ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

Fatouma AHMED ALİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Fatouma AHMED ALI tarafından hazırlanan **"*Gypsophila simonii* Hub.-Mor.'un *in vitro* Koşullarda Çoğaltımı"** adlı tez çalışması 09/02/2023 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 **:** Doç. Dr. Mehmet SEZGİN

Jüri Üyeleri **:**

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

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

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Biyoloji Anabilim Dalı
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 "***Gypsophila simonii* 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" ile 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 (09/02/2023).

Fatouma AHMED ALİ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

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

Fatouma AHMED ALİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet SEZGİN

Bu çalışmada, yarı kurak ve kurak alanlara sahip Çankırı ilinde, lokal endemik olarak yetişen, tıbbi aromatik bitkiler arasında yer alan ve ayrıca yok olma tehlikesi altında bulunan (EN) *Gypsophila simonii* HUB.-MOR. bitkisinin *in vitro* teknikler yardımıyla çoğaltımı amaçlanmıştır. Bu nedenle, *G. simonii*'nin *in vitro* yöntemle çoğaltımı için 3 farklı temel besin ortamı kullanılmıştır [a) Murashige ve Skoog(MS) b) Nitsch & Nitsch (NN) c) Gamborg's B5], katılaştırıcı (2,1 g/L gelrite), 6 sitokinin ve 6 oksin [a) 6-benzylaminopurin (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) Indol3-bütirik asit (IBA) (0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L), d) α-naftalen asetik asit (NAA) (0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L)] dozunun yer aldığı 36 farklı kombinasyonda hazırlanan bitki büyüme düzenleyicilerle birlikte besin ortamlarına ve karbon kaynağı olarak 30 g/L sakkaroz ilave edilmiş ve ortamın pH'sı 5,7'ye ayarlanmıştır. Bitkinin çoğaltımı aşamasında, sık sık yüzeysel ve içsel enfeksiyona rastlanmış, bu nedeniyle deney iki kez tekrarlanmış ve bu durum geliştirilen protokol ile giderilmiştir. En yüksek sürgün sayısı (40), KIN (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) bitki büyüme düzenleyici madde kombinasyonunu içeren MS besin ortamında elde edilmiştir. Köklendirme aşamasında, MS besin ortamı daha etkili olmuştur. En iyi kallus gelişimi MS besin ortamına, 0 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA, 0,5 mg/L BAP + 0 mg/L IBA, 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg /L IBA, 0 mg/L BAP + 0,25 mg/L NAA 0 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA, 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA, 0 mg/ L KIN + 0,25 mg/L IBA, 0 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA, eklenmiş bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarında elde edilmiştir. Bu endemik türe ait *in vitro* çoğaltım çalışmalarının yeterince yapılmamış olması ve ileride yapılacak çalışmalara temel oluşturması bakımından önem taşımaktadır.

2023, 37 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Doku kültürü, Endemik, *Gypsophila simonii*, *In vitro* çoğaltım, Saponin

ABSTRACT

Master of Science Thesis

IN VITRO MICROPROPAGATION OF *GYPSOPHILA SIMONII* HUB. MOR

Fatouma AHMED ALI

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

Advisor: Assoc.Prof.Dr. Mehmet SEZGİN

In this thesis study, it was aimed to propagate the plant of *Gypsophila simonii* HUB.-MOR. using *in vitro* techniques. This plant is a local endemic in Çankırı Province with arid and semi-arid lands, and an endangered (EN) species taking part among medicinal and aromatic plants. Therefore, 3 different basal media were used for *in vitro* propagation of *G. simonii* [a) Murashige and Skoog b) Nitsch & Nitsch c) Gamborg's B5], a solidifier (2.1 g/ L gelrite), 6 cytokinins and 6 auxins [a) 6-benzylaminopurine (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) Indole3-butyric acid (IBA) (0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L), d) α-naphthalene acetic acid (NAA) (0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L)] along with plant growth regulators prepared in 36 different combinations with 30 g/L sucrose was added to the basal media and as a carbon source, and the pH of the medium was set 5.7. During the *in vitro* propagation of the plant, superficial and internal infections were frequently encountered, so the experiment was repeated twice and this situation was resolved with the protocol developed for the plant. The highest shoot number (40) was obtained in MS nutrient medium containing the combination of KIN (0 mg/L) + NAA (0.5 mg/L) PGR. In the rooting stage, MS basal medium was more effective. The best callus development is in MS basal medium, 0 mg/L BAP + 0.5 mg/L IBA, 0.5 mg/L BAP + 0 mg/L IBA, 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L IBA, 0 mg/L BAP + 0.25 mg/L NAA 0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA, 0 mg/L KIN + 0.25 mg/L IBA, 0 mg/L KIN + 0.5 mg/L NAA, supplemented with plant growth regulator. It is important that *in vitro* reproduction studies of this endemic species have not been carried out sufficiently and that it will form the basis for future studies.

2023, 37 pages

Keywords: Endemic, *In vitro* propagation, *Gypsophila simonii*, Tissue culture, Saponin

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

"*Gypsophila simonii* Hub.-Mor.'un *in vitro* Koşullarda Çoğaltımı" adlı bu çalışma, Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışma konusunun seçiminden, çalışmanın sonlandırılmasına kadar her aşamada desteğini esirgemeden, bilgi ve tecrübesini her zaman bize aktaran Tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet SEZGİN'e 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 ve arkadaşım Fathia'ya sonsuz şükranlarımı sunarım.

Fatouma AHMED ALİ
Çankırı, Şubat 2023

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 Familyasındaki Diğer Türlerin *in vitro* Çoğaltım Çalışmaları 6
2.2 *Gypsophila* sp.'de *in vitro* Çoğaltım Çalışmaları 8
3. MATERYAL VE YÖNTEM 11
3.1 Bitki Materyali Temini 11
3.2 Yöntem 12
3.2.1 Sterilizasyon 12
3.2.2 *In vitro* çoğaltımın başlangıç aşamasında kullanılacak besin ortamı bileşimleri 13
3.2.3 Eksplantların dikimi ve ınkübe edilmesi 16
3.2.4 Alt kültür 17
3.2.5 Köklendirme aşaması 18
3.2.6 İstatistiksel analiz 19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 20
4.1 *G. simonii*'nin Rejenerasyonu 20
4.2 Organogenik Kallus Oluşumu 20
4.3 Rejenere ve Enfekte Eksplantlar 27
5. SONUÇ VE TARTIŞMA 29
KAYNAKLAR 33
ÖZGEÇMİŞ 37

SİMGELER DİZİNİ

cm	Santimetre
g	Gram
g/L	Gram/litre
L	Litre
mg/L	Miligram/litre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molar
µM	Mikromolar
°C	Santigrat derece
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

2,4-D	2,4- Diklorofenoksiasetik asit
BA	Benziladenin
BAP	6- benzylaminopurin
BDM	Büyüme düzenleyici madde
Dk	Dakika
GB	Gamborg's B5 besin ortamı
$HgCl_2$	Civa klorür
IAA	İndolasetik asit
IBA	Indolbütirik asit
KIN	Kinetin
MS	Murashige ve Skoog temel besin ortamı
NAA	Naftalenasetikasit
NaOCl	Sodyum hipoklorit
NN	Nitsch & Nitsch besin ortamı
TDZ	Thidiazuron
WPM	Woody plant medium
ZEA	Zeatin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 *G. simonii*'nın yayılış alanı Çankırı/TÜRKİYE (Bakış *et al.* 2011) 4
Şekil 1.2 *G. simonii*'nın genel görünümü a) habitatı b) çiçekleri c) habitusu 4
Şekil 3.1 *G. simonii*'nin toplandığı jipsli arazilerin jeolojik görünümü (Anonim 2021) 11
Şekil 3.2 *G. simonii* bitkisinin jipsli habitatı..... 12
Şekil 3.3 *G.simonii*'nin sterilizasyon amacıyla hazırlanması a) Bitkinin sürgünlerine ayrılması b) Yapraklarından arındırılmış sürgünler c) Bitki kesme işlemi d) Dikime hazır eksplantlar 13
Şekil 3.4 Besin ortamlarının laminar flow kabin içerisinde tüplere dağıtılması..... 15
Şekil 3.5 Steril ortamda *G. simonii* bitkisinin dikimi a) Tüplere eksplantları dikimi b) Tüp içerisindeki eksplantlar 16
Şekil 3.6 İnkübe edilen eksplantlar (25±1ºC sıcaklık ve 16/8 saat aydınlık/karanlık).. 17
Şekil 3.7 *In vitro* koşullarda gelişen eksplantlar a) MS besin ortamında KIN (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) ortamda kallus oluşumu b) NN besin ortamında KIN (0 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) kombinasyonunda ortamlarda sürgün oluşumu c) MS besin ortamında BAP (0 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) kombinasyonunda ortamlarda sürgün oluşumu 18
Şekil 3.8 Köklendirme ortamında eksplantlar a-b) Kök ve sürgün gelişimi MS Kinetin (0,00 mg/L) + Naftalenasetikasit (0,50 mg/L) ortamında 19
Şekil 4.1 MS Kinetin (0 mg/L) + Naftalenasetikasit (0,5 mg/L) kombinasyonunda sürgün oluşumu..... 26
Şekil 4.2 MS Kinetin (0 mg/L) + Naftalenasetikasit (0,5 mg/L) kombinasyonunda kök oluşumu 26
Şekil 4.3 Aynı tekerrürden elde edilen farklı sonuçlar a) NN KIN 0 mg/L+IBA 0,25 mg/L gelrite ile katılaştırıldığı ortamlarda sürgün oluşumu b) MS BAP 0 mg/L + NAA 0,5 mg/L ortamında kallus gelişimi 27
Şekil 4.4 Başlangıç aşamasında sürgün oluşumundan sonra enfeksiyon oluşumu 28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Bazı bitki türlerinde saponin içerikleri (Yücekutlu vd. 2012) 3
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan BDM kombinasyonları..... 15
Çizelge 4.1 BDM kombinasyonları arasındaki (K1-36/K1-12) ikili karşılaştırmaları . 22
Çizelge 4.2 BDM kombinasyonları arasındaki (K1-36/K13-24) ikili karşılaştırmaları 23
Çizelge 4.3 BDM kombinasyonları arasındaki (K1-36/K25-36) ikili karşılaştırmaları 24
Çizelge 4.4 Organik kallustan sürgün oluşumu bakımından temel besin ortamları arasındaki interaksiyon etkisi (P≤0,05) 26

1. GİRİŞ

Türkiye, üç fitocoğrafik bölgenin (İran-Turan, Akdeniz ve Avrupa-Sibirya) kesiştiği, Avrasya kıtası, florasında bir köprü olduğu için çok zengin bir biyolojik çeşitliliğe sahiptir, Anadolu insanlık tarihindeki en eski yerleşim yerlerinden biridir. Anadolu'da, endemik floranın en fazla olduğu bölgeler Doğu Anadolu ve Akdeniz bölgeleridir (Korkmaz 2012).

Türkiye'de ekonomik amaçlarla birçok bitki grubu tıbbi, aromatik, tıbbi hammaddeler, boyalar, çiçekçilik vb. şekilde kullanılmaktadır. Bu şekilde kullanılan bitki cinslerinden *Gypsophila* Türkiye'de 59 taksona sahiptir (Özçelik ve Yıldırım 2011).

Caryophyllaceae, dünya çapında 100 cins ve 2000 tür ile anjiyospermlerin başlıca çift çenekli familyalarından biridir (Korkmaz 2012). Bu aileye genellikle gül ailesi veya karanfil ailesi de denmektedir. Bu familyaya ait bitkiler, çoğu nemli tropik bölgeler dışında, dünyanın her yerinde, özelliklede kuzey yarım kürede bulunmaktadır. Caryophyllaceae, esas olarak, çok çeşitli habitatlar ve büyüme formları sergiledikleri Akdeniz bölgesinde yoğunlaşmıştır. Bu familyadaki bitkiler dik, uzun, yıllık veya çok yıllık otlar veya küçük çalılardır. Sadece birkaç türü (*Sanctambrosia* spp.) büyük çalılar veya küçük ağaçlardır. Familya genişlemiş boğumları, zıt basit yaprakları, tek çiçekleri, aktinosimetrik pentamerik veya tetramerik çiçekleri, pençe benzeri taç yaprakları yanında çift kanatta on yada daha az organ ile karakterize edilmektedir (Natho 1998). Caryophyllaceae familyasının *Stellaria media, Cerastium cerastoide* ve diğer *Stellaria* spp. türleri gibi bazı türler. *Cearstium* spp., *Silene* spp., vb. tarım arazilerinde zararlı otlar olarak nitendirilir (Holm *et al.* 1997). Caryophyllaceae familyası, bahçe bitkileriyle tanınır ancak üyelerinin tıbbi önemi hakkında çok az şey bilinmektedir.

Gypsophila, Silene (yaklaşık 150 takson) ve *Dianthus*'tan (yaklaşık 70 tür) sonra Caryophyllaceae familyasının Türkiye'de yayılış gösteren üçüncü büyük cinsidir (Korkmaz 2007). *Gypsophila* sp., Dünyanın farklı yerlerinde 35 cins ve yaklaşık 470 türle, İran-Turan ve Doğu Anadolu'nun yarısından fazla bir bölümünde endemik olarak yayılış gösteren, genellikle Türkiye'de yoğunlaşmış Anadolu genetik kökenli bir türdür

(Yıldız 2012). Çok yıllık bitki yapısına sahip *Gypsophila* türleri kök yapısı açısından toprağı sıkıca sarar. Bu nedenle heyelan, su akışı ve drenaj sorunlarını önlemektedir. Ayrıca, bazı *Gypsophila* süs bitkileri olarak kabul edilebilmektedir. *Gypsophila*'nın bir kısmı da soğuğa, kuraklığa, tuz ve bor gibi elementlere karşı dayanıklıdır. Bu türün esnekliği, birçok farklı habitata büyümesini sağlamıştır (Korkmaz ve Özçelik 2011).

Gypsophila'nın çeşitli saponinleri içerdiği bilinmektedir. Saponinler, yapısal olarak steroidal veya triterpen aglikonların ve bir veya daha fazla şeker zincirinin varlığı ile karakterize edilen çeşitli bileşiklerden oluşan, bitkiler aleminde yaygın olarak görülen glikozitlerdir. Bir veya daha fazla monosakkarit grubuna bağlı aglikonlardan oluşurlar (Oleszek 2002). Yapısal çeşitlilikleri, birçok geleneksel ve endüstriyel uygulamada kullanılan fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerine yansır (Fenwick *et al.* 1991). Saponinler, yüksek bitkilerde yaygın olarak dağıtılan büyük bir glikozit sınıfıdır (Çizelge 1.1). Bu bileşikleri diğer glikozitlerden ayıran sürfaktan özellikleridir. Deterjanlar, emülgatörler, hemolitik ajanlar ve membranlar için toksik maddeler gibi saponinlere özgü özelliklere sahiptirler. Saponinler, bazıları steroid ilaçların hemi-sentezinin başlangıç noktası olduğu için ilaç endüstrisinde de incelenmiştir. *Gypsophila*'nın çoğu türü, farmakolojik özellikleri sayesinde bitkisel ilaç ve kozmetik sanayinde kullanılmaktadır. Birçok bitkisel ve geleneksel ilacın ana bileşenleri olarak kabul edilirler ve birçok farmakolojik özelliğe sahip olduklarına inanılmıştır. Saponinleri ve polifenolleri geleneksel Çin tıbbında gözlemlenen biyolojik etkilerin çoğundan sorumlu anahtar bileşenler olarak tanınmıştır.

Saponin yönünden zengin ve ekonomik değere sahip olan bu cinslerin taksonları halk arasında "Çöven, Çövenotu, Çövenkoku, Helvakökü, Sabunotu" olarak bilinmektedir. Saponin (bir tür glikozit) içerdiğinden birçok alanda kullanılmaktadır. Çöven, saponin özütünün elde edildiği bitki olarak bilinsede özün kendisi de denilebilmektedir.

Bazı *Gypsophila*'nın saponin içerikleri, geleneksel tıpta öksürük ve soğuk algınlığı ilacı olarak değerlendirildiği gibi deterjan endüstrisinde çeşitli ürünlerin kaynağı olarak kullanılır. Bitkin içeriğindeki saponin molekülleri suyla karıştırıldığında sabunlu bir köpük oluşturur. Saponinler, köpürme ve emülsifiye edici özelliklere (Price *et al.* 1987),

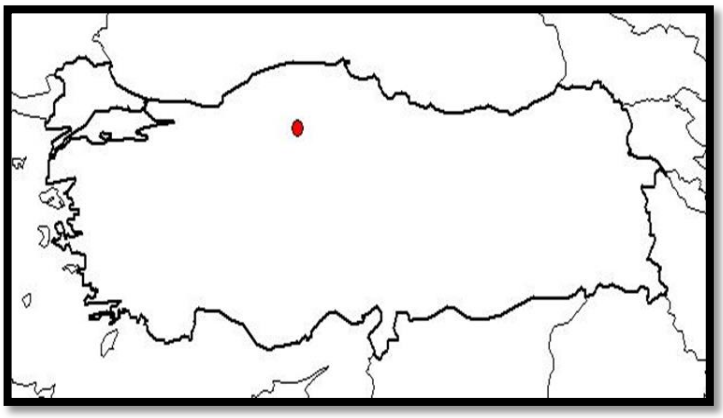
uçucu olmayan yüzey aktif madde bileşiklerine (Hostettmann and Marston 1995), tatlı ve acı tatlara (Heng *et al.* 2006) ve ayrıca antibakteriyel, böcek öldürücü, yumuşakça öldürücü gibi çeşitli özelliklere sahiptir (Sparg *et al.* 2004). Buna en güzel örnekte Isparta'da yetişen *Gypsophila perfoliata*'nın kökleridir.

Çizelge 1.1 Bazı bitki türlerinde saponin içerikleri (Yücekutlu vd. 2012)

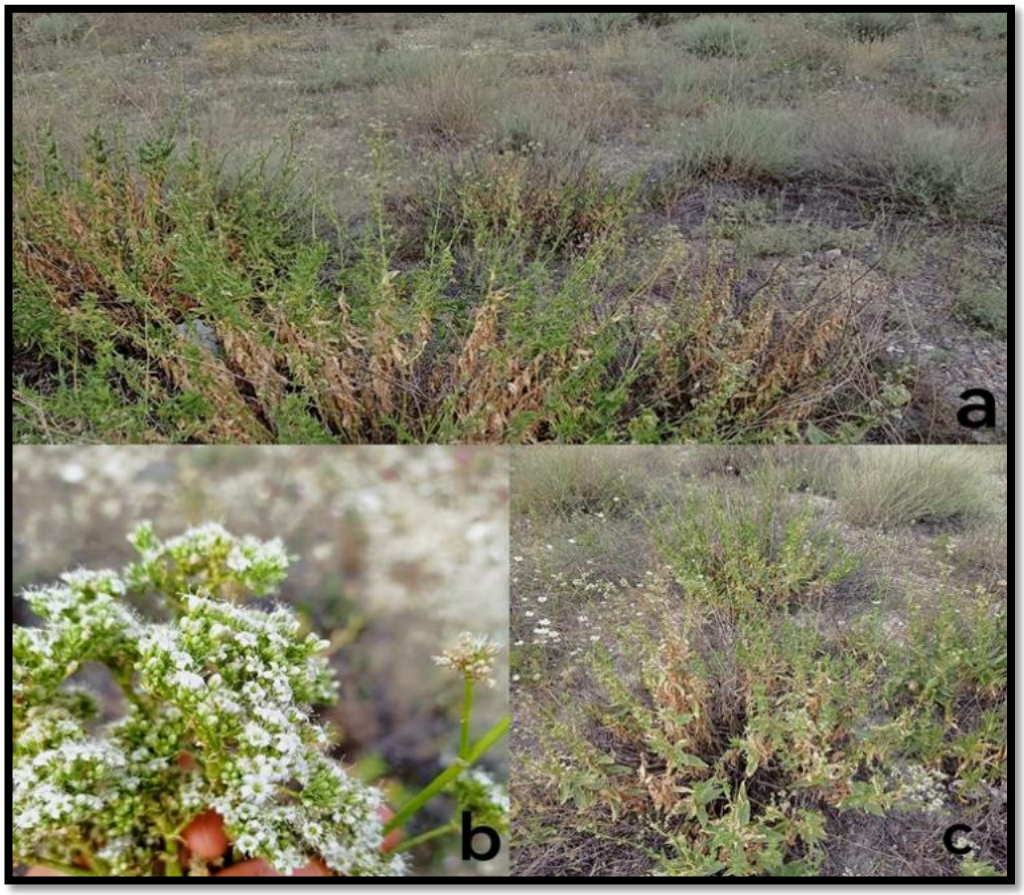
Bitki	**Saponin içeriği (%)**
G.bicolor grosh	20-25
G.arostii	11,20-11,41
G.venusta fenzl	12,65
G. eriocolly boiss	12,39
G. perfolıta var.*anatolıca*	14,44
G. paniculata	4,0
G. simonii	12,30
Soya fasulyesi	0,22-0,47
Quillaja bark	9-10
Yucca	10,00
Alfalfa	0,14-1,71
At kestanesi	3,00-6,00
Şeker kamaşı	5,80

Çankırı il merkezinin toprak yapısı jips veya üçüncü jeolojik dönemde oluşmuş jipstir. Bu toprak yapısı birçok endemik bitkiye ev sahipliği yapmaktadır. Türkiye Florası'nın ilk dokuz cildinin kayıtlarına göre Çankırı ilinde 360 takson, 119'u endemik olmak üzere 52 familyaya ait 357 tür bulunmaktadır (Ekim vd. 2000; Bakış *et al.* 2011). İlerleyen zamanlardaki flora çalışmaları ile tür sayısının 1.000'e ulaştığı tahmin edilmektedir. Çankırı sınırları içerinde yetişen *Gypsophila simonii* Hub.-Mor., yaklaşık 8000 cins 2100 türe sahip olan Caryopyllaceae familyasına ait bir bitkidir (Davis 1985; Hedge 1970). Bu tez çalışmasında, yarı kurak ve kurak alanlara sahip Karadeniz ile İç Anadolu arasında sınırı olan Çankırı'da (Şekil 1.1), lokal ve edafik endemik olarak yaşama ortamı bulan ve tıbbi aromatik bitki olan, bununla birlikte, Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Korunma Birliği (IUCN), ile birlikte Tarım ve Orman Bakanlığı'nca zarar görebilir bitkiler listesindeki (VU) *Gypsophila simonii* Hub.-Mor. (Şekil 1.2),

bitkisinin (Bakış *et al.* 2011), *in vitro* teknikler yardımıyla çoğaltımı ve aklimitizasyonu amaçlanmıştır.



Şekil 1.1 *G. simonii*'nın yayılış alanı Çankırı/TÜRKİYE (Bakış *et al.* 2011)



Şekil 1.2 *G. simonii*'nın genel görünümü a) habitatı b) çiçekleri c) habitusu

Abiyotik ve biyotik çevresel streslere maruz kalan bitkilerde, büyüme ve gelişmenin tüm aşamaları özellikle kuraklık, tuzluluk ve aşırı sıcaklık gibi abiyotik streslerden etkilenmektedir. Bitkilerin abiyotik strese en duyarlı olduğu aşamalar tohum çimlenmesi, fide gelişimi ve çiçeklenmedir (Patade *et al.* 2011, Partheeban *et al.* 2017). Abiyotik stresler ortalama mahsul verimini %50'den fazla azaltır ve dünya çapında mahsul kaybının önde gelen nedenidir (Wang *et al.* 2004). Biyotoniklik, bitki metabolizması ve morfolojisindeki değişiklikler ve büyümenin azalması ile açıklanabilen stresin bir sonucudur (Salisbury and Ross 1992). Bitkiler bu strese çeşitli fizyolojik ve metabolik değişikliklerle tepki vererek stresli koşulları minimum hasarla atlatmaya çalışırlar (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). Bu nedenle, dünyanın birçok yerinde yaygın bir sorun olan kuraklık ve tuz stresine karşı bitki tepkilerinin anlaşılması önemli bir konu haline gelmiştir (Jamil *et al.* 2011, Korkmaz ve Durmaz 2017). *Gypsophila*'nın bazı türleri, soğuk, kuraklık, tuzluluk gibi belirli stres faktörlerine karşı dayanıklıdır.

Gypsophila simonii bitkisinin, doku kültürü ile çoğaltımı konusunda yapılmış ve literatürde bu bitkinin çoğaltımı ile ilgili daha önce benzer bir çalışmaya rastlanmamış olması bu tez çalışmasını oldukça kıymetli hale getirmektedir. Çalışmada biyoteknolojik çoğaltım yöntemlerinden, yoğun, hızlı ve klonal bir çoğaltım olanağı sağlayan doku kültürü yöntemi ile *G. simonii* bitkisinin sürgün ucu ve nodlarının (boğum) eksplant olarak kullanıldığı *in vitro* koşullarda, çoğaltımı hedeflenmiştir. Eksplantlar ilk defa *in vitro* şartlar altında 3 tane besin ortamı ve 36 tane bitki büyüme düzenleyici madde (BDM) kombinasyonu kullanılarak kültüre alınmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Caryophyllaceae Familyasındaki Diğer Türlerin *in vitro* Çoğaltım Çalışmaları

Kritskaya vd. (2016), yaptıkları çalışmada, *Silene cretacea*'nın *in vitro* kültüründe mikro filiz oluşumunun özelliklerini incelemistir. MS ortamında (Murashige ve Skoog'a göre vitaminler içeren) 6- benzylaminopurin 0,2 mg/L, KIN 1,0 mg/L, Gibberellik asit (GA_3) 1,0 mg/L ve IAA 0,5 mg/L eklenmiştir. Mikroçoğaltım aşamasında IAA'nın en etkili olduğu gösterilmiştir. Matematiksel kombinasyon analizi ile seçilen bu büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonu ve konsantrasyonu, aksiller tomurcukları aktive etmiştir ve eksplant başına 9,3 ± 1,3 mikro sürgün içeren yüksek bir oran sağlanmıştır. Morfo-histolojik analiz, mikro sürgünlerin oluşumunun ana aşamalarını ortaya çıkarmıştır ve eksplantların kültür süresi boyunca kallus oluşumunun olmadığını kanıtlamıştır.

Shaulo vd. (2014), bitki materyalinin genetik stabilitesini korurken doğrudan bitki (*Dianthus mainensis*) rejenerasyonu için pratik bir yaklaşım bulmuştur. 3 mg/L BAP ilaveli MS ortamında, vitrifikasyon olmadan yüksek rejenerasyon oranları gözlenmiştir. Bitkilerin adapte olması ve köklenmesi kolay olmuştur. BDM'siz ½MS ortamı en yüksek köklenme yüzdesine ulaşılmıştır. Köklenen bitkiler sonra dış ortam şartlarına taşınmıştır.

Tejavathi ve Indira (2013), *Drymaria cordata* yaprak eksplantlarından nasır üretimi ile hızlı sürgün rejenerasyonu bu çalışmada sağlanmıştır. MS beslenme ortamı, çeşitli BAP ve TDZ karışımları ile desteklenmiştir. TDZ içeren ortamdan çok sayıda kallus gelişimi ve sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir, ancak BAP içeren ortamda herhangi bir kallus oluşumu görülmemiştir. 9 mg/L IBA içeren MS beslenme ortamının kök oluşumu için en iyi ortam olduğu rapor edilmiştir. Köklenen bitkiler saksılara alınmış ve %90'a varan oranlarda alışma sağlanmıştır.

Thiem vd. (2013), Sürgünlerin *in vitro* çoğaltma yöntemi kullanılarak, potansiyel terapötik öneme sahip bir bitki olan *Lychnis flos-cuculi* L. köklenmiştir. Hem *in vitro* hem de doğal kültürlerdeki bitkicik sürgünlerinden yararlanmıştır. Aksiller sürgünlerin üretimi sayesinde başarılı bir mikroçoğaltım protokolü oluşturulmuştur. %95'lik en yüksek bitki rejenerasyon verimliliği, eksplant başına 12'den fazla sürgün ile BAP (2,0 mg/L) ve NAA (0,2 mg/L) ile takviye edilmiştir. MS temel besin ortamında indüklenmiştir. Çoğaltılan sürgünler MS 0,5 ila 1,0 mg/L NAA ortamında, köklendikten sonra saksılara dikilmiştir. 2,4-D ve BAP içeren MS beslenme ortamında, kök eksplantlarından kallus gelişimi sağlanmıştır.

Kiani vd. (2012), *Diaphanoptera khorasanica* Rech.f bitkisi, *in vitro* çoğaltma için hedef olarak seçilmiştir. Eksplant kaynağı olarak, çeşitli gelişim aşamalarındaki fidan sürgünleri kullanılmıştır. Başlangıç aşamasında, çoğalma ve köklenme aşamaları için çeşitli büyüme düzenleyicileri (BDM) seçilmiştir. Sterilizasyon, % 1 sodyum hipoklorite 5 dakika maruz bırakıldıktan sonra, MS BAP (0,22 mg/L) ve IBA (0,24 mg/L) temel besin ortamında büyütülen eksplantlar, sürgün rejenerasyonunun en yüksek yüzdesini göstermiştir. TDZ'nin aksine, BAP ile zenginleştirilmiş ortam, hem yetişkin hem de fide eksplantlarından sürgünlerin gelişmesine izin vermiştir. 0,4 mg/L ve 0,2 mg/L NAA ile takviye edilmiş ortamda daha eski eksplantlardan büyütülen sürgünler, maksimum köklenme oranına sahiptir. Aklimitizasyon aşaması için, bitkicikler dış ortamlara taşınmıştır. Hem yaşlı hem de genç *D. khorasanica* fidelerinin eksplant kaynağı olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Erdoğan (2010), endemik *Silene sangaria*'nın mikroçoğaltımı üzerine araştırmalar yapılmıştır. Aksiller meristem, gövde ve yaprak, 0,5, 1 ve 3 mg/L NAA, BA ve 2,4-D'nin *in vitro* eksplantları çeşitli hormonal kombinasyonlarla MS ortamına eklenmiştir. Meristem, gövde ve NAA (1 mg/L) içeren MS ortamı en fazla kallus üretim oranlarını (%100) göstermiştir. İndirek organogenez ile en yüksek sürgün üretimi (%66) ve kök oluşumu (%73), sırasıyla 3 mg/L Benziladenin ortamında ve 1 mg/L'de Naftalenasetikasit ortamında büyütülen meristem eksplantlarında gözlenmiştir. Ancak değişen miktarlarda birden fazla hormon içeren ortam karışımlarında rejenerasyon mümkün olmamıştır. Köklendirme için 0,5, 1, 3 ve 5 mg/L NAA içeren ortamlar

kullanılmıştır. 1, 3 ve 5 mg/L NAA içeren ½ MS ortamı üzerinde hiçbir kök gözlenmemiştir. Buna karşılık, 0.5 mg/L NAA içeren tam MS ortamındaki fidelerin %100'ü köklenmiştir. *İn vitro* olarak başarıyla çoğaltılan *S. sangaria* fidanları dış koşullara aktarılmıştır.

Tejavathı ve Indira (2011), *Drymaria cordata*'nın boğum eksplantlarını kullanarak *in vitro* çoğaltılması için etkili bir protokol geliştirmiştir. Boğum kültürleri, tek başına veya çeşitli oksinlerle kombinasyon halinde, oksinler ve sitokininler ile desteklenmiş Murashige ve Skoog (MS) ortamında büyütülmüştür. Maksimum sürgün sayısı 19,51 ± 0,18'dir ve sadece 0,044 mg/L BAP ile güçlendirilmiş MS ortamında düğüm kültürlerinde %76,6'lık yüksek bir sürgün tepkisi frekansı elde edilmiştir. *In vitro* rejenere edilmiş sürgünler, 0,004 mg/L IBA ile MS'de köklenmiştir. Ortaya çıkan fideler başarıyla aklimatize edilmiştir. Hayatta kalma oranları yaklaşık %90 olarak kaydedilmiştir.

Miranda vd. (1999), *Stellaria longipes* Goldie hipokotil eksplantları, bir *in vitro* rejenerasyon tekniği oluşturmak için kullanılmıştır. MS beslenme ortamı, farklı miktarlarda BAP ve NAA BDM ilaveleri almıştır. Sürgünleri doğrudan ve dolaylı olarak çoğaltmak mümkün olmuştur. MS BAP (0,003 mg/L) ve IBA (0,005 mg/L) ortamında en yüksek sürgün sayısına ulaşılmıştır. Büyüyen sürgünler, kök aşaması için BDM'siz MS ortamına taşınmıştır. Başarıyla kök salmış bitkiler doğal ortamlarına taşınmıştır.

2.2 *Gypsophila* sp.'de *in vitro* Çoğaltım Çalışmaları

Üstüner vd. (2021), bu çalışmada *Gypsophila pilulifera* Boiss.&Heldr. (Caryophyllaceae) bitkisinin tuzluluk ve su stresinde *in vitro* çimlenme kabiliyeti ve büyümesi incelenmiştir. Tohumlar, farklı dozlarda NaCl (50, 100, 150, 200 mM) ve PEG 6000 (%5, %10, %15 ve %20) içeren BDM içermeyen MS ortamında büyütülmüştür. Filizlenen tohumlar ilk hafta üç gün arayla, ikinci hafta ise günlük olarak sayılmıştır. 21 gün sonra kök ve hipokotil uzunluğu, yaprak sayısı, taze ağırlık ve bitki canlılık indeksi belirlenmiştir. Artan tuzluluk ve su stresi ile tüm vejetatif büyüme

parametreleri arasında negatif korelasyonlar tespit edilmiştir. Kuruluğun en yüksek olduğu (%20) MS besin ortamında çimlenme olmasına karşın, MS besin ortamında 200 mM NaCl içeren şartlarda çimlenme elde edilememiştir. Sonuç olarak bitkinin tuz stresine kuraklığa göre daha duyarlı olduğu ve yüksek tuz konsantrasyonunun çimlenmeyi %100 oranında engellediği belirlenmiştir.

Rashid vd. (2012), Eksplant olarak apikal meristemleri, *in vitro* teknikler kullanılarak çiçekli bitki *Gypsophila paniculata* L.'nin mikro çoğaltımı için kullanılmıştır. Bitki çoğaltımı için farklı ortamlar kullanılmıştır. BAP'ın tek başıma konsantrasyonları (0,25, 0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0 mg/L ile), farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA, BAP ve KIN ile zenginleştirilmiş MS ortamında çoğaltım için kullanılmıştır. 1 mg/L BAP + 1 mg/L KIN kombinasyonları, NAA'nın farklı köklenme konsantrasyonları (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ve 0,5 mg/L) için BAP, KIN ve NAA (mg/L) kullanılmıştır. Denenen tüm besin ortamları arasında, en fazla filiz sayısı, çoklu tomurcuk oluşumu ve maksimum sürgün uzunluğu aşılamadan 4 gün sonra BAP (1 mg/L) eklenmiş besin ortamında elde edilmiştir. Bundan, 21 gün sonra aynı ortamda gözlemlenen yüzde 86'lık bir tepki ile 6,53 cm maksimum sürgün uzunluğunu göstermiştir. Kök gelişimi için en iyi ortam, dikim 11 gün sonra 2,66 cm uzunluğunda ve %85 köklenme oranıyla NAA 0,5 mg/L uygulamasında gerçekleşmiştir.

Toaima vd. (2013), bu çalışmada, farklı BDM'ler, katılaştırıcı ve şeker (sakaroz) *Gypsophila perfecta, Gypsophila paniculata* L. bitkilerinin mikroçoğaltımı ve hiperhidritesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sürgün uçları, farklı dozlarda BDM, BAP ve NAA içeren MS besin ortamına dikilmiştir. *Gypsophila paniculata*'da sürgün oluşumu en fazla 0,50 mg/L BAP ve Naftalenasetikasit içeren MS elde edilmiştir. Yüksek gelrite kullanımı, hiperhidrite ile sonuçlandığı ve kültür ortamındaki yüksek agar oranı daha etkili olduğu iletilmiştir. Köklendirme aşaması için 1 mg/L NAA ve 3 mg/L IBA ilave edilmiş ½ MS ortamında %95 köklenme oranı elde edilmiştir.

Chelariu vd. (2008), *Gypsophila muralis* üzerinde 1,0 ila 5,0 mg/L arasında değişen konsantrasyonlardaki farklı oksinlerin ve sitokininlerin MS ortamından etkisi incelenmiştir. Yanıt veren eksplantların sayısı, 2,4-D ile sağlanan besin ortamında en

yüksek olarak gerçekleşirken, IAA ilave edilen besin ortamında, morfojenik kültürlerde hücre büyümesi üzerinde olumlu bir etki sergileyen, hızlı büyüyen sarı ve yeşil kompakt kallus üretilmiştir. Sitokininlerdeki miktarındaki artış, daha kısa sürgünlerin farklılaşmasına yol açmıştır. IAA ile kombinasyon halinde BAP ile zenginleştirilmiş ortam, çoklu sürgünler geliştiren kompakt sarı-yeşil morfojenik kallus üretimini artırmıştır.

Teteryuk ve Mikhovich (2020), *Gypsophila uralensis* Less'in doku kültürü ile çoğaltımında. BA 1,0 mg/L + İndolasetik asit 0,1 mg/L eklenmiş Murashige ve Skoog temel besin ortamı ve WPM kullanmışlardır. Canlı kallus yüzdesi %82 ile %94 arasında değişmiştir. Kallus başına ortalama sürgün üretimi MS'de 6,2 ± 0,4 ve WPM'de 4,5 ± 0,4 olarak gerçekleşmiştir.

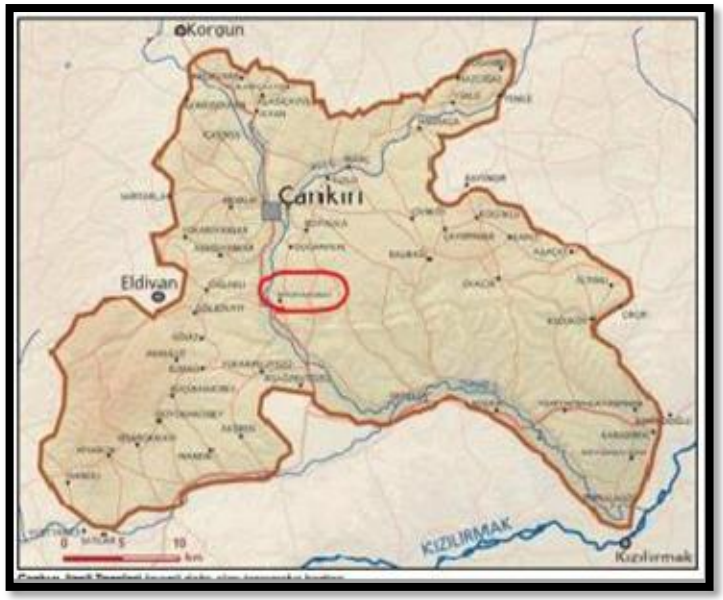
Ahroni vd. (1997)'ye göre *Gypsophila paniculata* L.'nın *in vitro* çoğaltımı için Arbel çeşidinin boğum araları kullanarak sürgün rejenerasyonu elde etmeye çalışmıştır. TDZ, BAP, KIN ya da Zeatin sitokinin kaynağı olarak ve oksin kaynağı olarak NAA kullanılmıştır. TDZ BDM'i içeren MS besin ortamında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

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, 2021-2022 yılları arasında Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1 Bitki Materyali Temini

Bu çalışmada, *Gypsophila simonii* örnekleri, Türkiye'de sadece Çankırı ili sınırları içinde doğal olarak yayılan, endemik, Çankırı-Ankara yolu yol kenarında, Süleymanlı köyü civarında, jipsli tepe üzerinde, 650-800 metre yükseklikte, 40º33'24" N ve 33º33'41" E koordinatlarında bulunmaktadır (Şekil 3.1). Bitkinin vejetasyon dönemi Nisan-Mayıs aylarında başlamakta ve Haziran-Temmuz ve Ağustos aylarında çiçek açmaktadır. *G. simonii* Çankırı-Ankara yolu üzerindeki jips habitatından 31 Mayıs ve 20 Temmuz tarihlerinde iki kez sınırlı miktarlarda, genellikle ekosisteme zarar vermeden, nadirliği ve yok olma riski göz önünde bulundurularak toplanmıştır (Şekil 3.2). Sürgün uçları ve bitki boğumları eksplant kaynağı olarak kullanılmış ve *in vitro* koşullarda çoğaltma için hazırlanmıştır.



Şekil 3.1 *G. simonii*'nin toplandığı jipsli arazilerin jeolojik görünümü (Anonim 2021)



Şekil 3.2 *G. simonii* bitkisinin jipsli habitatı

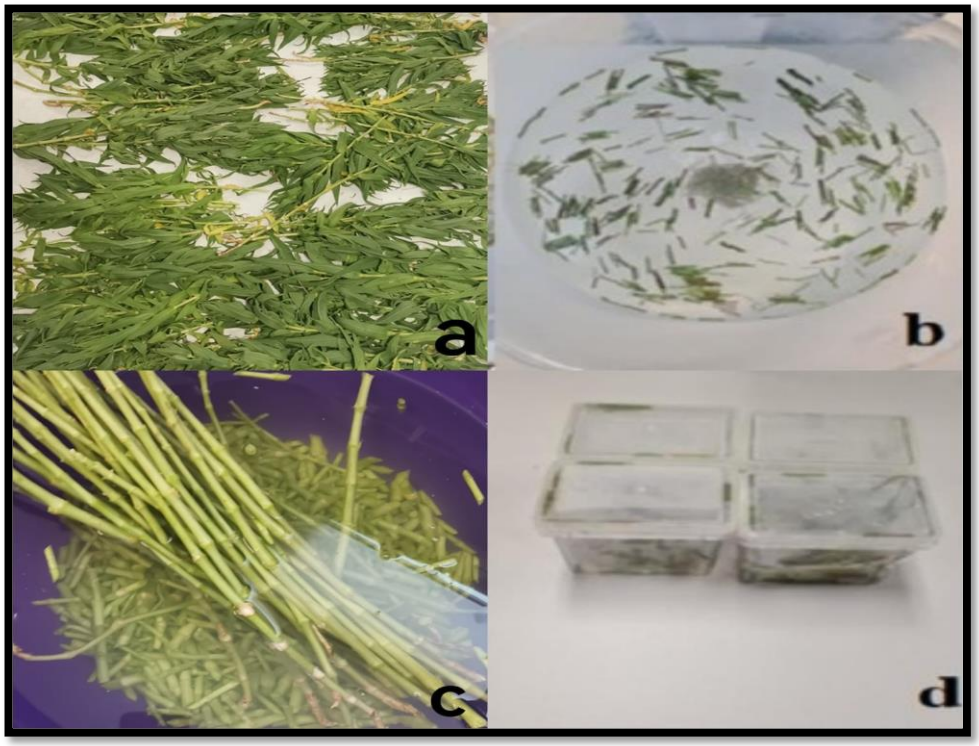
3.2 Yöntem

Çalışmada önemli bir biyoteknolojik yöntem olan, klonal, hızlı ve aynı zamanda bol miktarda çoğaltım olanağı sağlayan doku kültürü yöntemi ile *G.simonii'*nin sürgün ucu ve nodlarının (boğum) eksplant kaynağı olarak kullanıldığı *in vitro* şartlarda üretimi hedeflenmiştir. Eksplantlar, 3 farklı temel besin ortamı ve 36 farklı BDM kombinasyonu kullanılarak ilk kez *in vitro* koşullarda kültüre alınmıştır.

3.2.1 Sterilizasyon

Çalışma alanından toplanarak laboratuvara getirilen bitkiler, yüzey sterilizasyonu amacıyla öncelikle akan musluk suyu altında 20 dakika yıkanmıştır. Bitkilerin yaprakları ve küçük sürgünleri temizlendikten sonra eksplant olarak kullanılabilmesi için boyları 2 cm'den az olmayacak ve üzerinde 2'şer adet göz bulunacak şekilde parçalara ayrılmıştır. Sonrasında oluşabilecek enfeksiyona karşı distile su ile yıkanmış ve 1 g/L'lik Cuprason (Antifungal) 20 dk bekletilmiştir. Durulamadan sonra bitkiler tekrar 15 dk süreyle 1 g/L $HgCl_2$ içinde tutulmuştur. İçerisinde %15 aktif klorin bulanan sodyum hipokloritin (NaOCl), 3 damla Tween 20 eklenmiş %20'lik karışımında, 10 dk

süreyle sterilize edildikten sonra NaOCl'in dokulardan arındırılması amacıyla 3 kez 5'er dk boyunca steril saf su ile steril ortamda çalkalanmıştır (Sezgin and Dumanoğlu 2014) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 *G.simonii*'nin sterilizasyon amacıyla hazırlanması a) Bitkinin sürgünlerine ayrılması b) Yapraklarından arındırılmış sürgünler c) Bitki kesme işlemi d) Dikime hazır eksplantlar

3.2.2 *In vitro* çoğaltımın başlangıç aşamasında kullanılacak besin ortamı bileşimleri

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen *G.simonii'*nin sürgün ucu ve nodlarının eksplant olarak kullanıldığı çalışmada, bitki biyoteknolojisinin önemli yöntemlerden biri olan doku kültürü yardımı ile çoğaltım sağlanmıştır. Bu amaçla, başlangıç aşamasında farklı bileşim ve özelliklerdeki temel besin ortamları ile oksin ve sitokinin gruplarına ait BDM kombinasyonları kullanılmıştır (Sezgin and Dumanoğlu 2014, Kapdan and Sezgin 2021).

1) Temel besin ortamları

a) Murashige ve Skoog besin ortamı (Murashige and Skoog 1962)

b) Nitsch & Nitsch besin ortamı (Nitsch and Nitsch 1969)

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

2) Katılaştırıcı

a) Gelrite (2,1 g/L)

3) Büyümeyi düzenleyici maddeler (BDM) ve dozları

a) 0- 0,5 ve 1 mg/L BAP

b) 0- 0,5 ve 1 mg/L KIN

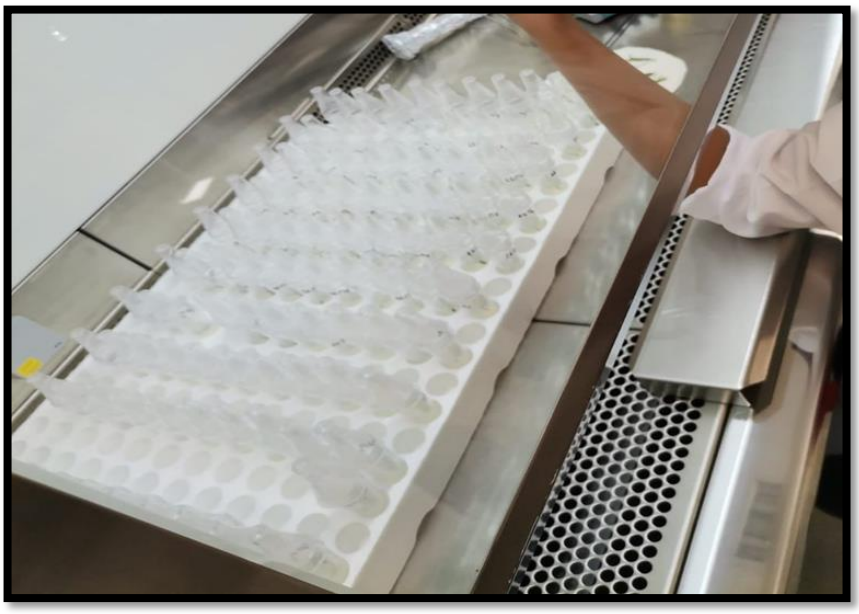
c) 0- 0,25 ve 0,5 mg/L IBA

d) 0- 0,25 ve 0,5 mg/L NAA

G. simonii'nin doku kültürü ile çoğaltımı için temel besin ortamı (3), sitokinin grubu (BAP ve KIN) 6 dozu ve oksin grubunun (IBA ve NAA) 6 dozunun yer aldığı toplam 36 farklı kombinasyonda besin ortamları hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). Bu ortamlara karbon kaynağı olarak sakkaroz (30 g/L) eklenmiş ve pH'ı 5,7 olarak ayarlanmıştır. Besin ortamları, BDM kombinasyonu ve katılaştırıcı ilavesinden sonra tekrar sayısına yetecek şekilde hazırlanmış (100 mL) ve erlenmayerler içerisinde otoklava yerleştirilerek sterilize edilmiştir. Sterilizasyon, dijital kontrollü otoklav ile 1,2 atm basınç altında, 121ºC sıcaklıkta 20 dk süresince yapılmıştır. Sterilizasyonu yapılan besin ortamları, laminar hava akışlı kabinde steril tek kullanımlık tüplere (120x10 mm) 10'ar mL olarak katılaşmasından hemen önce paylaştırılmıştır (Şekil 3.4). Her tüpte sadece bir tek eksplant olacak şekilde, bütün ortamlar 10'ar tekrar halinde dikime hazır edilmiştir (Kapdan and Sezgin 2021).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan BDM kombinasyonları

K1	0,00 mg/L BAP + 0,00 mg/L IBA	**K19**	0,00 mg/L KIN + 0,00 mg/L IBA
K2	0,00 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA	**K20**	0,00 mg/L KIN + 0,25 mg/L IBA
K3	0,00 mg/L BAP + 0,50 mg/L IBA	**K21**	0,00 mg/L KIN + 0,50 mg/L IBA
K4	0,50 mg/L BAP + 0,00 mg/L IBA	**K22**	0,50 mg/L KIN + 0,00 mg/L IBA
K5	0,50 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA	**K23**	0,50 mg/L KIN + 0,25 mg/L IBA
K6	0,50 mg/L BAP + 0,50 mg/L IBA	**K24**	0,50 mg/L KIN + 0,50 mg/L IBA
K7	1,00 mg/L BAP + 0,00 mg/L IBA	**K25**	1,00 mg/L KIN + 0,00 mg/L IBA
K8	1,00 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA	**K26**	1,00 mg/L KIN + 0,25 mg/L IBA
K9	1,00 mg/L BAP + 0,50 mg/L IBA	**K27**	1,00 mg/L KIN + 0,50 mg/L IBA
K10	0,00 mg/L BAP + 0,00 mg/L NAA	**K28**	0,00 mg/L KIN + 0,00 mg/L NAA
K11	0,00 mg/L BAP + 0,25 mg/L NAA	**K29**	0,00 mg/L KIN + 0,25 mg/L NAA
K12	0,00 mg/L BAP + 0,50 mg/L NAA	**K30**	0,00 mg/L KIN + 0,50 mg/L NAA
K13	0,50 mg/L BAP + 0,00 mg/L NAA	**K31**	0,50 mg/L KIN + 0,00 mg/L NAA
K14	0,50 mg/L BAP + 0,25 mg/L NAA	**K32**	0,50 mg/L KIN + 0,25 mg/L NAA
K15	0,50 mg/L BAP + 0,50 mg/L NAA	**K33**	0,50 mg/L KIN + 0,50 mg/L NAA
K16	1,00 mg/L BAP + 0,00 mg/L NAA	**K34**	1,00 mg/L KIN + 0,00 mg/L NAA
K17	1,00 mg/L BAP + 0,25 mg/L NAA	**K35**	1,00 mg/L KIN + 0,25 mg/L NAA
K18	1,00 mg/L BAP + 0,50 mg/L NAA	**K36**	1,00 mg/L KIN + 0,50 mg/L NAA



Şekil 3.4 Besin ortamlarının laminar flow kabin içerisinde tüplere dağıtılması

3.2.3 Eksplantların dikimi ve inkübe edilmesi

Sterilizasyon aşamasından sonra, *G. simonii* bitkilerinin yaprakları temizlendikten sonra, en az iki tomurcuk içeren boğumlar ve sürgün uçları tüplere dikilmiştir (Şekil 3.5). Eksplantlar aseptik şartlarda, uç kısmı ortam içerisine girecek şekilde dikey durumda ve kontaminasyonu engellemek amacıyla her bir tüpe 1 eksplant olacak şekilde dikilmiştir. Rejenerasyon aşamasında, tüm kültürler 4 hafta boyunca 25±1ºC' de 16/8 saat aydınlık/karanlık (35 µmol·m^{-2}·s^{-1}) şartlarda (Şekil 3.6) iklim kabininde inkübe edilmiş ve düzenli bir şekilde her gün kontrol edilmiştir.



Şekil 3.5 Steril ortamda *G. simonii* bitkisinin dikimi a) Tüplere eksplantları dikimi b) Tüp içerisindeki eksplantlar



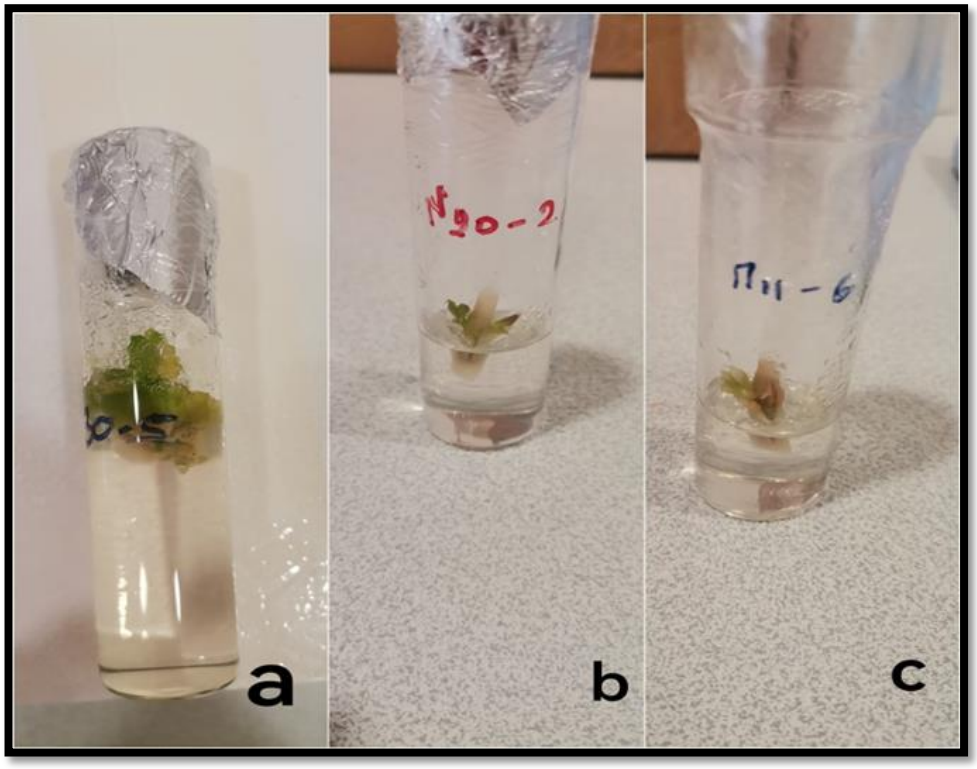
Şekil 3.6 İnkübe edilen eksplantlar (25±1ºC sıcaklık ve 16/8 saat aydınlık/karanlık)

3.2.4 Alt kültür

Yaprak ve küçük sürgünleri temizlenip yüzey sterilizasyonunun ardından dikimleri yapılan *G. simonii* eksplantları, inkübasyon amacıyla iklim odasına yerleştirilmiş ve düzenli olarak her gün kontrol edilmiştir. MS, GB ve NN temel besin ortamlarında ve içerisindeki BDM kombinasyonlarına uygun olarak, gelişimleri amacıyla eksplantlar alt kültüre alınmış ve çoğalmaları hedeflenmiştir.

Başlangıç aşaması sonrasında eksplantların gelişim gösterebilmeleri için bir ay ara ile üç kez alt kültür uygulaması yapılmıştır. Sürgün ve kök gelişimi için hazırlanan alt

kültür ortamları, çalışmanın başlangıç aşamasında kullanılan temel besin ortamları ve BDM kombinasyonları ile aynı olacak şekilde hazırlanmıştır. Sürgün ve kök gelişimi meydana gelen eksplantlarda kök sayısı, sürgün sayısı, kök uzunluğu, sürgün uzunluklarına ait ölçümler veri olarak toplanmıştır. Bu aşamada doğrudan sürgün meydana getiren eksplantlar ise doğrudan köklendirme amacıyla hazırlanan besin ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 3.7).

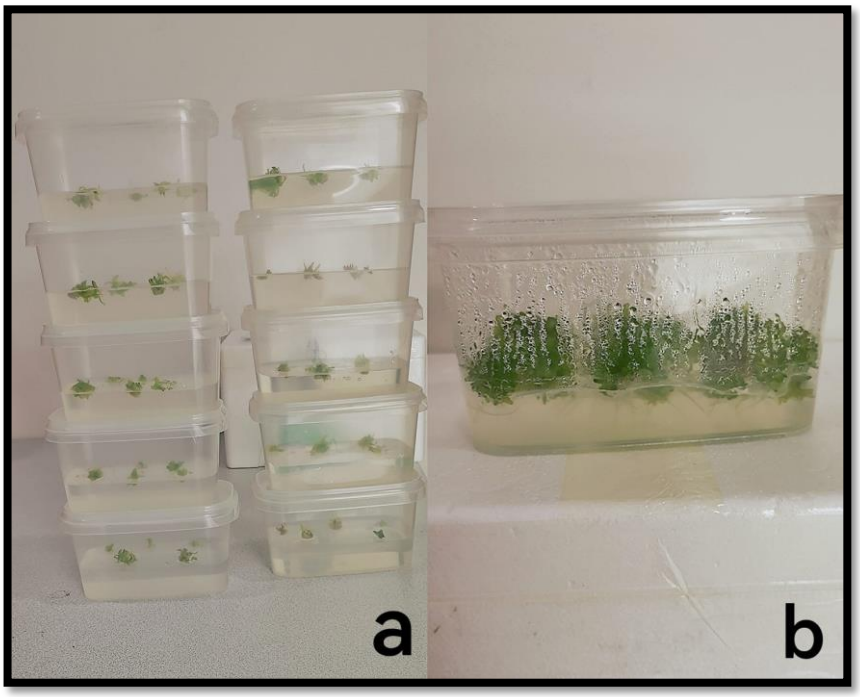


Şekil 3.7 *In vitro* koşullarda gelişen eksplantlar a) MS besin ortamında KIN (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) ortamda kallus oluşumu b) NN besin ortamında KIN (0 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) kombinasyonunda ortamlarda sürgün oluşumu c) MS besin ortamında BAP (0 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) kombinasyonunda ortamlarda sürgün oluşumu

3.2.5 Köklendirme aşaması

Sürgün gelişimi gösteren eksplantlar köklendirme ortamına alınmıştır (Şekil 3.8). Köklendirme aşamasında en iyi gelişimin gözlendiği temel besin ortamı içerisine, oksin grubundan büyüme düzenleyici NAA 0,5 mg/L ilave edilecek ve 16/8 saat

aydınlık/karanlık (35 µmol.m^{-2}.s^{-1}), koşullarda inkübe edilmiştir. Bitkiler gelişimlerine göre 8 hafta süre ile köklendirme ortamında tutulmuştur.



Şekil 3.8 Köklendirme ortamında eksplantlar a-b) Kök ve sürgün gelişimi MS Kinetin (0,00 mg/L) + Naftalenasetikasit (0,50 mg/L) ortamında

3.2.6 İstatistiksel analiz

Çalışmaya ait verilere göre tekrarların ortalaması olarak varyans analizi yöntemi SPSS programıyla Game-Howell parametrik olmayan (Nonparametric) Post-Hoc testi kullanılarak analiz yapılmıştır ($P<0,05$, 0,01, 0,001). İstatistiksel olarak meydana gelen anlamlı farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %5 hata sınırına göre belirlenmiş ve farklılıklar harfler yardımıyla ifade edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, biyoteknolojinin önemli yöntemlerinden biri olan doku kültürü ile G. simonii'nin in vitro çoğaltılması ve aklimitizasyonu amaçlanmıştır.

4.1 *G. simonii*'nin Rejenerasyonu

Eksplant kaynağı olarak sürgün uçları ve bitki boğumları kullanılmıştır. *G. simonii*, direkt organogenesis yoluyla bitki rejenerasyonunu gerçekleşmemiştir. Bu sebeple, bitki rejenerasyonu indirekt organogenesis ile elde edilen kalluslardan yeniden bitki oluşumu hedeflenmiştir. *G. simonii*'nin kritik yok olma tehlikesi (CR) altındaki bitkiler listesinde yer alması sebebiyle araziden sınırlı miktarda alınabilmiştir. Embriyo kültürü olmaksızın *in vitro* çoğaltma adımı ve bitkinin kendini yenileme yeteneği sorunları ile birleştiğinde, bitkilerin direk organogenesisi sağlanamamıştır. Ancak çalışmada kullanılan BDM'sinin konsantrasyonu, kombinasyonu ve türünün kallus oluşumu üzerinde olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir. Çalışma sırasında farklı 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 4.3 ve 4.4). İndirekt organogenesis yöntemi ile elde edilen kalluslarda sürgün ve kök oluşumu hedeflenmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2). Çalışmamızda kullanılan sterilizasyon protokolünün etkili olması enfeksiyon oluşumunu oldukça önlemiştir.

4.2 Organogenik Kallus Oluşumu

G. simonii'nin doku kültürü ve *in vitro* mikroçoğaltımından elde edilen kallus oluşumunun verileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kullanılan besin ortamları (MS, NN ve Gamborg's B5) ile farklı BDM kombinasyonları arasındaki kallus oluşumundaki istatistiksel farkın önemi araştırılmıştır. Bunun için bağımsız değişkenler (BDM kombinasyonu, temel besin ortamı) ve bağımlı değişken (kallus oluşumu)

ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Bağımsız değişkenler arasında "BDM kombinasyonu" istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,01$). Başka bir "temel besin ortamı" olan bağımsız değişkenin istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulunmuştur. Çalışmada elde edilen verilerdeki istatistiksel farklılıklara dayanarak, 36 farklı BDM kombinasyonu arasında kallus oluşumundaki istatistiksel farklılıkları belirtmek için ikili karşılaştırmaya bakılmıştır (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3). Bu amaçla BDM kombinasyonlarının arasında ortalama kallus oluşum miktarında istatistiksel olarak farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen verilerde kallus oluşumu sadece belirli BDM kombinasyonlarında olduğu için üç farklı temel besin ortamı arasındaki istatistiksel farklar önemsiz bulunmuştur. Bununla birlikte, üç ortamda elde edilen BDM verilerinin ortalamalarındaki istatistiksel farklılıklar incelenmiştir.

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	-	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K2	1,000	-	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K3	0,401	0,401	-	0,401	0,401	1,000	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401
K4	1,000	1,000	0,401	-	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K5	1,000	1,000	0,401	1,000	-	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K6	0,401	0,401	1,000	0,401	0,401	-	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,001
K7	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	-	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K8	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	-	1,000	1,000	1,000	-
K9	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	-	1,000	1,000	-
K10	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	-	1,000	-
K11	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	-	-
K12	-	-	0,001	-	-	0,001	-	-	-	-	-	-
K13	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K14	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K15	0,093	0,093	0,401	0,093	0,093	0,401	0,093	0,093	0,093	0,093	0,093	0,012
K16	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K17	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K18	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K19	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K20	0,401	0,401	1,000	0,401	0,401	-	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,001
K21	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K22	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K23	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K24	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K25	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K26	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K27	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K28	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K29	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K30	0,012	0,012	0,093	0,012	0,012	0,093	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,093
K31	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K32	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K33	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K34	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K35	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
K36	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-

- 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	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K2	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K3	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	1,000	0,401	0,401	0,401	0,401
K4	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K5	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K6	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	1,000	0,401	0,401	0,401	0,401
K7	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K8	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K9	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K10	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K11	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K12	-	-	0,012	-	-	-	-	0,001	-	-	-	-
K13	-	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K14	1,000	-	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K15	0,093	0,093	-	0,093	0,093	0,093	0,093	0,401	0,093	0,093	0,093	0,093
K16	1,000	1,000	0,093	-	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K17	1,000	1,000	0,093	1,000	-	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K18	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	-	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K19	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	-	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K20	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	-	0,401	0,401	0,401	0,401
K21	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	-	1,000	1,000	1,000
K22	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	-	1,000	1,000
K23	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	-	1,000
K24	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	-
K25	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K26	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K27	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K28	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K29	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K30	0,012	0,012	0,401	0,012	0,012	0,012	0,012	0,093	0,012	0,012	0,012	0,012
K31	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K32	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K33	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K34	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K35	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000
K36	1,000	1,000	0,093	1,000	1,000	1,000	1,000	0,401	1,000	1,000	1,000	1,000

- İstatistiksel 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	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K3	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,093	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401
K4	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K5	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K6	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,093	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401
K7	1,000	1,000	1,000	1,000	1000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K8	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K9	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K10	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K11	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K12	-	-	-	-	-	0,093	-	-	-	-	-	-
K13	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K14	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K15	0,093	0,093	0,093	0,093	0,093	0,401	0,093	0,093	0,093	0,093	0,093	0,093
K16	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K17	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K18	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K19	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K20	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,093	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401
K21	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K22	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K23	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K24	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K25	-	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K26	1,000	-	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K27	1,000	1,000	-	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K28	1,000	1,000	1,000	-	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K29	1,000	1,000	1,000	1,000	-	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K30	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	-	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
K31	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	-	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K32	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	-	1,000	1,000	1,000	1,000
K33	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	-	1,000	1,000	1,000
K34	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	-	1,000	1,000
K35	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	-	1,000
K36	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-

- İstatistiksel farklılığı olmadığını göstermektedir
K Kombinasyon

G. simonii'nin *in vitro* çoğaltımında, MS besin ortamında sürgün oluşumu (Şekil 4.1 ve 4.2), NN ve Gamborg's B5 ortamından daha iyi gelişme göstermiştir. *G.simonii* eksplantlarında sürgün oluşumu bakımından NN ve Gamborg's B5 besin ortamları arasındaki interaksiyon etkisi, istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur (Çizelge 4.4). Besin ortamına ek olarak, BDM'nin sürgün gelişimi için istatistiksel olarak çok etkili olduğu bulunmuştur. Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'teki verilere göre; K12 ile K7 arasında veya K12 ile K25 arasında 0,05 α değerine göre BDM ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark gözlenmemiştir. Bu iki BDM kombinasyonunun kallus oluşumu açısından bir fark yaratmadığı anlaşılmıştır. Ancak K12 ile K15 arasında veya K12 ile K20 arasında %95 güven aralığında istatistiksel olarak fark gözlenmiştir. İki BDM kombinasyonu, kallus oluşumunu farklı şekilde etkilediklerini göstermektedir.

MS ortamında kallus oluşumu açısından en iyi BDM kombinasyonları;

- BAP (0 mg/L) + IBA (0,5 mg/L),
- BAP (0,5 mg/L) + IBA (0 mg/L),
- BAP (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L),
- BAP (0 mg/L) + NAA (0,25 mg/L),
- BAP (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L),
- BAP (0,5 mg/L) + NAA (0,5 mg/L),
- KIN (0 mg/L) + IBA (0,25 mg/L),
- KIN (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) (Şekil 4.1 ve 4.2)

NN besin ortamında en yüksek kallus oluşumları;

- Kinetin (0,000 mg/L) + Indolbütirik asit (0,250 mg/L)

Besin ortamlarında oluşan kallusun, Murashige ve Skoog (MS) besin ortamından en yüksek oluşum oranı elde edilirken, Gamborg'un B5 besin ortamında çalışma süresince sonuç alınamamıştır.

Çizelge 4.4 Organik kallustan sürgün oluşumu bakımından temel besin ortamları arasındaki interaksiyon etkisi (P≤0,05)

Besin Ortamı arasındaki interaksiyon	Ortalama Fark	Standart Hata	F testi	Güven Aralığı (P<0.05)	
				Alt Sınır	Üst Sınır
MS-NN	0,036	0,011	0,002	0,014	0,059
MS-GB	0,036	0,011	0,002	0,014	0,059
NN-MS	-0,036	0,011	0,002	-0,059	-0,014
NN-GB	-3,207E-018	0,011	1,000	-0,022	0,022
GB-MS	-0,036	0,011	0,002	-0,059	-0,014
GB-NN	3,207E-018	0,011	1,000	-0,022	0,022



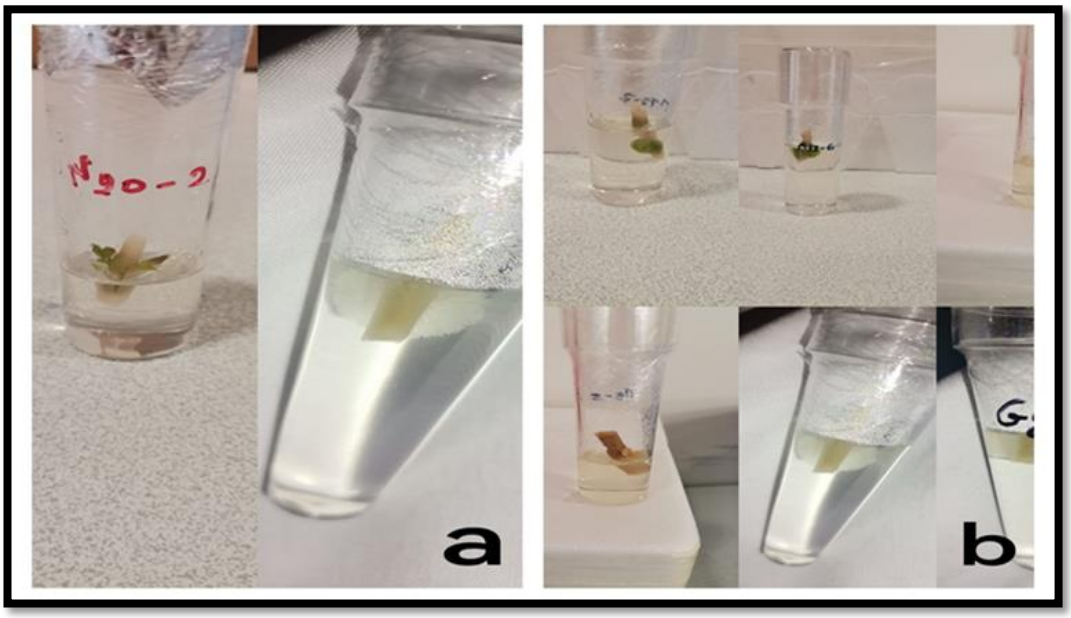
Şekil 4.1 MS Kinetin (0 mg/L) + Naftalenasetikasit (0,5 mg/L) kombinasyonunda sürgün oluşumu



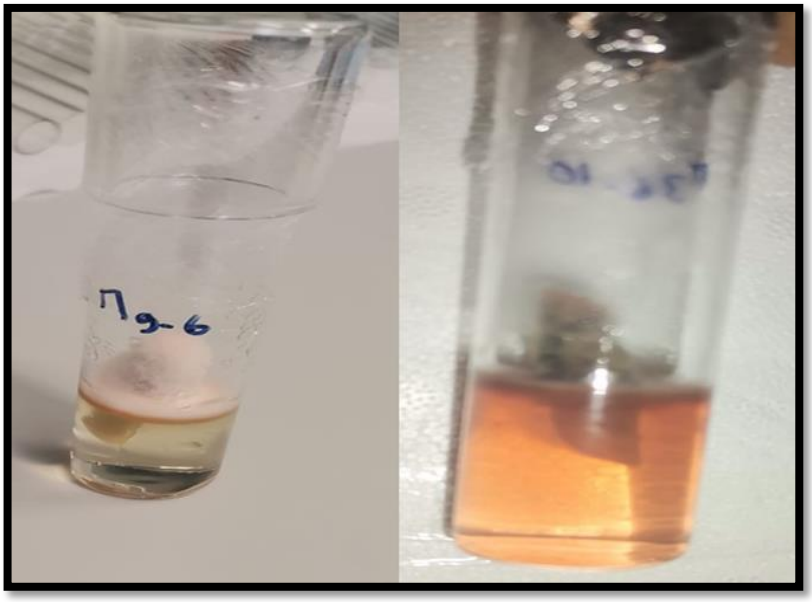
Şekil 4.2 MS Kinetin (0 mg/L) + Naftalenasetikasit (0,5 mg/L) kombinasyonunda kök oluşumu

4.3 Rejenere ve Enfekte Eksplantlar

Bitkilerin doğrudan jipsli topraktan çıkarılarak laboratuvar koşulları altında *in vitro* çoğaltım için hazırlanması rejenerasyon kapasitesinin bir miktar azalmasına neden olmaktadır. Eksplantlar, zorlu dış koşullardan laboratuvar koşullarına getirildiğinde ve çoğaltım için hazırlandığında da kullanılan etkili yüzey sterilizasyon protokolleri de rejenerasyon kabiliyetinde bir miktar azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.4). Aynı deney koşulları altında tekrarlanan eksplantlar temel besin ortamı, BDM kombinasyonu, inkübasyon süresi vb. açısından farklı sonuçlar verebilmektedir. Bazı eksplantlar direk ya da indirekt organogenesise cevap verirken, bazı eksplantlarda hiçbir yaşam veya yenilenme belirtisi görülememiştir (Şekil 4.3). En bol miktarda kallus gelişimine, Kinetin (0 mg/L) + Naftalenasetikasit (0,5 mg/L) kombinasyonda ulaşılmıştır.



Şekil 4.3 Aynı tekerrürden elde edilen farklı sonuçlar a) NN KIN 0 mg/L+IBA 0,25 mg/L gelrite ile katılaştırıldığı ortamlarda sürgün oluşumu b) MS BAP 0 mg/L + NAA 0,5 mg/L ortamında kallus gelişimi



Şekil 4.4 Başlangıç aşamasında sürgün oluşumundan sonra enfeksiyon oluşumu

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, Çankırı ili lokal endemiği ve yok olma tehlikesi altındaki bitkiler statüsünde değerlendirilen, aynı zamanda tıbbi ve aromatik özellikleri bulunan *Gypsophilia simonii* bitkisi, sürgün ucu ve nodlarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı ve farklı besin ortamların değişik dozlarda ayarlanmış bitki büyüme düzenleyici maddeler içerdiği ortamlarda çoğaltımı hedeflenmiştir.

Birçok bitki türünde olduğu gibi *Gypsophila* sp. cinslerinde de sürgün, nod ve apikal kısımları başlangıç eksplantı olarak doku kültürü ile çoğaltım çalışmalarında başarıyla kullanılmaktadır (Üstüner vd. 2021, Rashid *et al.* 2012, Chelariu *et al.* 2008, Teteryuk and Mikhovich 2020). Caryophyllaceae familyasının bitkilerinin *in vitro* mikroçoğaltımı için sürgünler üzerinde çalışmaları 1999 yılından beri yapılmaktadır ve günümüze kadar devam etmektedir.

G. simonii Çankırı'da yerel olarak yetişen, genellikle Mayıs ayı içerisinde son iki hafta ile Haziran ayının ilk iki haftası arasında antez dönemine ulaşarak gelişimini fizyolojik tamamlamaktadır. Bitkiler araziden toplanırken, bitkinin tam çiçekli haline ulaşmış olmasına dikkat edilmiştir. Denemeler sırasında farklı türde sorunlarla karşılaşılmıştır ki, bunlardan biri de enfeksiyondur. Enfeksiyonun eksplantların gelişimini engellemesi sebebiyle ikinci kez tekrarlanmıştır. Bu sebeple, bitkileri *in vitro* şartlarda dikime hazırlamak için kullanılan yüzey sterilizasyon protokolü modifiye edilerek araziden alınan ve doğrudan laboratuvar koşullarına getirilen bitkiler üzerinde uygulanmış ve enfeksiyonla mücadele konusunda olumlu sonuçlar alınmıştır. Çalışma süresi boyunca da enfeksiyon gelişimi çok nadir olmuştur. Enfeksiyon en çok, eksplantların inkübasyon tarihinden sadece 3-6 gün sonra görülmüştür. Bu enfeksiyonlar, bazı eksplantlarda direkt ya da indirekt sürgün rejenerasyonundan sonra endojen olarak ortaya çıkmıştır. Ancak bitkinin rejenerasyon hızının çok yavaş olması nedeniyle ilk kallus oluşumu ancak yaklaşık 2 ay sonra ortaya çıkmıştır. Bu nedenle indirekt rejenerasyon ile elde edilen sürgün ve kök gelişimleri ilk 3 ay boyunca gözlemlenememiştir. Denemede, bazı eksplantların enfekte olmadığı ancak rejenerasyon belirtilerin olmadığı durumlar da vardır (Şekil 4.3). Sterilizasyon aşamasının başarılmasından sonra eksplantlar, 36 farklı

BDM kombinasyonu ile hazırlanmış MS, NN ve Gamborg's B5 temel besin ortamlarında dikilmişlerdir. Bu ortamların yarı katı hale gelmesi için gelrite kullanılmıştır. Deneylerde tüm kombinasyonlar 10 tekerrürlü olarak hazırlanmıştır. Denemelerde elde edilen sonuçlarda farklılıklar gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada, *G. simonii* bitkisinin sürgün ucu ve boğum arası eksplantlarından direkt rejenerasyonu hedefine ulaşılamamıştır. Ancak bitki rejenerasyonu, elde edilen kallus aracılığıyla dolaylı organogenesis yöntemini amaçlanmıştır. *G. simonii* bitkisinin, IUCN Kırmızı Liste kategorisinde nesli tükenmekte olan bitki olarak listelendiğinden, sınırlı miktarlarda araziden alınabilmiştir. Bu nedenle, *in vitro* çoğaltma aşaması embriyo kültürü olmaksızın doğrudan başlatılmıştır. Bitkinin rejenerasyon kabiliyetiyle ilgili sorunlar nedeniyle yineleme gerçekleştirilmemiştir. Ancak çalışmada kullanılan BDM'nin konsantrasyonları, kombinasyonları ve türün kallus oluşumu üzerinde olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir.

G. simonii'nin *in vitro* mikroçoğaltım hedeflerinden doku kültürüyle elde edilen kallus oluşumu verilerinin istatistiksel bir değerlendirmesi yapılmıştır. Temel besin ortamları (MS, NN ve Gamborg's B5) ile farklı BDM kombinasyonları arasındaki kallus oluşumunun istatistiksel farklılıkların önemi araştırılmıştır. Bu amaçla, sonuçlardan elde edilen verilerin ortalama varyansı, çoklu karşılaştırmalı Game-Howell parametrik olmayan (Nonparametric) Post-Hoc testi kullanılarak analiz edilmiştir. Bitki gelişiminde karşılaştığımız sorunlar nedeniyle elde ettiğimiz veriler çok az sayıda olmuştur. "Temel besin ortamları" arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. Buna karşılık, bağımsız değişkenler arasında "BDM kombinasyonu" istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,01$). Her temel besin ortamında kullanılan BDM yönteminin istatistiksel farkı incelenmiş ve $\alpha=0,05$ anlamlılık düzeyi bulunmuştur. Tüm BDM kombinasyonlarının kallus büyümesi üzerinde aynı etkiye sahip olmadığı dikkat çekmiştir. Bazı BDM kombinasyonları kallus oluşumunu tetiklerken, diğerleri çok da etkili olmamıştır (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3).

Organogenik olan kalluslardan elde edilen en yüksek sürgün sayısı, sırasıyla 40 adet ile KIN (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) kombinasyonunun ilave edildiği MS temel besin

ortamında bulunmuştur (Şekil 4.1). Sürgün oluşumu BAP (0,5 mg/L) + IBA (0 mg/L), BAP (0 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) ilave edildiği MS ortamında da en yüksek sürgün sayılarına ulaşılmıştır. Sürgünlerin boyutları 0,5 cm ile 1,3 cm arasındaki boyutlarda değişmektedir. En düşük sürgün sayısı 2 adet ile KIN (0 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) kombinasyonlarını içeren NN ortamından elde edilmiştir. Sürgün uzunlukları 0,5 cm ile 2,3 cm arasında değişmektedir. Gamborg's B5 besin ortamında, çalışma sırasında sonuç elde edilmemiştir. En yüksek kök sayısı MS besin ortamında bulunmuş ve en iyi sonucu veren kombinasyon KIN (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) içeren kombinasyonu olduğu fark edilmiştir (Şekil 4.2). Kök uzunlukları 1,5 cm ile 7 cm arasındaki boyutlarda değişmektedir. Organogenik olmayan en bol miktarda kallus gelişimi ise BAP (0 mg/L) + IBA (0,5 mg/L), BAP (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L), BAP (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L), BAP (0,5 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) kombinasyonlarında elde edilmiştir (Şekil 4.3).

Çalışmaya paralel olarak, Rashid vd. (2012) yılında *G. panikulata*, Toaima vd. (2013) yılında *Gypsophila perfecta*, *Gypsophila poniculata* L.,'da elde ettikleri sonuçlar, çalışmamızın sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Toaima vd. (2013) *Gypsophila perfecta*, *Gypsophila paniculata* L. bitkilerinin sürgün uçlarını, MS ortamında farklı dozlarda BDM (BAP ve NAA) içeren bir mikroçoğaltım çalışması yapmışlardır. En fazla sürgün oluşumunu BAP (0,5 mg/L) + Naftalenasetikasit (0,5 mg/L) içeren ortamdan elde etmişlerdir. Öte yandan, Aslam vd. (2012), 1 mg/L BAP ilave edilmiş MS ortamda yüksek sürgün oluşumunun ve maksimum sürgün uzunluğunun elde edildiğini bildirmiştir. Kök gelişimi için en iyi ortam, %85 oranında 0,5 mg/L NAA içeren MS ortamında gözlenmiştir. Rashid vd. (2012), eksplant olarak apikal meristemleri, in vitro teknikler kullanılarak çiçekli bitki *Gypsophila paniculata* L.'nın mikro çoğaltımı için kullanılmıştır. Bitki çoğaltımı için farklı ortamlar kullanılmıştır. BAP'ın tek başıma konsantrasyonları (0,25, 0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0 mg/L ile), farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA, BAP ve KIN ile zenginleştirilmiş MS ortamında çoğaltım için kullanılmıştır. BAP (1mg/L) + KIN (1mg/L) kombinasyonları, NAA'nın farklı köklenme konsantrasyonları (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ve 0,5 mg/L) için BAP, KIN ve NAA (1 mg/L) kullanılmıştır. Denenen tüm besin ortamları arasında, en fazla sürgün sayısı, kallus oluşumu ve maksimum sürgün uzunluğu aşılamadan 4 gün sonra BAP 1

mg/L ile takviye edilmiş ortamlarda elde edilmiştir. Yüzde 86'lık bir tepki ile 6,53 cm maksimum sürgün uzunluğunu göstermiştir. Kök gelişimi için en iyi ortam, 2,66 cm uzunluğunda ve %85 köklenme oranıyla NAA 0,5 mg/L uygulamasında gerçekleşmiştir. Çalışmamızda en yüksek kök sayısı MS besin ortamında bulunmuş ve en iyi sonucu veren kombinasyonun KIN (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) içeren kombinasyon olduğu kaydedilmiştir. Köklerin uzunluğu 1,5 cm ile 7 cm arasında değişmektedir. Rashid vd. (2012) yılındaki çalışmalarında, en iyi sürgün ve kök gelişimi MS besin ortamından elde edilirken, çalışmamızda ise en iyi sürgün oluşumu 2,3 cm uzunluğu ile NN besin ortamında ve kök gelişimi MS besin ortamından elde edilmiştir. BDM'lerin belirli kombinasyonlarının her besin ortamına eklendiğinde farklı etkilere sahip olduğu gözlenmiştir.

2003-2023 yılları arasında TÜBİTAK tarafından hazırlanan ve kalkınma hedeflerinin sürdürülebilirliği doğrultusunda, "Genetik kaynaklarının karakterizasyonu, muhafazası ve biyolojik çeşitliliğin korunmasına yönelik teknolojiler geliştirebilmek" amacıyla, Ulusal Bilim ve Teknoloji Politikaları Strateji Belgesi'nde de önemle üzerinde durulan bir konudur (Anonim 2011). IUCN'in yok olma tehlikesi olan bitkiler kategorisinde bulunan ve ayrıca lokal endemik olarak kabul edilen *Gypsophila simonii* bitkisinin *in vitro* şartlarda ilk kez çoğaltımı çalışmasıdır. Oldukça kapsamlı bir optimizasyon çalışması konumundaki bu tez konusu, ileride yapılması muhtemel bir çok çalışmaya da ışık tutabilecek niteliktedir.

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_strate isi.pdf. Erişim Tarihi: 01.09.2022.

Bakış, Y., Babac, M.T., and Uslu, E. 2011. Updates and improvements of Turkish Plants Data Service (TÜBİVES). Proceedings of the 6th International Symposium in Health Informatics and Bioinformatics (HIBIT), pp. 136-140, İzmir.

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

Davis, P.H., 1965-1985. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press, pp. 1-9, 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 Üniversitesi, 114-115 sayfa, Ankara.

Erdoğan, U. 2010. Tehlike altındaki *Silene sangaria* coode&cullen' nın mikroçoğaltımı. Yüksek lisans tezi. Trakya Üniversitesi, 80 sayfa, Edirne.

Fenwick, G. R,. Price, K. R,. Tsukamoto, C. and Okubo, K. 1991. Toxic Substances in Crop Plants. Saponins, In: J.P.F. D'Mello, C.M. Duffus, and J.H. Duffus, Eds. The Royal Society of Chemistry, pp. 285, Cambridge.

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.

Hamza, A., Hamrouni L., Hanana, M., Hamza, F., Maher, G. and Neffati, M. 2012. *In vitro* micropropagation of *Helianthemum lippii* L. var *sessiliforuim* (Cistaceae): valuable pastoral plant. Middle-East Journal of Scientific Research, 11(5): 652-655.

Hedge, I.C. 1970. Hedysarum L. in Davis, P.H. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 3: 549-560.

Heng, L., Vincken, J. P., van Koningsveld, G. A., Legger, L. Gruppen, H., Van Boekel, MAJS., Roozen, J. P., Voragen, AGJ. 2006. Bitterness of saponins and their content in dry peas. Journal of the Science of Food and Agriculture, 102: 86-1225.

Holm, L. G., Plucknett, D. L., Pancho, J.V. and Herberger J. P. 1997. The world's worst weeds. University Press of Hawaii, pp. 111-114, Hawaii.

Hostettmann, K. and Marston, A. 1995. Saponins. Cambridge University Press, pp. 128-139, England.

Jamil, A., Riaz, S., Ashraf, M., and Foolad M.R. 2011. Gene expression profiling of plants under salt stress. Critical Reviews in Plant Sciences, 30(5): 435-458.

Kalefetoğlu, T. ve Ekmekçi, Y. 2005. The effect of drought on plant sand tolerance mechanisms. Gazi University Journal of Science, 18(4): 723-740.

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.

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

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

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

Korkmaz, H. ve Durmaz, A. 2017. Responses of plants to abiotic stress factors. Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 7(2): 192-207.

Kritskaya, T.A., Kashin, A.S. and Spivak, V.A. 2016. Features of clonal micropropagation of *Silene cretacea* (Caryophyllaceae) in *in vitro* culture. Russian journal of Dévelopmental Biology, 47: 359–366.

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.

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

Natho, G. 1998. The families and genera of vascular plants, vol. 2: K. Kubitzki, J. G. Rohwer, V. Bittrich (eds.), Magnoliid, hamamelid, and caryophyllid families. Springer Verlag, pp. 13-19, Berlin.

Nitsch, J.P., Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science, 163, 85-87.

Oleszek, W. A. 2002. Chromatographic determination of plant saponins. Journal of Chromatography A, 967: 147-162.

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, pp. 295-313.

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

Partheeban, C., Chandrasekhar, C. N., Jeyakumar, P., Ravikesavan, R. and Gnanam, R. 2017. Effect of PEG induced drought stress on seed germination and seedling characters of maize (*Zea mays* L.) genotypes. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(5): 110-1095.

Patade, V.Y., Kumari, M. and Ahmed, Z. 2011. Chemical seed priming as a simple technique to impart coldand salt stress tolerance in Capsicum. Journal of Crop Improvement, 25(5): 497-503.

Price, K.R,. Johnson, I. T. and Fenwick, G.R. 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feeding stuffs. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 26: 27-135.

Rashid, S., Ilyas, S., Naz, S., Aslam, F. and Ali, A. 2012. *In Vitro* Propagation Of *Gypsophila Paniculata* L. Through Plant Tissue Culture Techniques. Pakistan Journal Of Science, 64: 6-10.

Salisbury, F.B. and Ross, C.W. 1992. Plant Physiology. 4.ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, pp. 682, California.

Sezgin, M. and Dumanoglu, H. 2014. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 50: 58-68.

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(2): 106-110.

Sparg, S.G., Light, M. E. And van Staden, J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. J. Ethnopharmacol., 94: 219-243.

Tejavathi, D.H. and Indira, M.N. 2011-2013. 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 floscuculi* L., a plant with potential medicinal value. National Conference "*In Vitro* Cultures In Plant Physiology"., 55(2): 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.

Üstüner, H. 2021. *In vitro* germination and vegetative growth characteristics of *Gypsophila pilulifera* (Caryophyllaceae) seeds grown under abiotic stress conditions. Anatolian Journal of Botany, 5(2): 91-97.

Wang,W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. (2004). Role of planth eat shock proteins and molecular chaperones in the biotic stress response. Trends in Plant Science 9(5): 244-252.

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 : Fatouma AHMED ALİ

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Djibouti Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2015-2018

Yayınları (SCI ve diğer)

- Ahmed, F. and Sezgin, M. 2022. "Catha edulis: an amphetamine-type of plant substance and cultural drug from the horn of africa", the 15th International Scientific Research Congress ANKARA/TURKEY 20-21 August 2022.

- Ahmed, F. and Sezgin, M. 2021. "Use of essential oils in the in vitro culture to inhibit contamination of the medium and improve culture establishment" the 15th International Scientific Research Congress ANKARA/TURKEY 20-21 August 2022.