

T. C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEHLİKE ALTINDAKİ *SILENE SANGARIA*  
COODE&CULLEN' NİN MİKROÇOĞALTIMI

Umut ERDOĞAN

Yüksek Lisans Tezi

T.Ü. FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA

2010  
EDİRNE



T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEHLİKE ALTINDAKİ *SILENE SANGARIA* COODE&CULLEN' NİN  
MİKROÇOĞALTIMI

Umut ERDOĞAN

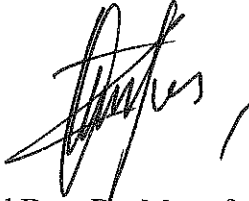
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Bu tez 15 /12 /2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.



Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA

(Danışman)



Yrd.Doç. Dr. Mustafa TELCİ

(Jüri üyesi)



Yrd.Doç.Dr. Necmettin GÜLER

(Jüri üyesi)

## ÖZET

Bu çalışmada, endemik ve tehlike altındaki *Silene sangaria*'nın ekolojik durumu, *in vitro* tohum çimlenmesi ve mikroçoğaltımı araştırılmıştır.

Çimlenme için hormon free MS, 1, 3 ve 5 mg/L GA<sub>3</sub> hormonu konsantrasyonlarına sahip MS ortamları ve steril olmayan kum kullanılmıştır. En yüksek çimlenme oranı, % 42.5 ile 3 mg/L GA<sub>3</sub> içeren MS ortamında görülmüştür.

*In vitro* fidelerden alınan koltuk altı meristemi, gövde ve yaprak eksplantları, 0.5, 1, ve 3 mg/L NAA, BA ve 2,4-D hormonlarını farklı kombinasyonlarda içeren MS ortamlarına transfer edilmiştir. En yüksek kallus oluşturma oranları (%100) 1 mg/L NAA içeren MS besi ortamında, meristem ve gövde eksplantlarında elde edilmiştir.

İndirekt organogenezle, en yüksek oranda sürgün oluşumu (%66) meristem eksplantlarında, 3 mg/L BA ortamında ve en yüksek oranda kök oluşumu (%73) gövde eksplantlarında, 1 mg/L NAA ortamında görülmüştür. Fakat farklı konsantrasyonlarda, farklı hormonlar içeren besi yeri kombinasyonlarında ise rejenerasyon elde edilememiştir.

Köklendirme için 0.5, 1, 3 ve 5 mg/L NAA içeren besi ortamları kullanılmıştır. 1,3 ve 5 mg/L NAA içeren, ½ MS besi yerlerinde hiç köklenme elde edilememiştir. Fakat 0.5 mg/L NAA içeren tam MS ortamındaki tüm fideler %100 oranında köklenmişlerdir. Başarıyla köklendirilen *in vitro* *S. Sangaria* fidecikleri toprağa şaşırtılmışlardır.

**Anahtar kelimeler:** *Silene sangaria*, endemik, nesli tehlike altındaki bitki türü, *in vitro*, mikroçoğaltım.

## ABSTRACT

In this study, ecological status, *in vitro* seed germination and micropropagation of an endemic and endangered plant species, *Silene sangaria*, were researched.

For germination, hormone free MS, MS media which was containing 1, 3 and 5 mg/L different concentrations of GA<sub>3</sub> hormone and non sterile sand were used. The highest germination rate, with %42, was observed in MS media which was including 3 mg/L GA<sub>3</sub> hormone.

Axillary meristem, stem and leaf explants obtained from these *in vitro* seedlings were transferred on basal media including 0.5, 1, ve 3 mg/L NAA, BA ve 2,4-D different hormone combinations. The highest callus formation rates (%100) were obtained in MS media including 1 mg/L NAA hormone from meristem and stem explants.

With indirect organogenesis, the highest *in vitro* shoot regeneration rate (%66) from meristem explants, in 3 mg/L BA media and the highest root regeneration rate (%73) from stem explants in 1 mg/L NAA media was obtained. But regeneration could not obtain with different combined medias which were including different hormones with different concentrations.

For rooting, MS media including 0.5,1,3 and 5 mg/L NAA was used. Rooting could not get from half strength MS media including 1,3 and 5 NAA. But all seedlings in full strength MS media which includes 0,5 mg/L, was rooted with at the rate of %100. Succesfully rooted *S. sangaria* seedlings were acclimatized to the soil.

**Key words:** *Silene sangaria*, endemic, endangered plant species, *in vitro*, micropropagation

## TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesinde, beni yönlendiren, bilgi birikimini benimle paylaşan, sorunlarıma bir baba şefkati ile eğilip her koşulda maddi manevi benden desteğini esirgemeyen, akademik kariyerimde örnek aldığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA'ya, çalışmam sırasında bölümümüz imkanlarından yararlanmamı sağlayan değerli hocam Botanik Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Feruzan DANE'ye, ders dönemimde danışmanlığımı yapan ve akademik kariyerimin başlangıcında bana ışık tutan değerli hocam Prof.Dr. Fisun KAYMAK'a, bilgi, deneyim ve tecrübelerinden istifade ettiğim, bana sabır göstererek tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, bir ağabey bir dost olarak gördüğüm değerli hocam öğretim görevlisi Sergun DAYAN'a, arazi çalışmalarını gerçekleştirmiş olan ve tez çalışmam süresince bana yol gösteren, mevcut kaynaklarını benden esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER ve Yrd. Doç. Dr. Çiler MERİÇ'e, istatistiki verilerin analizini gerçekleştiren, yüksek lisans eğitimim boyunca beni cesaretlendirerek yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Selçuk YURTSEVER'e ve katkıda bulunan diğer tüm hocalarıma sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Aynı zamanda çalışmamın her aşamasında bana moral vererek destek olan Biyoloji Ana Bilim Dalı yüksek lisans öğrencileri Asude SOYKAN, Burcu KARAHALİL, Gözde KORKMAZ KOŞANAY ve Seda YALÇIN' a teşekkürü borç bilirim.

Her koşulda beni destekleyen, bu çalışmamın ortaya çıkmasında büyük fedakarlıklarla maddi ve manevi olarak yanımda olarak bana sabır gösteren babam Hasan ERDOĞAN, annem Emine ERDOĞAN başta olmak üzere, tezimin her aşamasında ilgisini esirgemeyerek bilgisayar ve yazılım problemleri konusunda benden desteklerini esirgemeyen kardeşim Onur ERDOĞAN' a, bana olan güveninizi boşa çıkartmamak dileğiyle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen“Tehlike altındaki *Silene sangaria* Coode Et Cullen'nın mikroçoğaltımı” başlıklı TÜBAP 2010-13 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Desteklerinden dolayı Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' nin başta yöneticileri olmak üzere tüm yetkililerine teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                             |            |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>ÖZET.....</b>                                                            | <b>i</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                        | <b>ii</b>  |
| <b>TEŞEKKÜR .....</b>                                                       | <b>iii</b> |
| <b>SİMGELER DİZİNİ .....</b>                                                | <b>vi</b>  |
| <b>KISALTMALAR DİZİNİ .....</b>                                             | <b>v</b>   |
| <b>1. GİRİŞ .....</b>                                                       | <b>1</b>   |
| <b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>                                               | <b>3</b>   |
| 2.1 ÜLKEMİZİN BİTKİSEL ZENGİNLİĞİ.....                                      | 3          |
| 2.2 BİTKİSEL GEN KAYNAKLARI VE KORUNMA .....                                | 6          |
| 2.3 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜNÜN TANIMI, TARİHÇESİ VE KULLANIM ALANLARI .....      | 9          |
| 2.4 CARYOPHYLLACEAE (KARANFİLGİLLER) FAMILYASININ GENEL<br>ÖZELLİKLERİ..... | 14         |
| 2.5 SILENE CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....                                  | 15         |
| <b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>                                           | <b>18</b>  |
| 3.1 MATERYAL.....                                                           | 18         |
| 3.2 METOT .....                                                             | 20         |
| 3.2.1 Çalışma Ortamının Sterilizasyonu .....                                | 20         |
| 3.2.2 Denemelerde Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu .....              | 20         |
| 3.2.3 Kültür Besi Yerlerinin Hazırlanması ve Sterilizasyonu .....           | 22         |
| 3.2.4 İklimlendirme Koşulları.....                                          | 23         |
| 3.2.5 In vitro Çimlendirme .....                                            | 23         |
| 3.2.6 Kallus Başlatımı.....                                                 | 25         |
| 3.2.7 İndirekt Organogenez .....                                            | 28         |
| 3.2.8 Kallustan rejenerasyon.....                                           | 29         |
| 3.2.9 Köklendirme .....                                                     | 31         |
| 3.2.10 Dış ortama şaşırtma .....                                            | 32         |
| 3.2.11 Verilerin İstatiksel Analizleri .....                                | 32         |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                     | <b>33</b>  |
| 4.1 ARAZİ ÇALIŞMASI BULGULARI .....                                         | 33         |
| 4.2 ÇİMLENME BULGULARI.....                                                 | 34         |
| 4.3 MİKROÇOĞALTIM BULGULARI .....                                           | 38         |
| 4.3.1 Kallus Başlatımı ve Oluşumu .....                                     | 38         |
| 4.3.2 İndirekt Organogenez .....                                            | 44         |
| 4.3.3 Kallustan Rejenerasyon .....                                          | 53         |
| 4.3.4 Köklendirme Denemesi .....                                            | 54         |
| 4.3.5 Dış Ortama Şaşırtma .....                                             | 57         |

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| 4.3.6 Kontaminasyon Oranları..... | 59        |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>            | <b>74</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>              | <b>80</b> |

**SİMGELER DİZİNİ**

| <b><u>Simgeler</u></b> | <b><u>Açıklama</u></b> |
|------------------------|------------------------|
| m                      | Metre                  |
| ml                     | Mililitre              |
| L                      | Litre                  |
| mg                     | Miligram               |
| g                      | Gram                   |
| mg/L                   | Miligram/Litre         |
| g/L                    | Gram/Litre             |
| atm                    | Atmosfer               |
| N                      | Normal                 |
| μM                     | Mikromolar             |
| cm                     | Santimetre             |
| mm                     | Milimetre              |
| km                     | Kilometre              |
| %                      | Yüzde                  |
| ha.                    | Hektar                 |
| ppm                    | Parts per million      |

## KISALTMALAR DİZİNİ

| <b><u>Kısaltmalar</u></b> | <b><u>Açıklama</u></b>                                      |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------|
| vb                        | Ve benzeri                                                  |
| vd                        | Ve diğerleri                                                |
| GA <sub>3</sub>           | Giberellik asit                                             |
| 2-4-D                     | 2,4-Diklorofenoksiasetik asit                               |
| ABA                       | Absisik asit                                                |
| BA                        | 6 - benzilaminopürin                                        |
| NAA                       | Naftalen asetik                                             |
| K                         | Kinetin                                                     |
| IBA                       | İndol - 3 – butirik asit                                    |
| MS                        | Murashige&Skoog                                             |
| dk                        | Dakika                                                      |
| sa                        | Saat                                                        |
| sn                        | Saniye                                                      |
| ANOVA                     | Varyans analizi                                             |
| CR                        | Critically Endangered                                       |
| EN                        | Endangered                                                  |
| VU                        | Vulnerable                                                  |
| ÖBA                       | Önemli bitki alanı                                          |
| IUCN                      | International Union for Conservation of Nature              |
| USDA                      | <i>United States Department of Agriculture</i>              |
| CIAT                      | International Center for Tropical Agriculture               |
| INRA                      | French National Institute for Agricultural Research         |
| ICARDA                    | International Center for Agricultural Research in Dry Areas |
| AVRDC                     | The World Vegetable Center                                  |

## 1. GİRİŞ

İnsanoğlu var olduğu andan itibaren doğa ve doğa unsurları ile etkileşimde bulunmuş, doğadan faydalanma, doğaya ayak uydurma ve ona hakim olma çabası içinde olmuştur.

Doğanın en önemli unsuru olan bitkiler, havadaki karbondioksiti soğurup oksijen üretir, güneş enerjisini doğrudan kullanabilme yetenekleri sayesinde su ve güneş enerjisi yardımı ile organik maddeleri sentezlerler. Bu özellikleriyle primer üreticiler olarak doğada çok önemli görevler üstlenmektedirler. Bitkiler doğada yaşamın temel kaynağı olarak yer almakta ve bitkilerden yoksun bir yaşam düşünülememektedir.

Bitkilerin bilinen önemli yaşamsal fonksiyonlarının dışında diğer bazı çok önemli özellikleri de vardır. Bazı bitki türleri sentezledikleri primer ve sekonder metabolitler sayesinde ilaç sanayinde, kimya sanayinde, lif teknolojisi ve boya sanayinde kullanılmaktadırlar. Tüm bunların dışında ağaç, çalı, çiçekli bitki biçimleri ile peyzaj ve çevre düzenleme amaçlı kullanılarak insan doğasının estetik unsurları olarak yer almaktadırlar.

İnsanlar için bilinen bu faydalı özellikleri nedeniyle, bitkilerin sürekli tüketilmeleri sonucu bazı bitki türleri doğada yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmışlardır. Tüketicinin yanında doğada baskın ve en hareketli unsur olan insanlar zamanla bitkilerin doğal yaşam alanlarını istila etmeye ve bitkilere zarar vermeye başlamışlardır.

Bitkilerin kontrolsüz tüketimi ve çeşitli faktörlerle tahribatı sonucu yok olmalarına insanoğlu duyarsız kalmamış ve bitkileri koruma metotları geliştirmiştir. Özellikle biyoloji bilimi bitkilerin korunmasına yönelik çeşitli çözümler ortaya koymuştur. Bitkilerin doğal yaşam alanlarında korunmasından başka gen teknolojisindeki gelişmeler sayesinde çeşitli genetik uygulamaları ile önemli bitki gen kaynaklarının korunması sağlanmıştır. Bitki biyoteknolojisi alanı adı altında gelişen

biyoloji dalı ile bitkilerin alternatif üretim yöntemleri, genetik açıdan ıslah edilmeleri, üretimi yapılan bitkilerin koruma altına alınmaları gibi metotlar geliştirilerek gelecek nesillere bitkisel kaynakların aktarımı amaçlanmıştır.

Ilıman iklim kuşağı içerisinde bulunan ülkemiz, üçte biri yalnızca ülkemize özgü olmak üzere, yaklaşık 12.000 çiçekli bitki ve eğrelti türlerine ev sahipliği yapar. Özellikle son yıllardaki botanik araştırmalar, olağanüstü zengin bitki ve habitat çeşitliliğinin daha iyi tanınmasına katkıda bulunmuştur. Ancak bu zengin çeşitlilik büyük bir hızla bozulmaya, parçalanmaya ve yok olmaya başlamıştır (Atay vd. 2009). Bu aşamada koruma yöntemleri daha fazla önem kazanmıştır.

Ülkemizde klasik koruma metotlarına alternatif olarak bitki biyoteknolojisi uygulamalarına 1970’li yılların ikinci yarısında başlanmıştır (Ekim vd. 2000). Genetik ve moleküler tekniklerin gelişimi ve destekleri ile bitki biyoteknolojisi önem kazanmış, gelişerek günümüze ulaşmış ve önemini korumaktadır. Bugün ekonomik öneme sahip, nesli tükenme tehlikesi altında olan endemik bitki türlerinin çoğaltımı açısından en kolay, güvenilir ve verimli yol olmuştur.

Bu çalışmada, Marmara Bölgesinin Karadeniz kıyı kumullarında yaşayan, endemik ve nesli tükenme tehlikesi altında olan, *Silene sangaria* Coode&Cullen bitkisinin *in vitro* teknikler uygulanarak mikroçoğaltımı ile neslinin sürdürülmesi ve korunması amaçlanmıştır.

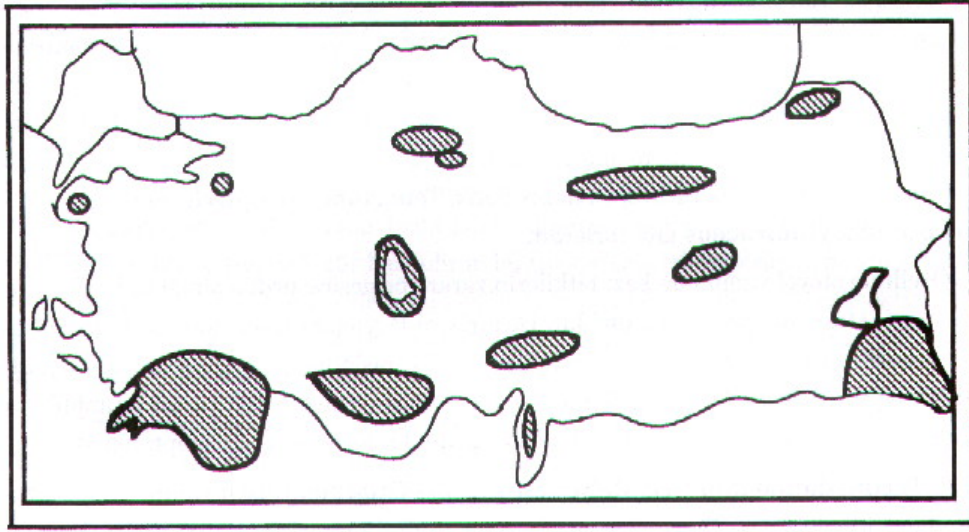
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Ülkemizin Bitkisel Zenginliği

Bugün yeryüzünde 270 000'in üzerinde bitki türü bulunduğu düşünülmekte ve bunların yaklaşık 34 000'inin tehlike altında olduğu varsayılmaktadır (Benson 1999). Avrupa kıtası toplam 12 000 adet eğrelti ve tohumlu bitkiye sahiptir ve bunların 2750 kadarının endemik olduğu bilinmektedir ( Ekim vd. 2000).

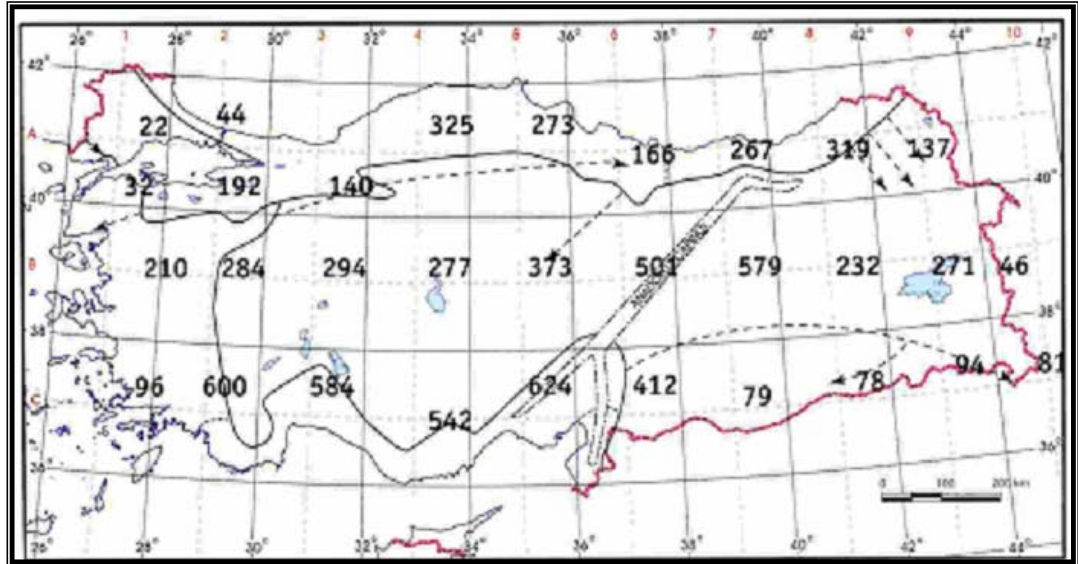
Ülkemizdeki endemizm oranı oldukça yüksek derecededir. Doğal çiçekli bitki ve eğreltilerde 3022'yi bulan endemik tür sayısı; alttür, varyete ve hibritlerle birlikte 3403'e yükselir. Başka bir deyişle Türkiye'de doğal olarak yetişen yaklaşık 12 000 bitki türünün dörtte biri endemiktir. Ilıman iklim kuşağında, Türkiye'den başka hiçbir ülkede bu endemizm oranı görülmez. Ilıman iklim kuşağında yer alan diğer bazı ülkeler ile karşılaştırma yapacak olursak İran'da endemizm oranı %17,5, İtalya'da %12,7, Fas'ta %17'dir (Özhatay vd. 2005).

Türkiye'de endemizm bakımından en zengin yerler Toros dağlarının batı ve orta kesimleri (özellikle Taşeli Platosu), İç Anadolu ile Doğu Anadolu arasındaki geçiş alanlarıdır. Özellikle Uludağ masifi, Kaz Dağı masifi, Ilgaz masifi gibi masifler, endemizm açısından özel alanlar olarak dikkat çekmektedirler (Avcı 2005).



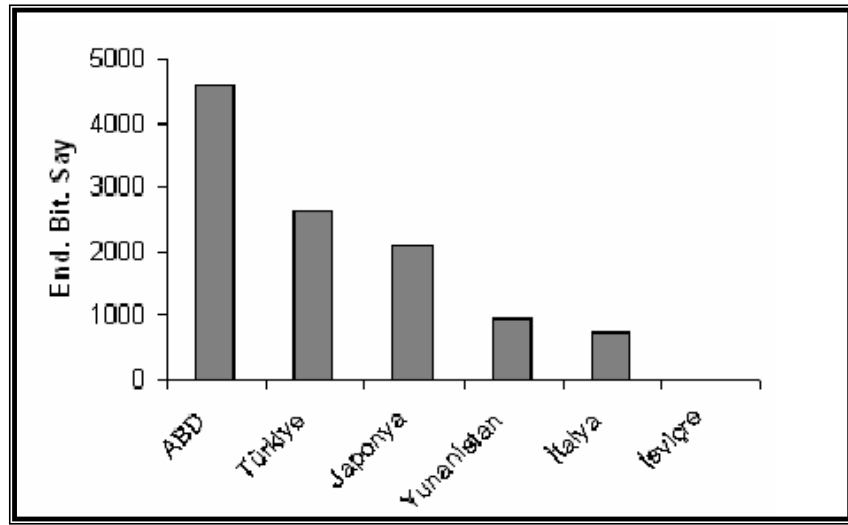
Şekil 2.1 Yurdumuzun endemik bitkiler açısından önemli yöreleri (Ekim vd. 2000)

Türkiye’deki endemik bitkilerin sayısının bölgelere göre dağılışı ise Akdeniz Bölgesinde 750, Doğu Anadolu Bölgesinde 380, İç Anadolu Bölgesinde 275, Karadeniz Bölgesinde 220, Ege Bölgesinde 160, Marmara Bölgesinde 70, G. Doğu Anadolu Bölgesinde 35 ve toplamda 1890’dır. Geriye kalan 1200 kadar endemik taksonun ise birden fazla coğrafi bölge sınırları içerisinde yayılım gösterdiği bilinmektedir (Kaya ve Aksakal 2005).



Şekil 2.2 Endemik taksonların “Türkiye Florası”ndaki kareleme sistemine göre sayısı (Özhatay vd. 2005)

Türkiye florasındaki bu olağanüstü zenginliğin ve çeşitliliğinin sebebi olarak çeşitli unsurlar gösterilmektedir. Ülkemizdeki zenginlik; farklı iklim tipleri (Karasal iklim, Okyanus iklimi ve Akdeniz iklimi), jeolojik ve jeomorfolojik çeşitlilik, zengin su kaynakları (deniz, göl ve akarsu), 0–5000 m’ler arasında değişen yükseklik farklılıkları, çok çeşitli habitat tipleri ve üç fitocoğrafik bölgenin (Avrupa-Sibirya, Akdeniz, İran-Turan) bulunduğu konumundan kaynaklanmaktadır (Özhatay vd. 2005). Anadolu diyagonalı (Anadolu Çaprazı) sınır kabul edilirse, doğusu ve batısı arasında ekolojik farklılıkların etkisi bitkisel çeşitlilik açısından da farklılıklar olarak ortaya çıkmış ve çeşitliliği oluşturan başka bir etmen olmuştur (Kaya ve Aksakal 2005).



Şekil.2.3 Ülkemizin zengin endemik bitki sayısının diğer ülkelere göre durumu (Kaya ve Aksakal 2005)

Bitkisel zenginlik ve endemizm oranının bu denli fazla oluşu ülkemizi yeryüzündeki önemli gen merkezlerinden biri haline getirmektedir. Botanik bilimi açısından endemik terimi; genel olarak yaşam alanları tahrip edilmemiş ve belirli bir ülke veya bölgeye ait yerel, ender ve çok ender bulunan türlere denir (Akman 1993). Buradan hareketle endemik türlerin; yaşama alanlarına özgü, hassas, nadir bulunabilmesi muhtemel ve korunma gereği duyulan türler oldukları sonucu ortaya çıkmaktadır. Çeşitli faktörler endemik bitkilerin yaşamlarını tehdit etmektedirler. Ülkemiz de sahip olduğu yüksek endemizm ile bu türlerin yaşamının devam ettirilmesi hassasiyetinin gösterilmesi açısından da önem kazanmaktadır.

## 2.2 Bitkisel Gen Kaynakları ve Korunma

Dünya nüfusunun hızla artması, insanların gereksinimlerini karşılamak amacı ile bitkisel gen kaynaklarının bilinçsizce kullanması, arazi açma faaliyetleri (şehirleşme ve tarım arazisi olarak kullanmak vb. nedenler ile), yerli (geleneksel) çeşitlerin yerini ıslah edilmiş çeşitlerin alması, tarım alanlarının genişletilmesi ve aşırı otlatma, turizm faaliyetleri, çorak (tuzcul alanların) ıslahı, yabancı ot ilaçlarının bilinçsiz ve aşırı kullanımı, tabii afetler, şehirleşme ve endüstrileşme bitki gen kaynaklarının azalmasına ve hızla kaybedilmesine neden olmaktadır (Ekim vd. 2000, Balkaya ve Yanmaz 2001).

Dünyada dar alanda ve sınırlı yayılışa sahip endemiklerin korunmaları konusunda son yıllarda oldukça ciddi ve önemli çalışmalar yapılmaktadır. Bunların uluslararası tehlike kategorilerinden hangisine dahil oldukları tespit edilerek, alınacak önlemlerde öncelik, nesli kaybolma tehlikesi altında olanlara verilmektedir. IUCN (The International Union for the Conservation of Nature and Natural Sources) 1994 yılında tehlike altındaki türlerin objektif kriterlere dayandırılarak listelenmesi amacı ile yeni bir kategorileşme sistemi belirlemiştir. 8 kategoriden oluşan bu listenin özellikle “CR”, “EN” ve “VU” kategorilerine sokulan bitkilerin korunmasına önem verilmelidir (Ekim vd. 2000). Sebebi CR (Critically endangered) çok tehlikede, EN (Endangered) tehlikede, VU (Vulnerable) zarar görebilir şeklinde sınıflandırılmış kategorilerin tehdit altında olan türleri içermeleridir. Ülkemiz endemiklerinden 171’i CR, 774’ü EN ve 688’i VU kategorilerinde sınıflandırılmıştır. Bu tablo ülkemiz endemiklerinin ne denli tehlike altında olduğunu gözler önüne sermektedir (Ekim vd. 2000).

Dünyamızı güneş sisteminde eşsiz yapan, genetik kaynaklardır. Genetik kaynaklar, canlıların gelişimini yönlendiren genleri içermektedir. Bu genlerin farklı kombinasyonları geçmişte ve günümüzde yapılmış, gelecekte yapılacak bitki ıslahı çalışmaları için son derece önemli olan genetik çeşitliliğin oluşumunu sağlamaktadır. Bu sebepten dolayı, bu çok değerli gen kaynaklarının gelecek için korunması son derece önemlidir (Şehirali vd. 1987).

Bitki genetik kaynaklarının korunması için başlıca üç yöntem kullanılmaktadır. İlki bütün canlı varlığın (biyom) korunması; tabiatta geniş alanlarda bitki ve hayvanlardan meydana gelen bütün canlı varlığın korunmasıdır. İkincisi *In situ* koruma sistemi; bitkileri kendi tabii yetiştirme alanlarında korumayı amaçlayan yöntemdir. Buna örnek olarak ÖBA (önemli bitki alanı) kavramı verilebilir. ÖBA, bitkisel çeşitlilik açısından çok zengin, nadir ve/veya endemik bitkilerin zengin toplulukları ve habitatlarını içeren bir yer olarak tanımlanır. Bu amaçla ülkemizde 90'lı yıllarda çeşitli kuruluşlar aracılığı ile bilim insanlarımız ülkemizin önemli ÖBA'larını belirleme çalışmalarına başlamıştır. Çok sayıda bilim adamı işbirliği ile günümüzde ülke çapında 144 ÖBA listelenmiştir. 2005 yılında 122 ÖBA listelenerek "Türkiye'nin 122 Önemli Bitki Alanı" kitabında yayınlanmıştır (Atay vd. 2009). Sonuncu koruma metodu *Ex situ* koruma sistemi; bir ülkenin veya belirli bir bölgenin çeşitli bitkilerini veya farklı özelliklere sahip bir bitki türüne ait genetik çeşitliliği mümkün olduğu kadar çeşitli materyal toplayarak bunları koruma altına almak ve çeşitli metotlar ile devamlılıklarını sağlamaktır (Ekim 1990).

*Ex situ* koruma çalışmalarına örnek olarak; tohum bankalarının oluşturulması, türlere ait genetik dağılımların tespiti, tohumların çimlenme prosedürlerinin belirlenmesi, tohumdan çoğaltımın yapılması ve bitki doku kültürü tekniklerini kullanarak hem mikroçoğaltımın yapılması hem de sürekli kültürlerin oluşturulması çalışmaları verilebilir (Dayan 2006).

Yukarıda verilen *Ex situ* koruma çalışmalarından tohum bankalarının oluşturulması ve tohumdan çimlendirme prosedürleri ile tohumdan üretim ve çoğaltım teknikleri günümüze kadar en sık kullanılan gen kaynağı muhafaza sistemi olmuştur. Doğal alanlarında korunmaya çalışılan genetik kaynakların hızla yok olduğunun fark edilmesi ile ilk olarak 1898 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde kaynakların tespit edilmesi ve koruma altına alınması amacı ile tarım bakanlığına bağlı olan "Tohum ve Bitki İndüksiyon Ünitesi" kurulmuştur. Daha sonra tüm ülkelerde yaygın hale gelen genetik kaynakları araştırmak ve toplamak üzere çeşitli uluslararası hizmet veren kuruluşlar kurulmuştur. Bugün için dünyada 7 merkez bulunmaktadır. Bunlar ABD'deki USDA (Tarım dairesi), CIAT (Uluslar Arası Tropik Tarım Merkezi ), İngiltere Cambridge Üniversitesi'ndeki "Baklagiller Koleksiyonu", Suriye'de ICARDA

(Uluslararası Kurak Alanlarda Tarımsal Araştırmalar Merkezi), Fransa'da INRA (Fransız Ulusal Tarım Araştırma Enstitüsü), Taiwan'daki Asya Sebzecilik Araştırma ve Geliştirme Merkezi (AVRDC) ve Rusya'da ki Vavilov Enstitüsü'dür (Balkaya ve Yanmaz 2001).

Gen kaynaklarının toplanması ve korunması uzun bir yöntem içermektedir. Bunlar sırası ile tohumların ayrılması, tohumların kurutulması ve temizlenmesi, etiketleme, paketleme, muhafaza ve canlılık kontrolü ve kayıt işlemidir (Balkaya ve Yanmaz 2001).

Tohum çimlenmesinin çeşitli zorlukları bulunmaktadır. Tohum çimlenmesinin en önemli problemi olan fizyolojik durum dormansidir. Tohum dormansisi, normal olarak tohumun çimlenmesi gereken koşullarda (yeterli nem, uygun sıcaklık, oksijen ve bazı durumlarda ışık) canlı tohumların çimlenmemesi durumudur (Schmidt, 2000). Yani dormansi tohum çimlenmesinin yetersizliği durumudur. Dormansinin aşılması için uygun koşulların yerine getirilmesi gerekmektedir. Dormansi de dış faktörlerin tohum içi hormonal mekanizmaya etki etmesi durumu söz konusudur. Brady ve McCourt 2003'e, göre tohum dormansisinin oluşumu hormon faaliyetlerinin denge modeli ile açıklanmaktadır. Bu modelde hormonlar arasında dengeden bahsedilmektedir. Absisik asitin (ABA) dormansiyi arttırdığı, giberellik asit (GA) ve etilenin dormansiyi azalttığı bildirilmiştir (Kozlowski ve Pallardy 1997). Maksimum genetik çeşitliliği sürdürmek için tohumdan yapılan çoğaltım yöntemlerinin tercih edilmesine rağmen, az sayıda tohum üreten ve tohum çimlenmesi güçlüğü bulunan ya da sera şartlarında çimlenme sonrası fide gelişimi güçlüğü yaşayan tehlike altındaki türlerin *ex situ* üretimi söz konusu olduğu durumlarda bitki doku kültürü teknikleri de kullanılmaktadır (Benson 1999).

### 2.3 Bitki Doku Kültürünün Tanımı, Tarihçesi ve Kullanım Alanları

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku ( eşitli bitki kısımları = eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi kısımlardan yeni bitki ve bitkisel ürünlerin üretilmesidir. Doku kültürüne “mikro o altım” veya “aseptik kültür” adı da verilmektedir. Mevcut çeşitlerde genetik çeşitliliği oluşturmak, yeni çeşitler geliştirmek ve kaybolmakta olan türlerin korunması ve çoğaltılması doku kültürünün kullanım amaçlarıdır (Babaoğlu vd. 2002).

Genetik materyalin uzun süre korunmasında doku kültürü tekniklerinden yararlanılmaktadır. Yapay besi ortamına aktarılan çeşitli eksplant tipleri sayesinde nesli tükenme durumunda olan bitki türleri koruma altına alınmış ve sürekliliği sağlanmıştır.

Doku kültürü 1900’l  yıllarda ilk deneysel çalışmalar ile başlamıştır. Haberlandt’ın totipotensi (toplam g c teorisi) görüşü doku kültürünün temelini teşkil etmiştir. Bu görüşte her bitki bir zigot hücresinden meydana gelir ve her zigot hücresinin komple bir bitkiyi meydana getirebilme potansiyeli vardır. Bu o bitkinin tüm canlı hücreleri içinde geçerlidir. 1930’lu yıllarda keşfedilen bitki hormonlarının doku kültüründe kullanılması büyük kolaylıklar sağlamış ve doku kültürünün gelişimine önemi katkı yapmıştır (Kocaçalışkan 2002).

Türkiye’de biyoteknoloji çalışmaları 1970’li yılların ikinci yarısında başlamıştır ve ilk yıllarda ağırlıklı olarak doku kültürü çalışmalarına yer verilmiştir. Moleküler ve genetik bilimlerinin yardımı ile doku kültürü çalışmaları günümüze kadar artarak devam etmiş ve yaygınlaşmıştır (Abak vd 2001).

Bitki doku kültürlerinin bitki ıslahındaki uygulama alanları; türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü, haploid bitki üretiminde anter ve yumurtalık kültürü, somaklonal varyasyon, *in vitro* seleksiyon, *in vitro* döllenme, *in vitro* germplazm muhafazası, somatik hücre melezlemesi (protoplast füzyonu) ve gen transferidir. Islah dışı uygulama alanları ise ticari açıdan önem taşımakta olan;

hastaliksız bitki elde edilmesinde meristem kültürü, mikroçoğaltım, sentetik tohum üretimi, sekonder metabolit üretimi ve kimeralardır (Babaoğlu vd. 2002).

Bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme gücüne sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, gövde, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkiler elde edilmesine mikroçoğaltım denir (Babaoğlu vd. 2002).

Mikroçoğaltım belirli aşamalardan meydana gelmektedir. Bunlar hazırlık, kültür başlangıç, sürgün çoğaltım, sürgün gelişimi ve köklendirme, dış ortama alıştırma (aklamatizasyon) aşamalarıdır (Babaoğlu vd 2002).

Hazırlık aşamasının ilk kısmı çalışma yapılacak bitki materyaline ait ana bitkinin seçimidir. Seçilecek ana bitkinin sağlıklı olması esas alınmaktadır. Eğer bitkinin laboratuvarında doku kültüründe yetiştirilmiş olanı varsa ana bitki olarak kullanılması daha uygundur, çünkü steril şartlarda büyüdükleri için kontaminasyon riski yok denecek kadar azdır. Ayrıca doku kültüründe yetişmiş olan bitkilerden alınan eksplantlar tabiattan alınmış olanlara göre daha kolay ve hızlı rejenere olmaktadır. Eğer doku kültüründe yetişmiş bitki temin etme imkanı yok ise dikkat edilecek bazı hususlar vardır. Bu durumda seçilecek ana bitki; sağlıklı olmalı, genç olmalı, bitkinin organ ve dokuları dormant olmamalı, ana bitki seçimi bahar mevsiminde yapılmalıdır, çünkü hormonal aktivite sonucu dormansiye girmiş yani zor koşullar altında gelişimini durdurmuş bitkilerin doku ve organları kültürde uygun cevap oluşturamayabilirler. Bahar mevsimi genellikle dormansi olayının en az görüldüğü mevsim olduğundan en uygun mevsimdir (Kocaçalışkan 2002).

Çalışmaya başlamadan önce dış ortamdan temin edilen ve eksplant alınacak bitkilerin organlarına (kök, çiçek, tohum gibi) sterilizasyon işlemi uygulanmalıdır. Bitki dokularının sterilizasyonu için sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit, gümüş nitrat ve civa klorür kullanılır. Genel olarak sterilizasyon işlemi aşamaları; musluk suyunda yıkama, % 70-95'lik etil alkolde birkaç saniye tutma, birkaç damla deterjan (Tween-20) içeren % 5-20'lik sodyum hipoklorit içerisinde 10-30 dakika kadar bekletme ve sonrasında 3-4 kez steril su ile çalkalama aşamalarından oluşmaktadır. Ancak

sterilizasyon işlemleri ana bitkinin yetiştiği ortamın özelliklerine ve eksplantın alındığı organa göre farklılıklar göstermektedir (Babaoğlu vd. 2002, Kocaçalışkan 2002).

Bu aşamadan sonra eksplantın alınacağı besi ortamı bileşenleri amaca uygun olarak hazırlanmalıdır. Besi ortamında su, inorganik maddeler (makro ve mikro elementler), organik maddeler (glukoz, fruktoz, nikotik asit, tiamin gibi), amino asitler (glutamin, arginin, aspartik asit gibi), meyve özleri ve suları (hindistan cevizi özütü, maya özütü gibi) ve bitki büyüme düzenleyicileri (oksinler, sitokininler, giberellinler gibi) bulunmalıdır (Kocaçalışkan 2002).

Bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarında kültür gelişimi açısından belirleyici olmaktadır. Oksinler kök gelişimini sitokininler de sürgün gelişimini uyarırlar. Sitokinin / oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin / sitokinin oranının yüksek olması kök oluşumunu, oksin ve sitokinin oranlarının eşit olması ise kallus oluşumunu desteklemektedir. Besin ortamına katılacak hormon miktarı bitki türüne ve kültür amacına göre değişmekle birlikte genelde 0,1 – 30 ppm arasında farklı konsantrasyonlar kullanılmaktadır (Babaoğlu vd. 2002, Kocaçalışkan 2002).

Bu aşamadan sonra bitki büyütme odasında iki önemli faktör olan ışık ve sıcaklığın ayarlanması gereklidir. Kültür kapları kapaklı olduğundan mutlak nem zaten sağlanmıştır. Işık genellikle beyaz serin floresan lambalarıyla sağlanır. Işık şiddeti 2000–10000 lüks arasında, fotoperyot sürekli ışık veya sürekli karanlık ya da 16 saat ışık 8 saat karanlık şeklinde olabilmektedir. Sıcaklık genellikle 18–25 °C dereceleri arasında olmalıdır (Kocaçalışkan 2002).

Bir sonraki aşama olan sürgün geliştirme ve köklendirme aşamasıdır. Önceki aşamada elde edilen sürgünler veya kalluslar bulundukları ortamdan alınarak farklı hormon konsantrasyonlarına sahip besi yerlerine aktarılmalıdırlar. Sitokininler sürgün oluşumunu uyardıklarından, kalluslar sitokinin içeren besi yerine alınarak sürgün oluşumu sağlanabilmektedir. Belirli bir uzunluğa ulaşmış sürgünlerse köklendirme amacıyla sitokinininden bağımsız köklendirme ortamlarına alınmalıdırlar, çünkü sürgün gelişim ortamında bulunan yüksek sitokinin varlığı köklenmeyi inhibe etmektedir. Oksin varlığı ise tam tersi olarak köklenmeyi teşvik etmektedir. Köklendirme çalışması *in vivo* ve *in vitro* olabilmektedir. Ancak *in vivo* (dış ortamda) yapılan köklendirme

çalışmalarında kayıp oranı yüksek olduğundan önce *in vitro*'da köklendirilip sonra dış ortama aktarılmalari önerilmektedir (Babaoğlu vd. 2002).

Son aşama ise dış ortama alıştırma (aklamatizasyon) aşamasıdır. Dış ortamın şartları ışık, nem, besin ve sterilité açısından kültür ortamına göre çok farklıdır. En uygun zaman köklerin geliştiğı ve yaprakların fotosentez yapabildikleri evredir. Dışarıya çıkarmadan önce ilk aşama ışık yoğunluğunu arttırmak ve kültür kabının kapağını aralayarak CO<sub>2</sub> gazının daha bol girişini sağlamaktır. Kapların ağzı bir haftadan fazla açık kalmadıkça kontaminasyonun sorun yaratmadığı gözlenmiştir (Babaoğlu vd. 2002). Bu aşamadan sonra bitkicik kaptan çıkarılarak kökleri agardan temizlenmelidir. Kökleri temizlenen bitki bir saksıya dikilerek üzeri naylon bir örtü veya cam, plastik vb. fanus ile kapatılmalıdır. Burada amaç nemi korumaktır. Yaklaşık 10 gün sonra naylon veya fanusta delikler açmak suretiyle havalandırma sağlanır ve bu işlem iki hafta kadar sürer. Bu sürenin sonunda üzeri açılan bitki serada gölge bir yere konularak bir ay kadar burada büyütölür. Bu aşamadan sonra bitkimiz doğal habitat şartlarına transfere hazır hale gelmiştir (Kocaçalışkan 2002).

Ekonomik öneme sahip, endemik ve türü tehlike altında olan bitkilerin korunması ve çoğaltılması için mikroçoğaltım en uygun metot olarak öne çıkmaktadır. Dünyada pek çok bilim adamı bu yolla nesli tehlike altında olan bitkilerin çoğaltımı ve korunması yoluna başvurmuştur. Bunlardan bazılarına aşağıdaki çalışmalar örnek olarak gösterilebilir.

Normah vd. (1997) Güney Batı Asya bölgesinde yaşayan ve tehlike altında olan *Citrus halimii* türü ile gerçekleştirdikleri mikroçoğaltım çalışması ile eksplant başına 9,6 sürgün elde etmiş ve köklendirdikleri bu sürgünlerden % 83 ünü dış ortam koşullarına alıştırmayı başarmışlardır.

McCartan ve van Staden (2003), Güney Afrika Kwa Zulu-Natal yöresinin endemiğı olan *Kniphofia leucocephala* türü bitkinin mikroçoğaltımını gerçekleştirmiş elde ettikleri 200 sürgünü köklendirerek dış ortama alıştırmayı başarmışlardır.

Ibañez ve Marco (1998), tehlike altındaki İspanya endemiğı olan *Minurtia valentia* bitkisi ile gerçekleştirdikleri mikroçoğaltım çalışmasında, % 96 oranında elde ettikleri sürgünlerin yaklaşık % 85'ini köklendirerek dışarıya alıştırmışlardır.

Diğer bir çalışma da, kanser engelleyici özelliği olduğu düşünülen, tehlike altındaki bir Hint bitkisi olan *Curciglio orchioides* bitkisinin mikroçoğaltımı Wala ve Jasrai (2003) adlı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar üç ay içerisinde meristemden kültürü yolu ile yaklaşık olarak 125 bitki elde etmeyi başarmışlardır.

Jordan vd (2001) doğada yok olmuş, sadece botanik bahçelerinde yaşayan, *Sophoria toromiro* türünün tohumlarını botanik bahçelerinden temin ederek öncelikle steril fideler üretmiş, ardından başarı ile türün mikroçoğaltımını gerçekleştirmişlerdir.

Endemizm açısından yüksek öneme sahip ülkemizde de mikroçoğaltım çalışmaları gün geçtikçe artarak devam etmektedir. Bu çalışmalara aşağıdaki örnekleri verebiliriz.

Baba (1995), Türkiye endemiği olan ve ekonomik öneme sahip *Astragalus tmoelus* var. *tmoelus*, *Digitalis cariensis*, *Sideritis sipylea*, *Stachys tmolea* ve *Tymus sipyleus* türleri ile doku kültürü çalışmaları yapmış ve dış ortama alıştırma çalışmalarını başarıyla sonlandırdığını rapor etmiştir. Yine Erdağ ve Kurt (2009), Türkiye endemiği olan *Centurea zeybekii* türünün mikroçoğaltımını başarı ile gerçekleştirdiklerini rapor etmişlerdir.

Ayan ve Çırak (2006), ülkemiz endemik bitkisi olan ve medikal açıdan önemi olduğu düşünülen *Hypericum heterophyllum* bitkisinin mikroçoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. 8.3 oranında köklenme elde edilmiş ve % 100'e yakın dış ortama alıştırma yapılmıştır.

Çakır ve Oluk (2009), anti bakteriyel ve anti fungal etkileri açısından öneme sahip ve aynı zamanda ülkemiz endemiği olan medikal *Origanum sipyleum* bitkisinin mikroçoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. 7.8 oranında sürgün elde edilmiş, bunların % 96'sı köklendirilmiştir. Elde edilen sürgünlerin yaklaşık % 76'sı dış ortama alıştırılarak hayatta kalmıştır.

Dayan (2006) bir diğer Türkiye endemiği olan *Thermopsis turcica*'nın mikroçoğaltımını gerçekleştirmişdir.

Parmaksız vd. (2005), tehlike altında olan bir başka tür *Muscari muscarimi*'nin olgunlaşmamış embriyolarını kullanarak hızlı soğancık üretimi prosedürünün geliştirmişlerdir.

Çöçü vd. (2005) Fabaceae ailesine mensup, yerel endemik ve CR kategorisinde yer alan gelecekte yok olma riski taşıyan *Astragalus duranii*'nin *in vitro* hızlı çoğaltım prosedürünü başarı ile gerçekleştirmişlerdir.

Dünyada ve ülkemizde yapılmış olan mikroçoğaltım çalışmalarına değindikten sonra çalışmamızın hedef bitkisi olan *Silene sangaria* hakkında yapılmış olan çalışmalara baktığımızda doku kültürü olarak daha önce bu bitki ile çalışılmadığını görmekteyiz.

## 2.4 Caryophyllaceae (Karanfilgiller) Familyasının Genel Özellikleri

Caryophyllaceae (Karanfilgiller) familyası Kuzey Yarım Küre'nin sıcak ve ılıman bölgeleri ile Güney Yarım Küre'nin tropik dağlarında yayılış göstermektedir. Bu familyaya ait bitkiler genelde çok yıllıktır ve çiçek özelliklerinden dolayı genelde pembe aile olarak nitelendirilmektedirler (Muca 2009). Caryophyllaceae familyası dünyada yaklaşık olarak 80 cins ve 2000 takson ile temsil edilen geniş bir familyadır. Dünyada *Silene* L. cinsi ise Caryophyllaceae familyası içerisinde 157 tür ile en fazla tür sayısına sahip cins olarak yeryüzünde bu familyayı temsil etmektedir.

Gövdelerinde şişkin nodyumlar bulunur. Yapraklar karşılıklı, bazen alması, basit ve çoğunlukla şeritsidir. Kulakçıkları genellikle yoktur, olanlarda derimsi yapıdadır. Çiçekler iki eşeyli, nadiren tek eşeyli ve iki evciklidir. Aktinomorf simetrikler. Çoğunlukla basit veya birleşik dikazyum çiçek durumu halinde, bazen de dalların ucunda tek şeklide bulunurlar. Kaliks 5 tane ve tabanda birleşmiştir. Çanak yaprakların sayısı bazı türlerde 4'tür. *Diantus*'da kaliks brahte ile çevrilmiştir. Korolla kaliks lobları ile aynı sayıda, taç yapraklardan meydana gelir. Taç yapraklar ayrıdır. Alt

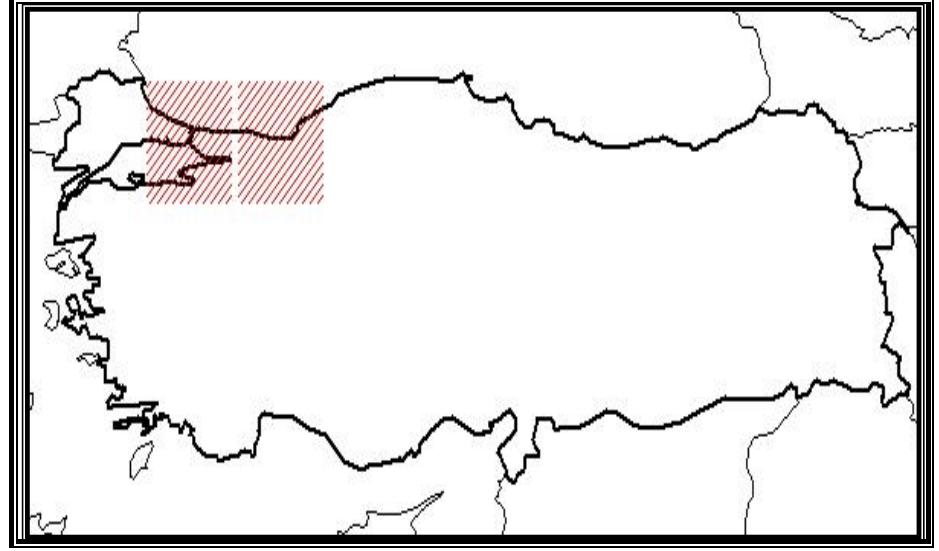
kısmı ince dar, üst kısmı genişçedir. Bununla beraber, bazı cinslerde hayli küçülmüş taç yapraklara da rastlanır. Plasentalanma merkezi eksenseldir. Meyve folikül, akendir. Erkek organ sayısı taçyaprak eşit veya 2 katıdır. Dişi organ tek, üst durumlu yumurtalıktır (Vikipedi1).

## 2.5 *Silene* Cinsinin Genel Özellikleri

*Silene* L. genusu Caryophyllaceae familyasına ait dünyadaki en geniş cinslerinden birisidir. Yaklaşık yarısı Akdeniz bölgesinde yetişmektedir. Güneybatı Asya *Silene* cinsinin ana çeşitlilik merkezidir. Ülkemizde yaklaşık olarak 135 tür ile temsil edilmektedir (Bağcı 2008). Ülkemizde bilinen 52 adet endemik *Silene* türü bulunmaktadır ve bu *Silene* genusunun yaklaşık % 40,3'ünü oluşturmaktadır (Seçmen 1996).

*Silene sangaria* Türkiye'nin kuzeybatısında uzanan Karadeniz kıyı kumullarına özgü, toprak üstüne yatmış dağınık, toprak altında sürünücü gövdeye sahip, çok yıllık bir bitkidir. İlk kez Sakarya Nehri'nin ağzı civarındaki kumullarından toplanarak 1967 yılında bilim dünyasına tanıtılmıştır. Bitkinin 1990'lı yıllarda ilk toplandığı alandan itibaren batıya, İzmit'e kadar 14 yerde, İstanbul, Kırklareli, Kocaeli, Sakarya ve Tekirdağ il sınırları içerisinde daha yetiştiği saptanmıştır. Bilinen bu 14 yayılış alanlarından 11'i İstanbul sınırları içerisinde. Aşağıda Şekil 2.4'teki haritada yayılış alanları gösterilmiştir. Türkiye'nin özellikle kuzeybatısındaki bu geniş ve sürekli yayılışı nedeniyle *Silene sangaria*'nın Bulgaristan kıyı kumullarında da bulunabileceği tahmin edilmektedir. Sarımsı beyaz çiçeklere sahip bu çok yıllık bitki halk arasında "Karadeniz salkımı, Kum nakılı ve Kum gıvışkan otu" adları ile bilinmektedir (Güler 2007). İstanbul kıyı kumullarının hızla yok olması (son 30 yılda ilin kıyı kumullarının yaklaşık %80'i yok olmuştur), geriye kalan kumul alanlarda ise kum ve linyit çıkarımı,

ağaçlandırma ve aşırı ikinci konut yapılaşması gibi nedenlerden ötürü tehdit altındadır (Özhatay vd. 2005) (Çelik 2005).



Şekil 2.4 *S. sangaria* bitkisinin ülkemiz sınırları içerisinde yayılış gösterdiği bölgeler (TÜBİVES)

Ülkemiz endemiği olan *S. sangaria* IUCN kırmızı listelerinde VU kategorisinde bulunan, ülkemizin Bern sözleşmesi Ek-1'de korunması gereken Caryophyllaceae türleri arasında yer alan ve bu sözleşme gereğince ülkemizin korumakla yükümlü olduğu bir bitki türüdür (Başkaya vd. 2008)

*Silene* türleri ile çeşitli *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Örneğin Gunter vd. (2007) *Silene vulgaris*'te kallus kültüründen *in vitro* polisakkarit modifikasyonu çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Jack vd. (2005) yine *S. vulgaris* ile yaptıkları *in vitro* çalışmada kallus oluşumu ve rejenerasyonunu belirlemişlerdir. Doğrudan *S. sangaria* ile yapılmış bir *in vitro* çalışmaya rastlanmamıştır. *S. sangaria*'nın Avrupa'da yetişen *Silene thymifolia* türü ile benzer özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Özhatay vd. 2005). Panayotova vd. (2008) *S. thymifolia* türü ile *in vitro* kültür çalışması yapmış ve yüksek bir rejenerasyon oranı elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada amaç, tohumdan çoğaltımla tohumların dormansi sorunlarının aşılmasını sağlamak ve etkin bir çimlenme prosedürü elde etmeye çalışmaktır. Bir diğer amacımız ise çalışmamızın aşamalarını *in vitro* ortamlarda gerçekleştirerek sağlıklı

steril fideler elde etmek ve bunları mikroçoğaltım aşamasında eksplant kaynağı olarak kullanmaktır. Asıl amacımız ise bitki doku kültürü tekniklerinden en iyi şekilde istifade ederek hızlı bir mikroçoğaltım prosedürü belirlemek ve VU kategorisinde yani yakın gelecekte zarar görmesi muhtemel olan *S. sangaria*'nın korunmasına katkı sağlamaya çalışmaktır.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Materyal

Bu çalışmada kullanılan bitki materyali Karadeniz kıyı kumulları üzerinde yayılış gösteren endemik *S. sangaria* bitkisidir (bkz Şekil 3.1). 2008 yılı Ağustos ayı içerisinde bu türün tohumları Kırklareli ili İğneada kumsalından toplanmıştır. *S. sangaria*'nın yayılış gösterdiği alanlardan temin edilen bitki örneklerinin bulunduğu bölge Şekil 3.2'deki harita üzerinde gösterilmiştir. Toplanan tohumların içerisinde sağlıklı olanları seçilmiş, deneylerde kullanılmaya kadar küçük zarflar içerisinde karanlıkta ve oda sıcaklığında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1 *Silene sangaria* bitkisinin doğal yayılış alanlarındaki görünümü (Vikipedi2)



Şekil 3.2 Deney materyali olan *S. sangaria* bitkisinin toplandığı İğneada sahil şeridinin harita üzerinde gösterimi

## **3.2 METOT**

### **3.2.1 Çalışma Ortamının Sterilizasyonu**

Mikroçoğaltım aşamalarının tümü steril kabin içerisinde ve çeker ocak alevinin yanında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya başlamadan bir gün önce laboratuvarın steril çalışma odası kısmındaki ultraviyole (UV) lambalar açık bırakılmıştır. Steril çalışma odası içerisinde kullanılacak benç üzeri ve steril kabinin iç yüzeyi, çalışma öncesinde ticari çamaşır suyu ile silinerek temizlenmiştir. Çalışma esnasında da % 70'lik etanol kullanılarak anlık sterilizasyon sağlanmıştır. Kültürlerin inkübe edildiği iklim kabini ise belli zamanlarla ticari çamaşır suyu ile temizlenmiştir.

### **3.2.2 Denemelerde Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu**

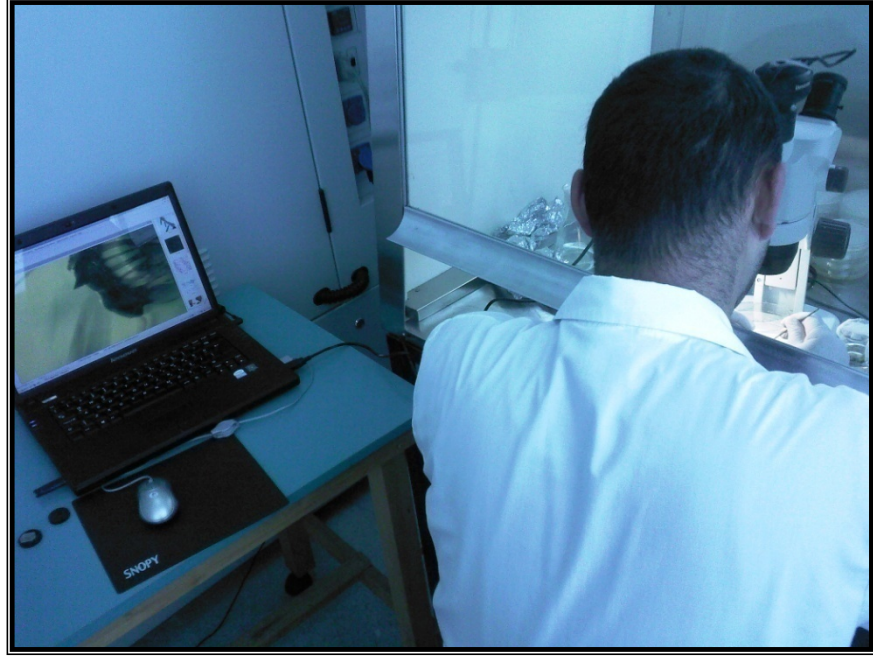
Denemelerde kullanılan beher, cam petri, besi yeri hazırlama şişesi, magenta kültür kabı, kültür şişesi, cam tüp, bistüri sapı, pens, tülbent bezi, spatül gibi malzemeler 121 °C ısı, 1 atm basınç altında 15 dk otoklavlanarak steril edilmişlerdir. Çalışmalarda kullanılan 9 cm'lik plastik petriler ise tek kullanımlık ve sterildirler.



Şekil 3.3 Deneylerimizi gerçekleştirdiğimiz Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'ndan görünüm



Şekil 3.4 Laboratuvarımızda kullandığımız bitki büyütme kabini



Şekil 3.5 Doku Kültürü Laboratuvarımızda steril kabin içerisinde çalışma esnasında

### 3.2.3 Kültür Besi Yerlerinin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

İlk aşama olarak besi yerlerine eklenecek bitki büyüme düzenleyicilerinin ve pH'yı ayarlamak amacı ile kullanılacak olan asit ve bazların stok solüsyonları hazırlanmıştır. Denemelerde kullanılan Naftalen asetik asit (NAA) ve 6-benzilaminopürin (BA) 70 ml sodyum hidroksit içinde çözülmüş ve son hacim 2 mg/ml olacak şekilde steril bidistile su ile 100ml'ye tamamlanmıştır. 2,4-Diklorofenoksiasetikasit (2,4-D) balon joje'de 20 ml etanol içinde çözülmüş ve son konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Yine Giberellik asit ( $GA_3$ ) stok solüsyonu, bidistile su içerisinde çözülerek son konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde 100 ml hacimde hazırlanmıştır. Hidroklorik asit ve sodyum hidroksitin 1 N'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Tüm stok solüsyonlar buzdolabında +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Denemeler için farklı kompozisyonlara sahip besi yerleri hazırlanmıştır. Tümünde MS (Murashige ve Skoog 1962) hazır tuz ve vitaminleri (4.3 g/L), sükroz (30 g/L), ve plant agar (7g/L) kullanılmıştır. Gerekli miktarda MS tuzları, vitaminleri ve sükroz amaca uygun hacim içerisindeki distile su içerisinde yavaşça çalkalamak sureti ile çözüldükten sonra, stok hormonlardan arzu edilen miktarda eklenmiştir. pH hidroklorik asit ve sodyum hidroksit ile  $5,7 \pm 0,1$ 'e ayarlandıktan sonra plant agar eklenmiştir. Besi yerleri 121 °C ısı, 1 atm basınçta 15 dk (nüve otoklavda P1 katı besi yeri sterilizasyon ayarında) otoklavlanmıştır. Otoklavlanan besi yerleri steril kabin içerisine alınarak oda sıcaklığında bir miktar soğutulduktan sonra bek alevi yanında amaca uygun steril kaplara (magenta kültür kabı, petri, cam tüp, kültür şişesi) dökülmüştür.

### 3.2.4 İklimlendirme Koşulları

Kültürler,  $25 \pm 1$  °C'de ve beyaz floresan lamba ışığında 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlıkta olmak üzere iklim kabininde inkübe edilmişlerdir.

### 3.2.5 *In vitro* Çimlendirme

Çimlenme çalışmalarına Ocak 2010'da başlanmıştır. İlk olarak stero mikroskop yardımı ile sağlıklı görünüme sahip 200 kadar *S. sangaria* tohumu seçilmiştir. Seçilen tohumlar küçük boyutta olduklarından tülbent bezi içine konularak, sterilizasyon işlemi esnasında, bir arada kalmaları sağlanmıştır (bkz. Şekil 3.6). Tohumlar ilk olarak 1 saat kadar musluk suyunda bekletilmişlerdir. Daha sonra sterilizasyon aşamalarının ilk

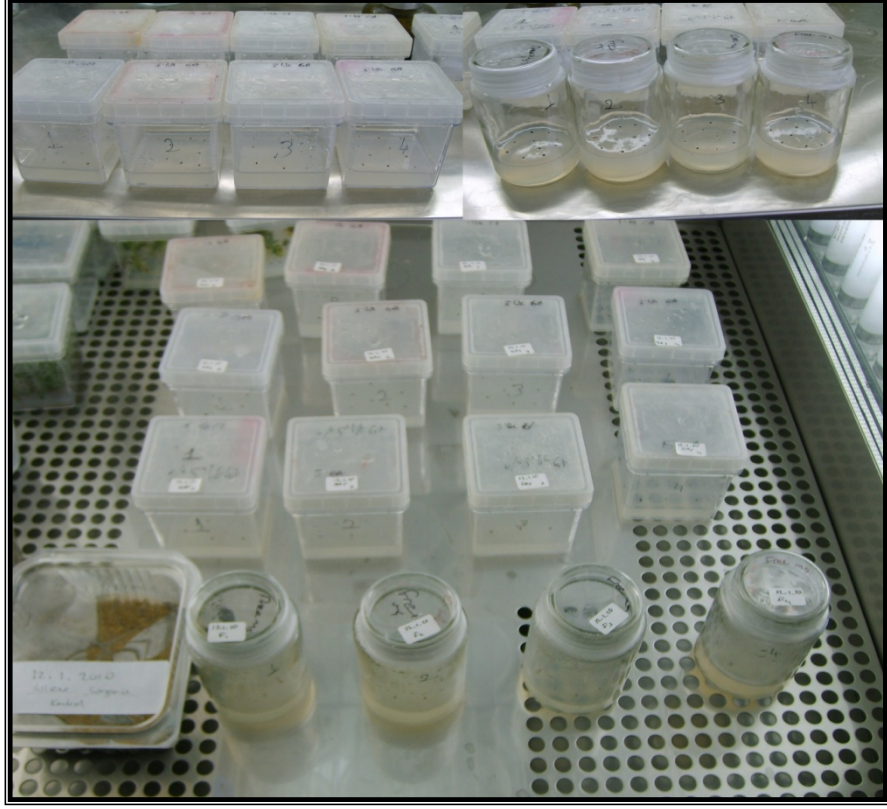
basamağı olarak % 70'lik alkolde 10 dk çalkalanmıştır. Bunu takiben 2 damla Tween - 20 solüsyonu damlatılmış % 10'luk ticari çamaşır suyu içerisinde 15 dk çalkalanarak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Sterilize edilen tohumlar, steril kabin içerisine alınarak, sterilizasyonda kullanılan maddelerin uzaklaştırılması amacıyla, 3 defa 1'er dk steril saf su ile durulanmıştır.



Şekil 3.6 Tülbent bezi içerisinde bulunan *S. sangaria* tohumlarının sterilizasyonu

Çimlendirme çalışmasında GA<sub>3</sub> hormonunun çimlenme ve gelişme gücüne etkisini gözlemek amacı ile farklı GA<sub>3</sub> konsantrasyonlarına sahip besi yerleri hazırlanmıştır. Bu amaçla hormon free MS, 1, 3 ve 5 mg/L GA<sub>3</sub> konsantrasyonlarına sahip farklı MS besi yerleri ve steril olmayan kum kullanılmıştır. Kullanılacak besi yerlerini dökmek için hava girişine izin veren fakat mikroorganizmaların girişini engelleyen magenta kapları ve kültür şişeleri kullanılmıştır. Daha önce ön denemelerde yapılan çalışmalarda, bir kaba ekilen 20 kadar tohumun çimlenme sonrası köklerinin birbirine dolaştığı ve kaptan ayrılarak çıkarılmada zorluk yaşandığından, besi yerleri kendi içinde daha küçük hacimde daha çok sayıda kaba ayrılarak daha az miktarda tohum yerleştirilmiştir. Her bir besi yeri çeşidine ve kuma toplamda 40'ar adet tohum yerleştirilmiştir. Her farklı besi yeri için her bir kaba 50'şer ml besi yeri dökülmüş ve 10'ar tohum yerleştirilmiştir. Kültür kapları daha önce belirtilen şartlardaki iklim

kabinine yerleştirilmiştir (bkz. Şekil 3.7). Çimlenme çalışması 30 gün sürmüş ve çimlenen tohum sayıları günlük olarak kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.7 Kiltür kaplarına ve şişelerine ekilmiş tohumların genel görüntüsü

### 3.2.6 Kallus Başlatımı

Kallus oluşumu amaçlı 10 farklı tip besi yeri hazırlanmıştır. 3 mg/L hormon konsantrasyonuna sahip; 2,4-D, BA, NAA besi yerleri, 1 mg/L konsantrasyonuna sahip; 2,4-D, BA, NAA besi yerleri, 1 mg/L BA 0,5mg/L NAA, 3 mg/L BA 0,5 mg/L NAA, 3mg/L NAA 1 mg/L BA ve 3 mg/L 2,4-D 1 mg/L BA içeren hormon

konsantrasyonlarına sahip besi yerleri hazırlanmıştır. Hazırlanmasında 3.2.3'te bahsedilen yöntemler kullanılmış otoklavlanan besi yerleri her bir petriye 30 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Aşağıdaki çizelgede hazırlanan besi yerleri gösterilerek numaralandırılmıştır.

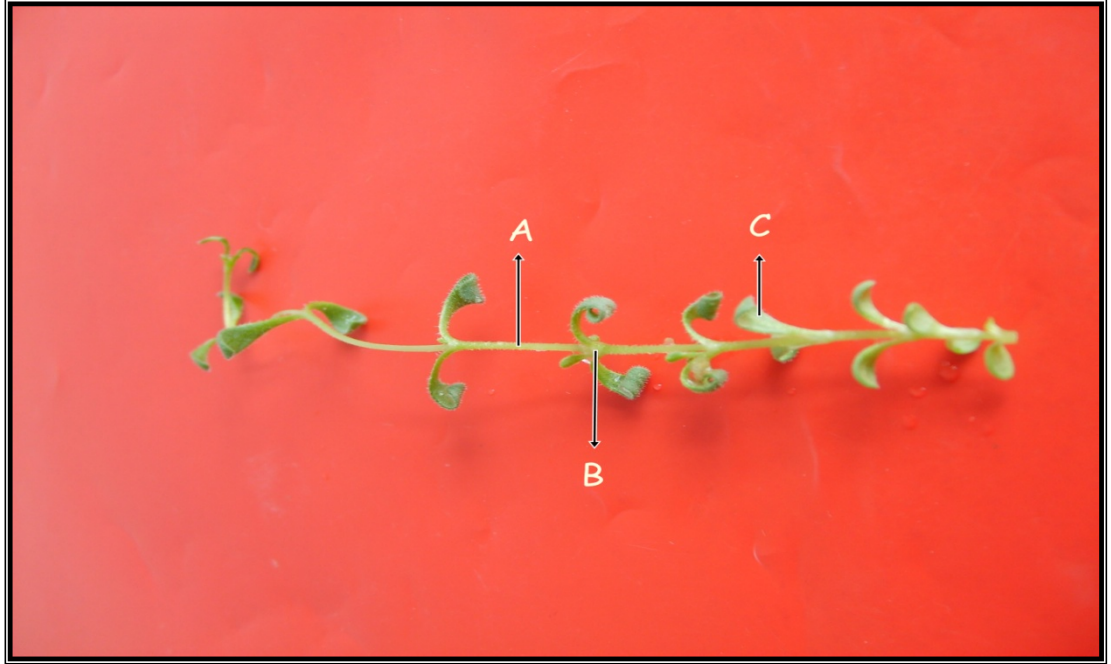
| Besi yeri no: | Hormon kons.      |
|---------------|-------------------|
| 1             | 3 mg/L 2,4D       |
| 2             | 3mg/L BA          |
| 3             | 3 mg/L NAA        |
| 4             | 1 mg/L 2,4-D      |
| 5             | 1 mg/L BA         |
| 6             | 1 mg/L NAA        |
| 7             | 1:0,5 mg/L BA/NAA |
| 8             | 3:0,5 mg/L BA/NAA |
| 9             | 3:1 mg/L NAA/BA   |
| 10            | 3:1 mg/L 2,4-D/BA |

Çizelge 3.1 Kallus oluşum aşaması için hazırlanan besi yeri tipleri ve hormon konsantrasyonları

3.2.5'de bahsedilen yöntemle çimlendirilmiş 30 günlük steril *S. sangaria* fideleri kallus denemesi amaçlı eksplant kaynağı olarak kullanılmışlardır. Amaca uygun olarak steril fidelerin koltuk altı meristemi, gövde ve yaprakları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır (Şekil 3.9). Elde edilen fidelerimizin kök yapısı çok ince, tüysü yapıda ve güçsüz oldukları için kökler eksplant kaynağı olarak kullanılamamıştır. Steril bistüri ile uç kısımları uzaklaştırılan yapraklar ve gövdeden 1 cm'lik parçalar ile yaprakları uzaklaştırılan koltuk altı meristemleri eksplant kaynağı olarak alınmış ve tüm eksplantlar besi yerinin üzerine yerleştirilmiştir.



Şekil 3.8 Steril kabin içerisinde eksplant alma işlemi esnasında



Şekil 3.9 Fide üzerinde eksplant alınan bölgeler A – Gövde, B – Koltuk altı meristemi, C – Yaprak

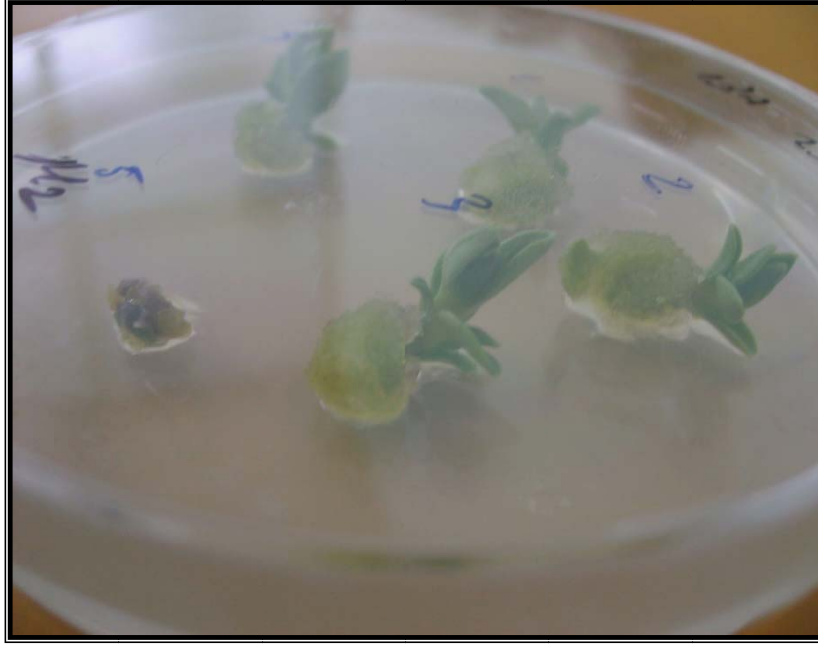
Kültürler iklim kabinine 3.2.4’te belirtilen şartlar altında yerleştirilmişlerdir. Gözlemler haftalık olarak yapılmış ve oluşan kalluslar 15 günde bir alt kültüre alınmıştır. Dördüncü haftadan sonra eksplantlar yeterli büyüklükte kallus

oluşturduklarından, kallus başlatımı sonlandırılmıştır. Deneme sonucu farklı tip besi yerlerinde farklı tip eksplantlardan oluşan kallus, kök ve sürgün oluşturan eksplantların sayıları kayıt altına alınmıştır.

### 3.2.7 İndirekt Organogenez

Daha önce bahsettiğimiz bitkisel hücrelerin totipotent özellikte olmaları organogenez olayının temelini teşkil etmektedir. Bitkisel bir hücre bozulmamış bir hücre zarı ve çekirdeğe sahip olduğu müddetçe mitotik bölünmelerle yeni bir bitkisel doku veya organ meydana getirebilmektedir. Bu bölünmeler sonucu doğrudan adventif kök veya sürgünler oluşması direkt organogenez olarak adlandırılırken, önce kallus sonra kallustan sürgün veya kökler oluşmasına ise indirekt organogenez denir (Babaoğlu vd. 2002). Bunu sağlamak için besin ortamındaki oksin/sitokininin oranının uygun şekilde planlanmış olması gereklidir. Oksin konsantrasyonu sitokininden çok fazla olursa veya sadece oksin varlığında kök gelişimi, tam tersi durumda sitokin konsantrasyonunun oksinden fazla olması veya tek başına sitokin içermesi sürgün gelişimini uyarır (Kocaçalışkan 2002).

Bizim çalışmamızda bölüm 3.2.6'daki kallus başlatımı ve oluşumu aşamasında birinci hafta itibari ile meydana gelen kallusların bazılarının üzerinde kök ve sürgünler oluşması ile indirekt organogenez olayının gerçekleştiği saptanmıştır. İndirekt organogenez ile meydana gelen sürgün ve kök içeren kalluslar ait oldukları eksplant tipi ve meydana geldikleri besi yeri çeşidine göre sınıflandırılarak kayıt altına alınmıştır.



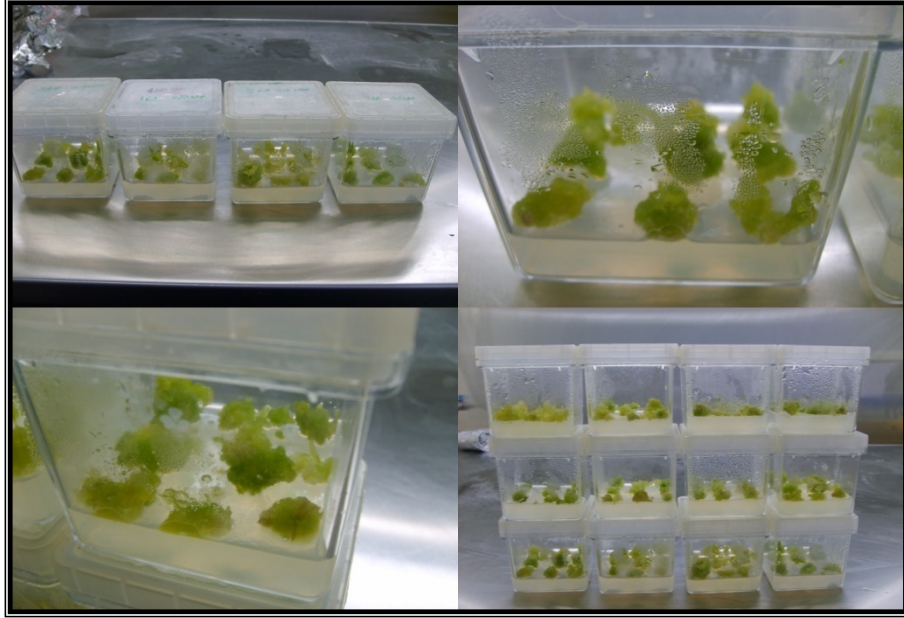
Şekil 3.10 İndirekt organogenez sonucu kalluslar üzerinde oluşmuş olan sürgünler

### 3.2.8 Kallustan rejenerasyon

Kallus oluşum aşamasında elde edilen 1 aylık kalluslar geliştiği hormon tipi dikkate alınarak sürgün oluşturma besi yerine transfer edilmişlerdir. Rejenerasyon aşamasında MS besi yerinde BA ve NAA'nın farklı kombinasyonları (BA/NAA – 1:0.5, 3:0.5, 5:0.5) kullanılmış ve bu besi yerleri numaralandırılarak aşağıda çizelgede verilmiştir. Belirten konsantrasyonlarda hormon içeren besi yerleri bölüm 3.2.3'te belirtildiği şekilde otoklavlanmış ve magenta kaplarına yaklaşık 50'şer ml olarak dökülmüştür. Her bir kaba 9'ar adet kallus konularak tekrarlanmış ve 3.2.4'teki şartlarda iklim kabinine yerleştirilmiş ve 6 hafta boyunca izlemeye alınmıştır.

| Besi yeri no: | Hormon kons.      |
|---------------|-------------------|
| 11            | 1:0,5 mg/L BA/NAA |
| 12            | 3:0,5 mg/L BA/NAA |
| 13            | 5:0,5 mg/L BA/NAA |

Çizelge 3.2. Kallustan rejenerasyon amaçlı hazırlanan besi yeri tipleri ve hormon konsantrasyonları



Şekil 3.11 Rejenerasyon için kallusların BA ve NAA içeren MS ortamına alınması

### 3.2.9 Köklendirme

Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için ½ MS ve kontrol amaçlı tam MS kullanılmıştır. Bu besi yerlerine 3.2.3'te belirtilen miktarlarda agar ve sükroz eklenmiştir. Köklenme için 0,5 mg/L NAA içeren tam MS ve 1 mg/L, 3mg/L ve 5mg/L NAA içeren yarım MS olmak üzere 4 tip besi yeri hazırlanarak tüplere dökülmüştür. Köklenme için kullanılan besi yerleri Çizelge 3.3'te gösterilmiştir. İndirekt organogenez ile oluşan her biri 0,5 cm'den büyük sürgünler hazırlanan tüplerde köklenmeye alınmıştır. Dört farklı ortam için 10'ar adet sürgün transfer edilmiş ve deneme 40 gün sürmüştür. Bu süre sonunda sürgün uzunlukları, köklenme durumları, kararan ve ölen sürgün sayıları tespit edilerek kayıt altına alınmıştır.

| Besi yeri no: | Hormon kons.  |
|---------------|---------------|
| 14            | 0,5 mg/L NAA* |
| 15            | 1 mg/L NAA    |
| 16            | 3 mg/L NAA    |
| 17            | 5 mg/L NAA    |

Çizelge 3.3 Köklendirme amaçlı hazırlanan besi yeri tipleri ve hormon konsantrasyonları, işaretlenmiş olan 14 nolu besi yeri tam MS besi ortamıdır

### 3.2.10 Dış ortama şaşırtma

40 gün sonunda elde edilen köklenmiş bitkicikler torf-kum karışımının bulunduğu kaba dikilerek üzerleri plastik pet şişe, cam kavanoz vb. ile kapatılarak mutlak nemin korunması amaçlanmıştır. Belli periyotlarla sulanan fidelerin gelişimleri gözlenmiş. 2 haftalık periyotlarla kapalı kaplara küçük birer delik açılarak dış ortam nemine alıştırmaları amaçlanmıştır.

### 3.2.11 Verilerin İstatiksel Analizleri

Çimlenme denemesinde elde edilmiş olan sonuçlar için Karagüzel ve Taşcıoğlu'na (2007) göre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\sum (nd) / N$$

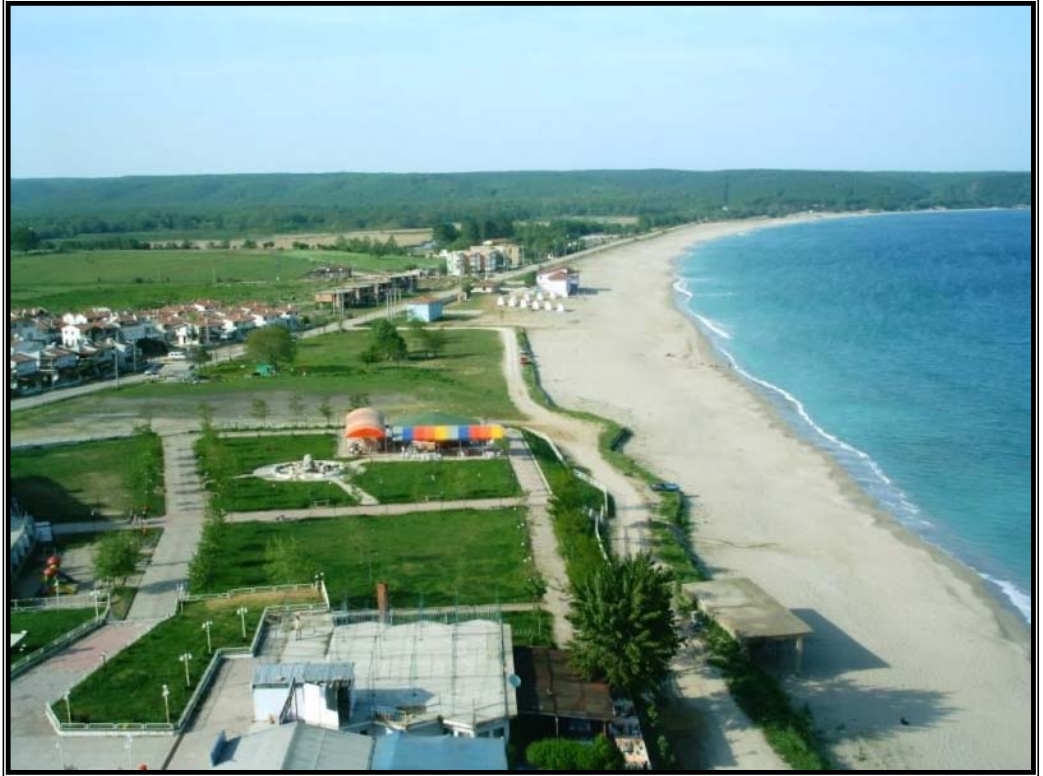
Burada ifade edilen semboller n: gözlem yapılan gün aralığında çimlenen tohum sayısını, d: inkübasyon süresinin o anki gününü ve N ise denemede çimlenmiş tohum sayısını belirtmektedir.

Denemeler sonunda elde edilen tüm verilerin ortalamaları ve standart hataları Minitab programı ile hesaplanmıştır. Yapılan bazı muamelelerin etkileri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Uygulama sonuçlarına ait ortalamalar arasındaki farklar 0,05 önem düzeyinde ve ki kare testi ile karşılaştırılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Arazi Çalışması Bulguları

Canlı bitki ve tohum materyali toplamaya yönelik arazi çalışmaları 2008 yılı Ağustos ayında *S. sangaria* türünün yayılış gösterdiği Kırklareli - İğneada bölgesinde gerçekleştirilmiştir. Arazi çalışmasında yaklaşık 10 km uzunluğa sahip İğneada kumsalının muhtelif bölgelerinde rastlanan bitki örnekleri ve tohumları rastgele toplanmıştır. Bitkinin İğneada kumsalı boyunca dağınık ve düzensiz bir yayılma gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.1 İğneada kumsalının havadan çekilmiş bir fotoğrafı (İğneada Belediyesi Web Sitesi–1)

## 4.2 Çimlenme Bulguları

Bu çalışmada, arazi çalışması sonucu elde edilen tohum sayısı sınırlı olduğundan denemelerde kullanılan tohum sayısı da kısıtlı olmuştur. Mevcut tohumlara canlılık testi uygulamamış olmamız bir eksiklik olarak gözüktü de, stereo mikroskop altında sağlıklı olduğu düşünülen tohumların seçimi yapılmış ve denemelerde sağlıklı görünüme sahip yaklaşık 1,5 mm boyundaki tohumlar kullanılmıştır (Şekil 4.2 ve 4.3). Tohum sterilizasyonu için bölüm 3.2.5'te belirtilen klasik sterilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu uygulama sonrası MS ortamına transfer edilmiş olan tohumlarda yaygın bir kontaminasyon problemine rastlanmamıştır.



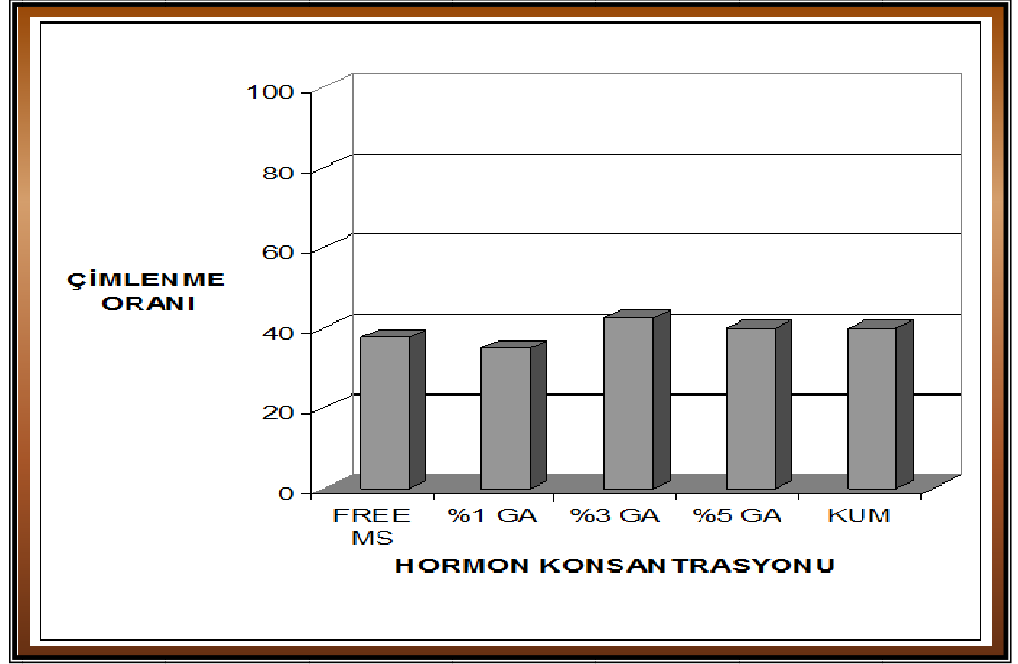
Şekil 4.2 Sağlıklı olduğu düşünülen *S. sangaria* tohumlarının bir arada görünümü



Şekil 4.3 Sağlıklı olduğu düşünülen *S. sangaria* tohumunun milimetrik kağıt üzerinde boyunun ölçülmesi

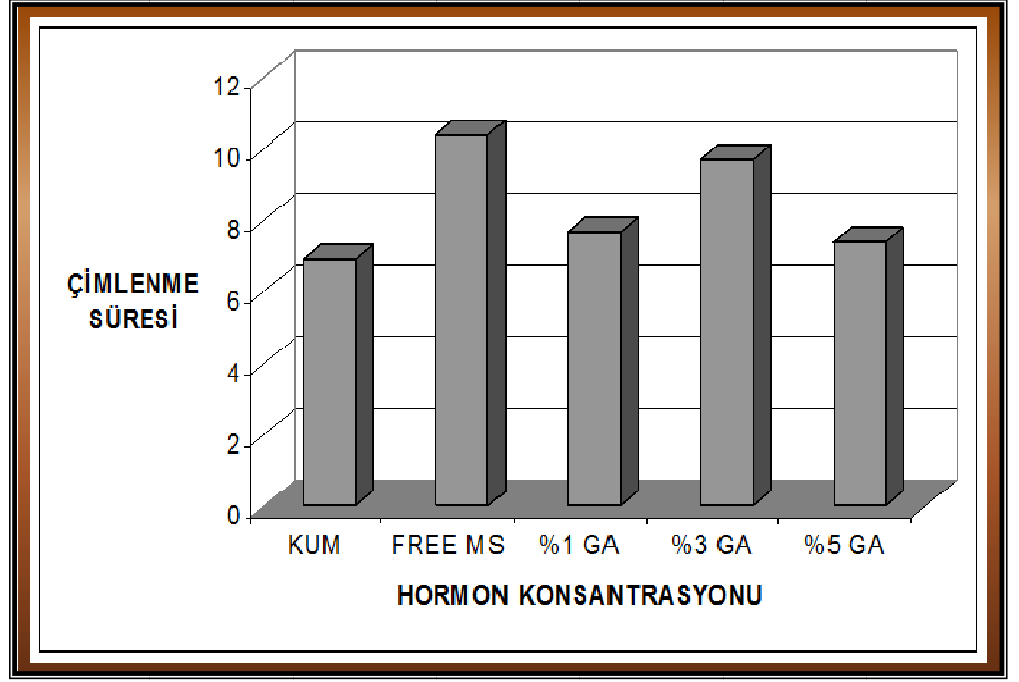
In vitro çimlenme denemesinde bölüm 3.2.5'te belirtildiği üzere, MS besiyeri yerine eklenmiş farklı GA<sub>3</sub> hormon konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi üzerine farklı parametreler açısından etkileri araştırılmıştır. Bu parametreler, 3.2.10'da belirtilen çimlenme zamanı, her besiyeri için çimlenen tohum sayısı ve çimlenen tohumların verdiği fidelerin boy uzunlukları açısından kıyaslanmasıdır.

Çimlenme oranlarında; GA<sub>3</sub> uygulaması MS ortamlarında çimlenmeyi azda olsa teşvik etmiştir. Kontrol grubu olarak kum ortamı kullanılmıştır. Kum ortamındaki çimlenme oranı %37.5 iken MS ortamında konsantrasyonlara göre sırasıyla free MS için %35, %1 için %40, %3 için %42.5, %5 için %40 olarak tespit edilmiştir. Ancak bu artış istatistikî açıdan önemli değildir. Tüm gruplarda çimlenme oranı, şekilde gösterildiği üzere maksimum %42.5'i geçmemiştir (Şekil 4.4)



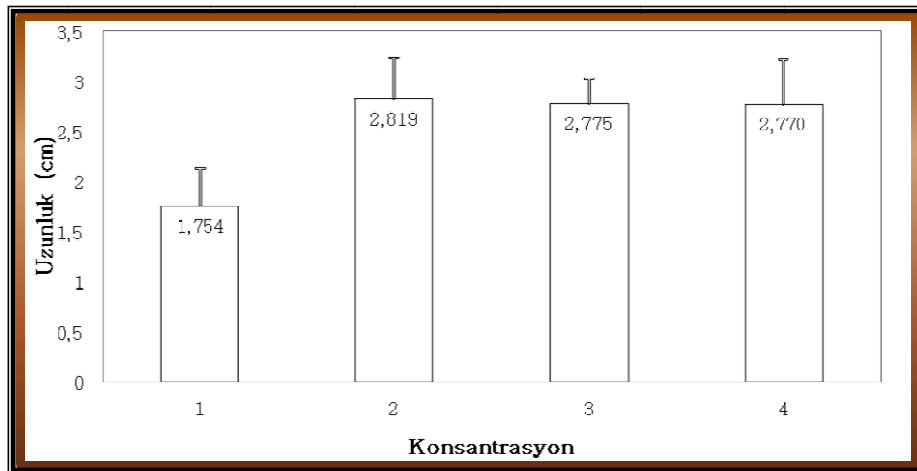
Şekil 4.4 Farklı GA<sub>3</sub> hormon konsantrasyonlarına sahip besi yerlerinde çimlenen tohum sayılarının oranı grafiği

Tohumların ortalama çimlenme zamanları kum için 6.9 gün iken MS ortamında sırasıyla 10.4, 7.7, 9.7, 7.4 gün olarak tespit edilmiştir. Ortalama çimlenme zamanı; kumda 6.9 gün iken hormonsuz MS ortamında 10.4 gün olmuştur. GA<sub>3</sub> kullanımı ile bu süre 7.4 güne kadar düşmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Farklı GA<sub>3</sub> hormonu konsantrasyonlarına sahip besi yerlerindeki tohumların ortalama çimlenme sürelerini gösteren şekil

MS ortamında gelişen fidelerin boy ortalamaları sırasıyla 1.9, 2.6, 2.2, 1.9 cm'dir. Fide boyları ortalamaları karşılaştırıldığında en az uzamanın hormonsuz MS'te olduğu görülmüştür. Diğer besi yerlerinde GA<sub>3</sub> konsantrasyonundaki artış ile de boy ortalamasının kısaldığı gözlenmiştir. Hormonsuz MS'te en kısa olan boy uzunluğu diğerlerinden farklı iken diğer konsantrasyonlar açısından ANOVA testine göre %0,05 önem seviyesine göre istatistiki açıdan farklılık görülmemiştir Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

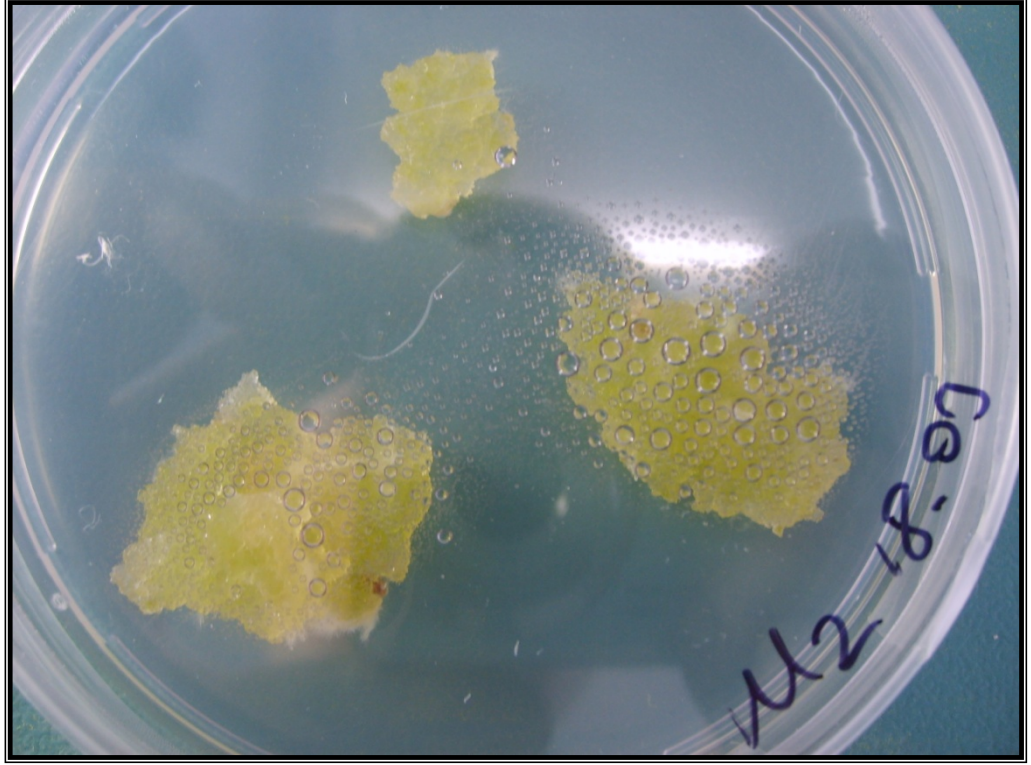


Şekil 4.6 Fide boy uzunlukları; 1-Free MS, 2-%1 GA, 3- %3 GA, 4- %5 GA

### 4.3 Mikroçoğaltım Bulguları

#### 4.3.1 Kallus Başlatımı ve Oluşumu

Yaklaşık 1 aylık çimlendirme çalışması sonucunda elde edilen steril fidelerden alınan koltuk altı meristemi, gövde ve yaprak eksplantları; bölüm 3.2.6 da yer alan Çizelge 3.1’de belirtilen, NAA, BA ve 2,4-D hormonlarının farklı konsantrasyonlarına ve kombinasyonlarına sahip 10 farklı besi yerinde kültüre alınmıştır. Her bir besi yerine her bir eksplant tipinden 15’er eksplant alınmıştır. Her 15 günde bir aynı ortamlarında alt kültüre alınmışlardır. Kallus dokusunun oluşumu birinci haftadan itibaren ilk olarak meristem eksplantlarında görülmüştür. İkinci haftadan itibaren gövde ve yaprak eksplantlarında da kallus başlangıcı görülmüştür. Meristem eksplantlarının tüm yüzeyinden kallus oluşumu gözlenirken, gövde ve yaprak eksplantlarının kesim yapılan uç kısımlarından kallus başlatımı görülmüştür. Oluşan kalluslar açık yeşil ve homojen görünümlüdürler (bkz Şekil 4.7). Tüm eksplant tiplerinden elde edilen kalluslar benzer görünümdedir.



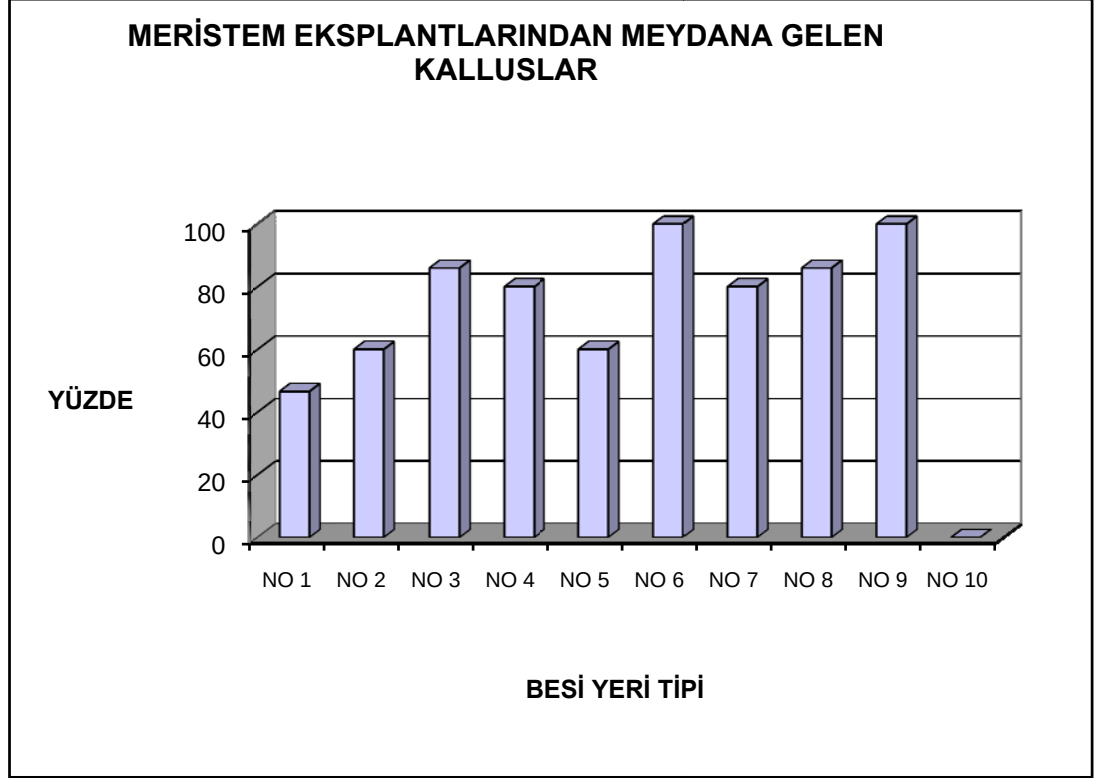
Şekil 4.7 Meristem eksplantlarından elde edilmiş kalluslar

10 farklı besi yerinde gerçekleştirilen kallus oluşturma aşaması sonucunda her eksplant tipine göre tüm besi yerlerinde oluşan kalluslar sayılarak yüzde oranları hesaplanmıştır. Sonuçlar toplu olarak Çizelge 4.1’de verilmiştir.

| Besi yeri<br>no | Hormon  | Hormon kons.<br>( mg/L) | Eksplantların Başarı yüzdesi |       |        |
|-----------------|---------|-------------------------|------------------------------|-------|--------|
|                 |         |                         | Meristem                     | Gövde | Yaprak |
| 1               | 2,4 D   | 3                       | 46,6                         | 53    | 0      |
| 2               | BA      | 3                       | 60                           | 0     | 53     |
| 3               | NAA     | 3                       | 86                           | 60    | 0      |
| 4               | 2,4 D   | 1                       | 80                           | 10    | 0      |
| 5               | BA      | 1                       | 60                           | 86    | 66     |
| 6               | NAA     | 1                       | 100                          | 100   | 7      |
| 7               | BA:NAA  | 1:0,5                   | 80                           | 60    | 0      |
| 8               | BA:NAA  | 3:0,5                   | 86                           | 100   | 33     |
| 9               | NAA:BA  | 3:1                     | 100                          | 46,6  | 0      |
| 10              | 2,4D:BA | 3:1                     | 0                            | 0     | 0      |

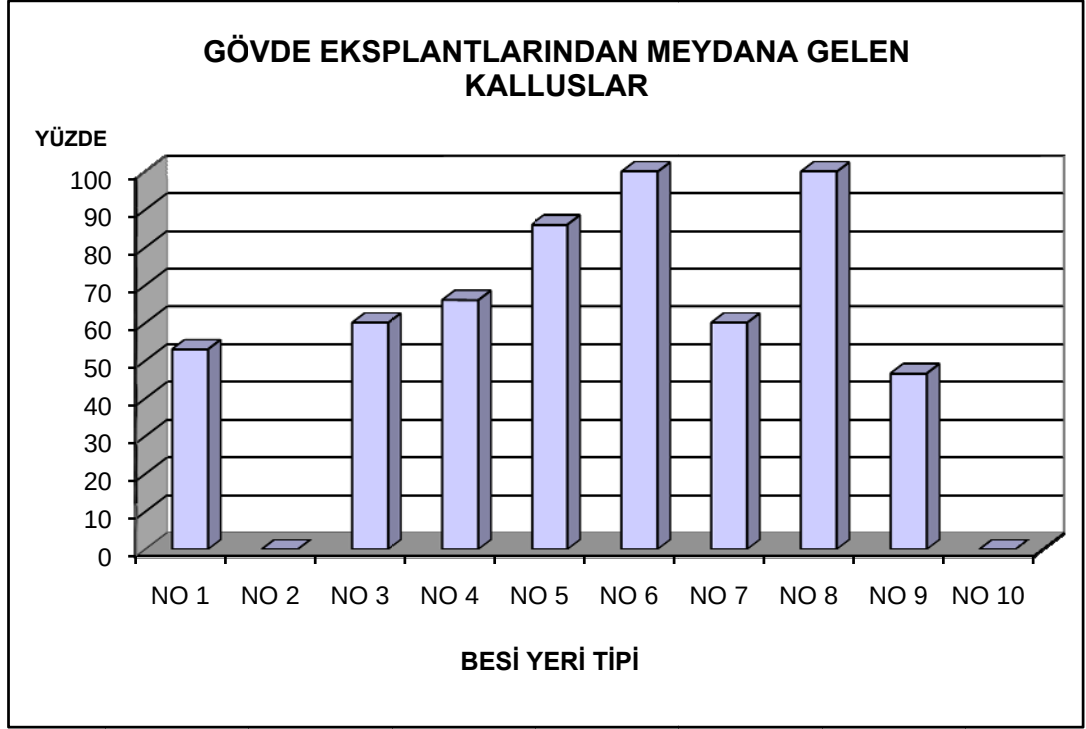
Çizelge 4.1 Eksplant tipine göre farklı besi yerinde kallus oluşturma yüzdeleri

Meristem eksplantı için; 6 ve 8 nolu besi yerlerinde tüm eksplantlardan kallus oluşurken 10 nolu besi yerindeki hiçbir eksplanttan kallus oluşmamıştır. Meristem eksplantlarından meydana gelen kallusların yüzdesi 4.8 nolu şekilde gösterilmiştir.



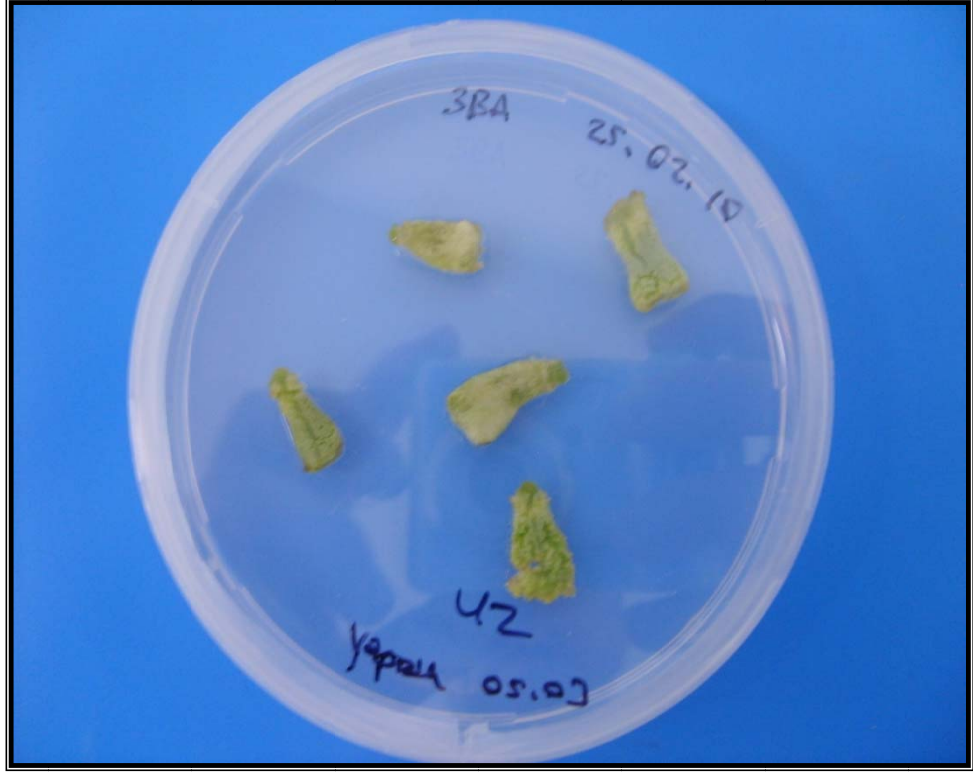
Şekil 4.8 Meristem eksplantlarından oluşan kallusların yüzde grafiği

Gövde eksplantı için; 6 nolu besi yerinde % 100 oranında kallus elde edilirken 10 nolu besi yerinde kallus elde edilememiştir. Farklı besi yerlerinin gövde eksplant tipi açısından kallus oluşturma yüzdeleri 4.9 nolu şekilde gösterilmiştir.

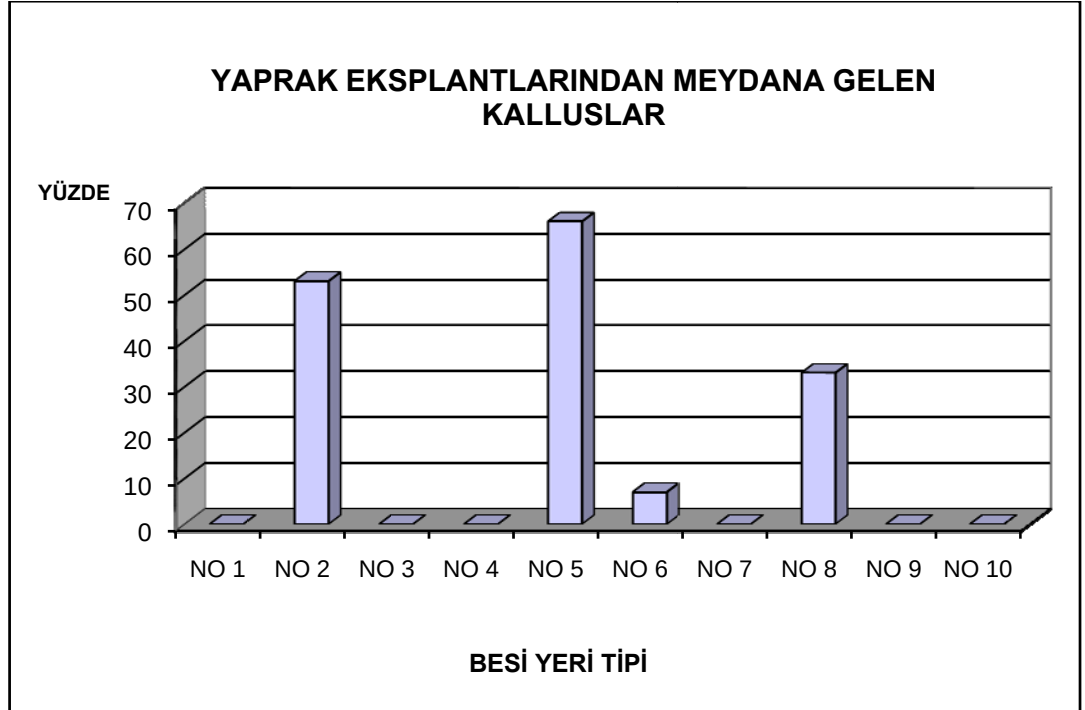


Şekil 4.9 Gövde eksplantlarından oluşan kallusların yüzde grafiği

Yaprak eksplantlarında kallus oluşturma yüzdesi hiçbir besi yerinde yüzde yüze ulaşamadığı gibi 1, 2, 4, 7, 9 ve 10 nolu besi yerlerinin hiç birisinde kallus oluşumu gözlenmemiştir. Yaprak eksplantlarında en yüksek kallus oluşturma oranı % 66 ile 5 nolu besi yerinde görülmüştür. Tüm oranlar 4.11 nolu şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.10 Kallus oluşturmeyan yaprak eksplantları



Şekil 4.11 Yaprak eksplantlarından oluşan kallusların yüzde grafiği

Tüm eksplant tipleri açısından 10 farklı besi yerinden elde edilen toplam kallus sayıları saptanmıştır. 4.2 nolu çizelgede her bir eksplant tipinden oluşan kallus sayıları gösterilmiştir. Her bir eksplant tipi için farklı besi yerlerinden 150'şer adet eksplant vardır. Çizelge 4.2'de 150 adet eksplanttan kaçının kallus oluşturduğu gösterilmiştir.

| EKSPLANT TİPİ | TOPLAM |
|---------------|--------|
| MERİSTEM      | 105    |
| GÖVDE         | 86     |
| YAPRAK        | 24     |

Çizelge 4.2 Eksplant çeşidine göre tüm besi yerlerindeki eksplantlardan oluşan kallusların toplamı

Eksplant tiplerine bağlı olarak 10 farklı besi yerinde elde edilen kallus sayılarının istatistiki olarak karşılaştırılması yapılmıştır. Buna göre;

SAYILAR (105; 86; 24) İSTATİSTİKİ OLARAK FARKLI Ki kare testi, Kİ KARE=50.02; DF=2; **P<0.001** şeklinde bulunmuştur. İstatistiki açıdan üç farklı eksplant tipinin 10 farklı besi yerinde oluşturdukları kallus sayıları arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir.

#### 4.3.2 İndirekt Organogenez

Yukarıda belirtilen kallus başlatım aşamaları sırasında; bölüm 3.2.6’da yer alan Çizelge 3.1’de belirtilen, birden ona kadar numaralandırılmış NAA, BA ve 2,4-D hormonlarının farklı konsantrasyonlarına ve kombinasyonlarına sahip 10 farklı besi yeri kullanılmıştı. Bu besi yeri kombinasyonları içerisinde, 1. hafta itibari ile bazı kalluslardan doğrudan kök ve sürgünlerin oluşması sureti ile indirekt organogenez olayı gözlenmiştir. Her bir besi yerinde, her bir eksplant tipinden meydana gelmiş olan kalluslardan oluşan kök ve sürgünlere sahip kalluslar sayılarak yüzde oranları saptanmış ve Çizelge 4.3 üzerinde gösterilmiştir. Bunun yanında sürgün veren kalluslar üzerindeki sürgün sayıları kayıt altına alınmış ve kallus başına düşen sürgün sayıları hesaplanarak Çizelge 4.4’te gösterilmiştir.

| Besi yeri<br>no | Hormon  | Hormon kons.<br>( mg/L) | Eksplantların Başarı yüzdesi |       |        |
|-----------------|---------|-------------------------|------------------------------|-------|--------|
|                 |         |                         | Meristem                     | Gövde | Yaprak |
| 1               | 2,4 D   | 3                       | 0                            | 0     | 0      |
| 2               | BA      | 3                       | 66                           | 0     | 0      |
| 3               | NAA     | 3                       | 0                            | 0     | 0      |
| 4               | 2,4 D   | 1                       | 0                            | 0     | 0      |
| 5               | BA      | 1                       | 60                           | 20    | 0      |
| 6               | NAA     | 1                       | 7                            | 0     | 0      |
| 7               | BA:NAA  | 1:0,5                   | 40                           | 7     | 0      |
| 8               | BA:NAA  | 3:0,5                   | 40                           | 13    | 0      |
| 9               | NAA:BA  | 3:1                     | 13                           | 7     | 0      |
| 10              | 2,4D:BA | 3:1                     | 0                            | 0     | 0      |

Çizelge 4.3 Farklı eksplant tiplerinden farklı besi yerlerinde indirekt organogenez ile sürgün oluşturan kallus yüzde sayıları



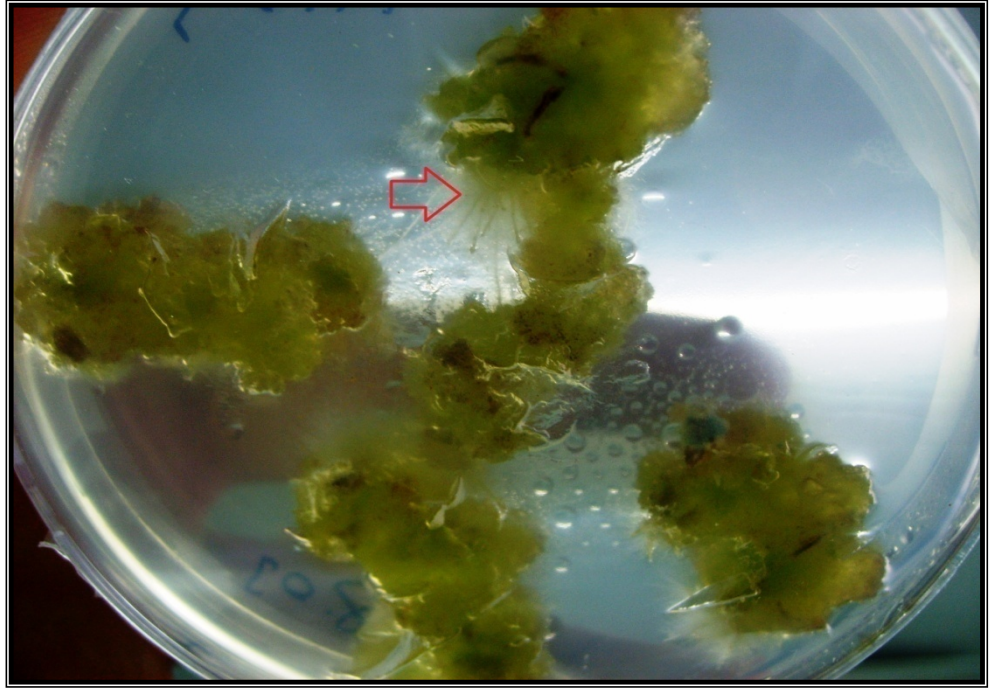
Şekil 4.12 Meristem eksplantından oluşmuş kallustan indirekt organogenez ile oluşmuş sürgünler.



Şekil 4.13 Gövde eksplantından oluşmuş kallustan indirekt organogenez ile meydana gelmiş olan sürgünler

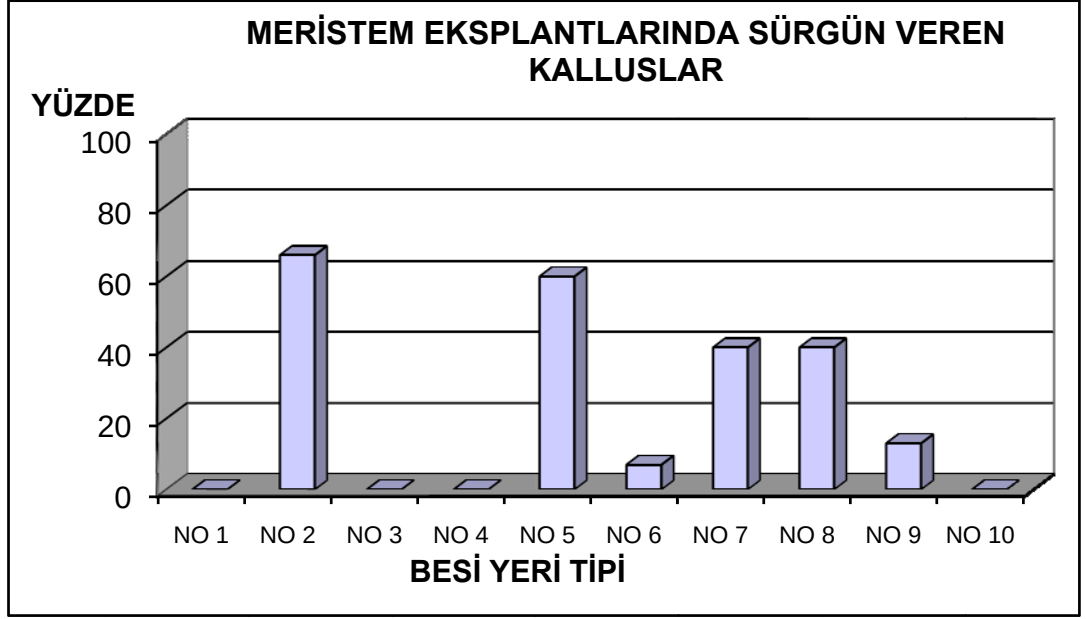


Şekil 4.14 Gövde eksplantından oluşmuş kallustan indirekt organogenez ile meydana gelmiş olan kökler



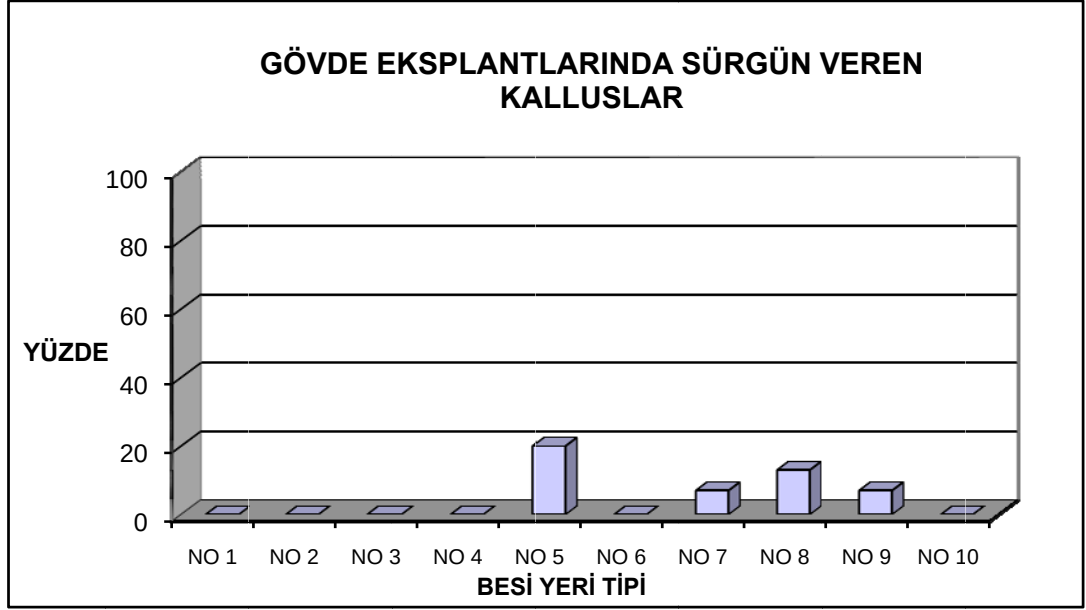
Şekil 4.15 Meristem eksplantından oluşmuş kallustan indirekt organogenez ile meydana gelmiş olan kökler

Meristem eksplantında indirekt organogenez ile meydana gelen sürgün veren kallus oranı mevcut tabloda görüldüğü üzere hiçbir besi yeri çeşidinde % 100'e ulaşamamıştır. 1, 3 ve 10 nolu besi yerlerinde hiç sürgün veren kallus görülmemektedir. En yüksek sürgün veren kallus oranı % 66 oranı ile 2 nolu besi yerinde görülmüştür. Yüzde oranları 4.16 nolu şekil üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4.16 Meristem eksplantlarında indirekt organogenez ile sürgün oluşturan kallus yüzdeleri

Gövde eksplantında indirekt organogenez ile 1, 2, 3, 4, 6 ve 10 nolu besi yeri çeşitlerinde hiç sürgün veren kallus elde edilememişken, en yüksek oran % 20 ile 2 nolu besi yerinde görülmüştür. 4.17 nolu şekilde yüzdeleri gösterilmiştir.



Şekil 4.17 Gövde eksplantlarında indirekt organogenez ile sürgün oluşturan kallus yüzdeleri

Yaprak eksplantlarında ise tüm besi yerlerinde hiçbir kallus üzerinde sürgün oluşumu gözlenmemiş, yaprak eksplant tipinde sürgün oluşturma açısından indirekt organogeneze rastlanmamıştır.

İndirekt organogenez ile sürgün veren kalluslar her eksplant tipi için, tüm besi yerlerinde sayılmıştır. Ayrıca sürgün veren kalluslar üzerindeki toplam sürgün sayıları da saptanarak her besi yeri çeşidinde her eksplant tipine uygun olarak kallus başına düşen sürgün sayısı hesaplanarak 4.4 nolu çizelgede gösterilmiştir.

| MERİSTEM EKSPANTLARINDA KALLUS BAŞINA DÜŞEN SÜRGÜN SAYILARI |        |        |        |        |        |        |        |        |        |         |
|-------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| Besi yeri tipleri                                           | 1 nolu | 2 nolu | 3 nolu | 4 nolu | 5 nolu | 6 nolu | 7 nolu | 8 nolu | 9 nolu | 10 nolu |
|                                                             | 0      | 5,4    | 0      | 0      | 6,7    | 0      | 12,5   | 7,8    | 6,5    | 0       |
| GÖVDE EKSPANTLARINDA KALLUS BAŞINA DÜŞEN SÜRGÜN SAYILARI    |        |        |        |        |        |        |        |        |        |         |
| Besi yeri tipleri                                           | 1 nolu | 2 nolu | 3 nolu | 4 nolu | 5 nolu | 6 nolu | 7 nolu | 8 nolu | 9 nolu | 10 nolu |
|                                                             | 0      | 0      | 0      | 0      | 2      | 0      | 10     | 7      | 12     | 0       |
| YAPRAK EKSPANTLARINDA KALLUS BAŞINA DÜŞEN SÜRGÜN SAYILARI   |        |        |        |        |        |        |        |        |        |         |
| Besi yeri tipleri                                           | 1 nolu | 2 nolu | 3 nolu | 4 nolu | 5 nolu | 6 nolu | 7 nolu | 8 nolu | 9 nolu | 10 nolu |
|                                                             | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       |

Çizelge 4.4 Tüm eksplant tiplerinde sürgün veren kalluslarda, kallus başına düşen sürgün sayısını gösteren çizelge

Tüm eksplant tipleri için indirekt organogenez ile sürgün veren kallus sayıları toplamı saptanmış Çizelge 4.5'te gösterilmiş ve istatistiki açıdan kıyaslanmıştır. Meristem eksplantlarından oluşan 105 adet kallustan 34'ü, gövde eksplantlarından oluşan 86 kallustan 7 'si sürgün meydana getirmiş, yaprak eksplantlarından oluşan 24 kallustan ise hiçbiri sürgün meydana getirmemiştir.

| <b>EKSPLANT TİPİ</b> | <b>TOPLAM</b> |
|----------------------|---------------|
| <b>MERİSTEM</b>      | 34            |
| <b>GÖVDE</b>         | 7             |
| <b>YAPRAK</b>        | 0             |

Çizelge 4.5 Eksplant çeşidine göre tüm besi yerlerindeki eksplantlardan indirekt organogenez ile sürgün veren kallus sayılarının toplamı

Eksplant tiplerine bağlı olarak 10 farklı besi yerinde sürgün veren kallusların toplam sayılarının istatistiki olarak karşılaştırılması yapılmıştır. Buna göre;

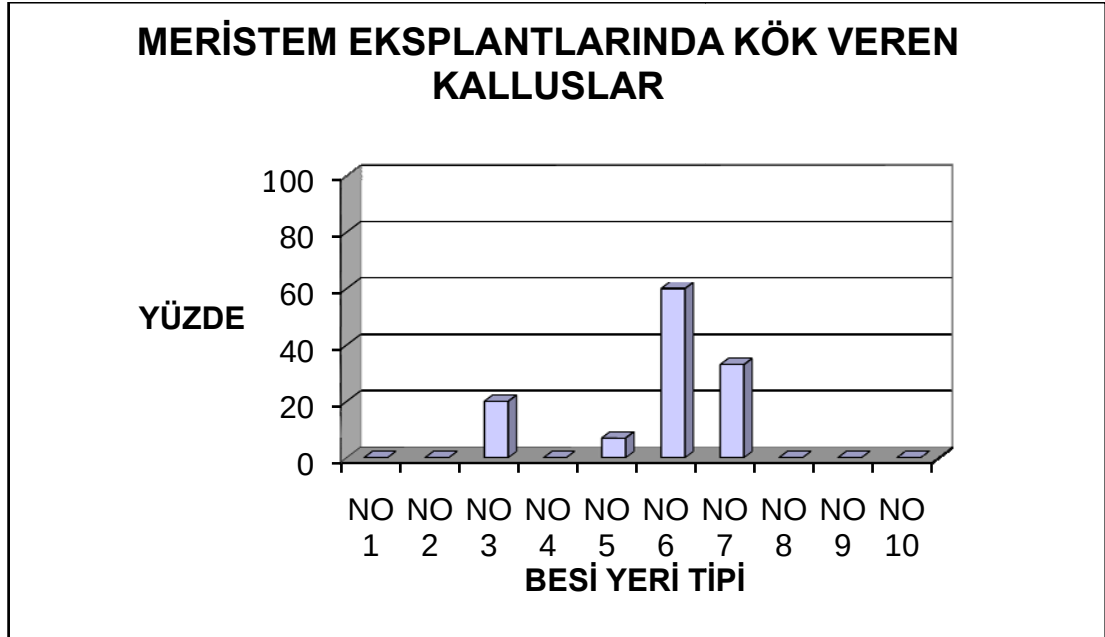
SAYILAR (34; 7) İSTATİSTİKİ OLARAK FARKLI Ki kare testi, Kİ KARE=17.8; DF=1; **P<0.001** şeklinde bulunmuştur. Yaprak eksplantlarından hiç sürgün veren kallus oluşmadığından kıyaslama meristem ve gövde eksplantları arasında yapılmış ve sonuç istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.6'da ise, farklı eksplant tiplerine ait farklı besi yerlerindeki indirekt organogenez ile kök meydana getiren kallus yüzdeleri gösterilmiştir

| Besi yeri<br>no | Hormon  | Hormon kons.<br>( mg/L) | Eksplantların Başarı yüzdesi |       |        |
|-----------------|---------|-------------------------|------------------------------|-------|--------|
|                 |         |                         | Meristem                     | Gövde | Yaprak |
| 1               | 2,4 D   | 3                       | 0                            | 0     | 0      |
| 2               | BA      | 3                       | 0                            | 0     | 0      |
| 3               | NAA     | 3                       | 20                           | 0     | 0      |
| 4               | 2,4 D   | 1                       | 0                            | 0     | 0      |
| 5               | BA      | 1                       | 7                            | 0     | 0      |
| 6               | NAA     | 1                       | 60                           | 73    | 20     |
| 7               | BA:NAA  | 1:0,5                   | 33                           | 0     | 0      |
| 8               | BA:NAA  | 3:0,5                   | 0                            | 0     | 0      |
| 9               | NAA:BA  | 3:1                     | 0                            | 0     | 0      |
| 10              | 2,4D:BA | 3:1                     | 0                            | 0     | 0      |

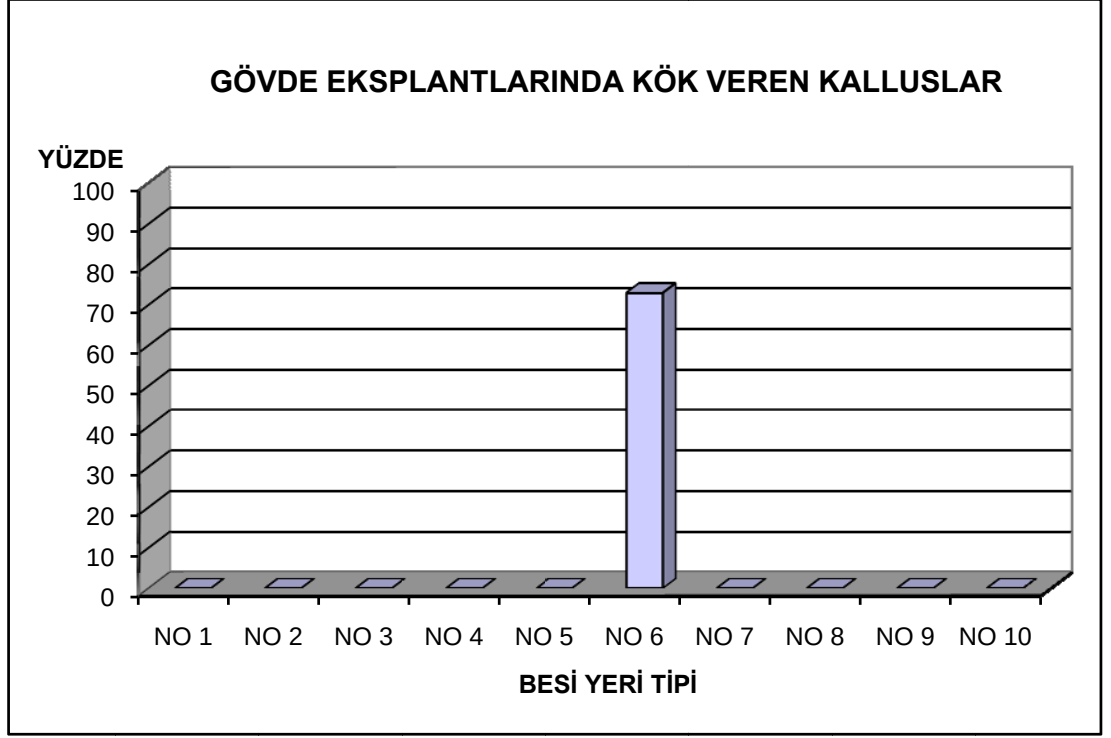
Çizelge 4.6 İndirekt organogenez ile kök veren kallusların yüzdeleri

Meristem eksplantında 6 farklı besi yerinde hiç kök veren kallus bulunmaz iken diğer besi yerlerinde de kök veren kallus oranı düşük seyretmiştir. En yüksek kök veren kallusların yüzdesi % 60 ile 6 nolu besi yerinde görülmüştür. Şekil 4.18’de ise kök veren kallusların yüzdesi şekil üzerinde gösterilmiştir.



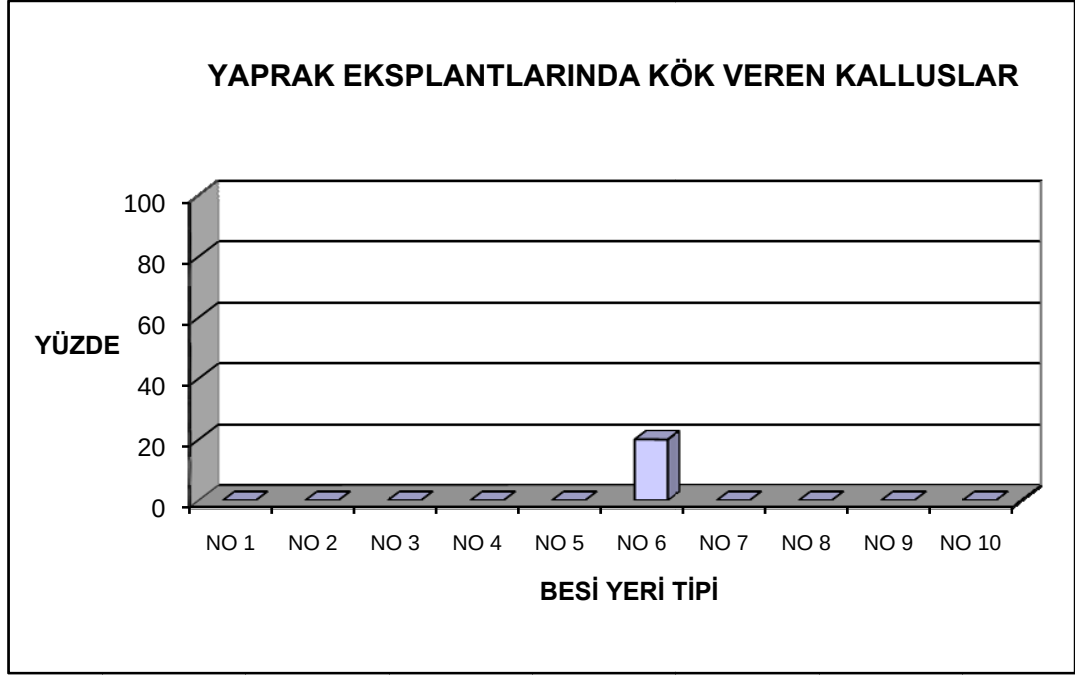
Şekil 4.18 Meristem eksplantlarında indirekt organogenez ile kök oluşturan kallus yüzdeleri

Gövde eksplantında kök veren kalluslara 9 adet besi yeri tipinde hiç rastlanmamıştır. Sadece 6 nolu besi yerinde % 73 oranında kök veren kallus elde edilmiştir. Şekil 4.19’da gövde eksplantına ait kök oluşturan kallus yüzdeleri gösterilmiştir.



Şekil 4.19 Gövde eksplantlarında indirekt organogenez ile kök oluşturan kallus yüzdeleri

Yaprak eksplantlarında gövde eksplantlarındaki gibi sadece 6 nolu besi yerinde kök veren kalluslar meydana gelmiştir. Yaprak eksplantlarında indirekt organogenez ile kök oluşturan kallus yüzdeleri Şekil 4.20’de gösterilmiştir.



Şekil 4.20 Yaprak eksplantlarında indirekt organogenez ile kök oluşturan kallus yüzdeleri

Tüm eksplant tipleri için indirekt organogenez ile kök veren kallus sayıları toplamı saptanmıştır. Meristem eksplantlarından 105 adet kallustan 23'ü, gövde eksplantlarından oluşan 86 kallustan 11'i, yaprak eksplantlarından 24'ten 3'ü kök meydana getirmiş, sonuçlar Çizelge 4.7'de gösterilmiş ve istatistiki açıdan kıyaslanmıştır.

| EKSPANT TİPİ | TOPLAM |
|--------------|--------|
| MERİSTEM     | 23     |
| GÖVDE        | 11     |
| YAPRAK       | 3      |

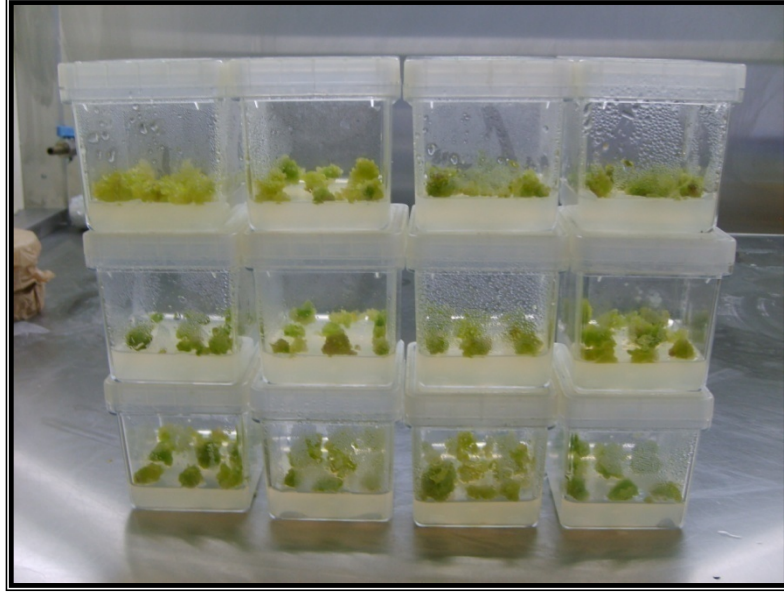
Çizelge 4.7 Eksplant çeşidine göre tüm besi yerlerindeki eksplantlardan indirekt organogenez ile kök veren kallus sayılarının toplamı

Eksplant tiplerine bağılı olarak 10 farklı besi yerinde sürgün veren kallusların toplam sayılarının istatistiki olarak karşılaştırılması yapılmıştır. Buna göre;

SAYILAR (18; 11; 3) İSTATİSTİKİ OLARAK FARKLI Ki kare testi, Kİ KARE=10.63; DF=2;  $P<0.01$  olarak bulunmuştur. Buna göre her bir eksplant tipi için farklı besi yerlerinde, kök veren kallus sayıları arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark görülmüştür

#### 4.3.3 Kallustan Rejenerasyon

İndirekt organogenez sonucu meydana gelen sürgünlü kalluslar bu aşamaya dahil edilmemiştir. İndirekt organogenez ile sürgün ve kök oluşturmayan kalluslar BA ve NAA hormonlarının farklı konsantrasyonlarına sahip (0.5, 1, 3 ve mg/L) MS besi yerlerinde inkübe edilmişlerdir (bkz Bölüm 3.2.8 Çizelge 3.2). Üç farklı besi yerine aktarılan kalluslar 2 haftada bir alt kültüre alınmışlardır. Altı haftalık zaman dilimi içerisinde kalluslardan hiç birinde sürgün oluşumu gözlenmemiştir. Tekrar gözden geçirilen besi yeri konsantrasyonları ve hazırlanma aşamalarında herhangi bir eksiklik veya sorun rapor edilmemiştir. İlerleyen zamanlarda mevcut kallusların farklı tipte ve farklı konsantrasyona sahip hormon içeren besi yerlerinde inkübe edilmesi planlanmıştır.



Şekil 4.21 Rejenerasyon aşamasında sürgün edilemeyen kalluslar

#### 4.3.4 Köklendirme Denemesi

Köklendirme denemesi için daha önceki aşamalarda indirekt organogenez aşamasında elde edilen 0,5 cm den büyük sürgünler kullanılmıştır. Besi yeri olarak NAA hormonunun farklı konsantrasyonlarını içeren bölüm 3.2.9'da yer alan Çizelge 3.3'teki besi yeri konsantrasyonları hazırlanmış ve her bir besi yeri içeren tüplere 10'ar adet sürgün aktarılmıştır. 40 gün süren köklendirme denemesi sonucunda tam güçte MS tuzları içeren 14 nolu besi yerindeki tüm sürgünler köklenirken, yarı güçte MS tuzları içeren 15, 16 ve 17 nolu besi yerlerindeki besi yerlerindeki hiçbir sürgün köklenmemiştir. Bu besi yerlerinde kullanılan besi yeri, agar, sükroz, hormon konsantrasyonu parametrelerine yönelik geriye dönük yapılan kontrollerde bir eksikliğe rastlanmamış, 20 günlük süre sonunda alt kültüre alınmalarına rağmen köklenme elde edilememiştir. Köklenme elde edilememesine karşın sürgünlerde boyca uzama

saptanmıştır. Tüm besi yerlerinde yer alan sürgünlerin boyları haftalık olarak ölçülerek kayıt altına alınmıştır.



Şekil 4.22 40 günlük süre sonunda köklenmiş bir *S.sangaria* sürgünü



Şekil 4.23 Köklenme denemesinde sürgünlerin boyunun ölçülmesi

Tüm besi yerlerindeki sürgünlerin boyca uzamaları kayıt altına alınmış ve son boyları kayıt edilerek boy ortalamaları hesaplanarak istatistiki açıdan kıyaslanmıştır. Buna göre;

ANOVA testi Tukey karşılaştırmasına göre;  $P < 0.001$ . 0.5 NAA hormon konsantrasyonuna sahip tam güçte MS tuzları içeren besi yerinin sürgün boyu ortalaması hepsinden yüksek fakat diğer besi yerlerindeki sürgün boyları ortalamaları birbirinden farklı değildir.

Köklenmiş olan tüplerdeki fideler çıkarılıp jelden temizlenerek bir sonraki aşama olan dışarı şaşırtma aşaması için hazırlanmıştır.



Şekil 4.24 Köklenme denemesinde köklenerek uzayarak çiçek açan *S.sangaria* fidesi

#### 4.3.5 Dış Ortama Şaşırtma

Köklenen ve tam bir bitki konumuna gelen *S. sangaria* fidelerinin ilk olarak içinde bulundukları kültür kaplarının kapakları açılmış ve ardından yüksek nem seviyesinde 3–4 gün kadar bekletilmiştir. Daha sonra torf - kum karışımı içeren bir kaba ve saksıya aktarılmış nemin korunması amacı ile üzerleri şeffaf olan pet şişe, cam kavanoz vb. malzemeler ile kapatılarak oda sıcaklığında ı ışık görecekt şekilde muhafaza edilmiştir. Nemi düşürmek adına 5 günlük periyotlarla şişeler üzerine delikler açılmıştır. Birkaç haftalık süre boyunca fidelerin çoğu hayatta kalamamıştır. Çok az sayıda fide yaşamını devam ettirebilmiştir. Yaşayan az sayıda fidede 1 buçuk ay kadar yaşatılabilmekmiştir.



Şekil 4.25 Dış ortama şaşırtma aşamaları



Şekil 4.26 Dış ortama şaşırtılmış bir *Silene sangaria* bitkisi

#### 4.3.6 Kontaminasyon Oranları

Doku kültürü çalışmalarında fiziksel ve kimyasal kaynaklı bulaşmalar sonucu meydana gelen kontaminasyonlar, çalışmaların işleyişine engel olmakta hatta başarısızlıkla sonuçlanabilmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle ortam veya eksplant kaynaklı bulaşmaları engellemek için çok iyi bir sterilizasyon prosedürü oluşturulması ve buna harfiyen uyulması gerekmektedir. Çalışma öncesinde belirlediğimiz bölüm 3.2.1, 3.2.2 ve 3.2.3'te belirttiğimiz sterilizasyon prosedürlerine uyulması sonucu yüksek bir kontaminasyon oranı ile karşılaşılmamıştır. Tohum çimlenmesi çalışmasında kontaminasyon oranı % 0.9, kallus başlatımı, oluşumu ve rejenerasyon aşamasında başlangıç için kontaminasyon oranı % 3, köklendirme aşamasında ise % 0'dır.

Kontaminasyon oranlarından düşük olduğundan bu açıdan çalışma sağlıklı bir şekilde ilerlemiştir.



Şekil 4.27 Kallus başlatımı, oluşumu ve rejenerasyon aşamasında besi yerinde görülen kontaminasyonlar

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Türkiye bitki çeşitliliği olağanüstü zengindir ve bu zenginliğin sebebi olarak çeşitli unsurlar gösterilmektedir. Bitkisel zenginliğimiz; farklı iklim tipleri (Karasal iklim, Okyanus iklimi ve Akdeniz iklimi), jeolojik ve jeomorfolojik çeşitlilik, zengin su kaynakları (deniz, göl ve akarsu), 0–5000 m’ler arasında değişen yükseklik farklılıkları, çok çeşitli habitat tipleri ve üç fitocoğrafik bölgenin (Avrupa-Sibirya, Akdeniz, İran-Turan) bulunduğu konumundan kaynaklanmaktadır (Özhatay vd. 2005). Türkiye’nin sahip olduğu bu coğrafik kuşakların getirdiği floral zenginlik ülkemizin biyolojik çeşitliliğinin önemli bir unsurudur. Ancak daha öncede belirttiğimiz üzere bilinçsiz insan faaliyetleri, bu zenginliğe zarar vererek tükenmesine neden olmaktadır. Bitkilerin kendi özel habitatlarında, istemli veya istemsiz insan faaliyetleri ile zarar görmesi sonucu pek türün yaşamı tehdit ve tehlike altına girmiştir. Son yüzyılda 30 bin bitki türünün yok olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle bitkisel gen kaynaklarının korunması amacı ile çeşitli uygulamalara başvurulmuştur. Ülkemizde bitkisel gen kaynakları, yeterince değerlendirilmeden, hatta bir bölümü henüz tanımlanmamışken yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmışlardır. İlk kez 1989’da nadir ve tehlikeli altındaki bitkilerin envanteri çıkarılarak kayıt altına alınmış ve kırmızı liste oluşturulmuştur (Özçelik 2006). Örnek vermek gerekirse 1.Tarım Şurasında ülkemizde bitkisel gen kaynaklarının korunması ve geliştirilmesine yönelik yer verilen maddelerde bizimle ilgili olan kısımda; *In situ* ve *Ex situ* koruma çalışmalarında ve araştırmalarında ilgili kuruluşların arasındaki gerekli koordinasyonun sağlanması gerektiğine işaret edilmiştir. Bizim çalışma alanımız olan bitki doku kültürleri bu noktada devreye girerek *Ex situ* koruma metodu olarak 1970’li yıllardan beri kendini yenileyerek geliştirmekte ve bu koruma metoduna çok önemli alternatifler sağlamaktadır.

Bu çalışmada Türkiye Kırmızı Bitkiler Kitabı’nda VU (vulnerable) zarar görebilir kategorisinde yer alan ve nesli tükenme tehlikesi altında bulunan *S. sangaria*’nın, bitki doku kültürü tekniklerini kullanarak hızlı çoğaltımını sağlayacak prosedürün belirlenmesi ve sürdürülebilir hale getirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır.

Öncelikle bu bitki türünün doğadaki mevcut durumu ve elde edilen tohumların çimlenme özellikleri araştırılmıştır.

*S. sangaria*'nın kırmızı bitkiler kitabına girmesinde ilk faktör olarak kumul alanlarının insan tahribi sonucu yok edilmesi olarak görülmektedir. *S. sangaria*'nın tıbbi amaçla kullanıldığı bilgisine rastlanmadığından, bu bitkinin tıbbi amaçla tüketilmiyor olması bitki açısından ekolojik bir avantaj olarak görülmektedir. Ayrıca yapılan taramalarda diğer *Silene* türleri içerisinde de medikal açıdan büyük öneme sahip olan bir türe rastlanmamıştır. Bitkinin doğal yayılış alanı olan kıyı kumullarında dikkat çeken bir diğer faktör ise hayvanlar tarafından tüketilebileceği ihtimalidir. 2010 yılı Temmuz ayı içerisinde yapılan Kırklareli – İğneada bölgesi arazi çalışmalarında *S. Sangaria*'nın doğal yayılış alanı olan İğneada sahil şeridinde otlayan büyükbaş hayvan gruplarına rastlanmıştır (bkz şekil 5.1).



Şekil 5.1 İğneada kıyı kumulları üzerinde otlayan büyükbaş hayvanlar (Umut ERDOĞAN 2010)

Kıyı kumullarının insan eli ile tahrip edilmesi sonucu buradaki doğal zenginliklerimiz de bilinçsizce yok edilmektedir. 1965–1972 İl Toprak Kaynağı Envanter Raporlarına göre 36.000 ha.'dan fazla kıyı kumulunun yok olduğu belirtilmiştir. Toprak Kullanım Planı olmayan ülkemizde özellikle 1980 sonrasında kıyı kumullarımızın çeşitli yollarla hızla yok edilmesi devam etmektedir.

Ülkemizde özellikle 1950’lerde tarım ve ağaçlandırmalar ile başlayan ve sonra 1980’lerde başlayan turizm faaliyetleri sonucunda kum alımı ve bu alanların ikincil konutlar, turistik tesisler (otel, golf alanları, park alanları vb.) ile kaplanması suretiyle tahribi artarak devam etmekte ve kıyı kumullarımızın bir sahibi bulunmamaktadır ( Uslu 2008). Prof. Dr. Turhan Uslu yaptığı çalışmalarda kıyı kumullarının tahribini tarihi süreçte gözler önüne sermiştir. 1950’li yıllarda ikinci dünya savaşı sebebiyle özellikle Karadeniz kıyı kumullarında Alman istilasına karşı beton mevziler inşa edilmiştir. Aynı tarihlerde traktörün ülkemiz tarımında yer alması ile kıyı kumulları, çok killi tarla toprakları ile karıştırılarak, taşınmak suretiyle tahrip edilmiştir. 1960 yılında ise kumullarımızın ağaçlandırılmaları şeklinde başlayan faaliyetle tahribat daha yoğun hale gelmiştir. Ağaçlandırma amacı ile kumulların doğal bitki örtüsünün makinelerle temizlenmesi, zamanla büyüyen ağaçların gölgesinde kalan bitki örtüsünün gelişmemesi ise tahribatın asıl nedeni olmuştur. 1980’lerde çıkan turizm kanunu ile kıyı kumulları, turizme açılmış ve kıymetlenerek oteller inşa edilmesi suretiyle tahribata uğramışlardır. Otellere ek olarak yazlık evlerin inşa edilmesi de tahribatın boyutlarını arttırmıştır. Bunların yanında şehirleşmeye bağlı artan nüfusla birlikte günümüze kadar tahribat artmış, insanımız bu doğal zenginliklerin farkında olmadan plajlarımızı tatil amaçlı kullanarak, bu bitki türlerinin üzerine basarak tahrip ederek biyolojik çeşitliliğimize zarar vermişlerdir. *S.sangaria* bitkisinin yayılış alanı olan İğneada kumsalı da turizm faaliyetleri ile insanlar tarafından sıkça ziyaret edilmektedir. Trakya bölgensin doğal güzellikleri ile ön plana çıkan bu tatil yöresinde bulunan endemik ve nadir bazı bitki türleri istemsiz insan faaliyetleri ile tahrip edilmektedir. Şekil 5.2’de İğneada kumsalında tatil yapan insanların kumullar üzerindeki gün boyu yerleşimi ve faaliyetleri bu tahribatın nasıl olabileceği konusunda bizlere fikir vermektedir.



Şekil 5.2 Kırklareli İğneada plajında tatil yapan vatandaşlarımız, *S. Sangaria*'nın yetiştiği kumullar üzerinde (İğneada Belediyesi Web Sitesi -2)

Nadir ve tehlike altındaki yabancı bitki türlerinde en sık rastlanan durumlardan birisi bu bitki türlerine ait çimlenme problemleri ya da çimlenme sonrası fide gelişimi problemleridir. Nadir ve tehlike altındaki bitkilerin tohumdan çoğaltılmasının sağlanması, tür içi genetik çeşitlilik seviyesinin artmasına katkı sağlar. Bunun yanında *in vitro* çoğaltım çalışmalarında steril fidelerin temini için yabancı bitki tohumlarının çimlenme gücü seviyelerinin belirlenmesi gerekmektedir (Dayan 2006). Endemik ve tehlike altındaki *S. sangaria* bitkisinden elde edilen kısıtlı ve az sayıdaki tohumlarla çimlenme deneyi gerçekleştirilmiştir. Dormansinin kırılması yönünde herhangi bir ön muameleye tabi tutulmayan tohumlar, sterilizasyon öncesi şişmeleri amacı ile sadece 1–2 saat kadar musluk suyunda bekletilmişlerdir. 3.2.5'te belirtilen tohum sterilizasyon aşamalarının uygulanması ile çalışma esnasında tohum kaynaklı kontaminasyon çok düşük seviyede gözlenmiş ve yaygın bir kontaminasyon problemine rastlanmamıştır. Sterilizasyon aşamasının, doku kültürü çalışmalarında en önemli ve sorunlu basamak

olduğu göz önüne alındığında bu sonucun *S. sangaria* tohumlarının sterilizasyonunda başarılı ve pratik olduğu gözlenmiştir.

Çevresel faktörlerin, tohumların çimlenmesinin uyarılmasında veya dormansi periyoduna girmesinde önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir. Bu etki çoğunlukla bitki hormonlarının seviyelerinde ortaya çıkan değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Güneş, 2000a). Örneğin, çevresel streslerden ışık ve sıcaklığın tohumlarda oluşturduğu dormansi, giberellinler tarafından ortadan kaldırılabilmektedir (Güneş, 2000b). Çimlenmenin başlamasında giberellik asit ( $GA_3$ )'in önemli rol oynadığı ve dormant tohumlarda absisik asit (ABA)'in etkisini ortadan kaldırarak depo besinlerin mobilizasyonunu sağladığı ileri sürülmüştür.  $GA_3$  uygulamasının nişasta ve depo proteinlerin hidrolizini hızlandırarak tohum çimlenmesini uyardığı saptanmıştır (Güneş, 2000a). Yine pek çok araştırmacı  $GA_3$ 'ün tohum çimlenmesini teşvik edici etkisini araştırarak rapor etmişlerdir (Sharma vd. 2004).

Bizim çalışmamızda çimlenme oranlarında;  $GA_3$  uygulaması MS ortamlarında tohum çimlenmesini azda olsa teşvik etmiştir. Ancak bu artış istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Tüm gruplarda çimlenme oranı maksimum %42.5'i geçmemiştir.  $GA_3$ 'ün çimlenme üzerine olan etkileri açısından, bazı endemik türlerde yapılmış olan in vitro çimlenme çalışmalarında çimlenmenin %100'e kadar çıktığı görülmüştür. Cenkeci vd. (2007) endemik bir tür olan *Thermopsis turcica* ile gerçekleştirdikleri çimlenme çalışmasında %100'e varan çimlenme oranına ulaşmışlardır. Bazı türlerde yapılan çalışmalarda ise çimlenme oranı düşük bulunmuştur. Baba (1995) ekonomik öneme sahip bazı ülkemiz endemikleri ile yaptığı çalışmada *Sideritis sipylea* ve *Digitalis cariensis* türlerine ait çimlenme çalışmasında çeşitli besi yeri konsantrasyonlarında çimlenme elde edemediğini rapor etmiştir. Bu açıdan bakınca bizim çalışmamızda elde edilen çimlenme oranları orta düzeyde başarılı sayılabilir. Ortalama çimlenme zamanı; kumda 6.9 gün iken hormonsuz MS ortamında 10.4 gün olmuştur.  $GA_3$  kullanımı ile bu süre 7.4 güne kadar düşmüştür. Bu açıdan  $GA_3$  uygulamasının çimlenme süresini kısalttığı düşünülebilir. Okay ve Günöz (2009) ülkemiz endemiği olan *Centurea tchihatcheffii* bitkisi ile gerçekleştirdikleri çimlenme çalışmasında,  $GA_3$  uygulaması ile çimlenme zamanının 15 günden 12 güne kadar indiğini rapor etmişlerdir. Fide boyları ortalamaları karşılaştırıldığında en az uzamanın

hormonsuz MS'te olduğu görülmüştür. Bitkide giberellinlerin tipik etkisinin boyca uzamayı arttırdığı bilinmektedir (Kocaçalışkan 2006). Diğer besi yerlerinde GA<sub>3</sub> konsantrasyonundaki artış ile de boy ortalamasının kısaldığı gözlenmiştir. Hormonsuz MS'te en kısa olan boy uzunluğu diğerlerinden farklı iken diğer konsantrasyonlar açısından ANOVA testine göre istatistiki açıdan farklılık görülmemiştir. Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile *S. sangaria* tohumlarının çimlenmesinde sorunlar olduğu ve GA<sub>3</sub> uygulaması ile çimlenme oranlarında anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Ortalama çimlenme zamanı GA<sub>3</sub> uygulaması ile kısalmıştır. GA<sub>3</sub> konsantrasyonun belli seviyede fide boy uzunluğunu arttırdığı ancak belli seviye sonrasında etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Yukarıda hızlı bir mikroçoğaltım prosedürünün gerçekleştirilmesi amacı ile steril fideler elde edebilmek amacı ile gerçekleştirilen *in vitro* çimlenme çalışmasının önemi vurgulanmıştır. Buradan yola çıkarak hedef bitkimizin doku kültürü teknikleri ile hızlı bir şekilde çoğaltımının ilk basamağı gerçekleşmiş ve çimlenme çalışması sonucu steril fideler elde edilmiştir. Mevcut taramalara göre daha önce *S. sangaria* bitkisine ait bir mikroçoğaltım çalışması yapılmadığından dolayı, yaptığımız bu araştırmanın sonuçları, bu bitki türü açısından bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

Mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılacak olan eksplantların seçimi önemlidir, çünkü eksplantlar türden türe değişik potansiyellere sahiptir. Totipotent özelliğin genç sürgün ve organlarda daha fazladır (Babaoğlu vd. 2002). Matkowski (2004) steril genç fidelerden alınan eksplantların daha güçlü ve erken kallus verdiklerini rapor etmiştir. Ayrıca kahverengileşme probleminin daha az görüldüğünü belirtmiştir. Buradan yola çıkarak bizim çalışmamızda da *in vitro* fide kullanımının avantajlarından faydalanılması amaçlanılmıştır.

*In vitro* koşullarda uygun olan çimlenme prosedürü belirlendikten sonra, çimlenme sonrası elde edilmiş steril fidelerden sağlanan yaprak, koltuk altı meristemi ve gövde eksplantlarının kallus oluşturma potansiyelleri üzerine MS temel besi yerinde, BA, NAA ve 2,4-D hormonlarının etkisini araştırdık.

Bizim çalışmamızda farklı besi yerlerinde, farklı tip eksplantların, kallus başlatımı açısından farklılıkları saptanarak ortaya konmuştur. Meristem eksplantlarında Çizelge 4.1’de gösterildiği üzere en yüksek kallus oluşturma oranı 1 mg/L NAA ve 3:1 mg/L NAA:BA içeren besi yerlerinde % 100 oranında elde edilmiştir. *Sideritis sipylea* ile yapılan *in vitro* kültür çalışmasında bizim çalışmamızda olduğu gibi NAA:BA içeren kültür ortamında yine % 100 oranında kallus elde edildiği rapor edilmiştir ( Erdağ vd. 2000). 3:1 mg/L 2,4-D:BA içeren besi yerinde hiç kallus elde edilememiştir bu oran % 0’dır. Yine *Amygdalus communis* L. cv. Yaltinski bitkisi ile yapılamış olan *in vitro* kültür denemelerinde 2:1 mg/L ve 4:1 mg/L 2,4-D:BAP besi yerlerinde meristemlerden oluşan kallus oranları % 0 olarak elde edilmiştir (Işıkalın vd. 2010). Gövde eksplantlarında 1 mg/L NAA ve 3:1 mg/L NAA:BA içeren besi yerlerinde kallus oluşturma oranı % 100 oranında olmuştur. *Salvia canariensis* L. bitkisinde gövde eksplantı açısından kallus oluşturma oranları yaklaşık 1 mg/L NAA içeren besi yerinde % 72, yaklaşık 3:1 mg/L NAA:BAP içeren besi yerinde % 96 olarak bulunmuştur (Molina 2004). 3:1 mg/L 2,4-D:BA hormon içeren besi yerinde ise gövde eksplantı açısından kallus oluşturma oranı meristem eksplantlarındaki gibi % 0 oranında elde edilmiştir. Yaprak eksplantlarında ise en yüksek kallus oluşturma oranı % 66 ile 1 mg/L BA içeriğine sahip besi yerinde görülmüştür. *Santalum album* L. yapraklarının eksplant olarak kullanıldığı çalışmada farklı BAP konsantrasyonlarını içeren besi yerlerinde en yüksek oran % 11 olarak elde edilmiştir (Mujib 2005). 1:0,5 mg/L BA:NAA ve 3:1 mg/L 2,4-D:BA hormon konsantrasyonuna sahip besi yerlerinde ise bu oran % 0 olarak elde edilmiştir. *Artemisia vulgaris* bitkisinde yapılan çalışmada bizim çalışmamızın aksine 1:0,5 mg/L BAP:NAA içeren besi yerinde yaprak eksplantlarından % 35 oranında eksplant elde edilmiştir (Borzabad vd. 2010). Bu farklılığın farklı bitkilerdeki farklı eksplantların sahip olduğu içsel hormon seviyesi farklılığından kaynaklandığı düşünülebilmektedir. Yine 3:1 mg/L 2,4-D:BA içeren besi yerinde hiç kallus elde edilememiştir. Meristem ve gövde eksplantlarında tek başına 1 mg/L 2,4-D içeren besi yerlerinde % 50’lere varan oranda kallus elde edilirken, yaprak eksplantında aynı tip besi yerinde bu oran % 0 olarak görülmüştür. Her eksplant tipinde 2,4-D’nin BA ile 3:1 mg/L oranında hormon içeren konsantrasyonlarında kallus elde edilememiştir. Bu 2,4-D hormonunun farklı konsantrasyonlarda farklı hormon kombinasyonları ile birlikte inhibe edici özelliği kazandığı fikrini ortaya çıkarmaktadır. Akman ve Darıcı (1998),

2,4-D ve benzeri sentetik bazı hormonların doğal oksinlerden farklı olduğunu, kolay parçalanamayarak bulunduğu ortamda biriktiğini ve bununla toksik madde şeklinde birikime neden olduğunu bildirmişlerdir.

Genel olarak kallus oluşumu açısından Çizelge 4.1 incelendiğinde 10 farklı besi yeri açısından meristem eksplantından oluşan kallus sayısının gövde ve yaprak eksplantlarından daha fazla oranda olduğu gözlenmiştir. Meristem dokunun devamlı bölünebilme yeteneğine sahip hücreler olması bu sonuç açısından destekleyici olmuştur (Kocaçalışkan 2002). Çizelge 4.1’de farklı eksplantlardan meydana gelen kallus oranları incelendiğinde 2 nolu besi yerinde meristem eksplantından oluşan kallus yüzdesinin (% 60) , yaprak eksplantından oluşan kallus oranından yüksek olduğu görülmüştür (% 53). Fakat 5 nolu besi yeri incelendiğinde yaprak eksplantlarından oluşan kallus oranı (% 66), meristem eksplantlarından oluşan kallus oranından (% 60) daha fazla olduğu görülmüştür. Bu açıdan incelendiğinde üç farklı eksplant tipi açısından, 10 farklı besi yerinde gerçekleştirilen kallus oluşturma denemesi sonuçlarında, her besi yeri tipi açısından kıyaslama yapıldığından eksplantların kallus oluşturma oranları arasında herhangi bir üstünlükten bahsedebilmemiz söz konusu değildir.

Sonuç olarak bakıldığında kallus oluşumu açısından, kallus oluşumunda ve büyümesinde oksin hormonlarının sitümüle edici rol oynadığı bildirilmiştir (Kocaçalışkan 2002). Farklı organların farklı iç hormon seviyelerine sahip olabileceği düşüncesi göz önünde bulundurularak bizim sonuçlarımız incelendiğinde yukarıda bahsedilen görüş bizim çalışmamızda bazı eksplant tipleri açısından destekleyici niteliğe sahiptir. Çizelge 4.1 incelendiğinde, genel olarak 3 farklı eksplant tipine ait 10 farklı besi ortamında gerçekleştirilmiş olan kallus oluşturma denemesinde tek başına oksin içeren veya oksin içeriği yüksek olan, (6 nolu besi yerinde meristem ve gövde eksplantları, 8 nolu besi yerinde meristem, gövde ve yaprak eksplantları) besi yerlerindeki eksplant tiplerinde meydana gelen kallus oranları yüksek elde edilmiştir.

Üç farklı eksplant tipi açısından 10 farklı besi yeri ortamında oluşan kalluslardan belirli bir süre içerisinde indirekt organogenez ile sürgünler meydana gelmiştir (bkz Çizelge 4.3). Meristem eksplantında 3 mg/L BA hormonu içeren besi yerinde % 66 oranı ile en fazla sürgün veren kallus elde edilmiştir. Yine meristem için 1 mg/L BA hormonu içeren besi yerinde bu oran % 60 olarak ortaya çıkmıştır. *Vigna unguiculata* L.

bitkisinde meristem eksplantlarından % 66,6 oranında sürgün oluşumu gözlenmiştir (Aasım vd. 2008). Gövde eksplantında en yüksek oran ise % 20 ile 1 mg/L BA içeren besi yerinde görülmüştür. *Verbena officinalis* L. bitkisinde yapılan sürgün oluşturma denemelerinde BA hormonunun 0.44, 2.22, 4.44, 13.32 ve 22.22  $\mu$ M BA içeren besi yerlerinde gövde internodlarından sürgün elde etme oranı % 0 olarak bulunmuştur (Türker vd. 2010). Yaprak eksplantlarından indirekt organogenez ile ise hiç sürgün elde edilememiştir. Tüm besi yerlerinde oran % 0 olarak görülmüştür. Bazı *Vitis spp.* türlerinde yaprak eksplantlarından adventif sürgün elde edilmesi deneyinde 1 mg/L BA içeren besi ortamında sürgün verme yüzdesi % 5,6 olarak saptanmıştır (Baydar 2000).

Çizelge 4.3'te her üç eksplant tipindeki kalluslardan, 10 farklı besi yerinde, indirekt organogenez ile meydana gelen sürgün veren kallus oranları incelendiğinde meristem eksplantı bu açıdan en başarılı eksplant tipi olarak ön plana çıkmaktadır. Yaprak eksplantındaki kalluslar ise indirekt organogenez ile sürgün oluşturmamışlardır. Bu açıdan yaprak eksplantına ait kallusların sürgün oluşturma durumu başarısız olmuştur. Sonuç olarak bakıldığında organogenez açısından besi ortamında sitokinin konsantrasyonu oksinden fazla veya sadece sitokinin bulunur ise sürgün gelişimi görüldüğü bildirilmiştir (Kocaçalışkan 2002). Bizim çalışmamıza bakıldığında Çizelge 4.3 incelendiğinde meristem eksplantı açısından 2, 5, 7 ve 8 nolu besi yerlerinde, gövde eksplantları açısından 5, 7 ve 8 nolu besi yerlerinde, sitokininlerin besi yerinde tek başına veya baskın oranda varlığının sürgün gelişimini sitümüle ettiği doğrulanmıştır. Her üç eksplant tipi açısından kalluslardan meydana gelen sürgün sayıları besi yeri farklılığı gözetmeksizin kıyaslandığında istatistiki açıdan üç eksplant tipi açısından farklılık gözlenmiştir. Çizelge 4.3'e bakıldığında indirekt organogenez ile kallustan sürgün rejenerasyonu açısından tüm besi yerleri için en başarılı olarak meristem eksplantı en başarısız ise yaprak eksplantı olarak ön plana çıkmaktadır.

Kalluslarda indirekt organogenez ile oluşan sürgünler ait oldukları eksplant tiplerine göre sayılarak kallus başına düşen sürgün sayısı hesaplanmıştır. Çizelge 4.4'te 10 farklı besi yerinde bulunan 3 farklı eksplant tipinden meydana gelmiş sürgünlü kalluslar üzerindeki ortalama sürgün sayıları gösterilmiştir. Bunlar incelendiğinde en yüksek eksplant başına düşen sürgün sayısı meristem eksplantlarında 1 mg/L BA hormonu içeren 7 nolu besi yerinde 12,5 olarak ortaya çıkmıştır. Aynı eksplant çeşidi

için, 3:0,5 mg/L BA/NAA hormonları içeren 8 nolu besi ortamında bu oran 7,8 olarak görülmüştür. Tek başına 3 mg/L BA içeren 5 nolu besi yerinde bu oran 5,4 iken, 1 mg/L BA içeren 5 nolu besi yerinde bu oran 6,7 olarak görülmüştür. Gövde eksplantı açısından da bu tabloya benzer sonuçlar elde edilmiştir. Belli miktarda NAA destekli ortamlarda kallus başına düşen sürgün sayısının fazla olduğu gözlenmiştir. Oso Grande adı verilen çilek bitkisi çeşidi ile yapılmış olan kültür çalışmasında kallus başına düşen sürgün miktarının en fazla 1:1 mg/L BAP/NAA içeren besi yerinde 26,54 olarak görülmüştür. En düşük oran ise 1 mg/L NAA içeren besi yerinde 4,96 olarak görülmüştür (Adak vd. 2005). Bizim çalışmamızda ise her üç eksplant tipi açısından tek başına NAA konsantrasyonuna sahip besi yerlerinde kallus başına düşen sürgün sayısı 0 olarak ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak sitokininlerden BA hormonunun sürgün sayısı artışına belli oranda etki ettiği fakat en yüksek verimi oksinlerden NAA bulunan kombinasyonlarında gösterdiği saptanmıştır.

İndirekt organogenez ile sürgün meydana getiren kallus oranları yanında kök meydana getiren kallus oranlarında hesaplanmış ve Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Her üç eksplant tipi açısından 10 farklı besi yerinde meydana gelen kök veren kallus oranları incelendiğinde, en yüksek oranın 1 mg/L NAA içeriği olan besi yerinde görüldüğü saptanmıştır. Meristem eksplantı için bu oran % 60, yaprak eksplantı için % 73 ve gövde eksplantı açısından % 20 olarak saptanmıştır. Gürel ve Wren (1995) şeker pancarı bitkisi ile yaptıkları indirekt organogenez çalışmasında 1 mg/L NAA hormonu içeren besi ortamında 13. gün itibari ile kalluslardan köklenme elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Yaprak ve gövde eksplantlarında sadece belirtilen 1 mg/L NAA hormonu içeren besi yerinde köklenme gerçekleşmiştir, diğer 9 besi yerinde gerçekleşmemiştir. Meristem eksplantı açısından kıyaslanınca 3 mg/L NAA, 1 mg/L NAA ve 1:0,5 mg/L BA:NAA hormonları içeren besi yerlerinde köklenme elde edilmiştir. Besi yerinde oksin konsantrasyonunun fazla olduğu veya ortamda sadece oksin bulunduğu ortamlarda kök gelişiminin solumüle edildiği bildirilmiştir (Kocaçalışkan 2002). Bizim çalışmamızda 3 farklı eksplant tipinde sonuç olarak sadece NAA içeren ortamlarda kök gelişiminin yüksek oranda meydana gelmesi bahsedilen görüşü destekler niteliktedir. Fakat meristem eksplantında 1:0,5 mg/L BA:NAA yerinde kök gelişimi meydana gelmesi bu görüşün aksine bir durum ortaya çıkarmıştır. *Acacia mearnsii* bitkisinde farklı eksplant tipleri ile gerçekleştirilmiş olan organogenez çalışmasında 4,65:2,65 µM

K:NAA hormon konsantrasyonuna sahip besi yerinde % 13,2 oranında; yine 9,30:2,65  $\mu$ M K:NAA hormon konsantrasyonuna sahip besi yerinde % 2,2 oranında köklenme elde edilmiştir (Quoirin vd. 1998). Bu durumun da bitkilerdeki doku ve organların farklı tipte içsel hormon seviyelerine sahip olmalarının bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülebilir.

İndirekt organogenez sonucu sürgün veya köklenme elde edilememiş olan kalluslar Çizelge 3.2’de verilen 11, 12 ve 13 nolu rejenerasyon besi yerlerine aktarılmışlardır. Burada sitokinin oranının oksin oranından fazla tutulması ile sürgün rejenerasyonu amaçlanmıştır. Fakat 6 haftalık rejenerasyon denemesi boyunca mevcut besi yerlerindeki kalluslardan hiç birinde rejenerasyon gerçekleşmemiştir. *Rauwolfia serpentina* bitkisi ile yapılmış olan doku kültürü çalışmasında besi yeri içeriği 1:0,5 mg/L BAP/IAA hormon içeriğine sahip MS besi ortamında % 52 oranında sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır (Singh vd 2009). Bunun yanında sadece sitokinin varlığında % 100 rejenerasyon başarısı elde edilmiş çalışmalarda mevcuttur. *Vicia narbonensis* L. var. *narbonensis* L. bitkisi ile gerçekleştirilmiş olan *in vitro* rejenerasyon çalışmasında 0,25 ve 0,50 mg/L BAP içeren MS besi ortamlarında % 100 oranında sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir (Kendir vd 2009). Bunun yanında bazı çalışmalarda, bizim çalışmamızda olduğu gibi başarısız sonuçlarda elde edilmiştir. *Withania somnifera* bitkisi ile yapılmış olan *in vitro* kültür çalışmasında 2,5:0,5 ve 2,5:1 mg/L BAP:NAA hormon konsantrasyonlarına sahip farklı besi yerlerinde sürgün rejenerasyon oranı % 0 olarak elde edilmiştir. Fakat aynı çalışma incelendiğinde en yüksek rejenerasyon oranının 1:2,5 mg/L BAP/K hormon konsantrasyonuna sahip besi yerinde % 80 olarak ortaya çıktığı görülmüştür (Siddique vd. 2004). Sonuç olarak çeşitli, sitokinin/oksin kombinasyonlarına sahip besi yerlerinin sürgün rejenerasyonunda her zaman sonuç veremediği gözlenmiştir. Sürgün rejenerasyonunu arttırmak için farklı sitokininlerin (BAP ve K gibi), farklı oranda kombinasyonlarını içeren besi yerlerinden de sürgün rejenerasyonu elde edilebileceği düşünülmüştür.

Mikroçoğaltım çalışmalarında diğer bir önemli aşama elde edilen fidelerin köklendirilme aşamasıdır. İndirekt organogenez ile elde edilmiş sürgünler bu deneme için kullanılmışlardır. Besi yeri olarak Çizelge 3.3’te gösterilen NAA hormonunun farklı konsantrasyonlarına sahip tam ve yarı MS besi yerleri kullanılmıştır. 0,5 mg/L

NAA içeren 14 nolu besi yerinde MS tuzları tam güçte kullanılmıştır. 1, 3 ve 5 mg/L NAA hormonu içeren 15, 16 ve 17 nolu besi yerinde ise MS tuzları yarı güçte kullanılmıştır. MS tuzlarının yarı güçte kullanılmasının köklenmeyi arttırdığı bazı çalışmalarda ortaya konmuştur. *Vernonia amygdalina* bitkisi ile gerçekleştirilmiş olan *in vitro* kültür çalışmasında 0.25, 0.5, 1 ve 2 mg/L NAA hormonu içeren ve yarı güçte MS tuzları kullanılarak hazırlanmış besi yerlerinde % 100 oranında köklenme elde edilmiştir (Khalafalla vd. 2009). Fakat bizim çalışmamızda aksine yarı güçte MS tuzlarının kullanıldığı 1, 3, ve 5 mg/L NAA hormonu içeren besi yerlerinde hiç köklenme elde edilememiştir. *Pyrus serothina* Rehd. bitkisi ile gerçekleştirilmiş olan *in vitro* kültür çalışmasında köklendirme amaçlı yarı güçte MS tuzları ile birlikte NAA ve IBA hormonlarının farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu çalışmada 10 mg/L IBA içeren besi yerinde % 40 oranında köklenme elde edilmişken, 10 mg/L NAA içeren besi yerinde bizim çalışmamızda olduğu gibi köklenme elde edilememiş ve oran % 0 olarak ortaya çıkmıştır (Banno vd. 1988). 0,5 mg/L NAA hormonu içeren ve tam güçte MS tuzlarının kullanıldığı besi yerinde % 100 oranında köklenme elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda tam ve yarı güçte MS tuzlarıyla kombine edilmiş oksin içerikli besi yerlerinde bizim çalışmamızda olduğu gibi tam güçte MS tuzları içeren besi yerlerinde daha yüksek köklenme oranları elde edilmiştir. *Citrullus lanatus* cv. Round Dragon bitkisi ile yapılmış olan *in vitro* köklenme çalışmasında yarı güçte MS tuzları içeren 0.1, 0.5, 1 ve 10 mg/L NAA hormon konsantrasyonlarına sahip besi yerlerinde sırası ile % 47, % 27, % 23 ve % 13 oranlarında köklenme elde edilmiştir. Tam güçte MS içeren aynı konsantrasyonlarda NAA hormonuna sahip besi yerlerinde ise bu oran ilkinden daha yüksek olarak sırası ile % 67, % 53, % 43 ve % 27'dir (Ganasan ve Huyop 2010). Tüm köklendirme ortamına aktarılan fidelerin başlangıç boyları ölçülmüş ve deneme sonlandırıldığında son boyları ölçülerek kayıt altına alınmıştır. Tüm ortamlardaki fidelerde boyca uzama saptanmıştır. İstatistiki açıdan yarı güçte MS tuzları içeren 1, 3 ve 5 mg/L NAA hormonu içeriğine sahip besi yerlerindeki fidelerin boy ortalamaları arasında fark yok, fakat tam güçte MS tuzlarına sahip 0,5 mg/L NAA hormonu içeren besi yerindeki fidelerin boyları diğerlerinden farklı çıkmıştır. Zaten oksinlerin belirli oranlarda hücre büyümesi ve uzamasını arttırdığı, aynı zamanda bitkilerin boyca büyümesine etki ettikleri bilinmektedir (Akgül 2008). Sonuç olarak köklendirme denemesinde en yüksek verim 0,5 mg/L NAA hormonu içeren tam güçte MS tuzlarına

sahip besi yerinde gerçekleşmiştir. Yarı güçte MS tuzlarına sahip NAA hormonu içeren ortamlarda ise köklenme gerçekleşmemiştir. Örnek verilen diğer çalışmalarda olduğu gibi bazen yarı güçte MS tuzlarının kullanılması avantaj gibi gözükse de, bazı bitki türlerinin gelişimleri esasında ihtiyaç duydukları inorganik madde ihtiyaçlarının farklı olabileceği göz önünde bulundurulduğunda, tam güçte MS tuzlarının kullanılmasının köklenme açısından verimi arttırdığı düşünülebilir.

Köklenen bitkilerin dış ortama şaşırtılmaları ile *S. sangaria* bitkisi için bir mikroçoğaltım prosedürü oluşturulduğu söylenebilir. Fakat kullanılan tohum sayısına kıyasla elde edilen bitki oranı düşük olduğundan mikroçoğaltım prosedürünün verimliliği tartışılabilir. Ancak farklı tipte, amaca uygun sentetik bitki düzenleyicilerinin kullanımı ile denemeler yapıldığında verimin artabileceği düşünülmektedir. Bu açıdan bakıldığında ortaya koyduğumuz mikroçoğaltım prosedürü, nesli tehdit altında olan bitkimiz açısından önem taşımaktadır.

Bu aşamadan sonra bitkinin *in situ* koruma metotları ile yayılış alanlarında koruma çalışmalarına da ağırlık verilmelidir. Özellikle bitkimizin yayılış alanı olan kumulların zarar görmesinin önüne geçilmeli ve halk bu konuda bilinçlendirilmelidir. Toplum duyarlılığının artması ile oluşacak hassasiyet ile bitkinin doğal yayılış alanları içerisinde korunması ilerleyen zamanlarda çıkabilecek sorunlar açısından şimdiden çözüm niteliği taşımaktadır. Bugün endemik ve tehlike altındaki *Silene sangaria* bitkisinin koruma altına alınması ve elde edilen tohum sayısının artması ile bitkinin ekolojik geleceği teminat altına alınmış olacaktır. Buda ülkemizin biyolojik zenginliğine doğrudan bir katkı sağlamış olacaktır.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmanın, bu türün korunmasına doğrudan ve dolaylı olarak katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Türün geleceğinin korunmasına katkısı olduğunu düşündüğümüz çalışmamıza kısaca göz attığımızda; tohum çimlenmesinin belirli ve orta düzeyde olduğunu, bitki eksplantlarından uygun eksplant çeşidi ve uygun hormon içeriğine sahip besi yerlerinde yüksek oranda kallus ve indirekt organogenezle steril fideler elde edebildiğimizi, indirekt organogenez ile oluşan sürgünleri uygun ortamda köklendirerek dış ortama alıştırarak bir mikroçoğaltım prosedürü ortaya çıkarabildiğimizi görmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Aasım, M, Khawar, KM, Özcan, S, 2008, “*In vitro* Micropropagation From Shoot Meristems of Turkish Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cv. Akkız” Bangladesh J. Bot. 37, 2, 149–154.
- Abak, K, Ellialtıoğlu, Ş, Sarı, N, 2001, ” Haploid bitki üretimi. Ref in: Bitki Biyoteknolojisi. Cilt I. Doku Kùltürleri ve Uygulamaları” 2002, (Editörler: M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), II. Baskı. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi, 137,189.
- Adak, N, Pekmezci, M, Gübbük, H, 2005, ““Oso Grande” çilek çeşidinin meristem kùltürü ile çoğaltılması üzerinde araştırmalar” GAP IV. Tarım Kongresi, 1, S 212–218.
- Akgül, H, 2008, “Büyüme ve Gelişim Düzenleyicileri” Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, 12, S 1–51.
- Akman, Y, 1993, “Biyocoğrafya” Ankara, Palme Yayınları.
- Akman, Y, Darıcı, C, 1998, “Bitki Fizyolojisi (Beslenme ve Gelişme Fizyolojisi)” Ankara.
- Atay, S, Güleriyüz, G, Orhun, C, Seçmen, Ö, Vural, C, 2009, “Dağlarımızdaki Zenginlik- Türkiye’nin 120 Alpin Bitkisi” İstanbul, Rubicon Vakfı Yayını.
- Avcı, M, 2005, “Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye’nin Bitki Örtüsü” İstanbul: İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakùltesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi 1302–7212, 13, S 27–55.
- Ayan, AK, Çırak, C, 2006, “*In vitro* Multiplication of *Hypericum heterophyllum*, an Endemic Turkish Species” USA: American Journal of Plant Pathalogy 1, 1, S 76–81.
- Baba, B, 1995, “Ekonomik Öneme Sahip Endemiklerin Doku Kùltürü Yöntemi İle Çoğaltılması” İzmir: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- Babaoğlu, M, Gürel, E, Özcan, S, 2002, “Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kùltürü ve Uygulamaları” II. Baskı. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Bağcı, Y, 2008, “A New Species of *Silene* L. (Caryophyllaceae) from South Anatolia, Turkey” Turk J Tübitak Bot., 32, S 11–15.

- Balkaya, A, Yanmaz, R, 2001, "Bitki Genetik Kaynaklarının Muhafaza İmkanları ve Tohum Gen Bankalarının Çalışma Sistemleri". *Ekoloji Çevre Dergisi* 10, 29.
- Banno, K, Hayashi, S, Tanabe, K, Tokuzumi, A, 1988, "In vitro Propagation of Japanese Pear Rootstocks" *Plant Tissue Culture Letters*, 5, 2, S 87–89.
- Başkaya, Ş, Başkent, EZ, Terzioğlu, S, 2008, "Developing and Implementing Multiple-Use Forest Management Planning in Turkey" *Environmental Management*, 42, S 37–48.
- Baydar, NG, 2000, "Asmada (*Vitis* spp.) Yapraklardan Adventif Sürgün Oluşumu Üzerine Bir Araştırma" *Turkish J. Biol. Tübitak*, 24, S 645–656.
- Benson, EE, (Editor), 1999, "Plant Conservation Biotechnology" Chapter 15 (V, C, Pence), London, UK: CRC Press, s:227–274 Ref in: Dayan, S, 2006, "Endemik ve Tehlike Altındaki *Thormopsis turcica* (Fabaceae)'nin In Vitro Çimlenmesi ve Mikroçoğaltımı" Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Borzabad, RK, Sadurshana, MS, Niranjana, MH, 2010, "In vitro Plant Regeneration from Leaf Explants of *Artemisia vulgaris* L. – A Medicinal Herb" *Modern Applied Science* 4, 9, S 130–134
- Brady, SB, McCourt, P, 2003, "Hormone Cross-Talk in Seed Dormancy" *Journal of Plant Growth Regulation*, 22, S 25–31
- Cenkci, S, Kargioğlu, M, Dayan, S, Konuk, M, 2007, "Endangered Status and Propagation of an Endemic Plant Species *Thormopsis turcica* (Fabaceae)" *Asian Journal of plant Sciences*, 6, 2, S 288–293.
- Çakır, A, Oluk, EA, 2009, "Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey" *African Journal of Biotechnology*, 8, 21, S 5769–5772.
- Çelik, A, 2005, "Yeşil Kuşak Kavramı ve İstanbul Kenti Yeşil Kuşak Sistemi İçin Öneriler" İstanbul: Bahçeşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Çöçü, S, Erişen, S, Duran A, Hamzaoglu, E, Gürlek, D, Parmaksız, Mirici, S, 2005 "Lokal Endemik *Astragalus duranii* Türünün in vitro Hızlı Çoğaltımı" XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 31 Ağustos- 2 Eylül 2005, Eskişehir.
- Dayan, S, 2006, "Endemik ve Tehlike Altındaki *Thormopsis turcica* (Fabaceae)'nin In Vitro Çimlenmesi ve Mikroçoğaltımı" Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Ekim T, Koyuncu, M, Vural, M, Duman, H, Aytaç, Z, Adıgüzel, N, 2000, "Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı" Ankara: TTKD ve Van 100. Yıl Üniversitesi Yayını, VAN.
- Ekim, T, 1990, "Türkiye'nin Biyolojik Zenginlikleri" Türkiye Çevre Sorunları Vakfı Yayını.

- Erdağ, B, Kurt, S, 2009, "In vitro germination and axillary shoot propagation of *Centaurea zeybekii*" Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences Biologia 64, 1, S 97–101.
- Erdağ, BB, Yürekli, K, 2000, "Callus induction and Shoot Regeneration of *Sideritis sipylea* Boiss. (Lamiaceae)" Bulletin of Pure and Applied Sciences, 19, 1, S 41–46.
- Ganasan, K, Huyop, F, 2010, "In vitro Regeneration of *Citrullus lanatus* cv. Round Dragon" Journal of Biological Sciences, 10, 2, S 131–137.
- Gunter, EA, Popeyko OV, Ovodov, YuS, 2007, "Modification of Polysaccharides from Callus Culture of *Silene vulgaris* (M.) G. Using Carbohydrases in vitro" Biochemistry (Moscow), 72, 9, S 1088–1015.
- Güler, N, 2007, "İğneada Longoz Ormanları Bitkileri (Resimli Tanıma Kılavuzu)" İstanbul, T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Biyolojik Çeşitlilik ve Doğal Kaynak Yönetimi Projesi Yayını.
- Güneş, T, 2000a, "*Arctium minus* (Hill.) Bernh. Tohum Çimlenmesi Sırasında Depo Maddelerin Mobilizasyonu" G.Ü Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi, 1, 1, p:31–37. Ref. in: Ünal, O, Gökçeoğlu, M, Topçuoğlu, ŞF, 2004 "Antalya Endemiği *Origanum* Türlerinin Tohum Çimlenmesi ve Çelikle Çoğaltılması Üzerinde Araştırmalar" Antalya: Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 17, 2, S 135–147
- Güneş, T, 2000b, "*Arctium minus* (Hill.) Bernh. Tohumlarında Gibberellik Asit Uygulmasının Çimlenme Ve  $\alpha$  - Amilaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi" Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 13, 3, p:589–597. Ref. in: Ünal, O, Gökçeoğlu, M, Topçuoğlu, ŞF, 2004 "Antalya Endemiği *Origanum* Türlerinin Tohum Çimlenmesi ve Çelikle Çoğaltılması Üzerinde Araştırmalar" Antalya: Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 17, 2, S 135–147.
- Gürel, E, Wren, MJ, 1995, "In vitro development from leaf explant of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Rhizogenesis and effect of sequential exposure to auxin and cytokinin" Ann. Bot, 75, S 31–38. Ref. in: Babaoğlu, M, Gürel, E, Özcan, S, 2002 "Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları" II. Baskı. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Ibañez, MR, Amo-Marco, JB, 1998, "Promotion by phloroglucinol of micropropagation of *Minuartia valentina*, an endangered and endemic Spanish plant" Netherlands (Kluwer Academic Publishers), Plant Growth Regulation, 26, S49–56.
- Işıkalın, Ç, Akbaş, F, Namlı, S, Başaran, D, 2010, "Adventitious shoot development from leaf and stem explants of *Amygdalus communis* L. cv. Yaltinski" Plant Omics Journal, 3, 3, S 92.96
- İğneada Belediyesi Web Sitesi – 1, <http://www.igneada.bel.tr/fotograflar/1.jpg>
- İğneada Belediyesi Web Sitesi -2, <http://www.igneada.bel.tr/fotograflar/50.jpg>

- Jack, EM, Anatasova, S, Verkleij JAC, 2005, "Callus induction and plant regeneration in the metallophyte *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae)" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80, S 25–31.
- Jordan, M, Larrain; M, Tapia, A, Roveraro, C, 2001, "*In vitro* regeneration of *Sophora toromiro* from seedling explants" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66, S 89–95.
- Karag zel, O, Ta  io lu, SG, 2007, "Sıcaklığın *Consolida orientalis*, *Isatis tinctoria* ve *Silene armeria* Do al Populasyonlarının  imlenme  zelliklerine Etkisi" *BAH E* 36, 1–2, S 19–28
- Kaya, Y, Aksakal,  , 2005, "Endemik Bitkilerin Dünya ve Türkiye'deki Da ılımı " *Erzincan: Erzincan E itim Fak ltesi Dergisi* 7, 1, S 85–99.
- Kendir, H, Demirba , N , Aasim, M, Khawar, KM, 2009, "*In vitro* plant regeneration from Turkish Narbon Vetch (*Vicia narbonensis* L. var. *narbonensis* L.)" *African Journal of Biology*, 8, 4, S 614–618.
- Khalafalla, MM, Daffalla1, HM, El-Shemy, HA, Abdellatef, E, 2009, "Establishment of in vitro fast-growing normal root culture of *Vernonia amygdalina* - a potent African medicinal plant" *African Journal of Biotechnology*, 8, 21, S 5952–5957.
- Kocaçalışkan,  , 2002, "Bitki K lt rleri (Organ, Doku ve H cre)" K tahya.
- Kocaçalışkan,  , 2006, "Bitki Fizyolojisi" K tahya.
- Kozlowski, TT, Pallardy, SG, 1997, "Growth Control in Woody Plants" Ac. Press, San Diego, S 643. Ref in: Yılmaz, M, 2008 "Do u Kayını (*Fagus orientalis* Lipsky.) Tohumlarında Dormansinin Nedenleri" *Kahramanmara : KS  Fen ve Mühendislik Dergisi*, 11, 1, S 69–73.
- Matkowski, A, 2004, "*In vitro* isoflavonoid production in callus from different organs *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi" *Journal of Plant Physiology*, 161, 3, S 343–346.
- McCartan, SA, Van Staden, J, 2003, "Micropropagation of The Endangered *Kniphofia leucocephala* Baijnath" *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 39, S 496–499.
- Molina, SM, 2004, "In vitro Callus Induction and Plants from Stem and Petiole Explants of *Salvia canariensis* L." *Plant Tissue Culture*, 142, 2, S 167–172
- Muca, B, 2009, "Türkiye *Ankyropetalum fenzi* (Caryophyllaceae) Cinsi Taksonları  zerinde Anatomik, Palinolojik, Taksonomik ve Morfolojik Ara tırmalar" Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Isparta.
- Mujib, A, 2005, "In vitro Regeneration of Sandal (*Santalum album* L.) from Leaves" *Tr. J. Bot.* 29, 3, S 63–67.
- Murashige, T, Skoog, FA, 1962, "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay With Tobacco Tissue Cultures" *Physiol. Plant.*, 15, S 473–479.

- Normah, MN, Hamidah, S, Ghani, FD, 1997, "Micropropagation of *Citrus halimii* – an endangered species of South-east Asia" Netherlands (Kluwer Academic Publishers), Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50: 225–227.
- Okay, Y, Günöz, A, 2009, "Gölbaşı'na *Endemik Centaurea tchihatcheffii* Fisch. et Mey. Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Bazı Uygulamaların Etkisi" Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım bilimleri Dergisi, 15, 2, S 119–126.
- Özçelik, R, 2006, "Biyolojik Çeşitliliği Korumaya Yönelik Yapılan (Planlama ve Koruma) Çalışmalar ve Türkiye Ormancılığına Yansımaları" Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi A, 2, S 23–36.
- Özhatay, N, Byfield, A, 2005, "Türkiye'nin Önemli 122 Bitki Alanı" WWF Türkiye (Doğal Hayatı Koruma Vakfı) yayını, İstanbul.
- Panayotova, LG, Ivanova, TA, Bogdanova, YY, Gussev, CV, Stanilova, MI, Bosseva, YZ, Stoeva TD, 2008, "In vitro cultivation of plant species from sandy dunes along the Bulgarian Black Sea Coast" Sofia: Phytologia Balcanica, 14, 1, S 119–123.
- Parmaksız, Çöçü, S, Uranbey, S, Mirici, S, Özcan, S, Sancak, C, Sarıhan, E, O, İpek, A, Kaya, M, D, Arslan, N, 2005, "Tehlike altındaki endemik *Muscari muscarimi* türünde olgunlaşmamış embriyolardan in vitro hızlı soğancık üretimi" XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 31 Ağustos- 2 Eylül, Eskişehir.
- Quoirin, M, Bittencourt JM, Zanette, F, de Oliveira, DE, 1998, "Effect of Growth Regulators on Indirect Organogenesis of *Acacia mearnsii* Tissues Cultured *in vitro*" Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 10 (2): 101–105.
- Schmidt, L, 2000, "Guide To Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed" Danida Forest Seed Centre, Denmark S 511 Ref. in: Yılmaz, M, 2008, "Doğu Kayını (*Fagus orientalis* Lipsky.) Tohumlarında Dormansinin Nedenleri" Kahramanmaraş: KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 11, 1, S 69–73.
- Seçmen, Ö, 1996, Türkiye Florası, Ege Üniv. Fen Fakültesi Teksirler serisi No: 120 Ref. in: Kaya, Y, Aksakal, Ö, 2005, "Endemik Bitkilerin Dünya ve Türkiye'deki Dağılımı" Erzincan: Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi 7, 1, S 85–99.
- Sharma, AD, Thakur, M, Rana, M, Singh, K, 2004, "Effect of plant growth hormones and abiotic stresses on germination, growth and phosphatase activities in *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds" African Journal of Biotechnology, 3, 6, S 208–312.
- Siddique, NA, Bari, MA, Shahnewaz, S, Rahman, MH, Hasan, MR, Khan, M.S.I, Islam, M.S, 2004, "Plant Regeneration of *Withania somnifera* L. Dunal (Ashwagandha) From Nodal Segments Derived Callus an Endangered Medical Plant in Bangladesh" Journal of Biological Sciences, 4, 2, S 219–223.
- Singh, P, Singh, A, Shukla, A.K, Singh, L, Pande, V, Naiwal, K, 2009, "Somatic Embryogenesis And In Vitro Regeneration Of An Endangered Medicinal Plant Sarpagandha (*Rauvolfia serpentina*. L)" Researcher, 1, 3, S 46–53

Şehirali, S, Özgen, M, 1987, “Bitkisel Gen Kaynakları” Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 1020, Ankara.

TÜBİVES, [http://www.eski.tubitak.gov.tr/tubives/index.php?com=18000&id=Silene\\_sangaria](http://www.eski.tubitak.gov.tr/tubives/index.php?com=18000&id=Silene_sangaria)

Türker, AU, Yücesan, B, Gürel, E, 2010, “Adventitious shoot regeneration from stem internode explants of *Verbena officinalis* L., A Medicinal Plant” Turkish J. Biol. Tübitak, 34, S 297–304.

Uslu, T, 2008, <http://www.turhanuslu.net/gazeteler/02062008.htm>

Vikipedi1, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Karanfilgiller>

Vikipedi2, [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Silene\\_sangaria\\_2.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Silene_sangaria_2.jpg)

Wala, BB, Jasrai, Y.T, 2003, “Micropropagation of an Endangered Medicinal Plant: *Curculigo orchioides* Gaertn.” Plant Tissue Cult. 13, 1, S13–19.

Yılmaz, M, 2008, “Doğu Kayını (*Fagus orientalis* Lipsky.) Tohumlarında Dormansinin Nedenleri” Kahramanmaraş: KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 11, 1, S 69–73.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1985 yılında İstanbul’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul’da tamamladım. 2004 senesinde girdiğim Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2008’de mezun oldum. 2008 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2010 senesi itibariyle bu tez ile Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimimi tamamladım.