248672

CAPPARIS OVATA (KAPARİ) BİTKİSİNDE STRES FİZYOLOJİSİ ÇALIŞMALARI

Özgün TUNA

Yüksek Lisans Tezi

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Aralık-2004

Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphanesi

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Özgün TUNA'nın '*Capparis ovata (Kapari)* Bitkisinde Stres Fizyolojisi Çalışmaları' başlıklı Biyoloji Ana Bilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 25.11.2004.. tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

		Adı- Soyadı	İmza
Üye(Tez Danışmanı)	**:**	**Yard. Doç. Dr. Banu A. EKMEKÇİ**	
Üye	**:**	**Prof. Dr. Ersin YÜCEL**	
Üye	**:**	**Doç. Dr. Güler ÇOLAK**	

Anadolu Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 15.12.2004 tarih ve 44/6....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Altuğ İFTAR
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

CAPPARIS OVATA (KAPARİ) BİTKİSİNDE STRES FİZYOLOJİSİ ÇALIŞMALARI

ÖZGÜN TUNA

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Yard. Doç. Dr. Banu A. EKMEKÇİ
2004, 58 Sayfa

Bu çalışmada kapari bitkisinin embriyoları üzerinde formik asit ve salisilik asit uygulaması yapılmış, bitki doku kültürü tekniklerinden embriyo kültürü tekniği uygulanarak bitkinin çimlendirilmesi amaçlanmış, formik asitte başarı sağlanmıştır. Bitkinin embriyoları invitro şartlarda MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Farklı makro element konsantrasyonlarının embriyoların gelişimi üzerinde oluşturduğu stres incelenmiştir. En iyi gelişme 1MS'te gözlenmiştir. Formik asit uygulamasıyla çimlendirilen bitkiye tuz stresi uygulanması sonucunda en iyi gelişmenin, %0'lık NaCl içeren ortamda olduğu gözlenmiştir. Tuz konsantrasyonu arttıkça bitkinin strese girdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kapari, doku kültürü, embriyo kültürü , tuz stresi, MS besiyeri.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

STRESS PHYSIOLOJI WORKS FOR CAPPARİS OVATA

ÖZGÜN TUNA

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Banu A. EKMEKÇİ
2004 , 58 Pages

In this study, formic acid and salicyclic acid has applied on the C. Ovata plants's embryos, applying one of the plant tissue culture tecnipues called embryo culture is aimed to germinate. Plants embryos were cultuvated in invitro conditions using MS medium. Stresses that caused by MS media containing different concentrations of macro elements on embryo growth are investigated. The best growth were obtained with 1MS. It's seemed that by applying formic asit, plant which has been germinate at the result of applying the salt stres has showed the best improvement contained NaCl the rate of %0.

Keywords: Capparis, tissue culture, embryo culture, salt stres, MS medium.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa kabul edilmemde ve çalışmalarımda bana destek olan hocam Fen Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Sayın Ahmet ÖZATA' ya, danışman hocam Yard. Doç. Dr. Sayın Banu A. EKMEKÇİ'ye, destekleriyle bana güç veren sevgili aileme, Makine Mühendisi Sevgili Utku TUNA'ya ve Resim Öğretmeni , meslektaşım Sevgili Emin GÜLÖREN'e, arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Özgün TUNA
Aralık - 2004

Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphane

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **i**

ABSTRACT ..... **ii**

TEŞEKKÜR ..... **iii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**

RESİMLER DİZİNİ ..... **x**

GRAFİKLER DİZİNİ ..... **xii**

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 4

2.1. Çimlenme 4

2.2. Çimlenmedeki Etkin Asitler 4

2.2.1. Salisilik Asit 4

2.2.2. Formik Asit 5

2.3. Stres Fizyolojisi 6

2.3.1. Stresin Tanımı ve Çeşitleri 6

2.3.2. Stresin Dereceleri 6

2.3.3. Strese Karşı Bitki Tepkileri 7

2.3. 3.3.1. Tolerans (Esneklik) 7

2.3. 3.3.2. Aklimasyon (Uyum) 7

2.3.3.3.3. Avoidans (Korunma) 7

2.4. Tuz Stresi 8

2.5. Bitki Doku Kültürü Çalışmaları 8

2.5.1. Embriyonun Tanımı 9

2.5.2. Embriyo Kültürü 10

2.5.2.1. Embriyo Kültürü İçin Gereksinimler 11

2.5.2.2. Besin Ortamı Bileşimi 11

2.6. Embriyo Kültürünün Uygulama Alanları 13

2.6.1. Biyolojik Temel Çalışmalarda 13

2.6.2. Tohumun Çimlenmemesi Durumunda 13
2.6.3. Islah Süresini Kısaltma 13
2.6.4. Yaşamayan Embriyoların Kurtarılmasında 14
2.6.5. Tohum Canlılıklarının Hızlı Test Edilmesinde 14
2.6.6. Ender Bitkilerin Çoğaltılmasında 14
2.7. Embriyo Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler 15
2.7.1. Genotip 15
2.7.2. Embriyonun Kültüre Alındığı Dönem 15
2.7.3. Besin Ortamının Bileşimi 15
2.7.4. Kültür Koşulları 15
2.7.5. Embriyoların İzolasyonu 15
2.8. Totipotansi, Polarite, Morfogenez, Apomiksis 16
2.9. Bitki Hormonları 17
2.9.1. Büyümeyi Teşvik Edici Hormonlar 17
2.9.1.1. IAA(İndol Asetik Asit) 17
2.9.1.2. Kinetin 18

3. MATERYAL VE METOTLAR 20
3.1. Materyal 20
3.1.1. Capparis ovata (Kebere, Kapari) Bitkisinin Genel Özellikleri 20
3.2. Metotlar 23
3.2.1. Çimlendirme 23
3.2.1.1. Formik Asit 23
3.2.1.2. Salisilik Asit 23
3.2.1.3. Doku Kültürü 23
3.2.1.3.1. MS Besi Yerinin Hazırlanması,
Alet ve Ekipmanın Sterilizasyonu 23
3.2.1.3.2. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu ve
Embriyoların İzolasyonu 26
3.2.1.3.3. Besin Ortamının Bileşimi 26
3.2.1.3.4. Fotoperiyot Uygulaması 26
3.2.1.3.5. Makro Elementlerin Konsantrasyonuna Bağlı Stres 27
3.2.2 Stres Fizyolojisi Çalışmaları 28
3.2.2.1. Tuz Stresi 28

4. BULGULAR **29**

5. TARTIŞMA **54**

6. KAYNAKLAR **57**

ŞEKİLLER DİZİNİ

1. İndol-3- Asetik Asit (IAA) 18
2. Kinetin 19

ÇİZELGELER DİZİNİ

1. MS Besiyeri 25
2. Makro Elementleri Farklı Konsantrasyonlarda İçeren MS Besin Ortamlarının Bileşimleri 27
3. Dördüncü Hafta Sonunda Çimlenen Embriyo Sayısı 31
4. Farklı NaCl Konsantrasyonlarındaki Bitkinin Dördüncü Hafta Sonundaki Boy Uzunlukları 44
5. Farklı NaCl Konsantrasyonlarındaki Bitkinin Dördüncü Hafta Sonundaki Maksimum Yaprak Sayısı 45
6. Farklı MS Besiyerlerindeki *C. Ovata*'da Yaşayan Embriyo Sayısı 52
7. Farklı MS Konsantrasyonlarında Besiyerlerindeki *C. Ovata*'da Kararan Embriyo Sayısı 53

Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphane

RESİMLER DİZİNİ

1. *Capparis ovata* bitkisinin genel görünümü 21
2. *Capparis ovata* çiçeği 21
3. *Capparis ovata*'nın farklı kesitleri 22
4. *C. ovata* embriyolarının formik asit uygulamasının 1.haftası 29
5. *C. ovata* embriyolarının formik asit uygulamasının 2.haftası 29
6. *C. ovata* embriyolarının formik asit uygulamasının 3.haftası 30
7. *C. ovata* embriyolarının formik asit uygulamasının 4.haftası 30
8. *C. ovata* embriyolarının salisilik asit uygulamasının 1.haftası 31
9. *C. ovata* embriyolarının %0 NaCl uygulamasının 1.haftası 33
10. *C. ovata* embriyolarının %0 NaCl uygulamasının 2.haftası 33
11. *C. ovata* embriyolarının %0 NaCl uygulamasının 3.haftası 34
12. *C. ovata* embriyolarının %0 NaCl uygulamasının 4.haftası 34
13. *C. ovata* embriyolarının %1 NaCl uygulamasının1.haftası 35
14. *C. ovata* embriyolarının %1 NaCl uygulamasının2.haftası 36
15. *C. ovata* embriyolarının %1 NaCl uygulamasının3.haftası 36
16. *C. ovata* embriyolarının %1 NaCl uygulamasının 4.haftası 37
17. *C. ovata* embriyolarının %2 NaCl uygulamasının 1.haftası 38
18. *C. ovata* embriyolarının %2 NaCl uygulamasının 2.haftası 38
19. *C. ovata* embriyolarının %2 NaCl uygulamasının 3.haftası 39
20. *C. ovata* embriyolarının %2 NaCl uygulamasının 4.haftası 39
21. *C. ovata* embriyolarının %3 NaCl uygulamasının 1.haftası 40
22. *C ovata* embriyolarının %3 NaCl uygulamasının 2.haftası 41
23. *C ovata* embriyolarının %3 NaCl uygulamasının 3.haftası 41
24. *C. ovata* embriyolarının %3 NaCl uygulamasının 4.haftası 42
25. *C. ovata* embriyolarının %4 NaCl uygulamasının 1.haftası 43
26. *C. ovata* embriyolarının %4 NaCl uygulamasının 2.haftası 43
27. *C. ovata* embriyolarının %4 NaCl uygulamasının 3.haftası 44
28. 1 MS besiyerine ekilen (KIN + IAA)
C. ovata embriyoları.(Skala 1cm) 46
29. 2 MS besiyerine ekilen *C. ovata* embriyoları 47

30. 3 MS besiyerine ekilen embriyoların görünümü 47
31. ½ MS besiyerine ekilen embriyoların görünümü 48
32. ¼ MS besiyerine ekilen embriyoların görünümü 48
33. 1 MS besiyerinde gelişen embriyoların 1 hafta sonundaki görünümü .. 49
34. ¼ MS besiyerinde gelişen embriyoların 1 hafta sonundaki görünümü .. 49
35. 1 MS besiyerinde gelişen embriyoların 2 hafta sonundaki görünümü .. 50
36. Gelişme kabına aktarılan 1 MS besiyerinde
gelişen embriyolar 50
37. Farklı bir 1 MS besiyerinden aktarılan embriyolar 51
38. 4. hafta başlangıcında 1 MS' ten aktarılan embriyolar 51

GRAFİKLER DİZİNİ

1. 4 hafta sonunda çimlenen embriyo sayısı 32
2. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki bitkinin 4 hafta sonundaki boy uzunlukları (cm) 45
3. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki bitkinin 4 hafta sonundaki maximum yaprak sayısı 46
4. Farklı MS besiyerlerindeki *C.ovata'* da yaşayan embriyo sayısı..... 53
5. Farklı MS besiyerlerinde yetişen bitkideki toplam kararma 53

1. GİRİŞ

Capparaceae familyasından olan ve değişik adlarla bilinen kapari, çeşitli amaçlarla faydalanılan, tıbbi ve aromatik özellikli çok yıllık bir bitkidir. "Gebere otu" da denilen kaparinin en yaygın türleri; *Capparis ovata* ve *Capparis spinosa*'dır. Kaparinin çiçek tomurcuğu, kök, meyve, tohum ve taze sürgünü, beslenmede kullanılır. Kimi bitki kısımları tedavide, kozmetik ve insektisit üretiminde yer alır. Birçok kapari türünden peyzaj mimarlığında, erozyon kontrolünde ve hayvan beslemede (özellikle süt verimini arttırmada) faydalanılır.

Kapari, yurdumuzda Akdeniz ikliminin hakim olduğu Batı Anadolu illeri başta olmak üzere, Orta Anadolu'da Tokat ve civarında, Doğu Karadeniz ve Güneydoğu illerinde doğal olarak yetişen,çalımsı yapıda, dik ve yatık olarak büyüyen dikenli bir bitkidir. Dünyada da Akdeniz ve Batı Asya ülkelerinde görülür. İspanya ve Fas'ta üretilir. Özellikle İspanya ve İtalya'da önemli bir kültür bitkisidir.

Fosfor, potasyum ve kalsiyumca zengin, kalkerli ve killi toprakları seven ve güneşten hoşlanan bir bitki olması nedeniyle, güneye bakan yamaçlarda kendiliğinden yetişmekte ve iyi gelişmektedir. [1]

Çiçek tomurcuklarında bol miktarda vitamin ve protein vardır. Yapılan bir çalışmada 100 gr çiçek tomurcuğunda kuru madde olarak; 67 mg fosfor, 9 mg demir, 24 mg protein, 12 mg selüloz ve 2 mg lipit tespit edilmiştir.

Gıda, kozmetik, boya ve ilaç sanayinde kullanılan kaparinin yurt dışına ihracı genellikle salamura şeklinde olmaktadır. Konserve olarak hazırlanan kapari; turşu, salata, pizza üstü, balık ve av etleri yanında garnitür olarak yenilmektedir. Doğadan toplanan tomurcuklar bir kavanoz içerisinde % 20'lik tuzlu suda üç ay bekletilip, sonra bire bir oranında sirke içine konulup, on gün sonra yenildiğinde, aroması ve lezzeti çok beğenilmektedir.

Kapari, erozyon kontrolünü sağlama ve çiçek tomurcuklarının sürgün uçlarının ve meyvelerinin çok yönlü değerlendirilmesi gibi nedenlerle, kırsal alanlarda halkın gelir düzeyini yükseltmede önem taşımaktadır.

Ayrıca rüzgar erozyonuna açık alanlarda tesis edilen rüzgar perdelerinde , toprak yüzeyini örten alt tabaka bitkisi olarak güvenle dikilebilmektedir.

---

[1] www. kirimhan. com / kapari . htm

Kaparinin insan sağlığı üzerinde de birçok faydası bulunmaktadır. Yurdumuzda pek bilinmemesine rağmen kaparinin kök kabuğunun, idrar söktürücü ve kabızlık giderici özelliği vardır. Karaciğer fonksiyonlarını düzenlediği ve cinsel gücü artırdığı söylenmektedir. İsrail'de yapılan bir çalışmada şeker hastalığının tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir (Yaniv,1989). Deri ve saç hastalıklarında etkili bir kozmetik katkısı olabileceği, araştırmaları doğrulamaktadır (Akgül,1996).

Ayrıca; ağrı kesici, balgam söktürücü, solucan düşürücü olduğu; romatizmaya, felce, iskorpit hastalığına, kan bozukluklarına, gut hastalığına, hemoroide, dalak büyümesine, kalça rahatsızlıklarına, diş ağrısına iyi geldiği, antitümör olduğu, adet düzenlediği bilinmektedir. Böylesine şifası olan, değişik alanlarda faydalanılan kaparinin, çalışma materyali olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Kapari yaygın olarak tohumla ve çelikle çoğaltılmaktadır. Ama sert tohum özelliğine bağlı dormansi nedeniyle tohumlarda çimlenme güçlüğü bulunması üretimde zorluklara neden olmaktadır (Orphanos, P.L,1988). Çimlenme güçlüğü olan bitkinin laboratuar koşullarında çimlendirilmesine karar verilmiştir.

Kaparinin doğada çoğalması, karıncalara, kuşlara ve toprak mikroorganizmalarına bağlıdır. Çünkü kapari bitkisinin tohumunda çimlenme engeli vardır. Bu çimlenme engelini, karıncalar ortadan kaldırmaktadır. Tohumun çevresinde bulunan mantarımsı zar, karınca asidince etkilenmektedir ve böylece çimlenme kendiliğinden oluşmaktadır. Karınca, kapariyi kışlık yiyecek olarak taşırken ağzından düşürünce çimlenme başlamaktadır.[2]

Bu çalışmada, laboratuvar koşullarında formik asit (karınca asidi) uygulaması yapılarak bu çimlenme engelinin yıkılması ve bitkinin çimlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bitkinin toplu olarak üretiminde Orman Bakanlığı'na bağlı birimlerde küllü su uygulaması yapıldığı kaydedilmiştir. Bu küllü su muamelesinde salisilik asitli %20'lik çözelti hazırlanmakta ve bitki çimlendirilmektedir. Laboratuvar koşullarında da salisilik asit uygulaması yapılarak bitkinin çimlendirilmesi amaçlanmıştır.

Ayrıca bitki doku kültürlerinden embriyo kültürü tekniği kullanılarak *Capparis ovata* bitkisinin laboratuvar koşullarında üretilmesi hedeflenmiştir ki, bu embriyo kültürü tekniğinin, daha hızlı çoğalma potansiyeline sahip olması, daha az yere gereksinim duyulması ve bu teknikle tüm yıl boyunca üretim yapılabilmesi, kimyasal ve fiziksel ortam koşulları üzerinde daha fazla kontrol olanağı sağlanması ve olgun dokuların yeniden gençleştirilmesi gibi avantajları vardır. Bir bitkinin yetişebilmesi için tüm ideal şartlar

---

[2] www. kapari. com

sağlanarak ve gelişim kontrol edilerek bitkinin çimlendirilmesi amaçlanmıştır. Embriyo kültürü tekniği uygulanarak laboratuvar koşullarında MS (*Murashiage Skoog)* besiyerinin farklı konsantrasyonlarıyla *Capparis ovata* bitkisinin çimlendirilmesine çalışılmıştır. MS besiyerinin 1, 2, 3, ½ , ¼ konsantrasyonları uygulanmıştır. Böylece bitkinin yetişebilmesi için optimum değerler doku kültürüyle sağlanarak, bitkinin gelişimi takip edilmiştir.

Kapari, geç tutuşan bir bitkidir. En kurak mevsimde yaz günleri bile yeşil kalması, toprak yüzeyini örterek ot vejetasyonunun gelişmesini önlemesi ve rüzgar akımlarını kesmesi nedeniyle yangına hassas bölgelerde değerlendirilmektedir. Ancak ışık isteği de göz ardı edilmeyip, yangın emniyet şeritleri ile yol kenarlarında tercih edilmektedir.

Kuraklığa dayanıklılığı ve toprak yüzeyini yayılarak örtmesi gibi özellikleriyle kurak/yarı kurak step sahalardaki gevşek yamaçlarda, erozyonla mücadelede büyük başarı elde edilmektedir.Bu nedenledir ki kapari, "çöl bitkisi" olarak da tanımlanmaktadır.

Bitkinin bilinen bu stres özelliklerine dayanıklılığından dolayı stres fizyolojisi çalışmalarından NaCl'ye dayanıklılığı saptanmaya çalışılmıştır.

Çimlenen bitkiye %0, %1, %2, %3, %4 NaCl uygulaması yapılmıştır. Tuz stresi uygulanan bitkinin gelişiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Tuzun bitki gelişimi üzerindeki etkileri, bitkinin tuz toleransı incelenmiştir.

Bu çalışmada *Capparis ovata* (kapari) bitkisiyle formik asit ve salisilik asit uygulaması yapılarak, bitki doku kültürü tekniklerinden embriyo kültürü uygulanarak bitkinin embriyolarının çimlendirilmesi amaçlanmıştır. Çimlenen bitki ile de tuz stresi uygulaması yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çimlenme

Çimlenme; tohumun embriyosundan, uygun koşullarda, normal bir bitkiyi oluşturan yapıların meydana gelmesi olarak tanımlanabilir. Bir tohumun yapısında yer alan radikulanın tohum gömleğini yırtıp çıkması, çimlenmenin başladığını belirleyen bir olaydır. Bir tohumun çimlenmesi için su alması gereklidir. Suyun büyük bir bölümü embriyoya gider. Dokular suya doyduğunda (ki bunun için 2-3 gün gereklidir) metabolizma yoğun olarak başlar. Bu da önemli bir ısı çıkışıyla gözlenir. Besin rezervleri hidrolize uğrar ve embriyoya sentez ve hücre bölünmesi için gerekli ürünleri (metabolit) verir. Su alınışına bağlı olarak hacim ve tohum gömleğinde hidratasyon artar. Hidratasyon da O_2 ve CO_2 permeabilitesini arttırarak, fazla su nedeniyle şişme olayının meydana gelmesine sebep olur. Bu olaya bağlı olarak da tohum gömleği yırtılarak , önce radikula , sonra hipokotil dışarı çıkar. Tohum artık uyanmıştır. Daha sonra diğer yapıların da meydana gelmesiyle ve büyüyüp gelişmesiyle tam bir bitki oluşur.

Çimlenmede etkili faktörlerden biri ısıdır ve çimlenmenin genel olarak 1-40° C arasında meydana geldiği saptanmıştır. Çimlenme olayında bir etmen de ışıktır. Bitkinin çimlenmesi için ışığa duyduğu gereksinim bitkiden bitkiye farklılık göstermektedir.

2.2. Çimlenmedeki Etkin Asitler

2.2.1. Salisilik Asit

Salisilik asit (0-Hidroksibenzoik asit) serbest veya bağlı olarak söğüt (*saliks alba*) yaprak ve kabuklarında bol bulunan tabii bir fenol ürünüdür. Salisin konjuge halde 1838'de izole edilmiş ve 1874'de aspirin (asetil salisilik asit) olarak sentezlenmiştir.

Salisilik asit bütün bitkilerde bulunur; fakat en fazla ısı üretici dokularda ve parazit bulaşması sırasında bulunması söz konusudur. Bu en azından üç süreç içermektedir:

- Bu asidin etkilerinden biri, kesilmiş çiçeklerin bir vazoda uzun süre kalmalarını sağlamasıdır ki bu, etilen biyosentezini inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca farklı süreli koşullarda yetiştirilmiş kısa ve uzun gün bitkilerinin çiçeklenmesini gerçekleştirir(Özellikle *Lemnaceae*). Bu arada bu etki spesifik değildir. Çünkü tabii çok sayıda doğal fenoller de benzer etki gösterirler. Keza giberillinler ile depozitif bir girişim gösterirler.

Anadolu Merkez Kütüphane

- Bazı bitki familyalarında (*Araceae*) termogenez olayları, fosforilant olmayan bir solunum aşırı etkinliği,çiçeklenme sırasında gerçekleşir. *Araceae*'deki termogenez nişasta bakımından zengin ve uca doğru göç eden, çiçek durumunun tabanında bulunan erkek çiçekler tarafından üretilen kalorigen adlı bir maddenin göçü ile açıklanmış olup, burada hissedilir bir sıcaklık üretilir. Kalorigenin salisilik asit tarafından gerçekleştirilmiş olduğu, iç kısımdaki miktarının termogenez esnasında 100 kat arttığı gösterilmiştir. Dokularda salisilik asidin yönetimi invitro şartlarda sıcaklık üretimi ile başlar.

Diğer bir olay patojen (hastalık yapan) ajanların direnç mekanizmasında salisilik asidin müdahalesidir. Bu, direnç süresinde sistemli bir şekilde kazanılır.[3]

2.2.2. Formik Asit

Karboksilli asitler gurubundan olan formik asit, H_2CO_2 formülüyle ifade edilir . Karıncaların vücutlarında bu kimyasal maddeyi üreten bezler vardır. Bu asit, antibiyotik etkisine sahiptir. Bu madde, karıncaların üzerinde ve yuvalarında mantar ve bakteri oluşumunu engeller.

Formik asit, bakterilere, küf ve mayalara etki eder. Mikrobik bozunmayı önlemek için gıdalarda koruyucu olarak kullanılır.

Formik asit (metanoik) doymuş asitlerin ilk temsilcisidir. 1749'da Marggraf tarafından tek başına elde edilen bu asit, karıncalarda, tırtıllarda, ısırganlarda ve ter gibi bazı biyolojik sıvılarda bulunur. Berthelot'un sentez metoduna göre, karbon monoksidin basınç altında, sodyum hidrokside etki ettirilmesiyle elde edilir ve sodyum formiyat meydana gelir. Sanayide kullanılan diğer bir sentez yöntemi de sodyum siyanürün otoklavda su etkisiyle bozundurulması temeline dayanır.

Susuz formik asit, dondurulduğu zaman 8,6°C'de eriyen bir sıvıdır. 101°C'de kaynar. Yoğunluğu 1,22'dir. Keskin bir kokusu vardır. Suda çözünür. $H\text{-}CO_2H$ formülüyle ifade edilir.

---

[3] Prof.Dr.Y.Akman-Prof.Dr.C.Darıcı, Bitki Fizyolojisi, Ankara, 1998, s.464

2.3. Stres Fizyolojisi

2.3.1. Stresin Tanımı ve Çeşitleri

Stres, biyolojide tarifi zor olan bir kavramdır. Bir çevrede devamlı olarak ya da arada sırada meydana gelen çok sayıdaki olumsuz; fakat hemen öldürücü olmayan koşullar, stres olarak bilinir. Bir başka yaklaşımla , bitkide metabolizmayı , büyüme ve gelişmeyi etkileyen veya engelleyen , uygun olmayan herhangi bir durum veya madde stres olarak kabul edilir. Aslında bitkide genellikle bir dış faktörün zorlaması ile oluşan etki olarak da tanımlanabilen stres kavramı , bitki toleransı ile yakından ilişkilidir.

Stres kavramı kısaca yaşam için optimal olan koşullardan önemli sapmalar olarak açıklanabilir. Organizmanın bütün fonksiyonel düzeylerinde meydana gelen değişiklikler ve tepkiler önce geri dönüşümlü (reversible) olmalarına rağmen, daha sonra kalıcı hale de gelebilir. Stres olayı geçici olarak meydana gelse bile , bitki canlılığı gerilemeye başlar ve stres devam ettikçe , bu zayıflama daha da ilerler. Bitki kapasitesinin sonuna ulaşıldığında ise o ana kadar belirti göstermeden (latent) kalan zarar, kronik hastalığa veya geri dönüşümsüz (irreversible) bir zarara dönüşebilir (Çakırlar ve Topçuoğlu, 1985,Larcher, 1995,Lichtenthaler,1996, Edreva, 1998, Taiz ve Zeiger, 1998).

Bitkilerin belirli bir stres faktörüne (stresör) olan tepkilerinin yapısı ve yoğunluğu, yaşa, adaptasyon derecesine, mevsimsel ve hatta günlük aktiviteye bağlı olarak önemli ölçüde değişebilmektedir. Bir bitkinin stresten sıkıntı çekip, çekmediği , bu bitkinin normal koşullardaki davranışıyla karşılaştırıldığında anlaşılabilir. Stresörün spesifik etkileri bitkide iyi tanımlanmış bir hedefi kapsamaktadır. Örneğin; yoğun radyasyon, tilakoid membranlarında doğrudan bir zarara yol açabilmekte veya iyonların ve ağır metallerin toksik konsantrasyonları , enzim proteinleri üzerinde doğrudan etki yapabilmektedir. Bu nedenle her bir durumda semptomlar oldukça spesifiktir. [4]

2.3.2. Stresin Dereceleri

Bitkiler yaşamları sürecinde pek çok stres olayları ve çok sayıda stres faktörleri ile karşılaşmaktadır. Fakat bazen bitkiler için stresten söz edilmeyebilir. Bu şekilde optimum şartların bulunmasına bazı fizyologlar "sıfır stres" adını verirler. Stresin dereceleri çok

[4] S.Özcan-E.Gürel-M.Babaoğlu, Bitki Biyoteknolojisi, S.Ü.Vakfı Yayınları, 2001, s.308

geniştir. Sıfır stresten , ılımlı ve şiddetli strese kadar değişen dereceleri vardır. Ancak tabiatta bitkiler için tamamen stressiz bir ortam zor bulunur. Bitkiler yaşadıkları çevrede yaşamlarını sürdürmelerini ve gelişme şanslarını kısıtlayıcı değişik olumsuz koşullara maruz kalırlar. Yeryüzünde kurak zonlar , tuzlu topraklara sahip bölgeler, kuzey ve güney kutupları ile yüksek dağlar gibi geniş alanlar bulunmakta ve bu alanlarda bitki büyümesini kolaylaştırıcı koşullar , kısa süreli olarak gerçekleşebilmektedir.

Stresin dereceleri bitki türüne göre değişmektedir. Yani bir bitki türünde şiddetli strese sebep olan bir stres faktörü , bir başka türde ılımlı strese ya da sıfır strese neden olabilir. Stresin derecesi , canlı sistemlerdeki metabolik olayların değişimine etki eden enerji miktarına da bağlıdır. Bir bitkinin tümü veya bazı kısımları (tohumlar, dormant tomurcuklar ve dormant hücreler) strese karşı dirençli olabilirken , bazı kısımlar (meristem dokular, sukkulent organlar, genç fideler) ise strese karşı duyarlıdır. Meristemler; canlı, ince çeperli, protoplazması bol, faal ve nukleusu iri olduğu için daha çok etkilenir. Destek doku hücreleri; kalın çeperli, sitoplazması az ve hücrelerinin % 50'sinden fazlası koful olduğu için strese dayanıklıdır. Bu arada stresin şiddeti kadar , bitkinin strese maruz kalma süresi de önemlidir.

2.3.3. Strese Karşı Bitki Tepkileri

2.3.3.1 Tolerans (Esneklik) : Bir bitkinin uygun olmayan çevre şartlarına maruz kalması durumunda, hayatını devam ettirmesi ve strese tahammülü olarak tanımlanabilir. Daha çok bitkinin genotipi ile ilgilidir. Stres faktörlerinin etkisini elimine etme, azaltma veya tamir etme mekanizmalarını ifade etmektedir.

2.3.3.2. Aklimasyon (Uyum) : Yeni bir çevreye adapte olmaya çalışan bir bitkideki kalıtsal olmayan değişiklikler olarak tanımlanabilir. Bir stres faktörü metabolizmayı değişikliğe uğratabilir. Bunun sonucu olarak bitki morfolojisinde de bir değişiklik meydana gelebilir. Fakat bu durumda bitki hayatını devam ettirebilir.

2.3.3.3. Avoidans (Korunma) : Stresten kaçınma, sakınma ve korunma anlamına gelir. Eğer stres kaynağı ile bitki dokusu veya organı arasında fiziki bir engel varsa , stres yeteri kadar etkili olmaz. Bu şekilde bitki kendini stresten korumuş olur. Kalıtsal olabilir veya olmayabilir. Kısaca stres faktörlerinin bitki dokularına girişinin önlenmesini veya azaltılmasını ifade etmektedir.

2.4. Tuz Stresi

Tuz yeryüzündeki yaşamın evrimi süresince karşılaşılan ilk kimyasal stres faktörüdür. Organizmalar iyonların düzenlenmesi ve protoplazmik yapıların stabilizasyonu için etkili mekanizmaları geliştirmek zorunda kalmıştır. Tuzlu habitatlar , kolay çözünen tuzların anormal düzeyde yüksek içeriklerine sahiptir. Nemli ve kurak iklim koşullarının her ikisinde de tuzlu topraklar mevcuttur.

Toprak tuzluluğu , topraktan oluşan evaporasyonun yıl boyunca toprağa süzülen yağış miktarından daha fazla olduğu kurak bölgelerde büyük ölçüde artma göstermektedir. Nemli bölgelerde tuzlu topraklar esas olarak NaCl içerir. Bu tip nötral tuzlu topraklar, kurak bölgelerde de meydana gelmektedir.

Yüksek tuz konsantrasyonlarının bitkilerde yarattığı sıkıntılar, suyun ozmotik olarak tutulmasından ve spesifik iyonların protoplazma üzerine olan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Su, tuz çözeltilerinde ozmotik olarak tutulmaktadır. Böylelikle tuz konsantrasyonu artarken , bitkilere suyun girişi daha az gerçekleşmektedir.

Genç bitkiler , köklerinin en yüksek tuz konsantrasyonu içeren toprağın üst tabakaları ile çevrelenmesinden ötürü , daha büyük zararlara maruz kalır. Çimlenme tuzsuz veya az tuzlu ortamlarda çok başarılı olarak gerçekleşmektedir.

Ekstrem tuz stresi, bodurlaşmaya ve kök büyümesinin engellenmesine yol açmaktadır. Bu stresin etkileri ile tomurcuk açması gecikmekte, sürgünlerin boyu kısalmakta , yapraklar küçülmekte ve hücrelerin ölümü gerçekleşmektedir. Ayrıca köklerde , tomurcuklarda , yaprak kenarlarında ve sürgün uçlarında nekrozlar oluşmakta , yapraklar sararmakta ve sürgünün tüm kısımlarında kurumalar meydana gelmektedir. Bitkilerde hormonal denge , tuzluluk tarafından etkilenen önemli bir faktördür. [5]

2.5. Bitki Doku Kültürü Çalışmaları

Bitki doku kültürü, aseptik şartlarda yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri) , doku (çeşitli bitki kısımları = eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak, doku kültürünün temel amaçları arasında

[5] S.Özcan-E.Gürel-M.Babaoğlu,Bitki Biyoteknolojisi,S.Ü.Vakfı Yayınları,2001, s.309

sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde çeşitli doku kültürü yöntemleri uygulanmaktadır.

Doku ve hücre kültürü teknikleri (in-vitro vejetatif üretim teknikleri) bazı araştırıcılar tarafından mikro üretim veya hızlı klonal üretim adı altında tanımlanmaktadır.

Bu teknikler , geleneksel vejetatif üretim tekniklerine göre aşağıda belirtilen üstünlüklere sahiptir:

-Daha yüksek çoğalma hızına sahip olma

-Daha az yere gereksinim duyma

-Tüm yıl boyunca üretim yapma imkanı

-Kimyasal ve fiziksel ortam koşulları üzerinde daha fazla kontrol olanağı sağlama

-Olgun dokulardan yeniden gençleştirme imkanlarını sağlama

2.5.1.Embriyonun Yapısı

Döllenmeden sonra olgunlaşıp gelişen tohum taslağı içinde oluşan embriyo, tohum denilen yapıyı meydana getirir. Tohumun içerdiği besin maddeleri onun çimlenip, fotosentetik olarak etkin bir organizma şeklini almasını sağlar. Döllenmeden sonra tohum taslağı ve endosperm büyümesi beraber gider. Endosperm miktarının birden artışı, embriyo kesesinin gelişmesiyle paralellik gösterir. Endosperm miktarı en yüksek düzeye ulaştığında, embriyo gelişmeye başlar. Endosperm sürekli azalırken, tohum taslağı ve embriyoda birbirine paralel bir artış görülür.

Döllenmiş yumurta hücresinin (zigotun) gelişmesiyle, bütün bir bitkiyi oluşturma potansiyeline sahip olan embriyo meydana gelir. Zigot, angiospermlerde genelde enine bölünür. Boyuna ve eğik bölünmeye de rastlanır. Enine bölünmenin sonunda embriyo kesesinin ucuna doğru apikal ve mikropile doğru daha büyük bir bazal hücre oluşur. Bu evrede zigotun enine bölünmeleriyle oluşan apikal ipliksi hücreler ve süspansörden oluşan yapıya "proembriyo" denilir. Yani iki hücreli evreden, organ oluşumunun başlamasına kadar olan dönemdeki embriyoya, proembriyo adı verilir. İki hücreli embriyo bölünme şekillerine göre linear veya T şekilli olabilir.

Kotiledonlar belirmeye başlarken bilateral olan simetri de eksensel şekle dönüşür. Tek ve iki çenekli bitkilerdeki fark plumula ve kotiledonlar belirdikten sonra ortaya çıkar. Dikotil embriyosu lateral olarak bağlı iki kotiledon taşıyan bir eksen içerir. Kotiledonların üst kısmındaki eksene "epikotil", alt kısmındakine ise "hipokotil" denir. Epikotil plumula

Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphane

(embriyonik gövde) hipokotil radikula (embriyonik kök) olarak sona erer. Monokotil embriyosu ise tek kotiledona sahiptir.

Süspansör, proembriyonun radikular ucundaki geçici bir yapıdır. Maksimum gelişimine embriyo küremsi evreye geldiğinde ulaşır. Olgun bir tohumda süspansörün sırf kalıntılarına rastlanır. Bu yapı embriyoyu embriyo kesesine bağlar ve uygun bir besi ortamı olan endospermin içine doğru iter. Bazı familyalarda endosperm yoktur, embriyo çok iyi gelişmiş olan süspansör emeçleri içerir. Birçok bitkide yapılan çalışmalarla, süspansörün embriyo beslenmesinde aktif rolü olduğu ortaya konmuştur.

2.5.2.Embriyo Kültürü

Yüksek bitkilerin tohumlarından ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek belli ortamlarda kültüre alınması "embriyo kültürü" olarak tanımlanmaktadır.

Bitki embriyolarının kültürü ile ilgili ilk çalışma Hanning (1904) tarafından yapılmıştır. Bundan sonra çok değişik bitki türlerinin embriyoları kontrollü koşullarda geliştirilmiştir. Bu çalışmalarla embriyoların besin ihtiyaçları , büyüme ve farklılaşmaları vb. konular incelenmiş ve embriyo kültürüne ilişkin bazı metotlar ortaya konmuştur (Raghavan , 1980 , Monnier , 1990).

İki tip embriyo kültüründen söz edilmektedir:

1. Olgun Tohum Embriyolarının Kültürü: Bu kültür oldukça kolaydır ve basit bir kültür ortamı ile başarılı sonuçlar alınmaktadır. Böylece embriyonik büyümeyi incelemek ve büyüme dönemlerini ortaya koymak , dormansi ve çimlenmenin metabolik ve biyokimyasal ayrıntılarını analiz etmek mümkün olmaktadır.
2. Olgunlaşmamış Erken Bölünme Fazındaki Proembriyoların Kültürü: Bu tip kültür, erken embriyo dönemlerinden itibaren embriyoların besin ihtiyaçlarının ortaya konulmasını ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Embriyonun izolasyonu oldukça zor bir iştir. Bu nedenle güç olan bir yöntemdir.

Embriyo izolasyonunun zor olması nedeniyle embriyo kültürüne bir alternatif olarak, tozlaşmış yumurtalık (ovary) kültürü ve olgunlaşmamış tohum taslağı (ovül) kültürü de kullanılmaktadır.

2.5.2.1. Embriyo Kültürü İçin Gereksinimler

Embriyo oluşumu , biyolojinin temel problemlerinden biridir. Hiç kuşkusuz her canlı sistemin en kayda değer özelliği, embriyo denen bu özel şekli inşa etme kapasitesine sahip olmasıdır. Bu olay bu güne kadar biyolojik olayların mekanik olarak izah edilmesi işlemlerinde en büyük komplikasyonları doğurmuş bir olaydır. Embriyo kültürü, embriyojenezin ortaya çıkış şeklini modifiye etmek için müdahale etmeye ve yeni bir embriyo yapısının incelenmesinde , embriyoya ait gelişmeye hükmeden bazı prensiplerin saptanmasına yarar.

Embriyo kültüründe en önemli konu farklı gelişme dönemlerinde kültüre alınan embriyoların düzenli olarak gelişimini destekleyici bir kültür ortamının belirlenmesidir. Embriyo kültürü ile ilgili ilk çalışmalar basit bir ortam üzerinde olgun embriyolardan bitki gelişimi konusunda olmuştur. Sonra olgunlaşmamış embriyoların kültürü ile ilgili çalışmalar da yapılmış ve kültüre alınan embriyonun gelişme dönemine göre kültür ihtiyaçları belirlenerek başarılı sonuçlar alınmıştır.

2.5.2.2. Besin Ortamı Bileşimi

Bitki doku kültürü çalışmalarında besi ortamında su, organik ve inorganik bileşikler bulunmaktadır. Kimyasal maddelerin farklı miktarlarda kullanılarak, uygulayıcılarının adlarıyla anılan çok sayıda besi ortamı bileşimi bulunmaktadır.

Embriyoların büyümesi üzerine farklı solüsyonların etkisi araştırılmış ve genellikle en iyi gelişmenin Murashige ve Skoog (MS) (1962) ve B5 (Gamborg ve ark.,1965) ortamlarında olduğu gözlenmiştir. Ancak MS solüsyonunun küçük boyuttaki embriyolar için toksik etkisi de gözlenmiştir.

Embriyo kültüründe mineral tuzların birçok farklı formülasyonu kullanılmaktadır. Olgun veya olgunlaşmamış embriyoların kültüründe genellikle uygun bir karbon kaynağına gereksinim vardır. Sakaroz, karbonhidratın en iyi formudur ve embriyo kültürü için çok yaygın olarak kullanılmaktadır. *Zea*'nın birkaç türü , *Datura stramonium* , *Pinus nigra* , *Capsella bursa pastoris*'ın embriyolarında, sakkarozun üstünlüğü belirlenmiştir. Sakkaroz kültür ortamına enerji kaynağı olarak eklenmesinin yanı sıra ozmolariteyi de korumaktadır. Bu fonksiyon için sakkarozun optimum konsantrasyonu embriyo gelişme dönemine göre değişmektedir. Olgun embriyolar % 2 sakkarozda oldukça iyi büyüme gösterir. Fakat daha genç embriyolar daha yüksek karbonhidrata ihtiyaç duyar. Embriyolar için kültür ortamı, bitki

doku kültürlerinde kullanılan genel ortamdakilerden daha yüksek bir sakkaroz konsantrasyonu içerir. Kültürün sonunda bu konsantrasyonun azalması gerekir.

Embriyo kültürü ortamlarında azotun nitrat , nitrit veya amonyum formunda ilavesine rağmen değişik amino asitlerin ortama eklenmesiyle de kültüre alınan embriyoların büyüme ve gelişmesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Raghavan , 1980).

Amino asitlerin tek başına veya kombinasyon halinde kültür ortamına eklenmesi embriyo büyümesini uyarabilmektedir. Örneğin; glutamin, çiçekli bitkilerin dokuz farklı familyasına ait embriyoların büyümesini teşvik etmiştir (Bhojwani ve Razdan , 1996). 20 amino asit karışımının embriyo büyüme ve gelişiminde CH (kazein hidrolizat) kadar etkili olduğu gösterilmiştir. Vitaminler embriyo kültüründe kullanılmaktadır. Ama bunlar her zaman gerekli değildir. Ototrofik olan tohum embriyoları hücresel biyosentez ile vitamin ihtiyacını karşılayabilmektedir (Raghavan , 1980).

Oksin , gibberellin ve sitokinin gibi eksojen büyüme düzenleyicilerinin ayrı ayrı ya da kombinasyon halinde uygulanmasıyla, primordiyal kök ve sürgünlerin gelişmesi ve morfogenesiste görülen modifikasyonlar, araştırıcıları embriyo büyümesinde hormonların rolü üzerindeki araştırmalara sevk etmiştir (Raghavan , 1980).

Bitki besin ortamlarında yer alan komponentler kullanım sıklığına göre sırasıyla , su, makro elementler, mikro elementler, vitaminler, şekerler (karbon kaynağı) , yarı katılaştırıcılar (jel yapıcılar, agar,agaroz vb.) bitki büyüme düzenleyicileri, tamponlar, amino asitler, kimyasal olarak tanımlanamayanlardır (George, 1993, Franklin ve Dixon , 1994, Gamborg ve Phillips,1995). Bu komponentlerin hepsi aynı anda her ortamda bulunmayabilir.

Genel olarak sıvı ortamlar için makro ve mikro elementler , bazı vitaminler ve karbon kaynağı (sakkaroz) yarı katı ortamlar için de ek olarak agar veya agaroz içeren ortamlara "temel besin ortamları" denir. Temel besin ortamlarına bitki büyüme düzenleyicileri ilavesiyle her tür bitki parçası, dokusu veya hücresi için farklı ve özel besin ortamları hazırlanabilir.

Su, bir besin ortamının %90'ından fazlasını oluşturur. Ortam formülasyonunu tam olarak tutturabilmek için kullanılacak suyun da iyonize olmasına özen gösterilmelidir. Eğer bu imkan yoksa, çift distile saf su kullanılmalıdır.

Besi ortamının pH'sı genelde 5,5 – 6 olmalıdır ve bu NaOH veya 1N HCl ile sağlanmaktadır.

2.6. Embriyo Kültürünün Uygulama Alanları

2.6.1. Biyolojik Temel Çalışmalarda

Zigotik embriyo kültürünün en yararlı ve güncel uygulama alanı, istenen özellikleri taşıyan nadir bitkilerin yetiştirilebilmesidir .Embriyo kültürü, temel embriyogenesisi çalışmak için iyi bir olanaktır. Embriyogenesisteki çeşitli dönemler, bu yolla analiz edilebilmektedir. Kısaca embriyo kültürü, normal embriyogenesis için uygun besin isteklerini belirlemek , beslenmenin ve fitohormonların etkisini ortaya koymak için iyi bir araçtır. Zigotik embriyoların kültürü, tohum taslağında embriyonun büyümesindeki koşulları belirlememizi sağlamaktadır.

2.6.2. Tohumun Çimlenmemesi Durumunda

Tohum dormansisi ve sterilitesi embriyo kültürü ile kırılabilmektedir. Bazı türlerdeki tohum dormansisi, embriyoyu çevreleyen yapıda var olan kimyasal engelleyiciler veya mekaniksel dayanıklılık nedeniyledir. Böyle durumlarda embriyoların izole edilip, besin ortamında kültüre alınması ile dormansi ortadan kaldırılmaktadır. Tohum sterilitesi embriyoyu çevreleyen yapıların uyuşmazlığı nedeniyle olabilir. Böyle durumlarda da embriyo kültürü ile canlı fideler elde edilmektedir.

2.6.3. Islah Süresini Kısaltmada

Islah çalışmaları bahçe bitkilerinde nadiren de olsa tohumların dormansi periyotları nedeniyle uzamaktadır. Embriyoların besin ortamında geliştirilmesi ile bu süre kısaltılabilmektedir. Dormansiye sebep olan faktörler , tohum kabuğu ve endospermdeki endojen inhibitörler , düşük sıcaklık , özel ışık gereksinimleri gibi faktörler embriyonun kültüre alınması ile giderilmektedir. Sert tohum kabuğu nedeniyle çimlenmenin geciktiği durumlarda da embriyo kültürü ile çimlenme hızlandırılmaktadır.

Olgun olmayan embriyoların izolasyonu ve kültürü ile ıslah programı kısaltılmaktadır. Bu kültürle bir yılda iki generasyon üretilerek ıslah çemberinin kısaltılması mümkün olmaktadır. Embriyoların yetersiz gelişmesi halinde , hibrit embriyoların yaşatılmasında embriyo kültüründen faydalanılmaktadır.

2.6.4. Yaşamayan Embriyoların Kurtarılmasında

a) Embriyoların Yetersiz Gelişmesi : Meyvenin çok hızlı olarak olgunlaşması ve embriyonun tam olarak gelişmesini sağlayamadığı durumdur. Böyle meyvenin tohumlarından embriyolar çıkarılıp, in-vitro kültüre alındığı zaman çimlenir ve normal bitkiler üretilir.

b) Hibrit Embriyoların Yaşayamaması : Uzak akraba olan türler arası melezler çoğunlukla başarısızdır, döllenme olmakla beraber hibrit embriyonun yaşamadığı görülmektedir. Bu duruma "embriyo düşmesi" veya "abortus" denilmektedir. Bunun sebeplerinden biri , endospermin gelişmemesi veya dejenere olmasıdır. Bu durumda embriyo beslenemediğinden dolayı ölür ve çimlenebilir tohumlar meydana getirmez. Hibrit embriyonunu izolasyonu ve kültüre alınması ile yapay besin ortamı endospermin yerine geçebilmekte, böylece hibrit embriyolar yaşatılmaktadır.

Böyle başarısız melezlerde embriyonun potansiyel olarak normal büyüme yeteneğinde olduğunu , tam hibrit embriyoların düşme olayının başlamasından önce izole edilerek besin ortamında kültüre alınması ile yaşatılabileceğini ve hibrit bitkilerin elde edilebileceğini göstermesi tarıma önemli katkılarda bulunmuştur.

2.6.5. Tohum Canlılıklarının Hızlı Test Edilmesinde

Embriyonun çimlenmesi ile gerçekleştirilen tohum canlılık testine, diğer metotlara göre daha doğru ve güvenilir bir test olarak bakılmaktadır (*Bhojvani ve Razdan* , 1996).

2.6.6. Ender Bitkilerin Çoğaltılmasında

Ticari muzun yabani bir akrabası olan *Musa balbisiana* doğada çimlenmemektedir. Bununla birlikte fideler embriyoların kültüre alınması ile kolaylıkla elde edilebilmektedir. Bazı hindistan cevizlerinde sıvı endosperm yerine yumuşak ve yağlı bir doku gelişir. Bu tip hindistan cevizleri 'makapuno' olarak adlandırılır. Bunların tohumları normal koşullar altında çimlenmede başarısız olmaktadır. İn-vitro kültür tekniği kullanılarak makapuno embriyolarından bitkicikler yetiştirilmiştir.

2.7. Embriyo Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler

2.7.1. Genotip

Diğer kültür çalışmalarında olduğu gibi embriyo kültüründe de genotip etkisi söz konusudur. İnvitro kültürde bazı türlerin embriyolarının gelişmesi çok kolay olurken bazı türlerde oldukça zordur.

2.7.2. Embriyonun Kültüre Alındığı Dönem

Çok küçük embriyoların invitro gelişmesi zordur. Embriyo invivoda ne kadar gelişmişse invitrodaki gelişimi de o ölçüde daha kolay olmaktadır. Örneğin *Brassicia napus*'un erken globular dönem embriyolarının in vitro kültüründe embriyo olgunlaşma oranının embriyo boyutu ile ilişkisi gösterilmiştir (*Goralsi ve ark.*,1998).

2.7.3. Besin Ortamının Bileşimi

Olgun embriyolar basit bir ortamda gelişirken erken gelişme dönemindeki embriyolar daha komplike bir ortama gerek duymaktadır. Embriyo kültürü için geliştirilmiş çeşitli ortamlar bulunmaktadır.

2.7.4. Kültür Koşulları

Kültürdeki oksijen, önemli bir faktördür. Bazı türlerin önce karanlıkta, sonra aydınlıkta inkübe edilmesi uygun olmaktadır. Kültürde optimum sıcaklık bitki türüne göre değişmektedir. Ayrıca dormansiyi kırmak için soğuk uygulaması gerekebilir.

2.7.5. Embriyoların İzolasyonu

Embriyoyu zedelemeden izole etmek özellikle erken gelişme dönemindeki embriyoların süspensorunun zarar görmemesi başarı için önemlidir. [6]

---

[6] M.Babaoğlu-E.Gürel-S.Özcan, Bitki Biyoteknolojisi, S.Ü.Vakfı Yayınları, 2002, s.338

2.8. Totipotansi , Polarite , Morfogenez , Apomiksis

Doku kültüründe tek bir hücrenin tam bir bitki oluşturma yeteneği, hücrelerin gelişme TOTİPOTANSİ'sini göstermektedir. Diğer bir deyişle her hücrenin bir bitkiyi oluşturan tüm özellikleri gizli olarak taşıma olgusuna TOTİPOTANSİ adı verilmektedir. Çünkü her biri tek bir hücreden yani zigottan kökenlenir ve genetik olarak aynıdır. O halde benzer olan bu totipotent hücreler bitki gelişmesi sırasında yapı ve işlev bakımından nasıl farklı olabilmektedir? Genetik olarak benzer hücrelerin bütün genleri etkindir. Uygun dış etkiler bazı genleri teşvik eder , bazılarını bastırır. Sonuç olarak hücreler oluşan etmenlere göre özel olan gelişme yollarını izler. Moleküler düzeyde bazı ajanlarla (hormonlarla) belirli genlerin etkinliği hücrenin farklılaşma yolunu belirleyen özel enzimlerin sentezine yol açmaktadır.

Bitki morfogenezinde tüm düzenleyici mekanizmanın varlığını gösteren bir olay da POLARİTE'dir. Yani bitkinin iki ucu arasında bireysel organlar arasında fizyolojik ve yapısal ayrımlar oluşmaktadır. Polarite, farklılaşmayı ve farklılaşmanın ortaya çıkışını kontrol eden bir etkendir.

Yalın bir meristematik dokuda karmaşık ve değişken yapılı dokulara aşamalı olarak değişme ve olgun bitki yapısı haline geçme FARKLILAŞMA olarak adlandırılır. Diğer bir deyişle özelleşmemiş yapılar özel işleri yapmak üzere değişikliğe uğrar. Farklılaşmamış meristematik durumdan farklılaşmış ve gelişmiş duruma geçişte hücrelerin ayrımlı düzenlenişi ve morfolojik özellikleri rol oynar. Sonuçta tek bir hücreden doku ve doku sistemi organ ve gelişmiş bir bitki ortaya çıkar. Farklılaşmada ilkin öncü meristemlerden ayrımlı yapılar oluşturulur. Sonra komşu hücrelerden farklı özellikler kazanılır. Böylece hücre düzeyinde farklılaşma olurken , o hücrenin belirli işlevler için öz yapısal özellikleri kazanması gereklidir (Yentür , 1984).

Bitkinin gelişmesi ya da ontogenesi arasında büyüme ve hücre farklılaşması ile bitki özel şeklini alır. Bu olaya MORFOGENEZ adı verilir. Morfogenez terimi, hem bitkinin dış yapısının, hem de iç düzenlenmesinin gelişmesi için kullanılır. Böylece farklılaşma ve özelleşme morfogenezin öğeleri olarak sayılmaktadır.

Döllenme, esas olarak embriyo kesesinin mikropil tarafında bulunan üç hücreden ortadaki yumurta hücresi ile erkek gametofitin birleşmesi olayıdır. Döllenmiş bir zigot hücresinden gelişmiş olan yarı benzeşik hücre ve dokular, aynı genetiksel yeteneğe sahip olmalarına karşın, ileri basamaklarda ayrımlı tipte hücre ve dokuları meydana getirir. Bazı

hallerde döllenme olmadan embriyo gelişir. Buna da APOMİKSİS denir. Aynı farklılaşma bu şartlarda da geçerlidir. Sonuçta yeni bir bitki oluşur (Önder,1985). [7]

2.9.Bitki Hormonları

Bitkilerin büyüme ve gelişmesinde rol oynayan en önemli iç faktörler bitki hormonlarıdır. Bitki büyüme hormonları, bitki içersinde taşınma özelliğine sahip olup, gittiği doku ve organlarda büyümeyle farklılaşmaya neden olur. Bunlar çok az yoğunluklarda bile etkilerini gösterebilme özelliğinde olup, bitkilerin fizyolojik etkinlerini kontrol etmektedir. Büyüme ve gelişmeyi düzene soktukları için "büyüme regülatörleri" olarak adlandırılır.

2.9.1. Büyümeyi Teşvik Edici Hormonlar

2.9.1.1. IAA (İndol Asetik Asit)

Oksinler, ünlü botanikçi Darwin'in bir yüzyıl önceki gözlemleri sonucunda saptanmıştır. Fakat oksini koleoptilden ilk izole eden Went'tir (1926).

Oksin, nispeten daha basit bir bileşik olarak indol-3-asetik asit (IAA) şeklinde tanımlanmıştır. Oksin ilk kez kristal halde insan idrarından elde edilmiştir. 1934 yılında Kögle ve Haagen Smith tarafından bulunup, adlandırılmıştır. Mantarlar dahil birçok bitki dokusunda bu bileşiğin çok yaygın olduğu görülmüş ve kristalize olarak elde dilmiştir (100 kg mısır tohumundan 500 mg). Araştırmalar IAA'nın bir amino asit olan triptofandan türevlendiğini kanıtlamıştır.

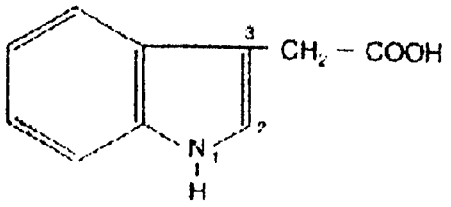
Oksin, genellikle embriyo büyümesi için bir engelleyicidir. *Datura stramonium* embriyolarının büyümeleri üzerine IAA'nın bir dizi konsantrasyonlarının etkisinin incelendiği bir çalışma oksinin genel engelleyici etkisine rağmen, ekstrem olarak düşük konsantrasyonlardaki uygulamasının kök primordiyum büyümesinin artmasını sağladığını ortaya koymuştur.

Oksinlerin bitkide büyümeyi teşvik edici etkisi, bitkilerin en küçük birimi olan hücreye etkisi ile mümkündür. Bir tek hücrenin büyüyebilmesi için , protein sentezinin artması , çeperin gevşemesi ve hücrenin su alması gerekir. IAA ise bu üç olayı da teşvik eder özelliktedir. Bu özelliğine bağlı olarak IAA hücrenin osmotik değerini yükseltir,

---

[7] B.A.Ekmekçi, Biyoteknoloji Ders Notları, A.Ü.Yayınları,1995, s.58

permeabiliteyi arttırır ve çeper basıncını azaltır. Ayrıca kambiyal aktiviteyi, odun dokusunun oluşumunu , meyve büyümesini teşvik eder ve partenokarpik meyve oluşumuna neden olur. Yaprak ve meyve absisyonuna ket vurur. Ayrıca lateral tomurcuk gelişimini önler. Solunumu hızlandırır. IAA etkisinde kreps çemberinin etkinliği artar . Dolayısıyla enerji fazlalığına neden olur. Ayrıca çiçeklenmeyi de arttırır. Şekil 1'de IAA'nın formülü verilmiştir.



İndol-3-asetik asit

Şekil 1: ***İndol-3-asetik asit (IAA)***

2.9.1.2. Kinetin

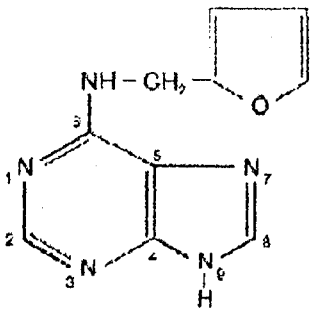
1956'da keşfedilmiştir. Bu madde hindistan cevizi (cocos nucifera) meyvesinin sıvı besi dokusu ya da hindistan cevizi sütüdür. Sitokininler içinde en önemlisi kinetindir(K). Sitokininlerin en önemli özelliği de DNA'dan sentetik olarak elde edilmeleridir. Kinetin büyümede hücre uzamasını, gelişmesini ve bölünmesini kontrol eder.

Sitokininler genellikle alkali özelliktedir. Kinetinin yapısı 6-furfuril aminopurin olup, bir purin halkası taşır. Büyüme üzerine kinetinlerin etkisi IAA ile beraber uygulandığında çok daha belirgin hale gelir. Sitokininlerin apikal dominansi, yaprak yüzeyi çiçeklenme ve polarite gibi fizyolojik olaylara etkinliği de araştırılmıştır. Kinetinin apikal dominansiyi çözücü özellikte olduğu ve çiçeklenmeyi teşvik ettiği birçok deneyle kanıtlanmıştır.

Kinetin bir sentetik sitokinindir. Bitkide doğal olarak meydana gelmez. Doğal sitokininlere örnek olarak mısırdaki zeatin verilebilir. Sitokinin grubu bitki hormonları, genç bitki embriyolarında ve dokularında keşfedilmiştir. Oksin büyümede tek başına değil, sitokininle birlikte etkilidir.

Sitokininlerin hücre bölünmesine etkilerini göstermek amacıyla sonbaharda yaşlanmış artık dökülmeye yüz tutan yapraklar alınarak, bunlardan kurslar çıkartılır . Bu kurslar, içinde kinetin bulunan bir kaba bırakılırsa, bir süre sonra iyice farklılaşmış ve klorofillerini kaybetmiş hücrelerin tekrar bölünebilirlik ve klorofil özelliklerinin geri geldiği saptanabilir. Şekil 2'de kinetinin formülü verilmiştir.

Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphane



Kinetin (=N^6 - furfuril adenin)

Şekil 2: *Kinetin*

3. MATERYAL ve METOTLAR

3.1.Materyal

3.1.2. *Capparis ovata* (Kebere, Kapari) Bitkisinin Genel Özellikleri

Bu çalışmada ele alınan materyal *Capparaceae* familyasından *Capparis ovata* (kapari) dır. Araştırma bitkisi çok yıllık, yayılıcı, sürünücü, çalımsı, zengin dallı, güçlü ve geriye doğru kıvrık dikenli, odunsu bir bitkidir. Yapraklar almaşık, darca, dikdörtgensi- eliptik , üst kısmı dikenli , ucu genelde sivridir. Çiçekler beyaz, bazen açık pembe renkli , çanak ve taç yaprak dört adet, üst taç yaprak uzun ve nektaryumludur. İlkbahar- yaz aylarında çiçek açar, çiçekleri kısa ömürlüdür. Tohumla üretilir. Bol güneşli yerlerde ve sıcak (ılıman) iklimlerde yetişir. Taşlı, kumlu, geçirgen, fakir ve kuru toprakları tercih eder. Az su verilmelidir. Kaya bahçelerinde, taş duvarların üzerinde , çatı bahçelerinde, yol kenarlarında, erozyon kontrol çalışmalarında , geniş alanların örtülmesinde kullanılabilir. Vatanı Türkiye ve Akdeniz Bölgesi'dir.[8]

Akdeniz ülkelerinde ilk çağlardan bu yana gıda ve tedavi amaçlı kullanılan kapari bitkisinden günümüzde boya ve kozmetik sanayinde yararlanılmaktadır. Kaparinin tomurcuklarında protein, vitamin, mineraller, rutin ve hardal yağı glikosidi vardır. Bu da kapariyi doyurucu bir besin haline getirmektedir.

Kaparinin kökleri toprağın derinliklerine inerek ve toprak altında yatay biçimde metrelerce yayılarak dolgu toprağı örtebilme özelliğine sahiptir. Bu şekilde toprak kaybının önüne geçilebilmektedir. Ayrıca tarıma elverişli olmayan alanları değerlendirmede kapari ideal bir bitkidir.

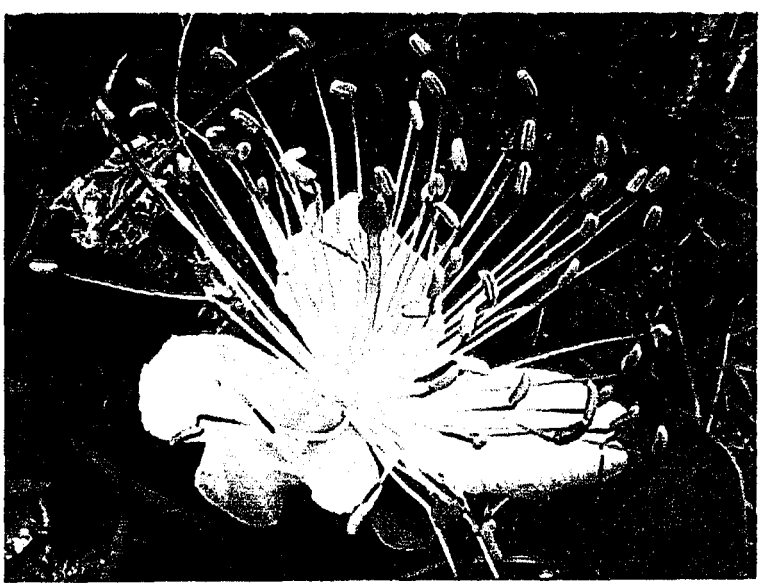
Kapari bitkisi yurdumuzun büyük bir bölümünde doğal olarak yetişebilmektedir. Deniz seviyesinden 2000m yüksekte bile görülmektedir (Karaman Göktepe Beldesi). Kapari bitkisi özelliği gereği yaz sıcağının ve güneşin olduğu her yerde yetişebilmektedir. Mayıs- Ağustos ayları arasında yeterli sıcağı ve güneşi bulduğu her yerde rahatlıkla yetişmektedir. Karadeniz Bölgesi gibi yüksek nemli ve bol yağış olan yerleri sevmez. Fosfor, potasyum ve kalsiyumca zengin kalkerli ve killi toprakları seven bir bitkidir. Topraktaki tuz oranının da yüksek olmaması gerekmektedir.

---

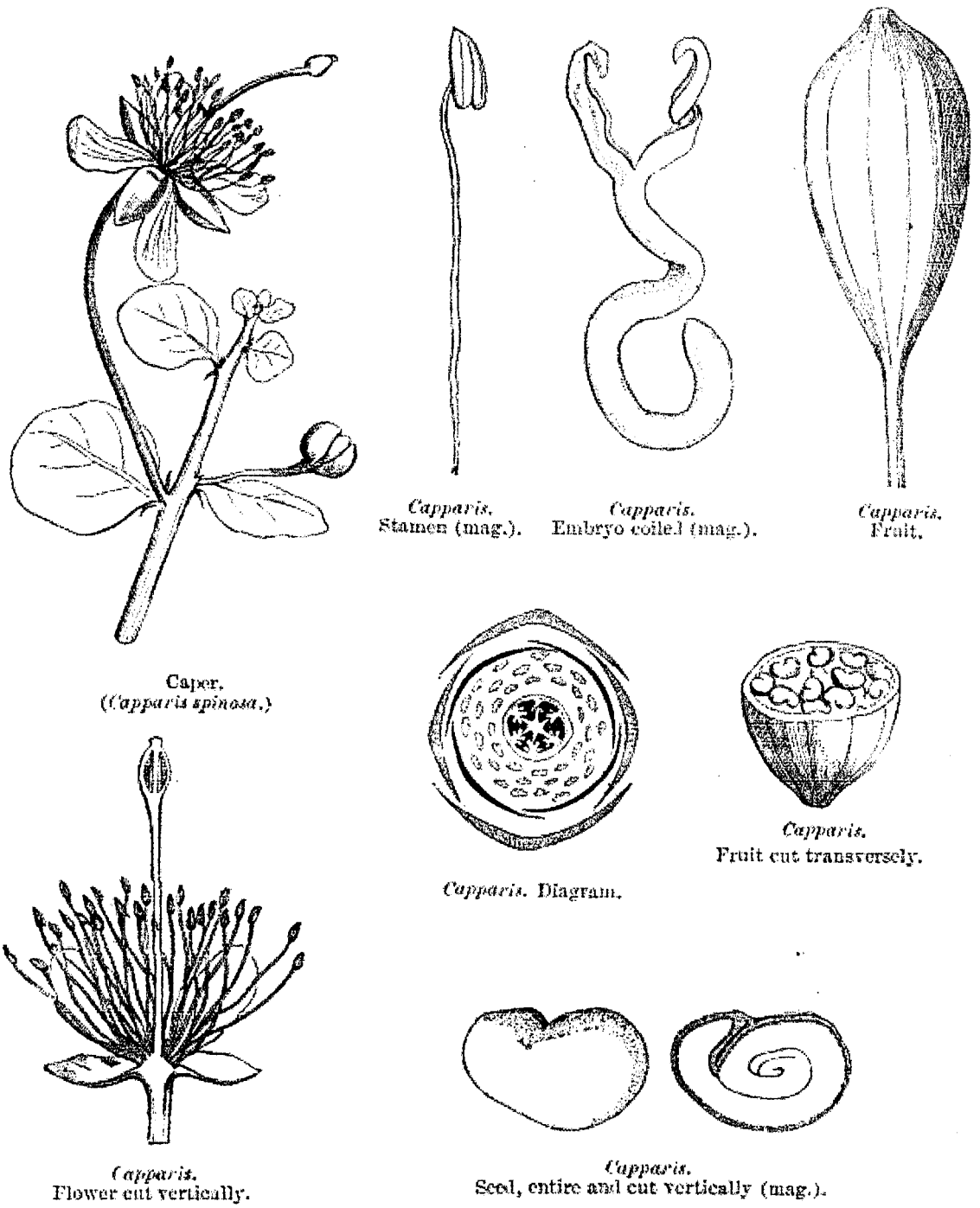
[8] Prof.Dr.E.Yücel, Çiçekler ve Yer Örtücüler, ETAM Matbaa Tesisleri Eskişehir,2002, s.86

Çalışmada kullanılacak olan *Capparis ovata* bitkisinin tohumları internette literatür taraması yapılırken ulaşılan GAMEKS firmasından, yine internet aracılığıyla sipariş verilerek sağlanmıştır. Resim 1'de *Capparis ovata* bitkisi görülmektedir. Resim 2'de bitkinin çiçeği görülmektedir. Resim 3'te de bitkinin farklı kesitleri yer almaktadır.

Resim 1: *Capparis ovata bitkisinin genel görünümü*



Resim 2: *Capparis ovata çiçeği*



Resim 3: *Capparis ovata*'nın farklı kesitleri.

3.2. Metotlar

3.2.1. Çimlendirme

Capparis ovata tohumları çimlendirilmek üzere iki ayrı saksıya ekilmiştir. İki saksıya da kestane toprağı konularak , on tane *C. ovata* embriyosu toprağın bir cm. derinine ekilerek, haftada bir pastör pipetiyle 25 ml. distile su kullanılarak sulanmıştır. Saksılar normal gün ışığında , 25 °C 'de (oda sıcaklığında) dört hafta süreyle gözlenmiştir.

3.2.1.1. Formik Asit

Capparis ovata tohumları ekilen iki saksıdan biri haftada bir pastör pipetiyle 25ml. %20'lik formik asit çözeltisiyle sulanmıştır. 100 ml. saf suya 20 cc. formik asit ilave edilerek %20'lik formik asit çözeltisi elde edilmiştir. Bitkinin su ihtiyacı pastör pipetiyle iki günde bir 25ml. distile su ile sağlanmıştır. Dört hafta süreyle gözlem yapılmıştır.

3.2.1.2. Salisilik Asit

Capparis ovata tohumları ekilen diğer bir saksıya haftada bir pastör pipetiyle 25ml. % 20'lik salisilik asit muamelesi yapılmıştır. 100 ml. saf suya 20 gr. salisilik asit ilave edilerek % 20'lik salisilik asit çözeltisi elde edilmiştir. Bitkinin su ihtiyacı pastör pipetiyle iki günde bir 25ml. distile su ile sağlanmıştır. Dört hafta süreyle gözlem yapılmıştır.

3.2.1.3. Doku Kültürü

Capparis ovata embriyoları MS besiyerinin farklı konsantrasyonlarında (1, 2, 3, ½, ¼) çimlendirilmiştir. 4 hafta süreyle gözlem yapılmıştır.

3.2.1.3.1.MS Besiyerinin Hazırlanması, Alet ve Ekipmanın Sterilizasyonu

Bu embriyo kültürü çalışmasında MS (*Murashiage Skoog*)(Çizelge 3.2.1.) besi ortamı kullanılmıştır. MS besi ortamındaki kimyasal maddelerin ölçümleri hassas terazi ile yapılmıştır ve 500 lt'lik erlenmayer içine konulmuştur. Erlenmayerin içine 250ml distile su

ilave edilmiştir. Bu işlemden sonra erlenmayerin ağzı pamukla sıkıca kapatılıp, üzerine alüminyum folyo sarılarak, elle 8 hareketi yapacak şekilde 5 dakika karıştırılmıştır. Karıştırmadan sonra otoklav bandı yapıştırılmış, besiyeri otoklavlanmaya hazır hale getirilmiştir. Otoklavın kapağı kapatılmış, 120° C'de ve 1,5 atm basınçta 15 dakika bekletilmiştir. Kallus oluşumu için MS stok solüsyonuna 1,0 mg/lt KIN (kinetin), bitkinin boyunun uzaması ve yapraklarının gelişimi için 1,0 mg/lt IAA (indol asetik asit) hormonları ilave edilmiştir.

Besin ortamlarının sterilizasyonu için standart bir işlem olarak otoklavda 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121 °C'de sterilizasyon yapılmıştır. İşlem tamamlandıktan sonra steril kabine alınan besiyeri 40 °C'ye kadar soğuduktan sonra 0.45 mm'lik steril filtrelerle besiyerine ilave edilmiştir. Çünkü yüksek sıcaklıklarda hormon ve enzimler özelliklerini kaybeder.

Otoklavlanan materyallerin her türlü kontaminasyondan korunması için erlenin ağzı steril pamukla kapatılıp, alüminyum folyo ile sarılmıştır.

Cam malzemeler (erlen, beher, petriler) ile pens, bistüri kuru havalı fırınlarda 160 °C-180 °C'de üç saat tutularak steril edilmiştir.

Besi ortamının dökületeceği petri kapları alüminyum folyo ile sarılmış ve 180° C'deki fırında 3 saat süre ile steril edilmiştir. Alüminyum folyo kağıtları açılarak steril kabinin içine bırakılmıştır. Otoklavdan çıkarılan erlenmayerin oda sıcaklığına gelinceye kadar soğuması beklenmiştir. (25° C-30° C) Bu sıcaklığa düştükten sonra , steri kabin içinde , bek alevinin yanında steril petrilere besiyeri dökülmüştür. IAA ve kinetin (0.1 mg) otoklavdan sonra besiyerinin sıcaklığı 40°C ye düşünce besiyerine ilave edilmiştir. Çünkü yüksek sıcaklıklarda hormon ve enzimler özelliklerini kaybeder. Besi ortamının donması ve kontaminasyon olasılığına karşı birkaç gün beklenilmiştir. Çizelge 1'de MS besiyeri ve komple sıvı besin çözeltisi bileşimleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.1 MS Besiyeri

Makro Elementler	Tam (mg/lt)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1800
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_27PO_4	170
Na_2Edta	37.5
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
Mikro Elementler	
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.4H_2O$	8.6
KI	0.86
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.7H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Organik Bileşikler	
Sukroz	30000
Agar	10000
Glisin	2
Inositol	100
Nikotinik asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Thiamin-HCl	0.1

Çizelge 3.2.2 Komple Sıvı Besin Çözeltisi

Makro Elementler	gr/lt saf su
$Ca_3(PO_4)_2$	0.5
$CaSO_4$	0.5
$MgSO_4$	0.5
NaCl	0.5
KNO_3	0.5
$FeCl_3$	0.5
İz Elementler	**cc/lt saf su**
NH_4MoO_4	1.0
$CuCl_2$	1.0
$MnCl_2$	1.0
Na_2BO_3	1.0
$ZnCl_2$	1.0

Çizelge 1. MS Besiyeri

3.2.1.3.2. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu ve Embriyoların İzolasyonu

Embriyosu çıkarılacak olan *Capparis ovata,* tohum testalarının sertliklerine göre 1-2 gün su içinde tutulmuştur.Yumuşaması sağlanmış tohumlar daha sonra steril kabin içine alınmıştır. Steril kabin içinde 3 tane beher hazırlanmıştır. Birincisine çamaşır suyu (hipoklorat), ikincisine %75'lik alkol, üçüncüsüne steril saf su konulmuştur. Sterilizasyon için tohumlar %0.5 sodyum hipokloritte (%10'luk kloraks) 2-3 dakika bekletildikten sonra %75'lik alkolde 2-3 dakika bekletilerek, steril distile su içinde de 2-3 dakika tutulmuştur. Sonra alkollenip, alevden geçirilmiş pens ve bistüri yardımıyla tohum kabuğu ve testası ayrılmıştır. Zarar verilmeden embriyo çıkarılmıştır. Embriyo steril olarak izole edilip, bekin yanında besin ortamının yüzeyine transfer edilmiştir. Bir petriye bu metotla beş embriyo ekilmiştir. Ekim petrinin dört köşesine ve bir tane ortasına olacak şekilde yapılmıştır. Petri parafilmle kaplanıp, üzerine günün tarihi, bitki türü, besiyeri ismi yazılıp, deftere kaydedilmiştir. Sonra petriler 25° C'ye ayarlı ve 35-40 H nem oranı olan iklim dolabına konulmuştur. 2-3 günde bir gelişmeleri kontrol edilmiştir. Gövde ve kök değişimleri kaydedilmiş, haftalık olarak fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.1.3.3. Besin Ortamının Bileşimi

Çalışmada temel besiyeri olarak en çok kullanılan besi ortamı MS ile ifade edilen *MURASHİGE SKOOG* (1962) besiyeri kullanılmıştır. Besi ortamının %97'sini su oluşturmaktadır. Kullanılan su, saf sudur. Farklı konsantrasyonlardaki MS besiyerlerine ilk gelişimi teşvik etmek için 0.1 mg/lt kinetin (KIN), sürgün gelişimi ve yapraklanmayı teşvik etmek için 0.1 mg/lt indol asetik asit (IAA) eklenmiştir.

3.2.1.3.4. Fotoperiyot Uygulaması

Gerek köklenmeyi teşvik etmek, gerekse köklenen genç bitkiciklerin adaptasyonu için fotoperiyot uygulaması yapılmıştır. Embriyoların ekiminden sonra 25°C' deki 24 saatlik karanlık fotoperiyotta iklim dolabında tutulan embriyoların gelişmesiyle fotoperiyoda başlanmıştır. Sürgünleri gelişen ve köklenen bitkicikler 25°C' de 20 W' lık beyaz floresans lambalarla aydınlatılmış iklim dolabında fotoperiyoda tabi tutulmuşlardır. Bitkilere iki hafta süreyle 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık fotoperiyot uygulanmıştır.

Fotoperiyot uygulamasıyla çimlenen embriyolar aktarma kabına taşınmıştır. Günlük olarak gelişimleri kaydedilmiştir.

3.2.1.3.5. Makro Elementlerin Konsantrasyonuna Bağlı Stres

Bu çalışmada *Capparis ovata* bitkisinin tohumlarından çıkarılan embriyolar , farklı konsantrasyonlardaki makro elementler içeren MS besi ortamlarına (¼ MS, ½ MS, 1MS, 2MS, 3MS) ekilmiştir. Hormon olarak 0,1 mg kinetin ve 0,1 mg IAA kullanılmıştır. Her petriye 5 adet embriyo ekilmiştir. Üç hafta süresince 25°C'deki iklim dolabında kültüre edilmiştir. Üç hafta sonunda embriyolar kök uzunluğuna , yaşayan embriyo sayısına ve kararmasına göre ayrı ayrı değerlendirilmiştir. MS besi ortamının farklı konsantrasyonlarda makro elementleri içeren bileşimleri çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2: Makro elementleri farklı konsantrasyonlarda içeren MS besi ortamlarının bileşimleri.

Makro Elementler (mg/lt)	**1/4 MS**	**1/2 MS**	**1 MS**	**2 MS**	**3 MS**	**4 MS**
NH_4NO_3	412,5	825	1650	3300	4950	6600
KNO_3	450	900	1800	3600	00	7200
$CaCl_2 2H_2O$	110	220	440	880	1320	1760
$MgSO_4 7H_2O$	92,5	185	370	740	1110	1480
$KH_2 7PO_4$	42,5	85	170	340	510	680
Na_2Edta	9,375	18,75	37,5	75	112,5	150
$FeSO_4 7H_2O$	6,95	13,9	27,8	55,6	83,4	110,2
Mikro Elementler						
H_3BO_3	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
$MnSO_4 4H_2O$	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3
$ZnSO_4 4H_2O$	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
KI	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86
$Na_2MoO_4 2H_2O$	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
$CuSO_4 7H_2O$	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
$CoCl_2 6H_2O$	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Organik Bileşikler						
Sucrose	30000	30000	30000	30000	30000	30000
Agar	10000	10000	10000	10000	10000	10000
Glycines	2	2	2	2	2	2
İnositol	100	100	100	100	100	100
Nikotinik asit	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Pridoksin-HCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Thiamin-HCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

3.2.2. Stres Fizyolojisi Çalışmaları

3.2.2.1. Tuz Stresi

Çimlenen *Capparis Ovata* bitkisiyle tuz stresi çalışılmıştır. Çimlenen embriyolara ayrı ayrı saksılarda %0, %1, %2, %3, %4 NaCl uygulanmıştır. İki günde bir 25ml.'lik pastör pipetiyle sulanmıştır. Dört hafta boyunca bitkinin gelişimi gözlenmiştir.

4. BULGULAR

Resim 4: C ovata embriyolarının formik asit uygulamasının 1.haftası.

Resim 5: C ovata embriyolarının formik asit uygulamasının 2.haftası.

Resim 6: C ovata embriyolarının formik asit uygulamasının 3.haftası.

Resim 7: C ovata embriyolarının formik asit uygulamasının 4.haftası.

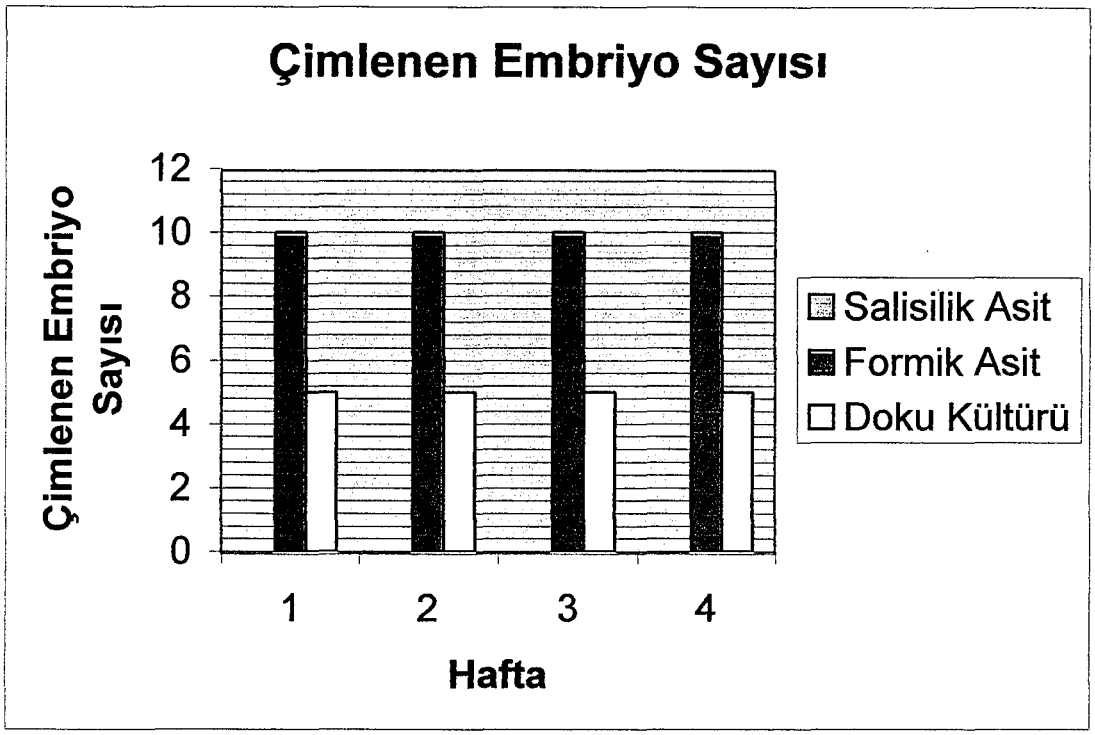
Anadolu Üniversitesi
Bilimsel Kütüphane

Resim 8:C ovata embriyolarının salisilik asit uygulamasının 1.haftası.

4 haftalık gözlemlerin sonucunda, salisilik asit ilavesiyle desteklenen saksılarda çimlenme olmadığı görülmüştür (Resim 8). Aynı sürede gözlemlenen formik asit muameleli saksılarda embriyolar çimlenmiştir. Birinci hafta sonunda çimlenen bitkinin boyu 0.4 cm (Resim 4), ikinci hafta sonunda 0.6 cm (Resim 5) , üçüncü hafta sonunda 0.9 cm (Resim 6), dördüncü hafta sonunda 1.1 cm (Resim 7) olarak ölçülmüştür. İkinci haftadan itibaren bitki yapraklanmaya başlamış, dördüncü haftanın sonunda ise iki yapraklı olarak gelişmiştir.

Hafta	**1**	**2**	**3**	**4**
Salisilik Asit	0	0	0	0
Formik Asit	10	10	10	10
Doku Kültürü	5	5	5	5

Çizelge 3: 4 hafta sonunda çimlenen embriyo sayısı.

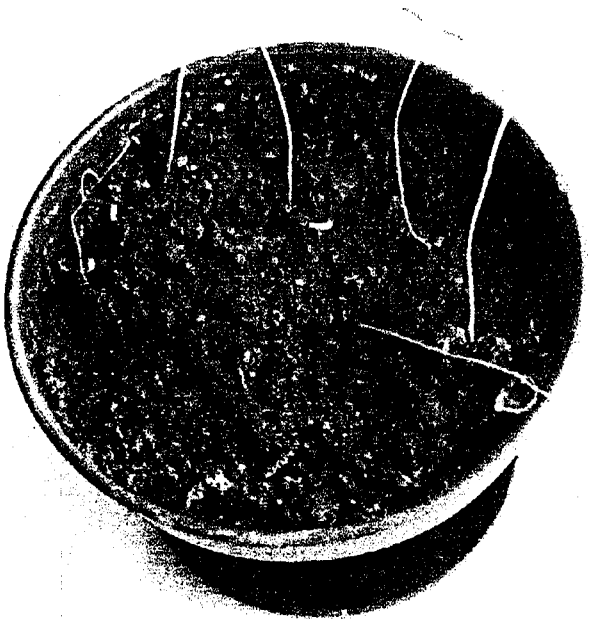


Grafik 1: 4 hafta sonunda çimlenen embriyo sayısı.

Çimlenen embriyolar tuz stresi incelemesini yapmak üzere 5 farklı saksıya aktarılmıştır. Her saksıya beşer tane çimlendirilmiş embriyo taşınmıştır. Birinci saksı %0, ikinci saksı %1, üçüncü saksı %2, dördüncü saksı %3 ve beşinci saksı %4 NaCl çözeltisiyle iki günde bir sulanmıştır.

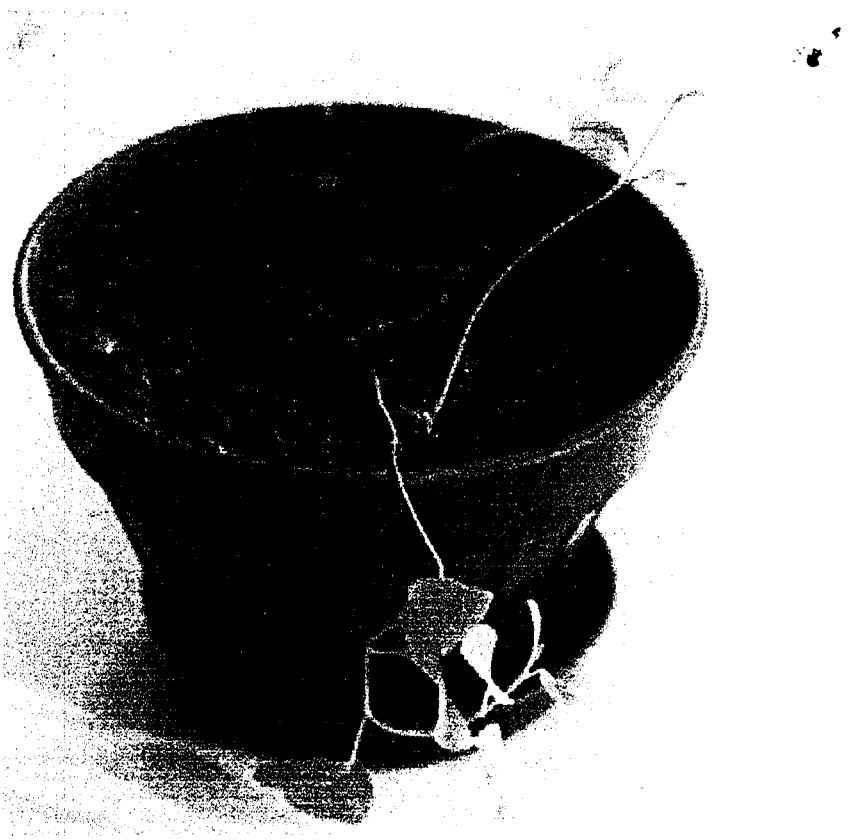
Dört hafta boyunca bitkideki boy uzaması, yaprak sayısının artması-azalması, yaprak ayasının genişlemesi yönlerinden bitki takip edilmiştir. Çimlenmenin ilerlemesi, bitkinin boyca büyümesi, yaprak sayısının artması en fazla %0'lık NaCl uygulamasında gözlenmiştir. Yüzde oranı arttıkça bitki büyüme ve gelişmesinin azaldığı kaydedilmiştir.

Resim 9: C ovata embriyolarının %0 NaCl uygulamasının 1.haftası.



Resim 10: C ovata embriyolarının %0 NaCl uygulamasının 2.haftası.

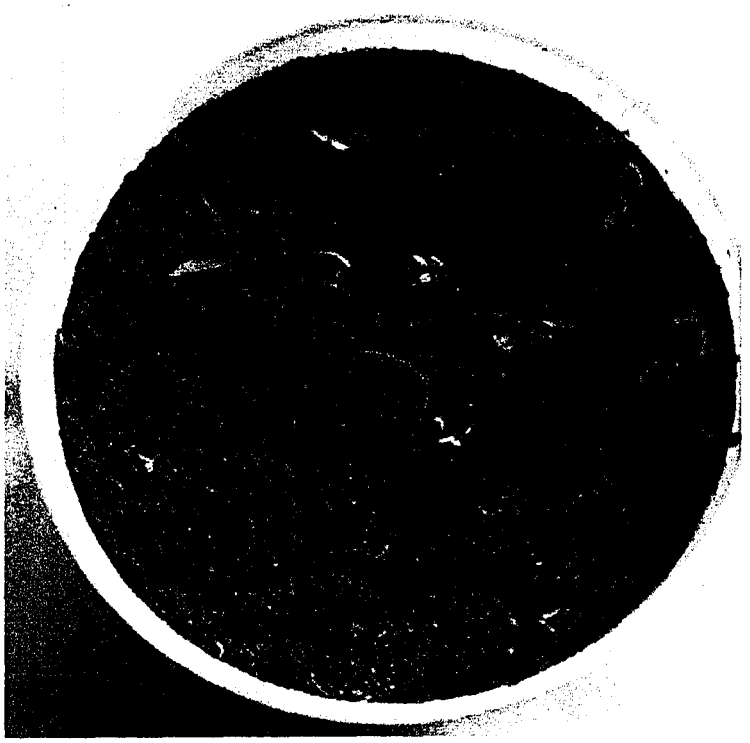
Resim 11: C ovata embriyolarının %0 NaCl uygulamasının 3.haftası.



Resim 12: C ovata embriyolarının %0 NaCl uygulamasının 4.haftası.

%20'lik formik asit çözeltisiyle 4 hafta sonunda çimlenen *Capparis ovata* bitkisinin boyu %0 NaCl uygulamasının 1. haftası sonunda 2.2 cm (Resim 9), 2. haftasının sonunda 4.3 cm (Resim 10),3. haftasının sonunda 7.6 cm (Resim 11), 4. haftasının sonunda 12.7 cm (Resim 12) olarak ölçülmüştür

%0'lık NaCl uygulamasıyla bitkide 1. hafta sonunda 3 tane olan yaprak sayısı 2., 3., 4. haftalarda 7 olarak sabit kalmış, büyüme ve boy olarak uzama gözlenmiştir.



Resim 13: C ovata embriyolarının %1 NaCl uygulamasının1.haftası.

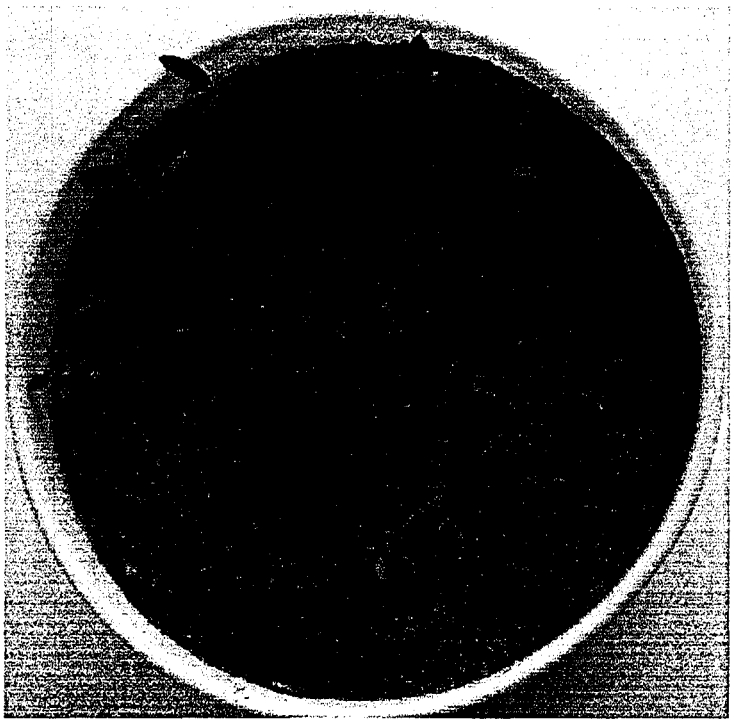
Resim 14: C ovata embriyolarının %1 NaCl uygulamasının2.haftası.

Resim 15: C ovata embriyolarının %1 NaCl uygulamasının3.haftası.

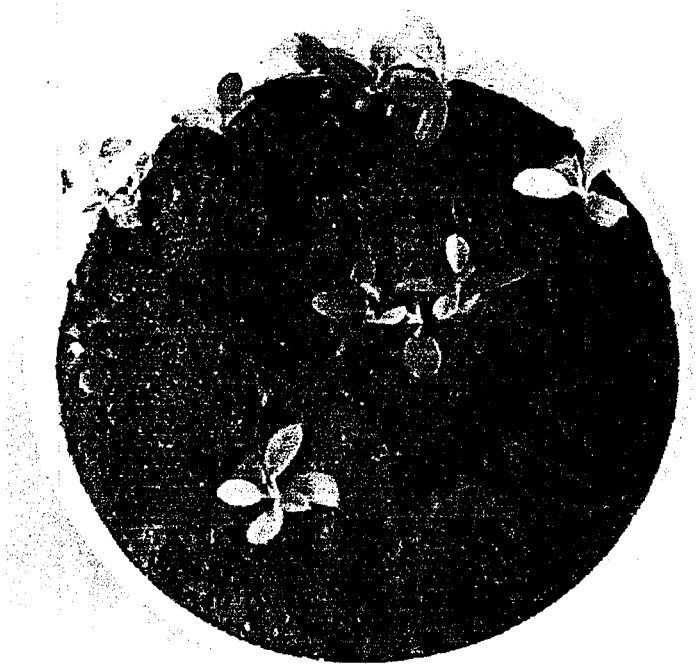
Resim 16: C ovata embriyolarının %1 NaCl uygulamasının 4.haftası.

%1'lik NaCl uygulamasıyla 1. hafta sonunda bitki 1.7 cm (Resim 13), 2. hafta sonunda 3 cm (Resim 14) , 3. hafta sonunda 4.2 cm (Resim 15), 4. hafta sonunda 4.5 cm (Resim 16) olmuştur.

%1'lik NaCl uygulamasıyla bitkide 1. hafta sonunda 3 tane olan yaprak sayısı 2., 3., 4. haftalarda 6 olarak sabit kalmış, yaprak ayasında büyüme gözlenmiştir.

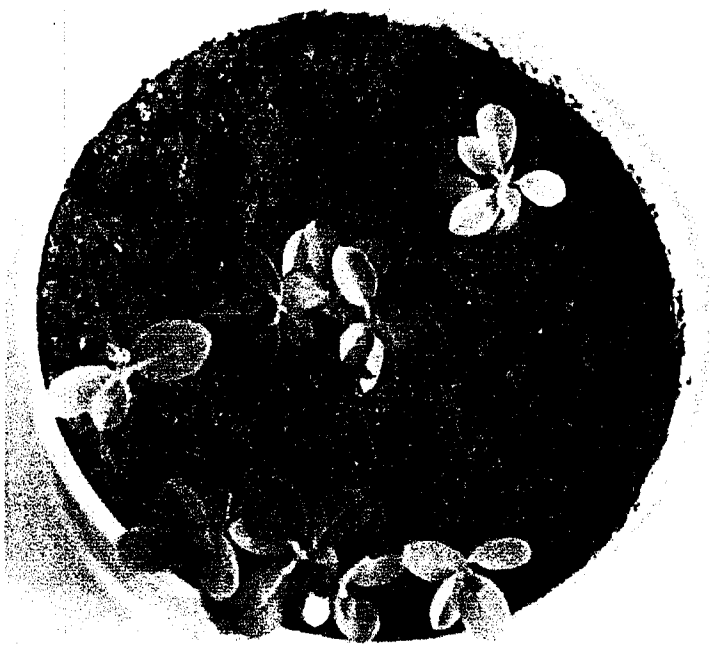


Resim 17: C ovata embriyolarının %2 NaCl uygulamasının 1.haftası.



Resim 18: C ovata embriyolarının %2 NaCl uygulamasının 2.haftası.

Resim 19: C ovata embriyolarının %2 NaCl uygulamasının 3.haftası.

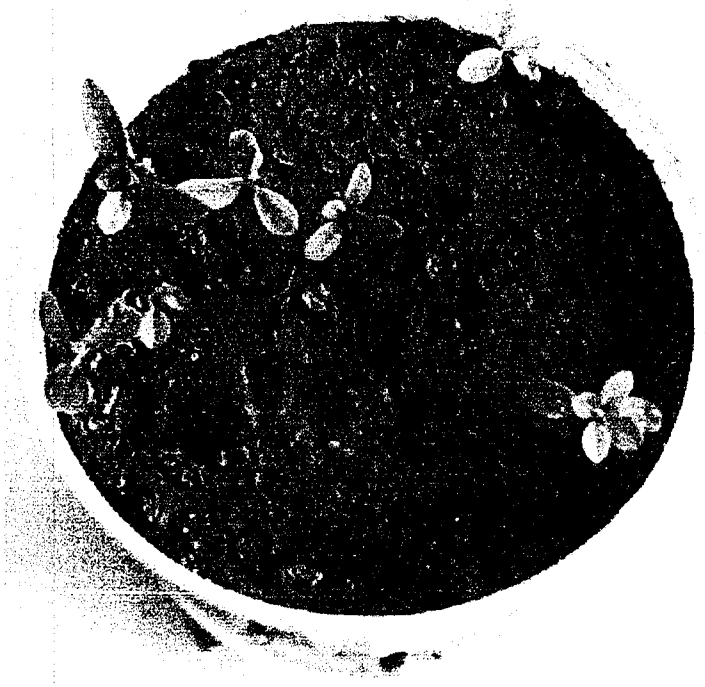


Resim 20: C ovata embriyolarının %2 NaCl uygulamasının 4.haftası.

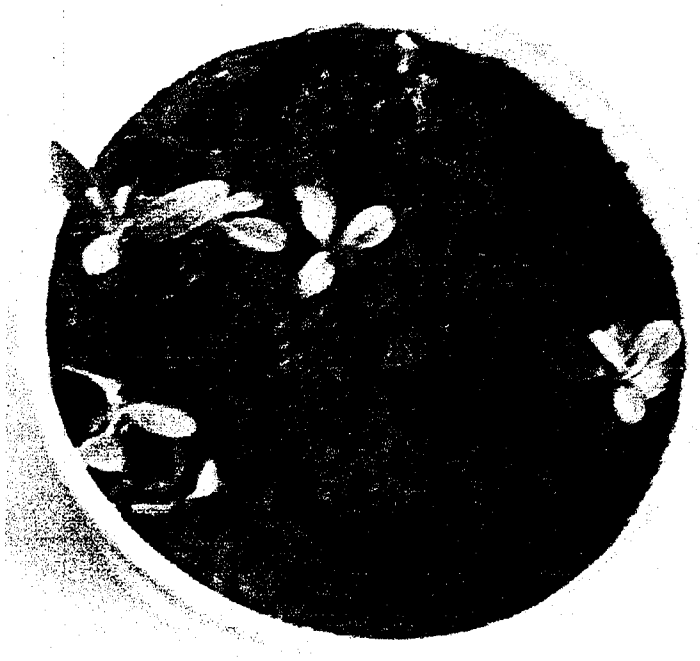
%2'lik NaCl uygulamasıyla bitki 1. hafta sonunda 1.7 cm (Resim 17) , 2. hafta sonunda 2.7 cm (Resim 18) , 3. hafta sonunda 3.5 cm (Resim 19) , 4. hafta sonunda 4 cm (Resim 20) olmuştur.

%2'lik NaCl uygulamasıyla bitkide 1. hafta sonunda 3 tane olan yaprak sayısı 2., 3., 4. haftalarda 6 olarak sabit kalmıştır. Yapraklarda sararmalar gözlenmiştir. Yaprak ayasında bariz bir büyüme kaydedilmemiştir.

Resim 21: C ovata embriyolarının %3 NaCl uygulamasının 1.haftası



Resim 22: C ovata embriyolarının %3 NaCl uygulamasının 2.haftası

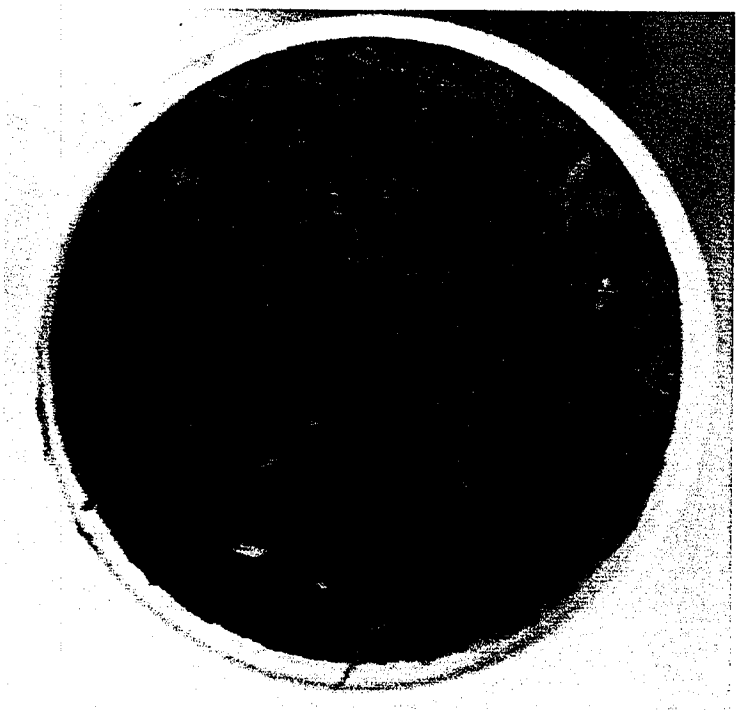


Resim 23: C ovata embriyolarının %3 NaCl uygulamasının 3.haftası

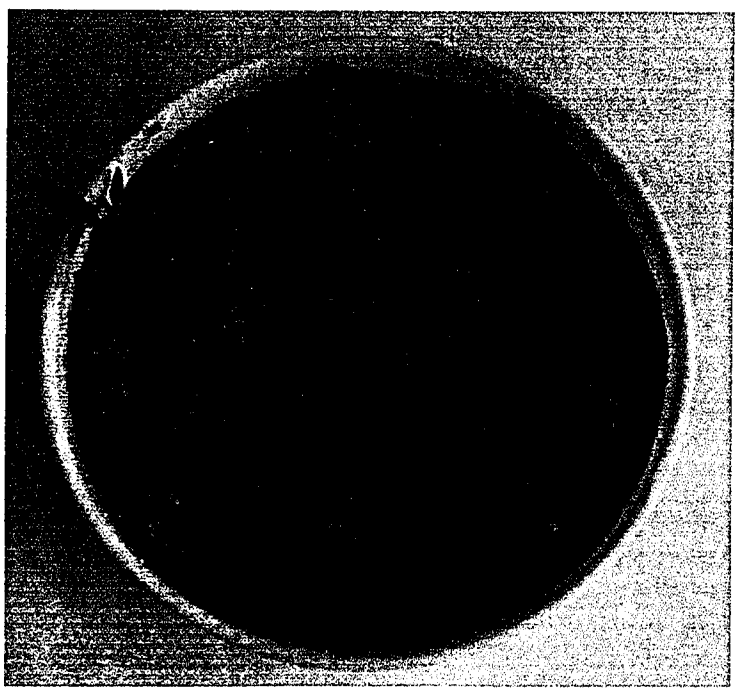
Resim 24: C ovata embriyolarının %3 NaCl uygulamasının 4.haftası

%3'lük NaCl uygulamasıyla bitki 1. hafta sonunda 1.5 cm (Resim 21) , 2. hafta sonunda 2.5 cm (Resim 22) , 3. hafta sonunda 3 cm (Resim 23) , 4. hafta sonunda 3 cm (Resim 24) olmuştur.

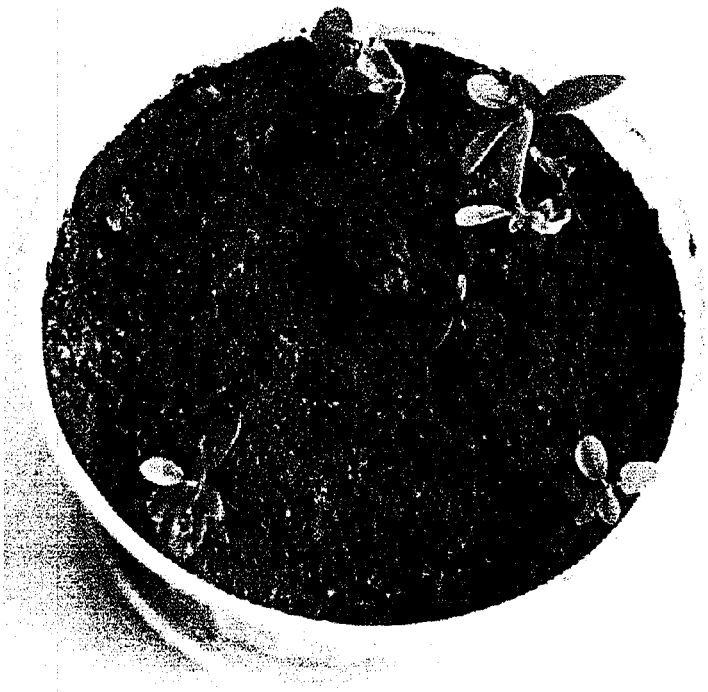
%3'lük NaCl uygulamasıyla bitkide 1. hafta sonunda 2 tane olan yaprak sayısı 2.hafta sonunda 6 olarak kaydedilmiştir. 3. ve 4. haftalarda yaprak sayısı 5'e düşmüştür. Yapraklarda sararma artmıştır. Yaprak ayasında büyüme olmamıştır.



Resim 25: C ovata embriyolarının %4 NaCl uygulamasının 1.haftası



Resim 26: C ovata embriyolarının %4 NaCl uygulamasının 2.haftası



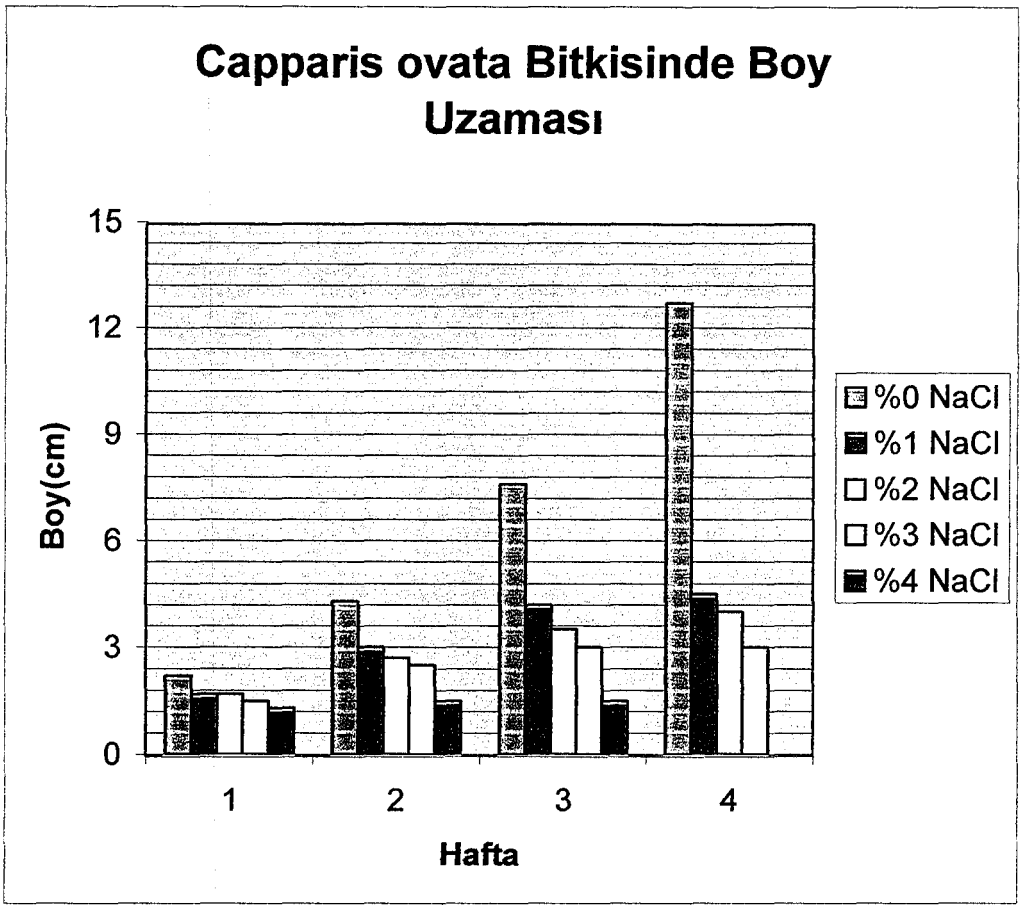
Resim 27: C ovata embriyolarının %4 NaCl uygulamasının 3.haftası

%4'lük NaCl uygulamasıyla bitki 1. hafta sonunda 1.3 cm (Resim 25) , 2. hafta sonunda 1.5 cm (Resim 26) , 3. hafta sonunda 1.5 cm (Resim 27) olmuştur. 4. hafta sonunda ise bitkinin kuruyup, öldüğü gözlenmiştir.

%4'lük NaCl uygulamasıyla bitkide 1. hafta sonunda 2 tane olan yaprak sayısı 2.hafta sonunda 3, 3. hafta sonunda 4 olarak artmıştır. 4. hafta sonunda yapraklar sararmış ve bitkinin kuruduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4: Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki bitkinin 4 hafta sonundaki boy uzunlukları . (cm)

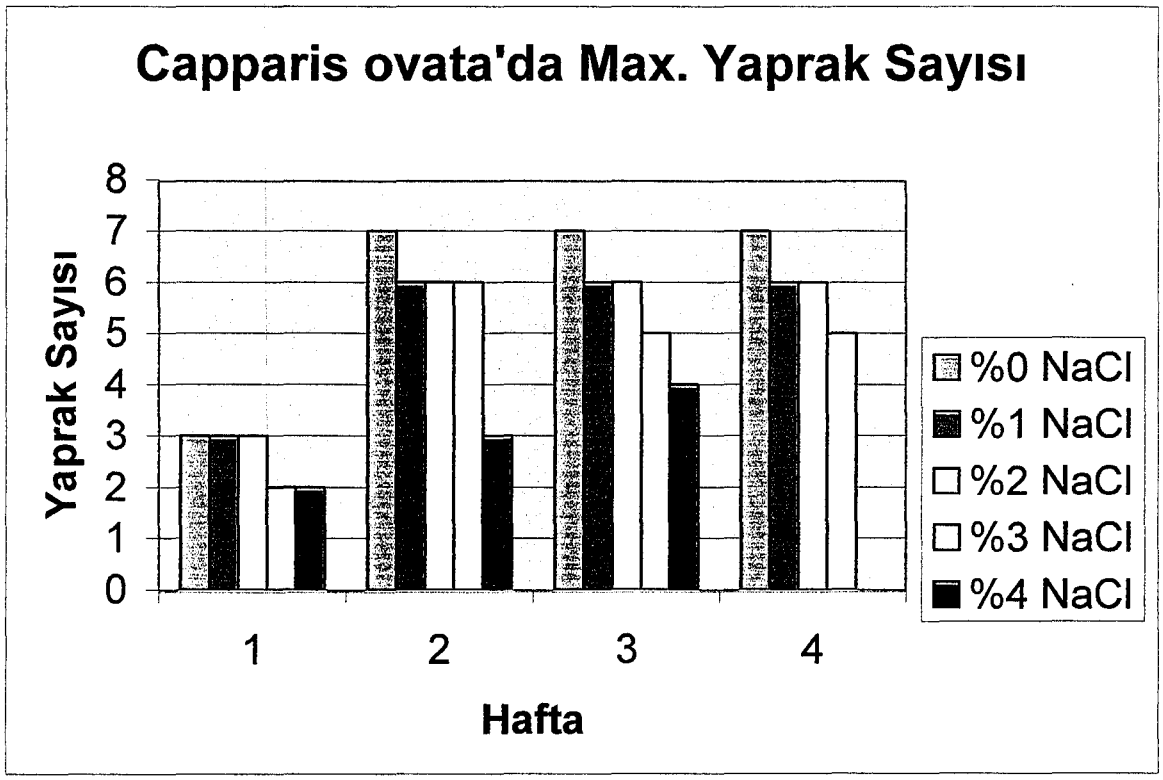
	1	2	3	4
0%	2,2	4,3	7,6	12,7
1%	1,7	3	4,2	4,5
2%	1,7	2,7	3,5	4
3%	1,5	2,5	3	3
4%	1,3	1,5	1,5	0



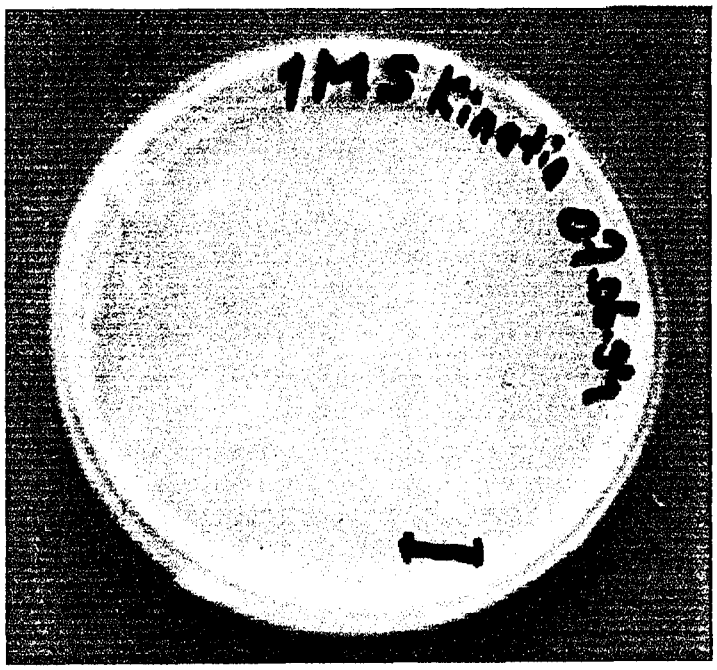
Grafik 2: Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki bitkinin 4 hafta sonundaki boy uzunlukları . (cm)

Çizelge 5: Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki bitkinin 4 hafta sonundaki maximum yaprak sayısı.

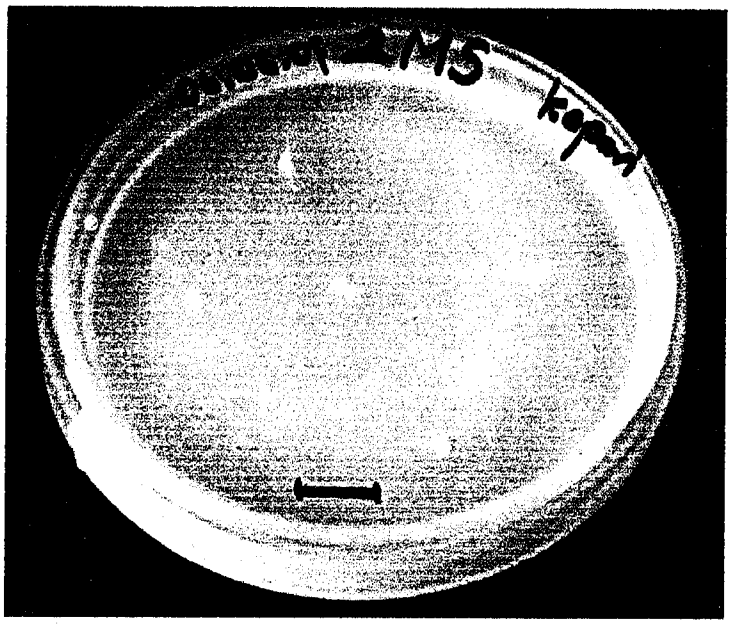
	1	2	3	4
0%	3	7	7	7
1%	3	6	6	6
2%	3	6	6	6
3%	2	6	5	5
4%	2	3	4	0



Grafik 3: Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki bitkinin 4 hafta sonundaki maximum yaprak sayısı.



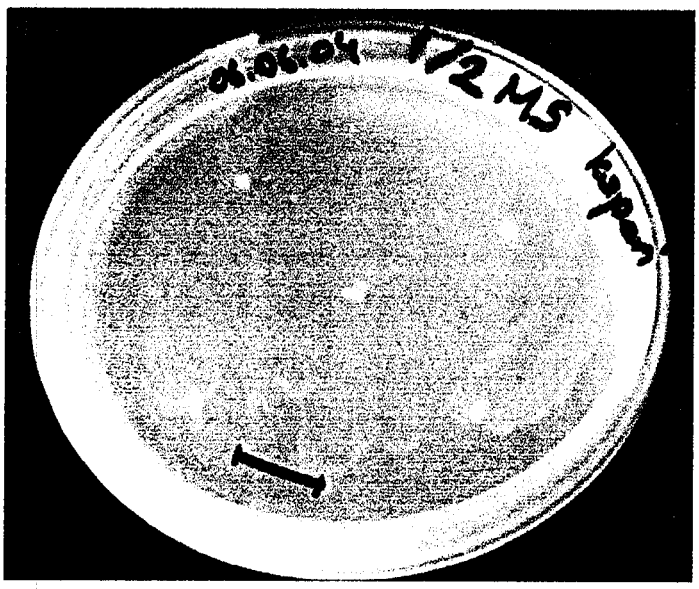
Resim 28: *1 MS besi yerine ekilen (KIN + IAA) C. Ovata embriyoları.Skala 1cm)*



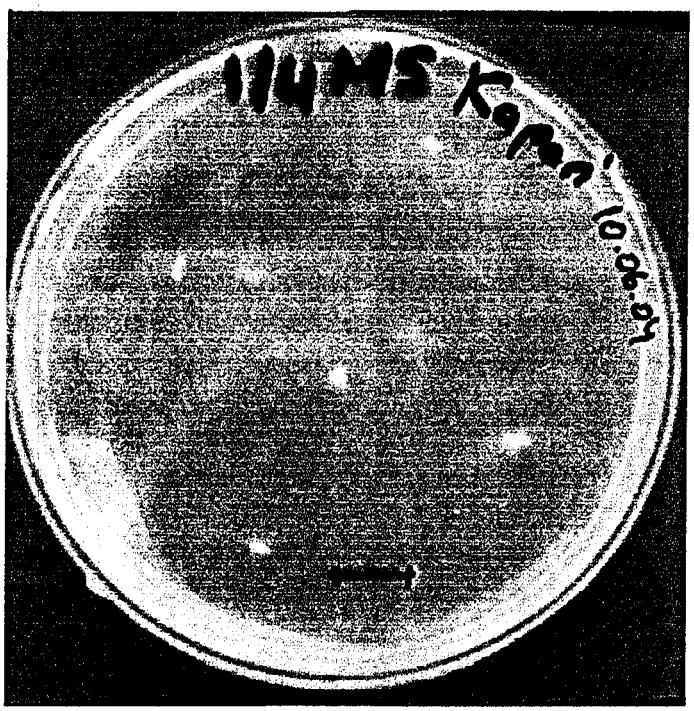
Resim 29: *2 MS besi yerine ekilen C. Ovata embriyoları*

Resim 30: *3 MS besi yerine ekilen embriyoların görünümü*

Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphane



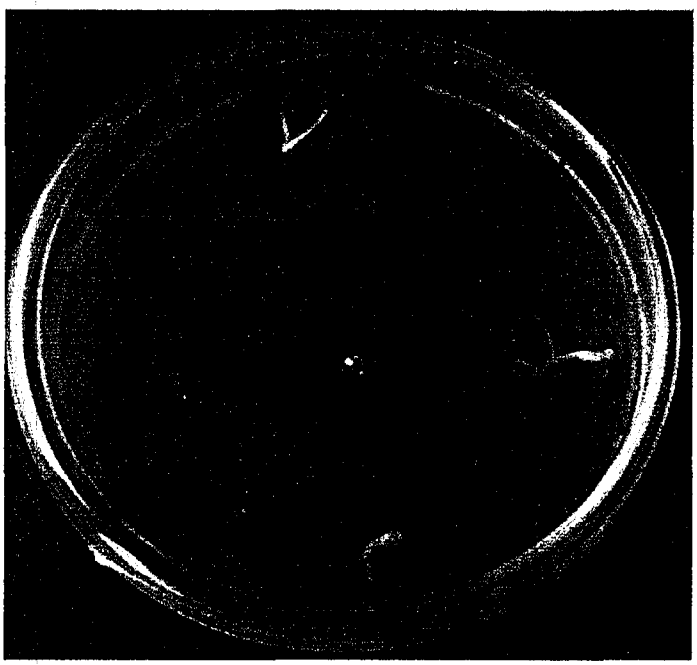
Resim 31: *½ MS besi yerine ekilen embriyoların görünümü*



Resim 32: *¼ MS besi yerine ekilen embriyoların görünümü*

Bu inkübasyonu takip eden 1 hafta sonunda gelişim olduğu görülmüştür. İlk günü takiben köklerin gelişmeye başladığı, kotiledonların da bunu takiben geliştikleri gözlenmiştir.

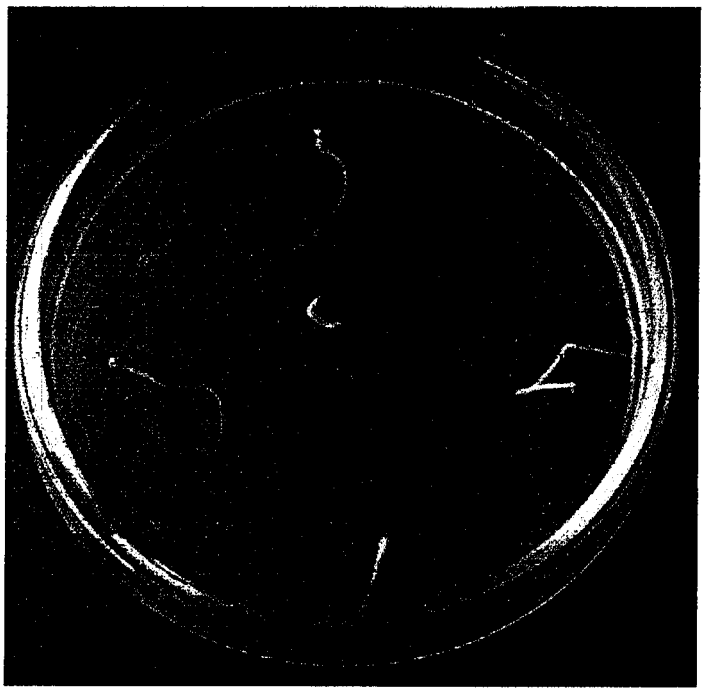
Bu gözlemi takiben 2 gün sonra 2, 3, ½ MS besiyerlerindeki embriyolarda kontaminasyon geliştiği gözlenmiştir.



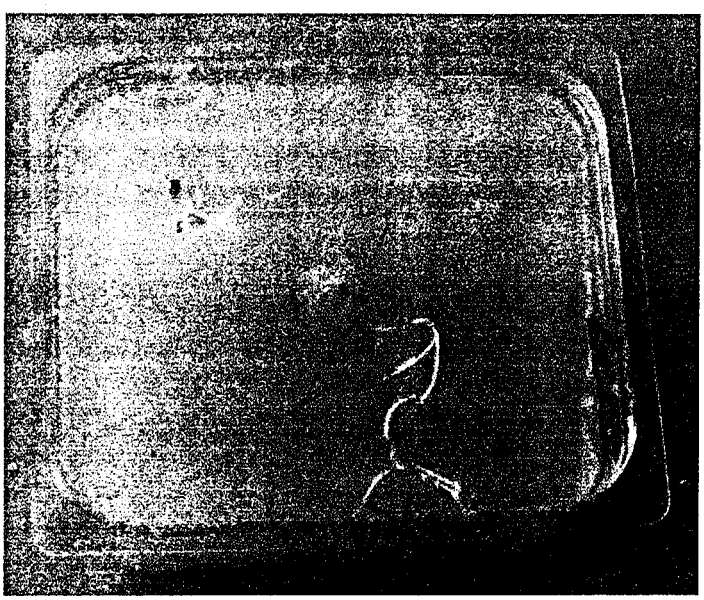
Resim 33: *1 MS besi yerinde gelişen embriyoların 1 hafta sonundaki görünümü*

Resim 34: *¼ MS besi yerinde gelişen embriyoların 1 hafta sonundaki görünümü*

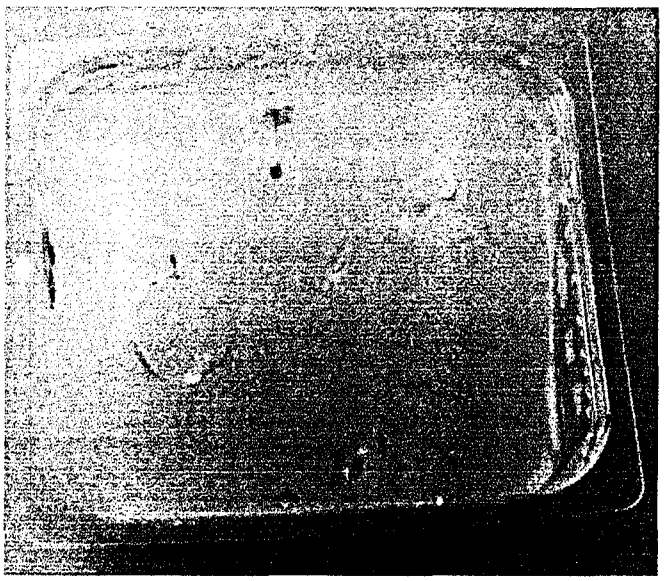
MS besiyerinde hormon ilavesiyle kök gelişimleri devam eden embriyolar 2-3 hafta takip edilmişlerdir. Sadece 1 MS besiyerindeki embriyoların kök uzamalarının arttığı gözlenmiştir.



Resim 35: *1 MS besi yerinde gelişen embriyoların 2 hafta sonundaki görünümü*



Resim 36: *Gelişme kabına aktarılan 1 MS besi yerinde gelişen embriyolar.*



Resim 37: *Farklı bir 1 MS besi yerinden aktarılan embriyolar.*

Resim 38: *4. hafta başlangıcında 1 MS den aktarılan embriyolar.*

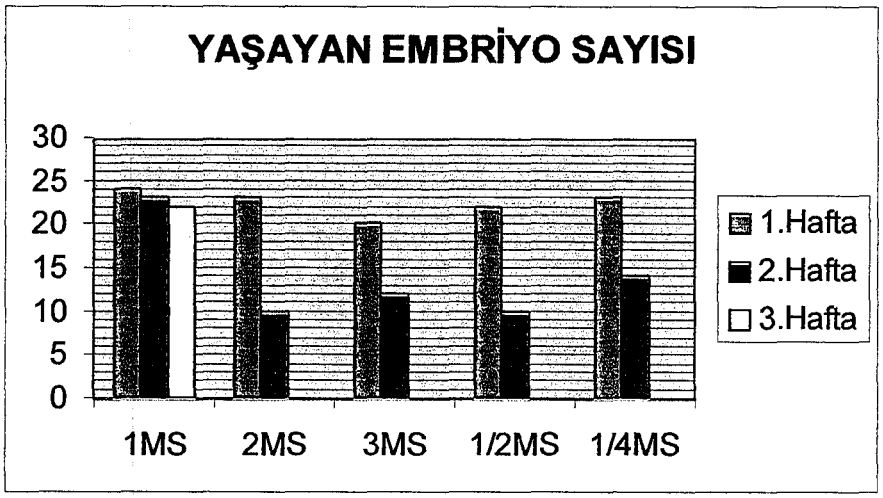
Doku kültürüyle ilgili olan çalışmada *Capparis ovata* (kapari) bitkisinin tohumlarından çıkarılan embriyolar in-vitro koşullarda MS besiyerinde KIN ve IAA içeren petrilere ekilmiştir. Farklı makro element konsantrasyonlarının embriyo gelişimi üzerinde oluşturduğu stres incelenmiştir.

En iyi kök gelişimi 3. hafta sonunda 1 MS besiyerinde görülmüştür. Diğer tüm MS kuvvetlerinde kök oluşumu gözlenememiştir. 1. hafta sonunda 3 MS besiyerindeki embriyolardan beşinde, 2 MS besiyerindeki embriyoların ikisinde, 1 MS de bir tane, ½ 'te üç tane, ¼ MS'te iki tane kararma başlamıştır.(Her MS konsantrasyonu için 5 petriye beşer embriyodan toplam 25 embriyo ekilmiştir.) 2. hafta sonunda toplamda 1 MS'te üç, 2MS'te onbeş, 3MS'te onüç, ½ MS'te oniki, ¼ MS'te on embriyoda kararma gözlenmiştir. 3. haftada 1 MS'te , 2 MS'te iki, 3 MS'te iki, ½ MS'te bir, ¼ MS'te iki embriyoda kararma görülmüştür. 3. hafta sonunda 1 MS dışındaki tüm besiyerlerindeki kapari embriyolarının tamamında kararma meydana gelmiştir. Bunun neticesinde bu embriyolarda hiç kök gelişimi olmamıştır.

Üçüncü hafta sonunda 1 MS besiyerinde gelişen *Capparis ovata* embriyolarından gelişme kabına aktarım yapılmıştır. Bunu takiben gövde uzunluklarının 2-3 cm olduğu gözlenmiştir. Bir aktarma kabında da bitki 2 yaprakçık sürmüştür. Ama sonuç olarak 1 MS besiyerinin *Capparis ovata* bitkisinin çimlenmesi için uygun makro elementleri içerdiği görülmüştür.

Çizelge 6: Farklı MS besi yerlerindeki *C.ovata' da yaşayan embriyo sayısı*

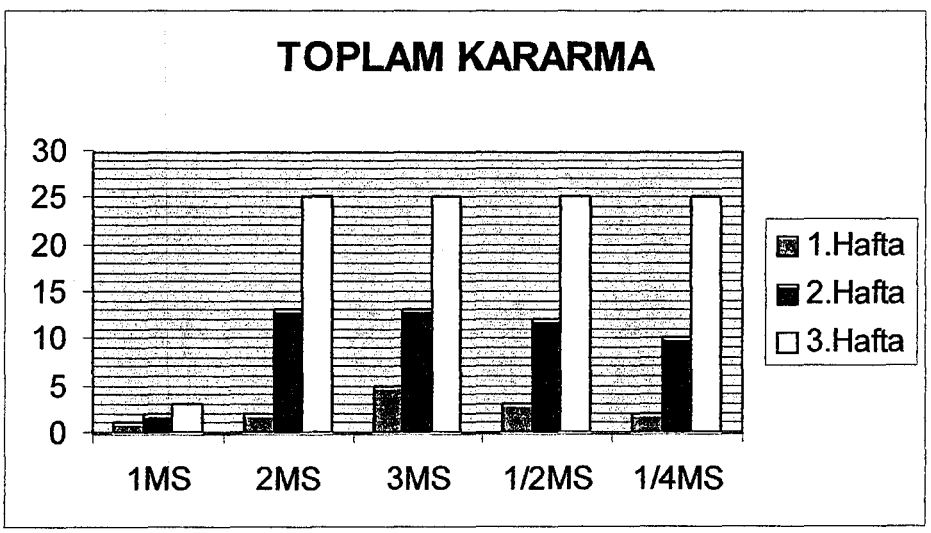
	1 MS	**2 MS**	**3 MS**	**1/2 MS**	**1/4 MS**
1.Hafta	24	23	20	22	23
2.Hafta	23	10	12	10	14
3.Hafta	22	0	0	0	0



Grafik 4: : Farklı MS besi yerlerindeki *C.ovata' da* yaşayan embriyo sayısı.

Çizelge 7: Farklı MS konsantrasyonlarında besi yerindeki *C.ovata' da* kararan embriyo sayısı

	1 MS	2 MS	3 MS	1/2 MS	1/4 MS
1.Hafta	1	2	5	3	2
2.Hafta	2	13	13	12	10
3.Hafta	3	25	25	25	25



Grafik 5: Farklı MS besi yerlerinde yetişen bitkideki toplam kararma.

5. Tartışma

Bitkinin tohumundaki mantarımsı zar çimlenme güçlüğüne sebep olmaktadır. Bu, doğada karıncalar tarafından çözümlenmektedir. Karınca tohumu taşırken, salgıladığı karınca asidi ile bitkinin çimlenme problemini ortadan kaldırmaktadır. Ağaçlandırma ve Erozyon Kontrolü Genel Müdürlüğü verilerine göre kaparinin erozyon kontrolü ve ihraç ürünü olarak toplu ekimlerinde formik asit ve salisilik asit ile çimlendirilme yapılmasının daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır[9]

Bu çalışmayla formik asit uygulamasıyla bitki dört haftada çimlendirilmiştir. Salisilik asit uygulamasıyla beklenen sonuç elde edilememiştir.

Kapari tohumlarında yapılacak olan zımparalama, delme, katlama, ön üşütme ve kimyasal maddeler ile muamele gibi çimlenmeyi arttırıcı birtakım uygulamalarla dormansinin kırılması ve sert tohum kabuğundan kaynaklanan çimlenme engelinin kaldırılması suretiyle başarı arttırılabilmektedir.

Ettiger ve Preece Rhododendron, sürgün ucu kültüründe koyu renkli bir salgının besin ortamına nüfuz ettiğini belirtmişlerdir. Bu salgılama explant gelişmesine ve canlılığın devam etmesine izin vermemiştir. Lyod ve McCown, Kkalmila latifolia L.'nin sürgün uçlarındaki doku kültürlerinde doku ölümü ve salgılama olayının görüldüğünü rapor etmişlerdir. 1 MS besiyerindeki embriyoların fazla kararmamasının nedeninin, tohumlardan embriyoların çıkartılması ve besiyerine transferi sırasında oluşan yaralanmalar sonrasında okside olan polifenoller olabileceği düşünülmektedir. Bitkilerin çoğu fenolik bileşikler bakımından zengindir ve bu maddeler engelleyici maddelerdir. Bu engelleyiciler, bitkilerde cüceleşme ve fitotoksik etkilere sahiptir.

Bürün ve Korkmaz (1999), olgun arpa embriyolarının kültüründe MS, 1/2MS, Randolph and Cox(RC) ve B_5 ortamlarını kullanmış ve embriyodan bitkicik gelişim yüzdelerine göre RC(%92.1), MS(%91.3), 1/2MS(%87.7) ve B_5(%85.7) ortamları olarak sıralanmıştır.[10]

1 MS besiyerindeki makro elementlerin normal makro elementleri içermesinden dolayı en iyi gelişim sağlanmıştır. Bunun yanında besin maddelerinin eksikliğinde ve fazlalığında ise embriyoların strese girdiği saptanmıştır. ½ ve ¼ MS besiyerlerinde besin elementleri eksik olduğu için bitkinin hücresel yapısı bozulmakta, bu eksiklik organellerin normal morfolojik görünümlerini kaybetmelerine neden olarak, bunların metabolik işlevlerini

[9] Kapari, T.C. Orman Bakanlığı Ağaçlandırma ve Erozyon Kontrolü Genel Müdürlüğü, A.G.M. Yayınları, 1997
[10] M. Babaoğlu-E. Gürel-S. Özcan, Bitki Biyoteknolojisi, S.Ü. Vakfı Y., 2002, s.326

engellemektedir. Bitki için esas elementlerden biri olan azot, protein molekülünün yapıtaşını oluşturmaktadır. Ayrıca protein sentezi için gerekli olan RNA ve DNA'yı oluşturan pürin ve primidinlerin yapısında bulunur. Eksikliğinde protein sentezi engelleneceği için hücre büyümesi ve bölünmesi azalır. Besiyerindeki azotun azalması, fenolik bileşiklerin üretiminde artışa yol açar. Fosfor, hücre miktarında artış sağlar ve fosfat miktarı arttıkça biyomas verimi artar. Fosfatın büyümeyi sınırlandırıcı bir faktör olarak hücre kültürlerinin başlangıcında düşük miktarda yer alması, genelde metabolit üretimini arttırmakta, büyümeyi ise baskılamaktadır.

Bitkinin yetişebilmesi için en ideal şartların sağlandığı embriyo kültürü tekniği ile 1MS besiyerinde bitkiler çimlendirilmiştir. Fakat aktarma kabında bitkilerin gelişemedikleri gözlenmiştir.

Tuzlu topraklarda artan osmotik potansiyelden dolayı, bitkilerin suyu yeteri kadar kullanamaması yada ortamda aşırı miktarda bulunan Na ve Cl'nin neden olduğu toksik etkiden dolayı üründe azalma olmaktadır. Tuz stresinde bitkilerde aşırı miktarlarda biriken Na, potasyumun alımını, Cl ise özellikle NO_3 alımını engelleyerek, bitkilerde iyon dengesinde bozulmalara neden olabilmektedir.

Yapılan bir çalışma sonucunda, nohut çeşitlerinin tuza bağlı olarak, kuru ağırlığında meydana gelen azalma, yetiştirme ortamının osmotik basıncının tuzdan dolayı artmasıyla su yarayışlılığının azalması ve buna bağlı olarak azalan transpirasyon ve bitkilerin iyon dengesindeki bozulmalardan ileri gelmesiyle açıklanabilir.[11]

Çeltik ve buğday çeşitlerinde tuzluluğa bağlı olarak bitki kuru ağırlığında meydana gelen azalmaya, Bernstein tarafından bildirildiği gibi tuzlu koşullarda, yetişme ortamının osmotik basıncının tuzdan dolayı artmasıyla suyun yarayışlılığının azalması, ayrıca Lewitt tarafından bildirildiği gibi bitkilerin iyon dengesindeki bozulmaların sebep olduğunu söylemek mümkündür.

Tuzlu koşullarda buğday ve çeltik bitkilerinin gerek gelişmeleri ve gerekse mineral madde içerikleri bakımından aralarında önemli farklılıkların olduğunu, gelişimin sadece suyun bitkiler tarafından yeteri kadar kullanılmamasının yanında , iyon alımı ve özellikle de iyon dengesindeki bozulmalar tarafından da sınırlanabileceğini söylemek mümkündür. [12]

---

[11] H.Özcan-M.A.Turan-Ö.Koç-Y.Çıkıllı-S.Taban,Tuz Stresinde Bazı Nohut (*Cicer aietinum L.cvs.)* Çeşitlerinin Gelişimi ve Prolin, Sodyum, Klor,Fosfor ve Potasyum Konsantrasyonlarındaki Değişimler,Tübitak

[12] M.Alpaslan-A.Güneş-S.Taban-İ.Erdal-C.Tarakçıoğlu,Tuz Stresinde Çeltik ve Buğday Çeşitlerinin Kalsiyum,Fosfor,Demir,Bakır,Çinko,ve Mangan İçeriklerinde Değişmeler,Tübitak.

Formik asit uygulamasıyla çimlenen bitkiye tuz stresi uygulaması yapılmıştır. En düşük tuz konsantrasyonunda bitki normal gelişimini gösterirken, tuz konsantrasyonunun artmasıyla birlikte bitki gelişiminin de gerilediği görülmüştür.

Kaparinin tuzlu ve drenajlı bozuk topraklar dışında kireçli, organik maddece fakir ve sığ topraklarda bile yetiştiği, Ağaçlandırma ve Erozyon Kontrolü Genel Müdürlüğü tarafından saptanmıştır(Bilecik-Şanlıurfa 1996) [13]

[13] Kapari, T.C. Orman Bakanlığı Ağaçlandırma ve Erozyon Kontrolü Genel Müdürlüğü, A.G.M. Yayınları, 1997

6. KAYNAKLAR

1. AKMAN , Y. ve DARICI , C. , *Bitki Fizyolojisi (Beslenme ve Gelişme Fizyolojisi)* , Ankara (1998)

2. ASLANARGUN , B. A. , *Biyoteknoloji Ders Notları* , Anadolu Üniversitesi, Eskişehir (1995)

3. ASLANARGUN , B. A. , *Doku Kültürü Laboratuvar Notları* , Anadolu Üniversitesi, Eskişehir (1995)

4. ASLANARGUN , B. A. , *Petunia x Hybrida Üzerinde Meristem Kültürü Çalışmaları,* Yüksek Lisans Tezi , Anadolu Üniversitesi, Eskişehir (1992)

5. ASLANARGUN , B. A. ve YÜREKLİ , A. K. , *Bitkilerde Mineral Beslenme Fizyolojisi,* Anadolu Üniversitesi, Eskişehir (2002)

6. BAYTOP , A. , *Farmasotik Botanik Ders Kitabı* , İstanbul Üniversitesi, İstanbul (1996)

7. BABAOĞLU , M., GÜREL , E. ve ÖZCAN , S. , *Bitki Biyoteknolojisi –1 (Doku Kültürü Uygulamaları)* , Selçuk Üniversitesi, Konya (2001)

8. BABAOĞLU , M., GÜREL , E. ve ÖZCAN , S. , *Bitki Biyoteknolojisi-2 (Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*) , Selçuk Üniversitesi, Konya (2001)

9. BAYRAKTAR , G. , *Gomphrene globosa L. (Hanım Düğmesi) nin İn-vitro Şartlarda Embriyo Kültürü ile Üretilmesi* , Yüksek Lisans Tezi , Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Anabilim Dalı, Eskişehir (2002)

10. BAŞARAN , D . , *Bitki Doku Kültürleri* , Dicle Üniversitesi, Diyarbakır (1990)

11. BHOJWANİ , S.S . ve RAZDAN , M. K. , *Plant Tissue Culture: Theory & Practise , Revised Edition ,* Elsevier Science , Amsterdam (1996)

12. ENDRESS , H. R . , *Basic Techniques , Plant Cell Biotechnologies , Springer – Verlag* Berlin , Heidelberg (1994)

13. ETİENNE , H. , BERTAND , B. ve ANTHONY , F. , *İmprovement of Somatik Embryogenesis in Hevea Brasiliensis Using the Temprorary Mersion Technique , İn vitro Cell. Dev.* Biol.(1997)

14. KESKİNER , S. , *Crambe orientalis L. Üzerinde Morfolojik , Anatomik , Karyolojik ve Doku Kültürü (Embriyo Kültürü) Çalışmaları* , Yüksek Lisans Tezi Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir (1992)

15. ÖNDER , N. , *Genel Bitki Fizyolojisi* , İstanbul (1985)

16. RİSVEN , A. H. G. C. , *İn vitro Studies of the Embriyos of Capsella bursa- pastoris* , Acta Bot. Neerl. 1 (1952)

17. RAGHAVAN , V. , *Embryo Culture , Perspectives in Plant Cell & Tissue Culture* Academic Press , Newyork (1980)

18. SEÇER , M. , ELMACI , Ö. L . , *Bitkilerde Beslenme Eksikliği Stresinin Hücresel Yapılara Etkileri* , Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir (1998)

19. SEÇMEN , Ö . , GEMİCi , Y. , GÖRK , G . , BEKAT , L . ve LEBLEBİCİ , E . , *Tohumlu Bitkiler Sistematiği* , Ege Üniversitesi , Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir (1995)

20. ÜNSAL , P. N . , *Bitki Hormonları Laboratuvar Uygulamaları* , Haliç Üniversitesi İstanbul (2001)

21. ÜNSAL , P. N. , *Bitki Büyüme Maddeleri* , İstanbul Üniversitesi, İstanbul (1993)

22. YÜCEL , E. , *Çiçekler ve Yer Örtücüler –1* , Etam Matbaa , Eskişehir (2002)