

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

FARKLI BESİN ORTAMLARINDA KÜLTÜRE ALINAN
Lilium candidum L.'NİN MİKROÇOĞALTIMI ve
KRİYOPREZERVASYONU İÇİN BİYOTEKNOLOJİK
YÖNTEMLERİN OLUŞTURULMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAKAN KARAKAŞ

TEMMUZ/2021

MUĞLA

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

FARKLI BESİN ORTAMLARINDA KÜLTÜRE ALINAN
Lilium candidum L.'NİN MİKROÇOĞALTIMI ve
KRİYOPREZERVASYONU İÇİN BİYOTEKNOLOJİK
YÖNTEMLERİN OLUŞTURULMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAKAN KARAKAŞ

TEMMUZ/2021

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

Hakan Karakaş tarafından hazırlanan **FARKLI BESİN ORTAMLARINDA KÜLTÜRE ALINAN *Lilium candidum* L.'NİN MİKROÇOĞALTIMI ve KRİYOPREZERVASYONU İÇİN BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERİN OLUŞTURULMASI** başlıklı tezin 12/07/2021 tarihinde aşağıda belirtilen jüriler tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JÜRİSİ

Dr. Öğretim Üyesi Filiz ALTAN (**Danışman**)
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza

Doç. Dr. Ergun KAYA
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza

Doç. Dr. Hasan YILDIRIM
Biyoloji Anabilim Dalı
Ege Üniversitesi, İzmir

İmza

ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Ramazan GÜP
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza

Tez çalışmaları kapsamında elde edilen ve sunulan veriler, sonuçlar, dokümanlar, bilgi ve belgeler bu tez çalışmasında benim tarafımdan elde edildiği; bilimsel ve akademik etik kurulları baz alınarak yapıldığını beyan ederim. Ayrıca tez çalışmaları dışında diğ er araştırmacılar tarafından elde edilmiş tüm sonuçların, belgelerin ve bilgilere atıf yapıldığını beyan ederim.

Hakan KARAKAŞ



ÖZET

FARKLI BESİN ORTAMLARINDA KÜLTÜRE ALINAN *Lilium candidum* L.'NİN MİKROÇOĞALTIMI ve KRİYOPREZERVASYONU İÇİN BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERİN OLUŞTURULMASI

Hakan KARAKAŞ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Filiz ALTAN

Temmuz 2021, 100 sayfa

Lilium candidum çok yıllık bir süs bitkisidir. İçeriğinde yer alan etmen bileşenler sayesinde birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilmektedir. Ancak biyotik ve abiyotik faktörlerden dolayı nesli tükenme tehlikesi altındadır. Bu durumdan dolayı mevcut tez çalışmasında bitkinin gelecek nesillere aktarılması için farklı biyoteknolojik yöntemler kullanılarak, bu türün koruma altına alınması hedeflenmektedir. Bu yöntemlerden birisi kriyoprezervasyondur. Kriyoprezervasyon bitkinin kallus, meristem, polen, tohum gibi çeşitli kısımları kullanılarak düşük sıcaklıkta uzun süre koruma sağlayabilen bir tekniktir. Bu teknik sayesinde nadir ve yok olma tehlikesi altında olan birçok bitki türü küçük alanlarda koruma altına alınabilmektedir. Bu çalışmada amaç *Lilium candidum* bitkisi için en uygun kriyoprezervasyon protokolünü oluşturarak bitkinin gelecek nesillere aktarılmasının sağlanması hedeflenmektedir. Çalışmada ilk olarak bitkiye ait gövde bulbilllerinden bitki doku kültürü tekniğiyle kallus ve meristemler elde edilmiştir. Daha sonra farklı PVS-2 uygulama süreleri (kallus için 60, 75, 90, 105 ve 120 dakika, meristem için 30, 45, 60 ve 90 dakika) uygulanarak en iyi kriyokorucu uygulama süresi belirlenmeye çalışılmıştır. Farklı besin ortamları (MS, OM, WPM, LB, NB) farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ile (BA, NAA, GA₃, Kinetin) kullanılarak en uygun ortam belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak kallus kriyoprezervasyonu için en uygun PVS-2 uygulama süresi 90 dakika ve en uygun besin ortamı OM olarak belirlenmiştir. Meristemlerde ise 90 dakika PVS-2 uygulamasının ve kömür tozu ilaveli MS besin ortamının iyi olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Lilium candidum*, Kriyoprezervasyon, Meristem, Kallus, PVS-2

ABSTRACT

ESTABLISHMENT OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR MICROPROPAGATION and CRYOPRESERVATION OF *Lilium candidum* L. CULTURED IN DIFFERENT NUTRIENT MEDIA

Hakan KARAKAŞ

Master of Science (M. Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Filiz ALTAN

July 2021, 100 pages

Lilium candidum is a perennial ornamental plant. Thanks to the active components in its content, it can be used in the treatment of many diseases. However, it is in danger of extinction due to biotic and abiotic factors. Due to this situation, in the current thesis, it is aimed to protect this species by using different biotechnological methods in order to transfer the plant to future generations. One of these methods is cryopreservation. Cryopreservation is a technique that can provide long-term protection at low temperatures by using various parts of the plant such as callus, meristem, pollen, and seed. Thanks to this technique, many rare and endangered plant species can be protected in small areas. In this study, it is aimed to create the most suitable cryopreservation protocol for *Lilium candidum* plant and to ensure the transfer of the plant to future generations. In the study, firstly, callus and meristems were obtained from the stem bulbils of the plant by plant tissue culture technique. Then, the best cryoprotectant application time was tried to be determined by applying different PVS-2 application times (60, 75, 90, 105 and 120 minutes for callus, 30, 45, 60 and 90 minutes for meristem). Different nutrient media (MS, OM, WPM, LB, NB) were used with different concentrations of plant growth regulators (BA, NAA, GA3, Kinetin) to determine the most suitable medium. As a result, the most suitable PVS-2 application time for callus cryopreservation was determined as 90 minutes and the most suitable nutrient medium was OM. In the meristems, 90 minutes of PVS-2 application and charcoal powder added MS nutrient medium were found to be good.

Keywords: *Lilium candidum*, cryopreservation, meristem, callus, PVS-2

canim aileme,



ÖNSÖZ

Bu çalışma, 217O009 nolu 3501- TÜBİTAK proje konusunun bir kısmını içermektedir. TÜBİTAK'a katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans süresi boyunca deneyimleri, bilgisi ve desteğiyle çalışmalarımın arkasında olan danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Filiz Altan'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarda tecrübesiyle beni yönlendiren Doç. Dr. Ergun Kaya hocama teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalar boyunca, manevi açıdan beni destekleyen ve deneylerime kendi çalışması gibi yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Hasret Kaya, Ayla Eren ve Hilal Büşra Tokgöz'e, tez yazımında bana yardımda bulunan Onur Çelik'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca benim arkamda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen canım aileme sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	1
1.2. Kaynak Özetleri.....	3
1.2.1. <i>Lilium candidum</i> L.	3
1.2.1.1. <i>Lilium candidum</i> L. bitkisinin taksonomik açısından sınıflandırılması.	5
1.2.1.2. <i>Lilium candidum</i> bitkisinin tıbbi açıdan önemi.....	5
1.2.2. Bitki doku kültürü	6
1.2.2.2. Bitki doku kültürünün avantajları	8
1.2.1.3. Bitki doku kültürünün dezavantajları.....	9
1.2.3. Kriyoprezervasyon	10
1.2.3.1. Soğanlı bitkiler ile yapılan kriyoprezervasyon çalışmaları	13
2. MATERYAL VE METOT	16
2.1. Materyal	16
2.1.1. Bitki materyali.....	16
2.1.2. Besin ortamı	16
2.2. Metot	17
2.2.1. Besin ortamlarının hazırlanması	17
2.2.2. Bitki materyalinin sterilizasyonu	18
2.2.3. Malzemelerin sterilizasyonu	19
2.2.4. Bitki materyalinin kültüre alınması.....	19
2.2.5. Kriyoprezervasyon çalışması	20
2.2.5.1. Kalluslardan kriyoprezervasyon çalışması	21
2.2.5.2. Meristemlerde kriyoprezervasyon çalışması.....	23

2.2.6. İstatistiki analiz	26
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
3.1. Bulgular	28
3.1.1. Bitki doku kültürü tekniği ile çoğaltılan bitkilerin analizi	28
3.1.2. Kriyoprezervasyon çalışmalarının analizi	34
3.1.2.1. <i>Kallusların morfolojik ve istatistiki analizi</i>	34
3.1.2.2. <i>Meristemlerin morfolojik ve istatistiki analizi</i>	84
3.2. Tartışma	88
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	94
KAYNAKÇA	95
ÖZGEÇMİŞ	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Lilium candidum</i> L. süs bitkisinin doğal yaşam alanından bir görüntüsü (Web-1)	4
Şekil 2.1. Toplanan gövde bulbilleri	16
Şekil 2.2. Gövde bulbillerinin çeşme suyu altında yıkanması	18
Şekil 2.3. Sterilizasyon basamakları (a: etil alkol ile muamele, b: ticari deterjan ile muamele, c: distile su ile durulanması).....	19
Şekil 2.4. Steril edilen gövde bulbillerinin besin ortamlarında kültüre alınması.....	20
Şekil 2.5. Bitkilerin alt kültüre alınması	20
Şekil 2.6. Kallusların ön kültüre alınması.....	21
Şekil 2.7. Kallusların dondurulması ve saklanması (a: ön kültüre alınan kalluslar kriyoviallere aktarılması, b: kriyoviallere PVS-2 eklenmesi, c: buz üzerinde bekletilmesi, d: azot tankında saklanması).....	22
Şekil 2.8. Kallusların çözündürülmesi ve kültüre alınması (a: su banyosunda sıvı hale dönüştürülmesi, b: PVS-2'nin enjektörle çıkarılması, c: Kallusların 1 M sükroz+ MS sıvı besin ortamına aktarılması, d: kallusların kurutma kağıdına aktarılması, e: kallusların besin ortamına kültüre alınması)	23
Şekil 2.9. Stereo mikroskopta meristem görüntüsü	24
Şekil 2.10. Meristemlere PVS-2 uygulanması (a: meristemlerin alüminyum folyo şeritlerine aktarılması, b: PVS-2 eklenmesi, c: buz üzerinde PVS-2 uygulaması yapılması).....	24
Şekil 2.11. Meristemlerin sıvı azot içerisine aktarılması	25
Şekil 2.12. Meristemlerin çözündürülmesi ve besin ortamlarında kültüre alınması (a: kriyoboxın azot içerisinde laminar hava kabinene aktarılması, b: meristemlerin kriyoviallerden çıkarılması, c: meristemlerin 1 M sükroz+ MS sıvı besin ortamına aktarılması, d: meristemlerin besin ortamında kültüre alınması).....	26

Şekil 3.1. Kepsut bölgesinden toplanan gövde bulbilleri ile mikroçoğaltımın yapılması	30
Şekil 3.2. Fethiye bölgesinden toplanan gövde bulbilleri ile mikro çoğaltımın yapılması	32
Şekil 3.3. Aydın bölgesinden toplanan gövde bulbilleri ile mikro çoğaltım yapılması	33
Şekil 3.4. 1 mg/L BA+ MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubu (a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması).....	35
Şekil 3.5. 1 mg/L BA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubu (a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması).....	35
Şekil 3.6. 1 mg/L BA+ WPM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubu (a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması).....	36
Şekil 3.7. 1 mg/L BA+ MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 1, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması).....	37
Şekil 3.8. 1 mg/L BA+ MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 2, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması).....	37
Şekil 3.9. 1 mg/L BA+ MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 3, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması).....	38
Şekil 3.10. 1 mg/L BA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 1, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması).....	39
Şekil 3.11. 1 mg/L BA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 2, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması).....	39

Şekil 3.12. 1 mg/L BA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 3, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması).....	40
Şekil 3.13. 1 mg/L BA+ WPM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 1, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması).....	41
Şekil 3.14. 1 mg/L BA+ WPM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 2, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması).....	41
Şekil 3.15. 1 mg/L BA+ WPM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 3, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması).....	42
Şekil 3.16. Kontrol grubu için kültüre alınan kallusların gelişim indeks değerleri ...	45
Şekil 3.17. Ön denemeler sonucunda kontrol grubu için kültüre alınan kallusların rejenerasyon oranı	46
Şekil 3.18. Kriyoprezerve edilmiş kallusların gelişim indeksi değerlerinin eğimi	46
Şekil 3.19. Kriyoprezerve edilmiş kallusların rejenerasyon eğimi	47
Şekil 3.20. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ MS besin ortamına kültüre alınan PVS-C grubu (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması)	47
Şekil 3.21. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ MS besin ortamına kültüre alınan PVS-C grubu (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması)	48
Şekil 3.22. Kriyoprezerve edilmiş kallusların 10 mg/L GA+MS besin ortamında kültüre alınması (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması)	48
Şekil 3.23. Kriyoprezerve edilmiş kallusların 10 mg/L GA+OM besin ortamında kültüre alınması (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması)	49

Şekil 3.24. Kriyoprezerve edilmiş kallusların 0,5 mg/L BA+0,2 mg/L NAA+MS besin ortamında kültüre alınması (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	49
Şekil 3.25. Kriyoprezerve edilmiş kallusların 0,5 mg/L BA+0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınması (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	50
Şekil 3.26. MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun stereo mikroskopta TZ test sonucu (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması).....	50
Şekil 3.27. OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun stereo mikroskopta TZ test sonucu (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması).....	51
Şekil 3.28. MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun ışık mikroskobundaki TZ test sonucu (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması).....	51
Şekil 3.29. OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun ışık mikroskobundaki TZ test sonucu (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması).....	52
Şekil 3.30. MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların stereo mikroskopta TZ test sonucu (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	52
Şekil 3.31. OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların stereo mikroskopta TZ test sonucu (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	53
Şekil 3.32. MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların ışık mikroskobundaki TZ test sonucu (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	53
Şekil 3.33. MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların ışık mikroskobundaki TZ test sonucu (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	54
Şekil 3.34. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun bir aylık gelişimi (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması)	54

Şekil 3.35. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun bir aylık gelişimi (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması)	55
Şekil 3.36. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların bir aylık gelişimi (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması; d: kontamine).....	55
Şekil 3.37. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların bir aylık gelişimi (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması)....	56
Şekil 3.38. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin stereo mikroskoptaki görüntüsü (a: 60, b:75 ve c: 90 dakika PVS-2 uygulaması)	56
Şekil 3.39. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin stereo mikroskoptaki görüntüsü (a: 60, b:75 ve c: 90 dakika PVS-2 uygulaması)	57
Şekil 3.40. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (a: 60, b:75 ve c: 90 dakika PVS-2 uygulaması)	57
Şekil 3.41. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (a: 60, b:75 ve c: 90 dakika PVS-2 uygulaması)	58
Şekil 3.42. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin stereo mikroskopta görüntüsü (a: 75 ve b:90 PVS-2 uygulaması)	58
Şekil 3.43. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin stereo mikroskopta görüntüsü (a: 60 ve b:75 PVS-2 uygulaması)	58
Şekil 3.44. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (a: 75 ve b:90 PVS-2 uygulaması).....	59

Şekil 3.45. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin ışık mikroskopundaki görüntüsü (a: 60 ve b:75 PVS-2 uygulaması).....	59
Şekil 3.46. PVS-C grubunun kallus gelişim indeksinin PVS-2 uygulama süresi ve besin ortamına göre büyüme eğrisi	61
Şekil 3.47. PVS-C grubunun rejenerasyon oranının PVS-2 uygulama süresi ve besin ortamına göre büyüme eğrisi.....	62
Şekil 3.48. Kriyoprezerve edilmiş kallusların kallus gelişim indeksi eğrisi.....	62
Şekil 3.49. Kriyoprezerve edilmiş kallusların rejenerasyon oranı	63
Şekil 3.50. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ 0,3 mg/L GA ₃ + MS besin ortamında kültüre alınan kallusların aylık gelişimi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 ve d: Deneme-3).....	64
Şekil 3.51. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ 0,3 mg/L GA ₃ + MS besin ortamında kültüre alınan kallusların aylık gelişimi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 ve d: Deneme-3).....	64
Şekil 3.52. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ 0,3 mg/L GA ₃ + MS, OM besin ortamları ile yapılan kriyoprezervasyon çalışmasında kallus gelişim indeks değerlerinin istatistiki açıdan değerlendirilmesi.....	66
Şekil 3.53. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ 0,3 mg/L GA ₃ + MS, OM besin ortamları ile yapılan kriyoprezervasyon çalışmasında rejenerasyon oranının istatistiki açıdan değerlendirilmesi.....	66
Şekil 3.54. Aydınlıkta 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 d: Deneme-3).....	67
Şekil 3.55. Karanlıkta 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi (Deneme-1).....	68
Şekil 3.56. Aydınlıkta 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ LB besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 d: Deneme-3).....	68

Şekil 3.57. Karanlıkta 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ LB besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 d: Deneme-3)	69
Şekil 3.58. Aydınlıkta 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ NB besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 d: Deneme-3)	69
Şekil 3.59. Karanlıkta 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ NB besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 d: Deneme-3)	70
Şekil 3.60. Aydınlıkta kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: OM, b: LB, c: NB besin ortamlarından gelen kalluslar)	70
Şekil 3.61. Aydınlıkta kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin ışık mikroskobu altındaki analizi (a: OM, b: LB, c: NB besin ortamlarından gelen kalluslar)	71
Şekil 3.62. Aydınlıkta kültüre alınan kiyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: OM, b: LB, c: NB besin ortamlarından gelen kalluslar)	71
Şekil 3.63. Aydınlıkta kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin ışık mikroskobu altındaki analizi (a: OM, b: LB, c: NB besin ortamlarından gelen kalluslar)	71
Şekil 3.64. Karanlıkta kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: OM, b: LB, c: NB besin ortamlarından gelen kalluslar)	72
Şekil 3.65. Karanlıkta kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin ışık mikroskobu altındaki analizi (a: OM, b: LB, c: NB besin ortamlarından gelen kalluslar)	72
Şekil 3.66. OM, LB ve NB besin ortamları kullanılarak yapılan çalışma sonucunda, kallusların gelişim indeks değerleri	75
Şekil 3.67. OM, LB ve NB besin ortamları kullanılarak yapılan çalışma sonucunda, kallusların rejenerasyon oranları	75

Şekil 3.68. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C'nin aylık gelişimi (a:60 ve b:90 PVS-2 uygulaması)	76
Şekil 3.69. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık gelişimi (a, b, c:60 dakika; d, e, f:90 dakika PVS-2 uygulaması; a, d: Deneme-1, b, e: Deneme-2 c, f: Deneme-3)	76
Şekil 3.70. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C'nin aylık gelişimi (a:60 ve b:90 PVS-2 uygulaması).....	77
Şekil 3.71. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık gelişimi (a, b, c: 60 dakika; d, e, f: 90 dakika PVS-2 uygulaması; a, d: Deneme-1, b, e: Deneme-2 c, f: Deneme-3)	77
Şekil 3.72. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan PVS-C'lerin TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması)	78
Şekil 3.73. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan PVS-C'lerin TZ testinin ışık mikroskobundaki analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	78
Şekil 3.74. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan kriyoprezerve edilmiş kallusların, TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	79
Şekil 3.75. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan kriyoprezerve edilmiş kallusların, TZ testinin ışık mikroskobundaki analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	79
Şekil 3.76. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan PVS-C'lerin TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması)	80
Şekil 3.77. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan PVS-C'lerin TZ testinin ışık mikroskobundaki analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	80

Şekil 3.78. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan kriyoprezerve edilmiş kallusların, TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	81
Şekil 3.79. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan kriyoprezerve edilmiş kallusların, TZ testinin ışık mikroskobu altında yapılan analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	81
Şekil 3.80. Kallus gelişim indeks değerinin uygulamaya bağlı olarak değerlendirilmesi	83
Şekil 3.81. Rejenerasyon oranının uygulamaya bağlı olarak analiz edilmesi.....	83
Şekil 3.82. PVS-C için kültüre alınan meristemlerin aylık gelişimi (a: 45, b: 60 dakika PVS-2 uygulaması)	85
Şekil 3.83. Kriyoprezerve edilmiş meristemlerin aylık gelişimi (60 dakika PVS-2 uygulaması).....	85
Şekil 3.84. PVS-C'lerin aylık gelişimi (a: 45, b: 60 ve c: 90 dakika PVS-2 uygulaması)	86
Şekil 3.85. Kriyoprezerve edilmiş meristemlerin aylık gelişimi (a, b, c: 45, d, e, f: 60 ve g, h, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması).....	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Besin Ortamında Kullanılan Bileşenlerin Miktarları	17
Çizelge 2.2. Kallusların çap boyutuna bağlı değerlendirme derecesi ve canlılık yüzdesi	27
Çizelge 3.1. Gövde bulbillerinin toplandığı bölgelere bağlı kültür alınan besin ortamlarının yayılımı.....	28
Çizelge 3.2. Kepsut bölgesinden toplanan gövde bulbillerinin besin ortamına göre alt kültüre alınması.....	29
Çizelge 3.3. Fethiye bölgesinden toplanan gövde bulbillerinin besin ortamına göre alt kültüre alınması.....	31
Çizelge 3.4. Aydın bölgesinden toplanan gövde bulbillerinin alt kültüre alındığı besin ortamı dağılımı.....	33
Çizelge 3.5. Bir ay sonunda kallusların çaplarına göre elde edilen veriler.....	43
Çizelge 3.6. Ön deneme sonucunda elde edilen istatistiki veriler.....	44
Çizelge 3.7. Bir ay sonunda kallusların çapına bağlı elde edilen veriler	60
Çizelge 3.8. 0,5 mg/L BA+0,2 mg/L NAA+ MS ve OM besin ortamları kullanılarak yapılan çalışmanın istatistiki analizi sonucu elde edilen veriler	61
Çizelge 3.9. Kallusların aylık gelişimine bağlı elde edilen kallus gelişim indeks değerleri.....	65
Çizelge 3.10. İstatistiki analiz sonucunda elde edilen veriler	65
Çizelge 3.11. Yapılan çalışma sonucunda kallusların gelişim indeks değerleri	73
Çizelge 3.12. Çalışma sonucunda kallus gelişim indeks değerlerinin ve rejenerasyon oranının istatistiki analizi	74
Çizelge 3.13. Yapılan çalışma sonucunda kallusların çapına bağlı aylık gelişim indeks değerleri.....	82
Çizelge 3.14. Kallus gelişim indeks değerleri ve rejenerasyon oranları	82

Çizelge 3.15. Meristemlerle yapılan kriyoprezervasyon çalışmasının istatistiki analiz sonucunda elde edilen veriler.....	87
--	----



SEMBOLLER VE KISALTMALAR

BA	Benzil Adenin
NAA	Naftelin Asetik Asit
GA ₃	Giberilik Asit
PVS-2	Plant Vitrification Solution 2- Bitki Vitrifikasyon Solüsyonu
LB	Broth (Miller)
NB	Nutrient Broth
MS	Murashige & Skoogh Medium
OM	Olive Medium
WPM	Woody Plant Medium
TZ	Tetrazolium
DMSO	Dimetil Sülfoksit

1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Lilium candidum L. tıbbi açıdan önem arz eden çok yıllık soğansu bir süs bitkisidir. İçeriğinde yer alan etken maddeler sayesinde ülser, çıban, yanık, iltihaplanma gibi durumlarda bitkiden hazırlanan drog ile tedavi amaçlı olarak kullanılabilir. Bitkinin tedavi edici özelliğinin yanında gençleştirici etki göstermesi itibarıyla kozmetik endüstrisi içinde kullanılabilir (Daneshvarroyandazagh vd. 2014).

Son zamanlarda olumsuz yönde değişen iklim koşulları, hastalıklar, enfeksiyonlar, karbon kirliliği gibi biyotik ve abiyotik faktörlerden dolayı bitkinin doğal alanları tahrip olmuştur (Tokgöz ve Altan 2020). Bunun yanında insanların bilinçsiz bir şekilde bitkiye ait üreme kısımlarına zarar vermesi, hayvanların besin ihtiyacı olarak karşılaması gibi birçok sebepten ötürü bitkinin nesli tükenme tehlikesi altına girmektedir. Dolayısıyla bitki biyoteknolojisi alanı başta olmak üzere birçok araştırma alanlarında çoğaltımı ve korunmasına yönelik olarak mikroçoğaltma prosedürü oluşturulması gerekmektedir (Tokgöz ve Altan 2020).

Bitki doku kültürü ve kriyoprezervasyon biyoteknolojik alanda en çok kullanılan tekniklerdir. Bitki doku kültürü bitkiye ait hücrelerin, dokusunun ya da organ kullanımına bağlı *in vitro* koşullar altında bitki büyüme düzenleyicileri etkisiyle manipülasyon edilerek yeni bitki oluşturulmasını sağlayan biyoteknolojik bir alandır (Oseni vd. 2018). Bu sayede bir bitkiden mikroçoğaltım gerçekleştirilerek çok sayıda aynı genetik özelliğe sahip bitki elde edilebilmesine imkân tanınmaktadır (Dagla 2012).

Bitki doku kültüründe ortam koşulları (sıcaklık, pH, nem vb.) çalışmanın amacına yönelik olarak kontrol edilebilir. pH bitkilerin büyüme ve gelişmesinde önemli faktörlerden biri olup 5,4 ile 5,8 değer aralığında olması bitkinin çoğalması için uygun aralığı ifade eder. Besin ortamında kullanılan büyüme düzenleyicileri, azot kaynağı vb. bileşenler bitki hücrelerinin ve dokularının gelişmesinde önemli derecede rol oynamaktadır. Oksinler ve sitokininler bitki doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak

kullanılan bitki büyüme düzenleyicileridir. Her iki hormon gurubu da hücre proliferasyonunda, indüksiyonunda ve kallus oluşumunda görev almaktadır (Oseni vd. 2018). 2007 yılında şeker otu bitkisiyle yapılan bir çalışmada oksin ve sitokin hormonları dengeli bir şekilde kullanılmış ve sonucunda bitki hücrelerinin çoğaldığı tespit edilmiştir (Rafiq vd. 2007).

Kriyoprezervasyon tekniği ise bitkinin kallus, meristem, gibi kısımları kullanarak yapılan muhafaza işlemine denir. Bu tekniğin temel mantığı bitki hücrelerinin içeriğinde bulunan sıvının kullanılan kriyo-koruyucular (Plant vitrification Solution-2 PVS-2) ile yer değiştirmesini sağlayarak ultra soğuk (-196 derecede) ortamda bitkinin dış etmenlerden korunmasını sağlamaktır. Böylece bitkiye ait önemli kısımlar çok yer kaplamaksızın uzun süreler boyunca korunabilmekte ve gelecek nesiller boyunca devamlılığı sağlanabilmektedir (Yılmaz-Gökdoğan ve Kaya 2017).

Kriyoprezervasyon çalışmalarında önceleri -35 ile -40 derece sıcaklıklarda hücre, içi homojen olacak şekilde buz hale getirilip sonrasında azot tankına alınırken, bu sistemde yaşanan problemler doğrultusunda yeni kriyoprezervasyon teknikleri araştırılmıştır (Yılmaz-Gökdoğan ve Kaya 2017). Son yıllarda yapılan çalışmalarda tek aşamalı dondurma tekniği yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu teknikte mantık sıcaklığın ani düşüşüne bağlı olarak vitrifikasyon temeline dayanmaktadır. Vitrifikasyon hücre içi sıvının buz kristali oluşturmada amorf bir şekilde dondurulmasıdır (Li vd. 2019).

Son yıllarda yapılan derlemelere ve araştırmalara bakıldığında farklı kriyoprezervasyon teknikleri geliştirilmiştir. Bu teknikler geleneksel kriyoprezervasyon ve geliştirilmiş kriyokoruma başlıkları altında ikiye ayrılmaktadır. Geliştirilmiş kriyokoruma teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar sırayla desikasyon, dehidratasyon, enkapsülasyon-dehidratasyon, vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon ve damlacık dondurma teknikleridir (Yılmaz-Gökdoğan ve Kaya 2017).

Bu çalışmada *Lilium candidum* L. bitkisine ait gövde bulbilleri kullanılarak en uygun kriyoprezervasyon protokolü oluşturulması hedeflenmiştir. Balıkesir'in Kepsut, Aydın'ın Bafa gölü ve Muğla'nın Fethiye ilçelerinden toplanan gövde bulbilleri ilk

aşamada bitki doku kültürü tekniği ile çoğaltılmıştır. Bu amaç doğrultusunda toplanan gövde bulbilleri önceden yapılan araştırmalar ve çalışmalar dikkate alınarak sterilizasyon basamakları uygulanmıştır (Tokgöz ve Altan 2020). farklı besin ortamlarında kültüre alınarak aseptik koşullarda çoğaltılmıştır. Elde edilen kallus ve meristemler ile kriyoprezervasyon çalışmasına gidilmiştir.

Kriyoprezervasyon çalışma protokolü önceden yapılan çalışmalar ve derlemeler dikkate alınarak yapılmıştır. Bu çalışma üç aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak bitki doku kültürü tekniği ile çoğaltılan kalluslar ve meristemler 24 saat ön kültüre alınmış ve bu sayede bitki hücrelerinin içeriğindeki sıvı dışarı atılmıştır. İkinci aşamada azot tankına aktarım gerçekleştirilmiştir. Kriyoprezervasyon çalışması için uygun protokolü belirlemek maksadıyla ideal kriyo-korucu süresi bu aşamada belirlenmiştir. Farklı sürelerde kallus ve meristemler kriyo-koruculara maruz bırakılmış ve azot tanklarına aktarılmıştır. Üçüncü ve son aşama çözme aşamasıdır. Burada kallus ve meristemler azot tanklarından çıkarılmış ve önceden yapılan çalışma protokolleri dikkate alınarak çözme işlemi uygulanmıştır. Kallus ve meristemlerin çözme sonrası ideal besin ortamını belirleyebilmek için farklı ortamlar uygulanmıştır.

Kriyoprezervasyon çalışmasını değerlendirilmesi kallus ve meristemlerin gelişim yüzdeleri dikkate alınarak yapılmıştır. Sonucunda ideal kriyoprezervasyon protokolü oluşturulmuştur.

1.2. Kaynak Özetleri

1.2.1. *Lilium candidum* L.

Bitkiler modern tıp ve geleneksel tedavi yöntemlerinde tercih edilen önemli canlı grubudur. Hastalıkların iyileştirmede önemli rol oynayan fitokimyasallara sahip olan bitkiler farmasötik, kozmetik gibi birçok endüstri alanında tercih edilmektedir. Sentetik ilaçların maliyetlerinin yüksek olmasına kıyasla alınabilmesi kolay olan bitkilerin aynı zamanda çevre dostu olması itibarıyla ilgi görmektedir. Bu nedenle tıbbi bitkiler üzerinde araştırmalar yoğun bir şekilde gerçekleştirilmektedir (Chandran vd. 2020).

Dünya üzerinde yaklaşık 100 türü bulunan *Lilium* çok yıllık soğan bitkisidir. *Lilium* türleri Kuzey Amerika, Kafkasya, Avrupa ve Çin’de doğal yayılım gösterir. Dünya çapında önemli bir bahçe ve saksı bitkisi olan *Lilium* büyük ve uzun raf ömrüne sahiptir. *Lilium* türlerinin bazıları soğan olarak kullanılması itibariyle sebze olarak tüketilebilmektedir. Besleyici özelliği olmasından dolayı içeriğinde protein, aminoasit ve lif içermektedir (Li vd. 2019).

Lilium candidum akzambak olarak da bilinen zambakgiller familyasına mensup çok yıllık otsu bitki türüdür. Soğanlı bir tür olan bitkinin dünya üzerindeki yerleşim alanları sırasıyla Türkiye, Lübnan, Filistin ve Balkanlardır. Türkiye’de Aydın, Muğla ve İzmir çevresinde yayılım gösteren bitkinin çiçek açma dönemi Mayıs-Haziran aylarındadır (Daneshvarroyandazagh vd. 2014). *Lilium candidum* yaklaşık bir metreye kadar uzayabilen, çiçekleri 8 ile 12 cm aralığında olan beyaz ya da krem renkli bir süs bitkisidir. Genelde 3 ile 6 çiçeğin bir araya gelerek salkım şeklini alan hoş kokulu ve gösterişli bitki türüdür (Bkz. Şekil 1.1).

Lilium candidum bitkisinin yaşam alanları genellikle çalılık, taşlık ve kurak alanlar olarak belirlenmiştir. Literatür araştırılması sonucunda *Lilium candidum* bitkisinin ekonomik açıdan oldukça değerli bir bitki olduğu, aromatik ve tıbbi açıdan değerlendirildiği tespit edilmiştir (Bakhshaie vd. 2016).



Şekil 1.1. *Lilium candidum* L. süs bitkisinin doğal yaşam alanından bir görüntüsü (Web-1)

1.2.1.1. *Lilium candidum* L. bitkisinin taksonomik açıdan sınıflandırılması

Alem: Bitkiler

Alt Alem: Yeşil Bitkiler

Sınıf: Tek Çenekliler

Takım: *Liliales*

Aile: *Liliaceae*

Cins: *Lilium*

Tür: *Lilium candidum* L. (Ak Zambak)

1.2.1.2. *Lilium candidum* bitkisinin tıbbi açıdan önemi

Lilium candidum L. içeriğinde tıbbi açıdan önemli etken bileşenlere sahip bir süs bitkisidir. Saponin başta olmak üzere glikozit, flavonoid, alkaloid vb. bileşenlere sahip olan *Lilium candidum* bitkisi geçmişten günümüze birçok hastalığın tedavisinde tercih edilebilmektedir. Bu hastalıklara örnek olarak ülser, mide iltihabı, yanık, şişlik, kızarma, çiban verilebilir. Bu gibi durumlarda bitkiden hazırlanan drog ile tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır (Royandazagh ve Pehlivan 2016). Bununla birlikte bitkinin içeriğinde bulunan bu bileşenlerin antitumör aktivitesi antioksidan etkiler. Bu durumda flavonoidlerdeki kimyasal maddeler dolaylı olarak etkilenebilmektedir. Yani flavonoid bakımından zengin *Lilium candidum* net bir şekilde antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu durum ise bitkinin biyoprotektif potansiyelinin olduğunu ifade eder (Daneshvarroyandazagh vd. 2014).

Lilium candidum bitkisinin hasarlı dokular üzerinde oldukça etkili olduğu yapılan araştırmalar ve denemeler sonucunda belirlenmiştir. İçeriğinde bulunan steroidler sayesinde bitkiye ait ekstraktlar ile hasarlı dokuları onarabilmekte, yaşlı doku ve hücreler gençleştirilebilmektedir. Bu sayede bitki kozmetik endüstrisi alanında oldukça yaygın olarak tercih edilebilmektedir (Daneshvarroyandazagh vd. 2014).

1.2.2. Bitki doku kültürü

Doğanın kutsal bir armağanı olarak görülen bitkiler sağlıklı bir çevrenin oluşmasında doğada üreten olarak önemli bir rol oynamaktadır. İnsanlar için önemli bir besin kaynağı olan bitkiler aynı zamanda tıbbi anormalliklerin önlenmesinde yardımcı olarak dengeli bir besin zincirinin oluşmasını sağlar. Hayvan ve diğer mikroorganizmaların aksine hareketsiz yaşam sürdürmeleri büyümeleri için gerekli faktörlerin yaşadığı alanda olmasını gerektirmektedir. Bu şekilde bitkiler çoğalabilir ve devamlılığını koruyabilirler. Ancak yaşadığı ortamda bulunan mikroorganizma ya da böcekler bitkiye zarar vererek üretimi negatif yönde olmasını sağlar. Bu durumun önüne geçilmesi maksadıyla bitki doku kültürü teknikleri geliştirilmiştir (Patil vd. 2021).

Bitki doku kültürü aksenik, *in vitro* ya da steril kültür olarak da adlandırılan hücrelerin, dokuların ve bileşenlerinin aseptik kültürüne denir. Bitki doku kültürü ilk olarak 1902 yılında Alman bilim adamı Gottlieb Haberlandt tarafından tek hücreli deneyler üzerinde yaptığı çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır (Thorpe 2007). Bitki doku kültürü tekniği kontrollü ışık, sıcaklık ve nem koşullarında bitkinin hücre, organ ya da dokularının kültürlenmesidir (Dagla 2012). Bitki doku kültüründe ana amaç bitki klonlarını üretebilmektir (Patil vd. 2021). Oluşturulan bitki klonlarının gelişimi bitki büyüme düzenleyicileri ile manipüle edilerek istenilen özellikte ürünlerin elde edilmesi sağlanabilir (Phillips vd. 2019). Modern biyoteknolojide bitkinin gelişim süreci, gen işlevi, mikroçoğaltma ve herhangi bir özellikte transgenik bitki üretiminde rol oynar. Bu sayede çoğaltılan bitki ürünleri virüsten ve bakteriden arındırılır, germplazması korunur ve tehdit altındaki ya da nesli tükenme noktasında olan bitkiler korunur (Bednarek vd. 2020).

Bitki doku kültürü tekniğinin uygulanması bir takım aşamalardan oluşmaktadır. Bu aşamalar sırayla sterilizasyon, besin ortamı hazırlama ve ideal ortam koşullarının (sıcaklık, pH, nem, ışık vb.) oluşturulmasıdır (Bakhshaie vd. 2016). Sterilizasyon aşamasında amaç bitki materyali üzerinde bulunan her türlü mikroorganizmadan bitkiyi arındırmak için yapılır. Bu aşamada bitki bir takım alkol kaynaklı dezenfektanlar (etil alkol, sodyum hipoklorit kaynaklı deterjanlar, hidrojen peroksit vb.) vasıtasıyla bitki yüzeyi temizlenir (Patil vd. 2021).

Bitki doku kültüründe besin ortamı bitkinin normal yaşamsal faaliyetlerinin devam ettirebilmesi için makro ve mikro besinlerin bir arada bulunduğu besin içeriğidir (Oseni vd. 2018). MS (Murashige ve Skoogh) en yaygın olarak kullanılan besin ortamıdır. Bu ortamda dışında B5, WPM (Woody Plant Medium), OM (Olive Medium) besin ortamları da son yıllarda yapılan bitki biyoteknolojisi araştırmaların da tercih edilmiştir (Phillips vd. 2019). Besin ortamları bitkinin bazal besin ihtiyaçlarının karşılamasıyla birlikte büyüme düzenleyicileri bitkinin gelişim düzeyini arttırmaktadır. Oksinler, sitokininler, giberellinler, etilenler ve absisik asitler kullanılan büyüme düzenleyicileridir. Genel anlamda oksinler ve sitokininler bitki doku kültürü tekniğinde tercih edilen büyüme düzenleyici gruplarıdır (Phillips vd. 2019).

Oksinler bitkilerin köklenmesini ve sürgün çoğaltmasını sağlayan büyüme düzenleyicisidir. Genel olarak kullanılanlar NAA (naftelin asetik asit), IBA (indol-3-butirik asit) ve 2,4 D. NAA ve 2,4 D kimyasallara ve ışığa karşı kararlı yapı gösteren büyüme düzenleyicileridir. Ancak IBA ışığa karşı duyarlıdır, kolayca bozulabilirler. Oksinler kullanılarak kallus oluşumu sağlanabilir, somatik embriyogenez indüklenebilir, hücre proliferasyonu uyarmak için tercih edilebilir. Klorofenoksiasetik asit ve 2,4,5-triklorofenoksiasetik isimli oksinler herbisitlere karşı kullanılabilen büyüme düzenleyicileridir. Ancak diğer büyüme düzenleyicilerine kıyasla daha belirgin özellikleri olmaması itibariyle son zamanlarda kullanılmamaktadır (Phillips vd. 2019).

Sitokininler bitkilerin gelişme ve büyümesinde etkili büyüme düzenleyici gurubudur. En sık kullanılan sitokininler BA (benzil adenin) ve kinetinlerdir. Bu büyüme düzenleyicileri ile genelde odunsu bitkilerin gelişimi için kullanıldığı belirlenmiştir. Sitokininler ile oksinler genel anlamda benzer amaçlar için tercih edilmekle birlikte sitokininler herbisitlere karşı dirençli olması maksadıyla geliştirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmaların geneline bakıldığında oksinler ile sitokininler birlikte tercih edilmektedir (Phillips vd. 2019).

Absisik asit ve giberellinler diğer büyüme düzenleyicilerine kıyasla daha az tercih edilen bitki büyüme düzenleyicileridir. Yaygın olarak sürgün, tohum gelişiminde ve dormansinin (uyku hali) kırılmasında tercih edilmektedir. Unikonazol ve

paclobutrazol gibi anti-giberellinler giberellinlerin aktivitesini azaltırlar, gövde uzamasına engel olurlar. Ancak odunsu bitkilerin köklenmesini sağlayabilirler. Absisik asit ve türevleri somatik embriogenezin oluşmasında rol alırlar (Phillips vd. 2019).

Etilenler bitkilerin olgunlaşmasını sağlayan büyüme düzenleyicisidir. Etilen büyüme düzenleyicisi 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit ya da 2-kloroetilfosfonik asit varlığında artırılır. Ancak ortamda gümüş bileşiklerinin (gümüş nitrat ya da gümüş tiyosülfat) etilen sayısını azaltır (Phillips vd. 2019).

1.2.2.2. Bitki doku kültürünün avantajları

Bitki doku kültürü aseptik koşullarda bitkilerin mikroçoğaltımına dayanan bir biyoteknolojik tekniktir. Bitkiler doğal ortama kıyasla saf şekilde çoğaltımı sağlanır ve daha kısa sürede sonuç alınabilir (Dagla 2012). Bu teknik sayesinde doğal ilaç üretimi de gerçekleştirilebilir. Son yıllarda yapılan araştırmalara bakıldığında sentetik ilaçların maliyetinin yüksek olması ve sağlık açısından daha güvenilir olması gibi nedenlerden dolayı tüketicilerin doğal ürünlere yani tıbbi bitkilere yöneldiği tespit edilmiştir. Son 20 yılda elde edilen verilere bakıldığında tıbbi ilaç endüstrisinde büyük oranda gelişme gözlenmiştir (Chandran vd. 2020).

Bitkiler doğal ortamda bazı etmenlerden dolayı gelişim sürecini tamamlayamayabilir ya da uzun süre sonunda tamamlayabilir. Bu durumda da istenilen sayıda bitki üretimi gerçekleştirilemez. Ancak bitki doku kültürü tekniği ile bu sorun çözülebilir. Ana bitki kaynak alınarak çeşitli bitki doku kültürü tekniği ile aynı genetik özelliğe sahip sağlıklı yeni bitkiler elde edilebilir. Bu amaç doğrultusunda bitkiye özgü uygun ortam koşulları ile bitkilerin büyüdüğü ve çoğalabildiği mikro ortam oluşturulabilir. Sonuç olarak aynı genetiğe sahip klonlar meydana getirilerek endüstri alanlarında kullanılabilir (Patil vd. 2021).

Bitki doku kültürü teknikleri ticari açıdan önemli sekonder metabolit üretimini gerçekleştirilebilir ve bunun yanında aynı bitki ailesinden farklı sınıflarda sekonder metabolit dağılımı elde edilebilir ve bitkilerin sekonder metabolit verim hızı artırılarak ve önemli tıbbi kullanımlarda tercih haline getirilmesinde rol oynar (Chandran vd.

2020). Bu sayede bitki doku kültürü tekniği ile bitki çoğaltımının yanında hastalıklar giderilebilir, sekonder metabolit üretimine bağlı büyük bir endüstri oluşturulabilir ve kesintisiz bir şekilde binlerce bitki üretimi sağlanabilir (Oseni vd. 2018).

Bitki doku kültürü tekniğinin en önemli avantajı yıl içerisindeki mevsimsel değişimlere bakılmaksızın ve oluşturulan kontrollü mikro ortamlarda bitki üretiminin sürekli bir şekilde devam ettirilmesidir. Böylece doğal alanları tahrip olmuş, iklimsel değişime bağlı biyolojik saati etkilenen bitkiler daha küçük alanda korunarak büyüme ve gelişme gösterebilirler (Oseni vd. 2018). Büyüme düzenleyicileri kullanılarak istenilen yönde bitki manipüle edilebilir ve binlerce yeni özellikte bitki üretimi sağlanabilir (Phillips vd. 2019).

Bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak somaklonal ve gametoklonal varyant üretimi yapılarak istenilen özellikte bitki ürünü elde edilir. Bu sayede kaliteli, hastalıklara dirençli, stres koşullarına tolerans gösterebilen, adaptasyon yeteneği yüksek düzeyde olan bitkiler çoğaltılabilir. Bitkilere kesme, aşılama gibi geleneksel yöntemlerin dışında mikroçoğaltma tekniği uygulamak çeşitli avantajları sağlayabilmektedir (Oseni vd. 2018). *Corydalis yanhusuo* önemli bir tıbbi bitkidir. Bu bitkiden hastalıksız yumru elde etmek için yumrudan türetilen kalluslardan somatik embriyogenez yapılması yeterlidir (Sagare vd. 2000). Muz üzerinde yapılan bir bitki doku kültürü çalışmasında ise brom mozaik ve muz demeti üst virüsünde saf muz çoğaltımı hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda muza ait meristem uç kültürleri oluşturulmuş ve sonucunda patojensiz yüksek kalitede verim elde edilmiştir (El-Shamy 2011).

1.2.1.3. Bitki doku kültürünün dezavantajları

Bitki doku kültürü ana bitki kaynak alınarak binlerce bitki üretimine imkân tanıyan bir tekniktir. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen bu teknikte uygulanan sterilizasyon, yaralama, bitki büyüme düzenleyicileri bitkinin strese girmesine sebep olur. Sonucunda bitki genetiksel açıdan kararsız olur. Bu duruma somoklonal varyasyon denir (Tosun ve Sağsöz 1995). Bitki doku kültürü tekniklerinde bitkinin genel olarak yapısı ne kadar çok bozulursa mutasyon riski yükselir. Bu risk meristem ya da doğrudan embriyogenez ve organogenez uygulanarak düşürülebilir. Kallus ara fazı

oluşturularak yapılan tekniklerde ise mutasyon riskinin yüksek olduğu yapılan derlemelerde ve çalışmalarda gösterilmiştir (Weckx vd. 2019).

Somoklonal varyasyon genotipin kararlılığına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Uygulanan stres koşullarına tüm genotipler aynı şekilde cevap vermez. Eğer genotipin kararlılığı az ise bu durum somoklonal varyasyona yatkınlığının olduğunu ifade eder (Bairu vd. 2011). Bitki doku kültüründe uygulanan streslerin amacı bitkinin rejenerasyon yeteneğinin artırılması içindir. Bu streslere ozmatik ve soğuk stres örnek olarak verilebilir. Ancak bu tip stresler pro-oksidanların ya da ROS (Reaktif Oksijen Türü) üretimini tetikler ve bitkinin genotip kararlılığını azaltır (Bednarek vd. 2020).

Bitki doku kültüründe büyüme düzenleyicileri bitkilerin çoğalmasında uyarıcı etkiye sahiptirler. Bu sayede kısa süre içerisinde çok sayıda bitki çoğaltılabilir (Phillips vd. 2019). Ancak bitki türlerine bağlı olarak bitki büyüme düzenleyicileri bitkinin genetik kararlılığını etkileyebilir. Oksinler ve sitokininler başta olmak üzere sentetik büyüme düzenleyiciler en önemli faktörlerdir. Büyüme düzenleyicileri doğrudan etki etmemekle birlikte hızlı çoğalmanın sonucunda dolaylı olarak etki ettiği düşünülmektedir (Weckx vd. 2019).

Bitki doku kültürü tekniğinde kullanılan besin ortamı belli bir süreden sonra besleyici özelliğini kaybeder. Bu durumda bitkinin canlılığının devam etmesi ve çoğalması amacıyla yeni ortama aktarılır. Bu olaya alt kültürlenme denir. Ancak alt kültür sayısının artması bitki genotipinin kararsız olmasını sebep olabilir. DNA metilasyonu şeklinde gerçekleşen genotip kararsızlığı zamana bağlı olarak birikir ve somoklonal varyasyonu tetikler. Alt kültürle alma sayısının çok olmasının yanında iki alt kültür arasındaki sürenin az olması da genetik kararlılığı etkileyen faktördür (Weckx vd. 2019). Yapılan bir çalışmada poliembriyoid alt kültürler arasında 2-4 hafta olması durumunda somoklonal varyasyon riskinin yüksek olduğu, 8 hafta olduğunda ise riskin düştüğü tespit edilmiştir (Eeuwens 1978).

1.2.3. Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon biyolojik materyalin ultra soğuk (-196⁰ sıcaklıkta) ortamda metabolizmasının bazal düzeye düşürülerek gerçekleştirilen muhafaza yöntemidir. Bu

sıcaklıkta hücrede enzimatik tüm reaksiyonlar ve hücresel bölünmeler durdurulur. Bu sayede bitki teorik olarak sonsuza kadar herhangi bir değişiklik yapılmaksızın hacim olarak küçük alanda çevresel etmenlerden korunur (Engelmann 2004). Kriyoprezervasyon temel tarımsal ürünlerin, tıbbi ve nesli tükenmekte olan bitkilerin genetik kaynakların korunması için güvenilir bir yöntemdir. Çeşitli türlerin dondurularak saklanmasıdaki en büyük engel evrensel kriyoprezervasyon protokolünün olmamasıdır. Yaygın olarak kullanılan damlacık dondurma tekniğinde her bir adım yeni tür için optimize edilmelidir. Optimizasyon ise yoğun, zaman alıcı ve başlangıç olarak daha fazla bitki materyali gerektiren bir basamaktır (Yang vd. 2019).

Kriyoprezervasyon bitkinin meristem, kallus, tohum gibi kısımlarında uygulanabilen, gen bankalarında bitki germplazmasının uzun süreli muhafazasını sağlayabilen biyoteknolojik tekniktir. Çoğu tahıl, yağlı tohumlar ve sebze gen bankalarında tohum olarak saklanmaktadır. Gen bankalarında yumru, süs bitkileri ve meyveler vejetatif olarak çoğalan bitkiler şeklinde muhafaza edilmektedir. Vejetatif olarak çoğalan tohumlar genotipleri temsil etmediklerinden dolayı sürgün ucu gibi kısımlar kullanılır. Sürgün uçlarının genetik kararlılıklarının yüksek olması hücre süspansiyonların ve genetik kaynakların muhafazasında yaygın tercih edilmektedir (Wang vd. 2020).

Kriyoprezervasyon bitki materyalinin genetik kararlılığını uzun süreli korumasından dolayı günümüzde favori teknik olarak kabul görmektedir (Wang vd. 2021). Ancak bu tekniğin düşük sıcaklıkta yapılması bazı bitkilerin, hücrelerinde bir takım anormalliklerin (dehidrasyon, hücre donması vb.) oluşmasına sebebiyet verebilmektedir. Bu durumun önlenmesi için kriyoprezervasyon çalışmasında ön işlem uygulanır. Ön işlemden hücre içi sıvının kristalleşme sebebiyle oluşabilecek hasar olmadan yapay olarak kurutulması sağlanır (Engelmann 2004). Klasik ve yeni dondurma adında iki farklı teknikte bu işlem yapılabilmektedir. Klasik tekniklerde dehidrasyon temelli dondurma stratejisi uygulanırken, yeni dondurma tekniklerinde vitrifikasyon temeline dayanmaktadır (Fahy vd. 1984).

Klasik kriyoprezervasyon tekniği yavaş soğutma veya sıvı azota daldırma şeklinde gerçekleştirilir. Yavaş soğutma basamağında hücreler ve dış ortamda sıcaklık düşerek dış ortamda buz oluşumu başlar. Hücre zarı buzun hücre içerisine girmesine engel olur

ve aynı zamanda buz hücrenin çoğalmasını engeller. Bu aşamada hücreler donmaz fakat soğuk halde bulunur. Sıcaklık düşürülmeye devam edildiğinde hücre dışı çözeltinin bir miktarı buza dönüşür. Hücreler aşırı soğuduğunda sulu buhar basıncı dış bölmenininkini aşarsa hücre su kaybıyla bu durumu dengeler. Hücre içi donmasının engellenmesi için hücre içi sıvı dışarı çıkartılır ve böylece zararlı hücre için donması azaltılır ya da önlenir. Bunun yanında donma kaynaklı dehidrasyon, hücre içi tuz konsantrasyonu ve hücre zarında ki değişiklikler zararlı olabilir (Engelmann 2004).

Klasik dondurma protokolü şu sırayla gerçekleşmektedir; bitki materyalinin çoğaltılması, ön dondurma (yavaş soğutma), bitki materyalinin sıvı azota daldırılması, saklama, hızlı çözündürme ve uygun besin ortamlarında kültüre alma (Engelmann 2004). Klasik teknikler kallus gibi farklılaşmış hücrelerde ve hücre süspansiyonlarında başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Kantha ve Engelmann 1994). Bu teknik farklılaşmış yapıların soğuğa toleranslı uç kısımların dondurulmasında tercih edilmektedir. Bununla birlikte klasik teknikleri genel anlamda karmaşık ve maliyeti yüksek olması nedeniyle az tercih edilmektedir (Engelmann 2004).

Vitrifikasyon temelli kriyoprezervasyon tekniğinde aşamalar şu şekilde gerçekleşmektedir; *in vitro* stok kültürü, ön kültür, sürgün uçlarının ya da kallusların vitrifikasyon solüsyonu ile (PVS-2 ya da PVS-3) muamelesi, sıvı azotta depolama ve çözülme sonrası uygun besin ortamlarında kültüre almadır (Wang vd. 2021). Bu teknikte kullanılan solüsyon vasıtasıyla dondurma işleminde bitki materyali donmanın zararlı etkilerden muhafaza edilir. Vitrifikasyon temelli dondurma tekniği klasik tekniğe göre avantajlar sağlayabilmektedir. Sürgün ucu, embriyo gibi karmaşık organların dondurulması bu teknikle ile gerçekleştirilebilir (Engelmann 2004).

Kriyoprezervasyon tekniklerinde vitrifikasyon temelli yaklaşım bitki germplazmasını dondurmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Li vd. 2019). Vitrifikasyon temelli teknikler sırayla şunlardır; dehidrasyon, enkapsülasyon-dehidrasyon, vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon, ön büyüme, büyüme öncesi dehidrasyon ve damlacık dondurmadır (Engelmann 2004). *Lilium* türüne ait bitkilerin dondurularak saklanması damlacık dondurma tekniği ile yapılmaktadır (Li vd. 2019).

1.2.3.1. Soğanlı bitkiler ile yapılan kriyoprezervasyon çalışmaları

Kriyoprezervasyon polen, tohum, sürgün ucu ya da kallus kısımları kullanılarak bitkinin genetik stabilitesini uzun süre muhafaza edilmesini sağlayan biyoteknolojik yöntemdir. Soğanlı bitkiler ile günümüze kadar birçok kriyoprezervasyon çalışması yapılmıştır (Li vd. 2019). Chen vd. *Lilium* bitkisinin üç farklı türüne ait sürgün uçlarını kullanarak kriyoprezervasyon çalışması yapmışlardır. *Lilium* türlerini 2 ay boyunca 16 saatlik fotoperiyotta 4 derecelik sıcaklıkta soğuk tedavisi uygulamışlardır. Bitkiye ait sürgün uçları bitkiden kesilerek alınmış, 0,3 M süktroz ilaveli MS besin ortamında 2 gün ön kültür işlemi uygulanmıştır. Böylece bitki hücrelerinin içeriğinde bulunan sıvı dışarı çıkartılmıştır. 22 derece sıcaklıkta 20-40 dakika aralığında sürede 2 M gliserol+ 0,4 M süktroz+ MS besin ortamında dondurma işlemi öncesi kültür işlemi uygulanmıştır. Sürgün uçları 5x30 mm uzunluğunda alüminyum folyo şeritlerine konmuş, üzerlerine yaklaşık 1,5 µL PVS-2 eklenmiştir. 90-120 dakikalarında PVS-2 muamele işleminin ardından alüminyum folyo şeritleri azota daldırılmış ve dondurma işlemi sonlandırılmıştır. Çözdürme işleminde azottan çıkarılan alüminyum folyo şeritler doğrudan 1,2 M süktroz ilaveli MS sıvı besin ortamına aktarılmıştır. 15 dakika bekletilmiş ardından 0,5 mg/L BA+ 0,1 mg/L NAA+ 0,3 mg/L GA₃+ 30 g/L süktroz+ 7 g/L agar+ MS besin ortamında kültüre alınmıştır. İlk aşamada kültürler 2 hafta karanlıkta 20 derece sıcaklıkta bekletilmiştir. Daha sonra 16 saatlik fotoperiyotta çoğalması sağlanmıştır. Sonucunda doğu melezi Sibiry türünde %65 ve %62 oranında, *Lilium lancifolium* türünde %84 ve %68 oranında ve *Lilium longiflorum* türünde %43 ve %35 oranında gelişim gözlenmiştir (Chen vd. 2011).

Liliaceae familyasına mensup *Tulipa tarda* bitkisinin meristemi kullanılarak bir kriyoprezervasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada vitrifikasyon temelli damlacık dondurma tekniği uygulanmıştır. İlk olarak bitki doku kültürü tekniği kullanılarak bitki çoğaltılmıştır. Bunun için 60 g/L ve 90/L sakkaroz destekli MS besin ortamları kullanılmıştır. Toplam 8 ay boyunca kültür işlemi uygulanmış, onuncu haftadan itibaren ise soğancık gelişimi gözlenmiştir. Kriyoprezervasyon çalışması için soğancıklardan meristem uç çıkarılmış, yarısı için 10 hafta boyunca soğuk tedavisi uygulanmış diğer yarısına tedavi uygulanmamıştır. Dondurma aşamasından önce 2 M gliserol+0,4 M süktroz+ MS besin ortamında 20 dakika ön kültür işlemi uygulanmış

daha sonra meristemler 20 mm x 5 mm uzunluklarında alüminyum folyolara konmuştur. PVS-2 ile farklı sürelerde (10, 20, 30, 45 ve 60 dakika) muamele edilmiştir. Ardından meristemler hızlı bir şekilde sıvı azota daldırılmış ve donma işlemi sonlandırılmıştır. Çözme aşamasında sıvı azottan çıkarılan meristemler hızla 1,2 M sakkaroz ilaveli MS ortamında 15 dakika bekletilmiştir. Ardından 60 g/L ve 90g/L sakkaroz ilaveli MS besin ortamına kültüre alınmıştır. Oda sıcaklığında 10 hafta boyunca kültür işlemi uygulanmıştır. Sonuç olarak bakıldığında canlı meristemlerin beyazımsı ye yarı saydam olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan PVS-2 süresinin soğuk tedaviyle arasında net bir ilişki kurulamamıştır. Bununla birlikte soğuk tedavisi uygulanan meristemlerin %100 rejenerasyon oranı gözlemlenmiştir. 20, 30 ve 60 dakika PVS-2 uygulama sürelerinin diğer sürelerle kıyasla daha iyi olduğu ve 60 g/L sakkaroz ilaveli MS besin ortamında gelişimin yüksek olduğu belirlenmiştir (Agnieszka ve Culture 2021).

Halk arasında nergis adıyla bilinen *Narcissus* L. bitkisiyle bir kriyoprezervasyon çalışması yapılmıştır. Geofit bir bitki olan *Narcissus*'a damlacık dondurma tekniği uygulanmıştır. Bu çalışmada ilk olarak 0,5 µM 6-benzilaminopurin+25 µM picloram+30 g/L süzkroz+ MS katı besin ortamında kültür işlemi uygulanmıştır. Kültürler 20 derecede 12 hafta boyunca karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Kültürlerden 1 mm, 2 mm ve 3 mm çaplarında embriyolar binoküler mikroskop altında çıkarılmıştır. Ardından embriyolar doku kültürü için kullanılan besin ortamında kültüre alınmıştır. Kriyoprezervasyon çalışmasının dondurma aşamasından önce embriyolar 20 dakika boyunca 2 M gliserol+0,4 M süzkroz+ MS ortamında ön kültüre alınmıştır. Embriyolar 2 cm x 0,5 cm uzunluklarda alüminyum folyo şeritlerine aktarılmış ve farklı sürelerde (10, 20, 30, 45 ve 60 dakika) PVS-2 ile muamele edilmiştir. Ardından hızlı bir şekilde sıvı azota aktarılarak dondurma işlemi bitirilmiştir. Çözme işleminde ilk olarak embriyolar 1,2 M süzkroz ilaveli MS besin ortamında 15 dakika bekletilmiş ardından 1 gün boyunca 0,3 M süzkroz+2,5 g/L agar+ MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Daha sonra 5 µM 6-benzilaminopurin+ 30 g/L süzkroz+ 0,5 NAA+ MS besin ortamında 20 hafta boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Sonuç olarak bakıldığında 1 mm çaplı embriyolarda maksimum gelişim yüzdesinin %76,7 olduğu ve bu çapta embriyoların dondurulmasının zararlı olduğu belirlenmiştir. 2 mm ve 3 mm çaplı embriyoların

rejenerasyon indeksine bakıldığında en düşük hayatta kalma oranı %73,3 ve %86,7 olduğu tespit edilmiştir. Bu oran 10 ve 20 dakika PVS-2 uygulamaları sonucunda alınmıştır. Diğer PVS-2 uygulamalarında hayatta kalma oranı %93 ile %100 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Maşlanka vd. 2016).

Halk arasında büyük kardelen çiçeği olarak bilinen geofit kökenli *Galanthus elwesii* bitkisine ait sürgün uçları kullanılarak damlacık vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmada ilk olarak bitkiye ait soğanlar 60 g/L sükroz+ 0,1 µM BA+ 0,1 µM IAA+ yarı güçlü MS katı besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültürler 20 derecede karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Kültürlerden elde edilen meristemler ile kriyoprezervasyon çalışmasına gidilmiştir. Meristemler 20 ve 30 dakika süreleri boyunca 2 M gliserol+0,4 M sükroz+ MS besin ortamında yükleme çözeltisine alınmıştır. Ardından 2 cm x 0,5 cm uzunluğunda alüminyum folyo şeritlerine meristemler aktarılmış, üzerlerine PVS-2 eklenmiştir. 10, 20 ve 30 dakika sürelerinde PVS-2 denemesi yapılmıştır. Meristemler son olarak hızlı bir şekilde sıvı azota daldırılmıştır. Çözme aşamasında meristemler 1,2 M sükroz destekli MS besin ortamına aktarılmış daha sonra 0,3 M sükroz+ 2,5 g/L jelrit+ MS filtre tabakada 1 gün inkübe edilmiştir. Meristemler 1 gün sonra 60 g/L sükroz+0,1 µM BA+0,1µM IAA+ MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Oda sıcaklığında 4 hafta karanlık ortamda bekletilmiş daha sonra 16 saat fotoperiyotta inkübe edilmiştir. Sonuç olarak bakıldığında 10 dakika PVS-2 uygulamasında %83,3 hayatta kalan meristem, %40 oranında gelişim gösteren meristem gözlemlenmiştir. 20 dakika PVS2 uygulamasında %96,7 hayatta kalan meristem, %65,5 oranında gelişim gösteren meristem elde edilmiştir. 30 dakika PVS-2 uygulamasında da %94,4 hayatta kalan meristem, %75,5 oranında gelişim gösteren meristem belirlenmiştir (Maşlanka vd. 2013).

Bu çalışmada *Lilium candidum* bitkisine ait kallus ve meristemler kullanılarak en uygun kriyoprezervasyon protokolü oluşturulması hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki materyali

Lilium candidum gövde bulbilleri Ege Üniversitesi öğretim üyeleri Doç. Dr. Hasan Yıldırım ve Dr. öğretim üyesi Ademi Pirhan tarafından toplanmış, çalışmaların yapılacağı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesine gönderilmiştir (Bkz. Şekil 2.1). Gövde bulbillerine ilk aşamada bitki doku kültürü tekniği uygulanmıştır. Sonucunda mikroçoğaltımı gerçekleştirilen gövde bulbillerinden kallus gelişimi sağlanmıştır. Elde edilen kalluslarda ve ayrıca soğan bulbillerinde elde ettiğimiz meristemler kullanılarak kriyoprezervasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.1. Toplanan gövde bulbilleri

2.1.2. Besin ortamı

Lilium candidum bitkisinin bitki doku kültürü tekniği ile çoğaltılması amacıyla üç farklı besin ortamı kullanılmıştır. Bunlar sırayla MS, WPM ve OM'dir. Bitkilerin gelişim ve büyümelerini teşvik etmek maksadıyla değişik konsantrasyonlarda bitki

büyüme düzenleyicileri kullanılmıştır. Sırayla isimleri şunlardır; BA, NAA ve GA₃. Besin ortamında katılaştırıcı olarak agar, karbon kaynağı olarak ise süktroz tercih edilmiştir. Tablo 2.1’de besin ortamında kullanılan tüm bileşenlerin miktarı verilmiştir.

Çizelge 2.1. Besin Ortamında Kullanılan Bileşenlerin Miktarları

BİLEŞENLER	KULLANILAN MİKTARLARI
MS	4,40 g/L
WPM	2,35 g/L
OM	4,1 g/L
SÜKTROZ	20 g/L
AGAR	7 g/L
BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİ	1 mg/L (Stok Konsantrasyon)

2.2. Metot

2.2.1. Besin ortamlarının hazırlanması

Besin ortamı hazırlamasında Tablo 1’de verilen verilere bağılı olarak, kullanılan tüm bileşenlerin miktarları hassas terazide tartılmıştır. Agar hariç tüm bileşenler beher içerisine aktarılmıştır (Agar pH derecesine etki etmediğı için hassas terazide tartıldıktan sonra otoklav şişesine aktarılmıştır). Ardından behere toplam hacmin yarısı olacak şekilde distile su eklenmiştir. Manyetik balık yardımıyla besin ortamı çözelti haline gelene kadar karıştırılmıştır. Sonra çözeltinin pH derecesi 5,8’e (toprak pH değeri 5,8 olduğı için) ayarlanmış ve besin ortamına distile su eklenerek toplam hacme tamamlanmıştır. Agarın olduğı otoklav şişesine besin ortamı aktarılmış ve otoklav cihazına konarak 121⁰ sıcaklık ve 1 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Son olarak steril edilmiş bitki doku kültürü kaplarına (magenta ve petri kapları) besin ortamı eklenmiş ve katılması sağlanmıştır.

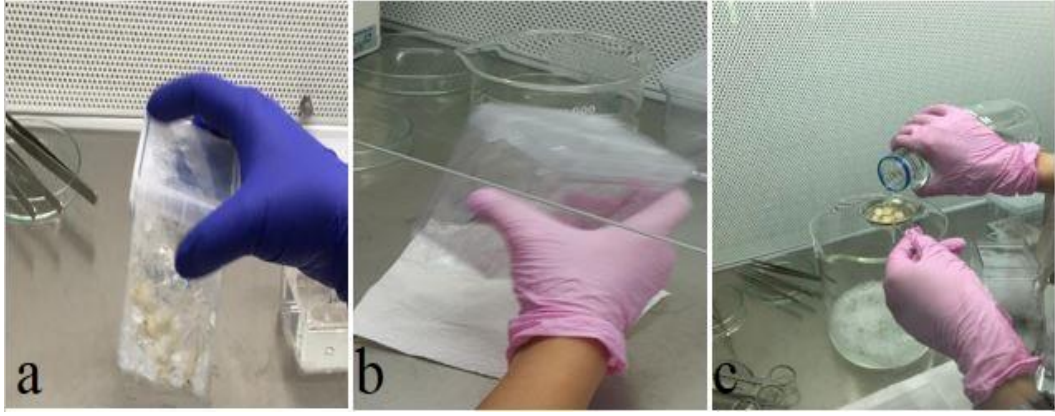
2.2.2. Bitki materyalinin sterilizasyonu

Lilium candidum bitkisine ait gövde bulbilleri bitki doku kültürü çalışması kapsamında steril edilmiştir. Laboratuvarında önceden yapılmış protokole göre sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Buna göre toplanan gövde bulbilleri ilk olarak çeşme suyu altında 45 dakika boyunca yıkanmıştır. Ardından kabukları soyulmuş ve tekrar çeşme suyu altında 20 dakika boyunca yıkanmıştır (Bkz. Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Gövde bulbillerinin çeşme suyu altında yıkanması

Yıkanan gövde bulbilleri steril laminar hava kabinine aktarılmıştır. İlk olarak %70'lik etil alkolde 10 dakika boyunca karıştırılmış daha sonra distile suda durulanmıştır. %20'lik ticari deterjanla 5 dakika boyunca muamele edilmiş ve distile su durulanmıştır. Son olarak da %10'luk ticari deterjana 5 dakika maruz bırakılmış ve distile su ile iyice durulanmıştır. Kurutma kağıdına aktarılarak sterilizasyon basamağı sonlandırılmıştır (Bkz. Şekil 2.3).



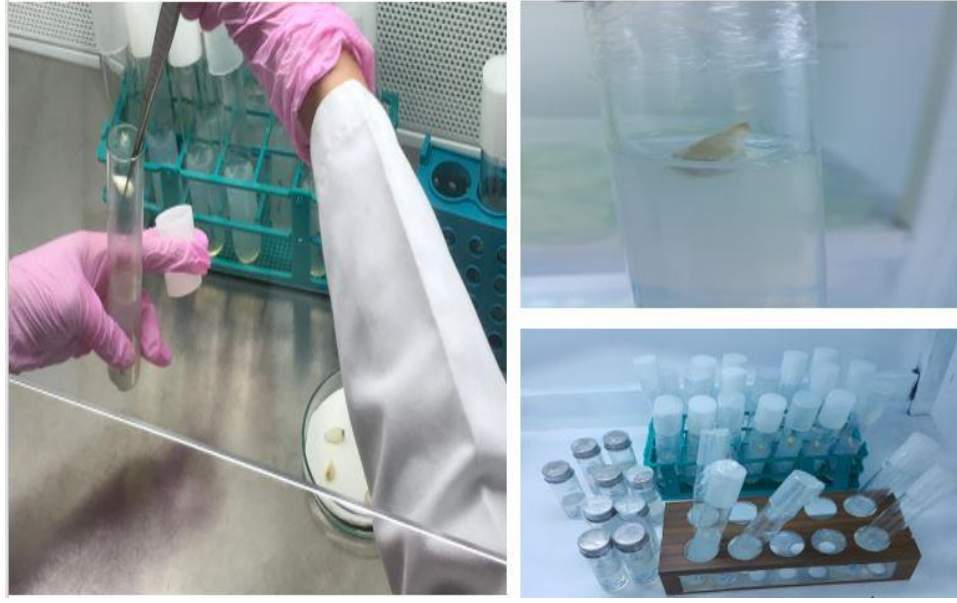
Şekil 2.3. Sterilizasyon basamakları (a: etil alkol ile muamele, b: ticari deterjan ile muamele, c: distile su ile durulanması)

2.2.3. Malzemelerin sterilizasyonu

Bitki doku kültürü çalışmaları aseptik koşullarda olmasından dolayı bitki materyali başta olmak üzere kullanılan tüm malzemelerin steril olması gerekmektedir. Buradan hareketle bu çalışmada kullanılan tüm bitki doku kültürü kapları (magenta, petri, penset, makas, bisturi) otoklav cihazında 121⁰ C sıcaklık ve 1 atm basınç altında 15 dakika boyunca steril hale getirilmiştir.

2.2.4. Bitki materyalinin kültüre alınması

Lilium candidum bitkisinin en uygun kriyoprezervasyon protokolünü oluşturmak maksadıyla yapılan bu çalışmanın ilk aşamasında steril edilmiş gövde bulbilleri hazırlanan besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Mikroçoğaltımı gerçekleştirmek üzere üç farklı besin ortamı kullanılmıştır. Bu besin ortamları sırayla 1 mg/L BA+ MS, OM ve WPM' dir. Kültüre alınan gövde bulbilleri belli zaman aralıklarında olmak üzere 4-8 hafta aralığında alt kültüre alınmıştır. Bitkilerin kallus gelişimini sağlamak üzere ilk alt kültürden itibaren 1 mg/L NAA+ MS, OM ve WPM besin ortamları da kullanılmıştır. Şekil 2.4'te sterilizasyondan sonra kültüre alınmış gövde bulbillerinin görüntüleri verilmiştir.



Şekil 2.4. Steril edilen gövde bulbillerinin besin ortamlarında kültüre alınması

Şekil 2.5'te alt kültüre alınmış bitkilerin fotoğrafları verilmiştir.



Şekil 2.5. Bitkilerin alt kültüre alınması

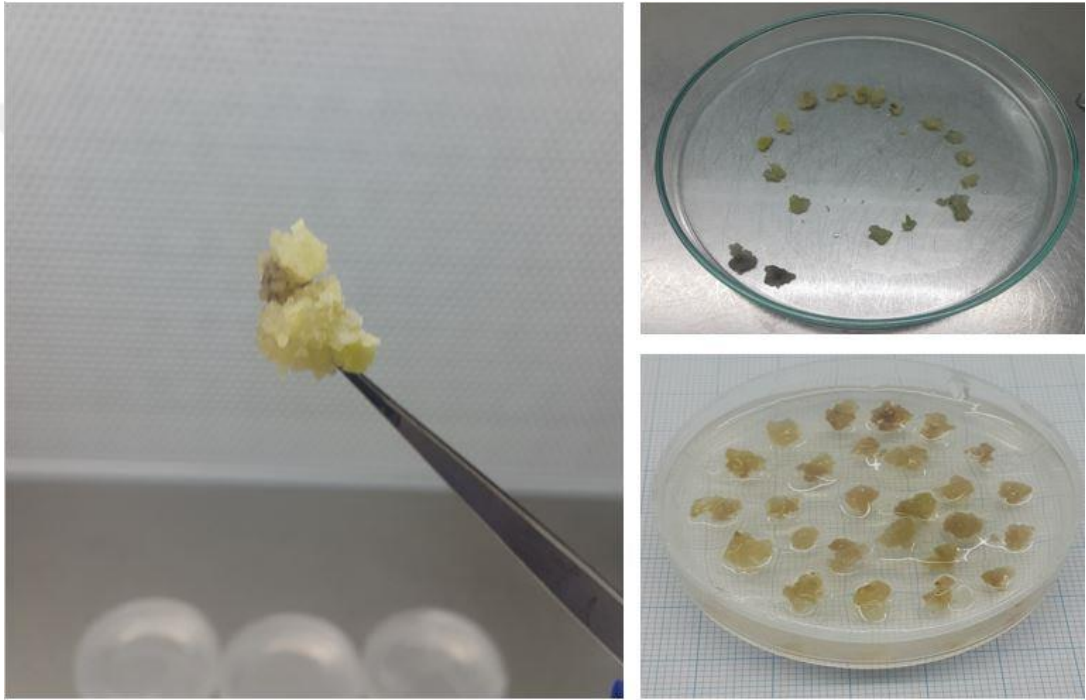
2.2.5. Kriyoprezervasyon çalışması

Lilium candidum bitkisi için uygun kriyoprezervasyon protokolü belirlemek amacıyla yapılmış bu çalışmada, bitki doku kültürü tekniği sonucunda elde edilmiş kallus ve meristemler kullanılarak kriyoprezervasyon çalışmalarına gidilmiştir. Laboratuvarında

yapılmış önceki çalışmalar ve diğer araştırmalar dikkate alınarak ön denemeler yapılmıştır. Elde edilen bulgular dikkate alınarak da en uygun yöntem oluşturulmaya çalışılmıştır.

2.2.5.1. Kalluslardan kriyoprezervasyon çalışması

Kriyoprezervasyon çalışması üç aşamada yapılmıştır. İlk aşamada 0,4 M sükroz+ MS besin ortamında kalluslar 24 saat ön kültüre alınmıştır. Ön kültür işlemi karanlık yerde ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (Bkz. Şekil 2.6).



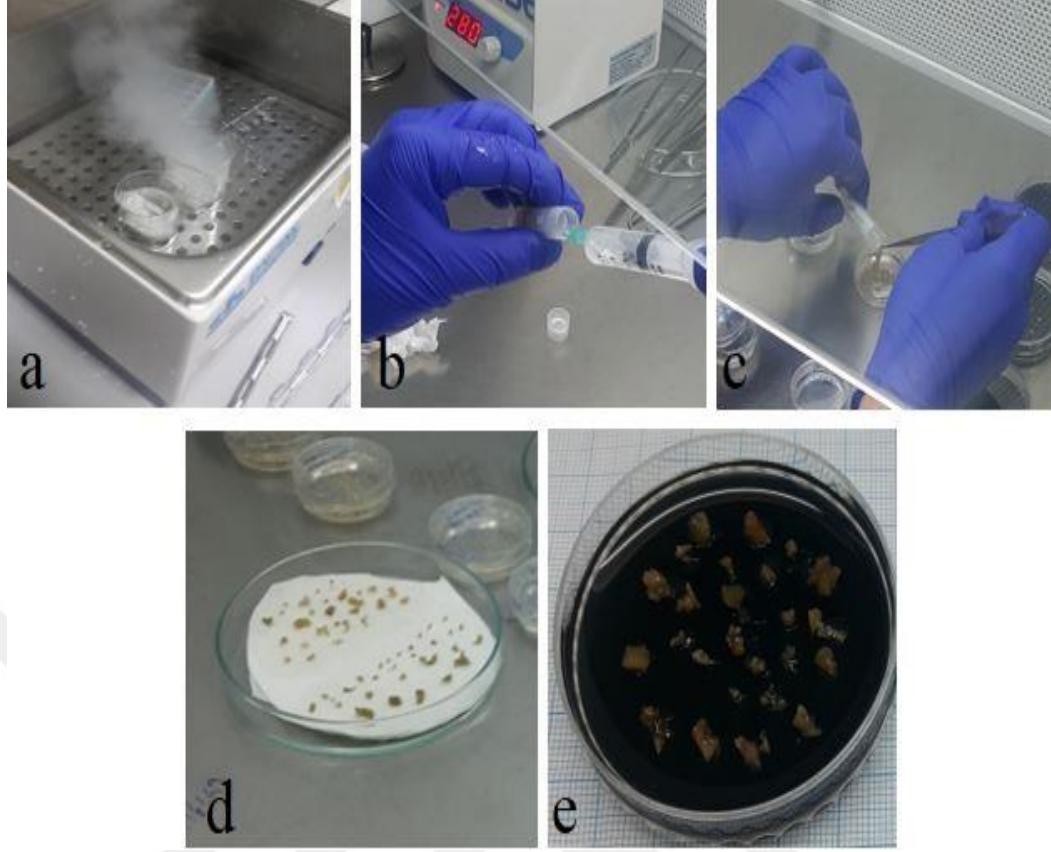
Şekil 2.6. Kallusların ön kültüre alınması

Kriyoprezervasyon çalışmasının ikinci aşaması dondurma ve saklamadır. Ön kültüre alınan kalluslar ilk olarak kriyoviallere aktarılmıştır. Daha sonra üzerine yaklaşık 1,5 mL PVS-2 eklenmiştir. Ön denemede PVS-2 bekleme süresi 60, 75, 90, 105 ve 120 dakika olarak uygulanmıştır. Elde edilen bulgular dikkate alınarak daha sonraki çalışmalarda 60, 75 ve 90 dakikalık denemeler kurulmuştur. PVS-2 ile muamele buz üstünde yapılmıştır. Ardından kriyoviallerden PVS-2 uzaklaştırılmış, yeni PVS-2 eklenmiştir. Son olarak kriyovialler azot tankına konmuş ve dondurma aşaması sonlandırılmıştır. Şekil 2.7’de dondurma aşamasının görüntüleri verilmiştir.



Şekil 2.7. Kallusların dondurulması ve saklanması (a: ön kültüre alınan kalluslar kriyoviallere aktarılması, b: kriyoviallere PVS-2 eklenmesi, c: buz üzerinde bekletilmesi, d: azot tankında saklanması)

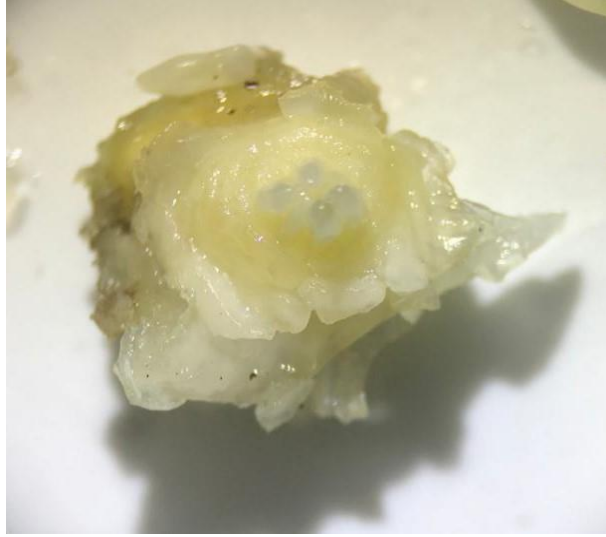
Kriyoprezervasyonun üçüncü ve son aşaması çözündürme aşamasıdır. Bu aşamada azot tankında saklanan kalluslar hızlı bir şekilde 40⁰ C sıcaklıktaki su banyosuna aktarılmış ve sıvı hale gelmesi sağlanmıştır. Ardından kriyovialden PVS-2 uzaklaştırılmış ve kalluslar 1 M süktroz+ MS sıvı besin ortamında 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kurutma kağıdına aktarılmış ve hazırlanan besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Ön denemelerde 1 mg/L BA+MS, OM ve WPM besin ortamları kullanılmış elde edilen bulgular ve analizlere bakılarak sonraki çalışmalarda WPM besin ortamı kullanılmamıştır. Diğer çalışmalarda kullanılan besin ortamları sırayla; 0,5 mg/L BA+0,2 mg/L NAA+ MS, OM, 0,5 mg/L BA+0,2 mg/L NAA+0,3 mg/L GA₃+ MS, OM, 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+OM, LB, NB' dir. Kullanılmış tüm besin ortamlarında Tablo 1'de verilen bileşenlere ek olarak kömür tozu (10 g/L) kullanılmıştır. Çözme aşamasının tüm adımları Şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.8. Kallusların çözündürülmesi ve kültüre alınması (a: su banyosunda sıvı hale dönüştürülmesi, b: PVS-2'nin enjektörle çıkarılması, c: Kallusların 1 M süktroz+ MS sıvı besin ortamına aktarılması, d: kallusların kurutma kağıdına aktarılması, e: kallusların besin ortamına kültüre alınması)

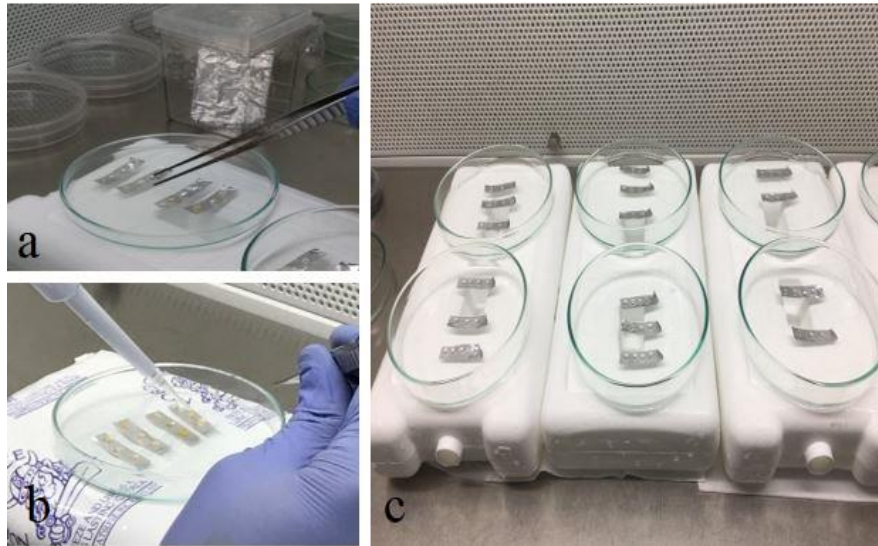
2.2.5.2. Meristemlerde kriyoprezervasyon çalışması

Meristemler ile yapılan çalışmada kalluslar ile yapılan çalışma gibi üç aşamadan oluşmaktadır. Her iki çalışmada birbirine benzerlik göstermekle birlikte bir takım farklılıklar içermektedir. Bu çalışmada ilk olarak meristemler Şekil 2.9'da verildiği gibi sürgünlerin kök kısımlarından çıkarılmıştır. Daha sonra meristemler 0,4 M süktroz+ MS besin ortamında kültüre alınmıştır. 24 saat boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda ön kültür işlemi uygulanmıştır.



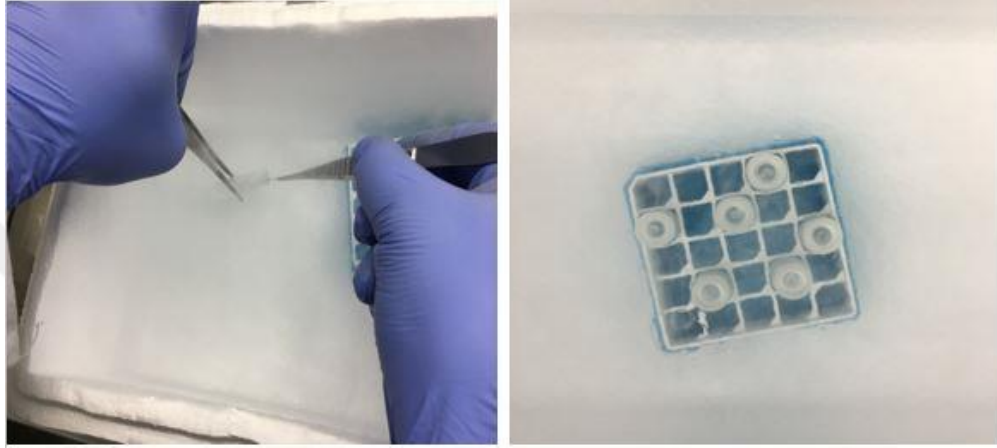
Şekil 2.9. Stereo mikroskopta meristem görüntüsü

Kriyoprezervasyon çalışmasının ikinci basamağı dondurma ve saklamadır. Bu basamakta ön kültür edilen meristemler Şekil 2.10'da gösterilen alüminyum folyo şeritlerine (2 cm x 0,5 cm uzunluklarda) aktarılmıştır. Ardından üzerlerine yaklaşık 10 μ L PVS-2 eklenmiş ve buz üzerinde beklenmiştir. Yapılan çalışmalar ve araştırmalara göre ön denemede 30, 45 ve 60 dakika PVS-2 uygulaması yapılmıştır. Daha sonra elde edilen bulgular dikkate alınarak 45, 60 ve 90 dakika PVS-2 uygulamaları gerçekleştirilmiştir.



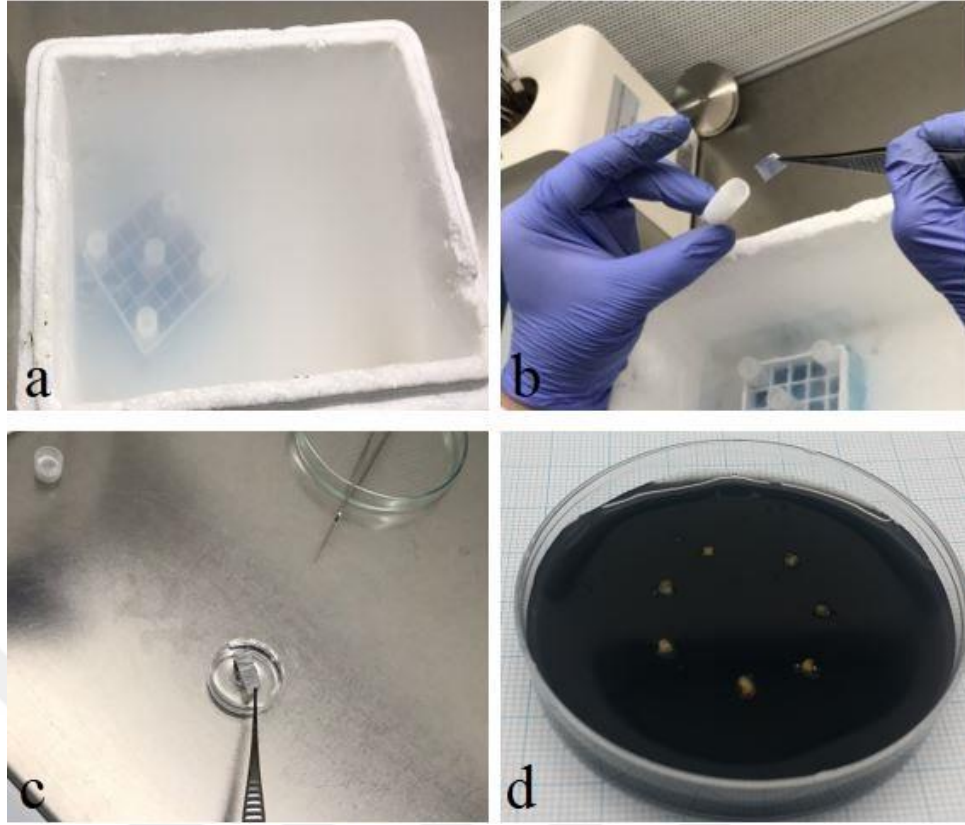
Şekil 2.10. Meristemlere PVS-2 uygulanması (a: meristemlerin alüminyum folyo şeritlerine aktarılması, b: PVS-2 eklenmesi, c: buz üzerinde PVS-2 uygulaması yapılması)

Alüminyum folyo şeritleri penset yardımıyla azot içerinde bulunan kriyoviale daldırılmış ve kriyovial kriyobox içerine konmuştur. Daha sonra kriyoboxlar azot tankına aktarılmıştır. Böylece meristemlerin dondurma aŗaması sonlandırılmıştır (Bkz. Şekil 2.11). PVS-2'nin toksik etkisine baēlı etkileri belirlemek maksadıyla birtakım meristemlere dondurma aŗaması uygulanmamıştır. Bu meristemler 1 M sükroz+ MS sıvı besin ortamında 20 dakika bekletilmiş daha sonra kömür tozlu 1 mg/L BA+ MS besin ortamında kültüre alınmıştır.



Şekil 2.11. Meristemlerin sıvı azot içerisine aktarılması

Kriyoprezervasyon  alıŗmasının son aŗaması meristemleri çözme ve besin ortamına kültüre almaktır. Azot tankından çıkarılan kriyoboxlar doērudan laminar hava kabinine aktarılmış ve azot içerisinde kriyovial içerisinde bulunan alüminyum folyo şeritleri çıkarılmıştır. Ardından meristemler 1 M sükroz + MS sıvı besin ortamına aktarılmış ve 20 dakika boyunca bekletilmiştir. Son olarak da 1 mg/L BA+ MS katı besin ortamına kültüre alınmıştır. Şekil 2.12'de çözme aŗamasının tüm basamakları verilmiştir.



Şekil 2.12. Meristemlerin çözündürülmesi ve besin ortamlarında kültüre alınması (a: kriyoboxın azot içerisinde laminar hava kabinene aktarılması, b: meristemlerin kriyoviallerden çıkarılması, c: meristemlerin 1 M süktroz+ MS sıvı besin ortamına aktarılması, d: meristemlerin besin ortamında kültüre alınması)

2.2.6. İstatistikî analiz

Kriyoprezervasyon çalışması sonucunda elde edilen tüm bulgular ve veriler istatistikî analiz yapılarak değerlendirilmiştir. Kalluslar ile yapılan çalışmanın değerlendirilmesi kallusların 1 ay sonunda elde edilen çaplarına göre yapılmıştır. Tablo 2.2’de gösterilen değerlere göre kallus gelişim indeksi ve rejenerasyon oranı SPSS programı ile oluşturulmuştur. Örneklerin birbiri ile kıyaslanması programın One-Way ANOVA tekniği kullanılarak yapılmıştır. One-Way ANOVA içerisinde Post-Hoc-LSD testi kullanılmış, p değeri ise 0,05’ den küçük olacak şekilde seçim yapılmıştır.

Çizelge 2.2. Kallusların çap boyutuna bağlı değerlendirme derecesi ve canlılık yüzdesi

DERECE	KALLUS ÇAPI (mm)	CANLILIK YÜZDESİ
1	1-2	%16,7
2	2-4	%33,4
3	4-6	%50,1
4	6-8	%66,8
5	8-10	%83,5
6	10 ve üzeri	%100

Meristemlerin istatistiki açıdan değerlendirilmesi meristemlerin rejenerasyon oranına göre yapılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm meristemler içerisinde büyüme ve gelişme gösterenler tespit edilerek hesaplanmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Bulgular

Lilium candidum bitkisi için uygun kriyoprezervasyon tekniğini tespit etmek hedefiyle bu çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada ilk olarak *Lilium candidum* bitkisinin gövde bulbilleri kullanılmış ve bitki doku kültürü tekniği vasıtasıyla mikroçoğaltım gerçekleştirilmiştir. Çoğaltım sonucunda elde edilen kallus ve meristemler ile kriyoprezervasyon çalışmasına gidilmiştir. Sonuç olarak elde edilen tüm morfolojik gözlemler ve istatistiki analizler çizelge ve şekillerle bu kısımda ifade edilmiştir.

3.1.1. Bitki doku kültürü tekniği ile çoğaltılan bitkilerin analizi

Lilium candidum bitkisinin gövde bulbilleri kullanılarak farklı besin ortamlarında bitkinin çoğaltımı sağlanmıştır. Bu besin ortamları sırayla 1 mg/L BA+ MS, OM ve WPM katı besin ortamlarıdır. Çizelge 3.1’de gövde bulbillerinin toplandığı bölge ve kullanılan besin ortamlarına göre sınıflandırılması yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Gövde bulbillerinin toplandığı bölgelere bağlı kültür alınan besin ortamlarının yayılımı

Toplanan Bölge	1 mg/L BA ilaveli OM besin ortamı	1 mg/L BA ilaveli MS besin ortamı	1 mg/L BA ilaveli WPM besin ortamı
Kepsut	7 tüp	7 tüp	5 tüp
Fethiye	2 tüp	2 tüp	1 tüp
Aydın		1 tüp	5 tüp
Bursa	1 tüp	1 tüp	

Sterilizasyon aşamasından sonra kültüre alınan gövde bulbilleri yaklaşık 3 hafta sonra sürgün gelişimi vermeye başlamışlardır. Sürgün gelişiminin yanında kallus gelişimini

de teşvik etmek maksadıyla 4 hafta sonra ilk alt kültür işlemi uygulanmıştır. Bunun için ek olarak 1 mg/L NAA+ MS, OM ve WPM besin ortamları kullanılmıştır. Alt kültüre alma işleminden yaklaşık 2 hafta sonra da kallus gelişimi gözlenmeye başlamıştır. Bu çalışmada alt kültüre alma 4-8 hafta aralığında olmak üzere toplam 7 kez alt kültür uygulaması yapılmıştır. Kepsut bölgesinden toplanan gövde bulbilleri ile yapılan çoğaltma işlemi diğer bölgelerden toplanan gövde bulbillerine kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 3.2’de Kepsut bölgesinden toplanan gövde bulbillerinin alt kültür verileri verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kepsut bölgesinden toplanan gövde bulbillerinin besin ortamına göre alt kültüre alınması

Alt Kültür Sayısı	1 mg/L BA ilaveli OM besin ortamı	1 mg/L NAA ilaveli OM besin ortamı	1 mg/L BA ilaveli MS besin ortamı	1 mg/L NAA ilaveli MS besin ortamı	1 mg/L BA ilaveli WPM besin ortamı	1 mg/L NAA ilaveli WPM besin ortamı
1.Alt Kültür	9 magenta	-	7 magenta	-	5 magenta	-
2.Alt Kültür	8 magenta	6 magenta	9 magenta	13 magenta	4 magenta	6 magenta
3.Alt Kültür	6 magenta	12 magenta	8 magenta	13 magenta	5 magenta	7 magenta
4.Alt Kültür	10 magenta	10 magenta	12 magenta	10 magenta	6 magenta	4 magenta
5.Alt Kültür	15 magenta	12 magenta	10 magenta	5 magenta	2 magenta	3 magenta
6.Alt Kültür	23 magenta	10 magenta	25 magenta	-	3 magenta	5 magenta
7.Alt Kültür	32 magenta	17 magenta	9 magenta	-	3 magenta	7 magenta

Alt kültür işleminde magenta kullanılmıştır ve her magentaya 4-6 aralığında bulbil eksplantı kültüre alınmıştır. Verilere bakıldığında en verimli besin ortamının OM olduğu, en verimsiz besin ortamının ise WPM olduğu belirlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinden BA ve NAA kullanılmıştır. BA bitkilerin sürgün gelişimi ve hücrelerin büyümesinin teşvik etmek maksadıyla kullanılmıştır. Sonucunda istenilen düzeyde verim alınabilmektedir. Şekil 3.1’de Kepsut’tan toplanan gövde bulbillerinin alt kültür görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.1. Kepsut bölgesinden toplanan gövde bulbiller ile mikroçoğaltımın yapılması

Fethiye bölgesinden toplanan gövde bulbiller ile yapılan mikroçoğaltma sonucunda elde edilen tüm veriler Çizelge 3.3.’de verilmiştir. İlk 6 aylık zaman diliminde istenildiği düzeyde verim alınamamıştır. Daha sonraki zaman diliminde yapılan gözlemlerde ise çoğaltımın hızlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. 1 mg/L BA+ MS ve 1 mg/L NAA+ MS besin ortamlarından en fazla bitki çoğaltılmıştır. Ancak 1 mg/L BA+ WPM ve 1 mg/L NAA+ WPM besin ortamlarında kontaminasyondan kaynaklı

çoğaltım sağlanamamıştır. Sürgün gelişimi kallus gelişimine kıyasla daha fazla olmuştur.

Çizelge 3.3. Fethiye bölgesinden toplanan gövde bulbillerinin besin ortamına göre alt kültüre alınması

Alt Kültür Sayısı	1 mg/L BA ilaveli OM besin ortamı	1 mg/L NAA ilaveli OM besin ortamı	1 mg/L BA ilaveli MS besin ortamı	1 mg/L NAA ilaveli MS besin ortamı	1 mg/L BA ilaveli WPM besin ortamı	1 mg/L NAA ilaveli WPM besin ortamı
1.Alt Kültür	1 magenta	-	2 magenta	-	1 magenta	-
2.Alt Kültür	2 magenta	4 magenta	5 magenta	3 magenta	-	-
3.Alt Kültür	3 magenta	2 magenta	10 magenta	5 magenta	-	-
4.Alt Kültür	2 magenta	2 magenta	14 magenta	8 magenta	-	-
5.Alt Kültür	2 magenta	1 magenta	13 magenta	8 magenta	-	-
6.Alt Kültür	-	2 magenta	24 magenta	15 magenta	-	-
7.Alt Kültür	-	-	12 magenta	7 magenta	-	-

Şekil 3.2’de Fethiye bölgesinden toplanan gövde bulbillerinin alt kültüre alınmış görüntülerine yer verilmiştir.



Şekil 3.2. Fethiye bölgesinden toplanan gövde bulbilleri ile mikro çoğaltımın yapılması

Şekil 3.2’de de görüldüğü Fethiye bölgesine ait gövde bulbilleri ile yapılan çoğaltım sonucunda elde edilen bitkilerin ince yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ancak Kepsut bölgesine ait gövde bulbillerin çoğaltımından elde edilen bitkilerin daha kalın ve köklerinin ise yoğun olduğu tespit edilmiştir. Buradan hareketle köklenmenin fazla olması, kökün bitkinin gelişimi için daha fazla katkı sağladığı sonucuna gidilebilir. Bununla birlikte Kepsut bölgesinden elde edilen bitkilerden daha fazla meristem elde edilmiştir.

Çizelge 3.4’te ise Aydın bölgesinden toplanan gövde bulbiller ile yapılan çoğaltımın sonucunda elde edilen veriler sunulmuştur. Bu bölgeden toplanan gövde bulbillerinin hiçbirisi 1 mg/L BA+ OM besin ortamına kültüre alınmadığı için OM besin ortamlarında çoğaltım yapılmamıştır. WPM besin ortamlarında ise kontaminasyon kaynaklı sebebiyetten dolayı çoğaltım sağlanamamış olup sadece MS besin ortamlarında çoğaltım sağlanmıştır. Bununla birlikte bu bölgeden gelen bulbillerden kallus gelişimi sağlamamıştır.

Çizelge 3.4. Aydın bölgesinden toplanan gövde bulbillerinin alt kültüre alındığı besin ortamı dağılımı

Alt Kültür Sayısı	1 mg/L BA ilaveli MS besin ortamı	1 mg/L BA ilaveli WPM besin ortamı
1.Alt Kültür	2 magenta	2 magenta
2.Alt Kültür	3 magenta	3 magenta
3.Alt Kültür	4 magenta	4 magenta
4.Alt Kültür	6 magenta	2 magenta
5.Alt Kültür	7 magenta	-
6.Alt Kültür	5 magenta	-
7.Alt Kültür	5 magenta	-

Aydın bölgesine ait bulbiller ile yapılan mikro çoğaltım istenildiği düzeyde verim elde edilememiştir. Bununla birlikte 1 mg/L BA+ MS besin ortamında kültüre alınan gövde bulbillerinden çok sayıda bitki elde edilmiştir. Özellikle beşinci aydan itibaren bitki sayısında artış gözlemlenmiştir. Şekil 3.3'te kültüre alınan bitkilerden bazıları gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Aydın bölgesinden toplanan gövde bulbiller ile mikro çoğaltım yapılması

Bursa bölgesinden elde edilen gövde bulbillerinden mikroçoğaltım sağlanamamıştır.

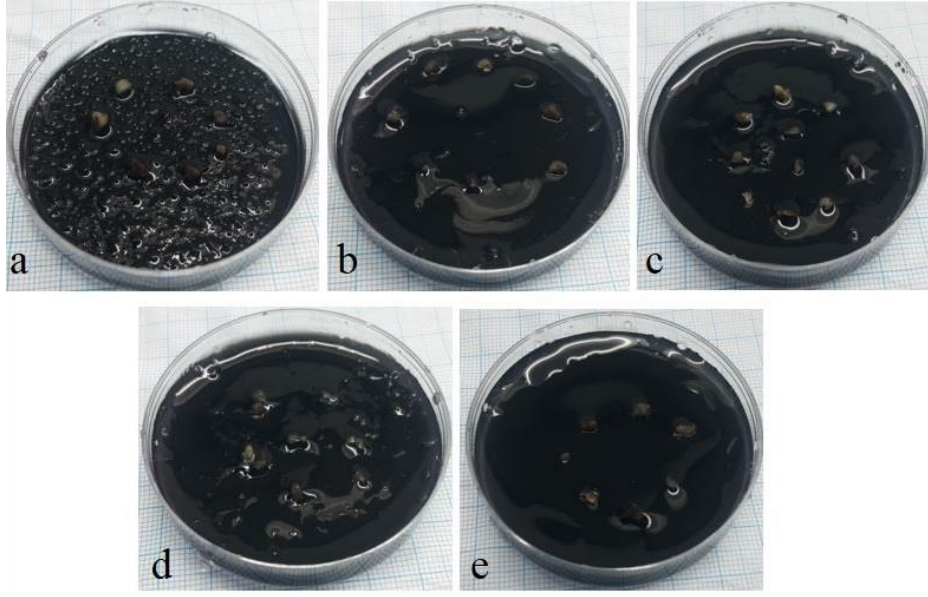
3.1.2. Kriyoprezervasyon çalışmalarının analizi

Bitki doku kültürü tekniği sonucunda 1 mg/L NAA+ MS, OM ve WPM besin ortamlarından elde edilen kalluslardan kriyoprezervasyon çalışmasına gidilmiştir. Fethiye, Aydın ve Bursa bölgelerinden istenildiği düzeyde kallus elde edilemediğinden, sadece Kepsut bölgesinden elde edilen kalluslardan kriyoprezervasyon çalışması yapılmıştır. 1 mg/L BA+MS ve OM besin ortamlarından elde edilen sürgün ve köklenmelerden meristemler çıkarılarak kriyoprezervasyon çalışması yapılmıştır. Kriyoprezervasyon çalışmaları morfolojik ve istatistiki açıdan değerlendirilmiştir. Morfolojik analizi haftalık ve aylık olarak yapılmış, canlılık ve soğancık gelişimi izlenilmiştir. İstatistiki analiz ise aylık olarak yapılmış, kültüre alınan tüm kallus ve meristemlerin canlılıklarına göre rejenerasyon yüzdesi dikkate alınarak inceleme yapılmıştır.

3.1.2.1. Kallusların morfolojik ve istatistiki analizi

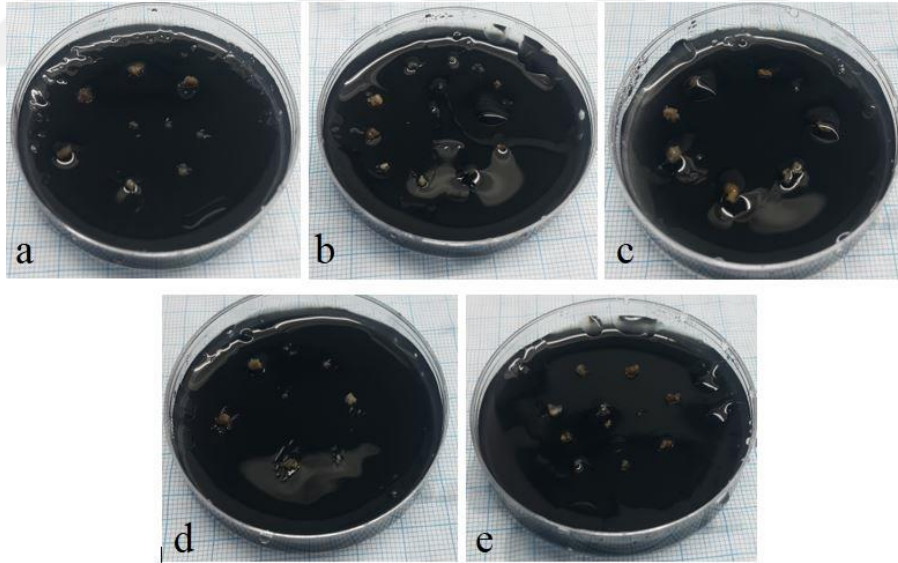
Lilium candidum bitkisinin uygun kriyoprezervasyon protokolünü belirlemek için yapılan bu çalışmada, önceden yapılmış araştırmalar ve derlemelere göre üç tekrarlı ön denemeler kurulmuştur. Ön denemelerde PVS-2 beş farklı sürede uygulanmıştır. Bu süreler sırayla 60, 75, 90, 105 ve 120 dakikalardır. Besin ortamı olarak ise kömür tozu destekli 1 mg/L BA+ MS, OM ve WPM besin ortamları kullanılmıştır. Bununla birlikte PVS-2'nin toksik özelliğinin ölümcül etkilerini belirlemek amacıyla her süre için PVS kontrol (PVS-C) grubu oluşturulmuştur.

1 mg/L BA+ MS, OM ve WPM besin ortamlarında kültüre alınan PVS-C gruplarının aylık gelişimleri Şekil 3.4, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da verilmiştir.



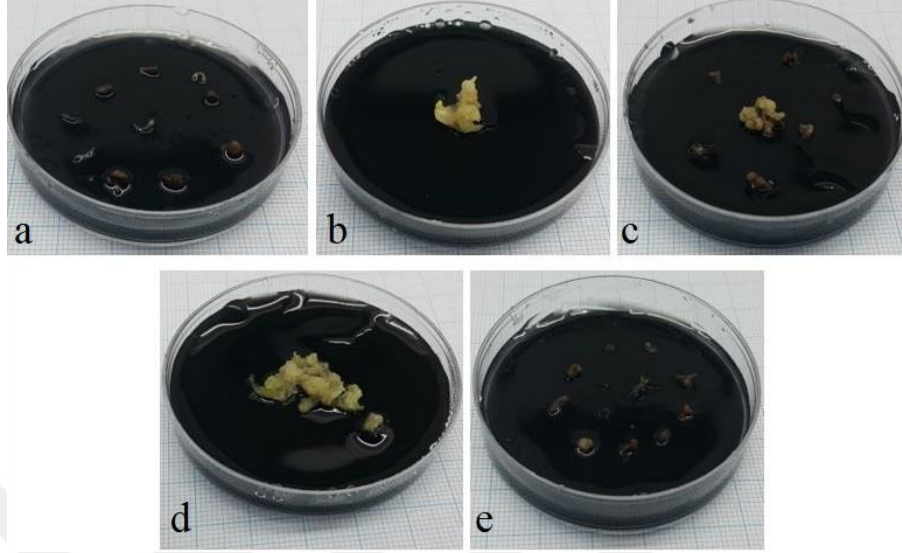
Şekil 3.4. 1 mg/L BA+ MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubu (a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması)

Şekil 3.4'e bakıldığında kallusların kararmaya başladığı ve canlılıklarını kaybettiği gözlemlenmiştir.



Şekil 3.5. 1 mg/L BA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubu (a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması)

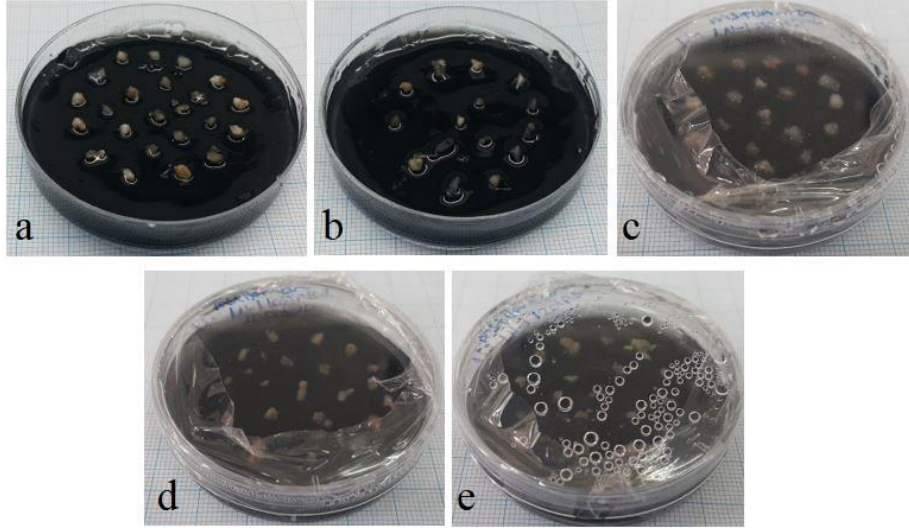
Şekil 3.5'e bakıldığında ise kallusların istenilen seviyede gelişmediği gözlemlenmiştir. MS besin ortamında kültüre alınan kalluslara benzer şekilde bu kalluslarda sürgün gelişimi gözlenememiştir.



Şekil 3.6. 1 mg/L BA+ WPM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubu (a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması)

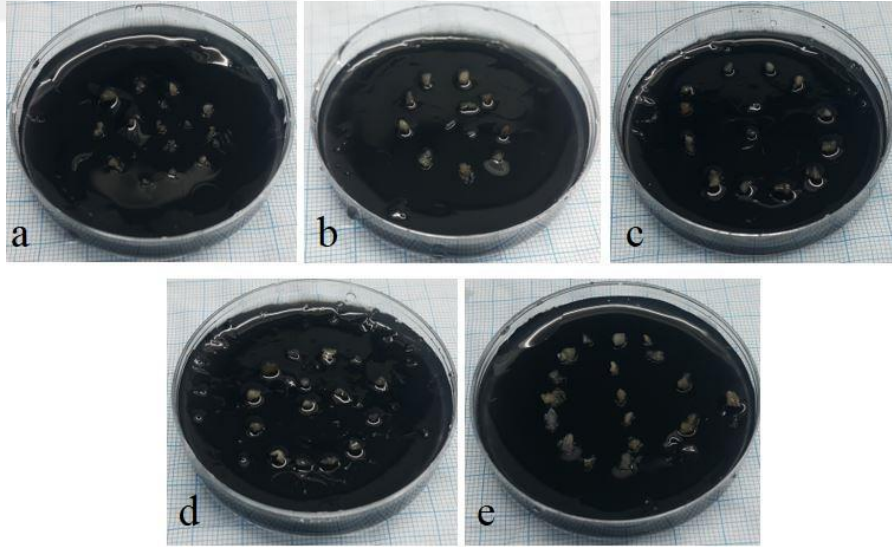
Şekil 3.6'da 1 mg/L BA+ WPM besin ortamında kültüre alınan kallusların aylık gelişimi gösterilmiştir. Şekle bakıldığında kallusların bir kısmında rejenerasyon başladığı belirlenmiştir. 75, 90 ve 105 dakika PVS-2 uygulamasının kontrol grupları için uygun olduğu belirlenmiştir. Ancak 60 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması yapılan kallusların karardığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak bakıldığında, üç besin ortamında kültüre alınan PVS-C kontrol gruplarından en başarılı besin ortamı 1 mg/L BA+ WPM besin ortamı olduğu, yapılan morfolojik analiz ile gösterilmiştir.

Kriyoprezerve edilmiş kallusların morfolojik analizi PVS-C gruplarında olduğu aylık kallus gelişimine göre yapılmıştır. Üç tekrarlı olacak şekilde çalışma yapılmıştır. 1 mg/ BA+ MS besin ortamında kültüre alınan kallusların aylık kallus gelişimleri Şekil 3.7 (Deneme- 1), Şekil 3.8 (Deneme- 2) ve Şekil 3.9'da (Deneme- 3) gösterilmiştir.



Şekil 3.7. 1 mg/L BA+ MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 1, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması)

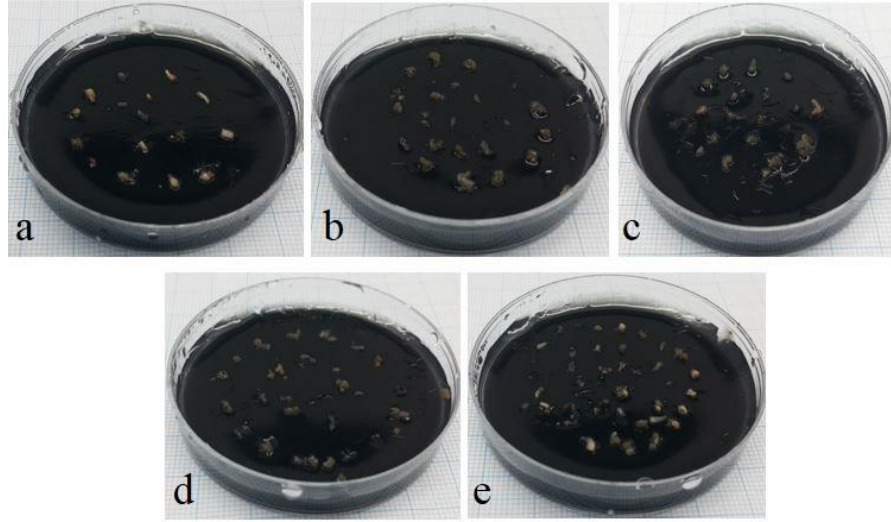
Deneme-1'in aylık kallus gelişimi Şekil 3.7'de gösterilmiştir. Kalluslara genel olarak bakıldığında canlılıklarının sürdüğü ve morfolojik olarak sarımsı renkte oldukları gözlemlenmiştir. Bununla birlikte kallusların yumuşak yapıya sahip oldukları belirlenmiştir.



Şekil 3.8. 1 mg/L BA+ MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 2, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması)

1 mg/L BA+ MS besin ortamı kullanılarak yapılan kriyoprezervasyon çalışmasının deneme-2 adlı çalışmasının aylık kallus gelişimi Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Şekle

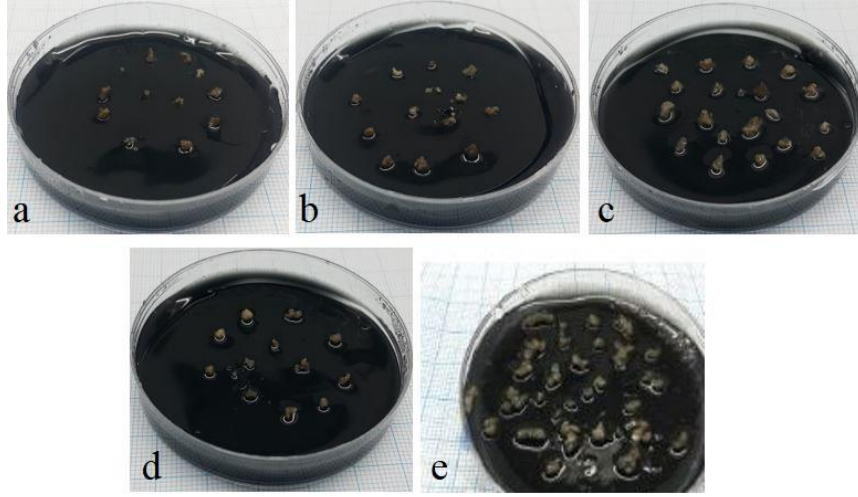
bakıldığında kallusların diğer çalışmaya kıyasla canlılıklarının kaybolduğu tespit edilmiştir. Çoğu kallusun sertleşmeye ve kararmaya başladığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.9. 1 mg/L BA+ MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 3, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması)

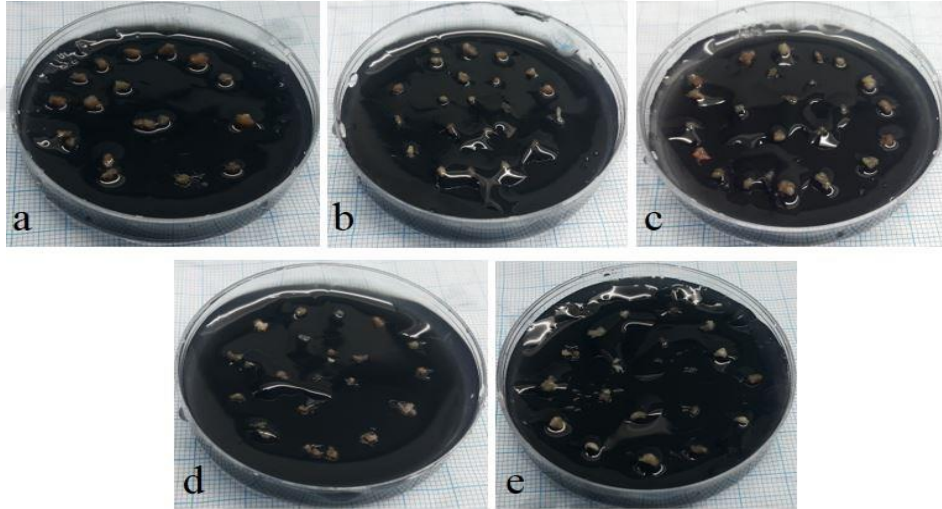
Şekil 3.9 1 mg/L BA+ MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların deneme- 3 adlı çalışmasının aylık morfolojik analizini ifade eder. Kalluslara bakıldığında büyüme göstermediği ancak canlılıklarının devam ettiği görülmektedir. Deneme- 2 çalışmasına benzer morfolojik yapıya sahiptirler. Sonuç olarak, 1 mg/L BA+ MS besin ortamı ile yapılan çalışmanın morfolojik analizine bakıldığında, kallusların sürgün gelişimi başlamadığı, bir kısmında canlılığının devam ettiği bununla birlikte bir kısmının ise karardığı belirlenmiştir.

1 mg/ L BA+ OM besin ortamı ile yapılan çalışmanın morfolojik açıdan analizi diğer besin ortamında uygulandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.10 (Deneme- 1), Şekil 3.11 (Deneme- 2) ve Şekil 3.12'de (Deneme- 3) kallusların aylık gelişimi gösterilmiştir.



Şekil 3.10. 1 mg/L BA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 1, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması)

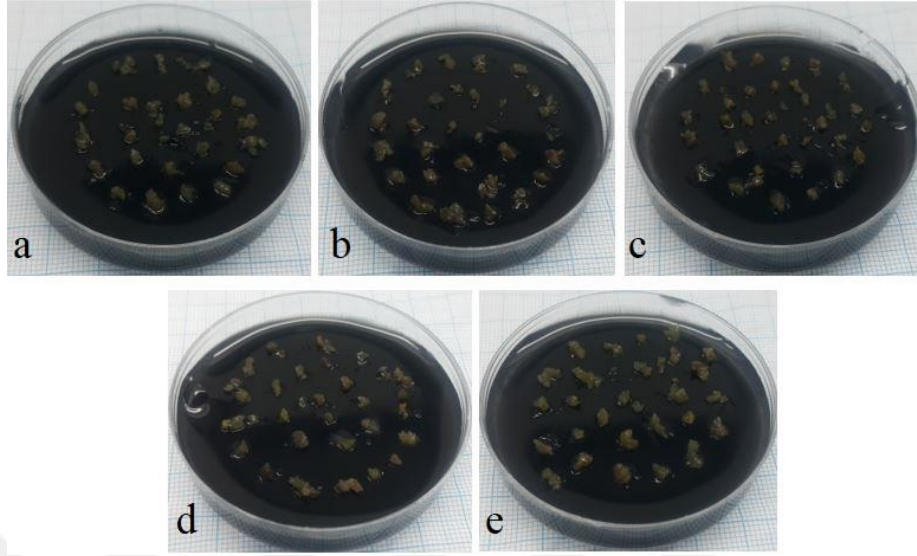
Deneme-1 adıyla yapılan kriyoprezervasyon çalışmasının aylık kallus gelişimi Şekil 3.10'de gösterilmiştir. Şekle bakıldığında kallusların sürgün gelişimine başlamadığı bununla birlikte morfolojik açıdan yumuşak yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.11. 1 mg/L BA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 2, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması)

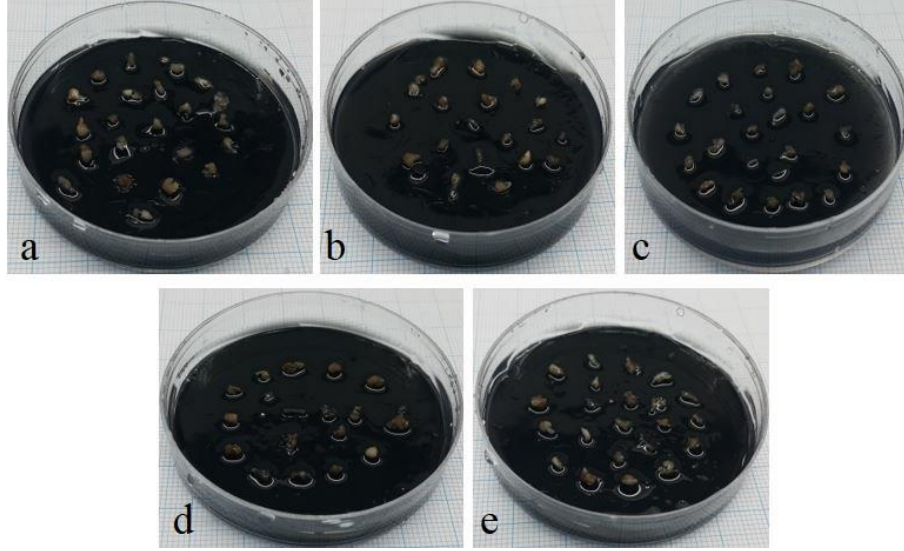
1 mg/L BA+ OM besin ortamı kullanılarak yapılan deneme-2 çalışmasının aylık kallus gelişimi Şekil 3.11'de gösterilmiştir. Şekle bakıldığında diğer çalışmada olduğu gibi kalluslarda sürgün gelişimi gözlenmemiştir. Kalluslarının büyük kısmında canlılığın

sürdüğü, renklerinin sarı-yeşil olduğu ve yumuşak yapıya sahip oldukları gözlemlenmiştir.



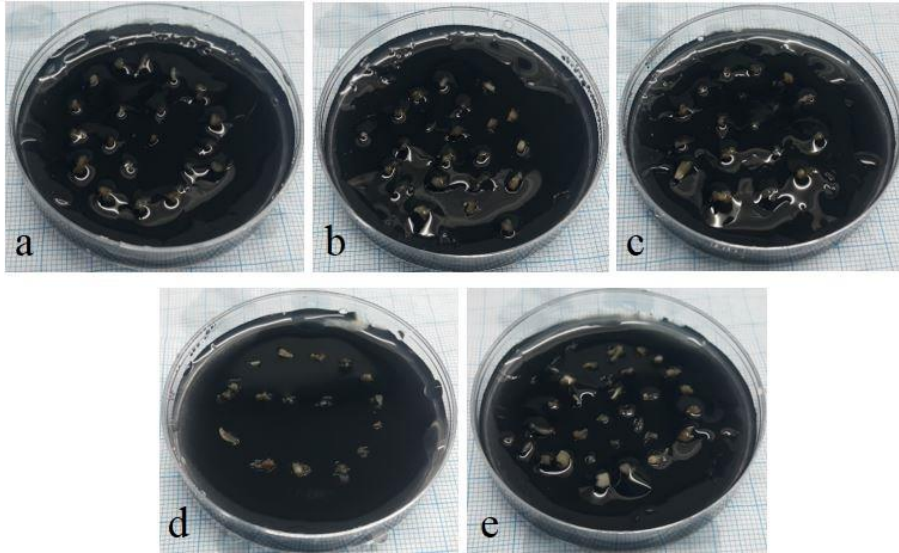
Şekil 3.12. 1 mg/L BA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 3, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması)

1 mg/L BA+ OM besin ortamıyla yapılan deneme- 3 çalışmasının aylık kallus analizi Şekil 3.12’de gösterilmiştir. Kallusların yumuşak, canlı ve sarı-yeşil renklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte büyüme gelişme gözlenmemiştir. 1 mg/ L BA+ OM besin ortamı ile yapılan üç çalışma morfolojik açıdan değerlendirildiğinde, kallusların genel olarak canlı ve büyüme potansiyeli olduğu belirlenmiştir. 1 mg/L BA+ WPM besin ortamı ile yapılan çalışmanın aylık analizi sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 3.13 (Deneme- 1), Şekil 3.14 (Deneme- 2) ve Şekil 3.15’te (Deneme- 3) verilmiştir.



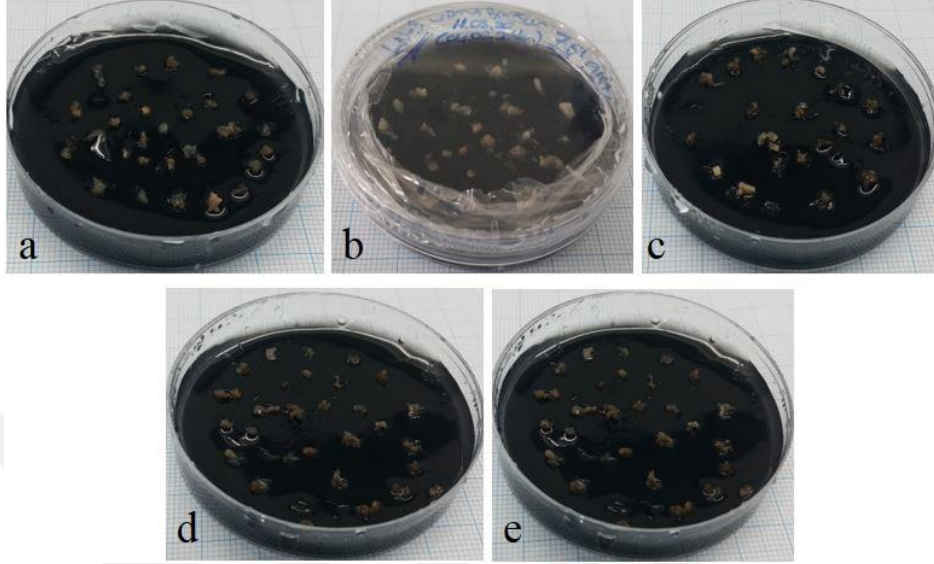
Şekil 3.13. 1 mg/L BA+ WPM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 1, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması)

1 mg/ L BA+ WPM besin ortamı kullanılarak üç çalışma yapılmıştır. İlk çalışmada kültüre alınan kallusların aylık analizi Şekil 3.13'te gösterilmiştir. Kallusların bir ay sonunda kararmaya ve sertleşmeye başladığı tespit edilmiştir. Bununla Şekil 3.13a ve Şekil 3.13d'de birkaç kallusun yumuşak ve sarı renkte olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.14. 1 mg/L BA+ WPM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 2, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması)

Şekil 3.14 ise 1 mg/L BA+ WPM besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi verilmiştir. Bu çalışmanın da diğer çalışmadaki gibi benzer sonuçlar vermiş, kallusların çoğunluğu kararmıştır. Bununla birlikte Şekil 3.14d ve Şekil 3.14e’de bazı kallusların canlılığının devam ettiği görülmektedir.



Şekil 3.15. 1 mg/L BA+ WPM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık analizi (Deneme- 3, a: 60, b: 75, c: 90, d:105 ve 120 dakika PVS-2 uygulaması)

1 mg/L BA+ WPM besin ortamı kullanılarak yapılan üçüncü kriyoprezervasyon çalışmasının yapılan aylık analiz sonucu Şekil 3.15’te gösterilmiştir. Kalluslar bir ay sonunda gelişim göstermemesine rağmen canlı oldukları tespit edilmiştir. Kallusların genel olarak kararmaya eğilimli olmasının yanında bazılarının sarı ve beyaz renktedir. Ön denemeler kapsamında yapılan tüm çalışmalara morfolojik açıdan genel olarak bakıldığında, 1 mg/ BA + MS, OM ve WPM besin ortamlarının kallusların kriyoprezervasyonunda yeterli etkide olmadığı belirlenmiştir. Bu besin ortamlarında kallusların sürgün gelişimi sağlanamamıştır.

Ön denemelerin istatistiki analizi aylık yapılan gözlemler sonucunda elde edilmiştir. Çizelge 3.5’te tüm denemelerde kullanılan kallusların, aylık gelişim indeks değerleri verilmiştir. Elde edilen değerler kallusların bir ay sonundaki çap uzunluğuna göre tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 2.2). Bu değerler baz alınarak istatistiki analizler yapılmış ve en uygun besin ortamı, PVS-2 uygulama süresi belirlenmiştir. PVS-2 uygulama süresinin artması rejenerasyon oranını orantılı bir şekilde artırmaktadır.

Ancak sürenin belli bir düzeyden sonra artması rejenerasyon oranını düşürmektedir. Çünkü PVS-2'nin toksik etkisi bitkilerin zehirlenmesine neden olur ve hücrelerin ölmesine sebep olur. Elde edilen verilere bakıldığında da 105 ve 120 dakika PVS-2 uygulamalarının bitki hücrelerine zarar vermektedir. Dolayısıyla ön denemelerin analizi doğrultusunda diğer denemelerde 60, 75 ve 90 dakika PVS-2 uygulamaları kullanılmıştır.

Besin ortamlarının birbiri ile kıyaslaması yapıldığında ise en iyi besin ortamının 1 mg/L BA+ WPM besin ortamı olarak tespit edilmiştir. 1 mg/L BA+ MS besin ortamı en düşük rejenerasyon oranı vermektedir. Ancak bitki doku kültürü çalışmalarında 1 mg/L NAA+ WPM besin ortamında yeterince kallus gelişimi sağlanamadığından WPM besin ortamı kriyoprezervasyon çalışmalarının devamında kullanılmamıştır.

Çizelge 3.5. Bir ay sonunda kallusların çaplarına göre elde edilen veriler

Denemeler	PVS-2 Uygulama Süresi (Dakika)	1 mg/L BA+ MS ortamında kültüre alınan kallusların indeks değeri	1 mg/L BA+ OM ortamında kültüre alınan kallusların indeks değeri	1 mg/L BA+ WPM ortamında kültüre alınan kallusların indeks değeri
PVS-C	60	3-2-3	3-3-3	3-3-3
PVS-C	75	3-3-3	4-3-3	4-4-3
PVS-C	90	4-3-3	4-4-3	5-4-4
PVS-C	105	4-3-3	3-3-3	4-4-3
PVS-C	120	3-3-3	3-3-2	3-3-3
Deneme-1	60	3-3-3	3-4-3	3-4-3
Deneme-1	75	3-3-3	3-3-3	4-4-3
Deneme-1	90	4-4-3	4-4-3	4-4-4
Deneme-1	105	3-3-3	3-3-3	3-3-2
Deneme-1	120	3-3-3	3-3-3	3-3-3
Deneme-2	60	3-3-4	4-4-4	3-3-3
Deneme-2	75	3-3-4	3-3-3	4-3-3

Çizelge 3.5. (devam)

Deneme-2	90	3-3-4	4-4-4	4-4-3
Deneme-2	105	3-3-3	3-3-3	3-2-2
Deneme-2	120	4-3-3	3-3-3	3-2-3
Deneme-3	60	3-3-4	4-4-4	3-3-4
Deneme-3	75	3-3-3	4-3-3	3-4-4
Deneme-3	90	3-3-3	4-3-3	4-4-3
Deneme-3	105	3-3-3	4-3-3	3-3-2
Deneme-3	120	3-3-2	3-3-3	3-2-2

Çizelge 3.5'te gösterilen veriler, SPSS programı yardımıyla istatistiki açıdan analizi yapılmıştır. Çizelge 3.6'da besin ortamlarının PVS-2 uygulama sürelerine göre kallus gelişim indeksi ve rejenerasyon oranları değerlendirilmiştir.

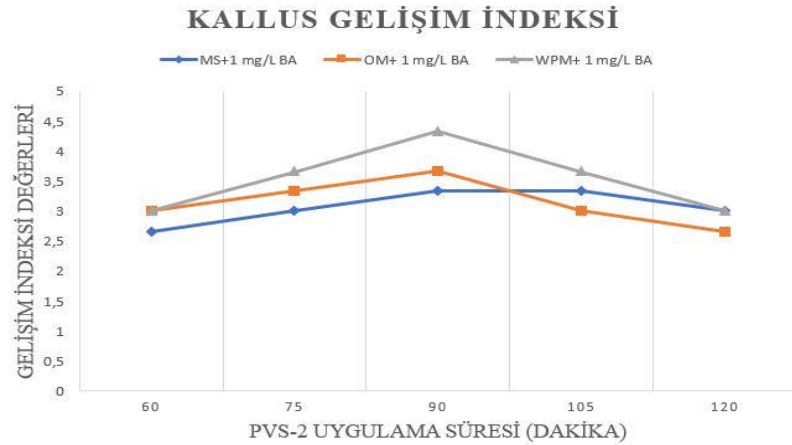
Çizelge 3.6. Ön deneme sonucunda elde edilen istatistiki veriler

PVS-2 UYGULAMA A SÜRELERİ (Dakika)		MS Besin Ortamı		OM Besin Ortamı		WPM Besin Ortamı	
		Kallus Gelişim İndeksi (Değer±SH)	Rejenerasyon Oranı (%±SH)	Kallus Gelişim İndeksi (Değer±SH)	Rejenerasyon Oranı (%±SH)	Kallus Gelişim İndeksi (Değer±SH)	Rejenerasyon Oranı (%±SH)
60	Kontrol	2,75±0,16 ^e	45,92±0,62 ^E	3±0 ^{de}	50,1±0 ^{DE}	3±0 ^{de}	50,1±0 ^{DE}
	Sıvı Azot	3,27±0,08 ^{cd} _e	54,7±0,33 ^{CDE}	3,82±0,06 ^b	63,85±0,26 ^B	3,27±0,08 ^{cd} _e	54,7±0,33 ^{CDE}
75	Kontrol	3,14±0 ^{de}	50,1±0 ^{DE}	3,40±0,16 ^{cd}	56,78±0,63 ^{CD}	3,72±0,14 ^{bc}	62,24±0,5 ^{BC}
	Sıvı Azot	3,14±0,06 ^{cd} _e	52,48±0,27 ^{CD} _E	3,14±0,06 ^{cd} _e	52,48±0,27 ^{CD} _E	3,62±0,08 ^c	60,53±0,35 ^C
90	Kontrol	3,40±0,16 ^{cd}	56,78±0,63 ^{CD}	3,72±0,14 ^{bc}	62,24±0,55 ^{BC}	4,38±0,14 ^a	73,22±0,55 ^A
	Sıvı Azot	3,40±0,16 ^{cd}	56,78±0,63 ^{CD}	3,72±0,14 ^{bc}	62,24±0,55 ^{BC}	4,38±0,14 ^a	73,22±0,55 ^A

Çizelge 3.6. (devam)

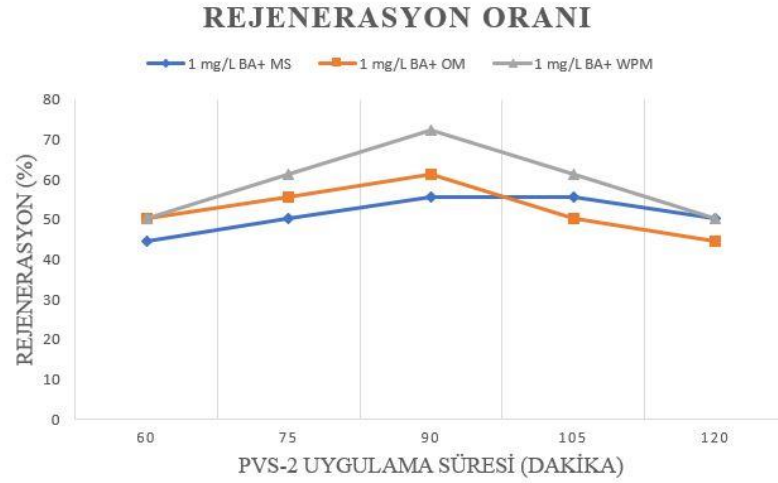
90	Sıvı Azot	3,40±0,09 ^{cd}	56,78±0,36 ^{CD}	3,72±0,78 ^{bc}	62,24±0,31 ^{BC}	3,82±0,06 ^b	63,85±0,26 ^B
105	Kontrol	3,40±0,16 ^{cd}	56,78±0,63 ^{CD}	3±0 ^{de}	50,1±0 ^{DE}	3,72±0,14 ^{bc}	62,24±0,55 ^{BC}
	Sıvı Azot	3±0 ^{de}	50,1±0 ^{DE}	3,14±0,06 ^{cde}	52,48±0,27 ^{CDE}	2,65±0,1 ^f	44,29±0,4 ^F
120	Kontrol	3±0 ^{de}	50,1±0 ^{DE}	2,75±0,16 ^e	45,92±0,62 ^E	3±0 ^{de}	50,1±0 ^{DE}
	Sıvı Azot	3,07±0,09 ^{de}	51,33±0,36 ^{DE}	3±0 ^e	50,1±0 ^E	2,84±0,74 ^e	47,42±0,29 ^E

Ön denemeler neticesinde elde edilen verilere bağlı olarak PVS-C grubu ile sıvı azot grupları değişik grafiklerle değerlendirilmiştir. Şekil 3.16’da gösterilen grafik PVS-C grubunun kallus gelişim indeksi verilerini göstermektedir.



Şekil 3.16. Kontrol grubu için kültüre alınan kallusların gelişim indeks değerleri

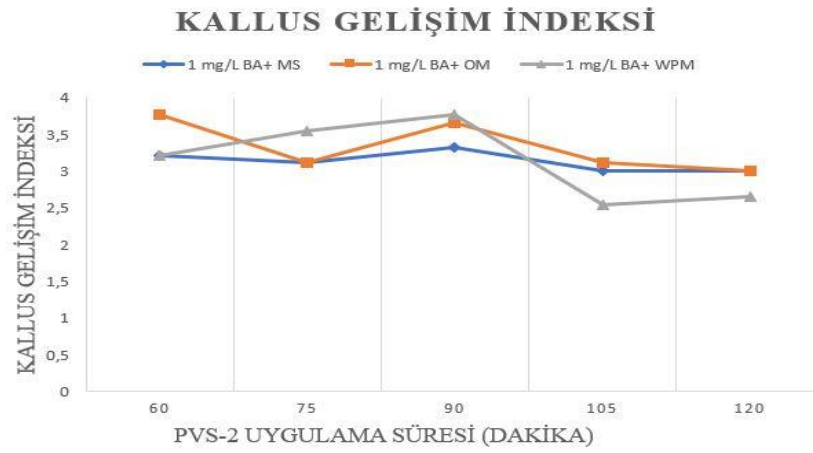
Şekil 3.17’te gösterilen grafik ise PVS-C grubunun rejenerasyon oranını yüzde olarak ifade etmektedir.



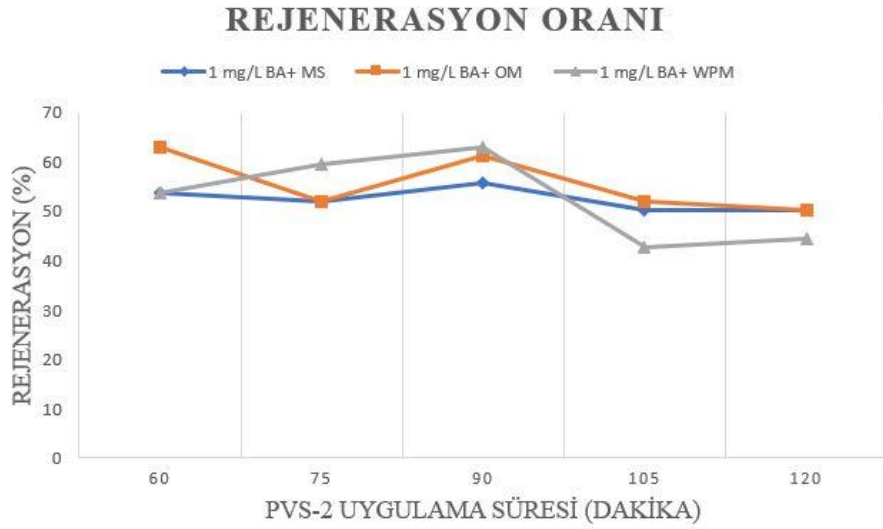
Şekil 3.17. Ön denemeler sonucunda kontrol grubu için kültüre alınan kallusların rejenerasyon oranı

Ön denemelerde kontrol grupları Şekil 3.16 ve Şekil 3.17’te verilen grafiklere göre değerlendirildiğinde 90 dakika PVS-2 uygulama süresinin diğerlerine kıyasla daha iyi sonuç verdiği söylenebilir. Bununla birlikte PVS-2 uygulama süresinin en az ve en çok olan uygulamalarda rejenerasyon oranları arasında fark olmadığı tespit edilmiştir.

Şekil 3.18 ve Şekil 3.19’de verilen grafikler ise kriyoprezerve edilmiş kallusların istatistiki açıdan analizini ifade etmektedir.



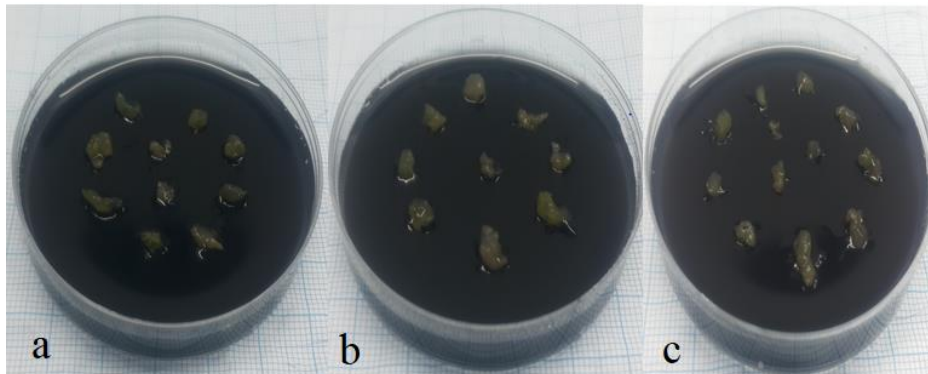
Şekil 3.18. Kriyoprezerve edilmiş kallusların gelişim indeksi değerlerinin eğimi



Şekil 3.19. Kriyoprezerve edilmiş kallusların rejenerasyon eğimi

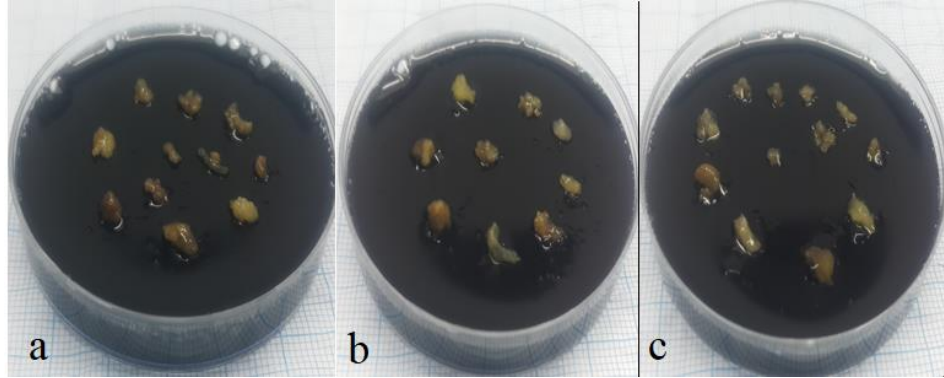
İstatistiki açıdan ön denemeler değerlendirildiğinde, kriyoprezerve edilmiş kallusların en yüksek rejenerasyon oranını 60 ve 90 dakika PVS-2 uygulamalarında vermiştir. Sürenin 90 dakikadan fazla olduğunda rejenerasyon oranı düşmüştür. Dolayısıyla bundan sonraki yapılan kriyoprezervasyon çalışmasında 105 ve 120 dakikalık PVS-2 uygulamaları kaldırılmıştır.

Kriyoprezervasyon çalışmasında en uygun protokolü belirlemek için ön denemeler neticesine bağlı olarak yeni çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmada iki farklı besin ortamı ve üç farklı PVS-2 uygulama süresi (60, 75 ve 90 dakika) kullanılmıştır. 0,5 mg/L BA+0,2 mg/L NAA+ MS ve OM besin ortamları tercih edilmiştir. Şekil 3.20’de MS besin ortamına kültüre alınan PVS-C grubu gösterilmiştir.



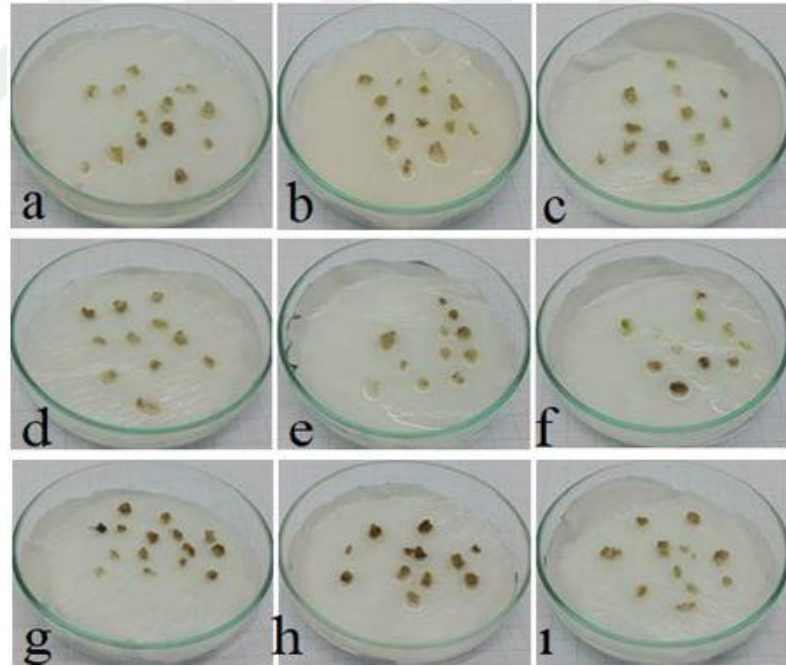
Şekil 3.20. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ MS besin ortamına kültüre alınan PVS-C grubu (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması)

Şekil 3.21’de ise OM besin ortamına kültüre alınan PVS-C grubu gösterilmiştir.

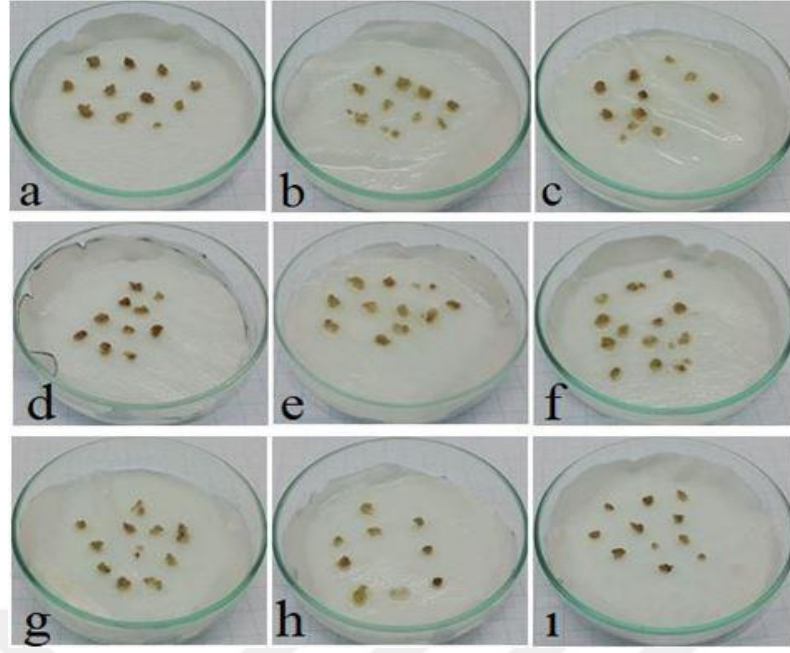


Şekil 3.21. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ MS besin ortamına kültüre alınan PVS-C grubu (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması)

Bu çalışma protokolünde ek olarak kriyoprezerve edilmiş kalluslar 1 gün 10 mg/L GA₃+ MS ve OM sıvı besin ortamlarında kültüre alınmıştır (Bkz. Şekil 3.22 ve Şekil 3.23).

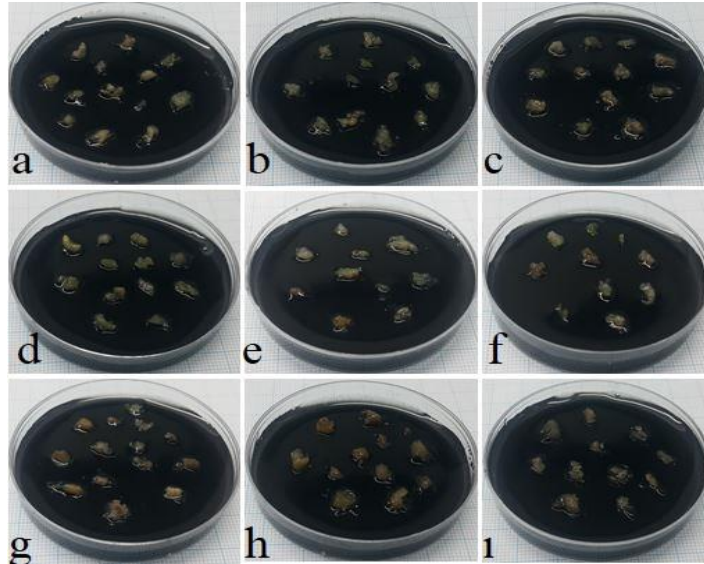


Şekil 3.22. Kriyoprezerve edilmiş kallusların 10 mg/L GA+MS besin ortamında kültüre alınması (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

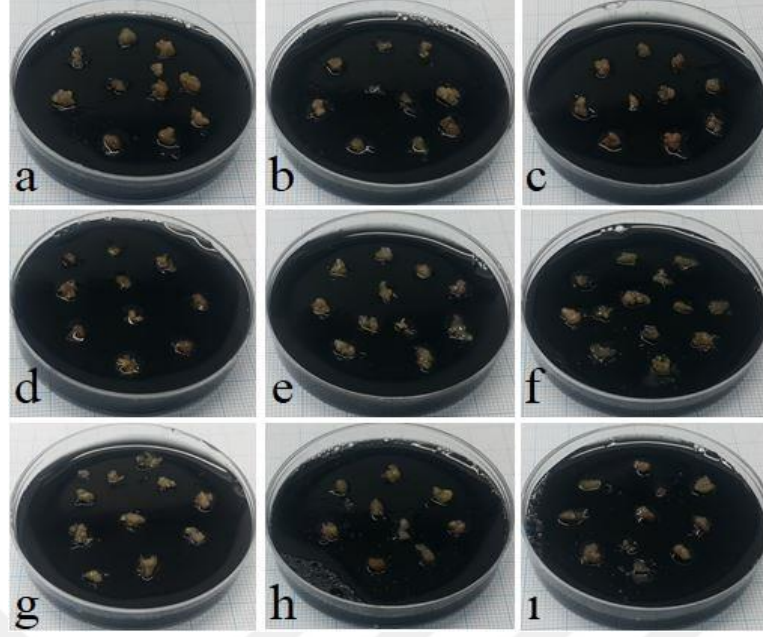


Şekil 3.23. Kriyoprezerve edilmiş kallusların 10 mg/L GA+OM besin ortamında kültüre alınması (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Kriyoprezerve edilmiş kalluslar daha sonra 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ MS ve OM besin ortamlarında kültüre alınmıştır (Bkz. Şekil 3.24 ve Şekil 3.25).

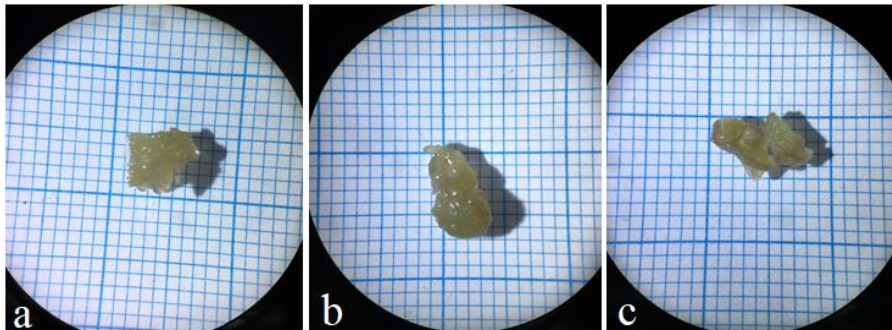


Şekil 3.24. Kriyoprezerve edilmiş kallusların 0,5 mg/L BA+0,2 mg/L NAA+MS besin ortamında kültüre alınması (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması)



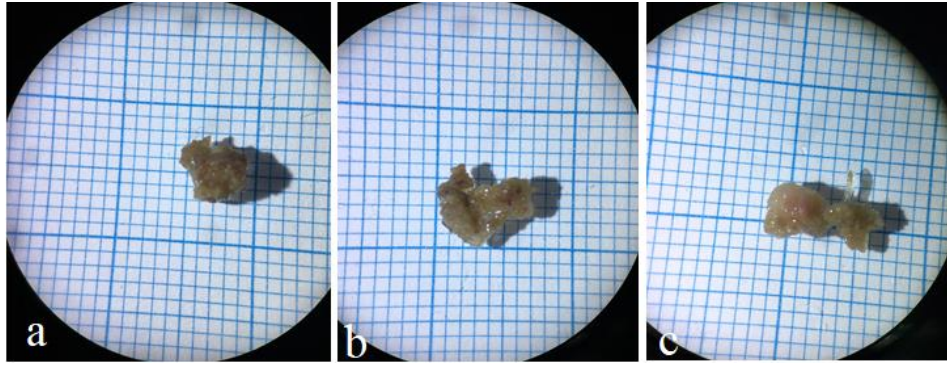
Şekil 3.25. Kriyoprezerve edilmiş kallusların 0,5 mg/L BA+0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınması (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, i: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, i: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılan bitki materyalinin canlılığı TZ testi ile kontrol edilebilmektedir. Çalışma öncesi kalluslardan birkaçı seçilerek TZ ile muamelesi yapılmıştır. Eğer kalluslar canlı ise ortama oksijen verir. TZ solüsyonu ise ortamdaki oksijeni yakalayarak kırmızı renk oluşumunu sağlar. Sonuç itibariyle mikroskop altında yapılan incelemede kırmızı rengin olması kullanılan bitki materyalinin canlılığını ifade eder. Bu çalışmada kallusların canlılığı bu test ile kontrol edilmiştir. MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ test sonucunun stereo mikroskop altındaki analizi Şekil 3.26’da verilmiştir.



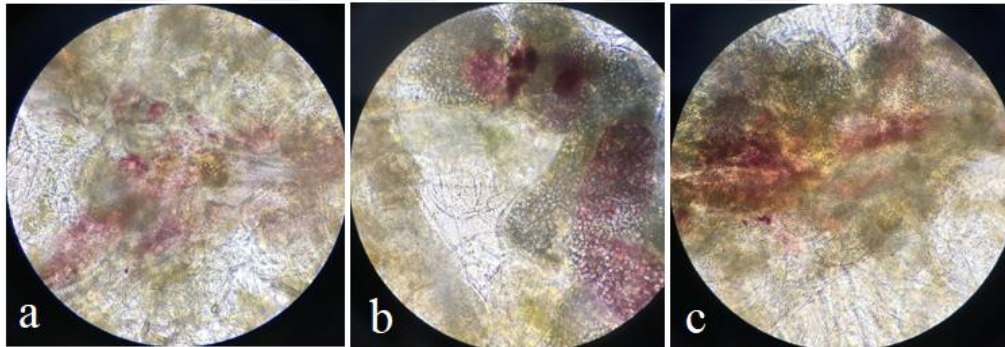
Şekil 3.26. MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun stereo mikroskopta TZ test sonucu (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması)

Şekil 3.27’de ise OM besin ortamında kültüre alınan PVS- C grubunun stereo mikroskoptaki TZ sonucu verilmiştir.



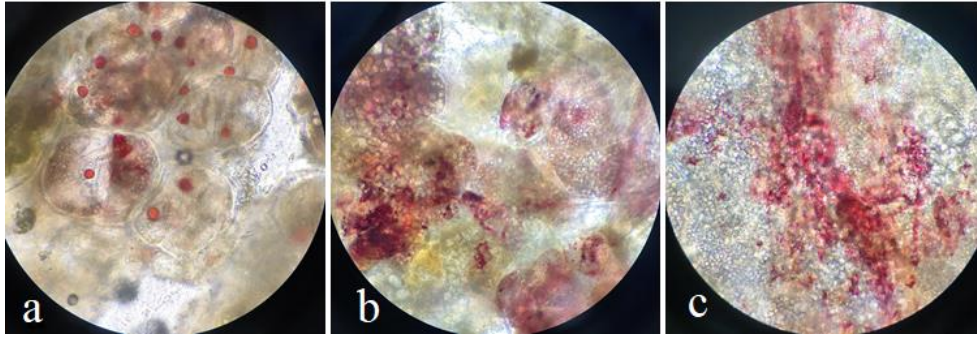
Şekil 3.27. OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun stereo mikroskopta TZ test sonucu (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması)

TZ testlerinin ışık mikroskobu analizi ile canlılığın varlığı tespit edilebilmektedir. Şekil 3.28’de MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ sonucunun ışık mikroskobu altında görüntüsü verilmiştir.



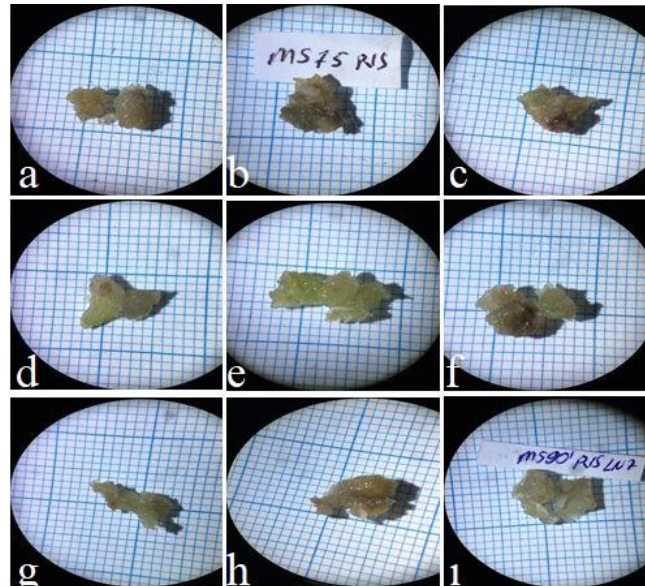
Şekil 3.28. MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun ışık mikroskobundaki TZ test sonucu (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması)

Elde edilen sonuç, kullanılan kallusların kriyoprezervasyon çalışmasından önce canlı olduğunu ifade etmektedir. Şekil 3.29’da ise OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ test sonuçlarının ışık mikroskobundaki analizini ifade etmektedir.



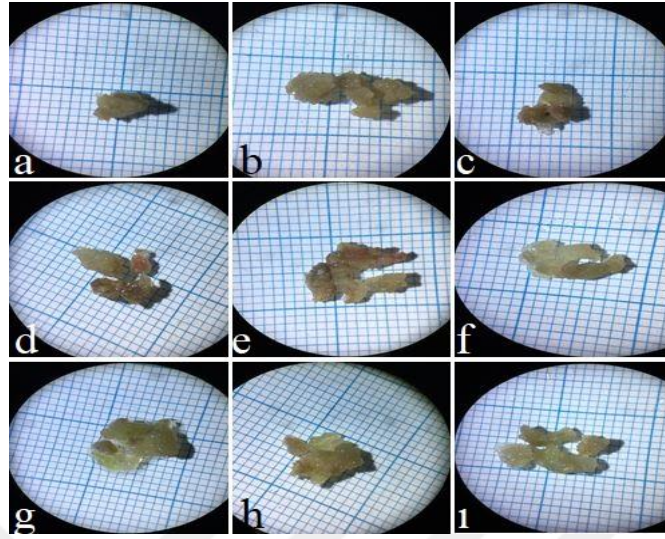
Şekil 3.29. OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun ışık mikroskobundaki TZ test sonucu (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması)

Şekil 3.29'da verilen görüntüye bakıldığında OM besin ortamı için kullanılan kallusların kriyoprezervasyon çalışması için canlılık açısından uygun olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak bakıldığında dondurma işlemi uygulanmayan kallusların canlı olduğu bu test ile kanıtlanmıştır. Dondurma işlemi uygulanan kallusların yani kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testi, çözündürme aşamasından hemen sonra seçilen birkaç kallus ile yapılmıştır. PVS-C grubunda olduğu gibi kalluslar 1 gün TZ solüsyonuna maruz bırakılmıştır. MS besin ortamında kültür alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin stereo mikroskoptaki sonucu Şekil 3.30'da verilmiştir.



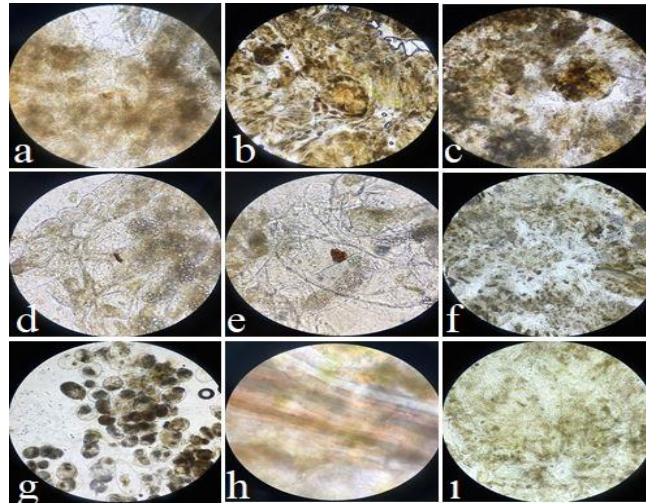
Şekil 3.30. MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların stereo mikroskopta TZ test sonucu (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, i: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, i: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Şekil 3.31’da ise OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin stereo mikroskoptaki görüntüsü verilmiştir.

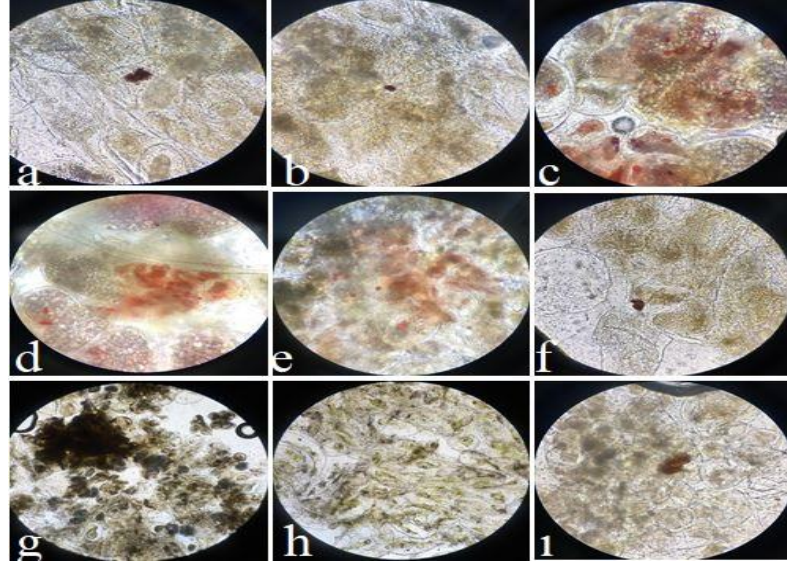


Şekil 3.31. OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların stereo mikroskopta TZ test sonucu (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ test sonuçları ışık mikroskobu altında analizi yapılmış, Şekil 3.32 ve Şekil 3.33’de gösterilen görüntüler elde edilmiştir.

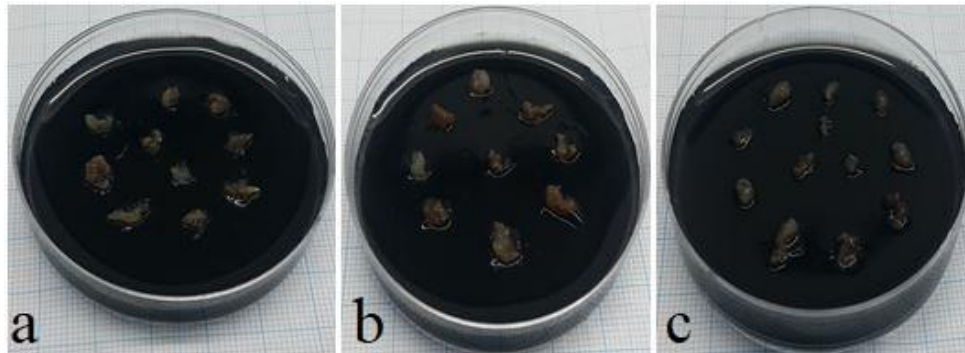


Şekil 3.32. MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların ışık mikroskobundaki TZ test sonucu (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

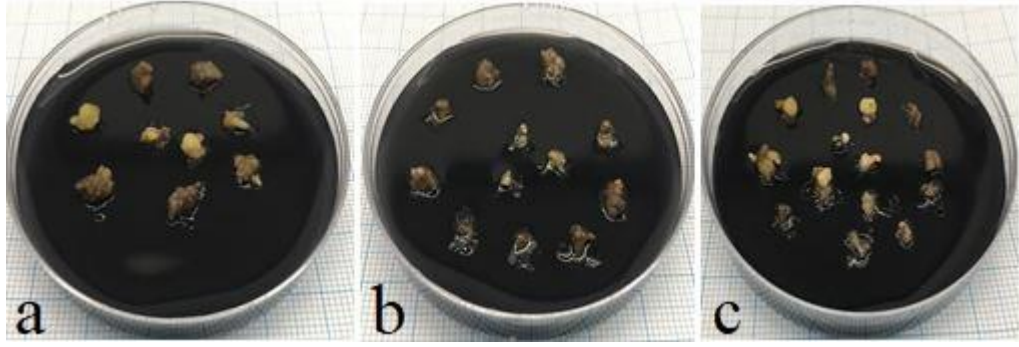


Şekil 3.33. MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların ışık mikroskobundaki TZ test sonucu (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ test sonuçlarına bakıldığında, bazı kalluslarda canlılığın dondurmanın etkisine bağlı olarak kaybolduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte kallusların çoğunluğunun canlılığını koruduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın istatistiki analizi kallusların aylık çap ölçümüne göre yapılmıştır. Ön denemede yapıldığı gibi kallusların aylık olarak gelişim süreci incelenmiş ve çap uzunluğuna bağlı olarak rejenerasyon oranı tespit edilmiştir. PVS-C grubu için kültüre alınan kallusların bir ay sonundaki gelişimi Şekil 3.34 ve Şekil 3.35'te gösterilmiştir.

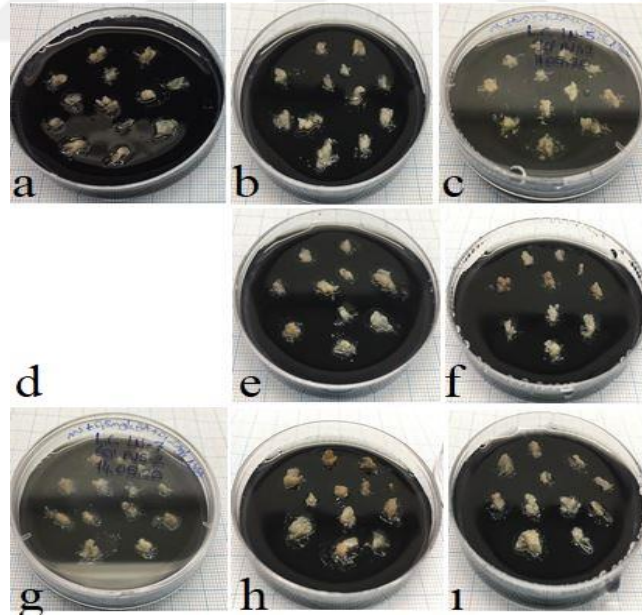


Şekil 3.34. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun bir aylık gelişimi (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması)

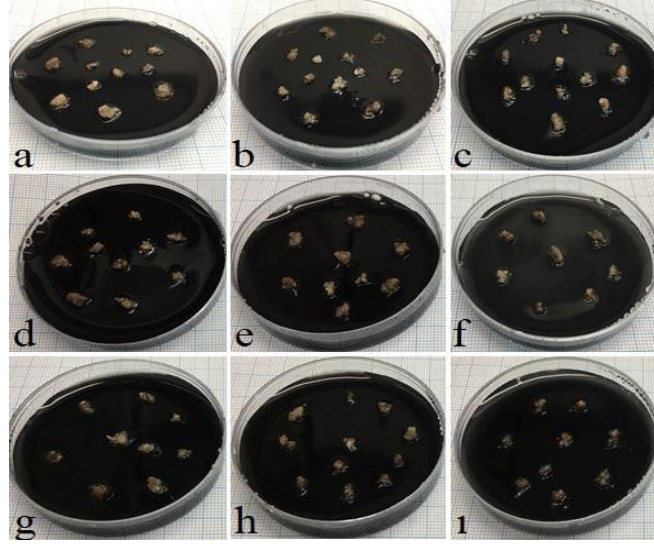


Şekil 3.35. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun bir aylık gelişimi (a:60, b:75 ve c:90 dakika PVS-2 uygulaması)

PVS-C grubunun bir ay sonunda elde edilen görüntülere bakıldığında MS besin ortamında kültüre alınan kalluslarda canlılık devam etmesine rağmen soğancık gelişimi gözlenememiştir. Bununla birlikte OM besin ortamında kültüre alınan kalluslarda sürgün gelişimi gözlenmiştir (Bkz. Şekil 3.35a ve Şekil 3.35c). 60 ve 90 dakika PVS-2 uygulamalarında kısmen sürgün gelişimi başlamıştır. Kriyoprezerve edilmiş kallusların bir ay sonunda yapılan gözlemler neticesinde Şekil 3.36 ve Şekil 3.37’te gösterilen görüntüler elde edilmiştir.

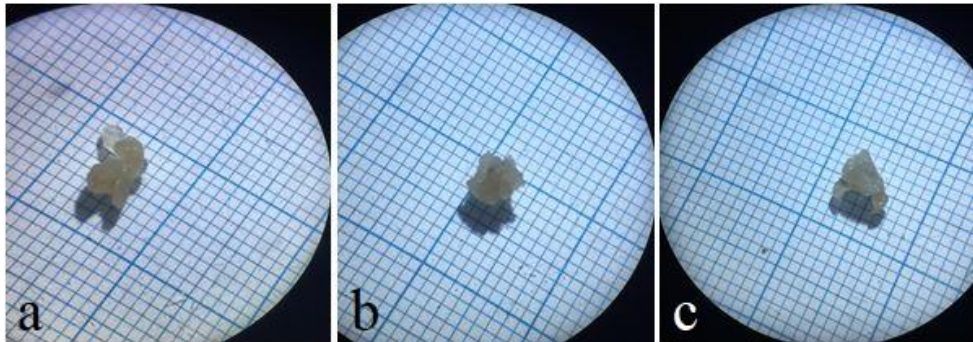


Şekil 3.36. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların bir aylık gelişimi (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması; d: kontamine)



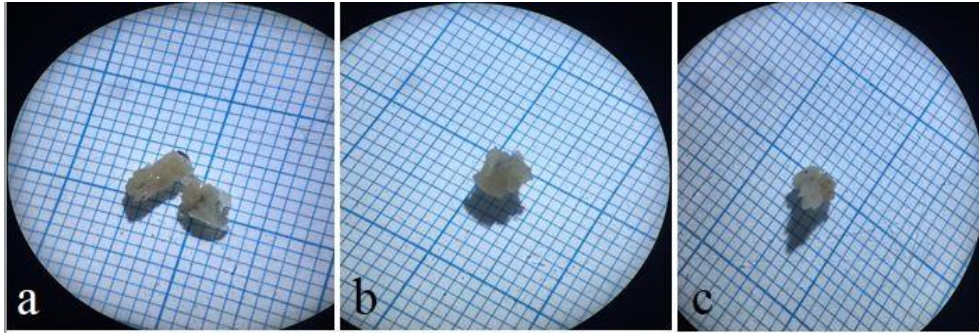
Şekil 3.37. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların bir aylık gelişimi (a, b, c: Deneme-1, d, e, f: Deneme-2, g, h, ı: Deneme-3; a, d, g: 60, b, e, h: 75, c, f, ı: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Kriyoprezerve edilmiş kallusların morfolojik açıdan analizine bakıldığında, genel anlamda canlı oldukları ama sürgün gelişimine başlamadıkları belirlenmiştir. Bununla birlikte OM besin ortamında kültüre alınan kallusların bazılarında kısmen soğancık gelişimine başladığı gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 3.37a ve Şekil 3.37g). Kallusların rejenerasyon yeteneğini artırmak için büyüme düzenleyicilerin konsantrasyonları değiştirilmiştir. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ MS ve OM besin ortamlarında kalluslar kültüre alınmıştır. Bir ay boyunca kültür işlemi uygulanmış ve sonuçlar TZ testi ile analiz edilmiştir. Şekil 3.38’de MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun stereo mikroskopta analizi verilmiştir.



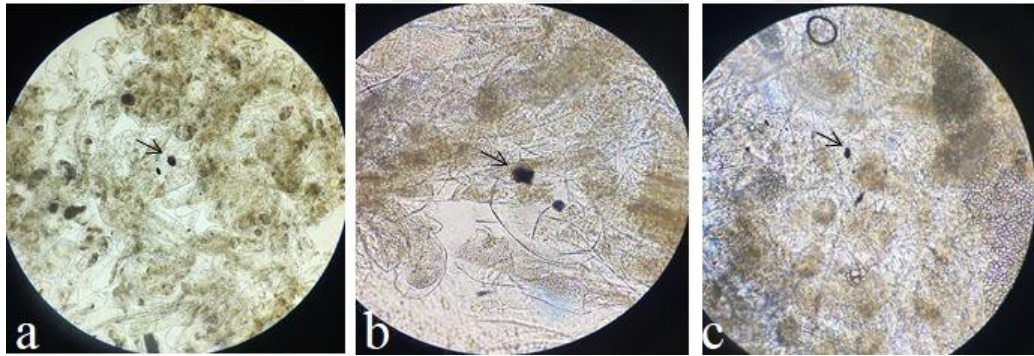
Şekil 3.38. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin stereo mikroskoptaki görüntüsü (a: 60, b:75 ve c: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Şekil 3.39’da ise OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin stereo mikroskop analizi verilmiştir.



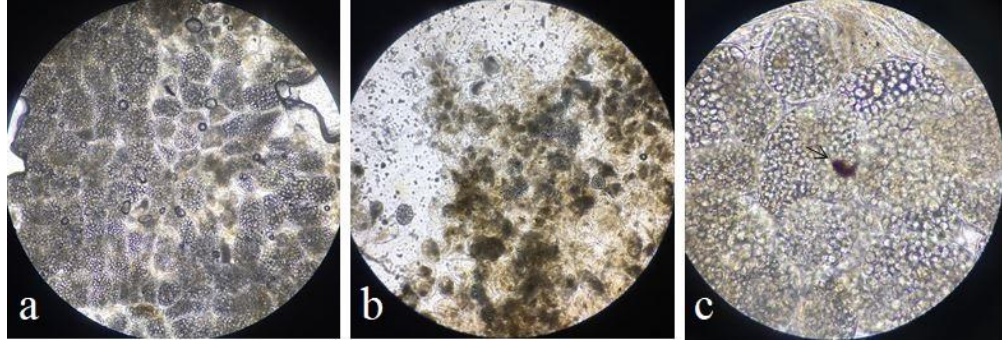
Şekil 3.39. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin stereo mikroskoptaki görüntüsü (a: 60, b:75 ve c: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

TZ testinin ışık mikroskobu ile analizi yapılarak kallusların canlılığı test edilmiştir. Şekil 3.40’ta MS besin ortamında kültüre alınan kallusların TZ testinin analizi verilmiştir.



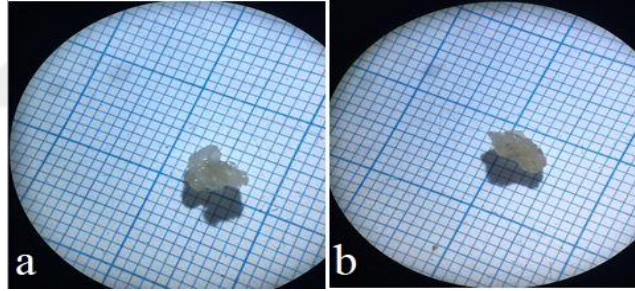
Şekil 3.40. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (a: 60, b:75 ve c: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Şekle bakıldığında ok ile gösterilen kısımların kırmızı olması kallusların canlı olduklarını ifade eder. Bu durum kallusların uyku (dormansi) olduğunu zaman geçtikçe büyüyebileceğini göstermektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde üç PVS-2 uygulaması da başarılı bir şekilde uygulanmıştır. OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin ışık mikroskobu analizi Şekil 3.41’de gösterilmiştir.

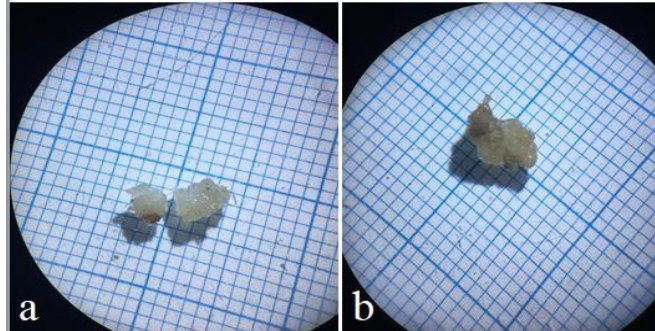


Şekil 3.41. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (a: 60, b:75 ve c: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

OM besin ortamında kültüre alınan kallusların TZ analizine bakıldığında sadece 90 dakika PVS-2 uygulamasında canlılık tespit edilmiştir. Diğer uygulamalarda ise canlılık gözlenememiştir. Kriyoprezerve edilmiş kallusların canlılık testi uygulanmıştır. Stereo mikroskopta yapılan analizler Şekil 3.42 ve Şekil 3.43'te verilmiştir.

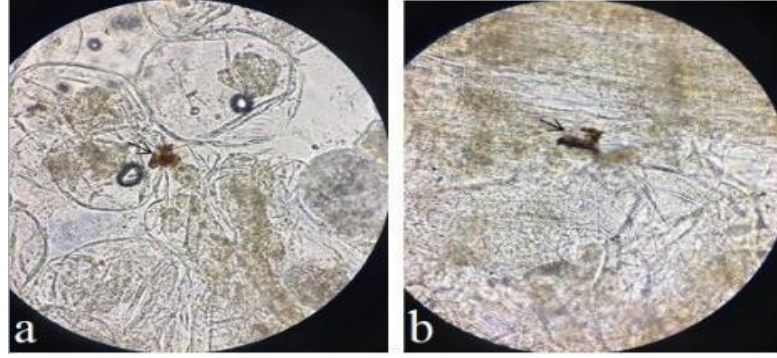


Şekil 3.42. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin stereo mikroskopta görüntüsü (a: 75 ve b:90 PVS-2 uygulaması)



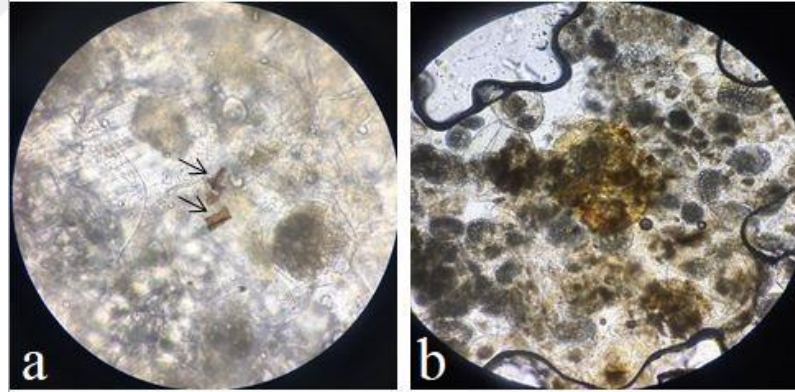
Şekil 3.43. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin stereo mikroskopta görüntüsü (a: 60 ve b:75 PVS-2 uygulaması)

Kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ test uygulamasının ışık mikroskobu altında yapılan analizler Şekil 3.44 ve Şekil 3.45'te gösterilmiştir.



Şekil 3.44. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ MS besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (a: 75 ve b:90 PVS-2 uygulaması)

MS besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların canlılıklarının devam yapılan TZ testi kanıtlanmıştır. 60 dakika PVS-2 uygulamasının kontamine olması sebebiyle TZ testi uygulanamamıştır. 75 ve 90 dakikalık PVS-2 uygulamaları ise başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.45. 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (a: 60 ve b:75 PVS-2 uygulaması)

OM besin ortamında kültürlen kriyoprezerve edilmiş kallusların canlılık test sonucuna göre kısmen canlı oldukları gözlemlenmiştir. Bu besin ortamında 90 dakika PVS-2 uygulamasının kontamine olması sebebiyle TZ testi uygulanamamıştır. 60 dakika uygulamasında ise belirgin şekilde kırmızılık elde edilmesi uygulamanın başarılı olduğunu kanıttır. 75 dakika PVS-2 uygulamasına bakıldığında ise turuncu rengi elde

edilmesi kısmen canlılığı ifade eder. Sonuç olarak bakıldığında bu çalışmada sürgün gelişimi gözlenememiştir fakat kalluslar canlıdır.

Bu çalışmanın istatistiki açıdan analizi ise kallusların aylık çap uzunluğuna göre yapılmıştır. Çizelge 3.7’de kallusların gelişim indeks değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.7. Bir ay sonunda kallusların çapına bağlı elde edilen veriler

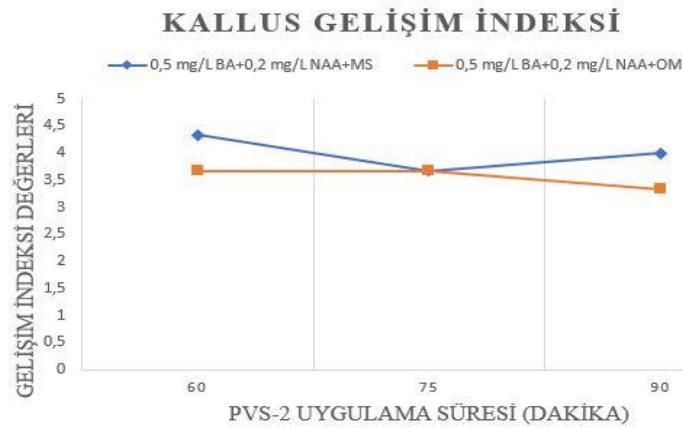
Denemeler	PVS-2 Uygulama Süresi (Dakika)	0,5 mg/L BA+ 0,2 NAA+ MS besin ortamında	0,5 mg/L BA+ 0,2 NAA+ OM besin ortamında
		kültüre alınan kallusların değerleri	kültüre alınan kallusların değerleri
PVS-C	60	4-4-5	3-4-4
PVS-C	75	3-4-4	3-4-4
PVS-C	90	3-4-5	3-3-4
Deneme-1	60	3-4-4	3-4-4
Deneme-1	75	3-4-4	3-3-4
Deneme-1	90	3-4-4	3-3-4
Deneme-2	60	Kontamine	3-4-4
Deneme-2	75	3-4-4	3-4-4
Deneme-2	90	3-3-4	3-3-4
Deneme-3	60	3-3-4	3-3-4
Deneme-3	75	3-4-4	3-3-4
Deneme-3	90	3-4-4	3-4-4

Kallusların gelişim indeks değerleri baz alınarak SPSS programı vasıtasıyla istatistiki analiz gerçekleştirilmiştir. Kallusların rejenerasyon oranı yüzdelerle ifade edilmiştir. Çizelge 3.8’de yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen veriler verilmiştir.

Çizelge 3.8. 0,5 mg/L BA+0,2 mg/L NAA+ MS ve OM besin ortamları kullanılarak yapılan çalışmanın istatistiki analizi sonucu elde edilen veriler

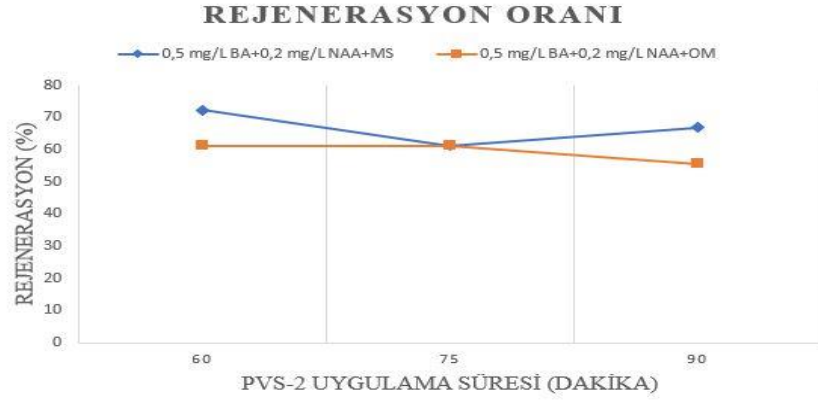
PVS-2 UYGULAMA SÜRELERİ (Dakika)		MS Besin Ortamı		OM Besin Ortamı	
		Kallus Gelişim İndeksi (Değer±SH)	Rejenerasyon Oranı (%±SH)	Kallus Gelişim İndeksi (Değer±SH)	Rejenerasyon Oranı (%±SH)
60	Kontrol	4,38±0,14 ^a	73,22±0,55 ^A	3,72±0,14 ^b	62,24±0,55 ^B
	Sıvı Azot	3,57±0,11 ^b	59,64±0,44 ^B	3,62±0,08 ^b	60,53±0,35 ^B
75	Kontrol	3,72±0,14 ^b	62,24±0,55 ^B	3,72±0,14 ^b	62,24±0,55 ^B
	Sıvı Azot	3,72±0,07 ^b	62,24±0,31 ^B	3,51±0,09 ^b	58,71±0,36 ^B
90	Kontrol	4,16±0,24 ^a	69,58±0,94 ^A	3,40±0,16 ^b	56,78±0,63 ^B
	Sıvı Azot	3,62±0,08 ^b	60,53±0,35 ^B	3,51±0,09 ^b	58,71±0,36 ^B

Çizelge 3.8’de verilen veriler dikkate alınarak kültüre alınan kallusların gelişim indeksi ve rejenerasyon oranını ifade eden grafikler elde edilmiştir. Şekil 3.38’de gösterilen grafik PVS-C için kültüre alınan kallusların aylık gelişim indeks değerlerinin, PVS-2 uygulama süresi ve besin ortamına göre artışı ya da azalışını ifade etmektedir.



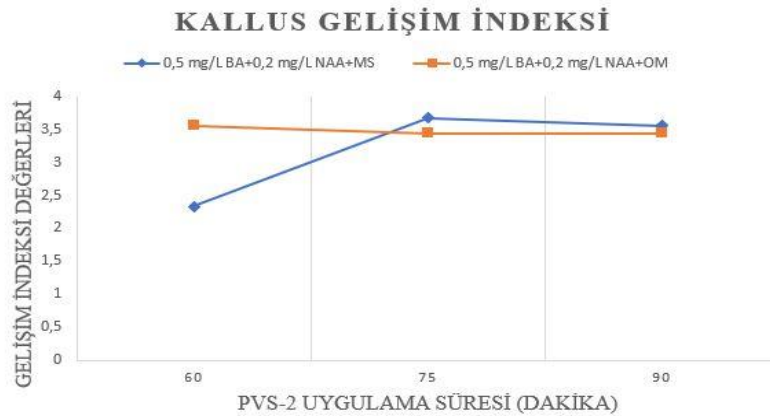
Şekil 3.46. PVS-C grubunun kallus gelişim indeksinin PVS-2 uygulama süresi ve besin ortamına göre büyüme eğrisi

Şekil 3.46’da verilen grafik dikkate alındığında PVS-2 uygulama süreleri arasında fark olmadığı belirlenmiştir. Üç sürede benzer büyüme eğrisine sahiptir. Besin ortamları kıyaslandığında ise MS besin ortamı 60 ve 90 dakika PVS-2 uygulamalarında, OM besin ortamına göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Kallusların rejenerasyon yüzdelerinin artış-azalış grafiği Şekil 3.47’de gösterilmiştir.

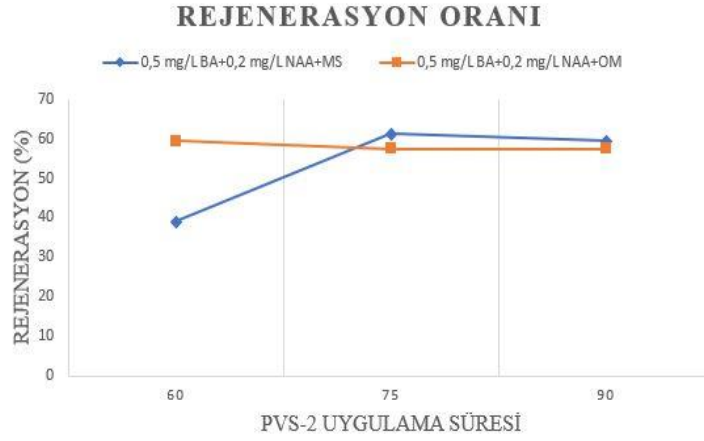


Şekil 3.47. PVS-C grubunun rejenerasyon oranının PVS-2 uygulama süresi ve besin ortamına göre büyüme eğrisi

PVS-C için kültüre alınan kallusların rejenerasyon oranının büyüme eğrisine bakıldığında, kallus gelişim indeksine benzer şekilde sonuç elde edilmiştir. PVS-2 uygulama süreleri benzer sonuçlar vermiştir. En iyi besin ortamı ise MS besin ortamıdır. Kriyoprezerve edilmiş kallusların istatistiki analizi ise Şekil 3.48 ve Şekil 3.49’da verilmiştir.



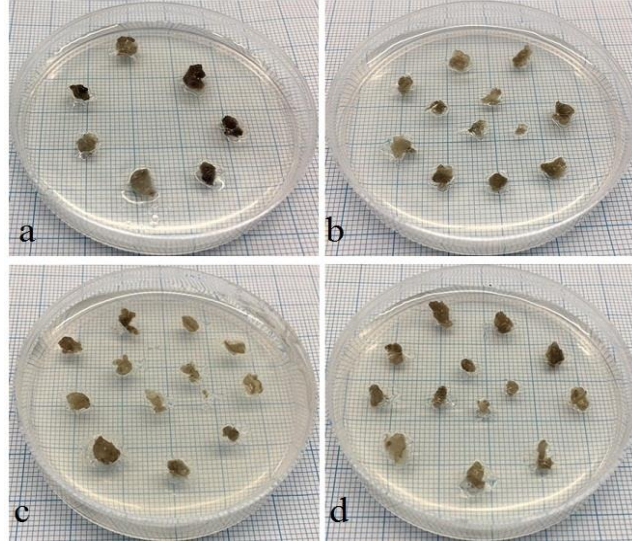
Şekil 3.48. Kriyoprezerve edilmiş kallusların kallus gelişim indeksi eğrisi



Şekil 3.49. Kriyoprezerve edilmiş kallusların rejenerasyon oranı

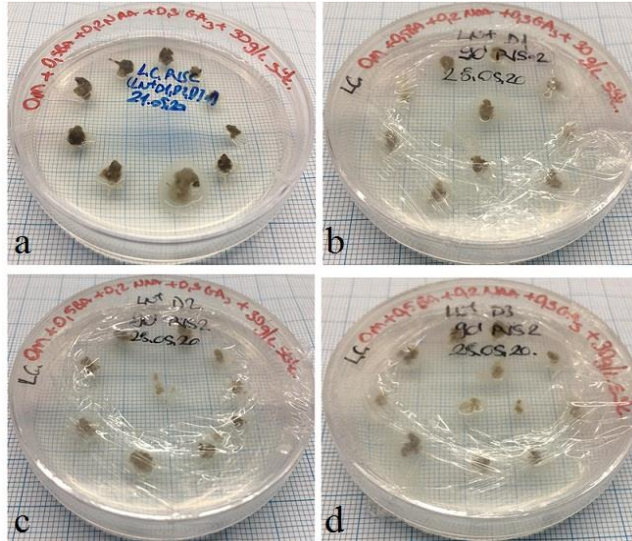
Kriyoprezerve edilmiş kallusların her iki grafiğine de bakıldığında 75 ve 90 dakika PVS-2 uygulamasının daha başarılı olduğu, kullanılan besin ortamları arasında büyük fark olmadığı tespit edilmiştir. 60 dakika PVS-2 uygulamasında bir denemenin kontamine olması rejenerasyon oranını düşürmesinde etkili olmuştur. Sonuç olarak, 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ MS, OM besin ortamları ile yapılan bu kriyoprezervasyon çalışmasında kallusların istenilen düzeyde rejenerasyon oranı elde edilememiştir. Yapılan morfolojik analizlerde ise kallusların çoğunluğunun kararma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Kallusların dormansi etkisinde olduğu düşünülerek yeni bir kriyoprezervasyon çalışması uygulanmıştır. Bu çalışmada iki farklı besin ortamı ve bir adet PVS-2 uygulama süresi kullanılmıştır. Buradaki asıl amaç kriyoprezerve edilmiş kallusların uygun besin ortamını belirlemek içindir. Diğer çalışmalarda PVS-2 uygulamaları arasında 90 dakikanın daha iyi olması sebebiyle, bu süre seçilmiştir. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ 0,3 GA₃+ MS, OM besin ortamları kömür tozu olmadan kullanılmıştır. Ortam koşulları yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi oda sıcaklığında ve 16 saatlik fotoperiyotta kültür işlemi uygulanmıştır. Kriyoprezervasyon protokolü ise ön denemede uygulandığı gibi yapılmıştır.

Bu çalışmada ön deneme ve diğer çalışmalarda olduğu gibi kallusların morfolojik ve istatistiki analizi aylık gelişime göre yapılmıştır. Şekil 3.50 ve 3.51’de yapılan çalışmada kullanılan kallusların aylık gelişimi gösterilmiştir. Şekil 3.50’de 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ 0,3 mg/L GA₃+ MS besin ortamında kültüre alınan kallusların aylık görünümü vardır.



Şekil 3.50. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ 0,3 mg/L GA₃+ MS besin ortamında kültüre alınan kallusların aylık gelişimi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 ve d: Deneme-3)

Şekil 3.50a'ya bakıldığında PVS-C için kültüre alınan kalluslar kararmaya ve sertleşmeye başlamışlardır. Ancak kriyoprezerve edilmiş kallusların daha iyi durumda oldukları gözlemlenmiştir. Beyaz renge ve yumuşak yapıya sahip olmaları hala canlı olduklarını ifade eder. Şekil 3.51'de ise 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ 0,3 mg/L GA₃+ OM besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi verilmiştir.



Şekil 3.51. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ 0,3 mg/L GA₃+ MS besin ortamında kültüre alınan kallusların aylık gelişimi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 ve d: Deneme-3)

OM besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık morfolojik analizi sonucunda Şekil 3.51 elde edilmiştir. Şekil 3.51a'da gösterilen, PVS-C için kültüre alınan kalluslar kararmışlardır. Kriyoprezerve edilmiş kallusların ise canlılıklarının devam ettiği fakat sürgün gelişimine başlamadığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın istatistiki analizi diğer çalışmalarda olduğu gibi kallusların çap uzunluğuna bağlı olarak yapılmıştır. Çizelge 3.9'da kallusların çap uzunluğuna bağlı elde edilen kallus gelişim indeks değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.9. Kallusların aylık gelişimine bağlı elde edilen kallus gelişim indeks değerleri

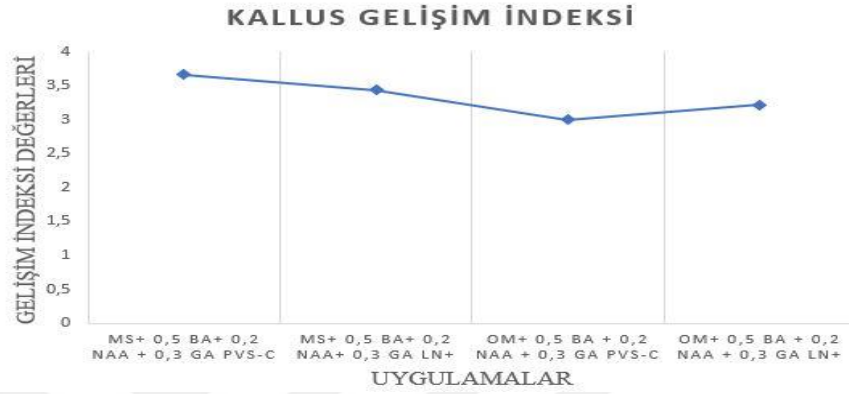
Denemeler	0,5 mg/L BA, 0,2 mg/L NAA 0,3 mg/L GA ilaveli MS besin ortamı	0,5 mg/L BA, 0,2 mg/L NAA 0,3 mg/L GA ilaveli OM besin ortamı
	ortamı	ortamı
PVS-C	4-4-3	4-2-3
DENEME-1	4-3-3	4-3-3
DENEME-2	4-4-3	3-3-3
DENEME-3	4-3-3	4-3-3

Yapılan kriyoprezervasyon çalışması sonucunda elde edilen kallus gelişim indeks değerleri kullanılarak SPSS programında istatistiki açıdan analiz gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.10'da elde edilen veriler gösterilmiştir.

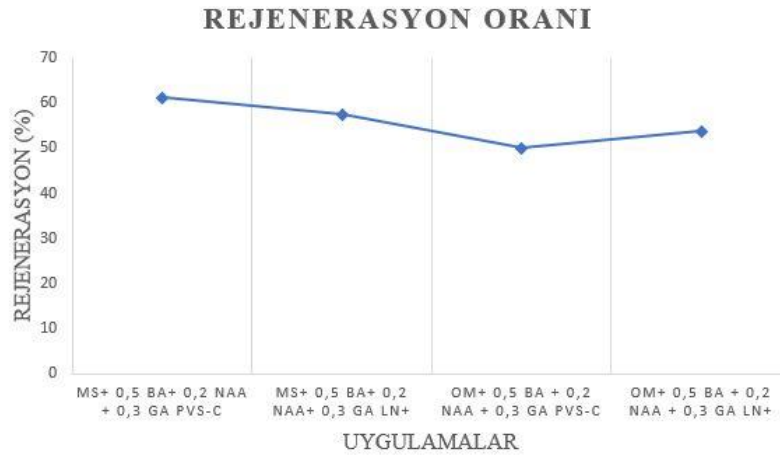
Çizelge 3.10. İstatistiki analiz sonucunda elde edilen veriler

PVS-2 UYGULAMA SÜRESİ (Dakika)		MS Besin Ortamı		OM Besin Ortamı	
		Kallus Gelişim İndeksi (Değer±SH)	Rejenerasyon Oranı (%±SH)	Kallus Gelişim İndeksi (Değer±SH)	Rejenerasyon Oranı (%±SH)
90	Kontrol	3,66±0,33 ^{ab}	61,23±5,56 ^{AB}	3±0,28 ^b	50,10±4,82 ^B
	Sıvı Azot	3,44±0,12 ^a	57,52±2,01 ^A	3,22±0,07 ^a	53,81±1,17 ^A

Kriyoprezervasyon çalışması sonucunda elde edilen verilere bağlı olarak kallusların gelişim indeks değeri ve rejenerasyon oranı istatistiki açıdan değerlendirilmiştir. Kallus gelişim indeks değeri baz alınarak, kullanılan besin ortamları ve uygulanan uygulamalar (PVS-C ve LN- kriyoprezerve edilmiş kalluslar) Şekil 3.52’de gösterilen grafikte değerlendirilmiştir. Şekil 3.53’te ise kallusların rejenerasyon yüzdelerinin grafiği verilmiştir.



Şekil 3.52. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ 0,3 mg/L GA₃+ MS, OM besin ortamları ile yapılan kriyoprezervasyon çalışmasında kallus gelişim indeks değerlerinin istatistiki açıdan değerlendirilmesi

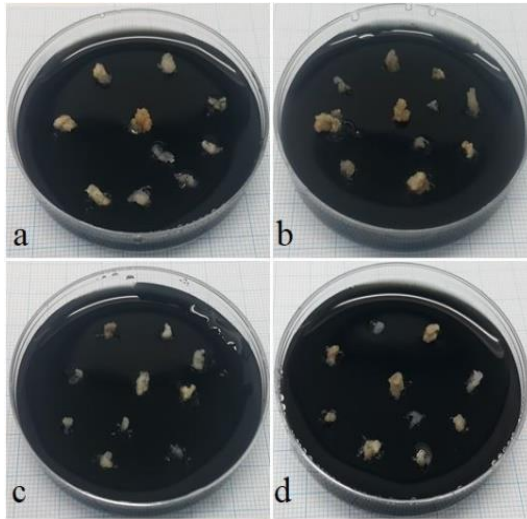


Şekil 3.53. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ 0,3 mg/L GA₃+ MS, OM besin ortamları ile yapılan kriyoprezervasyon çalışmasında rejenerasyon oranının istatistiki açıdan değerlendirilmesi

Şekil 3.52 ve Şekil 3.53’te gösterilen grafiklere bakıldığında kullanılan MS ve OM besin ortamları arasında belirgin bir fark olmadığı tespit edilmiştir. PVS-C için kültüre alınan kalluslar ile kriyoprezerve edilmiş kalluslar kıyaslandığında da fark olmaması

dondurma işleminin kallusların canlılığına etki etmediğini gösterir. Bununla birlikte rejenerasyon oranının %70' den az olması, yapılan çalışmada kullanılan büyüme düzenleyicilerin konsantrasyonunun değiştirilmesi gerektiğini ifade eder. Buradan hareketle yeni büyüme düzenleyicileri farklı konsantrasyonlarda kullanılarak bir kriyoprezervasyon çalışması daha yapılmıştır. Bu çalışmada 90 dakika PVS- 2 uygulaması kullanılmıştır ve kömür tozu destekli 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM, LB ve NB besin ortamları ile kriyoprezervasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada aydınlık (16 saat fotoperiyot) ve karanlık (24 saat karanlık) ortamların rejenerasyon üzerindeki etkisini belirlemek için iki farklı grup oluşturulmuştur. Ayrıca kullanılan kalluslar Fethiye bölgesine ait gövde bulbillerinden elde edilmiştir. Sadece bu kriyoprezervasyon çalışmasında Fethiye bölgesinden üretilen kalluslar kullanılmıştır, bundan önceki ve sonraki çalışmalarda Kepsut bölgesine ait gövde bulbillerinden üretilen kalluslar kullanılmıştır.

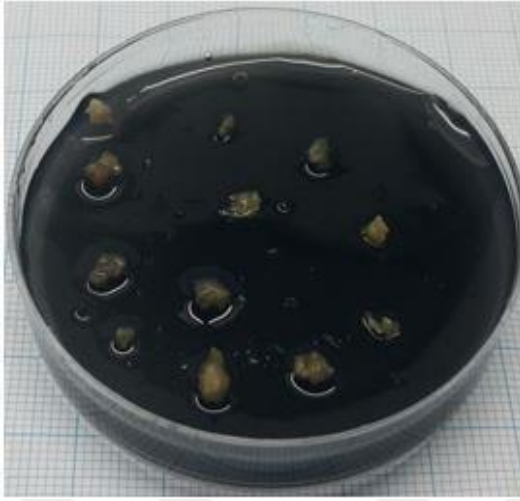
Yapılan kriyoprezervasyon çalışmasının morfolojik ve istatistiki analizi diğer çalışmalarda olduğu gibi aylık kallus gelişimine göre yapılmıştır. Şekil 3.54'te aydınlıkta OM besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi gösterilmiştir.



Şekil 3.54. Aydınlıkta 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 d: Deneme-3)

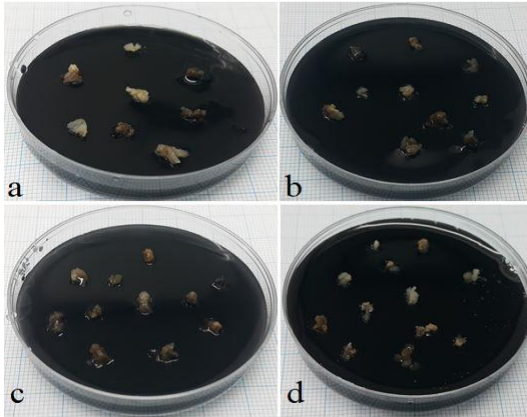
Şekil 3.54'e bakıldığında kallusların canlı, yumuşak, sarı ve beyaz renklere olduğu gözlemlenmiştir. Bazı kallusların büyüklüğüne bakıldığında soğancık gelişimine başladığı belirlenmiştir. PVS-C ve kriyoprezerve edilmiş kallusların benzer büyüklüklerde olduğu gözlemlenmiştir. OM besin ortamı kullanılarak karanlık ortamda yapılan çalışmanın aylık analizi ise Şekil 3.55'te gösterilmiştir. Bu çalışmada kullanılan iki deneme ve PVS-C'nin kontamine olması

sebebiyle geriye kalan tek denemenin aylık analizi gerçekleştirilmiştir.



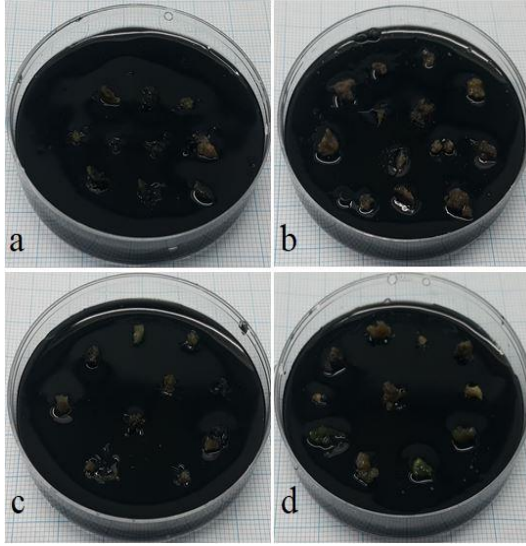
Şekil 3.55. Karanlıkta 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi (Deneme-1)

Karanlık ortamda gerçekleştirilen çalışmanın aylık morfolojik analizine göre, kallusların canlı ve sarımsı renkte oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca kalluslar yumuşak yapıya sahiptirler. Bununla birlikte bazı kallusların kararmaya başladığı, canlılıklarını kaybettiği tespit edilmiştir. OM besin ortamının, aydınlık ile karanlık ortam arasında kıyaslandığında morfolojik açıdan belirgin bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. LB besin ortamları kullanılarak yapılan çalışmaların aylık analizleri ise Şekil 3.56 ve Şekil 3.57’de gösterilmiştir.



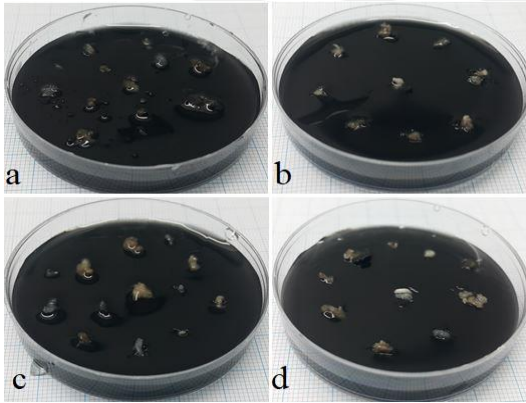
Şekil 3.56. Aydınlıkta 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ LB besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 d: Deneme-3)

0,2 mg/ kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ LB besin ortamının, aydınlıkta gerçekleştirilen çalışmanın aylık analizine göre kallusların bir kısmının canlı, renkli ve yumuşak olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 3.56a’daki kallusların rejenereasyon başlangıcında olduğu tespit edilmiştir. Kriyoprezerve edilmiş kalluslarda ise Şekil 3.56d’de gösterilen kallusların bazıları sürgün gelişimine eğilimli olduğu belirlenmiştir. Diğerlerinin ise canlılığı devam ettiği fakat dormansi olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.57. Karanlıkta 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ LB besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 d: Deneme-3)

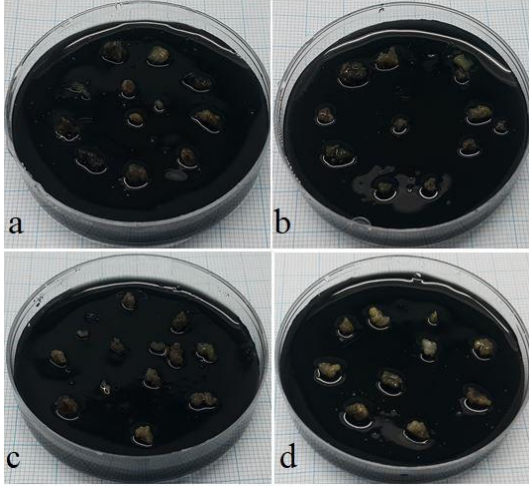
Karanlık ortamda LB besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık morfolojik analizi Şekil 3.57’de gösterilmiştir. Şekle bakıldığında neredeyse tüm kallusların karardığı ve canlıklarını kaybettiği gözlemlenmiştir. Aydınlıkta yapılan çalışmaya kıyaslandığında karanlık ortamın sürgün gelişimine etki etmediği belirlenmiştir. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ NB besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmaların aylık morfolojik analizi Şekil 3.58 ve Şekil 3.59’da gösterilmiştir.



Şekil 3.58. Aydınlıkta 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ NB besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 d: Deneme-3)

NB besin ortamı kullanılarak, aydınlıkta gerçekleştirilen kriyoprezervasyon çalışmasının aylık morfolojik analizine göre kallusların rejenerasyona başlama eğiliminde olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 3.58c) Ancak PVS-C için kültüre alınan kallusların karardığı gözlemlenmiştir. Şekil 3.59’da NB besin ortamının karanlıkta uygulanan çalışması gösterilmiştir. Şekle bakıldığında kallusların neredeyse tamamının karardığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte Şekil 3.59’da gösterilen çalışmada kullanılan

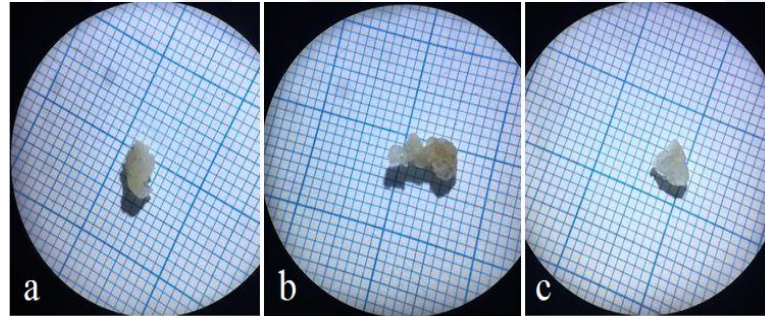
bazı kallusların canlılığının devam ettiği gözlemlenmiştir.



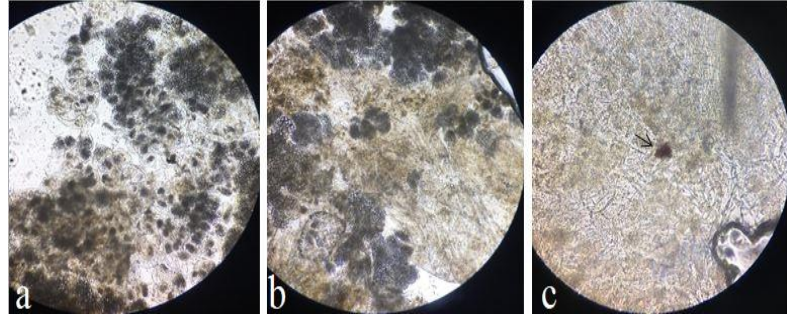
Şekil 3.59. Karanlıkta 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ NB besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmanın aylık analizi (a: PVS-C, b: Deneme-1, c: Deneme-2 d: Deneme-3)

NB besin ortamı kullanılarak yapılan çalışmalara bakıldığında, bu besin ortamının *Lilium candidum* bitkisi için uygun değildir. OM ve LB besin ortamları ile yapılan çalışmaların NB besin ortamına göre daha başarılı olduğu ancak istenilen düzeyde sürgün gelişiminde olmadığı belirlenmiştir. Buradan hareketle bu çalışmada kullanılan tüm kalluslar ilk kültürden 6 ay sonra 0,01 mg/L BA+0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamına aktarılmıştır. Bir ay boyunca kültür işlemi uygulanmış ve TZ testi uygulanarak kallusların canlılıkları morfolojik açıdan

analiz edilmiştir. Şekil 3.60'ta aydınlık ortamda kültüre alınan PVS-C'lerin stereo mikroskopta analizi gösterilmiştir. Şekil 3.61'de ise ışık mikroskobundaki analiz gösterilmiştir.

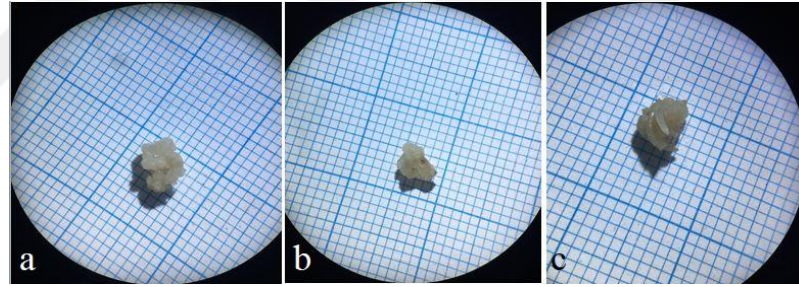


Şekil 3.60. Aydınlıkta kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: OM, b: LB, c: NB besin ortamlarından gelen kalluslar)

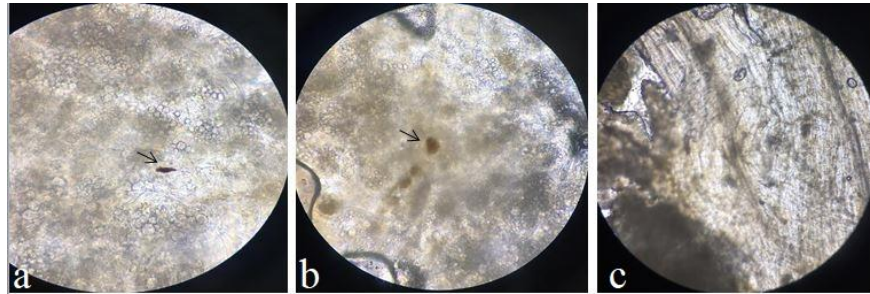


Şekil 3.61. Aydınlıkta kültüre alınan PVS-C grubunun TZ testinin ışık mikroskobu altındaki analizi (a: OM, b: LB, c: NB besin ortamlarından gelen kalluslar)

PVS-C için kültüre alınan kallusların TZ testinin stereo mikroskopta yapılan analize bakıldığında kallusların canlı, yumuşak ve beyaz renkte olduğu gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 3.60). Ancak ışık mikroskobunda yapılan analizde canlılık tespit edilememiştir. Sadece Şekil 3.61c'de ok ile gösterilen bölgede canlılık olduğu belirlenmiştir. Kriyoprezerve edilmiş kallusların canlılık test analizleri Şekil 3.62 ve Şekil 3.63'te gösterilmiştir.

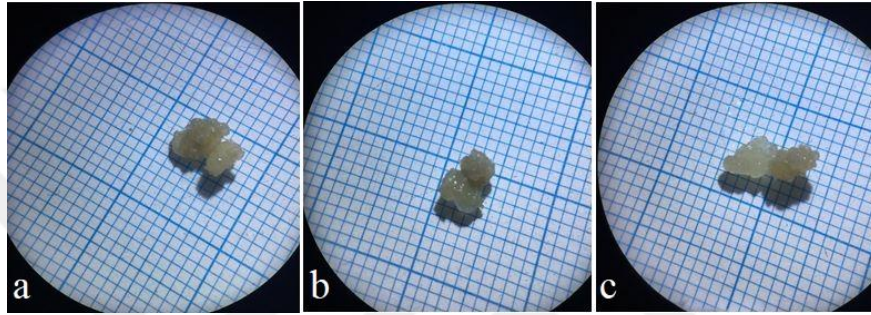


Şekil 3.62. Aydınlıkta kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: OM, b:LB, c: NB besin ortamlarından gelen kalluslar)



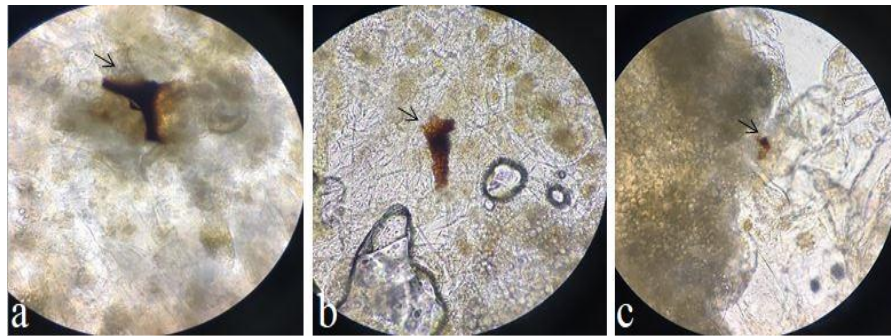
Şekil 3.63. Aydınlıkta kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin ışık mikroskobu altındaki analizi (a: OM, b: LB, c: NB besin ortamlarından gelen kalluslar)

Kriyoprezerve edilmiş kallusların canlılık testlerinin stereo mikroskopta yapılan morfolojik analize bakıldığında, kalluslar beyaz ve canlıdır. Işık mikroskobu analizine bakıldığında ise kırmızı renkli bölgeler tespit edilmiştir. Şekil 3.61a ve Şekil 3.61b’de ok ile gösterilen bölgelere göre kallusun canlı olduğu belirlenmiştir. Ancak Şekil 3.61c’de kırmızı bölge yoktur. Dolayısıyla NB besin ortamından gelen kallus canlı değildir. Karanlık ortamda yapılan çalışmanın canlılık test sonuçları Şekil 3.64 ve Şekil 3.65’te gösterilmiştir. PVS-C için canlılık testi uygulanmamıştır çünkü kontaminasyondan kaynaklı bitki materyali kalmamıştır. Sadece kriyoprezerve edilmiş kalluslar için TZ testi uygulanmıştır.



Şekil 3.64. Karanlıkta kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: OM, b: LB, c: NB besin ortamlarından gelen kalluslar)

Karanlık ortamda, kriyoprezervasyon çalışmasında kullanılan kallusların canlılık testi stereo mikroskopta analizi yapılmıştır (Bkz. Şekil 3.64). Kallusların yumuşak yapıda ve canlı olduğu belirlenmiştir. Beyaz renkli olarak gözlemlenen kallusların TZ testinin ışık mikroskobu analizi ise Şekil 3.65’te gösterilmiştir.



Şekil 3.65. Karanlıkta kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin ışık mikroskobu altındaki analizi (a: OM, b: LB, c: NB besin ortamlarından gelen kalluslar)

Karanlık ortamda kültüre alınan kiyoprezerve edilmiş kallusların TZ testinin ışık mikroskobu altında analize bakıldığında, kallusların canlı olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.65'te ok ile gösterilen kırmızı bölgeler kallusun canlılığını ispat etmektedir. Aydınlik ile karanlık ortam kıyaslandığında, karanlık ortamda daha kırmızı alan belirlenmiştir. Buradan hareketle karanlık ortam aydınlık ortama kıyasla kallusların canlı kalmasını teşvik etmektedir. Sonuç olarak bu çalışmaya morfolojik açıdan bakıldığında, OM ve LB besin ortamlarının ve karanlık daha başarılı olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmanın istatistiki açıdan analizi diğer çalışmalarda olduğu kallusların aylık çap uzunluğuna göre yapılmıştır. Çizelge 3.11'de kallusların aylık gelişim indeks değeri verilmiştir. Bu değerlere bağlı olarak rejenerasyon oranı belirlenmiştir.

Çizelge 3.11. Yapılan çalışma sonucunda kallusların gelişim indeks değerleri

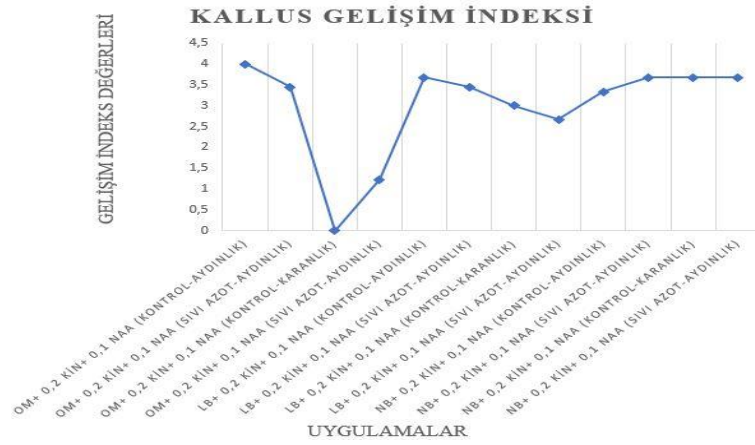
Denemeler	Aydınlık/Karanlık	0,2 mg/L kin+0,1 mg/L NAA ilaveli	0,2 mg/L kin+0,1 mg/L NAA ilaveli	0,2 mg/L kin+0,1 mg/L NAA ilaveli
		OM	LB	NB
PVS-C	Aydınlık	4-4-4	3-4-4	3-3-4
Deneme-1	Aydınlık	3-3-4	3-4-4	3-4-4
Deneme-2	Aydınlık	3-4-4	3-4-4	4-4-4
Deneme-3	Aydınlık	3-3-4	3-3-3	3-3-4
PVS-C	Karanlık	Kontamine	3-3-3	3-4-4
Deneme-1	Karanlık	3-4-4	2-3-3	4-4-4
Deneme-2	Karanlık	Kontamine	2-3-3	3-4-4
Deneme-3	Karanlık	Kontamine	2-3-3	3-3-3

Çizelge 3.11'de verilen veriler dikkate alınarak çalışmada kullanılan kallusların gelişim indeks değerleri ve rejenerasyon oranı istatistiki açıdan analiz edilmiştir.

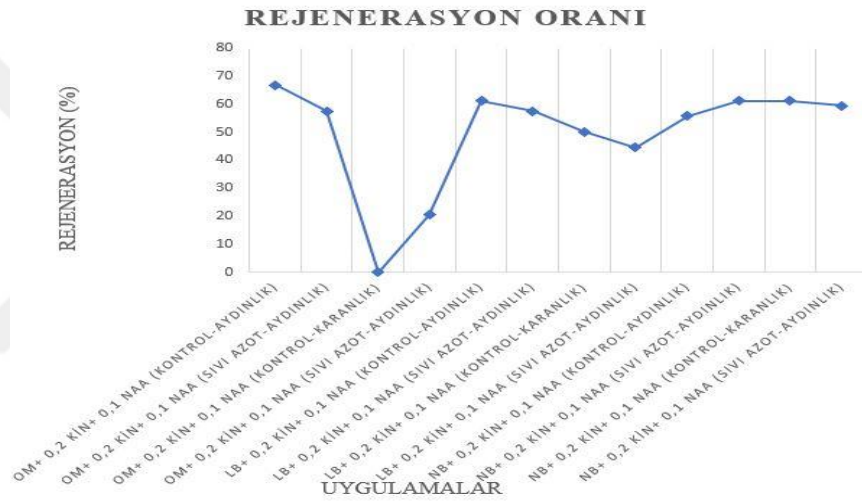
Çizelge 3.12. Çalışma sonucunda kallus gelişim indeks değerlerinin ve rejenerasyon oranının istatistiki analizi

UYGULAMA		OM Besin Ortamı		LB Besin Ortamı		NB Besin Ortamı	
		Kallus Gelişim İndeksi (Değer±SH)	Rejenerasyon Oranı (%±SH)	Kallus Gelişim İndeksi (Değer±SH)	Rejenerasyon Oranı (%±SH)	Kallus Gelişim İndeksi (Değer±SH)	Rejenerasyon Oranı (%±SH)
Aydınlık	Kontrol	4±0 ^a	66,8±0 ^{AB}	3,67±0,17 ^a	61,23±2,78 ^A B	3,33±0,13 ^a b	55,67±2,1 ^{AB} C
	Sıvı Azot	3,44±0,12 ^{ab}	57,52±2,01 ^A BC	3,44±0,08 ^a	57,52±1,40 ^A B	3,67±0,06 ^a	61,23±1,08 ^A B
Karanlık	Kontrol	0±0 ^d	0±0 ^E	3±0 ^b	50,1±0 ^C	3,67±0,08 ^a	61,23±1,39 ^B
	Sıvı Azot	1,22±0,21 ^c	20,41±3,47 ^D	2,67±0,05 ^b	44,53±0,83 ^C	3,56±0,05 ^a	59,38±0,8 ^B

OM, LB ve NB besin ortamları ile yapılan kriyoprezervasyon çalışması sonucunda elde edilen verilerin istatistiki açıdan analizi, SPSS programı vasıtasıyla yapılmıştır. Çizelge 3.12’de gösterilen verilere bağlı olarak kallusların gelişim indeks değerlerini ve rejenerasyon oranını gösteren grafikler oluşturulmuştur. Bu grafikler sayesinde yapılan çalışmada en uygun ortam koşulları ve besin ortamı tespit edilebilmiştir. Şekil 3.66’da kallusların gelişim indeks değerlerinin, Şekil 3.67’de ise kallusların rejenerasyon oranının uygulamaya bağlı olarak artış-azalışını göstermektedir.



Şekil 3.66. OM, LB ve NB besin ortamları kullanılarak yapılan çalışma sonucunda, kallusların gelişim indeks değerleri

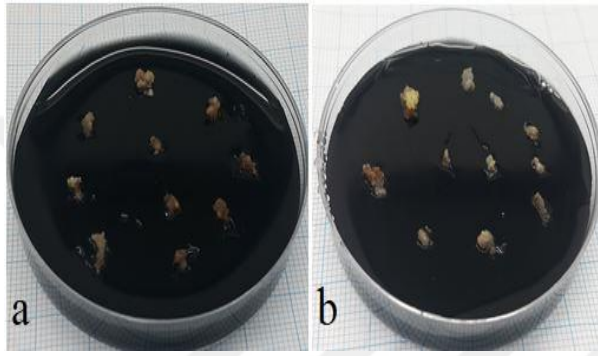


Şekil 3.67. OM, LB ve NB besin ortamları kullanılarak yapılan çalışma sonucunda, kallusların rejenerasyon oranları

Yapılan kriyoprezervasyon çalışmasının sonucunda Şekil 3.66 ve Şekil 3.67’de gösterilen grafikler elde edilmiştir. Grafiklere bakıldığında besin ortamlarında aynı koşullarda, genel olarak benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. OM besin ortamının, karanlıkta sonuç elde edilememiştir çünkü bu ortamda kültüre alınan kalluslar kontaminasyona uğradıklarından istatistiki analizde kullanılmamıştır. LB besin ortamı, aydınlık ortamı karanlık ortama kıyasla daha iyi sonuç vermiştir. NB besin ortamında ise yaklaşık olarak aynı sonuç alınmıştır. Sonuç olarak bu çalışma istatistiki açıdan değerlendirildiğinde diğer çalışmalar gibi sonuçlar elde edilmiştir.

Buradan hareketle kullanılan kallus seçiminin test edilebilmesi yeni bir kriyoprezervasyon çalışması daha yapılmıştır. Bu çalışmada 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA ve 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA büyüme düzenleyicileri tekrar kullanılmıştır. Önceki çalışmalardan elde edilen bulgular dikkate alınarak sadece OM besin ortamı ve iki farklı PVS-2 uygulama süresi (60 ve 90 dakika) kullanılmıştır.

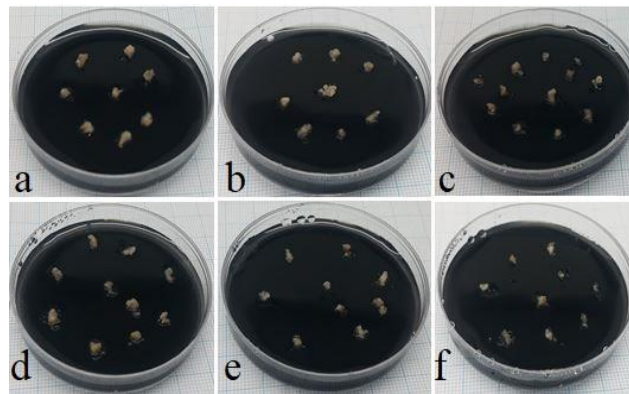
Yapılan bu çalışmanın morfolojik analizi ise kallusların aylık gelişimine bağlı olarak yapılmıştır. Şekil 3.68'de 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan kallusların aylık gelişimi gösterilmiştir.



Şekil 3.68. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C'nin aylık gelişimi (a:60 ve b:90 PVS-2 uygulaması)

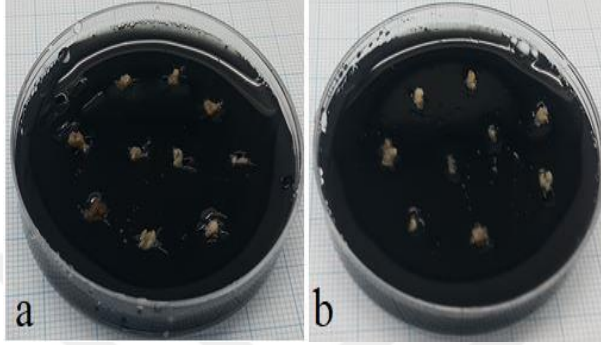
Şekil 3.68'e bakıldığında 90 dakika PVS-2 uygulamasının 60 dakikaya kıyasla daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 3.69b'de kallusların sürgün gelişimine başladığı belirlenmiştir. Ancak her iki uygulamada genel olarak kallusların kahverengi olduğu ve sertleşmeye başladığı tespit edilmiştir. Şekil 3.69'da kriyoprezerve edilmiş kallusların

aylık gelişimi gösterilmiştir.



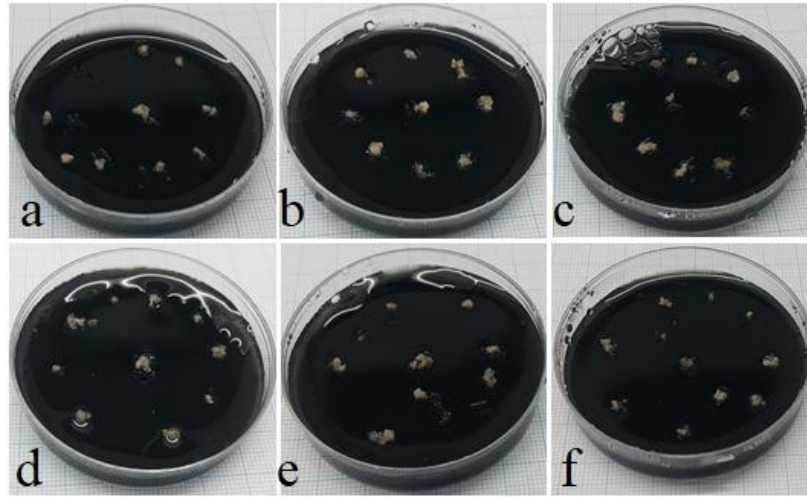
Şekil 3.69. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık gelişimi (a, b, c:60 dakika; d, e, f:90 dakika PVS-2 uygulaması; a, d: Deneme-1, b, e: Deneme-2 c, f: Deneme-3)

Kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık gelişimine bakıldığında morfolojik açıdan gelişim göstermemişlerdir. Ancak canlılıklarının devam ettiği, kararma ya da sertleşme gözlemlenmemiştir. 60 ve 90 dakika PVS-2 uygulamaları kıyaslandığında belirgin bir farklılık yoktur. Kallusların dormasinin etkisi devam etmesinden kaynaklı sürgün gelişimi yoktur. Şekil 3.70' de 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C'nin aylık gelişimi gösterilmiştir.



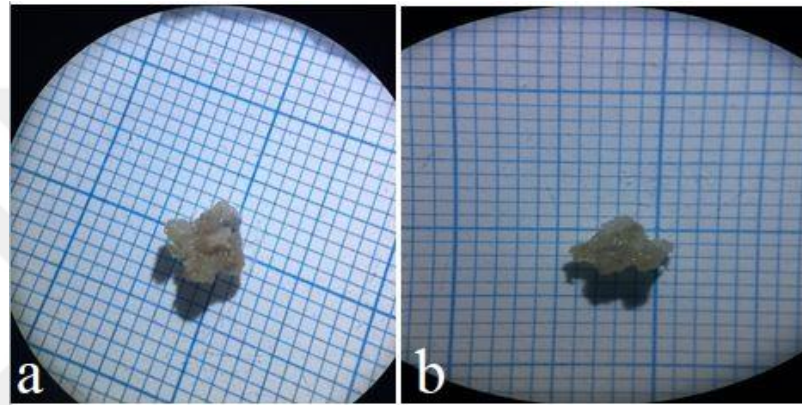
Şekil 3.70. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan PVS-C'nin aylık gelişimi (a:60 ve b:90 PVS-2 uygulaması)

Şekil 3.70'e bakıldığında kalluslarda sürgün gelişimi gözlenememiştir. 0,5 mg/ BA+ 0,2 mg/ NAA büyüme düzenleyicileri 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA ile kıyaslandığında kalluslar bu ortamda daha az gelişim göstermiştir. 60 ve 90 dakika PVS-2 uygulamaları arasında fark gözlenememiştir. Kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık gelişimi 3.71'de gösterilmiştir.



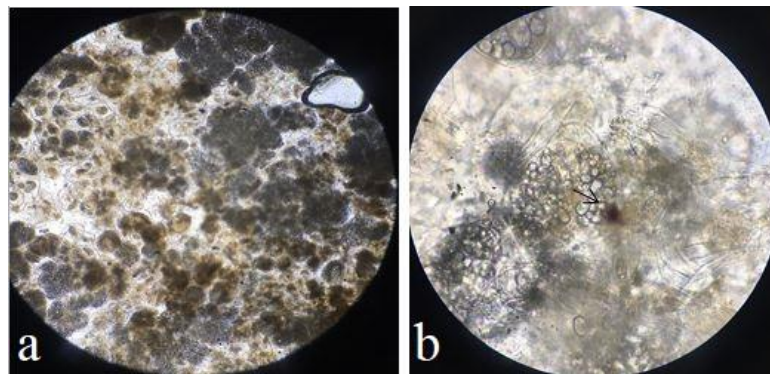
Şekil 3.71. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık gelişimi (a, b, c: 60 dakika; d, e, f: 90 dakika PVS-2 uygulaması; a, d: Deneme-1, b, e: Deneme-2 c, f: Deneme-3)

Kriyoprezerve edilmiş kallusların aylık gelişimine morfolojik açıdan bakıldığında, kalluslar küçük, beyaz ve yumuşak yapıya sahiptirler. Kallusların sürgün gelişimine başlamadığı ancak canlılıklarının devam ettiği tespit edilmiştir. Kalluslarda dormansi etkisinin devam etmesi sebebiyle istenilen büyüklüğe gelmemiştir. Diğer büyüme düzenleyicilerinden de benzer sonuçlar alınmasından dolayı tüm kalluslar 0,01 mg/L BA+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamına aktarılmıştır. Bir ay boyunca kültür işlemi uygulanmış ve TZ testi ile morfolojik açıdan analiz yapılmıştır. Şekil 3.72’de 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında aktarılan PVS-C’lerin stereo mikroskoptaki analizi gösterilmiştir.



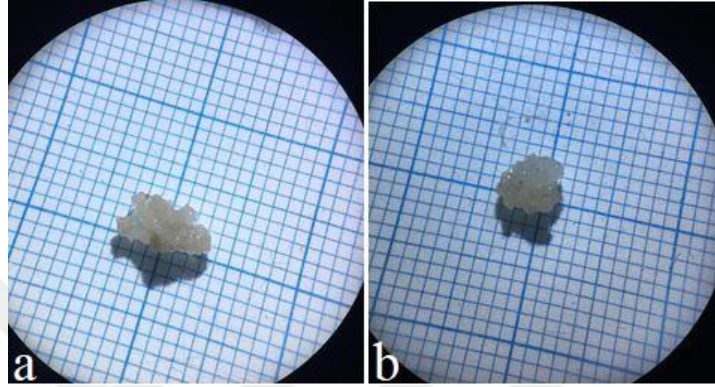
Şekil 3.72. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan PVS-C'lerin TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

PVS-C’lerin stereo mikroskop analizine bakıldığında kallusların canlı ve yumuşak yapıda oldukları gözlemlenmiştir. TZ testinin ışık mikroskobu ile yapılan analizi ise Şekil 3.73’te gösterilmiştir.



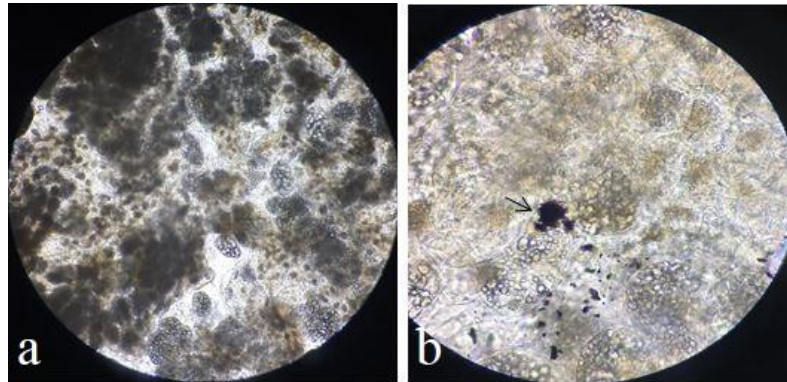
Şekil 3.73. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan PVS-C'lerin TZ testinin ışık mikroskobundaki analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

PVS-C'lerin ışık mikroskobu ile yapılan morfolojik analizde, kallusların canlı oldukları gözlenmiştir. Şekil 3.73b'de ok ile gösterilen kırmızı bölgenin kallusun canlı olduğunun kanıtıdır. 60 dakika uygulamasında buna benzer kırmızı bölge edilememiştir. 0,2 mg/L+ kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan kriyoprezerve edilmiş kallusların TZ test sonuçları ise Şekil 3.74 ve Şekil 3.75'te gösterilmiştir.



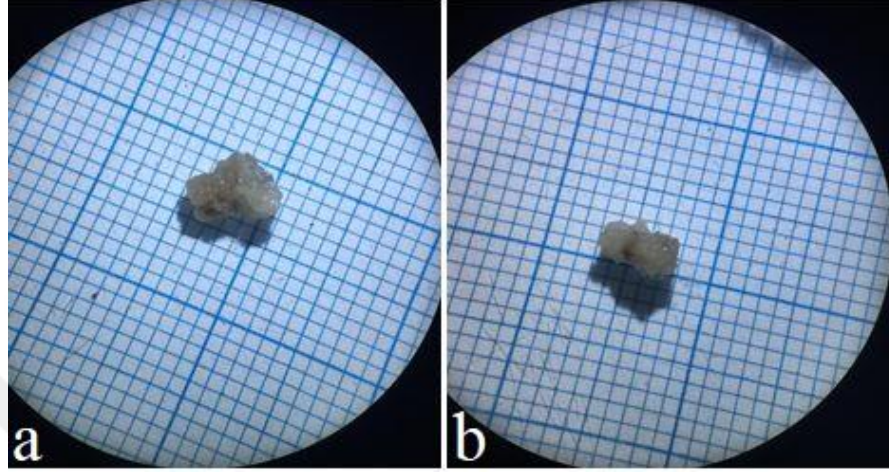
Şekil 3.74. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan kriyoprezerve edilmiş kallusların, TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Kriyoprezervasyon uygulanmış kalluslara yapılan TZ testinin morfolojik açıdan analizine göre, kalluslar beyaz renkte ve küçük oldukları belirlenmiştir. Soğancık gelişimi olmadığı ancak canlı oldukları gözlemlenmiştir. Işık mikroskobu ile yapılan analiz ise Şekil 3.75'te gösterilmiştir.



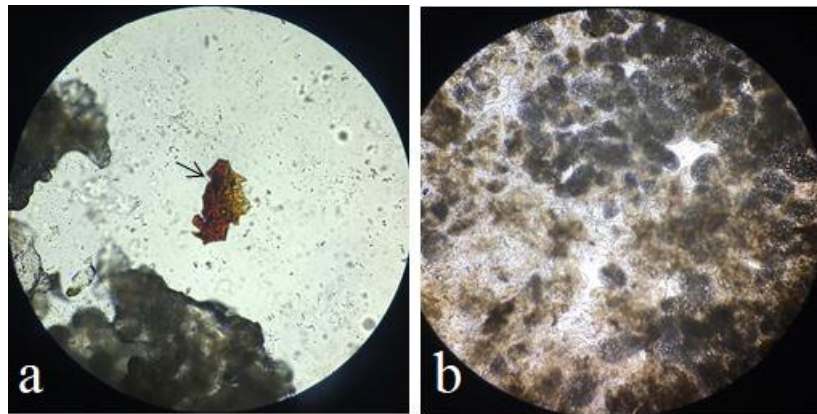
Şekil 3.75. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan kriyoprezerve edilmiş kallusların, TZ testinin ışık mikroskobundaki analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Kriyoprezerve edilmiş kalluslara yapılan TZ testinin ışık mikroskobu analizine göre, 90 dakika PVS-2 uygulamasında kullanılan kalluslar canlı yapıdadırlar (Bkz. Şekil 3.75b). Ancak 60 dakika uygulamasında canlılık tespit edilememiştir. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamında aktarılan PVS-C'lerin TZ testi sonuçları Şekil 3.76 ve Şekil 3.77'de gösterilmiştir.



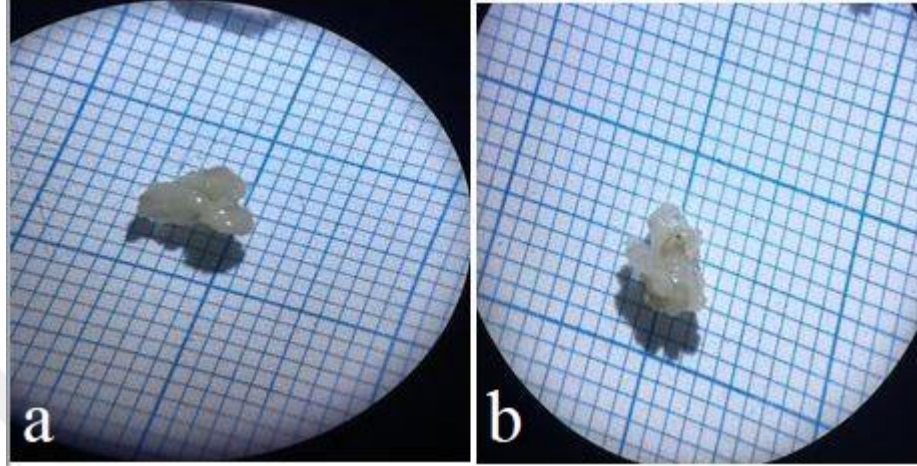
Şekil 3.76. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan PVS-C'lerin TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

TZ testinin stereo mikroskop altında yapılan analize bakıldığında, kallusların kahverengi tonlarda olduğu fakat sertleşme olmadığı gözlemlenmiştir. Kallusların yumuşak yapıda olması canlı olma ihtimalini artıran bir kriterdir. PVS-C'lerin TZ testinin ışık mikroskobu analizi Şekil 3.77'de gösterilmiştir.



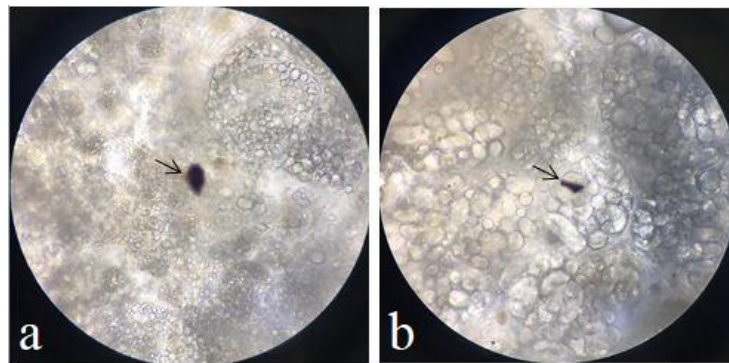
Şekil 3.77. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan PVS-C'lerin TZ testinin ışık mikroskobundaki analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Işık mikroskobu ile yapılan analize göre 60 dakika PVS-2 uygulamasında kullanılan kallusların net bir şekilde canlı oldukları belirlenmiştir (Bkz. Şekil 3.77). Ancak 90 dakika uygulamasında canlılık elde edilememiştir. Bu besin ortamında kullanılan kriyoprezerve edilmiş kallusların canlılık testinin analizi Şekil 3.78 ve Şekil 3.79'da gösterilmiştir.



Şekil 3.78. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan kriyoprezerve edilmiş kallusların, TZ testinin stereo mikroskop analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Kriyoprezervasyon uygulanmış kalluslara uygulanan TZ testinin morfolojik açıdan analizine göre kallusların canlı, yumuşak beyaz renkte oldukları gözlemlenmiştir. Işık mikroskobu ile yapılan analiz Şekil 3.79'da verilmiştir.



Şekil 3.79. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM besin ortamından aktarılan kriyoprezerve edilmiş kallusların, TZ testinin ışık mikroskobu altında yapılan analizi (a: 60 ve b: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Işık mikroskobu altında yapılan analize bakıldığında, kırmızı bölgeler tespit edilmiştir. Böylece her iki uygulamada kullanılan kallusların canlı oldukları ispatlanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmaya morfolojik açıdan bakıldığında 90 dakika PVS-2 uygulamasının ve 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamının diğerine kıyasla daha verimli olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmanın istatistiki açıdan analizi kallusların aylık çap gelişimine göre yapılmıştır (Bkz. Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13. Yapılan çalışma sonucunda kallusların çapına bağlı aylık gelişim indeks değerleri

Denemeler	PVS-2 Süre Uygulaması	0,5 mg/L BA+0,2 mg/L NAA ilaveli OM besin ortamı	0,2 mg/L kin+0,1 mg/L NAA ilaveli OM besin ortamı
PVS-C	60 Dakika	2-3-3	4-4-4
Deneme-1	60 Dakika	2-3-3	3-4-4
Deneme-2	60 Dakika	3-3-4	3-3-4
Deneme-3	60 Dakika	2-3-3	3-3-4
PVS-C	90 Dakika	2-3-3	3-3-4
Deneme-1	90 Dakika	2-3-3	3-4-4
Deneme-2	90 Dakika	3-3-4	3-3-3
Deneme-3	90 Dakika	2-2-3	3-3-3

Kallusların gelişim indeks değerleri kullanılarak SPSS programı vasıtasıyla çalışma istatistiki açıdan analizi yapılmıştır (Bkz. Çizelge 3.14).

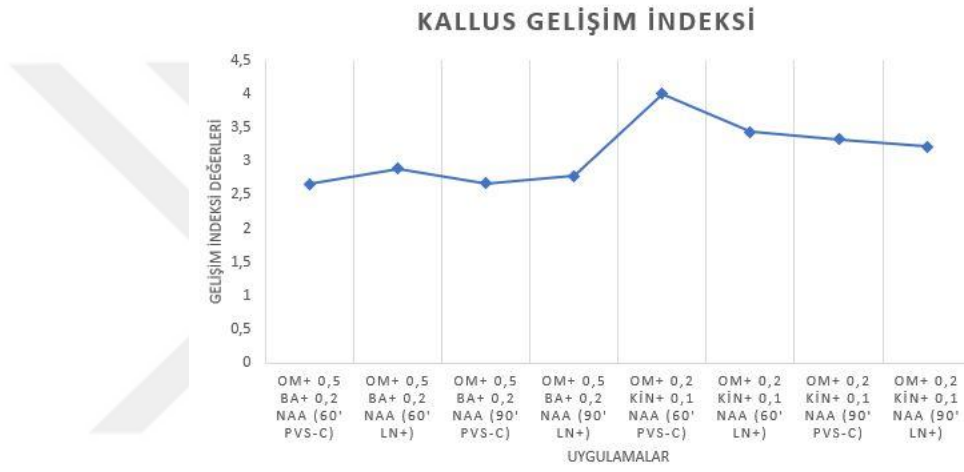
Çizelge 3.14. Kallus gelişim indeks değerleri ve rejenerasyon oranları

PVS-2 UYGULAMA SÜRESİ (DAKİKA)		0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM Besin Ortamı		0,2 mg/L Kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM Besin Ortamı	
		Kallus Gelişim İndeksi (Değer±SH)	Rejenerasyon Oranı (%±SH)	Kallus Gelişim İndeksi (Değer±SH)	Rejenerasyon Oranı (%±SH)
60	Kontrol	2,66±0,33 ^{cd}	44,53±5,67 ^{CD}	4±0 ^a	66,8±0 ^A
	Sıvı Azot	2,89±0,14 ^d	48,24±2,29 ^D	3,44±0,07 ^b	57,52±1,14 ^B

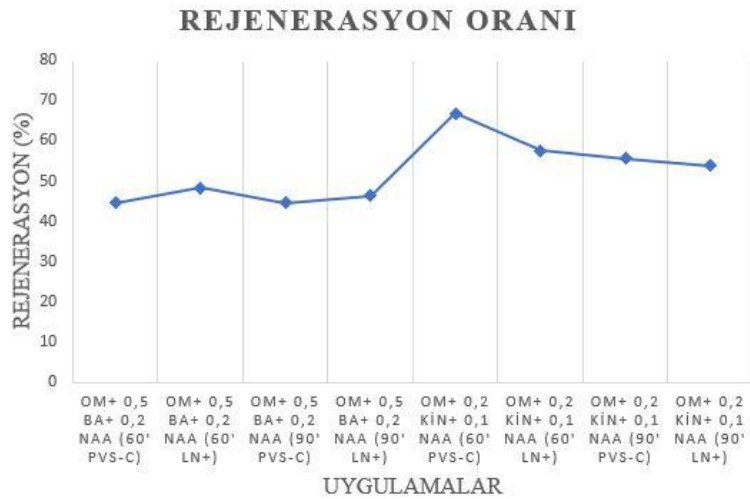
Çizelge 3.14. (devam)

90	Kontrol	2,67±0,17 ^d	44,53±2,78 ^D	3,33±0,11 ^{bc}	55,67±1,76 ^B
	Sıvı Azot	2,78±0,11 ^d	46,39±1,77 ^D	3,22±0,05 ^c	53,81±0,82 ^C

Kallusların aylık çap uzunluğu dikkate alınarak, yapılan kriyoprezervasyon çalışması SPSS programı ile istatistiki açıdan değerlendirilmiştir. Sonucunda Çizelge 3.14'te gösterilen veriler elde edilmiştir. Bu verilere ışığında Şekil 3.80 ve Şekil 3.81'de gösterilen grafikler elde edilmiştir.



Şekil 3.80. Kallus gelişim indeks değerinin uygulamaya bağlı olarak değerlendirilmesi



Şekil 3.81. Rejenerasyon oranının uygulamaya bağlı olarak analiz edilmesi

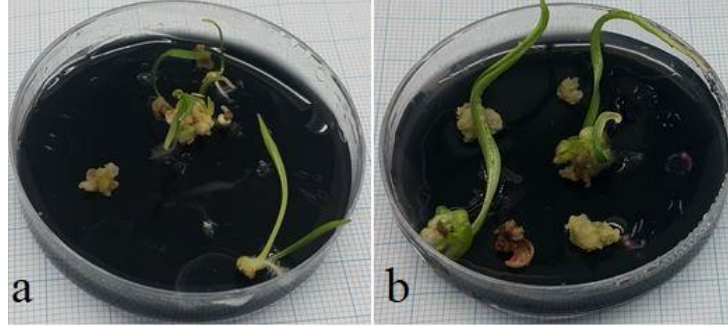
Kriyoprezervasyon çalışmasının istatistiki açıdan analizi, kallus gelişim indeks değeri ve kallus rejenerasyon oranına göre yapılmıştır. Her iki grafiğe bakıldığında 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamı daha başarılıdır. PVS-2 uygulama süreleri kıyaslandığında ise belirgin farklılık gözlenememiştir. Genel olarak aynı yüzdelerde rejenerasyon oranı elde edilmiştir. Bu çalışma yapılan diğer çalışmalarla istatistiki açıdan kıyaslandığında, diğer çalışmalarda olduğu gibi rejenerasyon oranı %40-%70 aralığına elde edilmiştir.

Kalluslar ile yapılan kriyoprezervasyon çalışmaları genel olarak değerlendirildiğinde istenilen düzeyde soğancık gelişimi elde edilememiştir. Kallusların canlılıklarının devam ettiği ancak dormansi etkisi altında kalmasından dolayı sürgün gelişimi elde edilememiştir. Elde edilen bulgular dikkate alındığında kullanılan besin ortamlarından OM besin ortamı ve 90 dakika PVS-2 uygulama süresi diğerlerine kıyasla daha verimli sonuçlar vermiştir.

3.1.2.2. Meristemlerin morfolojik ve istatistiki analizi

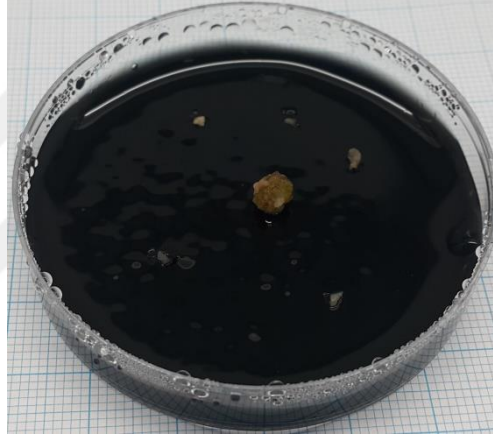
Lilium candidum bitkisi için uygun kriyoprezervasyon protokolü belirlemek için bitkiye ait meristemler kullanılarak kriyoprezervasyon çalışmaları yapılmıştır. Önceden yapılmış çalışmalar, derlemeler ve araştırmalar dikkate alınarak ilk aşamada ön denemeler kurulmuştur. Ön denemelerde üç farklı PVS-2 uygulama süresi (30, 45 ve 60 dakika) ve bir adet besin ortamı (kömür tozu destekli 1 mg/L BA+ MS) kullanılmıştır. Yapılan tüm çalışmaların morfolojik ve istatistiki açıdan değerlendirilmesi aylık gelişime göre yapılmıştır.

Ön denemeler de PVS-C için kültüre alınan meristemlerde üçüncü haftadan itibaren sürgün gelişimi gözlenmeye başlamıştır. Şekil 3.82’de PVS-C’lerin bir ay sonunda elde edilen gelişim gösterilmiştir. 30 dakika PVS-2 uygulamasının ikinci hafta sonunda kontamine olmuştur.



Şekil 3.82. PVS-C için kültüre alınan meristemlerin aylık gelişimi (a: 45, b: 60 dakika PVS-2 uygulaması)

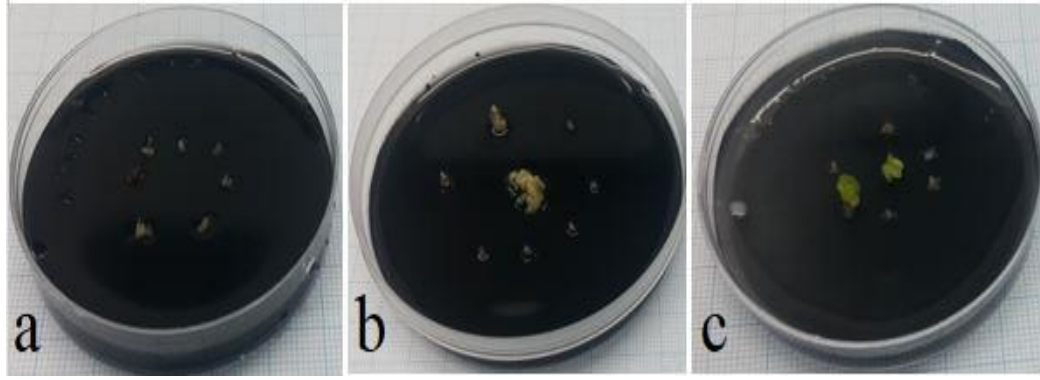
Kriyoprezerve edilmiş meristemlerin aylık gelişimi Şekil 3.83’te gösterilmiştir. 30 ve 45 dakika PVS-2 uygulamaları onuncu günde kontamine olmuştur.



Şekil 3.83. Kriyoprezerve edilmiş meristemlerin aylık gelişimi (60 dakika PVS-2 uygulaması)

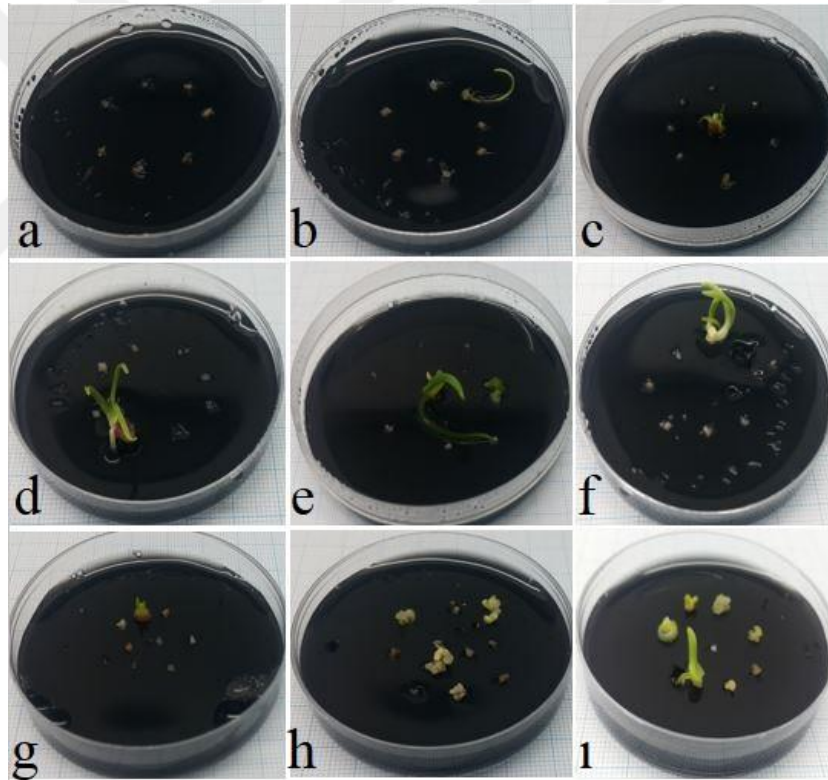
Şekil 3.83’e bakıldığında meristemin sürgün gelişimi gösterdiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak bakıldığında meristemlerle yapılan ön denemelerin başarılı bir şekilde sonuçlandırılmıştır. Elde edilen bulgular dikkate alınarak meristemlerden yeni kriyoprezervasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada da kömür tozu destekli 1 mg/L BA+ MS besin ortamı kullanılmıştır. Üç farklı PVS-2 uygulama süresi kullanılmıştır. Bu süreler sırayla 45, 60 ve 90 dakikadır. Üç tekrarlı denemeler kurulmuştur.

Yapılan kriyoprezervasyon çalışmasının morfolojik açıdan analizi aylık gelişimine bağlı olarak yapılmıştır. Şekil 3.84’te PVS-C’lerin aylık gelişimi gösterilmiştir.



Şekil 3.84. PVS-C'lerin aylık gelişimi (a: 45, b: 60 ve c: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Şekil 3.84'e bakıldığında 60 ve 90 dakika PVS-2 uygulamalarında sürgün gelişimi gözlenmiştir. Ancak 45 dakika PVS-2 uygulamasında gelişim gözlenmemiştir. Şekil 3.85'te ise kriyoprezerve edilmiş meristemlerin aylık gelişimi gösterilmiştir.



Şekil 3.85. Kriyoprezerve edilmiş meristemlerin aylık gelişimi (a, b, c: 45, d, e, f: 60 ve g, h, i: 90 dakika PVS-2 uygulaması)

Kriyoprezerve edilmiş meristemler on dokuzuncu günden itibaren sürgün gelişimi göstermeye başlamışlardır. Şekil 3.85'e bakıldığında üç PVS-2 uygulamada da sürgün

gelişimi sağlanmıştır. 90 dakika uygulamasında sürgün gelişimi yanında kallus gelişimi de sağlanmıştır. Kriyoprezervasyon çalışmasının morfolojik açıdan değerlendirildiğinde 60 ve 90 dakika uygulamaları daha başarılı sonuç vermiştir.

Meristemlerle yapılan kriyoprezervasyon çalışmasının istatistiki açıdan analizi sürgün gelişimi gösteren meristemlerin tüm meristeme oranı şeklinde hesaplanmıştır. Buradan hareketle meristemlerin aylık gelişimine bağlı olarak elde edilen veriler Çizelge 3.15'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.15. Meristemlerle yapılan kriyoprezervasyon çalışmasının istatistiki analiz sonucunda elde edilen veriler

Denemeler	Kültüre Alınan Meristem Sayısı (45 Dakika PVS-2 Uygulaması)	Gelişim Gösteren Meristem Sayısı (45 Dakika PVS-2 Uygulaması)	Kültüre Alınan Meristem Sayısı (60 Dakika PVS-2 Uygulaması)	Gelişim Gösteren Meristem Sayısı (60 Dakika PVS-2 Uygulaması)	Kültüre Alınan Meristem Sayısı (90 Dakika PVS-2 Uygulaması)	Gelişim Gösteren Meristem Sayısı (90 Dakika PVS-2 Uygulaması)
PVS- C	7	5	7	4	7	3
Deneme- 1	7	2	7	3	8	5
Deneme- 2	7	5	7	6	8	4
Deneme- 3	8	5	7	3	8	7
Toplam	29	17	28	16	31	19
Rejenerasyon Oranı (PVS-C)	%71.43		%57.14		%42.86	
Rejenerasyon Oranı (Sıvı Azot)	%54.55		%57.14		%66.67	
Toplam Rejenerasyon Oranı	%58.62		%57.14		%61.29	

Kriyoprezervasyon çalışmasının istatistiki açıdan değerlendirildiğinde 90 dakika PVS-2 uygulaması denemelerinde en iyi rejenerasyon oranı elde edilmiştir. Bununla birlikte üç PVS-2 uygulamasında başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Kriyoprezervasyon çalışmaları genel olarak değerlendirildiğinde, meristemler kallus ile kıyaslandığında meristemler daha iyi sonuç vermiştir. Meristemler ile yapılan kriyoprezervasyon çalışmalarında sürgün ve kallus gelişimi sağlanmıştır.

3.2. Tartışma

Lilium dünya üzerinde 100 türü bulunan çok yıllık soğanlı bir bitki türüdür. Çin, kuzey Amerika, Kafkasya, Avrupa'da doğal yayılış göstermekte olan bitki aynı zamanda dünya çapında önemli kesme, saksı ve bahçe bitkisi olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte sebze olarak da tüketilen *Lilium* türleri içeriğinde bol miktarda protein, aminoasit, diyet lifine sahiptir. Ancak son yıllarda küresel ısınmanın artması, endüstriyel ve sanayi atıklarının çevre kirliliğini etkilemesi ve insanların bitkinin doğal alanlarına zarar vermesi gibi sebeplerden ötürü *Lilium candidum*, *Lilium pomponium*, *Lilium maculatum*, *Lilium bukosanense* gibi birçok *Lilium* türü nesli tükenme tehlikesi altına girmektedir. Buradan hareketle bitkinin genetik kaynaklarını korunabilmesi için farklı biyoteknolojik teknikler ile korunması hedeflenmiştir. Bugüne kadar *Lilium* türleri kullanılarak birçok bitki doku kültürü ve kriyoprezervasyon çalışmaları yapılmıştır (Li vd. 2019).

Bu çalışmada *Lilium candidum* bitkisinin gövde bulbillerinden bitki doku kültürü tekniği vasıtasıyla elde edilen kallus ve meristemlerden uygun kriyoprezervasyon protokolü oluşturulması hedeflenmiştir.

Bitki doku kültürü aseptik koşullarda tek bir bitki kaynağından çok sayıda aynı genetik özellikte bitki elde edilmesine imkân sağlayan biyoteknolojik tekniktir. Teknik sayesinde bakteri, virüs, fungus gibi birçok mikroorganizmadan saf binlerce bitki çoğaltılabilir ve ticari amaçlı olarak kullanılabilir. Aynı zamanda normal koşullarda çimlenmesi uzun süren bitkilerin, kısa süre içerisinde üretimini mümkün yapabilmektedir. Bitki doku kültürü alan olarak kısıtlı ortamlarda yapılmasından

dolayı avantajlıdır. Bu ortamda bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli tüm besin maddeleri bulunmaktadır. Makro besin, mikro besin, vitamin, organik bileşik, bitki büyüme düzenleyicileri bitkilerin çoğalması ve hayatta kalması için gerekli kaynaklardır ve bunlar besin ortamlarında bulunmaktadır (Oseni vd. 2018). Günümüzde yaygın olarak MS, OM, B5, LB, NB, WPM gibi besin ortamları kullanılmaktadır (Bakhshaie vd. 2016). *L. rhodopaeum* bitkisiyle yapılan bir mikro çoğaltım çalışmasında LS besin ortamı kullanılmıştır. 0,5 mg/L+ 0,1 mg/L kinetin büyüme düzenleyicileri kullanılarak doğrudan organogenez yapılmış ve çok sayıda bitki üretimi sağlanmıştır (Stanilova vd. 1994).

Bitki doku kültüründe kullanılan büyüme düzenleyicileri bitki çoğaltımının teşvik edilmesini sağlayan bitkisel hormonlardır. Oksinler ve sitokininler çalışmalarda yaygın olarak tercih edilmektedir. Her iki hormon grubu da hücre proliferasyonunu sağlar ve bitkilerin büyüme ve gelişmesinde rol oynamaktadır. Oksinler bitkinin sürgün gelişmesini sağlarken, sitokininler kallus ve köklenmeyi teşvik ederler (Bakhshaie vd. 2016). Simmonds ve Cumming yaptıkları bir çalışmada 2.4 D ve BA büyüme düzenleyicilerini kullanmışlardır. Sonucunda çok sayıda kallus gelişimi elde edilmiştir. Ayrı ayrı veya çeşitli kombinasyonlarda NAA, 2,4-D veya BA ile takviye edilmiş tüm ortamlar arasında zambak çeşitlerinde yapılan denemelerde çok sayıda bitki çoğaltılmıştır. Ayrıca, NAA ve BA'nın farklı kombinasyonlarının ağırlıklı olarak fidan ürettiğini bulmuşlardır (Simmonds ve Cumming 1976). Benzer şekilde *L. rubellum* bitkisiyle yapılan bir çalışmada 0,1 mg/L BA+ 1 mg/L NAA+ MS besin ortamı kullanılmıştır ve sonucunda çok soğan oluşumu elde edilmiştir (Niimi ve Onozawa 1979).

L. longiflorum bitkisiyle yapılan bitki doku kültürü çalışmasında 0,5 mg/L BA+1 mg/L GA₃+ MS besin ortamı ile çok sayıda kallus elde edilmiştir. Sürgünler ise 0,2 mg/L NAA+ yarı güçlü MS besin ortamında sağlanmıştır (Nhut 2003). Yapılan bu çalışmada ise *Lilium candidum* bitkisine ait gövde bulbilleri farklı bölgelerden toplanarak bitki doku kültürü tekniği ile mikroçoğaltımı sağlanmıştır. Bunun için alkol ve deterjanla steril edilen gövde bulbillerinden üç farklı besin ortamında sürgün ve kallus gelişimi sağlanmıştır. Bu besin ortamları sırayla OM, MS ve WPM'dir. Ayrıca farklı bitki

büyüme düzenleyicileri kullanılmış ve bitki gelişimi için indükleyici güç oluşturulmuştur.

Kültüre alınan gövde bulbilleri üç hafta sonunda ilk kez gelişim göstermeye başlamıştır. Üç farklı besin ortamında organogenez ve köklenme gelişimi sağlanmıştır. En fazla sürgün ve kök gelişimi MS besin ortamında kültüre alınan gövde bulbillerinden sağlanırken, Kepsut bölgesinden toplanan gövde bulbilleri ile yapılan çalışmada en fazla mikroçoğaltım sağlanmıştır. 1 mg/L BA destekli besin ortamlarında sürgün ve kök gelişimi, 1 mg/L NAA destekli besin ortamlarında ise kallus gelişimi sağlanmıştır. Kalluslar morfolojik açıdan değerlendirildiğinde beyaz ve sarı renklerde olduğu ve yumuşak yapıya sahip oldukları gözlemlenmiştir. En fazla kallus gelişimi OM besin ortamında yapılan çalışmalarda elde edilmiştir.

Sürgün gelişimi gösteren eksplanların kök kısımlarından meristemler fikse edilmiştir. Yapılan çalışmada MS ve OM besin ortamlarından eşit oranda meristem elde edilmiştir. WPM besin ortamından ise meristem elde edilememiştir. Sonuç olarak mikroçoğaltımı sağlanan kalluslardan ve sürgün uçlarından elde edilen meristemlerden de kriyoprezervasyon çalışmasına gidilmiştir.

Kriyoprezervasyon bitkiye ait polen, meristem, kallus, tohum gibi kısımları kullanılarak ultra soğuk ortamda (-196°C), bitkinin muhafaza edilmesini sağlayan biyoteknolojik tekniktir (Li vd. 2019). Bu tekniğin temel mantığı bitki hücrelerinin soğuk ortamda metabolizmasını minimum düzeye düşürerek enziyatik reaksiyonların durmasını sağlar ve uzun süre boyunca çoğalmasını engelleyerek küçük alanda bitki materyalinin korunmasını sağlar (Wang vd. 2021). Kriyoprezervasyon çalışması sıvı azot ya da sıvı azot buharında gerçekleştirilebilir. Bu teknik kullanılarak birçok *Lilium* türünün muhafaza işlemi gerçekleştirilmiştir (Li vd. 2019).

Kriyoprezervasyon birçok farklı şekilde gerçekleştirilebilen bir tekniktir. Günümüze kadar yapılan birçok araştırma ve denemelerde çok sayıda kriyoprezervasyon tekniği geliştirilmiştir. Vitrifikasyon ve dehidrasyon temelli teknikler üzerine kriyoprezervasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu teknikler sırayla damlacık dondurma, vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon, dehidrasyon, enkapsülasyon-dehidrasyondur (Engelmann 2004). *Lilium* türleriyle farklı tekniklerle

kriyoprezervasyon çalışmaları yapılmıştır (Li vd. 2019). *L. japonicum* bitkisiyle yapılan bir çalışmada %3 sükroz içeren MS besin ortamında 40 gün bitki kültüre alınmıştır. 28 gün 12 saatlik fotoperiyotta 0⁰ C sıcaklıkta bitki materyallerine soğuk tedavisi uygulanmıştır. Kesilen sürgün uçları 0,3 M sükroz içerikli MS besin ortamında bir gün boyunca kültür işlemi uygulanmıştır. Sürgün uçları 25 dakika boyunca 0,4 M sükroz ve 2 M gliserol içeren yükleme solüsyonuna yüklenmiştir. Daha sonra 0⁰ C’de 100 ve 110 dakika PVS-2 uygulaması yapılmış ve sıvı azota daldırılarak dondurma işlemi uygulanmıştır. zme işlemi için, 40⁰ C sıcaklıkta meristemler bekletildi ardından PVS-2 kriyoviallerden uzaklaştırılmıştır. 1,2 M sükroz içerikli MS besin ortamında 25 dakika bekletilmiş ve önce kullanılan besin ortamında kültür işlemi uygulanarak çoğaltma sağlanmıştır. Sonucunda sürgün uçlarında %40 ile %85 aralığında rejenerasyon gelişimi sağlanmıştır. Hibrit tohumları kullanarak yapılan çalışmada ise %83 oranında başarı elde edilmiştir (Matsumoto vd. 1995).

L. callosum ve dört hibritiyle bir kriyoprezervasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada 2 hafta kültür işlemi uygulanan bitkiler daha sonra 7 gün boyunca 4⁰ C sıcaklıkta 16 saat fotoperiyotta soğuk tedavisi uygulanmıştır. Sürgün uçlarından meristemler kesilerek çıkartılmış, 0,3 M sükroz içerikli MS besin ortamında bir gece bekletilmiştir. Meristemler soğuk tedavisinde olduğu 0,7 M sükroz içerikli MS besin ortamında n kültür işlemi uygulanmıştır. 40-60 dakika boyunca %35 oranında güçlü PVS-3 ile muamele edilmiş ve daha sonra 240 dakika boyunca tam güçlü PVS-3’te bekletilmiştir. Sonucunda *L. callosum* bitkisinin gelişiminden %78 oranında başarı elde edilmiştir. Dört hibrit türünden, Carmina’da %87,5, Santander’de %53, Kristal ışıkta %64 ve Marrero’da %68 oranında gelişim sağlanmıştır. Çalışmalarda yaygın olarak kullanılan PVS-2 bu çalışmada kullanılmamıştır. Çalışmada kullanılan PVS-3’n içeriğinde %50 oranında gliserol ve %50 oranında MS bulunmaktadır. PVS-2’ye kıyasla daha toksik özellikte olmasından dolayı bu çalışmada tercih edilmiştir (Yi vd. 2013).

Lilium türü kullanarak yapılan bir çalışmada 1 mg/L NAA+ 0,5 mg/ TZ+ MS besin ortamın ile mikro çoğaltım sağlanmıştır. 4 hafta boyunca kültür işlemi uygulandıktan sonra sürgün uçlarından meristemler kesilerek çıkarılmıştır. Ardından %3 oranında sükroz destekli MS besin ortamında kültüre alınmıştır. 4 hafta sonra meristemler 0,5

M süzkroz destekli MS besin ortamda bir gün ön kültür işlemi uygulanmıştır. 2 M gliserol+ 0,4 M süzkroz içerikli yükleme solüsyonuna alınan meristemler 20 dakika boyunca bekletilmiştir. Yaklaşık 2 µL PVS-2 eklenir meristemlere, 4 saat PVS-2'ye maruz bırakıldı ve sıvı azota daldırılarak dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözme işlemi için meristemler 20 dakika boyunca 1,2 M süzkroz içerikli besin ortamında ısıtılmıştır. 1 mg/L NAA+ 0,2 mg/L TZ+ MS besin ortamında meristemlere kültüre alınmıştır. İlk 3 gün karanlık ortamda daha sonra aydınlık ortamda kültür işlemi uygulanmıştır. Sonuç olarak meristemlerden %67 oranında rejenerasyon gelişimi sağlanmıştır (Yin vd. 2014).

Yapılan çalışmalarda ilk olarak kalluslara ön kültür işlemi uygulanmıştır, farklı sürelerde PVS-2 uygulaması yapılmış ve dondurma işlemi uygulanmıştır. Daha sonra farklı besin ortamlarında (MS, OM, WPM, LB ve NB) ve değişik konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicilerinde (BA, NAA, GA₃ ve kinetin) kültür işlemi uygulanmıştır. Beş farklı PVS-2 süre (60, 75, 90, 105 ve 120 dakika) denemesi uygulanmıştır.

Önceden yapılmış denemeler ve araştırmalara göre ön denemelerde 1 mg/L BA+ OM, MS ve WPM besin ortamları kullanılmıştır. Ancak yapılan morfolojik ve istatistiki analizler sonucunda istenilen düzeyde başarı elde edilememiştir. Bununla birlikte ön denemeler sonucunda elde edilen veriler dikkate alınarak 60, 75 ve 90 dakika PVS-2 sürelerinin iyi olduğu tespit edilmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

0,5 mg/L BA+0,2 mg/L NAA+ MS ve OM ile yapılan çalışmada ön denemelere kıyasla kallusların canlılık oranının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yapılan morfolojik analizlerde kallusların yumuşak yapıya sahip oldukları gözlemlenmiştir. Ancak organogenez gelişimi sağlanamamış olmasından dolayı kallusların dormanside olduğu düşünülerek 0,3 GA₃'li yeni denemeler yapılmıştır. Bu denemede 90 dakika PVS-2 uygulanmıştır. 0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ 0,3 GA₃+ OM ve MS besin ortamları kullanılmıştır. Deneme sonucunda istenilen rejenerasyon gelişimi sağlanamamıştır. Buradan hareketle farklı kombinasyonlarda büyüme düzenleyicileri ve farklı besin ortamları kullanılarak yeni kriyoprezervasyon çalışmaları yapılmıştır.

Bu çalışmada 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM, LB ve NB besin ortamları kullanılırken, 90 dakika PVS-2 uygulaması yapılmıştır. Ayrıca karanlık ortamın

kallusların gelişimi üzerinde etkili olabileceği düşünülerek karanlık ortam denemeleri de yapılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda elde edilen veriler diğer çalışmalar ile kıyaslandığında, en iyi sonuçlar bu denemelerde gözlemlenmiştir. 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/ NAA+ OM besin ortamında kültüre alınan kallusların genel olarak canlı oldukları yapılan TZ testleri sonucunda gözlemlenmiştir. Karanlık ve aydınlık ortam arasında rejenerasyon gelişimi açısından farklılık tespit edilememiştir. Ancak diğer çalışmalarda olduğu gibi organogenez gelişimi elde edilememiştir. Bu yüzden kullanılan kallusların yeterli düzeyde canlı olmadığı düşünülerek farklı kalluslar kullanılarak aynı besin ortamlarında (0,5 mg/L BA+ 0,2 mg/L NAA+ OM ve 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM) yeni kriyoprezervasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda 60 ve 90 dakika PVS-2 uygulaması uygulanmıştır. Diğer çalışmalarda olduğu gibi kallusların TZ testleri sonucunda canlı oldukları tespit edilmiş ancak organogenez gelişimi sağlanamamıştır.

Kalluslar ile yapılan kriyoprezervasyon çalışmalara sonuç olarak bakıldığında genel olarak 90 dakika PVS-2 uygulamasının başarılı olduğu ve uygulanan besin ortamlarından da 0,2 mg/L kinetin+ 0,1 mg/L NAA+ OM besin ortamında rejenerasyon gelişimi açısından başarılı olduğu belirlenmiştir.

Meristemlerle önceden yapılmış çalışmalar ve araştırmalar dikkate alınarak ön denemeler yapılmıştır. Bu denemelerde 30, 45 ve 60 dakika PVS-2 uygulamaları ve 1 mg/L BA+ MS besin ortamı kullanılmıştır. İlk rejenerasyon gelişimi dördüncü hafta sonunda elde edilmiştir. Sonuç olarak bakıldığında ön denemelerde istenilen düzeyde gelişim sağlanmış ve meristemler kullanılarak daha kapsamlı yeni kriyoprezervasyon çalışmaları yapılmıştır.

1 mg/L BA+ MS besin ortamının ön denemelerde başarılı olmasından dolayı yeni çalışmalarda da kullanılmıştır. PVS-2 uygulama süresi olarak 30, 45, 60 ve 90 dakika kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda ilk rejenerasyon gelişimi on dokuzuncu gün sonunda, 60 PVS-2 uygulamasında elde edilmiştir. Bununla birlikte tüm PVS-2 süre uygulamalarında organogenez gelişimi gözlenmiştir. Sonuç olarak meristemler ile yapılan kriyoprezervasyon çalışmalarında elde edilen istatistiki ve morfolojik analizlere göre en iyi PVS-2 uygulama süresinin 90 dakika olduğu belirlenmiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kriyoprezervasyon bitkinin kallus, meristem, polen, sürgün ucu gibi kısımları kullanılarak, ultra soğukta uzun süre muhafazasını sağlayan biyoteknolojik bir tekniktir. Bugüne kadar nesli tükenme tehlikesi altında olan birçok bitki bu teknik ile çok yer kaplamaksızın koruma altına alınmıştır. Bu bitkilerden birisi ise *Lilium candidum* bitkisidir. *Lilium candidum* son zamanlarda olumsuz yönde değişen iklim koşulları, hayvan ve insanların doğal alanlarına zarar vermesi gibi faktörlerden dolayı nesli tükenme tehlikesi altındadır. Buradan hareketle bu çalışmada *Lilium candidum* bitkisi için en uygun kriyoprezervasyon protokolü oluşturması hedeflenmiştir. Yapılan çalışmada ilk olarak bitkiye ait gövde bulbillerinden bitki doku kültürü tekniği ile kallus ve meristemler elde edilmiştir. Daha sonra farklı sürelerde PVS-2 uygulaması yapılmış ve farklı besin ortamlarında kültüre alma işlemi uygulanmıştır. Yapılan denemeler sonucunda kalluslarda en iyi PVS-2 uygulama süresinin 90 dakika ve en uygun besin ortamının ise OM olduğu belirlenmiştir. Meristemlerde ise 90 dakikanın en iyi PVS-2 uygulama süresidir. Kriyoprezervasyondan sonra uygulanan kömür tozu ilaveli 1 mg/ BA+ MS besin ortamı ise meristemler ile yapılan çalışmada başarılı sonuçlar vermiştir.

Bu çalışmada sadece vitrifikasyon temelli kriyoprezervasyon teknikleri kullanılmıştır. Bu tekniğe ek olarak dehidrasyon temelli teknikler kullanılabilir ve böylece yeni besin ortamları ve yeni PVS-2 uygulama süreleri uygulanarak *Lilium candidum* bitkisi için yeni kriyoprezervasyon protokolleri oluşturulabilir. Bunun dışında bitkinin kallus ve meristem kısımları dışında polen, tohum gibi kısımları kullanılarak kriyoprezervasyon çalışmaları yapılabilir.

KAYNAKÇA

- Agnieszka, S. J. P. C., Tissue, veO. Culture (2021). "Droplet-vitrification cryopreservation of Tulipa tarda Stapf. apical meristems." **144**(1): 91-95.
- Bairu, M. W. vd. (2011). "Somaclonal variation in plants: causes and detection methods." **63**(2): 147-173.
- Bakhshaie, M. vd. (2016). "Biotechnological advances in Lilium." **35**(9): 1799-1826.
- Bednarek, P. T. vd. (2020). "Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi) genetic changes." **140**(2): 245-257.
- Chandran, H. vd. (2020). "Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds." e00450.
- Chen, X.-L. vd. (2011). "Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of Lilium by droplet-vitrification." **77**(2): 397-403.
- Dagla, H. J. R. (2012). "Plant tissue culture." **17**(8): 759-767.
- Daneshvarroyandazagh, S. vd. (2014). "Lilium candidum L.'da In vitro mikroçoğaltım ile kozmetik sanayisine ham madde temini." **1**(Özel Sayı-2): 1911-1916.
- Eeuwens, C. J. P. p. (1978). "Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (Cocos nucifera) and date (Phoenix dactylifera) palms cultured in vitro." **42**(2): 173-178.
- El-Shamy, M. J. A. J. o. M. R. (2011). "Management of viral disease in banana using certified and virus tested plant material." **5**(32): 5923-5932.
- Engelmann, F. (2004). "Plant cryopreservation: progress and prospects." **40**(5): 427-433.
- Fahy, G. M. vd. (1984). "Vitrification as an approach to cryopreservation." **21**(4): 407-426.

Kartha, K. veF. Engelmann (1994). Cryopreservation and germplasm storage. Plant cell and tissue culture, Springer: 195-230.

Li, J.-W. vd. (2019). "Development, progress and future prospects in cryobiotechnology of *Lilium* spp." **15**(1): 1-12.

Maślanka, M. vd. (2013). "Cryopreservation of *Galanthus elwesii* Hook. apical meristems by droplet vitrification." **34**(1): 1-9.

Maślanka, M. vd. (2016). "Cryopreservation of *Narcissus* L. 'Carlton' somatic embryos by droplet vitrification." **16**(1): 28-35.

Matsumoto, T. vd. (1995). "Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of lily by vitrification." **41**(3): 237-241.

Nhut, D. T. J. P. g. r. (2003). "The control of in vitro direct main stem formation of *Lilium longiflorum* derived from receptacle culture, and rapid propagation by using in vitro stem nodes." **40**(2): 179-184.

Niimi, Y. veT. J. S. H. Onozawa (1979). "In vitro bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker." **11**(4): 379-389.

Oseni, O. M. vd. (2018). "A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species." **7**(7): 3778-3786.

Patil, A. M. vd. (2021). "In Vitro Micropropagation of *Lilium candidum* Bulb by Application of Multiple Hormone Concentrations Using Plant Tissue Culture Technique." **8**(2): 244-253.

Patil, S. M. vd. (2021). "Sustainable development of plant tissue culture industry: The Indian scenario." **9**(2): 18-27.

Phillips, G. C. vd. (2019). "Plant tissue culture media and practices: an overview." **55**(3): 242-257.

Rafiq, M. vd. (2007). "In vitro clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* Bertoni." **39**(7): 2467-2474.

Royandazagh, S. D. veE. C. J. T. Z. F. D. Pehlivan (2016). "Lilium candidum L.'da In vitro Mikroçoğaltım ve Alkaloidler." **13**(3).

Sagare, A. vd. (2000). "Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae)—a medicinal plant." **160**(1): 139-147.

Simmonds, J. veB. J. S. H. Cumming (1976). "Propagation of *Lilium* hybrids. II. Production of plantlets from bulb-scale callus cultures for increased propagation rates." **5**(2): 161-170.

Stanilova, M. I. vd. (1994). "Morphogenetic potential and in vitro micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* Delip." **13**(8): 451-453.

Thorpe, T. A. J. M. b. (2007). "History of plant tissue culture." **37**(2): 169-180.

Tokgöz, H. B. veF. J. I. J. o. S. M. Altan (2020). "Callus Induction and Micropropagation of *Lilium candidum* L. Using Stem Bulbils and Confirmation of Genetic Stability via SSR-PCR." **7**(4): 286-296.

Tosun, M. veS. J. A. Ü. Z. F. D. Sağsöz (1995). "SOMAKLONAL VARYASYON VE BİTKİ İSLAHI." **26**(3).

Wang, M.-R. vd. (2021). "Assessments of rooting, vegetative growth, bulb production, genetic integrity and biochemical compounds in cryopreserved plants of shallot." **144**(1): 123-131.

Wang, M.-R. vd. (2020). "Advances in cryopreservation of in vitro-derived propagules: technologies and explant sources." 1-14.

Weckx, S. vd. (2019). "Tissue culture of oil palm: Finding the balance between mass propagation and somaclonal variation." **10**: 722.

Yang, X. vd. (2019). "Root cryopreservation to biobank medicinal plants: a case study for *Hypericum perforatum* L." **55**(4): 392-402.

Yi, J. Y. vd. (2013). "Efficient cryopreservation of Lilium spp. shoot tips using droplet-vitrification." **1**(2): 131-136.

Yılmaz-Gökdoğan, E. ve E. Kaya (2017). "Bitki biyoçeşitliliğinin kısa, orta ve uzun süreli korunması: biyoteknoloji ve kriyoprezervasyon." **22**(1): 87-111.

Yin, Z.-F. vd. (2014). "An efficient, widely applicable cryopreservation of Lilium shoot tips by droplet vitrification.

Web-1: <http://sifalibitkideposu.com/tag/lilium-candidum-benefits/>



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyadı Ha*** Ka*****
Uyruk TC
Doğum Yeri *****
Doğum Tarihi *****
Medeni Hali B****
Telefon 0(5**) *** **83
E-Posta h*****0@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Lise	Konak 50. Yıl Anadolu Lisesi	2013
Üniversite	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2018

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon
2019-2020	BAP	Bursiyer
2020	TÜBİTAK	Bursiyer
2021	BAP	Bursiyer

Yabancı Dil

Dil (İngilizce)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Okuma		X	
Konuşma		X	
Anlama		X	

Katıldığı Bilimsel Faaliyetler

11. Araştırma Sempozyumu, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2021 (Sözlü Sunum)

International Eurasian Conference on Biotechnology and Biocemistry, BioTechBioChem- 16-18 Aralık 2020 (Sözlü Sunum)

Dean of Students Office Genetics Student Association, Near East University-3-4 Nisan 2021

Kimsek'21, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimtek-19-20 Mart 2021

Wie Land Etkinliği, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi- 8-9 Mart 2021

Beden Dili ve Diksiyon, Joven Academia – 24.11.2019