyonlarının etkisini incelemişlerdir. Hem sürgün rejenerasyon potansiyeli hemde eksplant başına sürgün sayısı bakımından TDZ + NAA kombinasyonunun iyi sonuç verdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar gelişen sürgünlerin 0.5 mg NAA içeren 1/2 MS besisi ortamında köklendirilerek başarılı bir şekilde toprağa aktarıldığını bildirmişlerdir.

Walia ve ark. (2007), ilk kez aspirin endosperm dokusundan bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Bunun için, HUS-305 aspir çeşidinin endospermelerini, farklı konsantrasyonlarda BA, Kinetin, TDZ, 2,4-D ve NAA içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Araştırmacılar en yüksek kallus oluşumunu 2,4-D eklenmiş ortamdan elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca oluşan kallustan BA, Kin ve TDZ içeren ortamlarda embriyoların oluştuğunu ve maksimum embriyojenik yanıtı (%35.0) TDZ nin verdiğini belirlemişlerdir.

Kumar ve ark. (2008) NARI-6 aspir çeşidinin somatik embriyogenez yoluyla bitki rejenerasyonu için etkili bir protokol oluşturmuşlardır. Embriyojenik kallus oluşturmak için 10-17 günlük *in vitro* sürgünlerden alınan yaprak eksplantları ve kotiledonlar kullanılmıştır. Sonuçta, TDZ, 2-IP veya IBA ile desteklenmiş MS besisi ortamında kültüre alınan kotiledon eksplantlarından yüksek oranda (%94.3) embriyojenik kallus elde etmişlerdir. Daha sonra hormon içermeyen MS besisi ortamına aktarılan bu kallustan %100 oranında somatik embriyolar meydana geldiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar oluşan somatik embriyoları olgunlaştırarak GA3 ile desteklenmiş 1/4 MS ortamında çimlendirmişlerdir.

Başalma ve ark. (2007), dinçer aspir çeşidinin kotiledon yapraklarını kullanarak adventif sürgün rejenerasyonu protokolünü geliştirme çalışmalarında, TDZ ve IBA in farklı kombinasyonlarının etkisini incelemişlerdir. Bunun için kotiledon yapraklarını, TDZ ve IBA'ın farklı konsantrasyonları ve kombinasyonlarını içeren MS besisi ortamında kültüre almışlardır. Araştırmacılar, en yüksek sürgün rejenerasyon yüzdesi (%33.33) ve eksplant başına en fazla sürgün sayısını (eksplant başına 6.5 adet sürgün), 0.5 mg/ L TDZ ve 0.25 mg /L IBA içeren MS ortamından elde etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, 14 günlük fidelerin kotiledon nodları ve meristem uçlarını, farklı BAP-NAA kombinasyonları ile desteklenmiş MS besisi ortamında kültüre almışlardır. Kültürün 18-21 günleri arasında test edilen besisi ortamlarının çoğunda kotiledoner nodlardan ve meristem uçlarından doğrudan doğruya birden fazla yeni sürgün oluştuğunu ve % 100 sürgün çoğaltımı sağladıklarını ileri sürmüşlerdir.

Yang ve ark. (2009) Çin kökenli Tacheng aspir çeşidinin kotiledon eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine fitohormonların etkisini incelemişlerdir. Fitohormonların tek başına kullanıldığında kallus oluşumunu uyardığını ancak adventif tomurcukları doğrudan üretmediğini, buna karşın farklı fitohormon

kombinasyonlarının, adventif tomurcukların oluşmasını ve köklenme üzerine çeşitli etkilere sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak yapılan tüm denemelerden, optimum kallus indükleyici ortamı: MS +%3 Sakkaroz +%0.7 Agar +1.0 mg/L NAA; Sürgün Farklılaştırma ortamı: MS + %3 Sakkaroz +%0.7 Agar + 0.2 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA ve köklendirme ortamı: ¼ MS + 2.0 mg/L NAA + 0.5 mg/L IAA olarak belirlemişlerdir.

Aspir tohumlarının *in vitro* ortamda çimlenmesi ve kallus oluşturma potansiyelini inceleyen Kumari ve Pandey (2010), *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlardan gelişen fidelerin farklı kısımlarını (alt hipokotil, üst hipokotil, yaprak gibi) kullanmışlardır. Araştırmacılar, fitohormonların (2,4-D, IBA, IAA ve KN) farklı konsantrasyonlarının bulunduğu MS besi ortamına Hindistan cevizi sütünü (%20 ve %80 v/v) ilave etmişler ve en iyi kallus oluşumunun tüm eksplant çeşitlerinde 2,4-D nin farklı konsantrasyonlarında (3.0 ppm - 5.0 ppm) oluştuğunu tespit etmişlerdir.

İki aspir çeşidinde (Dinçer ve Sina) *in vitro* çoğaltma ve *Agrobacterium tumefaciens* vasıtasıyla gen aktarımını araştıran Motamedi ve ark. (2011), en yüksek kallus oluşumunun Dinçer çeşidinde (%94.33) 1 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS ortamında meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, kallustan sürgün oluşumunun en yüksek oranının (% 35.1) yine Dinçer çeşidinin kotiledon eksplantlarından, 0.1 mg/L NAA + 2 mg/L BAP ile desteklenmiş ortamda elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Ghasempour ve ark. (2014), lesaf aspir çeşidinin *in vitro* mikroçoğaltılması üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar, steril ettikleri tohumları çimlendirerek elde ettikleri fideleri BAP, Kinetin, NAA ve 2,4-D' nin farklı konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamına aktarmışlardır. Sonuçta, 1.0 mg/L BAP içeren MS besi ortamında kültüre aldıkları yaprak eksplantlarında %97.79 oranında kallus elde etmişlerdir. Ayrıca en iyi sürgün rejenerasyonunun 0.1 mg/L NAA ve 1.0 mg/L BAP içeren MS ortamında olduğunu rapor etmişlerdir.

Fan ve Guo (2014), Jimsar aspir (*C. tinctorius*) çeşidinin doku kültürü yolu ile çoğaltılması üzerine kültür koşullarının (sıcaklık, ışık, nem gibi), eksplant çeşidinin ve bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar, 6-8 günlük *in vitro* fidelerden alınan kotiledonların diğer eksplantlardan daha iyi sonuç verdiğini belirleyerek gündüz 24 °C- gece 16 °C sıcaklığın, 9000 lüks ışık şiddetinin ve %60 nispi nemin rejenerasyon için uygun olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, en yüksek sürgün rejenerasyon oranını eksplant başına 5 adventif tomurcuk (%79.1) ile; 12.0 mg/L TDZ, 2.5 mg/L IBA ve 1.5 mg/L 2-IP içeren MS besi ortamından elde edildiğini bildirmişlerdir.

Nikhil ve ark. (2014), kotiledon yapraklarını eksplant kaynağı olarak kullanarak iki aspir çeşidinin (AKS-207 ve PKV-pink) *in vitro* bitki rejenerasyon potansiyelini incelemişlerdir. Her 2 aspir çeşidinde de en iyi kallus oluşumunun, TDZ (2.0 mg/L) + NAA (0.5 mg/L) içeren ortamda kültüre alındıktan 21 gün sonra yaprak segmentlerinden elde edildiğini tespit etmişlerdir. Maksimum sürgün oluşumu ise %63.33 oranı ile AKS-207 çeşidinde ve TDZ (2.0 mg/L) + NAA (0.1 mg/L) ile desteklenen ortamda; PKV-pink içinse TDZ (2.0 mg/L) + NAA (0.5 mg/L) ile desteklenen ortamda olduğunu rapor etmişlerdir. Çoğaltılan ve iyi gelişen sürgünler daha sonra NAA nın farklı konsantrasyonlarında köklendirilerek toprağa adaptasyonu sağlanmıştır.

Özdemir ve Türker (2014), yabani aspirin (*C. persicus* Wild) *in vitro* çoğaltımı çalışmalarında BAP ve NAA'nın farklı kombinasyonlarının etkisini araştırmışlardır. Kallus oluşumu, rejenere sürgün yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve uzunluğu, eksplant başına kök sayısı ve uzunluğu için BAP-NAA arasındaki kombinasyonların etkili olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca en yüksek sürgün rejenerasyonunun 0.50 mg/L

BAP + 0.25 mg/L NAA bulunan MS besi ortamında, kallus oluşumunun ise 1 mg/L BAP + 1 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP + 1mg/L NAA bulunan MS besi ortamında olduğunu saptamışlardır.

Yaman (2014), Remzibey, Dinçer ve Shifa aspir çeşitleri ile ilgili yaptığı doku kültürü araştırmalarında, Remzibey çeşidinde 4 mg/L TDZ ve 0.2 mg/L NAA, Dinçer çeşidinde 1 mg/L TDZ ve Shifa çeşidinde ise 2 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP içeren MS besin ortamlarında adventif sürgün rejenerasyonunun arttığı sonucuna varmıştır.

Moghadam ve Mohammadi (2014), iki farklı aspir çeşidinin çimlenme özellikleri ve tane verimi üzerine askorbik ve salisilik asitin etkisini laboratuvar ve sera koşullarında incelemişlerdir. Araştırmacılar, askorbik ve salisilik asitin konsantrasyonu arttıkça, çimlenme oranının azaldığını ve en yüksek tane veriminin (bitki başına 16.2 g) 'Faraman' kültüründe olduğunu bildirmişlerdir.

Dıpti ve ark. (2015), iki farklı aspir genotipinin (AKS-207 ve PKV-Pink) kotiledon yapraklarını kullanarak *in vitro* sürgün rejenerasyon kapasitesini araştırmışlardır. En iyi kallus oluşumunun her iki genotipte 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L Kin (1 mg/L) içeren MS besi ortamında; maksimum sürgün rejenerasyonunun ise AKS-207 genotipi için 3.0 mg/L BAP, PKV-Pink için 4.0 mg/L BAP içeren MS besi ortamında olduğunu rapor etmişlerdir.

Culpan (2015), gibberellik asit ve salisilik asidin Dinçer ve Balcı aspir çeşitlerinde, verim ve kalite özellikleri üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, tane verimi ve yağ oranı bakımından çeşitler ile hormonlar arasındaki farklılıkların yanı sıra çeşit x hormon ve hormon x doz interaksiyonlarında önemli bulmuştur. Dekara en yüksek tane verimi (120.496 kg/da) SA uygulamasıyla Dinçer çeşidinden, en düşük verim ise (55.111 kg/da) GA<sub>3</sub> uygulamasıyla Balcı çeşidinden elde edilmiştir.

Moghbel ve ark. (2015), *in vitro* ortamda kültüre alınmış aspir (*C. tinctorius* L.) bitkisine kolşisin uygulayarak DNA içeriği ve stomalarda meydana gelen değişimleri inceledikleri çalışmada, aspir tohumlarını 24-48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda kolşisin, (%0- %0,03- %0,05- %0,08-%0,1 (W/V)) ile muamele ederek kontrollü koşullar altında katı MS ortamında kültüre almışlardır. Rejenere edilen bitkilerin hücresel DNA içeriği spektrofotometre ile ölçülmüştür. Ayrıca, stoma boyut ölçümünden ve spektrofotometreden elde edilen sonuçları teyit etmek için flow sitometrisini kullanmışlardır. Sonuçta, 24 saat boyunca %0.03, %0.05 ve %0.1 kolşisin uygulanan aspir fidelerinin daha büyük stomalara sahip oldukları ve tüm uygulamalarda DNA içeriğinin belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar yapılan flow sitometrisi analizlerinde de elde edilen bu sonuçların teyit edildiğini bildirmişlerdir.

Kanar (2016), 10 farklı aspir çeşidinin (Dinçer, Balcı, Remzibey, Rio, Nebraska 10, Oleic Leed, Quiriego 88, San Jose 89, Sina, Gila) Kahramanmaraş koşullarındaki verim ve verim unsurlarını incelemiştir. Sonuçta, en yüksek yağ oranına Oleic Leed (%35.31) çeşidinin, en yüksek tohum (99.23 kg/da) ve yağ (33.65 kg/da) verimine Balcı çeşidinin sahip olduğunu tespit etmiştir.

Kaya (2017), Balcı aspir çeşidinin *in vitro* hızlı çoğaltımı için steril fidelerin nod, hipokotil ve kotiledon kısımlarını farklı hormon kombinasyonlarının bulunduğu MS ortamında kültüre almıştır. Denemeler sonunda elde edilen kallustan eksplant başına en çok sürgün sayısı nod eksplantında 3,76 adet ile 0.5 mg/L Kin içeren MS besin ortamından; hipokotil eksplantında 1.0 adet ile 2.0 mg/L BAP içeren MS besin ortamından; kotiledon eksplantında ise 8,33 adet ile 0.5 mg/L BAP x 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Araştırmacı, eksplantlarda kallus oluşumu bakımından sonuçların iyi olmasına rağmen sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından literatüre kıyasla daha düşük sonuçlar elde

ettiğini rapor etmiş ve gelişen sürgünlerin çoğunun vitrifiye olduğunu ve bu nedenle köklendirme çalışmalarının yürütülemediğini bildirmiştir.

Diğer kompozit bitki üyeleriyle karşılaştırıldığında, aspir bitkisinin mikroçoğaltılması oldukça zordur. Aspirin mikroçoğaltılması üzerine birkaç literatür olmasına rağmen, genel olarak tüm çeşitlere uygulanabilen etkili bir bitki rejenerasyon protokolü hâlâ mevcut değildir (Fan ve Guo, 2013). Bu nedenle, sunulan tez çalışmasında Balcı aspir (*C. tinctorius*) çeşidinin olgun tohumlarından itibaren mikroçoğaltılması ve köklendirilmesi için optimum *in vitro* koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitki materyali

Bu çalışma Batman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada, materyal olarak Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 2011 yılında tescil edilen Balcı aspir (*C. tinctorius* L.) çeşidi kullanılmıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Balcı aspir çeşidinin

görünümü

olgun tohumlarının genel

#### Aspir Bitkisinin Takson Hiyerarşisi

- Alem : Plantae  
Sınıf : Magnoliopsida  
Takım : Asterales  
Familya : Asteraceae  
Altfamilya: Carduoideae  
Cins : Carthamus  
Tür : *Carthamus tinctorius* L.

Aspir, embriyoda plumulanın gelişimi ile oluşan ve olgunluk evresinde genellikle 80-100 cm'e kadar boylanabilen bir gövdeye sahip, yaygın olarak dallanma gözlenen çalimsı formda tek yıllık dikotil bir bitkidir (Babaoğlu, 2005). Yapraklar, gövde üzerinde sarmal diziliş gösterirler ve her noddan bir yaprak çıkar. Yaprak alanının, çeşitlere göre farklılık göstermesine rağmen, genişliği 2.5 ile 5 cm, uzunluğu ise 10 ile 15 cm arasında değişir (Dajue ve Mündel, 1996).

Çizelge 3.1. Tescilli Balcı aspir çeşidinin özellikleri (Anonim, 2017)

Dikenlilik	Morfolojik Özellikleri		Verim Özellikleri		Tarımsal özellikleri			
	Çiçek Rengi	Bitki Boyu (cm)	Tane Rengi	Sulu (kg/da)	Kuru (kg/da)	İç oram (%)	Bin Dane Ağırlığı (g)	Yağ Oranı (%)
Dikenli	Sarı	70-100	Beyaz	300-400	120-240	57-59	40-48	38-41

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. *In vitro* kültür koşulları

#### 3.2.1.1. Cam malzeme ve filtre kağıtlarının sterilizasyonu

Deneylerde kullanılan cam malzemelerden erlenmayer, beher fırça yardımıyla temizlenip, sıcak sudan geçirildikten sonra üç defa saf sudan geçirilerek etüvde 180 °C’de 3 saat bekletilmek suretiyle steril edilmiştir. Diğer cam malzemeler olan mezür, balon joje ve pipetler ise yine fırça yardımıyla yıkanıp, sıcak sudan geçirildikten sonra üç defa saf sudan geçirilerek 80 °C’de etüvde 3 saat bekletilmek suretiyle sterilizasyonları sağlanmıştır. Bitkisel materyallerin kültüre alındığı Magenta GA-7 kültür kapları, sıcak suda yıkanıp, üç defa saf sudan geçirilip kurutma işlemi sağlandıktan sonra alüminyum folyo ile sarılarak 121 °C’de ve 1 atm basınç altında 25 dakika süre ile otoklavda sterilizasyonu tamamlanmıştır. Araştırmanın her aşamasında kullanılan filtre kağıtları, 180 °C’de 2 saat süre ile besi ortamları ve stokların hazırlanmasında kullanılan saf su ise yine etüvde 180 °C’de 3 saat süre ile sterilize edilmiştir.

#### 3.2.1.2. Pens ve bisturilerin hazırlanması ve sterilizasyonu

Materyallerin uygun boyutlarda hazırlanması ve kültür kaplarına yerleştirilmesi için kullanılan pens ve bisturiler %96’lık alkol ile silinip 6-9’lu gruplar halinde alüminyum folyo ile sarılarak kuru hava sterilizatöründe 300 °C’de 30 dakika süre ile steril edilmiştir.

#### 3.2.1.3. Röpikaj ve kültür odalarının hazırlanması ve sterilizasyonu

Deneyler başlatılmadan 1 gün (24 saat) önce röpikaj odasındaki kapı, masa, dolaplar, zemin ve duvarlar seyreltilmiş sodyum hipoklorit (NaOCI) ile silinmiştir. Çalışmanın yapılacağı steril kabinin iç kısımları %70’lik alkol ile temizlenmiştir. Yukarıda verildiği gibi röpikaj odasının sterilizasyonu yapıldıktan sonra ultraviyole lambası 2-4 saat açık bırakılarak sterilizasyon işlemleri tamamlanmıştır.

Büyüme odasında; 30-60  $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetine sahip civalı Flüoresan lambalar (400 w, MBFR/U, Thorn) ve ortam sıcaklığını  $25\pm 2^\circ\text{C}$  de sabit tutan bir sıcaklık kontrol sistemi bulunmaktadır. Ayrıca büyüme odasının ışık periyodu 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak biçimde ayarlanmıştır (3000-5000 lüx).

#### 3.2.1.4. Besi ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu

Yapılan bütün deneysel çalışmalarda, besi ortamı olarak Murashige ve Skoog (1962) tarafından önerilen temel besi ortamının modifiye edilmiş şekli kullanılmıştır.

#### MS besi ortamında kullanılan stok çözeltilerin hazırlanması

##### MS (makro elementler) Ana Çözeltisi

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16.5 g
$\text{KNO}_3$	19.0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.7 g
Distile Su	1000 ml’ye tamamlanır.

##### MS Mikro 1 Elementler Ana Çözeltisi

$\text{H}_3\text{BO}_3$	620 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1695 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860 mg

KI	83 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	25 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

#### **MS Mikro 2 Elementler Ana Çözeltisi**

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	25 mg
CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	25 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

#### **Kompleks Şelatör Ana Çözeltisi**

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.725 g
Na <sub>2</sub> EDTA	2.785 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanır.

#### **Vitamin Karışımı Ana Çözeltisi**

Nikotik asit	50 mg
Glisin	200 mg
Pridoksin HCl	50 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlanır

#### **B1 Vitamini Ana Çözeltisi**

Tiamin HCl	100 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

#### **Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması**

##### **BAP Ana Çözeltisi (10<sup>-3</sup>)**

6-Benzilaminopurin (BAP)	100 mg
1N HCl	3-5 cc
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

##### **Kinetin Ana Çözeltisi (10<sup>-3</sup>)**

Kinetin (6-furfuroaminopurin)	100 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

##### **NAA Ana Çözeltisi (10<sup>-3</sup>)**

α Naftalen asetik asit (NAA)	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	3-5 cc
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

##### **IAA Ana Çözeltisi (10<sup>-3</sup>)**

İndolasetikasit (IAA)	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	5-10 cc
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

#### **1 Litre Murashige ve Skoog (MS) besi ortamının hazırlanması;**

Uygulamalarda kullanılan 1 L MS besi ortamı **Çizelge 3.2.** de belirtilen miktarlarda hazırlanmıştır. MS kültür besi ortamı hazırlanırken ilave edilen herbir stok solüsyondan sonra çözelti birkaç dakika çalkalanmıştır. Çalışmanın amacına uygun bitki büyüme düzenleyicileri (oksin ve sitokinin) belirlenip ilave edildikten sonra besi ortamının pH'sı 5.6-5.7 olacak şekilde 0.1 M NaOH yada 0.1 M HCl ile ayarlanmıştır. Katılaştırma ajanı olarak kültür besi ortamına 5.458 g agar eklenmiştir. Hazırlanan besi ortamı, 25 dakika süre ile 121 °C'de 1 atm basınç altında otoklavda steril edilmiştir.

Sterilizasyonu sağlanan besi ortamı röpikaj odasında bulunan steril kabin içerisinde Magenta GA-7 kültür kaplarına 50-60 ml olacak şekilde bölüştürülmüştür.

**Çizelge 3.2. MS besi ortamının içeriği (Murashige ve Skoog, 1962)**

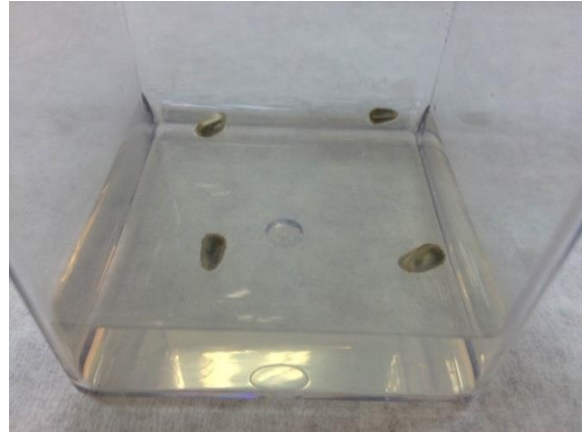
Agar	5.458 g
Sakkaroz	30 g
MS Ana Çözeltisi (Makro Elementler)	100 ml
MS Mikro Elementler-1	10 ml
MS Mikro Elementler-2	1 ml
Kompleks Şelatör	10 ml
Vitamin Karışımı	1 ml
B1 Vitamini Ana Çözeltisi	1 ml
Distile Su	1000 ml'ye tamamlanır

### 3.2.2. Sterilizasyon tekniğinin geliştirilmesi çalışmaları

Başlangıç materyali olarak kullanılan Balcı Aspir (*C. tinctorius* L.) çeşidine ait olgun tohumların dekontaminasyonu ve çimlenmesi için optimum sterilizasyon tekniği geliştirildi. Bunun için olgun tohumlar musluk suyunda iyice yıkandıktan sonra %70 lik alkolde 30 saniye bekletilerek ön sterilizasyona tabi tutuldu. Daha sonra tohumlar % 5'lik NaOCI solusyonunun farklı (10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 60 dk) bekletme süreleri ayrı ayrı uygulandı ve daha sonraki aşamada, steril distile su ile 5 kez 5'er dakika çalkalanmak üzere NaOCI'den arındırılarak sterilizasyon işlemi tamamlandı. Steril tohumlar, 30 g/L sakkaroz ve 5.458 g/L agar ile desteklenmiş hormonsuz 1/1 MS besi ortamında kültüre alınarak, optimum koşulların sağlanmış olduğu büyüme odasında gelişmeye bırakıldı (Şekil 3.2.). Kültüre alınan tohumların gelişimleri ile ilgili gözlemler alınarak, çimlenme durumları değerlendirildi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.2. Aspir tohumlarının çimlendirme besi ortamında kültüre alınması



Şekil 3.3. Kültür ortamında aspir tohumlarının genel görünümü

### 3.2.3. Çimlendirme çalışmaları

*In vitro* çimlendirme çalışmalarında başlangıç materyali olarak kullanılan olgun tohumlara 2 farklı uygulama yapılmıştır.

- Birinci uygulamada; tohumlar sterilizasyon işlemlerinden geçirildikten sonra, çatlatılmadan olduğu gibi *in vitro* ortamda kültüre alınmıştır.

- İkinci uygulamada; tohumlar sterilizasyon işlemlerinden geçirildikten sonra, steril pens ve bisturi yardımıyla embriyoya zarar vermeden çatlatılarak kültür besi ortamına aktarılmıştır.

### 3.2.3.1. Tohumların çimlenmesine MS kuvvetinin etkisi

Balcı aspir çeşidinin olgun tohumlarının *in vitro* ortamda çimlenmesine MS gücünün (1/1, 1/2, 1/4 ve kontrol) etkisi ayrı ayrı test edildi. Bunun için olgun tohumlar, bir önceki deneme sonuçlarına göre belirlenen sterilizasyon oranında (%5'lik NaOCI'de 60 dk) steril edildikten sonra, 30 g/L sakkaroz ve 5.458 g agar ile desteklenmiş farklı kuvvetteki MS besi ortamlarında kültüre alındı. Her bir Magenta kabında 4 tane olacak şekilde kültüre alınan tohumlar, büyüme odasında gelişmeye bırakıldı. Dört haftalık kültür süresi sonunda elde edilen veriler analiz edilerek değerlendirildi.

### 3.2.3.2. Tohumların çimlenmesine karbon kaynağının etkisi

Balcı aspir çeşidinin olgun tohumlarının *in vitro* ortamda çimlenmesine karbon kaynağının etkisini test etmek için 3 farklı şeker çeşidi kullanıldı. 5.458 g agar ile desteklenmiş ¼ MS besi ortamına aşağıda belirtilen şeker miktarları ilave edildi.

- 30 g/L sakkaroz
- 30 g/L maltoz
- 30 g/L fruktoz

Kültüre alınan tohumların gelişimleri ile ilgili gözlemler alınarak, çimlenme durumları değerlendirildi.

### 3.2.3.3. Tohumların çimlenmesine ışığın etkisi

Tohumların çimlenmesine ışığın etkisini (karanlık ve aydınlık) test etmek için MS besi ortamında kültüre alınan tohumların bir kısmı 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ışık periyodunun bulunduğu büyüme odasında gelişmeye bırakılırken bir kısmı da siyah bir örtü ile örtülerek karanlık ortamın oluşturulduğu aynı büyüme odasında gelişmeye bırakıldı. Dört haftalık kültür süresi sonunda elde edilen veriler analiz edilerek değerlendirildi.

### 3.2.4. Mikroçoğaltma çalışmaları

Mikroçoğaltma çalışmalarında başlangıç materyali elde etmek için Balcı Aspir (*C. tinctorius* L.) çeşidine ait olgun tohumlar öncelikle *in vitro* ortamda çimlendirildi. Daha sonra çimlenen tohumlar, 30 g/L sakkaroz ve 5.458g agar ile desteklenmiş MS besi ortamında birkaç defa alt kültüre alınarak *in vitro* sürgünler elde edildi. Elde edilen *in vitro* sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini belirlemek amacıyla aşağıda verilen sitokinin konsantrasyonları bir kontrol grubu ile birlikte test edildi.

- 0.5 – 1.0 – 2.0 - 4.0 mg/L Benzilaminopurin (BAP)
- 0.5 – 1.0 – 2.0 - 4.0 mg/L Kinetin (Kin)
- Kontrol ( hormon içermeyen)

**Şekil 3.4.**  
aktarılan *in vitro*  
görünümü



Çoğaltma ortamına  
*in vitro* sürgünlerin genel

Sürgünlerin gelişmesi için MS besi ortamı, 30 g/L sakkaroz, 5.458 g agar ile desteklendi. Yaklaşık 1.0-1.5 cm uzunluğunda 3-4 yaprak içeren sağlıklı sürgünler, hazırlanan bu besi yerlerinin bulunduğu Magenta GA-7 kültür kaplarına inkübe edilerek, büyüme odasında gelişmeye bırakıldı (Şekil 3.4.). Dört haftalık kültür süresi sonunda elde edilen veriler SPSS 20.0 paket programında (Duncan testinde) istatistiksel olarak analiz edilerek değerlendirildi.

### 3.2.5. Köklendirme çalışmaları

*In vitro* koşullarda elde edilen aspir sürgünlerinin köklenmesine IAA ve NAA'nin farklı konsantrasyonlarının (0.5 – 1.0 – 2.0 mg/L) etkisi bir kontrol grubu ile birlikte test edildi. Bu amaçla birkaç alt kültür sonrasında elde edilen 1.5-2.0 cm uzunluğunda, kalın gövdeli sürgünler steril kabin içerisinde jelozundan arındırılarak, IAA ve NAA'nin farklı konsantrasyonlarını içeren 30 g/L sakkaroz ve 5.458 g agar ile desteklenmiş 1/1 MS besi ortamına inkübe edildi. Köklenme besi ortamına aktarılan sürgünler, büyüme odasında (büyüme odasının sıcaklığı  $25 \pm 2$  °C, ışık periyodu 16 saat aydınlık 8 saat karanlık; 3000-5000 lüx) gelişmeye bırakıldı. Dört haftalık kültür süresi sonunda elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

### 3.2.6. Toprağa adaptasyon (aklimatizasyon)

*In vitro* koşullarda köklendirilen fideler, kültür kaplarından dışarı çıkarılarak önce musluk suyu altında 5-10 dakika daha sonra steril su içerisinde iyice yıkanarak agarlarından tamamen arındırılmış ve ticari olarak satılan torf – perlit karışımı (2:1) içeren saksılara ekimi yapıldı. Bu işlemten sonra, saksıların üst kısmı şeffaf poşet ile kapatılmış ve kontrollü bir şekilde büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Bitkileri dış ortam koşullarına kademeli olarak alıştırmak amacıyla saksıların üzerindeki poşet 2. günden itibaren 10 gün boyunca belirli aralıklarla açılmıştır ve bu sürenin sonunda, saksıların üst kısımlarındaki şeffaf poşetler tamamen çıkartılarak büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır.

### 3.2.7. İstatistiksel analizler

Rastgele seçilen örneklerden elde edilen verilerin analizi SPSS Paket programı (20.0) kullanılarak yapılmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılıkların önem derecesini belirlemek için tek yönlü varyans analizinin Duncan yöntemi seçilmiştir. Örnek sayıları

genellikle her parametre için (sürgün boyu, sürgün sayısı, çimlenme yüzdesi, kök boyu, kök sayısı) ayrı ayrı seçilerek (n=12) her bir testin güvenilirlik oranı %95 (p < 0.05) olarak belirlenmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

##### 4.1. Balcı Aspir (*C. tinctorius* L.) Tohumlarının Çimlendirilmesi

###### 4.1.1. Sterilizasyon tekniğinin geliştirilmesi

Balcı aspir (*C. tinctorius* L.) çeşidinin *in vitro* ortamda yetiştirilmesine yönelik bu çalışmada, eksplant sterilizasyonunu sağlamak amacıyla; %5'lik NaOCl'in farklı sürelerinde (10, 15, 20, 25, 30, 40, 45 ve 60 dakika) ayrı ayrı bekletilen olgun tohumlar, çimlenme besi ortamlarında kültüre alındı. Dört haftalık kültür periyodu sonrasında enfekte olan ve çimlenen tohumların sayısı yüzde olarak tespit edilerek elde edilen veriler **Çizelge 4.1.**de gösterildi.

Deneylerden elde edilen sonuçlara göre; sterilizasyon işlemine (kontrol grubu) tabi tutulmadan kültüre alınan tohumların tamamının 1 hafta içerisinde enfekte olduğu belirlendi. Tohumların kültüre alma çalışmalarında mutlaka sterilizasyon işlemi yapılması gerektiği (**Çizelge 4.1.**) ve kültürleri kurabilmek için tohumların kültüre alınmadan önce sterilizasyon yönteminin belirlenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

**Çizelge 4.1.** %5'lik NaOCl'in farklı sürelerinde bekletilen aspir tohumlarında enfeksiyon ve çimlenme yüzdesi

	%5 NaOCl'de Bekletme Süresi (dakika)								
	0	10	15	20	25	30	40	45	60
<b>Enfeksiyon Oranı (%)</b>	100	91.6	83.3	75	58.3	50	41.6	33	8
<b>Çimlenme Oranı (%)</b>	0	100	100	100	100	100	100	100	100

Rakamlar 12 materyalin ortalamasını göstermektedir.

Kültüre alındıktan 4 hafta sonra, NaOCl de bekletme süresi uzadıkça besi ortamlarında oluşan enfeksiyon oranının azaldığı, bekleme süresi ile enfeksiyon yüzdesinin ters orantılı olduğu belirlendi (**Çizelge 4.1.**). En yüksek bekletme süresi olan 60 dakikada enfeksiyon oranının %8 e kadar gerilediği görüldü. Bu nedenle, aspir tohumlarının kültüre alınmadan önce enfeksiyon riskinin azaltılması için %5'lik NaOCl'de minimum 60 dakika bekletilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

*In vitro* doku kültüründe başlangıç materyali olarak hangi eksplant kullanılırsa kullanılsın en önemli nokta sterilizasyon işlemleridir. Yapılan çalışmalarda, eksplant kaynağının yüzey sterilizasyonu için yaygın olarak kullanılan maddeler etil alkol, NaOCl, Ca(OCl)<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'dir. Birçok çalışmada, aspir bitkisinin olgun tohumlarının yüzey sterilizasyonu işlemi için NaOCl ve HgCl<sub>2</sub> gibi sterilizasyon ajanlarının kullanıldığı ve başarılı sonuçlar alındığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Nikam ve Shitole, 1999; Mandal ve Gupta, 2003; Özdemir ve Türker, 2014; Kaya, 2017).

Kaya (2017), balcı aspir çeşidinde yaptığı çalışmada, NaOCl ile yüzey sterilizasyon işleminde yüksek kontaminasyon oranları (sırasıyla %46,67; %36,67; %26,67) gözlediğini ve kontaminasyonu önleme ve çimlenmenin olumsuz etkilenmediği denemelerin %0.1'lik HgCl<sub>2</sub> ile yapılan sterilizasyon ile sağlandığını rapor etmiştir. Yaptığımız çalışmada, Balcı aspir çeşidinin olgun tohumlarının *in vitro* kültüründe kontaminasyonu önlemek için %5'lik NaOCl'de minimum 60 dakika bekletilme süresinin enfeksiyon oranını azalttığını (%8) ve en uygun yüzey sterilizasyonu olduğunu belirledik.

**Çizelge 4.2.** Çatlatılmış ve çatlatılmamış aspir tohumlarında enfeksiyon ve çimlenme yüzdesi

	Tohum Çatlatılmış	Tohum Çatlatılmamış
Enfeksiyon Oranı (%)	0	0
Çimlenme Oranı (%)	100	16.66

Rakamlar 12 materyalin ortalamasını göstermektedir.

Bununla birlikte, *in vitro* çimlendirme çalışmalarında başlangıç materyali olarak kullanılan olgun tohumları çatlatılarak/çatlatılmadan olmak üzere 2 farklı şekilde kültüre alındı. **Çizelge 4.2.** de görüldüğü gibi çimlenme yüzdesi bakımından çatlatılmış ve çatlatılmamış tohumlar arasında farklılıklar olduğu belirlendi. Çatlatılmış tohumların tamamının çimlendiği buna karşın, çatlatılmamış tohumların yaklaşık altıda birinin (%16.6) çimlendiği görüldü. Dolayısıyla tohumların *in vitro* ortamda daha kısa sürede çimlenmesini sağlayabilmek için mutlaka çatlatıldıktan sonra kültüre bırakılması gerektiği tespit edildi.

Aspir tohumları sert bir tohum kabuğuyla örtülü olduğundan fiziksel bir dormansiye sebep olmakta ve tohum çimlenmesi düşük seviyelerde kalmaktadır. Tohum kabuğunun fiziksel dormansiye sebep olabildiği ve çimlenmeyi engelleyebildiği, farklı bitki gruplarında birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Kaye ve Kuykendall, 2001; Tetsuya ve Takahashi, 2003; Rehman ve Park, 2000; Dayan, 2006). Araştırmacılar farklı ön işlemlerle tohum kabuğunun zayıflatılması durumunda fiziksel dormansinin kırılarak çimlenme yüzdesinin önemli oranda arttığını bildirmişlerdir.

Kaya (2017), balcı aspir çeşidinin olgun tohumlarını steril ettikten sonra herhangi bir işleme tabi tutmadan MS besi ortamında kültüre aldığıında %23 oranında çimlenme yüzdesi elde etmiştir. Bizde yaptığımız çalışmada aspir tohumlarını herhangi bir işleme tabi tutmadan kültüre aldığımızda çimlenme oranının %16,6 da kaldığını, ancak bisturi yardımı ile tohumu çatlatarak kültüre aldığımızda ise fiziksel dormansinin ortadan kalktığını ve çimlenme yüzdesinin %100 e ulaştığını belirledik.

Sonuç olarak, Balcı aspir (*C. tinctorius* L.) çeşidinin olgun tohumlarının *in vitro* ortamda çimlendirilmesi çalışmalarında en iyi sonuç %5 NaOCI'de **60 dk kadar bekletilen çatlatılmış tohumlardan** elde edildi.

#### 4.1.2. Tohumların çimlenmesine MS kuvvetinin etkisi

Aspir tohumlarının çimlenmesinde besi ortamında optimum koşulları sağlamak amacıyla, MS tuzlarının farklı konsantrasyonları (MS 1/1, 1/2, 1/4) bir kontrol grubu ile birlikte ayrı ayrı test edildi. **Çizelge 4.3.**'de görüldüğü gibi, genel olarak test edilen ortamların tümünde, çimlenme yüzdesi bakımından farklılıklar görülmezken morfolojik gelişimlerin değiştiği belirlendi. 4 haftalık kültür periyodu sonunda, test edilen MS gruplarında bitkilerin sürgün boyu yaklaşık 4 ile 6 cm arasında olurken sadece sakkaroz ve agarın bulunduğu kontrol grubunda bitkilerin sürgün boyu 0.97 cm olarak ölçülmüştür. Genel olarak bitkilerin morfolojik gelişimleri bakımından kontrol grubu ile MS grupları istatistiki açıdan karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli bulundu (**Çizelge 4.3.**).

**Çizelge 4.3.** Aspir tohumlarının çimlenmesi ve gelişmesi üzerine MS gücünün etkisi (santimetre ± standart sapma)

MS Besi Ortamının Gücü	Çimlenme oranı (%)	Sürgün Boyu (cm)	Kök Boyu (cm)
Kontrol	100	0.97±0.37 <sup>b</sup>	1.90±1.66 <sup>b</sup>
1/1 MS	100	6.23±3.80 <sup>a</sup>	6.12±5.64 <sup>a</sup>
1/2 MS	100	4.05±3.41 <sup>a</sup>	4.77±4.94 <sup>ab</sup>
1/4 MS	100	4.45±3.48 <sup>a</sup>	6.16±3.73 <sup>a</sup>

Rakamlar 4 haftalık kültür periyodu sonunda 12 materyalin ortalamasını göstermektedir. Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ( $p \leq 0.05$ ).

Test edilen MS grupları sürgün boyu ve kök boyu bakımından kendi aralarında karşılaştırıldığında benzer sonuçlar verdiği ve istatistiki açıdan anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Ancak bitkilerin morfolojik gelişimleri incelendiğinde 1/4 MS besi ortamında kültüre alınan tohumların yapraklarının daha yeşil ve canlı olduğu görüldü (**Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.**).



Şekil 4.1. Kontrol (sakkaroz ve agar) ortamında çimlenen tohumların genel görünümü



Şekil 4.2. 1/1 MS besi ortamında çimlenen tohumların genel görünümü



Şekil 4.3. 1/2 MS besi ortamında çimlenen tohumların genel görünümü



Şekil 4.4. 1/4 MS besi ortamında çimlenen tohumların genel görünümü

Genel olarak aspir üzerine yapılan doku kültürü çalışmalarında, birçok faktörün yanı sıra (genotip bitki yaşı, ışık, karbon kaynağı gibi) besi ortamı içeriğinin de etkisi mevcuttur ve bitki rejenerasyonunda başarıyı büyük oranda belirlemektedir. Yapılan çalışmalarda MS bazal besi ortamının aspirin *in vitro* kültürü için en uygun ortam olduğu rapor edilmiştir (George ve Rao, 1982; Fan ve Guo, 2013). Balcı aspir çeşidi ile ilgili yaptığımız çalışmada benzer şekilde MS besi ortamındaki tohumların kontrol grubuna göre daha iyi geliştikleri gözlemlendi.

Çimlenme sürecinde duyulan mineral ihtiyacı türden türe değişiklik gösterir ve muhtemelen tohumdaki rezervlere bağlıdır (Padilla ve Encina, 2003). Oruç (2012), *Verbascum lyidium* var. *Lyidium* ile yaptığı çalışmada bitkinin tohumlarının, besin rezervlerinin tohumun çimlenmesine yetecek düzeyde olduğunu; *in vitro* şartlarda çimlenmeye ihtiyaç duyulduğunda, basitçe, agar kullanılmasının yeterli olacağını bildirmiştir. Çalışmamızda benzer şekilde balcı aspir çeşidinin tohumları, sadece agar bulunan kontrol grubunda %100 çimlenmiş, ancak çimlenen tohumların gelişmesi için agar ortamı yetersiz kalmıştır. MS gruplarında bitkilerin sürgün boyu yaklaşık 4 ile 6 cm arasında olurken kontrol grubunda bitkilerin sürgün boyu 0.97 cm de kalmıştır. Bunun yanında Orcan (2016), çeltik tohumlarının *in vitro* çimlenmesi ile ilgili yaptığı çalışmada MS besi ortamları (1/1, 1/2 ve 1/4) arasında çok önemli farklılık olmadığını ancak morfolojik gelişim bakımından optimum besi ortamının 1/4 MS olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde aspir tohumlarının *in vitro* kültür çalışmalarında, test edilen besi ortamları arasında önemli farklılık olmadığını ancak

bitkilerin morfolojik gelişimleri göz önünde bulundurulduğunda en uygun besi ortamının 1/4 MS olduğunu belirledik.

#### 4.1.3. Tohumların çimlenmesine karbon kaynağının etkisi

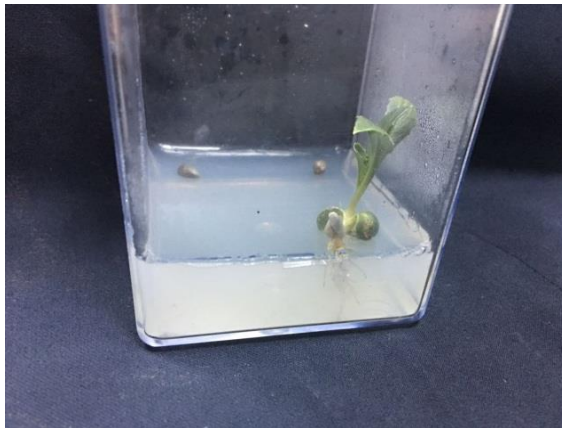
Balcı aspir (*C. tinctorius* L.) çeşidinin olgun tohumlarının *in vitro* ortamda çimlenmesine karbon kaynağının etkisini test etmek için ¼ MS besi ortamında 3 farklı şeker çeşidi (30 g/L sakkaroz, maltoz ve fruktoz) kullanıldı. Kültüre alınan tohumların gelişimleri ile ilgili gözlemler dört haftalık kültür periyodu sonunda alınarak, veriler **Çizelge 4.4. de** gösterildi.

**Çizelge 4.4.** Karbon kaynağı olarak kullanılan şeker çeşitlerinin aspir tohumlarının çimlenmesi ve gelişmesi üzerine etkisi (santimetre ± standart sapma)

Karbon Kaynağı	Çimlenme Oranı (%)	Sürgün Boyu (cm)	Kök Boyu (cm)
30 g/L Sakkaroz	100	3.83±2.96 <sup>a</sup>	6.33±4.67 <sup>a</sup>
30 g/L Maltoz	50	2.08±3.25 <sup>ab</sup>	2.32±3.81 <sup>b</sup>
30 g/L Fruktoz	41.6	1.25±1.80 <sup>b</sup>	2.20±3.05 <sup>b</sup>

Rakamlar 4 haftalık kültür periyodu sonunda 12 materyalin ortalamasını göstermektedir. Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ( $p \leq 0.05$ ).

**Çizelge 4.4 de** belirtilen veriler ışığında, test edilen tüm gruplarda tohumların çimlendiği ancak çimlenme yüzdesinin kullanılan şeker çeşidine göre değiştiği görüldü. Maltoz ve fruktoz şekerlerinin ilave edildiği besi ortamında kültüre alınan tohumların %40-50 si çimlenirken (**Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.**) sakkarozlu besi ortamındaki tohumların tamamının çimlendiği belirlendi. Ayrıca çimlenen tohumlardan gelişen sürgünlerin morfolojik bakımdan da sakkarozlu besi ortamında daha iyi geliştiği ve bu farklılığın istatistiki bakımdan da önemli olduğu tespit edildi (**Şekil 4.7.** ).



**Şekil 4.5.** Karbon kaynağı olarak Maltoz içeren besi ortamında çimlenen tohumların genel görünümü



**Şekil 4.6.** Karbon kaynağı olarak Fruktoz içeren besi ortamında çimlenen tohumların genel görünümü



Şekil 4.7. Karbon kaynağı olarak Sakkaroz içeren besi ortamında çimlenen tohumların genel görünümü

Bitkiler, her türlü karbon kaynağını metabolize edip etkili bir şekilde kullanamazlar. Baker ve Dyer (1996), aspirin *in vitro* kültürü ile yaptıkları çalışmada düşük sukroz oranının sürgün çoğaltılmasında hiperhidrasyonu azalttığını ve sürgünlerin köklenmesini yüksek oranda (%98) sağladığını bildirmiştir. Sukroz, aspirin *in vitro* rejenerasyonu ve köklenmesi için glikoz ve maltoza göre en uygun karbon kaynağıdır (Mandal ve ark., 2001; George ve Rao, 1982; Fan ve Guo, 2013). Biz de yaptığımız çalışmada, balcı aspir tohumlarının *in vitro* ortamda çimlenmesi üzerinde besi ortamında kullanılan şeker çeşidinin etkili olduğunu ve sürgünlerin morfolojik gelişimleri bakımından sakkarozun (sukroz) diğer şekerlerden (fruktoz ve maltoz) daha iyi sonuç verdiğini belirledik.

#### 4.1.4. Tohumların çimlenmesine ışığın etkisi

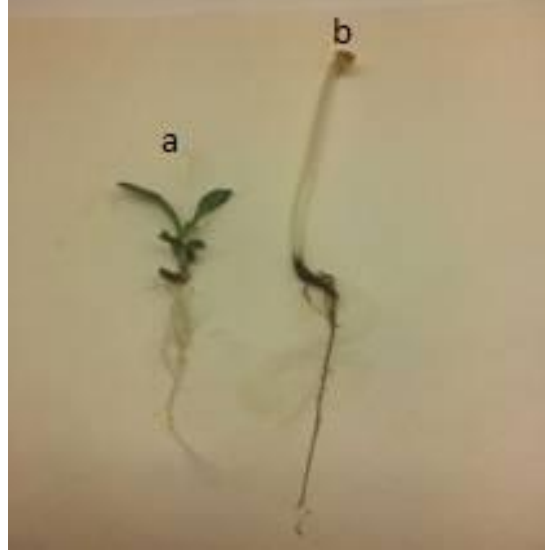
Balcı Aspir (*C. tinctorius L.*)'in olgun tohumlarının *in vitro* ortamda çimlenmesine ışığın etkisi (karanlık ve aydınlık) ayrı ayrı test edildi. Kültüre alınan tohumların bir kısmı 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ışık periyodunun bulunduğu büyüme odasında gelişmeye bırakılırken bir kısmı da siyah bir örtü ile örtülerek karanlık ortamın oluşturulduğu aynı büyüme odasında gelişmeye bırakıldı. Dört haftalık kültür süresi sonunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5 de analiz edilerek değerlendirildi.

Çizelge 4.5. Balcı aspir tohumlarının çimlenmesi ve gelişmesi üzerine ışığın etkisi (santimetre  $\pm$  standart sapma)

	Çimlenme Oranı (%)	Sürgün Boyu (cm)	Kök Boyu (cm)
Aydınlık	100	4.38 $\pm$ 3.23	4.59 $\pm$ 5.66
Karanlık	100	10.87 $\pm$ 5.87	10.20 $\pm$ 8.02

Rakamlar 4 haftalık kültür periyodu sonunda 12 materyalin ortalamasını göstermektedir.

Genel olarak tohumların çimlenmesi üzerinde ışığın etkili olmadığı bununla birlikte çimlenen tohumların gelişmesi için 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ışık periyodunun daha iyi sonuç verdiği tespit edildi. Karanlık ortamda çimlenen tohumların çok uzun boylu ve beyaz renkli yani etiyole bitki görünümünde olduğu belirlendi (Şekil 4.8.). Sonuç olarak, balcı aspir tohumlarının çimlenmesi ve gelişmesi için mutlaka ışığa bırakılması gerektiği tespit edildi.



Şekil 4.8. a.Aydınlık (16/8 fotoperiyot) b. Karanlık ortamda çimlenen tohumların genel görünümü

Tohum çimlenmesi, bitkinin yaşam döngüsünün ilk ve en kritik safhalarından biri olup (Grime ve Camphell, 1991; Guan ve ark., 2009) hormonal ve çevresel koşullardan etkilenir (Finch-Savage ve Leubner-Metzger, 2006; Chang ve ark., 2010; Çulha, 2011). Ayrıca, küçük tohumlu bitkilerin çoğunun *in vitro* çimlenmesinde ışığa gereksinim duyulur (Plummer ve Bell, 1997; Clarke ve ark., 2000). Bunker (1994), ışığın *Brachycome iberidifolia* tohumlarının *in vitro* çimlenme yüzdesini arttırdığını bildirmiştir. Benzer şekilde, *V. lyidium* var. *lyidium* ile yapılan *in vitro* çalışmada, aydınlık uygulamasında tohumların toplam çimlenme oranı % 63 iken karanlık uygulamasında bu oranın % 30'a düştüğü rapor edilmiştir (Oruç, 2012). Yaptığımız çalışmada, balcı aspir tohumlarının hem aydınlık hem de karanlık ortamda çimlendiğini ancak çimlenen tohumların aydınlık ortamda morfolojik olarak daha iyi gelişme gösterdiğini belirledik.

#### 4.2. Mikroçoğaltma Çalışmaları

Balcı Aspir (*C.tinctorius L.*) çeşidinin olgun tohumlarından itibaren *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine farklı BAP ve Kin (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L) konsantrasyonlarının etkisi bir kontrol grubu ile birlikte araştırıldı. Dört haftalık kültür periyodu sonunda elde edilen veriler Çizelge 4.6. ve Çizelge 4.7. de sunuldu.

Çizelge 4.6. *In vitro* sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine BAP konsantrasyonlarının etkisi (santimetre ± standart sapma).

	Sürgün Boyu (cm)	Sürgün Sayısı (adet)
<b>Kontrol</b>	3.20±1.33 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
<b>0.5 mg/LBAP</b>	3.37±0.71 <sup>a</sup>	5.33±1.23 <sup>a</sup>
<b>1.0 mg/LBAP</b>	2.91±0.66 <sup>a</sup>	3.25±1.13 <sup>b</sup>
<b>2.0 mg/LBAP</b>	3.39±1.16 <sup>a</sup>	1.83±1.19 <sup>cd</sup>
<b>4.0 mg/LBAP</b>	2.74±0.87 <sup>a</sup>	2.83±2.20 <sup>bc</sup>

Rakamlar 4 haftalık kültür periyodu sonunda 12 materyalin ortalamasını göstermektedir. Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ( $p \leq 0.05$ ).

Dört haftalık kültür periyodu sonunda, test edilen BAP konsantrasyonlarında, sürgün boyu bakımından sonuçların birbirine çok yakın olduğu ve istatistiki açıdan kontrol grubu da dahil herhangi bir anlamlı farklılık olmadığı görüldü (**Şekil 4.9.**). Bununla birlikte, yeni sürgün oluşumunun besi ortamında kullanılan BAP konsantrasyonuna göre değiştiği ve istatistiki bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu belirlendi (**Çizelge 4.6.**). Uygulama grupları arasında en fazla yeni sürgün oluşumuna, eksplant başına 5.33 ve 3.25 adet ile düşük BAP konsantrasyonlarında (0.5 - 1.0 mg/L) elde edildi (**Şekil 4.10.** ve **4.11.**). BAP konsantrasyonu arttıkça (2.0-4.0 mg/L) sürgün sayısında bir azalma olduğu ve bu azalmanın istatistiki açıdan da anlamlı olduğu belirlendi (**Şekil 4.12.** ve **Şekil 4.13.**). Oluşan sürgünlerin morfolojik gelişimlerine bakıldığında tüm gruplarda sürgünlerin taban kısmında kallus oluşumu ve yapraklarında vitrifikasyon (şeffaflaşma) görüldü. Besi ortamında BAP konsantrasyonu arttıkça kallus ve yaprak vitrifikasyonunda da artış olduğu belirlendi.



**Şekil 4.9.** Hormonsuz MS besi ortamında sürgünlerin genel görünümü



**Şekil 4.10.** 0.5 mg/L BAP içeren besi ortamında sürgünlerin genel görünümü



**Şekil 4.11.** 1.0 mg/L BAP içeren besi ortamında sürgünlerin genel görünümü



**Şekil 4.12.** 2.0 mg/L BAP içeren besi ortamında sürgünlerin genel görünümü



**Şekil 4.13.** 4.0 mg/L BAP içeren besi ortamında sürgünlerin genel görünümü  
Balcı Aspir (*C. tinctorius* L.) çeşidinin olgun tohumlarından itibaren *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine Kin'in (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L) farklı konsantrasyonlarının etkisi bir kontrol grubu ile birlikte araştırıldı. Dört haftalık kültür periyodu sonunda elde edilen veriler **Çizelge 4.7.** de sunuldu.

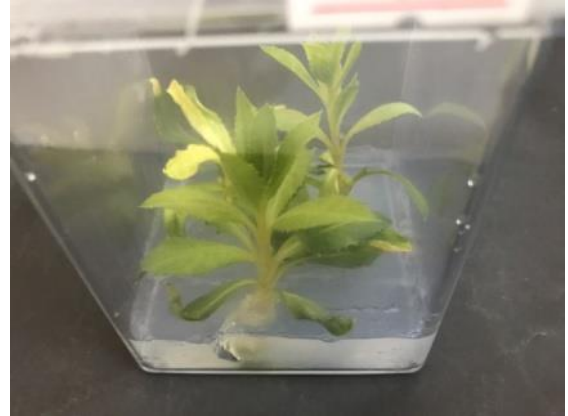
**Çizelge 4.7.** *In vitro* sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine kinetin konsantrasyonlarının etkisi (santimetre  $\pm$  standart sapma).

	Sürgün Boyu (cm)	Sürgün Sayısı (adet)
<b>Kontrol</b>	3.20 $\pm$ 1.33 <sup>b</sup>	1.00 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
<b>0.5 mg/L Kin</b>	5.66 $\pm$ 1.76 <sup>a</sup>	3.33 $\pm$ 2.30 <sup>a</sup>
<b>1.0 mg/L Kin</b>	3.54 $\pm$ 2.06 <sup>b</sup>	2.50 $\pm$ 1.56 <sup>ab</sup>
<b>2.0 mg/L Kin</b>	3.37 $\pm$ 1.82 <sup>b</sup>	1.33 $\pm$ 0.65 <sup>cb</sup>
<b>4.0 mg/L Kin</b>	2.75 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	3.75 $\pm$ 1.65 <sup>a</sup>

Rakamlar 4 haftalık kültür periyodu sonunda 12 materyalin ortalamasını göstermektedir. Aynı sutunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ( $p \leq 0.05$ ).



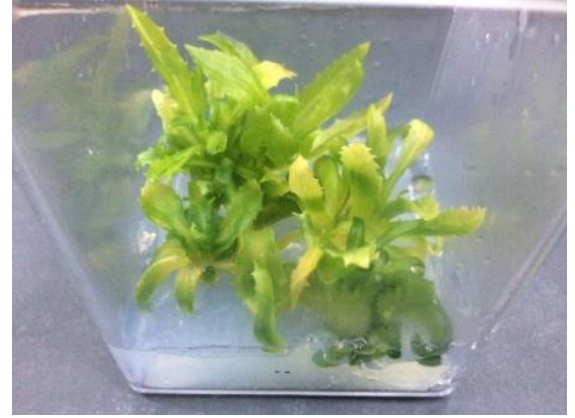
**Şekil 4.14.** 0.5 mg/L Kin içeren besi ortamında sürgünlerin genel görünümü



**Şekil 4.15.** 1.0 mg/L Kin içeren besi ortamında sürgünlerin genel görünümü



Şekil 4.16. 2.0 mg/L Kin içeren besi ortamında sürgünlerin genel görünümü

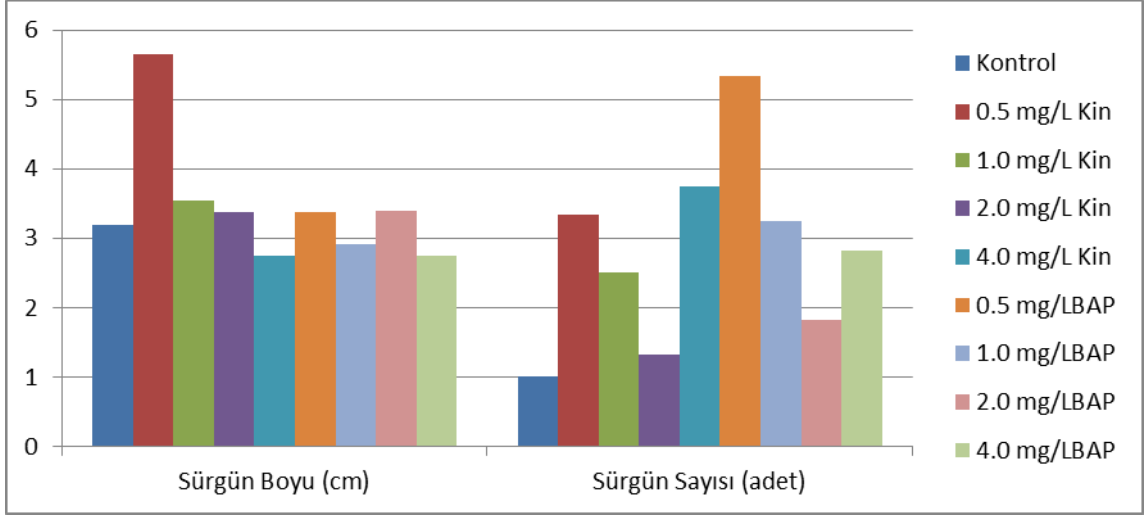


Şekil 4.17. 4 mg/L Kin içeren besi ortamında sürgünlerin genel görünümü

*In vitro* aspir fidelerinin mikroçoğaltılmasına bir sitokin olan kinetin etkisi incelendiğinde, sürgün boyu bakımından çok önemli farklılıkların olmadığı ancak yeni sürgün oluşumunun uygulanan konsantrasyona göre değişiklik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). Çizelge 4.7. de görüldüğü gibi test edilen gruplar arasında, en iyi sürgün oluşumu eksplant başına 3.75 adet sürgün ile 4.0 mg/L Kin ve 3.33 adet sürgün ile 0.5 mg/Kin içeren ortamdan elde edildi (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). Ancak 4.0 mg/L Kin içeren ortamda oluşan sürgünlerin BAP uygulamalarında olduğu gibi büyük oranda vitrifiye olduğu ve dolayısıyla sürgün çoğaltımı için uygun olmadığı belirlendi. Test edilen Kin uygulamaları arasında, oluşan yeni sürgünlerin morfolojik gelişimleri göz önünde bulundurulduğunda vitrifikasyonun olmadığı köklenmeye uygun en sağlıklı sürgünlerin geliştiği ortamın 0.5mg/L Kin uygulaması olduğu tespit edildi.

Balcı aspir çeşidinin mikroçoğaltımı üzerine genel olarak (BAP ve Kin) konsantrasyonlarının etkisi karşılaştırıldığında, sürgün boyu bakımından önemli bir farklılığın olmadığı (0.5 mg/L Kin hariç), test edilen her iki grupta sürgün boyların birbirine çok yakın olduğu belirlendi (Şekil 4.18.). Test edilen BAP ve Kin konsantrasyonları arasında en iyi sürgün boyu 5.66 cm ile 0.5 mg/L Kin içeren ortamdan elde edildi. Sürgün sayısı bakımından incelendiğinde ise gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılıklar olduğu görüldü. Ayrıca sitokin içermeyen kontrol grubunda yeni sürgün oluşumuna rastlanmadığı için, *in vitro* sürgünlerin çoğaltılması için besi ortamına mutlaka Bitki büyüme düzenleyicisinin (BBD) ilave edilmesi gerektiği sonucuna varıldı. Test edilen tüm gruplar arasında eksplant başına en iyi sürgün oluşumu 0.5 mg/L BAP ile desteklenmiş ortamdan elde edilmesine rağmen daha önce belirtildiği gibi sürgünlerin vitrifiye olması nedeniyle bu ortamın sürgün çoğaltımı için uygun olmadığı tespit edildi. Genel olarak Kin uygulamalarında morfolojik olarak köklenmeye uygun vitrifiye olmamış sağlıklı sürgünler elde edildi.

Sonuç olarak, balcı aspir çeşidinin *in vitro* ortamda mikroçoğaltımı için en iyi ortamın 0.5 mg/L Kin ile desteklenmiş MS besi ortamı olduğu tespit edildi.



Şekil 4.18. Balcı Aspir (*C. tinctorius L.*) çeşidinin mikroçoğaltımı üzerine BAP ve Kin konsantrasyonlarının etkisi

Aspir bitkisi ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunda sürgün rejenerasyonu ya direk tomurcuktan ya da kallustan itibaren elde edilmiştir. Kullanılan eksplant kaynakları ise genellikle kotiledon, hipokotil, yaprak, kök, gövde, anter gibi bitki kısımları olmuştur (Fan ve Guo, 2013). Ayrıca bazı araştırmacılar da, meristematik hücreler içermesi bakımından gövde ucu ile sürgün ucunun, sürgün ve kök gelişiminde en verimli eksplant olduğunu rapor etmişlerdir (Özgen ve ark. 1998; Özdemir ve Türker, 2014). Çalışmamızda, Balcı aspir çeşidi ile yaptığımız sürgün çoğaltımı çalışmasında, eksplant kaynağı olarak olgun tohumlardan *in vitro* ortamda elde edilen sürgünleri kullanarak iyi sonuçlar elde ettik.

Bitki doku kültürü çalışmalarında, Bitki Büyüme Düzenleyicisinin konsantrasyonları ve kombinasyonlarının besi ortamına ilave edilmesi adventif sürgün oluşumu üzerinde oldukça etkilidir (Mariashibu ve ark., 2013). Yaptığımız çalışmada sitokin içermeyen kontrol grubunda yeni sürgün oluşumuna rastlamadığımız için besi ortamına mutlaka BDD ilave edilmesi gerektiğini tespit ettik.

Orlikowska ve Dyer (1993), Radhika ve ark. (2006), Başalma ve ark. (2007), Sujatha ve Dinesh (2007), Nikhil ve ark. (2014); farklı aspir çeşitlerinde hipokotil, kotiledon ve yaprağı, eksplant kaynağı olarak kullanıp, TDZ-NAA kombinasyonlarının adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılabilir bir protokol olabileceğini önermişlerdir. Motamedi ve ark. (2011) kotiledon, Ghasempour ve ark. (2014) ile Özdemir ve Türker (2014) olgun tohumların *in vitro* ortamda çimlendirerek elde ettikleri sürgünlerin çoğaltımında BAP-NAA kombinasyonunun sürgün rejenerasyonu için optimum olduğunu bildirmişlerdir.

Kaya (2017), Balcı aspir çeşidinin *in vitro* hızlı çoğaltımı için steril fidelerin nod, hipokotil ve kotiledon kısımlarını farklı hormon kombinasyonlarının bulunduğu MS ortamında kültüre alarak kallus oluşturmuştur. Elde edilen kallustan eksplant başına en çok sürgün sayısı nod eksplantında 3,76 adet ile 0.5 mg/L Kin ortamından; kotiledon eksplantında ise 8,33 adet ile 0.5 mg/L BAP x 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamından elde ettiğini rapor etmiştir. Ancak gelişen sürgünlerin çoğunun vitrifiye olduğunu ve bu nedenle gelişemediğini bildirmiştir. Aynı aspir çeşidi ile yaptığımız çalışmada, en iyi sürgün oluşumunun eksplant başına 3.33 adet sürgün ile 0.5 mg/L Kin içeren ortamdan elde ettik. Araştırmamızın aksine oluşan sürgünlerin morfolojik olarak vitrifiye olmadığı köklenmeye uygun olduğunu saptadık. Bu nedenle, Balcı aspir çeşidinin *in vitro* ortamda mikroçoğaltımı için en iyi ortamın 0.5 mg/L Kinetin ile desteklenmiş MS besi ortamı olduğunu belirledik.

### 4.3. Köklendirme Çalışmaları

*In vitro* koşullarda elde edilen Balcı aspir (*C.tinctorius* L.) çeşidine ait sürgünlerin köklenmesine NAA ve IAA'nın 3 farklı konsantrasyonunun (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) etkisi bir kontrol grubu ile birlikte test edildi. Dört haftalık kültür periyodu sonunda elde edilen veriler değerlendirilerek **Çizelge 4.8.**de sunuldu.

**Çizelge 4.8.** *In vitro* koşullarda elde edilen balcı aspir çeşidinin sürgünlerinin köklenmesine IAA ve NAA'nın etkisi.

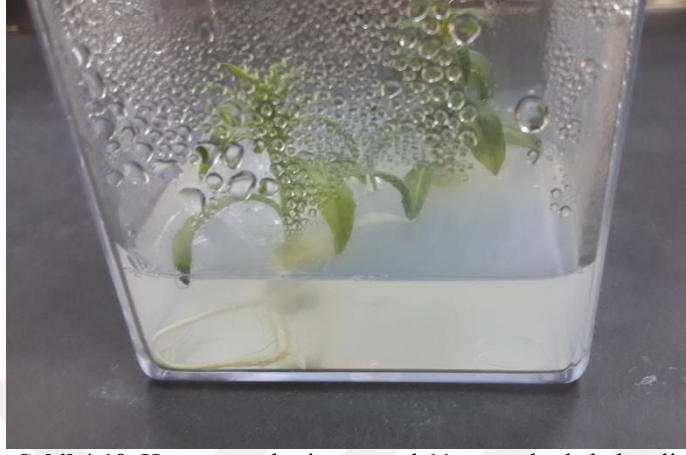
	Konsantrasyon (mg/L)	Sürgün Boyu (cm)	Kök Boyu (cm)	Kök Sayısı (adet)
Kontrol	0.0	3.43± 1.26 <sup>a</sup>	3.87± 1.13 <sup>a</sup>	3.50± 0.32 <sup>b</sup>
	0.5	2.06 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.00± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>
NAA	1.0	2.21 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.30± 2.18 <sup>b</sup>	0.87± 1.56 <sup>b</sup>
	2.0	3.90 ± 1.99 <sup>a</sup>	2.60± 1.82 <sup>ab</sup>	20.00± 0.65 <sup>a</sup>
IAA	0.5	2.12 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>
	1.0	3.12 ± 2.27 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.67 <sup>ab</sup>	2.50± 1.75 <sup>b</sup>
	2.0	4.0 ± 3.28 <sup>a</sup>	1.76 ± 1.22 <sup>ab</sup>	3.25 ± 1.30 <sup>b</sup>

Rakamlar 4 haftalık kültür periyodu sonunda 12 materyalin ortalamasını göstermektedir. Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ( $p \leq 0.05$ )

Dört haftalık kültür periyodu sonunda gelişen sürgünlerde, kontrol, NAA ve IAA'nın yüksek (1.0 ve 2.0 mg/L) konsantrasyonlarında kök oluşumu görülürken, düşük konsantrasyonlarda NAA ve IAA (0.5 mg/L) içeren ortamlarda köklenme gözlenmedi (**Çizelge 4.8.**). 2.0 mg/L NAA içeren besi ortamı dışındaki uygulamalarda (kontrol, 1.0 - 2.0 mg/L IAA, 1.0 mg/L NAA) bulunan sürgünlerde meydana gelen köklenme oranının birbirine yakın olduğu ve istatistiksel olarak da bu benzerliğin anlamlı olmadığı belirlendi. Test edilen tüm uygulamalarda en fazla kök oluşumu eksplant başına 20 adet ile 2.0 mg/L NAA içeren ortamda kültüre alınan sürgünlerden elde edildi. Elde edilen bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulundu.

Köklerin morfolojik gelişimlerine bakıldığında, kontrol grubu ile 1.0- 2.0 mg/L IAA ve 1.0 mg/L NAA ile desteklenmiş besi ortamlarında az sayıda olan köklerin zayıf, yer yer sarardığı ve kahverengileştiği tespit edildi (**Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21.**ve **Şekil 4.22.**). Köklenme çalışmaları için kullanılan 2.0 mg/L NAA'lı besi ortamında ise, daha güçlü ve sağlıklı köklerin geliştiği sürgünlerin canlı ve yaprakların koyu yeşil olduğu görüldü (**Şekil 4.23.**).

Doku kültürü çalışmalarında besi ortamlarında elde edilen sürgünlerin köklenmesini sağlamak bazı durumlarda mümkün olmamaktadır. Bu durumda sürgünlerin, kök oluşumu teşvik edecek hormonların bulunduğu ortamlara aktarılması gerekmektedir. Bitki büyüme düzenleyicilerinden oksinlerin kök oluşumunu teşvik ettiği de bilinmektedir (Kadıoğlu 2004). Özdemir ve Türker (2014) ile Talat ve Anwar (2010), IBA içeren MS besi ortamına aktardıkları aspir sürgünlerinde köklenme gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir. Yaptığımız köklendirme çalışmalarında, 2.0 mg/L NAA içeren MS besi ortamında kültüre alınan sürgünlerden eksplant başına 20 adet kök elde edildi. Çalışmamızı destekler şekilde Prasad ve ark. (1991), Orlikowska ve Dyer (1993), Radhika ve ark. (2006), Yang ve ark. (2009) NAA içeren MS besi ortamına aktardıkları *in vitro* aspir sürgünlerinde köklenme elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalıştığımız aynı aspir çeşidinde Kaya (2017) ise kültüre aldığı sürgünlerin vitrifiye olması sebebiyle bitkilerde kök gelişiminin olmadığını rapor etmiştir.



Şekil 4.19. Hormonsuz besi ortamındaki sürgünlerde kök gelişimi



Şekil 4.20. 1.0 mg/L IAA içeren besi ortamındaki sürgünlerde kök gelişimi



Şekil 4.21. 2.0 mg/L IAA içeren besi ortamındaki sürgünlerde kök gelişimi



Şekil 4.22. 1.0 mg/L NAA içeren besi ortamındaki sürgünlerde kök gelişimi



Şekil 4.23. 2.0 mg/L NAA içeren besi ortamındaki sürgünlerde kök gelişimi

#### 4.4 Toprağa Adaptasyon (Aklimatizasyon)

Aklimatizasyon alışmaları için köklendirme çalışmalarında elde edilen tam bir bitki konumuna gelen canlı ve sağlıklı köklü fideler agarlarından tamamen arındırıldı ve ticari olarak satılan torf – perlit karışımı (2:1) içeren saksılara dikildi (**şekil 4.24.**). Saksıların zeri şeffaf poşet ile kapatılarak  $25\pm 2$  °C sıcaklık ile 16/8 fotoperiyoda sahip büyüme odasında gelişmeye bırakıldı (**şekil 4.25.**). Bitkileri dış ortam koşullarına kademeli olarak alıştırmak amacıyla saksıların üzerindeki poşet 2. günden itibaren 10 gün boyunca belirli aralıklarla açılmak suretiyle, ortamın nemi kontrol altında tutulmaya çalışıldı. Bu şekilde uygulamaya tabi tutulan bitkilerin üzerleri 10. gün sonunda tamamen açıldı ve 2 hafta daha büyüme odasında gelişmeye bırakıldı. Fidelerin bu süre sonuna kadar hayatta kaldıkları ve yaşamlarına devam ettikleri tespit edildi (**şekil 4.26.**).



**şekil 4.24.** *İn vitro* koşullarda köklendirilmiş aspir fidesi



**şekil 4.25.** Torf-Perlit karışımı saksılara ekilmiş fidelerin büyüme odasında gelişmeye bırakılması



**Şekil 4.26.** Köklü fidelerin gelişmiş hali

*İn vitro* şartlarda elde edilen köklü fidelerin toprağa aktarılması ve dış koşullara adaptasyonunun sağlanması önemli bir sorundur ve bitkiler için öldürücü olabilmektedir. Çalışmamızda, köklü aspir fideleri saksılara aktarılmış ve bitkiler canlı kalarak toprağa adaptasyonu sağlanmıştır. Çalışmamızı destekler şekilde, Talat ve Anwar (2010), Sujatha ve Dinesh (2007), Radhika ve ark. (2006) ile Özdemir ve Türker (2014) yaptıkları çalışmada köklendirdikleri aspir bitkilerinin toprağa adaptasyonlarını sağladıklarını bildirmişlerdir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Asteracea (Compositae) familyasının üyesi olan Aspir (*C. tinctorius* L.) geniş adaptasyon yeteneğine sahip, gerek beslenme gerekse de biyoyakıt üretiminde öne çıkan tek yıllık yağlı tohumlu bir bitkidir. Ülkemizde yıllardır kültürü yapılan aspir çeşitlerinin adaptasyon yetenekleri iyi olmakla birlikte, en önemli dezavantajları yağ oranlarının ve tohum verimlerinin düşük olmasıdır. Aspiden ekonomik düzeyde verim alabilmek için, modern yetiştiricilik yöntemlerinin yanı sıra ileri ıslah metotlarının kullanılarak tohum verimi ve yağ oranı yüksek olan yeni aspir çeşitleri geliştirilmelidir. Günümüzde bitki ıslahçıları yüksek verimli, kaliteli ve stres faktörlerine dayanıklı yeni çeşitler geliştirmek üzere klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan, destekleyen ve hızlandıran biyoteknolojik yöntemlerden yararlanma yoluna gitmektedirler. Islah süresinin kısaltılmasında önemli avantaj sağlayan *in vitro* rejenerasyonun gerçekleştirilebilmesi de ancak ilgili bitki türü için etkili bir doku kültürü protokollerinin oluşturulmasına bağlıdır.

Yaptığımız literatür taramalarına göre, araştırmamızda bitkisel materyal olarak kullandığımız aspirin mikroçoğaltılması ile ilgili üzerine birkaç çalışma olmasına rağmen, genel olarak tüm çeşitlere uygulanabilen etkili bir bitki rejenerasyon protokolünün bulunmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle sunulan tez çalışmasında, 2011 yılında tescil edilen ve linoleik tipte olan Balcı aspir (*C. tinctorius*) çeşidinin olgun tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesi ve elde edilen sürgünlerin çoğaltılması, köklendirilmesi için optimum protokolün oluşturulması amaçlanmıştır.

Bu araştırmadan elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

1. *In vitro* doku kültüründe başlangıç materyali olarak hangi eksplant kullanılırsa kullanılsın en önemli nokta sterilizasyon işlemleridir. Balcı aspir (*C. tinctorius* L.) çeşidinin *in vitro* ortamda yetiştirilmesine yönelik yaptığımız çalışmanın ilk aşamasında; başlangıç eksplantı olarak kullanılan tohumların sterilizasyonu sağlandı. Tohumların NaOCl'de en yüksek bekletme süresi olan 60 dakikada enfeksiyon oranı %8 e kadar gerilediği görüldü. Bu nedenle, aspir tohumlarının kültüre alınmadan önce enfeksiyon riskinin azaltılması için %5'lik NaOCl'de minimum 60 dakika bekletilmesi gerektiği belirlendi.
2. Aspir tohumlarının sert bir testa ile örtülü olması fiziksel bir dormansiye sebep olmakta ve dolayısıyla da tohum çimlenme oranı düşük seviyelerde kalmaktadır. Yaptığımız *in vitro* çimlendirme çalışmalarında başlangıç materyali olarak kullanılan olgun aspir tohumlarını çatlatılan/çatlatılmayan olmak üzere 2 farklı şekilde kültüre aldık.

Çatlatılmış tohumların tamamının çimlendiği, çatlatılmamış tohumların ise çok az sayıda (%16.6) çimlendiği görüldü. Bu nedenle, *in vitro* ortamda çimlenmenin gerçekleşmesi için tohum testasına müdahale (çatlatılması) edildikten sonra kültür besi ortamına aktarılmasının gerekliliği tespit edildi.

3. Bitki doku kültürlerinde kullanılan besi ortamı başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biridir ve MS bazal besi ortamının aspirin *in vitro* kültürü için en uygun ortam olduğunu bildiren birçok çalışma bulunmaktadır. Yaptığımız çalışmada benzer şekilde MS besi ortamındaki tohumların kontrol grubuna göre daha iyi geliştiğini gözledik. Ayrıca bitkilerin morfolojik gelişimleri incelendiğinde ¼ MS besi ortamında kültüre alınan tohumların yapraklarının daha yeşil ve canlı olduğu dolayısıyla en uygun besi ortamının ¼ MS olduğu belirlendi.
4. Bitkiler, her türlü karbon kaynağını metabolize edip etkili bir şekilde kullanamazlar. Yaptığımız çalışmada, balcı aspir tohumlarının çimlenmesi üzerinde besi ortamında kullanılan şeker çeşidinin etkili olduğunu ve çimlenen tohumların morfolojik gelişimleri bakımından sakkarozun diğer şekerlerden (früktöz ve maltoz) daha iyi sonuç verdiğini saptadık. Maltoz ve fruktoz şekerlerinin ilave edildiği besi ortamında kültüre alınan tohumların %40-50'si çimlenirken sakkarozlu besi ortamında tohumların tamamının çimlendiği belirlendi.
5. Genellikle küçük tohumlu bitkilerin çoğunun *in vitro* çimlenmesinde ışığa gereksinim duyulur. Yaptığımız çalışmada, balcı aspir (*C. tinctorius* L.) tohumlarının hem fotoperiyod (16/8) hem de karanlık ortamda çimlendiğini ancak çimlenen tohumların aydınlık ortamda morfolojik olarak daha iyi gelişme gösterdiğini belirledik. Karanlık ortamda çimlenen tohumların çok uzun boylu ve beyaz renkli yani etiyole bitki görünümünde olduğu için tohumların çimlenmesi ve gelişmesi için mutlaka ışığa bırakılması gerektiği tespit edildi.
6. Sürgün çoğaltılması çalışmasında, sitokinin içermeyen kontrol grubunda yeni sürgün oluşumuna rastlanmadığı için, besi ortamına mutlaka Bitki Büyüme Düzenleyicisinin (BBD) ilave edilmesi gerektiği belirlendi. Test edilen tüm BAP konsantrasyonları arasında en iyi sürgün çoğaltımı,

eksplant başına yaklaşık 5.33 adet 0.5 mg/L BAP içeren ortamdan elde edildi. Ancak gelişen sürgünlerin morfolojik gelişimlerine bakıldığında sürgünlerin taban kısmında kallus ve yapraklarında vitrifikasyon (şeffaflaşma) görüldüğünden sürgün çoğaltımı için uygun olmadığı belirlendi.

7. Test edilen Kin uygulamaları arasında, en iyi sürgün oluşumu eksplant başına 3.75 adet sürgün ile 4.0 mg/L Kin ve 3.33 adet sürgün ile 0.5 mg/L Kin içeren ortamdan elde edildi. Ancak 4.0 mg/L Kin içeren ortamda oluşan sürgünlerin BAP uygulamalarında olduğu gibi büyük oranda vitrifiye olduğu ve dolayısıyla sürgün çoğaltımı için uygun olmadığı belirlendi. Test edilen BAP ve Kin konsantrasyonları arasında en iyi sürgün boyu 5.66 cm ile 0.5 mg/L Kin içeren ortamdan elde edildi.
8. Vitrifikasyonun olmadığı, köklenmeye uygun sağlıklı sürgünlerin geliştiği 0.5 mg/L Kin ile desteklenmiş MS besi ortamının, balcı aspir çeşidinin *in vitro* sürgün çoğaltımı için en ideal ortam olduğu tespit edildi.
9. *In vitro* şartlarda her zaman köklenmeyi sağlamak mümkün olmamakta ve bu durumda besi ortamına kök oluşumunu sağlayacak hormonların ilave edilmesi gerekmektedir. Yaptığımız çalışmada, sürgünlerde kök oluşumunu elde etmek amacıyla MS besi ortamına NAA ve IAA'nın 3 farklı konsantrasyonlarını (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) ilave ettik. Sonuçta 0.5 mg/L NAA ve IAA içeren besi ortamı dışında, tüm gruplarda sürgünlerin köklendiğini belirledik. En fazla kök oluşumunu ise eksplant başına 20 adet ile 2.0 mg/L NAA içeren ortamda kültüre alınan sürgünlerden elde ettik. Oluşan köklerin diğer oranlara göre, daha kalın ve sağlıklı geliştiğini, sürgünlerin canlı ve yaprakların koyu yeşil olduğunu belirledik.
10. Köklendirme çalışmalarında elde edilen, tam bir bitki konumuna gelen canlı ve sağlıklı fideleri torf – perlit karışımı içeren saksılara dikerek toprağa adaptasyonunu sağladık.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, Balcı aspir (*C. tinctorius*) çeşidinin olgun tohumları için *in vitro* çimlenme koşulları, çimlenme çalışmalarından elde edilen sürgünlerin çoğaltılması ve köklendirilmesi için ideal bir protokol oluşturulmuştur. Elde edilen köklü fidelerin toprağa aktarılması ve başarılı bir şekilde dış ortama adaptasyonu sağlanmıştır.

*in vitro* kültür ortamında aspir bitkisi sürgünlerinin vitrikiye olması karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir. Balcı aspir çeşidi ile ilgili yaptığımız bu çalışmada da gelişen sürgünlerin bir kısmında vitrifikasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu olumsuzluğun bertaraf edilmesi için vitrifikasyonu engellemeye yönelik yeni çalışmalar yapılması faydalı olacaktır.

## **KAYNAKLAR**

- Abak, K., Ellialtıoğlu, Ő., Sarı, N., 2001, ‘‘Haploid bitki üretimi. Ref in: Bitki Biyoteknolojisi. Cilt I. Doku Kùltürleri ve Uygulamaları’’ 2002, (Editörler: M.Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), II. Baskı. Konya: *Selçuk Üniversitesi Basımevi*, 137-189.
- Akman, Y., Ketenoğlu, O., Kurt, L., Güney, K., Hamzaoğlu, E., Tuğ, N., 2007, *Angiospermae (Kapalı Tohumlular), Palme Yayınları*, ISBN 9799944341228, 810 s., İstanbul.
- Anonim, 2013, FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division, [<http://faostat3.fao.org/download/q/qc/e>]. Erişim Tarihi: 21.04.2015.
- Anonim, 2014, Türkiye İstatistik Kurumu, [<http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>]. Erişim Tarihi: 29.06.2015.
- Anonim,2017, Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü, tescilli çeşitlerimiz: Balcı [<https://arastirma.tarim.gov.tr/gktaem/Menu/12/Tescilli-Cesitlerimiz>], Erişim Tarihi: 24.11.2017.
- Angın, D., Şensöz, S., 2006, Aspir Tohumu Pres Kùspesinin Piroлизinde Sürükleyici Gaz (N2) Akış Hızının Etkisi ve Sıvı Ürün Karakterizasyonu, Fırat Üniversitesi, *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 18(4), 445-452.
- Arıoğlu, H., Kolsarıcı, Ö., Göksu, A. T., Güllüoğlu, L., Arslan, M., Çalışkan, S., Söğüt, T., Kurt, C., Arslanoğlu, F., 2010, Yağ Bitkileri Üretiminde Artırılması Olanakları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Bildiriler Kitabı-1*; 361-375, Ankara.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., 2001, Doku Kùltürü: Temel Laboratuvar Teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kùltürü ve Uygulamaları (M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan Editörler) s:1-35, *S.Ü. Vakfı Yayınları*, Konya.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. 2002, Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kùltürü ve Uygulamaları, *Selçuk Üniversitesi Basımevi*, 374.
- Babaoğlu, M., 2005, Aspir tarımı (*Carthamus tinctorius* L.) [[http://www.ttae.gov.tr/makaleler/aspir\\_tarimi.htm](http://www.ttae.gov.tr/makaleler/aspir_tarimi.htm)]. Erişim Tarihi: 25.05.2015.
- Babaoğlu, M., 2006, Dünya’da ve Türkiye’de aspir bitkisinin tarihi, kullanım alanları ve önemi. Broşür,*Trakya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü*, Edirne.
- Babaoğlu, M., 2007, Aspir ve Tarımı, *Trakya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü*, Edirne.
- Bajaj, Y.P.S., Furmanowa, M., Olszowska, O., 1988, Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants,*Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 4,60-103.
- Baker, C. M., Dyer, W. E. 1996, Improvements in rooting regenerated safflower (*Carthamus tinctorius* L.) shoots [J]. *Plant Cell Reports*, 16,106-110.
- Başalma, D., Uranbey, S., Mirici, S., Kolsarıcı, Ö., 2007, TDZ x IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and in vitro multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.), *African Journal of Biotechnology*, 8: 960–966.
- Berglund, D.R., Riveland, N., Bergman, J., 2007, Safflower production, [<http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/crops/a870w.htm>]. Erişim: 27.05.2015.
- Birben, F., 2015, Doğal Vejetasyondan Seçilen Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Hatlarında Verim, Kalite Ve Bazı Bitkisel Özelliklerin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri AnabilimDalı*, 63 s., Konya.

- Bunker K.V., 1994, Overcoming poor germination in *Australian daisies* (*Asteraceae*) by combinations of gibberellin, scarification, light and dark, *Hortic Sci.*, 59, 243–252 pp.
- Chang, C., Wang, B., Shi, L., Li, Y., Duo, L., Zhang, W., 2010, Alleviation of salt stress-induced inhibition of seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by ethylene and glutamate, *Journal of Plant Physiology* 167,152-156.
- Clarke, P.J., Davison, E.A., Fulloon, L., 2000, Germination and dormancy of grassy woodland and forest species: effects of smoke, heat, darkness and cold, *Aust J Bot.*, 48, 687–700 pp.
- Cöşge, B., Gürbüz, B., Kıralan, M., 2007, Oil content and fatty acid composition of some safflower (*Carthamus tinctorius* L.) varieties sown in spring and winter, *International Journal of Natural and Engineering Sciences* 1(3): 11-15.
- Culpan, E., 2015, Gibberellik Asit Ve Salisilik Asit Uygulamalarının Aspir (*Carthamus tinctorius* L.)’in Tohum Verimi Ve Kalite Özelliklerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, *Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*,58 s., Tekirdağ.
- Çulha, Ş., 2011, Tuz Stresinin Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Çeşitlerindeki Bazı Fizyolojik Ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisinin İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*,177 s., Ankara
- Dajue, L., Mündel, H-H., 1996, Safflower *Carthamus tinctorius* L., Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 7,*International Plant Genetic Resources Institute*, 83p.
- Dayan, S., 2006, Endemik ve tehlike altındaki *Thermopsis turcica*(Fabaceae)’nın *in vitro* çimlenmesi ve mikroçoğaltımı, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim dalı, Yüksek lisans tezi 67 s., Afyon.
- Demirci, M., Esendal, E., Geçgel, Ü., Taşan, M., 2003, Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Yağının Yağ Asidi Kompozisyonu ve Besin Değeri, Türkiye I. Yağlı Tohumlar, *Bitkisel Yağlar ve Teknolojileri Sempozyumu*. (22-23 Mayıs 2003), 126-130, İstanbul.
- Dıptı, D. R., Dudhare, M. S., Mohite, N. R., Shingote, P. R., Jadhav, P.V., Moharil, M. P., 2015, Refiement of In vitro Regeneration System in Elite Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) *Journal of Cell and Tissue Research Vol.* 15(1): 4849-4854.
- Fan, L., Guo, M., 2013, Progress of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Regeneration through Tissue Culture, *Journal of Medical Colleges of Pl.* 289-301.
- Fan, L., Guo, M., 2014, Regeneration of *Carthamus tinctorius* from Jimsar, *Chinese Herbal Medicines*, 6 (3): 237-241.
- Finch-Savage, W.E., Leubner-Metzger, G., 2006, Seed dormancy and the control of germination, *New Phytol* 171, 501-523.
- George, L., Rao, P. S., 1982, *In vitro* multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) through tissue culture [J]. *Proc Indian Natn Sci Acad*, B48:791-794.
- Ghasempour, H.R., Soheilikhah Zh., Zeberjadi, A.R., Ghasempour, S., Karimi, N., 2014, *In vitro* Micropropagation, Callus İnduction and Shoot Regeneration in Safflower L. cv. Lesaf, *Iranian Journal Of Plant Physiology*, 4 (2): 999-1004.
- Grime, J.P., Campbell, B.D., 1991, Growth rate, habitat productivity, and plant strategy as predictors of stress response. In: Mooney, H.A., Winner, W.E., Pell, E.J., Chu,

- E. (Eds.), Response of Plants to Multiple Stresses. Academic Press, Inc., San Diego, London, 143-159.
- Guan, B., Zhou, D., Zhang, H., Tian, Y., Japhet, W., Wang, P., 2009, Germination responses of *Medicago ruthenica* seeds to salinity, alkalinity, and temperature, *Journal of Arid Environments* 73, 135-138.
- Ihara, M., Umekawa, H., Takahashi, T. ve Furuichi Y., 1998, Comparative Effects of Short- and Long-Term Feeding of Safflower Oil and Perilla Oil on Lipid Metabolism in Rats, *Biochemistry and Molecular Biology*. 121 (2): 223-231.
- İşler, N., 2014, Aspir Tarımı, *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi*, Hatay.
- Kadıoğlu, A., 2004, Bitki Fizyolojisi, Eser ofset matbacılık, 258-317, Trabzon.
- Kanar, Y., 2016, Kahramanmaraş Koşullarında Bazı Aspir (*Carthamus tinctorius*) Çeşitlerinin Verim ve Verim Unsurlarının Belirlenmesi, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 56 s., Kahramanmaraş.
- Karaaslan, D., Hakan, M., 2007, Diyarbakır Koşullarında Aspir İçin En Uygun Yazlık Ekim Zamanının Ve Çeşitlerinin Belirlenmesi. *Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi*, (25-27 Haziran 2007), 665-668, Erzurum.
- Kaya, Ş., 2017, Aspir (*Carthamus Tinctorius* L.) Bitkisi Balcı Çeşidinin Doku Kültürüyle *In Vitro* Çoğaltımı, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 59 s., İstanbul.
- Kaye, T.N, Kuykendall, K., 2001b, "Effects of scarification and cold stratification on seed germination of *Lupinus sulphureus* ssp. *kincaidii*" *SeedSci. & Technol.*, 29, 663-668.
- Knights, S., 2007, Safflower: potential and world adaptability, *IREC Farmers Newsletter*, 176: 34-35.
- Kocaçalışkan, İ., 2002, "Bitki Kültürleri (Organ, Doku ve Hücre)" Kütahya.
- Koç, H., 2001, Yağ Bitkileri, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitapları Serisi* No:22, Tokat.
- Konar, V., Aşkın, Y., Türkoğlu, İ., 2010, Yabani Aspir (*Carthamus persicus* Wild) Bitkisinin Yağ Asidi Bileşiminin İncelenmesi. *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*. 22 (1): 29-36.
- Kumari, S., Pandey, R. K., 2010, In vitro Germination and Callus Induction from Seeds of *Carthamus tinctorius* L., *An International Quarterly Journal of Life Sciences The Bioscan* 5(2): 247-250.
- Kumar, J. V., Kumari, B. R., Castano, E., 2008, Cyclic somatic embryogenesis and efficient plant regeneration from callus of safflower [J]. *Biologia Plantarum*, 52:429-436.
- Lin, N., Fan, S., Shan, G., Zuo, P., Cui, L. 2014, Safflower Yellow for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Complementary Therapies in Medicine*. 22 (2): 354-361.
- Mariashibu, T.S., Anbazhagan, V.R., Jiang, S.Y., Ganapathi, A., Ramachandan, S., 2013, *In vitro* regeneration and genetic transformation of soybean, edited by James E. Board, published: January 2.

- Mandal, A. K. A., Gupta, S. D., Chatterji, A. K., 2001, Factors affecting somatic embryogenesis from cotyledonary explants of safflower [J]. *Biologia Plantarum*, 44: 503-507.
- Mandal, A. K. A., Gupta, S. D., 2003, Somatic embryogenesis of safflower: influence of auxin and ontogeny of somatic embryos [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 72: 27-31.
- Moghadam A.K., Mohammadi K., 2014, A laboratory and glasshouse evaluation of ascorbic and salicylic acid effect on germination traits and grain yield of safflower cultivars, *Environmental and Experimental Biology*, 12: 39-42.
- Moghbel, N., Borujeni, M.K., Bernard, F., 2015, Colchicine effect on the DNA content and stomatasize of *Glycyrrhiza glabra var. glandulifera* and *Carthamus tinctorius* L. cultured *in vitro*, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13: 1-6.
- Motamedi, J., Zebarjadi, A., Kahrizi, D., Salmanian, A.H., 2011, In vitro propagation and Agrobacterium-mediated transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using a bacterial mutated aroA gene [J]. *Australian J Crop Science*, 5:479-486.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plantarum*, 15, 473-497.
- Mündel, H-H., Blackshaw, R.E., Byers, J.R., Huang, H.C., Johnson, D.L., Keon, R., Kubik, J., McKenzie, R., Otto, B., Roth, B., Stanford, K., 2004, Safflower production on the canadian prairies, Graphcom Printers LTD., *Lethbridge, Alberta*, 37p.
- Nikhil, M., Dudhare, M.S., Jadhav P.V., Moharil M.P., Deshmukh A.S., 2014, In Vitro Shoot Regeneration and Plantlet Development In Safflower (*Carthamus tinctorius* L.), *The Bioscan* 9(2): 551-555.
- Nikam, T. D., Shitole, M. G., 1999, *In vitro* culture of Safflower L.cv. Bhima: initiation, growth optimization and organogenesis, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 5: 15-22.
- Oelke, E.A., Oplinger, E.S., Teynor, T.M., Putnam, D.H., Doll, J.D., Kelling, K.A., Durgan, B. R., Noetzel, D.M., 2000, Safflower, [<http://www.hort.purdue.edu/NEWCROP/AFCM/safflower.html>].
- Orcan, M.Y., 2016, Yerel Karacadağ Çeltiğinin (*Oryza sativa* L.) *In Vitro* Koşullarda Farklı Tuz Çeşidi Ve Konsantrasyonlarına Verdiği Yanıtlar, Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 68 s., Batman.
- Orlikowska, T.K., Dyer, W.E., 1993, In vitro regeneration and multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius* L.), *Plant Science* 93: 151-157.
- Oruç, N., 2012, Türkiye Endemiği *Verbascum lyidium var. lyidium* Bitkisinin *In Vitro* Çimlenmesi Üzerine Farklı Işık, Sıcaklık ve Besi Ortamlarının Etkileri ve Elde Edilen Bitkileri Doğaya Aktarma Çalışmaları, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 65 s., İzmir.
- Özdemir, F., Türker, M., 2014, Effect of Different Combinations of BAP and NAA in vitro Propagation of Wild Safflower (*Carthamus persicus* Wild). *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 24 (1), 30-35.
- Özgen, M., Özcan, S., Sevimay, C.S., Sancak, C., Yıldız, M., 1998, High frequency adventitious shoot regeneration in sainfoin, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 42: 205-208.
- Öztürk, Ö., 1994, Konya Ekolojik Şartlarında Bazı Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Çeşitlerinde Verim ve Verim Unsurlarının Tespiti, *Selçuk Üniversitesi Fen*

- Bilimleri Enstitüsü*, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 69.s., Konya.
- Padilla, I.M.G., Encina, C.L., 2003, *In vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) seeds, *Hortic. Sci.*, 97, 219–227 pp.
- Pahlavani, M.H., Mirlohi, A.F., Saedi, G., 2004, Inheritance of flower color and spininess in safflower (*Carthamus tinctorius* L.), *Journal of Heredity* 95(3), 265-267.
- Plummer, J.A., Bell D.T., 1997, The effect of temperature, light and gibberellic acid (GA3) on germination of Australian everlasting daisies (*Asteraceae*, Tribe *inuleae*), *Aust. J. Bot.*, 43, 93–102 pp.
- Prasad, B. R., Khadeer, M. A., Seeta, P., Anwar, S. Y., 1991, *In vitro* induction of androgenic haploids in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 10:48-51.
- Radhika, K., Sujatha, M., Nageshwar, R.T., 2006, Thidiazuron stimulates adventitious shoot regeneration in different safflower explants, *Biologia Plantarum*, 50: 174-179.
- Rehman, S., Park, I.H., 2000, “Effect of scarification, GA and chilling on the germination of goldenrain-tree (*Koelreuteria paniculata* Laxm.) seeds” *Scientia Horticulturae* Vol:85 p: 319-324.
- Smith, V.H., Jimmerson, J., 2005, Safflower, [<http://www.ampc.montana.edu/briefings/briefing58.pdf>].
- Sujatha, M., Dinesh, K.V., 2007, *In vitro* bud regeneration of *Carthamus tinctorius* and wild *Carthamus* species from leaf explants and axillary buds. *Biologia Plantarum*, 51: 782-786.
- Talat, K., Anwar, S.Y., 2010, High frequency somatic embryogenesis and plantlet regeneration via somaticembryos in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 7:239-249.
- Tetsuya, K., Takahashi, K., 2003, “Breaking of physical dormancy andgermination ecology for seeds of *Thermopsis lupinoides* Link.” *J. Jpn. Soc.Regevet. Tech.* Vol: 30(1) p:163-168.
- Uysal, N., Baydar, H., Erbaş, S., 2006, Isparta populusyonundan geliştirilen aspir (*Carthamus tinctorius* L.) hatlarının tarımsal ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 1(1), 52-63.
- Walia, N., Kaur, A., Babbar, S. B., 2007, Proliferation and differentiation from endosperm of *Carthamus tinctorius* [J]. *Biologia Plantarum*, 51: 749-753.
- Yang, J., Xiong, L., Li T., 2009, The Effect of Phytohormones on safflower regeneration plant [J]. *J Chinese Med Mater*, 32:1335-1338.
- Yaman, H., 2014, Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) çeşitlerine uygulanan farklı dozda gama ışınının m1 ve m2 bitkilerinin bazı tarımsal özellikleri ve *invitro* adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 329 s., Ankara.
- Yu, S. Y., Lee, Y. J., Kim, J. D., Kang, S. N., Lee, S. K., Jang, J. Y., Lee, H. K., Lım, J. H., Lee, O. H., 2013, Phenolic Composition, Antioxsidant Activity and Anti-Adipogenic Effect of Hot Water Extract from Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seed. *Nutrients*. 5 (12): 4884-4907.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Atike HAMİDİ BİRECİKLİ  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : DİYARBAKIR/1989  
**Telefon** :  
**Faks** :  
**e-mail** : atikebirecikli@gmail.com

### EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Ziya Gökalp Lisesi/DİYARBAKIR	2006
Üniversite	: Dicle Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	: Batman Üniversitesi	-