

Yağ Gülü (*Rosa damascena* Mill.)'nün *In Vitro* Koşullarda Klonal Çoğaltımı

Ş. Evrim ARICI^{1*}, Bekir ŞAN², Soner KAZAZ³

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Isparta

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Isparta

³Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara

(Geliş Tarihi/Recived Date: 10.07.2017; Kabul Tarihi/Accepted Date: 10.10.2017)

Öz

Yağlık gül bitkisinin *in vitro* koşullarında sağlıklı ve hızlı bir şekilde üretilmesi çok önemlidir. Bu çalışmada *Rosa damascena*'nın bitki parçalarından *in vitro* koşullarında çoğaltım protokolü oluşturulması hedeflenmiştir. Eksplantlar farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonlarda benzil amino pürin (BAP), Naftalin asetik asit (NAA), Thidiazuron (TDZ) ve Kinetin içeren MS besi ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Ayrıca bu çalışmada, farklı karbon kaynaklarının (sakkaroz, fruktoz, glikoz) sürgün gelişimine etkisi de araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonlarda benzil amino pürin (IAA) ve indole-3-butirik asit (IBA)'nin kök gelişimine etkisi çalışılmıştır. En iyi sürgün oluşumu 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1 GA₃ en fazla sürgün sayısı ise 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1 GA₃'de gözlenmiştir. Sürgün gelişme denemesinde özellikle 30 g/l sakkaroz içeren besi ortamı üzerinde gül sürgünlerinde gelişme ve yan sürgünler tespit edilmiştir. Bitkiler en iyi ½ MS+2 mg/l IBA içeren besi ortamlarda köklenmiştir. Bitki kökleri 3-5 cm olduğunda başarılı bir şekilde torf içeren saksılara aktarılmıştır.

Anahtar kelimeler: Gül, *In vitro*, Sürgün ucu, Kök gelişimi, Mikroçoğaltım, Karbonhidrat

In Vitro Clonal Micropropagation of Oil-Bearing Rose (*Rosa damascena* Mill.)

Abstract

In vitro propagation of rose has played a very important role in rapid multiplication of cultivars with desirable traits and production of healthy and disease-free plants. In this study, a protocol for *in vitro* propagation of *Rosa damascena* was established using nodal segments harboring axillary buds as explants. Explants were cultured on solid Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with different concentrations and combinations of benzyl aminopurine (BAP), Naphthaleneacetic acid (NAA), Thidiazuron and Kinetin. In addition effect of different sources of carbohydrate on shoot regeneration (sucrose, fructose, glucose) were also investigated. Effect of different concentrations and combinations of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) on root formation of shoots were studied. The highest percentage of shoot initiation was observed on MS medium containing 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1 GA₃, whereas maximum average number of multiplied shoots was produced on MS medium with 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1 GA₃. For carbonhydrate, 3% sucrose was the best for culture shoot tips of rose variety. For rooting, highest percentage of rooted shoots was obtained on ½ MS+2 mg/l IBA. Plantlets roots of 3 to 5 cm length were successfully transferred to pots containing sterile peat moss for acclimatization.

Keywords: Rose; *In vitro*, MS medium; Shoot-tip, Root induction, Micropropagation, Carbohydrate

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: evrimarici@sdu.edu.tr

1. Giriş

Gül yağı dünya ticaretinde önemli olan yüzlerce uçucu yağ arasında yükte hafif, pahada ağır yağların başında gelmektedir (Baydar, 2005). Dünyada yıllık yaklaşık 15.000 ton gül çiçeği üretimi yapılmakta olup, gül çiçeği üretiminde Türkiye ilk sırada yer almaktadır. Türkiye'nin gül çiçeği dikili alanı 2.200 ha, üretimi 6.750 ton ve verimi de 4.250 kg ha/l'dır. Türkiye'nin 2014 yılında toplam getirisi 13.961.163 \$ olan 3.443 kg gül yağı ihracatı yaptığı bildirilmektedir (Anonim, 2014). Gülyağı talebinin % 50'si Türkiye'den, % 40'ı Bulgaristan'dan, %10'u ise İran, Hindistan, Fas ve Afganistan gibi diğer ülkelerden karşılanmaktadır (Örmeci Kart ve ark., 2012). Ülkemizde yağ gülü Isparta, Burdur, Afyon ve Denizli ile Konya ve Antalya'nın bir bölümünü içine alan Göller Yöresinde üretilmektedir. Isparta ili ve çevresini kapsayan Göller yöresi 120 yıldır Türkiye'nin yağ gülü üretim merkezi olup sadece Türkiye'nin değil aynı zamanda dünyanın da en önemli yağ gülü ve gül yağı üretim alanlarından birisidir. Isparta yöresinin karakteristik iklim ve toprak özellikleri, dünyanın en kaliteli yağ gülü üretimine olanak sağlamaktadır. Isparta ve yöresinde gül üretimi çok önemli olup çok sayıda bitkiye ihtiyaç duyulmaktadır. Gül yağı üretiminde *R. moschata*, *R. centifolia*, *R. damascena* ve *R. alba* türleri kullanılmaktadır. Isparta ve çevresinde ise gül yağı üretiminde *Rosa damascena* Mill. türü yetiştirilmektedir. *Rosa damascena* Mill. genellikle gül yağı, gül koncreti, biyokoncret, absolü, bioabsolü ve gülsuyu gibi temel kozmetik ürünler de elde edilmesinde kullanılan bir gül çeşididir (Jabbarzadeh ve Khosh-Khui, 2005). Bu gül çeşidi genellikle çelikleme yöntemiyle çoğaltılır. Çelikleme tekniği ile tesis edilen yağ gülü bahçelerinin dezavantajları arasında çeliklerin alındığı bahçedeki hastalık ve zararlıları beraberinde taşıması, ekonomik verime 4-5 yaşlarında başlaması, fazla sayıda çeliğe ihtiyaç duyulması, çelik temini zorluğu, hızlı üretim ve tüplü fidan üretimine olanak sağlamaması sayılabilir. Tohumlar ise daha çok anaç üretimi ve ıslah çalışmalarında kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerle seleksiyon çalışmalar ile belirlenecek bitkilerin hızlı ve çok sayıda üretilebilmesi için yeterli değildir. Bilindiği gibi bir çok bitki türü, doku kültürü yöntemiyle yaygın olarak çoğaltılmaktadır. Mikro çoğaltımın genel olarak bitki yetiştiriciliği ve genetiği yönünden önemi ve avantajları; hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyalinin elde edilmesi, kitlesel üretimde fenotipik ve genotipik benzerliklerin olması, alışıla gelen yöntemlerden daha kısa kültür süresinde daha kolay üretilmesi, üretimde daha az anacın kullanılması ve somaklonal varyasyondan dolayı yeni genotiplerin elde edilmesi sıralanabilir. Son yıllarda araştırmacılar doku kültürü tekniklerinden faydalanarak gülün doku kültürü ile çoğaltımı üzerine araştırmalar yapmışlardır. Mazmanoğlu (2003), yapmış olduğu çalışmada *R. damascena*'nın mikro çoğaltılmasına uygun besi ortam kompozisyonunu sürgün gelişmesi aşamasında MS sıvı+ 1 mg/l BAP+ 7.5 g/l agar, çoğaltma aşamasında MS+1 mg/l BAP+0.1 mg /L GA₃+7.5 g/l agar, MS+2 mg/l BAP+0.1 mg/l GA₃+7.5 g/l agar, MS+2 mg/l BAP+0,1 mg/l NAA+0.1 mg/l GA₃+7.5 g/l agar içeren besi ortamlar üzerinde başarılı bir şekilde kardeşlenmenin olduğunu belirlemişlerdir. Pati ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada *R. damascena* yapraklarını bitki rejenerasyonunun teşviki için farklı hormon konsantrasyonu ve kombinasyonları içeren besi ortamlar üzerinde kültüre almışlardır. En iyi bitki rejenerasyonu ½ MS+%3 sakkaroz+ 46.8µM tidiazuran+0.27 µM NAA+ 17.7µM AgNO₃ içeren MS besi ortamı olduğu tespit edilmiştir. Rejenere olan bitkiler MS+2.25 µM BAP+ 0.054 µM NAA içeren besi ortamı üzerinde 7, 14, 21, 28, ve 35 gün süreyle kültüre alınmıştır. En iyi sürgün oluşumunun 21 gün içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Arıcı ve ark. (2005), yapmış oldukları çalışmada *R. turcica* Mill. gül

çeşidinin sürgün uçlarını farklı hormon konsantrasyonları ve kombinasyonları içeren besi ortamı üzerinde kültüre alarak BAP, GA₃ ve NAA bitki büyüme hormonlarının farklı kombinasyonları ve konsantrasyonlarını içeren besi ortamı üzerinde kültüre alarak mikro çoğaltımını araştırmışlardır. En fazla sürgün gelişimi eksplant başına 4 sürgün ile MS+1 mg/l BAP+ 0.5 mg/l GA₃ hormon konsantrasyonunda gerçekleştiği belirlenmiştir. Elde edilen köksüz bitkilerde kök oluşumunu teşvik etmek amacıyla bitkiler bazal MS ile IBA'nın değişik konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamları üzerinde kültüre alınmıştır. En iyi kök oluşumunu MS+0.5 mg/l IBA içeren MS besi ortamı üzerinde olduğu belirlenmiştir. Jabbarzadeh ve Khosk-Khui (2005), *R. damascena*'nın sürgünlerini farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda kinetin, BA ve IBA içeren besi ortamlar üzerinde kültüre almışlardır. Çalışma sonucunda en iyi sürgün gelişiminin 2.5-3 mg/l BA ve 0.1 mg/l IBA içeren besi ortam üzerinde olduğu gözlemlenmiştir.

Doku kültürü çalışmalarında besi ortam içerisinde kullanılan karbon kaynakları ve miktarı bitkinin çoğalmasında önemli yer tutmaktadır. Genellikle sürgün gelişiminde %3 oranında sakkaroz kullanılmaktadır (Pati ve ark., 2006). Murashige ve Skoog (1962), yapmış oldukları çalışmada %3 sakkaroz oranının bitki sürgün gelişimine %2-4 sakkarozdan daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanısıra Davies (1980) %2-8 oranında sakkaroz besi ortamına ilave etmiş ve en iyi sürgün gelişimi %4-5 oranında sakkaroz içeren besi ortamlarında tespit edilmiştir.

Bitkilerin doku kültüründe klonal çoğaltılması gerçekleştirilse bile bazı durumda köklenmesi ve toprak adaptasyonları üzerinde sorunlar yaşanmıştır. Bu sorunu çözmek amacıyla bazı araştırmacılar tarafından bitkilerin doku kültürü besi ortamında köklendirilmesi için çalışmalar yapılmıştır. Pati ve ark. (2001), mikro çoğaltılmış *R. damascena* ve *R. bourbonian* bitkiciklerinin köklendirilmesinde IBA içeren besi ortamındaki bitkilerin kök sayısının NAA içeren besi ortamdakilere göre daha fazla olduğunu, oksin ve sakkaroz miktarının artırılmasıyla da kök sayısının azaldığını ancak yüksek sakkaroz varlığında (%5) kök uzunluğunun arttığını buna bağlı olarak da kök uçlarında kararmaların meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Bu bitkiler köklendirmek için ½ MS + 10µM IBA+%3 sakkaroz içeren sıvı besi ortamı içerisinde 7 gün kültüre alındıktan sonra, büyüme düzenleyicileri içermeyen ½ MS katı besi ortamına aktarılmıştır. Çalışmanın sonucunda kök sayısının yüksek olduğunu ve dış besi ortama aktarmada ise yüksek oranda başarının sağlandığı rapor edilmiştir. Pati ve ark. (2004), rejenere olan *R. damascena* bitkilerini köklendirmek için ½ MS+10 µM IBA içeren sıvı besi ortamı içerisinde 2 hafta kültüre aldıktan sonra bir hafta karanlıkta %3 sakkaroz içeren sıvı besi ortam içerisinde kültüre almışlardır. Daha sonra hormon içermeyen sıvı besi ortamı içerisine transfer etmişlerdir. Köklenen bitkiler 5-6 hafta sonra toprağa transfer edilmiştir. Bitkilerin köklenme oranlarının % 90 olduğu gözlenmiştir. Jabbarzadeh ve Khosk-Khui (2005), *in vitro*'da mikro çoğaltımını gerçekleştirdikleri *R. damascena*'nın sürgünlerini MS, ½ MS, 1/3 MS, ¼ MS ve farklı konsantrasyonlarda IAA, IBA ve NAA içeren besi ortamları üzerinde kültüre almışlar ve köklenmelerin teşvik edilmediğini gözlemlemişlerdir. En iyi kök gelişiminin 2.5 mg/l 2,4-D içeren besi ortamı üzerinde 2 hafta kültüre alındıktan sonra hormon içermeyen bazal MS besi ortamına transfer edilen bitkilerde tespit etmişlerdir.

Süleyman Demirel Üniversitesi BAP tarafından 2552-M-10 ile desteklenen projemizde yağlık gül olarak bilinen *R. damascena* Mill. gül türünün sürgün ucu tekniği kullanılarak *in vitro* koşullarda doku kültürü yoluyla çoğaltılması amaçlanarak, hızlı bir şekilde hastalık ve zararlılardan arı gül bitki anaçlarının üretimi hedeflenmiştir. Araştırma sonucunda hızlı ve etkili bir fidan üretimi için uygun bir protokol geliştirilmeye çalışılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Araştırmanın bu kısmında bitkisel materyal olarak *R. damascena* Mill. yağlık gül çeşidine ait eksplantlar kullanılmıştır

2.1. Eksplantların Dezenfeksiyonu

Rosa damascena'ya ait sürgün uçları ve yan sürgünleri Mayıs ayında SDÜ Rosarium bahçesinden alınmış, steril kabin içerisinde steril saf su ile birkaç kez yıkandıktan sonra, yüzeysel dezenfeksiyonunu sağlamak amacıyla, önce %70'lik etanol içerisinde 2 dakika bekletilmiştir. Daha sonra eksplantlar 1-2 damla tween 20 içeren %10'luk sodyum hipoklorid çözeltisi içerisinde 10 dakika süre ile çalkalandıktan sonra steril saf su ile her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kez yıkanmıştır. Yüzeysel sterilizasyonu uygulanan sürgün uçları steril kabin içerisinde steril petri kaplarına konan çift katlı steril filtre kağıtları üzerinde kurutulmak amacıyla 20-30 dk bekletilmiştir.

2.2. Besin ortamları

Doku kültürü çalışmalarının bütün aşamalarında temel besi ortamı olarak Murashige ve Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) besi ortamı kullanılmıştır. Besi ortamlarına 7.5 g/l agar ve 30g/l sakkaroz ilave edilmiştir. pH'ları 5.8'e ayarlandıktan sonra, agar ilavesinin ardından ısıtılarak agarı eritilen besi ortamlar 5 ml olacak şekilde tüplere dağıtılmıştır. Daha sonra 121°C sıcaklık, 1,2 atm basınç altında 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 5 tekerrürlü ve her tekerrürde 10 eksplant olacak şekilde kurulmuştur.

2.3. En Uygun Büyüme Düzenleyici Madde Kombinasyonlarının Belirlenmesi

Sürgün eksplantlarından en yüksek sürgün poliferasyonunu sağlayan büyüme düzenleyici kombinasyonunun belirlenmesi amacıyla Çizelge 1'de sunulan hormon konsantrasyonu ve kombinasyonları kullanılmıştır. Kültürler hazırlanan bu besi ortamlarında 4 hafta süreyle kültüre alındıktan sonra, eksplant başına düşen sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından incelenmiştir.

Çizelge 1. Sürgün poliferasyonu aşamasında en uygun büyümeyi düzenleyici kombinasyonunun belirlenmesi amacıyla kullanılan kombinasyonlar

No	Büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonları	No	Büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonları
1	0.5 mg/l TDZ	17	0.5 mg/l BAP
2	0.5 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IBA	18	0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA
3	0.5 mg/l TDZ + 0.5 mg/l IBA	19	0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l IBA
4	0.5 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA	20	1 mg/l BAP
5	0.5 mg/l TDZ + 0.5 mg/l IBA	21	1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1 mg/l GA ₃
6	0.3 mg/l TDZ	22	1 mg/l BAP + 0.5 mg/l IBA
7	0.3 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IBA	23	2 mg/l BAP
8	0.3 mg/l TDZ + 0.5 mg/l IBA+ 0.1 mg/l GA ₃	24	2 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1 mg/l GA ₃
9	0.3 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA	25	0.5 mg/l Zeatin
10	0.3 mg/l TDZ + 0.5 mg/l NAA	26	0.5 mg/l Zeatin + 0.1 mg/l NAA
11	1 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA	27	0.5 mg/l Zeatin + 0.5 mg/l NAA
12	1 mg/l Zeatin	28	0.5 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA+0.1 mg/l GA ₃
13	1 mg/l Zeatin + 0.1 mg/l IBA	29	1 mg/l Kinetin
14	1 mg/l Zeatin + 0.5 mg/l IBA+0.1 mg/l GA ₃	30	1 mg/l Kinetin + 0.1 mg/l IBA
15	0.5 mg/l Kinetin + 0.1 mg/l IBA	31	1 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l IBA
16	0.5 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l IBA	32	1 mg/l Kinetin + 0.1 mg/l NAA

2.4. Sürgün Proliferasyonu Üzerine Farklı Karbonhidrat Tip ve Konsantrasyonlarının Etkilerinin Belirlenmesi

Bu amaçla, en uygun büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonunu içeren besin besi ortamına sürgün oluşumu üzerine etkilerini belirlemek amacıyla ek olarak 20, 30, 40 ve 50 g/l dozlarında glikoz, fruktoz ve sakkaroz ilave edilmiştir. Ayrıca besi ortamlarına 7 g/l agar ilave edilmiştir. Hazırlanan bu besin besi ortamlarında 4 hafta süreyle gelişmeye bırakılan kültürler, sürgün sayıları ve sürgün uzunlukları bakımından incelenmiş ve aynı besi ortamlarda 3 kez alt kültüre alındıktan sonra, farklı tip ve konsantrasyonlar şeklinde uygulanan karbonhidratların sürgün poliferasyonu üzerine etkileri belirlenmiştir.

2.5. Köklendirme Aşamasında Yapılan Uygulamalar

Farklı uygulamalar sonucunda elde edilen *in vitro* sürgünlerin köklendirilmeleri için IBA, IAA, 2, 4-D ve NAA'nın 0, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4 mg/l konsantrasyonlarını içeren, farklı yoğunluktaki katı MS besi ortamlarında (½MS ve MS) kültüre alınmıştır. Besi ortamlarına ayrıca 7 g/l agar ve 20 g/l sakkaroz ilave edilmiştir. Köklendirme besi ortamlarında bitkiler 4 hafta süre ile kültüre alınan bitkiler daha sonra köklenme durumları (köklenme var/yok) ile kök yoğunluğu (az, orta, çok) bakımından değerlendirilerek, köklenme için en uygun besi ortam belirlenmiştir. Köklenen bitkiler

torf üzerinde toprağa alınarak doğal koşullara adaptasyonları sağlanmıştır. Yaklaşık üç hafta sonra bitkiler seralara alınmıştır.

2.6. Kültür Koşulları

Doku kültürlerinin tüm aşamalarında besin besi ortamlarına dikilen kültürler sıcaklığı $25\pm 1^\circ\text{C}$ ve gün uzunluğu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık ve ışık intensitesi de 3000 lüks olarak ayarlanmış kültür odalarında gelişmeye bırakılmıştır.

2.7. İstatistik Analizler

Bitkilerde sürgün gelişimi ve kök gelişimi ile ilgili çalışmalar 4 hafta sonra değerlendirilmiştir. Bütün denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 5 tekerrürlü kurulmuş olup her tekerrürde 10 bitki bulunmaktadır. Bütün denemeler 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen veriler SPSS 16 istatistik programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testi ile istatistik olarak değerlendirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. En Uygun Büyüme Düzenleyici Madde Kombinasyonlarının Belirlenmesi

Sürgün eksplantlarından en yüksek sürgün poliferasyonunu sağlayan büyüme düzenleyici kombinasyonunun belirlenmesi amacıyla projede belirlenen besi ortamlarında sunulan hormon kombinasyonları kullanılmıştır. Besi ortamları 7.5 g/l agar ve 30g/l sakkaroz ilave edilmiştir. Kültürler hazırlanan bu besin besi ortamlarında 4 hafta süreyle kültüre alındıktan sonra, eksplant başına düşen sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından incelenmiştir. Denemede kullanılan farklı hormon kombinasyonu içeren bazı besi ortamları üzerinde gül sürgün uçlarında gelişme gözlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1: Farklı besi ortamlarda kültüre alınmış gül sürgün uçları.

En iyi sürgün oluşumu 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1 GA₃ içeren besi ortamında, en fazla sürgün sayısı ise 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1 GA₃ besi ortamında gözlenmiştir (Şekil 2). Denemede kullanılan farklı hormon kombinasyonu içeren 16 besi ortam üzerinde de gül sürgün uçlarında gelişme gözlenmemiştir (Çizelge 2). Bir ay sonunda bitkilerde kararmalar ve kurumalar tespit edilmiştir (Şekil 3). Sonuç olarak TDZ ve kinetin hormonu *in vitro* koşullarında gül sürgün ucundan bitki rejenerasyonunu teşvik etmemiştir. Denemede kullanılan farklı BAP hormon kombinasyonu içeren besi ortamı

üzerinde gül sürgün uçlarında gelişme gözlenmiş ve bir ay sonucunda bitkilerde büyüme ve yeni sürgünler tespit edilmiştir.

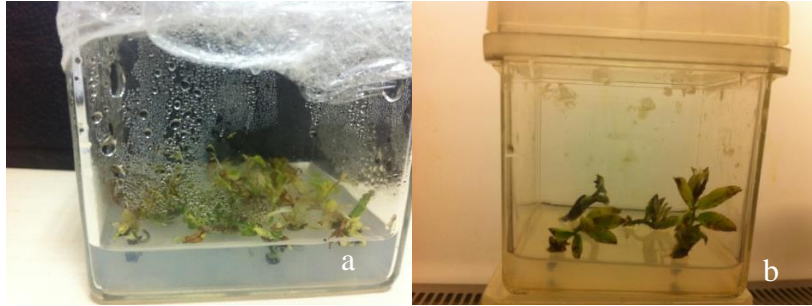
Çizelge 2. Farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda büyüme düzenleyici içeren besi ortamlarında gelişen gül sürgün boyu ve sürgün sayısı

No	Büyüme düzenleyici madde kombinasyonları	Sürgün (cm)	boyu	Sürgün sayısı
1	0.5 mg/l TDZ	0 g		0 d
2	0.5 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IBA	0 g		0 d
3	0.5 mg/l TDZ + 0.5 mg/l IBA	0 g		0 d
4	0.5 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA	0 g		0 d
5	0.5 mg/l TDZ + 0.5 mg/l IBA	0 g		0 d
6	0.3 mg/l TDZ	0 g		0 d
7	0.3 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IBA	0 g		0 d
8	0.3 mg/l TDZ + 0.5 mg/l IBA+0.1 mg/l GA ₃ +	0 g		0 d
9	0.3 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA	0 g		0 d
10	0.3 mg/l TDZ + 0.5 mg/l NAA	0 g		0 d
11	1 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA	0 g		0 d
12	1 mg/l Zeatin	1,5 e		1,5 bc
13	1 mg/l Zeatin + 0.1 mg/l IBA	1,6 e		1,4 bc
14	1 mg/l Zeatin + 0.5 mg/l IBA+0.1 GA ₃	1,95 cd		1,6 abc
15	0.5 mg/l Kinetin + 0.1 mg/l IBA	0 g		0 d
16	0.5 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l IBA	0 g		0 d
17	0.5 mg/l BAP	1,4 f		1,4 c
18	0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA	1,2 f		1,8 ab
19	0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l IBA	1,2 f		1,8 ab
20	1 mg/l BAP	2,10 ab		1,47 c
21	1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1mg/l GA ₃	2,20 a		1,70 abc
22	1 mg/l BAP + 0.5 mg/l IBA	2,0 bcd		1,85 a
23	2 mg/l BAP	1,51 e		1,6 abc
24	2 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1mg/l GA ₃	1,92 d		1,94 a
25	0.5 mg/l Zeatin	1,2 f		1,4 c
26	0.5 mg/l Zeatin + 0.1 mg/l NAA	2,10 ab		1,60 abc
27	0.5 mg/l Zeatin + 0.5 mg/l NAA	2,05 abc		1,62 abc
28	0.5 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA+0.1mg/l GA ₃	0 g		0 d
29	1 mg/l Kinetin	0 g		0 d
30	1 mg/l Kinetin + 0.1 mg/l IBA	0 g		0 d
31	1 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l IBA	0 g		0 d
32	1 mg/l Kinetin + 0.1 mg/l NAA	0 g		0 d

R. bourbonia'dan aldıkları boğum parçalarını MS+BAP (2.5, 5, 10 µM)+%2 sakkaroz +0.75 agar içeren besi ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Yapılan çalışma sonucunda



Şekil 2. MS-1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1 GA₃ içeren besi ortamı üzerinde gelişen sürgün uçları (a,b)



Şekil 3. 0.3 mg/l TDZ + 0.5 mg/l IBA+ 0.1mg/l GA₃ (a) ve 1 mg/l Kinetin + 0.1 mg/l IBA (b) içeren besi ortamları üzerinde kültüre alınan gül sürgün uçları

sürgün uzunluğu, kalınlığı ve sayısı bakımından en iyi gelişimi 5 µM BAP içeren besi ortamları üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Pati ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada *R. damascena* yaprakları bitki rejenerasyonunun teşviki için farklı hormon konsantrasyonu ve kombinasyonları içeren besi ortamlar üzerinde kültüre almışlardır. En iyi bitki rejenerasyon teşvik besi ortamının ½ MS+%3 sakkaroz+ 46.8µM tidiazuran+0.27 µM NAA+ 17.7µM AgNO₃ gözlenmiştir. Rejenere olan bitkiler MS+2.25 µM BAP+ 0.054 µM NAA içeren besi ortamı üzerinde 7, 14, 21, 28, ve 35 gün süreyle kültüre alınmıştır. En iyi sürgün oluşumunun 21 gün içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Jabbarzadeh ve Khosk-Khui (2005), *R. damascena*'nın sürgünlerini farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda kinetin, BA ve IBA içeren besi ortamlar üzerinde kültüre almışlardır. Çalışma sonucunda en iyi sürgün gelişiminin 2.5-3 mg/l BA ve 0.1 mg/l IBA içeren besi ortamı üzerinde olduğu gözlemlenmiştir. Salekjalali (2012), *R. damascena*'da BA'nın sürgün sayısını, NAA'nın sadece yeşil yaprak sayısını, floroglusinolün ise eksplant başına sürgün sayısını önemli derecede artırdığını; en iyi sürgün gelişiminin 2 mg/l BA, 0.1 mg/l NAA ve 100 mg/l floroglusinol içeren MS besi ortamının olduğu tespit etmişlerdir. Bagheri ve ark. (2015) da benzer şekilde BA ve NAA kombinasyonunun sürgün gelişimi için en uygun kombinasyon olduğunu, besin besi ortamlarına sitokinin ve oksinlerle birlikte gibberellik asit (GA₃) ilavesinin yağ gülünde sürgün gelişimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Mazmanoğlu (2003), yapmış olduğu çalışmada *R. damascena*'nın mikro çoğaltımında en uygun besi ortamın; sürgün gelişmesi aşamasında MS sıvı+ 1 mg/l BAP+ 7.5 g/l agar, çoğaltma aşamasında

MS+1 mg/l BAP+0.1 mg /L GA₃+7.5 g/l agar, MS+2 mg/l BAP+0.1 mg /L GA₃+7.5 g/l agar, MS+2 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA+0.1 mg /L GA₃+7.5 g/l agar içeren besi ortamları üzerinde başarılı bir şekilde kardeşlenmenin olduğu gözlenmiş, ancak bir sonraki alt kültürde bitkilerin bir kısmında nekrosiz görülmüş, daha sonra da bunların öldüğü tespit edilmiştir. Nikbakht ve ark. (2005), *R. damascena*'da en yüksek sürgün gelişimi ve çoğalma oranının 1 mg/l BA+ 0.1 mg/l NAA+ 0.1 mg/l GA₃ içeren besi ortamlarından elde edildiğini belirlemişlerdir. Alsemaan (2013), yağ gülünde 2 mg/l BA + 2 mg/l GA₃ kombinasyonunun sürgün gelişimini olumlu yönde etkilediğini bildirmiştir.

3.2. Sürgün Proliferasyonu Üzerine Farklı Karbonhidrat Tip ve Konsantrasyonlarının Etkilerinin Belirlenmesi

Sürgün gelişme denemesinde elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak, çalışmada bitki rejenerasyonu gerçekleşen 1 mg/l BAP+ 0.1 mg /L IBA+ 0,1 mg/l GA₃ hormon içeren besi ortamına farklı karbonhidrat tip ve konsantrasyonları (20, 30, 40 ve 50 g/l dozlarında glikoz, fruktoz ve sakkaroz) ilave edilmiştir. Denemede kullanılan farklı karbon kaynaklarından sakkaroz içeren besi ortamlar üzerinde gül sürgün uçlarında gelişme gözlenmiştir (Çizelge 3).

Özellikle 30 g/l sakkaroz içeren besi ortamı üzerinde gül sürgünlerinde gelişme ve yan sürgünler tespit edilmiştir (Şekil 4). 20 g/l sakkaroz içeren besi ortamlarında da gül sürgün gelişiminde benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Besi ortamı içerisindeki sakkaroz miktarı 40 ve 50 g/l de ise gül sürgünlerinde gelişim yavaşlamış ve 4. hafta sonunda hafif kararmalar tespit edilmiştir. Bu besi ortamlar üzerinde hiç bir sürgün gelişimi gözlenmemiştir.

Çizelge 3. Farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda karbonhidrat içeren besi ortamlarda gelişen gül sürgün boyu ve sürgün sayısı

No	Farklı karbon kaynakları	Sürgün boyu (cm)	Sürgün sayısı
1	20 g/l sakkaroz	2,2 b	1,4 b
2	30 g/l sakkaroz	2,5 a	1,8 a
3	40 g/l sakkaroz	1,2 c	0,5 c
4	50 g/l sakkaroz	1 c	0 d
5	20 g/l glikoz	0 d	0 d
6	30 g/l glikoz	0 d	0 d
7	40 g/l glikoz	0 d	0 d
8	50 g/l glikoz	0 d	0 d
9	20 g/l fruktoz	0 d	0 d
10	30 g/l fruktoz	0 d	0 d
11	40 g/l fruktoz	0 d	0 d
12	50 g/l fruktoz	0 d	0 d

Curir ve ark. (1986), gül sürgünlerinin köklendirilmesinde düşük karbon konsantrasyon (%1.5 sakkaroz) kullanımının bitkilerde köklendirmeyi artırdığını saptamışlardır. Damiano ve ark. (1987), agarlı besi ortam üzerine 1 cm kalınlıkta sıvı besi ortam ilave

edilmiş çift fazlı besi ortam uygulamasının köklenme oranında artış sağladığını bildirmişlerdir. Pati ve ark. (2001), mikro çoğaltılmış *R. damascena* ve *R. bourbonian*



Şekil 4. MS+ 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1 GA₃+ 30 g/l sakkaroz içeren besi ortamı üzerinde kültüre alınan gül sürgün uçları

bitkiciklerinin köklendirilmesinde IBA içeren besi ortamdaki bitkilerin kök sayısının NAA içeren besi ortamındakilere göre daha fazla olduğunu, oksin ve sakkaroz miktarının artırılmasıyla da kök sayısının azaldığını ancak yüksek sakkaroz varlığında (%5) kök uzunluğunun arttığını buna bağlı olarak da kök uçlarında kararmaların meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Murashige ve Skoog (1962), yapmış oldukları çalışmada %3 sakkaroz oranının bitki sürgün gelişimine %2-4 sakkarozdan daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanısıra Davies (1980) %2-8 oranında sakkarozu besi ortamına ilave etmiş ve en iyi sürgün gelişimi %4-5 oranında sakkaroz içeren besi ortamlarında tespit edilmiştir. Marcelis van Acker ve Scholten (1995) ise sakkaroz dışında glukoz kullanmışlar ve glikozun sürgün gelişimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

3.3. En Uygun Köklendirme Ortamının Belirlenmesi

Farklı uygulamalar sonucunda elde edilen *in vitro* sürgünlerin köklendirilmeleri için IBA, IAA, 2, 4-D ve NAA'nın 0, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4 mg/l konsantrasyonlarını içeren, farklı yoğunluktaki katı MS besi ortamlarında (½ MS ve MS) kültüre alınmıştır. IAA ve 2.4 D içeren besi ortamlarda kültüre alınan bitkilerde hiç bir gelişme olmadığı için değerlendirmeye alınmamıştır. Genel olarak bitkilerde farklı konsantrasyonlarda IBA içeren besi ortamlarda kök gelişiminin daha iyi teşvik edildiği gözlenmiştir. (Çizelge 4). ½ MS, MS , ½ MS+0.5 mg/l NAA ve MS+0.5 mg/l NAA içeren besi ortamlarda kök



Şekil 5: ½ MS+2 mg/l IBA içeren besi ortamında köklenen gül bitkicikleri

Çizelge 4. Bazı büyüme düzenleyici dozlarının gülde köklenme üzerine etkileri

Uygulamalar	Büyüme düzenleyiciler	Köklenme oranı (%)	Kök sayısı
1	½ MS	0 fg	0 f
2	½ MS+0.5 mg/l IBA	13,3 ef	1 cdef
3	½ MS+1 mg/l IBA	68,3 b	4,3 b
4	½ MS+2 mg/l IBA	83,3 a	6 a
5	½ MS+4 mg/l IBA	13,3 ef	2 cde
6	½ MS+0.5 mg/l NAA	0 fg	0 f
7	½ MS+1 mg/l NAA	6,67 f	0,3 ef
8	½ MS+2 mg/l NAA	0 fg	0
9	½ MS+4 mg/l NAA	6,7 f	1 cdef
10	MS	0 fg	0 f
11	MS+0.5 mg/l IBA	26,7 de	2,7 c
12	MS+1 mg/l IBA	51,7 c	1,3 cdef
13	MS+2 mg/l IBA	37,3 d	2,3 cd
14	MS+4 mg/l IBA	13,3 ef	1,3 cdef
15	MS+0.5 mg/l NAA	0 fg	0 f
16	MS+1 mg/l NAA	6,7 f	0,3 ef
17	MS+2 mg/l NAA	0 fg	0 f
18	MS+4 mg/l NAA	6,7 f	0,67 def

gelişimi gözlenmemiştir. Bitkiler en iyi ½ MS+2 mg/l IBA içeren besi ortamlarda %83.3 oranında, MS+0.5 mg/l IBA içeren besi ortamda ise %68.8 oranında köklenmiştir (Şekil 5). Kök gelişimini tamamlayan bitkicikler toprağa aktarılmış ve doğal koşullara adaptasyonları sağlanmıştır.

Bar ve ark. (1984), köklenme aşamasında ½ MS besi ortamı içerisine 0.5 mg/l IAA+ 0.5mg/l IAA ve 0.5mg/l IBA eklendiğinde sürgünlerin %60'ında köklenmenin oluştuğunu bildirmiştir. Cai ve ark. (1984), ½ MS besi ortamı içerisine 0.5-1 mg/l IAA ilave edildiğinde 10-15 gün içerisinde gül sürgünlerinin bu besi ortamı içerisinde köklendiğini rapor etmişlerdir. Curir ve ark. (1986), gül sürgünlerinin köklendirilmesinde düşük karbon konsantrasyonunun (%1.5 sakkaroz) kullanımının bitkilerde köklendirmeyi artırdığını saptamışlardır. Damiano ve ark. (1987), agarlı besi ortam üzerine 1 cm kalınlıkta sıvı besi ortam ilave edilmiş çift fazlı besi ortamı uygulamasının köklenme oranında artış sağladığını bildirmişlerdir. Pati ve ark. (2001), mikro çoğaltılmış *R. damascena* ve *R. bourbonian* bitkilerinin köklendirilmesinde IBA içeren besi ortamdaki bitkilerin kök sayısının NAA içeren besi ortamdakilere göre daha fazla olduğunu, oksin ve sakkaroz miktarının artırılmasıyla da kök sayısının azaldığını ancak yüksek sakkaroz varlığında (%5) kök uzunluğunun arttığını buna bağlı olarak da kök uçlarında kararmaların meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Pati ve ark. (2004), rejenere olan *R. damascena* bitkilerini köklendirmek için ½ MS+10 µM IBA içeren sıvı besi ortamı içerisinde 2 hafta kültüre aldıktan sonra bir hafta karanlıkta %3 sakkaroz içeren sıvı besi ortamı içerisinde kültüre almışlardır. Bitkilerin köklenme oranlarının %90 olduğu gözlenmiştir. Jabbarzadeh ve Khosk-Khui (2005), *in vitro*'da mikroçoğaltımını gerçekleştirdikleri *R. damascena*'nın sürgünlerini MS, ½ MS, ¼ MS, ¼ MS ve farklı konsantrasyonlarda IAA, IBA ve NAA içeren besi ortamlar üzerinde kültüre almışlar ve köklenmelerin teşvik edilmediği gözlemlemişlerdir. En iyi kök

gelişiminin 2.5 mg/l 2,4-D içeren besi ortamı üzerinde 2 hafta kültüre alındıktan sonra hormon içermeyen bazal MS besi ortamına transfer edilen bitkilerde olduğunu tespit etmişlerdir. Noodezh ve ark. (2012) yapmış oldukları çalışmada *in vitro* koşullarında *R. damascena*'nın sürgünlerinin ½ MS+0.1 mg/l IBA içeren besi ortamlarında en iyi kök gelişimini gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Tabesh ve ark. (2013) doku kültüründe çoğaltılan bitkilerin köklenme besi ortamlarında NAA ile IBA'yı birlikte kullanmışlar ve 0.5 µM NAA ile 1.5 µM IBA içeren sıvı ½ Van der Salm besi ortamında sürgünlerin tamamının köklendiğini ve kök uzunluğunun ortalama 7.66 mm) bildirmişlerdir.

4. Sonuçlar

Bilindiği gibi bir çok bitki türü, doku kültürü yöntemiyle yaygın olarak çoğaltılmaktadır. *In vitro* çoğaltım yöntemi ile genel olarak hastalıklardan arı sağlıklı, fenotipik ve genotipik benzerlikleri aynı olan kitlesel bitki üretimi yapılabilir. Sonuç olarak, yapmış olduğumuz çalışmada yağlık gülün doku kültürü besi ortamlarında en iyi sürgün oluşumu 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1 GA₃ içeren besi ortamında en fazla sürgün sayısı ise 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA+0.1 GA₃ besi ortamında gözlenmiştir. Sürgün gelişme denemesinde elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak, çalışmada bitki rejenerasyonu gerçekleşen 1 mg/l BAP+ 0.1 mg /L NAA+ 0.1 mg/l GA₃ hormon konsantrasyonu ilave edildikten sonra farklı karbonhidrat tip ve konsantrasyonları (20, 30, 40 ve 50 g/l glikoz, fruktoz ve sakkaroz) ilave edilmiştir. Denemede kullanılan farklı karbon kaynaklarından sakkaroz içeren besi ortamları üzerinde gül sürgün uçlarında gelişme gözlenmiştir. Özellikle 30 g/l sakkaroz içeren besi ortamı üzerinde gül sürgünlerinde gelişme ve yan sürgünler tespit edilmiştir. İçerisinde 20 g/l sakkaroz içeren besi ortamlarda da gül sürgün gelişiminde benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Bitkiler en iyi ½ MS+2 mg/l IBA içeren besi ortamda % 83,3 oranında köklenmiştir. Araştırma sonucunda hızlı ve etkili bir fidan üretimi için uygun bir protokol geliştirilmeye çalışılmıştır. Çalışmada geliştirilmiş olan klonal mikroçoğaltım tekniği; günümüzde pratik anlamda doku kültürü ile fidan üretimi yapmaya başlayan özel kuruluşlar tarafından kullanılarak, gül fidanı üretiminin artırılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, gülün ekonomik olarak ne kadar önemli olduğu göz önünde tutulacak olursa hızlı bir şekilde, çok sayıda , istenilen özelliklere sahip, sağlıklı gül bitkilerinin mutlaka yetiştirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda *in vitro* çoğaltım yöntemleri aktif rol oynamaktadır. Bu çalışma ile gülün *in vitro*'da çoğaltılması için uygun bir protokol oluşturulmaya çalışılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından **2552-M-10 No`lu** proje ile desteklenmiştir.

Kaynakça

1. Anonim (2014). Gül çiçeği raporu. TC Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü, Pp:11.

2. Alsemaan T (2013). Micropropagation of damask rose (*Rosa damascena*) cv. Almarah. International Journal of Agricultural Research, 8(4): 172-177.
3. Arıcı Ş E, Koç N K, Yüceer S, Köseli M A (2005). Gül (*Rosa turcica*)'ün *in vitro* klonal çoğaltımı.14. Biyoteknoloji Kongresi Bildirileri, 31 Ağustos -2 Eylül, ss:362-365, Eskişehir.
4. Bagheri M S, Saidi A, Jari S, Goodarzi G (2015). Effects of different hormonal concentrations on damask rose (*Rosa damascena* Mill.) Micropropagation in liquid tissue culture medium. International Journal of Biosciences, 6(6): 10-16.
5. Baydar H (2005) Tıbbi, aromatik ve keyf bitkileri bilim ve teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 51, Isparta, Pp: 135-143.
6. Cai J, Cai M Y, Qian D (1984). Induction of multiple shoots and rapid propagation of clones of China rose (*R. chiensis*). Plant Physiol. Comm. Zhiwu Shenglixue Tongxun No: 5: 37-38.
7. Curir P, Damiano C, Cosmi T (1986). *In vitro* propagation of some rose cultivars. Acta Hort., 187: 221-224.
8. Damiano C, Ruffoni B, Costantino C, Bregliano R (1987). *In vitro* propagation of seven rose cultivars. Ann. Inst. Sperimentale Floricoltura 18(1): 43-55.
9. Davies D R (1980). Rapid propagation of roses *in vitro*. Sci Hort;13:385– 89.
10. Jabbarzadeh Z, Khosk-Khui M (2005). Factor affecting tissue culture of damask rose (*R.damascena* Mill.) Scientia Horticulturae, 105: 475-482.
11. Khosk-khui, M, Sink K C (1982). Micropropagation of new and old world rose species Journal of Horticultural Sciences 57(3): 315-319.
12. Mazmaoğlu M (2003). *Rosa damascena*'nın *in vitro* kültürde yan tomurcuk ve sürgün uçlarıyla mikroçoğaltılması. Yüksek Lisans Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.
13. Murashige T, Skoo, F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
14. Nikbakht A, Kafi M, Mirmasoudi M, Babalar M (2005). Micropropagation of damask rose (*Rosa damascena* Mill.) cvs Azaran and Ghamsar. International Journal of Agriculture & Biology, 7(4): 535-538.
15. Noodezh H M, Moieni A, Baghizadeh A (2012). *In vitro* propagation of the damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(5): 530-538.
16. Örmeci Kart M, İkiz M, Demircan V (2012). Türkiye'de yağ gülü (*Rosa damascena*) üretimi ve ticaretinin gelişimi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 7 (1): 124-134.
17. Pati K P, Sharma M, Ahuja P S (2001). Micropropagation, protoplast culture and its implications in the improvement of scenta rosa. Acta Hort., 547:147-158.
18. Pati K P, Sharma M, Sood A, Ahuja P S (2004). Direct shoot regeneration from leaf explants of *R.domesцена* Mill. *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant, 40:192-196.

19. Pati K P, Rath S P, Sharma M, Sood A, Ahuja P S (2006). *In vitro* propagation of rose—a review, *Biotechnology Advances* 24: 94–114.
20. Salekjalali M (2012). Phloroglucinol, BAP and NAA enhance axillary shoot proliferation and other growth indicators *in vitro* culture of damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, 12(7): 960-966.
21. Tabesh F, Jafarkhani Kermani M, Khayam Nekouei M, Mousavi A, Khalighi A (2013). *In vitro* propagation of damask rose (*Rosa damascena* cv. Ispahan). *Annals of Biological Research*, 4 (8): 134-138.