ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GYPSOPHILA GERMANICOPOLITANA HUB.-MOR.'UN *IN VITRO* KOŞULLARDA ÇOĞALTIMI

Migane NIMAAN ABDILLAHI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Migane NIMAAN ABDILLAHI tarafından hazırlanan **"*Gypsophila germanicopolitana* Hub.-Mor.'un *In Vitro* Koşullarda Çoğaltımı"** adlı tez çalışması 15/02/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN

Jüri Üyeleri **:**

Başkan **:** Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Doç. Dr.Ömer Cem KARAKOÇ
Tarım ve Yaşam Bilimleri Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Doç. Dr.Atilla ÇAKIR
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Bingöl Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "***Gypsophila germanicopolitana*** **Hub.-Mor.'un** ***In Vitro*** **Koşullarda Çoğaltımı**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (15/02/2022).

Migane NIMAAN ABDILLAHI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GYPSOPHILA GERMANICOPOLITANA HUB.-MOR.'UN *IN VITRO* KOŞULLARDA ÇOĞALTIMI

Migane NIMAAN ABDILLAHI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN

Bu tez çalışmasında, Çankırı ili sınırları içerisindeki jipsli tepeler üzerinde yayılış gösteren ve Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği kırmızı liste kategorisine göre "kritik yok olma tehlikesi (**CR**)" altındaki bitkiler listesinde yer alan *Gypsophila germanicopolitana* HUB.-MOR. bitkisinin *in vitro* koşullarda çoğaltımı amaçlanmıştır. Eksplant kaynağı olarak bitkinin sürgün uçları ve sürgünler üzerindeki boğum araları kullanılmıştır. *In vitro* çoğaltım için temel besin ortamları olarak **1)** Murashige ve Skoog (MS) **2)** Nitsch & Nitsch (NN), bitki büyüme düzenleyicilerinden sitokinin kaynağı olarak **1)** 6-benzylaminopurin (BAP) (0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L) ve**2)** Kinetin (KIN) (0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L)'in yanı sıra oksin kaynağı olarak da **3)** Indol-3-bütirik asit (IBA) (0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L) ve **4)** α-naftalen asetik asit (NAA) (0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L) dozları 36 farklı madde kombinasyonu halinde ilave edilmiştir. Besin ortamlarına katılaştırıcı olarak gelrite (2,1 g/L) ve karbon kaynağı olarak 30 g/L sakaroz eklenmiştir. Sonuç olarak En yüksek sayıda sürgün rejenerasyonu, 0 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA bitki büyüme düzenleyici madde kombinasyonu ilave edilmiş Nitsch & Nitsch (NN) besin ortamında gözlenmiştir. MS besin ortamında kültüre alınmış eksplantlarda ise köklenme NN besin ortamına göre daha başarılı olmuştur. Daha önce bu endemik türe ait herhangi bir *in vitro* çoğaltım çalışmasının yapılmamış olması ve ileride yapılacak çalışmalara temel oluşturması bakımından özgün değer taşımaktadır.

2022, 35 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Sürgün ucu kültürü, Doku kültürü, Endemik, *In vitro* çoğaltım, *Gypsophila germanicopolitana*

ABSTRACT

Master of Science Thesis

IN VITRO PROPAGATION OF *GYPSOPHILA GERMANICOPOLITANA* HUB.-MOR.

Migane NIMAAN ABDILLAHI

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. Mehmet SEZGİN

In this thesis study, *in vitro* propagation of *Gypsophila germanicopolitana* HUB.-MOR., which grows on gypsum hills within the limits of Çankırı province was taken as an aim. The species is included in the list of plants under "critical extinction (**CR**)" according to the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources red list category. Shoot tips and internodes of the plant were used as explant source. for *in vitro* propagation, as basal nutrient medium **1)** Murashige and Skoog (MS) **2)** Nitsch & Nitsch (NN) were chosen, as plant growth regulators **1)** 6-benzylaminopurine (BAP) (0 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L) and **2)** Kinetin (KIN) (0 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L) were used as cytokinin source as well as **3)** Indole-3-butyric acid (IBA) (0 mg/L) L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L) and **4)** α-naphthalene acetic acid (NAA) (0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L) were as auxin source. After that 36 combinations with different doses were established. Gelrite (2.1 g/L) was used as a gelling agent and 30 g/L sucrose was added as a carbon source to the nutrient media. As a result, the best of shoot regeneration was observed in Nitsch & Nitsch (NN) nutrient medium with a combination of 0 mg/L KIN + 0.5 mg/L NAA plant growth regulator. Root regeneration was more successfully present within the explants cultured in MS nutrient medium than in NN nutrient medium. No any other *in vitro* propagation studies have been carried out on this endemic species before and so it has a unique value in serving as basis to future studies.

2022, 35 pages

Keywords: Shoot tip culture, Tissue culture, Endemic, *In vitro* propagation, *Gypsophila germanicopolitana*

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışma konusunun seçiminden, çalışmanın sonlandırılmasına kadar her aşamada desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden sıkça yararlandığım danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca her zaman yanımda olan ve beni destekleyen aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Migane NIMAAN ABDILLAHI
Çankırı, Şubat 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **v**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **6**
2.1 Caryophyllaceae Familyasına Ait Diğer Türlerde *In Vitro* Çoğaltım **6**
2.2 *Gypsophila* ile İlgili Çalışmalar **7**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **10**
3.1 Materyal **10**
3.2 Araziden Toplanan Bitkilerin Sterilizasyonu **11**
3.3 Besin ortamlarının hazırlanması **13**
3.4 Eksplantların Dikimi ve Inkübe Edilmesi **17**
3.5 Alt Kültür **17**
3.6 İstatistiksel Analiz **18**
4. BULGULAR **19**
4.1 *G. germanicopolitana'nın* Rejenerasyonu **19**
4.2 Organogenik Olan Kallus Oluşumu **20**
4.3 Organogenik Olmayan Kallus Oluşumu **27**
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **28**
KAYNAKLAR **32**
ÖZGEÇMİŞ **35**

SİMGELER DİZİNİ

cm	Santimetre
dk	Dakika
mg/L	Miligram/litre
mL	Mililitre
M	Molar
°C	Santigrad derece
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

2,4-D	2,4- Diklorofenoksiasetik asit
BAP	6- benzylaminopurin
BDM	Büyüme düzenleyici madde
EtOH	Etanol
$HgCl_2$	Civa klorür
IAA	Indolasetik asit
IBA	Indolbütirik asit
KIN	Kinetin
NAA	Naftalen asetik asit
NaOCl	Sodyum hipoklorit
TDZ	Thidiazuron
ZEA	Zeatin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 *G. germanicopolitana* bitkisinin görünümü 3
Şekil 1.2 *G. perfoliata* (Helvacı çöveni) 5
Şekil 3.1 G. germanicopolitana'ın yayılış alanı-Çankırı/TÜRKİYE 10
Şekil 3.2 *G. germanicopolitana* bitkisinin habitatı 11
Şekil 3.3 *G. germanicopolitana* HUB.-MOR.'un çiçeklerinin görünümü 12
Şekil 3.4 *G. germanicopolitana'*da sterilizasyon aşamaları 12
Şekil 3.5 *G. germanicopolitana*'da sterilizasyon için eksplantların hazırlanması a) Araziden getirilen bitkinin sürgünlerine ayrılması b) Sürgünlerin yıkanması c)Yapraklarından arındırılmış sürgünler d) Dikim için hazırlanmış eksplantlar 13
Şekil 3.6 Besin ortamlarının tüplere 10 mL olarak dağıtılmasının ve dikim yapılmış eksplantların görünümü 17
Şekil 3.7 Kallusları alt kültürü a) ECO2BOX/Green Filter®(Duchefa) kaplarına dikimi b) Alt Kültüre alinmis eksplantlar 18
Şekil 4.1 Sürgün ve kök oluşumu a) BAP (1 mg/L) + IBA (0,5 mg/L kombinasyonunda kök oluşumu b) KIN (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) kombinasyonunda sürgün oluşumu 20
Şekil 4.2 NN besin ortamında en yüksek sürgün sayısı a) KIN (0,5 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) kombinasyonunda sürgün oluşumu b) BAP (1 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) kombinasyonunda sürgün oluşumu 25
Şekil 4.3 MS temel besin ortamı KIN (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) kombinasyonunda sürgün oluşumu 25
Şekil 4.4 MS besin ortamı KIN (0 mg/L) + IBA(0,5 mg/L) kombinasyonunda kök oluşumu 26
Şekil 4.5 MS besin ortamı BAP (1 mg/L)+IBA (0,25 mg/L) kombinasyonunda kök oluşumu 26
Şekil 4.6 a) KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) kombinasyonunda kallus oluşumu b) BAP (0 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) kombinasyonunda kallus oluşumu 27
Şekil 4.7 KIN (0,5 mg/L) +IBA (0,25 mg/L) kombinasyonunda kallus oluşumu 27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 *Gypsophila* sp. cinsinin türleri 2
Çizelge 3.1 Murashige ve Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962) ve Nitsch & Nitsch (Nitsch and Nitsch 1969) temel besin ortamlarının içeriği 15
Çizelge 3.2 Bitki büyüme düzenleyici madde (BDM) kombinasyonları uygulama tablosu 16
Çizelge 4.1 BDM kombinasyonları arasındaki (1-36/1-12) ikili karşılaştırmaları 21
Çizelge 4.2 BDM kombinasyonları arasındaki (1-36/13-24) ikili karşılaştırmaları 22
Çizelge 4.3 BDM kombinasyonları arasındaki (1-36/25-36) ikili karşılaştırmaları 23
Çizelge 4.4 Organik kallustan sürgün oluşumu bakımından temel besin ortamları ile bazı BDM kombinasyonları arasındaki interaksiyon 24

1. GİRİŞ

Türkiye, biyolojik çeşitlilik açısından zenginliği ile dünyanın önde gelen ülkelerinden biridir. Bu zenginlik, bitkisel çeşitlilik ve yüksek endemizm oranıyla (%35) dikkat çekmektedir (Ataşlar 1999). Anadolu birçok bitkinin anavatanı olup, bazı ekonomik bitki cinslerinin de (*Astragalus, Verbascum, Bolanthus* gibi) gen merkezi olarak tanınmaktadır. Ama bu durum son 50 yıldan bu yana ülkenin doğal zenginliği tarım-hayvancılık faaliyetleri, erozyon, yangınlar, tomrukçuluk, yerleşim, ağaç kesimi, sanayileşme ve aşırı pestisit kullanımı gibi faktörler tarafından tehdit edilmektedir (Avcı 2005). Bu nedenle on iki nadir ve endemik bitki türünün neslinin tükendiği belirtilmektedir.

Caryophyllaceae (Karanfilgiller), en büyük angiyosperm familyalarından biridir. Familyanın yaklaşık 100 cinsi ve 2200 türü bulunmaktadır (Korkmaz 2012). Caryophyllaceae familyasına ait bireyler genellikle kuzey ve güney yarım kürelerin ılıman bölgelerinde ve tropikal dağlarda bulunmaktadır. Bu familyanın gen merkezinin Akdeniz Havzası olduğu bildirilmesine karşın; Doğu Anadolu, Sina yarımadası, Suriye, Filistin, Ermenistan, İran, Ürdün, yukarı Mezopotamya, Transkafkas'ın doğu ve güneyindeki kurak ve yarı-kurak kısımları, Hindikuş'un güneyi, Kuzey Himalaya'nın güney kısmı, Volga nehrinin güneyi, Gobi Çölü'nü çevreleyen ve Iran-Turan bölgeleri olarak isimlendirilmiş alanlarda yayılım göstermişir (Korkmaz 2007). Bu bölgelerde rastlanan bitki türleri kuru ve yoğun güneş ışınları bulunduğu habitatlarda ortaya çıkmış heliofitlerdir. Buna karşın bazı türleri sadece dağlık bölgelerle sınırlı kalmıştır. Caryophyllaceae familyası, tıbbi ve süs bitkisi özellikleri nedeniyle önemlidir ve kaşık otu, alçıtaşı, karanfil otu, sabun otu bu familyanın üyeleri arasında yer almaktadır.

Dünyada farklı bölgelerde de yayılış gösteren Caryophyllaceae familyasının üçüncü en büyük cinsi *Gypsophila* sp., Türkiye'de İran-Turan ve Doğu Anadolu bölgelerinde yoğunlaşan 35 cins ve 470 civarında türü yetişmekte ve bunların yarısından fazlası endemik olup Anadolu bu tür için gen kaynağı durumundadır (Yıldız 2012). "*Gypsophila*", jipsli ortamlarında optimal gelişim gösteren bitkilerin adıdır. *Gypsophila* ismi Yunanca'da jips anlamına gelen "gypsus" ve seven anlamına gelen "philos"

kelimelerinden kurulmuştur. Cinsinin türleri birçok farklı habitatlarda yetişebilmek için uyum sağlamaktadır (Korkmaz ve Özçelik 2011). Bu bitkiler, tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık hallerde bulunmaktadır (Şekil 1.1). Türkiye, jips alanlarının göstergesi olan ve ekonomik olarak oldukça değerli olan *Gypsophila*'nın gen kaynağı özelliği ve taksonun biyolojik özellikleri nedeniyle tanıtılması çok gerekli bir türdür (Çizelge 1.1) (Korkmaz 2012).

Çizelge 1.1 *Gypsophila* sp. cinsinin türleri

G. acutifolia	*G. floribunda*	*G. pallida*	*G. struthium*
G. adenophylla	*G. germanicopolitana*	*G. paniculata*	*G. tenuifolia*
G. altissima	*G. glandulosa*	*G. parva*	*G. tekirae*
G. antari	*G. glomerata*	*G. patrinii*	*G. thyraica*
G. aretioides	*G. graminifolia*	*G. perfoliata*	*G. tschiliensis*
G. arrostii	*G. hakkiarica*	*G. peshmenii*	*G. tuberculosa*
G. aucheri	*G. heteropoda*	*G. petraea*	*G. tubulosa*
G. baytopiorum	*G. hispida*	*G. pilosa*	*G. turcica*
G. bicolor	*G. huashanensis*	*G. pilulifera*	*G.uralensis*
G. bitlisensis	*G. lepidioides*	*G. pinifolia*	*G. venusta*
G. brachypetala	*G. leucochlaena*	*G. polyclada*	*G. viscosa*
G. briquetiana	*G. libanotica*	*G. pulvinaris*	*G. yusufeliensis*
G. capituliflora	*G. licentiana*	*G. repens*	*G. elegans*
G. castellana	*G. lignosa*	*G. ruscifolia*	*G. eriocalyx*
G. cephalotes	*G. linearifolia*	*G. scorzonerifolia*	*G. fastigiata*
G. cerastioides	*G. makranica*	*G. sedifolia*	*G. oblanceolata*
G. confertifolia	*G. muralis*	*G. sericea*	*G. oldhamiana*
G. curvifolia	*G. nabelekii*	*G. serpylloides*	*G. olympica*
G. davisii	*G. nana*	*G. silenoides*	*G. simonii*
G. davurica	*G. nodiflora*	*G. simulatrix*	*G. sphaerocephala*
G. desertorum	*G. osmangaziensis*	*G. spinosa*	
G. festucifolia	*G. pacifica*	*G. stevenii*	

Yarı kurak ve kurak alanlara sahip Çankırı ilinde, lokal endemik olarak yetişen çok yıllık otsu ve tıbbi aromatik bitkiler arasında yer alan, ayrıca, Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Korunma Birliği Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği – International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), Tehlike Altındaki Bitkiler Komitesi Sekreterliği (Threatened Plant Committee (TPC)), Dünya Doğayı Koruma Vakfı (World Wildlife Foundation (WWF)) gibi kuruluşların yanı sıra Türkiyede de Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından kritik yok olma tehlikesi

altındaki bitkiler listesinde (CR) yer alan *Gypsophila germanicopolitana* Hub.-Mor. bitkisinin *in vitro* teknikler yardımıyla çoğaltımının ve aklimitizasyonunun sağlanmasıdır (Ekim vd. 2000). Bu tez çalışmasında, *Gypsophila germanicopolitana*'nın *in vitro* çoğaltımı ile ilgili ilk çalışma olması bakımından özgündeğer taşımaktadır. *Gypsophila germanicopolitana'*nın *in vitro* çoğaltım teknikleri kullanarak vegetatif olarak çoğaltılmıştır.



Şekil 1.1 *G. germanicopolitana* bitkisinin görünümü

Türkiye'nin değişik yörelerinde çöğen, çöven, çuvan, çoğan, çevgen, çöğür, helvacı otu, alçı otu, sabun otu gibi yerel adlarla bilinen *Gypsophila* farklı özelliklerinden dolayı pek çok üretim sektörlerinde ilgi çekmektedir. Bazı *Gypsophila* türleri (*G. arrostii* Guss., *G. bicolor* Freyn & Sint.), (*G.rossh., G. eriocalyx* Boiss), (G. *arrostii var. nebulosa*) tıbbi alanında, gıda ürünleri, temizlik ve kozmetik ürünleri, park ve bahçelerde süs bitkisi olarak kullanılabilmekte, tarımsal sektörü, peyzaj, tekstil, kuyum, kimya ve eczacıların alanlarında da yaygın olarak kullanılmaktadır (İnan 2006).

Bir tür glikozit olan saponinler, genellikle toksik ve bitki kaynaklı organik kimyasal bileşik sınıfına aittir. Çöven rizomlarından elde edilen bu saponin ekstraktı, öksürük, solunum sistemi ve bazı diğer hastalıkların tedavisinde, sabun ve likörlerin üretiminde, film emülsiyonlarında ve kimyasal temizleyicilerde, köpük oluşturucu olarak yangın

söndürücülerin üretimde yaygın kullanılmaktadır. "Tahin Helvası", "Koz Helva" ve "Paşa Lokumu" olarak adlandırılan tatlı çeşitlerinin üretiminde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Özçelik ve Yıldırım 2011). Saponinler, amfifil glikozitler olarak gruplandırılmalarına karşın yapısal olarak da lipofil steroid veya triterpenoid türevleri olarak adlandırılır. Bunun yanında birleşik olarak bir ya da birden fazla karbonhidrat yan zincirine sahip glikozitler olarak da adlandırılmaktadır (Kocaoğlu 2004).

Bazı *Gypsophila* türleri, soğuk, kuraklık, tuzluluk ve yüksek bor elementlerinin birikimi gibi bazı stres faktörlerine karşı dayanıklıdır. *Gypsophila perfoliata* L. (Şekil 1.2) ve *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat bitkilerinin bor açısından hiperakümülatör olma potansiyeline sahip olduğunu, *G. sphaerocephala* yapraklarında yaklaşık 3500 mg/kg Bor bulunduğu halde bitkinin sağlıklı bir şekilde geliştiğini belirlemişlerdir (Babaoğlu *et al.* 2004). Bu nedenle, tarım açısından üretilmesi daha kolay olan *G. sphaerocephala* ve *G. perfoliata* bitkileri ile aynı türden olan *G. arrosti* bitkisinin hiperakümülatör olma potansiyelinin belirlenmesi, Bor toksitesi problemi bakımından tarım alanları için önem arz etmektedir.. Ek olarak, yapay gübre kullanımından kaynaklanan bor toksisitesinin ürün veriminde kayba neden olduğu ve bu hasarın aynı alanda büyüyen *Gypsophila* türleri ile ortadan kaldırılabileceği düşünülmektedir (Özçelik ve Yıldırım 2011).

*Gypsophila'*nın birçok türünün köklerinin kaynatılmasıyla elde edilen ılık su, ipek ve narin kumaşların temizliğinde kullanılmaktadır. İnan (2006) kök saplarının su ile iyice kaynatıldıktan sonra ipek ve değerli kumaşlar bu suda bekletildiğinde kumaşların renk ve parlaklığının bozulmadan temizlendiği bildirilmiştir. İlaç üretiminde ve altın ağartmada da kullanıldığı belirtmektedir (Özçelik ve Özgökçe 1999). Gypsophila rizomlarının kaynatılmasından elde edilen sıvının idrar söktürücü etkileri vardır. Bunun yanında, kozmetik alanında sıvının leke ve sivilce giderici etkisi da olduğu bildirilmiştir (Ayeh *et al*. 2009).



Şekil 1.2 *G. perfoliata* (Helvacı çöveni)

Çöven üzerine önemli bir araştırmada oğullarını lösemiden kaybeden İngiliz bilim insanları Dr. David Flavell ve eşi Bee tarafından yapılmıştır. Araştırmaya göre 'Bahar Yıldızı' olarak da adlandırılan bu bitki çoğu lösemi hastasına umut kapısı olacağı tespit edilmiştir. Çöven şifalı bitkisinin çiçeklerinde lösemi ilaçlarının etkisini artıracak öz bir madde bulunmaktadır. Bu madde sayesinde birçok lösemili hasta tedavi edilebilecektir. Araştırmaların tam olarak netlik kazanması için çalışmalar devam etmektedir.

Bu tez çalışmasında, *G. germanicopolitana*'nın *in vitro* çoğaltımı ile ilgili ilk çalışma olması bakımından özgün değer taşımaktadır. Çalışmada önemli bir biyoteknolojik yöntem olan, yoğun, hızlı ve klonal bir çoğaltım imkânı sağlayan doku kültürü yöntemi ile *G. germanicopolitana* bitkisi sürgün ucu ve nod (boğum) gibi eksplantlar kullanılarak *in vitro* şartlarda çoğaltımı hedeflenmiştir. *G. germanicopolitana* eksplantları ilk kez *in vitro* koşullarda 2 farklı besin ortamı ve 36 farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonu kullanılarak kültüre alınmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Caryophyllaceae Familyasına Ait Diğer Türlerde *In Vitro* Çoğaltım

Miranda vd. (1999), *Stellaria longipes* Goldie hipokotil eksplantlarını kullanarak *in vitro* rejenerasyon protokolü geliştirmiştir. Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA BDM'leri MS besin ortamına ilave edilmiştir. Direkt ve inderkt sürgün regenerasyonu sağlanmıştır. En yüksek sürgün sayısı 0,003 mg/L BAP ve 0,005 mg/L IBA içeren MS besin ortamında elde edilmiştir. Köklenme aşaması için gelişen sürgünler, BDM içermeyen MS ortamına alınmıştır. Başarıyla köklenen bitkiler dış koşullarına aktarılmıştır.

Kiani vd. (2012), *Diaphanoptera khorasanica* Rech.f bitkisinin *in vitro* çoğaltımı hedef olarak alınmıştır. Eksplant kaynağı olarak farklı gelişim seviyelerde bulunan fidelerin sürgünleri kullanılmıştır. Başlangıç, çoğaltma ve köklendirme aşamaları için farklı büyüme düzenleyici maddeler (BDM) seçilmiştir. Eksplantlar, %1 sodyum hipoklorit (NaOCl) ile 5 dk muamele edildikten sonra 0,22 mg/L BAP ve 0,24 mg/L IBA içeren MS temel besin ortamında kültüre alındıklarında en yüksek sürgün regenerasyon yüzdesini göstermiştir. Hem yetişkin hem de fide kaynaklı eksplantlardan elde edilen sürgün gelişimi TDZ'nin aksine BAP ilaveli ortamlardan elde edilmiştir. Yaşlı eksplantlarından elde edilen sürgünler, 0,4 mg/L ve 0,2 mg/L NAA ilave edilen ortamda en yüksek köklenme oranı gözlemlenmiştir. Bitkicikler, aklimitizasyon aşaması için dış koşullara aktarılmıştır. *D. khorasanica*'nın hem yaşlı hem de genç fidelerinin eksplant kaynağı olarak kullanılmaları mümkün olduğu ispatlanmıştır.

Tejavathi ve Indira (2013), bu çalışmada *Drymaria cordata* bitkisinin yaprak eksplantlarından kallus oluşumu aracılıyla sürgünlerin hızlı rejenerasyonu elde edilmiştir. MS besin ortamına farklı BAP ve TDZ kombinasyonları ilave edilmiştir. BAP içeren ortamda kallus oluşumu görülmemişken, TDZ içeren ortamdan ise bol miktarda kallus gelişimi ve sürgün regenerasyonu elde edilmiştir. Kök gelişimi için en uygun ortam 9 mg/L IBA ilaveli MS besin ortamı olduğu iletilmiştir. Köklendirilen bitkiler saksılara aktarılmış ve yaklaşık %90 oranında aklimatizasyon sağlanmıştır .

Thiem vd. (2013), potansiyel olarak tıbbi değeri olan *Lychnis flos-cuculi* L., bitkinin sürgünlerin *in vitro* çoğaltım yöntemi yoluyla çoğaltarak köklendirmiştir. Hem doğadaki hem de *in vitro* kültürlerden alınan bitkiciklerinin sürgünlerini kullanmıştır. Aksiller sürgün oluşumu yoluyla başarılı bir mikro çoğaltma protokolü geliştirilmiştir. Eksplant başına 12'den fazla sürgün ile en yüksek bitki rejenerasyon verimliliği %95, 2,0 mg/L BAP ve 0,2 mg/L NAA ilave edilmiş MS temel besin ortamında indüklenmiştir. Çoğaltılan sürgünler, 0,5-1,0 mg/L NAA içeren MS ortamında köklendirilmiş ve saksılara aktarılmıştır. Kök eksplantlarından kallus gelişimi 2,4-D ve BAP içeren MS besin ortamında oluşturulmuştur.

Shaulo vd. (2014), bitki materyalinin genetik stabilitesini koruyarak doğrudan bitki rejenerasyonunu sağlamak için etkili bir yöntem araştırmıştır. 3 mg/L BAP ilave edilmiş MS ortamında, vitrifikasyon olmadan yüksek rejenerasyon oranlar görülmüştür. Bitkilerin köklenmesi ve adaptasyonu zor olmamıştır. En yüksek köklenme yüzdesi, BDM içermeyen ½MS ortamında elde edilmiştir. Köklendirme aşamasından sonra köklü bitkiler dış koşullara alınmıştır. *Dianthus mainensis* rejenerantları deneysel alanlarda başarıyla yetiştirilmektedir .

Çördük ve Akı (2010) etkili bir sürgün rejenerasyon protokolü oluşturmak için bu çalışma yürütülmüştür. *D. trojana*'nın yaprak eksplantları, (0,1, 0,5, 1, 3, 5 mg/L) BAP, (0,1, (0,5, 1 mg/L) NAA ve %3 (a/h) sakaroz ve %0,8 (a/h) agar içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. En yüksek sürgün sayısı, 3,0 mg/L BA+ 0,1 mg/L NAA'nin ilave edildiği MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarından elde edilmiştir. Gelişen sürgünlerin, BDM içermeyen MS besin ortamında köklendirildikleri (2-3 cm) ve turba ve perlit karışımı (2:1 v/v) içeren saksılara ayrı ayrı aktarıldıkları ifade etmiştir .

2.2 *Gypsophila* ile İlgili Çalışmalar

Morariu vd. (2008), *Gypsophila muralis*'in fidelerinin sürgün uçları üzerinde çalışmıştır. 1-5 mg/L arasındaki konsantrasyonda olan farklı BDM kullanılmıştır. 2,4-D içeren MS ortamından yüksek sürgün regenerasyon oranı izlenmişken, IAA'nin ilave

edildiği ortamda basit kallus oluşumu görülmüştür. Artan sitokinin konsantrasyonu gelişmemiş sürgünlerin farklılaşmasına yol açmıştır. IAA ve BAP kombinasyonu içeren besin ortamlarda kültüre alınmış kallusların organogenik kapasiteleri olduğu iletilmiştir.

Toaima vd. (2013), bu çalışmada, farklı BDM, katılaştırıcı jeller ve sakarozun *Gypsophila perfecta*, *Gypsophila paniculata* L. bitkilerin mikroçoğaltım ve hiperhidritesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Farklı dozlarda olan BAP ve NAA BDM'lerini içeren MS besin ortamında sürgün uçları kültüre alınmıştır. *Gypsophila paniculata* L.'nın en yüksek sürgün oluşumu, her biri 0,5 mg/L BAP ve NAA içeren MS ortamından ile elde edilmiştir. Yüksek gelrite kullanımı, hiperhidrite ile sonuçlandığı ve kültür ortamındaki yüksek agar oranı daha etkili olduğu iletilmiştir. Köklendirme aşaması için 1 NAA ve 3 IBA mg/L ilave edilmiş ½ MS ortamında %95 köklenme oranı elde edilmiştir .

Aslam vd. (2012), bu çalışmada, eksplant olarak *Gypsophila paniculata* L.'nin apikal meristemleri kullanılmıştır. *In vitro* çoğaltım için MS besin ortamına farklı (0,25, 0,5, 1, 1.5 ve 2,0 mg/L) NAA ve KIN kombinasyonları ilave edilmiştir. En yüksek sürgün sayısı 1 mg/L BAP konsantrasyonu içeren MS besin ortamında elde edilmiştir. Köklendirme ortamı için farklı konsantrasyonlarda olan (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ve 0,5 mg/L) NAA BDM'leri kullanılmıştır. Kök gelişimi %85 oranıyla 0,5 mg/L NAA içeren MS ortamında gözlemlenmiştir .

Teteryuk ve Mikhovich (2020), *Gypsophila uralensis* Less fidelerinden kallus elde etmek için doku kültürü yöntemi kullanmıştır. MS ve Woody Plant Medium (WPM) besin ortamlarına 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L IAA BDM Kombinasyonu ilave edilmiştir. Elde edilen kallusların organogenesis kabiliyetleri olduğu iletilmiştir. Canlı kallus yüzdesi %82 ile %94 arasında değişmiştir. Kallusların %90'undan indirekt sürgün regenerasyonu elde edilmiştir. Köklendirme aşaması için farklı IAA BDM kombinasyonlarının ilave edildiği bir artıştı MS ortamı kullanılmıştır. Besin ortamına IMA (Inhibitory Mold Agar) eklenmesi kök gelişiminde bir artış görülmüştür.

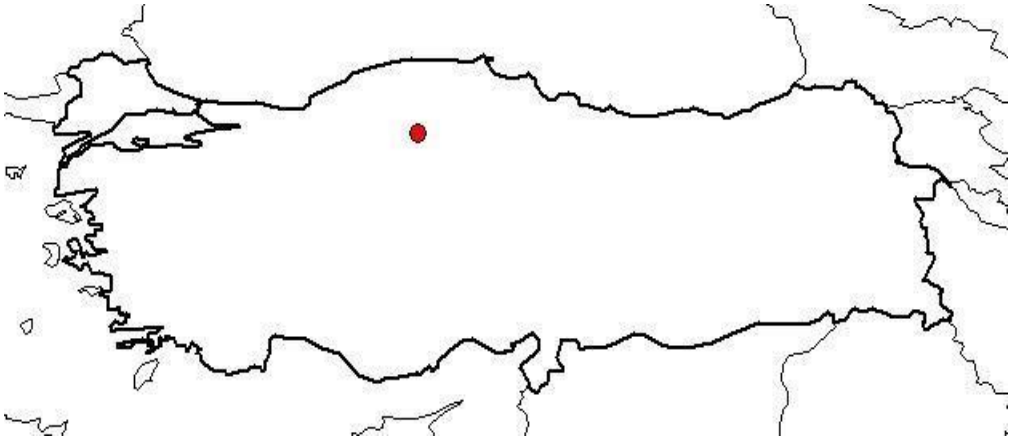
Ahroni vd. (1997), *Gypsophila paniculata* L.'nın *in vitro* çoğaltımı için Arbel çeşidinin boğum araları kullanarak sürgün rejenerasyonu elde etmeye çalışmıştır. Sitokinin kaynağı olarak TDZ, BAP, KIN veya Zeatin ve oksin kaynağı NAA kullanılmıştır. TDZ BDM'i içeren MS besin ortamında kültüre alınan eksplantların %100'ü sürgün oluşumunu sağlamış, eksplant başına 19 sürgün gelişmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışması, 2021-2022 yılları arasında, Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü bünyesinde bulunan Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Çankırı İli'ne ait olan endemik *Gypsophilia germanicopolitana* HUB.-MOR. bitkisinin *in vitro* çoğaltımı hedeflenmiştir.

3.1 Materyal

G.germanicopolitana, Çankırı-Ankara karayolu üzerindeki jipsli tepelerinde, 700-750 m yükseltide, 40º33'24,0" N ve 33º33'41,6" E koordinatlarında bulunmaktadır. Bitkinin vejetasyon dönemi Mayıs ayında başlamış ve Haziran ayında tam çiçekli halinde görülmüştür. *G. germanicopolitana* bitkinin doğal yaşam alanları (Şekil 3.1) ve çoğalmalarına engel olmayacak şekilde 20 Haziran tarihinde, jipsli habitatlarından sınırlı miktarda toplanmış (Şekil 3.2) ve laboratuvar aseptik ortamına getirilmiştir. Bitkinin sürgün uçları ve boğum araları eksplantlar kaynağı olarak kullanılmış ve *in vitro* şartlarda çoğaltım amacıyla hazırlanmıştır.



Şekil 3.1 *G. germanicopolitana*'ın yayılış alanı-Çankırı/TÜRKİYE



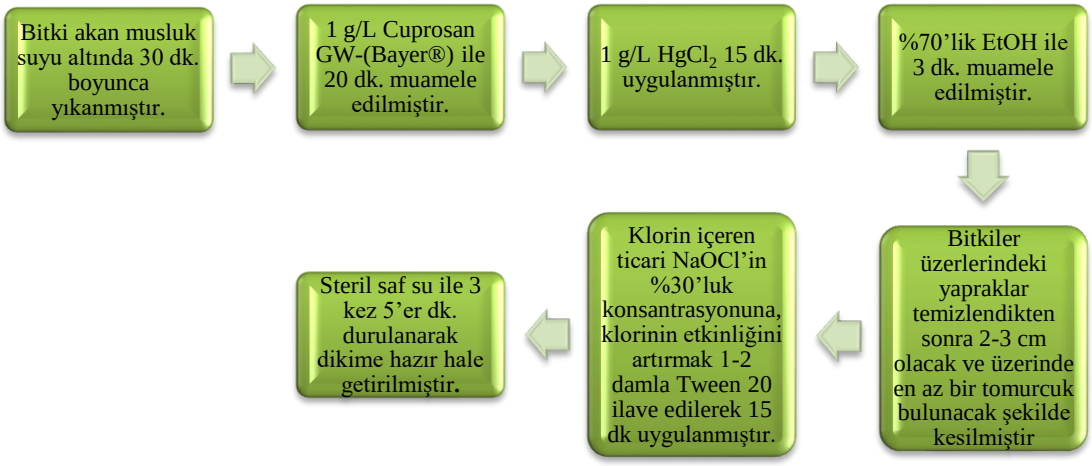
Şekil 3.2 *G. germanicopolitana* bitkisinin habitatı

3.2 Araziden Toplanan Bitkilerin Sterilizasyonu

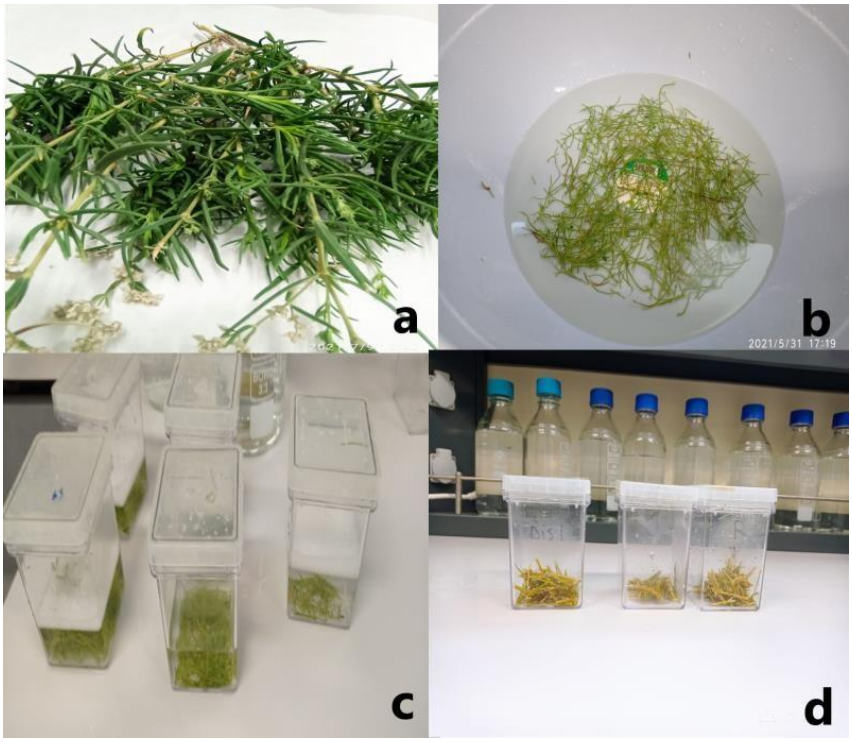
Araziden toplanılan *G. germanicopolitana* bitki materyalleri canlılıklarını kaybetmemeleri için buz kalıplarının olduğu sandıklara yerleştirerek hızlı bir şekilde laboratuvar ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.3) (Şekil 3.4). Laboratuvar ortamına aktarılan bitki materyalleri ilk önce çeşme suyu ile ön yıkama işlemine tabi tutulup kurutma kağıtları üzerinde kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5a). Kurutma işleminden sonra denemde kullanılacak bitki materyalleri yapraklarından arındırılmış sürgünler kesilerek, apikal meristemler, dokular ve boğum aralarına ayırarak yüzeysel sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Yüzeysel sterilizasyon protokolünde eksplantlar %70'lik alkol içerisinde 3 dk bekletildikten sonra 2 kez 5'er dk steril saf su ile durulama işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 3.5b). Yüzeysel sterilizasyon işleminde sonra, söz konusu eksplantlar; içerisine 3-4 damla tween 20 ve %15 aktif klorin (Cl_2) eklenmiş %20'lik ticari sodyum hipoklorit (NaClO) solüsyonu ile 10 dk süre ile muamele edilmiştir (Şekil 3.5c). Etkinliği arttırılmış sodyum hipokloriti belirlenen süre sonrasında dokulardan uzaklaştırma için aseptik koşullarda steril saf su her uygulama 5'er dakika olmak üzere 3 kez durulama işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5d) (Kapdan and Sezgin 2021).



Şekil 3.3 *G. germanicopolitana* HUB.-MOR.'un çiçeklerinin görünümü



Şekil 3.4 *G. germanicopolitana'*da sterilizasyon aşamaları



Şekil 3.5 G. *germanicopolitana*'da sterilizasyon için eksplantların hazırlanması **a)** Araziden getirilen bitkinin sürgünlerine ayrılması **b)** Sürgünlerin yıkanması **c)** Yapraklarından arındırılmış sürgünler **d)** Dikim için hazırlanmış eksplantlar

3.3 Besin ortamlarının hazırlanması

İn vitro çoğaltmada temel besin ortamlarından MS (Murashige and Skoog 1962) ve NN (Nitsch and Nitsch 1969) kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Her 2 temel besin ortamının katılaştırılmasında 2,1g/L oranında gelrite ve karbon kaynağı olarak 30 g/L sakkaroz kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH'sı 5,7'ye ayarlandıktan sonra kültür aşamasında kontaminasyonları önlemek amacıyla PPM (Plant Preservative Mixture-Duchefa)® 1 mL/L olarak eklenmiştir. Tüm bu işlemlerden sonra söz konusu temel besin ortamlarına bitki büyüme düzenleyicilerinden sitokinin kaynağı olarak 6-benzylaminopurin (BAP) ve Kinetin (KIN) (0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L)in yanı sıra oksin kaynağı olarak da Indol-3-bütirik asit (IBA) ve α-naftalen asetik asit (NAA) (0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L)'ten oluşan toplam 36 farklı kombinasyonda hazırlanan büyümeyi düzenleyici madde (Çizelge 3.2) eklenerek ortamlar sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Besin ortamlarının sterilizasyonu 121°C, 1,2 atm basınç altında 20 dakika süre ile kontrollü

otoklavda gerçekleştirilmiştir. Sterilize edilen besin ortamlar direkt laminar hava akışlı kabin içerisine alınmış, katılaşmasına izin vermeden hemen steril De Wit® tüplere (130x10 mm) 12'şer mL olarak dağıtılmıştır. Her kombinasyon 10'ar tekerrür olacak şekilde hazırlanmıştır. İki temel besin ortamı için toplam 720 tane De Wit® tüp (Duchefa) hazırlanarak deneme deseni oluşturulmuştur.

Temel besin ortamları

a) Murashige ve Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962)
b) Nitsch & Nitsch (NN) (Nitsch and Nitsch 1969)

Büyümeyi düzenleyici maddeler ve kombinasyonları

a) 6-benzilaminopurin (BAP)-(0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L)
b) Kinetin (KIN)-(0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L)
c) Indol-3-bütirik asit (IBA)-(0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L)
d) α-naftalenasetik asit (NAA)-(0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L)

Çizelge 3.1 Murashige ve Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962) ve Nitsch & Nitsch (Nitsch and Nitsch 1969) temel besin ortamlarının içeriği

Makro Elementler	**MS (mg/L)**	**NN (mg/L)**
Amonyum nitrat (NH_4NO_3)	1650	720
Potasyum nitrat (KNO_3)	1900	950
Kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$)	440	220
Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$)	370	185
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	170	68
Mikro Elementler		
Potasyum iyodür (KI)	0,83	-
Borik asit (H_3BO_3)	6,2	10
Mangan sülfat monohidrat ($MnSO_4.4H_2O$)	22,3	25
Çinko sülfat heptahidrat ($ZnSO_4.7H_2O$)	8,6	10
Sodyum molibdat dihidrat ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0,25	0,25
Bakır sülfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$)	0,025	0,025
Kobalt klorür heksahidrat ($CoC_{l2}.\ 6H_2O$)	0,025	-
DEMİR		
Sodyum-demir EDTA ($C_{10}H_{12}N_2FeNa$)	37,3	37,3
Demir sülfat heptahidrat ($FeSO_4\ 7\ H_2O$)	27,8	27,8
Vitaminler ve diğerleri		
Myo-Inositol ($C_6H_{12}O_6$)	100	100
Glisin ($C_2H_5NO_2$)	2	2
Thiamine klorid hidroklorid ($C_{12}H_8C_{l2}N_4OsxH_2O$)	0,1	0,5
Pridoksol hidroklorid ($C_8H_{12}ClNO_3$)	0,5	0,5
Nikotinik asit ($C_6H_5NO_2$)	0,5	5
Biotin	-	0,05
Folik asit	-	0,5

Çizelge 3.2 Bitki büyüme düzenleyici madde (BDM) kombinasyonları uygulama tablosu

1	BAP (0 mg/L) + NAA (0 mg/L)	**19**	KIN (0 mg/L) + NAA (0 mg/L)
2	BAP (0 mg/L) + NAA(0,25 mg/L)	**20**	KIN (0 mg/L) + NAA (0,25 mg/L)
3	BAP (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L)	**21**	KIN (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L)
4	BAP (0 mg/L) + IBA (0 mg/L)	**22**	KIN (0 mg/L) + IBA (0 mg/L)
5	BAP (0 mg/L) + IBA (0,25 mg/L)	**23**	KIN (0 mg/L) + IBA (0,25 mg/L)
6	BAP (0 mg/L) + IBA (0,5 mg/L)	**24**	KIN (0 mg/L) + IBA (0,5 mg/L)
7	BAP (0,5 mg/L) + NAA (0 mg/L)	**25**	KIN (0,5 mg/L) + NAA (0 mg/L)
8	BAP (0,5 mg/L) + NAA (0,25 mg/L)	**26**	KIN (0,5 mg/L) + NAA (0,25 mg/L)
9	BAP (0,5 mg/L) + NAA (0,5 mg/L)	**27**	KIN (0,5 mg/L) + NAA (0,5 mg/L)
10	BAP (0,5 mg/L) + IBA (0 mg/L)	**28**	KIN (0,5 mg/L) + IBA (0 mg/L)
11	BAP (0,5 mg/L) + IBA (0,25 mg/L)	**29**	KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,25 mg/L)
12	BAP (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L)	**30**	KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L)
13	BAP (1 mg/L) + NAA (0 mg/L)	**31**	KIN (1 mg/L) + NAA (0 mg/L)
14	BAP (1 mg/L) + NAA (0,25 mg/L)	**32**	KIN (1 mg/L) + NAA (0,25 mg/L)
15	BAP (1 mg/L) + NAA (0,5 mg/L)	**33**	KIN (1 mg/L) + NAA (0,5 mg/L)
16	BAP (1 mg/L) + IBA (0 mg/L)	**34**	KIN (1 mg/L) + IBA (0 mg/L)
17	BAP (1 mg/L) + IBA (0,25 mg/L)	**35**	KIN (1 mg/L) + IBA (0,25 mg/L)
18	BAP (1 mg/L) + IBA (0,5 mg/L)	**36**	KIN (1 mg/L) + IBA (0,5 mg/L)

3.4 Eksplantların Dikimi ve Inkübe Edilmesi

G. germanicopolitana bitkisinin boğum ve sürgün uçlarının sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra steril magenta kaplarında saklanmıştır. Aseptik koşullarda, eksplantların üzerinde bulunan apikal nodlarını besin ortamının içerisine yerleşmesine dikkat ederek dikey pozisyonda tüplere dikilmiştir. Kontaminasyon olasılığını engellemek ve azaltmak adına, her bir De Wit tüpe sadece bir eksplant dikilmiştir. Bitki rejenerasyonunu sağlamak için, optimal yaşam parametrelerinin ayarlandığı iklim odasında inkübe edilmiştir. Tüm kültürler 25±2 ºC sıcaklık, 16 saat aydınlık (35 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) ve 8 saat karanlık koşullarda kültüre alınmıştır (Şekil 3.6).

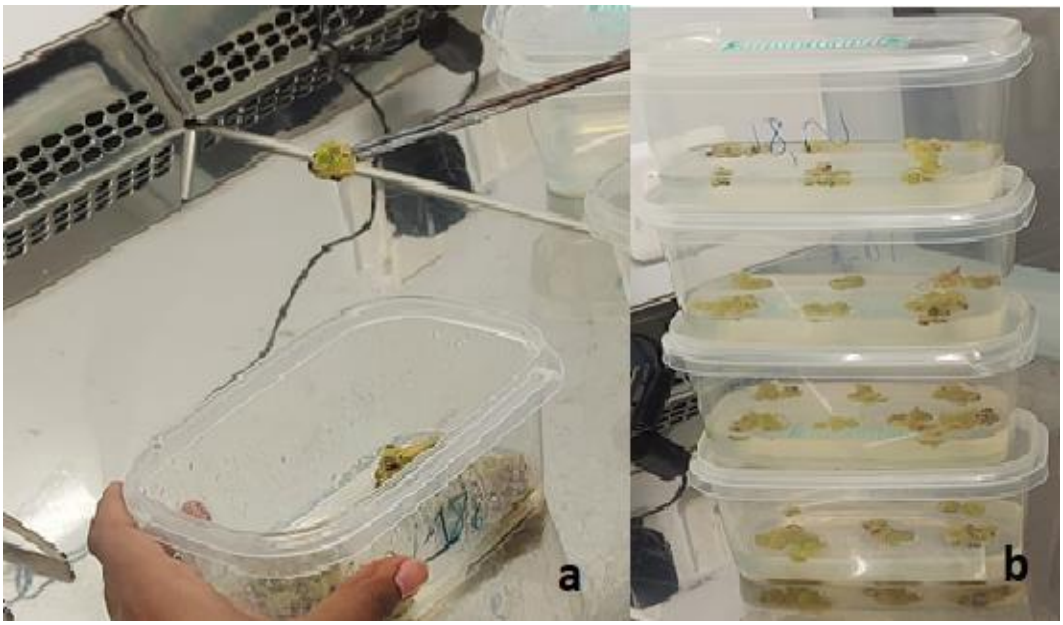


Şekil 3.6 Besin ortamlarının tüplere 10 mL olarak dağıtılmasının ve dikim yapılmış eksplantların görünümü

3.5 Alt Kültür

Dikimleri gerçekleştirilen *G.germanicopolitana* eksplantları, iklim odasında inkübe edilmiş ve gelişimleri günlük kontrol edilmiştir. Optimal gelişme şartları ayarlandıktan sonra eksplantlar 4 hafta ara ile 2 kez De Wit tüplerine ve 3 kez daha ECO_2BOX/Green Filter®(Duchefa) 125x65x80 mm kaplarına alt kültüre alınmıştır (Şekil 3.7a). Alt kültür,

besin ortamlarının tazeliğini sürdürmek ve bitkinin gelişimin devam ettirilebilmesi için yapılmıştır (Şekil 3.7b). Alt kültür çalışmalarında, başlangıç aşamasında kullanılan aynı temel besin ortamları, BDM kombinasyonları bitkinin gelişimine devam etmesi bakımından kullanılmıştır. Sürgün ve kok gelişimini gösteren eksplantların kök uzunluğu, kök sayısı, sürgün uzunluğu ve sürgün sayılarının ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 3.7 Kallusları alt kültürü **a)** ECO2BOX/Green Filter®(Duchefa) kaplarına dikimi
b) Alt Kültüre alinmis eksplantlar

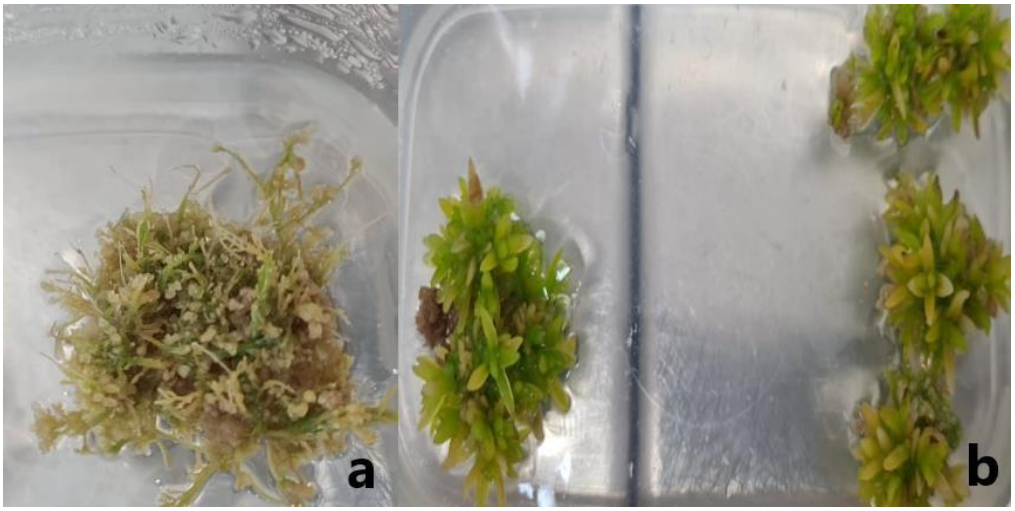
3.6 İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada, sonuçlardan elde edilen verilerin ortalaması varyans analizi yöntemi (ANOVA) ile SPSS Paket Programı ile F-testine göre kontrol edilmiştir ($P < 0,05$, 0,01, 0,001). Ortaya çıkan önemli farklılıklar Game-Howell Nonparametric Post-Hoc çoklu karşılaştırma testi ile %5 hata sınırı esasına göre yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 *G. germanicopolitana*'nın Rejenerasyonu

Bu çalışmada, biyoteknolojinin önemli yöntemlerinden biri olan doku kültürü ile *G. germanicopolitana* 'nın *in vitro* çoğaltımı ve bitkiye dönüşümü hedeflenmiştir. Bitkinin sürgün ucu ve boğum araları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Direkt organogenesis aracılıyla bitki rejenerasyonu *G. germanicopolitana*'da sağlanamamıştır. Ancak indirekt organogenesis yöntemi ile elde edilen kalluslardan yeniden bitki rejenerasyonu hedeflenmiştir. *G. germanicopolitana* bitkisinin Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği kırmızı liste kategorisine göre kritik yok olma tehlikesi (CR) altındaki bitkiler listesinde yer alması sebebiyle araziden sınırlı miktarda alınabilmiştir. Embriyo kültürü yapılmadan doğrudan *in vitro* çoğaltım aşamasına geçilmiş olması ve bitkinin rejenerasyon kabiliyetindeki sıkıntılar ile birleşince tam anlamıyla bir bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. Ancak, çalışmada kullanılan bitki BDM'lerinin konsantrasyon, kombinasyon ve türlerinin kallus oluşumu üzerinde pozitif etkilerinin de oldukça fazla olduğu gözlemlenmiştir. Eksplantlardan meydana gelen kallusların organ oluşturma potansiyellerine dayanarak organogenik olan ve rejenerasyon yeteneğine sahip olmayan bol miktarda kallus elde edilmiştir. Indirekt organogenesis yöntemi ile elde edilen kalluslardan, sürgün ve kök oluşumu hedeflenmiştir (Şekil 4.1). Çalışmamızda kullanılan sterilizasyon protokolü oldukça etkili olmuş ve enfeksiyon görülme oranı oldukça düşük olmuştur.



Şekil 4.1 Sürgün ve kök oluşumu **a)** BAP (1 mg/L) + IBA (0,5 mg/L kombinasyonunda kök oluşumu **b)** KIN (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) kombinasyonunda sürgün oluşumu

4.2 Organogenik Olan Kallus Oluşumu

Çalışmada elde edilen kallus oluşumunun verileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. MS ve NN temel besin ortamları, farklı BDM kombinasyonları arasında kalluslardan sürgün ve/veya kök oluşumu bakımından meydana gelen farklılıkların izlenmesi amaçlanmıştır. Kök oluşumunda elde edilen verilerin azlığı nedeniyle istatistiksel değerlendirmeleri yapılamamıştır. Ancak, sürgün oluşum miktarı daha yüksek olduğu için, eksplantların sürgün oluşturma durumlarına göre temel besin ortamı ve BDM kombinasyonları arasındaki farklılıklarının istatistiksel önemi araştırılmıştır. Bu amaçla, bağımsız değişkenler (BDM kombinasyonu ve temel besin ortamı) ANOVA testiyle değerlendirilmiştir. "BDM kombinasyonu" bağımsız değişkeni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,01$). Diğer bağımsız değişken olan "temel besin ortamı" ise tek başına istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel farklılığına dayanarak, 36 farklı BDM kombinasyonun sürgün oluşturma üzerinde farklı etkilere sahip oldukları izlenmiştir. İstatistiksel farklılığının anlamını belirtmek amacıyla ikili karşılaştırma ortaya konulmuştur (Çizelge 4.1- 4.3). Bu amaçla, BDM kombinasyonlarının ortalama sürgün oluşturma oranı bakımından birbirleri arasında istatistiksel farklılığın olup olmadığı araştırılmıştır.

Çizelge 4.1 BDM kombinasyonları arasındaki (1-36/1-12) ikili karşılaştırmaları

BDM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	–	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–
2	–	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–
3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	–	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–
8	–	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–
9	0,009	0,009	–	0,009	–	–	0,009	0,009	–	0,009	0,009	0,009
10	–	–	–	–	–	–		0,009		–	–	–
11	–	–	–	–	–	–		0,009	–	–	–	–
12	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–	–
13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–	–
15	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
16	–	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–
17	–	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–
18	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
19	–	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–
20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
21	0,003	0,003	–	–	–	–	0,003	0,003	–	0,003	0,003	0,003
22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
23	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24	0,003	0,003	–	–	–	–	0,003	0,003	–	0,003	0,003	0,003
25	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
26	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
27	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
28	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
29	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
30	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
31	–	–	–	–	–	–	–	–	0,034	–	–	–
32	–	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–
33	–	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–
34	–	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–
35	–	–	–	–	–	–	–	–	0,009	–	–	–
36	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

- Istatistiksel farklılığı olmadığını göstermektedir

Çizelge 4.2 BDM kombinasyonları arasındaki (1-36/13-24) ikili karşılaştırmaları

BDM	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
2	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
8	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
9	–	0,009	–	0,009	0,009	–	0,009	–	–	–	–	–
10	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003	–
11	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003	–
12	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003	–
13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	0,003	–
15	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
16	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
17	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
18	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
19	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
21	–	0,003	–	0,003	0,003	–	0,003	–	–	–	–	–
22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
23	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24	–	–	–	–	0,003	–	0,003	–	–	–	–	–
25	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
26	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
27	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
28	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
29	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
30	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
31	–	–	–	–	–	–	–	–	0,010	–	–	0,010
32	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
33	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
34	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	0,003
35	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003	–	–	
36	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,003

- Istatistiksel farklılığı olmadığını göstermektedir

Çizelge 4.3 BDM kombinasyonları arasındaki (1-36/25-36) ikili karşılaştırmaları

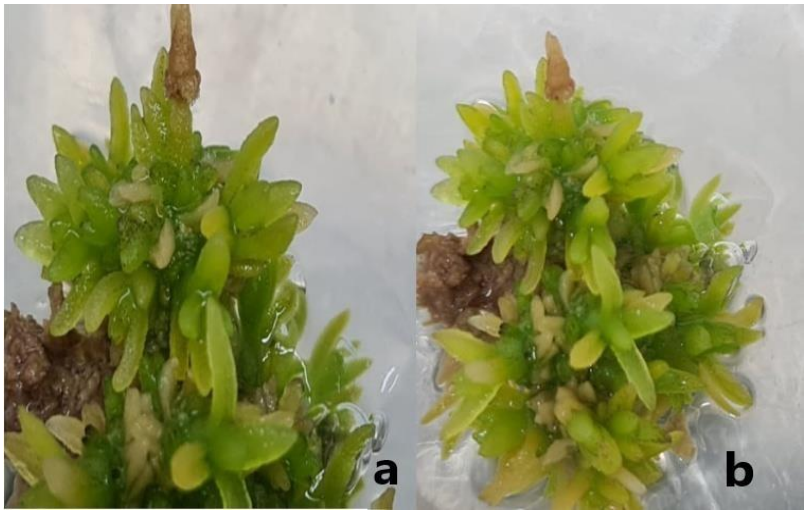
BDM	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	–	–	–	0,009	0,009	–	0,034	0,009	0,009	0,009	–	0,009
10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
15	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
16	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
19	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
21	–	–	–	0,003	0,003	–	0,01	0,003	0,003	0,003	–	0,003
22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
23	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24	–	–	–	0,003	0,003	–	0,01	0,003	0,003	0,003	–	0,003
25	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
26	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
27	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
28	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
29	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
30	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
31	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
32	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
33	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
34	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
35	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
36	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

- Istatistiksel farklılığı olmadığını göstermektedir

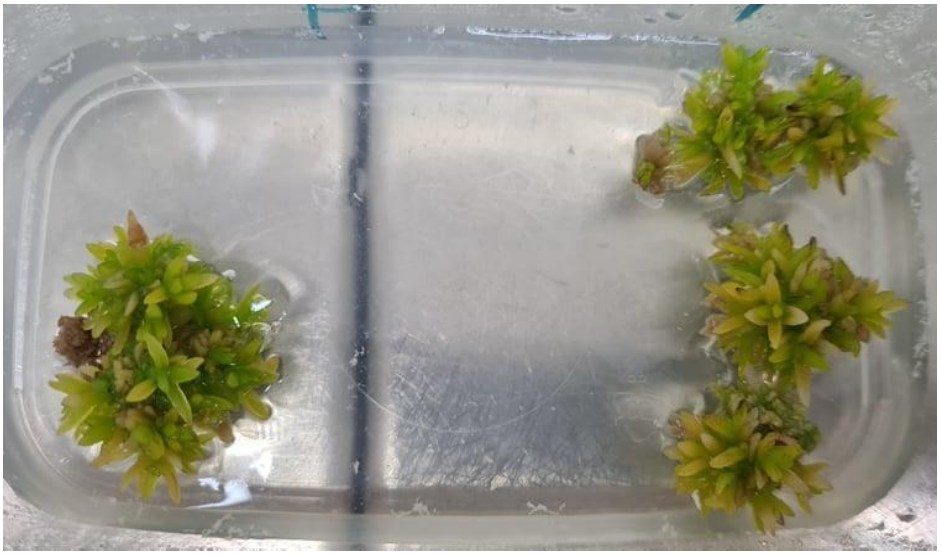
G.germanicopolitana bitkisinde *in vitro* çoğaltımında sürgün oluşumu NN temel besin ortamında MS ortamına göre daha iyi bir gelişim göstermiştir. Besin ortamının yanı sıra BDM'lerinin de sürgün gelişim üzerine oldukça etkili oldukları istatistiksel olarak ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.4). Elde edilen en yüksek sürgün sayısı bakımından, 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA (35 adet), 0,5 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA (40 adet) ve 0 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA (50 adet) BDM kombinasyonlarını içeren NN temel besin ortamında bulunmuştur (Şekil 4.2). Sürgün oluşumu 0 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA, 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA ilave edildiği MS ortamında da gerçekleşmiştir. Buradaki sürgünlerin boyutları 0,1 cm ile 2 cm arasındaki boyutlarda değişmektedir (Şekil 4.3). En düşük sürgün sayısı 0 mg/L KIN + 0,25 mg/L NAA (20 adet) ve 0 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA (10 adet), BDM kombinasyonlarını içeren NN besin ortamından ve 1 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA, 0,5 mg/L KIN + 0 mg/L IBA kombinasyonlarını içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Bu calışmada gelişen sürgünlerin boyutları 0,1 cm ile 0,5 cm arasındaki boyutlarda değişmektedir.

Çizelge 4.4 Organik kallustan sürgün oluşumu bakımından temel besin ortamları ile bazı BDM kombinasyonları arasındaki interaksiyon

BDM	NN		MS	
	Ortalama/ Standart Hata	**Örneklem sayısı**	**Ortalama/ Standart Hata**	**Örneklem sayısı**
BAP 0,5 mg/L + IBA 0 mg/L	0,60±0,5	10	0	10
BAP 0,5 mg/L + IBA 0,5 mg/L	0	10	0,30±0,4	10
BAP 1 mg/L + IBA 0,5 mg/L	0	10	0,50±0,5	10
BAP 0 mg/L + NAA 0,5 mg/L	0,60±0,5	10	0,10±0,3	10
BAP 0,5 mg/L +NAA 0,25 mg/L	0,40±0,5	10	0	10
BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L	0,60±0,5	10	0	10
BAP 1 mg/L + NAA 0,5 mg/L	1,0	10	0,20±0,4	10
KIN 0 mg/L + IBA 0,5 mg/L	0,10±0,3	10	0,20±0,4	10
KIN 0,5 mg/L + IBA 0 mg/L	0	10	0,10±0,3	10
KIN 1 mg/L + IBA 0,25 mg/L	0	10	0,30±0,4	10
KIN 0 mg/L + NAA 0,25 mg/L	0,20±0,4	10	0,20±0,4	10
KIN 0 mg/L + NAA 0,5 mg/L	0,80±0,4	10	0,50±0,5	10
KIN 0,5 mg/L + NAA 0 mg/L	0	10	0,30±0,4	10
KIN 0,5 mg/L + NAA 0,25 mg/L	0,50±0,5	10	0,30±0,4	10
KIN 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L	1,0	10	0,30±0,4	10
KIN 1 mg/L + NAA 0 mg/L	0,60±0,5	10	0	10
KIN 1 mg/L + NAA 0,25 mg/L	0,40±0,5	10	0	10
KIN 1 mg/L + NAA 0,5 mg/L	0,40±0,5	10	0,10±0,3	10



Şekil 4.2 NN besin ortamında en yüksek sürgün sayısı **a)** KIN (0,5 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) kombinasyonunda sürgün oluşumu **b)** BAP (1 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) kombinasyonunda sürgün oluşumu



Şekil 4.3 MS temel besin ortamı KIN (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) kombinasyonunda sürgün oluşumu

Kalluslardan gelişen köklerde sürgün oluşumu meydana gelmemiştir. Kalluslar hem oksin hem de sitokinin grubu BDM içeren ortamlarda bulunmasına rağmen tam anlamıyla bitkiye döşüm sağlanamamıştır. Ancak farklı uzunluklara sahip olan kökler ortaya çıkmıştır. Köklerin uzunluğu 0,5 cm ile 8 cm arasındaki boyutlarda değişmektedir. Kök oluşumu MS ortamında elde edilmiştir (Şekil 4.4). En yüksek kök oluşum oranı MS besin ortamında bulunmuş ve en iyi sonucu veren kombinasyon 0

mg/L KIN + 0.5 mg/L IBA,1 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA içeren kombinasyonları olduğu görülmüştür (Şekil 4.5).



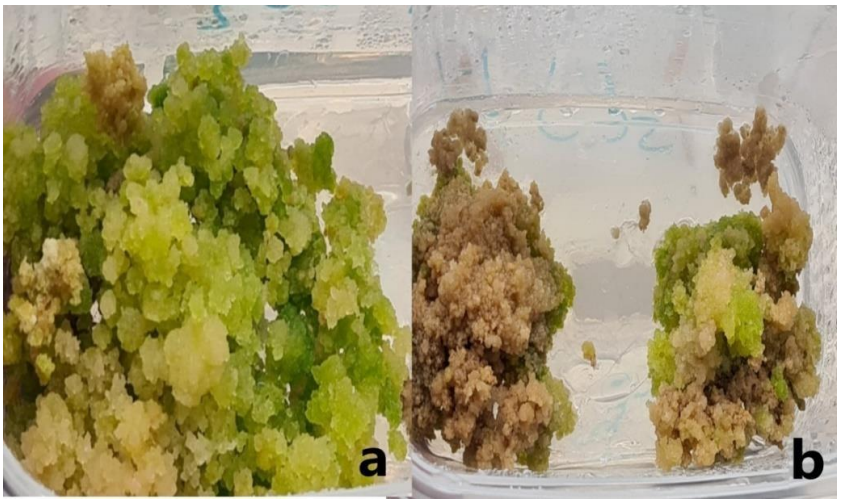
Şekil 4.4 MS besin ortamı KIN (0 mg/L) + IBA(0,5 mg/L) kombinasyonunda kök oluşumu



Şekil 4.5 MS besin ortamı BAP (1 mg/L)+IBA (0,25 mg/L) kombinasyonunda kök oluşumu

4.3 Organogenik Olmayan Kallus Oluşumu

MS ve NN besin ortamında kültüre alınan eksplantların çoğunda basit kallus ya da kök oluşumunu sağlanmıştır. Kalluslardan organogenesis hedeflenirken NN besin ortamındaki kullanılan başlangıç BDM kombinasyonları ilave edilmiştir. Organ oluşturma kabiliyetleri olmayan kalluslar çoğalmaya devam etmiştir. Bu aşamada herhangi bir organogenik oluşum elde edilememiştir. En bol miktarda kallus gelişimi, 0 mg/L BAP + 0,25 mg/L NAA, 0,5 mg/L KIN+ 0,5 mg/L IBA kombinasyonlardan elde edilmiştir (Şekil 4.6). En düşük kallus miktarı ise 0,5 mg/L KIN + 0,25 mg/L IBA kombinasyonunda gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.6 a) KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) kombinasyonunda kallus oluşumu **b)** BAP (0 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) kombinasyonunda kallus oluşumu



Şekil 4.7 KIN (0,5 mg/L) +IBA (0,25 mg/L) kombinasyonunda kallus oluşumu

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, lokal endemik, ve tehlike altındaki bitkiler kategorisinde yer alan *Gypsophilia germanicopolitana* bitkisinin, sürgün ucu ve nodları eksplant kaynağı olarak kullanılarak farklı dozlarda kombinasyonları ayarlanmış bitki büyüme düzenleyiciler ve farklı temel besin ortamlarında *in vitro* şartlarda kültüre alınarak çoğaltımı hedeflenmiştir. Bu çalışmanın amacı, seçilen endemik bitkinin optimum çoğaltım ve rejenerasyon protokolünün oluşturulmasıdır.

Caryophyllaceae familyasının bitkilerinin *in vitro* mikroçoğaltımı amacıyla sürgün ucu ve nodları eksplant kaynağı olarak birçok çalışmada da başarıyla kullanılmıştır (Ahroni *et al.* 1997, Miranda *et al.* 1999, Morariu *et al.* 2008, Çördük and Akı 2010, Wei *et al.* 2010, Aslam *et al.* 2012, Kiani *et al.* 2012, Toaima *et al.* 2013, Tejavathi and Indira 2013, Thiem *et al.* 2013, Shaulo *et al.* 2014, Teteryuk *et al.* 2020)

Çankırı ilinin jipsli tepeleri üzerinde yayılış gösteren *G. germanicopolitana* 2021 yılın Mayıs ayının son haftasında arazide mevcut olup Haziran ayının ikinci haftasından itibaren ise tam çiçekli ve meyveli halinde bulunmuştur. Bir bitkinin fizyolojik ve morfolojik açıdan en olgun hali tam çiçekli olduğu zamandır (Kocaçalışkan 2008). Araziden alınarak doğrudan laboratuvar şartlarına getirilen bitki için *in vitro* şartlarda dikime hazırlamak amacıyla uygulanan yüzeysel sterilizasyon protokolü etkili olmuş ve çalışma sırasında enfeksiyon oluşumuna çok nadir rastlanmıştır. Ancak bitkinin çok yavaş regenerasyon hızı sayesinde ilk kallus oluşumu ancak 2 ay sonra ortaya çıkmış ve indirekt regenerasyon yoluyla elde edilen sürgün ve kök gelişmelerinin 6 ay sonra gözlemlenebilmesine sebep olmuştur. Denemede bazı eksplantların enfeksiyona kapmamış olmasına rağmen herhangi bir yaşamsal belirti göstermediği durumlar da meydana gelmiştir. Sterilizasyonun ardından eksplantlar MS ve NN temel besin ortamlarına 36 farklı BDM kombinasyonu ile hazırlanmış ortamlara dikilmişlerdir. Denemelerde tüm kombinasyonlar 10'ar tekerrür olarak hazırlanmıştır. Denemelerde elde edilen sonuçların farklılıkları izlenmiştir. Laboratuvar şartlarına getirilen ve *in vitro* mikçoğaltım amacıyla hazırlanan eksplantlarda olası enfeksiyonu engellemek adına

gerçekleştirilen etkin ve kuvvetli yüzey sterilizasyonu beraberinde bitkilerin rejenerasyon kabiliyetinde azalmaya sebep olmuştur.

Çalışmada *G. germanicopolitana* bitkisinin sürgün ucu ve boğum arası eksplantlarından doğrudan bitki rejenerasyonu hedefi tam anlamıyla sağlanamamıştır. Ancak elde edilen kalluslardan yeniden indirekt organogenesis yöntemi ile bitki rejenerasyonu hedeflenmiştir. *G. germanicopolitana* bitkisinin Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği (IUCN) kırmızı liste kategorisine göre kritik yok olma tehlikesi altındaki bitkiler listesinde yer alması (Ekim vd. 2000) sebebiyle araziden sınırlı miktarda alınabilmesi ve buna istinaden doğrudan *in vitro* çoğaltım aşamasına geçilmiş olması, bitkinin rejenerasyon kabiliyetindeki sıkıntılar ile rejenerasyon başarılamamıştır. Ancak, çalışmada kullanılan BDM'lerinin konsantrasyon, kombinasyon ve türlerinin kallus oluşumu üzerinde pozitif etkilerinin oldukça fazla olduğu gözlemlenmiştir.

*G.germanicopolitana'*da NN besin ortamının sürgün gelişimi MS besin ortamına göre daha iyi sonuçlar verirken MS besin ortamı da kallus gelişimi ve kök oluşumunu sağlamıştır. Her iki besin ortamlarında da aynı BDM kombinasyonları kullanılmış fakat farklı gelişim sonuçları elde edilmiştir.

G.germanicopolitana 'nın *in vitro* çoğaltımından elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Temel besin ortamları ve BDM kombinasyonlarının oluşturdukların gelişim etkilerinin arasındaki farklar istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve ortalamalar arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur. BDM kombinasyonlarının arasında çoklu karşılaştırmalar yapmak için Games-Howell testi kullanılmıştır. "BDM kombinasyonu" bağımsız değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,01$). Sürgün oluşturma üzerinde 36 farklı BDM kombinasyonun farklı etkilere sahip oldukları ortaya çıkmıştır. İstatistiksel olarak farklılığının anlamını belirtmek amacıyla ikili karşılaştırma ortaya konulmuştur (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3). Bu amaçla, BDM kombinasyonlarının ortalama sürgün oluşturma oranı bakımından birbirleri arasında istatistiksel farklılığın olup olmadığı araştırılmıştır.

Organogenik olan kalluslardan elde edilen en yüksek sürgün sayısı, sırasıyla 35, 40 ve 50 adet ile 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA, 0,5 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA ve 0 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA kombinasyonunun ilave edildiği NN temel besin ortamında bulunmuştur (Şekil 4.2). Sürgün oluşumu 0 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA, 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA ilave edildiği MS ortamında da bulunmuştur. Sürgünlerin boyutları 0,1 cm ile 2 cm arasındaki boyutlarda değişmektedir (Şekil 4.3). En düşük sürgün sayısı 20 ve 10 adet ile 0 mg/L KIN + 0,25 mg/L NAA, 0 mg/L KIN + 0,5 mg/L, kombinasyonlarını içeren NN besin ortamından ve 1 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA, 0,5 mg/L KIN + 0 mg/L IBA kombinasyonlarını içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Sürgünlerin boyutları 0,1 cm ile 0,5 cm arasında değişmektedir. En yüksek kök sayısı MS besin ortamında bulunmuş ve en iyi sonucu veren kombinasyon 0 mg/L KIN+ 0,5 mg/L IBA, 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA içeren kombinasyonu olduğu fark edilmiştir. (Şekil 4.6). Köklerin uzunluğu 0,5 cm ile 8 cm arasındaki boyutlarda değişmektedir. Organogenik olmayan en bol miktarda kallus gelişimi ise 0 mg/L KIN+ 0,25 mg/L NAA, 0,5 mg/L KIN+ 0,5 mg/L IBA kombinasyonlarda elde edilmiştir (Şekil 4.3). En düşük kallus miktarı ise 0,5 mg/L KIN + 0,25 mg/L IBA kombinasyonda gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sürgün sayısından farklı olarak, Aslam vd. (2012), *G. paniculata*'nın apikal meristemlerinden yüksek sürgün oluşumu ve maksimum sürgün uzunluğu 1 mg/L BAP ilave edilmiş MS ortamda elde edilmiştir. Kök gelişimi için en iyi ortam, %85 oranıyla 0,5 mg/L NAA içeren MS ortamında gözlemlenmiştir. Toaima vd. (2013) ise, *Gypsophila perfecta*, *Gypsophila paniculata* L. bitkilerin mikroçoğaltımında farklı dozlarda olan BAP ve NAA BDM'lerini içeren MS besin ortamında sürgün uçları kültüre alınmıştır. En yüksek sürgün oluşumu, her biri 0,5 mg/L BAP ve NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Ahroni vd. (1997), *Gypsophila paniculata* L.'nin *in vitro* çoğaltımı için Arbel çeşidinin boğum araları kullanarak sürgün rejenerasyonu elde etmeye çalışmıştır. Sitokinin kaynağı olarak TDZ, BAP, KIN veya Zeatin ve oksin kaynağı NAA kullanılmıştır. TDZ BDM'i içeren MS besin ortamında kültüre alınan eksplantların %100'ü sürgün oluşumunu sağlamış, eksplant başına 19 adet sürgün gelişmiştir. Teteryuk vd. (2020), *Gypsophila uralensis* Less fidelerinden kallus elde etmek için doku kültürü yöntemi kullanmıştır. MS ve Woody

Plant Medium (WPM) besin ortamlarına 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L IAA BDM kombinasyonu ilave edilmiştir. Kallusların %90'nından indirekt sürgün regenerasyonu elde edilmiştir. Köklendirme aşaması için farklı IAA dozlarının ilave edildiği MS ortamı kullanılmıştır. Aslam vd. (2012)'de eksplant olarak *Gypsophila paniculata* L.'nın apikal meristemleri kullanılmıştır. Gelişen sürgünlerin köklendirme ortamı için farklı konsantrasyonlarda olan (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 & 0,5 mg/L) NAA dozları kullanılmıştır. Kök gelişimi %85 oranıyla 0,5 mg/L NAA içeren MS ortamında gözlemlenmiştir. Kaviani vd. (2012), bu çalışmada, *Matthiola incana*'nın bitkininden elde edilen tohumlarının sürgün uçları kullanılmıştır. Gelişen sürgünlerin en yüksek kök sayısı (1,85) ve kök en uzun kök (5,2 cm) 2 mg/L NAA içeren ortamda gözlemlenmiştir. Çalışmamızda ise en yüksek kök sayısı MS besin ortamında bulunmuş ve en iyi sonucu veren kombinasyon 0 mg/L KIN+ 0,5 mg/L IBA, 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA içeren kombinasyonu olduğu fark edilmiştir (Şekil 4.6). Köklerin uzunluğu 0,5 cm ile 8 cm arasındaki boyutlarda değişmektedir. Diğer çalışmalarda en iyi sürgün ve kök gelişimi MS temel besin ortamından elde edilirken bizim çalışmamızda ise en iyi sürgün oluşumu NN besin ortamında bulunmuş ve kök gelişimi de MS ortamından elde edildiği fark edilmiştir. Seçilen BDM kombinasyonların her bir besin ortamına ilave edildiğinde farklı etkilere sahip olduğu izlenmiştir.

Sonuç olarak TÜBİTAK tarafından hazırlanan Ulusal Bilim ve Teknoloji Politikaları 2003-2023 Strateji Belgesinde de (Anonim 2011), sürdürülebilir kalkınma hedefi doğrultusunda, "Gen kaynaklarının karakterizasyonu, muhafazası ve biyolojik çeşitliliğin korunmasına yönelik teknolojiler geliştirebilmek" hedefi belirtilmiştir. Bu çalışmada, tıbbi ve aromatik özelliklerinin yanı sıra IUCN tarafından "kritik yok olma tehlikesi (CR)" bitkiler listesinde bulunan ve lokal endemik olan *Gypsophila germanicopolitana* (Ekim vd. 2000). Bitkisinin *in vitro* çoğaltımı açısından ilk ve tektir. Başlangıç aşamasında kullanılan iki farklı besin ortamı, 36 farklı BDM kombinasyonu ve bir tür ana katılaştırıcının denenmesi açısından oldukça kapsamlı bir optimizasyon çalışmasıdır. Bu konu ileride çalışılacak olan *G. germanicopolitana* bitkisinde elde edilen sürgünlerin tıbbi ve kozmetik özelliklere bakmak için uygundur.

KAYNAKLAR

Ahroni, A., Zuker, A., Rozen, Y., Shejtman, H.,and Vainstein, A. 1997. An efficient method for adventitious shoot regeneration from stem-segment explants of gypsophila. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 49:101-106.

Anonim, 2011. Ulusal Gıda Ar-Ge ve Yenilik Stratejisi Ek-3. https://www.tubitak.gov.tr/sites/default/files/ek3_ulusal_gida_arge_yenilik_stratejisi.pdf. Erişim Tarihi: 05.10,2021.

Aslam F., Rashid S., Ilyas S., Naz S., and Ali A. 2012. *In vitro* propagation of Gypsophila paniculata L. through plant tissue culture techniques. Pakistan Journal of Science**.** 64: 6-10,

Ataşlar, E. 1999. Batı Anadolu Gypsophila L. Türleri üzerinde biyosistematik çalışmalar. Doktora tezi. Osmangazi Üniv. Fen Bilimleri, 128 sayfa, Eskişehir.

Avcı, M. 2005. Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye'nin Bitki Örtüsü, İstanbul Üniv. Edebiyat Fak. Coğrafya Bölümü, Coğrafya Dergisi, 13: 27-55.

Ayeh, K.O., Selliah, R. and. Hvoslef-Eide, A.K. 2009. Effect of media on some *in vitro* and ex-vitro parametersin micropropagation of Gypsophila paniculata L. Academic J. Plant Sci., 2: 260-266.

Babaoğlu, M., Gezgin, S., Topal, A., Sade, B., and Dural, H. 2004. Gypsophila sphaerocephala Fenzl ex Tchihat. a boron hyperaccumulator plant species that may phytoremediate soils with toxic B levels. Turkish Journal of Botany., 28: 273-278.

Çördük, N. and Akı, C., 2010, Direct shoot organogenesis of Digitalis trojana Ivan., an endemic medicinal herb of Turkey African Journal of Biotechnology., 9:1587-1591.

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., ve Adıgüzel, N. 2000, Tehlike altında bitkiler, In: Türkiye bitkileri kırmızı kitabı. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Yüzüncü Yıl Üniv, s 114-115, Ankara.

Fior, S., Casazza, G., Minuto, L. and Roccotiello, E. 2006. Seed morphology in Moehringia L. and ts taxonomic significance in comparative studies within the Caryophyllaceae. Plant Systematics and Evolution., 262: 189–208.

İnan, M. 2006. Çukurova Koşullarında Farklı kökenli çöven (Gypsophila sp.) türlerinde kök verimleri ve saponin içeriklerinin araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, 90 sayfa, Adana.

Kapdan, E. and Sezgin, M. 2021. *In vitro* propagation to conserve the local endemic and endangered medicinal plant Helianthemum germanicopolitanum Bornm. Brazilian Archives of Biology and Technology., 64:1-14.

Kiani, M., Zarghami, H., Memariani, F. and Tehranifar. A. 2012. *In vitro* propagation and conservation of Diaphanoptera khorasanica (Caryophyllaceae), a threatened endemic and potential ornamental species innortheast of Iran. Journal of Cell and Molecular Research., 4: 89-96.

Kocaoğlu, G. B. 2004. Saponinler ve biyolojik önemi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg., 1: 125-131.

Korkmaz, M. 2007. Türkiye'de yetişen tek yıllık Gypsophila L. (Caryophyllaceae) taksonları üzerinde biyosistematik çalışmalar. Doktora Tezi , S. Demirel Üniv,248 sayfa, Isparta.

Korkmaz, M. ve Özçelik, H. 2011. Türkiye Gypsophila L. (caryophyllaceae) taksonlarının ekolojik özelliklerine katkilar. Biological Diversity and Conservation,, 15: 148-160,

Korkmaz, M. 2012. Türkiye'nin bazı Gypsophila L. (Caryophyllaceae) taksonlarının habitat özellikleri. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi., 5: 111-125.

Miranda, J., Konschuh, M., Yeung, C., and Chinnappa, C. 1999. *In vitro* plantlet regeneration from hypocotyl explants of Stellaria longipes (Caryophyllaceae). Canadian Journal of Botany., 77: 318-322.

Morariu, A., Chelariu, E., and Căuleţ R. 2008. *In vitro* micropropagation of gypsophila muralis from cotyledon explants. University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi:269-274.

Özçelik, H., ve Özgökçe, F. 1999. Gypsophila bitlisensis Bark. ve Gypsophila elegans Bieb. üzerinde morfolojik, taksonomik ve ekolojik araştırmalar. First International Symposium on Protection of Natural Environment and Ehrami Karaçam :295-313.

Özçelik, H., ve Yıldırım, B. 2011. Türkiye çövenlerinin (Gypsophila L. ve Ankyropetalum Fenzl spp.) ekonomik önemi, kullanım olanakları ve korunması üzerine düşünceler, SDÜ Orman Fakültesi Dergisi., 12: 57-61.

Shaulo, D.N, Erst, A.A. and Erst, A.S. 2014. *In vitro* Propagation of Dianthus mainensis, an endemic plant from the West Sayan (North Asia). Taiwania., 59: 106–110,

Tejavathi, D.H. and Indira, M.N. 2013. Regeneratıon of shoots from leaf callus cultures of drymarıa cordata (L) wılld ex roem and schult indian. Journal Of Fundamental And Applied Life Sciences., 3:111-115.

Teteryuk, L.V. and Mikhovich Zh. E. 2020, *In vitro* culture of the Ural endemic Gypsophila uralensis Less.(Caryophyllaceae)Turczaninowia.,23: 29–35.

Thiem, B., Maliñski, M. and Tomczyk, M. 2013. *In vitro* propagation of Lychnis flos-cuculi L., a plant with potential medicinal value. National Conference "*In Vitro* Cultures In Plant Physiology"., 55: 66.

Toaima, N., Bosila, H., and Abd El-Fattah El-Ateeq, A. 2013. *In vitro* growth regulators, gelling agents and sucrose levels affect micropropagation of Gypsophila paniculata L.Middle East Journal of Agriculture Research., 5: 313-323.

Yıldız, K. 2012. Silene L. In: Guner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. & Babaç, M.T. (Eds.); Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). İstanbul Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, pp. 354–365, Istanbul.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Migane NIMAAN ABDILLAHI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2018-Halen
Lisans	Cibuti Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü	2014-2017

Akademik Aktiviteler

1. **Nimaan, M.** and Sezgin, M. 2020, "Phythotherapy", 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasian BioChe 2020). June 28-29 2020/Ankara.

2. **Nimaan, M.** 2021. "Pharmacological use of medicago sativa", SELJUK SUMMIT 4th International Applıed Scıences Congress. Agust 10 2021/ Izmir.

3. **Nimaan, M.** and Sezgin, M. 2021. "Vertical farming in Africa a solution for a sustainable agriculture", 4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences. November 25 2021/Ankara