ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALYSSUM NEZAKETİAE AYTAÇ & H. DUMAN (NEZAKET KEVKESİ)'NİN *IN VITRO* KOŞULLARDA ÇOĞALTIMI

Sevde Büşra AKIN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır
TEZ ONAYI

Sevde Büşra AKIN tarafından hazırlanan **"*Alyssum nezaketiae* Aytaç & H. Duman (Nezaket Kevkesi)'nin *in vitro* Koşullarda Çoğaltımı"** adlı tez çalışması 09/02/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **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 **" *Alyssum nezaketiae* Aytaç & H. Duman (Nezaket kevkesi)'nin *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).

Sevde Büşra AKIN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ALYSSUM NEZAKETİAE AYTAÇ & H. DUMAN (NEZAKET KEVKESİ)'NİN *IN VITRO* KOŞULLARDA ÇOĞALTIMI

Sevde Büşra AKIN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet SEZGİN

Bu çalışmada, kurak ve yarı kurak alanlara sahip Çankırı ilinde, lokal endemik olarak yetişmekte olan Uluslararası Doğa Koruma Birliği (International Union for Conservation of Nature (IUCN)) verilerine göre CR (Kritik Seviyede Nesli Tehdit Altında) kategorisine aday olduğu bilinen *A. nezaketiae* türünün tür devamlılığının *in vitro* çoğaltım teknikleri ile sağlanarak bazı abiyotik stres şartlarına toleranslarının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla, *A. nezaketiae*'nin *in vitro* yöntemle çoğaltımı için 2 farklı temel besin ortamı için [a) Murashige ve Skoog (MS) b) Woody Plant Medium (WPM)], katılaştırıcı olarak gelrite kullanılmış, ortamlara 6 sitokinin ve 6 oksin [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) Indol-3-asetik asit (IBA)-(0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L) d) α-naftalenasetik asit (NAA)-(0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L)] dozunun yer aldığı 36 farklı kombinasyonda hazırlanan büyümeyi düzenleyici madde ile karbon kaynağı olarak 30 g/L sakaroz ilave edilmiş ve ortamın pH'ı 5.7'ye ayarlanmıştır. In vitro çoğaltım aşamasında kallustan sürgün rejenerasyonu (8) en iyi KIN (0,5 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) BDM kombinasyonu sahip WPM besin ortamında, en fazla sürgün sayısı (5,8) ve maksimum sürgün uzunluğu (0,86) KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) BDM kombinasyonuna sahip WPM besin ortamında elde edilmiştir. Köklendirme aşamasında ise en iyi kök sayısı (21,75) ile maksimum kök uzunluğuna (0,65) ve en iyi sürgün sayısına (1,4) KIN (0,5) + IBA (0,5) BDM dozunun bulunduğu ortamda ulaşılmıştır. Ayrıca tüm denemelerde MS besin ortamı en iyi sonucu vermiştir. En iyi sürgün ve kök gelişimi gösteren bitkiler aklimitizasyon aşamasına alınmış ancak bitkiler dış koşullara uyum gösterememiştir.

2023, 40 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Doku kültürü, Endemik, *In vitro* çoğaltım, *A. nezaketiae*

ABSTRACT

Master of Science Thesis

IN VITRO MICROPROPAGATION OF
ALYSSUM NEZAKETIAE AYTAÇ & H. DUMAN (NEZAKET KEVKESİ)

Sevde Büşra AKIN

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet SEZGİN

In this study *A. nezaketiae* which is known to be a candidate for the CR (Critical Endangered) category according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN) data, which grows locally endemic in the province of Çankırı, which has arid and semi-arid areas, was investigated. It is aimed to determine the tolerance of some abiotic stress conditions by ensuring the continuity of the species with *in vitro* propagation techniques. For this purpose, for *in vitro* propagation of *A. nezaketiae*, 2 different basal media [a) Murashige and Skoog (MS) b) Woody Plant Medium (WPM)], gelrite was used as a solidifier, 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) Indole-3 -acetic acid (IBA)-(0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L) d) α-naphthaleneacetic acid (NAA)-(0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L)] 30 g/L sucrose was added as a carbon source with the growth regulator prepared in 36 different combinations including the dose of the drug and the pH of the medium was adjusted to 5.7. During the *in vitro* propagation process, the best shoot regeneration from callus (8) was achieved in WPM medium with the combination of KIN (0.5 mg/L) + NAA (0.5 mg/L) BDM. The maximum shoot number (5.8) and maximum shoot length was obtained in WPM medium with a combination of (0.86) KIN (0.5 mg/L) + IBA (0.5 mg/L). In the rooting phase, the best root number (21.75) and the maximum root length (0.65) and the best shoot number (1.4) were achieved in the medium with KIN (0.5mg/L) + IBA (0.5mg/L) BDM dose. In addition, MS medium gave the best results in all trials. The plants showing the best shoot and root development were taken to the acclimatization stage, but they could not adapt to the external conditions.

2023, 40 pages

Keywords: Tissue culture, Endemic, *In vitro* propagation, *A. nezaketiae*

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışma konusunun seçiminden, çalışma sürecinin tamamlanmasına kadar her aşamada ilgisini, desteğini esirgemeyen; bilgi ve tecrübesinden sıkça yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet SEZGİN'e sonsuz saygı ve şükranlarımı iletirim.

Çalışma sürecinde desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ hocama teşekkürlerimi borç bilirim.

Çalışmamın her aşamasında sabırla bana destek olan eşim Abdullah AKIN, kıymetli annem Selime TEMEL, babam Rüstem TEMEL ve kardeşim Batuhan TEMEL'e tecrübesinden sıkça yararlandığım arkadaşım doktora öğrencisi Emine KAPDAN ve bilgisine başvurduğum doktora öğrencisi Mustafa KAHYA'ya ayrıca laboratuvar aşamasında yardımlarını gördüğüm Cibuti'li arkadaşlarıma sevgi ve saygılarımı sunarım.

Sevde Büşra AKIN
Çankırı, Şubat 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ **5**
2.1 Brassicaceae Familyasındaki Farklı Türlerin *in vitro* Çoğaltım Çalışmaları **5**
2.2 *Alyssum* sp. Hakkında Yapılan Çeşitli Çalışmalar **7**
2.3 *Alyssum* sp.'de *in vitro* Çoğaltım Çalışmaları **9**
3. MATERYAL YÖNTEM **10**
3.1. Materyal Temini **10**
3.2 Arazi Çalışması Sonrası Bitkilerin Sterilizasyonu **11**
3.3 Temel Besin Ortamları ve Büyüme Düzenleyici Maddeler **12**
3.4 Eksplantların dikimi ve inkübe edilmesi **15**
3.5 Altkültür **16**
3.6 Eksplantların Köklendirilmesi **18**
3.7 Aklimitizasyon Aşaması **20**
3.8 İstatistiksel Analiz **21**
4. BULGULAR **22**
4.1 Altkültürlerde Meydana Gelen Sürgün Oluşumu **22**
4.2 Altkültürlerde Meydana Gelen Sürgün Sayısı **23**
4.3 Altkültürlerde Meydana Gelen Sürgün Uzunluğu **25**
4.4 Altkültürlerde Meydana Gelen Kök Sayısı **26**
4.5 Altkültürlerde Meydana Gelen Kök Uzunluğu **27**
4.6 Köklendirme Aşaması **28**
4.7 Aklimitizasyon **30**

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 32
KAYNAKLAR 36
ÖZGEÇMİŞ 40

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
µM	Mikromolar
kg	Kilogram
M	Molar
mg/L	Miligram/litre
ml	Mililitre
nm	Nanometre

KISALTMALAR DİZİNİ

2,4-D	2,4- Diklorofenoksiasetik asit
BA	Benziladenin
Ca++	Kalsiyum
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
IAA	İndolasetik asit
IBA	Indolbütirik asit
KCI	Potasyum klorür
MS	Murashige ve Skoog (temel besin ortamı)
NAA	Naftalenasetikasit
NACI	Sodyum klorür
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
TDZ	Thidiazuron
WPM	Woody plant medium (temel besin ortamı)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 *A. nezaketiae*'nin yayılış alanı Çankırı/TÜRKİYE (Bakis *et al*. 2011) 1
Şekil 1.2 Türün tespit edildiği noktaların uydu görüntüsü (Anonim 2016) 2
Şekil 1.3 *A. nezaketiae*'nin a) çiçekleri ve b) habitatı 3
Şekil 3.1 a) *A. nezaketiae* bitkisini tam çiçekli görünümü, b) Araziden toplanarak laboratuvara getirilen *A. nezaketiae* ve c) *A. nezaketiae* bitkisinin çiçek, yaprak ve sürgünleri 11
Şekil 3.2 *A. nezaketiae*'nin sterilizasyonu a) Bitkinin sürgünlerinin ayrılması, b) EtOH uygulaması ve c) Dikime hazır eksplantlar 12
Şekil 3.3 Laminar flow kabin içerisinde her bir steril tüpe 10 ml olacak şekilde aktarılan besin ortamlarının görünümü 14
Şekil 3.4 Laminar hava akışlı kabin içerisinde eksplantların tüplere dikimi 15
Şekil 3.5 Dikim sonrası eksplantlar 16
Şekil 3.6 İnkübe edilen eksplantlar (İklim kabini) 16
Şekil 3.7 Eksplantların gelişimi a) WPM-BAP (0 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamında kök gelişimi, b) MS-BAP (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) besin ortamında kök oluşumu, c) MS-BAP (0 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamında kallus oluşumu ve d) WPM-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0 mg/L) besin ortamında sürgün oluşumu 18
Şekil 3.8 *A. nezaketiae'*nin *s*ürgün gelişimi gösteren eksplantlarının köklendirme ortamına aktarılması a) Köklendirme ortamına eksplantların aktarılması, b) Köklendirme amacıyla dikilmiş eksplantlar, c) ve d) MS besin ortamında KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) BDM kombinasyonuna sahip ortamda sürgün ve kök gelişimi 19
Şekil 3.9 Rejene olmuş *A. nezaketiae* a) MS-KIN (1 mg/L) + IBA (1 mg/L) besin ortamında kök ve sürgün oluşumu ve b) MS-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında kök ve sürgün oluşumu 20
Şekil 3.10 Rejenere olan bitkilerin dış koşullara aktarılması 21
Şekil 4.1 Sürgün gelişimi a) WPM-BAP (0,5 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) besin ortamında sürgün gelişimi, b) WPM-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında sürgün ve kök oluşumu, c) MS-KIN (1 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamında sürgün oluşumu ve d) MS-KIN (1 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamında sürgün oluşumu 24
Şekil 4.2 Köklendirme ortamında kök ve sürgün gelişimi a) MS-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında sürgün ve kök gelişimi, b) MS-KIN (0,25 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamında sürgün ve kök gelişimi, c) MS-KIN (1 mg/L) + IBA (1 mg/L) besin ortamında sürgün ve kök gelişimi ve d) WPM-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında sürgün ve kök gelişimi 28
Şekil 4.3 Aklimitizasyon aşamasına alınan *A. nezaketiae* bitkisi 31

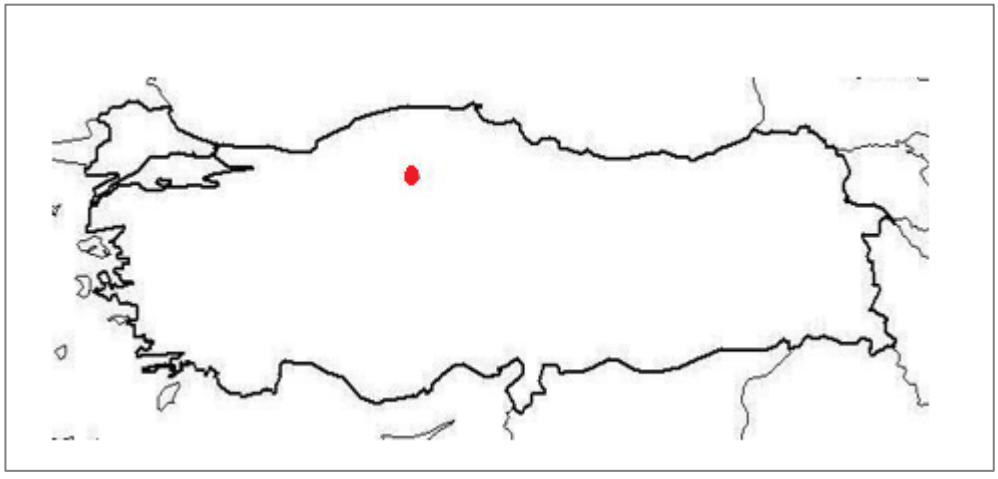
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 BDM kombinasyonları 14
Çizelge 4.1 *A. nezaketiae'*de kallustan sürgün rejenerasyonuna ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu (P≤0.05) 22
Çizelge 4.2 *A. nezaketiae* eksplantlarında sürgün sayılarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu (P≤0.05) 23
Çizelge 4.3 *A. nezaketiae* eksplantlarında sürgün uzunluklarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu (P≤0.05) 25
Çizelge 4.4 *A. nezaketiae* eksplantlarında kök sayılarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu (P≤0.05) 26
Çizelge 4.5 *A. nezaketiae* eksplantlarında kök uzunluklarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu (P≤0.05) 27
Çizelge 4.6 Köklendirme aşamasında kullanılan BDM dozlarının uygulanış tablosu 29
Çizelge 4.7 *A. nezaketiae* eksplantlarında köklendirme aşamasında "BDM dozlarının" kök sayısı ve uzunluğu ile sürgün sayısı ve uzunluğuna etkisi (P≤0.05) 29
Çizelge 4.8 *A. nezaketiae* eksplantlarında köklendirme aşamasında "besin ortamlarının" kök sayısı ve uzunluğu ile sürgün sayısı ve uzunluğuna etkisi (P≤0.05) 30

1. GİRİŞ

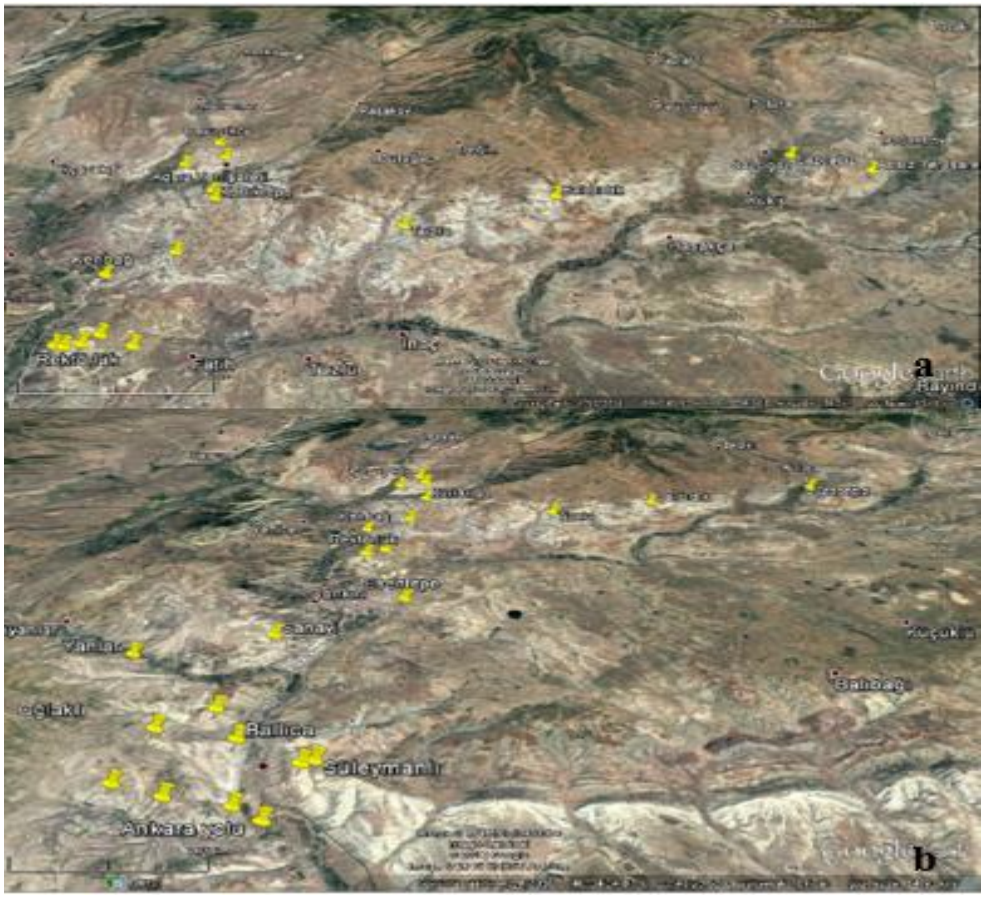
Anadolu, farklı coğrafik özelliklere ve çeşitliliğe sahip olması sebebiyle biyolojik çeşitlilik bakımından oldukça önemli bir potansiyele sahiptir. Öyle ki tüm Avrupa'da toplam 12.000 bitki türünden 2.750'si endemikken, Anadolu'da, 1/3'ü endemik olmak üzere yaklaşık 11.000 bitki taksonuna ev sahipliği yapmaktadır (Ekim vd. 2000). Dünyada endemik türlerin korunması ve nesillerinin devamının sağlanması adına ciddi çalışmalar yürütülmektedir. Ülkemizde bu konudaki çalışmalar 1992-1997 yılları arasında değer kazanmaya başlamıştır. Oldukça sınırlı bir alanda yaşamlarını devam ettiren endemik türler, nesillerini sürdürebilmek adına birtakım tehditlerle karşı karşıya kalmaktadır. Özellikle şehirleşme, sanayileşme, turizm, aşırı otlatma, tarım alanlarının bilinçsiz genişletilmesi, yangınlar, herbisit kullanımı gibi etkenler bitkiler için büyük tehlike oluşturmaktadır.

Çankırı il merkezinin bulunduğu bölgenin toprak yapısı, jipsli (alçıtaşı) serilerden oluşmuştur (Şekil 1.1). Birçok endemik bitkinin bulunduğu bu bölgede Türkiye Florası'nın ilk 10 cildinin kayıtlarına göre 119 tanesi endemik olmak üzere toplam 357 tür yaşamaktadır (Davis 1965, Davis 1988). Daha sonra yapılan çeşitli flora çalışmaları ile tür sayısının 1000'in üzerinde olduğu tahmin edilmektedir.



Şekil 1.1 *A. nezaketiae*'nin yayılış alanı Çankırı/TÜRKİYE (Bakis *et al*. 2011)

Çankırı'nın, kurak ve yarı kurak ikliminde lokal ve endemik olarak doğal bir yayılış gösteren (Şekil 1.2) ve Uluslararası Doğa Koruma Birliği (International Union for Conservation of Nature (IUCN)) verilerine göre henüz tehlike kategorisinde yer almamasına karşın hem yaşam alanının 100 km^2 civarında olması, hem kesin bulunduğu habitat sınırlarının çok küçük olması nedeniyle dağılış kriteri bakımından CR (Kritik Seviyede Nesli Tehdit Altında) kategorisine aday olduğu bilinen *A. nezaketiae* (Aytaç ve Duman 2000) oldukça önem arz etmektedir.



Şekil 1.2 Türün tespit edildiği noktaların uydu görüntüsü (Anonim 2016)

Brassicaceae (Hardalgiller-Turpgiller) familyasına ait, küçük ve otsu formlarda genellikle bir ya da çok yıllık olan bu bireyler Antarktika kıtası hariç dünya üzerinde geniş bir alanda yayılış sergilemektedir (Koch and Kiefer 2006). Brassicaceae familyası günümüzde yaklaşık 320 cins ve bu cinslere ait yaklaşık 3.700 kadar tür ile bilinmektedir (Anonim 2016).

Grup olarak damarlı bitkiler olarak sınıflandırılırken ayrıca çiçekli bitkiler ailesine de mensup olan Brassicaceae taksonomi sınıflandırması aşağıdaki gibidir (Mabberley 1987);

Alem: Plantae
Bölüm: Tracheophyta
Sınıf: Magnoliopsida
Takım: Brassicales
Familya: Brassicaceae

Bu familya içerisinde yer alan *Alyssum* cinsine ait 210 kadar geçerli tür bulunmakla birlikte bunlardan 110 kadarı Türkiye'de yer almaktadır. Bu bitkilerin yaklaşık 50 kadarı endemik olup genelde dağlık ve engebeli alanlarda görülmektedir (Şekil 1.3). Yeryüzü genelinde ise en fazla Akdeniz çevrelerinde görülmesine karşın birkaç türün Kuzey Afrika, Orta Asya, Sibirya ve Kuzey Amerika'da da yer aldığı bilinmektedir (Dudley 1964, Dudley 1965).



Şekil 1.3 *A. nezaketiae*'nin a) çiçekleri ve b) habitatı

Doğal yaşam alanları sınırlı olan endemik türlerin hem yaşam alanlarının korunması hem tür devamlılığının sağlanması oldukça mühimdir. Bu amaçla bu bitkilerin kültüre alınma çalışmalarının yapılması oldukça önemlidir.

Çankırı ilinde lokal endemik olarak bulunan *A. nezaketiae* jipsli sahalara özgüdür (Aytaç ve Duman 2000). Bu türün bireylerine, erozyonun şiddetli olduğu, topraktaki organik maddenin az olduğu, ana kayanın yüzeyde çözünme gösterdiği oldukça ekstrem koşullara sahip ortamlarda dahi rastlanmıştır.

Bir yerleşim alanının çevresinde yayılış gösteren dolayısıyla insan etkisine maruz kalma ihtimali yüksek olan bunun yanında aşırı otlatma, tarla açma, yol yapım çalışmaları, hızla artan nüfusa bağlı olarak kentleşme gibi faktörler *A. nezaketiae* türünün neslini tehlikeye sokmaktadır. Tüm bunlara ek olarak her ne kadar erozyonun tehdit ettiği ekstrem alanlarda yayılış gösterse de, bu derece hızlı gerçekleşen erozyonun, bitkinin yaşayabileceği alanları her geçen gün sınırlandırdığını söylemek mümkündür. Tüm bunlar düşünüldüğünde bu türün *in vitro* teknikler kullanılarak kısa sürede vejetatif olarak çoğaltılması oldukça mühimdir.

Bu tez çalışmasında, *A. nezaketiae* bitkisinin sürgün ucu ve nodları eksplant kaynağı olarak kullanılmış, doku kültürünün mikro çoğaltım tekniği ile hızlı ve klonal olarak çoğaltılmıştır. *A. nezaketiae* eksplantları *in vitro* şartlarda kültüre alınmış, kültür ortamında katılaştırıcı olarak gelrite, 2 farklı temel besin ortamı, bitki büyüme düzenleyicilerin (BDM) 36 farklı kombinasyonuyla köklendirme ile sürgün rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Kök ve sürgün gelişimi gösteren bitkiler aklimitizasyon aşamasına alınmış ancak bitkiler dış koşullara uyum sağlayamamıştır. Dış koşullarda gelişim gösteremeyen bitkilerin abiyotik stres faktörlerine karşı toleransları belirlenememiştir. Bu çalışma ile *in vitro* şartlarda *A. nezaketiae*'nin çoğaltımı konusunda ilk kez çalışılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1 Brassicaceae Familyasındaki Farklı Türlerin *in vitro* Çoğaltım Çalışmaları

Ceylan (2015), yaptığı tez çalışmasında *Crambeorientalis* L.'de mikroçoğaltımını gerçekleştirmek amacıyla NAA ve BAP'ın farklı dozlardaki etkilerini incelemiştir. *C. orientalis* tohumlarını BDM içermeyen Murashige ve Skoog (MS) ortamında kültüre almıştır. On dört gün sonra gelişen fidelerde eksplant kaynağı olarak boğum ve sürgün kullanmıştır. Eksplantları BAP ve NAA'nın 12 farklı kombinasyonunu içeren MS ortamında kültüre almıştır. Böylece yüzde olarak kallus ve sürgün oluşum oranlarını, eksplant/ortalama sürgün sayıları ile sürgün uzunluğuna olan etkilerini tespit etmiştir. Sürgün uçlarının kültüre alınmasıyla tüm BDM konsantrasyonlarında kallus oluşumunu gözlemlemiştir. Ortalama sürgün uzunluğuna en fazla MS-BAP (2 mg/L) ortamında ulaşılmıştır. Rejenere edilen sürgünleri farklı konsantrasyonlarda NAA içeren MS besin ortamında köklendirmiş ancak genel olarak rejenere sürgünlerinin köklendirilmesinin güç olduğunu gözlemlemiştir (Ceylan 2015).

Özdemir ve Yıldırım (2016), yaptıkları çalışmada *in vitro* koşullarda üretilen bitkileri hipokotil kısımlarını eksplant kaynağı olarak kullandıkları *Crambemaritima* L.'nin mikro çoğaltımını amaçlamışlardır. Eksplantlar, BAP (0,50-1-2 mg/L) ve NAA'nın (0-0,25-0,5 mg/L) 9 farklı kombinasyonu ile oluşturulan MS temel besin ortamında kültüre alınmıştır. Kallus oluşum yüzdesi ortalamaları en fazla BAP (0,5 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) içeren MS besin ortamında, rejenere sürgün yüzdesi ortalamalarında da MS-BAP (2 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) ortamında, her eksplantın ürettiği ortalama sürgün sayısını maksimum MS-BAP (1 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) besin ortamında, ortalama sürgün uzunluğunu maksimum MS-BAP (2 mg/L) besin ortamında kaydetmişlerdir. Gelişimleri iyi olan sürgünler MS-NAA (1 mg/L) bulunduran ortamda köklendirilmiştir (Özdemir ve Yıldırım 2016).

Memon ve Memon (2021), yaptıkları çalışmada bir Cu akümülatörü olduğu bilinen *Brassica nigra* için etkili bir bitki rejenerasyon protokolü oluşturmuşlardır. 10 günlük olgun bitkilerden alınan nodları, eksplant olarak kullanmışlardır. En yüksek kallus

oluşum yüzdesini (%100) 0,1 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA, 0,6 mg/L + BAP 0,2 mg/L NAA içeren MS besin ortamlarında gözlemişlerdir. En yüksek sürgün oluşum yüzdesini (%100) 0,6 mg/L BAP + 0,05 mg/L IBA, 0,2 mg/L IBA + 0,2 mg/L NAA ortamlarında elde etmişlerdir. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (3,25) 0,6 mg/L BAP + 0,05 mg/L IBA takviyeli MS ortamında elde edilmiştir. MS ortamında gelişim gösteren bitkiler toprağa aktarılmış, bitki büyüme odasında bir ay büyütülmüştür (Memon ve Memon 2021).

Yıldızhan (2007), *Brassica nigra* bitkisinin *in vitro* şartlarda çoğaltımını amaçlamışlardır. Çalışmada *B. nigra*'nın fitoremediasyon amaçlı yoğun olarak üretimi ile düşük maliyetli ve verimli bir rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. Steril edilen *B. nigra* tohumlarını, hormonsuz MS besin ortamında 30 gün boyunca kültüre almış; bu dönemdeki bitkileri, değişik dozlarda BAP ve NAA bulunduran MS besin ortamlarına aktarmıştır. Yüksek kallus oluşumunu hipokotil, apeks ve gövde eksplantlarında saptarken direkt ve indirekt sürgün rejenerasyonlarının her ikisini de apeks eksplantlarında belirlemiştir. Direkt sürgün oluşumunu NAA ve BAP'ın tüm kombinasyonlarında sağlarken apeksten indirek sürgün oluşumunu, NAA ve BAP büyüme düzenleyicilerinin uygun oranlarda bulunduğu besi ortamlarında tespit etmiştir. İndirekt ve direkt oluşan sürgünleri, kök rejenerasyonu için 5 farklı MS besin ortamına aktarmış ve 7-20 gün içerisinde kök gelişimi gözlemlemiştir. Rejenerasyonu tamamlayan bitkileri toprağa aktarmıştır (Yıldızhan 2007).

Demir (2020), endemik *R. carnosula*'nın somatik embriyogenesis ya da organogenesis ile rejenerasyonunu sağlayarak etkili bir *in vitro* klonal üretim protokolü ortaya koymayı amaçlanmıştır. Eksplant kaynağı olarak embriyolardan elde edilen bitkiciklerin hipokotil ve kotiledonları kullanmıştır. Eksplantlar oksin grubu IAA, NAA ve 2,4-D, sitokinin grubu BAP, TDZ ve Zeatinin çeşitli konsantrasyonlarından oluşan 73 farklı rejenerasyon ortamına dikilmiştir. Böylece eksplant tipleri ve rejenerasyon ortamlarının yalnız ve birbirleri ile olan etkileşimlerinin; eksplant tepkisi, kallus miktarı, kallus çeşidi (embriyogenik ya da organogenik), antosiyanin oluşumları, direkt veya indirekt somatik embriyogenesisi ile sürgün-kökü kapsayan organogenesis oluşumları üzerine

etkilerini araştırmıştır. Çalışma sonunda kontrol ortamlarında somatik embriyo, sürgün ve yoğun olarak kök yapıları oluşumları gözlenmiştir (Demir 2020).

2.2 *Alyssum* sp. Hakkında Yapılan Çeşitli Çalışmalar

Oturgan (2007), 5 cinse ait 11 tür bitkiyi biyolojik aktiviteleri açısından incelemiştir. Bitkiler üzerinde yaptığı çalışmada iki tanesinin potansiyel sitotoksik, birinin DPPH, tamamının ise indirgen özellikte olduğunu ve suyu temizleme durumuna göre antioksidan olduğunu, sekiz bitkinin de mikrobiyolojik aktivitelerinin anlamlı olduğunu ifade etmiştir.

Bazı *Alyssum* türlerinin gıda sanayinde doğal stabilizatör olarak kullanılmasının yanı sıra bazı türlerinde önemli bazı biyolojik aktivitelere sahip olduğunu Hamedi vd. (2015), Erdogan vd. (2015) yaptığı çalışmalarda belirtmişlerdir (Hamedi vd. 2015, Erdogan vd. 2015).

Bayramoğlu vd. (2012) yaptığı çalışmada, *Alyssum discolor* T.R. Dudley & Hub.-Mor.'un kimyasal olarak modifiye edilmiş biokütlesinin, sulu ortamlarda bulunabilen reaktif sarı tekstil boyasının ayrıştırılmasında biyolojik çözücü olarak kullanılabileceğini saptamıştır (Bayramoğlu vd. 2012).

Akdemir vd. (2019) yaptıkları çalışma ile *Alyssum* cinsine ait *A. pateri*subsp *prostratum* bitkisinde kök, toprak üstü ve çiçek kısımlarında kütle azaltma katsayıları ile molar yok-olma katsayılarını incelemişlerdir. Toprak üstü ve çiçek yapılarının kök yapısına nazaran daha yüksek oranda radyasyon soğurma kabiliyetinin olduğunu saptamışlardır (Akdemir vd. 2019).

A. corsicum'un bitkisel arıtım çalışmalarında kullanılmaya aday bir bitki olarak ağır metallerden özellikle nikelin biyoremediyasyonu ve geri kazanılmasında oldukça önemli bir role sahip olduğunu vurgulayan Babaoğlu (2008), bu araştırmasında *A. corsicum* bitkisini doku kültürü şartlarında çeşitli nikel derişimleri varlığında

yetiştirmiştir. Bitkinin nikel metalini gövdesinde köklerine oranla daha fazla biriktirdiğini ve nikel metalinin derişimindeki artışla birlikte yaprak tüyü yoğunluğu ve yapısında değişiklikler meydana geldiğini gözlemlemiştir. Ayrıca *Alyssum pterocarpum* T.R. Dudley, *Alyssum cypricum* Nyár, *Alyssum discolor* T.R. Dudley & Hub-Mor. *Alyssum huber-morathii* T.R. Dudley, *Alyssum masmenaeum* Boiss., *Alyssum caricum* T.R. Dudley, *Alyssum davisianum* T.R. Dudley, *Alyssum pinifolium* (Nyár.) T.R. Dudley, *Alyssum peltarioides* Boiss. sub sp. *peltarioides*, *Alyssum callichroum* Boiss .& Balansa, *Alyssum crenulatum* Boiss., *Alyssum samariferum* Boiss. & Hausskn türlerinin öne çıkan Ni biriktirici *Alyssum* türleri olduğunu Adıgüzel ve Reeves (2012) bildirmiştir (Adıgüzel ve Reeves 2012).

Tozyılmaz (2019) çalışmasında, ülkemizde endemik olarak yetişen *Alyssum discolor* Dudley & Hub-Mor., bitkisinden elde ettiği ekstraktların, disk difüzyon yöntemiyle on sekiz bakterive iki fungus suşuna karşı antibakteriyel ve antifungal aktivitelerini incelemiştir. *Alyssum discolor* Dudley & Hub-Mor. antimikrobiyal çalışmada en düşük etkiyi gösterirken funguslara karşı bir etki gösterememiştir. Anti biyofilm çalışmasında ise yine en düşük aktiviteyi göstermiştir (Tozyılmaz 2019).

Tajbakhsh vd. (2012) gerçekleştirdikleri çalışmada, *Alyssum*'un metanol ekstraktlarında fenolik miktarı, antioksidan özellikleri gram pozitif ve negatif bakterilerdeki aktiviteleri incelemiştir (Tajbakhsh vd. 2012).

Alyssum türlerinin ,özellikle çok yıllık olanlarının, kuraklığa dayanıklı olmaları ve toprak istekleri bakımından da kanaatkar olmaları nedeniyle erozyon çalışmalarında öncü bitki olarak kullanılabileceğini Kürşat vd. (2008) ifade etmiştir (Kürşat vd. 2008).

Ertuğ (2014), Türkiye'de Goramaz olarak adlandırılan *Alyssum constellatum* Boiss. türünün yapraklarının gıda olarak tüketildiğini bildirmektedir (Ertuğ 2014).

Alyssum minus Rothm. tohumlarının rahatlatıcı ve kabızlık giderici olarak; *Alyssum campestre* L. yapraklarının, rahatlatıcı ve öksürük kesici olarak; *Alyssum alyssoides* L.

ateş düşürücü, rahatlatıcı, faranjit önleyici, öksürük kesici ve ses kısılmasını önleyici olarak kullanıldığını Amiri vd. (2012), Amiri vd. (2013), Parsaei vd. (2016) ifade etmiştir (Amiri vd. 2012, Amiri vd. 2013, Parsaei vd. 2016).

2.3 *Alyssum* sp.'de *in vitro* Çoğaltım Çalışmaları

Vinterhalter vd. (2008) *Alyssum murale* ile çalışmışlar ve sürgün oluşumu için en ideal ortamın 0,46 µM kinetin içeren MS besin ortamı olduğunu ortaya koymuşlardır. Eksplantlar üzerinde yaklaşık bir ay sonra kök oluşumları gözlenmiştir. Kökler izole edilmiş ve BDM içermeyen ortamda çoğaltmışlardır. Bazı eksplantlarda hızlı büyümeyi gözlemlerken, kendiliğinden sürgün oluşumunu görmüşlerdir (Vinterhalter vd. 2008).

Bayat (2017) yaptığı çalışmada Çanakkale'de yayılış gösteren *Alyssum pinifolium* (Nyar.) TR. Dudley türünün mikro çoğaltımını gerçekleştirmiştir. Materyal olarak *in vitro* yetiştirilmiş bitkilerin sağlıklı nod, internod, yapraklarını kullanmış ve MS ortamında kültüre almıştır. Kültür ortamına farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BAP ve IAA ilave etmiştir. Kallus oluşumda MS-BAP (2 mg/L) ve IAA (0,1 mg/L) besin ortamında en iyi sonuca ulaşılmıştır. Yapılan altkültürler sonucunda indirekt organogenesis elde edilmiştir (Bayat 2017).

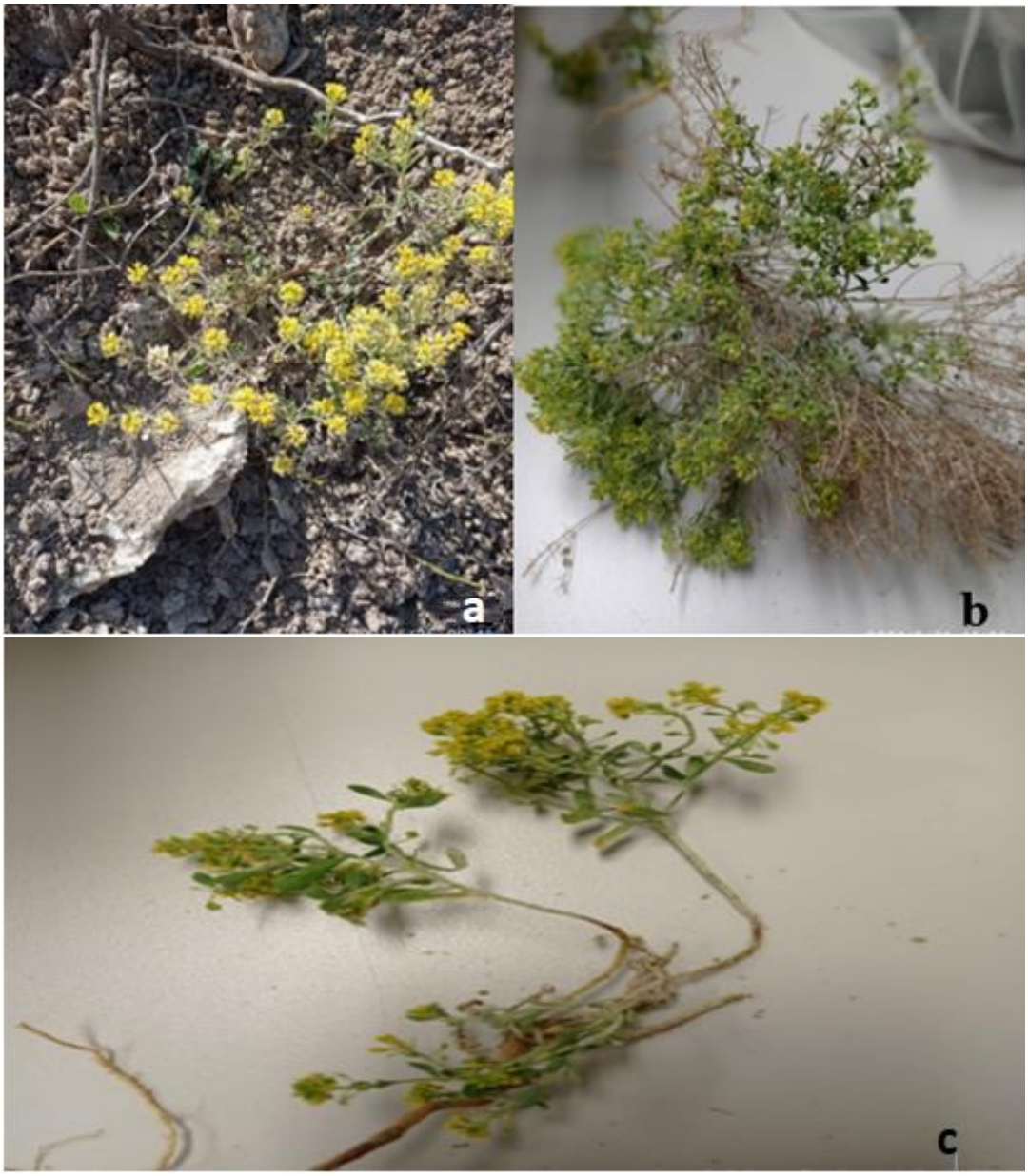
3. MATERYAL YÖNTEM

Tez çalışmasında denemeler 2020-2023 yılları arasında, ÇAKÜ Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.1. Materyal Temini

Nezaket kevkesi (*A. nezaketiae*), ilk olarak Prof. Dr. Hayri Duman tarafından 1995 yılında Çankırı-Kastamonu yolu üzeri Kenbağ Mevkii'nden toplanmıştır. Daha sonra yapılan araştırmalarla bitkiye Çankırı-Ankara yolu, Ballıca Mevkii'nde de rastlanmıştır (Vural ve Şahin 2013). Böylece Türkiye'de sadece Çankırı il merkezi çevresinde; Ankara yolu, Kastamonu yolu ve Yapraklı yolu kenarındaki eğimli tepelerdeki jipsli topraklarda yayılış gösteren, Kritik Seviyede Nesli Tehdit Altında (CR) kategorisine aday olduğu bilinmekte olan yaklaşık 10 cm boyunda, sarı çiçekli, küçük ve hoş görünüşlü bir bitkidir.

Vejetasyon döneminin başlamasıyla birlikte ilkbaharda (Nisan-Mayıs) arazide görülmeye başlayan Nezaket Kevkesi, genellikle mayıs ayının ortalarına denk gelecek şekilde çiçeklenmeye başlar. Çankırı Karatekin Üniversitesi mevkiinde, 40°28'54"N-33°38'48"E koordinatlarına sahip alandan doğal yaşam ortamları ve çoğalmaları olumsuz etkilenmeyecek şekilde toplanan bitkiler laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.1).

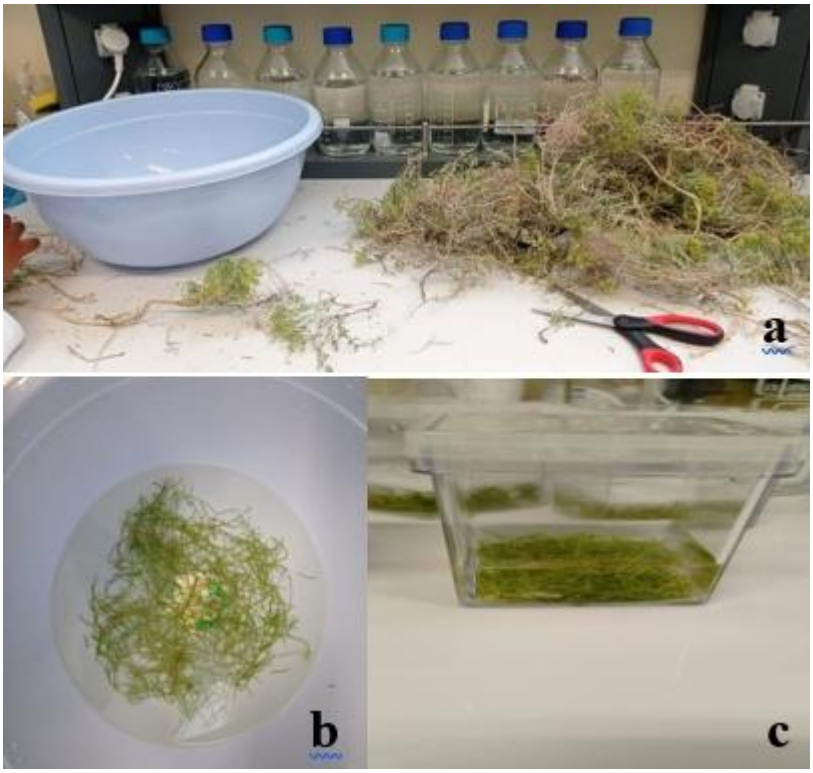


Şekil 3.1 a) *A. nezaketiae* bitkisini tam çiçekli görünümü, b) Araziden toplanarak laboratuvara getirilen *A. nezaketiae ve* c) *A. nezaketiae* bitkisinin çiçek, yaprak ve sürgünleri

3.2 Arazi Çalışması Sonrası Bitkilerin Sterilizasyonu

Yetişme alanından toplanan *A. nezaketiae* laboratuvara getirilmiş, *in vitro* şartlarda dikiminden önce bitkinin gerekli yüzey sterilizasyon protokolü aşağıdaki şekilde uygulanmıştır (Sezgin and Dumanoğlu 2014):

- İlk olarak bitki musluk suyu altında 20 dk. süresince yıkanmıştır.
- Etanolde (%70) 3 dk. muamele edilmiştir.
- Ticari sodyum hipokloritin (%15 klor içeren NaOCl) %20'lik solüsyonuna etkinliği artırması için Tween 20'den (8-10 mg/L) ilave edilmiş ve 10 dk. süresince muamele edilmiştir.
- NaOCl'in dokulardan arındırılması amacıyla 5 dakika boyunca steril saf su ile aseptik koşullarda çalkalanmış ve bu işlem 3 kez tekrar edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 *A. nezaketiae*'nin sterilizasyonu a) Bitkinin sürgünlerinin ayrılması, b) EtOH uygulaması ve c) Dikime hazır eksplantlar

3.3 Temel Besin Ortamları ve Büyüme Düzenleyici Maddeler

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen *A. nezaketiae* bitkisinin sürgün ucu ve sürgün üzerindeki nodları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu amaçla başlangıç aşamasında farklı temel besin ortamları ile oksin ve sitokinin grubu bitki büyüme düzenleyici maddelerin (BDM) farklı dozları ile yapılan kombinasyonları kullanılmıştır

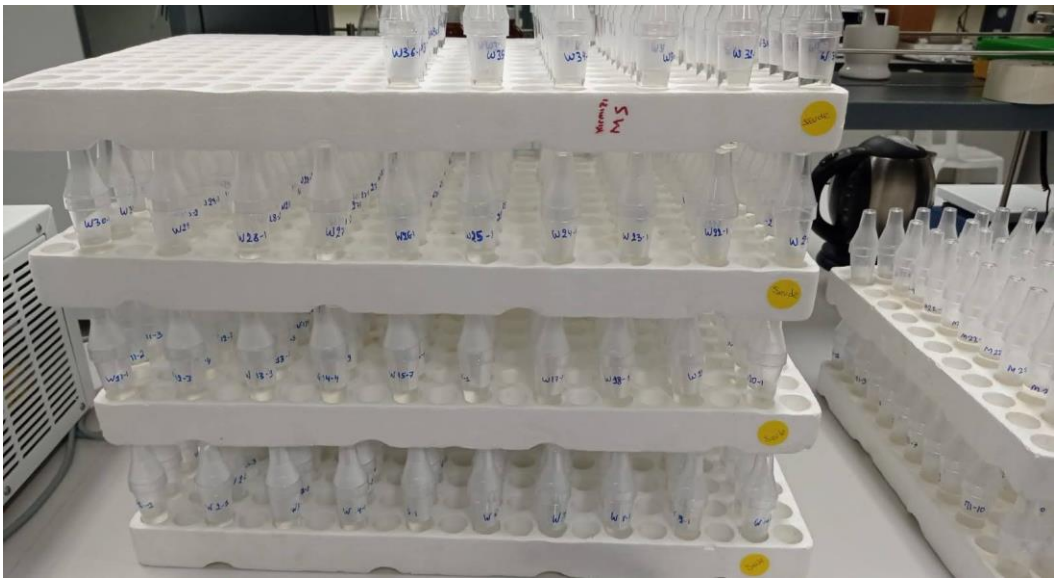
(Şan *et al*. 2007, Yıldızhan 2007, Sezgin and Dumanoğlu 2014). Bu aşamada ortamlarla birlikte ve BDM kombinasyonlarının başlangıç aşamasındaki etkileri denenmiştir (Çizelge 3.1).

1. Başlangıç aşamasında kullanılan temel besin ortamları
   a) Murashige ve Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962)
   b) Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd and McCown 1981)
2. Büyümeyi düzenleyici maddeler ve dozları
   a) 6-benzilaminopurin (BAP-0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L)
   b) Kinetin (KIN-0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L)
   c) Indol-3-asetik asit (IBA-0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L)
   d) α-naftalenasetik asit (NAA-0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L)

A. nezaketiae için 2 temel besin ortamı, 6 tane sitokinin ve 6 tane oksin dozlarının bulunduğu 36 farklı kombinasyonda hazırlanmış olan temel besin ortamlarına karbon kaynağı olarak sakkaroz (30 g/L), katılaştırıcı olarak da gelrite (2,1 g/L) eklenmiştir. Ortamların pH'ı 5,7'ye ayarlanmıştır (Babaoğlu vd. 2001). Tüm kombinasyonlar onar tekrar olacak şekilde hazırlanmıştır. Dikim aşamasından sonra olası bir kontaminasyonu engellemek amacı ile besin ortamlarına Plant Preservative Mixture (PPM-(Duchefa®)) (1 ml/L) olacak şekilde eklenmiştir. Uygun miktarlarda BDM ve katılaştırıcı içeren besin ortamları erlenmayerlere eşit miktarlarda paylaştırılmış (120 ml) ve sterilizasyonun sağlanması amacıyla otoklava konulmuştur. Otoklavda 20 dk boyunca 121°C sıcaklık ve 1,2 atm basınçta ortamların sterilizasyonu sağlanmıştır (Sezgin and Dumanoğlu 2014). Sterilizasyon sonrasında besin ortamları, laminar hava akışlı kabin içerisinde gelrite katılaşmadan 130x10 mm ebatlarındaki steril tüplere yaklaşık 10 mL olacak şekilde paylaştırılmıştır (Şekil 3.3).

Çizelge 3.1 BDM kombinasyonları

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



Şekil 3.3 Laminar flow kabin içerisinde her bir steril tüpe 10 ml olacak şekilde aktarılan besin ortamlarının görünümü

3.4 Eksplantların dikimi ve inkübe edilmesi

Sterilizasyon aşamasından sonra *A. nezaketiae* bitkisinin nod ve sürgün uçları eksplant kaynağı olarak kullanılmış ve bu eksplantların tüplere dikimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Her tüp içine 1 adet eksplant dikilmiştir (Şekil 3.5). Tüm kültürler bu aşamadan itibaren 25±1ºC'de, 16/8 saat aydınlık/karanlık (35 µmol·m^{-2} s^{-1}) şartlarda olan iklim kabinine alınmış ve bir ay boyunca burada düzenli olarak kontrol edilerek inkübasyonları sağlanmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.4 Laminar hava akışlı kabin içerisinde eksplantların tüplere dikimi



Şekil 3.5 Dikim sonrası eksplantlar



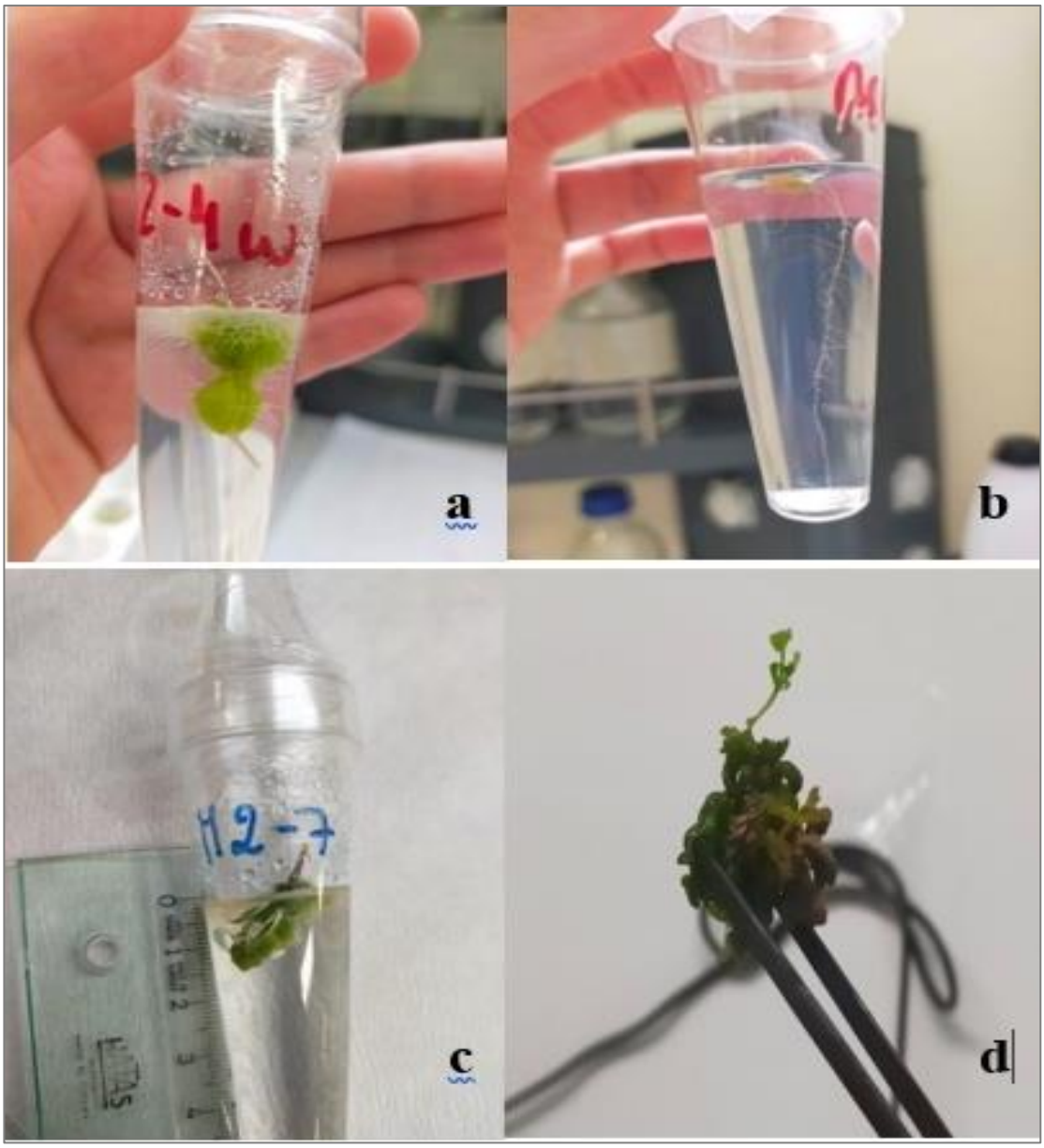
Şekil 3.6 İnkübe edilen eksplantlar (İklim kabini)

3.5 Altkültür

A. nezaketiae bitkisinin yapraklarından temizlenerek uygun koşullarda sterilize edilen ve ardından dikimi gerçekleştirilen eksplantları, iklim odasında inkübe edilmiş ve gün

aşırı kontrolü sağlanmıştır. Eksplantlar, besin ortamları ve BDM kombinasyonları başlangıç aşamasındaki kombinasyonlara bağlı kalınarak altkültüre alınmış çoğalmaları ve gelişimleri takip edilmiştir.

Eksplantların başlangıçta kallus oluşumundan sonra sürgün ve kök gelişimlerini gerçekleştirebilmeleri amacıyla 28 gün aralıkla ile 4 kez altkültüre alınmıştır. Eksplantların altkültür çalışmaları devam eden süreçte besin ortamı MS ve katılaştırıcı olacak şekilde sürdürülmüştür. Bazı eksplantlar sürgün ve kök gelişimi göstermiş bu aşamada kök sayısı ve uzunluğu ile sürgün sayısı ve uzunluğuna ait veriler kaydedilmiştir. Doğrudan sürgün gelişimi gösteren eksplantlar kök gelişimi için köklendirme ortamlarına (Şekil 3.7) aktarılmıştır.

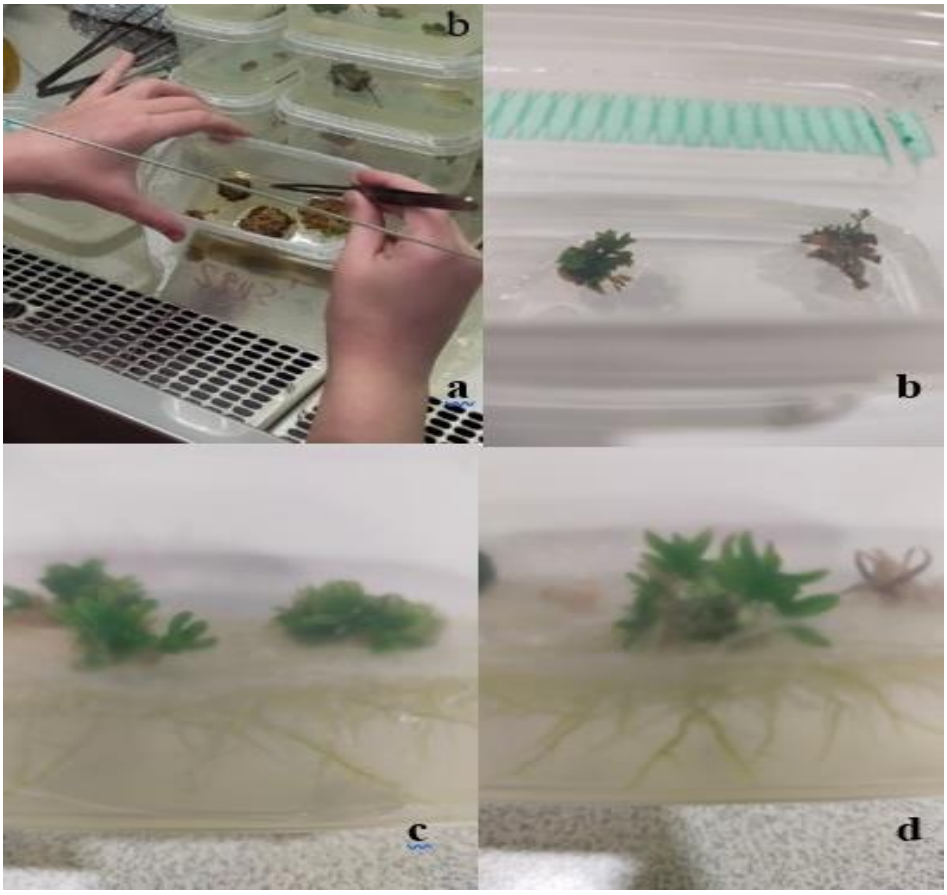


Şekil 3.7 Eksplantların gelişimi a) WPM-BAP (0 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamında kök gelişimi, b) MS-BAP (0 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) besin ortamında kök oluşumu, c) MS-BAP (0 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamında kallus oluşumu ve d) WPM-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0 mg/L) besin ortamında sürgün oluşumu

3.6 Eksplantların Köklendirilmesi

Köklendirme aşamasında aynı zamanda sürgün gelişimi de gösteren eksplantlar, MS ve WPM besin ortamları içerisine KIN ve IBA'nın farklı dozları ile birlikte katılaştırıcı olarak gelrite eklenmiş ve dikimleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada eksplantlar,

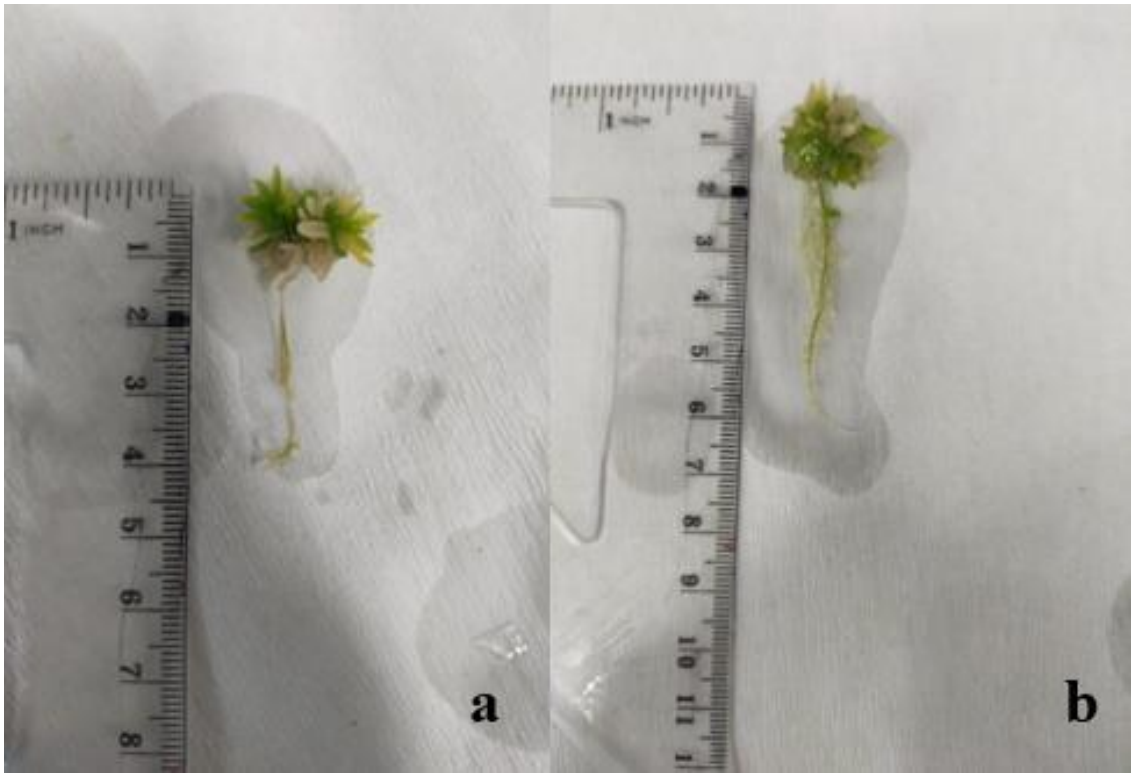
içerisinde 120 mL temel besin ortamı bulunan 125x65x80 mm ebatlarındaki steril tüplere dikilmiştir. Köklendirme aşaması yirmi sekizer günlük periyotlar halinde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada köklenme aşaması için dikilen bitkiler 25±1ºC'de, 16/8 saat aydınlık/karanlık şartlarda iklim kabini içerisinde inkübasyona alınmıştır (Mandal *et al*., 2013). Kök oluşumu gösteren eksplantlarda, adet olarak kök sayıları ve köklere ait uzunluklar (cm) ile meydana gelen sürgünlerin sayıları ve sürgün uzunlukları veri olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 *A. nezaketiae'*nin sürgün gelişimi gösteren eksplantlarının köklendirme ortamına aktarılması a) Köklendirme ortamına eksplantların aktarılması, b) Köklendirme amacıyla dikilmiş eksplantlar, c) ve d) MS besin ortamında KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) BDM kombinasyonuna sahip ortamda sürgün ve kök gelişimi

3.7 Aklimitizasyon Aşaması

A. nezaketiae eksplantlarından sürgünleri ve kökleri gelişmeye başlayanlar aklimitizasyon (dış koşullara alıştırma) aşamasına alınmıştır. Bulundukları temel besin ortamlarından dikkatle alınan bitkiler, üzerlerindeki ortam kalıntısının temizlenmesi amacıyla distile saf su ile iyice yıkanmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Rejene olmuş *A. nezaketiae* a) MS-KIN (1 mg/L) + IBA (1 mg/L) besin ortamında kök ve sürgün oluşumu ve b) MS-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında kök ve sürgün oluşumu

Gelişim gösteren bitkiler, çiçek toprağı, kum ve perlitten (hacimce 3:1:1 v/v) oluşan karışıma dikilmiştir. Bu karışım öncelikle ve topraktan kaynaklı olası bir kontaminasyonu engellemek amacıyla 121^{o}C'de ve 1,2 atm basınçta 90 dk süresince otoklav da sterilize edilmiştir. Bitkilerin toprağa dikimleri sonrasında yaklaşık 50 mL saf su ile ve günaşırı olacak şekilde sulanmıştır. Bitkiler küçük plastik kaplara dikilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Rejenere olan bitkilerin dış koşullara aktarılması

3.8 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 önemli farklılıkların belirlenmesi amacıyla Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, %5 hata sınırına göre uygulanmış ve farklılıklar harfler yardımıyla ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

A. nezaketiae'nin sürgün ucu ve nodları eksplant olarak kullanılmış ve bu eksplantların rejenerasyonları içinde bulundukları besin ortamları ile bu ortamların içerdikleri BDM kombinasyonlarına bağlı olarak gözlenmiştir. Bu amaçla her altkültürden sonra gelişim gösteren kallus, sürgün ve kök yapıları gözlenerek sayısal veriler kaydedilmiştir.

4.1 Altkültürlerde Meydana Gelen Sürgün Oluşumu

A. nezaketiae'nin *in vitro* çoğaltımında, besin ortamlarında kallusların rejenerasyonu ile oluşan sürgün sayıları gözlemlenmiş ve veriler istatiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu anlamda 'temel besin ortamı x BDM kombinasyonu' arasındaki interaksiyon, istatiksel olarak önemlidir ($P \leq 0.05$). Eksplantlarında, kültür başlangıç aşaması sonrasında kallustan meydana gelen sürgün oluşumuna ait değerler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 *A. nezaketiae'*de kallustan sürgün rejenerasyonuna ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu ($P \leq 0.05$)

Besin Ortamı			Besin Ortamı		
BDM	**MS**	**WPM**	**BDM**	**MS**	**WPM**
1	0±0c	0,3±0,6cd	**19**	0,8±1,8 cd	0±0d
2	1,4±3,4 cd	1±2,3cde	**20**	1,3±2,2 cd	2,7±3,7bcde
3	2,8±4,3 abcd	5,3±8,4abcd	**21**	2,7±3,6 abcd	5,1±13,1abcde
4	0±0c	0±0d	**22**	0,7±1,6 cd	2,6±4,5bcde
5	2,9±3,6 abcd	6,3±8,1ab	**23**	1,3±1,6 cd	4,6±6,6abcde
6	1,9±3.10abcd	2±3,6bcde	**24**	3,4±4,9 abcd	5,5±7,6abc
7	1,6±4,3bcd	0±0d	**25**	0,1±0,3 c	0,1±0,3cd
8	1,7±3,6 abcd	1,3±3,7bcde	**26**	**4,9±3,7 a***	1,3±2,7bcde
9	1,3±3.7cd	1,5±1,7bcde	**27**	4,7±4,7 ab	2±5bcde
10	1,1±2,5 cd	0,8±2,2cde	**28**	1±2,5 cd	0±0d
11	2,6±4,2 abcd	2,4±7,5bcde	**29**	1,2±3,7 cd	0,1±0,3cd
12	0,5±1,2 c	0,3±0,9cd	**30**	1,6±2,2 bcd	2,9±6,2bcde
13	1,3±2,0 cd	1,8±5,6bcde	**31**	0,2±0,4 c	0±0d
14	3,9±5,2 abc	1,1±2,6cde	**32**	1,8±3,5 abcd	1,5±4,4bcde
15	2,1±2,4 abcd	1,5±1,9bcde	**33**	2,7±4,1 abcd	**8±8,5a***
16	2,1±3,9 abcd	0,1±0,3cd	**34**	1,9±2,0 abcd	1,6±2,9bcde
17	0,2±0,4 c	0,2±0,4cd	**35**	0,8±1,2 cd	2,7±4bcde
18	0,1±0,3 c	0,3±0,6cd	**36**	0±0 c	1,8±1,9bcde

*Faklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

A. nezaketiae'de kallustan sürgün oluşumu "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" arasındaki interaksiyonda, MS-KIN (1 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamıyla birlikte WPM-KIN (0,5 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) besin ortamında, sürgün oluşumlarına ait en iyi değerler elde edilmiştir. Ayrıca, MS-KIN (1 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında ve WPM-BAP (0,5 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamında bulunan sürgünlerde rejenerasyon istatiksel olarak önemli bulunmuştur.

4.2 Altkültürlerde Meydana Gelen Sürgün Sayısı

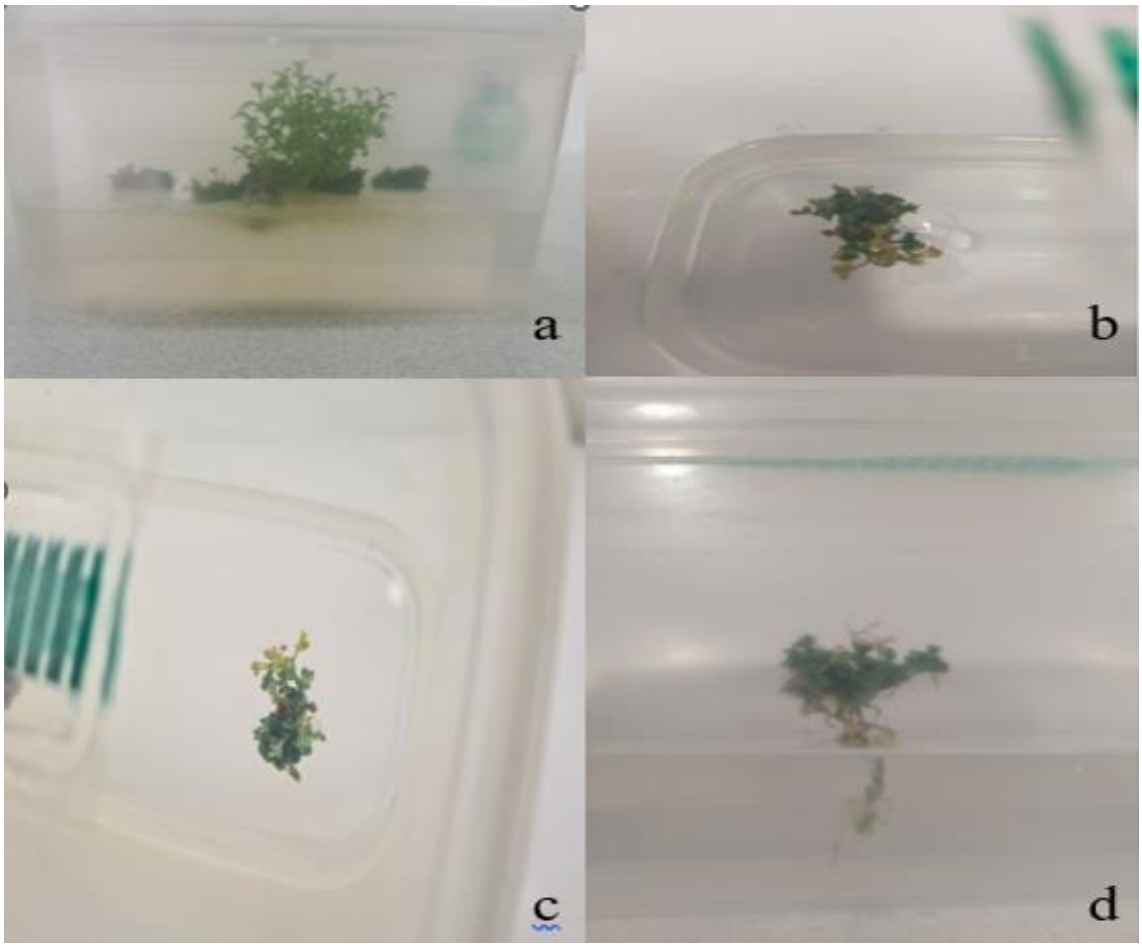
*A. nezaketiae'*nin *in vitro* çoğaltımında, eksplantların besin ortamlarında meydana gelen sürgün sayılarına ait veriler alınmış ve istatiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu anlamda, 'temel besin ortamı x BDM kombinasyonu' interaksiyonu istatiksel manada önemli olarak ortaya çıkmıştır (P≤0.05). Eksplantlarda meydana gelen sürgün sayılarına ait verilerin istatistiksel ortalamaları aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 *A. nezaketiae* eksplantlarında sürgün sayılarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu (P≤0.05)

	Besin Ortamı			**Besin Ortamı**	
BDM	**MS**	**WPM**	**BDM**	**MS**	**WPM**
1	0±0c	0±0c	**19**	0±0c	0±0c
2	0,2±0,6c	2,2±4,6abc	**20**	0,4±1,2c	4,4±7,6abc
3	0,7±1,4bc	2,6±3,6abc	**21**	1,2±1,9abc	2,7±5,1abc
4	0,1±0,3c	0±0c	**22**	0,8±2,5bc	0,7±1,6c
5	0,5±1,2c	1,1±2bc	**23**	0,2±0,6c	0,2±0,6c
6	0,7±1,4bc	3,3±5,9abc	**24**	1,2±2,5abc	**5,8±5,8a***
7	0,3±0,94c	0±0c	**25**	0±0c	0,1±0,3c
8	0,4±1,2c	1,4±3,7abc	**26**	2,4±3,5ab	1,8±5,6abc
9	0,3±0,9c	4,2±6,9abc	**27**	**2,6±3,8a***	2,5±5abc
10	0±0c	1,2±3,1bc	**28**	0±0c	0±0c
11	0,7±1,6bc	3,8±8,6abc	**29**	0,4±1,2c	0±0c
12	0±0c	1,4±4,4abc	**30**	1,1±2,3abc	2,1±4,3abc
13	0,8±2,5bc	1,5±3,8abc	**31**	0±0c	0±0c
14	0,4±0,6c	5,6±7,3ab	**32**	1,4±2,6abc	1,3±4,1abc
15	1,6±2,7abc	3,5±5,2abc	**33**	0,7±2,2bc	1,8±2,1abc
16	0,9±1,9abc	2,8±5,1abc	**34**	1,4±1,7abc	3±5,5abc
17	0±0c	0±0c	**35**	0±0c	0,6±1c
18	0±0c	0±0c	**36**	0±0c	0,1±0,3c

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

Eksplantlarda sürgün sayılarında “temel besin ortamı x BDM kombinasyonu” interaksiyonu önemli bulunmuştur. MS-KIN (1 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamının yanı sıra WPM-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında sürgün sayısı bakımından en iyi veriler elde edilmiştir. Ayrıca, MS-KIN (1 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamı ile WPM-BAP (0,5 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) besin ortamında sürgün sayıları istatistiksel manada önemlidir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Sürgün gelişimi a) WPM-BAP (0,5 mg/L) + NAA (0.25 mg/L) besin ortamında sürgün gelişimi, b) WPM-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında sürgün ve kök oluşumu, c) MS-KIN (1 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamında sürgün oluşumu ve d) MS-KIN (1 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamında sürgün oluşumu

4.3 Altkültürlerde Meydana Gelen Sürgün Uzunluğu

A. nezaketiae'nin *in vitro* çoğaltımının altkültür aşamasında eksplantlarda meydana gelen sürgün uzunluklarına ait veriler alınmış ve istatistiksel manada değerlendirilmesi sonrasında "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu istatistiksel anlamda önemli olarak ortaya çıkmıştır (P≤0.05) (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 *A. nezaketiae* eksplantlarında sürgün uzunluklarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu (P≤0.05)

Besin Ortamı			Besin Ortamı		
BDM	**MS**	**WPM**	**BDM**	**MS**	**WPM**
1	0±0b	0±0e	**19**	0±0b	0±0e
2	0,14±0,4b	0,29±0,6abcde	**20**	0,2±0,6ab	0,53±0,8abcde
3	0,16±0,3b	0,6±0,5abcde	**21**	0,25±0,5ab	0,43±0,7abcde
4	0,04±0,1b	0±0e	**22**	0,08±0,2b	0,13±0,2de
5	0,1±0,2b	0,24±0,4bcde	**23**	0,05±0,1b	0,04±0,1e
6	0,47±1ab	0,41±0,6abcde	**24**	0,27±0,4ab	**0,86±0,7a***
7	0,03±0b	0±0e	**25**	0±0b	0,1±0,3e
8	0,45±1,4ab	0,22±0,4bcde	**26**	0,24±0,3ab	0,15±0,4cde
9	0,06±0,1b	0,6±0,9abcde	**27**	0,34±0,4	0,46±0,8abcde
10	0±0b	0,16±0,3cde	**28**	0±0b	0±0e
11	0,26±0,6ab	0,32±0,6abcde	**29**	0,06±0,1b	0±0e
12	0±0b	0,22±0,6bcde	**30**	0,16±0,3b	0,28±0,4abcde
13	0,16±0,5b	0,19±0,4bcde	**31**	0±0b	0±0e
14	0,22±0,3ab	0,81±1ab	**32**	0,15±0,2b	0,12±0,3e
15	0,37±0,7ab	0,77±0,9abc	**33**	0,1±0,3b	0,64±0,76abcde
16	0,2±0,4ab	0,36±0,6abcde	**34**	**0,65±0,7a***	0,75±1,2abcd
17	0±0b	0±0e	**35**	0±0b	0,17±0,3cde
18	0±0b	0±0e	**36**	0±0b	0,04±0,1e

*Faklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

Eksplantlarda sürgün uzunluk verileri "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu, MS-KIN (1 mg/L) ile WPM-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında en iyi sürgün uzunluğuna ulaşılmıştır. Ayrıca MS-BAP (0,5 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) ile BAP (0,5 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) BDM kombinasyonuna sahip ortamlardaki sürgün uzunluğu istatiksel olarak önemli bulunmuştur.

4.4 Altkültürlerde Meydana Gelen Kök Sayısı

A. nezaketiae'nin in vitro çoğaltımında, altkültürlerde eksplantların meydana getirdikleri köklere ait sayılar veri olarak alınmış ve yapılan istatistiksel değerlendirmede, "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu istatistiksel manada önemli olarak nitelendirilebilecek bir farklılık ortaya koymamıştır (P≤0.05) (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 *A. nezaketiae* eksplantlarında kök sayılarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu (P≤0.05)

Besin Ortamı			Besin Ortamı		
BDM	**MS**	**WPM**	**BDM**	**MS**	**WPM**
1	0±0a	0,5±1,5a	**19**	0,1±0,3a	0±0a
2	1,4±3,5a	6,5±13,6a	**20**	0,2±0,6a	7,9±15,3a
3	2,7±5a	4±10,2a	**21**	0,8±1,1a	4,4±7,5a
4	0,1±0,3a	0±0a	**22**	0,7±2,2a	0,7±1,4a
5	0±0a	0±0a	**23**	0,1±0,3a	0,1±0,3a
6	1,3±2,6a	4,9±12,3	**24**	2,2±6,2a	3,3±5,7a
7	0,3±0,9a	0±0a	**25**	0,1±0,3a	0,5±1,5a
8	2±6,3a	4±9,2a	**26**	1,1±2,8a	6,6±20,8a
9	2±6,3	4,4±8,4a	**27**	0,8±1,6a	5±15,12a
10	0±0a	1,2±3,7a	**28**	0±0a	0±0a
11	3,2±7,5a	7,4±15,9a	**29**	0±0a	0±0a
12	0,2±0,6a	0,6±1,8a	**30**	0,1±+0,3a	5,9±13,2a
13	0,9±2,8a	2,9±9,1a	**31**	0,1±0,3a	0±0a
14	0,9±2,2a	6,5±10,4a	**32**	0,4±1,2a	0,4±1,2a
15	2,2±4,5a	6,8±14,6a	**33**	0,4±0,8a	0,7±1,4a
16	0±0a	2,5±7,9a	**34**	2,1±3,5a	3,3±8,5a
17	0,2±0,6a	0±0a	**35**	0±0a	0,4±0,6a
18	0±0a	0±0a	**36**	0±0a	0,6±1,8a

*Faklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

Eksplantlarda kök sayılarının "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" arasındaki interaksiyonunda istatiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Elde edilen veriler, tüm kombinasyonların ve besin ortamlarının kök sayıları üzerinde aynı etkiyi gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

4.5 Altkültürlerde Meydana Gelen Kök Uzunluğu

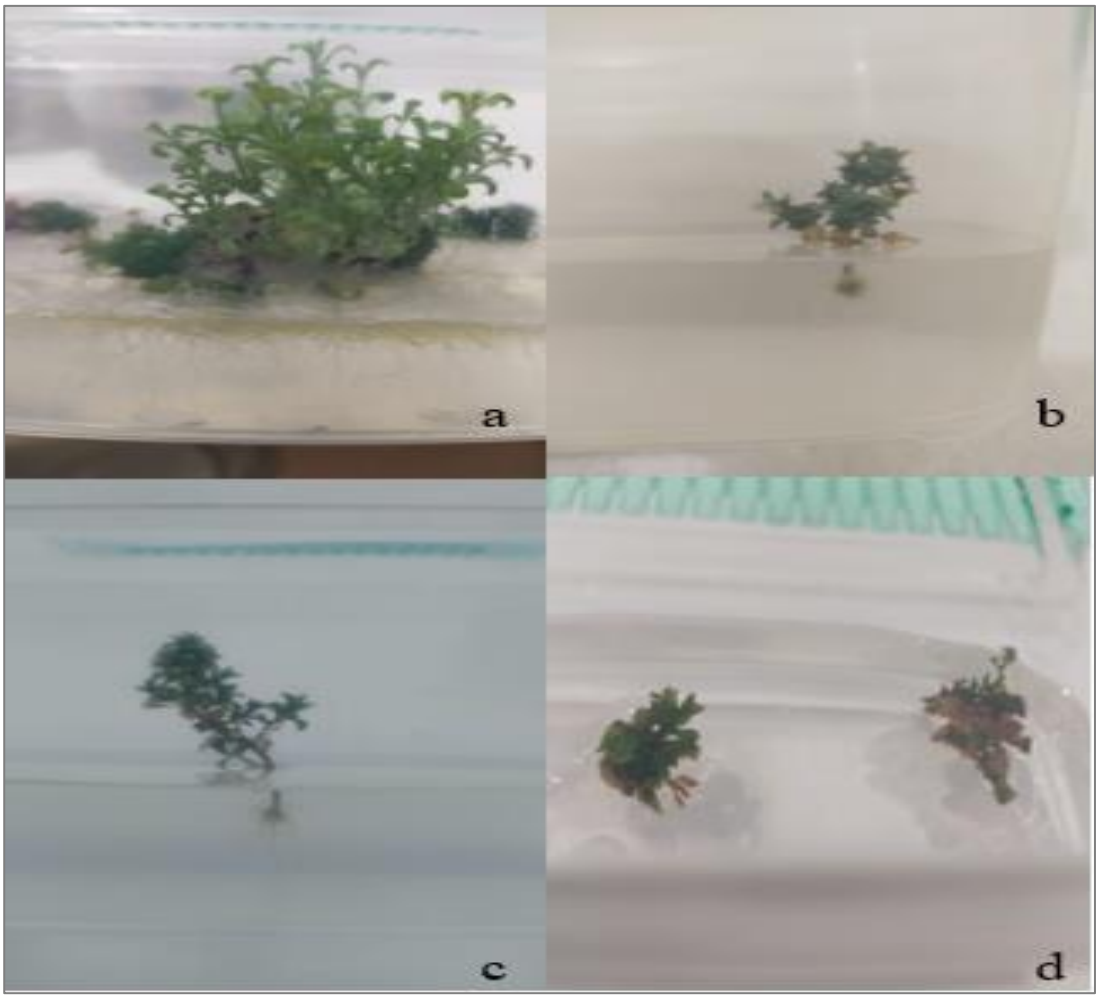
A. nezaketiae'nin in vitro çoğaltımında, altkültürlerde meydana gelen köklere ait uzunluk verileri alınmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" arasındaki interaksiyon istatistiksel manada önem oluşturduğu anlaşılmıştır (P≤0.05) (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 *A. nezaketiae* eksplantlarında kök uzunluklarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonu (P≤0.05)

Besin Ortamı			Besin Ortamı		
BDM	**MS**	**WPM**	**BDM**	**MS**	**WPM**
1	0±0a	0,1±0,3bcd	**19**	0,5±1,5a	0±0d
2	0,3±0,6a	0,65±1,1abcd	**20**	0,15±0,47a	0,8±1,1abcd
3	0,7±1,1a	0,37±0,6abcd	**21**	0,49±0,9a	0,58±0,9abcd
4	0,05±0,1a	0±0d	**22**	0,17±0,5a	0,3±0,6abcd
5	0±0a	0±0d	**23**	0,002±0a	0,08±0,2bcd
6	0,27±0,4a	0,28±0,7abcd	**24**	0,19±0,4a	0,96±1,3ab
7	0,15±0,4a	0±0d	**25**	0,03±0a	0,1±0,3bcd
8	0,2±0,6a	0,62±1,3abcd	**26**	0,31±0,6a	0,3±0,9abcd
9	0,35±1,1a	0,62±1,1abcd	**27**	0,2±0,4a	0,45±1,1abcd
10	0±0a	0,04±0,1cd	**28**	0±0a	0±0d
11	0,39±0,8a	0,47±0,9abcd	**29**	0±0a	0±0d
12	0,5±1,5a	0,15±0,4bcd	**30**	0,02±0a	0,4±0,8abcd
13	0,15±0,4	0,24±0,7abcd	**31**	0,03±0	0±0d
14	0,2±0,4a	**1,14±1,2a***	**32**	0,1±0,3a	0,28±0,8abcd
15	0,385±0,6a	0,45±0,9abcd	**33**	0,06±0,1a	0,5±1,2abcd
16	0±0a	0,23±0,5bcd	**34**	0,57±0,8a	0,95±2abc
17	0,2±0,6a	0±0d	**35**	0±0a	0,29±0,5abcd
18	0±0a	0±0d	**36**	0±0a	0,04±0,1cd

*Faklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

Eksplantlarda köklere ait uzunluk verilerinin "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonunda, WPM-BAP (0,5 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) besin ortamında kök uzunluğu bakımından en iyi veriler elde edilmiştir. Ayrıca WPM-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamı da istatiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Köklendirme ortamında kök ve sürgün gelişimi a)MS-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında sürgün ve kök gelişimi, b) MS-KIN (0,25 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamında sürgün ve kök gelişimi, c) MS-KIN (1 mg/L) + IBA (1 mg/L) besin ortamında sürgün ve kök gelişimi ve d) WPM-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında sürgün ve kök gelişimi

4.6 Köklendirme Aşaması

A. nezaketiae in vitro çoğaltımında eksplantlar altkültür aşamasını takiben köklendirme ortamlarına alınmıştır (Şekil 4.3) . Bu aşamada, altkültür aşamasında en iyi sonuç veren oksin ve sitokinin grubu BDM ve farklı kombinasyonlarının etkilerine bakılmış (Çizelge 4.6) ayrıca besin ortamlarının bitki gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir (Çizelge 4.7). Eksplantların oluşturdukları sürgün sayıları ve uzunlukları, kök sayıları ve uzunluklarına ait verileri kaydedilmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.6 Köklendirme aşamasında kullanılan BDM dozlarının uygulanış tablosu

	BDM DOZU
1	KIN (0 mg/L) + IBA (0 mg/L)
2	KIN (0.25 mg/L) + IBA (0.25 mg/L)
3	KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L)
4	KIN (1 mg/L) + IBA (1 mg/L)

Çizelge 4.7 *A. nezaketiae* eksplantlarında köklendirme aşamasında "BDM dozlarının" kök sayısı ve uzunluğu ile sürgün sayısı ve uzunluğuna etkisi (P≤0.05)

	BDM DOZU	SÜRGÜN ADET	SÜRGÜN BOY	KÖK ADET	KÖK BOY
1	KIN (0 mg/L) + IBA (0 mg/L)	0,2±0,5c	0,05±0,15b	0,05±1,3b	0,05±0,15c
2	KIN (0.25 mg/L) + IBA (0.25 mg/L)	0,9±1,2ab	**0,82±1,16a***	13,75±25,17ab	0,48±0,71ab
3	KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L)	**1,4±1,18a***	**0,87±0,89a***	**21,75±35,62a***	**0,65±0,87a***
4	KIN (1 mg/L) + IBA (1 mg/L)	0,70±0,9bc	**0,66±0,92a***	4,25±13,69b	0,15±0,47bc

A. nezaketiae eksplantlarında köklendirme aşamasında BDM dozlarının kök sayıları-uzunlukları ile sürgün sayıları-uzunlukları üzerine olan etkisi incelendiğinde, en iyi kök sayısı (21,75) ile maksimum kök uzunluğuna (0,65) ve en iyi sürgün sayısına (1,4) KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) BDM dozunun bulunduğu ortamda ulaşılmıştır. Sürgünlere ait uzunluklar ile ilgili olarak BDM dozları arasında istatistiksel anlamda bir farklılık ortaya konmamıştır. Köklendirme aşamasında besin ortamlarının sürgün sayıları, uzunlukları, kök sayıları ve uzunlukları üzerine olan etkisi Çizelge 4.8'de verilmiştir.

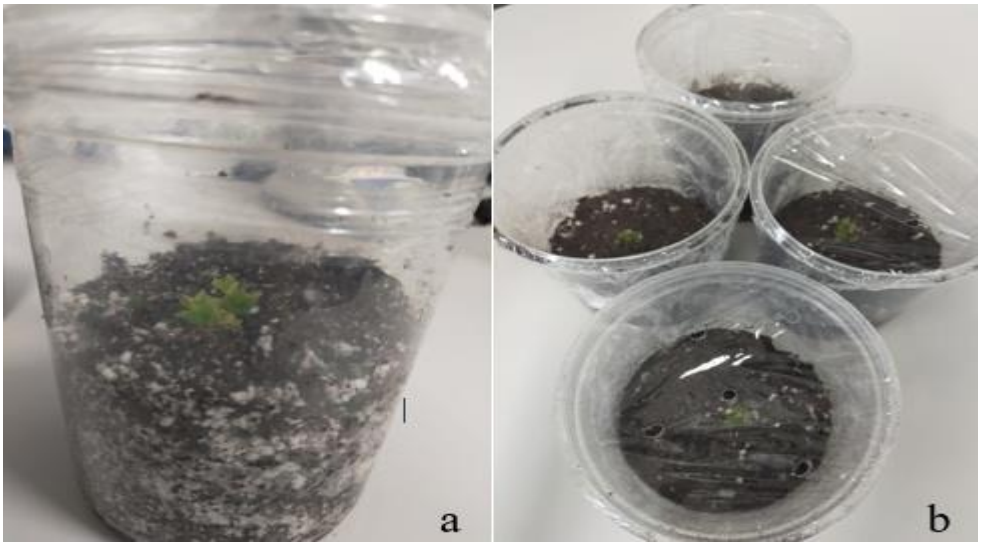
Çizelge 4.8 *A. nezaketiae* eksplantlarında köklendirme aşamasında "besin ortamlarının" kök sayısı ve uzunluğu ile sürgün sayısı ve uzunluğuna etkisi (P≤0.05)

Besin Ortamı		N	Mean
SÜRGÜN ADET	MS	40	**1,125±1,20**
	WPM	40	0,475±0,81
SÜRGÜN BOY	MS	40	**0,62±0,88**
	WPM	40	0,585±0,95
KÖK ADET	MS	40	**16,52±31,38**
	WPM	40	3,62±9,47
KÖK BOY	MS	40	**0,43±0,69**
	WPM	40	0,2425±0,6

A. nezaketiae eksplantlarında köklendirme aşamasında "besin ortamlarının" kök sayısı ve uzunluğu ile sürgün sayısı ve uzunluğu üzerine etkileri incelendiğinde, 4 bağımlı değişkenin tamamı (kök sayısı 16,52; kök uzunluğu 0,43; sürgün sayısı 1,125; sürgün uzunluğu 0,62) için MS besin ortamı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.7 Aklimitizasyon

A. nezaketiae bitkisinin en iyi kök ve sürgün gelişimi gösteren 8 örneği seçilmiştir. İklim odasında inkübe edilen bitkilerin dış koşullarda gelişim gösteremedikleri görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.5 Aklimitizasyon aşamasına alınan *A. nezaketiae* bitkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çankırı'ya endemik özellikte, kritik seviyede nesli tehlike altında (CR) kategorisine aday olduğu bilinen ayrıca önemli bir biyolojik çeşitlilik kaynağı oluşturan *Alyssum* cinsine ait *A. nezaketiae* bitkisi sürgün uçları ve nodlarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı, farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyici madde içeren temel besin ortamlarında çoğaltımı bu tez çalışmasının amacını oluşturmaktadır.

Brassicaceae familyasına ait bitkilerin aseptik şartlarda *in vitro* çoğaltımı için birçok bitki türünde olduğu gibi sürgün ucu, nod, hipokotil ve kotiledonları birçok çalışmada eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır (Yıldızhan 2007, Ceylan 2015, Özdemir ve Yıldırım 2016, Demir 2020, Memon and Memon 2021).

Çankırı ili sınırlarında lokal endemik olarak yayılış gösteren *A. nezaketiae* 2021 yılının vejetasyon döneminin başlamasıyla birlikte arazide görülmeye başlanmış ve mayıs ayının ortasından itibaren tam çiçekli hali bulunmuştur. Fizyolojik anlamda tam olarak gelişimini tamamlamış çiçekli bitkiler mayıs ayının sonuna doğru *in vitro* çoğaltım amacıyla araziden alınarak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Uygulanan yüzeysel sterilizasyon protokolü etkili olmuş, çalışma sırasında enfeksiyon oluşumuna nadir rastlanmıştır. Sterilizasyon aşamasından sonra MS ve WPM temel besin ortamlarına, büyüme düzenleyici maddelerin 36 farklı kombinasyonu hazırlanarak ilave edilmiştir. Ortamların gelrite ile katılaştırılmaları sağlanmıştır.

Çalışmada *A. nezaketiae* bitkisinin sürgün ucu ve nod eksplantlarından bitki rejenerasyonu sağlanmış ancak elde edilen sürgün ve köklerin oldukça yavaş geliştiği gözlemlenmiştir. Başlangıç aşamasından sonra uygulanan her altkültür sonucu bazı eksplantların kök ve sürgün gelişimini gerçekleştirdiği ancak gelişimin sınırlı bir şekilde devam ettiği görülmüştür. Ayrıca eksplantların dikimi sırasında geliştiği düşünülen enfeksiyonlarında süreci zora soktuğu düşünülmektedir.

A. nezaketiae eksplantlarında çoğaltım başlangıcında elde edilen kalluslardan meydana gelen sürgün rejenerasyonuna ait 'temel besin ortamı x BDM kombinasyonu', intereksiyonda (Çizelge 4.1), MS-KIN (1 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamı ve WPM-KIN (0,5 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) besin ortamı sürgün oluşumu verilerinde en iyi sonuçlara ulaşılmıştır. Bununla birlikte MS-KIN (1 mg/L) + IBA (0,5 mg/ L) besin ortamında ve WPM-BAP (0,5 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamındaki sürgün rejenerasyonu istatiksel olarak önemli bulunmuştur. WPM besin ortamı farklı BDM dozlarında en başarılı sonuçlara ulaşılmıştır. Bayat (2017) yaptığı çalışmada ise MS besin ortamına farklı miktar ve kombinasyonlarda BAP ve IAA ilave etmiştir. Sağlıklı kalluslardan altkültürler yolu ile sürgün oluşumunu gerçekleştirmiş, en iyi sürgün oluşumunu nod eksplantlarından elde edilen kalluslardan BAP (2,0 mg/L) ve IAA (0,1 mg/L) ile desteklenen MS ortamında olduğunu tespit etmiştir. Çalışmamızda ise MS besin ortamı ile birlikte WPM de kullanılmıştır.

Eksplantlarda çoğaltımın başlangıcında, sürgün sayılarına ait verilerin "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonunda (Çizelge 4.2), MS-KIN (1 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) besin ortamında (sürgün sayısı 2,6) ve WPM-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında (sürgün sayısı 5,8) sürgün sayısına ait en iyi değerlere ulaşılmıştır. Aynı zamanda yine MS-KIN (1 mg/L) + IBA (0,25 mg/L) ortamında (sürgün sayısı 2,4) ile WPM-BAP (0,5 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) ortamında (sürgün sayısı 5,6) sürgün sayılarından elde edilen veriler (Şekil 4.1) istatistiksel manada önemli olarak değerlendirilmiştir. Ceylan (2015), *Crambeorientalis* L. ile yaptığı çalışmada çalışmamızdan farklı olarak sadece BAP ve NAA konsantrasyonlarının etkilerini incelemiştir. BDM içermeyen MS temel besin ortamında kültüre aldığı tohumlardan elde ettiği bitkilerin kotiledon boğum ve hipokotil eksplant kaynağı olarak kullanmıştır. Hipokotil eksplantlarının MS ortamında kültüre alınmasıyla eksplant /ortalama sürgün sayısı en fazla 27,34±0,69 ile MS-BAP (1,0 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) ortamında olduğunu saptamıştır. Kotiledon eksplantlarının MS besin ortamında kültüre alınmasıyla eksplant/ortalama sürgün sayısı en fazla MS-BAP (2 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) (%18,14) ortamında olduğunu belirlemiştir.

A. nezaketiae eksplantlarında kök sayılarının "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" arasındaki interaksiyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Elde edilen veriler, tüm kombinasyonların ve besin ortamlarının kök sayıları üzerinde aynı etkiyi gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Altkültür sonrası elde edilen veriler titizlikle toplanmasına karşın veriler arasındaki uyum istatiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Çoğaltımın başlangıcı aşamasındaki köklere ait uzunlukların "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu" interaksiyonunda, WPM-BAP (0,5 mg/L) + NAA (0,25 mg/L) besin ortamında kök uzunluğu bakımından en iyi veriler elde edilmiştir. Ayrıca WPM-KIN (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) besin ortamında kök uzunluğu istatiksel olarak önemli bulunmuştur. Ceylan (2015), *Crambeorientalis* L. var. *orientalis*'in mikro üretimi için yaptığı çalışmada rejenere edilen sürgünleri farklı konsantrasyonlarda NAA içeren MS besin ortamında köklendirmiş ancak genel olarak rejenere sürgünlerinin köklendirilmesinin güç olduğunu gözlemlemiştir.

Çalışmamızda, altkültür uygulamalarından sonra gerçekleştirilen köklendirme aşamasında meydana gelen kök sayı ve uzunlukları ile sürgün sayı ve uzunluklarına ait veriler alınmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu aşamada farklı dozlarda kullanılan KIN ve IBA ile besin ortamının etkilerine bakılmıştır. Köklendirme aşamasında besin ortamları ve BDM dozlarının etkileri istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm denemelerde en iyi kök sayısı (kök sayısı 21,75) ve maksimum kök uzunluğu (kök uzunluğu 0,65) ile en iyi sürgün sayısına (sürgün sayısı 1,4) ait veriler KIN ve IBA'nın 1 mg/L dozunun olduğu ortamda elde edilirken; elde edilen veriler BDM dozlarının sürgün uzunluğu üzerine etkilerinde anlamlı bir farklılık ortaya koymamıştır. Bununla birlikte besin ortamlarının köklendirme aşamasındaki etkisi istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. MS besin ortamı tüm denemelerde (kök sayısı 16,52; kök uzunluğu 0,43; sürgün sayısı 1,125; sürgün uzunluğu 0,62) başarılı bulunmuştur.

Aklimitizasyon aşaması için sürgün ve kök gelişimi açısından en başarılı bitkiler seçilmiş dış koşullara aktarılmıştır. *A. nezaketiae* bitkisinin *in vitro* çoğaltımı ile elde edilen bitkilerde kök ve sürgün gelişimi gerçekleşmiş ancak gelişimler belirli sınırlar

içerisinde kalmıştır. Bundan dolayı optimum seviyede tutulan dış koşullara aktarılan bitkiler bu koşullar çerçevesinde gelişim gösterememiştir.

2003-2023 yılları arasında TÜBİTAK tarafından hazırlanan ve kalkınma hedeflerinin sürdürülebilirliği doğrultusunda, "Gen kaynaklarının karakterizasyonu, muhafazası ve biyolojik çeşitliliğin korunmasına yönelik teknolojiler geliştirebilmek" hedefi, Ulusal Bilim ve Teknoloji Politikaları Strateji Belgesi'nde de önemle üzerinde durulan bir konudur (Anonim 2011). Bu çalışmada, aromatik özelliklerinin yanı sıra IUCN verilerine göre henüz tehlike kategorisinde yer almamasına karşın hem yaşam alanının 100 km^2 civarında olması, hem kesin bulunduğu habitat sınırlarının çok küçük olması nedeniyle dağılış kriteri bakımından CR (Kritik Seviyede Nesli Tehdit Altında) kategorisine aday olduğu bilinen *A. nezaketiae*'nin (Aytaç ve Duman 2000) *in vitro* çoğaltımı bakımından ilk ve tektir. Kapsamlı bir optimizasyon çalışması konumundaki bu tez konusu, *A. nezaketiae* ve diğer endemik bitkilerin *in vitro* çoğaltımı için yapılacak çalışmalarda kaynak olarak kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

Anonim, 2011. Ulusal Gıda Ar-Ge ve Yenilik Stratejisi Ek-3. https://www.tubitak.gov.tr/sites/default/files/ek3_ulusal_gida_arge_yenilik_stratejisi.pdf. Erişim Tarihi: 05.10.2019.

Anonim, 2016. T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Nezaket Kevkesi (*Alyssum nezaketiae*) Tür Eylem Planı. https://www.researchgate.net/publication/349457279_Nezaket_kevkesi_Alyssum_nezaketiaeTur_Eylem_Plani. Erişim Tarihi: 23.08.2021.

Adıgüzel, N. and Reeves, R. D. 2012. Important serpentine areas of turkey and distribution patterns of serpentine endemics and nickel accumulators. Bocconea., 24: 7-17.

Akdemir, F. Turhan, M.F. Akman, F. Geçibesler, İ.H. Kaçal, M.R. ve Durak, R. 2019. '*Alyssum paterisub* sp. *prostratum* bitkisinin kütle azaltma katsayılarının ve molar yok-olma katsayılarının ölçülmesi. Journal of the Institute of Science and Technology., 9(1): 339-346.

Amiri, M.S. Jabbarzadeh, P. and Akhond, M. 2012. An ethno botanical survey of medicinal plants used by ındigenous people ın zangelanlo district northeast Iran. Journal of Medicinal Plants Research., 6 (5):749-753.

Amiri, M.S. and Joharchi, M.R. 2013. Ethno botanical ınvestigation of traditional medicinal plants commercialized ın the markets of mashhad Iran. Avicenna Journal of Phytomedicine., 3 (3): 254-271

Aytaç, Z. and Duman, H. 2000. *Alyssum nezaketiae* new species from central anatolia, Israel Journal of Plant Sciences., 48: 317-326.

Babaoğlu, M. Gürel, E. ve Özcan, S. 2001. Bitki biyoteknolojisi doku kültürü ve uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi., 71-88.

Babaoğlu, A. S.S. 2008. Doku kültüründe yetiştirilen *Alyssum corsıcum* (brassıcaceae) bitkisinde nikel birikiminin belirlenmesi ve moleküler analizi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, 144 sayfa, Ankara.

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.

Bayat, H. 2017. Çanakkale endemiği *Alyssum pınıfolıum* (nyar.) t.r. dudley türünün *ın vit*ro mikro çoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale On sekiz Mart Üniversitesi, 36 sayfa, Çanakkale.

Bayramoğlu, G. Ersoy, G. Adıgüzel, N. ve Arıca, MY. 2012. Modifiye *Alyssum discolor* (*a. discolor*) biyokütlesinin boya gideriminde kullanılması ve spektroskopik özelliklerinin belirlenmesi. VI. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay.

Ceylan, Y. 2015. Crambeorientalis L. var. orientalis L.' nin mikro üretimi üzerine farklı Bap ve Na konsantrasyonlarının etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Bartın Üniversitesi, 68 sayfa, Bartın.

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

Demir, M. 2020. Endemik *R. carnosula* boıss. & heldr. (brassıcaceae)'da *in vitro* rejenerasyon ve sentetik tohum üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, 111 sayfa, Antalya.

Dudley, T.R. 1964. Synopsis of the Genus Alyssum. J. Arnold Arbor., 45(3): 358 – 373.

Dudley, T.R. 1965. Alyssum L. in Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Ed.: Davis, P.H., Edinburgh: Edinburgh University Press, 1: 362 – 409.

Ekim, T. Koyuncu, M. Vural, M. Duman, H. Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N. 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi ve Tabiatı Koruma Derneği, Barışcan Ofset, Ankara.

Erdogan, MK. Geçibesler, İH. and Behçet, L. 2015. Composition and antioxidant capacity of the essential oils of Alyssum pateri Nyár subsp. prostratum (Nyár) Dudley (Brassicaceae). Türk Doğa ve Fen Dergisi, 4(2): 25-29.

Ertuğ, F. 2014. Resimli Türkiye Floras,. Ali Nihat Gökyiğit Vakfı, Flora Araştırmaları Derneği ve Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları Yayını, Cilt 1, Sayfa 319-420 İstanbul.

Hamedi, A. Ghanbari, A. Razavipour, R. Saeidi, V. Zarshenas, MM. Sohrabpour, M. and Azari, H. 2015. Alyssum homolocarpum seeds: phytochemical analysis and effects of the seed oil on neural stem cell proliferation and differentiation. Journal of Natural Medicines, 69(3): 387-396.

Koch, M. A. and Kiefer, C. 2006. Molecules and migration: biogeographical studies in cruciferous plants. Plant Systematic and Evolution, 259: 121-142.

Kürşat, M. Civelek, Ş. ve Kandil, A. 2008. *Alyssum harputicum* Dudley'in (Brassicaceae) Morfolojik, Anatomik ve Polen Özellikleri ile Kromozom Sayısı Bakımından Araştırılması. Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi, 20 (2): 205-215.

Lloyd, G. and McCown, B.H. 1981. Commercially feasible micro propagation of mountain laurel (Kalmialatifolia) by use of shoot tip culture. Proc. International Plant Propagation Society, 30, 421−427.

Mabberley, D.I. 1987. The Plant Book. Camb. Univ. Press, Cambridge, New York.

Mandal, J. 2013. *In vitro* flowering and micropropagation of *Hyptissuaveolens* (Linn.) Poit. An important medicinal herb. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 19(3): 233-247.

Memon, F. and Memon, A. 2021. *ın vitro* callus ınduction and shoot regeneration system of a metal accumulator plant, Brassica nigra L. Turkish Journal of Agriculture -Food Science and Technology, 9(11): 1993-1998.

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

Oturgan, H. 2007. Crucıferae familyasına ait bazı türlerde biyolojik aktivite çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, 43 sayfa, İstanbul.

Özdemir, F. ve Yıldırım, M. 2016. *Crambemaritima* L. Hipokotilinden *ın vitro* mikro üretim., YYÜ Tar. Bil. Dergisi (YYU J AGR SCI), 26(2): 168-173.

Parsaei, P. Bahmani, M. Naghdi, N. Asadi-Samani, M. and Rafieian-Kopaei, M. 2016. the most ımportant medicinal plants effective on constipation by the ethnobotanical documents, In: Iran A Review. Der. Pharmacia Lettre., 8 (2): 188-194.

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.

Şan, B. and Köksal. A.İ. 2007. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of some European chestnut (Castaneasativa Mill.) cultivars. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 31: 175−179.

Tajbakhsh, M., Mehri, N. and Azmi, R. 2012. Phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of Alyssum sp. (Brassicaceae). National Conference of Natural Products and Medicinal Plants (NCNPMP), p.175.

Tozyılmaz, V. 2019. Anadolu florasına ait bazı endemik türlerin antimikrobiyal, antioksidan ve anti biyofilm aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Bartın Üniversitesi, 167 sayfa, Bartın.

Vinterhalter, B., Savic J., Platisia J., Raspor M., Ninkovic S., MiticN. and Vinterhalter D. 2008. Nickel tolerance and Hyper-accumulation in shoot cultures regenerated from hairyroot cultures of *Alyssum murale* Waldst et Kit. Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult., 94: 299–303.

Vural, M. ve Şahin, B. 2013. Çankırı'da dar yayılışlı iki endemik bitki türü üzerinde gözlemler. Biyolojik Çeşitlilik Sempozyumu Bildiri Kitabı, sayfa 227- 231, Marmaris.

Yıldızhan, Y. 2007. *B. nigra* Bitkisinin *ın vitro* şartlarda doku kültürü ile çoğaltılması. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, 99 sayfa, İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Sevde Büşra AKIN

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2011-2015

İş Deneyimi

Yıl	**Kurum**	**Ünvan**
2015- Halen	Milli Eğitim Bakanlığı	Öğretmen

Akademik Aktiviteler

Akın, S.B. and Sezgin, M. 2020.'Sekonder Metabolitler', 3nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasian Bio Che 2020) March 19-20, 2020/Ankara, Turkey