ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ONOBRYCHIS GERMANICOPOLITANA HUB.-MOR. ET SIMON'UN *IN VITRO* ÇOĞALTIMI

Radia ABDOURAHMAN ABDILLAHI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Radia ABDOURAHMAN ABDILLAHI tarafından hazırlanan **"*Onobrychis germanicopolitana* HUB.-MOR. ET SIMON'un *In vitro* 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. Atilla ÇAKIR
Bahçe Anabilim Dalı
Bingöl Üniversitesi

Üye **:** Doç. Dr. Ömer Cem KARAKOÇ
Yapraklı MYO
Çankırı Karatekin 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 "***Onobrychis germanicopolitana* HUB.-MOR. ET SIMON'un *In vitro* 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).

Radia ABDOURAHMAN ABDILLAHI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ONOBRYCHIS GERMANICOPOLITANA HUB.-MOR. ET SIMON'UN
IN VITRO ÇOĞALTIMI

Radia ABDOURAHMAN ABDILLAHI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN

Bu çalışmada, Davis'in oluşturduğu Grid sistemine göre A4 karesi içinde bulunan Çankırı ili jipsli tepeleri üzerinde yayılış gösteren ve Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği kırmızı liste kategorisine göre yok olma tehlikesi altındaki bitkiler listesinde yer alan *Onobrychis germanicopolitana* HUB.-MOR. ET SIMON bitkisinin *in vitro* çoğaltımı amaçlanmıştır. Eksplant kaynağı olarak sürgün ucu ve boğum araları kullanılmıştır. *İn vitro* çoğaltım için **1)** Murashige ve Skoog (MS) **2)** Gamborg's B5 temel besin ortamlarına, 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 **3)** İndol-3-bütirik asit (IBA) (0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L) ve **4)** 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) (0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L) dozları 36 farklı bitki büyüme düzenleyici madde kombinasyonu halinde ilave edilmiştir. Besin ortamlarına karbon kaynağı olarak 30 g/L sakkaroz ve katılaştırıcı olarak gelrite (2,1 g/L) ilave edilmiştir. Çalışmada, başlangıç ya da ileri aşamalarda ortaya çıkan enfeksiyonların oluşumu nedeniyle iki kez tekrarlanmış ve bitkiye uygun sterilizasyon protokolü geliştirilmiştir. Sonuç olarak bitki rejenerasyonu sağlanamamış, ancak organogenik olmayan kallus elde edilmiştir. En iyi kallus gelişimi MS besin ortamına 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA, 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D bitki büyüme düzenleyici madde kombinasyonlarını ilave edilmiş ortamda sağlanmıştır. Bu endemik türe ait herhangi bir *in vitro* çoğaltım çalışmasının yapılmamış olması, ileride yapılacak çalışmalara temel oluşturması bakımından özgün değer taşımaktadır.

2022, 43 sayfa

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

ABSTRACT

Master of Science Thesis

IN VITRO PROPAGATION OF *ONOBRYCHIS GERMANICOPOLITANA* HUB.-MOR. ET SIMON

Radia ABDOURAHMAN ABDILLAHI

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

Advisor: Asst. Prof. Dr. Mehmet SEZGİN

In this study, *in vitro* propagation of *Onobrychis germanicopolitana* HUB.-MOR. ET SIMON was carried out, a species identified as an endangered plant according to the Red List of the International Union for Conservation of Nature. *O. germanicopolitana* is a local endemic plant that displays a natural growth on Çankırı gypsum hills located in the A4 square according to the Grid system created by Davis. Shoot tips and internodes were used as an explant source. For *in vitro* propagation purpose, to **1)** Murashige and Skoog (MS) and **2)** Gamborg's B5 basal media were added **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) as a source of cytokinin and, **3)** Indole-3-butyric acid (IBA) (0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L) and **4)** 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) (0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L) as well as an auxin source. A total of 36 different plant growth regulator combinations were obtained and added to the basal media. Gelrite gelling agent (2.1g/L) was added to the media and 30 g/L sucrose also as a source of carbon. Due to the manifestation of infections occurring in the initial or advanced stages of the study, the exeperiment was repeated twice and a more appropriate sterilization protocol for the plant was developed. Plant regeneration could not be achieved, and as a result, non-organogenic calli were obtained. The best callus formation belonged to MS medium containing 1 mg/L BAP + 0.25 mg/L IBA, 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/ L KIN + 0.5 mg/L 2,4-D plant growth regulator combinations. The fact that no *in vitro* propagation studies of this specific endemic species have been carried out has a unique value in terms of offering the groundwork for future studies.

2022, 43 pages

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

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışma konusunun seçiminden, çalışmanın sonlandırılmasına kadar her aşamada desteğini esirgemeden, bilgi ve tecrübesini her zaman bize aktaran Tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN'a sabrı, anlayışı ve rehberliği için teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteği gördüğüm Doktora öğrencisi Emine KAPDAN'a sevgi ve saygılarımı sunarım. Ayrıca beni her zaman destekleyen ve yanımda olan aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Radia ABDOURAHMAN 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 **7**
2.1 Fabaceae Familyasına Ait Bazı Bitkilerin *In vitro* Şartlarda Doku Kültürü ile Çoğaltımı **7**
2.2 *Onobrychis* sp.'nin Çoğaltımı ile İlgili Yapılan Çalışmalar **9**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **14**
3.1 Materyal **14**
3.2 Bitkilerin Sterilizasyon Aşamaları **15**
3.3 Besin Ortamların Hazırlanması **17**
3.4 Eksplantların Dikim Aşaması **20**
3.5 Eksplantların Inkübasyon Edilmesi **21**
3.6 Alt Kültür **22**
3.7 Verilerin İstatistiksel Analizi **23**
4. BULGULAR **24**
4.1 *O.germanicopolitana*'nın Rejenerasyonu **24**
4.2 Organogenik Olmayan Kallus Oluşumu **24**
4.3 Yaşam Belirtisi Kaybeden Eksplantlar **31**
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **33**
KAYNAKLAR **38**
ÖZGEÇMİŞ **43**

SİMGELER DİZİNİ

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

KISALTMALAR DİZİNİ

2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
BAP	6-benzylaminopurin
BDM	Büyüme düzenleyici madde
Dk	Dakika
EtOH	Etanol
$HgCl_2$	Civa klorür
IAA	Indol-3-asetik asit
IBA	Indol-3-bütirik asit
KIN	Kinetin
NAA	Naftalen asetik asit
NaOCl	Sodyum hipoklorit
TDZ	Thidiazuron

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 *O. germanicopolitana*'nın yayılış alanı Çankırı/TÜRKİYE (Bakis *et al* .2011) 4
Şekil 1.2 *O. germanicopolitana* bitkisinin habitusu 5
Şekil 1.3 *O. germanicopolitana*'nın a) genel görünümü b) çiçekleri 5
Şekil 3.1 *O. germanicopolitana*'nin toplandığı jipsli arazilerin jeolojik görünümü (Anonim 2021) 14
Şekil 3.2 *O. germanicopolitana* bitkisinin jipsli habitatı 15
Şekil 3.3 *O. germanicopolitana*'nın sterilizasyon aşamaları a) Yapraklarından arındırılmış ve kesilmiş sürgünler b) $HgCl_2$'te bekletilen eksplantlar c) Otomatik karıştırıcı aracılığıyla ticari NaOCl ile muamele edilen eksplantlar d) Dikim için hazırlanmış eksplant 16
Şekil 3.4 Besin ortamlarının laminar flow kabin içerisinde tüplere dağıtılması 20
Şekil 3.5 Eksplantların dikim aşamaları a) eksplantların laminar flow kabin içerisinde De Wit tüplere yerleştirilmesi b) Dikimi yapılan eksplantların viyol içerisinde görünümü 21
Şekil 3.6 25±2ºC sıcaklık, 16 saat aydınlık (35 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) ve 8 saat karanlık koşullarda iklim kabininde inkübe edilen eksplantlar 22
Şekil 3.7 De Wit tüplerinde alt kültürde bulunan eksplantlar 23
Şekil 3.8 ECO2 BOX/Green Filter kaplarında alt kültüre alınmış eksplantlar 23
Şekil 4.1 MS besin ortamında elde edilen kalluslar a) 1 mg/L BAP + 0,25 IBA mg/L kombinasyonunda kallus gelişimi b) 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi c) 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi d) 0,5 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi.....30
Şekil 4.2 Gamborg's B5 besin ortamında kallus gelişimi a) 1 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi b) 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi 31
Şekil 4.3 Aynı tekerrürden elde edilen farklı sonuçlar a) Gamborg's B5 besin ortamında 1 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi b) MS ortamında 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi.....32
Şekil 4.4 Başlangıç aşamasında sürgün oluşumundan sonra enfeksiyonlar a) 0,5 mg/L KIN konsantrasyonunda sürgün enfeksiyonu b) BDM içermeyen ortamda direkt rejenerasyon sürgünün enfeksiyonu c) Sadece 0,25 mg/LIBA ve 1 mg/L BAP içeren ortamın sürgün enfeksiyonu.....32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Murashige ve Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962) ve Gamborg's B5 (B5) (Gamborg *et al*. 1968) temel besin ortamlarının içeriği 18
Çizelge 3.2 BDM kombinasyonları uygulama tablosu 19
Çizelge 4.1 BDM kombinasyonları arasındaki (K1-36/K1-12) ikili karşılaştırmaları 26
Çizelge 4.2 BDM kombinasyonları arasındaki (K1-36/K13-24) ikili karşılaştırmaları 27
Çizelge 4.3 BDM kombinasyonları arasındaki (K1-36/K25-36) ikili karşılaştırmaları 28

1. GİRİŞ

Türkiye'de, yaklaşık 12000 bitki türü yetişmekte, bu bitki türlerinin yaklaşık 4000'i ise Türkiye'ye endemiktir (Şenkul ve Kaya 2017). Bu hakikat ile Türkiye, Avrupa'da bulunan tüm ülkelerin endemik bitki türlerinden daha fazlasına sahiptir. Avrupa ve Asya arasındaki konum, dağlık rölyefler ve bol yağışlara sahip olması Türkiye'ye bitki çeşitliliğinin zenginliğini sağlamıştır. Çiçekli bitkiler (*Angiospermler*) arasında üçüncü büyük familya, baklagiller (Fabaceae) familyasına ait, bitkiler aleminin kalabalık familyalarından biridir. Çok çeşitli bir familya olan baklagiller, yaklaşık 765 cins ve 20000'den fazla bilinen türleri vardır (Azani *et al.* 2017). Yeryüzünde baklagillerde insan gıdaları, hayvan yemi, yeşil gübre, odun, yağ gibi çeşitli organik ürünleri bulunmakta ve böylece ekonomik, ekolojik ve tarımsal sektörlerine büyük katkılar sağlamaktadır. Bitkiler alemindeki baklagillerin yeri bakımdan ise, Fabales takımı ve iki çenekliler (Dicotyledoneae) sınıfına bağlıdır.

-Sınıf: İki çenekliler

-Takım: Fabales

-Familya: Fabaceae (Baklagiller)

Baklagiller familyasının önemli bir üyesi olan *Onobrychis* (korunga) cinsinin yaklaşık 170 türü bulunmaktadır. Esas dağılımı İran, Türkiye ve Transkafkasya'da olup tek ve çok yıllık halinde yetişmektedir (Yücel 2019). *Onobrychis* cinsi muazzam bir tür çeşitliliğine sahiptir. Bunlardan sadece *O. viciifolia* (Adi korunga), *O. arenaria* (Kit.) DC. (Anadolu korungası), *O. transcaucasica* Grossh. (Kafkas korungası) bitkileri tarımsal açıdan önem taşımaktadır. Bu türler arasında sadece adi korunga olarak bilinen bitki en çok duyulan ve yaygın tarımı yapılan türdür (Açıkgöz 2001). Türkiye'de bulunan 55 farklı korunga türünün 28 tanesinin endemik olduğu bilinmekte (Hedge 1970, Davis 1965-1985), bu da korunga tür çeşitliliğinin % 50,9'una karşılık gelmektedir.

İç Anadolu bölgesinde, bitki çeşitliliğinin çok olmadığı alçılı (jipsli), verimsiz, taşlık ve meyilli alanlara kolayca adapte olup doğal olarak yetişmektedir.

Ayrıca eğimli alanlarda, erozyon ıslahında sıklıkla kullanılmakta olan korunga ile su ve rüzgâr erozyonunu kontrol etmekte mümkündür.

Korunga çok lezzetli bir yem bitkisidir. Şişkinlik yaratmaması nedeniyle yeşilken, solmadan otlatılabildiği için otlamada ve hayvan yemi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Anonim 2021). Protein oranı çok yüksek olup, besin içeriği iyi olan korunga, fosfor, kalsiyum ve diğer mineral maddelerce oldukça zengindir. Korunga ham protein içeriği %20-25 oranında iken, ayrıca tohumlarında bu oran yaklaşık %36'dır (Anonim 2021). Bu nedenle korunga tohumları hayvan yemi olarak da tercih edilmektedir. Korunga bitkisinin çiçekleri arıcılıkta da çok faydalıdır. İyi bir polen ve bal ekstraksiyon kaynağı olup, çoğu arılar tarafından tercih edilmektedir. Bu arıların balları oldukça verimli, özel ve hoş bir aroma taşımaktadır (Knuth 1906-1909, Özbek 2011).

Korunganın yetiştiği toprakları mineral maddece çok zengin hale getirdiği ve bunun nedeni olarak da bir bakteri kolonisinin varlığı olduğu bilinmektedir (Anonim 2019). Kök nodüllerinde simbiyoz olarak yaşamakta olan *Rhizobium* sp. bakterisi, serbest atmosferik azotu (N) toprağa fikse ederek toprağı azotça zenginleştirmekte ve verimliliğini arttırmaktadır. Fikse edilen N bitkinin ihtiyacına göre amonyağa dönüştürülmekte ve bunun karşılığında bakteriler bitkiden besin maddelerini alıp yaşamalarını sürdürmektedir (Anonim 2019). Örneğin, *O. viciifolia* üzerinde yapılan bazı çalışmalarda, iki farklı simbiyoz kolonisinin var olduğu belirtilmiştir. Birinci koloni *Rhizobium* kolonisidir ve yumrucuk (nodül) adı verilen özel yapıların oluşmasıyla havadaki inorganik N elementin fiksasyonunu halleden kolonidir. İkinci tip ise mikoriza olarak adlandırılmakta, çeşitli fungus türlerinin gelişmesi ile oluşup bitkiye özellikle fosfor gibi bazı besin maddeleri kazandırmaktadır (Carbonero 2011). Korunga kökleri, çoğu baklagil yem bitkilerinin kökleriyle kıyaslandığında daha uzun ve daha da derin katmanlara gidebildikleri için topraktaki gömülü olan su ve besin maddelerinden faydalanmaktadır. Bitkinin yetiştiriciliği sayesinde toprağa sürüldüğü zaman büyük miktarlarda organik madde sağlanmaktadır. Mera ıslahında ve karışımlarda diğer yem bitkilere iyi geldiği ve kolayca geliştiği için değerli bir yem bitkisidir. Hayvansal kökenli gıdalar, insanoğlu beslenmesinde geniş bir alana sahiptir. Hayvan

yetiştiriciliğinde keçi, sığır ve koyundan elde edilen et ve süt gibi ürünler insanın besin ihtiyacını karşılaşmaktadır.

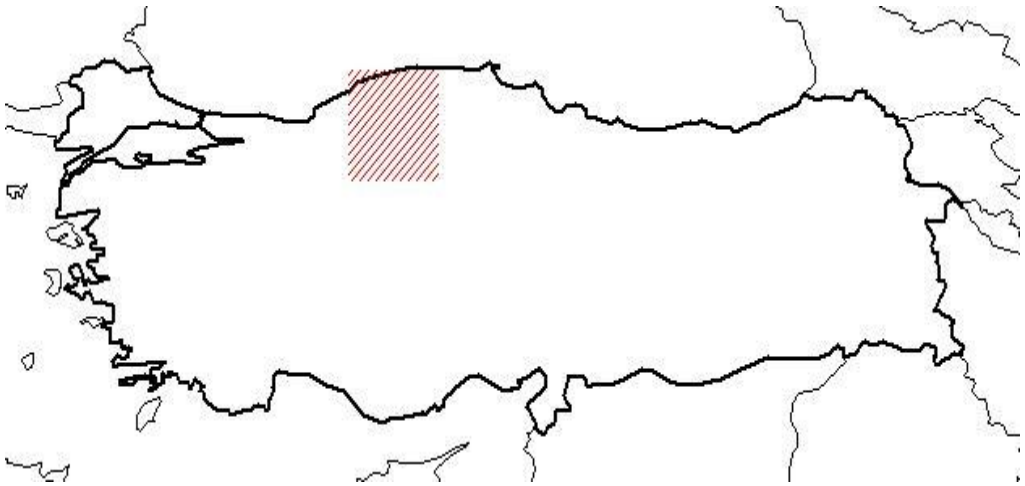
Son yıllardaki küresel ısınma, su kaynaklarının aşırı kullanılması, kuraklık, azalmış toprak verimliliği, verimli alanların imara açılması, erozyon, tarımsal veya kentleşme gibi olumsuz faktörler kaba yem üretiminin azalmasına ve dolaysıyla ürünlerde birim fiyat artışına sebep olmaktadır. Çayır ve mera alanları önemli doğal kaba yem kaynağı olması yetmemekte ve bugünlerdeki duyulan ihtiyaçlara cevap vermemektedir. O yüzden tarımsal alanlar sadece insanoğlunun değil, hayvanların besin taleplerini de karşılaşmalı, bu nedenle yem bitkilerin tarlalarda yetiştiricilik faaliyetleri giderek artmış ve halen artmaya devam etmektedir (Budak 2013).

Tanenler, bitki sekonder metabolitleri arasında yer alıp çeşitli özelliklere ve yüklere sahiptir (Heil *et al*. 2002, Volf *et al*. 2015, Kempf 2016). Kondens tanen (CTs), hidrolize edebilen tanen (HTs), kompleks tanen ve florotanen (phlorotanin) olmak üzere 4 farklı gruba ayrılabilir (Serrano *et al*. 2009). Tanenler, özellikle baklagiller familyasında geniş ölçüde dağılmaktadır. Korunga cinsinde yüksek oranlarda bulundukları belirlenmiştir (Makkar 2003). Tanence zengin olması nedeniyle korunga, antiparazitik ve solucan yok edici (antihelmintik) etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Tanenler korunga bitkilerinde CT formunda bulundukları iletilmiş, hayvan beslenmesi ve yem bitkinin besin değerinden faydalanmasında çok etkili oldukları çeşitli çalışmalarda desteklenmiştir. Protein oranı yüksek olduğu için, korunganın hazmı önemli bir işlemdir. CT proteinlerin ölçülü miktar ve doğru kullanımında büyük bir rol oynamaktadır. Dolaysıyla hayvanların büyümesinin hızlandığı, süt miktar ve kalitesinin arttığı gözlemlenmiştir (Girard *et al*. 2016, Kempf 2016).

Eski literatürlerde, tanenlerin korungalara tıbbi özelliği kazandırdıklarına dair kanıtlar bulunmamıştır. Ancak bugünlerde, tanenlerin tıbbi özelliklerini taşıdıklarının doğrulanmış kanıtları bazı bilimsel çalışmalarda desteklenmiştir (Anonymous 2015). Tanen içeriği yüksek olan tüm bitki türleri yöre insanları tarafından kullanılmıştır. Baş ağrısından kabızlığa kadar birçok hastalığın tedavisini oluşturmuştur. İshal, soğuk algınlığı, grip, boğaz ağrısı, hemoroite çare olarak alınmıştır (Anonymous 2015). Çok

sayıda türlerin antitümör etkisine sahip oldukları ortaya çıkmış ve etnobotaniksel olarak kanser tedavisinde kullanılmıştır. Fakat saflaştırılmaları zor olan tanenlerin kimyasal olarak sabit olmayışları, kanser önleyici maddeler olarak adlandırılmaları bakımından çok az umut vaat etmektedir (Anonymous 2015).

Onobrychis germanicopolitana bitkisi, Çankırı ilinin kurak ve yarı kurak bölgelerinde endemik olarak yetişen bir korunga türüdür. Davis'in oluşturduğu Grid sistemine göre Türkiye A4 karesi içinde (Şekil 1.1) yer alan Çankırı jipsli habitat tepeleri üzerinde yayılış göstermektedir (Şekil 1.2). Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği – International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) kırmızı liste kategorisine göre Tehlike Altındaki Bitkiler (Endangered) **EN** kategorisinde yer almaktadır (Ekim vd. 2000).



Şekil 1.1 *O. germanicopolitana*'nın yayılış alanı Çankırı/TÜRKİYE (Bakis *et al*. 2011)



Şekil 1.2 *O. germanicopolitana* bitkisinin habitusu

O. germanicopolitana'nın gövdeleri yatık tüyler ile kaplıdır. Çiçek gövdeleri otsu olup tabana doğru odunsulaşmıştır. Yaprakları, eliptik ve her iki yüzeyi yoğun yatık tüylerle kaplıdır. Salkımlar, 20 ila 30 çiçekten oluşup meyvelere doğru uzamaktadır (Şekil 1.3). Her çiçeğin kendi çiçek sapı (pedicel) olup yatık, beyaz tüylü ve çok kısadır. Korolla, pembe renklidir; standart suborbikular, nadiren emerginattır. Legümen meyve yuvarlağımsı olup 1-3(-4) adet çıkıntıya sahiptir. Çiçeklenme dönemi haziran ayıdır (Davis 1965-1985).



Şekil 1.3 *O. germanicopolitana*'nın **a)** genel görünümü **b)** çiçekleri

Bu tez çalışmasında, *O. 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 ve doku kültürü yöntemi ile *O. germanicopolitana* bitkisi sürgün ucu ve nod (boğum) gibi eksplantlar kullanılarak *in vitro* şartlarda çoğaltımı hedeflenmiştir. *O. 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 Fabaceae Familyasına Ait Bazı Bitkilerin *In vitro* Şartlarda Doku Kültürü ile Çoğaltımı

Barna ve Wakhlu (1994), olgunlaşmamış nohut (*Cicer arietinum*) yapraklarını eksplant olarak kullanmışlar, oluşan kalluslardan adventif sürgünler elde etmişlerdir. En bol miktarda kallus oluşumu 0,02 mg/L NAA ve 0,001 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyici madde (BDM) kombinasyonu ilave edilen besin ortamına ait olduğunu aktarmışlardır. En yüksek sürgün rejenerasyon sayısı gövde dokularının eksplantlarından elde edilmiş ve 0,002 mg/L BAP ve 0,0002 mg/L IBA içeren MS besin ortamında bulunduğu iletilmiştir. Kök oluşumu ise, 0,002 mg/L IBA ilave eden ortamdan elde edilmiştir.

Özgen vd. (1997)'de, Elçi ve Mesa-Sirsa yonca tohumlarından fide elde edilmiştir. Fidelerin sapçıklarını eksplant olarak kullanıp doku kültürü aracılığıyla sürgün oluşumu sağlanmıştır. Eksplantlar farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda olan BAP ve NAA BDM'lerini içeren MS besin ortamında büyütülmüştür. Elçi çeşidinde en fazla sürgün sayısı, 2 mg/L BAP ve 0,2 mg/L NAA ilave edilen ortamda bulunmuştur. Mesa-Sirsa çeşidinin en yüksek sürgün sayısı ise 1 mg/L BAP ve 0,2 mg/L NAA içeren ortamına ait olduğu rapor edilmiştir. IBA konsantrasyonunu arttırdıklarında, köklenme oranı %80-90 civarında bulunduğunu ifade etmişlerdir. Mesa-Sirsa çeşidinin ortalama kök uzunluğu Elçi çeşidininkinden daha düşük olduğu aktarılmıştır.

Bhatt ve Dhar (2000), *Bauhinia vahlii* bitkisinin *in vitro* koşullarda bitki rejenerasyonunu hedef olarak almışlardır. TDZ ve kinetin kombinasyonunun etkisi oldukça olumlu olduğunu aktarmışlar, sürgün sayısının önemli seviyede arttığını ifade etmişler, 0,01 mg/L NAA ilave eden MS ortamının sürgün ortalama köklenme oranının %83'e ulaştığını belirlemişlerdir. Aklimatizasyon aşamasından önce gelişen bitkiler farklı şeker konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş olup, bitkinin canlılığı üzerinde etkili olmadığını aktarmışlardır. Ancak bitki kalitesindeki artışı fark etmişlerdir. Tam bitkiye dönüş oranı %50'de bulunmuştur.

Shibli ve Ajlouni (2000)'de endemik siyah iris (*Iris nigricans*)'ten somatik embriyo, hücre ve protoplast kültürünü elde etmişlerdir. Üretilen kalluslar 300 mg/L Prolin, 0,008 mg/L NAA, 0,001 mg/L Kinetin ve 0,001 mg/L 2,4-D içeren alt kültür ortamında, karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Başlangıç ortam BDM'lerini değiştirip, (0, 0,008, 0,01, 0,02 ve 0,03 mg/L) TDZ, 0,0001 mg/L 2,4-D ve 0,0001 IBA mg/L olan BDM'leri rejenerasyon ortamına ilave etmişlerdir.

Çöçü vd. (2003)'de 8 farklı fiğ (*Vicia sativa*) çeşitlerinden adventif sürgün rejenerasyonunu elde etmek için embriyo eksenleri ve olgunlaşmamış kotiledonlar kullanılmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyon oranı % 95 olup 4 mg/L BAP ve 0,25 mg/L NAA içeren MS ortamına ait olduğu rapor edilmiş ve Kubilay çeşidinin olgunlaşmamış embriyo eksenlerinden elde edilmiştir. 2 mg/L BAP ve 0,25 mg/L NAA içeren besin ortamında bulunan Sarıelçi çeşidinden 9,47 adet ile en yüksek sürgün sayısı elde edilmiştir. Kullanılan BDM'ler olgunlaşmamış kotiledonları üzerinde etkisiz olup sürgün rejerenasyonu sağlanmamıştır. Gelişen sürgünler 2,5 mg/L IBA ilave eden köklendirme MS besin ortamına alınmış, gelişen fideler diş koşullara aktarılmıştır.

Erdoğan vd. (2004), bu çalışmada, Burçak tohumlarından gelişen bitkiciklerin kotiledon boğum eksplantlarını kullanarak farklı TDZ, BAP veya BAP ve NAA kansontrasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 15,7 adet ile 4 mg/L BAP ve 0,25 mg/L NAA içeren besin ortamlarına ait oldukları belirlenmiştir. Köklendirme aşaması için 2 mg/L IBA kullanmışlardır. En fazla embriyo oluşumu 0,01 mg/L BAP konsantrasyonunda olduğu belirlenmiştir. Zeatin ve TDZ'nin embriyonun gelişimi üzerinde etkisiz kaldıkları ispatlanmıştır. Ancak, besin ortamlara 0,2 M Sukroz; Glukoz ve Fruktoz kattıklarında, etkileri daha belli olduğunu aktarmışlardır. Süspansiyon kültüründen elde edilen hücreler 0,2 M sukroz, 0,01 mg/L BAP ilave edilen ortama alındıklarında gayet iyi sonuçlar elde edilmiştir. Deneme sonunda gelişen embriyoların %90'ı köklenmiştir. Sağlıklı bitkiye dönüş sağlanmış ve bitkilerin %95'i dış ortama alınmıştır.

Yıldız ve Özgen (2006), bu çalışmada üç keten (*Linum usitatissimum*) çeşidi üzerinde çalışmışlardır. Hipokotil eksplantlarını kullanıp farklı NAA, TDZ ve BAP

konsantrasyonlarının rejenerasyon oranı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. En iyi sürgün rejenerasyonu % 100, % 96.7 ve % 70 oranları ile eksplant başına sürgün sayısı 9,8, 9,8 ve 15,4 adet, petri başına toplam sürgün sayısı 98, 96 ve 108 adet, en yüksek eksplant ağırlığı 1054, 944, ve 800 mg ile 1 mg/L BAP ve 0,02 mg/L NAA ilave edilen MS ortamına ait olduğunu bildirmişlerdir. TDZ dozunun 1 mg/L'nin üstüne çıkması eksplantlara toksik etkisi yaptığı ve sürgün rejenerasyon oranını önemli ölçüde azalttığını ifade etmişlerdir.

Kahramanoğulları (2012), bu çalışmada *Lathyrus chrysanthus* Boiss.'in tohumlarının çimlendirilmesi ile elde edilmiş olan fidelerden alınan eksplantlar kültüre alınmıştır. Eksplant kaynağı olarak, tohum kotiledonların, boğum arası ve sürgün ucu meristemi kullanılmıştır. Eksplantlar (0,25, 0,50, 1 ve 2 mg/L) BAP ve (0,05 ve 0,10 mg/L) NAA konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 0,25 mg/L BAP ve 0,05 mg/L NAA içeren ortamına ait olduğu belirlenmiştir.

Dadaşoğlu ve Tosun (2017), bu çalışmada eksplant kaynağı olarak çimlendirilmiş tohumlardan gelişen bitkiciklerin, sürgün, kök ve hipokotil eksplantları kullanılmıştır. En fazla sayıda sürgün oluşumu kök eksplantından 29 adet ile 1,5 mg/L BAP ilave edilen ortamdan elde edilmiştir. Kotiledonlarda, en yüksek sürgün sayısı 7,8 adet ile TDZ'nin 1,0 mg/L'lik dozundan elde edilmiştir. Kök oluşumu bakımından ise en iyi sonuç 14,8 adet ile 0,4 mg/L NAA konsantrasyonunda hipokotilden elde edilmiştir.

2.2 *Onobrychis* sp.'nin Çoğaltımı ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Hiroshi ve Zhumeng (1993)'te *O. viciifolia*'nin kotiledon, hipokotil ve kök eksplantlarını kullanılmıştır. Eksplant başına en fazla sürgün rejenerasyonu 0,02 mg/L BAP ve 0,001 mg/L NAA konsantrasyonlarını içeren ortamına ait olduğu bildirilmiştir. Sürgün rejenerasyonu bakımdan kök ve hipokotil eksplantlar kotiledonlara göre daha olumlu bir sonuç verdikleri ifade edilmiştir.

Özgen vd. (1998)'de, *O. viciifolia* bitkinin sap ve yaprakçıkları eksplant olarak kullanılmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu 0,0001 mg/L NAA ve 0,04 mg/L BAP konsantrasyonlarının ilave edildiği ortama ait olduğu aktarılmıştır. Gelişen sürgünler 0,01 mg/L IBA içeren köklendirme ortamına alınıp dış koşullara başarıyla transfer edilmiştir.

Akçura vd. (1999)'da, korunga hipokotil, kök, yaprak, epikotil ve kotiledon gibi eksplantları üzerinde çalışılmıştır. Eksplant başına en fazla sürgün rejenerasyonu, NAA ve BAP içeren ortamında bulunmuş olup, gelişen sürgünler 0,2 mg/L IBA ilaveli MS ortamına köklendirmeye alınmıştır.

Sancak (1999)'da, *in vitro* koşullarda korunganın mikroçoğaltımı hedeflenmiştir. Değişik BAP, IBA ve NAA kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamında 8 hafta içinde tek bir embriyonik eksenden fazla sayıda sürgün içeren bitkiler elde edilmiştir. En yüksek sayıda sürgün rejenerasyonu 2 mg/L BAP ve 0,05 IBA, 2 mg/L BAP ve 0,1 mg/L IBA, 2 mg/L BAP ve 0,05 mg/L NAA, 2 mg/LBAP ve 0,1 mg/L NAA, veya 8 mg/L BAP ve 0,05 mg/L kombinasyonlarını içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. En yüksek sürgün uzunluğu, sadece 2 mg/L BAP içeren ortamda gözlenmiştir. Gelişen sürgünler, 1 mg/L IBA ilave edilmiş MS köklendirme ortamında 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Ortalama köklenme yüzdesi %60 olup, sürgünler sağlıklı bitkiye dönüşmüştür.

Çeliktaş vd. (2006), korungada (*O. viciifolia*) kallus aracılığıyla somatik embriyogenesis elde etmek amacıyla bitkinin (boğum, genç yaprak, apikal meristem, yaprak sapı ve olgunlaşmamış çiçek) hemen hemen her dokusu eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Gamborg's B5 besin ortamına farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonlarda (0,01, 0,02 mg/L) NAA, (0, 0,002, 0,003, 0,005 mg/L) kinetin ve (0, ,02, 0,003, 0,005 mg/L) BAP BDM'leri ilave edilmiştir. En fazla sayıda sürgün rejenerasyonu, apikal meristem eksplantlarını içeren 0,003 mg/L kinetin ve 0,02 mg/L NAA ilave edilmiş ortamda bulunmuştur. Gelişen sürgünler 0,02 mg/L IBA içeren MS besin ortamında köklendirmeye alınmıştır.

Tamas ve Savatti (2006), *O. viciifolia'*nin mikroçoğaltımını hedefleyerek sırasıyla 1, 2 ve 3 yaşındaki bitkilerin, sürgün ucu ve boğum arası eksplantlarını kullanmıştır. BDM miktarına bağlı olarak boğum eksplantlarının rejenerasyon oranı %92'den %95'e kadar olduğu bildirilmiştir. Boğum arası eksplantlarının canlılık yüzdesi, sürgün ucu eksplantlarının canlılık yüzdesinden daha yüksek olduğu ancak, rejenerasyon ve gelişme yüzdesi ise daha düşük olarak belirlenmiştir. Rejenerasyon yüzdesinin, eksplant kaynağı olarak kullanılan bitkinin yaşıyla doğru orantılı olduğunu ifade edilmiştir.

Karamian ve Ranjbar (2008)'de, *O. subnitens* bitkisinin hipokotil eksplantlarını kullanarak bitki rejenerasyonu elde etmeye çalışmıştır. Farklı dozlarda BAP ve 2,4- D konsantrasyonlarını içeren MS ortamında, organogenik olan ve olmayan kallus oluşumu sağlanmıştır. Organ oluşturma potansiyeli olan kallusların organogenesisi için 1 mg/L BAP ve 0,5 mg/L NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Organogenik olmayan kalluslar ise BDM içermeyen ya da 2 mg/L NAA içeren MS ortamına aktarılmıştır. Gelişen eksplantların tümü tam bitkiye dönüş sağlamıştır.

Sağlam (2010), *O. viciifolia* kotiledon boğum eksplantları üzerinde çalışmıştır. *İn vitro* koşullarda farklı NAA ve BAP konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. En uzun sürgün boyu (6,79cm) 1 mg/L BAP ve 0,02 mg/L NAA konsantrasyonda bulunmuştur. Köklendirme aşaması için gelişen sürgünlerin 50 mg/L IBA içeren MS ortamında 10 dakika süreyle muamele edildikleri bildirilmiştir.

Mohajer vd. (2012), *in vitro* koşullarda *O. viciifolia* Scop.'un mikroçoğaltımı amacıyla, farklı BAP, NAA ve IBA konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Kök, yaprak ve sap dokularından organogenesis potansiyeli olan somatik embriyolar elde etmek amaçlanmıştır. Somatik embriyoların oluşumu açısından en iyi sonuç kök ve yaprak eksplantlarından, 2,5 mg/L BAP ve 0,5 mg/L NAA kombinasyonunu içeren MS ortamından elde edildiği bildirilmiştir. Kallus oluşumu için ise en iyi sonuç, sap eksplantlarından elde edilmiş olup 0,5 mg/L BAP ve 1 mg/L IBA konsantrasyonuna ait olduğu ifade edilmiştir.

Garshasbi vd. (2012)'de korunganın (*O. sativa* var. Chadegan) sap, kök parçaları, sürgün ve apikal meristemi eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Bir eksplantın kallus oluşturma ve rejenerasyon kabiliyetini belirlemek amacıyla bu çalışma yürütülmüştür. MS besin ortamına farklı konsantrasyonlarda olan bitki büyüme düzenleyicileri (BAP ve 2,4- D) eklenmiştir. En fazla kallus (5,46 cm), (6 mg/L) 2,4-D ve (1 mg/L) BAP içeren ortamda bulunan apikal meristem eksplantlarından elde edilmiştir. En yüksek sürgün sayısı ise 4 mg/L BAP ilave edilen ortamda bulunmuştur. Sonunda, gelişen sürgünler 1 mg/L IBA ilave edilmiş MS ortamında köklendirildikten sonra, tam bitkiye dönüşmüş ve dış koşullara aktarılmıştır.

Kamalvand ve Karamian (2013), *O. altissima'*nin epikotil, kotiledon ve hipokotil eksplantlarını, farklı konsantrasyonlarında olan BAP ve 2,4-D BDM'lerini içeren MS besin ortamına almıştır. Seçilmiş olan büyüme düzenleyicilerin konsantrasyon ve türlerinin organogenesis üzerinde değil, kallus oluşumu üzerinde daha etkili oldukları belirlenmiştir. Hipokotil eksplantlarından gelişen oraganogenik kalluslar tam bitkiye dönüş kapasitesi oldukça yüksek olmuş, ancak diğer eksplantlardan organ oluşturma potansiyeli olmayan basit kalluslar gelişmiştir.

Turgut (2014), *O. viciifolia'*nin tohumlarından gelişen bitkiciklerin gövde, kotiledon ve yaprak eksplantlarını farklı 9 konsantrasyonda TDZ, BAP ve NAA içeren MS besin ortamlarında kültüre almıştır. Tohumların magenta kabı başına en fazla sayıda sürgün oluşumu 148,6 adet ile 0,1 mg/L TDZ içeren besin ortamında bulunmuştur. Petri kutusu başına 107,6 adet ile sürgün rejenerasyonu 2 mg/L TDZ içeren besin ortamına ait olduğunu bildirmiştir. Gelişen sürgünler 1 mg/L IBA içeren ortamlarda köklendirilmiş ve zamanı gelince saksılara alınmıştır.

Yükselgüngör (2018) yaptığı çalışmada, 3 farklı endemik korunga türü üzerinde çalışmıştır. Tohumdan elde edilen fidelerin kotiledon boğumlarını kullanıp farklı bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS besin ortamında kültüre almıştır. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı, *O. fallax* ve *O. elata*'da 4 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA içeren ortamda bulunurken *O. stenostachya*'da 4 mg/L BAP içeren ortamda,

O. viciifolia'da ise 2 mg/L BAP ilave edilmiş besin ortamında bulunmuştur. Köklendirme aşamasında ise 1 veya 2 mg/L IBA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır.

Uysal ve Topbaş (2021), *O. viciifolia*'nin Özerbey-03 çeşidinin hipokotil eksplantları (0,1 mg/L, 0,5 mg/L) BAP ve (0,5 mg/L, 0,1 mg/L) IAA konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamına kültüre alınmıştır. Sonuç olarak BDM içermeyen ortamdan %84 oranında direkt rejenerasyon elde edilmiştir. Kallus geliştirme açısından, %84 oranıyla 0,5 mg/L BAP ve 0,1 mg/L IAA eklenmiş ortamdan elde edilmiştir. Kallus eksplantlarından en fazla sayıda sürgün rejenerasyonu 0,83 adet ile 0,5 mg/L BAP içeren ortamda bulunmuştur. Elde edilen sonuca dayanarak, bitki direkt rejenerasyonunu sağlamak için BDM içermeyen bir ortamın kullanılması iyi bir seçim olarak ortaya çıkmıştır. Kallus oluşturma açısından ise, BAP ve NAA'nin yüksek konsantrasyonlarının kallus oluşumunu teşvik ettiği bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma 2021-2022 yılları arasında Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Bu calışmada materyal olarak Çankırı'ya ait olan endemik *Onobrychis germanicopolitana* HUB.-MOR. ET SIMON bitkisi kullanılmıştır.

3.1 Materyal

O. germanicopolitana, Çankırı-Ankara yolu üzerinde, Süleymanlı Köyünün (Şekil 3.1) jipsli tepelerinde, 650-700 m yükseltide, 40°51'68.5"N ve 33°18'88.8" E koordinatlarında bulunmaktadır. Bitkinin vejetasyon dönemi Mayıs ayında başlamasıyla birlikte, bitki arazide Haziran ve Temmuz aylarında tam çiçekli halinde görülmeye başlamıştır. Bitkilerin genel olarak ekosistemine zarar vermeden, *O. germanicopolitana'*nın nadirliği ve yok olma riskini de dikkate alarak, 10 Haziran ve 15 Temmuz tarihlerinde, iki kez Çankırı-Ankara yolu üzerindeki jipsli habitatlarından sınırlı miktarda toplanmış (Şekil 3.2) ve laboratuvar ortamına getirilmiştir. Bitkinin sürgün uçları ve boğum araları eksplantlar kaynağı olarak kullanılarak *in vitro* şartlarda çoğaltım amacıyla hazırlanmıştır.



Şekil 3.1 *O. germanicopolitana*'nin toplandığı jipsli arazilerin jeolojik görünümü (Anonim 2021)

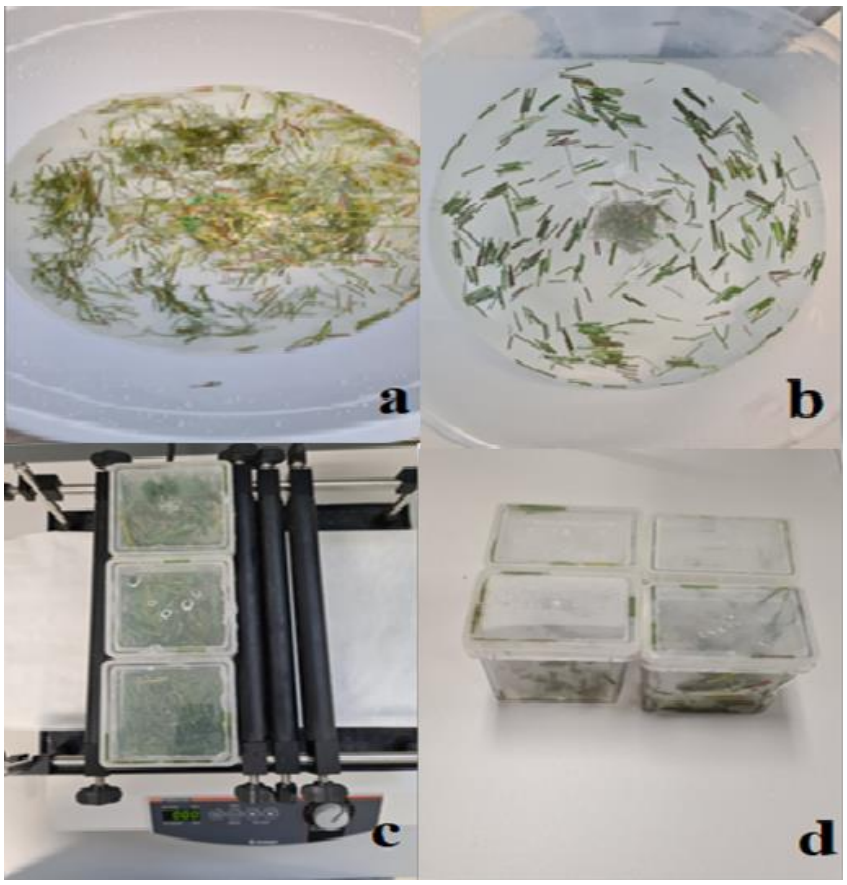


Şekil 3.2 *O. germanicopolitana* bitkisinin jipsli habitatı

3.2 Bitkilerin Sterilizasyon Aşamaları

O. germanicopolitana'nın sterilizasyonu için yüzeysel sterilizasyon protokolü uygulanmıştır. Bu aşamada, araziden laboratuvar koşullarına getirilen bitkiler öncelikle musluk suyu altında en az 20 dk boyunca yıkanmıştır. Bitkinin büyüklüğü ve *in vitro* çoğaltımda kullanılacak olan eksplantların hazırlanması amacıyla, sürgün uçları ve sürgünler üzerindeki en az iki nodun bulunduğu parçalar eksplant olacak şekilde kesilerek hazırlanmıştır. Ardından eksplantlar, %70'lik etanolde 3 dk bekletilmiştir ve steril safsu ile 2 defa 5'er dk süre ile durulanmıştır. Bu eksplantlar, içerisine 3 ya da 4 damla Tween 20 ilave edilmiş %15 aktif klorin içeren %20'lik ticari sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonunda 10 dk süre ile muamele edilmiştir. Tween 20 ile etkinliği artırılmış sodyum hipokloritin dokulardan durulanması 3 kez 5'er dakika süre ile steril saf su ile çalkalanarak yapılmıştır. Ancak bu protokol *O. germanicopolitana* eksplantlarının sterilizasyonuna yetersiz geldiği gözlenmiştir. Onun için bu protokole ilave olarak yeni sterilizasyon adımları eklenmiştir. Bitkilerin sterilizasyonu aşağıdaki yeni protokole göre gerçekleştirilmiştir (Kapdan and Sezgin 2021):

- Laboratuvara getirilen bitki musluk suyu altında 20 dk boyunca yıkanmıştır,
- Bitkilerin kotiledon ve epikotil kısımlar kesildikten sonra geriye kalan sürgün ucu ve boğum araları eksplantlar kullanılmıştır (Şekil 3.3**a**)
- Antifungal 1 g/L Cuproson GW-(Bayer®) ile 20 dk muamele edilmiştir
- 1 g/L $HgCl_2$'de 10 dk bekletilmiştir (Şekil 3.3**b**)
- %70'lik EtOH'ile 3 dk muamele edilmiştir ve steril saf suyundan geçirilmiştir
- Hacmen %15'lik ticari NaOCl'in %20'lik konsantrasyonuna 1-2 damla Tween 20 ilave edip otomatik çalkalayıcı ile 15 dk muamele edilmiştir (Şekil 3.3**c**)
- Sonunda Steril saf su ile 3 kez 5'er dk durulanmış steril ve hazır eksplant (Şekil 3.3**d**)



Şekil 3.3 *O. germanicopolitana*'nın sterilizasyon aşamaları **a)** Yapraklarından arındırılmış ve kesilmiş sürgünler **b)** $HgCl_2$'te bekletilen eksplantlar **c)** Otomatik karıştırıcı aracılığıyla ticari NaOCl ile muamele edilen eksplantlar **d)** Dikim için hazırlanmış eksplant

3.3 Besin Ortamların Hazırlanması

Başlangıç aşamasında, içerdikleri tuz konsantrasyonları bakımından farklı olan 2 temel besin ortamı (Çizelge 3.1), katılaştırıcı olarak gelrite, karbon kaynağı olarak sakkaroz ve farklı doz ve kombinasyonlarda hazırlanmış BDM'leri kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Eksplantların büyüme ve gelişimleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

A. Temel besin ortamları

1) Murashige ve Skoog (MS) besin ortamı (Murashige and Skoog1962)

2) Gamborg's B5 besin ortamı (Gamborg *et al.* 1968)

B. Katılaştırıcı

Gelrite (2,1 g/L)

C. Büyümeyi düzenleyici maddeler ve kombinasyonları

1) 6-benzilaminopurin (BAP)-(0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L)

2) Kinetin (KIN)-(0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L)

3) Indol-3-bütirik asit (IBA)-(0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L)

4) 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D)-(0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L)

Çizelge 3.1 Murashige ve Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962) ve Gamborg's B5 (B5) (Gamborg *et al*. 1968) temel besin ortamlarının içeriği

(A) MAKRO ELEMENTLER	**g/mol**	**MS Ortamı mg/l**	**Gamborg B5 Ortamı mg/l**
Amonyum nitrat (NH_4NO_3)	80,04	1650	-
Potasyum nitrat (KNO_3)	101,11	1900	2500
Kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$)	147,02	440	150
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	136,09	170	-
Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4.7\ H_2O$)	246,48	370	250
(B) DEMİR			
Sodyum-demir EDTA ($C_{10}H_{12}N_2FeNa$)	367,1	36,7	36,7
Demir sülfat heptahidrat ($FeSO_4\ 7\ H_2O$)	278,02	27,8	27,8
(C) MİKRO ELEMENTLER			
Mangan sülfat monohidrat ($MnSO_4.\ H_2O$)	169,02	16	10
Çinko sülfat heptahidrat ($ZnSO_4.7H_2O$)	287,54	8,6	2,0
Borik asit (H_3BO_3)	61,83	6,2	3,0
Potasyum iyodür (KI)	166,01	0,83	0,75
Sodyum molibdat dihidrat ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	241,95	0,25	0,25
Bakır sülfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$)	249,68	0,025	0,025
Kobalt klorür heksahidrat ($CoCl_2.\ 6H_2O$)	237,9	0,025	0,025
(D)VİTAMİNLER			
Myo-Inositol ($C_6H_{12}O_6$)	180,16	100	100
Glisin ($C_2H_5NO_2$)	75,07	2	-
Thiamin klorid hidroklorid ($C_{12}H_8C_{l2}N_4OsxH_2O$)	337,27	0,1	10,0
Nikotinik asid ($C_6H_5NO_2$)	123,11	0,5	1,0
Pridoksol hidroklorid ($C_8H_{12}ClNO_3$)	205,64	0,5	1,0

Çizelge 3.2 BDM kombinasyonları uygulama tablosu

K1	0 mg/L BAP + 0 mg/L IBA	**K19**	0 mg/L KIN + 0 mg/L IBA
K2	0 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA	**K20**	0 mg/L KIN + 0,25 mg/L IBA
K3	0 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA	**K21**	0 mg/L KIN + 0,5 mg/L IBA
K4	0,5 mg/L BAP + 0 mg/L IBA	**K22**	0,5 mg/L KIN + 0 mg/L IBA
K5	0,5 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA	**K23**	0,5 mg/L KIN + 0,25 mg/L IBA
K6	0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA	**K24**	0,5 mg/L KIN + 0,5 mg/L IBA
K7	1 mg/L BAP + 0 mg/L IBA	**K25**	1 mg/L KIN + 0 mg/L IBA
K8	1 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA	**K26**	1 mg/L KIN + 0,25 mg/L IBA
K9	1 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA	**K27**	1 mg/L KIN + 0,5 mg/L IBA
K10	0 mg/L BAP + 0 mg/L 2,4-D	**K28**	0 mg/L KIN + 0 mg/L 2,4-D
K11	0 mg/L BAP + 0,25 mg/L 2,4-D	**K29**	0 mg/L KIN + 0,25 mg/L 2,4-D
K12	0 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D	**K30**	0 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D
K13	0,5 mg/L BAP + 0 mg/L 2,4-D	**K31**	0,5 mg/L KIN + 0 mg/L 2,4-D
K14	0,5 mg/L BAP + 0,25 mg/L 2,4-D	**K32**	0,5 mg/L KIN + 0,25 mg/L 2,4-D
K15	0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L2,4-D	**K33**	0,5 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D
K16	1 mg/L BAP + 0 mg/L 2,4-D	**K34**	1 mg/L KIN + 0 mg/L 2,4-D
K17	1 mg/L BAP + 0,25 mg/L 2,4-D	**K35**	1 mg/L KIN + 0,25 mg/L 2,4-D
K18	1 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D	**K36**	1 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D

O. germanicopolitana'nin *in vitro* mikroçoğaltımı için temel besin ortamı olarak MS ve Gamborg's B5 besin ortamları, gelrite ile katılaştırıcı olarak kullanılmıştır. Bu ortamlara 6 sitokinin ve 6 oksin dozunun yer aldığı 36 farklı kombinasyonda hazırlanan büyümeyi düzenleyici madde (Çizelge 3.2) ve karbon kaynağı olarak da 30 g/L sakkaroz ilave edilmiştir. Besin ortamlarında, eksplantların dikiminden sonra oluşabilecek olası kontaminasyonu önlemek amacı ile PPM (Plant Preservative Mixture-Duchefa)® 1 mL/L olarak eklenmiştir. Besin ortamlarının pH'sı 5,6'ile 5,8 arasındaki aralıkta bulunacak şekilde ayarlanmış, ayarı için 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılmıştır. Her kombinasyon 10' ar tekerrür olacak şekilde hazırlanmıştır. İki temel besin ortamı için toplam 720 tane De Wit® tüp (Duchefa) hazırlanmıştır.

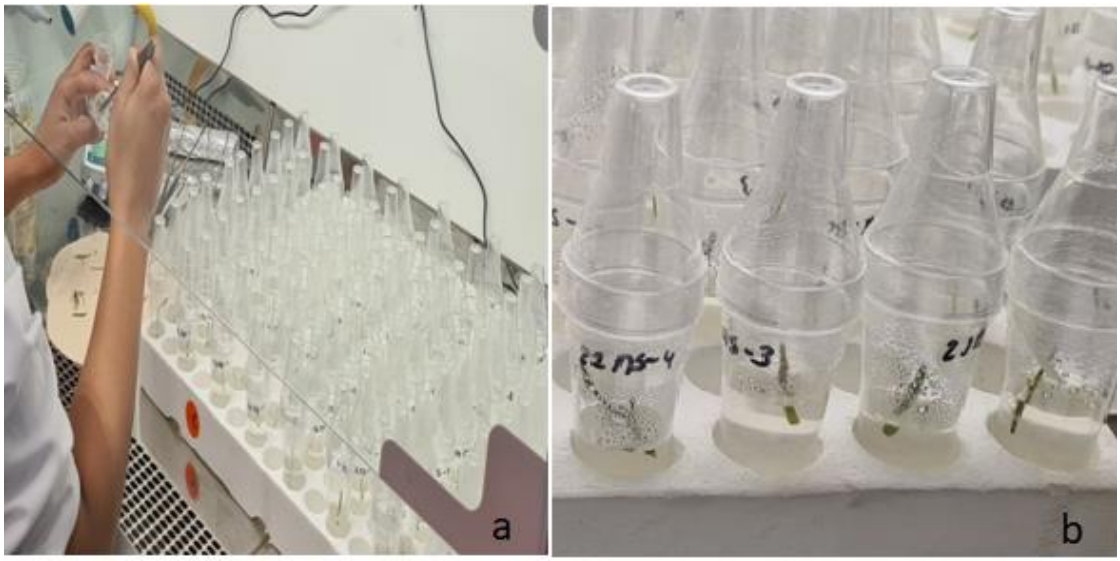
Besin ortamlarının sterilizasyonu için kontrollü otoklav kullanılmış, bunun için 121°C, 1,2 atm basınç altında 20 dakika süre ile gerçekleştirilmiştir. Sterilize edilen besin ortamlar direkt laminar hava akışlı kabin içerisine alınmış, katılaşmasına izin vermeden hemen steril De Wit® tüplere (130x10 mm) 12'şer mL olarak dağıtılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Besin ortamlarının laminar flow kabin içerisinde tüplere dağıtılması

3.4 Eksplantların Dikim Aşaması

Besin ortamlarının soğuyup katılaşmaları ve ortamlarda oluşabilecek olası bir enfeksiyonun görülebilmesi için bir gün beklenmiştir. Steril edilen *O. germanicopolitana* bitkisinin eksplantları hazır halde laminar hava akışlı kabinde steril magenta kaplarında saklanmıştır. Eksplantlar, aseptik koşullarda ve üzerinde bulunan nodlardan en az birinin besin ortamının içerisine yerleşmiş olmasına dikkat ederek dikey pozisyonda tüplere dikilmiştir (Şekil 3.5a). Olası bir kontaminasyonun tüm eksplantlara yayılmasını engellemek amacıyla her bir De Wit tüpe sadece bir eksplant olacak şekilde dikilmiştir (Şekil 3.5b).



Şekil 3.5 Eksplantların dikim aşamaları **a)** eksplantların laminar flow kabin içerisinde De Wit tüplere yerleştirilmesi **b)** Dikimi yapılan eksplantların viyol içerisinde görünümü

3.5 Eksplantların Inkübasyon Edilmesi

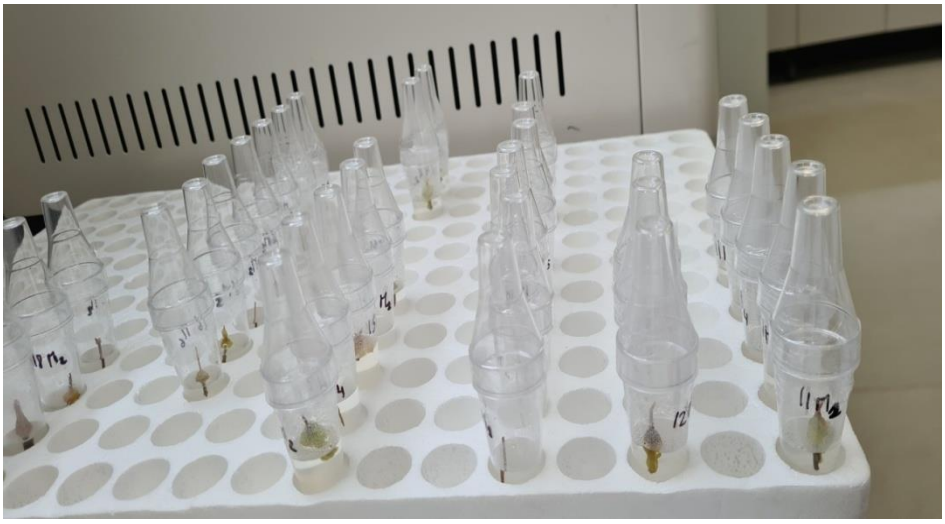
Yüzeysel sterilizasyonu ve ardından dikimleri gerçekleştirilen *O. germanicopolitana* bitkisinin eksplantları, inkübasyon amacıyla iklim odasına alınmış ve günlük olarak takibi gerçekleştirilmiştir. Optimal yaşam ve bitki rejenerasyonunu sağlamak için, dış koşullardaki bulunan yaşam parametrelerinin sağlandığı iklim odasında tüm kültürler 25±2ºC sıcaklık, 16 saat aydınlık (35 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) ve 8 saat karanlık koşullarda inkübe edilmiştir (Şekil 3.6). İnkübasyon süresi bitkinin özeliklerine göre değişmektedir. Bitkinin rejenerasyon kapasitesine doğrudan bağlı olarak uzun ya da kısa bir sure sonra, bitki aklimizasyon ortamına alınabilmektedir.



Şekil 3.6 25±2ºC sıcaklık, 16 saat aydınlık (35 µmol·m-^{2}·s-^{1}) ve 8 saat karanlık koşullarda iklim kabininde inkübe edilen eksplantlar

3.6 Alt Kültür

Dikimleri gerçekleştirilen *O. germanicopolitana* eksplantları, iklim odasında inkübe edilmiş ve her gün kontrol edilmiştir. Kültürlerin gelişimi dikildikleri besin ortamlarının içerdikleri MS ya da Gamborg's B5 ve bitki BDM'lerinin farklı kombinasyonlarına göre farklılık görülmüştür. Optimal büyüme koşulları ayarlandıktan sonra eksplantlar 4 hafta ara ile 3 kez De Wit tüplerine (Şekil 3.7) ve 3 kez daha ECO2 BOX/Green Filter®(Duchefa) 125x65x80 mm kaplarına alt kültüre alınmıştır (Şekil 3.8). Alt kültür, besin ortamlarının tazeliğini korumak ve bitkinin gelişimin devam ettirilebilmesi amacıyla yapılmıştır. İlk üç alt kültür aşamasında besin ortamının bileşenleri, katılaştırıcı ve bitki BDM kombinasyonları değiştirilmemiştir. Sonraki alt kültür aşamalarında ise yine aynı temel besin ortamlarına BDM olmadan sadece katılaştırıcı eklenerek eksplantlar inkübe edilmiştir.



Şekil 3.7 De Wit tüplerinde alt kültürde bulunan eksplantlar



Şekil 3.8 ECO2 BOX/Green Filter kaplarında alt kültüre alınmış eksplantlar

3.7 Verilerin İstatistiksel Analizi

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 *O. germanicopolitana*'nın Rejenerasyonu

Çalışmada hedeflenen *O. germanicopolitana* bitkisinin sürgün ucu ve boğum arası eksplantlarından doğrudan bitki rejenerasyonu sağlanamamıştır. Ancak indirekt organogenesis yöntemi ile elde edilen kalluslardan yeniden bitki rejenerasyonu hedeflenmiştir. *O. germanicopolitana* bitkisinin IUCN kırmızı liste kategorisine göre yok olma tehlikesi altındaki bitkiler listesinde yer alması sebebiyle araziden sınırlı miktarda alınarak doğrudan *in vitro* çoğaltım aşamasına geçilmiş olması, bitkinin rejenerasyon kabiliyetindeki sıkıntılar ile birleşince bitkiye tam anlamıyla dönüşüm sağlanamamıştır. Ancak, çalışmada kullanılan bitki BDM'lerinin konsantrasyon, kombinasyon ve türlerinin kallus oluşumu üzerinde pozitif etkilerinin oldukça fazla olduğu gözlemlenmiştir. Çalışma sırasında farklı türde sorunlarla da karşılaşılmıştır. Eksplantlarda bir süre sonrasında cansızlık, sürgün oluşturamama gibi sorunlarla da karşılaşılmıştır. Eksplantlar arasında başlangıç aşamasında direkt rejenere olan bazı eksplantlar, bitkinin kendisinden kaynaklı içsel enfeksiyonlar sebebiyle canlılıklarını sürdürememiştir (Şekil 4.4 ve 4.5). Bitkilerin sahip olduğu totipotensi özelliğinin yanında, kallusun hem sürgün gelişimi ve çoğaltımında önemli bir materyal olması hem de sekonder metobolit üretimi ve tespitinde de kullanılabilecek bir potansiyele sahip olması (Mansuroğlu ve Gürel 2002) sebebiyle elde edilen kalluslar, kıymetli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

4.2 Organogenik Olmayan Kallus Oluşumu

*O. germanicopolitana'*nın doku kültürü ile *in vitro* mikroçoğaltımından elde edilen kallus oluşumunun verileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. MS, Gamborg's B5 temel besin ortamları, farklı BDM kombinasyonları arasında kallus oluşumu bakımından istatistiksel farkın önemi araştırılmıştır. Bu amaçla, bağımsız değişkenler (BDM kombinasyonu, temel besin ortamı) ve bağımlı değişken (kallus oluşumu) ANOVA testiyle değerlendirilmiştir. Buna göre "BDM kombinasyonu" bağımsız değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,01$).

Diğer “temel besin ortamı” olan bağımsız değişken ise istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel farklılığına dayanarak, kallus oluşturma bakımdan 36 farklı BDM kombinasyonun arasındaki istatistiksel farklılığı belirtmek amacıyla ikili karşılaştırma ortaya konulmuştur (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3). Bu amaçla, BDM kombinasyonlarının ortalama kallus oluşturma miktarı bakımından birbirleri arasında istatistiksel farklılığın olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen verilerde kallus meydana getirme durumunun sadece bazı BDM kombinasyonlarında olması nedeniyle iki farklı temel besin ortamı arasındaki istatistiksel farklılık önemli bulunmamıştır. Ancak, her iki ortamdan elde edilen BDM verilerinin ortalamalarının istatistiksel farklılığına bakılmıştır.

Çizelge 4.1 BDM kombinasyonları arasındaki (K1-36/K1-12) ikili karşılaştırmaları

BDM	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12
K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005	-
K2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,004	-
K3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005	-
K4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005	-
K5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005	-
K6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005	-
K7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005	-
K8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,034	-
K9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
K11	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
K12	0,005	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,034	-	0,005	-	-
K13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
K14	0,005	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,034	-	0,005	-	-
K15	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,01	0,001	0,005	0,034	0,001	0,034	-
K16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K17	0,037	0,032	0,034	0,034	0,034	0,034	0,034	-	-	0,034	-	-
K18	0,037	0,032	0,034	0,034	0,034	0,034	0,034	-	-	0,034	-	-
K19	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	0,005
K20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
K21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,035
K22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
K23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
K24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
K25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
K26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
K27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
K28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
K29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,034
K30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,034
K31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
K32	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,005	0,034	0,001	0,034	-
K33	0,005	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,034	-	0,005	-	-
K34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
K36	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	-	0,005	0,001	0,005	-

- İstatistiksel farklılığı olmadığını göstermektedir
K Kombinasyon

Çizelge 4.2 BDM kombinasyonları arasındaki (K1-36/K13-24) ikili karşılaştırmaları

BDM	K13	K14	K15	K16	K17	K18	K19	K20	K21	K22	K23	K24
K1	0,005	0,001	-	0,037	0,037	-	-	-	-	-	-	-
K2	0,004	0,001	-	0,032	0,032	-	-	-	-	-	-	-
K3	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-	-
K4	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-	-
K5	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-	-
K6	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-	-
K7	-	0,005	-	-	0,034	-	-	-	-	-	-	-
K8	-	0,005	--	-	-	-	-	0,034	-	-	-	-
K9	-	0,005		-	-	-	-	0,034	-	-	-	-
K10	-	0,005	0,001		0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K11	-	-	0,034	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K12	0,005	-	-	-	-	-	0,005	0,005	0,034	0,005	0,005	0,005
K13	-	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K14	0,005	-	-	-	-	-	0,005	0,005	0,034	0,005	0,005	0,005
K15	0,001	-	-	0,034	-	-	0,001	0,001	0,005	0,001	0,001	0,001
K16	-	-	0,034	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K17	0,034	-	-	-	-	-	0,034	-	-	0,034	0,034	0,034
K18	0,034	-	-	-	-	-	0,034	-	-	0,034	0,034	0,034
K19	-	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K20	-	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K21	-	0,034	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K22	-	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K23	-	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K24	-	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K25	-	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K26	-	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K27	-	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K28	-	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K29	-	0,034	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K30	-	0,034	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K31	-	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K32	0,001	-	-	0,034	-	-	0,001	0,001	0,005	0,001	0,001	0,001
K33	0,005	-	-	-	-	-	0,005	0,005	0,034	0,005	0,005	0,005
K34	-	-	0,034	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K35	-	0,005	0,001	-	0,034	0,034	-	-	-	-	-	-
K36	0,001	-	-	0,005	0,034	0,034	0,001	0,001	-	0,001	0,001	0,001

- Istatistiksel farklılığı olmadığını göstermektedir
K Kombinasyon

Çizelge 4.3 BDM kombinasyonları arasındaki (K1-36/K25-36) ikili karşılaştırmaları

BDM	K25	K26	K27	K28	K29	K30	K31	K32	K33	K34	K35	K36
K1	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001	-
K2	-	-	-	-	-	-	0,001	0,004	-	-	0,001	-
K3	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001	-
K4	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001	-
K5	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001	-
K6	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001	-
K7	-	-	-	-	-	-	-	0,001	-	-	0,001	-
K8	-	-	-	-	-	-	-	0,005	-	-	0,005	-
K9	-	-	-	-	-	-	-	0,034	-	-	0,001	-
K10	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K11	-	-	-	-	-	-	-	0,034		-	-	0,005
K12	0,005	0,005	0,005	0,005	0,034	0,034	0,005	-	-	-	0,005	-
K13	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K14	0,005	0,005	0,005	0,005	0,034	0,034	0,005	-	-	-	0,005	-
K15	0,001	0,001	0,001	0,001	0,005	0,005	0,001	-	-	0,034	0,001	-
K16	-	-	-	-	-	-	-	0,034	-	-	-	0,005
K17	0,034	0,034	0,034	0,034	-	-	0,034	-	-	-	0,034	0,034
K18	0,034	0,034	0,034	0,034	-	-	0,034	-	-	-	0,034	0,034
K19	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K20	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K21	-	-	-	-	-	-	-	0,005	0,034	-	-	0,001
K22	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K23	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K24	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K25	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K26	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K27	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K28	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K29	-	-	-	-	-	-	-	0,005	0,034	-	-	0,001
K30	-	-	-	-	-	-	-	0,005	0,034	-	-	0,001
K31	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K32	0,001	0,001	0,001	0,001	0,005	0,005	0,001	-	-	0,034	0,001	-
K33	0,005	0,005	0,005	0,005	0,034	0,034	0,005	-	-	-	0,005	-
K34	-	-	-	-	-	-	-	0,034	-	-	-	0,005
K35	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,005	-	-	0,001
K36	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	-	-	0,005	0,001	-

- Istatistiksel farklılığı olmadığını göstermektedir
K Kombinasyon

Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'teki verilere göre; K1 ile K7 veya K1 ve K 25 arasında α değeri 0,05 anlamlılık derecesine göre, BDM ortalamalar arasında istatistiksel bir farklılık olup olmadığına baktığımızda bir farklılık görülmemiştir. Her iki BDM kombinasyonun kallus oluşturma açısından bir fark yaratmadıkları anlamına gelmektedir. Fakat K1 ile K31 arasında veya K1 ile K32 arasında istatistiksel bir farklılık olduğu %95 güven seviyesinde görülmüştür. Her iki BDM kombinasyonun kallus oluşturma açısından farklı şekilde etkiledikleri göstermektedir.

Kallus meydana getirme bakımından en iyi BDM kombinasyonları;

- 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA,
- 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D,
- 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D,
- 0,5 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D

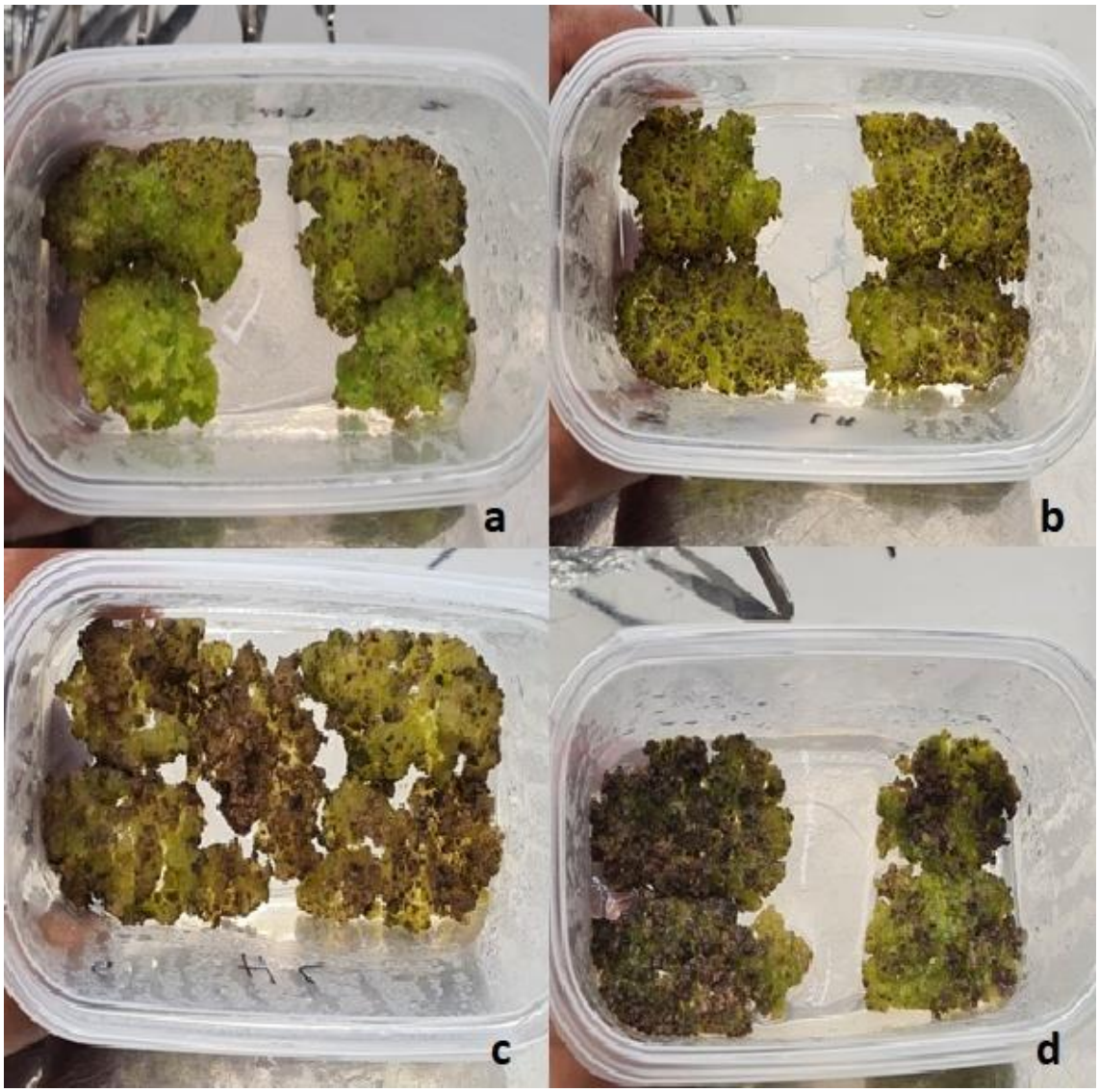
BDM kombinasyonlarının ilave edildiği MS temel besin ortamlarında bulunmuştur. Gamborg's B5 besin ortamında ise en iyi kallus oluşumları ise;

- 1 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D,
- 1mg/L BAP + 0,25 mg/L 2,4-D

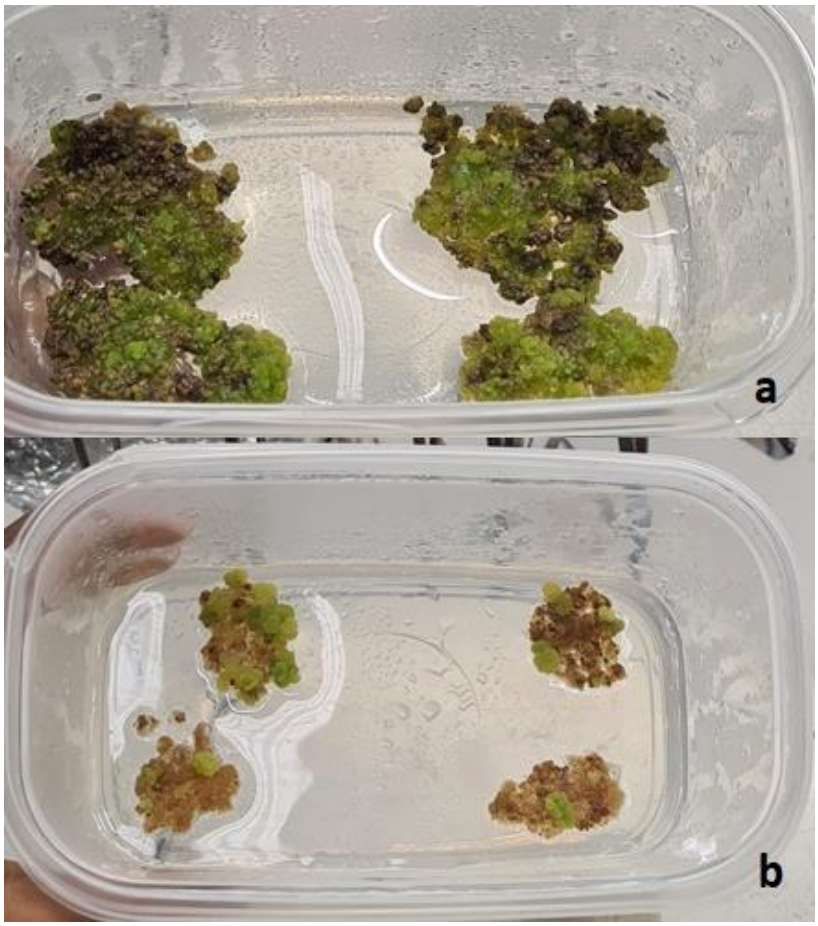
BDM kombinasyonlarında elde edilirken, en düşük kallus oluşum ortalaması;

- 0 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA,
- 0 mg/L KIN+ 0,25 mg/L IBA
- 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonları ilave edilen ortamlara ait

oldukları gözlemlenmiştir. Besin ortamlarında en yüksek kallus oluşum oranı Murashige ve Skoog (MS) besin ortamından elde edilirken, Gamborg's B5 besin ortamı MS ortamına göre daha düşük sonuçlar vermiştir.



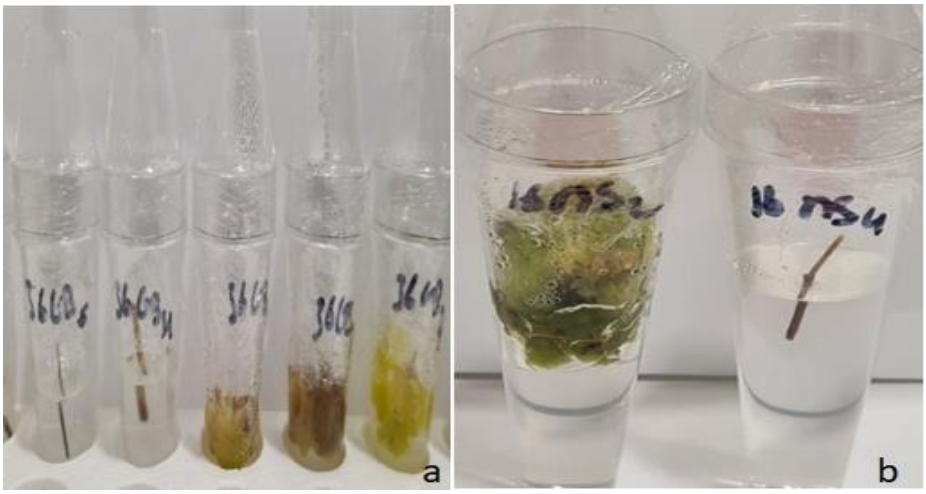
Şekil 4.1 MS besin ortamında elde edilen kalluslar **a)** 1 mg/L BAP + 0,25 IBA mg/L kombinasyonunda kallus gelişimi **b)** 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi **c)** 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi **d)** 0,5 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi



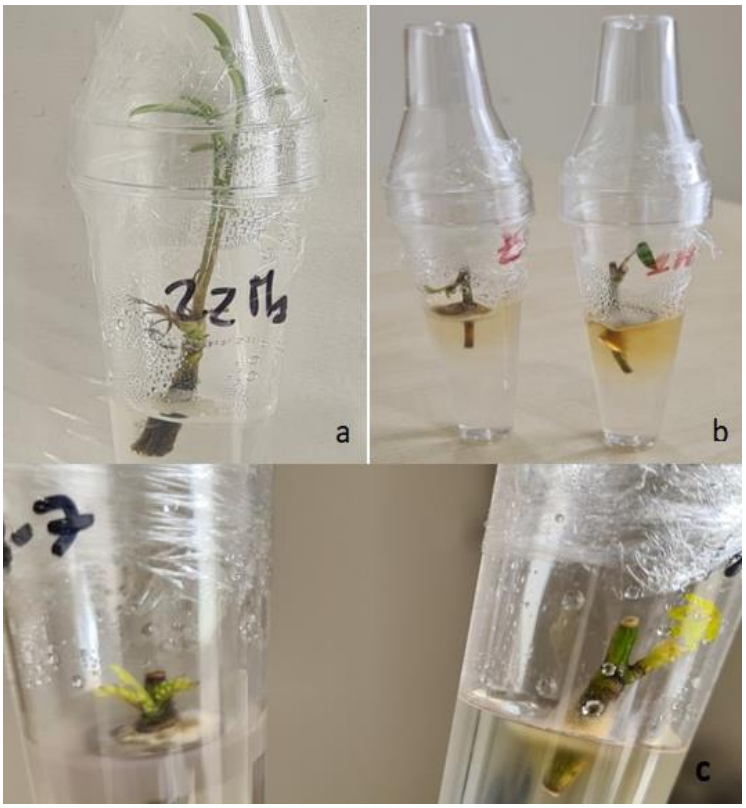
Şekil 4.2 Gamborg's B5 besin ortamında kallus gelişimi **a)** 1 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi **b)** 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi

4.3 Yaşam Belirtisi Kaybeden Eksplantlar

Temel besin ortamı, BDM kombinasyonu, inkübasyon süresi açısından aynı deneme koşullarına sahip tekerrürlerde eksplantlarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bir eksplant sürgün oluşumu veya kallus meydana getirirken diğeri ise herhangi bir yaşam ya da rejenerasyon belirtisi göstermemiştir (Şekil 4.3). Ayrıca, bitkinin kendisinden kaynaklı içsel enfeksiyonlarından olmuştur (Şekil 4.4). Bitkinin jipsli topraklı araziden direk olarak alınarak laboratuvar şartlarında *in vitro* çoğaltım için hazırlanması rejenerasyon yeteneğinde bir takım azalmalara da sebep olmaktadır. Zorlu dış koşullardan laboratuvar şartlarına getirilen ve çoğaltım amacıyla hazırlanan eksplantların etkin bir yüzey sterilizasyon protokolüne tabi tutulması rejenerasyon kabiliyetinde azalmaya sebep olmuştur.



Şekil 4.3 Aynı tekerrürden elde edilen farklı sonuçlar **a)** Gamborg's B5 besin ortamında 1 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi **b)** MS ortamında 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kallus gelişimi



Şekil 4.4 Başlangıç aşamasında sürgün oluşumundan sonra enfeksiyonlar **a)** 0,5 mg/L KIN konsantrasyonunda sürgün enfeksiyonu **b)** BDM içermeyen ortamda direkt rejenerasyon sürgünün enfeksiyonu **c)** Sadece 0,25 mg/L IBA ve 1 mg/L BAP içeren ortamın sürgün enfeksiyonu

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, lokal endemik, ve tehlike altındaki bitkiler kategorisinde yer alan *Onobrychis 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.

Fabaceae familyasının bitkilerinin *in vitro* mikroçoğaltımı amacıyla tohum, sürgün ucu ve nodları eksplant kaynağı olarak birçok çalışmada da başarıyla kullanılmıştır (Hiroshi and Zhumeng 1993, Özgen *et al*. 1997, Özgen *et al*. 1998, Akçura vd. 1999, Sancak 1999, Tamas and Savatti 2006, Karamian and Ranjbar 2008, Sağlam 2010, Garshasbi *et al*. 2012, Mohajer *et al*. 2012, Kamalvand and Karamian 2013, Turgut 2014, Yükselgüngör 2018, Uysal ve Topbaş 2021).

Çankırı ilinin jipsli tepeleri üzerinde yayılış gösteren *O. 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). Bitkilerin araziden toplanmasında bu duruma dikkat edilmiştir. Bu çalışma sırasında farklı türde sorunlarla karşılaşılmıştır. İnatçı ve tekrarlayan farklı türde (bakteriyel ve fungal) enfeksiyonlar nedeniyle iki kez gerçekleştirilmiştir. En sık karşılaşılmış enfeksiyon türü, eksplantların inkübasyon tarihinden sadece 3 ila 6 gün sonra görülen enfeksiyonlarıyken, bazı eksplantların direkt veya indirekt sürgün rejenerasyonu sonrasından gelişen içsel kaynaklı enfeksiyonlar görülmüştür. Başlangıç ortamında bir süre sonra gelişen beyazımsı bakteri kolonisi katmanları ve fungus hiflerinin oluşumları tespit edilmiştir (Şekil 4.4). İkinci denemede, eksplantlar kültüre alınmadan önce tüm dış ve iç kaynaklı enfeksiyonların uzaklaştırılması amacıyla fungusit ve $HgCl_2$ ile takviye edilmiş yeni bir sterilizasyon protokolü uygulanmıştır (Kapdan and Sezgin 2021) (Şekil 3.4). Öte yandan, bitkinin tüylü yapısı (mikroorganizma barınağı) ve jipsli

toprağa yakın bulunması kolaylıkla uzaklaştırılamayan enfeksiyonlara da sebep olmuştur.

Sterilizasyon probleminin giderilmesinin ardından eksplantlar MS ve Gamborg's B5 temel besin ortamlarına 36 farklı BDM kombinasyonu ile hazırlanmış ortamlara dikilmiştir. Denemelerde tüm kombinasyonlar 10'ar tekerrür olarak hazırlanmıştır. Denemelerde elde edilen sonuçların farklılıkları izlenmiştir. Bazı eksplantlarda kallus ya da sürgün oluşumu meydana gelirken büyük kısmında ise herhangi bir yaşam ya da rejenerasyon belirtisi olmamıştır. Laboratuvar şartlarına getirilen ve *in vitro* mikroçoğaltım amacıyla hazırlanan eksplantlarda etkin ve kuvvetli bir yüzey sterilizasyon protokolünün uygulanması bitkilerin rejenerasyon kabiliyetinde azalmaya sebep olmuştur.

Çalışmada *O. germanicopolitana* bitkisinin sürgün ucu ve boğum arası eksplantlarından doğrudan bitki rejenerasyonu hedefi sağlanamamıştır. Ancak elde edilen kalluslardan yeniden indirekt organogenesis yöntemi ile bitki rejenerasyonu hedeflenmiştir. *O. germanicopolitana* bitkisinin IUCN kırmızı liste kategorisine göre yok olma tehlikesi altındaki bitkiler listesinde yer alması 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.

*O. germanicopolitana'*nın doku kültürü ile *in vitro* mikroçoğaltımı hedefinden elde edilen kallus oluşumunun verileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. MS, Gamborg's B5 temel besin ortamları ile farklı BDM kombinasyonları arasında kallus oluşumu bakımından istatistiksel farkın önemi araştırılmıştır. Bu amaçla, sonuçlardan elde edilen verilerin ortalaması varyans analizi çoklu karşılaştırma Game-Howell Nonparametric Post-Hoc testine göre yapılmıştır. Bitki gelişimde karşılaştığımız sorunlardan dolayı elde ettiğimiz veriler sonuçta çok düşük olmuş ve "temel besin ortamları" arasındaki istatistiksel farklılık önemli bulunmamıştır. Ancak bunun aksine "BDM kombinasyonu" bağımsız değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı

bulunmuştur ($p \leq 0,01$). Her iki temel besin ortamında kullanılan BDM'lerin ortalamalarının istatistiksel farklılığına bakılmış ve $\alpha = 0,05$ anlamlık derecesine göre anlamlı bulunmuştur. Tüm BDM kombinasyonlarının kallus büyümesi üzerinde aynı etkiye sahip olmadığını fark edilmiştir. Bazı BDM kombinasyonları kallus oluşumunda endüktif olurken, diğerleri ise çok fazla etkili olmamıştır (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3).

En iyi kallus oluşumu 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA, 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D ve 0,5 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D BDM kombinasyonlarının ilave edildiği MS besin ortamlarında bulunmuştur. Gamborg's B5 besin ortamında ise en iyi kallus oluşumu 1 mg/L KIN + 0,5 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L 2,4-D BDM kombinasyonlarında elde edilirken, en düşük kallus oluşumu 0 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA, 0 mg/L KIN + 0,25 mg/L IBA, 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonlarının ilave edildiği ortamlara ait oldukları gözlemlenmiştir. Besin ortamlarında en yüksek kallus oluşum oranı MS besin ortamından elde edilmiştir, Gamborg's B5 besin ortamı MS ortamına göre daha düşük sonuçlar vermiştir.

O. germanicopolitana, jipsli habitatlarda yüksek kalsiyum (Ca) ve sülfat (SO_4) oranlarına sahip topraklarda yetişen bir bitkidir. Habitatında edafik istekleri arasında kalsiyum ve sülfat inorganik maddelerin oranı dengeli olmalıdır. Çalışmada kullanılan temel besin ortamlarından (Çizelge 3.1) MS besin ortamında Ca, kalsiyum klorürü dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$) formunda 440 mg/L iken Gamborg's B5 ortamında 150 mg/L oranında bulunmaktadır. MS besin ortamında SO_4 ise Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$) olarak 370 mg/L, Demir sülfat heptahidrat ($FeSO_4.7H_2O$) olarak 27,8 mg/L, Mangan sülfat monohidrat ($MnSO_4.\ H_2O$) olarak 16 mg/L, Çinko sülfat heptahidrat ($ZnSO_4.7H_2O$) olarak 8,6 mg/L ve Bakır sülfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$) olarak da 0,025 mg/L olarak bulunmaktadır. Gamborg's B5 besin ortamında ise bu Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$) olarak 250 mg/L, Demir sülfat heptahidrat ($FeSO_4.7H_2O$) olarak 27,8 mg/L, Mangan sülfat monohidrat ($MnSO_4.\ H_2O$) olarak 10 mg/L, Çinko sülfat heptahidrat ($ZnSO_4.7H_2O$) olarak 2 mg/L ve Bakır sülfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$) olarak da 0,025 mg/L olarak bulunmaktadır (Chawla 2002). Gamborg's B5 besin ortamı MS ortamına göre daha düşük sonuçlar vermesi besin ortamlarının inorganik mineral madde içeriklerinin farklı olması nedeniyledir.

Sonuçlarımıza benzer bir şekilde Kamalvand ve Karamian (2013)'te, *O. altissima'*nin epikotil ve kotiledon eksplantlarını farklı konsantrasyonlarda BAP ve 2,4-D BDM'lerini ilave edilmiş MS ortamına almıştır. Eksplantlardan organogenesis potansiyeli olmayan kalluslar gelişmiştir.

Karamian ve Ranjbar (2008)'de yaptıkları çalışmada da *O. subnitens'*nin hipokotil eksplantları yine farklı BAP ve 2,4- D konsantrasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmış, organogenik kallus oluşumu sağlanmıştır. Kalluslarda organ oluşturmak amacıyla 1 mg/L BAP ve 0,5 mg/L NAA içeren MS ortamında kültür edilmiş ve tam bitkiye dönüş sağlanmıştır. Çalışmada eksplantlar başta BDM içermeyen besin ortamlarına alında da eksplant başına kallus oluşturma oranı genellikle düşük olduğu için, elde edilen kalluslar organogenesis amacıyla bir besin ortamına transfer edilmeden önce, yeterli miktara ulaşmak için BDM içeren asıl büyüme ortamlarında tutulmuştur.

Özgen vd. (1997) ve Erdoğan vd. (2004)'te, yaptıkları çalışmalarda, Fabaceae familyasına ait bireylerin tohumlarından gelişen fidelerin sürgünlerini ve boğumlarını eksplant olarak kullanıp, farklı BAP ve NAA kansantrasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre almıştır. Sırasıyla eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 2 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA ve 4 mg/L BAP + 0,25 mg/L NAA içeren besin ortamlarına ait oldukları belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda, doğadaki bitkiden elde edilen sürgün eksplantları kullanılmış, eksplant kaynağı doğal habitatlarından toplanmış bitki olup tamamen sterilize edilmesi imkansız olduğu ve enfeksiyon oluşma ihtimalinin arttığı fark edilmiştir. Garshasbi vd. (2012)'de *O. sativa* apikal meristem ucunu eksplant kaynağı olarak kullanmış 6 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP içeren ortamından en büyük kallus 5,46 cm elde edilmiştir. Sağlam (2010)'da, *O. viciifolia* kotiledon boğum eksplantları farklı NAA ve BAP konsantrasyonları ilave edilmiş MS ortamında kültüre alınmış, en uzun sürgün boyun 6,79cm 1 mg/L BAP ve 0,02 mg/L NAA konsantrasyonunda bulunmuştur. Bizim çalışmamızdaki en büyük kallus 6-7cm boyutta olup 1 mg/L BAP ve 0,5 mg/L 2,4-D içeren ortama ait olduğu gözlemlenmiştir. Garshasbi vd. (2012) ve Sağlam (2010)'da, çalışmamıza göre yüksek dozda oksin kullanıldığı anlaşılmıştır.

Sonuç olarak TÜBİTAK tarafından hazırlanan 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, IUCN kırmızı listesi tarafından yok olma tehlikesi altındaki bitkiler listesinde bulunan ve lokal endemik olan *Onobrychis germanicopolitana* bitkisinin *in vitro* çoğaltımı açısından tek ve ilktir. Başlangıç aşamasında kullanılan 2 farklı besin ortamı, 36 farklı BDM kombinasyonu ve bir katılaştırıcının denenmesi açısından kapsamlı bir optimizasyon çalışmasıdır. Bu konu ileride çalışılabilecek olan *O. germanicopolitana* veya diğer endemik bitkilerin *in vitro* çoğaltımı ve rejenerasyonu konusundaki araştırmalarda önemli bir ön kaynak olarak kullanılabilecektir. Elde edilen kallusları üzerinde tanen ekstraksiyon çalışmaları ve mikrosatellit belirteçleri kullanarak bazı korunga popülasyonlarında genetik çeşitliliğin (polimorfizm) belirlenmesi gibi çalışmalar yapmak için uygundur.

KAYNAKLAR

Açıkgöz, E. 2001. Yem Bitkileri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 2 Bölüm, Baklagil Yem Bitkileri. 54s.

Akçura, M. Eskalen, A. ve Elçi, S. 1999. Korungada (*Onobrychis viciifolia*) kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu. Tarla Bitkileri Kongresi,Cilt I, Genel ve Tahıllar., s 47-51, Adana.

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: 05.08.2021.

Anonim, 2019. https://www.bingol.edu.tr/documents/BAKLAG%C4%B0L%20YEMB%C4%B0TK%C4%B0LER%C4%B0.pdf. Erişim tarihi: 29.04.2021.

Anonim, 2021. Yem bitkileri-Korunga. https://www.amasyadsyb.org/sut/yembitki/10. Erişim tarihi: 20.11.2021.

Anonim, 2021. Çankırı jipsli tepeleri. https://www.dogadernegi.org/wp-content/uploads/2018/11/ort030-cankiri-jipsli-tepeleri-onemli-doga-alanlari-kitabi.pdf. Erisim tarihi: 12.12.2021.

Anonymous, 2015. Medicinal plants and their uses. http://medicinalplants. us/onobrychis-viciifolia-scop-sainfoin. Erişim tarihi: 15.10.2021.

Azani, N. Babineau, M. Bailey, C. Banks, H. Barbosa, AR. Pinto, RB. and Zimmerman, E. 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. The Legume Phylogeny Working Group (LPWG)., 66: 44-77.

Bakis, Y. Babac, M. T. and Uslu, E. 2011. Updates and improvements of Turkish Plants Data Service (TÜBİVES) In Health Informatics and Bioinformatics.

Barna, K.S. and Wakhlu, A.K. 1994. Whole plant regeneration of Cicer arietinum from callus cultures via organogenesis. Plant Cell Rep., 13: 510-513.

Bhatt, I. D. and Dhar, U. 2000. Combined effect of cytokinin on multiple shoot production from cotyledonary node explants of *Bauhinia vahlii*. Plant Cell, Tissue Organ Cult., 62: 79-83.

Budak, F. 2013. Iğdır İli çayır-mera ve yem bitkilerinin durumu hayvan beslenmesinde önemi. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi., 6: 49-55.

Carbonero, C. H. Mueller-Harvey, I. Brown, TA. and Smith, L. 2011. Sainfoin (Onobrychis viciifolia) a beneficial forage legume. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization., 9:70-85.

Chawla, H., S. 2002. Nutrition medium, In: Introduction to Plant Biotechnology. Science Puplisher,Inc, pp. 16-17, USA.

Çeliktaş, N. Can, E. Hatipoğlu, R. and Avci, S. 2006. Somatic embryogenesis, callus production, and plantlet growth in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). New Zealand Journal of Agricultural Research., 49(4):383-388.

Çöçü, S. Uranbey, S. ve Sancak, C. 2003. Bazı yaygın fiğ (*Vicia sativa* L.) çesitlerinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi .,9 (4): 445-449.

Dadaşoğlu, E. ve Tosun, M. 2017. Bazı bitki büyüme düzenleyici maddelerinin korungada (*Onobrychis sativa* L.) *in vitro* özellikler üzerine etkisi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.,7(3): 267-278.

Davis, P.H. 1965-1985. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.1-9. Edinburgh University Press, 560p, Edinburgh.

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.

Erdoğan, Y. Çöçü, S. Parmaksız, İ. Sancak, C. ve Arslan, O. 2004. Bazı Burçak (*Vicia Ervilia*L.Wild.) kotiledon boğum eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi., 10:206-210.

Gamborg, O.L. Miller, R.A. and Ojima, O. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Experimental Cell Research., 50:151-158.

Garshasbi, H. Omidi, M. Torabi, S. and Davodi, D. 2012. The study of phytobiomes and explants on callus induction and regeneration of sainfoin (*Onobrychis sativa*).Pakistan Journal of Agricultural Science., 49:319-322.

Girard, M. Dohme-Meier, F. Wechsler, D. Goy, D. Kreuzer, M. and Bee, G. 2016. Ability of 3 tanniferous forage legumes to modify quality of milk and Gruyère-type cheese. Journal of Dairy Science., 99: 205-220.

Hedge, I.C., 1970. Hedysarum L, In: Davis, P.H. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, pp. 549-560, Edinburgh.

Heil, M., Baumann, B., Andary, C., Linsenmair, KE., and McKey, D. 2002. Extraction and quantification of condensed tannins as a measure of plant anti-herbivore defence, In: Revisiting an old problem. Naturwissenschaften, pp. 89: 519-524. Germany.

Hiroshi, N., and Zhumeng, Y., 1993. Tissue culture of sainfoin, In: Proceeding of the XVII international grassland congres, pp. 1044-1045.

Kahramanoğulları, C. T. 2012. *Lathyrus Chrysanthus* BOISS. Bitkisinde ın vıtro sürgün rejenerasyonu üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, 54 sayfa, Ankara.

Kamalvand, A. and Karamian, R. 2013. Somatic embryogenesis and organogenesis studies in tissue culture of *Onobrychis altissima* Gross. Asian Journal of Medical and Pharmaceutical Research., 3: 115-119.

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

Karamian, R. and Ranjbar M. 2008. Plant regeneration from Onobrychis subnitens Bornm. Hypocotyl explants via somatic embryogenesis and organogenesis. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica., 50: 13-18.

Kempf, K. 2016. Self fertilization and marker-trait associations in Sainfoin (Onobrychis viciifolia). Doktoral Thesis, University of Hohenheim, pp 196, Almanya.

Knuth, P. 1906-1909. Handbook of flower pollination (trans by J. R. Ainsworth-Davis). Claredon Press, Oxford.; 3: 318-320.

Kocaçalışkan, İ. 2008. Bitki Fizyolojisi. Nobel Yayıncılık No:1338, 361 sayfa, Ankara

Makkar, H.P.S. 2003. Effects on fate tannins in ruminant animals, adaptation to tannins ans strategies to overcome detrimental effects of feeding tanin-rich feeds. Small Ruminant Research., 49: 241-256.

Mansuroğlu, S., and Gürel, E. 2002. Mikroçoğaltım In: Bitki Biyoteknolojisi I. Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds), Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, s. 262-281, Konya.

Mohajer, S. Taha, R. M. Khorasani, A. and Yaacob, J. S. 2012. Induction of different types of callus and somatic embryogenesis in various explants of Sainfoin (*Onobrychis sativa*). Australian Journal of Crop Science., 6: 1305-1313.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum., 15: 473-497.

Özbek, H. 2011. Korunga (*Onobrychis viciifolia*) önemli bir arı bitkisi. Arı Bilimi.,11: 51-62.

Özgen, M. Altınok, S. Özcan, S. and Sevimay, C.S. 1997. *İn vitro* micropropagation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars. Tr. J. of Botany., 21: 275-278.

Özgen, M. Özcan, S. Sevimay, C. S. Sancak, C. and Yıldız, M. 1998. High frequency adventitious shoot rejeneration in sainfoin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture., 52: 205-208.

Öztürk, M. 2002. Akvaryum bitkisi *Ludwigia sp*'nin *in vitro* koşullarda coğaltımına farklı oranlardaki büyüme düzenleyicilerin etkileri. Yüksek LisansTezi. Ankara Üniversitesi, 46 sayfa, Ankara.

Sağlam, S. 2010. Growth regulators effects on *in vitro* shoot regeneration of sainfoin (*Onobrychis sativa* Lam.). Biotechnology & Biotechnological Equipment., 24: 2077-2079.

Sancak, C. 1999. *İn vitro* Micropropagation of Sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.). Tr. J. of Botany., 23:133–136.

Serrano, J. Puupponen-Pimia, R. Dauer, A. Aura, A-M. and Saura-Calixto, F. 2009. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. Mol Nutr Food Res., 53: 310-329.

Shibli, R.A. and Ajlouni, M.M. 2000. Somatic embryogenesis in the endemic black iris (*Iris nigricans*). Plant Cell, Tiss. Org. Culture., 61: 15-21.

Şenkul, Ç. ve Kaya, S. 2017. Türkiye endemik bitkilerinin coğrafi dağılışı Üniversitesi. Türk Coğrafya Dergisi., 69: 109-120.

Tamas, E. and Savatti, M. 2006. Micropropagation in vitro asparcetei (*Onobrychisviciifolia* Scop.) Agricultura - StiinNa si practica nr., 1-2: 57-58.

Turgut, B.M. 2014. Korunga (*Onobrychis sativa* l.)'da farklı TDZ (Thıdıazuron) uygulamalarının *in vitro* sürgün rejenerasyonuna etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, 51 sayfa, Ankara.

Uysal, H. ve Topbaş, T. 2021. Korunga (Onobrychis viciifolia) hipokotil eksplantlarının *in vitro* rejenerasyon yeteneğinin belirlenmesi. Türk Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği., 372: 75-82.

Volf, M. Hrcek, J. Julkunen-Tiitto, R. and Novotny, V. 2015. To each its own: Differential response of specialist and generalist herbivores to plant defence in willows. Journal of Animal Ecology., 84: 1123-1132.

Yıldız, M. and Özgen, M. 2006. A comparison of growth regulators for adventitious shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum* L.). Journal of Food, Agriculture and Environment., 4: 171-174.

Yücel, G. 2019. Kültürü yapılan korunga (*onobrychis* mill., baklagiller) taksonları ve bazı yabani akrabalarının moleküler sitogenetik yöntemler ile karakterizasyonu. Doktora Tezi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, 141 sayfa, Tekirdağ.

Yükselgüngör, D. 2018. Bazı korunga türlerinde doku kültürü Yöntemleri ile bitki çoğaltımı. Yükseklisans tezi. Erciyes üniversitesi, 55 sayfa, Kayseri.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Radia ABDOURAHMAN ABDILLAHI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2018-2022
Lisans	Cibuti Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü	2014-2017

İş Deneyimi

Yıl	**Kurum**	**Görev**
2019-2021	LIV Ankara Hastanesi	Tercümanlık

Akademik Aktiviteler

1. **Abdourahman, R.** and Sezgin, M. 2019. "Adaptation of plants to environmental stress conditions", 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasian BioChe 2019). June 28-29 2019/Ankara.

2. **Abdourahman, R.** and Sezgin, M. 2021. "Role of salicylic acid in plants under salinity stress", Book of Full Text Black Sea Summit 7th International Applied Sciences Congress. September 29 2021/ Ordu.