

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ertan GENEYİKLİ**

**BARIŞ ZAMBAĞI'NIN (*SPATHIPHYLLUM*) BAZI ÇEŞİTLERİNDE  
MİKROÇOĞALTIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2009**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BARIŞ ZAMBAĞI (*SPATHIPHYLLUM*) ÇEŞİTLERİNDE  
MİKROÇOĞALTIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Ertan GENEYİKLİ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 05/01/2009 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
**Oybirliği/Oyçokluğu** ile Kabul Edilmiştir.

|                           |                      |                         |
|---------------------------|----------------------|-------------------------|
| İmza.....                 | İmza.....            | İmza.....               |
| Doç.Dr.Yeşim YALÇIN MENDİ | Prof.Dr.Zerrin SÖĞÜT | Doç.Dr.Yıldız AKA KAÇAR |
| Danışma                   | Üye                  | Üye                     |

Bu tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

**Kod No:**

**Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ**  
**Enstitü Müdürü**  
**İmza ve Mühür**

Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.  
Proje No: ZF2008YL34

**Not:**Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

**ÖZ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BARIŞ ZAMBAĞI'NIN (*SPATHIPHYLLUM*) BAZI ÇEŞİTLERİNDE  
MİKROÇOĞALTIM OLANAKLARININ ARASTIRILMASI**

**Ertan GENEYİKLİ**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman : Doç. Dr. N. Yeşim YALÇIN-MENDİ**

**Yıl: 2009, Sayfa: 59**

**Jüri: Doç. Dr. N. Yeşim YALÇIN-MENDİ**

**Prof. Dr. Zerrin SÖĞÜT**

**Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR**

Bu çalışmada, *Spathiphyllum*'un 3 çeşidinin (*Spathiphyllum* 'Sweet Dario', *Spathiphyllum* 'Sweet Chico', *Spathiphyllum* 'Sweet Cupido'), sürgün ucu kültürü yöntemiyle mikroçoğaltımı hedeflenmiştir. Mikroçoğaltımın birinci denemesinde bitkicikler, Kin (Kinetin) (0.0, 1.0, 2.0 mg/l) ve BA( Benziladenin) (0.0, 1.0, 2.0 mg/l) içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Çalışmanın ikinci denemesinde, 3 çeşitte, BA (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) ve NAA (0.0, 0.5, 1.0 mg/l)'nın 12 farklı kombinasyonu kullanılarak kardeşlendirme oranları incelenmiştir. Üçüncü denemede ise yüksek BA (0.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/l) ve NAA (0.0, 2.0, 4.0 mg/l)'nın 12 farklı kombinasyonunu içeren MS ortamlarına bitkicikler aktararak kardeşlenme oranları ve yüksek sitokinin konsantrasyonunun neden olduğu somaklona varyasyonlar incelenmiş ve istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

BA-Kin denemelerinden elde edilen en iyi kardeşlenme oranı her iki çeşit için 1.0 mg/l BA içeren MS ortamından elde edilmiş olup S. 'Sweet Dario' 'da 1.0 mg/l BA'da 14.3, S. 'Sweet Chico' 'da. ise 13.5, 1 mg/l Kin' de ise sırasıyla 7.5 ve 4.5 sürgün/eksplant oranında saptanmıştır. BA-NAA ile kurulan 12 farklı denemede ise en iyi kardeşlenme oranı sırasıyla 3 çeşitte (*Spathiphyllum* 'Sweet Dario', *Spathiphyllum* 'Sweet Chico' ve *Spathiphyllum* 'Sweet Cupido') 15.3, 17.8 ve 18 sürgün/eksplant olarak 1.0 mg/l BA içeren ortamda kaydedilmiştir. Üçüncü denemede ise 8.0 mg/l BA içeren ortamlarda gelişen bitkiciklerde yaprakların mızrak şeklinde deforme olduğu ve somaklona varyasyon görüldüğü hem görsel hem de RAPD analizleri kullanılarak saptanmıştır

**Anahtar kelimeler:** Doku kültürü, *Spathiphyllum*, *in vitro*, mikroçoğaltım

## ABSTRACT

### MSc. THESIS

# RESEARCHES ON MICROPROPOGATION FOR BARIŞ ZAMBAĞI (*SPATHIPHYLLUM*) VARIETIES

Ertan GENEYİKLİ

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ

Year : 2009, Pages: 59

Juri: Assos.Prof. N. Yeşim YALÇIN-MENDİ

Prof. Dr. Zerrin SÖĞÜT

Assos.Prof. Yıldız AKA-KAÇAR

In this study, micropropagation of three cultivars of *Spathiphyllum* was studied by shoot tip culture. In the first step of micropropagation, plantlets were transferred in to the MS media containing Kin (0.0, 1.0, 2.0 mg/l) and BA (0.0, 1.0, 2.0 mg/l). In the second part of the study, multiplication ratio of three varieties of *Spathiphyllum* was tested in the MS media containing BA (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) and NAA (0.0, 0.5, 1.0 mg/l) combinations. In the third part of the study, multiplication ratio and epigenetic variation caused by high cytokinin of three varieties of *Spathiphyllum* were tested in the MS media containing BA (0.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/l) and NAA (0.0, 2.0, 4.0 mg/l) combinations. The results were analysed statistically.

The highest proliferation ratios in the media containing 1.0 mg/l BA for two varieties were 14.3 shoot/explant for *S. dario* and 13.5 shoot/ eksplant for *S. chicco*. The media containing 1.0 mg/l Kin showed that 7.5 shoot/explant and 4.5 shoot/explant for two varieties, respectively. The best proliferation ratios in MS media containing BA (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) and NAA (0.0, 0.5, 1.0 mg/l) combinations were obtained from 1 mg/l BA alone as 15.3, 17.8 ve 18 shoots/explant for three *Spathiphyllum* varieties (*Spathiphyllum* ‘Sweet Dario’, *Spathiphyllum*. ‘Sweet Chico’, *Spathiphyllum* ‘Sweet Cupido’,) respectively. In the third study, the plantlets grown in the MS media containing 8.0 mg/l BA showed leaf deformity and somaclonal variation. This variation was determined by morphologic and RAPD analysis.

**Key words :** Tissue culture, *Spathiphyllum*, *in vitro*, micropropagation

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca tezimin planlanması, yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç.Dr.Yeşim YALÇIN MENDİ'ye sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında öneri ve dileklerinden yararlandığım değerli Hocam Doç.Dr.Yıldız AKA-KACAR'a teşekkürü borç bilirim.

İstatistik analizler konusunda yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Nurşen YILDIRIM, Arş. Gör. Hatice BİLİR'e teşekkür ederim.

Bitki materyallerimin sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen Fidan A.Ş. sahibi Erhan TANRISEVER'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak da aileme teşekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

|                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÖZ.....                                                                                        | I         |
| ABSTRACT.....                                                                                  | II        |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                  | III       |
| İÇİNDEKİLER.....                                                                               | IV        |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                                                         | VI        |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                                           | <b>1</b>  |
| <b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>                                                               | <b>8</b>  |
| 2.1. <i>Spathiphyllum</i> ’ da Doku Kültürü Çalışmaları.....                                   | 8         |
| 2.2. <i>Spathiphyllum</i> ’ da Yapılan Diğer Çalışmalar.....                                   | 11        |
| <b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>                                                               | <b>14</b> |
| 3.1. Materyal.....                                                                             | 14        |
| 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyalleri.....                                            | 16        |
| 3.2. Metot.....                                                                                | 18        |
| 3.2.1. Eksplantların Sterilizasyonu.....                                                       | 18        |
| 3.2.1.1. Sterilizasyonda Hipo Klorür Denemeleri.....                                           | 18        |
| 3.2.1.2. Sterilizasyonda Civa Klorür Denemeleri.....                                           | 19        |
| 3.2.2. Besi Ortamları ve Hazırlanması.....                                                     | 22        |
| 3.2.3. Bitkiciklerin Kardeşlenme Ortamlarına Aktarılması.....                                  | 26        |
| 3.2.3.1. BA ve Kin İçeren Ortamlara Bitkiciklerin Aktarılması.....                             | 26        |
| 3.2.3.2. BA ve NAA Kombinasyonlarını içeren Ortamlara<br>Bitkiciklerin Aktarılması.....        | 26        |
| 3.2.3.3. Yüksek BA ve NAA Kombinasyonlarını İçeren<br>Ortamlara Bitkiciklerin Aktarılması..... | 26        |
| 3.2.4. Moleküler Çalışmalar.....                                                               | 27        |
| 3.2.4.1. DNA İzolasyonu.....                                                                   | 27        |

|                                                                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.4.2. DNA İzolasyon Aşamaları.....                                                                                   | 28        |
| 3.2.4.2.(1). DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi.....                                                             | 29        |
| 3.2.4.3 RAPD Analizleri.....                                                                                            | 29        |
| 3.2.4.3.(1).RAPD Agaroz Jel Elektroforezi.....                                                                          | 30        |
| 3.2.5. Kardeşlenen Bitkiciklerin Köklendirme Ortamlarına<br>Aktarılması.....                                            | 32        |
| 3.2.6. Bitkiciklerin Dış Ortama Adaptasyonu.....                                                                        | 32        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>                                                                          | <b>33</b> |
| 4.1. Sterilizasyon Denemesi Sonuçları.....                                                                              | 33        |
| 4.1.1. Sterilizasyonda Hipo Klorür Denemesi Sonuçları.....                                                              | 33        |
| 4.1.2. Sterilizasyonda Civa Klorür Denemesi Sonuçları.....                                                              | 33        |
| 4.2. Farklı Hormon Konsantrasyonlarının Sürgün Ucu Kültürü<br>Yöntemi ile Mikroçoğaltım Üzerine Etkileri.....           | 35        |
| 4.2.1 Kin ve BA İçeren Ortamlarda Gelişen<br>Bitkiciklerin Mikroçoğaltım Sonuçları.....                                 | 35        |
| 4.2.2. BA (0, 0.5, 1, 2 mg/l) ve NAA (0, 0.5, 1) ile Kombine<br>Edilmiş 12 Farklı Hormon Konsantrasyonu Sonuçları ..... | 39        |
| 4.2.3. Yüksek BA ve NAA Kombinasyonlarını İçeren<br>Ortamlarda Gelişen Bitkiciklerin Mikroçoğaltım Sonuçları...         | 43        |
| 4.3. Moleküler Analiz Sonuçları.....                                                                                    | 47        |
| 4.3.1. DNA İzolasyonu Sonuçları.....                                                                                    | 47        |
| 4.3.2 RAPD Analizi Sonuçları.....                                                                                       | 48        |
| 4.4 Bitkiciklerin Köklenme Ortamındaki Köklenme<br>Oranı Sonuçları.....                                                 | 52        |
| 4.5.Köklenen Bitkiciklerin Toprak Koşullarına Alıştırma Sonuçları... ..                                                 | 53        |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                                                                                        | <b>54</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                                                                   | <b>56</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                                                                    | <b>59</b> |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1. Ülkeler Bazında Dünya Süs Bitkisi Üretimi.....                                                          | 2  |
| Çizelge 1.2. Ülkeler Bazında İhracat Payları.....                                                                    | 2  |
| Çizelge.1.3. Avrupa Laboratuvarlarındaki Süs Bitkisi Üretimleri.....                                                 | 6  |
| Çizelge.1.4. 1998-2000 Almanya’ da Yaygın Olarak<br>Mikroçoğaltımı Yapılan Süs Bitkileri.....                        | 7  |
| Çizelge 3.1. MS Temel Besin Ortamında Bulunan Besin<br>Maddeleri ve Konsantrasyonları.....                           | 25 |
| Çizelge.3.2. DNA İzolasyon Yönteminde Kullanılan<br>Ekstraksiyon Tampon Çözeltilisinin İçeriği.....                  | 27 |
| Çizelge.3.3 RAPD-PCR Protokolü.....                                                                                  | 30 |
| Çizelge.3.4. PCR Koşulları.....                                                                                      | 30 |
| Çizelge.4.1. Civa Denemesi Sonucunda Gelişen Sağlam Bitkicik Oranı.....                                              | 34 |
| Çizelge.4.2. Kin ve BA İçeren Ortamlarda Gelişen Bitkiciklerin<br>Kardeşlenme Oranları.....                          | 37 |
| Çizelge.4.3. BA-NAA’ nın 12 Farklı Konsantrasyonlarındaki<br>Kardeşlenme Oranları.....                               | 41 |
| Çizelge.4.4. Yüksek BA ve NAA Kombinasyonlarını İçeren<br>Ortamlarda Gelişen Bitkiciklerin Kardeşlenme Oranları..... | 46 |
| Çizelge.4.5 DNA Miktarları ve Saflık Dereceleri.....                                                                 | 48 |
| Çizelge.4.6. IAA Konsantrasyonlarındaki Köklenme Yüzdeleri.....                                                      | 52 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil.1.1 Türkiye’ deki Süs Bitkileri Üretim Bölgeleri.....                                                                                                                                                                                                                                                     | 4  |
| Şekil.3.1. <i>Spathiphyllum</i> Bitkisinin Genel Görünümü.....                                                                                                                                                                                                                                                  | 15 |
| Şekil 3.2. <i>Spathiphyllum</i> Bitkisinin Çiçeğinin Görünümü.....                                                                                                                                                                                                                                              | 15 |
| Şekil.3.3. <i>Spathiphyllum</i> ‘Sweet Dario’ Bitkilerinin Görünümü .....                                                                                                                                                                                                                                       | 16 |
| Şekil.3.4. <i>Spathiphyllum</i> ‘Sweet Chico’ Bitkilerinin Görünümü.....                                                                                                                                                                                                                                        | 16 |
| Şekil.3.5. <i>Spathiphyllum</i> ‘Sweet Cupido’ Bitkilerinin Görünümü.....                                                                                                                                                                                                                                       | 17 |
| Şekil. 3.6. Eksplant Kaynağı Olarak Kullanılan Bitkiler .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 18 |
| Şekil 3.7. Sodyum Hipoklorit’le Kurulan Denemelerde Bitkiciklerde<br>Görülen Enfeksiyon Problemi.....                                                                                                                                                                                                           | 19 |
| Şekil 3.8. <b>A)</b> Çeşme Suyu Altında Bitkilerin Yıkanması ve Temizlenmesi,<br><b>B)</b> Toprak Kısımlarından Arındırılmış Bitkicikler.....                                                                                                                                                                   | 19 |
| Şekil 3.9. Yaprak ve Kök Kısımlarının Ayrılması.....                                                                                                                                                                                                                                                            | 20 |
| Şekil 3.10. Civa Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....                                                                                                                                                                                                                                                         | 20 |
| Şekil 3.11. <b>A)</b> Çeker Ocak Altında Civa Muamelesi,<br><b>B)</b> Steril Kabinden Altında Yapılan Sterilizasyon.....                                                                                                                                                                                        | 21 |
| Şekil 3.12. <b>A)</b> Sodyum Hipoklorit Çözeltisi,<br><b>B)</b> Sürgünlerin Sodyum Hipokloritle Muamele Edilmesi.....                                                                                                                                                                                           | 21 |
| Şekil.3.13. pH Metre.....                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 23 |
| Şekil.3.14. Sterilizasyon İşlemlerinde Kullanılan Otoklavın Görünümü.....                                                                                                                                                                                                                                       | 23 |
| Şekil.3.15. <b>A)</b> Sürgünlerin Pens Yardımıyla Alınması,<br><b>B)</b> Sürgünlerin Uçlarının Çıkarılması,<br><b>C-D-E-F)</b> Sürgünlerin Besi Ortamına Transferi,<br><b>G)</b> Tüplerin Kapaklarının Streç Film ile Kapatılması<br><b>H)</b> Transfer Edilen Sürgünlerin Büyütme<br>Odasında İnkübasyonu..... | 24 |
| Şekil 3.16. <b>A)</b> Yaprakların Sıvı Azotta Öğütülmesi,<br><b>B,C)</b> Alkol ve Deterjanların Eklenmesi .....                                                                                                                                                                                                 | 29 |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil.3.17. <b>A)</b> Agaroz Jelin Dökülmesi,                                    |    |
| <b>B)</b> Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi,                                     |    |
| <b>C)</b> Agaroz Jelin Koşturulması,                                             |    |
| <b>D)</b> Agaroz Jelin UVP Jel Dökümantasyon                                     |    |
| Cihazında Görüntülenmesi .....                                                   | 31 |
| Şekil 4.1. Civa Denemesi Sonucunda Gelişen Sağlam Bitkicik Oranı.....            | 34 |
| Şekil.4.2. Civa Denemesi Sonucunda Elde Edilen Bitkicikler.....                  | 35 |
| Şekil 4.3. Kin - BA İçeren Ortamlardaki Kardeşlendirme Oranları.....             | 37 |
| Şekil.4.4. Sürgün Sayısı Üzerine Farklı BA Konsantrasyonlarının Etkisi.....      | 38 |
| Şekil.4.5. Sürgün Sayısı Üzerine Farklı Kinetin Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 38 |
| Şekil.4.6. Bitki Gelişimi Üzerine Kin ve BA Konsantrasyonlarının Etkisi .....    | 38 |
| Şekil.4.7. BA-NAA'nın 12 Farklı Konsantrasyonlarındaki Kardeşlenme               |    |
| Oranı.....                                                                       | 41 |
| Şekil.4.8. BA-NAA'nın 12 Farklı Konsantrasyonlarındaki                           |    |
| Bitkiciklerin Görünümü.....                                                      | 42 |
| Şekil.4.9. Farklı BA Konsantrasyonlarının Bitki Büyüme ve Gelişimi               |    |
| Üzerine Etkileri.....                                                            | 44 |
| Şekil.4.10. 4 mg/l BA'nın NAA ile Kombinasyonlarının Bitki Gelişimi              |    |
| Üzerine Etkileri.....                                                            | 45 |
| Şekil.4.11. Farklı BA-NAA Konsantrasyonlarının Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi     |    |
| <b>(A)</b> 8 mg/l <b>(B)</b> 8mg/l BA - 2 mg/l NAA, 8 mg/l BA - 4 mg/l NAA ..... | 45 |
| Şekil.4.12. Yüksek Sitokinin Konsantrasyonlarının Kardeşlenme Grafiği.....       | 46 |
| Şekil.4.13 Farklılık Gözlenen RAPD Primerleri                                    |    |
| (OPA-10, OPA-11, OPA-14, OPAJ-20).....                                           | 51 |
| Şekil.4.14. IAA Konsantrasyonlarındaki Köklenme Yüzdeleri Grafiği.....           | 52 |
| Şekil.4.15. IAA Konsantrasyonlarındaki Köklenmiş Bitkicikler.....                | 53 |
| Şekil.4.16. Toprak Koşullarına Alıştırılmış Bitkiler.....                        | 53 |

**1. GİRİŞ**

Süs Bitkileri üretimi, Dünya’da ve Türkiye’de ekonomiye katkı sağlayan önemli bir sektör olarak kabul edilmektedir. Hollanda ve Amerika gibi gelişmiş ülkelerin yanında gelişmekte olan bazı Afrika, Asya ve Güney Amerika ülkeleri de uygun ekoloji ve ucuz iş gücü olanaklarını kullanarak süs bitkileri üretimi ile ihracat geliri elde etmektedirler. Günümüzde çiçek, artık sadece süs değil, para kazandıran, gelir getiren bir tarım faaliyetidir. Dünyada da pek çok ülke bunun farkına varmış ve süs bitkilerinden para kazanır duruma gelmiştir. Afrika ülkeleri açlıktan, Güney Amerika ülkesi olan Kolombiya da uyuşturucu ticaretinden çiçek yetiştirip satarak kurtulmaya çalışmaktadır. Kolombiya’nın yıllık çiçek satışından geliri 500 milyon doları aşmıştır. İsrail çölde çiçek yetiştirip satarak 200 milyon dolar gelir sağlamaktadır. Hollanda tüm Avrupa ülkelerine çiçek satmaktadır.

Dünya’da yaklaşık 145 ülkede ticari anlamda süs bitkileri üretimi yapılmakta, bu ülkelerin toplam üretim alanı ise 223.105 hektar olarak tahmin edilmektedir (**Gürsan ve Erkal, 1998; Yazgan ve ark., 2005**). Üretilen 212,5 milyon bitkiden yaklaşık %78’ ini süs bitkileri oluşturmaktadır. Hollanda, spatifilum, krizantem, begonya, benjamin, lale, sıklamen, filodendron, afrika menekşesi ve orman gülü gibi saksı bitkilerinin ihracatında egemendir (**Rout ve ark, 2006**).

Dünya süs bitkileri üretiminde; Hollanda (% 33), Japonya (% 24), İtalya (% 11), Amerika (% 12), Tayland (% 10) ve diğerleri % 14’lük bir paya sahiptir. İhracaatdaki payları ise Hollanda; % 59, Kolombiya; % 10, İtalya; % 16, İsrail; % 4 , İspanya; % 2 , Kenya; % 1 ve diğerleri; % 18 ’dir.

**Çizelge 1.1. Ülkeler Bazında Dünya Süs Bitkisi Üretimi**

| ÜLKELER   | ÜRETİM(%) |
|-----------|-----------|
| Hollanda  | 33        |
| Japonya   | 24        |
| Amerika   | 12        |
| İtalya    | 11        |
| Tayland   | 10        |
| Diğerleri | 14        |

İhracaatta en iyi olan dört ülke (Hollanda, Kolombiya, İtalya, İsrail) dünya pazarının % 80' ini elinde bulundurmakta, % 20' sinden daha azını da geliştirmekte olan Afrika, Asya, Latin Amerika gibi ülkeler paylaşmaktadır (**Rout ve ark, 2006**).

**Çizelge 1.2. Ülkeler Bazında İhracat Payları**

| ÜLKELER   | İHRACAT PAYLARI (%) |
|-----------|---------------------|
| Hollanda  | 59                  |
| İtalya    | 16                  |
| Kolombiya | 10                  |
| İsrail    | 4                   |
| İspanya   | 2                   |
| Kenya     | 1                   |
| Diğerleri | 18                  |

Türkiye’de de süs bitkisi üretimi ve ticareti hızla gelişmektedir. Üretimin büyük bölümü; Ege (İzmir), Marmara (Yalova, İstanbul, Kocaeli, Bursa, Adapazarı-Sapanca) ve Akdeniz (Antalya, Adana, Mersin) bölgelerinde gerçekleşmektedir **(Bitkisel üretim özel ihtisas komisyonu süs bitkileri alt komisyon raporu, 2001) (Şekil 1.1).**

Türkiye kesme çiçek üretim alanlarının 1988 yılında % 46.5’ i Marmara bölgesinde iken, 1993 yılına kadar olan 5 yıllık dönemde bu oran % 35.9’ a gerilemiş, 1993-1999 döneminde ise tekrar artış göstererek % 56.9’ a yükselmiştir. Bu artış gladiol, statis, gibi türlerin açık alanlarda tarla çiçeği olarak yetiştiriciliğindeki artıştan kaynaklanmıştır. Akdeniz Bölgesinde ise üretim alanlarında 1988-1993 yılları arasında önemli artışlar olmuş, bu dönemde üretim alanları oranı % 14’ ten % 25.5’ e yükselmiştir. 1993-1999 döneminde ise artış hızı yavaşlamış ve Akdeniz bölgesinin toplam üretim alanları içindeki payı % 20.5’ e düşmüştür. Burada en önemli faktör, Antalya’da açık alanda kesme çiçek yetiştiriciliğinin yapılmamasından kaynaklanmaktadır. Ege Bölgesindeki kesme çiçek üretim alanları artış hızının dengeli ve yavaş olduğu görülmektedir. Burada da üretimin büyük bölümü açıkta yapılmakta olup, 1999 yılında % 21.5’lik pay ile ikinci büyük kesme çiçek üretim alanı konumuna gelmiştir **(Bitkisel üretim özel ihtisas komisyonu süs bitkileri alt komisyon raporu, 2001)**



**Şekil 1.1.** Türkiye’deki Süs Bitkileri Üretim Bölgeleri

İç ve dış mekan’da kullanılan süs bitkileri, genel olarak generatif üretim (tohum, eşeyli üretim) ve vejetatif üretim (çelik, eşeysiz üretim) olmak üzere iki yöntemle üretilmektedir. Generatif üretimde; hem tohumla (begonya, petunya, ateş, ipek, ladin, göknar, erguvan, akçaağaç) hem de sporlarla üretim (aşk merdiveni, adiantum gibi eğrelti olarak bilinen çiçeksiz bitkiler) yapılırken, vejetatif üretimde; çelik (difenbahya, kroton, gül, leylak, mor salkım, ladin, göknar), stolon uçları (aşk merdiveni, kurdela çiçeği), daldırma (zakkum, altınçanak, kauçuk, difenbahya, kardeş kanı, leylak), ayırma (zambak, singonyum, beyaz yelken, flamingo gagası), aşı (gül, kamelya, kaktüs), toprak altı organları (sıklamen, lale, sümbül gibi soğanlı ve yumru bitkiler) ve son yıllarda önemi gittikçe artan doku kültürü (hemen hemen çoğu bitkilerde uygulanabilir) yöntemleri kullanılmaktadır.

Tüm Dünya’da yaklaşık 156 süs bitkisi, doku kültürü yöntemi ile farklı ticari laboratuvarlarda üretilmektedir. Doku kültürü, ucuz iş gücü ve düşük maliyet sağlamasına rağmen geleneksel çoğaltım metodlarından çok daha pahalıdır. Dünya’da 20.yy’da klasik ıslah yöntemleriyle elde edilen yeni çeşitler, bitkisel üretimi önemli bir düzeyde arttırmasına rağmen, 21.yy’ da artan nüfusun ihtiyaç duyacağı bitkisel ürünü karşılamada yetersiz kalacağı düşünülmekte ve bu gibi durumlarda biyoteknolojik yöntemlere başvurulmaktadır. Klonal çoğaltma amaçlı *in vitro* kültür tekniklerini ilk uygulayan araştırmacı Georges Morel olmuştur (Hu ve

Wang, 1983). Morel, 1985 yılında orkidelerde sürgün uçlarını kullanarak hızlı bir şekilde mikroçoğaltımı sağlamıştır. Morel' in bu başarısından sonra, ekonomik önemi olan bitkilerin *in vitro* kültür yoluyla çoğaltılması bu bitkilerin bilinen aseksüel yollarla çoğaltılmasına alternatif olarak görülmeye başlanmıştır. Bugün bir çok sera bitkisinde *in vitro* çoğaltma yaygın olarak kullanılmaktadır (**Hatipoğlu, 1999**).

**Çizelge.1.3.** Avrupa Laboratuvarlarındaki Süs Bitkisi Üretimleri (Laimer ve Rücker, 2003)

| Bitki Türleri                  | 1988 | 1990 | 1993 | 1996-97 |
|--------------------------------|------|------|------|---------|
| Alstroemeria                   | 5    | 4    | 6    | 6       |
| Anthurium                      | 6    | 13   | 16   | 13      |
| Aster                          |      | 4    | 2    | 5       |
| Begonia                        | 11   | 16   | 11   | 8       |
| Camellia                       |      | 3    | 4    | 3       |
| Campanula                      | 3    | 5    | 2    | 2       |
| Chrysanthemum ve Dendrenthemum | 6    | 8    | 12   | 12      |
| Cryptocoryne                   | 2    | 2    | 3    | 6       |
| Dianthus                       | 6    | 9    | 8    | 8       |
| Dicentra                       |      | 1    | 2    | 3       |
| Echinodorus                    |      | 2    | 2    | 5       |
| Euphorbia                      | 2    | 2    | 1    | 5       |
| Gardenia                       | 4    | 9    | 10   | 4       |
| Gentiana                       | 3    | 3    | 4    | 3       |
| Geranium                       |      | 1    | 1    | 11      |
| Gerbera                        | 20   | 28   | 21   | 21      |
| Gypsophila                     | 3    | 7    | 7    | 6       |
| Hemerocallis                   | 1    |      | 3    | 3       |
| Hosta                          | 3    | 6    | 2    | 12      |
| Hydrange ve Horstensia         | 7    | 9    | 15   | 10      |
| Impatines                      | 1    | 2    | 2    | 6       |
| Kalnachoe                      | 3    | 4    | 3    | 2       |
| Lilium                         | 7    | 9    | 9    | 5       |
| Limonium ve Statice            | 3    | 1    | 5    | 5       |
| Lobelia                        |      |      | 6    | 9       |
| Pelargonium                    | 7    | 10   | 14   | 8       |
| Petunia                        |      |      | 1    | 7       |
| Primula                        | 4    | 6    | 8    | 3       |
| Sainthpaulia                   | 14   | 23   | 10   | 9       |
| Scaevola                       |      |      | 7    | 7       |
| Sinningia ve Gloxinia          | 6    | 3    | 8    | 6       |
| Spathiphyllum*                 | 18   | 37   | 43   | 30      |
| Streptocarpus                  | 3    | 3    | 6    | 2       |



**Çizelge.1.4.** 1998-2000 Almanya’ da Yaygın Olarak Mikroçoğaltımı Yapılan Süs Bitkileri (Laimer ve Rücker, 2003)

| Bitki Türleri     | 1998  | 1999  | 2000 |
|-------------------|-------|-------|------|
| Phalaenopsis      | 3,453 | 6,682 | 9,15 |
| Fragaria          | 4,562 | 3,14  | 3,6  |
| Rhododendron      | 2,102 | 2,153 | 2,1  |
| Anthurium         | 1,985 | 1,91  | 965  |
| Rosa              | 520   | 516   | 524  |
| Syringa           | 375   | 399   | 445  |
| Rubus             | 514   | 389   | 412  |
| Streptocarpus     | 300   | 350   | 350  |
| Sinningia         | 443   | 420   | 341  |
| Solanum tuberosum | 280   | 380   | 330  |
| Miltonia          | 559   | 478   | 308  |
| Bambus            | 310   | 310   | 300  |
| Prunus            | 216   | 233   | 298  |
| Spathiphyllum*    | 2,001 | 860   | 251  |
| Petunia           |       |       | 194  |
| Kalmia            |       |       | 150  |
| Gentiana          | 210   | 238   | 139  |
| Lobelia           | 139   | 126   | 123  |

Ülkemizin *Spathiphyllum* talebi çoğunlukla doku kültüründen çıkmış bitkicikler olarak yurt dışından, özellikle de Hollanda’dan temin edilmektedir. Bu da süs bitkilerinde büyük oranda dışarıya bağımlı olduğumuzu göstermektedir. Bu tez kapsamında, 3 farklı *Spathiphyllum* çeşitinde (*Spathiphyllum* ‘Sweet Dario’, *Spathiphyllum*. ‘Sweet Chico’ ve *Spathiphyllum* ‘Sweet Cupido’) mikroçoğaltım olanaklarının araştırılması amaçlanmış olup, yüksek sitokinin konsantrasyonlarıyla kurulan denemelerde meydana gelen genetik farklılıklar moleküler düzeyde incelenmiştir.

**2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR****2.1. *Spathiphyllum* ' da Doku Kültürü Çalışmaları**

**Fonnesbeck ve Fonnesbeck (1979)**' nın yaptıkları çalışmada yaprak, çiçek, sap ve tomurcuk kısımları eksplant olarak kullanılmıştır. Yaprak ve yaprak sapı kullanıldığında sürgün sağlanamamış ancak çiçek parçalarından sürgün oluşumu gözlenmiştir. Tomurcuklar ve özellikle gövde parçaları, explant olarak çok uygun bulunmuştur. Çoğaltma aşamasında 2 mg/l PBA ile desteklenmiş bazal besi ortamından 8 hafta sonunda 9.1 sürgün/eksplant oranında sürgün gelişimi sağlamışlardır.

*Spathiphyllum*'un kök ve gövde eksplantları, 2 mg/l BA (benzylaminopurin) ve 1 mg/l Kinetin içeren MS ortamında kültüre alındığında sürgün oluşumu teşvik edilmiştir. MS ortamına 1 mg/l BA ve 0,1 mg/l IAA eklendiğinde ise sürgün oluşumunun aynı şekilde teşvik edildiği belirlenmiştir. Köklenme ortamına alınan sürgünlerden 15 gün sonra köklü bitki elde edilmiştir (**Chang - Jinshu 1989**).

**Werbrouck (1995)**'ın yaptıkları çalışmada *Spathlpyllum floribundum* 'petite schott'un ortamına imidazole fungusit eklenmesi ile BA'nın indüksiyonu arttığını gözlemlemişlerdir. İmizail konsantrasyonunun artmasıyla, sürgün sayısı artmış ve meristemler küçülmüştür. 16 mg/l imizalil ile 2,5 mg/l BA birleştirildiği zaman explant başına 127 sürgün elde etmişlerdir. İmizalil köklenmeyi engelleyici etki yapmamış olup İmizalil, BA'sız ortama eklendiğinde bitki başına düşen kök sayısı ve toplam kök uzunluğu azalmış ancak yeni sürgünlerin gelişmediğini kaydetmişlerdir.

**Werbrouck ve ark.(1996)** imizalil, prochloraz ve triflumizole gibi imidazole fungusitleri ve büyümeyi engelleyici paclobutrazolun, *Spathiphyllum* gibi Aracea familyası bitkilerinde, dışardan uygulanan sitokinin etkisini göstererek sürgün oluşumunu teşvik ettiğini belirlemişlerdir. Bunların işleyiş mekanizmasının kısmen giberellik asit (GA) biyosentezinin engellenmesine dayandığını, sadece GA sentezi değil aynı zamanda içsel sitokinin mekanizmasını da değiştirdiğini belirtmişlerdir.

Syngonium ve *Spathiphyllum*'un sürgün çoğaltılması ve eksplant gelişimi; katı agar ortamı ve sıvı ortam (interfacial membrane rafts=IMR sistemi kullanılarak) kullanılarak karşılaştırılmıştır. 25 günlük kültürlerden sonra IMR üzerindeki kültürden sürgün çoğalma oranı maksimuma ulaşırken 40. günün sonunda taze ağırlık toplamında artış sağlanmıştır. IMR, üzerinde yetiştirilen Syngonium ve *Spathiphyllum* sürgünlerinin miktar ve sayılarını değiştirmemiş ancak birçok bitkide daha fazla kök oluşumu gözlenmiştir (**Watad ve ark. 1997**).

**Ramez ve ark. (2001)**, *Spathiphyllum floribundum* L.'nin aksiller sürgünlerinin, 3 farklı BA konsantrasyonunun (1, 2 ve 5 mg/ l), 0,05 mg/l NAA ve 1,0 mg/l IAA ile kombinasyonu veya 3 farklı 2,4-D kombinasyonunu (0,005, 0,05 ve 0,1 mg/l) içeren MS ortamlarında, taze ağırlık oranları ve sürgün sayılarını belirlemişlerdir. En iyi sürgün sayısı, 0,05 mg/l NAA içeren BA kombinasyonlarından sağlanmıştır. 2 mg/l BA ve 0.05 mg/l NAA içeren ortamda kültüre alınmış sürgünlerden; sürgün sayısı oranı (5,8), taze ağırlık oranı (116 mg/ explant), yaprak sayısı/bitki (14,7), yan sürgün sayısı/ bitki (5,3), bitki çapı (14,2 cm) ve yüksekliği (13,0 cm) saptanmıştır. Daha sonra bitkiciklerin sera koşullarına alıştırılması sağlanmıştır.

*Spathiphyllum*'un *in vitro* sürgünleri (3-4 cm) GA<sub>3</sub>' ün (0-10 mg/l) farklı konsantrasyonlarını içeren MS ortamında 12 hafta boyunca kültürü alınmıştır. Kültür ortamındaki çiçeklenmenin GA<sub>3</sub> konsantrasyonlarıyla ilgili olduğu görülmüştür. 10 mg/l GA<sub>3</sub> içeren katı kültürde, ilk çiçek 56 gün sonra görülmüş ve en yüksek çiçeklenme oranı % 83 olarak saptanmıştır. Karbon kaynağı olarak sakkarozun öneminin saptanması için farklı sakkaroz konsantrasyonları (% 0-12), kullanılmıştır. Katı kültürde, sakkarozun *in vitro* çiçeklenme için vazgeçilmez olduğu ve % 6' oranının çiçek oluşumu için yeterli olduğu belirlenmiştir (**Dewir ve ark. 2004**).

Çalışmada, iç mekan süs bitkilerinden *Spathiphyllum* Sweet Pablo çeşidinin *in vitro* koşullarda çoğaltılması amaçlanmıştır. Denemede kullanılan bitkisel materyale ait bitkiler laboratuvara getirilerek yüzey sterilizasyonları yapılmış ve sürgün uçları çıkarılarak Murashige ve Skoog (1962) bazal besi ortamı, büyümeyi düzenleyicilerden ise 0,0-1,0-2,0 mg/l BA, 1,0-2,0 mg/l PBA içeren ortamlarda

kültüre alınmışlardır. Bitkiciklerin altkültür kardeşlendirme ortamına aktarılmaları 4 altkültür boyunca devam etmiş ve bu altkültürler boyunca bitkiciklerin kardeş sayısı, taze ağırlık, sürgün uzunlukları incelenmiştir. Çoğalma katsayısı ve sürgün taze ağırlığı bakımından en iyi sonuç, BA (1 mg/l) ortamından sağlanmıştır (5.18 sürgün/bitki; 1.14 g/sürgün). Sürgün uzunluğu bakımından ise kontrol ortamında en iyi sonuç elde edilmiştir (4,74 cm). Köklendirme ortamında, MS (1962) basal ortamına ek olarak 0,0-0,1-1,0 mg/l IBA kullanılmıştır. En iyi köklenme büyüme düzenleyici içermeyen kontrol ortamından elde edilmiştir (**Aka-Kacar ve ark. 2005**).

Farklı hormon konsantrasyonları ile desteklenmiş MS ortamında *Spathlpyllum cannifolium*'un sürgün ucu kültürü kullanılarak mikroçoğaltımı araştırılmıştır. Ortama BA (4,44-13,32 µM) eklenmesi, sürgün gelişimini önemli oranda arttırmıştır. Oksinler (IBA ve NAA) sitokininler ile birlikte kullanıldığında her bir explanttaki sürgün sayısı yalnız BA ile muamele edilmiş ortama göre artmıştır. En fazla sürgün oranı her bir eksplant başına 9.3 olarak 4.9 µM IBA ve 13.32 µM BA içeren ortamdan elde edilmiştir. Bitkiler %100 köklendirilmiş ve başarı ile dış ortama alıştırılmışlardır (**Dewir ve ark. 2006**).

## 2.2. *Spathiphyllum*' da Yapılan Diğer Çalışmalar

**Sutter ve ark. (1985)**, yapmış oldukları çalışmada, sera koşullarında ve *in vitro* koşullardaki Maranta, Dieffenbachia, Chrysanthemum, *Spathiphyllum* ve Gerbera bitkilerine ait üst kutikula tabakasının morfolojik ve fiziksel özelliklerini, elektron mikroskobu ve gravimetrik analizler kullanarak tespit etmişlerdir. Morfolojik özellik olarak sera koşullarında Dieffenbachia, Chrysanthemum ve Gerbera'da farklılık görülmesine rağmen *in vitro*'daki bitkilerde gözle görülür bir farklılık gözlenmemiştir.

**Huylenbreck ve ark. (1995)**, yapmış oldukları çalışmada mikroçoğaltım sırasında iki farklı sukroz konsantrasyonunda (% 3 ve % 6) kültüre alınmış *Spathiphyllum* cv. 'Petite' bitkisinin karbon ve fotosentez metabolizmalarını takip etmişlerdir. Alıştırmanın ilk dönemlerinde net fotosentez ve adenozin difosfoglikoz (ADPG) fosforilazın her iki denemede de azaldığını gözlemişler ancak iki haftanın sonunda her iki şeker konsantrasyonunda da farklılık görememişlerdir.

**Brunner ve ark. (1995)**, *in vitro*'da geliştirilen 3 süs bitkisi türünden 18 bakteri ırkını izole etmiş ve karakterizasyonlarını yapmışlardır. Eksplantlardaki en yüksek kontaminasyon oranlarını, % 80 (Dieffenbachia), % 65 (Anthurium), % 30 (*Spathiphyllum*) ve izole edilen organizmaları da % 73 Gram (-) ve % 27 Gram (+) olarak tespit etmişlerdir. İzole edilen bakterileri çeşitli antibiyotiklerle muamele etmişler ve sadece trimethoprim-ulfametoxazol' un etkili olduğunu bildirmişlerdir.

**Klock ve ark. (1998)**, *Spathiphyllum schott* 'Petite' bitkilerinin iki fosfor seviyesinde (düşük ve yüksek), mikorizalı ve mikorizasız ortamda gelişimlerine bakmışlardır. Bitki gelişimine her iki seviyenin de etkili olmadığını kaydetmişlerdir.

**Mak ve ark. (2001)**, *Spathiphyllum schott* 'Sensation' bitkilerinin gelişimi üzerine nitrojen uygulamalarının etkisini ve stomatal iletim ve klorofil içeriklerini çalışmışlardır. Maksimum sürgün kuru ağırlığını 8 mM N'da SP içeren ortamda üstten ve alttan sulamayla elde etmişlerdir. CD içeren üstten sulamalı ortamda ise 16 mM N'da, 4 ve 8 mM N' dan daha iyi sonuç elde etmelerine rağmen, stomatal iletim

ve transprasyon, 4 mM N'da azalmış ve yüksek N seviyelerinde de kademeli olarak azalmanın devam ettiği kaydedilmiştir.

**Chen ve Yuncong (2005)**, Florida, Michigan ve North Carolina'dan elde ettikleri 3 farklı 'coal fly ash' in alternatif bir besleyici olarak *Spathiphyllum schott* 'Ty's Pride' bitkisinde gelişime etkisini incelemişlerdir. Aylık olarak materyallerin elektrik iletkenliği ve pH ölçümlerini yapmışlar ve bitki boyu, ağırlığı, taze ve kuru madde miktarlarını gözlemişlerdir. Uygun pH değerini, 3.8 ve 6.6 arasında saptamışlardır. Materyallerin bitki gelişimine etkisini de düşük bulmuşlardır.

**Chen ve ark. (2005)**, 15 *Spathiphyllum* kültürünün soğuklamaya karşı tepkisini, 2, 5 ve 10 gün süresince 3.3, 7.2, 10 ve 11.1 °C soğuklama sıcaklıklarında incelemeye almışlardır. 3.3 ve 7.2 °C'de soğuklama zararları görülmüştür. Genç yaprakların yaşlı yapraklara göre daha dirençli olduğu, 10 ve 11.1 °C'de gözle görülür doku zararları görülmediği kaydedilmiştir.

**Nhut ve ark. (2005)**, *Spathiphyllum* bitkisinde, yapay ışık kaynaklarının mikroçoğaltıma etkisini incelemişlerdir. Floresan lamba altında 45  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'de 60 gün boyunca kırmızıdan maviye kadar farklı seviyelerde gözlem yaparak bitki gelişimini kontrol etmişlerdir. En yüksek toplam sürgün ve kök taze ağırlığını, % 80 kırmızı + % 20 mavi ışık altında elde etmişlerdir. Taze sürgün ve kök ağırlığını 45 ve 75  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'dan daha iyi olarak, 60  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ve 75  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  koşullarında elde etmişlerdir.

**Orlikowska ve ark. (2005)**, dört saksılı süs bitkisinde ve iki kesme çiçekte adventif yapılardan regenerasyonu ve tesadüfi mutasyonların izolasyonunu çalışmışlardır.

**Wang ve ark. (2006)**, *Spathiphyllum* 'Sensation' bitkiciklerinin yer aldığı kültür kaplarını, kapalı ve gaz geçirgen bir sistem olarak polypropilen film ile hava difüzyonu için kapatmışlardır. Bitkilerin köklenmesine hava difüzyonunun etkili olduğunu ve köklenmenin 3-5 gün erken başladığını saptamışlardır. Kültür kaplarındaki karbondioksit konsantrasyonu fotoperiyot boyunca yaklaşık 80

mol.mul<sup>-1</sup> olarak sınırlandırılmıştır. Ventilasyon ile yaprakların klorofil içerikleri ve fotosentez oranları da daha yüksek bulunmuştur.

**Duquenne ve ark. (2007)** *Spathiphyllum wallisii* ‘Alain’ ve *Anthurium scherzerianum* ‘238’ in somatik embriyo ve yapraklarından protoplastların izolasyonu üzerinde çalışmışlardır. *Spathiphyllum wallisii* ve *Anthurium scherzerianum*’ in embriyo ve yapraklarından sırasıyla yaklaşık  $1 \times 10^6$  g<sup>-1</sup> ve  $1 \times 10^5$  g<sup>-1</sup> oranlarında protoplast izole etmişlerdir.

**3. MATERYAL VE METOD**

Çalışma 2007–2008 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü ve Biyoteknoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

**3.1. Materyal****3.1.1. Kullanılan Bitki Materyalleri**

Araştırmada, eksplant kaynağı olarak *Spathiphyllum*un 3 çeşiti olan *Spathiphyllum* ‘Sweet Dario’, *Spathiphyllum* ‘Sweet Chico’, *Spathiphyllum* ‘Sweet Cupido’ kullanılmıştır. Bitki materyalleri, sterilizasyon ve Kin- BA denemeleri için ekim 2008, BA – NAA denemeleri için Haziran 2008 döneminde Fidan Seracılık’ tan temin edilmiştir. Ekim ayında temin edilen bitkiler alınırken dario ve chicco çeşidi temin edilebildiğinden dolayı sterilizasyon ve Kin-BA denemeleri sadece bu iki çeşitte kurulmak zorunda kalınmıştır. Daha sonra Kurulan denemede 3 çeşit birlikte temin edilebilmiştir.

*Spathiphyllum*, Aracea familyasına ait bir iç mekan bitkisidir. Orijini, Kolombiya ve Venezuela’ dır. Doğada 36 türü bulunan *Spathiphyllum* cinsi oldukça kuvvetli büyüyen ve bakımı kolay olan bir salon bitkisidir. *Spathiphyllum*’un (Barış Zambağı) yaprakları yeşil, uzunca oval, uç kısma doğru sivri çiçekleri beyaz, spathe ve spadiksten oluşmuştur. Çiçek başağını saran spadiks beyaz renkte olduğu için Barış Zambağı veya yelkene benzerliğinden dolayı Beyaz Yelken adlarıyla anılmaktadır.





**Şekil.3.1.** *Spathiphyllum* Bitkisinin Genel Görünümü



**Şekil 3.2.** *Spathiphyllum* Bitkisinin Çiçeğinin Görünümü

**3.1.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Çeşitleri**

*Spathiphyllum* ‘Sweet Dario’, yaprakları koyu yeşil, uzunca oval, yaprak kenarları kıvrımsız uç kısma doğru sivri uzunca bir sap üzerinde kaşık biçimindedir.



**Şekil.3.3. *Spathiphyllum* ‘Sweet Dario’ Bitkilerinin Görünümü**

*Spathiphyllum* ‘Sweet Chico’, yaprakları koyu yeşil, uzunca oval, uç kısma doğru sivri uzunca bir sap üzerinde kaşık biçimindedir. Yaprak kenarları hafif kıvrımlı bir yapıya sahiptir.



**Şekil.3.4. *Spathiphyllum* ‘Sweet Chico’ Bitkilerinin Görünümü**

*Spathiphyllum* ‘Sweet Cupido’ yaprakları açık yeşil, uzunca oval, kıvrımsız uç kısma doğru sivri uzunca bir sap üzerinde kaşık biçimindedir.



**Şekil.3.5.** *Spathiphyllum* ‘Sweet Cupido’ Bitkilerinin Görünümü

**3.2. Metot****3.2.1. Eksplantların Sterilizasyonu**

*Spathiphyllum* bitkisinin sürgün uçları eksplant kaynağı olarak kullanılmış (Şekil 3.6.), her deneme için sürgünler teker teker ayrılarak sterilizasyon için hazırlanmıştır.



**Şekil. 3.6.** Eksplant Kaynağı Olarak Kullanılan Bitkiler

**3.2.1.1. Sterilizasyonda Hipo Klorür Denemeleri**

Çalışmanın ilk aşamasında sterilizasyon için öncelikle % 70 alkol (5 dk.), % 2 sodyum hipoklorit (15 dk.) konsantrasyonu denenmiştir. Fakat ortamlarda aşırı derecede fungus ve bakteri sorunuyla karşılaşmıştır. Bunun üzerine enfeksiyon sorununu aşmak için farklı sodyum hipoklorit denemeleri yapılmıştır. Sırasıyla; birinci denemede % 70 alkol (10 sn.), % 2 sodyum hypoklorit + 2 damla Twin-20 (15 dk.), ikinci denemede % 70 alkol (30 sn), % 5 sodyum hypoklorit + 2 damla Twin-20 (15 dk.), üçüncü denemede % 70 alkol (1 dk.), % 10 sodyum hypoklorit + Twin-20 (15dk.), dördüncü denemede % 70 alkol (2 dk.), % 35 sodyum hypoklorit + Twin (15 dk.), beşinci denemede % 70 alkol (2 dk.) % 50 sodyum hypoklorit +

Twin(15 dk.) olarak 5 deneme kurulmuştur. Bu denemelerin hepsinde enfeksiyon sorunuyla karşılaşıldığından dolayı HgCl<sub>2</sub> (civa klorür) denemelerine geçilmiştir (Şekil 3.7).



**Şekil 3.7.**Sodyum Hypoklorit’le Kurulan Denemelerde Bitkiciklerde Görülen Enfeksiyon Problemi

#### 3.2.1.2. Sterilizasyonda Civa Klorür Denemeleri

Civa Klorür denemelerinde % 0.03, 0.05, 0.08 ve 0.1 w/v olmak üzere 4 farklı civa konsantrasyonu denenmiştir. Bitkiler öncelikle çeşme suyu altında yıkanarak toprak kısımlarından arındırılmışlardır (Şekil 3.8).



A



B

**Şekil 3.8. A)** Çeşme Suyu Altında Bitkilerin Yıkanması ve Temizlenmesi, **B)** Toprak Kısımlarından Arındırılmış Bitkicikler

Daha sonra ayırma yöntemiyle her bir bitkinin kardeşleri ayrılmış, yaprak ve kök kısımları kesilerek sürgünler çıkarılmıştır (**Şekil 3.9**).



**Şekil 3.9.** Yaprak ve Kök Kısımlarının Ayrılması

Çok büyük olan sürgünlerin dış kısımları soyularak her bir sürgün yaklaşık 2-3 cm büyüklüğe getirilmiştir. Daha sonra kesilen sürgünler akan su altında yarım saat beklemeye bırakılmıştır. Kaba sterilizasyondan sonra bitkiciklerin çeker ocak altında civa muamelesi için civa konsantrasyonları hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon hassas terazide tartılmış ve saf su ilave edilerek tamamlanmıştır (**Şekil 3.10**).



**Şekil 3.10.** Civa Konsantrasyonlarının Hazırlanması

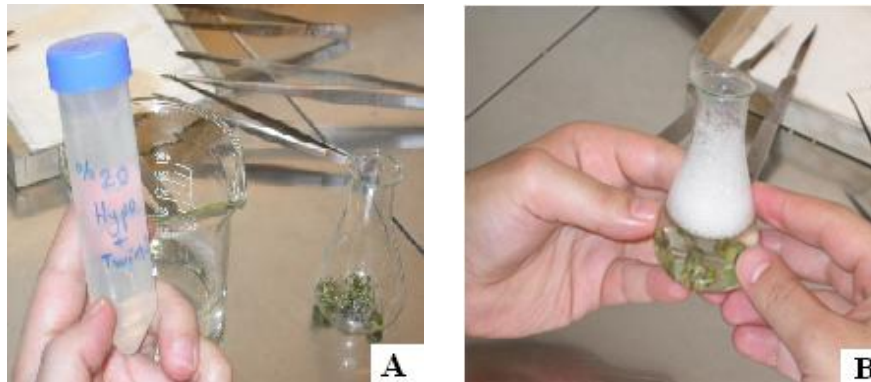


Sürgünler çeker ocak altında, hazırlanan konsantrasyonlar içerisinde 10 dakika bekletilmiş, 5-6 kez saf su ile durulanmış ve daha sonra steril kabin içerisinde steril beherlere transfer edilmiştir (**Şekil 3.11**).



**Şekil 3.11. A) Çeker Ocak Altında Civa Muamelesi, B) Steril Kabin Altında Yapılan Sterilizasyon**

Steril kabin içerisinde sürgünler, öncelikle % 70 Ethanol’ de 10 saniye bekletilmiş ve saf su ile durulandıktan sonra ilk önce % 20 Sodyum Hipoklorit + Twin-20 (2 damla)’ de 5 dakika, daha sonra % 10 Sodyum Hipoklorit + Twin 20 (2 damla)’ de 10 dakika çalkalanarak her uygulamadan sonra saf su ile tekrar durulanmıştır (**Şekil 3.12**).



**Şekil 3.12. A) Sodyum Hipoklorit Çözeltisi, B) Sürgünlerin Sodyum Hipokloritle Muamele Edilmesi**

Sterilizasyonu tamamlanan sürgünler, farklı hormon konsantrasyonlarını içeren besi ortamlarına steril pens yardımıyla transfer edilerek ağızları streç film ile kapatılmış ve büyütme odasında inkubasyona bırakılmıştır.

### **3.2.2. Besi Ortamları ve Hazırlanması**

Eksplantlar, sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra steril kabin içerisinde BA, Kinetin ve NAA' nın farklı konsantrasyonlarını içeren MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Çalışmada Çizelge 3.1' de kimyasal bileşimi verilen MS (**Murashige and Skoog, 1962**) temel besi ortamına ait olan makro ve mikro elementleri, vitaminleri ve FeNaEDTA içerikleri kullanılmıştır. Besi ortamında kullanılan makro elementler; x 20, mikro elementler ve FeNaEDTA; x 100'lük, stok çözeltiler, vitaminler, büyümeyi düzenleyiciler ve diğer maddeler mg/l stok çözeltiler olarak hazırlanmıştır.

Bütün denemelerde, sterilizasyon ve kardeşlenme için kullanılan besi ortamları kültürden önce 2,5 cm x 15 cm uzunluğundaki her bir tüpe 10 ml olacak şekilde eşit olarak dağıtılmıştır. Deneme, her yinelemede 5 bitki olmak üzere 4 yinelemeli tesadüf blokları deneme desenine göre kurulmuştur. Köklendirme ortamları için majenta kültür kapları kullanılmış ve bitkicikler her bir majentaya 9 tane eksplant gelecek şekilde kültüre alınmıştır. Ortamlar hazırlanırken, bir miktar saf su üzerine gerekli kimyasallar, hormonlar eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra, 1 N HCl ve 1 N KOH kullanılarak pH metre yardımıyla ortamların pH' sı 5.8'e ayarlanmış (**Şekil.3.13**) ve ortamın katılaşması için agar (Sigma-A 1296) eklenmiştir.





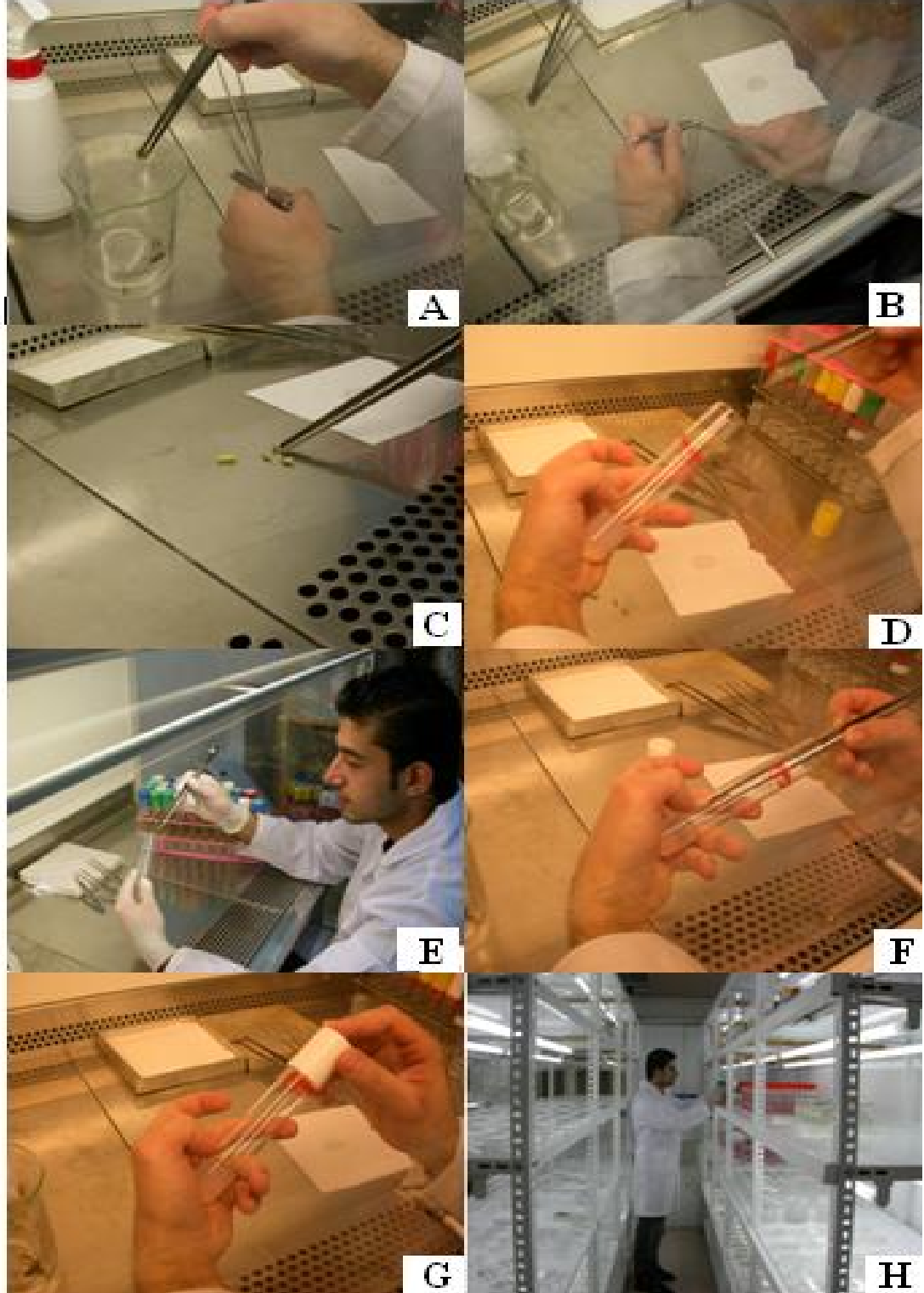
**Şekil.3.13.** pH metre

Ortamlar hazırlandıktan sonra sterilizasyon için otoklavda 121 °C’ de, 1,05 kg/cm<sup>3</sup> basınçta 15 dk. bekletilmiştir (Şekil.3.14).



**Şekil.3.14.** Sterilizasyon İşlemlerinde Kullanılan Otoklavın Görünümü

Bitkiciklerin gelişimleri, 25-26 °C ve 3000-4000 lüks ışık yoğunluğundaki büyütme odasında sağlanmıştır (Şekil 3.15.H).



**Şekil 3.15.** A) Sürgünlerin Pens Yardımıyla Alınması, B) Sürgünlerin Bisturi Yardımıyla Soyulması, C-D-E-F) Sürgünlerin Besi Ortamına Transferi, G) Tüplerin Kapaklarının Kapatılması ve Streçfilm ile Kapatılması H) Transfer Edilen Sürgünlerin Büyütme Odasında İnkübasyonu

**Çizelge 3.1.** MS Temel Besin Ortamında Bulunan Besin Maddeleri ve Konsantrasyonları (Murashige ve Skoog, 1962)

| <b>Makro Elementler</b>                             | <b>(MURASHIGE ve SKOOG, 1962) (mg/l)</b> |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| KNO <sub>3</sub>                                    | 1900                                     |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1650                                     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 370                                      |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | 332.2                                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 170                                      |
| <b>Mikro Elementler</b>                             | <b>(MURASHIGE ve SKOOG, 1962) (mg/l)</b> |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 16.9                                     |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 8.6                                      |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 6.20                                     |
| KI                                                  | 0.83                                     |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0.25                                     |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0.025                                    |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0.025                                    |
| FeNaEDTA                                            | 36.72                                    |
| <b>Vitaminler ve Amino asitler</b>                  | <b>(MURASHIGE ve SKOOG, 1962) (mg/l)</b> |
| Myo-inositol                                        | 100.0                                    |
| Pyridoxine-HCl                                      | 50                                       |
| Nicotinik Asit                                      | 50                                       |
| Thiamin – HCL                                       | 10                                       |
| Glycine                                             | 2.0                                      |
| <b>Diğer</b>                                        |                                          |
| Sakkaroz (g/l)                                      | 30                                       |
| Agar (g/l)                                          | 7                                        |
| pH                                                  | 5.7                                      |

**3.2.3. Bitkiciklerin Kardeşlenme Ortamlarına Aktarılması****3.2.3.1. BA ve Kin İçeren Ortamlara Bitkiciklerin Aktarılması**

Farklı civa klorür konsantrasyonlarında sterilize edilmiş eksplantlar, 1 ay süresince 1 mg/l BA içeren MS ortamında inkübe edilerek bitkilerdeki enfeksiyon yüzdesi ve yaşama oranları belirlenmiştir. Sağlıklı bitkicikler, Kin (0.0-1.0-2.0 mg/l ) ve BA (0.0-1.0-2.0 mg/l) içeren MS ortamlarına aktararak kardeşlenme oranları incelenmiştir. Kardeşlenen bitkicikler 2 ay sonra 1 altkültüre alınarak kardeş sayısı oranları belirlenmiştir.

**3.2.3.2. BA ve NAA Kombinasyonlarını İçeren Ortamlara Bitkiciklerin Aktarılması**

Bu denemede eksplantlar, BA (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) ve NAA (0.0, 0.5, 1.0 mg/l)'nın 12 farklı kombinasyonunu içeren MS ortamlarına aktararak kardeşlenme oranları incelenmiş ve istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

**3.2.3.3. Yüksek BA ve NAA Kombinasyonlarını İçeren Ortamlara Bitkiciklerin Aktarılması**

Bu denemede de eksplantlar, BA (0.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/l) and NAA (0.0, 2.0, 4.0 mg/l)'nın 12 farklı kombinasyonunu içeren MS ortamlarına aktararak kardeşlenme oranları incelenmiş ve istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

**3.2.4. Moleküler Çalışmalar****3.2.4.1. DNA İzolasyonu**

Kültüre alınmış *spathiphyllium* çeşitlerinden DNA izolasyonu gerçekleştirmek amacıyla 0.0, 4.0, 8.0 mg/l BA, seviyelerine ait bitkisel materyallerin yaprakları steril kabin şartları altında alınmış, alimünyum folyolara sarılıp, sıvı azota batırılarak(-196 °C), -85 °C de saklanmıştır. Alınan bitkisel materyal DNA izolasyonu yapmak amacıyla havanlar içerisinde sıvı azot ile birlikte öğütülmüştür. Öğütülen bitkisel materyaller 0.1 gr olacak şekilde 1.5 ml'lik tüplere yerleştirilmiştir ve DNA izolasyonu aşamalarına geçilmiştir. Bu çalışmada MiniPrep DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır. DNA izolasyonunda kullanılan tampon çözeltinin içeriği Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir. İzolasyon sırasında ekstraksiyon tampon çözeltiler dışında kloroform : izoamilalkol (24:1 oranında), Tris-EDTA (Tris 1 M PH:8, EDTA: 0.5 M PH:8), RNase A (10 mg/ml) solüsyonu, izopropanol ve etil alkol (%99) kullanılmıştır.

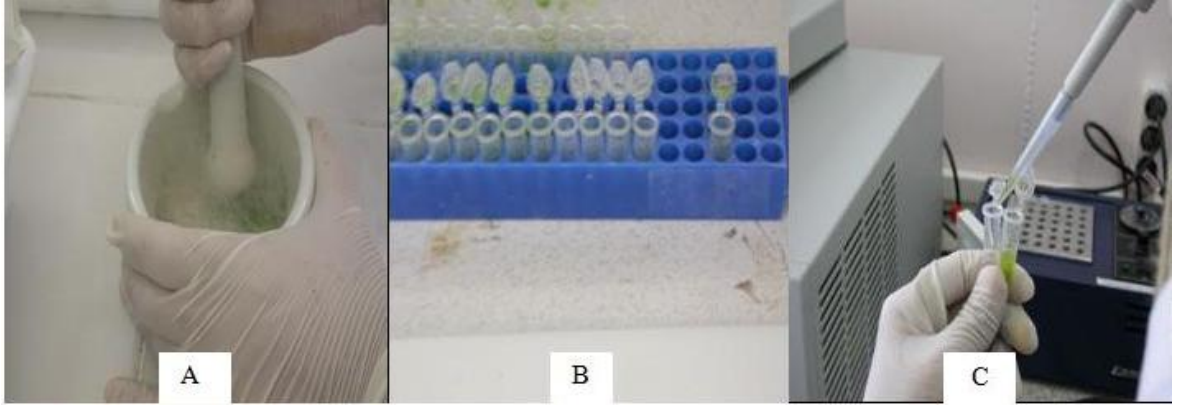
**Çizelge 3.2.** DNA İzolasyon Yönteminde Kullanılan Ekstraksiyon Tampon Çözeltisinin İçeriği

| <b>Solüsyon</b>       | <b>Konsantrasyon</b> |
|-----------------------|----------------------|
| CTAB                  | % 2,0                |
| NaCl (5 M)            | 1,4 M                |
| EDTA (0,5 M) pH 8,0   | 0,2 M                |
| TRIS-HCl (1 M) pH 8,0 | 0,1 M                |

**3.2.4.2. DNA İzolasyon Aşamaları**

1. Her tüpe hazırlanan ekstraksiyon solüsyonundan 396 µl ve 4 µl β-merkaptoetanol eklenmiştir.
2. Homojenizasyon sağlanana kadar pipet yardımıyla tüpler karıştırılmıştır.
3. Tüpler 65 °C’de 20 dakika bekletilir. Bu sırada tüpler iki defa karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.
4. Her tüpe 400 µl kloroform:izoamilalkol eklenmiştir, 15 dakika karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.
5. 5 dakika 13.000 devirde tüpler santrifüj edilmiştir. Bekleme sırasında her örnek için yeni temiz bir santrifüj tüpü hazırlayıp etiketlenmiştir ve her birinin içine 400 µl soğuk (-20 C) izopropanol eklenmiştir.
6. Santrifüj tamamlandığında tüplerin üst kısmındaki sıvı kısım steril pipet aracılığıyla 400 mikrolitre soğuk (-20) izopropanol içeren santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle –20 °C’de bekletilmiştir.
7. 5 dakika 13.000 devirde santrifüj edilmiştir.
8. Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Pelletin kuruması için tüpler ters bırakılarak bekletilmiştir, bu işlem 10-15 dakika sürebilir.
9. Kuruyan Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür. Her tüpe 4 µl RNAase A eklenmiştir ve 15 dakika oda sıcaklığında tüpler bekletilmiştir.
10. Her tüpe 500 µl soğuk EtOH (%100) (buzluktan çıkmış) eklenmiştir ve tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle –20 °C’de bekletilmiştir.
11. 5 dakika 13.000 devirde santrifüj edilmiştir.
12. Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüştür ve pelletin kuruması için tüpler ters çevirilmiştir. (yaklaşık 10 dakika)
13. Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür.
14. Örnekler –20 °C’de saklanmıştır.

DNA izolasyonu aşamaları Şekil 3.16.’da gösterilmiştir.



**Şekil 3.16. A)** Yaprakların Sıvı Azotta Öğütülmesi, **B,C)** Alkol ve Deterjanların Eklenmesi

#### 3.2.4.2.1 DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile (NanoDrop ND 100) ölçümler yapılarak belirlenmiştir. Elde edilen spektrofotometre sonuçları değerlendirilip ilgili hesaplamalar yapılmıştır ve DNA konsantrasyonları önce 50 ng'a ve ardından 5 ng'a seyreltilmiştir.

#### 3.2.4.3. RAPD Analizleri

RAPD PCR koşulları Fiedler ve ark. (1998)' na göre yapılmıştır. *Spathiphyllum* çeşitlerinde toplam 18 RAPD (OPA02, OPA19, OPA04, OPA19, OPA10, OPA01, OPA11, OPAK9 OPA14, OPAC09, OPAJ20, OPAD18, OPAF09, OPN20, OPAI 11, OPAI 12, OPAJ 14, OPAJ9 Operon Technologies, Alameda, CA, USA) primeri kullanılmıştır. RAPD PCR koşulları, PCR protokolü **Çizelge 3.3 ve 3.4.'de** belirtilmiştir.

**Çizelge.3.3 RAPD PCR Protokolü**

| <b>Kullanılan Kimyasallar</b> | <b>Her örnek için kullanılan miktar (ul)</b> |
|-------------------------------|----------------------------------------------|
| ddH <sub>2</sub> O            | 1.00                                         |
| PCR Master Mix 2X             | 6.25                                         |
| MgCl <sub>2</sub>             | 0.50                                         |
| <i>Taq</i> DNA Polimeraz      | 0.05                                         |
| Primer (30 ng)                | 1.25                                         |
| DNA (5 ng)                    | 3.00                                         |
| Toplam Hacim                  | 12 ul                                        |

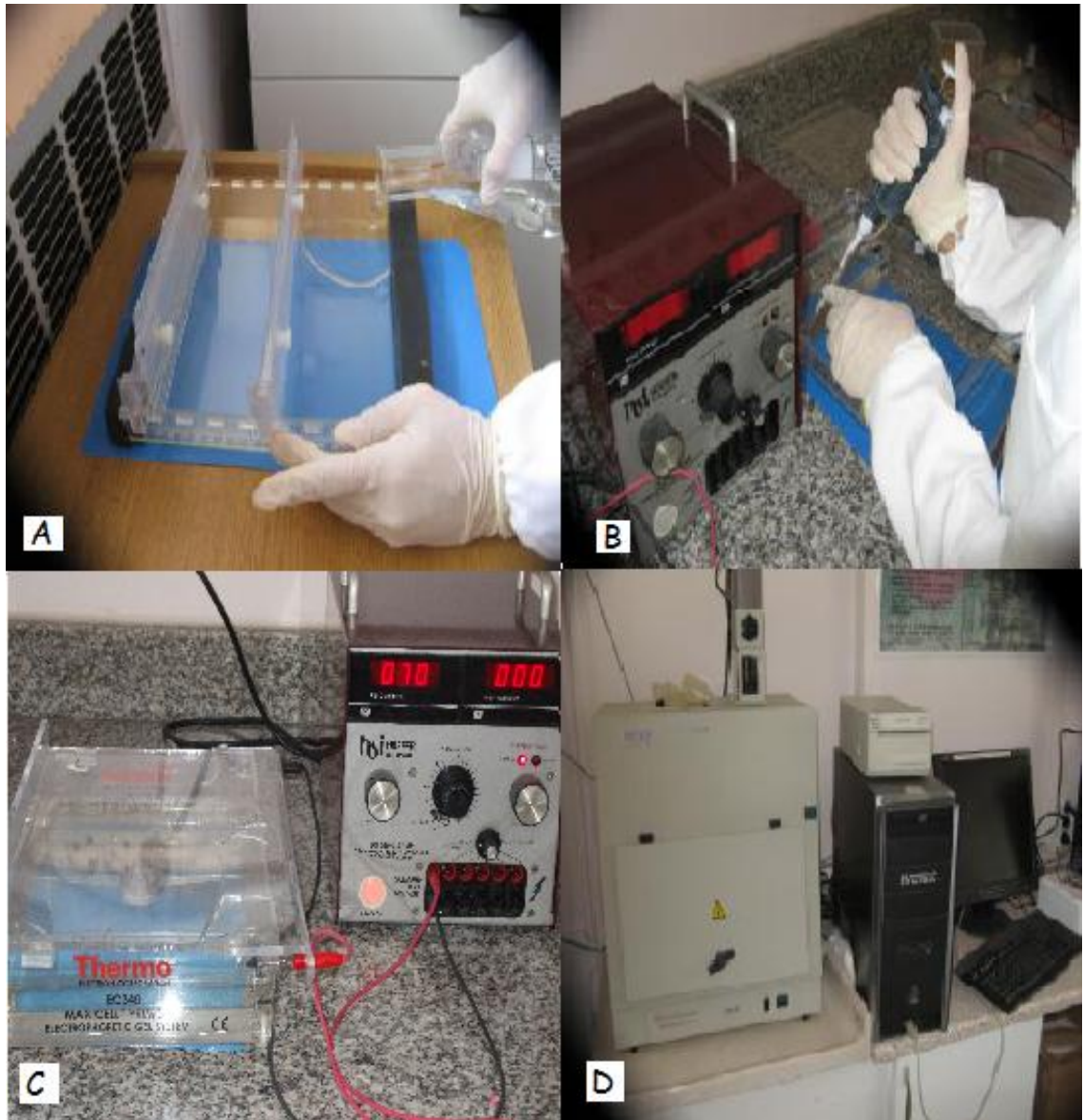
**Çizelge.3.4 PCR Koşulları**

|                            |          |
|----------------------------|----------|
| 94 oC 2 dk ön denatürasyon |          |
| 94 oC 2 dk denatürasyon    |          |
| 37 oC 1 dk annealing       | 45 döngü |
| 72 oC 2 dk polimerizasyon  |          |
| 72 oC 10 dk son yazılım    |          |
| 4 oC ∞                     |          |

**3.2.4.3.1. RAPD Agaroz Jel Elektroforezi**

Elde edilen PCR ürünlerinden 12 µl çekilerek üzerine 3 µl yükleme bufferı eklenmiş ve % 1.5'luk agaroz jel içerisinde 1XTAE (Trizma Base, Glacial Asetik Asid, EDTA (Na<sub>2</sub>.EDTA.H<sub>2</sub>O) buffer eklenerek 70 volt elektrik akımı altında 4 saat süreyle koşturulmuştur. Elektroforez işleminden sonra % 0.1'lik ethidium bromide ile jel boyaması yapılmıştır. RAPD analizlerinde agaroz gel elektroforez sonucunda her bir primer için bantların değerlendirilmesinde 1 kb DNA markır kullanılmıştır. Elde edilen bantların büyüklüğü 100, 250, 500, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 bp uzunluklarındaki bantlara bakılarak değerlendirilmiştir





**Şekil.3.17. A) Agaroz Jelin Dökülmesi, B) Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi, C) Agaroz Jelin Koşturulması, D) Agaroz Jelin UVP Jel Dökümantasyon Cihazında Görüntülenmesi**

**3.2.5. Kardeşlenen Bitkiciklerin Köklendirme Ortamlarına Aktarılması**

Kardeşlendirme ortamında kardeş sayıları belirlenen bitkicikler, köklendirme oranları belirlenmek üzere, kültür tüplerinden majentalara transfer edilmiştir. Köklendirmede hormon olarak, IAA' in 0.0, 0.5, 1.0 mg/l olmak üzere 3 farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. İstatistik analizleri yapılarak köklenen bitkicikler sera koşullarına alıştırılmıştır.

**3.2.6. Bitkiciklerin Dış Ortama Adaptasyonu**

Bitkiciklerin dış ortama adaptasyonu kademeli olarak yapılmıştır. Öncelikle büyütme odasında, majenta kapaklarındaki streç filmler çıkarılarak, kapaklar 2 gün süre ile gevşetildikten sonra, kapaklar tamamen açılarak bitkiler sera koşullarına çıkarılmaya hazır hale getirilmiştir. Daha sonra bitkiler büyütme odasından çıkarılarak pens yardımıyla majentalardan alınarak bitkilerin kökleri agarlı besi ortamından arındırılmıştır. Bitkilerin toprak koşullarına alıştırılması aşamasında ise, 2:1 torf:perlit oranı hazırlanarak saksılara dikilmiştir.

**4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA****4.1. Sterilizasyon Denemesi Sonuçları****4.1.1. Sterilizasyonda Hipo Klorür Denemesi Sonuçları**

Yapılan denemeler sonucunda görülmüştür ki; bitkide endojen kaynaklı fungus ve bakteri sorununu aşmak için etanol ve sodyum hipoklorit ile yapılan yüzey sterilizasyonu yeterli gelmemektedir. Sodyum hipokloritle yapılan bütün denemelerde bitki gelişiminde sorun olmamasına rağmen, %100 enfeksiyon sorunuyla karşılaşmıştır. Bunun üzerine bu sterilizasyona ek olarak HgCl<sub>2</sub> (civa klorür) kullanılmıştır. Sterilizasyon denemelerinde MS besi ortamına hormon olarak 1 mg/l BA ilave edilmiştir.

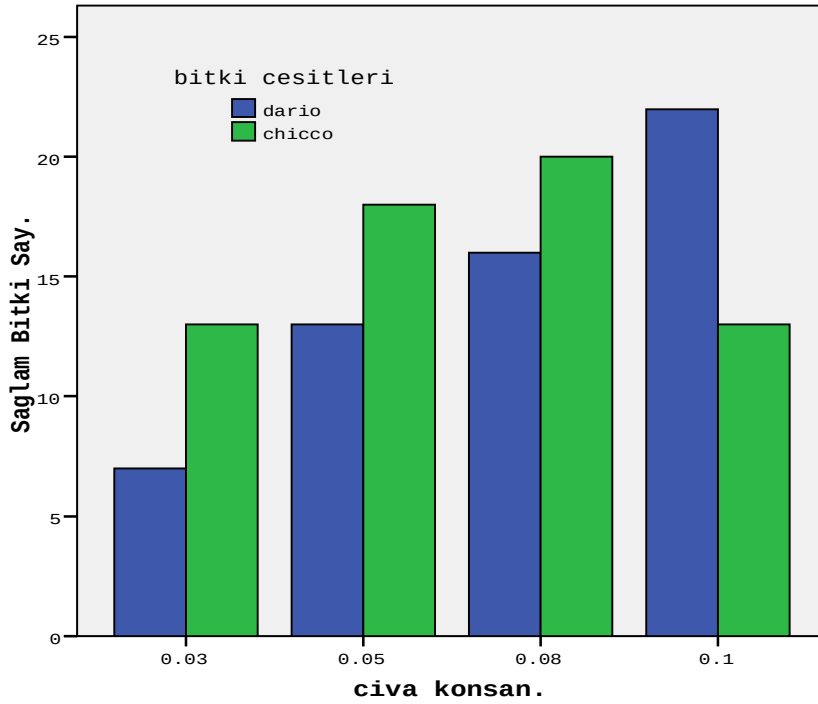
**4.1.2. Sterilizasyonda Civa Klorür Denemesi Sonuçları**

Civa, sodyum hipoklorit ve etanol ile birlikte kombine edilen sterilizasyon sonucunda sterilizasyon sorunu kısmen de olsa aşılmıştır. Civa ile yapılan deneme sonuçları Tablo 6.1’ de görülmektedir. Bu denemelerde yapılan istatistik analizi sonucunda ( $P < 0.05$  önem düzeyinde), 4 farklı civa konsantrasyonu ve çeşitler arasında fark görülmemiştir.

Civa deneme sonuçlarında birinci çeşitte (*Spathiphyllum ‘Sweet Dario’*) sağlam bitki oranı % 47.5, ikinci çeşitte (*Spathiphyllum ‘Sweet Chico’*) %52.5 olarak kaydedilmiştir. Birinci çeşitte en yüksek yaşama oranı %0.1 (w/v) HgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda %18 , ikinci çeşitte en yüksek yaşama oranı %0.08 (w/v) HgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda % 16.4 oranında sağlıklı bitki elde edilmesiyle sonuçlanmıştır. **Dahap (2006)**, *Hydrangea macrophylla Thunb* (ortanca) bitkisinde yapmış olduğu çalışmada civa klorürün 4 farklı (0.0, 0.1, 0.2, 0.4) konsantrasyonunu, chlorox ile kombine ederek kullandığında enfeksiyon sorununu 0.2, 0.4 civa + % 50-60 chlorox seviyelerinde % 100 başarıyla elimine etmiştir. *Spathiphyllum* bitkisinde de civa konsantrasyonları yükseltilerek ve başka dezenfektanlarla kombine edilerek, sterilizasyonda daha yüksek başarılı elde edilebilir.

Çizelge 4.1. Civa Klorür Denemesi Sonucunda Gelişen Sağlam Bitkicik Oranı

| Civa konsantrasyonları<br>(w/v) | <i>S. dario</i> |               | <i>S. chico</i> |               | Toplam |               |
|---------------------------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|--------|---------------|
|                                 | Mean            | Kardeşlenme % | Mean            | Kardeşlenme % | Mean   | Kardeşlenme % |
|                                 |                 |               |                 |               |        |               |
| 0.03                            | 7               | 5,70          | 13              | 10,70         | 10     | 16,40         |
| 0.05                            | 13              | 10,70         | 18              | 14,80         | 15,5   | 25,40         |
| 0.08                            | 16              | 13,10         | 20              | 16,40         | 18     | 29,50         |
| 0.1                             | 22              | 18,00         | 13              | 10,70         | 17,5   | 28,70         |
| <b>Toplam</b>                   | 14,5            | 47,50         | 16              | 52,50         | 15,25  | 100,00        |



Şekil 4.1. Civa Klorür Denemesi Sonucunda Gelişen Sağlam Bitkicik Oranı



**Şekil.4.2.**Civa Denemesi Sonucunda Elde Edilen Bitkicikler

#### **4.2. Farklı Hormon Konsantrasyonlarının Sürgün Ucu Kültürü Yöntemi ile Mikroçoğaltım Üzerine Etkileri**

*Spathiphyllum* bitkilerinde sürgün ucu kültürü yöntemi kullanılarak, Benziladenin (BA), Kinetin (Kin) ve Naftalenasetikasit (NAA)’in bitki gelişimi, kardeşlenme ve köklenme üzerine etkileri incelenmiştir.

##### **4.2.1 Kin ve BA İçeren Ortamlarda Gelişen Bitkiciklerin Mikroçoğaltım Sonuçları**

Civa denemelerinden elde edilen sağlam bitkiler, Kin (0.0, 1.0, 2.0 mg/l) ve BA (0.0, 1.0, 2.0 mg/l) içeren 6 farklı ortama transfer edilmiştir. Transferden 2 ay sonra bitkiler alt kültüre alınarak kardeş sayılarına bakılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre çeşitler arasında önem düzeyinde bir farklılık görülmezken ( $P < 0.05$ ), kardeş sayıları arasında önemli farklılık bulunmuştur. İstatistiki sonuçlara göre en iyi kardeşlenme oranı *Spathiphyllum* ‘Sweet Dario’ ve *Spathiphyllum* ‘Sweet Chico’ çeşitleri için 1 mg/l BA içeren hormon konsantrasyonundan elde edilmiş olup (**Çizelge.4.2**), en iyi bitki gelişimi 2 mg/l BA’ da gözlenmiştir (**Şekil. 4.4, 4.5, 4.6**). Birinci çeşitte (*Spathiphyllum* ‘Sweet Dario’) 1

mg/l BA' da 14.3 sürgün/eksplant, ikinci çeşitte (*Spathiphyllum* 'Sweet Chico') 13.5 sürgün/eksplant oranında, 2 mg/l BA' da ise sırasıyla 7.0 ve 6.5 sürgün/eksplant oranında kardeşlenme görülmüştür. **Aka-Kaçar ve ark (2005)**, yapmış oldukları çalışmada en iyi sürgün oranını 4. altkültürde 1mg/l BA seviyesinde 8.49 sürgün/eksplant, 2 mg/l BA' da ise 6.89 sürgün/eksplant olarak elde etmişlerdir. Kinetin' de en iyi kardeşlenme oranına baktığımızda sırasıyla; 1 mg/l Kin' de 7.5 ve 4.3 sürgün/eksplant iken, 2 mg/l Kin' de sırasıyla 2.8 ve 4.3 sürgün/eksplant olarak sonuçlanmıştır. Büyüme düzenleyicisi olarak BA (benziladenin)' nın bitki gelişimine ve kardeşlenmeye etkisinin, Kin'e göre daha iyi olduğu görülmüştür (**Şekil 4.5**). **Chang-Jinshu ve ark (1989)**'nın yapmış oldukları çalışmada *Spathiphyllum*'un kök ve gövde eksplantları, 2 mg/l BA (benzylaminopurin) ve 1 mg/l Kinetin içeren MS ortamında kültüre alındığında sürgün oluşumu teşvik edilmiştir. MS ortamına 1 mg/l BA ve 0,1 mg/l IAA eklendiğinde sürgün oluşumunun aynı şekilde teşvik edildiği belirlenmiştir.

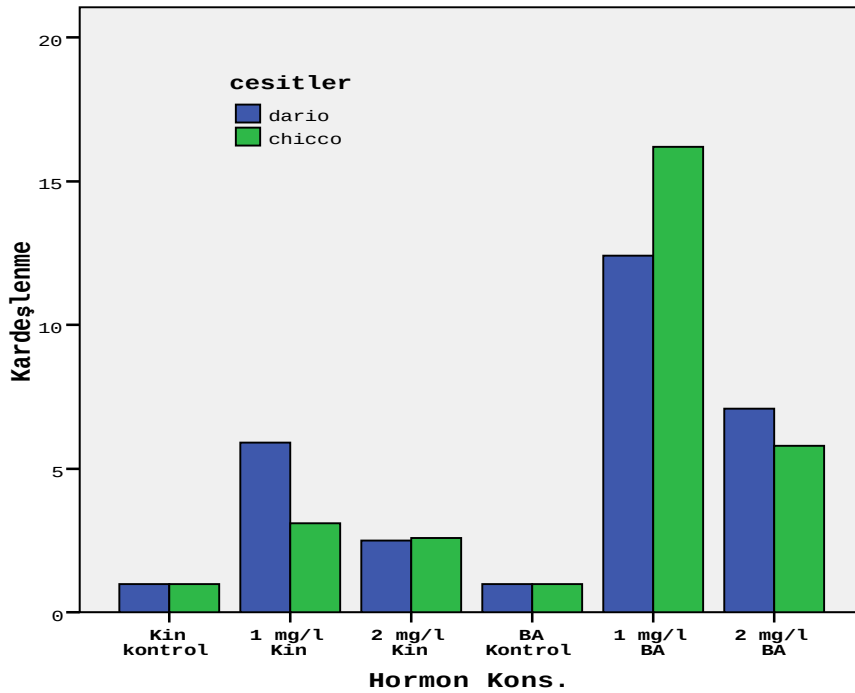
**Çizelge 4.2.** Kin ve BA İçeren Ortamlarda Gelişen Bitkiciklerin Kardeşlenme Oranları

| Kin-BA      | Çeşitler        |                  |        |
|-------------|-----------------|------------------|--------|
|             | <i>S. dario</i> | <i>S. chicco</i> | ORT.   |
| Kin Kontrol | 0.3             | 0.5              | 0.4d   |
| 1 mg/l Kin  | 7.5             | 4.3              | 5.9bc  |
| 2 mg/l Kin  | 2.8             | 4.3              | 2.9bcd |
| BA Kontrol  | 1.0             | 1.0              | 1.0cd  |
| 1 mg/l BA   | 14.3            | 13.5             | 13.9a  |
| 2 mg/l BA   | 7.0             | 6.5              | 6.8b   |
| <b>ORT.</b> | 5.5             | 4.8              | 5.2    |

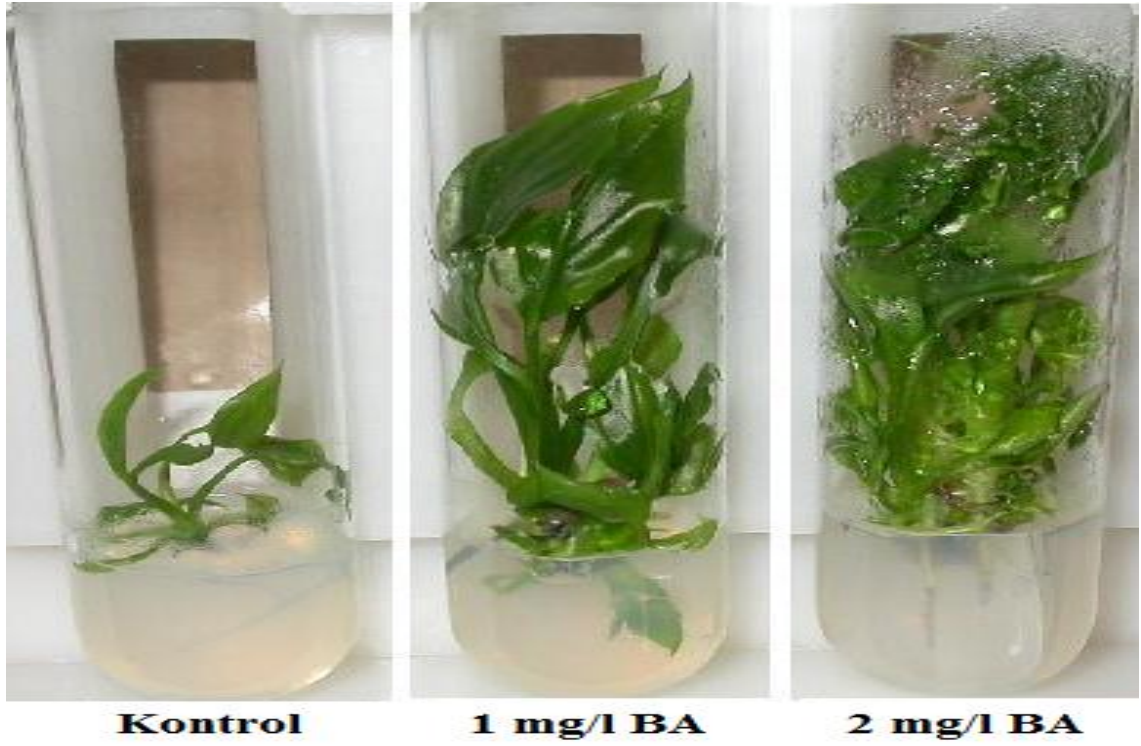
LSD 0.05 uygulama = 3.9

LSD 0.05 çeşit = ö.d.

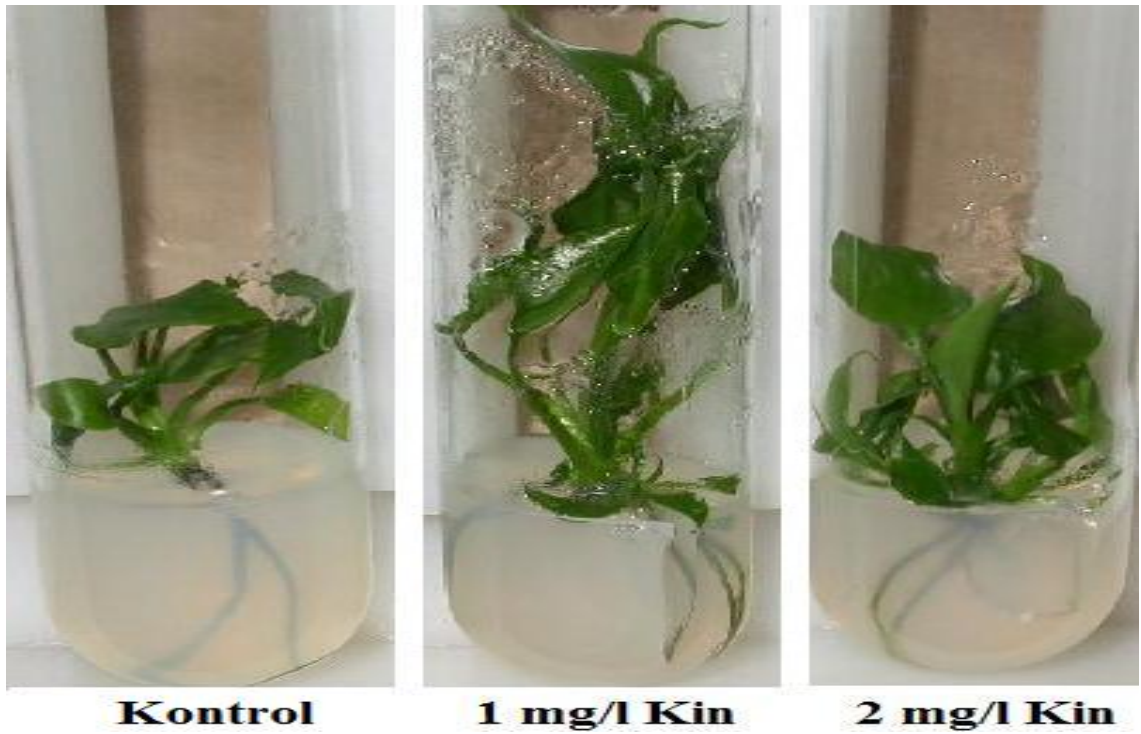
Ö.d. önemli değil

**Şekil 4.3.** Kin-BA İçeren Ortamlardaki Kardeşlendirme Oranları



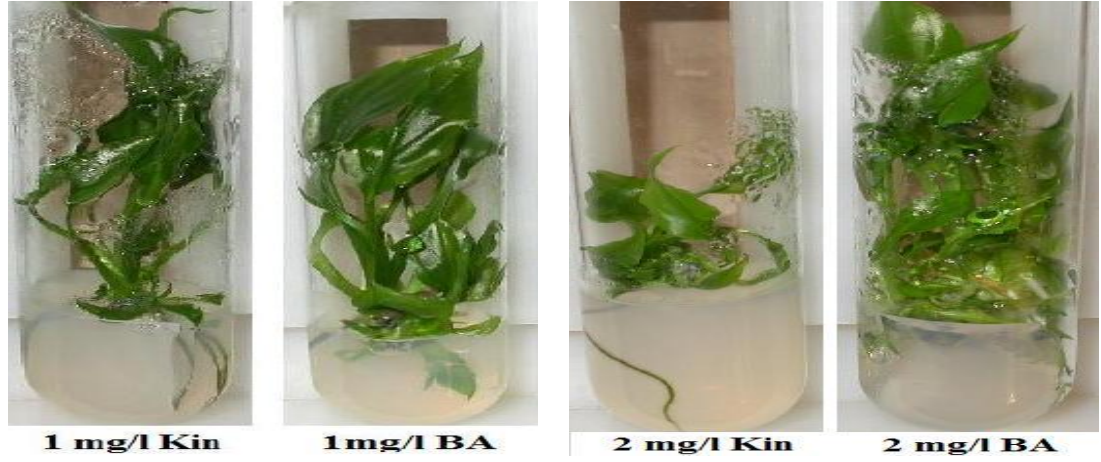


Şekil.4.4. Sürgün Sayısı Üzerine Farklı BA Konsantrasyonlarının Etkisi



Şekil.4.5. Sürgün Sayısı Üzerine Farklı Kinetin Konsantrasyonlarının Etkisi





**Şekil.4.6.** Bitki Gelişimi Üzerine Kin ve BA Konsantrasyonlarının Etkisi

#### 4.2.2. BA (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) ve NAA (0.0, 0.5, 1.0) ile Kombine Edilmiş 12 Farklı Hormon Konsantrasyonu Sonuçları

Bu denemede büyüme düzenleyicileri olarak BA (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) ve NAA (0.0, 0.5, 1.0 mg/l)'nın 12 farklı konsantrasyonuyla kombine edilmiş MS (Murashige ve Scoog, 1962) ortamı kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre; en yüksek kardeşlenme değeri 1mg/l BA'da birinci çeşitte (*Spathiphyllum* 'Sweet Dario') 15.3 sürgün/eksplant, ikinci çeşitte (*Spathiphyllum* 'Sweet Chico') 17.8 sürgün/eksplant, üçüncü çeşitte (*Spathiphyllum* 'Sweet Cupido') ise 18 sürgün/eksplant olarak kaydedilmiştir. Diğer konsantrasyonlarda en iyi kardeşlenme 0.5 mg/l ve 2 mg/l BA seviyelerinde gözlemlenmiştir. 0.5 mg/ BA seviyelerinde birinci çeşitte; 8.3 sürgün/eksplant, ikinci çeşitte; 9.8 sürgün/eksplant , üçüncü çeşitte ise 10.5 sürgün/eksplant, 2mg/l BA'da birinci çeşitte; 9.8 sürgün/eksplant, ikinci çeşitte; 9.5 sürgün/eksplant ve üçüncü çeşitte ise 10 sürgün/eksplant, oranında kardeşlenme gözlenmiştir.

BA'nin tek başına kullanıldığında kardeşlendirme oranının en yüksek, NAA kombinasyonları devreye girdiği durumlarda ise bu oranların düştüğü görülmüştür. Pierik ve ark., (1984)'da ortamda oksinlerin bulunmasının adventif ve aksiller sürgün gelişimini engellediğini bildirmişlerdir. 1 mg/l BA'nın 0.5 mg/l NAA kombinasyonuna bakıldığında, kardeşlendirme oranının *S. dario* çeşidi için 6.0

sürgün/eksplant, *S. chicco* çeşidi için 3.5, *S. cupido* çeşidi için ise 4.8'e düştüğü görülmüştür. 1 mg/l BA'nın 1 mg/l NAA kombinasyonunda da benzer sonuçlar alınmıştır. Kardeşlendirme oranları *S. dario* *S. chicco* ve *S. cupido* çeşitleri için, 2.8, 2.8 ve 2.8 sürgün/eksplant olarak saptanmıştır.

2 mg/l BA'nın 0.5 mg/l NAA kombinasyonuna bakıldığında ise, kardeşlendirme oranının *S. dario* çeşidi için 4.5 sürgün/eksplant, *S. chicco* çeşidi için 4.5, *S. cupido* çeşidi için ise 5.0'e düştüğü görülmüştür. 2 mg/l BA'nın 1 mg/l NAA kombinasyonundaki kardeşlendirme oranları ise *S. dario* *S. chico* ve *S. cupido* çeşitleri için, 2.8, 2.8 ve 2.8 sürgün/eksplant olarak saptanmıştır (**Çizelge.4.3**). Yürütülen çalışmada BA ile 0.5 ve 1 mg/l NAA kombinasyonlarında kardeşlenme teşvik edilmemiş aksine yüksek NAA konsantrasyonlarının kardeşlenmeyi azaltıcı etki yaptığı görülmüştür. Tek başına 0.5 mg/l ve 1.0 mg/l NAA konsantrasyonlarında ise kardeşlenme yerine sadece köklenme gözlenmiştir.

**Ramez ve ark. (2001)**, *Spathiphyllum floribundum* çeşidinde yapmış oldukları çalışmada, 1.0, 2.0 ve 5.0 mg/l BA seviyelerinde sırasıyla 1.2, 1.8, 1.3 sürgün/eksplant oranında sürgün sayısı elde etmişlerdir. Araştırmacılar, en iyi sürgün sayısını, 5 mg/l BA + 0,05 mg/l NAA içeren ortamdan 5.9 sürgün/eksplant oranında sağlamışlardır. 1mg/l BA + 0.05 mg/l NAA ve 2 mg/l BA + 0.05 NAA kombinasyonlarından da sırasıyla 5 ve 5.8 sürgün/eksplant oranında sürgün elde etmişlerdir. Araştırmacılar, kullanılmış olan NAA konsantrasyonunun düşük olmasının kardeşlenme üzerine olumlu etki yaptığını ve kardeşlenme oranlarını arttırdığını belirtmişlerdir.

Bu oranların, elde etmiş olduğumuz kardeşlendirme oranları ile karşılaştırıldığında çok düşük oranlar olduğu görülmektedir. Bu durumun, kullanılan çeşit faktörü, eksplant kaynağı, eksplantın yaşından kaynaklanabildiği gibi kültür ortam koşulları, süreleri, ışık, sıcaklık gibi fiziksel koşullardan da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

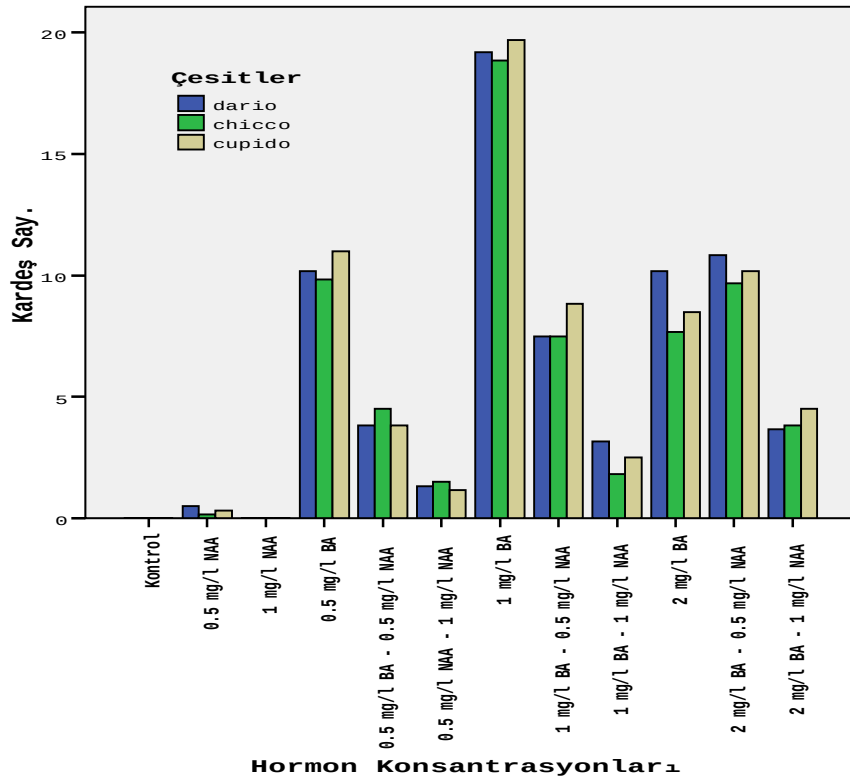
**Çizelge.4.3.** BA-NAA'nın 12 Farklı Konsantrasyonlarındaki Kardeşlenme Oranları

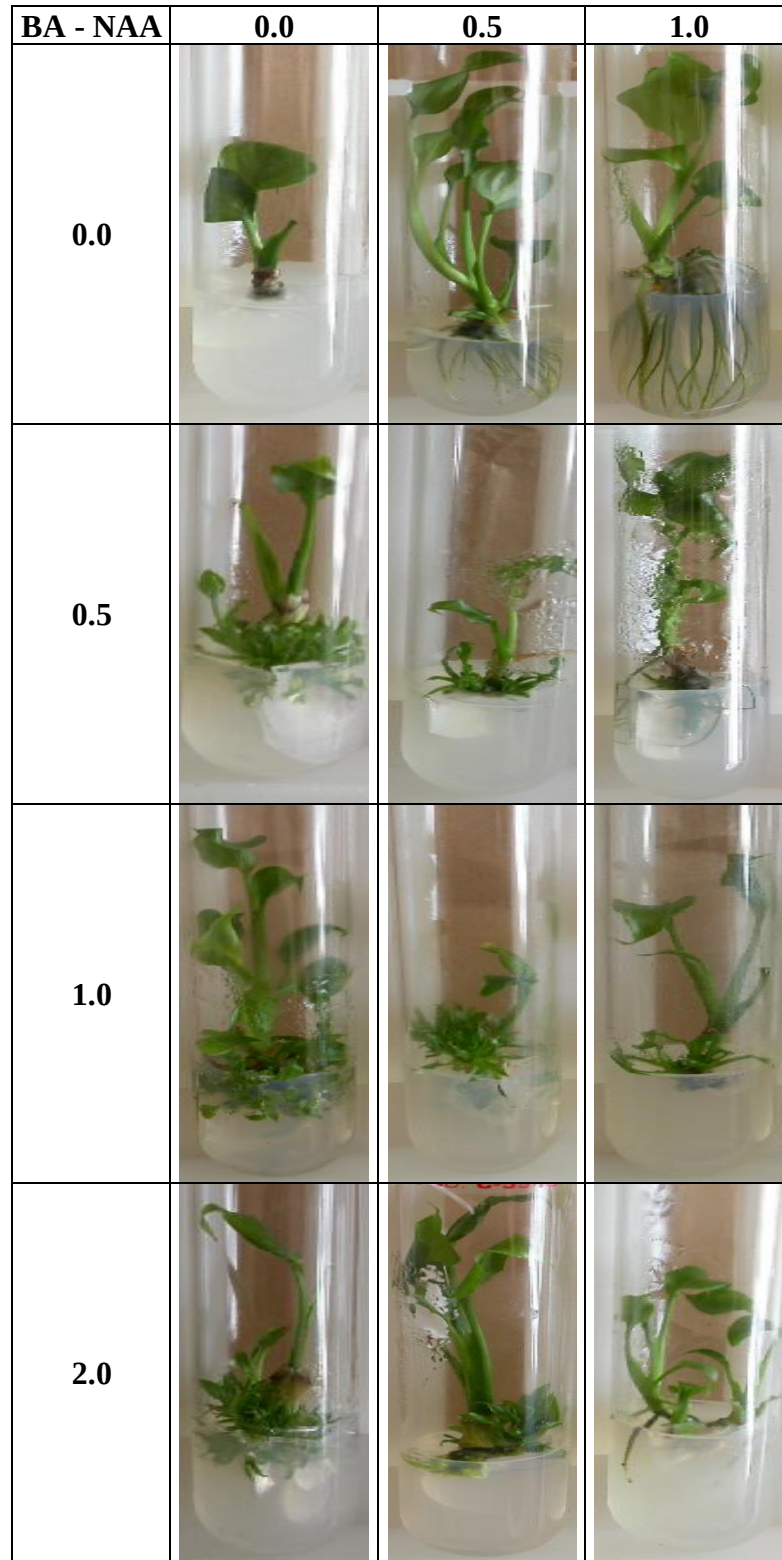
| BA-NAA                     | Çeşitler        |                 |                  |       |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------|
|                            | <i>S. dario</i> | <i>S. chico</i> | <i>S. cupido</i> | ORT.  |
| Kontrol                    | 0               | 0.3             | 0.3              | 0.2f  |
| 0.5 mg/l NAA               | 0.5             | 0.5             | 0.3              | 0.4ef |
| 1 mg/l NAA                 | 0.5             | 0.3             | 0.3              | 0.4ef |
| 0.5 mg/l BA                | 8.3             | 9.8             | 10.5             | 9.5b  |
| 0.5 mg/l BA - 0.5 mg/l NAA | 2.5             | 3.3             | 2.8              | 2.4de |
| 0.5 mg/l NAA - 1 mg/l NAA  | 3.0             | 3.5             | 1.5              | 2.6d  |
| 1 mg/l BA                  | 15.3            | 17.8            | 18               | 17a   |
| 1 mg/l BA - 0.5 mg/l NAA   | 6.0             | 3.5             | 4.8              | 4.8c  |
| 1 mg/l BA - 1 mg/l NAA     | 2.8             | 2.8             | 2.8              | 2.8cd |
| 2 mg/l BA                  | 9.8             | 9.5             | 10               | 9.8b  |
| 2 mg/l BA - 0.5 mg/l NAA   | 4.5             | 4.5             | 5.0              | 4.7c  |
| 2 mg/l BA - 1 mg/l NAA     | 2.8             | 2.8             | 2.8              | 2.8cd |
| <b>ORT.</b>                | 4.7             | 4.9             | 5                | 4.8   |

LSD 0.05 uygulama = 2.09

LSD 0.05 çeşit = ö.d.

Ö.d. önemli değil

**Şekil.4.7.** BA-NAA'nın 12 Farklı Konsantrasyonlarındaki Kardeşlenme Grafiği



**Şekil.4.8.** BA-NAA'nın 12 Farklı Konsantrasyonlarındaki Bitkiciklerin Görünümü

#### 4.2.3. Yüksek BA ve NAA Kombinasyonlarını İçeren Ortamlarda Gelişen Bitkiciklerin Mikroçoğaltım Sonuçları

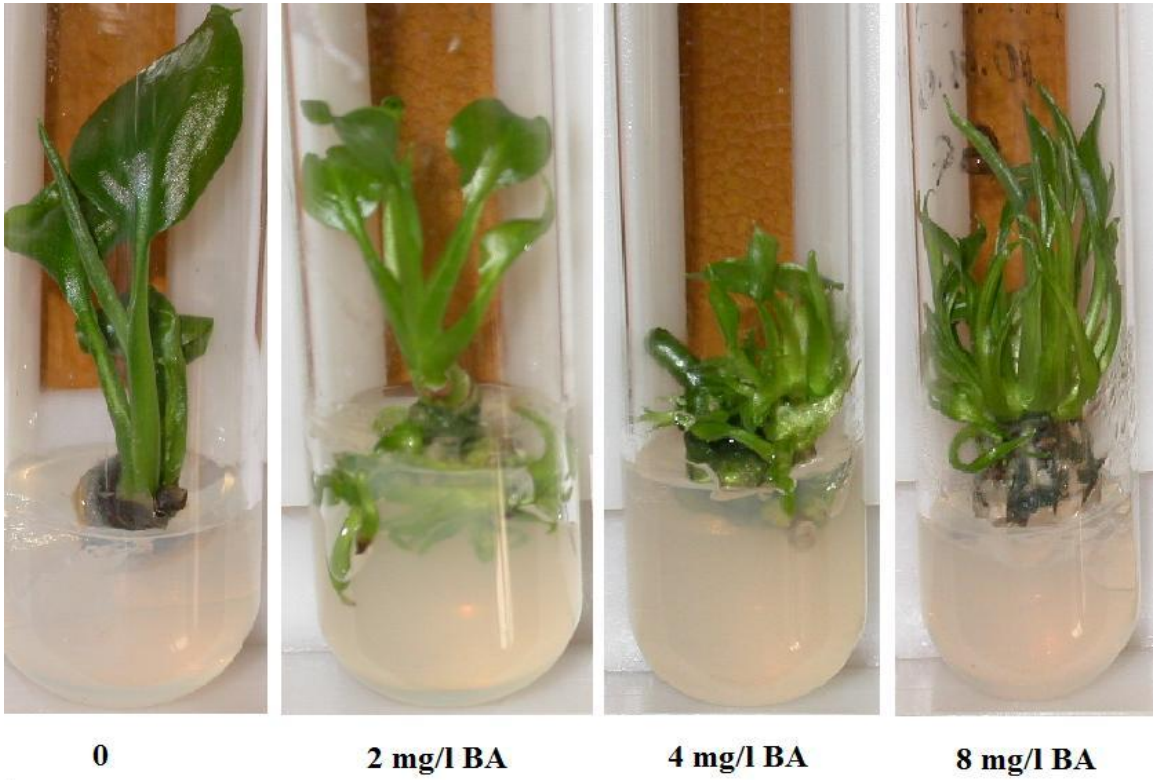
Bu denemede de eksplantlar, yüksek BA (0.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/l) and NAA (0.0, 2.0, 4.0 mg/l)'nın 12 farklı kombinasyonunu içeren MS ortamlarına aktarılarak kardeşlenme oranları incelenmiş ve istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

En iyi bitki gelişimi ve kardeşlendirme, 2.0 ve 4.0 mg/l BA içeren ortamlardan sağlanmıştır. 2 mg/l BA, *Spathiphyllum* 'Sweet Chico', 'Sweet Dario' ve 'Sweet Cupido' çeşitleri için 4.0, 4.0, 6.0 sürgün/eksplant oranında kardeşlenme göstermiştir. Bu çeşitler için 4.0 mg/l BA'nın kardeşlenme oranları ise 6.5, 4.0, 3.8 sürgün/eksplant'dır (**Çizelge.4.4**).

2 mg/l BA'nın 2.0 mg/l NAA ile kombinasyonu sonucunda, 1.8,, (*S. chicco*), 3.5 (*S. dario*) ve 3.8 sürgün/eksplant (*S. cupido*) kardeşlenme oranları belirlenmiştir. 2 mg/l BA'nın 4.0 mg/l NAA ile kombinasyonu sonucunda oluşan kardeşlenme oranları ise, 1.5 (*S. chicco*), 2.0 (*S. dario*) ve 1.5 (*S. cupido*) sürgün/eksplant olarak saptanmıştır. 4.0 mg/l BA'nın 4 mg/l NAA kombinasyonu sonucunda ise her üç çeşit için 3.8, 1.8 ve 2.8 sürgün/eksplant kardeşlenme oranları belirlenmiştir (**Şekil.4.10**, **Çizelge.4.4**).

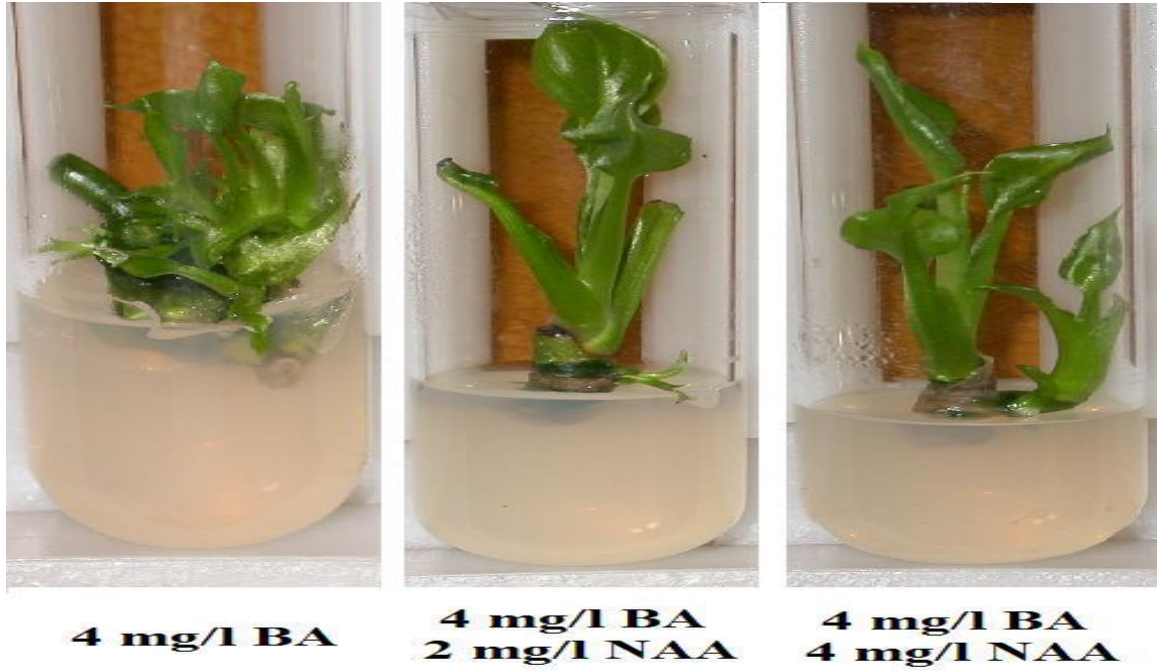
Her ne kadar 8.0 mg/l BA içeren ortamdan her üç çeşit için de en yüksek kardeşlenme oranları (8.0, 3.5 ve 8.3 sürgün/eksplant) elde edildiyse de (**Çizelge.4.4**), oluşan yaprakların mızrak şeklinde deforme olduğu ve bitkilerde somaklonal varyasyon görüldüğü saptanmıştır (**Şekil 4.11(A)**). Yüksek BA'nın NAA ile kombinasyonu sonucunda bitki deformasyonunda azalma bunun yanında deforme olan yapraksı yapıların normale döndüğü ve normal kardeşlenmenin görüldüğü saptanmıştır(**Şekil.4.11 B**). Yapılan araştırmalar da, ortam içerisinde 2,4-D, NAA ve sentetik sitokininlerin kullanılmasının bazı durumlarda bitkilerde deformasyonlara hatta mutasyonlara neden olduğunu belirtmektedirler. Özellikle de araştırmacılar, yüksek sitokinin konsantrasyonlarının somaklonal varyasyona neden olduğunu belirtmişlerdir (**Evans and Sharp, 1986**). *In vitro*'da çoğaltılan bitkilerde görülen varyasyon, genetik bozulmalar ile sonuçlanabilmekte ve bunlara somaklonal varyasyon denilmektedir (**Scowcroft, 1985**).

*Saintpaulia inantha* and *Begonia X hiemalis*'in *in vitro* ve *in vivo* adventif sürgün çoğaltılmasında da mutasyonlar gözlenmiştir. Bu durumların yüksek sitokinin konsantrasyonlarında daha da arttığı belirtilmiştir. (Scowcroft, 1985; Ando et al, 1986). Santos, (2008), *Spathiphyllum*'da BA ve NAA kullanılarak sürgün ucu çoğaltımı çalışmaları yapmış ve elde edilen bitkiciklerde somaklonal varyasyonu gözlemiştir.

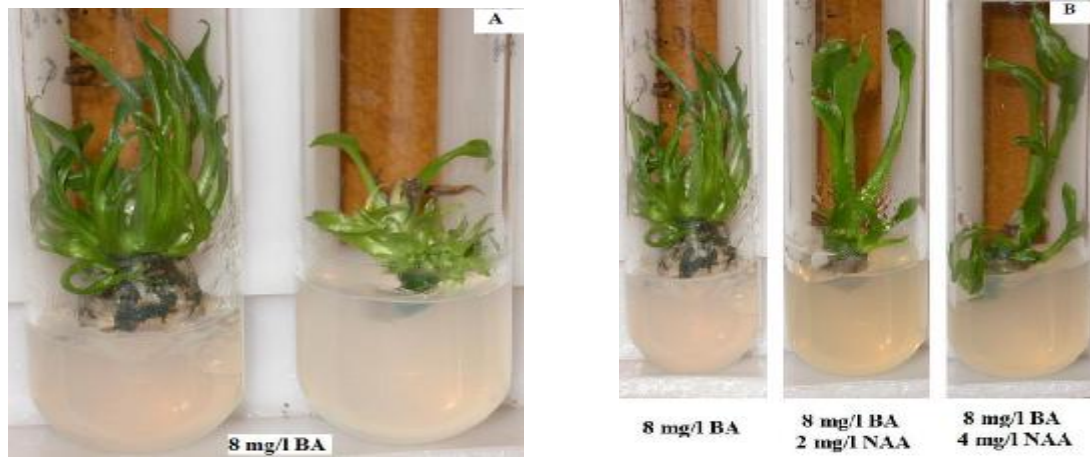


**Şekil.4.9.** Farklı BA Konsantrasyonlarının Bitki Büyüme ve Gelişimi  
Üzerine Etkileri





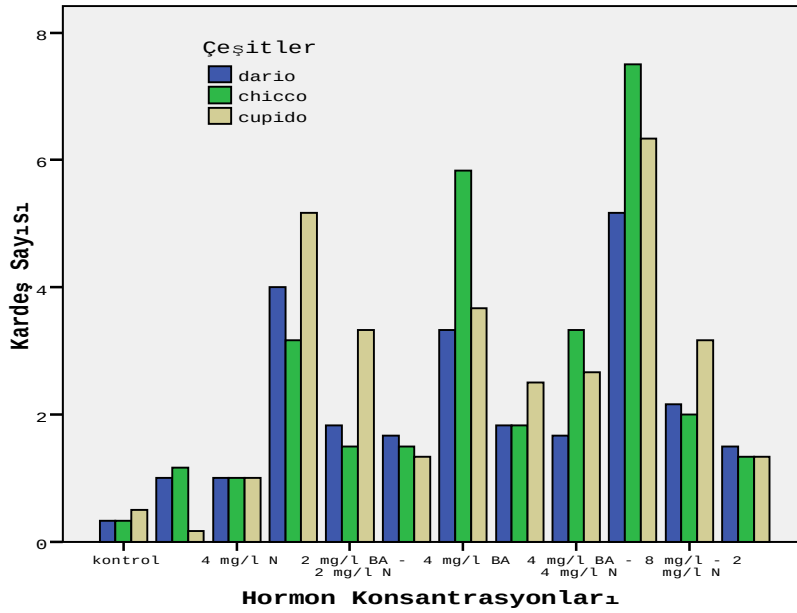
**Şekil.4.10.** 4 mg/l BA'nın NAA ile Kombinasyonlarının Bitki Gelişimi  
Üzerine Etkileri



**Şekil.4.11.** Farklı BA-NAA Konsantrasyonlarının Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi  
(A) 8 mg/l (B) 8mg/l BA - 2 mg/l NAA, 8 mg/l BA - 4 mg/l NAA

**Çizelge.4.4.** Yüksek BA ve NAA Kombinasyonlarını İçeren Ortamlarda Gelişen Bitkiciklerin Kardeşlenme Oranları

| BA-NAA                                                      | Çeşitler        |                  |                  |            |
|-------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------|
|                                                             | <i>S. dario</i> | <i>S. chicco</i> | <i>S. cupido</i> | ORT.       |
| Kontrol                                                     | 0.5             | 0.5              | 0.8              | 0.6        |
| 2.0 mg/l NAA                                                | 1.3             | 1.3              | 0.3              | 0.9        |
| 4.0 mg/l NAA                                                | 1.0             | 1.0              | 1.0              | 1.0        |
| 2.0 mg/l BA                                                 | 4.0             | 4.0              | 6.0              | 4.7        |
| 2.0 mg/l BA - 2.0 mg/l NAA                                  | 1.8             | 1.5              | 3.8              | 2.4        |
| 2.0 mg/l NAA - 4.0 mg/l NAA                                 | 2.0             | 1.5              | 1.5              | 1.7        |
| 4.0 mg/l BA                                                 | 4.0             | 6.5              | 3.8              | 4.8        |
| 4.0 mg/l BA - 2.0 mg/l NAA                                  | 2.0             | 1.8              | 2.5              | 2.1        |
| 4.0 mg/l BA - 4.0 mg/l NAA                                  | 1.8             | 3.8              | 2.8              | 2.8        |
| 8.0 mg/l BA                                                 | 3.5             | 8.0              | 8.3              | 6.6        |
| 8.0 mg/l BA - 2.0 mg/l NAA                                  | 2.5             | 1.8              | 4.3              | 2.9        |
| 8.0 mg/l BA - 4.0 mg/l NAA                                  | 1.8             | 1.5              | 1.3              | 1.5        |
| <b>ORT.</b>                                                 | <b>2.2</b>      | <b>2.8</b>       | <b>3.5</b>       | <b>2.7</b> |
| LSD uygulama = 2.6<br>LSD Çeşit = Ö.d.<br>Ö.d. Önemli değil |                 |                  |                  |            |



**Şekil.4.12.** Yüksek Sitokinin Konsantrasyonlarının Kardeşlenme Grafiği



### 4.3. Moleküler Analiz Sonuçları

#### 4.3.1. DNA İzolasyonu Sonuçları

Tez kapsamında kullanılan genotipler incelendiğinde, DNA izolasyonu sonucunda DNA miktarları yüksek bulunmuştur. En yüksek DNA konsantrasyonu, 4 mg/l BA içeren MS ortamında gelişen *S. chicco* çeşidinden (235,26 ng DNA/ ul), en düşük DNA miktarı ise 8 mg/l BA içeren MS ortamında gelişen *S. chicco* çeşidinden (88,39DNA/ ul) elde edilmiştir.

DNA'nın saflığını ölçmek için genel olarak 260 ve 280 nm absorbiyon değerlerinin oranları kullanılmakta; 1,80-2,00 arasındaki oranların saflığı yüksek olarak değerlendirilmektedir. Çalışmada kullanılan genotiplere ait saflık değerleri 1,75- 2,12 arasında değişmektedir. (**Çizelge.4.5**)

Bitki moleküler biyoloji çalışmalarında DNA izolasyon aşaması son derece önemlidir. PCR uygulamalarında ise DNA'nın miktar ve özellikle saflığı amplifikasyon açısından daha da önem kazanmaktadır (**Ergül, 2000**). Bitki moleküler biyoloji çalışmalarında iyi bir DNA izolasyonu başarıyı önemli ölçüde etkilemektedir. Tez kapsamında kullanılan çeşitlere ait DNA'lar incelendiğinde DNA miktarları yüksek bulunmuştur.

DNA'lar kalite bakımından değerlendirildiğinde, kaliteli DNA'larda saflığın A260/A280 oranının yaklaşık 2,0 civarında bulunması beklenmektedir. Elde edilen değerlerin 2,0'den yüksek olması; örneğin RNA, kloroform ya da fenol ile kirli olduğunu ve 1,6 değerinden düşük olması ise örnek içerisinde proteinler ya da fenolik (polifenol) bileşikler bulunduğunun göstergesidir (**Hoisington, 1992**). Bu çalışmada elde edilen DNA saflık oranları 1,81-1,93 arasında bulunmuştur.

Çizelge.4.5. DNA miktarları ve Saflık Dereceleri

| No | İsim            | DNA Miktarı (ng DNA ul-1) | DNA Saflığı (A260/A280) |
|----|-----------------|---------------------------|-------------------------|
| 1  | Dario-Kontrol   | 104,18                    | 1,86                    |
| 2  | Dario-4 mg/L BA | 155,6                     | 1,85                    |
| 3  | Dario-8 mg/L BA | 177,28                    | 1,88                    |
| 4  | Chico-Kontrol   | 60,81                     | 1,93                    |
| 5  | Chico-4 mg/L BA | 235,26                    | 1,92                    |
| 6  | Chico-8 mg/L    | 88,39                     | 1,81                    |
| 7  | Cupido-Kontrol  | 210,68                    | 1,92                    |
| 8  | Cupido-4 mg/L   | 161,9                     | 1,87                    |
| 9  | Cupido-8 mg/L   | 177,5                     | 1,89                    |

#### 4.3.2. RAPD Analizi Sonuçları

*In vitro* ortamda 0.0, 4.0, 8.0 mg/l BA seviyelerinde, morfolojik olarak farklılık gözlenen bitkiciklerden alınan yaprak örneklerinde, somaklonal varyasyonu genetik olarak saptamak amacıyla RAPD analizi yapılmıştır. RAPD analizinde 18 primerden (OPA02, OPAI19, OPA04, OPA19, OPA10, OPA01, OPA11, OPAK9, OPA14, OPAC09, OPAJ20, OPAD18, OPAF09, OPN20, OPAI 11, OPAI 12, OPAJ 14, OPAJ9 Operon Technologies, Alameda, CA, USA) 4 tanesinde (OPA-10, OPA-11, OPA-14, OPAJ-20 ) farklılık gözlenmiştir (Şekil.4.13).

**OPA-10 Primeri:** Yapılan RAPD analizleri sonucunda, *Spathiphyllum* “sweet Dairo” ve *Spathiphyllum* “Sweet Cupido” çeşitlerinde farklı BA uygulamalarından kaynaklanan herhangi bir genetik değişiklik tespit edilmemiştir. Ancak *Spathiphyllum* ‘Sweet Chico’ çeşidinde 8 mg/l BA seviyesinde genetik olarak farklılık tespit edilmiştir. Yapılan RAPD analizi sonucunda *Spathiphyllum* ‘Sweet Chico’ çeşidine ait agaroz jelde toplam 3 DNA bandı elde edilmiştir. Elde edilen DNA bantları incelendiğinde, 0.0 mg/l BA ve 4.0 mg/l BA seviyelerindeki uygulamalardan elde edilen bitkiciklerde, DNA bant büyüklükleri sırasıyla yaklaşık 250, 375, 700 baz çifti olarak belirlenmiştir. 8.0 mg/l BA seviyesindeki uygulama sonucunda elde edilen bitkiciklerde, DNA bant büyüklükleri sırasıyla yaklaşık 250, 300, 700 baz çifti olarak belirlenmiştir. 0.0 mg/l BA ve 4.0 mg /l BA

uygulamalarında 375 bç büyüklüğünde görülen DNA bandı, 8 mg/l BA uygulamalarında 300 bç büyüklüğünde bir DNA bandı olarak gözlenmiştir.

**OPA-11 Primeri:** Yapılan RAPD analizleri sonucunda, *Spathiphyllum* ‘Sweet Dario’ ve *Spathiphyllum* ‘Sweet Cupido’ çeşitlerinde farklı BA uygulamalarından kaynaklanan herhangi bir genetik değişiklik tespit edilmemiştir.

*Spathiphyllum* ‘Sweet Chico’ çeşidinde 8.0 mg/l BA seviyesinde genetik olarak farklılık tespit edilmiştir. Yapılan RAPD analizi sonucunda *Spathiphyllum* ‘Sweet Chico’ çeşidine ait agaroz jelde toplam 5 DNA bandı elde edilmiştir. Elde edilen DNA bantları incelendiğinde, 0.0 mg/l BA ve 4.0 mg/l BA seviyelerindeki uygulamalardan elde edilen bitkiciklerde, DNA bant büyüklükleri sırasıyla yaklaşık 250, 350, 700, 1000 ve 1500 bç olarak belirlenmiştir. 8 mg/l BA seviyesindeki uygulama sonucunda elde edilen bitkiciklerde, DNA bant büyüklükleri sırasıyla 250, 300, 350, 1000 ve 1500 baz çifti olarak belirlenmiştir. 0.0 mg/l BA ve 4.0 mg /l BA uygulamalarında 350 bç büyüklüğünde görülen DNA bandı, 8 mg/l BA uygulamalarında 300 bç büyüklüğünde bir DNA bandı olarak gözlemlenmiştir.

**OPA-14 Primeri:** Yapılan RAPD analizleri sonucunda, *Spathiphyllum* ‘Sweet Dario’ ve *Spathiphyllum* ‘Sweet Cupido’ çeşitlerinde farklı BA uygulamalarından kaynaklanan herhangi bir genetik değişiklik tespit edilmemiştir.

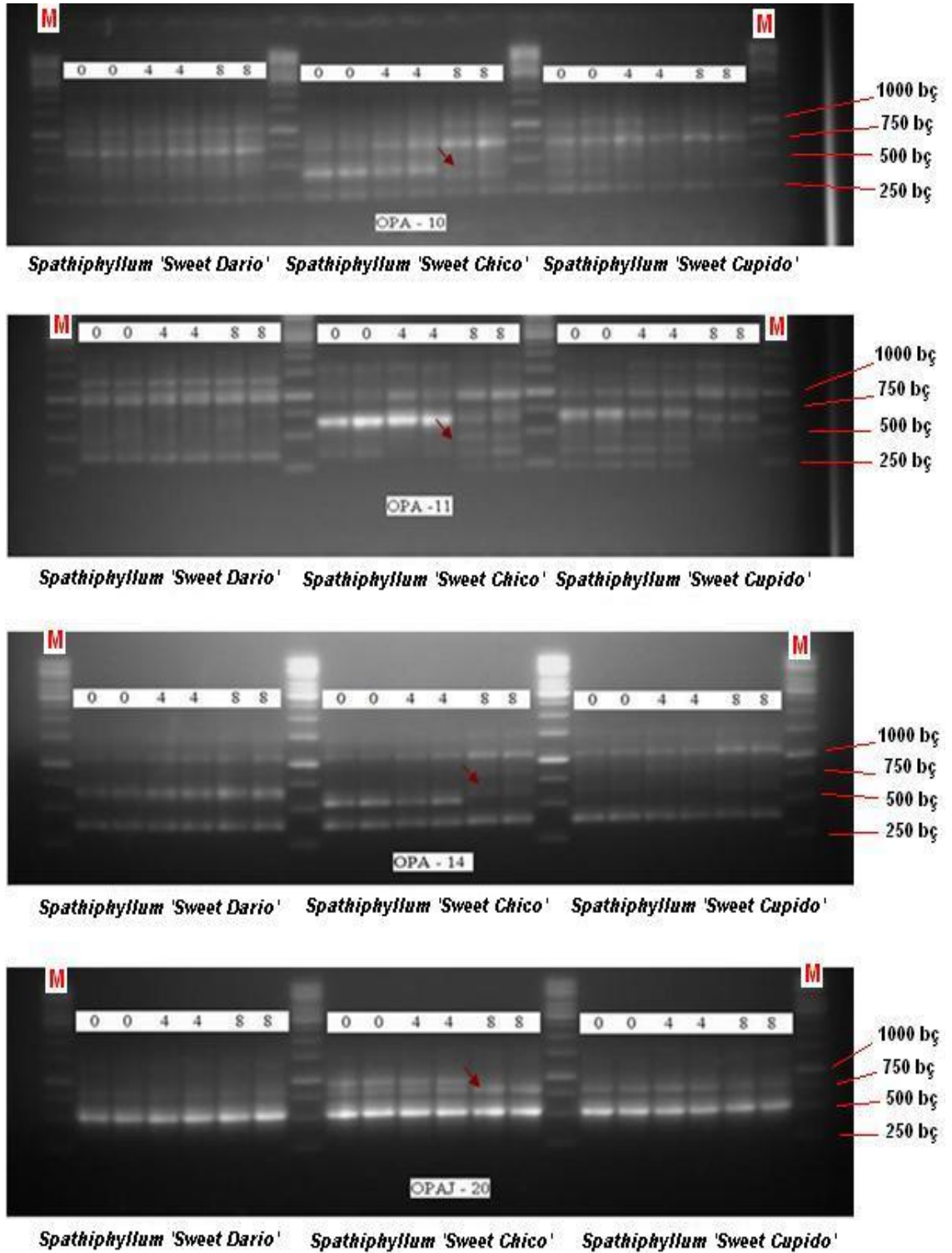
*Spathiphyllum* ‘Sweet Chico’ çeşidinde 8.0 mg/l BA seviyesinde genetik olarak farklılık tespit edilmiştir. Yapılan RAPD analizi sonucunda *Spathiphyllum* ‘Sweet Chico’ çeşidine ait agaroz jelde toplam 3 DNA bandı elde edilmiştir. DNA bant büyüklükleri toplam 3 bant olmak üzere, sırasıyla yaklaşık 350, 500 ve 1100 bç olarak belirlenmiştir. 8.0 mg/l BA seviyesindeki uygulama sonucunda elde edilen bitkiciklerde, DNA bant büyüklükleri sırasıyla yaklaşık 350, 700 ve 1100 baz çifti olarak belirlenmiştir. 0.0 mg/l BA ve 4.0 mg /l BA uygulamalarında 500 bç büyüklüğünde görülen DNA bandı, 8 mg/l BA uygulamalarında 700 bç büyüklüğünde DNA bandı olarak gözlenmiştir.

**OPAJ-20 Primeri:** Yapılan RAPD analizleri sonucunda, *Spathiphyllum* ‘Sweet Dairo’ ve *Spathiphyllum* ‘Sweet Cupido’ çeşitlerinde farklı BA uygulamalarından kaynaklanan herhangi bir genetik değişiklik tespit edilmemiştir.

*Spathiphyllum* ‘Sweet Chico’ çeşidinde 8.0 mg/l BA seviyesinde genetik

olarak farklılık tespit edilmiştir. Yapılan RAPD analizi sonucunda *Spathiphyllum* ‘Sweet Chico’ çeşidine 0.0 mg/l BA ve 4.0 mg/l BA uygulamalarına ait agaroz jelde toplam 3 DNA bandı elde edilmiştir. DNA bant büyüklükleri toplam 3 bant olmak üzere, sırasıyla yaklaşık 500, 800 ve 1000 b olarak belirlenmiştir. Farklı olarak, 8 mg/l BA uygulamasında ise bant büyüklükleri 500 ve 800 b olan toplam 2 bant gözlemlenmiştir.

*In vitro* ortamda morfolojik olarak gözlenen değişiklikler, RAPD analizleri sonucunda 4 RAPD primerinde gözlenen farklı DNA bantları ile genetik olarak daa tespit edilmiştir. Morfolojik olarak gözlenen ve genetik düzeyde de incelenen bu değişiklikler elde edilen bitkiciklerde somoklonal varyasyonun varlığını göstermiştir.



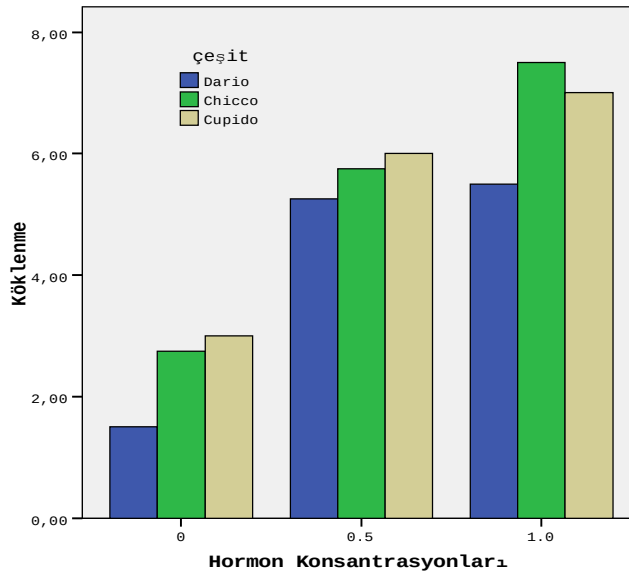
Şekil.4.13. Farklılık Gözlenen RAPD Primerleri (OPA-10, OPA-11, OPA-14 ve OPAJ-20)

#### 4.4. Bitkiciklerin Köklenme Ortamındaki Köklenme Oranı Sonuçları

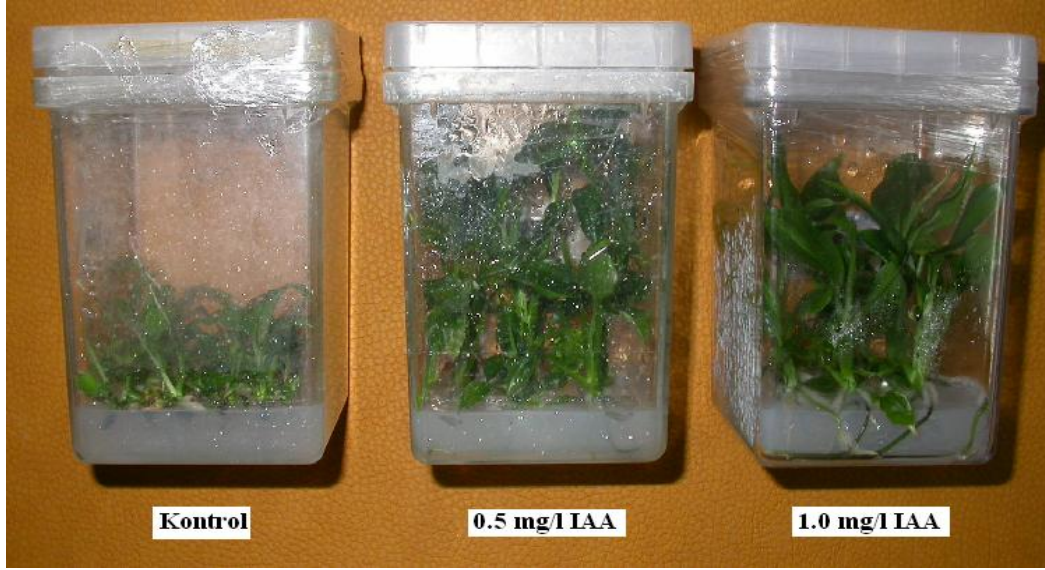
Köklenme aşamasında IAA' nın üç farklı konsantrasyonunun köklenmeyi etkileme yüzdeleri incelendiğinde, bütün bitkilerin köklendiği gözlenmiştir ve değerler birbirine yakın çıkmıştır (**Çizelge 4.6**).

**Çizelge.4.6.** IAA Konsantrasyonlarındaki Köklenme Yüzdeleri

| IAA              | Çeşit               |                      |                      | Toplam(%) |
|------------------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------|
|                  | S. <i>dario</i> (%) | S. <i>chicco</i> (%) | S. <i>cupido</i> (%) |           |
| 0                | 3,4                 | 6,2                  | 6,8                  | 16,4      |
| 0.5              | 11,9                | 13                   | 13,6                 | 38,4      |
| 1.0              | 12,4                | 16,9                 | 15,8                 | 45,2      |
| <b>Toplam(%)</b> | 27,7                | 36,2                 | 36,2                 | 100       |



**Şekil.4.14.** IAA Konsantrasyonlarındaki Köklenme Yüzdeleri



**Şekil.4.15.** IAA Konsantrasyonlarındaki Köklenmiş Bitkicikler

#### 4.5.Köklenen Bitkiciklerin Toprak Koşullarına Alıştırma Sonuçları

Köklenen bitkiciklerin saksılara alıştırılması konusunda herhangi bir güçlükle karşılaşılmamış ve bitkiler % 90 başarıyla toprak koşullarına alıştırılmışlardır.



**Şekil.4.16.** Toprak Koşullarına Alıştırılmış Bitkiler

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *Spathiphyllum* bitkisinin üç çeşidi üzerine doku kültürü yöntemi kullanılarak mikroçoğaltım olanakları araştırılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında bitki ve toprak kaynaklı enfeksiyon aşılma çalışılmış ve yüzey sterilizasyonu için çeşitli denemeler yapılmıştır. Çoğaltım aşamasında ise besi ortamlarında, BA, Kin, NAA, IAA gibi hormonlar kullanılarak; sterilizasyon aşamasında sağlam bitki, çoğaltma aşamasında, kardeşlenme ve köklenme oranlarına bakılmıştır.

Bitkideki enfeksiyon sorununu en aza indirmek için öncelikle ethanol, sodyum hipoklorit ve tween 20 kullanılarak sterilasyondan başarı sağlanmaya çalışılmıştır. Sterilizasyon için bu kimyasalların yeterli gelmediği görüldüğünde civa klorür denemelerine geçilmiştir. Denemelerde kullanılan 4 farklı civa konsantrasyonu (0.03, 0.05, 0.08, 0.1) ve çeşitler arasında istatistiki olarak farklılık görülmemesine rağmen .civa ve sodyum hipokloritle birlikte yapılan sterilizasyonun etkili olduğu görülmüştür ve yeterli sayıda enfeksiyonsuz, sağlıklı bitkicik elde edilmiştir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında ise; besi ortamlarına eklenen büyüme düzenleyicilerinin kardeşlenme üzerine etkileri incelenmiştir. İlk olarak sterilizasyonda kurulan denemelerden elde edilen bitkiler Kin-BA içeren ortamlarda kültüre alındığında kültürden 2 ay sonra en iyi kardeşlenmenin 1 mg/l BA seviyesinde 13.9 sürgün/eksplant oranında elde edildiği görülmüştür. Kardeşlendirme aşamasında BA'nın Kin'e göre sürgün gelişiminde daha iyi etki gösterdiği saptanmıştır.

İkinci olarak, BA ve NAA kombinasyonu ile kurulan 12 farklı denemede ise en iyi kardeşlenme oranı sırasıyla 3 çeşitte (*Spathiphyllum* 'Sweet Dario', 'Sweet Chico', 'Sweet Cupido') 15.3, 17.8 ve 18 sürgün/eksplant olarak 1.0 mg/l BA içeren ortamda kaydedilmiştir.

Diğer araştırmacıların çalışmalarına nazaran yüksek oranda sürgün oluşumu gerçekleştiği görülmüştür. Çalışmada kullanılan BA ile yüksek konsantrasyondaki NAA (0.5 ve 1 mg/l NAA) kombinasyonlarının kardeşlenmeyi teşvik etmediği,



aksine yüksek NAA konsantrasyonlarının kardeşlenmeyi azaltıcı etki yaptığı görülmüştür. Diğer araştırmacıların yapmış oldukları çalışmalara bakıldığında da sitokinin ile birlikte kullanılan düşük oksin konsantrasyonlarının hücre bölünmesini, bitki gelişimini ve kardeşlenmeyi teşvik ettiği, oksin konsantrasyonlarının arttırıldığı durumlarda ise kardeşlenmenin engellendiği görülmüştür

İleride yapılacak çalışmalarda, aynı kültür koşulları kullanılarak, sitokinin ile kombine edilen oksin konsantrasyonları düşük tutularak ve NAA'ya ek olarak farklı oksinler (IBA ve IAA) denenerek daha fazla sürgün elde edilebileceği düşünülmektedir. Kültür sürelerinin uzun tutulması ve kültüre alınma sırasında 15 x 20'lik kültür tüplerinin kullanılması yerine daha geniş kültür kaplarından yararlanılması daha faydalı olacaktır.

Yüksek hormon konsantrasyonlarının (BA ve NAA) kullanıldığı denemede ise 8.0 mg/l BA içeren ortamdan her üç çeşit için de en yüksek kardeşlenme oranları elde edilmesine rağmen, oluşan yaprakların mızrak şeklinde deforme olduğu ve bitkilerde somaklona varyasyon görüldüğü, yüksek BA'nın NAA ile kombinasyonu sonucunda bitki deformasyonunda azalma bunun yanında deforme olan yapraksı yapıların görülmeyerek, normal kardeşlenmenin görüldüğü saptanmıştır. Yüksek sitokinin konsantrasyonunun neden olduğu somaklona varyasyon, hem *in vitro* ortamda morfolojik olarak hem de RAPD analizleri yapılarak genotipik olarak gözlenmiştir. Çalışmanın ileriki aşamalarında, somaklona varyasyonun ileri aşamalarını gözlemek amacıyla varyasyonun görüldüğü bitkicikler toprağa alıştırılıp geliştirildikten sonra tekrar DNA izolasyonu yapıp, farklı markır sistemleri ile kontrol edilmesi önerilmektedir.

Yürütülen araştırmada, istatistik analizler sonucunda çeşitler arasında herhangi bir farklılık görülmemiş olup, sterilizasyon aşamasında civa klorürün etkili olduğu, kardeşlendirme aşamasında ise 1.0 mg/l BA'da en yüksek kardeşlendirme oranının elde edildiği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- ALBERT, M.T.Y., YEH D. M., 2001.** Nitrogen nutrition of *Spathiphyllum* 'Sensation' grown in sphagnum peat-and coir-based media with two irrigation methods. HortScience, ISSN 0018-5345
- AKA KAÇAR, Y., MAZMANOĞLU, M., MENDİ, Y.Y., SERÇE, S., ÇETİNER, S, 2005.** The Effect of Cytokinin Type and Concentration on Multiplication Rate of *Spathiphyllum* (Fam. Aracea). Asian Journal of Plant Sciences, 4 (4): 401-404.
- DUQUENNE, B., EECKHAUT, T., WERBROUCK, S., HUYLENBROECK, J. V., 2007.** Effect of Enzyme Concentrations on Protoplast İsolation and Protoplast Culture of *Spathiphyllum* And *Anthurium*. Plant Cell, Tissue And Organ Culture, P: 165-173
- CHEN, L.J., HENY, R.J., ROBINSON, C.A., 2000.** Response of *Spathiphyllum* Cultivars To Chilling Temperatures. Proc. Fla. State Hort. Soc. 113: 165-169
- DEWIR, Y.H., HAHN, E.J., PAEK, K.Y., 2004.** *In Vitro* Flowering of *Spathiphyllum Cannifolium* Influences of Gibberellic Acid, Culture Type and Sucrose Concentration. ISHS Acta Horticulturae, 725.
- TAN NHUT, D., TAKAMURA, T., WATANABE, TANAKA., M., 2005.** Artificial Light Source Using Light-Emitting Diodes (Leds) In The Efficient Micropropagation of *Spathiphyllum* Plantlets. II International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. ISHS Acta Horticulturae, 692
- DAHAB, T.A.M., 2006.** *In vitro* propagation of *Hydrangea macrophylla* Thunb. Arab J. Biotech., Vol. 10, No. (1) Jan. (2007):161-178.
- DEWIR, Y. H., CHAKRABARTY, D., HAHN, E..J., PAEK, K.Y., 2006.** A Simple Method For Mass Propagation of *Spathiphyllum* Cannifolium Using an Airlift Bioreactor. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 42 (3): 291-297

- SUTTER, E..G., 1985.** Morphological, Physical and Chemical Characteristics of Epicuticular Wax on Ornamental Plants Regenerated *In Vitro*. *Annals of Botany* 55: 321-329
- SANTOS, M.D.M., (2008).** Micropropagação do abacaxizeiro ornamental [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens and Leal] e avaliação da fidelidade genotípica dos propágulos. Master's thesis, Departamento de Botânica, UNB, Brasília
- FONNESBECH, M AND FONNESBECH, A., 1979.** *In vitro* propagation of *Spathiphyllum*. *Sci Hortic.*, 10:21-25.
- LIAO, F.X., WANG, B.Q., XU, F.N., YANG, Z.Y., WANG, G.P., 2006.** Growth and Physiological Characteristics of Plantlets of *Spathiphyllum* 'Sensation' in Rooting Phase as Affected By Sucrose-Free Medium And Diffusive Ventilation. *ISHS Acta Horticulturae*, 725
- GURSAN, K., KIVANÇ, T., ÇELİKBİLEK, M., AKSU, E., 2002.** Bitkisel Üretim Özel İhtisas Komisyonu Süs Bitkileri Alt Komisyon Raporu. Ankara (<http://ekutup.dpt.gov.tr/bitkiure/sus/oik653.pdf> ).
- HATİBOĞLU, R., 1999.** Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi. Syf: 55
- HUYLENBROECK, J.M.V., DEBERGH, P. C., 1995.** Impact Of Sugar Concentration *In vitro* on Photosynthesis and Carbon Metabolism During Ex Vitro Acclimatization of *Spathiphyllum* Plantlets. *Physiologia Plantarum*, Volume 96, Issue 2, Pages 298-304
- BRUNNER, I., ECHEGARAY, A., ABRAHAM, R., 1995.** Isolation and Characterization of Bacterial Contaminants From *Dieffenbachia Amoena* Bull, *Anthurium Andreanum* Linden And *Spathiphyllum* Sp. Shoot Cultured *In Vitro*. *Scientia Horticulturae* Volume 62, Issues 1-2, Pages 103-111
- JINSHU, C., 1989.** The Effect of Some Hormones on Bud Induction and Propagation of *Spathiphyllum*. *Chinese Bull. Bot.*, 6: 61-165.

- JINSHU, C, 2005.** Coal fly ash as an amendment to container substrate for *Spathiphyllum* production. Bioresource Technology, Volume 97, Issue 15, Pages 1920-1926
- KLOCK-MOORE, A.K., WAGNER, S., 1998.** Growth of *Spathiphyllum* 'Petite' In Substrates Inoculated With Mycorrhizae. Proc. Fla. State Hort. Soc., 111:20-22
- LIAO, F.X., WANG, B.Q., XU, F.N., YANG, Z.Y. AND WANG, G.P., 2006.** Growth And Physiological Characteristics of Plantlets of *Spathiphyllum* 'Sensation' In Rooting Phase As Affected By Sucrose-Free Medium And Diffusive Ventilation. Acta Hort. (ISHS) 725:325-332
- LAIMER, M., RÜCKER, W., 2003.** Plant Tissue Culture: 100 Years Since Gottlieb Haberlandt. Springer, Page: 118-119
- MURASHIGE, T. AND SKOOG, F., 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-assay with Tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- ORLIKOWSKA, T., SABALA, I. AND NOWAK, E., 1995.** Adventitious Shoot Regeneration on Explants of *Anthurium*, *Codiaeum*, *Dieffenbachia*, *Gerbera*, *Rosa* And *Spathiphyllum* For Breeding Purposes. Acta Hort. (ISHS) 420:115-117
- ROUT, G.R., MOHAPATRA, A., MOHAN JAİN, S., 2006.** Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances, 24, 531-560.
- RAMIREZ-MALAGON R., BORODANENKO A, BARRERA-GUERRA JL, OCHOA-ALEJO,A. 2001.** Shoot number and shoot size affected by growth regulators *in vitro* culture of *Spathiphyllum floribundum* L. Sci. Hortic., 89:227-236.
- WERBROUCK, S.P.O., DEBERGH, P.C. 1995.** Imazalil Enhances The Shoot-Inducing Effect of Benzyladenine In *Spathiphyllum-Floribundum* Schott. Journal of Plant Growth Regulation 14 (2): 105-107 .
- WERBROUCK, S.P.O., REDİG, P., VANONCKELEN, H.A., DEBERGH, P.C. 1996.** Gibberellins Play a Role in the Interaction between Imidazole

Fungicides and Cytokinins In Araceae. Journal of Plant Growth Regulation 15 (2): 87-93 .

**WATAD, A.A, K.G., RAGHOTHAMA, M., KOCHBA, A., NİSSİM AND V. GABA, 1997.** Micropropagation of *Spathiphyllum* ve Syngonium is Facilitated by Use of Interfacial Membrane Rafts. HortScience, 32:307-308.

**YAZGAN, M.E., KORKUT, A.B., BARIŞ, E., ERKAL S., YILMAZ R., ERKEN, K., GÜRSAN, K, ÖZYAVUZ, M., 2005.** Süs Bitkileri Üretiminde Gelişmeler, Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1981 yılında Kilis’de doğdum. İlköğretim eğitimini Adana’ da, lise eğitimimi 1997 yılında Kilis’de tamamladıktan sonra 2001 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandım. 2006 Eylül ayında Çukurova Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans programına başladım.