

Dağ kekiği (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) Ietswaart)'nin mikroçoğaltımı

A. Haluk TÜRKER (Orcid: 0000-0001-5920-5615)^{1*}, Rüştü HATİPOĞLU (Orcid: 0000-0002-7977-0782)²

¹Orman Bölge Müdürlüğü, Orkøy Şube Müdürlüğü, ADANA

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, ADANA

*Sorumlu yazar/Corresponding author: abduhalukturker@ogm.gov.tr, Geliş tarihi/Received: 09.02.2018, Kabul tarihi/Accepted: 10.05.2018

Öz

Bu araştırmada, *Origanum syriacum* L. var. *bevanii* türünün doku kültürü (*in vitro*) yöntemiyle mikroçoğaltımı için rejenerasyon protokolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada, donör bitkilerden alınan çeşitli eksplantlar (yaprak diski, sap boğumu, tepe ve yan tomurcuk), 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit (2,4-D) veya Naftalen Asetik Asit (NAA) (0; 0,25; 0,5; 0,75 ve 1,0 mg/l) ve 6-Benzil Amino Pürin (BAP) veya Furfuryladenine (Kinetin) (0; 0,5; 1,0; 1,5 ve 2,0 mg/l) bitki büyüme düzenleyicilerinin tek başına ve farklı konsantrasyonda kombinasyonları ilave edilen Murashige ve Skoog (MS) temel besiy ortamında kültüre alınmıştır. Kültürler, 4-6 haftalık kültür süresi sonunda indüksiyon ortamıyla aynı içeriğe sahip alt kültür ortamlarına aktarılmış ve daha sonra da 2,4-D veya NAA (0; 0,1 ve 0,25 mg/l) ve BAP veya Kinetin (0,25; 0,5 ve 1,0 mg/l) ile kombine edilen farklı konsantrasyondaki rejenerasyon ortamlarına aktarılmıştır. Sürgünlerin köklendirilmesi amacıyla büyüme düzenleyici içermeyen ½MS ortamı kullanılmıştır.

Araştırma sonucunda, çoğul sürgün oluşumu ve fide üretimi için tepe ve yan tomurcuk eksplantlarının en uygun eksplant olduğu ve tek başına 1,5 mg/l BAP ilave edilen MS ortamının en uygun ortam olduğu belirlenmiştir. BAP ortamında gelişen sürgünlerin köklendirilmesinde ½MS ortamı başarılı olmuştur. Bununla birlikte, 1,0 mg/l NAA ilave edilen indüksiyon ortamında köklü tek sürgünler elde edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyon oranı (eksp-lant başına ortalama 36,0 adet sürgün) ve köklenme oranı (% 81,2); 1,5 mg/l BAP ilave edilen ortamda kültüre alınan yan tomurcuk eksplantlarından elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Origanum syriacum* L. var. *bevanii*, mikroçoğaltım, *in vitro*, eksplant, rejenerasyon

Micropropagation of bible hyssop (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) Ietswaart)

Abstract

The aim of this research was to determine the regeneration protocol for micropropagation of *Origanum syriacum* L. var. *bevanii* using tissue culture (*in vitro*) method.

In the research, the various explants (leaf disc, stem node, apical and axillary buds) from the donor plants were cultured on Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with alone and combinations of different concentrations of 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) or Naphthalene Acetic Acid (NAA) (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/l) and 6-Benzil Amino purine (BAP) or Furfuryladenine (Kinetin) (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) plant growth regulators. After four-six weeks of culture period, the cultures were transferred to the sub-culture medium having the same content as the induction medium. Then the cultures were transferred to the regeneration media containing different concentrations of 2,4-D or NAA (0, 0.1, 0.25 mg/l) in combination with BAP or Kinetin (0.25, 0.5, 1.0 mg/l). ½MS medium which does not contain growth regulators was used to root the shoots.

As a result of the research, it was determined that the apical or axillary bud explants were the most suitable explant for multiple shoot formation and plantlet regeneration and that MS medium with 1.5 mg/l BAP alone was the most suitable medium. ½MS medium was successful for rooting the shoots growing on the medium with BAP. However single shoots with roots were obtained in the induction medium supplemented with 1.0 mg/l NAA. The highest shoot regeneration ratio (an average of 36.0 shoots per explants) and rooting ratio (81.2%) was obtained from the axillary bud explants cultured in the medium supplemented with 1.5 mg/l BAP.

Keywords: *Origanum syriacum* L. var. *bevanii*, micropropagation, *in vitro*, explant, regeneration

To cite this article (Atıf): TÜRKER, A., HATİPOĞLU, R. (2018). Dağ kekiği (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) Ietswaart)'nin mikroçoğaltımı. Ormanlık Araştırma Dergisi, 5 (2), 97-111.
DOI: 10.17568/ogmoad.392869

1. Giriş

Bitki türlerinin istenilen özelliklere sahip genotiplerinin hızlı ve ekonomik bir şekilde klonlanması için doku kültürü (*in vitro*) teknikleri önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Ayrıca, bitki doku kültürleri gıda, kozmetik ve ilaç sanayinde kullanılan ekonomik öneme sahip doğal antioksidanlar gibi sekonder metabolitlerin kontrollü çevre şartlarında üretimi için tarla tarımı yanında alternatif bir üretim şekli sunmaktadır (Tisserat ve Vaughn, 2008; Grzegorzczuk ve ark., 2005). Günümüzde gittikçe yaygınlaşan modern biyoteknolojik yöntemlerden gen aktarma çalışmaları sonucunda elde edilen yeni bitkilerin çoğaltılmasında da doku kültürü tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır.

In vitro kültür teknikleri, bitkilerin totipotensi, yeniden farklılaşma ve kompotensi olmak üzere üç temel yeteneğine dayanmaktadır (Taji ve ark., 2002). Totipotensi, bir bitki hücresinin tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyelidir ve bir organizmanın büyüme ve yeniden üretimi için gerekli tüm bilgilerin tek bir hücrede yer aldığı anlamına gelmektedir. Yeniden farklılaşma, tam gelişmiş hücrelerin meristematik hücrelere geri dönüşüm kapasitesini ve Kompotensi ise bir hücre veya dokunun belirli bir şekilde gelişmesi için içsel potansiyelini ifade etmektedir. Kullanılan bitki parçalarına bağlı olarak da intakt (tohum), embriyo, organ (sürgün, kök, yaprak, anter), kallus, hücre (hücre süspansiyon) ve protoplast kültürü gibi çeşitli *in vitro* kültür tipleri bulunmaktadır.

Mikroçoğaltım, bir bitkinin tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip belirli kısımlarından suni besin ortamlarında ve steril koşullar altında fiziksel ve genetik olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitkinin hızlı çoğaltılması amacıyla kullanılan bir doku kültürü tekniğidir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Eğer bitkilerin uygun besin maddesi ihtiyaçları, hormon ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkün olabilmektedir.

Oksin grubu büyüme düzenleyicileri *in vitro* koşullarda meristem ve sürgün uçlarının başlangıç büyümesini yapmalarını sağlarlar ve adventif kök oluşumunu teşvik edip, genellikle sürgün oluşumunu engellerler (Machakova ve ark., 2008). Ancak, oksinlerin yüksek konsantrasyonları kallus oluşumunu teşvik eder. Sitokinin grubu büyüme düzenleyicileri ise adventif sürgün oluşumunu teşvik edip, kök oluşumunu engellerler (Van Staden ve ark., 2008).

Çeşitli morfogenetik değişimler için ihtiyaç duyulan

büyüme düzenleyicilerinin çeşidi ve oranı, metabolik durumlarına bağlı olarak dokudan dokuya ve hücreden hücreye değişiklik gösterdiği için tüm bitkilerde ve hatta aynı bitkinin tüm hücrelerinde totipotensi elde etmek için genel bir ortamın önerilmesi kolay bir iş değildir. Bunun yanında bazı türlerde *in vitro* üretimde türe özgü genetik yatkınlık olabildiği gibi genetik olumsuzluklar da görülebilmektedir. Bu genetik olumsuzlukların başında, ekspantların sterilizasyonu ve parçalara ayrılmasıyla oluşan kararma olayı gelmektedir (Larkin ve Scowcroft, 1981).

Çeşitli bitki eksplantları, besin ortamları, büyüme düzenleyicisi kombinasyonları, agar, sakkaroz ve yetiştirme koşulları kullanılarak *Origanum* cinsine ait tıbbi ve aromatik özellikteki türlerin *in vitro* koşullarda üretimine yönelik bazı çalışmalar yapılmıştır (Kumari ve Saradhi, 1992; Akbudak, 2002; Arafeh ve ark., 2003; Goleniowski ve ark., 2003; El-Gengaihi ve ark., 2006; Özkum, 2006; Morone-Fortunato ve Avato, 2008; Oana ve ark., 2008; Oluk ve Çakır, 2009; Çakır, 2011; Tanrıver, 2013). Bununla birlikte, *Origanum syriacum* türünde çok az sayıda araştırma yapıldığı görülmektedir (Arafeh ve ark., 2003; El-Gengaihi ve ark., 2006).

Bu çalışmada ülkemizin ticari ve ekonomik öneme sahip tıbbi ve aromatik bitkilerinden olan Dağ kekiği bitkisinin ülkemizin Doğu Akdeniz Bölgesinin değerli ekotiplerinin doku kültürü (*in vitro*) yöntemiyle mikroçoğaltımı için rejenerasyon protokolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Dağ kekiği (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii*) türünün Doğu Akdeniz Bölgesindeki doğal yayılış alanlarından (Tarsus-Damlama köyü-R: 480 m) çelikle alınarak çoğaltılan ve kültüre alma çalışmalarında yüksek herba ve uçucu yağ verimine sahip olduğu tespit edilen (Güllüba ve Özkurt, 2006) ve Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün araştırma alanına diki- len 62/2 nolu ekotipin fidanlık ortamındaki 1 yaşlı fidanlarının taze sürgünleri çalışmada bitki materyali olarak kullanılmıştır (Şekil 1).

2.2. Yöntem

2.2.1. Besi ortamlarının hazırlanması

Araştırmada temel besi ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamı kullanılmıştır. Bu temel besi ortamının içeriği Tablo 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Dağ kekiği bitkisi
Figure 1. Bible hyssop
(*Origanum syriacum* L. var. *bevanii*)

Tablo 1. Araştırmada kullanılan temel besi ortamının bileşimleri
Table 1. Composition of the basal medium used in the research

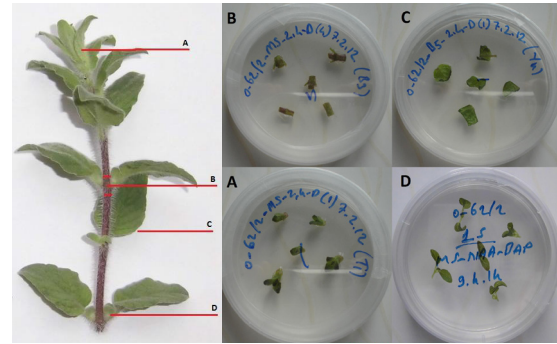
Bileşik	MS (mg/l)
Makro Elementler	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1.900
NH ₄ NO ₃	1.650
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
Mikro Elementler	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ ·H ₂ O	15,6
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
KI	0,83
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
Organik Maddeler	
Sakkaroz	30.000
Thiamin.HCl	0,1
Pyridoxin.HCl	0,5
Nikotinik Asit	0,5
Myo-İnositol	100
Glisin	2,0
pH	5,8
Agar	7.000

2.2.2. Eksplantların hazırlanması ve kültür ortamına yerleştirilmeleri

Eksplantların hazırlanması: Fidelerin 10-15 cm boyundaki taze sürgünleri havanın serin olduğu akşam saatlerinde kesilmiş ve içerisinde musluk suyu bulunan kavanozlara konularak dokuların sertleşmesinin sağlanması amacıyla buzdolabında +4 °C’de 1 gün süreyle bekletilmiştir.

Yüzey sterilizasyonu: Steril kültür ortamlarında meydana gelebilecek bakteri ve mantar enfeksiyonlarına karşı araştırmada kullanılacak eksplantların sterilizasyonu için taze sürgünlere % 70’lik etil alkol çözeltisi (5 sn), 3 damla Tween 20 ilave edilmiş % 1,25’lik sodyum hipoklorit çözeltisi (15 dk) işlemi ve ayrıca % 70’lik etil alkol (5 sn), % 1,0’lik sodyum hipoklorit çözeltisi (5 dk), 2,5 g/l fungusit (captan) çözeltisi işlemi uygulanarak, üç kez steril distile suyla durulanmıştır.

Steril kabin içerisinde sterilizasyon işlemi bitirilen sürgünlerin tepe tomurcuğu, sap boğumu, yaprak diskleri ve yan tomurcukları araştırmada eksplant olarak kullanılmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Eksplant olarak kullanılan bölümler:
A- Tepe tomurcuğu (T.T), B- Sap boğumu (S.B),
C- Yaprak diski (Y.D.), D- Yan tomurcuk (Y.T.)
Figure 2. Parts used as explants:
A- Apical bud, B- Stem node, C- Leaf disc,
D- Axillary bud

İndüksiyon aşaması: *In vitro* kültürün indüksiyon aşamasında, Tablo 2’de verilen oksin grubu (2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit - 2,4-D veya Naftalen Asetik Asit - NAA) ve sitokinin grubu (6-Benzil Amino Pürin - BAP veya Furfuryl adenine - Kinetin) bitki büyüme düzenleyicilerinin 24 farklı kombinasyonu (80 işlem) ilave edilen ve büyüme düzenleyici içermeyen (1 işlem) MS ortamının eksplantların gelişimi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Sterilizasyon uygulamalarından sonra steril kabin içerisinde cam petri kaplarında, sürgünlerden yukarıda açıklanan eksplantlar izole edilmiştir. Steril bistüri ile kesilerek ayrılan 4-5 mm’lik yaprak, sap boğumu, yan ve tepe tomurcuğu kısımları 10 ml besi ortamı içeren 60 x 15 mm boyutlarındaki petri kaplarına 5’er adet olarak yerleştirilmiştir. İçerisine 5 adet eksplant yerleştirilen her petri kabı bir deneme ünitesi olarak dikkate alınmış ve her eksplant-besi ve büyüme düzenleyici ortamı kombinasyonu için 5 tekrarlamaya (5 petri kutusu) yapılmıştır.

Kültür petrilere, 23 °C sıcaklık, % 70 nem, 16 saat fotoperyot ve 12.000 lüks ışık koşullarını sağlayan iklimlendirme kabini içinde inkübe edilmişlerdir.

Tablo 2. İndüksiyon aşamasında MS ortamına ilave edilen büyüme düzenleyicisi kombinasyonları
Table 2. Combinations of plant growth regulators added on MS medium during the induction stage

(Hormonsuz / Oksin +/- Sitokinin mg/l)			
Ortam No	2,4-D+BAP/ NAA+Kinetin	Ortam No	2,4-D+Kinetin/ NAA+BAP
0	0,00 + 0,00	0	0,00 + 0,00
1	0,25 + 0,00	2	0,00 + 0,50
3	0,50 + 0,00	4	0,00 + 1,00
5	0,75 + 0,00	6	0,00 + 1,50
7	1,00 + 0,00	8	0,00 + 2,00
9	0,25 + 0,50	9	0,25 + 0,50
10	0,25 + 1,00	10	0,25 + 1,00
11	0,25 + 1,50	11	0,25 + 1,50
12	0,25 + 2,00	12	0,25 + 2,00
13	0,50 + 0,50	13	0,50 + 0,50
14	0,50 + 1,00	14	0,50 + 1,00
15	0,50 + 1,50	15	0,50 + 1,50
16	0,50 + 2,00	16	0,50 + 2,00
17	0,75 + 0,50	17	0,75 + 0,50
18	0,75 + 1,00	18	0,75 + 1,00
19	0,75 + 1,50	19	0,75 + 1,50
20	0,75 + 2,00	20	0,75 + 2,00
21	1,00 + 0,50	21	1,00 + 0,50
22	1,00 + 1,00	22	1,00 + 1,00
23	1,00 + 1,50	23	1,00 + 1,50
24	1,00 + 2,00	24	1,00 + 2,00

Alt kültür aşaması: İndüksiyon aşamasında kallus oluşturan eksplantlar ve kallus oluşturmaya direkt sürgün oluşturan eksplantlar, gelişimlerini devam ettirmeleri amacıyla kararmış, çürümüş kallus veya eksplant parçalarından temizlenerek 4-6 hafta sonra indüksiyon ortamı ile aynı içeriğe sahip alt kültür ortamlarına aktarılmıştır.

Rejenerasyon aşaması: İndüksiyon ve alt kültür aşamaları sonunda (8-10 hafta) 2,4-D veya NAA içeren ortamlarda direkt sürgün ve kök oluşturan eksplantlar belirlenmiş ve araştırmada denenilen ortamlarda eksplantlardan oluşan kalluslar, bitki rejenerasyonunun sağlanması amacıyla Tablo 3'de gösterilen oksin (2,4-D veya NAA) ve sitokininlerin (BAP veya Kinetin) 9 farklı kombinasyonu (36 işlem) ilave edilen 25 ml MS ortamı bulunan 90x15 mm boyutlarındaki tek kullanımlık steril petrilere aktarılmıştır.

Köklenme aşaması: İndüksiyon ve alt kültür aşamaları sonunda tepe ve yan tomurcuk eksplantlarından gelişen ve kardeşlenme oluşturan sürgünler

tekleme yapıldıktan sonra daha fazla gelişme ve köklenme sağlanması amacıyla içerisinde (bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen) 15 ml ½MS ortamı bulunan cam tüplere aktarılmıştır. Her bir cam tüp bir deneme ünitesi olarak alınmış ve 5 tekrarlama yapılmıştır. *In vitro* kültürün başlangıcından 14 hafta sonra kök oluşumu gözlenen sürgünlerin sayısı belirlenmiştir.

Tablo 3. Rejenerasyon aşamasında MS ortamına ilave edilen büyüme düzenleyicisi kombinasyonları
Table 3. Combinations of plant growth regulators added on MS medium during the regeneration stage

(Oksin + Sitokinin mg/l)		
Ortam No	2,4-D+BAP/ NAA+Kinetin	2,4-D+Kinetin/ NAA+BAP
1	0,00 + 0,25	0,00 + 0,25
2	0,00 + 0,50	0,00 + 0,50
3	0,00 + 1,00	0,00 + 1,00
4	0,10 + 0,25	0,10 + 0,25
5	0,10 + 0,50	0,10 + 0,50
6	0,10 + 1,00	0,10 + 1,00
7	0,25 + 0,25	0,25 + 0,25
8	0,25 + 0,50	0,25 + 0,50
9	0,25 + 1,00	0,25 + 1,00

Dış ortama adaptasyon aşaması: Köklenmiş sürgünler steril torf ile doldurulmuş altı süzek yapıdaki fide tüplerine aktarılmış, fakat köklerde çürümeler oluşması nedeniyle bir diğer uygulama olarak 1/4 oranında çürütülmüş mısır sapı samanı ve 3/4 oranında briket toprağı (volkanik tüf) içeren karışım ortamlarına aktarılmıştır. Bitkiler, dış koşullara adaptasyon sağlamak açısından, 23 °C sıcaklık, % 70 nem, 16 saat fotoperyot ve 12.000 lüks ışık koşullarını sağlayan iklimlendirme kabini konulmuş ve 2 hafta süreyle günde 3-4 defa steril distile suyla sulanmıştır.

İklimlendirme kabini içinde 2 hafta bekletilen bitkiler, laboratuvar ortamında direkt güneş ışığı almayan pencere kenarına çıkartılmış ve günde 2 defa sulanarak burada 1 hafta gelişimleri izlenmiştir. Bu süre sonunda gelişimini sağlıklı olarak sürdüren bitkiler, kış aylarında cam sera koşullarına ve yaz aylarında gölgeleme sağlayan file örtü çekilmiş dış koşullardaki fidanlık ortamına alınmıştır.

2.2.3. İncelenen özellikler

2.2.3.1. Sürgün indüksiyon oranı

İndüksiyon aşaması sonunda (4-6 hafta) kültürler alt kültüre aktarılırken, her petri kutusunda sürgün oluşturan eksplantların sayısı belirlenmiş ve petri kutusu başına sürgün oluşturan eksplant sayısı petri kutusuna yerleştirilen eksplant sayısına oranlanarak

(Sürgün oluşturan eksplant sayısı / Explant sayısı) Sürgün indüksiyon oranları (%) belirlenmiştir.

2.2.3.2. Sürgün rejenerasyon oranı

İndüksiyon ve alt kültür aşamaları sonunda (8-10 hafta) eksplantlardan oluşan sürgünler sayılarak (Sürgün sayısı / Explant sayısı) Sürgün rejenerasyon oranları (adet) belirlenmiştir.

2.2.3.3. Köklenme oranı

İndüksiyon ve alt kültür aşamaları sonunda (8-10 hafta) tek başına 2,4-D veya NAA içeren ortamlarda direkt gelişerek köklenen tepe ve yan tomurcuk eksplantlarının ve tek başına BAP içeren ortamlarda gelişerek kardeşlenme oluşturan tepe ve yan tomurcuk eksplantlarında teklemeye yapıldıktan sonra büyüme düzenleyici içermeyen ½MS ortamına aktarılan sürgünlerin (14 hafta sonunda) Köklenme oranları (%) (Köklenen sürgün sayısı / Sürgün sayısı) belirlenmiştir.

2.2.4. İstatistiksel analizler

Dış koşullardan alınarak kullanılan eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemlerine rağmen meydana gelen yüksek enfeksiyon oranları yanında, uygulanan sterilizasyon işlemleri sonucunda özellikle de tomurcuk ve yan tomurcuk eksplantlarında meydana gelen kararmalar laboratuvar çalışmalarında elde edilen sonuçları sınırlamıştır. Bununla birlikte, araştırmada uygulanan denemelerden sonuç alınabilen verilerden istatistiksel olarak analiz edilebilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Araştırmadan elde edilen verilere tesadüf bloklarında Bölünen-Bölünen Bölünmüş Parseller Deneme Deseni'ne (Steel ve Torrie, 1960) uygun olarak MSTATC istatistik programında varyans analizi uygulanmıştır. Eksplantlar - temel besi ortamları - büyüme düzenleyicisi kombinasyonları deneme parsellerini oluşturmuştur. Sürgün indüksiyonu ve köklenme oranı gibi yüzde olarak ifade edilen değerlere Arcsin $\sqrt{x+0.001}$ transformasyonu, sürgün rejenerasyon oranı değerlerine ise $\sqrt{x+0.001}$ transformasyonu uygulanmıştır. Varyans analizinde önemli olduğu saptanan faktör ortalamalarının karşılaştırılması için Duncan testi kullanılmıştır.

3. Bulgular

3. 1. Sürgün indüksiyonu

Eksplantların kültüre alınmasından itibaren 14 hafta boyunca yapılan periyodik gözlemlerde; kültürün birinci haftasından itibaren özellikle bazı tepe ve yan tomurcuk eksplantlarında yaprak primordialelerinin gelişerek yaprak haline geldiği gözlenmiştir. Kültür başlangıcından 3 hafta sonra,

özellikle sap boğumu, tepe ve yan tomurcuklardan ortaya çıkan sürgünler daha belirgin hale gelmiştir.

Sadece oksin içeren indüksiyon ortamları karşılaştırıldığında, NAA'nın 2,4-D'ye kıyasla sürgün indüksiyonunda çok daha etkili olduğu ve sağlıklı sürgünler oluştuğu, NAA içeren ortamlarda ilk haftadan itibaren sürgünlerin tek ve sağlıklı olarak geliştiği, 2,4-D içeren ortamlarda ise yine ilk haftadan itibaren sürgünlerin gelişmeye başladığı, fakat sürgünlerin dip kısımlarında kallus oluşumlarının başladığı, şişkinleştiği ve deforme oldukları ve ikinci haftadan sonra sürgünlerin çürümeye başladıkları gözlenmiştir.

Sadece sitokinin içeren indüksiyon ortamları karşılaştırıldığında, BAP'ın Kinetin'e kıyasla çok daha etkili olduğu ve sağlıklı sürgünler oluştuğu, BAP içeren ortamlarda ilk haftadan itibaren sürgünlerin geliştiği, ikinci haftadan itibaren yan sürgünlerin geliştiği, üçüncü haftadan itibaren de kardeşlenmenin ve çoğul sürgünlerin oluşmaya başladığı (Şekil 3), Kinetin içeren ortamda ise çok daha az oranda olmak üzere ilk haftadan itibaren tek sürgünlerin gelişmeye başladığı, fakat sürgün gelişimin çok yavaş ilerlediği ve üçüncü haftadan itibaren tek sürgünlerin deforme olmaya başladığı gözlenmiştir.



Şekil 3. BAP içeren indüksiyon ortamlarında gelişen tepe ve yan tomurcuk eksplantlarında sürgün oluşumları

Figure 3. Shoots emerged from apical and axillary buds grown in induction media with BAP

2,4-D veya NAA'nın BAP veya Kinetin ile birlikte kullanıldığı indüksiyon ortamlarında 2,4-D içeren kombinasyonlarda çoğunlukla sürgünlerin bir miktar gelişmeyle birlikte büyüyerek deforme olduğu ve kallus geliştirmeye başlayarak karardığı, NAA içeren kombinasyonlarda az sayıda da olsa çoğunlukla yavaş bir şekilde sürgünlerin büyümeye başladığı yüksek dozlarda sürgünlerin deforme olduğu ve dip kısımlarda kallus oluşumları başladığı gözlenmiştir.

3. 1. 1. Oksinlerin sürgün indüksiyon oranına etkisi

2,4-D veya NAA (0,25; 0,50; 0,75 ve 1,0 mg/l) içeren MS ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda saptanan sürgün indüksiyon oranı değerlerine ait

varyans analizi sonuçları Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4'de görüldüğü gibi, oksin çeşidi ve eksplant tipi sürgün indüksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir. Ayrıca, oksin çeşidi x eksplant tipi interaksyonunun sürgün indüksiyonu açısından istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Sürgün indüksiyon oranı ortalama % 9,2 olarak gerçekleşmiştir (Tablo 5).

NAA içeren ortamlarda kültüre alınan eksplantlar 2,4-D içeren ortamlarda kültüre alınanlara göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek sürgün indüksiyon oranı göstermiştir. Nitekim NAA içeren ortamlarda kültüre alınan eksplant tiplerinin sürgün indüksiyon oranı ortalaması % 17,8 olmasına karşılık, 2,4-D ortamında ortalama % 0,6 olmuştur.

Eksplant tipi sürgün indüksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir. Nitekim tepe tomurcuğu eksplantları test edilen diğer eksplantlara göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek sürgün indüksiyon oranı ortalaması (% 16,6) göstermiştir.

Varyans analizi sonuçlarına göre oksin çeşidi x eksplant tipi interaksyonunun istatistiksel olarak önemli çıkması, oksinlerin sürgün indüksiyon oranı üzerine etkisinin eksplant tipine bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır.

3.1.2. Sitokininlerin sürgün indüksiyon oranına etkisi

BAP veya Kinetin (0,5; 1,0; 1,5 ve 2,0 mg/l) içeren MS ortamında kültüre alınan tepe ve yan tomurcularda saptanan sürgün indüksiyon oranı değerlerine ait varyans analizi sonuçları Tablo 6'da verilmiştir. Tablo 6'da görüldüğü gibi, sitokinin çe-

şidi tepe ve yan tomurcuk eksplantlarında sürgün indüksiyonunu istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir. Ayrıca sitokininin çeşidi x sitokinin konsantrasyonu interaksyonunun sürgün indüksiyon oranı açısından istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya çıkmıştır.

BAP veya Kinetin içeren MS ortamında kültüre alınan tepe ve yan tomurcuk eksplantlarında ortalama sürgün indüksiyon oranı % 33,54 olarak gerçekleşmiştir (Tablo 7).

Tablo 4. 2,4-D veya NAA'nın sürgün indüksiyon oranı değerlerine ait varyans analizi sonuçları
Table 4. Variance analysis results of the shoot induction ratio of 2,4-D or NAA

Varyasyon Kaynağı	S.D.	K.O.	F Değeri
Tekerrür	2	509,069	1,9323ns
Oksin Çeşidi	1	6.989,497	26,5310*
Hata 1	2	263,447	
Oksin Kons.	3	47,893	0,2799
Ok. Ç.xOk.Kon.	3	201,221	1,1758
Hata 2	12	171,133	
Eksplant	3	1.142,502	10,4350***
OksinxEksplant	3	769,132	7,0249***
Ok.Kons.xEks.	9	214,747	1,9614
O.Ç.xO.K.xEks.	9	154,797	1,4138
Hata 3	48	109,487	
Genel	95		

* : P≤0,05 düzeyinde önemli , *** : P≤0,001 düzeyinde önemli

Tablo 5. 2,4-D veya NAA'nın sürgün indüksiyon oranı ortalamaları (%)
Table 5. Averages of the shoot induction ratio of 2,4-D or NAA

Oksin	Eksplant				Ortalama
	S. Boğumu	T. Tomurcuk	Yaprak Diski	Y. Tomurcuk	
2,4-D	0,0 (0,2)* c ³	1,67 (3,2) c	0,0 (0,2) c	0,7 (2,1) c	0,6 (1,4) B ¹
NAA	20,0 (18,2) b	31,5 (33,8) a	2,8 (3,1) c	16,9 (18,8) b	17,8 (18,5) A
Ortalama	10,0 (9,2) B ²	16,6 (18,5) A	1,4 (1,6) C	8,8 (10,5) B	9,2 (9,9)

* Açık Değerleri; 1) Farklı büyük harf ile gösterilen oksin çeşidi ortalamaları istatistiksel olarak birbirinden farklıdır 2) Farklı büyük harf ile gösterilen eksplant çeşidi ortalamaları Duncan testine göre P≤0,05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır 3) Farklı harf ile gösterilen oksin çeşidi-eksplant kombinasyonu ortalamaları Duncan testine göre P≤0,05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

Tablo 6. BAP veya Kinetinin sürgün indüksiyon oranı değerlerine ait varyans analizi sonuçları
Table 6. Variance analysis results of the shoot induction ratio of BAP or Kinetin

Varyasyon Kaynağı	S.D.	K. O.	F Değeri
Tekerrür	3	370,338	7,1811
Sitokinin Çeşidi	1	36.539,366	708,5260***
Hata 1	3	51,571	
Sito. Konsant.	3	152,563	1,1403ns
Sit. Ç.x S. Kon.	3	443,193	3,3126*
Hata 2	18	133,788	
Eksplant	1	250,875	1,8290
Sit.Ç. x Eks.	1	24,457	0,1783
Sit. Kon x Eks.	3	78,946	0,5756
Sit.ÇxS.Kon.xE.	3	22,595	0,1647
Hata 3	24	137,166	
Genel	63		

* P≤0,05 düzeyinde önemli , *** P≤0,001 düzeyinde önemli

Sitokininler sürgün indüksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiş ve BAP içeren ortamlarda kültüre alınan tepe ve yan tomurcuk eksplantları % 63,4 sürgün indüksiyon oranı ortalaması ile Kinetine göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek sürgün indüksiyon oranı ortalaması göstermiştir.

Sitokininin dozuna bağlı olarak sürgün indüksiyon oranı ortalaması % 27,4 ile % 37,3 arasında de-

ğişmiş ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı ortaya çıkmıştır. Ancak sitokininin çeşidi x sitokinin konsantrasyonunun istatistiksel olarak önemli çıkması (Tablo 6), sitokinin konsantrasyonunun sürgün indüksiyonu üzerindeki etkisinin sitokinin çeşidine bağlı olarak önemli derecede farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Nitekim BAP konsantrasyonunun 0,5 mg/l'den 1,0 mg/l'ye çıkartılması sürgün indüksiyon oranında istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmuş, konsantrasyonun 1,0 mg/l'nin üzerine çıkartılması 1,0 mg/l'ye göre istatistiksel olarak önemli bir farklılık yaratmamıştır (Tablo 7). Bununla birlikte denenen Kinetin konsantrasyonları sürgün indüksiyon oranında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yaratmamıştır.

Tepe tomurcuğu eksplantlarında sürgün indüksiyon oranı ortalaması % 35,8 olmasına karşılık, yan tomurcuk eksplantlarında bu oran % 31,3 olarak saptanmış ve istatistiksel olarak birbirinden farklılık göstermemiştir.

3. 2. Sürgün rejenerasyonu

İndüksiyon ortamında oluştuktan sonra alt kültür ortamına aktarılan sürgünler 4 hafta sonunda kardeşlenmişlerdir. Oluşan sürgünler sayılarak, Sürgün Rejenerasyon Oranları belirlenmiştir.

Sürgün rejenerasyon oranları bakımından sürgün indüksiyonunda olduğu gibi NAA oksininin 2,4-D

Tablo 7. BAP veya Kinetinin sürgün indüksiyon oranı ortalamaları (%)
Table 7. Averages of the shoot induction ratio of BAP or Kinetin

Sitokinin	Eksplant	Doz (mg/l)				Ortalama
		0,5	1,0	1,5	2,0	
BAP	T. Tomurcuk	49,6 (44,7)*	70,0 (56,8)	77,5 (61,8)	71,6 (57,9)	67,2 (55,3)
		45,0 (38,4)	62,5 (53,1)	60,0 (51,1)	71,3 (57,9)	59,7 (50,1)
	Ortalama	47,3 (41,6)b ²	66,3 (55,0)a	68,8 (56,4)a	71,4 (57,9)a	63,4 (52,7)A ¹
	Kinetin	T. Tomurcuk	5,0 (6,8)	2,5 (4,7)	10,0 (13,4)	0,0 (0,2)
10,0 (9,9)			0,0 (0,2)	1,7 (3,9)	0,0 (0,2)	2,9 (3,5)
Ortalama		7,5 (8,4)c	1,3 (2,5)c	5,8 (8,6)c	0,0 (0,2)c	3,6 (4,9)B
Ortalama		27,4 (25,0)	33,8 (28,7)	37,3 (32,5)	35,7 (29,0)	33,5 (28,8)
	T. Tomurcuk - Y. Tomurcuk	35,8 (30,8)	31,3 (26,8)			

* Açık Değerleri; 1) Farklı büyük harf ile gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. 2) Benzer küçük harf ile gösterilen sitokininin çeşidi- sitokinin konsantrasyonu ortalamaları Duncan testine göre P≤0,05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

oksinine kıyasla ve BAP sitokininin Kinetin sitokininine kıyasla çok daha etkili olduğu belirlenmiştir.

3.2.1. Oksinlerin sürgün rejenerasyon oranına etkisi

2,4-D veya NAA (0,25; 0,50; 0,75 ve 1,0 mg/l) içeren MS ortamında kültüre alınan eksplantlarda saptanan sürgün rejenerasyon oranı değerlerine ait varyans analizi sonuçları Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8'de görüldüğü gibi, oksin çeşidi ve eksplant tipi sürgün rejenerasyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir. Ayrıca oksin çeşidi x eksplant etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya çıkmıştır.

MS ortamında kültüre alınan eksplantların sürgün rejenerasyon oranı ortalaması 0,20 sürgün/eksplant olarak gerçekleşmiştir (Tablo 9).

NAA içeren ortamda kültüre alınan eksplantların sürgün rejenerasyon oranı ortalaması (0,37 sürgün/eksplant) 2,4-D içeren ortama kıyasla (0,02 sürgün/eksplant) istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek olmuştur.

NAA içeren ortamlarda 2,4-D içeren ortamlara göre istatistiksel olarak önemli derecede daha

yüksek sürgün indüksiyon oranı ortalaması elde edilmesi (Tablo 5) nedeniyle NAA içeren ortamlarda sürgün rejenerasyon oranının 2,4-D içeren ortamlardakine göre daha yüksek olması beklenen bir sonuçtur.

Tablo 8. 2,4-D veya NAA'nın sürgün rejenerasyon oranı değerlerine ait varyans analizi sonuçları
Table 8. Variance analysis results of the shoot regeneration ratio of 2,4-D or NAA

Varyasyon Kaynağı	S.D.	K.O.	F Değeri
Tekerrür	2	0,244	2,5352
Oksin Çeşidi	1	3,271	33,9737*
Hata 1	2	0,096	
Oksin Kons.	3	0,005	0,0691
Ok. Ç. x O. Kons.	3	0,103	1,5294
Hata 2	12	0,068	
Eksplant	3	0,880	17,7087***
Oksin Ç. x Eksplant	3	0,549	11,0393***
Ok. Kons. x Eks.	9	0,066	1,3226
Ok.Ç.xOk.Kon.xEk.	9	0,040	0,8101
Hata 3	48	0,050	
Genel	95		

* P≤0,05 düzeyinde önemli, *** P≤0,001 düzeyinde önemli

Tablo 9. 2,4-D veya NAA'nın sürgün rejenerasyon oranı ortalamaları
Table 9. Averages of the shoot regeneration ratio of 2,4-D or NAA

Oksin	Eksplant				Ortalama
	S. Boğumu	T. Tomurcuk	Yaprak Diski	Y. Tomurcuk	
2,4-D	0,0 (0,03)*c ³	0,06 (0,12)c	0,0 (0,03)c	0,04 (0,10)c	0,02 (0,07)B ¹
NAA	0,33 (0,39)b	0,76 (0,86)a	0,0 (0,03)c	0,39 (0,48)b	0,37 (0,44)A
Ortalama	0,17 (0,21)B ²	0,41 (0,49)A	0,0 (0,03)C	0,21 (0,29)B	0,20 (0,26)

* Karekök Değerleri; 1) Aynı sütun içerisinde farklı büyük harf ile gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır; 2) Aynı satır içerisinde farklı büyük harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0,05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır 3) Farklı küçük harf ile gösterilen oksin çeşidi- eksplant kombinasyonu ortalamaları Duncan testine göre P≤0,05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

İncelenen 4 eksplant tipi içerisinde tepe tomurcuğu eksplantları 0,41 sürgün/eksplant rejenerasyon oranı ile diğer eksplant tiplerine göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek sürgün rejenerasyon oranı ortalaması göstermiştir.

Oksin çeşidi x eksplant tipi etkileşiminin istatistiksel olarak önemli çıkması, incelenen oksinlerin sürgün rejenerasyon oranı üzerindeki etkisinin eksplant tipine bağlı olarak önemli derecede farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır (Tablo 8). Nitekim sap boğumu, tepe ve yan tomurcuk eksplantları NAA içeren ortamlarda 2,4-D içeren

ortamlara göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek sürgün rejenerasyon oranı ortalaması göstermesine karşılık, yaprak diski eksplantlarında oksin tipine bağlı olarak önemli bir farklılık görülmemiştir (Tablo 9).

3.2.2. Sitokininlerin sürgün rejenerasyon oranına etkisi

BAP veya Kinetin (0,5; 1,0; 1,5 ve 2,0 mg/l) içeren MS ortamında kültüre alınan tepe ve yan tomurcuk eksplantlarında saptanan sürgün rejenerasyon oranı değerlerine ait varyans analizi sonuçları Tablo

10'da verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi sitokinin çeşidi ve sitokinin konsantrasyonu, sitokinin çeşidi X sitokinin konsantrasyonu, sitokinin konsantrasyonu X eksplant ve sitokinin çeşidi X sitokinin konsantrasyonu X eksplant interaksyonlarının sürgün rejenerasyon oranı açısından istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya çıkmıştır.

Tablo 10. BAP veya Kinetinin sürgün rejenerasyon oranı değerlerine ait varyans analizi sonuçları
Table 10. Variance analysis results of the shoot regeneration ratio of BAP or Kinetin

Varyasyon Kaynağı	S.D.	K.O.	F Değeri
Tekerrür	3	0,345	24,2889*
Sitokinin Çeş.	1	147,370	10.386,2764***
Hata 1	3	0,014	
Sito. Kon.	3	12,912	42,9916***
Sit.Ç. x S.Kon.	3	13,460	44,8161***
Hata 2	18	0,300	
Eksplant	1	0,441	1,6205
Sit.Ç. x Eks.	1	1,070	3,9333
S. Kon. x Eks.	3	1,716	6,3068**
S.Ç.xS.K.xEk.	3	2,460	9,0408***
Hata 3	24	0,272	
Genel	63		

*P≤0,05; **P≤0,01, ***P≤0,001 düzeyinde önemli

Tepe ve yan tomurcuk eksplantlarının sürgün rejenerasyon oranı ortalaması 6,8 sürgün/eksplant olarak gerçekleşmiştir (Tablo 11).

BAP içeren ortamlarda kültüre alınan eksplantların sürgün rejenerasyon oranı ortalaması (13,5 sürgün/eksplant) Kinetin içeren ortama (0,1 sürgün/eksplant) göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek olmuştur.

BAP içeren ortamlarda sürgün indüksiyon oranının Kinetin içeren ortama göre daha yüksek olması nedeniyle (Tablo 7), BAP içeren ortamlarda kültüre alınan eksplantların sürgün rejenerasyon oranının Kinetin içeren ortama göre daha yüksek olması beklenen bir sonuçtur.

Sitokinin konsantrasyonunun 0,5 mg/l'den 1,5 mg/l'ye kadar artırılması ile sürgün rejenerasyon oranı ortalaması istatistiksel olarak önemli derecede artmış, 1,5 mg/l'den 2,0 mg/l'ye çıkartılması önemli bir farklılık yaratmamıştır. Ancak sitokinin çeşidi x sitokinin konsantrasyonu interaksyonunun istatistiksel olarak önemli çıkması (Tablo 10), sitoki-

nin konsantrasyonunun sürgün rejenerasyon oranı üzerindeki etkisinin sitokinin çeşidine bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 11. BAP veya Kinetinin rejenerasyon oranı ortalamaları
Table 11. Averages of the shoot regeneration ratio of BAP or Kinetin

Sitokinin	Doz mg/l	Eksplant		Ort.
		T.T.	Y.T.	
BAP	0,50	2,04 (1,4)* e ⁵	0,9 (0,8) ef	1,5 (1,1) c ³
	1,00	5,8 (2,4) d	5,4 (2,2) d	5,6 (2,3) b
	1,50	12,8 (3,4) c	36,0 (6,0) a	24,4 (4,7) a
	2,00	23,0 (4,8) b	22,4 (4,7) b	22,7 (4,7) a
	Ort.	10,9 (3,0)	16,2 (3,4)	13,5 (3,2) A ¹
Kinetin	0,50	0,1 (0,2) f	0,3 (0,3) f	0,2 (0,2) d
	1,00	0,1 (0,2) f	0,0 (0,03) f	0,06 (0,1) d
	1,50	0,4 (0,4) f	0,1 (0,2) f	0,2 (0,3) d
	2,00	0,0 (0,03) f	0,0 (0,03) f	0,0 (0,03) d
	Ort.	0,2 (0,2)	0,1 (0,1)	0,1 (0,2) B
Doz (mg/l)	0,50	1,1 (0,8) cd ⁴	0,6 (0,5) d	0,8 (0,7) C ²
	1,00	2,9 (1,3) c	2,7 (1,1) c	2,8 (1,2) B
	1,50	6,6 (1,9) b	18,0 (3,1) a	12,3 (2,5) A
	2,00	11,5 (2,4) b	11,2 (2,4) b	11,3 (2,4) A
	Ortalama	5,5 (1,6)	8,1 (1,8)	6,8 (1,7)

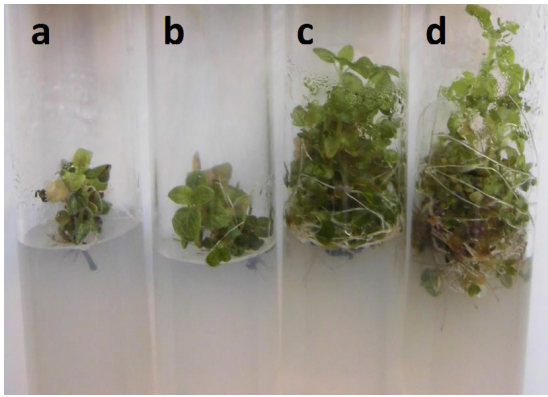
* Karekök değerleri; 1) Farklı büyük harf ile gösterilen sitokinin çeşidi ortalamaları istatistiksel olarak birbirinden farklıdır 2) Farklı büyük harf ile gösterilen sitokinin konsantrasyonu ortalamaları P≤0,05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır 3) Farklı küçük harf ile gösterilen sitokinin çeşidi- sitokinin konsantrasyonu kombinasyonu ortalamaları Duncan testine göre P≤0,05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır 4) Farklı küçük harf ile gösterilen sitokinin konsantrasyonu-eksplant kombinasyon ortalamaları Duncan testine göre P≤0,05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır 5) Farklı küçük harf ile gösterilen sitokinin çeşidi-sitokinin konsantrasyonu- eksplant kombinasyon ortalamaları Duncan testine göre P≤0,05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

Nitekim BAP konsantrasyonunun 0,5 mg/l'den 1,5 mg/l'ye kadar artırılması ile sürgün rejenerasyon

oranında istatistiksel olarak önemli derecede artış sağlanmasına karşılık, farklı Kinetin konsantrasyonları sürgün rejenerasyon oranında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yaratmamıştır (Tablo 11; Şekil 4-5).



Şekil 4. BAP ve Kinetinin farklı konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyon oranına etkileri
Figure 4. Effects of different concentrations of BAP and Kinetin on the shoot regeneration ratio



Şekil 5. BAP'ın farklı konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyon oranına etkileri
(a: 0,5; b: 1,0; c: 1,5; d: 2,0 mg/l)

Figure 5. Effects of different concentrations of BAP on the shoot regeneration ratio

Varyans analizi sonuçlarına göre sitokinin konsantrasyonu x eksplant interaksyonunun istatistiksel olarak önemli çıkması, sürgün rejenerasyon oranı açısından eksplant tiplerinin birbirine karşı durumunun besi ortamındaki sitokinin konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır.

Nitekim 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/l sitokinin içeren ortamlarda eksplant tipleri arasında sürgün rejenerasyon oranı açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmamasına karşılık, 1,5 mg/l sitokinin içeren ortamda yan tomurcuk eksplantları tepe tomurcuğu eksplantlarına göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek sürgün rejenerasyon oranı ortalaması göstermiştir.

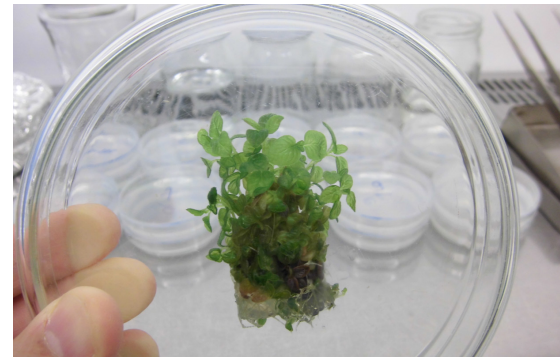
Eksplant tiplerinin sürgün rejenerasyon oranı açısından farklılıkları, sitokinin çeşidi x sitokinin konsantrasyonu etkileşiminde de görülmüştür. Nitekim 1,5 mg/l BAP içeren ortamda yan tomurcuklar tepe tomurcuklarına göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek sürgün rejenerasyon oranı ortalaması göstermiş (36,0 adet sürgün/eksplant), diğer kombinasyonlarda eksplant tipleri arasında sürgün rejenerasyon oranı açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık ortaya çıkmamıştır.

3.3. Köklenme ile ilgili bulgular

İndüksiyon ortamlarında özellikle de NAA veya düşük konsantrasyonlarda 2,4-D içeren ortamlarda rejenere olan sürgünler aynı ortamda kök oluşturmıştır.

Sitokinin içeren indüksiyon ortamlarında rejenere olan çoğul sürgünler indüksiyon ortamlarında kök oluşturamamış, tekleme yapılarak köklendirilmek için büyüme düzenleyicisi içermeyen ½MS ortamına aktarılmıştır (Şekil 6).

BAP etkisiyle gelişen ve tekleme yapılarak ½MS ortamına aktarılan sürgünler bu ortamda 6 haftada (*in vitro* kültürün başlangıcından 14 hafta sonunda) sağlıklı olarak köklenmiştir (Şekil 7). Ayrıca ½MS ortamı sürgün gelişimini de desteklemiştir.



Şekil 6. Tekleme yapılarak köklendirme ortamlarına aktarılan sürgünler

Figure 6. The shoots thinned and transferred to the rooting media



Şekil 7. 1/2MS ortamında gelişen ve köklenen sürgünler
Figure 7. The shoots grown and rooted on 1/2MS medium

3.3.1. İndüksiyon ortamında oksinlerin (2,4-D ve NAA) köklenme oranına etkisi

İndüksiyon aşamasında 2,4-D veya NAA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan tepe ve yan tomurcuk eksplantlarından rejenere olan sürgünlerden aynı alt kültür ortamında kök oluşturanların % olarak saptanan oranlarına ait varyans analizi sonuçları Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. 2,4-D veya NAA'nın köklenme oranı değerlerine ait varyans analizi sonuçları
Table 12. Variance analysis results of the rooting ratio of 2,4-D or NAA

Varyasyon Kaynağı	S.D.	K.O.	F Değeri
Tekerrür	1	412,135	1,6960
Oksin Uygulaması	4	1.914,739	7,8795*
Hata 1	4	243,002	
Eksplant	1	38,130	0,1468
Oksin Uygu. x Eks.	4	731,670	2,8169
Hata 2	5	259,741	
Genel	19		

*P≤0,05 düzeyinde önemli

Tablo 12'de görüldüğü gibi oksin uygulaması, indüksiyon ortamında oluşan sürgünlerin köklenme oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir. Eksplant tipi ise, indüksiyon ortamında oluşan sürgünlerin köklenme oranına istatistiksel olarak önemli etkide bulunmamıştır.

0,25 mg/l 2,4-D veya NAA'nın 4 farklı konsantrasyonunu (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mg/l) içeren MS besi

ortamında kültüre alınan tepe ve yan tomurcuk eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin aynı ortamda köklenme oranı ortalaması % 27,7 olmuştur (Tablo 13).

Tablo 13. 2,4-D veya NAA'nın köklenme oranı ortalamaları (%)

Table 13. Averages of the rooting ratio of 2,4-D or NAA

Oksin (mg/l)	Eksplant		Ortalama
	Tepe Tomurcuğu	Yan Tomurcuk	
0,25 mg/l 2,4-D	8,3 (13,0)*	16,7 (18,6)	12,5 (15,8) B ¹
0,25 mg/l NAA	15,0 (22,6)	0,0 (1,812)	7,5 (12,2) B
0,50 mg/l NAA	23,3 (28,7)	8,3 (13,0)	15,8 (20,9) B
0,75 mg/l NAA	26,7 (31,0)	33,3 (28,3)	30,0 (29,6) B
1,0 mg/l NAA	45,8 (42,6)	100 (90,0)	72,9 (66,3) A
Ortalama	23,8 (27,6)	31,6 (30,3)	27,7 (29,0)

* Açık değerleri; 1) Farklı büyük harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0,05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

Oksin uygulamaları indüksiyon ortamında oluşan sürgünlerin köklenme oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir. 1,0 mg/l NAA içeren ortamda rejenere olan sürgünlerin köklenme oranı (% 72,9) 0,25 mg/l 2,4-D veya diğer NAA konsantrasyonlarını içeren ortamlardakine göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek olmuştur. Bu bulgular, özellikle NAA'nın düşük konsantrasyonlarının indüksiyon ortamında oluşan sürgünlerin köklenmesi için yeterli gelmediğini, 1,0 mg/l NAA içeren MS ortamında ise rejenere olan sürgünlerin aynı zamanda köklenebildiğini ortaya koymaktadır.

0,25 mg/l 2,4-D veya NAA'nın farklı dört konsantrasyonunu içeren MS ortamında kültüre alınan tepe ve yan tomurcuklardan rejenere olan sürgünler indüksiyon ortamında köklenme oranı açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermemekle birlikte, tepe tomurcuklarından rejenere olan sürgünlerin ortalama % 23,8'i, yan tomurcuklardan rejenere olan sürgünlerin ortalama % 31,6'sı köklenmiştir.

3.3.2. BAP ortamında tepe ve yan tomurcuklardan rejenere olan sürgünlerin ½MS ortamındaki köklenme oranları

İndüksiyon aşamasında farklı konsantrasyonlarda (0,5; 1,0; 1,5 ve 2,0 mg/l) BAP içeren MS ortamlarında kültüre alınan tepe ve yan tomurcuk eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin aktarıldıkları büyüme düzenleyicisi içermeyen ½ MS ortamındaki köklenme oranlarına ait varyans analizi sonuçları Tablo 14’de verilmiştir.

Tablo 14. BAP içeren MS ortamlarında tepe ve yan tomurcuk eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin ½ MS ortamındaki köklenme oranı (%) değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Table 14. Variance analysis results of rooting ratio (%) of shoots, regenerated from apical and axillary buds on MS medium with BAP, on ½ MS medium

Varyasyon Kaynağı	S.D.	K.O.	F Değeri
Tekerrür	3	322,834	0,4019
BAP Konsant.	3	5.140,756	6,399*
Hata 1	9	803,330	
Eksplant	1	390,262	1,8380
BAP Kons. x Eks.	3	320,240	1,5080
Hata 2	12	212,357	
Genel	31		

*P≤0,05 düzeyinde önemli

Tablo 14’te görüldüğü gibi BAP konsantrasyonu, BAP içeren ortamlarda rejenere olan sürgünlerin köklenme oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemişken, eksplant tipinin köklenme oranına etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ortaya çıkmıştır.

BAP içeren MS ortamlarında kültüre alınan tepe ve yan tomurcuk eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin ½ MS ortamındaki köklenme oranı ortalaması ise % 43,5 olmuştur (Tablo 15).

İndüksiyon ortamındaki BAP konsantrasyonunun 1,5 mg/l’ye kadar artırılması bu ortamlarda tepe ve yan tomurcuklardan oluşan sürgünlerin köklenme ortamındaki köklenme oranını istatistiksel olarak önemli düzeyde (% 65,6) artırmıştır. İndüksiyon ortamında BAP konsantrasyonunun 1,5 mg/l’den 2,0 mg/l’ye çıkartılması ile elde edilen % 73 köklenme oranı söz konusu ortamda rejenere olan sürgünlerin köklenme oranında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yaratmamıştır.

Tepe ve yan tomurcuklardan rejenere olan sürgünlerin köklenme ortamındaki köklenme oranı sürgünlerin rejenere olduğu eksplant tipine bağlı olarak önemli derecede farklılık göstermemiştir

(Tablo 14). Nitekim tepe tomurcuklarından rejenere olan sürgünlerin köklenme oranı ortalaması % 37,4 olmasına karşılık, yan tomurcuklardan rejenere olan sürgünlerin köklenme oranı % 49,7 olmuştur (Tablo 15).

Tablo 15. BAP içeren MS ortamlarında tepe ve yan tomurcuk eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin ½ MS ortamındaki köklenme oranı ortalamaları (%)

Table 15. Averages (%) of rooting ratio on ½ MS medium of shoots regenerated from apical and axillary buds on MS medium with BAP

BAP Konsant. (mg/l)	Eksplant		Ortalama
	Tepe Tomurcuğu	Yan Tomurcuk	
0,5	6,3 (8,9)*	0,0 (1,8)	3,1 (5,3) B ¹
1,0	22,2 (25,2)	42,7 (34,7)	32,5 (30,0) AB
1,5	50,0 (45,5)	81,2 (68,5)	65,6 (57,0) A
2,0	71,2 (57,7)	74,7 (60,1)	73,0 (58,9) A
Ortalama	37,4 (34,3)	49,7 (41,3)	43,5 (37,8)

* Açık değerleri; 1) Farklı büyük harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0,05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır



Şekil 8. Fidan tüplerine aktarılmış ve iklim dolabına yerleştirilmiş dağ kekiği bitkicikleri

Figure 8. Plantlets of bible hyssop that were transferred to seedling tubes and put in climate cabinet



Şekil 9. Saksıya aktarılmış dağ kekiği bitkisi

Figure 9. Bible hyssop transferred to pot

Köklendirilen Dağ kekiği bitkicikleri fide tüplerine aktarılmış, iklimlendirme kabini ve laboratuvar ortamında dış koşullara alıştırıldıktan sonra saksılara aktarılmıştır (Şekil 8-9).

4. Tartışma ve Sonuç

Araştırmada en sağlıklı ve büyük kallus oluşumlarının yalnızca 2,4-D içeren indüksiyon ortamlarında (Tablo 2; 1,3,5,7) gerçekleştiği gözlenmiştir. NAA kullanılan indüksiyon ortamlarında küçük-cıltz kallus oluşumları gözlenmiş, fakat bu kallus oluşumları büyümeyerek gelişme göstermemiştir. 2,4-D'nin BAP veya Kinetin ile birlikte kombine edildiği ortamlarda eksplantlardan deforme şeklinde büyümeler yanında çok fazla gelişmeyen kallus oluşumları ortaya çıkmıştır. NAA ve BAP veya Kinetin büyüme düzenleyicilerinin birlikte kombine edildiği ortamlarda deforme şeklinde büyümeler yanında kallus oluşumları görülmüş, fakat kallus oluşumları gelişmemiştir.

Eksplantların kültüre alınmasından itibaren 14 hafta boyunca yapılan periyodik gözlemlerde, sürgün indüksiyonunda tek başına kullanılan NAA'nın (Tablo 2; Ortam No: 1, 3, 5 ve 7) 2,4-D'ye kıyasla çok daha etkili olduğu ve sağlıklı sürgünler oluşturduğu gözlenmiştir. NAA içeren ortamlarda ilk haftadan itibaren sürgünlerin çoğunlukla tek ve sağlıklı olarak geliştikleri, 2,4-D içeren ortamlarda ise yine ilk haftadan itibaren sürgünlerin gelişmeye başladığı, fakat sürgünlerin dip kısımlarında kallus oluşumlarının başladığı, şişkinleştiği ve deforme oldukları ve ikinci haftadan sonra sürgünlerin çürümeye başladıkları gözlenmiştir.

Sürgün indüksiyonunda tek başına sitokinin kullanılan indüksiyon ortamlarında (Tablo 2; Ortam No: 2, 4, 6 ve 8) BAP'ın Kinetine kıyasla çok daha etkili olduğu (Tablo 7), BAP içeren ortamlarda ilk haftadan itibaren sürgünlerin gelişmeye başladığı, ikinci haftadan itibaren yan sürgünlerin gelişmeye başladığı ve üçüncü haftadan itibaren de kardeşlenmenin ve çoğul sürgünlerin oluşmaya başladığı görülmekle birlikte, Kinetin içeren ortamlarda çok daha az oranda olmak üzere ilk haftadan itibaren tek sürgünlerin gelişmeye başladığı, fakat sürgün gelişimin çok yavaş ilerlediği ve üçüncü haftadan itibaren tek sürgünlerin deforme olduğu gözlenmiştir.

2,4-D veya NAA'nın ve BAP veya Kinetinin birlikte kullanıldığı indüksiyon ortamlarında (Tablo 2; Ortam No: 9 ve 24); 2,4-D içeren kombinasyonlarda çoğunlukla sürgünlerin bir miktar gelişmeyle birlikte büyüyerek deforme olduğu ve kallus geliştirmeye başlayarak karardığı, NAA içeren kombinasyonlarda az sayıda da olsa çoğunlukla yavaş

bir şekilde sürgünlerin büyümeye başladığı yüksek dozlarda (Ortam No: 16 ve 24) sürgünlerin deforme olduğu ve dip kısımlarda kallus oluşumu başladığı gözlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda BAP veya Kinetin içeren MS besisi ortamında tepe ve yan tomurcuk eksplantlarının ortalama sürgün indüksiyon oranı % 33,5 olarak gerçekleşmiştir. Sürgün indüksiyonu açısından BAP'ın % 63,4 ortalama ile Kinetinden daha üstün olduğu, BAP'ın 1,0 mg/l dozunun sürgün indüksiyon oranı açısından optimum olduğu ortaya çıkmıştır.

Arafeh ve ark. (2003), *Origanum syriacum*'un *in vitro* koşullarda çoğaltımı üzerine yaptıkları araştırmada, farklı konsantrasyonlarda (0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 veya 2,0 mg/l) Kinetin, BA veya TDZ (Thidiazuron) içeren MS ortamlarında en yüksek sürgün oluşumunun 0,4 mg/l Kinetin ve 0,8 veya 1,2 mg/l BA kombinasyonundan elde edildiğini bildirmişlerdir. Farklı olarak bu çalışmada tek başına BAP'ın sürgün indüksiyonunda çok etkili olduğu tespit edilmiştir. Literatürle bu araştırma çalışmasının farklılığını farklı genetik yapılarıdaki farklı genotiplerle çalışılmasına bağlayabiliriz. Bu doğrultuda, Hatipoğlu (2008), farklı genotiplerin *in vitro* kültürde farklı besisi ortamlarına gereksinim duyabildiklerini bildirmiştir.

Sürgün rejenerasyon oranları bakımından sürgün indüksiyonunda olduğu gibi NAA'nın 2,4-D'ye kıyasla ve BAP'ın Kinetine kıyasla çok daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

İndüksiyon aşamasında eksplantlardan gelişen kalluslar aktarıldıkları rejenerasyon ortamlarında (Tablo 3) indüksiyon ortamlarında göstermiş oldukları gelişimi devam ettirerek büyümüşlerdir. Ancak kalluslardan bitki rejenerasyonu gerçekleşmemiştir. Özellikle 2,4-D gibi sentetik oksinlerin etkisinde uzun süre kalan kallusların rejenerasyon kapasitelerini kaybettikleri açıklanmıştır (Machakova ve ark., 2008). Bu araştırmada, kallustan sürgün ve bitki rejenerasyonunun olmamasına, kallusların alt kültür ortamı ve rejenerasyon ortamlarının büyüme düzenleyicisi içeriğinin neden olmuş olması muhtemeldir.

BAP konsantrasyonunun 0,5 mg/l'den 1,5 mg/l'ye kadar artırılması ile sürgün rejenerasyon oranında istatistiksel olarak önemli derecede artış sağlanmasına karşılık, farklı Kinetin konsantrasyonları sürgün rejenerasyon oranında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yaratmamıştır (Tablo 11; Şekil 4-5).

Oksin uygulamaları indüksiyon ortamında oluşan sürgünlerin köklenme oranını istatistiksel olarak

önemli derecede etkilemiştir (Tablo 13). Bu sonuç, düşük oksin konsantrasyonlarında ortamdaki oksinin meristemlerin büyümesi ve sürgünün oluşması için kullanıldığı (Machakova ve ark., 2008), köklenme için ortamda ve bitki dokularında yeterli oksin kalmadığını göstermektedir.

Sürgünlerin köklenmeleri için aktarıldıkları büyüme düzenleyici içermeyen ½ MS ortamı başarılı olmuştur. Ayrıca ½ MS ortamı kardeşlenme sonucu oluşan sürgünlerin gelişimini de teşvik etmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren MS ortamlarında kültüre alınan tepe ve yan tomurcuklardan rejenere olan sürgünlerin büyüme düzenleyici içermeyen ½ MS ortamında köklenme oranı ortalaması % 43,5 olmuştur. En yüksek köklenme oranı (% 81,2); 1,5 mg/l BAP ilave edilen MS ortamında kültüre alınan yan tomurcuk eksplantlarından elde edilmiştir. Tepe ve yan tomurcuklardan rejenere olan sürgünlerin köklenme ortamındaki köklenme oranı sürgünlerin rejenere olduğu eksplant tipine bağlı olarak önemli derecede farklılık göstermiştir (Tablo 15).

Sitokininlerin Dağ kekiği türünde sürgün rejenerasyon oranına etkisi ile ilgili bulgular, Goleniowski ve ark. (2003), Özkum (2006), Iyer ve Pai (2000), Morone-Fortunato ve Avato (2008), Oana ve ark. (2008), Oluk ve Çakır (2009) tarafından farklı *Origanum* türlerinde yapılan çalışmalarda elde edilen bulgularla kıyaslandığında alt kültür sonunda tek başına BAP dozunda kardeşlenen ve gelişen yan tomurcuk eksplantlarından eksplant başına ortalama 36 adet sürgün elde edilmesi ve büyüme düzenleyici içermeyen ½ MS ortamına aktararak köklendirilmesi çok daha pratik ve etkili sonuçlar alındığını göstermektedir. Ayrıca, bu çalışmada tıbbi ve aromatik açıdan değerli ekotiplerin klonlanması amacıyla arazi koşullarında yetiştirilen donör bitkilerden alınarak kullanılan eksplantların fizyolojik durumu ve sağlık durumu açısından, aseptik *in vitro* koşullarda tohumdan yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantların kullanıldığı bu araştırmalarla kıyaslandığında elde edilen sonuçların daha dikkat çekici olduğu görülmektedir.

Bu araştırma sonucunda, *Origanum syriacum* L. var. *bevanii* türünün tepe ve yan tomurcuklarından mikroçoğaltımı için en uygun ortamın 1,5 mg/l BAP ilave edilen MS ortamı olduğu belirlenmiştir.

Teşekkür

Bu makale; T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü, Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne yürütülen 20.7705/2010-2014 proje numaralı ve “Biberiye

(*Rosmarinus officinalis* L.) ve Dağ Kekikinin (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) Ietswart) In Vitro Rejenerasyon Olanaklarının ve Uçucu Yağ Bileşenlerinin Araştırılması” isimli araştırma projesi kapsamında hazırlanmıştır.

Kaynaklar

Akbudak, M.A., 2002. Küçük çiçekli yakı otu (*Epilobium parviflorum* schreb.) ve İzmir kekiği (*Origanum onites* L.)’nde uygun doku kültürü şartlarının belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

Arafeh, R.M, Mahmoud, M.S. , Shibli, R.A., 2003. *In vitro* seed propagation of wild syriana marjoram (*Origanum syriacum* L.). *Advances in Horticultural Science*, 17 (4), 241-244.

Çakır, A., 2011. Batı anadolu endemiği *Origanum sipyleum* L. (kekik) bitkisinin *in vitro* mikroçoğaltımı ve mikro bitkilerde uçucu yağ içeriğinin araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

El-Gengaihi, S., Taha, H.S., Kamel, A.M., 2006. *In vivo* and *in vitro* comparative studies of *Origanum* species. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, Vol.4 (3&4): 127-134.

Goleniowski, M.E., Flamarique, C., Bima, P., 2003. Micropropagation of oregano (*Origanum vulgare* x *applii*) from meristem tips. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 39:125-128.

Grzegorzczak, I., Bilichowsky, I., Mikiciuk-Olasik, E., Wysokinska, H., 2005. *In vitro* cultures of *salvia officinalis* L. as a source of antioxidant compounds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, Vol. 74, No. 1: 17-21.

Gülbaba, A.G., Özkurt, N., 2006. Doğu Akdeniz Bölgesi Kekiklerinin (*Origanum* sp.) Kültüre Alınması ve Islahı. Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü, Teknik Bülten No: 24, Tarsus.

Hatipoğlu, R., 2008. Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190, Ders Kitapları Yayın No: A-58, Ç.Ü. Yayınları No: 47, Adana.

Iyer, P.V., Pai, J.S., 2000. *In vitro* regeneratiin of *Majorana hortensis* Moench from callus and nodal stem segments, *Journal of Species and Aromatic Crops*, 9 (1), 47-50.

Kumari, N., Saradhi, P.P., 1992. Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgare* L. *Plant Cell Reports* 11: 476-479.

Larkin, P.J. Scowcroft, W.R., 1981. Somaclonal Variation: A Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.

Machakova, I., Zazimalova, E., George, E.F., 2008. Plant

Growth Regulators I: Introduction; Auxins, Their Analogues and Inhibitors. In: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, Volume I. The Background, Springer, Dodrect. PP: 175-204.

Mansuroğlu, S., Gürel, E., 2001. Mikroçoğaltım. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları, Baba-oğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (edt.) 374 sayfa, 262-281.

Morone-Fortunato, I., Avato, P., 2008. Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 93:139-149.

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

Oana, C.T., Marcela, F., Maria, P., 2008. Considerations regarding the effects of growth regulators over the “*in vitro*” morphogenetic reaction at *Origanum vulgare* L. *J. Plant Develop.* 15: 133-138.

Oluk, E.A., Çakır, A., 2009. Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey. *African Journal of Biotechnology Vol. 8* (21), pp. 5769-5772.

Özkum, D., 2006. Kekik (*Origanum minutiflorum*) ve adaçayı (*Sideritis stricta*)’nın doku kültürü yoluyla çoğaltımı üzerinde araştırmalar. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara.

Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1960. Principles and Procedure of Statistics with Special References to the Biological Sciences. McGraw-Hill Book Comp.,Inc. New York.

Taji, A., Kumar, P.P. Lakshmanan, P., 2002. In Vitro Plant Breeding. Food Products Press, Crop Science, Chapter 1.

Tanrıver, S., 2013. *Origanum minutiflorum* O. Schwarz ve P. H. Davis (sütçüler kekiği)’un mikroçoğaltımı ve *in vitro* koşullarda üretilen fidelerin fenolik bileşiklerin analizi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

Tisserat, B., Vaughn, S.F., 2008. Growth, morphogenesis and essential oil production in *Mentha spicata* L. plantlets *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 44: 40-50.

Van Staden, J., Zazimalova, E., George, E.F., 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, Their Analogues and Anagonists. In: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, Volume I. The Background, Springer, Dodrect. PP: 205-226.