**T.C.**
**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un KALLUS KÜLTÜRLERİNDEN BİTKİ REJENERASYONU

**Zeynep KABAYEL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR**
**Temmuz - 2019**

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Zeynep KABAYEL tarafından yapılan **"*Nepeta baytopii* Hedge & *Lamond*'un Kallus Kültürlerinden Bitki Rejenerasyonu"** konulu bu çalışma , jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan :Prof.Dr.Hasan ÇETİN ÖZEN

Üye : Doç. Dr.Filiz AKBAŞ

Üye : Prof.Dr.Süreyya NAMLI (Danışman)

Tez Savunma Sınavı Tarihi: **12/07/2019**

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

Doç.Dr.Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR

( MÜHÜR )

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Süreyya NAMLI'ya;

Çalıştığım bitkiyi önerip teşhisini sağlayarak yardımını hiç esirgemeyen Sayın Prof.Dr..A.Selçuk ERTEKİN'e;

Çalıştığım bitkinin in vitro mikro çoğaltımını yapıp tezime ön ayak oluşturan ve aynı zamanda bu zorlu tez sürecinde benden desteğini bir an için bile olsa esirgemeyen ve hayatımın her evreside yanımda olan değerli arkadaşım Melek Sürer Han'a teşekkürü borç bilirim.

Son olarak tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan sevgili annem Nesliye KABAYEL ve değerli babam İsmet KABAYEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep KABAYEL

Haziran 2019 - DİYARBAKIR

# İÇİNDEKİLER


| | | Sayfa |
|---|---|---|
| **TEŞEKKÜR** | | I |
| **İÇİNDEKİLER** | | II |
| **ÖZET** | | IV |
| **ABSTRACT** | | VI |
| **ÇİZELGE LİSTESİ** | | VIII |
| **ŞEKİL LİSTESİ** | | IX |
| **KISALTMA VE SİMGELER** | | XII |
| **1.** | **GİRİŞ** | 1 |
| **2.** | **KAYNAK ÖZETLERİ** | 5 |
| **3.** | **MATERYAL ve METOT** | 9 |
| 3.1. | Materyal | 9 |
| 3.2. | Metod | 9 |
| 3.2.1. | Çalışma Ortamının ve Çalışmada kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu | 9 |
| 3.2.2. | Çalışma Materyali Olan Tohumların Sterilizasyonu | 10 |
| 3.2.3. | MS ortamında Tohum Çimlendirme Aşaması | 10 |
| 3.2.4. | İndirekt Organogenesis Çalışmaları İçin Ön Hazırlık | 11 |
| 3.2.4.1. | Kallus Kültürleri İçin Kallus Ortamlarının Hazırlanması | 12 |
| 3.2.4.2. | Çimlenen Sürgünlerin Kallus Oluşum Ortamına Aktarılması | 12 |
| 3.2.4.3. | Yapraklardan Elde Edilen Kallus Oluşum Oranları ve Ağırlıkları | 13 |
| 3.2.4.4. | Köklerden Elde Edilen Kallus Oluşum Oranları ve Ağırlıkları | 13 |
| 3.2.4.5. | Gövdelerden Elde Edilen Kallus Oluşum Oranları ve Ağırlıkları | 14 |
| 3.2.4.6. | Kalluslardan Sürgün Oluşumu ve Sürgünlerin Köklendirilmesi | 14 |
| 3.2.4.7. | Oluşan Sürgünlerin Toprağa Adaptasyonu | 14 |

**4. BULGULAR VE TARTIŞMA ..... 17**

4.1. Kültür Başlatma Çalışmaları ..... 17

4.2. İndirekt Organogenesis Bulguları ..... 17

4.2.1. Yapraklardan Elde Edilen Kallus Oluşumu ..... 18

4.2.2. Köklerden Elde Edilen Kallus Oluşumu ..... 24

4.2.3. Gövdelerden Elde Edilen Kallus Oluşumu ..... 30

4.2.4. Kalluslardan Sürgün Oluşumu ve Sürgünlerin Köklendirilmesi ..... 35

**5. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 41**

**6. KAYNAKLAR ..... 45**

ÖZGEÇMİŞ ..... 49

# ÖZET

*Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un KALLUS KÜLTÜRLERİNDEN BİTKİ REJENERASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep KABAYEL

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2019

Nepeta baytopii Hedge &Lamond'un İn vitro ortamda indirek organogenesis yolu ile rejenerasyon protokolu geliştirlmesi amaçlanmıştır. Kallus oluşumu için in vitro ortamda gelişen fidelerin yaprak, kök ve gövde parçaları explant olarak kullanıldı.

Lamiaceae familyasının bir üyesi olan Nepeta baytopii Hedge &Lamond' un İn vitro'da çoğaltımı sağlandı. Daha sonra elde edilen sürgünlerin çeşitli kısımlarından kallus elde etme yolları araştırıldı. Oluşan kalluslardan sürgünler elde edildi. İn vitro şartlarda kallustan elde edilen sürgünlerin toprağa adaptasyon çalışmaları başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. En fazla kallus oluşum oranının hangi hormon tipinde ve hangi parametrede olduğu saptandı. Ayrıca kallus oluşumuna kök ,gövde ve yaprak kısımlarından hangisinin daha çok cevap verdiği değerlendi. Bugüne kadar N. baytopii Hedge & Lamond kallus kültürleri için rapor yoktu. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, N. Baytopii Hedge & Lamond'un kök gövde ve yaprak explantlarını kullanarak kallus başlatılması ve kallustan sürgün rejenerasyonu için etkili bir prosedür geliştirmekti.

Bu çalışmada N. baytopii Hedge & Lamond'un sürgün indüksiyonundan gelen kallus oluşumu için temel prosedürler açıklanmaktadır. Çalışmamızın konusu olan ve Türkiye'de bulunan N.baytopii Hedge & Lamond için kapsamlı bir biyoteknolojik çalışma bulunmamaktadır. Tohumlar, benzilaminopurin (BAP; 0,125 mg / l) ile desteklenmiş Murashige ve Skoog (MS-1962) ortamı üzerinde ekimi yapıldı( IAA, NAA, IBA and 2, 4-D). Karanlık şartlarda BAP(0.125 mg/l) ile kombine edilen 4 farklı konsantrasyon ve kombinasyonu (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l) ile desteklenmiş MS ortamında kök,gövde ve yaprak explantlarından kallus başlatıldı.

Sürgünlerden elde edilen kök, gövde, yaprak gibi farklı parçalar kallus oluşumu için kullanıldı. Oluşan kalluslardan sürgünler elde edildi. Çalışma sonucunda elde edilen sürgünlerin toprağa adapte olmasını sağlayarak, türün doğada sürmesine katkıda bulunacaktır. Bu çalışma, N. baytopii Hedge & Lamond 'nın yaprak, gövde ve kökünden kallus indüksiyonu ve kallus rejenerasyonu için etkili ve tekrarlanabilir bir protokol geliştirmek için tasarlanmıştır. Çünkü bu türün Doğu ve Güneydoğu Bölgesi için endemik bir tür kapsamında

değerlendirilmesi gerektiği önerilmektedir. Bu tezin gelecekteki çalışmalar için bilim adamlarının harekete geçmelerine yardımcı olacağı umulmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** kallus oluşumu, indirek çoğaltım,*In vitro,* yaprak, kök, gövde, BBD

## ABSTRACT

PLANT REJENERATİON FROM CALUS CULTURES OF *Nepeta Baytopii* Hedge & Lamond

MSc THESIS

Zeynep KABAYEL

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2019

The regeneration protocol through *in vitro* indirect organogenesis of *Nepeta baytopii Hedge &Lamond* was intended to be developed. Leaf,stem and root explants taken from *in vitro* grown seedlings were used as explants for callus induction.

N. baytopii Hedge & Lamond, a member of the Lamiaceae family, was reproduced in vitro. Then, ways to obtain callus from various parts of the shoots obtained were investigated. Shoots were obtained from the formed callus. The soil adaptation studies of the shoots obtained from the callus in in vitro conditions were carried out successfully.

The maximum number of callus formation was determined in which hormone type and in which parameter it was determined. In addition to callus formation which one of the parts of root, stem and leaf were determined to be more responsive. So far, no study has been reported on *in vitro* callus culture for this plant.Therefore, the objective of the present study was to develop an efficient procedure for shoot regeneration from callus and the callus induction using leaf, stem and root explants of N. baytopii Hedge & Lamond.

This study describes the basic procedures for the establishment of callus from shoots induction of N. Baytopii Hedge & Lamond. There is no comprehensive study for N. baytopii Hedge & Lamond forming our study subject and located in Turkey. The seeds were inoculated onto Murashige and Skoog (MS-1962) medium supplemented with benzilaminopurin (BAP; 0,125 mg /l). The various parts as root,stem, leaf of obtained shoots were used for callus formation. Callus was initiated from root , leaf and stem explants on MS medium supplemented with four different concentrations and combinations of auxin ( IAA, NAA, IBA and 2, 4-D) combined with BAP (0.125 mg l-1) under dark conditions. For callus formation, calli were transferred into different auxins concentrations (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 mg l-l ).

Different parts such as root, stem and leaf obtained from shoots were used for callus formation.The Shoots were obtained from the formed callus. By ensuring soil adaptation of shoots obtained as a result of the study , will contribute to the continuation of the type in the nature. The present study was designed to develop an efficient and reproducible protocol for callus induction from leaf,stem and root of N. baytopii Hedge & Lamond and regeneration of calli. Because it is suggested that this species should be evaluated within the scope of an endemic species for the East and Southeast Region It is hoped that this thesis will help scientists to take action for future studies.

**Key Words:** Callus induction, Indirect regeneration, *in vitro*, leaf explants , root explants, stem explants, PGRs.

# ÇİZELGE LİSTESİ


| Çizelge No | | Sayfa |
|---|---|---|
| **Çizelge 3.1.** | 1/1 MS Besi Ortamın İçeriği | 11 |
| **Çizelge 3.2.** | İndirekt organogenesis için MS destekli hormon içerikleri | 12 |
| **Çizelge 3.3.** | Eksplant tipine göre eksplantlardan oluşan kallusların % oranı | 13 |
| **Çizelge 3.4.** | Yaprak Eksplant tipine göre oluşan kallusların % oranları ve ağırlıkları | 13 |
| **Çizelge 3.5.** | Kök Eksplant tipine göre oluşan kallusların % oranları ve ağırlıkları | 14 |
| **Çizelge 3.6.** | Gövde Eksplant tipine göre oluşan kallusların % oranları ve ağırlıkları | 14 |

# ŞEKİL LİSTESİ


| Şekil No | | Sayfa |
|---|---|---|
| **Şekil 3.1.** | A.B.*Nepeta baytopii* Hedge&Lamond' bitkisinin doğal ortamdaki resimleri | 9 |
| **Şekil 4.1.** | 0,125 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü | 17 |
| **Şekil 4.2.** | 0,125 mg/l BAP 0,25 mg/l 2,4 D yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 18 |
| **Şekil 4.3.** | 0,125 mg/l BAP+ 0,5 mg/l 2,4 D yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 18 |
| **Şekil 4.4.** | 0,125 mg/l BAP+ 1 mg/l 2,4 D yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 18 |
| **Şekil 4.5.** | 0,125 mg/l BAP+ 1,5 mg/l 2,4 D yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 18 |
| **Şekil 4.6.** | 0,125 mg/l BAP+ 0,25 mg/l NAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 19 |
| **Şekil 4.7.** | 0,125 mg/l BAP +0,5 mg/l NAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 19 |
| **Şekil 4.8.** | 0,125 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 20 |
| **Şekil 4.9.** | 0,125 mg/l BAP+ 1,5 mg/l NAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 20 |
| **Şekil 4.10.** | 0,125 mg/l BAP+ 0,25 mg/l IBA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 21 |
| **Şekil 4.11.** | 0,125 mg/l BAP+ 0,5 mg/l IBA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 21 |
| **Şekil 4.12.** | 0,125 mg/l BAP+ 1 mg/l IBA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 21 |
| **Şekil 4.13.** | 0,125 mg/l BAP+ 1,5 mg/l IBA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 21 |
| **Şekil 4.14.** | 0,125 mg/l BAP+ 0,25 mg/l IAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 22 |
| **Şekil 4.15.** | 0,125 mg/l BAP+ 0,5 mg/l IAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 22 |
| **Şekil 4.16.** | 0,125 mg/lBAP+ 1 mg/l IAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 23 |
| **Şekil 4.17.** | 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l IAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü | 23 |
| **Şekil 4.18.** | 0,125 mg/lBAP+0,25 mg/l 2,4 D kökten elde edilen kallus görüntüsü | 24 |
| **Şekil 4.19.** | 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D kökten elde edilen kallus görüntüsü | 24 |
| **Şekil 4.20.** | 0,125 mg/l BAP+ 1 mg/l 2,4 D kökten elde edilen kallus görüntüsü | 24 |
| **Şekil 4.21.** | 0,125 mg/l BAP+ 1,5 mg/l 2,4 D kökten elde edilen kallus görüntüsü | 24 |
| **Şekil 4.22.** | 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l NAA kökten elde edilen kallus görüntüsü | 25 |

**Şekil 4.23.** 0,125 mg/l BAP + 0, 5 mg/l NAA kökten elde edilen kallus görüntüsü 25

**Şekil 4.24.** 0,125 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA kökten elde edilen kallus görüntüsü 26

**Şekil 4.25.** 0,125 mg/l BAP+ 1,5 mg/l NAA kökten elde edilen kallus görüntüsü 26

**Şekil 4.26.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l IBA kökten elde edilen kallus görüntüsü 26

**Şekil 4.27.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA kökten elde edilen kallus görüntüsü 26

**Şekil 4.28.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l IBA kökten elde edilen kallus görüntüsü 27

**Şekil 4.29.** 0,125 mg/l BAP+ 1,5 mg/l IBA kökten elde edilen kallus görüntüsü 27

**Şekil 4.30.** 0,125 mg/l BAP+ 0,25 mg/l IAA kökten elde edilen kallus görüntüsü 28

**Şekil 4.31.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA kökten elde edilen kallus görüntüsü 28

**Şekil 4.32.** 0,125 mg/l BAP+ 1 mg/l IAA kökten elde edilen kallus görüntüsü 28

**Şekil 4.33.** 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l IAA kökten elde edilen kallus görüntüsü 28

**Şekil 4.34.** 0,125 mg/l BAP+ 0,25 mg/l 2,4 D gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 29

**Şekil 4.35.** 0,125 mg/l BAP+ 0,5 mg/l 2,4 D gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 29

**Şekil 4.36.** 0,125 mg/l BAP+ 1 mg/l 2,4 D gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 30

**Şekil 4.37.** 0,125 mg/l BAP+ 1,5 mg/l 2,4 D gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 30

**Şekil 4.38.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l NAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 31

**Şekil 4.39.** 0,125 mg/l BAP+ 0,5 mg/l NAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 31

**Şekil 4.40.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l NAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 31

**Şekil 4.41.** 0,125 mg/l BAP+ 1,5 mg/l NAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 31

**Şekil 4.42.** 0,125 mg/l BAP+ 0,25 mg/l IBA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 32

**Şekil 4.43.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 32

**Şekil 4.44.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l IBA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 32

**Şekil 4.45.** 0,125 mg/l BAP+ 1,5 mg/l IBA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 32

**Şekil 4.46.** 0,125 mg/l BAP+ 0,25 mg/l IAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 33

**Şekil 4.47.** 0,125 mg/l BAP+ 0,5 mg/l IAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 33

**Şekil 4.48.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l IAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 34

**Şekil 4.49.** 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l IAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü 34

**Şekil 4.50.** Kalluslardan oluşan sürgünlerin görüntüleri 35

**Şekil 4.51.** Kalluslardan oluşan sürgünlerin köklendirmesine ait görüntüler 35

**Şekil 4.52.** Kalluslardan oluşan sürgünlerin poşetlenip toprağa adaptasyon sağlama 36

**Şekil 4.53.** Kalluslardan oluşan sürgünlerin toprağa adaptasyon görüntüsü 37

**Şekil 4.54.** Toprağa adaptasyonda saksı görüntüleri 37

**Şekil 4.55.** Toprağa adaptasyonda saksı görüntüleri 38

**KISALTMA VE SİMGELER**

| | |
|---|---|
| 2,4-D | : 2,4 Diklorofenoksi asetikasit |
| Atm | : Atmosfer |
| BAP | : 6-Benzilaminopurin |
| BBD | : Bitki Büyüme Düzenleyicileri |
| °C | : Santigratderece |
| Dk | : Dakika |
| D.Ü. | : Dicle Üniversitesi |
| EN | : Endemik |
| Gr | : Gram |
| $gr/l^{-1}$ | : Gram/Litre |
| IAA | : İndolasetik asit |
| IBA | : İndolbütirik asit |
| KİN | : Kinetin |
| MS | : Murashige ve Skoog |
| mg | : Miligram |
| mm | : Milimetre |
| $mg/l^{-1}$ | : Miligram/Litre |
| NAA | : Naftalin asetik asit |
| NaOCl | : Sodyumhipoklorit |
| PGRs | : Bitki büyüme düzenleyicileri |
| w/v | : Ağırlık/Hacim |
| v/v | : Hacim/Hacim |

## 1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, moleküler biyoloji ve genetik alanındaki gelişmeler ile bitki doku kültürü çalışmaları hız kazanmıştır. Gelişen biyoteknoloji tanımı ile dikkat çeken konulardan biri, bitkinin çeşitli kısımlarından çoğaltım yapılabilmesi için büyüme düzenleyicilerinden gerekli olan dozun, parametre ve kombinasyon çalışmaları ile saptanabilmesidir. Yetiştirildiği coğrafya, iklim şartları, yetiştirme koşulları gibi değişik faktörlere göre yetiştirilmesi büyük çapta farklılık gösterebilen bitkiler için bu koşulun tam olarak sağlanabilmesi ise oldukça zor olmasına rağmen, biyolojik yanıt oluşturabilmesi bakımından ise büyük bir avantaj temin etmektedir.

Tabiatın en önemli öğesi bitkilerdir, çünkü havadaki karbondioksiti alıp oksijeni üretirler. Güneş enerjisini direk olarak kullandıkları için su ve güneş enerjisi yardımı ile organik maddeleri sentezlerler. Bu sayede de doğada primer üreticiler olarak en elzem görevler üstlenmişlerdir. Bitkiler yaşamın ana kaynağı olarak doğadaki yerini almıştır, bitkilerin olmadığı bir doğa düşünülemez. Fakat insanoğlunun doğayı bilinçsizce tahrip etmesi sonucu bugün bir çok tür yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmış, bitkilerin doğal alanları azalmaya başlamıştır. Bitkilerin doğadaki bu tahribatına, yok oluşuna zaman içinde insanoğlu tepki vermiş ve bitkilerin tükenme tehlikesine karşı önlemler almaya başlamıştır. Öncelikle biyoloji alanında bitkilerin korunması amacıyla farklı metotlar geliştirilmiştir. Bitkilerin yaşam alanlarının korunmasının yanı sıra gen teknolojisindeki ilerlemeler, farklı genetik yöntemler sayesinde bitki gen kaynaklarının korunma altına alınması temin edilmiştir. Biyolojinin bir alt dalı olan bitki biyoteknolojisi ile bitkilerde alternatif üretim, ıslah çalışmaları, bitkilerin koruma altına alınmaları yolu ile bitkisel kaynakların gelecek kuşaklara aktarımı hedeflenmiştir. Ülkemizin olağanüstü flora zenginliği ve çeşitliliğinin nedeni şu şekilde açıklanmaktadır. Farklı iklim özellikleri (Okyanus, Karasal ve Akdeniz iklimi), jeolojik konumu, jeomorfolojik yapısı, bol su kaynakları , değişen yükseklik farklılıkları, farklı tiplerdeki habitat yapısı ve üç fitocoğrafik bölgenin (Akdeniz, İran-Turan, Avrupa-Sibirya) bulunduğu konum itibari iledir (Özhatay ve ark., 2005).

Bitki gen kaynaklarının korunmasında üç yöntem bulunmaktadır.

1-Canlılığın korunması: Doğal alanlardaki bitki ve hayvanlardan oluşan tüm canlılığın korunmasıdır.

2- *In situ* koruma sistemi: Bitkilerin kendi habitatlarında korunması.

*3- Ex situ* koruma sistemi: Belirli bir bölgenin çeşitli bitkilerini ve farklı

Özelliklere sahip bir bitki türüne ait genetik çeşitliliğini mümkün olduğu kadar farklı materyal toplayarak korumaya almak ve farklı teknikler ile sürekliliğini temin etmektir (Ekim 1990).

Türkiye coğrafi, iklim ve ekolojik yapısı bakımından ender ülkelerden biridir. Bu özellikleri sebebiyle de, çok farklı bitki türlerinin bulunması ve aynı zamanda yetiştirilebilmesi özelliğine sahiptir. Ülkemizin Asya ile Avrupa arasında bulunması, coğrafik yapısı ve farklı iklimsel özelliklerinden dolayı, hemen hemen diğer Avrupa ve Asya ülkelerindeki bitki çeşitliliğine yakın bir zenginliğe ulaştırmıştır. Bilim ve teknolojideki ilerlemeler ile sentetik ilaçların kullanımı, doğal ilaçların kullanımının önüne geçmiş ve atalarımızın yılların birikimi olan bitkilerden yararlanma şekli *kocakarı ilaçları* olarak isimlendirilmiştir. Teknolojideki gelişmeler bitkisel ilaç araştırmalarına farklı bir bakış açısı kazandırmıştır. Gerek fitokimyasal ve gerekse biyolojik alanlardaki yöntemsel ilerlemeler ile bitkilerin bileşimlerindeki bitki özütleri ayrıştırılmaya başlanmış ve bileşenlerin etkisi araştırılmıştır. Kocakarı ilaçları olarak isimlendirilen bitkilerin bileşenlerinin keşfi ile bitkilerden daha etkin bir şekilde faydalanılması sonucunda geleneksel halk ilaçlarına olan ilgi de artış gözlemlenmiştir. Aromatik bitkiler, genellikle tedavi edici potansiyele ve yararlara sahiptir. Bu yararlar da, genellikle pek çok şifalı bitkide bulunan esansiyel yağlarla ilgilidir.

Bu düşünce ile hareket ederek araştırmamızda Dünya'da çok iyi bilinen Lamiaceae familyasının bir üyesi olan *Nepeta baytopii Hedge & Lamond'un in vitro* ortamda gerçekleştirilen çoğaltımı sayesinde elde edilen sürgünlerin farklı kısımlarından kallus oluşumu için gerekli olan bitki büyüme düzenleyicilerinin (BBD) uygun tip ve konsantrasyonunun saptanması amaçlandı. İlk kallus kültürleri Gautheret tarafından 1934 yılında gerçekleştirilmiştir. Kallus kültürleri, ana bitkiden kesilip alınan herhangi bir parçanın ve bölünme özelliğini haiz olan doku veya organ parçalarını karbon kaynağı olarak sükroz ve bitki büyüme düzenleyicileri olarak ta bir sitokin ve oksin içeren besi ortamında gelişmesi ile meydana gelen morfolojik düzensizlik sonucu oluşan düzensiz yapılara genel olarak verilen addır (Babaoğlu M.ve ark. 2002).

Kallus oluşumu için, *in vitro* koşullar altında ana bitkiden alınan ve bölünme özelliğini kaybetmemiş doku veya organ parçalarını kallus oluşum ortamına aktarılması sonucunda oluşan organizasyon göstermemiş doku parçaları (morfolojik düzensizliğe sahip kütleler) şeklinde tanımlanabilir. Kök, gövde ve yapraklardan kallus uyarımı yapılarak kallus oluşumu için uyartı verilebilir. Oluşturulan kalluslar, steril şartlar altında periyodik zaman aralıkları ile alt kültürleri yapılıp taze besi ortamlarına aktarılarak uzun süre korunması temin edilebilir. Fakat oluşan kallusların uzun süre alt kültüre alınması bazı strüktürel değişikliklere neden olmaktadır. Genellikle büyüme ve gelişme için gerekli olan eksojen hormon ihtiyacının ortadan kalkması, sürgün veya kök meydana getirme yeteneğinin azalması, kallus yapısında bazı değişikliklerin oluşması. Çalışma süresince tüm bu durumlar göz önünde bulundurularak her türlü titizlik gösterildi.

Bu çalışma da N.baytopii *Hedge & Lamond'un* Doku kültürü teknolojisi kullanarak geliştirilen stratejiler ile bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları ve kombinasyonları etkisi altında indirek organogenesis yolları araştırıldı. Farklı denemeler ile bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları ve kombinasyonlarının etkisi altında bu bitki türünün doku kültürü yöntemleri kullanılarak geliştirilen indirek organogenesis açıklanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Geleneksel metotlar ile gerçekleştirilen çogaltma yöntemleri, *in vit*ro şartlar altında yapılan mikroçoğaltım üretme teknikleriyle karşılaştırıldığında öne çıkan en değerli avantaj, başlangıçta kullanılan eksplantdan, kısa bir zamanda birçok sayıda mikrosürgün elde edilmesi, bu sürgünlerinde gerek *in vitro* gerekse *in vivo*'da köklendirilmesi sayesinde sayıca fazla bitkinin elde edilebilmesidir. Son yıllarda bu flavonoid ve yağ asidi içeriği bakımından zengin olan lamiaceae türleri üzerinde gittikçe artan bir şekilde *in vitro* üretim teknikleri denenmekte ve bu alanda başarılı çalışmalar yapılarak endemik tür grubuna girmekte olan birçok türün nesli devam ettirilmektedir.

Tohum çimlenmesinde, türden türe değişmekle birlikte bazı zorluklar bulunmaktadır. Bu zorlukların en önemlisi ise tohum dormansisidir. Bu fizyolojik olay sonucunda tohumun çimlenmesi için gerekli olan koşullar ( nem, ısı, ışık ve oksijen ) yerinde olmasına rağmen tohum çimlenmesine engel teşkil etmektedir. Tohum çimlenmesi için dormansiye neden olan durumun ortadan kaldırılması için gerekli şartların sağlanması gereklidir. Bu dormansi durumunun hormonların çalışma dengesinden kaynaklandığını belirterek bu durumu denge modeli ile ifade etmişlerdir. Brady ve Mc Court (2003), dormansiyi tohumdaki absisik asit (ABA) miktarının arttırdığını, etilenin ve giberellik asidin (GA) ise dormansiyi azalttığını rapor etmişlerdir.

Daha önceki çalışmamızda N. baytopii *Hedge & Lamond* 'un tohumlarının sterlizasyonu ve çimlenmesi ile ilgili olarak parametre çalışmaları gerçekleştirerek çimlenme, sürgün elde etme, köklenme ve adaptasyonu ile ilgili yüksek lisans tezini gerçekleştirerek bu tür için bir protokol oluşturduk **(**Sürer Han, 2018). Doku kültürü teknikleri, homojen özelliklere sahip sağlıklı bitkilerin seri üretimine uygulanabilir alternatif yöntemler sağlar. İndirek rejenerasyon, bitki yetiştiriciliği için genç ve olgun bitkilerden, diğer yöntemlerden daha düşük bir genetik kararsızlık riski olan faydalı bir yoldur (Rao, ve Lee, 1986). Yazar, bitkiler bölünebilme özelliğini sahip olduğundan kallus kültürlerine de bu özelliğin yoğun olduğu hücrelerden başlanabilineceğini rapor etmiştir (Ramawat, 2003). Bu nedenle, bu çalışmada N. baytopii *Hedge & Lamond* 'un kallus indüksiyonu için farklı eksplantlar ve büyüme düzenleyicilerin kombinasyonları test edilmiştir.

Doğal koşullarda bulunan genetik derlemeler ıslah çalışmalarında kullanılmak için korunmuş materyale ulaşım kolaylığı sağlasa da doğadaki genetik kaynaklardan oluşan kolleksiyonlar, ıslah çalışmalarında materyali bulmada kolaylık sağlasa dahi doğal şartlar altında meydana gelen doğa olayları, hastalıklar ve zararlılar bu kolleksiyonların zaman içersinde yok olması gibi sorunlara neden olabilmektedir. Bu sebepledir ki bu doğal koleksiyonların, güvenli kopyaları koruma teknikleri kullanılarak çıkartılmalıdır. Biyoteknolojik metotlar aracılığı ile doku kültürü yöntemleri bu amaca önemli avantajlar ile destek vermektedir. Biyoteknolojik çalışmalar nihayetinde ve bu alandaki ilerlemeler endemik türlerin kontrol altına alınması, korunması, türün doğadaki devamının temin edilmesi için yeni olanaklar oluşturmuştur. Bu türlerden tibbi, kozmetik, farmakolojik alanda yararlanılması gibi yeni olanaklar yaratmaktadır. Bitki fizyolojisinin alt dalı olan bitki doku kültürü teknikleri bu türler için bir avantajdır Azizian ve ark.(2001) tarafından, nepeta cinsinin taksonomisi ve polen morfolojisi üzerine yapmış oldukları çalışmalarda polenin görünüm ve farklılık boydaki çaplarından, anatomik ve morfolojik verilerden elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda Budanstsev (1993a,b) tarafından önerilen *Nepeta denudata* 'nın section Denudata' ya aktarılması düşüncesini desteklemişlerdir (Azizian ve ark. 2001). Nepeta türleri nadiren çok yıllık, yıllık otsu bitkilerdir. Bu türler genellikle hoş aromatik, uçucu yağlar bakımından zengin ve ekonomik açıdan da ilgi çekmektedir. Bazı nepeta türleri halk arasında, diüretik, terletici, antitussif, antispazmodik, anti-astmatik febrifüj, emmenagogue ve yatıştırıcı ajanlar olarak kullanılmakta olup ayrıca deri döküntüleri olan çocuklarda topical bir tedavi gibi antiseptik ve büzücü olarak, yılan ve akrep sokmalarında da kullanılır (Tzakou ve ark, 2000; Rapisarda ve ark, 2001; Formisano,2011). Nepeta türlerinin Kuzey ve orta Amerika, Avrupa, Güneybatı ve Orta Asya, Kuzey Afrika, Çin, Kore, Japonya ve Kanarya Adaları (Hedge, 1978; Pojarkova, 1954; Jamzad ve ark., 2000), boyunca dağıldığını rapor etmişlerdir. Cantino ve ark.,(1992) Hoş kokulu güzel çiçeklere sahip olan Lamiaceae familyasındaki en büyük türleri oluşturan nepetanın aşağı yukarı 300 tür ile temsil edildiğini belirtmişlerdir. Aşağıda adı geçen araştırıcılar Nepeta cinsinin 19 türü için, Türkiye'de endemik olan 40 taksondan oluşan 35 tür ile temsil edilmekte olduğunu belirtmişler ve endemizm oranını % 48' olarak belirlemişler. Türlerin çoğunun Türkiye'deki Doğu Anadolu ve Toros dağlarında yayılış gösterdiğini rapor etmişlerdir (Hedge ve Lamond, 1982; Aytaç ve

Yıldız, 1996; Güner ve ark, 2000; Dirmenci, 2005). Rechinger (1982) iran'da 63 tür teşhis etmiştir. Araştırıcılar, değişik yazarlar tarafından farklı sınıflandırmalara tabi tutulduğundan Nepeta'nın sınıflandırılmasının problemli olduğunu belirtmişler. En son çalışmalar moleküler tekniklere dayanarak cinsin infra-jenerik sınıflandırması (Jamzad, 2001; Jamzad ve ark. 2003) yapılmış olup türlerin, çiçek morfolojisine bağlanabilecek yeni bir sınıflandırma temin ettiklerini raporlamışlardır. Nepeta cinsi, Nepetoideae alt familyasına aittir ve yaklaşık 300 otsu içeren tür içeren çok yıllık, nadiren yıllık türlerdir (Formisano ve ark., 2011). Bu cinsin hoş kokulu güzel çiçeklere sahiptir (Cantino ve ark.1992). Özellikle İran'da yabani olarak yetişen kırk bir yerli veya endemik Nepeta türüne atıfta bulunan esansiyel yağ bileşimini rapor etmişlerdir (Jinous Asgarpanah ve ark,.2014).

Shekhawat ve ark (2015) *Passiflora foetida* L. sürgünlerinin köklenmesi için oksinlerden IBA nın en iyi sonuçu verdiğini belirtmişlerdir. Bu sonuç bizim köklenme çalışmaları sonucumuz ile uyuşmaktadır. Çünkü yaptığımız çalışmalarda kökte 0,125 mg/1 BAP + 1,5 mg/1 IBA parametrede iyi kallus oluşumu gözlendi. Sürgünler 2 haftadan daha fazla köklenme ortamında bekletildiği zaman kök uçları kahverengileşmeye başladığı görüldü. Bazı araştırıcılar bu sorunu çözmek için büyüme düzenleyicilerinin olmadığı besi ortamına bitkileri transfer ederek çözmüşlerdir. Örneğin Ginova ve ark.(2012), *Rosa damascene*'de sadece kök oluşumunun başlatılmasını teşvik etmek için oksinlerin elzem olduğunu, fakat daha sonraki kök gelişimi için gerekli olmadığını rapor etmişlerdir. Araştırıcılar, Benzil adenin purın'nin besi ortamında bulunması sürgün uzaması için gerekli bulunmuş ve IBA nında köklenme için IAA' den daha iyi olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamış da bizde kallustan sürgün elde ederken IBA nin NAA ,IAA ve 2.4-D den daha iyi sonuç verdiğini gördük (Mahmoud ve Hassanein 2018). Nodal explantlar, kotiledon tomurcukları ve sürgün ucu kültürleri aracılıgı ile kallustan bitki yetiştirilmesi ile ilgili başarılı çalışmalar mevcuttur (Raghava Swamy ve ark. 1992). Srivastava ve ark, (2017) *Brassica oleracea L*. var. botrytis'de TDZ etkili bitki regenerasyonu ve rejenere bitkilerde genetik stabilite ve antioksidan enzim aktivitesinin etkisi konulu çalışmalarında sitokinin konsantrasyonu (22.2 µM BAP and 22.7 µM TDZ) artıkça kallus oluşumunda azalma tespit etmişlerdir. TDZ nin kallus oluşumunu BAP'tan daha iyi teşvik ettiğini rapor etmişlerdir. Rugini E, & Gutierrez-Pesce P (2003), farklı explant

tipleri ve kültür ortamlarını, farklı kivi tipleri için etkili bir köklenme ve regenerasyon, kallus ve hücre kültürü, sürgün ve embriyo oluşumunu başlatmak için materyal kaynağı olarak kullanmışlardır.

Moncaleon ve ark. (2001), *Actinidia deliciosa* ile ilgili çalışmalarında rapor etmişlerdir ki çoğaltımın farklı aşamaları üzerine BA' nın sadece önemli bir etkiye sahip olmadığını aynı zamanda rejeneratlarin gelişimini de düzenlediğini göstermişlerdir. Dirmenci ve ark (2004) tarafından Doğu Anadolu'da yetişen ve endemik olan dört Nepeta L. türünün; N. baytopii Hedge & Lamond, N. crinita Montbret & Aucher ex Bentham N. obtusicrena Boiss. & Kotschy ex Hedge ve N. sorgerae Hedge & Lamond', N. ile ilgili çalışmalarının sonucu olarak en çok nesli tükenmekte olan türlerin N. baytopii ve N. sorgerae olduğunu belirtmişlerdir. Bu türlerin gerek in situ ve gerekse ex situ olarak korunması gerektiği üzerinde durmuşlardir. Bu türlerin yayılış alanlarının oldukça sınırlı olduğunu ve tohumlarının toplanması, tohum bankalarına yatırılması gerektiğini belirtmişlerdir. Hedge Lamond, (1968) bu türün çok fazla morfolojik karaktere sahip olduğunu, yaprak şekil ve büyüklüğünün değişken bir özellik gösterdiğini, ayrıca kaliks ve korolla karakterlerinin yakın ilişkili türler arasında değişebileceğini rapor etmiştir. Kılıç (2013) tarafından *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond 'un morfolojik ve sistematik özellikleri üzerine yayınlanan çalışmasında, türün çiçek parçalarının özellikleri değerlendirilerek bu türün taksonomik açıdan teşhis anahtarına yeni bir anlam kazandırılmış olup türün tanımı ve teşhis amaçlı yeni morfolojik özellikleri belirlenerek bu tür için bilgi alanı genişletilmiştir.Yazar derlemesi ile, İran'da bulunan Nepeta türlerinin yerli ve endemik türler dahil 38 türün uçucu yağ bileşimini rapor etmiştir (Jinous Asgarpanaha ve ark., 2014).

# 3. MATERYAL ve METOT

## 3.1. Materyal

Bu tez ile ilgili tüm çalışmalar Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. N.baytopii Hedge& Lamond 'un tohumları Güney Doğu Anadolu Bölgesinde Bingöl'ün Genç ilçesinden 25 km uzaklıkta yol kenarları güzergahlarından bizzat kendim tarafından temin edip, teşhisi ise Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN tarafından yapılmıştır. Bitki materyali olarak, doğal alanlardan toplanan N.baytopii Hedge&Lamond'un tohumlarından *in vitro* kültür yoluyla elde edilen sürgünlerin çeşitli parçaları explant olarak kullanılmıştır.



**Şekil 3.1.** A.B.*Nepeta baytopii* Hedge&Lamond' bitkisinin doğal ortamdaki resimleri

## 3.2. Metod

### 3.2.1. Çalışma Ortamının ve Çalışmada kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Çalışma sırasında kullanılan erlenmayer ve beher fırça yardımıyla temizlendikten sonra sıcak su ve saf sudan 3 kez geçirilmek suretiyle 180 °C'lik etüv de 3 saat bekletilerek kullanıldı. Diğer cam malzemeler ise; balon joje, mezür ve pipetler belli boylardaki fırçalar ile yıkanarak sıcak sudan ve saf sudan 3 kez geçirilerek 85 °C'lik etüvde 3 saat süre ile steril edildikten sonar kullanıldı.

Kültür kapları (Magenda GA-7) bulaşık makinesi ile yıkandıktan sonra 3 er kez sıcak su ve saf sudan geçirilerek kurutulduktan sonra kültür kapları alüminyum folyo ile

2 kat sarıldıktan sonra 25 dakika 121 °C'de ve 1 atm basınç altında otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirildi. 180 ºC etüvde kullanılan filtre kağıtları 120 dakika , kullanılan saf sular ise yine 180 ºC'lik etüvde 180 dakika bekletilip sterilizasyonu sağlandı.

% 96'lık alkol ile pens ve bisturiler silinip 10 adetli olarak alüminyum folyo ile sarılarak paketleme işlemi yapıldıktan sonra 300 °C'lik bir ısıdaki fırında 30 dakika tutularak steril edildi.

Çalışmaya başlamadan 1 gün öncesinde çalışma yapılacak olan röpikaj odası ve odadaki tüm malzemeler % 53'lük sodyum hipoklorit (NaOCI) ile temizlenmiştir. Steril kabinin tamamı ise %70'lik alkol ile dezenfekte edilerek Ultraviyole lambası oda temizlendikten sonra ekim işlemlerinden bir gece önce 2 saat açık bırakılarak, odadaki sterilizasyon işleminin tamamlanması sağlanmıştır.

Kültür odasında 3000-5000 lüx'lük ışık şiddetine sahip floresan ampuller ile aydınlanma sağlanmaktadır. Ortamın sıcaklığı 25±2 ºC ye ayarlanmış sıcaklık kontrol sistemi ile sağlanmıştır. Ayrıca fotoperiyod, bir zaman ayarlayıcısı yardımı ile aydınlık/karanlık, 16 saat / 8 saat olacak şekilde ayarlandı.

Bu araştırmada yapılan bütün labaratuvar çalışmalarında, besi ortamı olarak Murashige ve Skoog (MS-1962) tarafından önerilen temel besi ortamının ayarlanmış şekli kullanılmıştı.

### 3.2.2. Çalışma Materyali Olan Tohumların Sterilizasyonu

*Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumları sterilizasyon işleminde önceki yapılan çalışma göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Tohumlar öncelikle %70 alkolde 30 saniye ön sterilizyona tabi tutularak %7 lik NaOCl' de 10 ve 15'er dakika bekletildikten sonra son çalkalama suyunda suyun dibine çöken tohumlar ekim işlemi için kullanılmıştır.

### 3.2.3. MS ortamında Tohum Çimlendirme Aşaması

Steril tohumların çimlenmesi ve büyümesi için uygun gördüğümüz 1/1 MS besi ortamına 30 g/l sükroz eklendikten sonra besi ortamının pH'sı 5.8 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 5.458 g/l agar ilavesi ile 25 dakika süre ile 1 atm basınçta 121 ºC'de

otoklavda steril edilen besiyeri kültür kaplarına (Meganda GA-7) streil kabının içerisinde bölüştürülerek soğumaya bırakıldı.

Steril kabin içinde, steril pens ve bistüri yardımı ile steril filtre kağıtları arasında tohumların birer birer kültür kaplarına ekimi yapıldı. Ekimi yapılan tohumlar önceden fotoperiyodu ayarlanmış kültür odasında gelişmeye bırakılarak çimlenme ve gelişimleri takip edilmiştir.

**Çizelge 3.1.** 1/1 MS Besi Ortamın İçeriği

| | |
|---|---|
| Agar | 5.458 g |
| Sakkaroz | 30 g |
| MS Ana Çözeltisi (Makro Elementler) | 100 ml |
| MS Mikro Elementler-1 | 10 ml |
| MS Mikro Elementler-2 | 1 ml |
| Kompleks Kelatör | 10 ml |
| Vitamin Karışımı | 1 ml |
| B1 Vitamini Ana Çözeltisi | 1 ml |
| Distile Su | 1000 ml olacak şekilde ayarlandı. |

### 3.2.4. İndirekt Organogenesis Çalışmaları İçin Ön Hazırlık

Çimlenmesi ve büyümesi takip edilen sürgünlerin kallus için uygun ortamlar oluşturabilmek için öncelikle sürgünler sitokin de (0.125 BAP) aktarımı yapıldıktan sonra gelişimi iyi olan sürgünler kök, gövde ve yaprak olacak şekilde üç farklı eksplant oluşturularak farklı oksin hormonlarının (IBA, IAA, NAA, 2.4 D) bulunduğu farklı parametrelere (0.25, 0.5, 1.0, 1.5) ekim işlemleri sağlanarak kontrol ve takipleri yapılmıştır.

**Çizelge 3.2.** İndirekt organogenesis için MS destekli hormon içerikleri

| BESİ YERİ | KALLUS ORTAMI VE HORMON İÇERİĞİ |
|---|---|
| MS 1 | 0.125 mg l-1 BAP+ 0.25 mg l/ IBA |
| MS 2 | 0.125 mg l-1 BAP+ 0.5 mg l/ IBA |
| MS 3 | 0.125 mg l-1 BAP+ 1.0 mg l/ IBA |
| MS 4 | 0.125 mg l-1 BAP+.1.5 mg l/ IBA |
| MS 5 | 0.125 mg l-1 BAP+ 0.25 mg l/ NAA |
| MS 6 | 0.125 mg l-1 BAP+ 0.5 mg l/ NAA |
| MS 7 | 0.125 mg l-1 BAP+ 1.0 mg l/ NAA |
| MS 8 | 0.125 mg l-1 BAP+.1.5 mg l/ NAA |
| MS 9 | 0.125 mg l-1 BAP+ 0.25 mg l/ 2,4-D |
| MS 10 | 0.125 mg l-1 BAP+ 0.5 mg l/ 2,4-D |
| MS 11 | 0.125 mg l-1 BAP+ 1.0 mg l/ 2,4-D |
| MS 12 | 0.125 mg l-1 BAP+.1.5 mg l/ 2,4-D |
| MS 13 | 0.125 mg l-1 BAP+ 0.25 mg l/ IAA |
| MS 14 | 0.125 mg l-1 BAP+ 0.5 mg l/ IAA |
| MS 15 | 0.125 mg l-1 BAP+ 1.0 mg l/ IAA |
| MS 16 | 0.125 mg l-1 BAP+.1.5 mg l/ IAA |
| MS+kontrol | |

### 3.2.4.1. Kallus Kültürleri İçin Kallus Ortamlarının Hazırlanması

1 lt MS besi ortamı **Çizelge 3.1**.'de belirtilmiştir. Çalışmanın amacına uygun olarak kallus oluşumu için gerekli onla bitki büyüme düzenleyicileri (oksin ve sitokinin) ve bunların 4 farklı parametreleri (Çizelge 3.2) seçilip ayrı ayrı besi ortamına eklendikten sonra pH'sı 5.8 olacak şekilde her besi ortamı olarak ayarlandı ve kültür besi ortamına 5.460 g agar eklendikten sonra 25 dakika 121ºC'de 1 atm basınçta otoklavda steril edildi.

### 3.2.4.2. Çimlenen Sürgünlerin Kallus Oluşum Ortamına Aktarılması

Kallus oluşumu için öncelikle 1/1MS hormonsuz besi ortamında tohumların kültüre alınıp çimlenmesinden sonra, 0.125 mg/l BAP+ 1/1 MS ortamına sürgün sayısında artış sağlanmak için alınmıştır. Oksin hormonlarının (IBA, IAA, NAA, 2.4 D) 4 farklı konsantrasyon (0.25, 0.5, 1.0, 1.5) uygulanarak sürgünlerin 3 farklı

eksplantları (kök, gövde ve yaprak) kallus oluşumu için besi kültür ortamına ekilip ve karanlık ortama gelişimi için bırakılıp haftalık morfolojik gözlemleri yapılmıştır.

**Çizelge 3.3.** Eksplant tipine göre eksplantlardan oluşan kallusların % oranı

| Eksplant Tipi | Materyal sayısı | % Kallus oranı |
|---|---|---|
| KÖK | 720 | %62,50 |
| GÖVDE | 720 | %52,08 |
| YAPRAK | 720 | %37,77 |

### 3.2.4.3. Yapraklardan Elde Edilen Kallus Oluşum Oranları ve Ağırlıkları

Yaprak eksplantı üzerine test edilen BAP destekli oksin hormonların (IAA, IBA, NAA, 2.4 D) farklı konsantrasyonları ile elde edilen kallus oranları aşağıdaki çizelge de detaylı bir şekilde belirtilmiş olup farklı konsantrasyonların kallus oluşumu üzerinde etkisi olduğu gözlenmiştir. Her bir parametre için eksplant tiplerinden 45 'şer eksplant alınmıştır. Kültürün 10.gününde aynı ortama aktarılarak 1.alt kültür 20. Gününde yine aynı ortamda 2. alt kültür yapılmıştır. Yaprak eksplantında elde edilen veriler incelendiğinde, (çizelge 3.3) kullanılan sürgün büyütme ve kallus oluşturma ortamlarından (MS 13 0.125 mg l-1 BAP+ 0.25 mg l/ IAA) hormonların kullanıldığı besi ortamlarında bütün yaprak eksplantlarında kallus oluşturduğu gözlendi.

**Çizelge 3.4.** Yaprak Eksplant tipine göre oluşan kallusların % oranları ve ağırlıkları

| Yaprak Eksplantı | Materyal Sayısı | Taze Ağırlık | Kuru Ağırlık | % Kallus Oranı |
|---|---|---|---|---|
| **BAP + IAA** | 180 | ~3.346 gr | ~0.287 gr | %80 |
| **BAP + IBA** | 180 | ~4.284 gr | ~0.443 gr | %19 |
| **BAP + NAA** | 180 | ~2.513 gr | ~0.237 gr | %10 |
| **BAP + 2,4 D** | 180 | ~2.961 gr | ~0.243 gr | %60 |

### 3.2.4.4. Köklerden Elde Edilen Kallus Oluşum Oranları ve Ağırlıkları

1/1 MS Besi kültür ortamında çimlenmesi sağlanan N.Baytopii Hedge& Lamound'un daha sonra elde edilen sürgünler 0.125 mg/l BAP konsantrasyonu ile sürgün çoğaltımı işlemini yaptıktan sonra var olan sürgünleri yaprak, kök ve gövde olucak şekilde 3 ayrı eksplant oluşturularak kallus oluşumu için karanlık ortamda morfolojik gözlem işlemi yapılmıştır. Kök eksplantlarından elde etiğmiz veriler incelediğinde, (çizelge 3.4) kullanılan kallus oluşturma ortamlarından MS 7 ve MS 8 (0.125 mg l-1 BAP+ 1.0 mg l/ NAA ve 0.125 mg l-1 BAP+ 1.5 mg l/ NAA) besi kültür ortamlarında bütün kök eksplantlarında kallus oluşturduğu gözlendi.

**Çizelge 3.5.** Kök Eksplant tipine göre oluşan kallusların % oranları ve ağırlıkları

| Kök Eksplantı | Materyal Sayısı | Taze Ağırlık | Kuru Ağırlık | % Kallus Oranı |
|---|---|---|---|---|
| **BAP + IAA** | 180 | ~3.346 gr | ~0.287 gr | %33.33 |
| **BAP + IBA** | 180 | ~4.284 gr | ~0.443 gr | %55.51 |
| **BAP + NAA** | 180 | ~2.513 gr | ~0.237 gr | %86.11 |
| **BAP + 2,4 D** | 180 | ~2.961 gr | ~0.243 gr | %69.87 |

### 3.2.4.5. Gövdelerden Elde Edilen Kallus Oluşum Oranları ve Ağırlıkları

Gövde eksplantlarının üzerinde yapılan 0.125 mg/l BAP ve NAA nin farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı besi ortamlarındaki morfolojik gözlemler ve ölçümlere dayanarak bitki rejenerasyonu gösterdiği gözlemlendi. Kallus oluşturma oranı, %40.55 ve %65.00 arasında hesaplandı (çizelge 3.5) Ayrıca MS 6 besi ortamında (çizelge 3.1) kallus oluşumu daha iyi verimlilikte olmasına rağmen tam anlamıyla istenilen kallus oluşumu görülmemiştir.

**Çizelge 3.6.** Gövde Eksplant tipine göre oluşan kallusların % oranları ve ağırlıkları

| Gövde Eksplantı | Materyal Sayısı | Taze Ağırlık | Kuru Ağırlık | % Kallus Oranı |
|---|---|---|---|---|
| **BAP + IAA** | 180 | ~2.811 gr | ~0.216 gr | %57.22 |
| **BAP + IBA** | 180 | ~3.933 gr | ~0.349 gr | %54.44 |
| **BAP + NAA** | 180 | ~1.852gr | ~0.139 gr | %65.00 |
| **BAP + 2,4 D** | 180 | ~2.127 gr | ~0.158 gr | %40.55 |

### 3.2.4.6. Kalluslardan Sürgün Oluşumu ve Sürgünlerin Köklendirilmesi

Çalışmanın bu aşamasında daha önce yapılan çalışmada rapor edilen veriler 0.125 mg/l BAP'ın en iyi sürgün oluşturma besi ortamı ile köklendirme besi ortamı için 0.25 mg/l IBA nın en iyi besi ortamı olduğunu belirten verilerine dayanarak gerekli ortamlar oluşturulmuştur. Elde edilen Kalluslardan en verimli olanları seçilip öncelikle 0.125 mg/l BAP ortamında sürgün oluşumuna bırakılmıştır. Yapılan işlem sonrası 14-21 gün arasında sürgün oluşumu gözlenmiştir. Elde edilen sürgünler 21. Günde Kök oluşumu için hazırlanan 0.25 mg/l IBA ortamına aktarılarak kök oluşumuna bırakılmıştır. Kalluslardan elde edilen sürgünlerde 10-15 gün arasında kök oluşumu gözlenmiştir.

### 3.2.4.7. Oluşan Sürgünlerin Toprağa Adaptasyonu

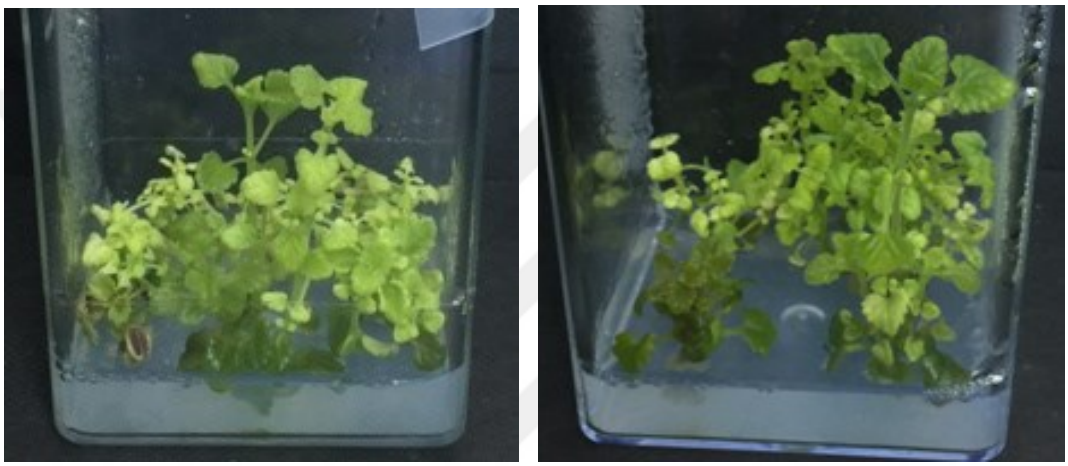
Elde edilen köklü sürgünlerin büyük kısmının toprağa adaptasyonunun gerçekleşmesi için belirli aşamalarda geçirilerek sağlanmış ve bitki doku kültür tekniği ile kısa sürede sürgün çoğaltımı yoluna gidilmiştir.

Köklendirme ortamında kök oluşumu oluşturulduktan sonra küçük bitkiçikler haline gelen sürgünler öncelikle kültür kaplarından çıkarılarak musluk suyu ile iyice yıkanarak jelimsi besiyerinden arındırıldı. Turbiyer toprağın bulunduğu küçük kaplar bolca sulandı ve köklü fideler, hazırlanan bu kaplara ekilerek hava almayacak şekilde üzerleri plastik torbalar ile kapatıldı. Kaplara ekimi yapılan fideler 16/8 fotoperiyoda 25 ± 2 ºC'deki kültür odasına gelişmeye bırakıldı. 3. gün kapların üzerini örten plastik torbalarda küçük delikler açılarak fidelerin hava alınması sağlandı. Bu sayı 9-10. güne kadar aşamalı olarak artırıldı. 10. gün kapların üzerindeki plastik torbalar 5 dakika süre ile tamamıyla çıkarıldı. Torbaların kaplardan çıkarılma süresi 20-25 güne kadar kademeli olarak artırıldı. 20-25 günden sonra plastik torbalar tamamen çıkarıldı ve küçük fidecikler daha geniş saksılara alınarak büyüme odasında büyümeye bırakıldı.

# 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

## 4.1.Kültür Başlatma Çalışmaları

Bu araştırmada *N. baytopii* Hedge&Lamond'un tohumları önceden yapılan çalışmanın rapor ettiği %7 NaOCI de 10 dakika bekletildikten sonra son çalkalama suyunda 10 dakika daha beklettik suyun dibine inen tohumların hormonsuz MS besi yerlerine ekiminı yaptık. *N. baytopii* Hedge & Lamond'un sürgün çoğaltımını ise Han'ın tezinde (2018) belirtmiş olduğu çoğaltma protokolünü uygulayarak bir sitokinin olan BAP'ın 0.125 mg/l eklenmiş MS besi ortamına aktarılarak ekim yapıldı.



**Şekil 4.1.** 0,125 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü

## 4.2. İndirekt Organogenesis Bulguları

Sterilazasyondan geçen tohumlar öncelikle 14 günlük MS hormonsuz ortamında çimlenme ve daha sonrada MS ortamına bir sitokinin olan 0.125 mg/lBAP'lı ortam da sürgünlerin ekimi ile elde edilen steril fidelerin kök, gövde ve yaprak eksplantları; bölüm 3.2.4. de belirtildiği gibi Çizelge 4.1'de belirtilen, MS ortamına BA+ NAA, BA+IBA, BA+IAA ve BA+2,4-D hormonlarının farklı konsantrasyonlarına ve kombinasyonlarına sahip 16 farklı besi yerine ekimi yapılmıştır. MS ortamları agar eklenmeden ve otoklavlanmadan önce PH' sı 5.8 e ayarlandı. Daha sonra 25 dakika süre ile 121$^{o}$C de 1 atm basınç altında steril edildi. Kültürler 25$^{0}$C±2 de karanlık periyodunda kallus oluşumu için gelişime bırakıldı. Tüm denemeler 3 tekrarlı yapıldı. Kallus kültürlerinin başlatılmasından itibaren düzenli aralıklarla morfolojik gözlemler her parametre için ayrı ayrı alınmıştır. Her bir parametre için eksplant tiplerinden 45'şer eksplant alınmıştır. Kallus dokusunun oluşumu birinci haftadan itibaren ilk olarak

meristem eksplantlarında görülmüştür. İkinci haftadan itibaren kök ve yaprak eksplantlarında da kallus başlangıcı görülmüştür. Meristem eksplantlarının tüm yüzeyinden kallus oluşumu gözlenirken, kök ve yaprak eksplantlarının kesim yapılan uç kısımlarından kallus başlatımı görülmüştür. Oluşan kalluslar açık yeşil ve homojen görünümlüdürler.Tüm eksplant tiplerinden elde edilen kalluslar benzer görünümdedir.

### 4.2.1. Yapraklardan Elde Edilen Kallus Oluşumu

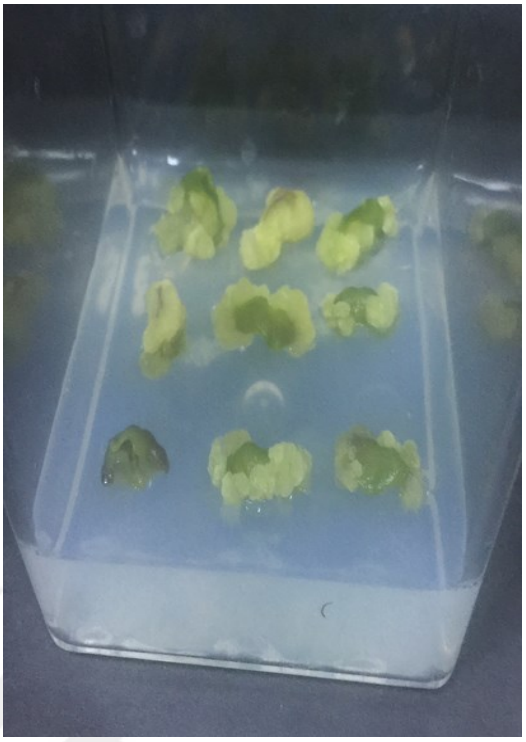
Yaprak eksplantı üzerine test edilen BAP destekli oksin hormonların (IAA, IBA, NAA, 2.4 D) farklı konsantrasyonları ile elde edilen kallus oranları çizelge 4.3 'de detaylı bir şekilde belirtilmiştir. Farklı konsantrasyonların kallus oluşumu üzerinde etkisi olduğu açıkça görülmektedir. Yaprak eksplantlarında kallus oluşma oranı en iyi oran %80 iken en kötü oran %10 olarak belirlenmiştir. Elde edilen kallusları kuru ve taze ağırlıkları yaklaşık olarak her oksin parametresi için 180 materyal olarak kullanarak yaklaşık değerler hesaplanmıştır. (Çizelge 3.4) Yaprak eksplantı üzerine oluşturulan BAP destekli oksin hormonlarının konsantarasyonların detayları belirtilmiştir.

**-0,125 mg/l BAP + 2,4 D**

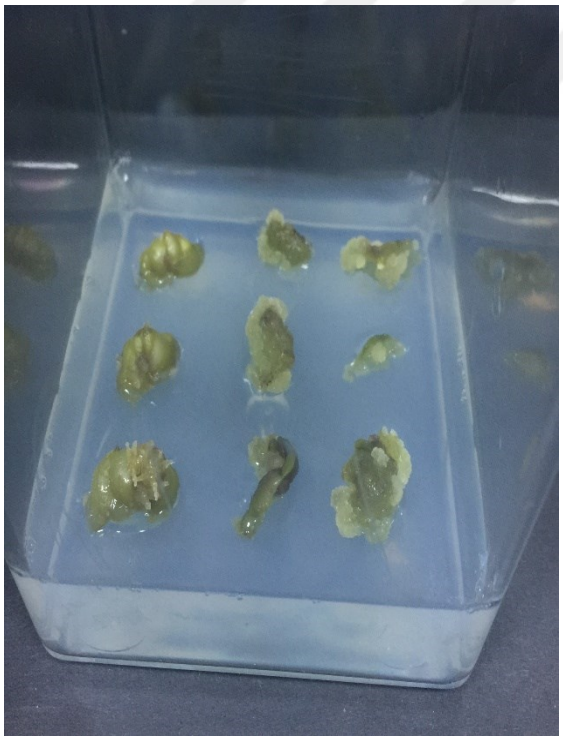
2,4 D mg/l hormonun farklı konsantrasyonları (0,25-0,5-1.0-1,5) denediğimizde aldığımız morfolojik sonuçların da kallus oluşumu gözlendi. Elde ettiğimiz kalluslar şeffaf, yumuşak ve vitrifiye olmuş şekildedir. Besi ortamının 2,4 D miktarı artıkça kallus oluşumunda azalma meydana gelmiştir.



**Şekil 4.2.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l 2,4 D yapraktan elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.3.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D yapraktan elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.4.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4 D yapraktan e edilen kallus görüntüsü

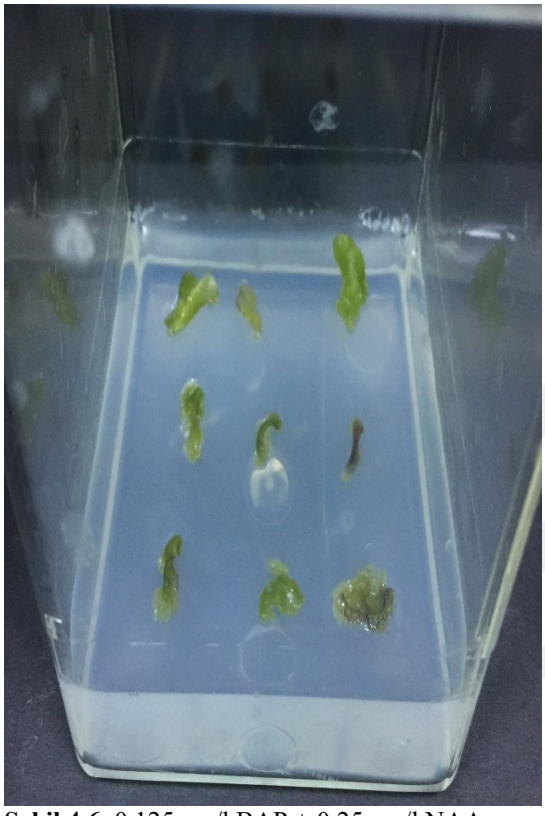


**Şekil 4.5.** 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l 2,4 D yapraktan elde edilen kallus görüntüsü

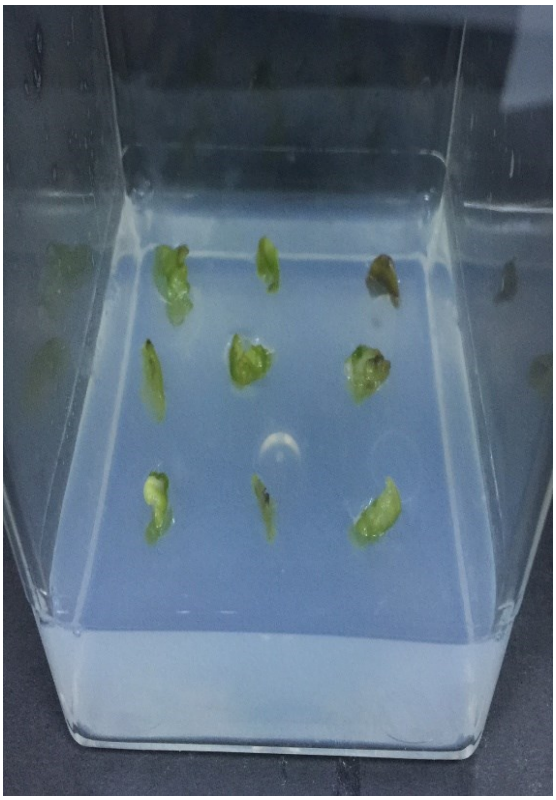
**-0,125 mg/l BAP + NAA**

Bu oksin hormonun dört farklı konsantrasyonu (0,25-0,5-1-1,5) denenmiştir.

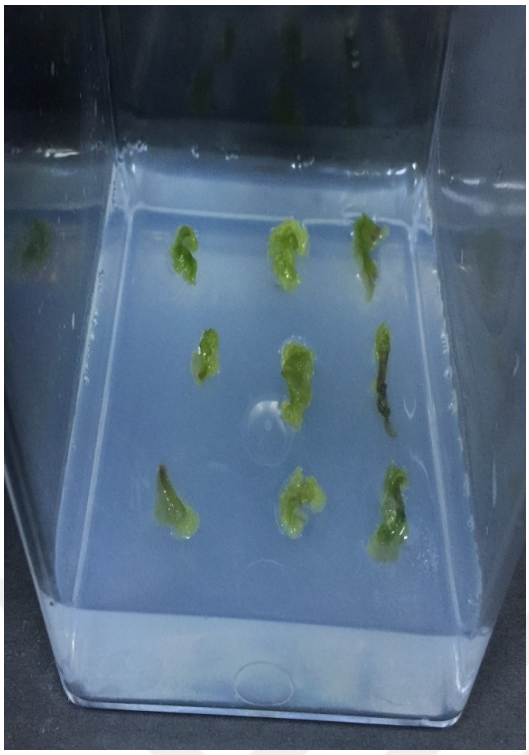
Bu parametrelerde çalışmamıza yönelik hiçbir cevap alınamadı ve ekilen sürgünlerde klorofil kaybı ve vitrifikasyon mevcut.



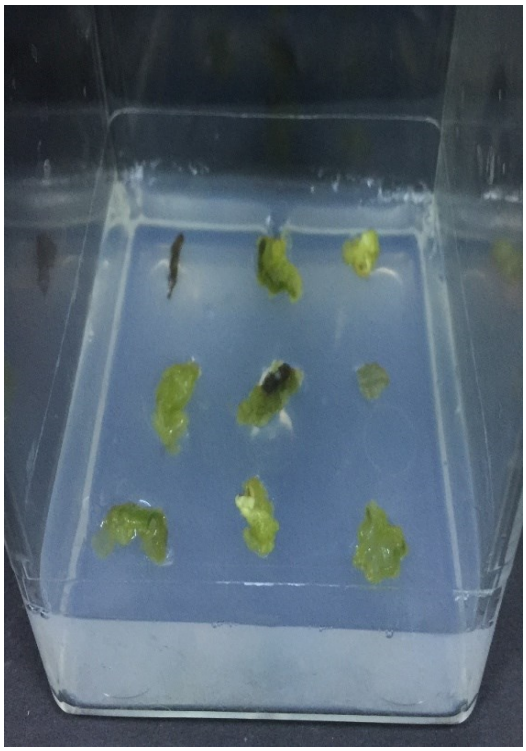
**Şekil 4.6.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l NAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.7.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.8.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l NAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.9.** 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l NAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü

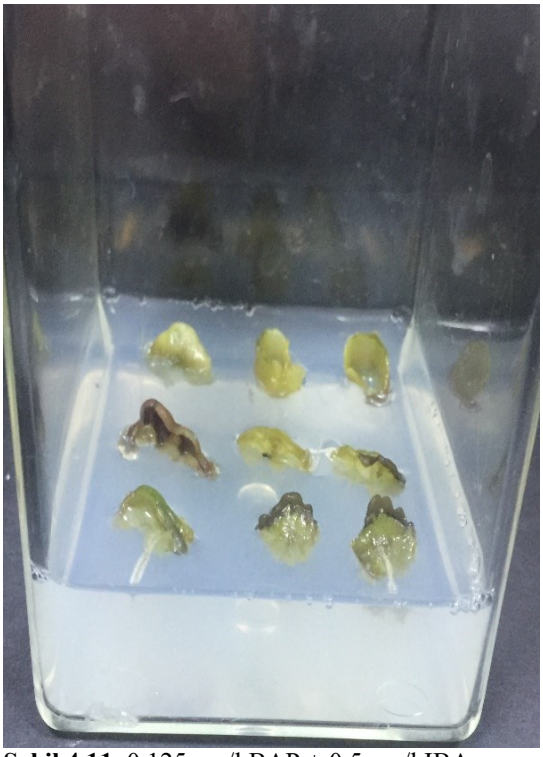
**-0,125 mg/l BAP + IBA**

Bu oksin hormonun dört farklı konsantrasyonu (0,25-0,5-1.0-1,5) denenmiştir.

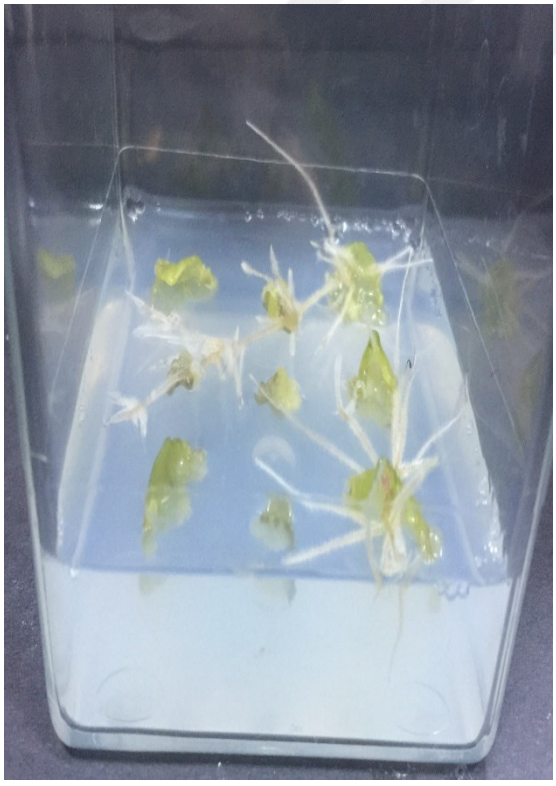
Bu parametrelerin tümünde kallus oluşumu gözlendi. Fakat oluşan kalluslarda klorofil kaybı yanısıra hat safhada vitrifikasyon gözlendi. Yaprak paratmetresinde kallus oluşum oranı %19 olarak hesaplandı(Çizelge3.4).



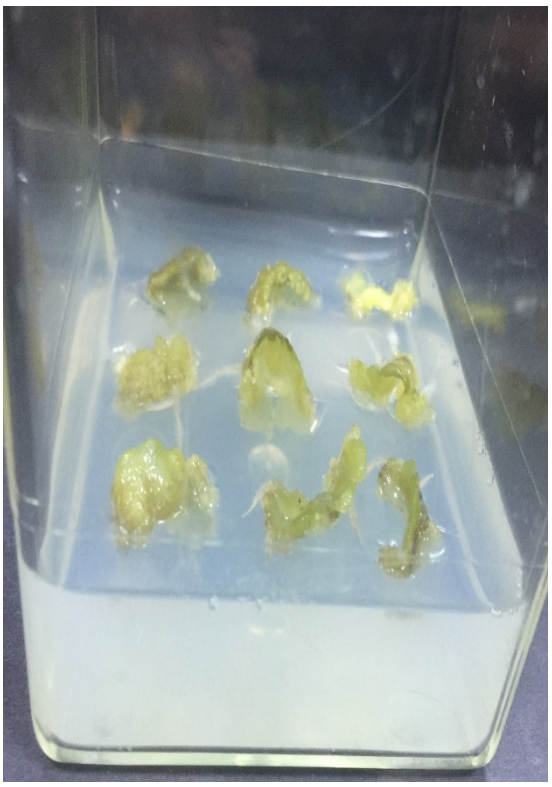
**Şekil 4.10.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l IBA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.11.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.12.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l IBA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü



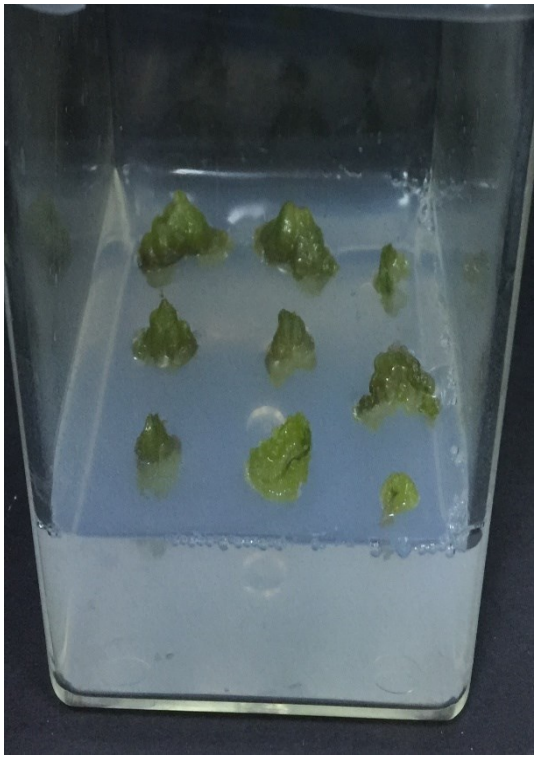
**Şekil 4.13.** 0,125 mg/l BAP+ 1,5 mg/l IBA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü

**-0,125 mg/l BAP + IAA**

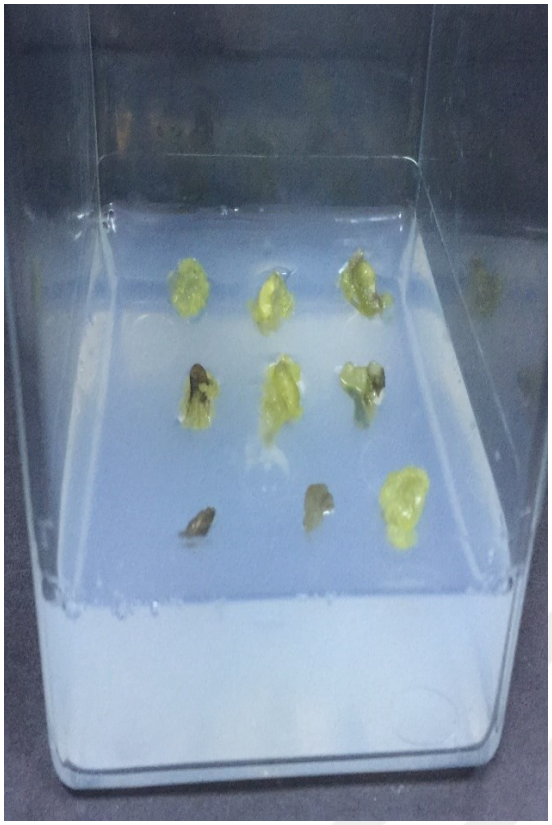
Bu oksin hormonun dört farklı konsantrasyonu (0,25-0,5-1-1,5) denenmiştir. Çalışmamızda yaprak eksplantı üzerine yapılan BAP destekli oksin hormonlarından en iyi sonuç aldığımız hormon IAA'dır. En fazla kallus oluşumu 0,5 mg/l IAA gösterirken en iyi kallus büyüesinin olduğu parametre 1,5 mg/l IAA'dir.



**Şekil 4.14.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l IAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.15.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.16.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l IAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.17.** 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l IAA yapraktan elde edilen kallus görüntüsü

### 4.2.2. Köklerden Elde Edilen Kallus Oluşumu

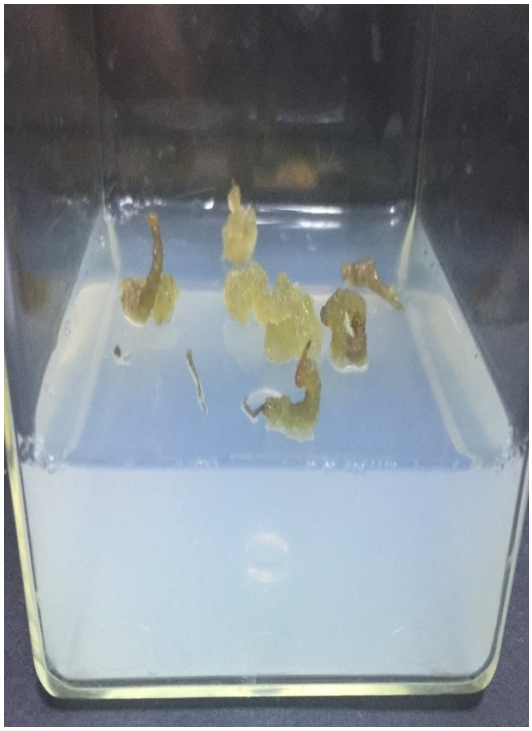
Kök eksplantı üzerine test edilen BAP destekli oksin hormonların (IAA, IBA, NAA, 2.4 D) farklı konsantrasyonları ile elde edilen kallus oranları Çizelge 4.4 'de detaylı bir şekilde belirtilmiştir. Farklı konsantrasyonların kallus oluşumu üzerinde etkisi olduğu açıkça görülmektedir. Kök eksplantlarında kallus oluşma oranı en iyi oran %86 ve en kötü oran %33,33 olarak belirlenmiştir. Kök eksplantlarından elde edilen kallusların taze ve kuru ağırlılları her oksin parametresi için 180 materyal üzerinden yaklaşık olarak değerleri hesaplanmıştır(Çizelge3.5). Morfolojik gözlemlerimizi değerlendirdiğimizde ise aşağıdaki sonuçları elde ettik.

**-0,125 mg/l BAP + 2,4 D**

Bu oksin hormonun dört farklı konsantrasyonu (0,25-0,5-1.0-1,5) denenmiştir. Yapılan çalışmama yönelik bu parametrede uyguladığım konsantrasyonların büyük çoğunluğunda kallus oluşumu gözlenmesine rağmen istenilen kallus oluşumu görülmedi. Oluşan kalluslar zayif, yumuşak ve sarımtırak rengindedir.



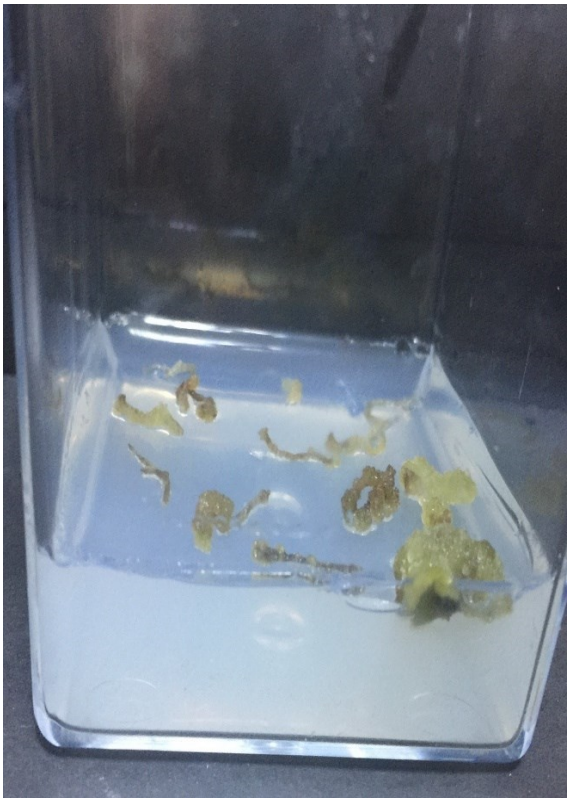
**Şekil 4.18.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l 2,4 D kökten elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.19.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D kökten elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.20.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4 D kökten elde edilen kallus görüntüsü



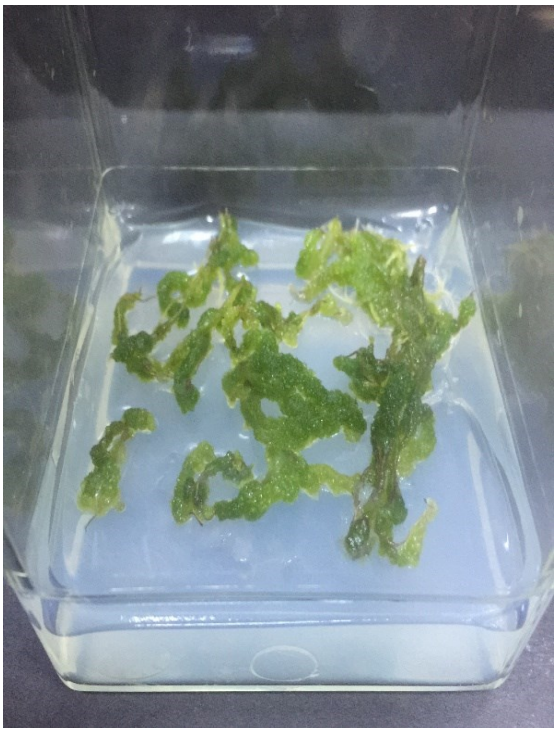
**Şekil 4.21.** 0,125 mg/l BAP+ 1,5 mg/l 2,4 D kökten elde edilen kallus görüntüsü

**-0,125 mg/l BAP + NAA**

Bu oksin hormonun dört farklı konsantrasyonu (0,25-0,5-1.0-1,5) denenmiştir. Kök eksplantında kallus oluşumuna yönelik yaptığım çalışmamda en iyi sonucu bu parametrelerimizde elde ettik. En iyi sonucu veren 1,5 mg/l NAA ve 1 mg/l NAA idi. Özellikle 1 mg/l NAA da elde ettiğimiz kalluslar sıkı, yoğun, koyu yeşil renkte olmakla birlikte sürgün oluşumu da görüldü.



**Şekil 4.22.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l NAA kökten elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.23.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA kökten elde edilen kallus görüntüsü



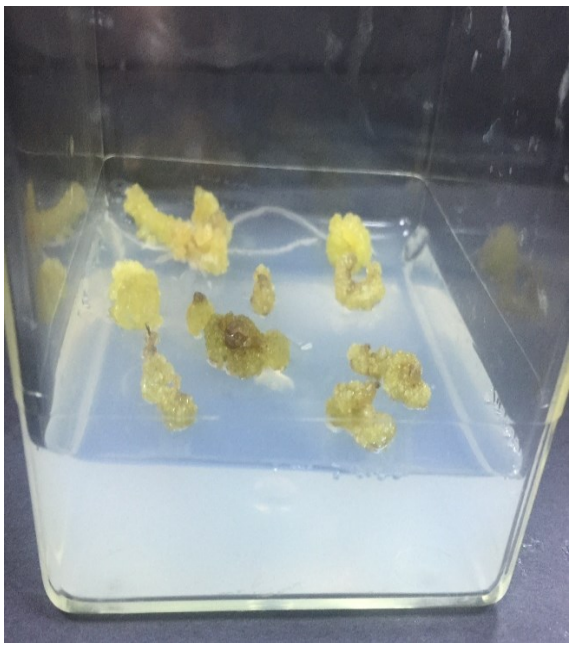
**Şekil 4.24.** 0,125 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA kökten elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.25.** 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l NAA kökten elde edilen kallus görüntüsü

**-0,125 mg/l BAP + IBA**

Bu oksin hormonun dört farklı konsantrasyonu (0,25-0,5-1.0-1,5) denenmiştir. Parametrelerde yapılan morfolojik gözlemler sonucu kallus oluşumu gözlenmesine rağmen oluşan kalluslar zayıf, şeffaf, yumuşak ve sarımtırak renktedir.



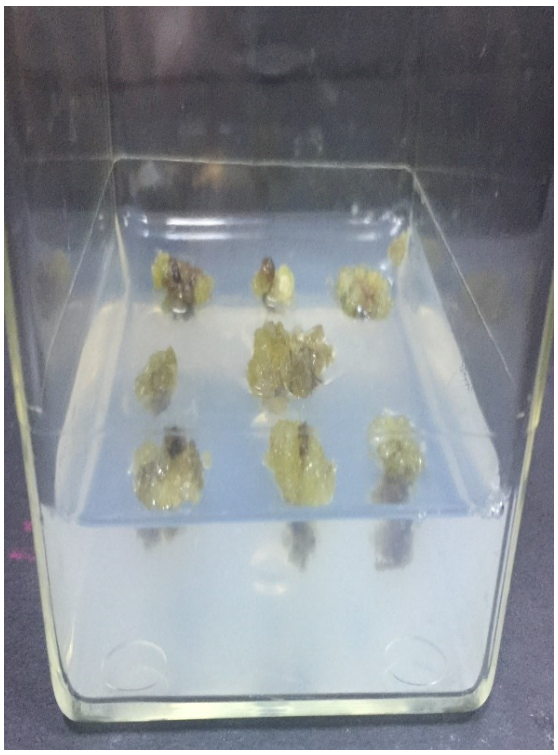
**Şekil 4.26.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l IBA kökten elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.27.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA kökten elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.28.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l IBA kökten elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.29.** 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l IBA kökten elde edilen kallus görüntüsü

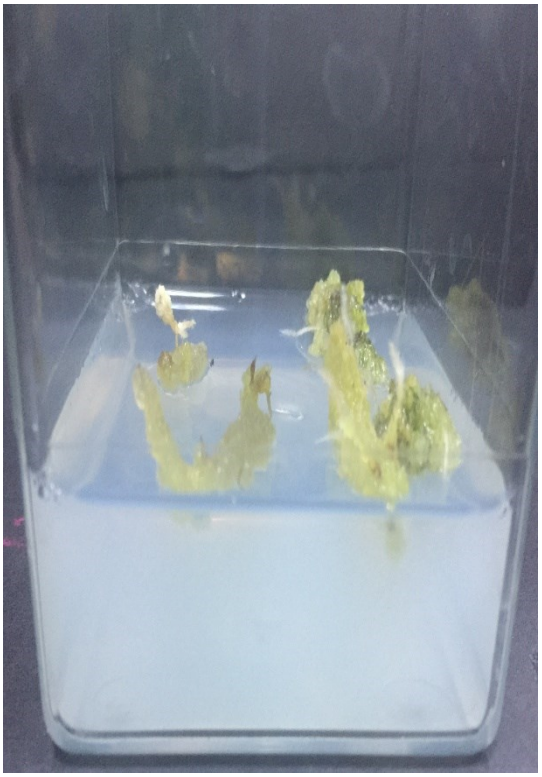
**-0,125 mg/l BAP + IAA**

Bu oksin hormonun dört farklı konsantrasyonu (0,25-0,5-1.0-1,5) denenmiştir.

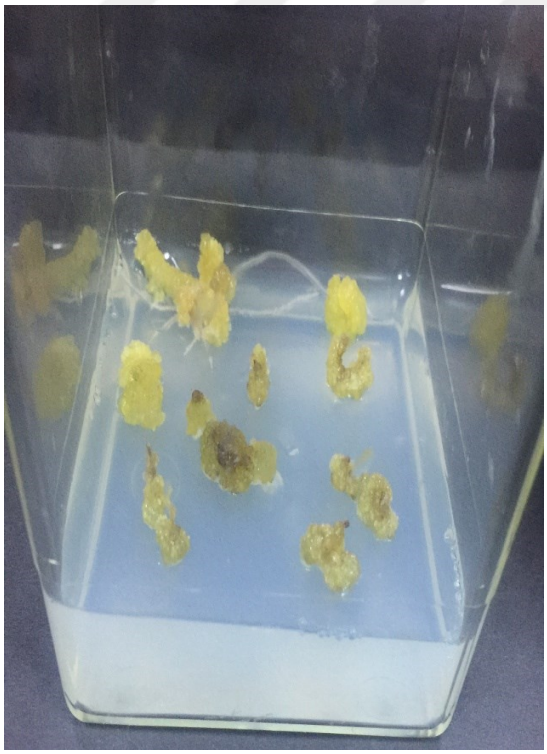
Bu parametrede elde edilen sonuçlar kök parametresinin en düşük değeri olarak gözlenmiştir. Yapılan çalışmada az da olsa kallus oluşumu görülmüş fakat oluşan kalluslar sağlıksız kalluslardır.



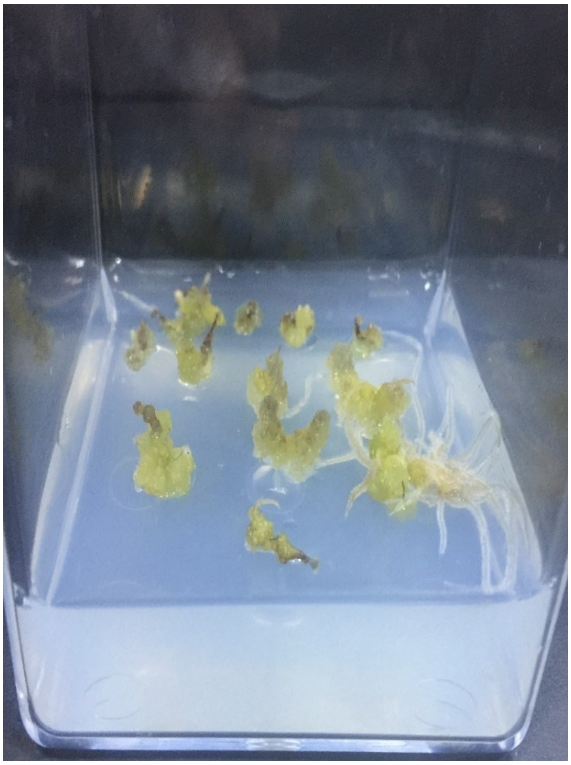
**Şekil 4.30.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l IAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.31.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.32.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l IAA kökten elde edilen kallus görüntüsü



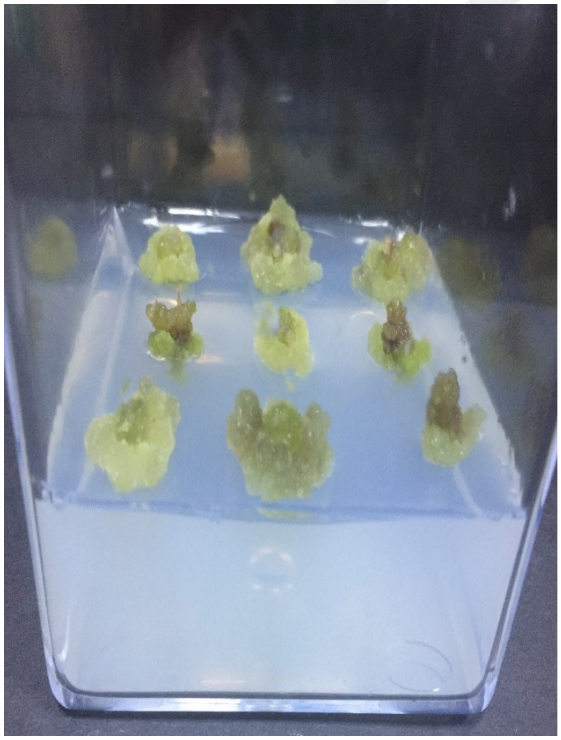
**Şekil 4.33.** 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l IAA kökten elde edilen kallus görüntüsü

### 4.2.3.Gövdelerden Elde Edilen Kallus Oluşumu

Gövde eksplantı üzerine test edilen BAP destekli oksin hormonların (IAA, IBA, NAA, 2.4 D) farklı konsantrasyonları ile elde edilen kallus oranları Çizelge 4.5'de detaylı bir şekilde belirtilmiştir. Farklı konsantrasyonların kallus oluşumu üzerinde etkisi olduğu açıkça görülmektedir. Gövde eksplantlarında kallus oluşma oranı en iyi oran %65 ve en kötü oran %40 olarak belirlenmiştir. Elde edilen kallusların taze ve kuru ağırlıkları oksin parametrelerinde 180 materyal üzerinden yaklaşık değerler hesaplanmıştır(Çizelge 3.6). Morfolojik gözlemlerimizi değerlendirdiğimizde ise aşağıdaki sonuçları elde ettik.

**-0,125 mg/l BAP + 2,4 D**

Bu oksin hormonun dört farklı konsantrasyonu (0,25-0,5-1.0-1,5) denenmiştir. Parametrelerde zayıf, cılız bir kallus oluşumu vardır. Genel olarak gövdede gelişim yoktur. 2,4 D oksin hormonunmiktarında artış meydana geldikçe gövde degelişme olmadığı gibi renkte kahverengileşme gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.34.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l 2,4 D gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.35.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.36.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4 D gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



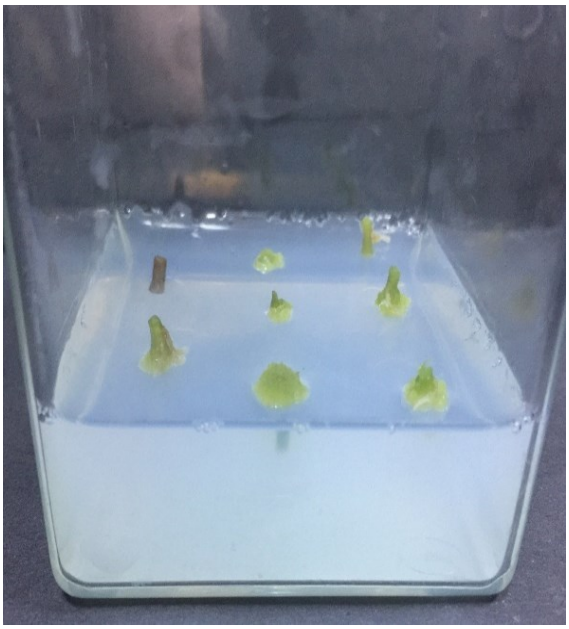
**Şekil 4.37.** 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l 2,4 D gövdeden elde edilen kallus görüntüsü

**-0,125 mg/l BAP + NAA**

Bu oksin hormonun dört farklı konsantrasyonu (0,25-0,5-1.0-1,5) denenmiştir. Morfolojik gözlemlerini aldığımız bu değerde çalışmamıza yönelik hiçbir sonuç elde edemedik. Kallus oluşumu gözlenmediği gibi ekimi yapılan gövde ekplantında klorofil kaybı gözlendi.



**Şekil 4.38.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l NAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.39.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



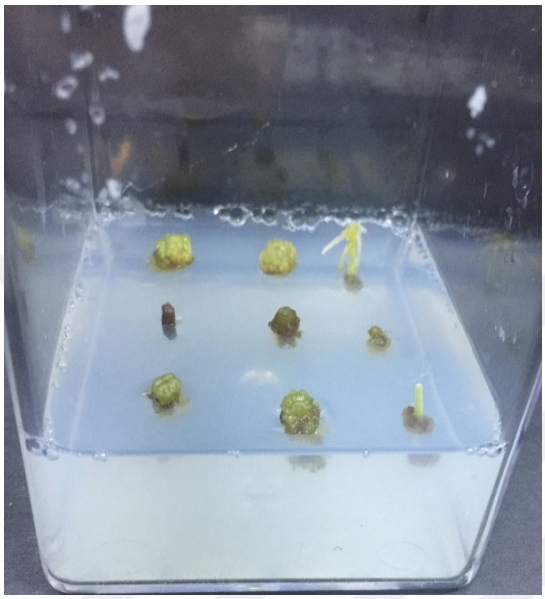
**Şekil 4.40.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l NAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.41.** 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l NAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü

**-0,125 mg/l BAP + IBA**

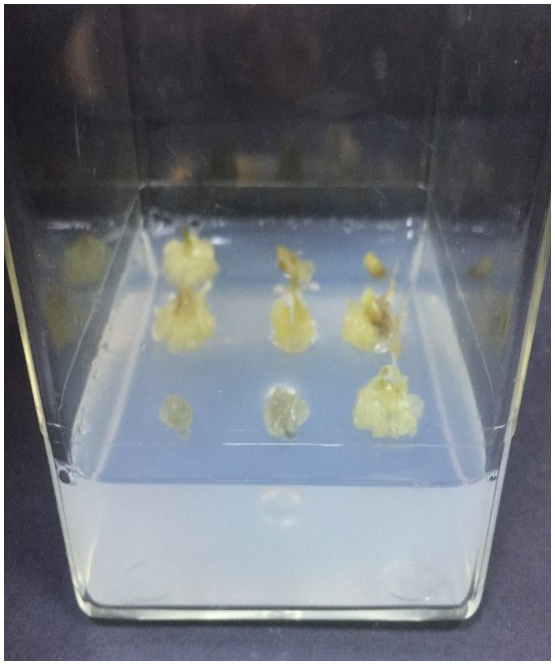
Bu oksin hormonun dört farklı konsantrasyonu (0,25-0,5-1.0-1,5) denenmiştir. Morfolojik gözlemlerimizi değerlendirdiğimizde bu parametrelerde kallus oluşumu vardır. Fakat oluşan kalluslar da yumuşak, şeffaf ve vitrifiye olmuştur.



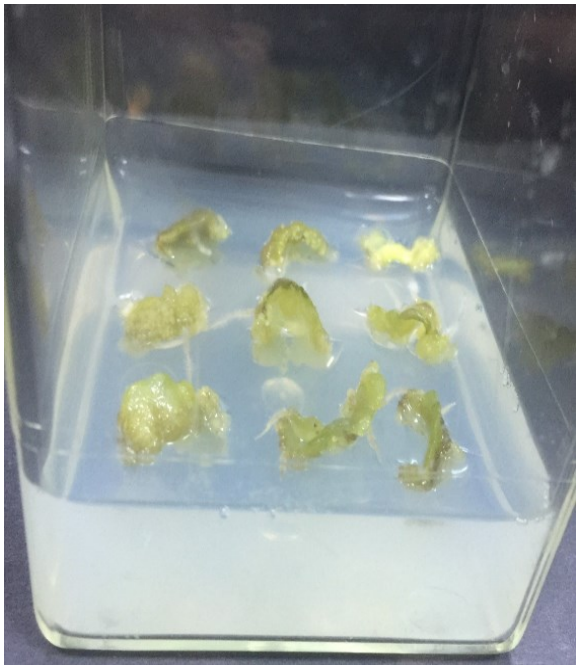
**Şekil 4.42.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l IBA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.43.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



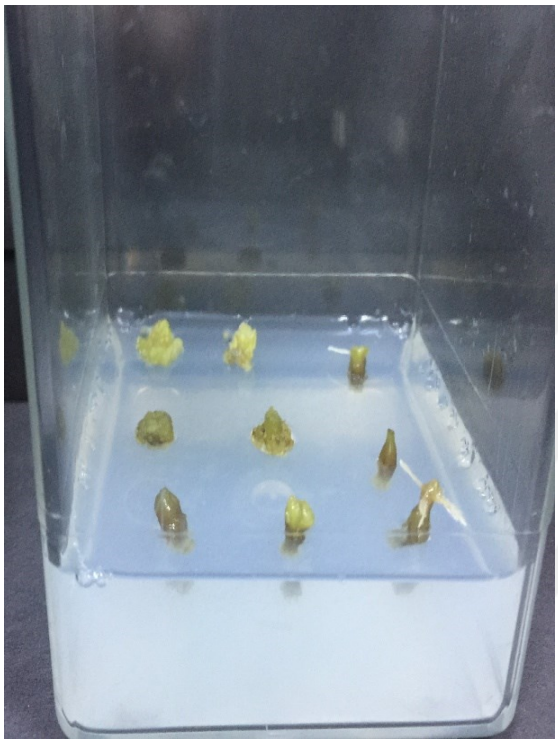
**Şekil 4.44.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l IBA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



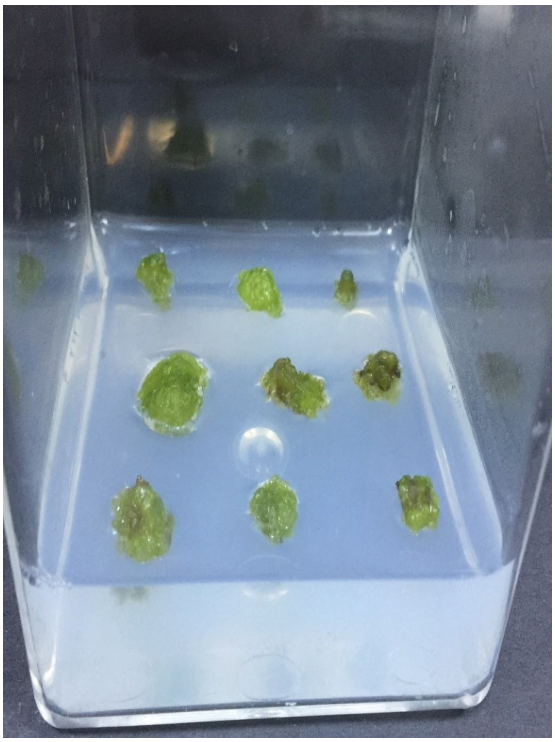
**Şekil 4.45.** 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l IBA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü

**-0,125 mg/l BAP + IAA**

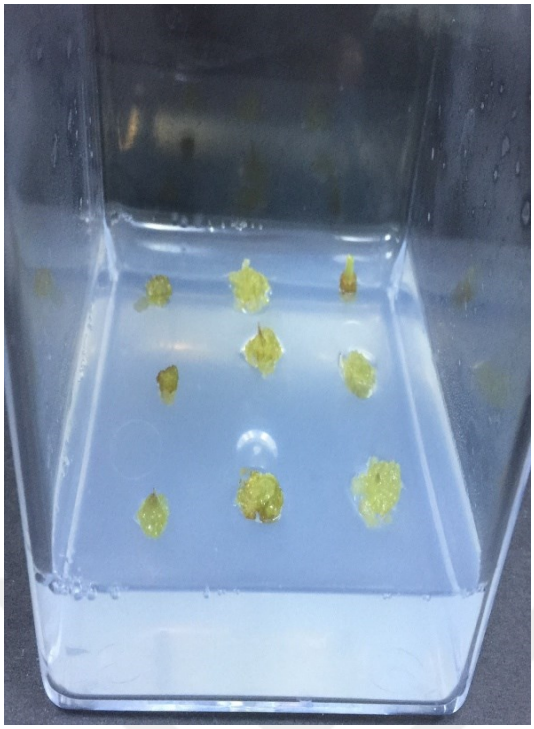
Bu oksin hormonun dört farklı konsantrasyonu (0,25-0,5-1.0-1,5) denenmiştir. Morfolojik gözlemlerimizi değerlendirdiğimizde bu parametrelerin tümünde kallus oluşumu vardır ama oluşan kalluslar sağlıksız ve istediğimiz kalluslar değildi.



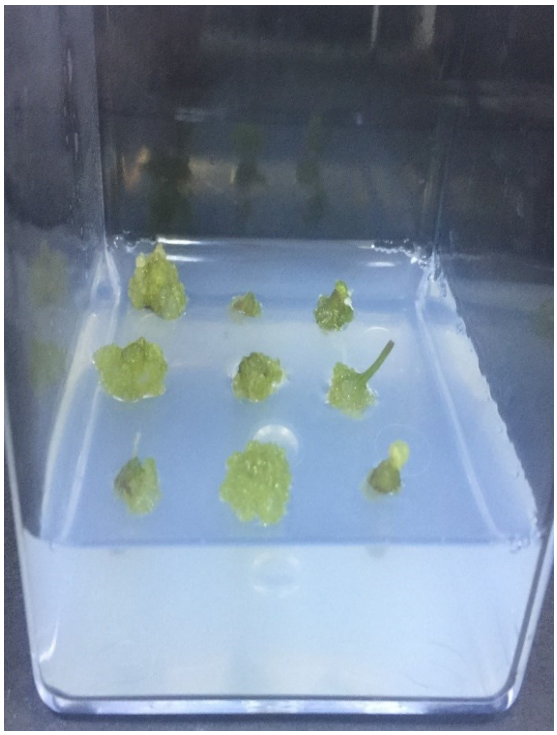
**Şekil 4.46.** 0,125 mg/l BAP + 0,25 mg/l IAA Gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



**Şekil 4.47.** 0,125 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



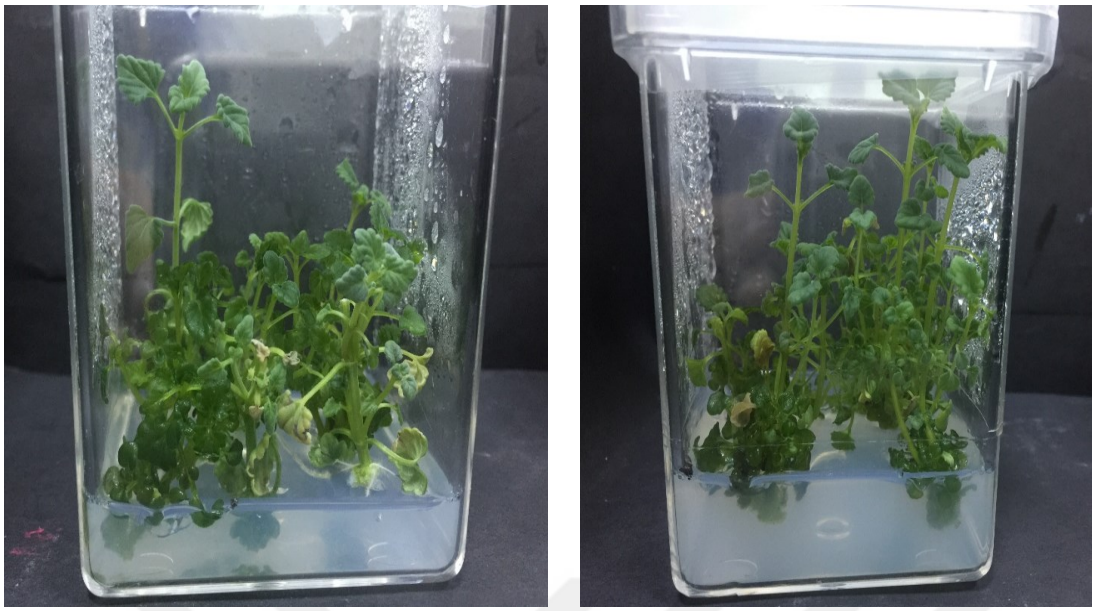
**Şekil 4.48.** 0,125 mg/l BAP + 1 mg/l IAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü



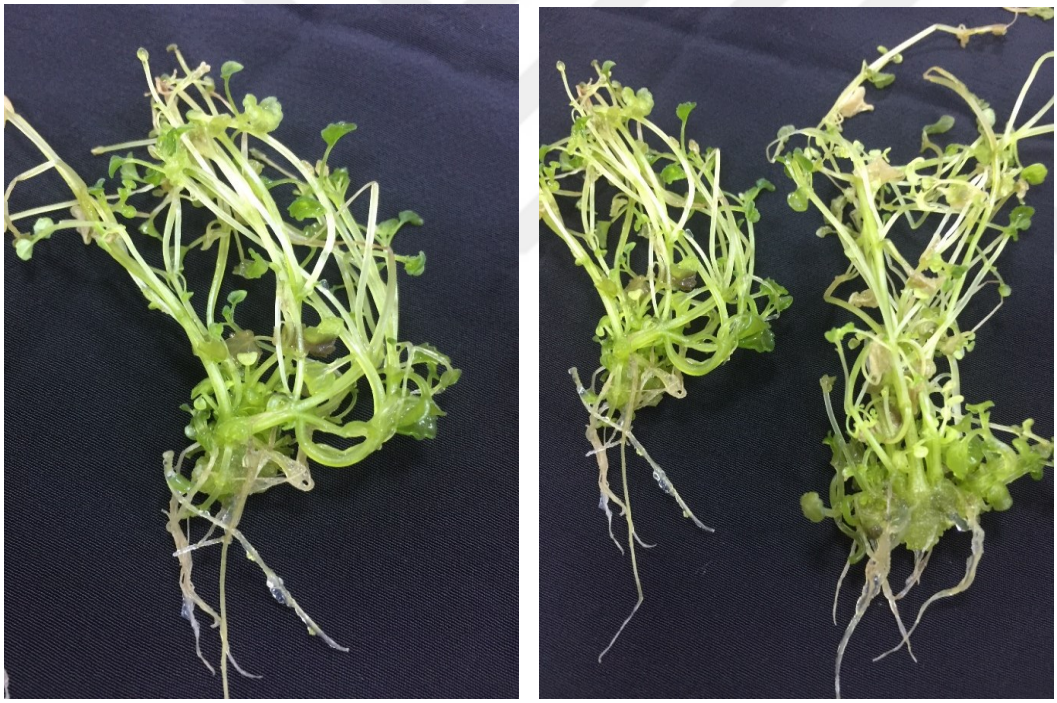
**Şekil 4.49.** 0,125 mg/l BAP + 1,5 mg/l IAA gövdeden elde edilen kallus görüntüsü

### 4.2.4. Kalluslardan Sürgün Oluşumu ve Sürgünlerin Köklendirilmesi

*In vitro* fidelerden alınan kök, gövde ve yaprak eksplantları, 0.125 mg/l BAP ile desteklenmiş 0.25, 0.5, 1.0 ve 1.5 mg/L NAA, IBA, IAA ve 2,4-D hormonlarını farklı kombinasyonlarda içeren MS ortamlarına aktarıldıktan sonra kallus oluşumu için 21 gün beklendi. Kallus oluşumu sağlıklı ve iyi gelişenler öncelikle sürgün oluşumu için 0,125 mg/l BAP besi ortamına aktarıldı. 15. Günün sonunda oluşan sürgünler kök oluşumu için 0,25 mg/l IBA besi ortamına transfer edildi. 10-15 gün aralığında kök oluşumu gözlemlenmiştir. Kök oluşumu görülen küçük bitkiciklerin toprağa adaptasyonu yapılmadan önce köklü bitkiciklerin bulundukları besi ortamında kurtulabilmeleri için musluk suyu yardımıyla bulundukları jellerden temizlendiler.



**Şekil 4.50.** Kalluslardan oluşan sürgünlerin görüntüleri



**Şekil 4.51.** Kalluslardan oluşan sürgünlerin köklendirmesine ait görüntüler

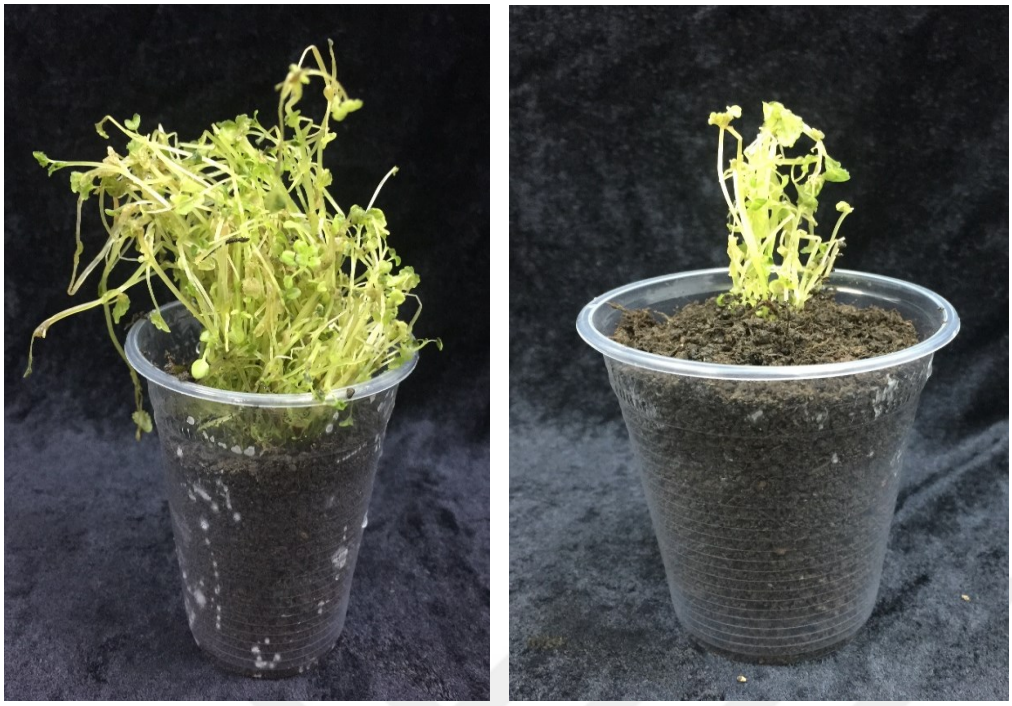
Elde edilen köklü sürgünlerin büyük kısmının toprağa adaptasyonunun gerçekleşmesi için belirli aşamalarda geçirilerek sağlanmış ve bitki doku kültür tekniği ile kısa sürede sürgün çoğaltımı yoluna gidilmiştir.

Köklendirme ortamında kök oluşumu oluşturulduktan sonra küçük bitkiçikler haline gelen sürgünler öncelikle kültür kaplarından çıkarılarak musluk suyu ile iyice

yıkanarak jelimsi besiyerinden arındırıldı. Turbiyer toprağın bulunduğu küçük kaplar bolca sulandı ve köklü fideler, hazırlanan bu kaplara ekilerek hava almayacak şekilde üzerleri plastik torbalar ile kapatıldı. Kaplara ekimi yapılan fideler 16/8 fotoperiyoda 25 ± 2 oC'deki kültür odasına gelişmeye bırakıldı. 3. gün kapların üzerini örten plastik torbalarda küçük delikler açılarak fidelerin hava alınması sağlandı. Bu sayı 9-10. güne kadar aşamalı olarak artırıldı. 10. gün kapların üzerindeki plastik torbalar 5 dakika süre ile tamamıyla çıkarıldı. Torbaların kaplardan çıkarılma süresi 20-25 güne kadar kademeli olarak artırıldı. 20-25 günden sonra plastik torbalar tamamen çıkarıldı ve küçük fidecikler daha geniş saksılara alınarak büyüme odasında büyümeye bırakıldı.



**Şekil 4.52.** Kalluslardan oluşan sürgünlerin poşetlenip toprağa adaptasyon sağlama



**Şekil 4.53.** Kalluslardan oluşan sürgünlerin toprağa adaptasyon görüntüsü



**Şekil 4.54.** Toprağa adaptasyonda saksı görüntüleri



**Şekil 4.55.** Toprağa adaptasyonda saksı görüntüleri

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tohumdan elde edilen sürgünlerin çoğaltılmasında sürgün çoğaltımını sağlamak için, genellikle sitokininler kullanılmaktadır. Bu çalışmada MS ortamı baslangıç kültürlerinde tohum çimlenmesi için hormonsuz ve sürgün çoğaltımında ise MS+BAP eklenerek sağlanmıştır (Şekil 4.1.).Sürgünlerin kök, gövde ve yaprak eksplantları kullanılarak, kallus ortamı olarak MS besin ortamına eklenen BAP+OKSİN (çizelge 4.1.) her eksplantın farklı parametrelerinden en iyi kalluslar elde edilmiştir.elde edilen kalluslar yeşil, kompakt ve sıkı idi (Şekil 4.25) . *İn vitro*'da kök oluşumunu saglamak amacı ile sürgün oluşumu ve çogalmasına teşvik edilerek belli boya ulasmış olan sürgünler kesilip daha önce yapılan çalışmada belirtildiği gibi köklenme için oksin tiplerinden IBA (0.25mg/l ) kullanıldı. Kültüre alınan sürgünlerden 0.25 mg/l IBA'nın eklendiği ortamda bulunan sürgünlerin %85-90'inde farklı uzunluk ve sayılarda köklenme elde edilmiştir (Şekil 4.35)

Bitki büyüme düzenleyicilerin çeşit ve konsantrasyonu kallus oluşumu için önemli bir etkendir. Nepeta kök, gövde ve yaprak parçalarından en fazla kallus oluşumu kök parçasında ve bitki büyüme düzenleyicilerinden de BAP + NAA ortamında kallus oluşumu gözlendi (Şekil 4.25) .Büyüme düzenleyicilerinin olmadığı ortamda kallus oluşumu gözlenmedi. Sitokinin konsantrasyonundan bağımsız olarak oksinin kallus oluşumu için önemli olduğu tespit edildi. Sitokininlerin varlığında, kallus oluşum yüzdesi oranı %86 ile artış gösterdi. Işık koşullarına göre karanlıkta daha yüksek kallus oluşum yüzdesi elde edildi. Işık koşulları altında daha az kallus oluşumu görüldü. Mather ve Roberts (1998) kendi araştırmalarında bunun Işığa duyarlı PGR'lerin bozulmasından kaynaklanabilir olacağını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamız yazarları desteklemektedir.

Nelofar Gulam Nabi ve ark. (2018) tehlike altındaki tıbbi bir bitki olan *Spilanthes acmella Linn* 'in yaprak ekplantlarından kallus yolu ile bitki regenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Maksimum kallus oluşumunu, 0.5 mg / 1 BAP ile 1.5 mg / 1 2,4-D ile desteklenmiş MS ortamında % 70,5 oranında elde ettiklerini raporlamışlardır. Koyu yeşil ve kırılgan bir morfolojik görünüme sahip kalluslar elde etmişler. Biz çalışmamızda en iyi kallus oluşumunu kök eksplantın 0.125 mg/l BAP + 1 mg/l NAA da %86 oranında elde ettik. Işıkalan ve ark.(2011*) Hypericum spectabile*

için *in vitro* olarak indirek uygulanabilir bir rejenerasyon protokolü geliştirmişler ve *in vitro* ortamda yetiştirilen kök ve yaprak eksplantlarından kallus oluşumunu başlatmışlardır. Nepeta gibi çalımsı forma sahip olan bu bitkide en iyi kallus indüksiyonunu yaprak eksplantında 1.0 mg /l BAP + 2.0 mg/l 2.4-D içeren MS ortamından elde etmişlerdir. Kalluslar kompakt, granüler ve yeşil renkli olup kallus kaynaklı sürgünleri ise 0.5 mg /1 BAP içeren MS ortamında elde etmişlerdir. Biz nepeta da ise yaprak eksplantında 0.125 mg/l + 1,5 mg/l IAA da %80 oranında elde ettik.

Carolina Mariane Moreıra ve ark (2016) *Ananas erectifolius*'un genç yapraklarının taban, orta ve uç kısımlarıdan kallus elde etmek için yaptıkları araştırmalarında, elde edilen yaprak taban segmentlerinin yüksek miktarda meristematik hücreye sahip olduğu, kullanılan üç eksplant türü arasında kallusu ve aynı zamanda sürgün rejenerasyonunu indükleyen tek eksplant tipinin yaprak tabanı olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca kallus oluşum sıklığını en iyi veren, pikloram, 2,4-D ve TDZ içeren ortamlardan elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Bizde çalışmamızda yaprak parçalarının taban kısımlarında kallus oluşum oranın fazla olduğunu gözlemleyerek aynı sonuca vardık.

Öncelikle bu araştırma da; İlk olarak en uygun eksplant; kallus kültürünün oluşturulması için belirlendi. Bunu yapmak için N.baytopii Hedge& Lamond'nın tohumları doğal yetişme ortamından toplanarak *in vitro* ortamda daha önce ki çalışmada belirlenen sterilizasyon ve çoğaltım prosedürü uygulandı. Yaprak, gövde ve kök kısımlarından alınan parçalar ile kallus oluşum oranının saptanması için BBD lerinin farklı konsantrasyonu ve kombinasyonları ile MS besi ortamında kallus kültürleri oluşturuldu. Yapılan çalışmalar sonucunda en iyi kallus oluşum yüzdesi kökte %86 güvde de %65 yaprak ta %80 olarak sitokinin + oksin oranında elde edildi. Aşağıda adı geçen araştırıcıler tarafından yapılan çalışmalarda bizim çalışmamızı desteklemektedir. Araştırıcıler hem tıbbi ve hem de süs bitkilerinin etkili bir regenerasyonu ve kallus oluşumu için sitokininler ile birlikte oksinlerin varlığı gerekli olduğunu rapor etmişlerdir (Mendi et al. 2009; Mun ve Mun 2016). Chamail ve ark.(1999) kiwifruit (*Actinidia deliciosa*)'nin yaprak parçalarının kallus kültürleri için MS ortamına farklı konsantrasyonlarda 2,4-D, NAA, 2iP, kinetin ve BAP eklemişler, sert, nodüler ve yeşil olarak en iyi kallus oluşumunu MS ortamına BA (1.5 mg/l) and NAA (1 mg/l)

eklenmiş besi yerlerinden elde etmiş olduklarını raporlamışlardır. Centeno ve ark.(1996), *A.deliciosa* dokularının kallusundan yeni organların uyarılması için en iyi sonuçların, BA ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarında elde edildiğini bildirmiştir. Biz çalışmamızda en iyi kallus oluşumunu kökte %86, gövde de %65 ve yaprakta %80 oranlarda elde ettik. Bu çalışma, çalışmamız ile uyum içndedir. Bu çalışmada verimli bir indirek organogenez protokolü kallus oluşumu ile nepeta için kuruldu. Bu çalışmanın sonucu olarak, doku kültürü tekniklerinin klonal yayılmada önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Çeşitli sebeblerle Nepeta türlerinin, elit genotipleri medical uygulamalar, halk hekimliği ve doğanın aşırı hor kullanılması sonuçu ile bu türlerin sömürülmesi sömürü bu bitkinin yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalması durumunu oluşturmaktadır. Sonuç olarak, geliştirilen bu protokol sayesinde bu türün yeniden doğaya kazandırılabileceğini gösterdik. Bu yöntem yeniden üretilmesi için son derece avantajlıdır.

Sarwat Naz ve ark.( 2018). *Brassıca napus L*.nin in vitro çoğaltımı üzerine farklı büyüme düzenleyicilerinin etkilerini araştırmışlar ve kallus oluşumu için en ideal eksplantın hipokotilin olduğunu ve MS ortamının 0.1 mg/l 2,4-D ile desteklenmesinden elde edildiğini tespit etmişler. Bizim bu çalışmada kullandığımız bitki türü *Brassıca napus L* gibi çalı formunda olmasına rağmen en iyi kallus oluşum oranını ortalama %80 olduğunu bulduk.

Büyüme düzenleyicilerin türü ve konsantrasyonu N.baytopiii *Hedge & Lamond* için yaprak, kök ve gövde parçalarının *in vitro* rejenerasyon için önemli faktörlerdir. Büyüme düzenleyicilerinin olmadığı ortamda kallus oluşumu görülmedi. Her hangi bir sitokinin tipinin ortamda bulunup bulunmamasından bagımsız olarak oksin, kallus oluşumu açısından önemlidir. Sitokininlerin varlığında NAA' in oranı %80 besi yerinde artan konsantrasyonları ile kallus oluşum oranında artış sağlanmıştır (şekil 4.25). Ayrıca ortamda sitokinin bulunması kallus oluşumu açısından önemlidir. Ancak Mather ve Roberts (1998) araştırmalarında, bazı yaprak diskleri sadece 2 mg / l NAA ile kallus oluşturduğundan oksinin sitokinden daha önemli olduğunu belirtmişler ve oksinin öneminin hücre bölünmesindeki rolünden kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Karanlık şartlarda oluşan kalluslar, ışık altında oluşan kalluslardan daha sıkı ve daha yeşil renkte olduğunu ve karanlık şartlardaki kallus oluşum oranı ışık şartlarına göre daha yüksek bulunmuş, bunun nedeninin ise ışığa duyarlı olan bitki büyüme

düzenleyicilerinin parçalanması ile açıklamışlardır (Mather ve Roberts 1998). Bu çalışma ile yaptığımız morfolojik gözlemler sonucunda ışığa duyarlı olan bitki büyüme düzenleyicilerden özellikle oksinlerin parçalanmasına neden olduğunu düşünerek yazara destek veriyoruz.

## 6. KAYNAKLAR


Aytac Z & Yıldız G (1996). A new record for the Flora of Turkey. Turk J Bot 20: 385-386.

Azizian, D., Jamzad, Z. & Serpooshan, F. 2001 12 15: Pollen morphology and taxonomy of the genus Nepeta sect. Psilonepeta (Labiatae) in Iran. -Iran. Journ. Bot. 9 (l): 19-26. Tehran.

Babaoğlu, M. Gürel, E. ve Özcan, S. Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 2002: 2-167.

Brady, SB, McCourt, P, 2003, "Hormone Cross-Talk in Seed Dormancy" ***Journal of Plant Growth Regulation***, 22, S 25–31

Budantsev, A.L. (1993a). Ultrastructural features of fruit surface in genus Nepeta (Lamiaceae). ***Botanicheskii Zhurnal***, 78(4), 80-87.

Budantsev, A.L. (1993b). The ultrastructural features of fruit surface in some genera of the tribe Nepeteae (Lamiaceae). ***Botanicheskii Zhurnal***, 78(5), 100-108.

Cantino, P.D., R.M. Harley and S.J. Wagstaff, Genera of Labiatae: Status and classification. In: Advances in Labiate Science, 1st edn. Edits., R.M. Harley and T. Reynolds, pp. 511–522, Royal Botanic Gardens, Kew (1992).

Carolına Moreira, Helena Andrade, Suzan Bertolucci, Osmar Lameira, Aliyu Mohammed, José Eduardo Pinto .(2016).Plantlet regeneration from young leaf segments of curaua (*Ananas erectifolius*), an Amazon species. Turk J Biol, 40, 1227-1234

Centeno, M. L., Rodriguez, A., Feito, I., & Fernández, B. (1996). Plant Cell Reports, 16, 58–62. doi:10.1007/BF01275450.

Chamail, A., S. Kumar, D.R. Sharma, Subodh Chander.(1999**) Regeneration of kiwifruit (Actinidia deliciosa) cv. 'Hayward' from leaf callus**. 56, Issue-4 (279-285)

Dirmenci T (2005). A new subspecies of Nepeta (Lamiaceae) from Turkey. Bot J Linn Soc 147: 229-233.

Ekim, T, 1990, "Türkiye'nin Biyolojik Zenginlikleri" Türkiye Çevre Sorunları Vakfı Yayını.

Formisano C., D. Rigano and F. Senatore, Chemical constituents and biological activities of Nepeta species. Chem. Biodivers, 8, 1783–1818 (2011).

Gautheret, R.J. 1934. Culture du tissue cambial. C.R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. p. 2195- 2196.

Ginova A., Tsvetkov I., Kondakova V. (2012): *Rosa damascena* Mill. - an overview for evaluation of propagation methods. ***Bulgarian Journal of Agricultural Science***, 18: 545–556.

Guner A, Ozhatay N, Ekim T & Bafler KHC. (eds.) (2000). Nepeta L. in: Guner A (ed), Flora of Turkey and East Aegean Islands, vol. 11 (Supplement II). Edinburgh University Press.

Hedge IC & Lamond JM (1982). Nepeta L. In: Davis PH (ed), Flora of Turkey and East Aegean Islands, Vol. 7, pp. 264-288. Edinburgh: Edinburgh University Press.

Hedge IC., Lamond J., Studies in the Flora of Afghanistan: VII, Labiatae Lam. Roy. Bot. Gard., 28, 97-123, 1968.

Hedge, I. C. (1978). Labiatae. In: Heywood, V.H. (ed.). *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press. 238-239pp

Işıkalan Ç., Akbaş F., Namlı S., Karakuş P. (2011) "Indirect Shoot Regeneratıon from in vıtro-derıved root and leaf explants of *Hyperıcum Spectabile*" Fresenius Environmental Bulletin. 20(10a): 2693-2698.

Jamzad Z, Harley MM, Ingrouille M, Simmonds MSJ & Jalili A (2000). Pollen exine and nutlet surface morphology of the annual species of Nepeta L. (Lamiaceae) in Iran. - In: Harley MM, Morton GM & Blackmore S (eds.), Pollen and Spores: Morphology and Biology, pp. 385-397. Kew: Royal Botanic Gardens.

Jamzad, Z. 2001: A phylogenetic study of Nepeta L. (Lamiaceae). -Ph. D. thesis, Birkbeck College , University of London.

Jamzad, Z., Chase, M., Ingrouille, M, Simmonds M, and Jalili, A. 2003: Phylogenetic relationships among Nepeta L. (Lamiaceae) species and related genera based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. -Taxon 52: 21-32.

JinousAsgarpanaha, Sanaz Sarabian and Parisa Ziarati (2014). Essential oil of Nepeta genus (Lamiaceae) from Iran: a review. Vol. 26, No. 1, 1–12, Journal of Essential Oil Research,

Mahmoud I.M.A., Hassanein A.M.A (2018). Essential factors for *in vitro* regeneration of rose and a protocol for plant regeneration from leaves. Hort. Sci. (Prague), 45: 83–91.

Mather J.P., Roberts P.E. (1998): Introduction to Cell and Tissue Culture Theory and Technique. New York, Plenum Press.

Mendi Y.Y, Curuk P., Kocaman E., Unek C., Eldogan S., Gencel G., Cetiner S. (2009): Regeneration of begonia plantlets by direct organogenesis. African Journal of Biotechnology, 8:1860–1863.

Moncaleon, P., Rodriguez, A., & Fernández, B. (2001). In vitro response of Actinidia deliciosa explants to different BA incubation periods. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67, 257–266. doi:10.1023/A:1012732429147.

Mun S., Mun G. (2016): Development of an efficient callus proliferation system for *Rheum coreanum* Nakai, a rare medicinal plant growing in Democratic People's Republic of Korea. Saudi Journal of Biological Sciences, 23: 488–494

Murashige, T., Skoog, F., A Revised Medium for Rapid Growth and Biossays with Tobacco Tissue Cultures, Physiol. Plant., 15, 473-497,1962.

Nelofar Gulam Nabi, Dr. Mukta Shrivastava, Dr. Asrar Amin Khan and Sajad Hussain Dar.(2018) Organogenesis in callus derived from leaf explants of *Spilanthes acmella* Linn: an endangered medicinal pant. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2018; 7(1): 01-07

Ömer KILIÇ (2013). A morphological and systematical study on endemic *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond (Lamiaceae) from Bingöl (Turkey). Ot Sistematik Botanik Dergisi. (2013). 20, 2, 17-24.

Pojarkova AI (1954). Nepeta L. In: Shishkin B K (ed.), Flora of The U.S.S.R., Vol. 20, pp. 191-293. Moskva-Leningrad: Academy Science of the U.S.S.R.

Raghava Swamy B.V., Himabindu K., Lakshmi Sita G., 1992. *In vitro* micropropagation of elite rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). Plant Cell Reports, *11*: 126–131.

Ramawat, K.G. (2003) Plant Biotechnology, Publishing S. Chand and Co Ltd New Delhi. Pp. 1-37.

Rao, A.N. and Lee, S.K. (1986) An overview of the *in vitro* propagation of woody plants and plantation crops. In: Withers L A and P G Alderson (Eds.) *Plant Tissue Culture and its Agricultural Application*. Butterworths, London. pp. 123– 138.

Rapisarda A, Galati EM, Tzakou O, Flores M & Miceli N (2001). Nepeta sibthorpii Betham (Lamiaceae): Micromorphological analysis of leaves and flowers. Farmaco 56: 413-415.

Rechinger, K. H. 1982: Nepeta in K.H. Rechinger (ed.) Fl. Iranica, 150: 108-216. -Graz.

Rugini E, Gutierrez-Pesce P (2003). Micropropgation of kiwi fruit (Actinidia sp). In Micropropagation of Woody Trees and Fruits, editors : Mohan Jain S, Ishii K, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 75: 647-669.

Sarwat Naz, Muhammad Faheem Sıddıquı And Saboohı Raza. Effect of different growth regulators on in vitro propagation of brassica napus L. *Pak. J. Bot*., 50(5): 1871-1876, 2018.

Shekhawat M.S., Kannan N., Manokari M., Ravindran C.P.(2015): *In vitro* regeneration of shoots and *ex vitro* rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 13: 209–214.

Sürer Han, M.,(2018). Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Yetişen ve Endemik Bir Tür Olan Nepeta baytopii Hedge & Lamond' un İn vitro Mikroçoğaltım Yollarının Araştırılması.Yüksek Lisans Tezi. D.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü

Tuncay Dirmenci., Bayram Yıldız., Gülendam Tümen (2004) Threatened Categories of Four Nepeta L. (Lamiaceae) Species Endemic to the East Anatolia. Turk J Bot 28: 221-226

Tzakou O, Haruda C, Galati EM & Sanogo R (2000). Essential Oil Composition of Nepeta argolica Bory et Chaub. subsp. Argolica subsp. argolica Flavour Fragr J 115-118.

# ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** **:** Zeynep KABAYEL

**Doğum Yeri** **:** Diyarbakır

**Doğum Tarihi** **:** 30.10.1989

**Medeni Hali** **:** Bekar

**Yabancı Dili** **:** İngilizce

**EĞİTİM DURUMU**

**Lise** **:** Melik Ahmet Lisesi / 2004-2007

**Lisans** **:** Dicle Üniversitesi / 2010-2014

**Yüksek Lisans** **:** Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü /2016-

**Proje ve Sertifika**

Pedagojik Formasyon Eğitim Sertifikası / D.Ü. Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi

DÜPTAM Uygulamalı Moleküler Teknikler ve Workshop I: Western Blot ve Hücre Kültürü Uygulamaları / 2017

# DİCLE ÜNİVERSİTESİ
# FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
# TEZ İNTİHAL FORMU

| | |
|---|---|
| **ÖĞRENCİ BİLGİLERİ** | |
| **ADI VE SOYADI** | Zeynep KABAYEL |
| **ÖĞRENCİ NO** | 16801011 |
| **EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI** | |
| **YARIYIL** | ☐ Güz ☒ Bahar |
| **ANABİLİM DALI** | BİYOLOJİ |
| **PROGRAM** | Yüksek Lisans |
| **TEZ KONUSU** | ***Nepeta baytopii*** Hedge &*Lamond*'un Kallus Kültürlerinden Bitki Rejenerasyonu. |
| **İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ** | |
| **RAPOR TÜRÜ** | Tez Savunma Sınavı Sonrası |
| **SAYFA SAYISI** | **49** |
| **BENZERLİK ORANI** | **% 13** |
| **RAPORLAMA TARİHİ** | **26/06/ 2019** |

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam **49** sayfalık kısmına ilişkin, **26/06/ 2019** tarihinde şahsım ve tez danışmanım tarafından. **turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **% 13**'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

☒Kabul/Onay sayfaları hariç,
☒Kaynakça hariç
☐Alıntılar hariç/dâhil
☐Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

**Zeynep KABAYEL**
**26/06/ 2019**

| | |
|---|---|
| Prof.Dr.Süreyya NAMLI<br>**Tez Danışmanı**<br>**26/06/ 2019** | Prof.Dr.Yüksel ÇOŞKUN<br>**Anabilim Dalı Başkanı**<br>**26/06/ 2019** |

**Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.**

KGK-FRM-340/00