

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORCID : - - -

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :
ORCID : - - -

Trabzon

ÖNSÖZ

“Tehlike Altındaki Endemik *Tripleurospermum conoclinium* ve *T. hygrophilum* (Asteraceae) Türlerinin Mikroçoğaltımı ve Korunması” adlı tez çalışması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenerek, konu seçimimde ve çalışmalarımın yürütülmesinde her zaman yol gösteren, yanımda olan, destek ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hüseyin İNCEER’e saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmam boyunca, bilgi ve görüşlerini benimle paylaşarak, tezimin gelişmesine katkıda bulunan tez izleme jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Sema AYAZ’a ve Sayın Prof. Dr. Ali Ömer ÜÇLER’e, başta Sayın Prof. Dr. Ersan KALAY olmak üzere KTÜ Temel Tıp Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı’na, tez çalışmalarımı yürütebilmem için ortam ve olanak sağlayan Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e ve laboratuvar çalışmalarımda yardıma ihtiyacım olduğunda desteklerini esirgemeyen tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca sabır ve destekleri ile her an yanımda olan maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma TÜBİTAK 117Z588 nolu proje ile desteklenmiştir. Doktora eğitimimde burs imkânı sağlayan TÜBİTAK Yönetim Kurulu Başkanı’na ve değerli üyelerine teşekkür ederim.

Tuğba ERGİN
Trabzon 2023

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Tehlike Altındaki Endemik *Tripleurospermum conoclinium* ve *T. hygrophilum* (Asteraceae) Türlerinin Mikroçoğaltımı ve Korunması” başlıklı bu çalışmayı, baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Hüseyin İNCEER sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 10/03/2023

Tuğba ERGİN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş....	1
1.2. Koruma Biyolojisi	4
1.2.1. Tohum Depolama	5
1.2.2. Botanik Bahçeleri	6
1.2.3. <i>In vitro</i> Depolama	6
1.2.4. Kriyoprezarvasyon.....	6
1.3. Doku Kültürü	8
1.4. Mikroçoğaltım Aşamaları.....	10
1.4.1. Hazırlık Aşaması	12
1.4.2. Kültür Başlangıç Aşaması	12
1.4.2.1. Besiyeri İçeriği.....	13
1.4.2.2. Makro ve Mikro Elementler	14
1.4.2.3. Karbohidrat Kaynağı	14
1.4.2.4. Vitaminler.....	14
1.4.2.5. Aminoasitler	15
1.4.2.6. Kimyasal Olarak Tanımlanmayanlar	15
1.4.2.7. Jel Yapıcı Ajanlar	16
1.4.2.8. pH..	16
1.4.2.9. Bitki Büyüme Düzenleyicileri	16
1.4.2.9.1. Oksinler.....	17

1.4.2.9.2.	Sitokininler	18
1.4.2.9.3.	Giberellinler	20
1.4.2.9.4.	Absisik Asit	21
1.4.2.9.5.	Etilen.....	21
1.4.3.	Çoğaltım Aşaması.....	21
1.4.4.	Köklendirme Aşaması	23
1.4.5.	Dış Ortama Alıştırma Aşaması.....	24
1.4.6.	Doku Kültürlerinde Karşılaşılan Problemler	25
1.4.6.1.	Somaklonal Varyasyon.....	25
1.4.6.2.	Hiperhidrisite	27
1.4.6.3.	Kontaminasyon	27
1.5.	<i>Tripleurospermum conoclinium</i> (Boiss. & Bal.) Hayek.'un Morfolojik Özellikleri	28
1.6.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> (Bornm.) Bornm.'un Morfolojik Özellikleri	29
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	30
2.1.	Bitki Materyali.....	30
2.2.	Kültür Koşulları	30
2.3.	Sterilizasyon ve Aken Çimlendirme	30
2.4.	Sürgün Çoğaltımı.....	32
2.5.	Köklendirme	32
2.6.	Aklimatizasyon	33
2.7.	Stabilite Testleri.....	33
2.7.1.	Kromozom Sayımı.....	33
2.7.2.	Akım Sitometrik Analiz.....	34
2.8.	Stoma İncelemeleri	35
2.9.	İstatiksel Analizler	35
3.	BULGULAR.....	36
3.1.	<i>Tripleurospermum conoclinium</i> (Boiss. & Bal.) Hayek.	36
3.1.1.	Aken Çimlendirme.....	36
3.1.2.	Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Sürgün Çoğaltımı Üzerine Etkisi	37
3.1.3.	Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Köklenme Üzerine Etkisi	46
3.1.4.	Kromozom Sayımı.....	49
3.1.5.	Aklimatizasyon	50

3.1.6.	Akım Sitometrik Analiz.....	54
3.1.7.	Stoma Özellikleri	55
3.2.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> (Bornm.) Bornm.	56
3.2.1.	Aken Çimlendirme.....	56
3.2.2.	Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Sürgün Çoğaltımına Etkisi	57
3.2.3.	Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Köklenme Üzerine Etkisi	67
3.2.4.	Kromozom Sayımı.....	70
3.2.5.	Aklimatizasyon	71
3.2.6.	Akım Sitometrik Analiz.....	75
3.2.7.	Stoma Özellikleri	76
4.	TARTIŞMA	77
5.	SONUÇLAR.....	87
6.	ÖNERİLER.....	89
7.	KAYNAKLAR.....	90
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

TEHLİKE ALTINDAKİ ENDEMİK *TRIPLEUROSPERMUM CONOCLINIUM* VE *T. HYGROPHILUM* (ASTERACEAE) TÜRLERİNİN MİKROÇOĞALTIMI VE KORUNMASI

Tuğba ERGİN
Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hüseyin İNCEER
2023, 119 Sayfa

Bu tez çalışmasında, nesli tehlike altında olan endemik *Tripleurospermum conoclinium* (Boiss. & Bal.) Hayek ve *Tripleurospermum hygrophilum* (Bornm.) Bornm. türlerinin mikroçoğaltım ile *ex situ* koruması yapılmıştır. Mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin stabilite testleri akım sitometri, kromozom sayımı, ve stoma analizi ile yapılmıştır. *Tripleurospermum conoclinium* ve *T. hygrophilum*'un mikroçoğaltımında *in vitro* ortamda çimlendirilen akenlerden elde edilen fideler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Sürgün çoğaltımında, 6-benzylaminopurine (6-BA, 0,25, 0,5 ve 1 mg L⁻¹), kinetin (KIN, 0,25, 0,5 ve 1 mg L⁻¹), 6-(γ,γ-dimethylallylamino)-purine (2iP, 0,25, 0,5 ve 1 mg L⁻¹)'nin indol-3-bütirik asit (IBA, 0,1 mg L⁻¹) ve naftalin asetik asit (NAA, 0,1 mg L⁻¹) ile kombinasyonunu içeren MS kullanılmıştır. *Tripleurospermum conoclinium* için eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamındaki bitkilerden elde edilmiştir. *Tripleurospermum hygrophilum* için en yüksek sürgün sayısı 0,25 mg mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamındaki bitkilerden elde edilmiştir. Köklendirme için indol-3-bütirik asit (IBA; 0,25, 0,5 ve 1 mg L⁻¹) ve naftalen asetik asit (NAA; 0,25, 0,5 ve 1 mg L⁻¹) içeren MS ortamı kullanılmıştır. *Tripleurospermum conoclinium* için eksplant başına en yüksek kök sayısı 1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamındaki bitkilerden elde edilmiştir. *Tripleurospermum hygrophilum* için en yüksek kök sayısı 0,25 mg NAA içeren MS ortamındaki bitkilerden elde edilmiştir. Mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin nuklear DNA'sı, bu bitkilerin doğal popülasyonlarındaki nuklear DNA miktarları ile kıyaslandığında herhangi bir değişiklik görülmemiştir. *In vitro* ortamda çoğaltılan *T. conoclinium* ve *T. hygrophilum*'un kromozom sayısının $2n = 2x = 18$ olduğu tespit edilmiştir. Kromozom sayısının doğal ortamdaki bitkilerdeki kromozom sayısı ile benzer olduğu bulunmuştur. Aklimatizasyonu yapılan bitkilerin stoma uzunluğunun doğal ortamda büyüyen bitkilerin stoma uzunluğu ile aynı olduğu gözlenmiştir. *Ex vitro* koşullara aktarılan *T. conoclinium*'un hayatta kalma oranı %95, *T. hygrophilum*'un hayatta kalma oranı %98 olarak belirlenmiştir. Dış ortama aktarılan bitkiler ikinci yılında çiçeklenip aken oluşturmuştur. Elde edilen bu veriler koruma biyolojisine katkı sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Koruma biyolojisi, Mikroçoğaltım, Endemik, *Tripleurospermum conoclinium*, *Tripleurospermum hygrophilum*

PhD. Thesis

SUMMARY

MICROPROPAGATION AND CONSERVATION OF THREATENED ENDEMIC *TRIPLEUROSPERMUM CONOCLINIUM* AND *T. HYGROPHILUM* (ASTERACEAE) SPECIES

Tuğba ERGİN

Karadeniz Technical University

The Graduate School of Natural and Applied Sciences

Biology Graduate Program

Supervisor: Prof. Dr. Hüseyin İNCEER

2023, 119 Pages

In this thesis, *ex situ* conservation of the threatened endemic species *Tripleurospermum conoclinium* (Boiss. & Bal.) Hayek and *Tripleurospermum hygrophilum* (Bornm.) Bornm. was carried out by micropropagation. The stability tests of the micropropagated plants were performed by flow cytometry (FCM), chromosome counting and stomatal analysis. In micropropagation of *T. conoclinium* and *T. hygrophilum*, seedlings obtained from achenes germinated *in vitro* were used as explant source. MS supplemented with the combination of 6-benzylaminopurine (6-BA, 0,25, 0,5 and 1 mg L⁻¹), kinetin (KIN, 0,25, 0,5 and 1 mg L⁻¹), 6- y,dimethylallylamino)-purine (2iP, 0,25, 0,5 and 1 mg L⁻¹) with indole-3-butyric acid (IBA, 0,1 mg L⁻¹) and naphthaleneacetic acid (NAA, 0,1 mg L⁻¹) were used at shoot multiplication. The highest number of shoots per explant for *T. conoclinium* was obtained from plants in MS medium supplemented with 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA. For *T. hygrophilum*, the highest shoot number was obtained from plants in MS medium supplemented with 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA. MS medium supplemented with indole-3-butyric acid (IBA; 0,25, 0,5, and 1 mg L⁻¹) and naphthalene acetic acid (NAA; 0,25, 0,5 and 1 mg L⁻¹) was used for rooting. The highest number of roots per explant for *T. conoclinium* was obtained from plants in MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ NAA. For *T. hygrophilum*, the highest root number was obtained from plants in MS medium supplemented with 0,25 mg L⁻¹ NAA. Nuclear DNA of micropropagated plants did not change when compared to the nuclear DNA amounts in natural populations of these plants. It was determined that the chromosome number of *T. conoclinium* and *T. hygrophilum* reproduced *in vitro* was $2n = 2x = 18$. The chromosome number was found to be similar to the number of chromosomes in plants in the natural environment. It was observed that the stomatal length of the acclimatized plants was the same as the stomatal length of the plants growing in the natural environment. The survival rate of *T. conoclinium* transferred to *ex vitro* conditions was 95%, and the survival rate of *T. hygrophilum* was determined 98%. Plants transferred to the *ex vitro* flowered and formed achene in the second year. These data have contributed to conservation biology.

Key Words: Conservation biology, Micropropagation, Endemic, *Tripleurospermum conoclinium*, *Tripleurospermum hygrophilum*

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Koruma stratejileri	5
Şekil 2. Biyoçeşitliliğin korunması (Dhurvas, 2015).....	8
Şekil 3. Mikroçoğaltım aşamaları	10
Şekil 4. Mikroçoğaltım döngüsü.....	11
Şekil 5. İndol-3-butirik asit (IBA).....	17
Şekil 6. Naftalinasetik asit (NAA).....	18
Şekil 7. İndol-3-asetik asit (IAA).....	18
Şekil 8. 6-benzilamino purin (6-BA)	19
Şekil 9. 6-yy dimetilaminopurin (2iP)	19
Şekil 10. N-(2-furanilmetil)-lH-purin-6-amin (kinetin).....	19
Şekil 11. 6-(4-hidroksi-3-metil-trans-2-butenilamino)purin (zeatin)	20
Şekil 12. <i>Tripleurospermum conoclinium</i> kültür başlangıç aşaması. (a) <i>In vitro</i> aken çimlenmesi, (b) Yedinci gün. Ölçekler: 3 cm.....	36
Şekil 13. <i>Tripleurospermum conoclinium</i> kültür başlangıç aşaması. (a) Ondördüncü gün, (b) Otuzuncu gün. Ölçekler: 3 cm	37
Şekil 14. Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da sürgün sayısına etkisi.....	40
Şekil 15. Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da sürgün boyuna etkisi.....	40
Şekil 16. Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da yaprak sayısına etkisi.....	41
Şekil 17. Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da nod sayısına etkisi.....	41
Şekil 18. <i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da sürgün çoğaltımı. (a) Kontrol, (b) 0,25 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 0,25 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (d) 0,25 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 0,25 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 0,25 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (g) 0,25 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 3 cm	42
Şekil 19. <i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da sürgün çoğaltımı. (a) Kontrol, (b) 0,5 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 0,5 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (d) 0,5 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 0,5 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 0,5 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (g) 0,5 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 3 cm.....	43

Şekil 20.	<i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da sürgün çoğaltımı. (a) Kontrol, (b) 1 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 1 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (d) 1 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 1 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 1 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (g) 1 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 3 cm.....	44
Şekil 21.	<i>Tripleurospermum conoclinium</i> 0,5 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı	46
Şekil 22.	Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da kök sayısına etkisi.....	47
Şekil 23.	Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da kök boyuna etkisi.....	48
Şekil 24.	Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da sekonder kök sayısına etkisi	48
Şekil 25.	<i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da köklendirme. (a) Kontrol, (b) 0,25 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 0,25 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (d) 0,5 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 0,5 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (g) 1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 2 cm.....	49
Şekil 26.	<i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da mitotik metafaz (2n=18). (a) Kontrol, (b) 1 mg L ⁻¹ IBA, (c) 1 mg L ⁻¹ NAA, (d) 0,25 mg L ⁻¹ IBA. Ölçekler: 5 µm..	50
Şekil 27.	<i>Tripleurospermum conoclinium</i> vermikülit ortamı	51
Şekil 28.	<i>Tripleurospermum conoclinium</i> çiçeklenme evresi.....	52
Şekil 29.	<i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da aklimatizasyon aşamaları. (a) <i>Ex vitro</i> ortam yedinci gün, (b) <i>Ex vitro</i> ortam on dördüncü gün, (c) Botanik bahçesi, (d) Botanik bahçesi çiçeklenme başlangıcı, (e-f) Çiçeklenme evresi.	53
Şekil 30.	<i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'un <i>ex situ</i> koleksiyonlarından elde edilen akenleri. Ölçek: 2 mm.....	54
Şekil 31.	<i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'un akım sitometrik histogramı.....	54
Şekil 32.	<i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'un stoma görüntüleri. (a) Yaprak üst yüzeyinden yüzeysel kesit, (b) Yaprak alt yüzeyinden yüzeysel kesit. Ölçekler: 30 µm	55
Şekil 33.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da kültür başlangıç aşaması. (a) <i>In vitro</i> aken çimlenmesi, (b) Yedinci gün. Ölçekler: 3 cm	56
Şekil 34.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da kültür başlangıç aşaması. (a) Ondördüncü gün, (b) Otuzuncu gün. Ölçekler: 3 cm	57
Şekil 35.	Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da sürgün sayısına etkisi.....	61
Şekil 36.	Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da sürgün boyuna etkisi.....	61
Şekil 37.	Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da yaprak sayısına etkisi.....	62

Şekil 38.	Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da nod sayısına etkisi.....	62
Şekil 39.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'un sürgün çoğaltımı. (a) Kontrol, (b) 0,25 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 0,25 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (d) 0,25 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 0,25 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 0,25 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (g) 0,25 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 3 cm	63
Şekil 40.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'un sürgün çoğaltımı. (a) Kontrol, (b) 0,5 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 0,5 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (d) 0,5 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 0,5 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 0,5 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (g) 0,5 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 3 cm	64
Şekil 41.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'un sürgün çoğaltımı. (a) Kontrol, (b) 1 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 1 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (d) 1 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 1 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 1 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (g) 1 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 3 cm	65
Şekil 42.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 0,5 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı	67
Şekil 43.	Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da kök sayısına etkisi.....	68
Şekil 44.	Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da kök boyuna etkisi.....	69
Şekil 45.	Bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da sekonder kök sayısına etkisi	69
Şekil 46.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da köklendirme. (a) Kontrol, (b) 0,25 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 0,25 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (d) 0,5 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 0,5 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 1 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (g) 1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 2 cm.....	70
Şekil 47.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da mitotik metafaz (2n=18). (a) Kontrol, (b) 0,25 mg L ⁻¹ IBA, (c) 0,25 mg L ⁻¹ NAA, (d) 1 mg L ⁻¹ IBA. Ölçekler: 5 µm.....	71
Şekil 48.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> vermikülit ortamı.....	72
Şekil 49.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> çiçeklenme evresi	73
Şekil 50.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da aklimatizasyon aşamaları. (a) <i>Ex vitro</i> ortam yedinci gün, (b) <i>Ex vitro</i> ortam on dördüncü gün, (c) Botanik bahçesi, (d) Botanik bahçesi çiçeklenme başlangıcı, (e-f) Çiçeklenme evresi. 74	
Şekil 51.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'un <i>ex situ</i> koleksiyonlarından elde edilen akenleri. Ölçekler: 2 mm	75

Şekil 52.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'un akım sitometrik histogramı	75
Şekil 53.	<i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'un stoma görüntüleri. (a) Yaprak üst yüzeyinden yüzeysel kesit, (b) Yaprak alt yüzeyinden yüzeysel kesit. Ölçekler: 30 µm	76



TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. İncelenen <i>Tripleurospermum</i> türlerinin lokalite ve koleksiyon bilgileri.....	30
Tablo 2. Murashige ve Skoog (MS) besiyeri içeriği.....	31
Tablo 3. <i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün çoğaltımına etkisi.....	39
Tablo 4. <i>Tripleurospermum conoclinium</i> 'da bitki büyüme düzenleyicilerinin köklenmeye etkisi	47
Tablo 5. <i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün çoğaltımına etkisi.....	60
Tablo 6. <i>Tripleurospermum hygrophilum</i> 'da bitki büyüme düzenleyicilerinin köklenmeye etkisi	68

SEMBOLLER DİZİNİ

ANOVA	: Varyans Analizi
Atm	: Atmosfer
C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FISH	: Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
GISH	: Genomic <i>In Situ</i> Hybridization
gr	: Gram
HCL	: Hidroklorik Asit
IBA	: Indol-3-Bütirik Asit
KIN	: Kinetin
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar

MS	: Murashige ve Skoog (1962)
NAA	: Naftalenasetik asit
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PVP	: Polivinilpirolidon
sn	: Saniye
μM	: Mikromol
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece
μl	: Mikrolitre
2iP	: 6-(y,ydimethylallylamino)-purine
6-BA	: 6-Benzylaminopurine

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Dünya üzerindeki tüm yaşam formları birbirleri ile dinamik bir ilişki içerisinde biyolojik çeşitliliği oluşturur. İnsanoğlu sürdürülebilir bir çevre için biyoçeşitliliği korumak zorundadır. Canlı türlerinin yaşadığı habitatların bozulması, aşırı tüketim, fiziksel ortamın (toprak-su-hava) kirlenmesi, küresel seviyede iklimsel değişimler, endüstriyel tarım ve diğer antropojenik aktiviteler yeryüzündeki biyoçeşitliliği azaltıp türlerin yok olmasına veya nesillerinin tehlike altına girmesine sebep olmaktadır. Doğrudan ya da dolaylı olarak tehlike altına giren biyolojik çeşitliliğin korunması, doğanın korunması anlamına gelmektedir (Ansari vd., 2016; Arora, 2018).

Türlerin küresel koruma statüsüne ilişkin en önemli bilgi kaynağı, IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources/Uluslararası Doğa Koruma Birliği) Kırmızı Listesi'dir (Coelho vd., 2020). Son yıllarda insan faaliyetleri sebebiyle türlerin yok olma oranları önemli ölçüde arttığından dolayı, tür odaklı koruma çalışmaları da artmıştır. Tür kayıplarına ilişkin bilgiler, IUCN Kırmızı Liste Programı tarafından yapılan ülke değerlendirmelerinden ve bunların küresel olarak değerlendirilerek sentezlenmesinden oluşmaktadır (Heywood ve Iriondo, 2003). Son değerlendirmelere göre var olan 422.683 bitki türü içerisinde, tanımlanan 38.630 türden 15.774'ü tehdit altındadır (Coelho vd., 2020).

Bir ülkenin maden zenginliğine eşdeğer olan bitki çeşitliliği, somut ve ekonomik bir kaynak olarak giderek daha fazla tanınmaktadır ve bitki genetik kaynakları olarak adlandırılmaktadır. Bu çeşitlilik, insanlık için ekonomik değeri olan sınırlı bir dünya kaynağıdır ve sürdürülemez uygulamalar yüzünden azaltılıp yok edilmektedir (Hawkes vd., 2000). Oysaki bitkiler; atmosfer yapısı, besin döngüsü ve diğer ekosistem süreçlerinin korunması için çok önemlidir. Ayrıca sayısız organizma için yaşam alanı ve besin sağlamaktadır (Hawsworth ve Bull, 2007). Habitatların bozulması, aşırı tüketim, fiziksel ortamın (toprak-su-hava) kirlenmesi, küresel seviyede iklim değişiklikleri, endüstriyel tarım faaliyetleri ve diğer antropojenik aktiviteler yeryüzündeki bitki çeşitliliğini azaltıp türlerin yok olmasına veya nesillerinin tehlike altına girmesine sebep olmaktadır (Pathak ve Abido, 2014).

Türkiye, zengin bitki çeşitliliği ile Avrupa ve Ortadoğu'daki çoğu ülkeden ayrılmaktadır. Bitki çeşitliliği açısından kıta ülkeleri arasında dokuzuncu sırada yer almaktadır (Ekim vd., 2000; Avcı, 2005). Türkiye florasının yaklaşık üçte biri ise endemik bitkilerden oluşur (Avcı, 2005). Ancak nüfus artışı ile birlikte, bitki çeşitliliğine yönelik tehditler artmaya başlamıştır. Son yıllarda otlatma, tarımda aşırı gübre ve kimyasal kullanımı gibi tarımsal faaliyetler başta olmak üzere sanayileşme, kentleşme turizm faaliyetleri gibi antropojenik baskılardan dolayı bitki çeşitliliği, yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır. Ülkemizdeki bitki biyoçeşitliliğine yönelik bu ve benzeri baskılar sonucunda endemik bitki türlerinin önemli bir kısmı tehlike altındadır (Ekim vd., 2000; Karagöz, 2003).

Endemik türler, sınırlı bir dağılıma ve çok yüksek habitat özgüllüğüne sahip olduğundan dolayı, bunların nasıl korunması gerektiği önemli sorulardan biridir. Endemik türlerin doğal sebeplerle yok olma olasılıkları yüksektir. Bununla birlikte iklim değişikliği gibi doğal bir fenomenin bile artık insan müdahalesinden bağımsız olmayışı, doğal ve insan kaynaklı yok olma arasındaki sınırları çok daha belirsiz hale getirmiştir (Brigham ve Schwartz, 2003). Endemik bitki türleri genellikle antropojenik tehditlere ve doğal değişikliklere karşı daha savunmasızdır bu nedenle, daha yüksek bir yok olma riski taşırlar. Bu türlerin korunması dünya genelinde büyük bir endişe kaynağıdır. Dolayısıyla korunmalarını desteklemek için koruma önlemleri alınmalıdır (Coelho vd., 2020). Bu kapsamda tehlike altındaki türleri korumaya yönelik *in situ* (habitatı içerisinde) (Gómez ve Herranz, 1993; Laguna, 2001; Betz vd., 2013; Kadis vd., 2013) ve *ex situ* (habitatı dışında) (Brusa vd., 2007; Valletta vd., 2015; Grigoriadou vd., 2020) koruma çalışmaları son yıllarda artmaya başlamıştır.

Koruma biyolojisi, son yıllarda artan tür ve habitat kayıpları ile yok olma krizlerine bir cevap olarak, modern biyolojinin temel hedeflerinden biri haline gelmiştir. Koruma biyolojisi; genetiği, evrimsel biyolojiyi, ekolojiyi ve sistematiki de içine alan uygulamalı bir alandır (Meine vd., 2006). Koruma biyolojisinde kullanılan yöntemlerden *in situ* ve *ex situ* yöntemlerin temel amacı, seçilen türün genetik çeşitliliğini devam ettirmektir. *In situ* ve *ex situ* koruma çalışmaları temel olarak bilinen koruma stratejilerindendir (Şekil 1). *In situ* koruma; hedef türlerin ekosistemi ve habitatı ile birlikte korunmasını, onların yaşamlarını sürdürmelerini hedefler. *Ex situ* koruma ise hedef türün doğal habitatının dışında korunmasını hedefler. Türlerin korunması habitatlara bağlıdır, fakat habitatların kalıcı ve sürdürülebilirliğinin garantisi yoktur. Bundan dolayı *ex situ* koruma çalışmaları,

nesli tehdit altındaki birçok tür için kaçınılmazdır (Pathak ve Abido, 2014). *Ex situ* koruma çalışmalarında ise biyoteknolojik yöntemlerden olan mikroçoğaltım tekniği, oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu yöntemle, birçok endemik ve\veya nesli tehlike altındaki türlerin hızlı bir şekilde korunmasının yanı sıra, yabani populasyonların bitki üzerindeki etkisinin minimum seviyede olduğu bitki materyalleri elde edilmektedir (Valletta vd., 2015).

Asteraceae familyası, yaklaşık 1600-1700 cins ve 25000-35000 tür ile temsil edilen, çiçekli bitkilerin en büyük familyalarından biridir (Funk vd., 2009; Mandel vd., 2019). Bu familya ülkemizde 137 cins ve 1209 tür ihtiva etmekte olup, tür sayısı açısından birinci sırada bulunmaktadır. Bu türlerden 447'si endemik, endemizm oranı ise %37'dir ve ülkemizin endemik tür bakımından da en zengin familyasıdır (Davis vd., 1988; Özhatay ve Kültür, 2006). Bu familya; süs bitkisi ve sebze olarak kullanılan bitkiler içermesinin yanı sıra, etken maddeler ve uçucu yağlar nedeniyle tıbbi kullanımı olan, taşıdıkları inulin ve sabit yağlardan dolayı gıda olarak kullanılan, kauçuk nedeniyle de sanayi ve ekonomik değere sahip olan bir familyadır (Baytop, 1991). Endemizm oranının yüksek olduğu bu familyadaki endemik taksonlarla yapılan *ex situ* korumaya yönelik *in vitro* çoğaltım çalışmaları son yıllarda artmaya başlamıştır. (Kodja vd., 1998; Pevallek-Kozlina, 1998; Izquierdo, 2006; Souza vd., 2007; Corral vd., 2011; Gorgorov vd., 2011; Chang vd., 2012; Rogova vd., 2015; Angela vd., 2016; Bohórquez-Quintero vd., 2016; Valletta vd., 2015; Yordanova vd., 2017; Panwar vd., 2020; Grigoriadou vd., 2020; Panwar ve Joshi, 2020) Ülkemizde ise *ex situ* korumaya yönelik *in vitro* çoğaltım çalışmaları oldukça sınırlıdır (Erdağ ve Emek, 2009; Kurt ve Erdağ, 2009; Okay ve Demir, 2010; Yüzbaşıoğlu vd., 2012; Emek ve Erdağ, 2013; Okay vd., 2014; Özel, 2016; Sevindik vd., 2019; Cüce vd., 2022; İnceer vd., 2022).

Asteraceae familyasının Anthemideae tribusunda yer alan *Tripleurospermum* Sch. Bip. cinsi, yaklaşık 40 tür içerir (Oberprieler vd., 2007). Bu cinsin ülkemizde 33 türü bulunmaktadır ve bunların 17'si endemiktir (İnceer vd., 2012; Tekşen vd. 2022). Endemizm oranının kayda değer şekilde yüksek olduğu bu cinsteki türlerin birçoğu, antropojenik faktörler sebebiyle yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır (Ekim vd., 2000). Anadolu'da *Tripleurospermum* türleri halk arasında "Akpapatya" olarak bilinir (İnceer, 2012) ve antiinflamatuvar, antiseptik, antifungal, antibakteriyel, antiülser ve antioksidan gibi birçok yararlı tıbbi özelliğe sahiptirler (Cavar Zeljkovic vd., 2015).

Tripleurospermum conoclinium (Boiss. & Bal.) Hayek ve *Tripleurospermum hygrophilum* (Bornm.) Bornm. ülkemiz için endemik olan türlerdir. Bu türler aynı zamanda güncel IUCN Kırmızı Liste Kategorileri ve Ölçütlerine göre nesli tehlike altında olan *Tripleurospermum* türleri arasında yer alırlar (IUCN 2022). Diğer yandan, bu cinste yer alan türlerle ilgili *ex situ* korumaya yönelik çalışmalar ise sadece *T. fissurale* (Sosn.) E. Hossain ve *T. insularum* Inceer & Hayırlıoğlu-Ayaz türlerinin *in vitro* çoğaltımı ile sınırlıdır (Cüce vd., 2022; İnceer vd., 2022). Dolayısıyla, gerek *T. conoclinium* gerekse *T. hygrophilum* türlerini korumaya yönelik şu ana kadar herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu tez çalışmasında, endemik *T. conoclinium* ve *T. hygrophilum* türlerinin mikroçoğaltım ile *ex situ* korunması amaçlanmıştır.

1.2. Koruma Biyolojisi

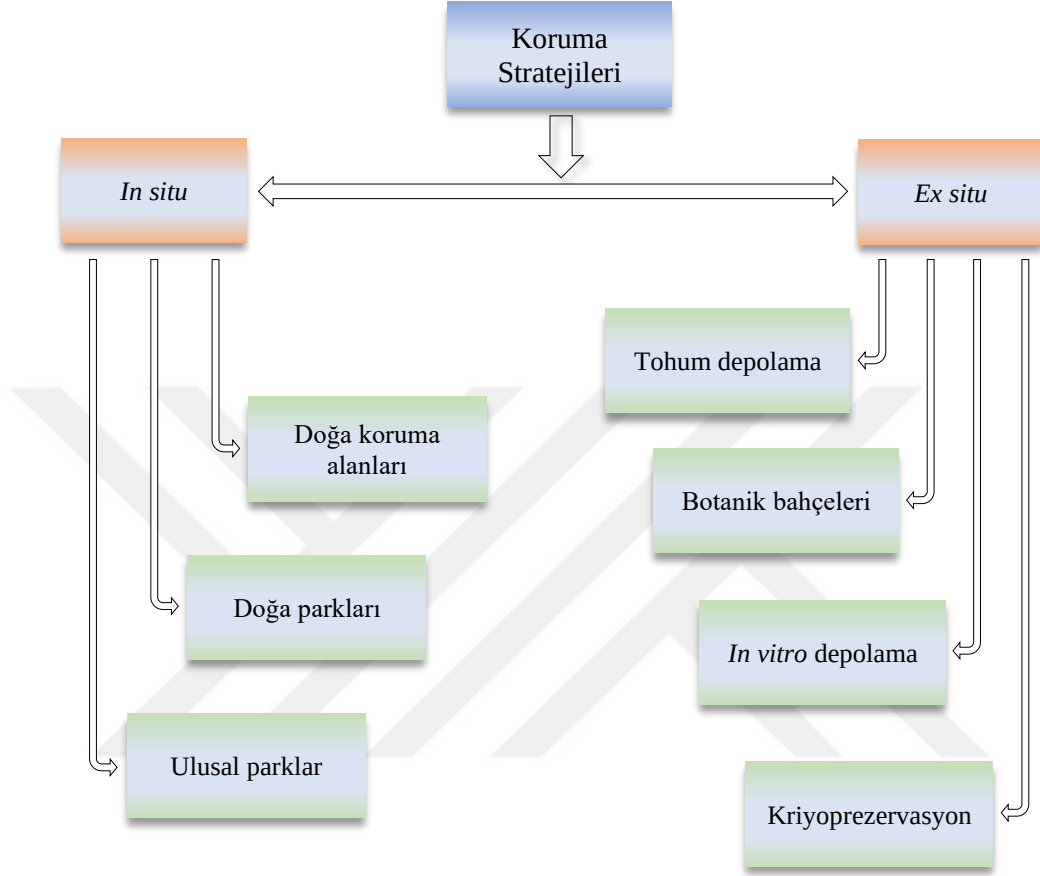
Bitkilerin korunması konsepti, tarihsel olarak tıbbi bitkilerin kullanımı ve korunması ile ilişkilendirilmiştir. Tarihsel kayıtlar, eski Yunanlıların, Perslerin, Çinlilerin, Asurluların ve Mısırlıların tıbbi amaçlarla, belirli bitkileri kullandıklarını göstermektedir. Bu kültürler yakın bölgelerinde yetişen bitkileri kullanan yerel bitki toplayıcılarıydı. Zamanla bu toplulukların bitkilerle olan ilişkileri, bitkilerin bir alandaki yerinin kullanılabilecekleri ikinci bir alana *ex situ* transferini içerecek şekilde daha kompleks ve planlı bir hale gelmiştir (Maxted vd., 2020).

Bu iki stratejinin uygulanmasında bariz bir temel fark vardır: *in situ* koruma, hedef türlerin bulundukları yerde belirlenmesini, yönetimini ve izlenmesini içerirken, *ex situ* koruma, hedef türlerin hedef bölgeden örneklenmesini, nakledilmesini ve depolanmasını içerir (Maxted vd., 2020).

In situ ve *ex situ* koruma, genetik kaynakları korumada birbirini tamamlayan yöntemlerdir (Şekil 1 ve 2). Doğa koruma alanları, doğa parkları, ulusal parklar ve biyogenetik rezervleri *in situ* koruma alanlarına örnek olarak verilebilir (Pathak ve Abido, 2014).

Ex situ korumaya ise tohum bahçeleri, klon bankaları, botanik bahçeleri, arboretumlar, tohum ve polen bankaları ve embriyo dokularının soğuk saklanması (kriyoprezervasyon) örnek olarak verilebilir (Pathak ve Abido, 2014). Entegre bir koruma programının parçası olarak *ex situ* koruma, genişleyen krize pragmatik bir yanıttır (Raven,

2004). *Ex situ* korumaya yönelik küresel yatırımların çoğu, genetik kaynakların korunmasına yöneliktir. Başlıca *ex situ* teknikler (Şekil 1).



Şekil 1. Koruma stratejileri

1.2.1. Tohum Depolama

Bitki germplazmını korumanın en uygun yollarından biri tohumları depolamaktır. Tohumlar düşük nem ve sıcaklık koşullarında saklanır. Bu teknik, çoğu bitki türünün ortodoks tohumları için rutin olarak kullanılır. Geleneksel tohumlar için etkili bir depolama tekniğidir ve birçok genotipin uzun süre boyunca depolanmasına izin verir. Tesisler masaüstünden (tohumlar silika jel üzerinde hava geçirmez koşullarda saklanır) donduruculara ve gömme tohum kasalarına sahip büyük ölçekli gen bankalarına kadar değişebilir (Hawkes vd., 2000; Raven, 2004).

1.2.2. Botanik Bahçeleri

Botanik bahçeleri ve arboretumlar, eğitim, ekonomik kullanım ve bilimsel araştırma için düzenlenen canlı bitki koleksiyonlarıdır. Genellikle botanik bahçeleri, dünyanın belirli egzotik bir bölgesinden veya bir bölgenin kendi doğal florasından türler içeren belirli bir florada uzmanlaşmıştır. Londra Kew'deki Royal Botanic Garden, ve A.B.D.'deki Missouri Botanical Garden tür çeşitliliğinin yüksek olduğu en bilinen botanik bahçelerindendir. İlk botanik bahçeleri hekimlerin tıbbi maddeler üretme amacıyla kullandıkları bahçeler olarak bilinsede son yıllarda, çevre ve koruma konularında artan farkındalıkla birlikte, botanik bahçelerinde tehdit altındaki yabani türlerin korunmasına yönelik bir hareket oluşmuştur. Botanik bahçeleri bünyesinde nadir ve endemik bitkilerin korunması için çalışmalar yapılmaktadır (Hawkes vd., 2000).

1.2.3. *In vitro* Depolama

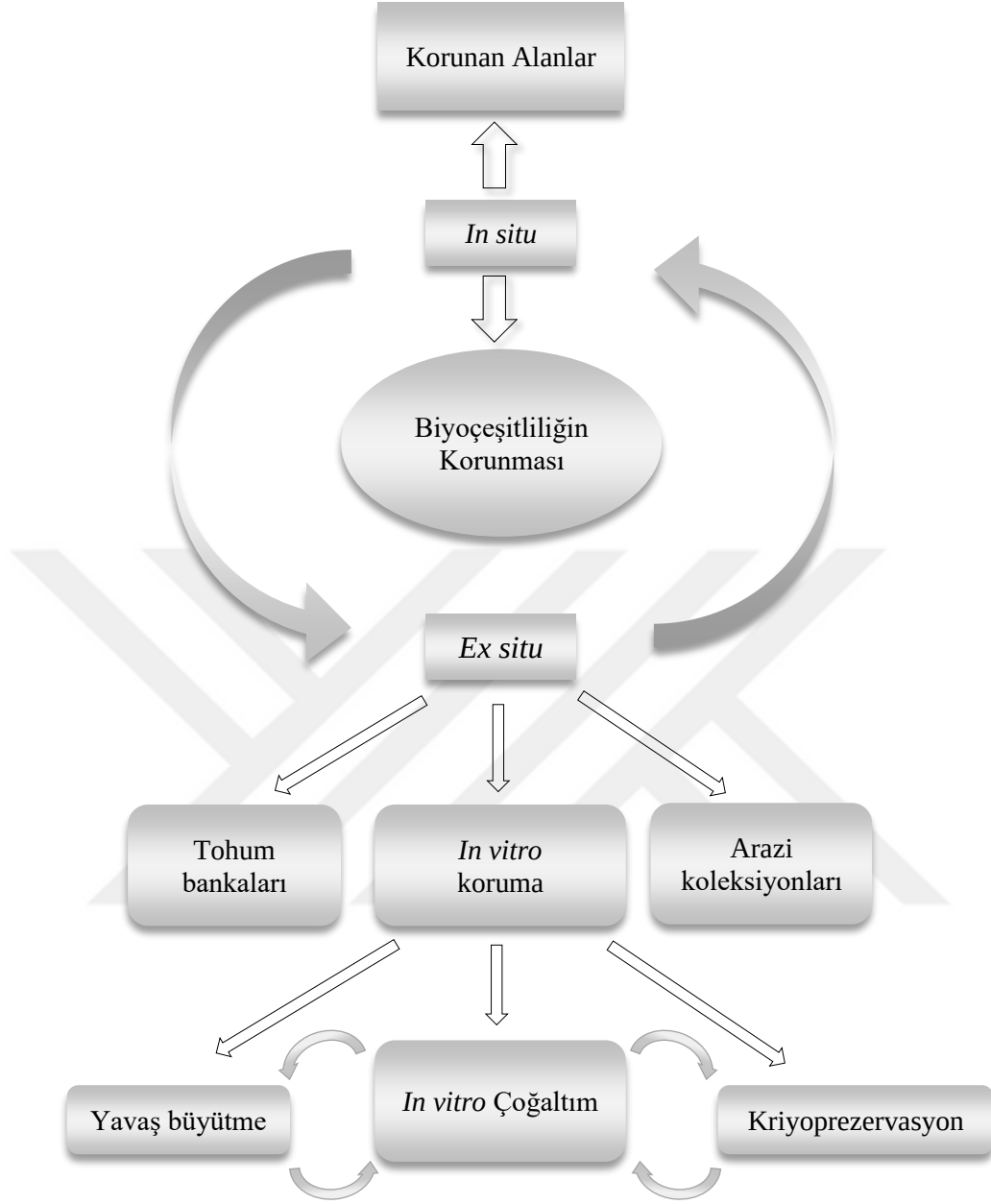
Germplazmın laboratuvar koşullarında (*in vitro*) saklanması, ve çoğaltımı yapılan türlerin uzun süreli korunması için özellikle uygundur (Laliberte, 1997). Doku örneklerinin steril, patojen içermeyen bir ortamda toplanmasıdır. Somatik dokular, sıcaklık ve ışık kontrollü ortamda, yavaş büyüme koşulları altında *in vitro* olarak depolanır. Bu teknik, malzemenin kısa sürelerde korunması için etkilidir, ancak eğitimli teknisyenlere ve laboratuvar malzemelerine erişim gerektirir (Raven, 2004).

1.2.4. Kriyoprezervasyon

Bu yöntemle tohumlar, polenler veya dokular sıvı nitrojende donmuş halde saklanır. Bu teknik, tarım ve bahçe bitkilerinin uzun süreli depolanması için ve giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Malzemenin uzun süre korunmasında etkilidir, ancak önemli bir başlangıç sermayesi yatırımı ve eğitimli teknisyenlere ve sıvı nitrojen kaynaklarına erişim gerektirir. Tropikal türler için teknikler geliştirildikçe, kriyoprezervasyonun daha kullanışlı hale gelmesi beklenmektedir; zamanla saha gen bankalarına olan ihtiyacı azaltacağı düşünülmektedir (Raven, 2004).

Özellikle son yıllarda biyoteknolojik yöntemler *ex situ* koruma çalışmalarına büyük katkı sağlamıştır. *In vitro* çoğaltım için kullanılan bu biyoteknolojik yöntemlerin amacı geleneksel koruma yöntemlerinin yerini almak değil, mevcut yöntemleri tamamlamak ve geliştirmektir. Bitki koruma biyoteknolojisi, sadece bitki genetik kaynaklarının korunmasını değil, aynı zamanda yönetimi, karakterizasyonu ve uygulamasını da içerir. Özellikle kültür koleksiyonlarındaki bitki genetik kaynaklarının doku kültürü teknolojileri kullanılarak çoğaltımı; bitki materyalinin değerlendirilmesi, kullanılması ve güvenli alışverişi için kolay erişim sağlar (Coelho vd., 2020).

In vitro çoğaltım, çok sayıda bitkinin kısa sürede ve sınırlı bir alanda geri kazanılmasına izin verdiği ve çoğaltım materyalinin taşınmasını kolaylaştırdığı için geleneksel çoğaltım yöntemlerine etkili bir alternatif olarak kabul edilir. Bu metot, geleneksel tekniklerle çoğaltılması zor olan nesli tehlike altındaki nadir ve endemik türlerin çoğaltımında oldukça yararlıdır. Bu tekniğin diğer bir avantajı, ana bitkiden alınan küçük miktarlarda başlangıç bitki materyalinin çoğaltım için yeterli olmasıdır. Koruma programlarında kullanılabilmesi için etkili çoğaltım protokollerinin oluşturulması önemlidir. *In vitro* çoğaltım teknikleri, nesli tehlike altında olan bitkilerin genetik materyalinin kısa vadede korunmasına olanak sağlar. Bu durum, bitkilerin doğrudan çoğaltılması için temel bir adım olmasının yanında, orta ve uzun vadeli koruma uygulamaları için de temel bir adımdır (Coelho vd., 2020).



Şekil 2. Biyoçeşitliliğin korunması (Dhurvas, 2015)

1.3. Doku Kültürü

Etkili biyoteknolojik yöntemler üzerine bir asırdan uzun süredir devam eden araştırmalar sürse de *in vitro* çoğaltım, genetik doğruluğunu koruyan ve zararlılardan arınmış birçok önemli bitki türünün büyük ölçekli üretimi için önemli bir araç olmaya devam etmektedir (Cardoso vd., 2018). Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni

doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir. Bitki doku kültürü ilk olarak 1902’ de Gottlieb Haberlandt tarafından Alman akademisinde yaptığı konuşma sırasında öne sürüldü. Haberlandt doku kültürünün temelini teşkil eden Totipotensi kavramını ilk kez ortaya atan kişidir bu yüzden doku kültürünün fikir babası olarak kabul edilir. Bu tarihten sonra doku kültüründe özellikle 1960’lı yıllara kadar ilk kök kültürünün yapılması, ilk kallus kültürünün yapılması, ilk sitokinin tanımlanması gibi bir dizi yeni gelişme yaşanmıştır. Murashige ve Skoog’un MS besiyerini geliştirmesiyle doku kültüründeki gelişmeler hızlanmıştır. Bu alandaki gelişmeler 1960’ların başlarında yoğun olarak gerçekleşmiş olup bugün ise modern biyoteknoloji için standart prosedürler haline gelmiştir. Bugün *in vitro* kültürler temel olarak beş alanda kullanılır;

İstenilen özelliklerdeki bitki materyalinin geniş çapta üretiminde

Genetiği değiştirilmiş fertil bireylerin üretiminde

Temel bitki fizyolojisi için model sistemler oluşturulmasında

Tehlike altındaki türlerin korunmasında

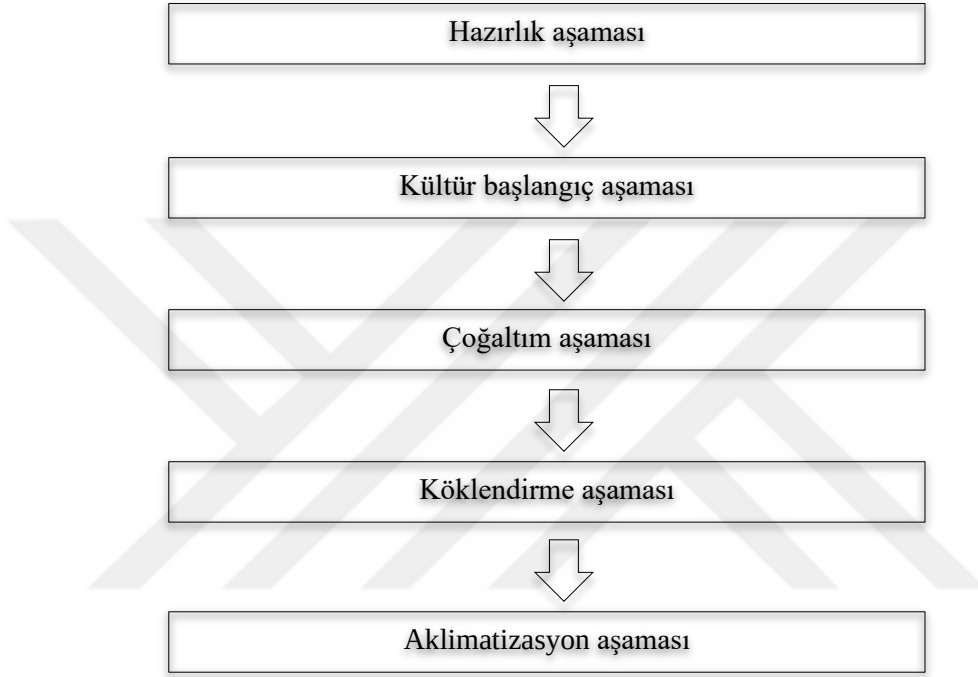
Sekonder metabolitlerin üretiminde

(Babaoğlu vd., 2001; Loyola vd., 2006)

Klasik biyoteknolojik bir yöntem olan *in vitro* çoğaltımın birçok avantajı vardır. Bir ay gibi kısa bir süre içinde binlerce bitkinin üretilbildiği hızlı bir çoğaltma yöntemidir; çoğaltma döngüsü sırasında bitki doku sterilizasyonu ve steril kültür işlemleri sonucunda sağlıklı bitki materyalinin sağlandığı, yabancı ot temizleme gerektirmeyen, daha az su kullanılan, daha küçük bir alan gerektiren ve pestisit içermeyen bir ortam kullanılarak maliyetten tasarruf edilerek yapılan ekonomik bir çoğaltma yöntemidir. Ayrıca başlangıç materyali olarak sadece küçük bir bitki dokusuna ihtiyaç duyulan (nesli tükenmekte olan bitki türleri için çok önemlidir) verimli ve uygun bir çoğaltma yöntemidir (Liao vd., 2006).

1.4. Mikroçoğaltım Aşamaları

Mikroçoğaltım 1974’de Murashige tarafından üç temel aşama olarak belirlenmiştir son yıllarda ise bu aşamalara çalışmanın amacına yönelik olarak aklimatizasyon aşaması gibi aşamalarda eklenmiştir (Şekil 3, 4).



Şekil 3. Mikroçoğaltım aşamaları



Şekil 4. Mikroçoğaltım döngüsü

1.4.1. Hazırlık Aşaması

Explant kaynağı olarak kullanılacak bitkilerin çoğaltımı yapılmak istenen bitki ile aynı özellikleri taşımasına dikkat edilmelidir (Kenneth, 1989). Mevsimsel faktörlerin mikroçoğaltımın başarısını etkileyeceği göz önünde bulundurularak eksplant kaynağı olacak bitkiler uygun mevsimde toplanmalıdır. Hedef bitkileri toplarken kalan popülasyonu tehlikeye atmadan toplanması, doğru şekilde teşhis edilmesi gerekmektedir. Kaynak materyalin taşınmasının zor olduğu veya taşıma sırasında canlılık kaybına yol açacağı durumlarda *in vitro* koleksiyonlar bu zorlukların üstesinden gelmek için kullanılır (Benson, 1999; George vd., 2008).

1.4.2. Kültür Başlangıç Aşaması

Doku kültürleri bitki kısımlarından başlatılır. Bitkilerden alınan küçük organ veya doku kısımlarına eksplant denir. Mikroçoğaltımın başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biri eksplant seçimidir. Başlatılacak kültürün tipine, kültürün amacına, çoğaltılacak türe göre eksplant seçimi de değişiklik gösterir (Cassells, 1997). Bu yüzden eksplant seçimine önem verilmeli amaca yönelik eksplant seçilmeli ayrıca herhangi bir hastalık belirtisi göstermeyen sağlıklı bitkiler kullanılmalıdır. Hemen hemen her bitki dokusu (kök, yaprak, çiçek, nod, meristematik dokular vb.) eksplant olarak kullanılabilir fakat elde edilecek başarı kültür sistemine, kullanılan türe ve kontaminantlardan arındırılmaya bağlı olarak değişir (Kenneth, 1989).

Bitki yüzeyleri birçok mikroorganizma türüne ev sahipliği yapar. Kullanılan eksplanta bağlı olarak içsel ve dışsal mikroorganizmalar *in vitro* kültürlerle taşınabilirler (Benson, 1999). Eksplantların kültür öncesi dezenfeksiyonu, bakteri mantar gibi kontaminantların bitkiden uzaklaştırılması için elzemdir. Yüzey sterilizasyonu bitkiye zarar vermeyecek hassaslıkta aynı zamanda kontaminantları uzaklaştıracak kadar da etkili olmalıdır (Iliev vd., 2010.) Sterilizasyon işlemleri eksplant tipine ve bitki türüne bağlıdır (Benson, 1999). Eksplantın akan musluk suyu altında 30 dakika ila 2 saat süreyle yıkanması, tüylü dokulardan depo organlarına kadar kullanılacak eksplantlar üzerindeki kontaminasyon miktarını büyük ölçüde azaltır (Kenneth, 1989). Tohumlar direk sterilazasyon ajanları ile muameleye diğer eksplant kaynaklarına göre daha dayanıklıdır

(Benson, 1999). Yıkandıktan sonra, eksplant dokusu, yüzeyde bulunan kirleticileri öldürmek için antiseptik bir solüsyona daldırılır. Çamaşır suyu (%0,5-5,25 sodyum hipoklorit), bitki doku kültüründe en yaygın kullanılan sterilantlardan biridir. Etanol, kalsiyum hipoklorit, hidrojen peroksit, gümüş nitrat, metil bromür ve cıva klorür kullanılan diğer dezenfektanlar arasında bulunur. Polioksietilen sorbitan monolaurat (Tween-20) gibi bir deterjanın sterilanta eklenmesi, su ile bitki dokusu arasındaki yüzey gerilimini kırarak dezenfektanın etkinliğini artırabilir. En etkili sterilizasyon prosedürünü elde etmek için çeşitli sterilantlar tek başına veya sırayla kullanılabilir (Kenneth, 1989).

1.4.2.1. Besiyeri İçeriği

Bu aşamadaki en önemli hususlardan bir diğeri de çoğaltımın amacına yönelik olarak uygun besiyeri ortamını belirlemektir. Besiyeri ortamı bitki doku ve organlarının büyümeleri için gerekli besinleri sağlayan yapay bir ortamdır. Besiyeri ortamı makro elementler, mikro elementler, vitaminler, diğer organik bileşenler (aminoasit vb.), bitki büyüme düzenleyicileri, katılaştırıcı ajanlar (sıvı besiyeri değilse) ve şükroz içerir. Kültür ortamının bileşimi bitki türlerine, eksplantlara ve deneyin amacına bağlı olarak değişir. Çoğu bitki için belirli standart ortamlar kullanılır ancak türe özgü optimizasyonların gerekebileceği durumlarda büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları değiştirilerek veya kültür ortamına belirli bileşenlerin eklenmesiyle kültür ortamının içeriğinde değişiklikler yapılabilir (Iliev vd., 2010). Farklı formülasyonlardan oluşan birçok besiyeri ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri bulunmaktadır. Bunlardan MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı en yaygın şekilde kullanılanlardandır. MS ortamından sonra en çok kullanılan besiyeri ortamları B5 ortamı (Gamborg vd., 1968), Woody Plant ortamı (WPM; Lloyd ve McCown, 1980), Driver ve Kuniyuki Woody Plant ortamı (DKW, Driver ve Kuniyuki, 1984), Anderson ortamı (AN; Anderson, 1984)'dır.

MS ortamı, hem dikotlar hem de monokotlar için yaygın olarak kullanılır. Hem nitrat hem de amonyum formlarında yüksek nitrojen seviyesinden dolayı, nispeten yüksek amonyum nitrat oranı nedeniyle iyi bir bitki rejenerasyon ortamı sağlar. Bununla birlikte, bazen MS ortamı, yüksek seviyelerde amonyum iyonları içerdiğinden, optimum büyüme için en iyi ortam değildir. Buna karşılık, bazı bitki türleri için B5 ortamı amonyum açısından çok düşük olabilir. Odunsu bitkiler için genellikle daha az miktarda makro besin

tuzları içeren ortamlar kullanılır, bu nedenle ½-MS, MMS (Modifiye MS) ve WPM odunsu bitkiler için yaygın olarak kullanılmaktadır. DKW besiyeri ortamı ise MS'e benzer şekilde daha yüksek bir amonyum:nitrat oranına sahiptir, ancak MS'den daha az nitrojen içerir ve farklı tuz kaynakları kullanır, bu da sülfat konsantrasyonunda diğer ortamlara nazaran bir artışa neden olur. *In vitro* çoğaltımı yapılacak türe göre farklı besiyerleri kullanılsa da hala otsu bitkiler için en yaygın olarak MS besiyeri kullanılmaktadır (Phillips ve Garda, 2019).

1.4.2.2. Makro ve Mikro Elementler

Doğada toprak, bitkileri besler ve büyümeleri ve gelişmeleri için temel besinleri sağlar. Karbon, hidrojen ve oksijenin yanı sıra bitkiler, [azot (N), potasyum (K), kalsiyum (Ca), fosfor (P), magnezyum (Mg) ve kükürt (S)] olarak adlandırılan makro elementler ve [demir (Fe), nikel (Ni), klor (Cl), manganez (Mn), çinko (Zn), bor (B), bakır (Cu) ve molibden (Mo)] olarak bilinen mikro elementlere ihtiyaç duyar. Bu nedenle bu elementler çoğu besiyeri ortamının vazgeçilmez temel parçalarıdır.

1.4.2.3. Karbohidrat Kaynağı

Kültüre alınan bitki hücreleri yeterli miktarda fotosentez yapamadıkları için enerji kaynağı olarak çeşitli karbohidratlar kullanılır. Karbohidratlar *in vitro* kültürlerde enerji ve karbon kaynağıdır aynı zamanda ozmotik bir role sahip oldukları bilinir (George vd., 2008). Besiyeri ortamlarında kullanılan en uygun karbohidrat sükrozdur. Bazı durumlarda sükroz yerine früktozda kullanılabilse de etkisi sükroza göre düşüktür. Laktoz, galaktoz, rafinoz, maltoz gibi diğer karbohidratlarda denenmiş olup hiçbiri sükroz kadar etkili bulunmamıştır (Kenneth, 1989).

1.4.2.4. Vitaminler

Vitaminler bitkilerde çeşitli metabolik süreçlerde katalizör olarak gereklidir. Bitkiler *in vitro* koşullarda büyütüldüklerinde bazı vitaminlerin yokluğu büyümeyi olumsuz etkileyebilmektedir. Besiyeri ortamlarında en sık kullanılan vitaminler arasında tiamin (B1), nikotinik asit, piridoksin (B6) ve miyo-inositol bulunur. Tiamin temel olarak tüm

hücrelerin büyüme için ihtiyaç duyduğu bir vitamindir. Nikotinik asit ve piridoksin de rutin olarak kültür ortamlarına eklenir ancak birçok türde hücre büyümesi için gerekli değildir. Myo-inositol'un varlığı kültür ortamlarında gerekli olmasa da küçük miktarlarda eklenmesi çoğu bitki türünde büyüme için uyardığı bilinmektedir (Kenneth, 1989). Diğer vitaminler arasında ise d pantotenik asit (B5), askorbik asit (C), a-tokoferol (E), folik asit (M), retinol (A), riboflavin (B2) ve kolekalsiferol (D3) zaman zaman özel uygulamalarda besin ortamlarına ilave edilmektedir fakat büyümeye etkileri belirgin değildir (Babaoğlu vd., 2001).

1.4.2.5. Aminoasitler

Çoğu doku kültürü için eğer ortamda yeterli miktarda ve doğru oranlarda nitrat ve amonyum iyonları varsa, aminoasitlerin eklenmesi gereksiz olabilir. Aminoasitler, kültürlerin indirgenmiş azot ihtiyacını karşılamak için bitki ortamına eklenebilir, ancak pahalı olduklarından yalnızca iyi sonuç vereceğinden emin olunan ticari üretimlerde kullanılabilir (George vd., 2008). Bu azotlu bileşikler tüm kültür ortamları için gerekli olmasa da protoplast gibi bazı kültürlerde büyümeyi teşvik ettiği için kullanılabilir. L-Glutamin, L-asparagin, L-sistein ve L-glisin, kültür ortamlarında yaygın olarak kullanılan aminoasitlerdir (Bhatia vd., 2015).

1.4.2.6. Kimyasal Olarak Tanımlanmayanlar

Kültür ortamlarına çeşitli organik ekstraktların eklenmesi kültür ortamlarında olumlu sonuçlar verebilir. Bunlardan bazıları; protein hidrolizatları, hindistancevizi sütü, maya özleri, malt özleri, öğütülmüş muz, portakal suyu ve domates suyudur. Kültür ortamına aktif kömürün (AC) eklenmesi de bazı ortamlar için faydalı, bazıları için zararlı bir etkiye sahip olabilir. Bir ortamdan diğer ortama oldukça farklı sonuçlar çıktığı için bu maddelerin kullanımı dikkatli bir şekilde yapılmalıdır (Kenneth, 1989).

1.4.2.7. Jel Yapıcı Ajanlar

Jelleşmiş ortam, protoplast, hücre, doku ve organ kültürleri için yaygın olarak kullanılan yarı katı, destekleyici matrisler sağlar (George vd., 2008). Agar, yarı katı ve katı bitki doku kültürü ortamı hazırlamak için en yaygın olarak kullanılan jelleştirici ajandır. Agarın, diğer jelleştirici ajanlara göre çeşitli avantajları vardır. Agar su ile karıştırıldığında yaklaşık 60-100°C'de eriyen ve yaklaşık 45°C'de katılaştıran bir jel oluşturur; bu nedenle, agar jelleri tüm uygun inkübasyon sıcaklıklarında stabildir. Ayrıca, agar jelleri ortam bileşenleri ile reaksiyona girmez ve bitki enzimleri tarafından parçalanmaz. Agar kadar yaygın olmasa da kullanılan diğer jelleştirici tipleri aljinat, agaroz, Phytigel (Gelrite), silikajel, jelatin ve nişastadır (Kenneth, 1989).

1.4.2.8. pH

Besiyerinin pH değeri kültür ortamının katılaşmasını ve iyon alınımını etkiler. 4,5'ten düşük veya 7,0'den yüksek pH değerleri, *in vitro* doku büyümesini ve gelişimini büyük ölçüde engeller. Ortamın pH'nın agarın jelleşme verimini, madde alınımını, tuzların çözünürlüğünü, kimyasal reaksiyonları etkilediği bilinmektedir (Bhatia vd., 2015). Farklı bitki türlerine göre ortamın pH gereksinimi değişebilir, ancak çoğu bitkinin yetiştirilebileceği ideal pH aralığı 5,5-6,5'tir. Asteraceae familyası üyeleri ile yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmalarında besiyeri ortamı pH'ı genel olarak 5,8 olarak ayarlanmıştır (Kodja vd., 1998; Harbage, 2001; Izquierdo, 2006; Souza vd., 2007; Corral vd., 2011; Chang vd., 2012; Emek ve Erdağ, 2013; Okay vd., 2014; Valletta vd., 2015; Bohórquez-Quintero vd., 2016; Carra vd., 2016; Trejgell vd., 2018; Sevindik vd., 2019; Panwar vd., 2020).

1.4.2.9. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

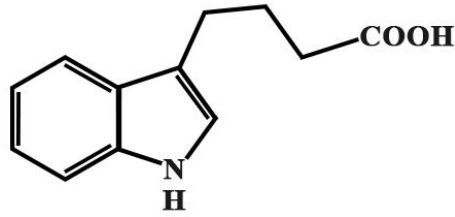
Bitki dokularında doğal olarak bulunan bazı kimyasallar büyüme ve gelişmede düzenleyici olarak görev yapar. Bitki büyüme düzenleyicileri veya bitki hormonları olarak bilinen bu bileşikler genel olarak düşük konsantrasyonlarda aktiftir. Bitki büyüme düzenleyicilerine benzer fizyolojik etkiye sahip olan sentetik kimyasallarda bitki büyüme

düzenleyicileri olarak adlandırılır (George vd., 2008). Tanımlanmış beş grup bitki büyüme düzenleyicisi vardır bunlar;

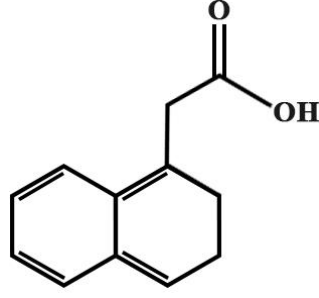
- Oksinler
- Sitokininler
- Giberellinler
- Etilen
- Absisik asit

1.4.2.9.1. Oksinler

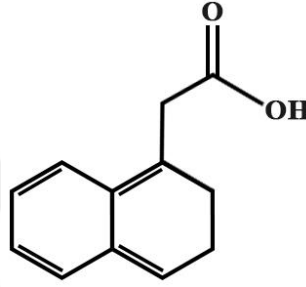
Oksinler hücre bölünmesi, hücre uzaması, kök oluşumu, kallus oluşumu, somatik embriyogenez, yan sürgünlerin gelişiminin baskılanmasından sorumludur (George vd., 2008). Bitki doku kültürü ortamında yaygın olarak kullanılan oksinler, indol-3-asetik asit (IAA), indol-3-bütirik asit (IBA), 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve naftalinasetik asit (NAA)'dır (Şekil 5, 6, 7). Bunlardan indol-3-asetik asit (IAA) doğal olarak oluşurken iken diğerleri sentetiktir. 2,4,5-triklorofenoksiasetik asit (2,4,5-T), 3,6-dikloro-2-metoksibenzoik asit (dikamba) ve 4-amino-3,5,6-trikloropikolinik asit (pikloram) diğer sentetik oksinler arasındadır (Kenneth, 1989).



Şekil 5. İndol-3-bütirik asit (IBA)



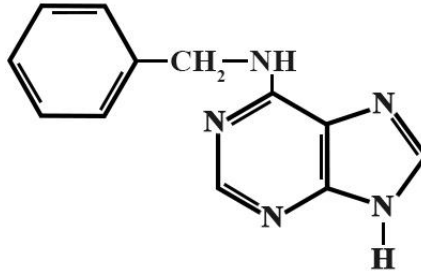
Şekil 6. Naftalinasetik asit (NAA)



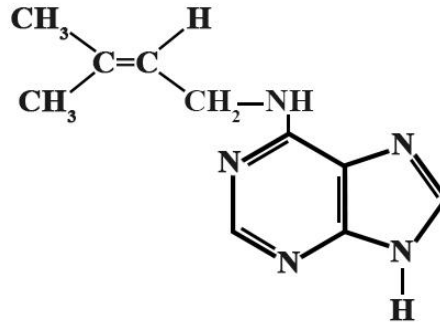
Şekil 7. İndol-3-asetik asit (IAA)

1.4.2.9.2. Sitokininler

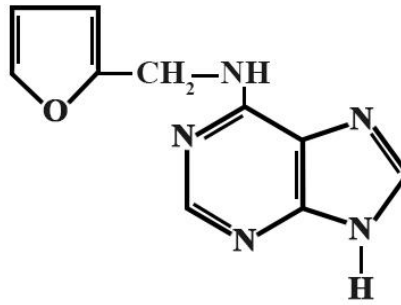
Sitokininler başlıca protein sentezini uyarır hücre döngüsü kontrolünde görev alırlar. Hücre bölünmesini uyararak morfogenezi kontrol ederler. Kültür ortamlarına eklenen sitokininler apikal dominansının kırılmasını sağlayarak yanal (lateral) tomurcukların çıkışını sağlar, sürgün oluşumunu uyarır. Kültür ortamlarında yaygın olarak kullanılan sitokininler arasında 6-benzilamino purin (6-BA), 6-yy dimetilaminopurin (2iP), N-(2-furanilmetil)-lH-purin-6-amin (kinetin) ve 6-(4-hidroksi-3-metil-trans-2-butenilamino) purin (zeatin) vardır (Şekil 8, 9, 10, 11). Zeatin ve 2iP, doğal olarak oluşan sitokininler olarak kabul edilirken, BA ve kinetin sentetik olarak bilinen sitokininlerdir (Kenneth, 1989, Bhatia vd., 2015).



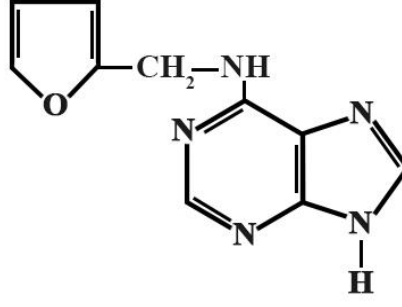
Şekil 8. 6-benzilamino purin (6-BA)



Şekil 9. 6-yy dimetilaminopurin (2iP)



Şekil 10. N-(2-furanilmetil)-1H-purin-6-amin (kinetin)



Şekil 11. 6-(4-hidroksi-3-metil-trans-2-butenilamino)purin (zeatin)

Bir bitki doku kültüründe meydana gelen morfogenez tipi, büyük ölçüde ortamda bulunan oksinlerin ve sitokininlerin oranına ve konsantrasyonlarına bağlıdır. Bitkilerin köklenmesi, embriyogenez ve kallus oluşumunun tamamı, genel olarak, oksinin sitokine oranı yüksek olduğunda meydana gelirken, bu oran düşük olduğunda adventif ve aksiller sürgün oluşumu meydana gelir. Oksinlerin ve sitokininlerin oranları kadar konsantrasyonları da bir o kadar önemlidir. Yüksek bir oksin/sitokinin oranı, embriyogenez ve kök oluşumuna yol açarken, düşük bir oran, aksiller tomurcuk ve sürgün çoğalmasına yol açar, ancak kallus oluşumu için bir ara oran gereklidir (Kenneth, 1989, Bhatia vd., 2015).

1.4.2.9.3. Giberellinler

Giberellinler bitkilerde çeşitli gelişme yanıtlarına sebep olur. Sürgün uzaması bunlardan biridir. İnterkalar meristem uzamasını aktive ettiği için bitkilerde sürgün uzamasına sebep olur. Giberellinlerin bir diğer önemli rolü, ot ve tahıl tohumlarında α -amilaz ve proteaz gibi hidrolitik enzimlerin indüklenmesi ve dolayısıyla endosperm mobilizasyonunu kolaylaştırmasıdır. Bazı bitkilerdeki diğer görevleri ise; tohum çimlenmesi, cinsiyetin belirlenmesi ve meyve gelişiminin kontrolüdür. Kallus kültürlerinde, kök ve sürgün meristemlerinin oluşumunu engeller (George vd., 2008; Benson, 1999).

1.4.2.9.4. Absisik Asit

Absisik asitin (ABA) bitkilerde stoma kapanmasının düzenlenmesi, kökler tarafından su ve iyon alımının kontrolü, yaprak dökülmesi ve yaşlanması gibi birçok rolü vardır ve dolayısıyla diğer hormonlar gibi çok yönlü etkilere sahiptir. Doku kültürlerinde bazen morfogenez veya büyümeyi destekler ayrıca somatik embriyogenezde kullanılır (George vd., 2008; Bhatia vd., 2015).

1.4.2.9.5. Etilen

Etilen, gaz halinde bulunan, yaygın olarak klimakterik meyvelerde meyve olgunlaşmasının kontrolü ile ilişkili olan ve doğal olarak oluşan bir bitki büyüme düzenleyicisidir. Bazı bitki hücre kültürlerinde üretimi, genellikle kültürün büyümesini ve gelişmesini engeller. Gaz halinde kullanılması için, etileni serbest bırakmak gerekir bu yüzden ortama 2-kloroetan fosforik asit tozu eklenir (Bhatia vd., 2015).

1.4.3. Çoğaltım Aşaması

Bu aşamanın ana hedefi önceki aşamadan elde edilen bitki materyalinin hızlı bir şekilde çoğaltımıdır. İstenilen bitki miktarı elde edilene kadar altkültür yapılır. İzlenecek olan *in vitro* prosedüre göre çoğaltım yeni oluşan sürgünlerden, somatik embriyolardan, depo organlarından gerçekleştirilebilir. Çoklu sürgün çoğaltımı için sitokinin ya da sitokinin ve oksin kombinasyonu ilave edilmiş ortamlar kullanılır. Oluşturulan sürgünler besiyeri ortamında tekrar çoğaltılabilir veyahut köklendirme aşamasına geçilebilir. Sürgünler bitki materyalinin durumuna göre her 2-8 haftada bir alt kültürlenir. Sürgün çoğaltımı aşamasında kullanılan en yaygın sitokininler şunlardır: Kinetin (KIN), zeatin (ZEA), 6-benziladenin (6-BA) ve 2-izopentil adenin (2iP). Son yıllarda thidiazuron (TDZ)' de sürgün ortamlarında kullanılmaya başlanmış özellikle odunsu bitkilerde kullanımı yaygın hale gelmiştir (Watanabe ve Pehu, 1997; Iliev vd., 2010). Son beş yılda yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmalarında sürgün ortamlarında en çok kullanılan sitokinin 6-benziladenin (6-BA) olduğu belirtilmiştir. Kinetin (KIN), 6-benziladenin (6-BA)'den sonra

en sık kullanılan ikinci sitokininidir. Kullanılan diğer sitokininler sırasıyla thidiazuron (TDZ), 2-izopentil adenin (2iP) ve zeatin (ZEA)'dir (Philips ve Garda, 2019).

Bazı durumlarda sitokininin tek başına yeterli olsa da, sürgün çoğaltım aşamasında, yüksek sitokinin seviyeleri ile birlikte düşük bir oksin konsantrasyonu genellikle sürgün oluşumu için gereklidir. Bunun kallus oluşumunu indüklemeyi teşvik edecek bir konsantrasyondaki oksin olması önemlidir (George vd., 2008). Asteraceae üyeleri ile yapılan *in vitro* sürgün çoğaltım çalışmaları; *Tricholepis roylei* Hook.f. ile yapılan mikroçoğaltım çalışmasında sürgün çoğaltımı için en verimli ortamın 1 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamının olduğu tesbit edilmiştir (Panwar ve Joshi, 2020). Türkiye'ye endemik bir tür olan *Anthemis xylopoda* O.Schwarz türü ile yapılan çalışmada en yüksek sürgün sayısının 0,5 mg L⁻¹ 6-BA içeren MS besiyeri ortamında görüldüğü rapor edilmiştir (Erdağ ve Emek, 2009). Mikroçoğaltım protokolünün oluşturulduğu *Catamixix baccharoides* Thomson türünde 1,5 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamının en etkili sürgün çoğaltım ortamı olduğu tespit edilmiştir (Panwar vd., 2020). Endemik bir tür olan *Calendula maritima* subsp. *maritima* (Guss.) Ohle'nin mikroçoğaltımının yapıldığı çalışmada en etkili sürgün ortamının 1 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı olduğu belirlenmiştir (Carra vd., 2016). Nadir bir endemik olan *Crepis novoana* S. Ortiz, X.Soñora & Rodr.Oubiña türünün *ex situ* korunmasına yönelik çalışmada, türün mikroçoğaltım protokolü ortaya çıkarılmıştır, 0,5 mg L⁻¹ 6-BA + 0,5 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamının sürgün çoğaltımına en uygun ortam olduğu rapor edilmiştir (Corral, 2011). *Achillea occulta* Constantin. & Kalpoutz. ile yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmasında ise başlangıç materyali olarak sürgün uçları kullanılmıştır. En yüksek sürgün sayısı 1 mg L⁻¹ 6-BA + 0,5 mg L⁻¹ IBA içeren ortamdan elde edilmiştir (Grigoriadou vd., 2011). *In vitro* çoğaltım protokolünün oluşturulduğu *Artemisia annua* L. türünde en yüksek sürgün sayısı 1,5 mg L⁻¹ 6-BA + 0,5 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Gopinath vd., 2014). Abraham ve Thomas (2015), *Elephantopus scaber* L. çoğaltım çalışmasında en etkili sürgün çoğaltım ortamının 1,5 mg L⁻¹ TDZ + 0,5 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı olduğunu bulmuşlardır. *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. türünde yapılan çalışmada en etkili sürgün çoğaltım ortamının 2 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı olduğu bildirilmiştir (Khandakar vd., 2014). Koroch vd., (2002), *Echinacea purpurea* (L.) Moench ile yapıtları çalışmada en etkili sürgün ortamının 1 mg L⁻¹ 6-BA + 0,01 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı olduğunu belirtmişlerdir. *Carthamus tinctorius* (L.) tohumlarının

başlangıç materyali olarak kullanıldığı mikroçoğaltım çalışmasında $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren ortamın en verimli sürgün ortamı olduğu rapor edilmiştir (Ghasempour vd., 2014). Valletta vd., (2015), endemik bir tür olan *Centaurea cineraria* subsp. *circae* L. ile yaptıkları çalışmada $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA ve 2 mg L^{-1} KIN ortamının sürgün oluşturmada etkili olduğunu bulmuşlardır. *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni türü ile yapılan mikroçoğaltım çalışmasında 2 mg L^{-1} IAA + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN içeren ortamın en yüksek sayıda sürgünün olduğu ortam olduğu bildirilmiştir (Hwang, 2006). Joshi ve Dhar (2003), *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. türünde yaptıkları çalışmada en yüksek sürgün sayısının $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamında olduğu rapor edilmiştir. *Spilanthes acmella* (L.) L. mikroçoğaltım protokolünün oluşturulduğu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki ($0,5\text{-}4 \text{ mg L}^{-1}$) 6-BA ve ($0,5\text{-}4 \text{ mg L}^{-1}$) KIN içeren ortamlar denenmiş, en iyi sürgün ortamının 2 mg L^{-1} 6-BA içeren MS ortamı olduğu bulunmuştur (Kurian ve Thomas, 2015). Bais vd., (2002), nesli tehlike altındaki *Spilanthes mauritiana* (A.Rich. ex Pers.) DC. ile yaptıkları çalışmada en etkili sürgün ortamının $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı olduğunu rapor etmişlerdir.

1.4.4. Köklendirme Aşaması

In vitro çoğaltımdaki önemli aşamalardan biri de köklendirme. Bazı türler farklı bir uygulama gerektirmeksizin bitki büyüme düzenleyicisi olmayan besiyeri ortamlarında *in vitro* olarak köklendirilebilir. Fakat çoğu türde köklendirme için oksin gerekmektedir. Köklendirme ortamlarında yaygın olarak kullanılan oksinler şunlardır: İndolasetik asit (IAA), naftalin asetik asit (NAA), indol butirik asit (IBA) ve 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D). Bazı türlerin köklendirilmesinde makro ve mikrobeyinler yarıya indirilir. *In vitro* köklendirme yaygın olarak kullanılsa da özellikle ticari işletmelerde köklendirme dış ortamda da yapılabilir (Kenneth, 1989). Son yıllarda yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmalarında sürgün ortamlarında en çok kullanılan oksin naftalin asetik asit (NAA)'dır. Naftalin asetik asit (NAA)'den sonra en çok kullanılan ikinci oksin indol butirik asit (IBA)'dır. Kullanılan diğer sitokininler sırasıyla 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve kimyasal olarak daha az kararlı, kolay degrade olan indolasetik asit (IAA)'dır (Philips ve Garda, 2019).

Asteraceae üyeleri ile yapılan *in vitro* köklendirme çalışmaları; Abraham ve Thomas (2015), *E. scaber*'in *in vitro* çoğaltım çalışmasında en etkili köklendirme ortamının 1,5 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı olduğunu bulmuşlardır. Endemik bir tür olan *A. xylopoda* türü ile yapılan çalışmada en etkili köklendirme ortamının 0,5 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamında görüldüğü rapor edilmiştir (Erdağ ve Emek, 2009). *Dendranthema grandiflorum* türünde yapılan çalışmada en etkili köklendirme ortamının 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı olduğu bildirilmiştir (Khandakar vd., 2014). Koroch vd., (2002), *E. purpurea* ile yaptıkları çalışmada en etkili köklendirme ortamının 0,4 mg L⁻¹ IBA ve 1,0 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı olduğunu belirtmişlerdir. Yüzbaşıoğlu vd., (2012), *Centaurea arifolia* Boiss. ile yaptıkları çalışmada en etkili köklendirme ortamının 1,0 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamında olduğunu rapor etmişlerdir. Valletta vd., (2015), *C. cineraria* subsp. *circae* ile yaptıkları çalışmada 0,5 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamının köklendirmede etkili olduğunu bulmuşlardır. *Stevia rebaudiana* türü ile yapılan mikroçoğaltım çalışmasında köklendirme için 2 mg L⁻¹ IBA + 0,5 mg L⁻¹ KIN içeren ortamın en etkili ortam olduğu bildirilmiştir (Hwang, 2006). *Artemisia petrosa* ssp. *eriantha* (Genepi) için en etkili köklendirme ortamı ise 2 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı olarak bulunmuştur (Pace vd., 2004). *In vitro* çoğaltım protokolünün oluşturulduğu *A. annua* türünde en iyi köklendirme ortamının 2 mg L⁻¹ IBA içeren MS olduğu bulunmuştur (Gopinath vd., 2014). Joshi ve Dhar (2003), *S. obvallata* türünde yaptıkları çalışmada tüm bitkilerin köklendiği ortamın 0,5 mg L⁻¹ IBA içeren MS olduğunu rapor etmişlerdir (Joshi ve Dhar, 2003). *Spilanthes acmella* mikroçoğaltım protokolünün oluşturulduğu çalışmada en iyi köklendirme ortamının 2 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı olduğu bulunmuştur (Kurian ve Thomas, 2015). Bais vd., (2002), *S. mauritiana* ile yaptıkları çalışmada en etkili kök ortamının 0,2 mg L⁻¹ IAA içeren MS ortamı olduğunu rapor etmişlerdir.

1.4.5. Dış Ortama Alıştırma Aşaması

In vitro ortamdaki bitkiler, düşük ışık seviyesinde, aseptik koşullarda, yüksek miktarda şeker yüksek miktarda nem içeren, heterotrofik büyümeye izin verecek besin maddeleri içeren bir ortamda büyürler. Bu ortama alışan bitkiler, doğrudan dış ortama yerleştirildiklerinde çevresel koşullar sebebiyle hayatta kalmaları zorlaşır. Bu sebeple mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin fizyolojik ve anatomik özellikleri, sera veya dış ortama

kademeli olarak alışmalarını gerektirmektedir (Hazarika, 2003). Aklimatizasyon olarak adlandırılan bu aşama çoğaltımı yapılan bitkinin çevresel değişimlere uyum sağlama süreci olarak adlandırılır. Aklimatizasyonu sağlanacak bitkilerin kök ve sürgün açısından uygun büyüklükte ve sağlıklı bitkiler olması gerekir. *In vitro* da köklenen bitkiler uygun bir ortama alınarak kısmi gölge içeren, yüksek bağıl nemli ortamlarda bir süre tutulmalıdır. Bitkilerin bulunduğu ortamdaki bağıl nem kademeli olarak düşürülerek iklime alıştırılır. Yapraklardaki fotosentez hızı ve kütikula mumu dahil olmak üzere çeşitli faktörler dış ortama alışma sırasında hayatta kalma oranı ile ilişkilendirilmiştir (Kenneth, 1989). *Ex vitro* koşullara aktarılıp iklilendirilen bitkiler kademeli olarak yaprak anatomisi ve morfolojilerini değiştirirler. Ayrıca bitkiler yapraklarının yüzeyinde koruyucu kütikular bir mum tabakası oluşturur. Bundan sonra bitkiler açık alanlara transfer için uygun hale gelir (Iliev vd., 2010).

1.4.6. Doku Kültürlerinde Karşılaşılan Problemler

1.4.6.1. Somaklonal Varyasyon

Bitki doku kültürlerinde, rejenerantların üretimi sırasında gerçekleşen ve genetik kararsızlık sonucu ortaya çıkan kalıtsal değişikliklerdir. Bitki doku kültürlerindeki bitkiler sitolojik ve kromozom anormallikleriyle sonuçlanan bitki büyüme süreçlerinden geçerler. Somaklonal varyasyon bitki fenotiplerindeki kalıtsal değişiklikler, kromozom sayılarındaki varyasyon, gen mutasyonlarının birikimi, ribonükleik asitte (RNA) gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler, protein profilleri ve DNA dizilerindeki moleküler değişiklikler ile kendini belli eder. Bu varyasyonlara eksplantın genotipi, kültür rejimi ve bitki büyüme düzenleyicileri sebep olabilir. Somatik varyasyonların doğal bitki popülasyonlarında önceden de var olabildiği bilinse de böyle varyasyonlara doku kültürlerinde doğadakiniden çok daha yoğun şekilde rastlanmasının doku kültürü şartları sebebiyle olduğu belirtilmiştir (Benson, 1999). Meristem, sürgün ucu, aksillar veya apikal tomurcuklardan doğrudan elde edilen kültürler çoğunlukla genetik olarak kararlıdır. Protoplastlardan, yaprak ve yaprak saplarından en önemlisi kallustan elde edilen bitkiler değişen seviyelerde somaklonal varyasyonlar içerebilir (Hawkes vd., 2000; Benson, 1999).

In vitro ortamlarda çoğaltılan bitkilerin genetik stabilitesinin belirlenmesi fenotipik, sitolojik (kromozom sayımı, FISH, GISH, PCR vb.), biyokimyasal (spektrofotometrik ve kromatografik ayırma teknikleri) ve moleküler düzeyde (akım sitometri, polimeraz zincir reaksiyonu, DNA-DNA hibridizasyon, DNA metilasyon çalışmaları, somatik hibridizasyon çalışmaları) çeşitli tekniklerle gerçekleştirilebilir (Hawkes vd., 2000; Benson, 1999).

Nükleik aside özgü floresan boyaların kullanıldığı akım sitometri metodu, bitki doku kültürlerinde meydana gelen DNA içeriğinin ve ploidi varyasyonlarının değerlendirilmesi için hızlı, basit ve tekrarlanabilir bir tekniktir. Akım sitometri *in vitro* çoğaltımı yapılan bitkilerin genetik kararlılık/kararsızlığını belirlemek için kullanılan oldukça yaygın bir metottur (Escobedo-Gracia-Medrano vd., 2018). Literatürde *in vitro* ortamda çoğaltımı yapılan bitkilerin genetik stabilitelerinin kontrolünde akım sitometri metodu kullanılmaktadır (Awolaye vd., 1994; Loureiro vd., 2007a; Brito vd., 2010; Mallón vd., 2010; Faizal vd., 2011; Clarindo vd., 2012; Rewers vd., 2012; Viehmannova vd., 2016; Samarina vd., 2019; Abdolinejad vd., 2020; Parzymies vd., 2020; Syeed vd., 2021; Ulvrova vd., 2021; Cüce vd., 2022; İnceer vd., 2022).

In vitro kültürlerde en yaygın görülen genetik kararsızlık ploidi seviyesindeki değişikliklerdir. Ploidi seviyesini belirlemenin klasik yöntemi, mitozun metafazındaki kromozomları saymaktır. Aktif bölünme safhasındaki hücrelerde çoğunlukla ploidi stabildir. Kromozom sayımı güvenilir bir genetik kararlılığı yansıtır (Neumann vd., 2009). Geleneksel olarak boyanmış, somatik kromozomlara dayalı sitolojik analizler, *in vitro* çoğaltımı yapılan bitkilerin kromozomlarındaki sayısal/yapısal varyasyonları belirlemek için kullanılmaktadır. Armstrong ve Phillips (1988), somatik embriyolardan rejenere edilen mısır bitkilerinin, organogenez yoluyla elde edilenlere göre sitolojik olarak daha değişken olduğunu belirtmişlerdir. Henry vd., (1996), somatik embriyogenezle türetilen bitkilerde kültür koşullarının uzaması ile orantılı olarak kromozomlarda anormal artışlar gözlemişlerdir. Birçok çalışmada, *in vitro* ortamda çoğaltımı yapılan bitkilerin genetik stabilitelerinin kontrolünde kromozom sayımı kullanılmaktadır (Wawrosch vd., 1994; Godo vd., 1998; Chen vd., 2006; Mallón vd., 2010; Nasırcılar vd., 2011; Clarindo vd., 2012; Dafadar vd., 2012; Viehmannova vd., 2016; Ulvrova vd., 2021; Cüce vd., 2022; İnceer vd., 2022).

1.4.6.2. Hiperhidrisite

Bitki doku kültürlerinde karşılaşılan problemlerden biri de hiperhidrisitedir. Hiperhidrisite, *in vitro* bitki çoğaltımında görülen en yaygın fizyolojik bozukluktur. Belirli anatomik, morfolojik, fizyolojik ve metabolik bozukluklar gösterir. Hiperhidrisite camısı sürgünler, kalınlaşmış gövdeler, kısa boğumlar, yarı saydam, kırılğan, uzun ve bükülmüş yapraklar ile kendini belli eder. Hiperhidrisitenin semptomları arasında klorofil eksikliği, plastidlerde büyük nişasta granüllerinin birikmesi, hücreler arası boşluklarda fazla sıvı bulunması, mezofilde büyük hücreler arası boşlukların oluşumu, epikutiküler tabakanın oluşumunda azalma, enzim aktivitesinde azalma ve normal metabolik süreçlerin bozulmasına bağlı olarak protein sentezinde meydana gelen değişikliklerde sayılabilir (Polivanova ve Bedarev, 2022). Yapılan çalışmalarda hiperhidrik sürgünlerin dokularındaki içsel sitokinin içeriğinin normal bitkilere kıyasla arttığı, ayrıca hiperhidrisite derecesinin ise ortamdaki sitokinin konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı, rapor edilmiştir (Ivanova vd., 2006; Sharma ve Mohan, 2006; Ivanova ve Van Staden, 2011; Chandrika vd., 2015; Liu vd., 2017; Gantait ve Mahanta, 2022).

Hiperhidrisite, doku kültürünün kullanımını önemli ölçüde zorlaştırır, klonal mikro çoğaltmanın etkinliğini ve fidelerin kalitesini düşürür, bitkilerin *ex vitro* adaptasyonunu engeller ve bitki materyalinde önemli kayıplara yol açabilir. Oksidatif stres, bozulmuş nitrojen metabolizması ve endojen hormonların dengesizliği hiperhidrisitenin ana sebeplerini oluşturur. *In vitro* çoğaltımı yapılan bitkilerin hiperhidrisite seviyesini etkileyen ana faktörler, ortamın mineral ve hormonal bileşimi ve yetiştirme koşullarıdır özellikle kültür kaplarının havalandırılmasıdır (Polivanova ve Bedarev, 2022).

1.4.6.3. Kontaminasyon

Mikrobiyal kontaminasyonlar, hem bilimsel amaçlı hem de ticari amaçlı *in vitro* çoğaltım yapılan laboratuvarlarda hala bitki kayıplarının en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir (Leifert vd., 1994). Doku kültürlerinde kontaminasyonlar genellikle, endofitik mikroorganizmalar veya yüzey sterilizasyonuna dirençli mikroorganizmalar içeren eksplantların *in vitro* kültüre edilmesiyle ortaya çıkar (Cassells, 2000). *In vitro* kültür ortamındaki çoğu mantar ve maya bitkiyi kısa bir süre içerisinde öldürürken

Staphylococcus, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* gibi bazı bakteriyel kontaminantlar bitkiye zarar vermeden latent şekilde kültür ortamında varlığını sürdürebilir (Leifert vd., 1994). Bitkiyle beraber simbiyotik bir şekilde varlığını sürdürebilen mikroorganizmalar *in vitro* koşullarda çevresel şartların değişmesiyle (stres koşullarında) bitkiye zararlı hale gelebilir (Quambusch ve Winkelmann, 2018). Bitki doku kültüründe kullanılan besiyeri ortamları, birçok mikroorganizmanın büyümesini teşvik eden maddeler içerir. Bazı mikroorganizmalar bitkinin büyümesini teşvik ettiği gibi bazıları ise tam tersi bitki gelişimini olumsuz etkiler (Cassells, 2000). Kontaminasyonları önlemek için birçok laboratuvar besiyerlerine farklı antibiyotikler eklenir. Fakat antibiyotikler belli mikroorganizmaları ortadan kaldırır ya da baskılar her mikroorganizma için etkili değildir. Bu nedenle antibiyotik kullanımı doku kültürü uygulamalarında pratik bir uygulama olarak kabul edilmez. Doku kültürü kontaminasyonunu kontrol etmenin en iyi ve ekonomik stratejisi, stres koşullarını ortadan kaldırmak, aseptik kültürler oluşturmak ve rutin laboratuvar uygulamalarını sürdürmektir (Cassells, 2000).

1.5. *Tripleurospermum conoclinium* (Boiss. & Bal.) Hayek.'un Morfolojik Özellikleri

Bir veya çok yıllık, 25 - 35 cm. Gövdeler 1 veya çok sayıda, dallanmış ya da tepede dallanmamış. Yapraklar 2-3- pinnatisek; yaprak lopları linear - lanseolat, mukronat. Kapitulum radiat, 2 - 4 ya da nadiren çok sayıda, korimbus, ligullar hariç 0,9 - 1,5 cm genişliğinde, uzun pedunkullu. Fillariler ovat-oblong, obtus veya subobtus, pubescent ya da glabrescent, kenarlar kahverengimsi, zarsı. Reseptakulum elongat, genişçe koniksi - oblong. Ligullar 9 - 13 mm, tüpsü çiçeklerin korolla lopları uçlarda belirgin salgı bezli. Akenler ters ovat ya da ters ovat-oblong, $\pm$ basık, olgunlukta koyu kahverengi veya siyah, 1 - 2 x 0,6 - 1,2 mm, belirgin müsilaajlı, anterior düz veya belirgin çizgili, posterior 3 damarlı, damarlar kalın, beyaz; korona mevcut değil; salgı bezleri akenin tepesinde birleşme eğilimindedir (Enayet Hossain, 1975).

Çiçeklenme zamanı: Nisan - Temmuz.

Habitat: Çayırılık ve kırsal alanlar.

Yükseklik: 1200 m.

Türkiye'deki yayılışı: Karadeniz, Marmara, Akdeniz ve Ege Bölgeleri.

1.6. *Tripleurospermum hygrophilum* (Bornm.) Bornm.'un Morfolojik Özellikleri

Bir ya da iki yıllık, boyu 28 cm'e kadar uzar. Gövde bir veya tabanda bölünmüş. Alt yapraklar 3 - pinnatisek, üst yapraklar 1 - 2 - pinnatisek; yaprak lopları küçük, üçgenimsiakut ya da linear - akut, mukronat. Kapitulum 2 - 3 diskoid, 6 - 8 mm genişliğinde; pedunkullar nispeten uzun, çıplak, tüysüz. Dıştaki fillariler ovat - lanseolat, içteki fillariler oblong - lanseolat, tüysüz, bütün fillariler beyaz, zarsı kenarlı. Reseptakulum ovoid. Çiçeklerin korolla lopları uçlarda salgı bezsiz. Akenler 1,3 - 1,8 x 0,4 - 0,6 mm, ters piramit şeklinde, olgunlukta kahverengi, belirgin müsilaajlı, anterior düz veya oldukça tuberkulat, posterior 3 damarlı, damarlar nispeten kalınlaşmış, akut, beyaz, araları dar; korona loblu, beyaz, boyu akenin 1/5 - 1/4'ü kadar (Enayet Hossain, 1975).

Çiçeklenme zamanı: Mayıs - Haziran.

Habitat: Kayalık alanlar, kaya çatlakları ve çalılıklar, nehir yakınları.

Yükseklik: 380 m.

Türkiye'deki yayılışı: Ege ve Marmara bölgeleri.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitki Materyali

Mikroçoğaltımı yapılacak olan *T. conoclinium* ve *T. hygrophilum* türlerinin olgun akenleri, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Araştırma Laboratuvarında muhafaza edilen Prof. Dr. Hüseyin İNCEER'in tohum/meyve koleksiyonundan temin edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. İncelenen *Tripleurospermum* türlerinin lokalite ve koleksiyon bilgileri

Tür	Lokalite	Koleksiyon Numarası
<i>T. conoclinium</i>	B2 İzmir: Bozdağ, 1191 m, 25.05.2011	İnceer 828
<i>T. hygrophilum</i>	B1 İzmir: Yamanlar Dağı, 900 m, 24.05.2011	İnceer 810

2.2. Kültür Koşulları

Akenleri çimlendirmek için büyüme düzenleyicileri içermeyen MS temel besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri her Magentaya yaklaşık 40 ml olacak şekilde konulmuştur. Bu işlem için 98,5 x 59 mm hacmindeki cam Magenta kültür kapları (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) kullanılmıştır. Bu besiyerlerinde karbon kaynağı olarak %2 (w/v) sukroz (Duchefa Biochemie, Hollanda, Haarlem) ve %0,8 (w/v) agar (Duchefa Biochemie, Hollanda, Haarlem) kullanılmıştır. Besiyeri ortamlarının pH değerleri 1 M HCl veya 1 N NaOH ile otoklav öncesi 5,8 olarak ayarlanarak 121°C'de 1,1 kPa basınç altında 20 dakika sterilize edilmiştir.

2.3. Sterilizasyon ve Aken Çimlendirme

Sterilizasyon işleminde ilk önce akenler ön muamele için 30 dk musluk suyunda yıkanmıştır. Daha sonra 30 sn %70'lik (v/v) etanol (EtOH) çözeltisine maruz bırakılmıştır. Etanol'ün uzaklaştırılmasından sonra akenler 10 dk %3 (v/v) sodyum hipoklorit (NaOCl)

  zeltisi ile yüzey sterilizasyonları yapılmıştır. Sterile edilmiş akenler dionize steril su ile 15 dk 3 kere yıkanmıştır ve steril kabinde bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen Murashige ve Skoog (MS) (Murashige ve Skoog 1962) (Duchefa Biochemie, Hollanda, Haarlem) temel besiyeri ortamına ekimleri yapılmıştır (Tablo 2).

Dört haftanın sonunda akenlerin çimlenme yüzdeleri kaydedilmiştir. Tüm aken çimlendirme deneyleri her tür için yirmi aken üzerinden gerçekleřtirilmiřtir.

Tablo 2. Murashige ve Skoog (MS) besiyeri içeriği

Murashige ve Skoog (MS) Besiyeri Ortamı	
��erik	mg L⁻¹
Makro Elementler	
CaCl ₂	332,02
KH ₂ PO ₄	170,00
KNO ₃	1900,00
MgSO ₄	180,54
NH ₄ NO ₃	1650,00
Mikro Elementler	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
FeNaEDTA	36,70
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,83
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Vitaminler	
Glycine	2,00
Myo-Inositol	100,00
Nicotinic acid	0,50
Pyridoxine HCl	0,50
Thiamine HCl	0,10

2.4. Sürgün Çoğaltımı

Çimlenen akenlerden elde edilen bitkiciklerin nodal segmentleri eksplant olarak kullanılmıştır. Bu eksplantlar yeterli sürgün sayısı elde edilene kadar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS temel besiyeri ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantlar dört haftada bir altkültür edilmiştir. Üçüncü alt kültürden sonra bu bitkicikler sürgün çoğaltma aşamasında kullanılmıştır. Sürgün çoğaltımı farklı konsantrasyonlardaki 6-benzylaminopurine (6-BA, 0,25, 0,5 ve 1 mg L⁻¹), kinetin (KIN, 0,25, 0,5 ve 1 mg L⁻¹), 6-(y,ydimethylallylamino)-purine (2iP, 0,25, 0,5 ve 1 mg L⁻¹), içeren farklı sitokininlerin indol-3-bütirik asit (IBA, 0,1 mg L⁻¹), naftalin asetik asit (NAA, 0,1 mg L⁻¹) oksinleriyle ayrı ayrı kombine edilmesiyle oluşturulan MS temel besiyerinde yapılmıştır. Bu besiyerlerinde kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinden 6-BA ve NAA hariç tümü 0,22 µm filtrelerle steril edilmiştir. Steril edilen bitki büyüme düzenleyicileri yaklaşık 40°C'de soğutulan besiyeri ortamına eklenmiştir. Büyüme düzenleyicilerinin olmadığı MS (Murashige ve Skoog 1962) besiyeri ise kontrol olarak kullanılmıştır. Besiyeri ortamlarının pH değerleri 1 M HCl veya 1 N NaOH ile otoklav öncesi 5,8 olarak ayarlanmıştır. Tüm kültür ortamları, 121°C'de 1,1 kPa basınç altında 20 dakika sterilize edilmiştir. Bitki büyütme odasındaki kültür koşulları, 50 µmol m⁻² s⁻¹ fotosentetik ışık yoğunluğunda 16 saat gündüz, 8 saat gece fotoperiyodu altında 24 ± 2°C olarak ayarlanmıştır. Bunun için soğuk gün ışığı floresan lambaları (Philips HO 49 W/840, Polonya) kullanılmıştır. Tüm sürgün çoğaltımı deneyleri her bir bitki büyüme düzenleyicisi konsantrasyonu için yirmi eksplant içermiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, yaprak sayısı ve kallus oluşumu kaydedilmiştir.

2.5. Köklendirme

Köklendirme için indol-3-bütirik asit (IBA; 0,25, 0,5 ve 1 mg L⁻¹) ve naftalen asetik asit (NAA; 0,25, 0,5 ve 1 mg L⁻¹) içeren MS besiyeri ortamları hazırlanmıştır, sürgün ortamlarında yeterli uzunluğa (≥ 20 mm) ulaşan sağlıklı bitkicikler bu köklendirme ortamlarına aktarılmıştır. Köklendirme aşaması 50 µmol m⁻² s⁻¹ fotosentetik ışık yoğunluğunda 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyodu altında 24 ± 2°C olarak ayarlı bitki büyütme odası koşullarında yapılmıştır. Tüm sürgün köklendirme deneyleri her bir

bitki büyüme düzenleyicisi konsantrasyonu için yirmi eksplant içermiştir. Dört haftanın sonunda kök sayısı, kök boyu, sekonder kök sayısı gibi parametrelerin ölçümü ile köklenme başarısı hesaplanmıştır.

2.6. Aklimatizasyon

Köklenen bitkilerin besiyeri kalıntıları musluk suyu ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Köklenen sürgünler 71×71 mm ebatında şeffaf ışık geçiren plastik kaplarda, pH 5,8'e ayarlanmış Hoagland besin solüsyonu içeren vermikülitli ortama aktarılmıştır. Vermikülit ortamına aktarılan bitkilerin, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosentetik ışık yoğunluğunda 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyodu altında $24 \pm 2^\circ\text{C}$ olarak ayarlı bitki büyütme odasında dört hafta süre ile büyüme ve gelişimleri takip edilmiştir. İkinci hafta kapakları açılmaya başlanan bitkilerin ikinci haftanın sonunda kapakları tamamıyla açılmıştır. Bundan sonra canlılığını devam ettiren, gelişimini sürdüren bitkiler 1:1 (v/v) oranında torf ve orman toprağı karışımına alınarak botanik bahçesine aktarılmıştır. Dış ortama aktarılan ve aklimatizasyonunu tamamlayan bitkilerin büyüme ve gelişimleri bir yıl süre ile takip edilerek fenolojik (çiçeklenme, meyve) gözlemleri yapılmıştır. Çiçeklenen bitkilerin aken görüntüleri stereo-binoküler mikroskop aracılığıyla çekilmiştir.

2.7. Stabilite Testleri

Doku kültürü ortamlarında çoğaltımı yapılan bitkilerde oluşabilecek anormalliklerin kontrolü için üç aşamada stabilite testleri uygulanmıştır. Bunlar köklendirme aşamasında kromozom sayımı ile aklimatizasyon sonrasında akım sitometri ve stoma analizleridir.

2.7.1. Kromozom Sayımı

Bitki büyüme düzenleyicilerini içeren veya içermeyen (kontrol) MS ortamlarında köklendirmeye alınan bitkilerden elde edilen aktif kök uçları kromozom sayımı için kullanılmıştır. Örnekler ilk olarak 2 mM 8-hidroksikinolin çözeltisinde, 18°C 'de, 6 saat ön muameleye alınmıştır. Ön muameleden sonra kök uçları, 3:1 oranında %96'lık etanol - asetik asit karışımı ile $+4^\circ\text{C}$ 'de 24 saat fikse edilmiştir. Fiksatiften alınan kök uçları

%70'lik etanol ile 3 kez yıkanmıştır daha sonra 60°C'de, 1N HCl'de 10 - 12 dakika hidroliz edilmiştir. Hidrolizden alınan kök uçları saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra Shiff-Reagent ile 2-3 saat boyanarak oda sıcaklığında 2-3 saat bekletilip %45'lik asetik asit ile ezme preparatları yapılmıştır (İnceer ve Beyazoğlu, 2004). Daimi hale getirilen preparatlardan iyi dağılmış ve kromozomları belirgin olan hücreler belirlenerek kromozom sayımları bu preparatlar üzerinden yapılmıştır. Kromozom sayımı, her türün köklendirme aşamasındaki her bir deneme grubundan 3 farklı preparat üzerinden yapılmıştır. Bu hücrelere ait kromozomların görüntüleri Leica DM 1000 mikroskobu aracılığıyla çekilmiştir.

2.7.2. Akım Sitometrik Analiz

In vitro 'da büyütülüp aklimatizasyonu yapılmış bitkilerin nuklear DNA analizi akım sitometri kullanılarak yapılmıştır. Her türün üç farklı bireyinden elde edilen sağlıklı yapraklar, 1 ml modifiye WPB (Loureiro vd., 2007b, 0,2 M Tris-HCl, 4 mM MgCl₂·6H₂O, 2 mM EDTA, Na₂·2H₂O, 86 mM NaCl, 10 mM K₂S₂O₅, %1 PVP-10, %1 (v/v) Triton X-100, pH 7,5) tamponu içerisinde, mekaniksel olarak keskin bir jilet yardımıyla küçük parçalara ayrılmış ve 30 µM naylon filtre ile süzülerek tüplere transfer edilmiştir. Elde edilen nukleus süspansiyonuna 50 µg/ml RNase ve 50 µg/ml propodium iodide (PI) ilave edilerek ışıksız bir ortamda ölçüm yapılana kadar buz içerisinde inkübe edilmiştir. Hazırlanan örnekler bir BD Accuri C6 akım sitometrisi kullanılarak analiz edilmiştir (İnceer vd., 2016). Akım sitometrik analiz dış ortama aktarılan aklimatizasyonu sağlanmış, sağlıklı bitkilerden her tür için rastgele 3 farklı örnek üzerinden 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Tüm ölçümler aynı cihaz ile yapılmıştır. Her örnekten en az 10.000 nukleus ölçülmüştür. Analizi yapılan örneklerden yalnızca G₁ pikinin varyasyon katsayısı (CV) %5'in altında olan histogramlar dikkate alınmıştır (Doležel vd., 2007a). Nuklear DNA analizleri; mikroçoğaltımı yapılan örneklerin ve standart (*Zea mays* 'CE-777') olarak kullanılan bitkinin G₀/G₁ pik konumlarının floresan değerlerinin, karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir (Doležel vd., 2007b). Nuklear DNA miktarı (2C), G₀/G₁ pikinin floresan yoğunluklarına ait değerler kullanılarak, aşağıdaki formül aracılığıyla pikogram (pg) olarak hesaplanmıştır (Doležel ve Bartoš, 2005).

$$\text{Örneğin 2C DNA değeri (pg)} = \frac{\text{Örneğin } G_0/G_1 \text{ pik ortalaması}}{\text{Standardın } G_0/G_1 \text{ pik}} \times \text{Standardın 2C DNA değeri (pg)}$$

2.8. Stoma İncelemeleri

İlk olarak aklimatizasyonu yapılan bitkilerin genç yaprakları stoma ölçümler için FAA'da (5 kısım formalin: 5 kısım asetik asit: 90 kısım %70 etanol) fikse edilmiştir. En az 48 saat fikse edildikten sonra bitki materyalleri %70 etanol çözeltisinde stoklanmıştır. Analizler %70'lik etanol çözeltisinde muhafaza edilen materyallerden alınan kesitler üzerinden yapılmıştır. Yaprakların alt ve üst yüzeylerinden elle yüzeysel kesitler alınmıştır. Alınan kesitler direkt gliserinli su ile kapatılarak yarı daimi preparatlar hazırlanmıştır. Stomalar, mikrometrik oküler kullanılarak Olympus CX21 ışık mikroskopunda ölçülmüştür. Her türden rastgele 3 farklı örnek üzerinden 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Her bir tür için en az 50 stoma ölçülmüştür. Stoma görüntüleri Leica DM 1000 mikroskobu aracılığıyla çekilmiştir.

2.9. İstatiksel Analizler

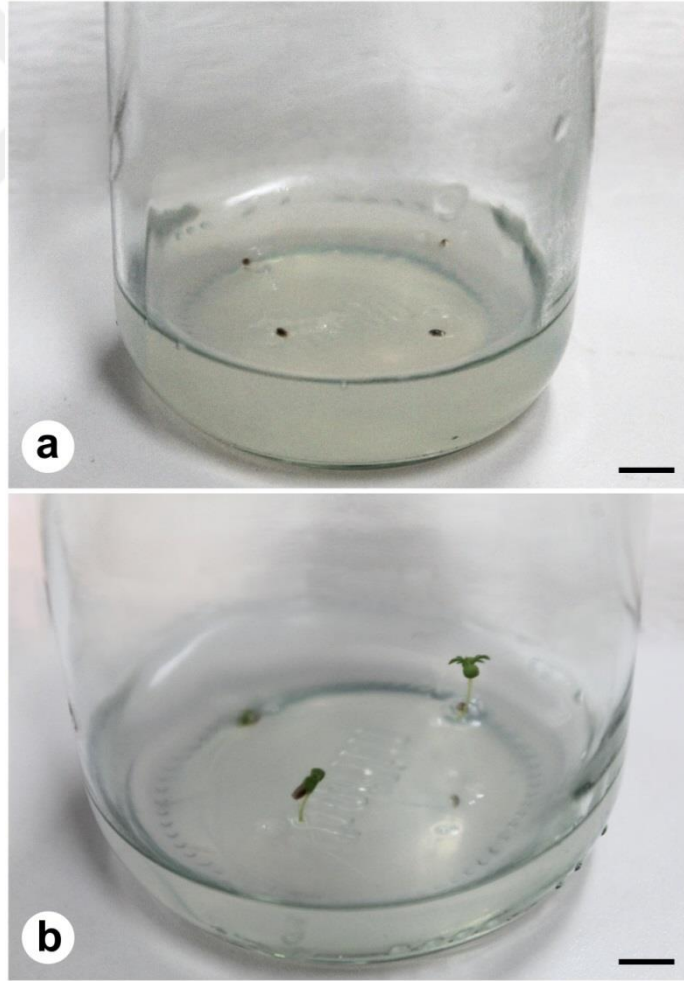
In vitro çoğaltım verilerinin istatistikleri için, varyans analizlerinden (ANOVA) Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Tüm istatistikler SPSS (versiyon 10) bilgisayar programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

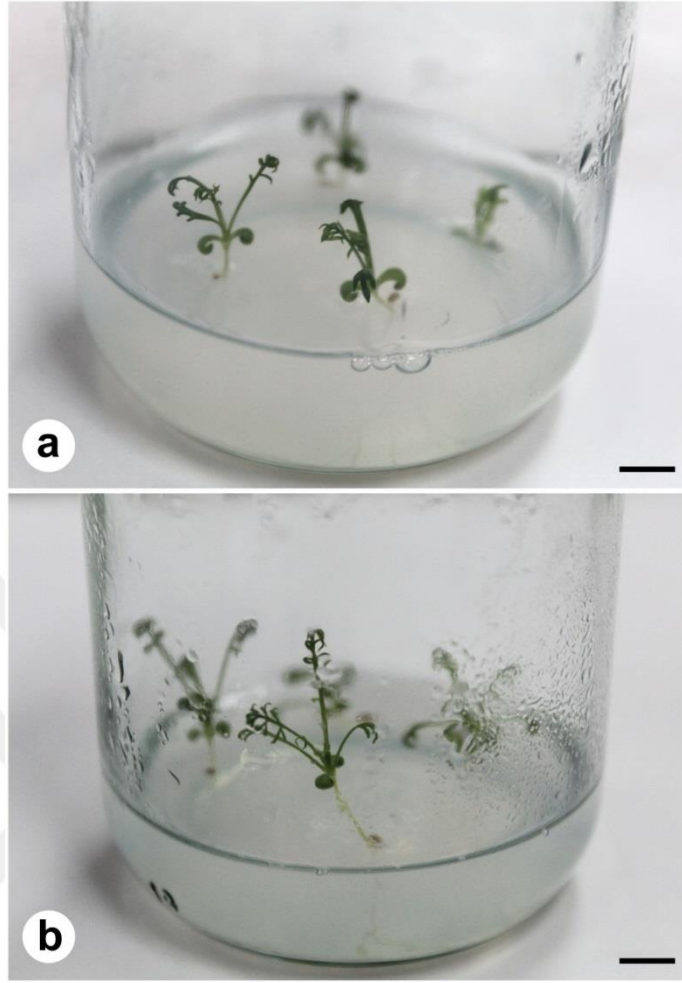
3.1. *Tripleurospermum conoclinium* (Boiss. & Bal.) Hayek.

3.1.1. Aken Çimlendirme

Bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS ortamında *T. conoclinium* akenlerinde %10 oranında kontaminasyon gözlenmiştir. İlk çimlenme yedinci günde gözlemlenmiştir. Maksimum çimlenme yüzdesine iki haftanın sonunda ulaşılmıştır ve akenlerin %65'i ikinci haftanın sonunda çimlenmiştir (Şekil 12, 13).



Şekil 12. *Tripleurospermum conoclinium* kültür başlangıç aşaması. (a) *In vitro* aken çimlenmesi, (b) Yedinci gün. Ölçekler: 3 cm



Şekil 13. *Tripleurospermum conoclinium* kültür başlangıç aşaması. (a) Ondördüncü gün, (b) Otuzuncu gün. Ölçekler: 3 cm

3.1.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Sürgün Çoğaltımı Üzerine Etkisi

KIN'in IBA ve NAA ile kombinasyonlarından oluşan MS besiyerlerinde en yüksek sürgün sayısı ($2,90 \pm 0,31$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 3 ve Şekil 14, 19b), en düşük sürgün sayısı ($1,20 \pm 0,41$) 1 mg L^{-1} KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 14, 20e). En yüksek sürgün boyu ($38,38 \pm 1,55$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 3 ve Şekil 17, 20b), en düşük sürgün boyu ($22,46 \pm 1,70$) ise $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamında tespit edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 15, 18e). Nod sayısı verilerine göre en yüksek nod sayısı ($4,15 \pm 0,59$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 3 ve Şekil 17, 19b), en düşük nod sayısı ($2,05 \pm 0,60$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri

ortamında bulunmuştur (Tablo 3 ve Şekil 17, 18e). En yüksek yaprak sayısı ($26,30 \pm 2,58$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 3 ve Şekil 16, 18b), en düşük yaprak sayısı ($13,45 \pm 2,87$) ise $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 16, 18e).

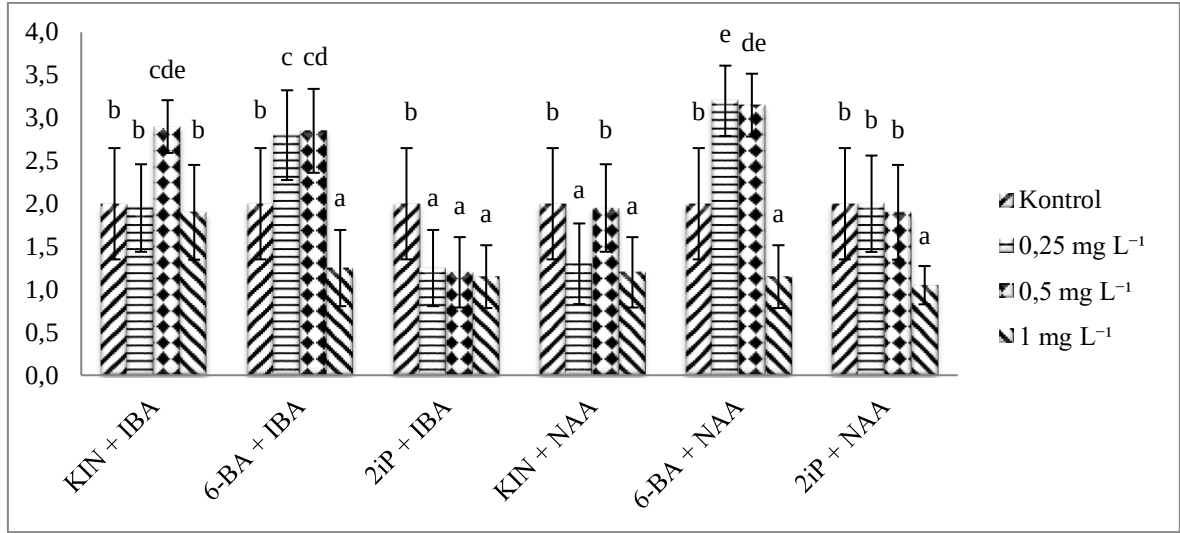
6-BA'nın IBA ve NAA ile kombinasyonundan oluşan MS besiyerlerinde en yüksek sürgün sayısı ($3,20 \pm 0,41$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 3 ve Şekil 14, 19f), en düşük sürgün sayısı ($1,15 \pm 0,37$) ise 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 14, 20f). Sürgün boyuna etkisine bakıldığında en yüksek sürgün boyu ($37,94 \pm 1,95$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 3 ve Şekil 15, 19f), en düşük sürgün boyu ($25,19 \pm 1,84$) ise $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında bulunmuştur (Tablo 3 ve Şekil 15, 19c). Nod sayısı açısından değerlendirildiğinde en yüksek nod sayısı ($4,90 \pm 0,64$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 3 ve Şekil 17, 19c), en düşük nod sayısı ($1,15 \pm 0,37$) ise 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında tespit edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 17, 20c). En yüksek yaprak sayısı ($32,00 \pm 2,43$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 3 ve Şekil 16, 19f), en düşük yaprak sayısı ($14,50 \pm 2,91$) ise 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 16, 20f).

2iP'in IBA ve NAA ile kombinasyonundan oluşan MS besiyerlerinde en yüksek sürgün sayısı ($2,00 \pm 0,56$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 3 ve Şekil 14, 18g), en düşük sürgün sayısı ($1,05 \pm 0,22$) ise 1 mg L^{-1} 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 14, 20g). En yüksek sürgün boyu ($30,51 \pm 2,20$) 1 mg L^{-1} 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 3 ve Şekil 15, 19d), en düşük sürgün boyu ($18,52 \pm 1,44$) ise $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında tespit edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 15, 20d). En yüksek nod sayısı ($3,05 \pm 0,51$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 3 ve Şekil 17, 18g), en düşük nod sayısı ($1,15 \pm 0,37$) ise 1 mg L^{-1} 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında bulunmuştur (Tablo 3 ve Şekil 17, 19d). Yaprak sayısı açısından incelendiğinde en yüksek yaprak sayısı ($25,25 \pm 2,77$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 3 ve Şekil 16, 18g), en düşük yaprak sayısı ($16,65 \pm 2,80$) ise $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 16, 19g).

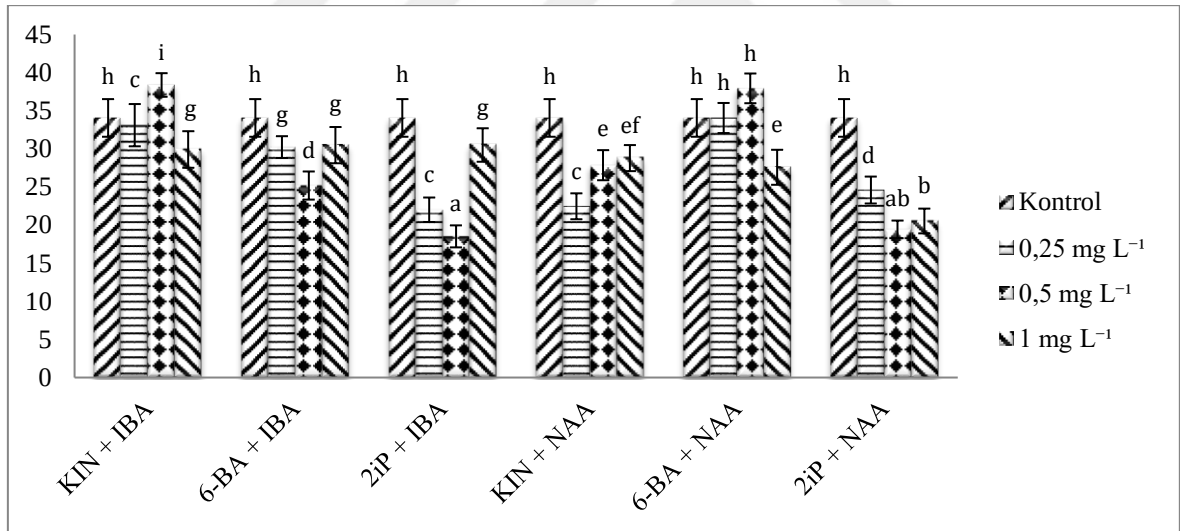
Tablo 3. *Tripleurospermum conoclinium*'da bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün çoğaltımına etkisi

Kontrol	Sitokinin (mg L ⁻¹)			Oksin (mg L ⁻¹)		Sürgün Sayısı	Sürgün Boyu (mm)	Yaprak Sayısı	Nod Sayısı	Kallus
	KIN	6-BA	2iP	IBA	NAA					
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,00 ± 0,65b	34,06 ± 2,47h	22,40 ± 1,47ef	3,00 ± 0,56de	-
	0,25			0,1		1,95 ± 0,51b	33,11 ± 2,77c	26,30 ± 2,58g	3,10 ± 0,64de	+
		0,25		0,1		2,80 ± 0,52c	30,23 ± 1,43g	26,25 ± 2,86g	3,95 ± 0,51f	+
			0,25	0,1		1,25 ± 0,44a	22,01 ± 1,61c	21,30 ± 2,11e	2,95 ± 0,51cde	+
	0,25				0,1	1,30 ± 0,47a	22,46 ± 1,70c	13,45 ± 2,87a	2,05 ± 0,60b	+
		0,25			0,1	3,20 ± 0,41e	34,05 ± 1,97h	31,85 ± 3,34i	4,65 ± 0,59g	+
			0,25		0,1	2,00 ± 0,56b	24,60 ± 1,77d	25,25 ± 2,77g	3,05 ± 0,51de	+
0,5				0,1		2,90 ± 0,31cde	38,38 ± 1,55i	26,05 ± 2,70g	4,15 ± 0,59f	++
		0,5		0,1		2,85 ± 0,49cd	25,19 ± 1,84d	28,95 ± 3,00h	4,00 ± 0,65f	++
			0,5	0,1		1,20 ± 0,41a	18,52 ± 1,44a	15,25 ± 2,45bc	2,00 ± 0,56b	++
	0,5				0,1	1,95 ± 0,51b	27,86 ± 1,97e	21,85 ± 2,66ef	3,05 ± 0,51de	++
		0,5			0,1	3,15 ± 0,37de	37,94 ± 1,95h	32,00 ± 2,43i	4,90 ± 0,64g	++
			0,5		0,1	1,90 ± 0,55b	19,44 ± 1,16ab	16,65 ± 2,80c	2,75 ± 0,44cd	++
1,0				0,1		1,90 ± 0,55b	29,92 ± 2,40fg	23,20 ± 3,24f	3,20 ± 0,52e	+++
		1,0		0,1		1,25 ± 0,44a	30,49 ± 2,38g	21,60 ± 2,28ef	1,15 ± 0,37a	+++
			1,0	0,1		1,15 ± 0,37a	30,51 ± 2,20g	19,10 ± 2,15d	1,15 ± 0,37a	+++
	1,0				0,1	1,20 ± 0,41a	28,79 ± 1,71ef	15,25 ± 2,29bc	2,60 ± 0,68c	+++
		1,0			0,1	1,15 ± 0,37a	27,58 ± 2,30e	14,50 ± 2,91ab	1,70 ± 0,47b	+++
			1,0		0,1	1,05 ± 0,22a	20,54 ± 1,62b	16,05 ± 1,99bc	1,75 ± 0,44b	+++

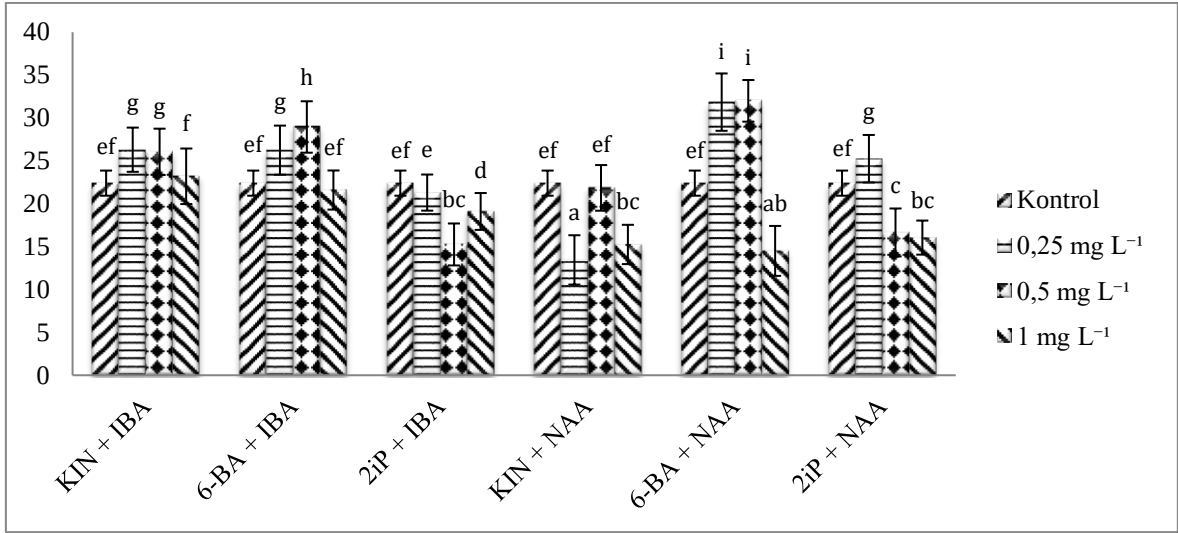
Aynı harflerle gösterilen değerler (ortalama ± standart sapma) önemli ölçüde farklı değildir (P = 0,05, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi). +++: Yüksek. ++: Orta. +: Hafif. -: Yok.



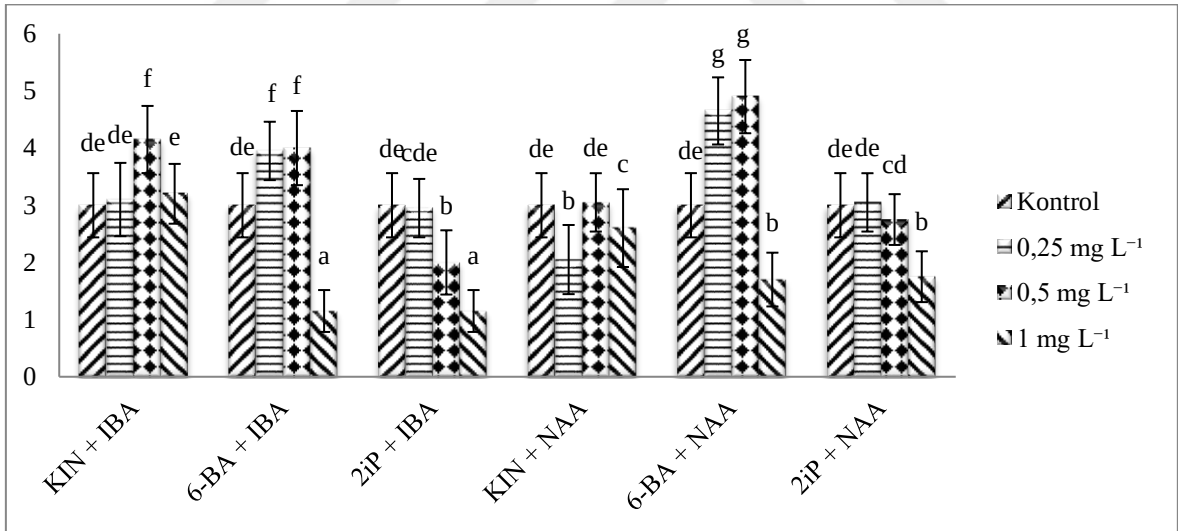
Şekil 14. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum conoclinium*'da sürgün sayısına etkisi



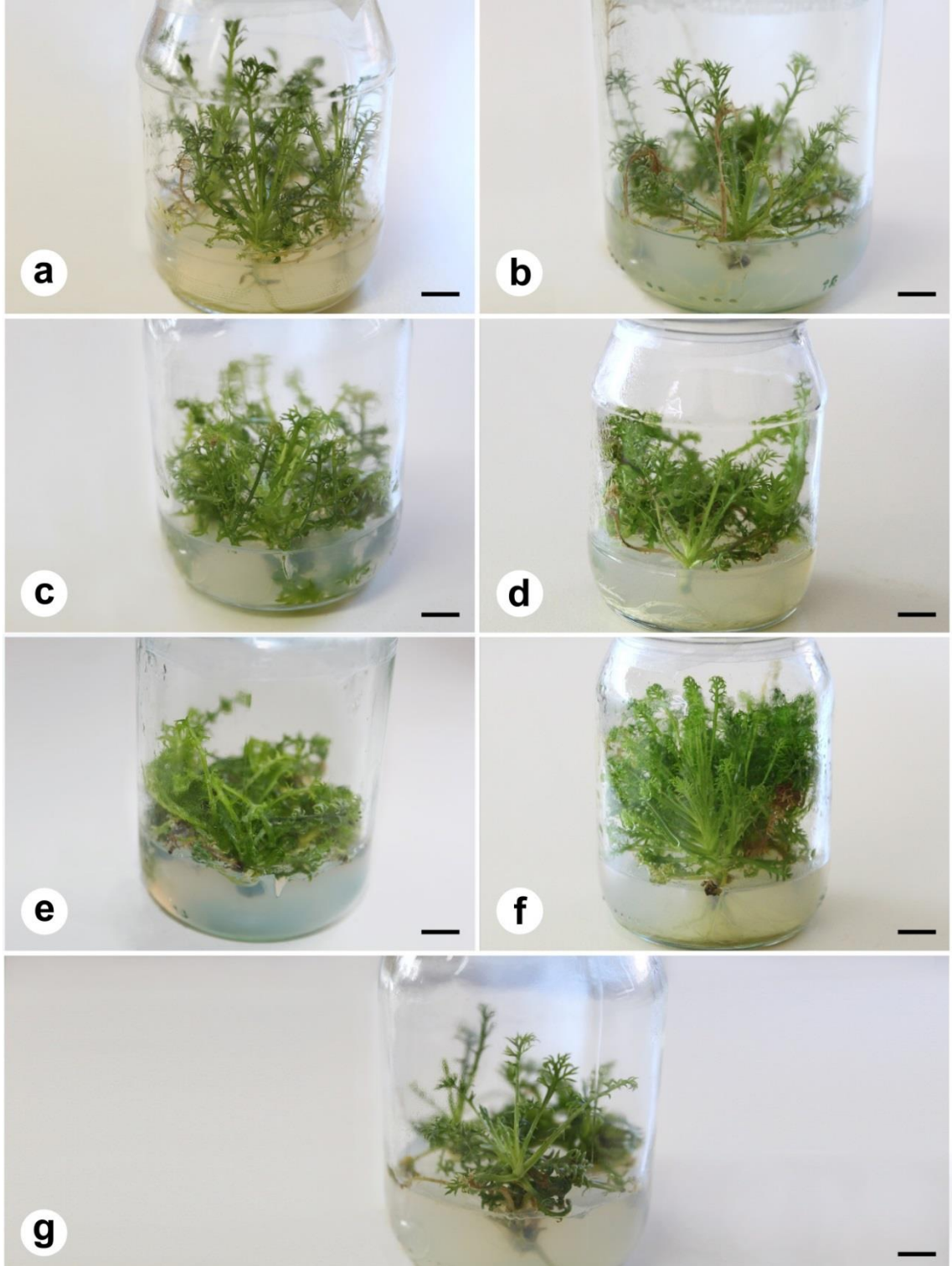
Şekil 15. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum conoclinium*'da sürgün boyuna etkisi



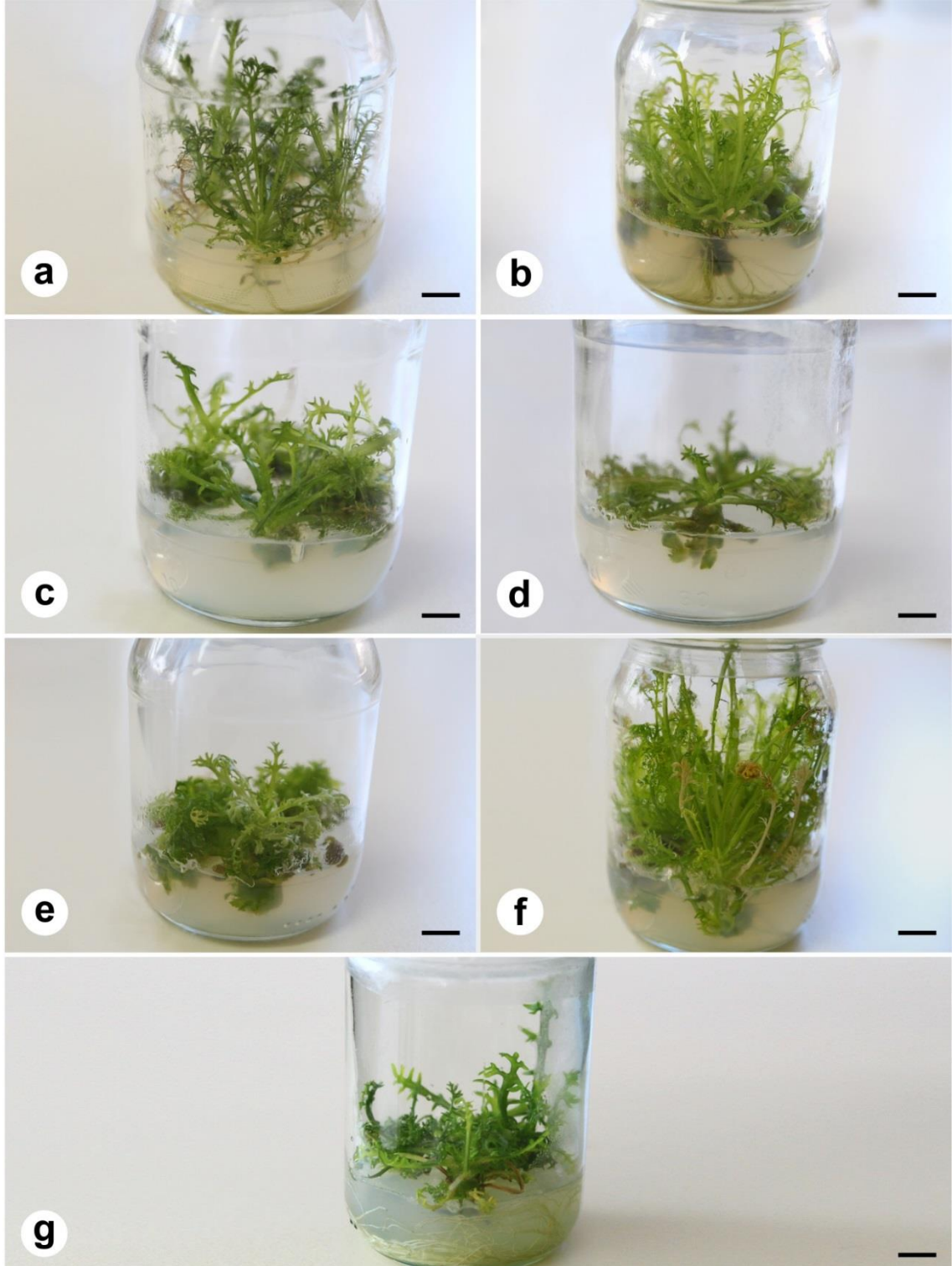
Şekil 16. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum conoclinium*'da yaprak sayısına etkisi



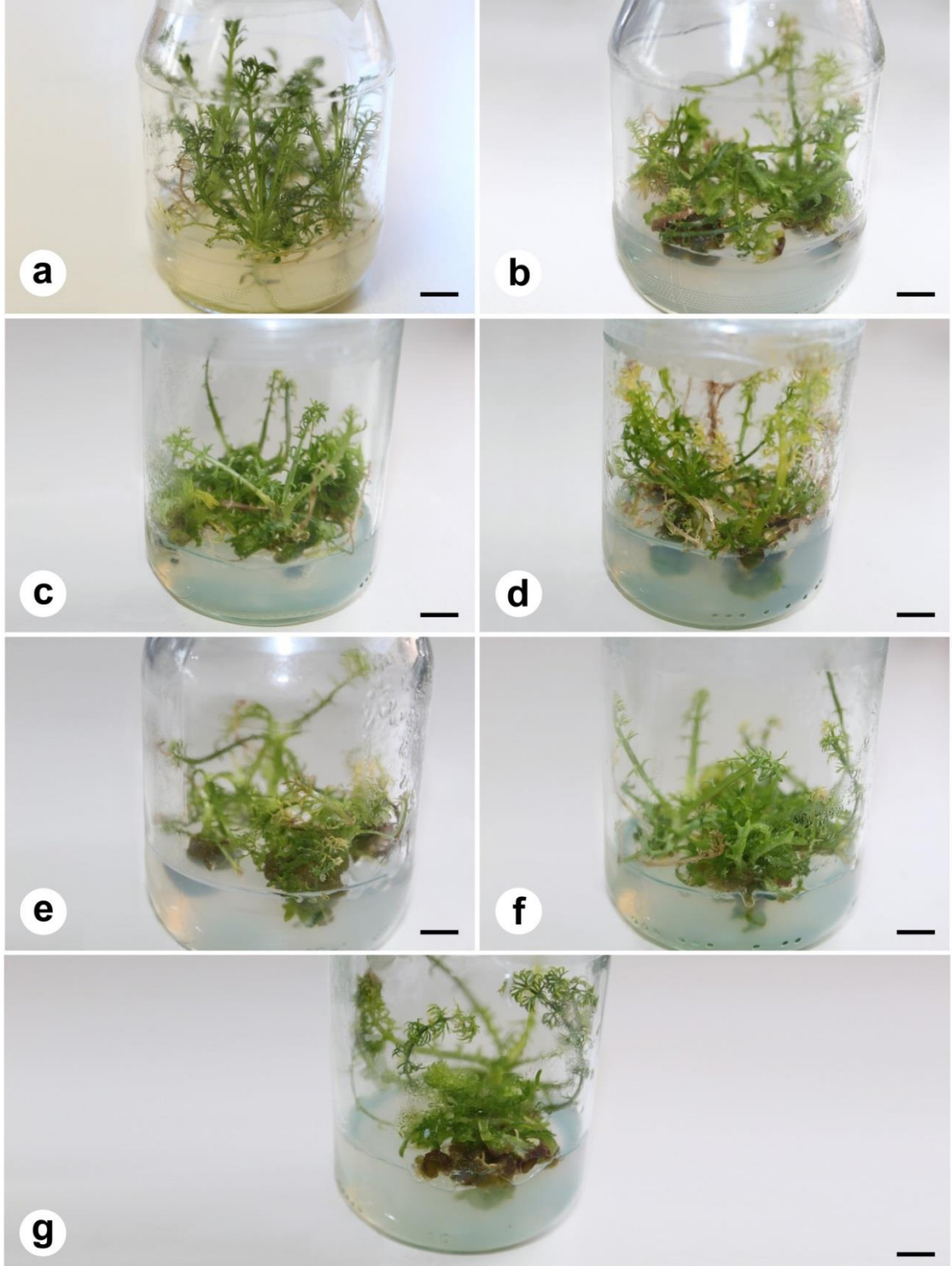
Şekil 17. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum conoclinium*'da nod sayısına etkisi



Şekil 18. *Tripleurospermum conoclinium*'da sürgün çoğaltımı. (a) Kontrol, (b) 0,25 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (d) 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 0,25 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (g) 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 3 cm



Şekil 19. *Tripleurospermum conoclinium*'da sürgün çoğaltımı. (a) Kontrol, (b) 0,5 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 0,5 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (d) 0,5 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 0,5 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 0,5 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (g) 0,5 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 3 cm



Şekil 20. *Tripleurospermum conoclinium*'da sürgün çoğaltımı. (a) Kontrol, (b) 1 mg L^{-1} KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamı, (c) 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamı, (d) 1 mg L^{-1} 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamı, (e) 1 mg L^{-1} KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı, (f) 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı, (g) 1 mg L^{-1} 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 3 cm

Tüm bitki büyüme düzenleyicileri sürgün sayısı açısından incelendiğinde en yüksek sürgün sayısının $(3,20 \pm 0,41)$ $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamında olduğu, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol grubunda sürgün sayısının $2,00 \pm 0,65$ olduğu tespit edilmiştir. En düşük sürgün sayısı ise $(1,05 \pm 0,22)$ 1 mg L^{-1} 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamında tespit edilmiştir. Sürgün boyu açısından değerlendirildiğinde tüm bitki büyüme düzenleyicileri arasında $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamından en yüksek sürgün boyu $(38,38 \pm 1,55)$ elde edilmiştir (Şekil 21). Sürgün boyunun kontrol grubunda $34,06 \pm 2,47$ olduğu tespit edilmiştir en düşük sürgün boyunun $(18,52 \pm 1,44)$ ise $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir. Nod sayısı açısından en iyi ortamın $(4,90 \pm 0,64)$ $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamı olduğu bu oranın kontrol grubunda $3,00 \pm 0,56$ ve en düşük nod sayısının $(1,15 \pm 0,37)$ ise 1 mg L^{-1} 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA ve 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamlarında olduğu tespit edilmiştir. Tüm bitki büyüme düzenleyicileri yaprak sayısı açısından incelendiğinde en yüksek yaprak sayısının $(32,00 \pm 2,43)$ $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamında, en düşük yaprak sayısının $(13,45 \pm 2,87)$ ise $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamında olduğu bu oranın kontrol grubunda $22,40 \pm 1,47$ olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3).



Şekil 21. *Tripleurospermum conoclinium* 0,5 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı

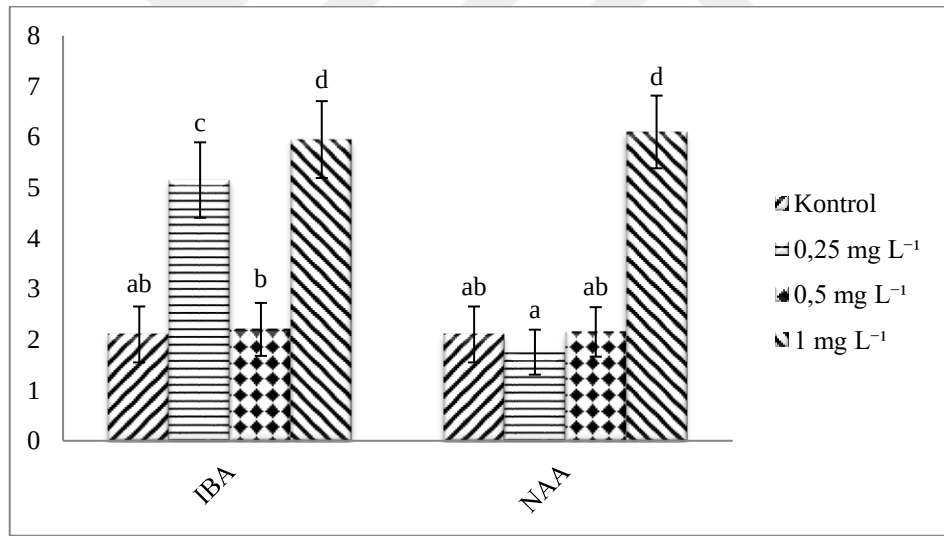
3.1.3. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Köklenme Üzerine Etkisi

IBA ve NAA içeren MS besiyerleriyle oluşturulan köklenme ortamlarında; en yüksek kök sayısı ($6,10 \pm 0,72$) 1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 4 ve Şekil 22, 25g), en düşük kök sayısı ($1,75 \pm 0,44$) ise 0,25 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 4 ve Şekil 22, 25c). Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında kök sayısının $2,10 \pm 0,55$ olduğu tespit edilmiştir. Kök boyu açısından tüm ortamlar arasında en verimli ortamın en yüksek kök boyu ($88,52 \pm 3,84$) ile 1 mg L⁻¹ IBA olduğu (Tablo 4 ve Şekil 23, 25f), bu oranın kontrol grubunda $62,83 \pm 3,76$ olduğu, en düşük kök boyunun ($28,06 \pm 3,27$) ise 0,25 mg L⁻¹ NAA ortamında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4 ve Şekil 23, 25c). Tüm köklendirme ortamları arasında en yüksek sekonder kök sayısı ($14,10 \pm 0,55$) bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamından elde edilirken (Tablo 4 ve Şekil 21, 22a) en düşük sekonder kök sayısı ($3,10 \pm 0,31$) 0,5 mg L⁻¹ NAA ortamından elde edilmiştir (Tablo 4 ve Şekil 23, 25e).

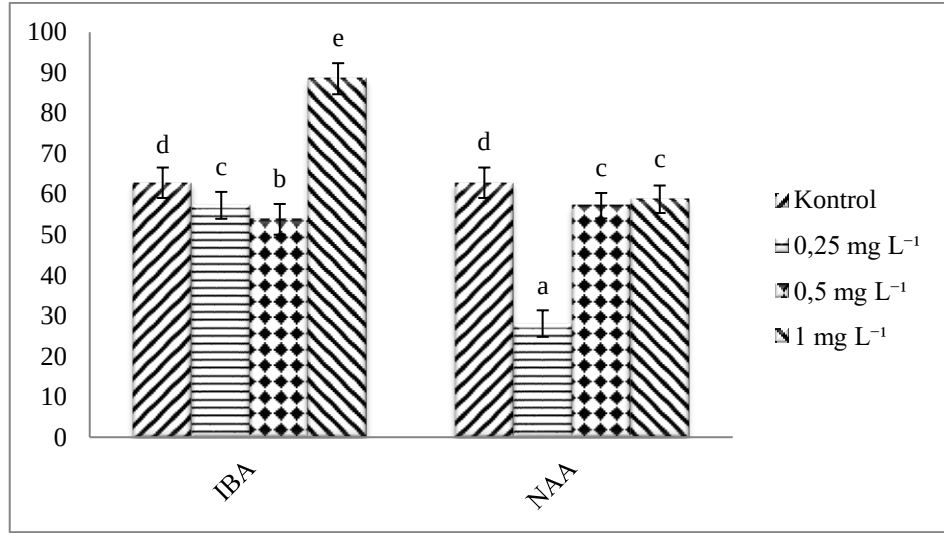
Tablo 4. *Tripleurospermum conoclinium*'da bitki büyüme düzenleyicilerinin köklenmeye etkisi

Kontrol	IBA (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	Kök sayısı	Kök boyu (mm)	Sekonder kök sayısı
0,0	0,0	0,0	2,10 ± 0,55ab	62,83 ± 3,76d	14,10 ± 0,55f
	0,25		5,15 ± 0,75c	57,25 ± 3,32c	6,20 ± 0,62c
	0,5		2,20 ± 0,52b	53,80 ± 3,79b	3,90 ± 0,31b
	1,0		5,95 ± 0,76d	88,52 ± 3,84e	12,00 ± 0,65d
		0,25	1,75 ± 0,44a	28,06 ± 3,27a	4,10 ± 0,55b
		0,5	2,15 ± 0,49ab	57,16 ± 3,15c	3,10 ± 0,31a
		1,0	6,10 ± 0,72d	58,76 ± 3,39c	13,00 ± 0,56e

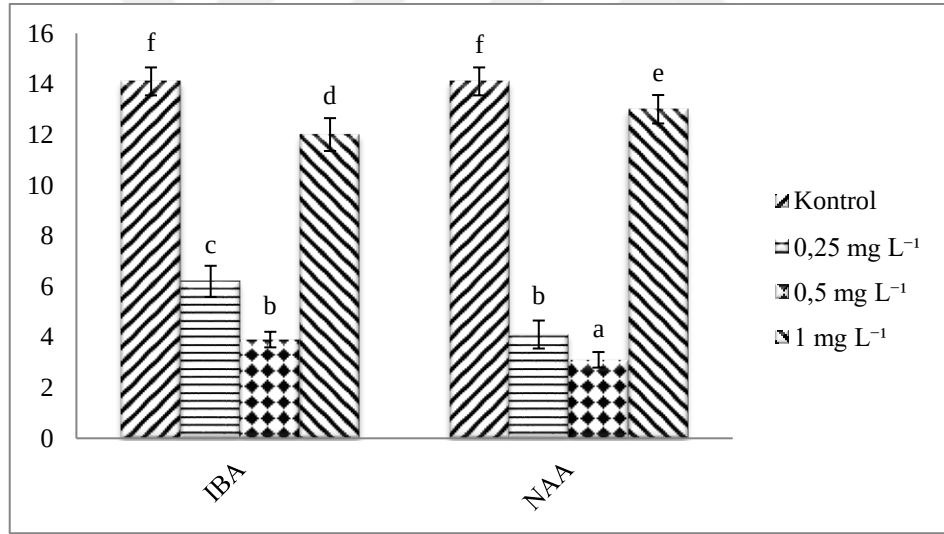
Aynı harflerle gösterilen değerler (ortalama ± standart sapma) önemli ölçüde farklı değildir (P = 0,05, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi).



Şekil 22. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum conoclinium*'da kök sayısına etkisi



Şekil 23. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum conoclinium*'da kök boyuna etkisi



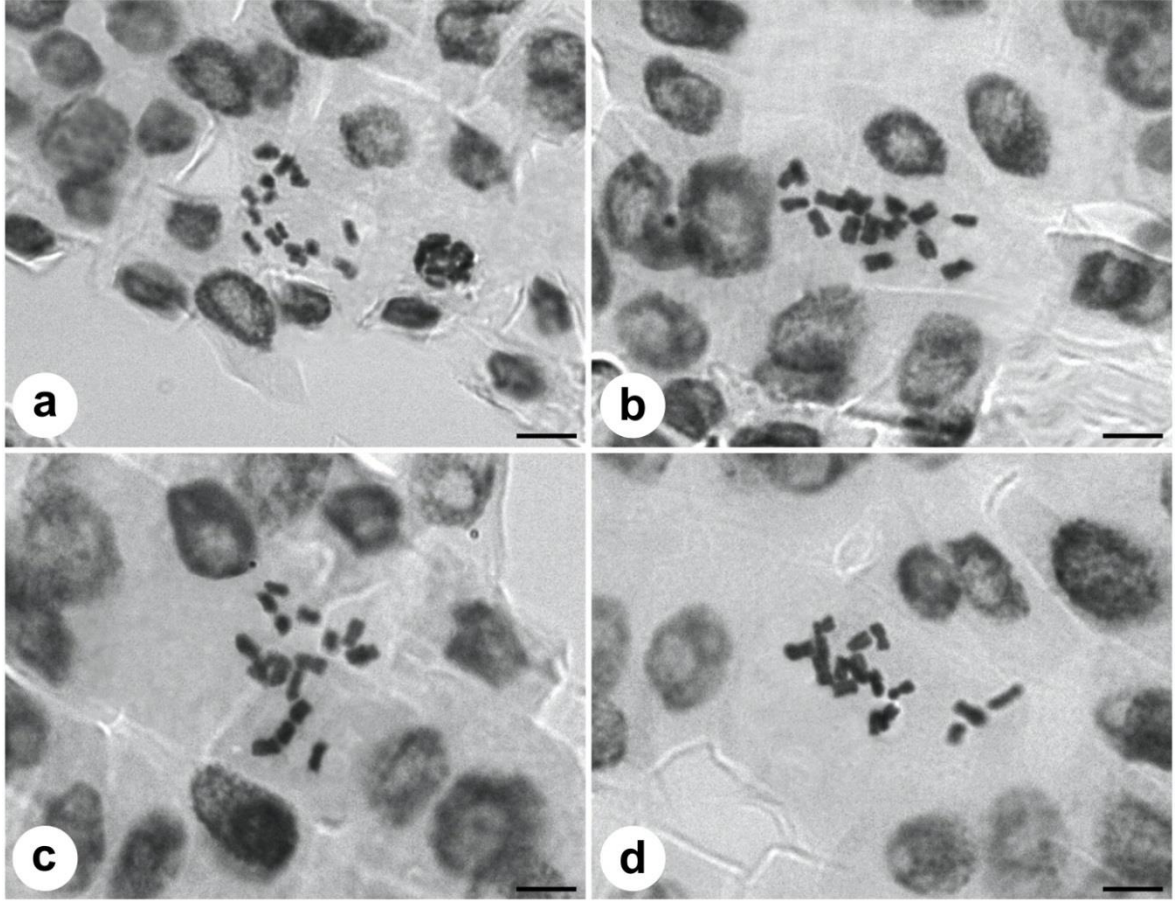
Şekil 24. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum conoclinium*'da sekonder kök sayısına etkisi



Şekil 25. *Tripleurospermum conoclinium*'da köklendirme. (a) Kontrol, (b) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamı, (c) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı, (d) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamı, (e) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı, (f) 1 mg L^{-1} IBA içeren MS ortamı, (g) 1 mg L^{-1} NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 2 cm

3.1.4. Kromozom Sayımı

In vitro ortamda köklendirme aşamasındaki bitkilerin kromozom sayımı yapılmıştır, oksin içeren veya içermeyen her bir deneme grubunda kromozom sayısının $2n = 2x = 18$ olduğu tespit edilmiştir. Bütün deneme gruplarında kromozom sayısının sabit olduğu herhangi bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. *Tripleurospermum conoclinium*'da mitotik metafaz ($2n=18$). (a) Kontrol, (b) 1 mg L^{-1} IBA, (c) 1 mg L^{-1} NAA, (d) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ IBA. Ölçekler: $5 \text{ }\mu\text{m}$

3.1.5. Aklimatizasyon

In vitro ortamda köklenen bitkiler, Hoogland içeren vermikülit ortamlarında gelişimlerini sağlıklı bir şekilde sürdürmüş olup bu ortamda başarılı bir şekilde adaptasyonu sağlanmıştır (Şekil 27, 29a).



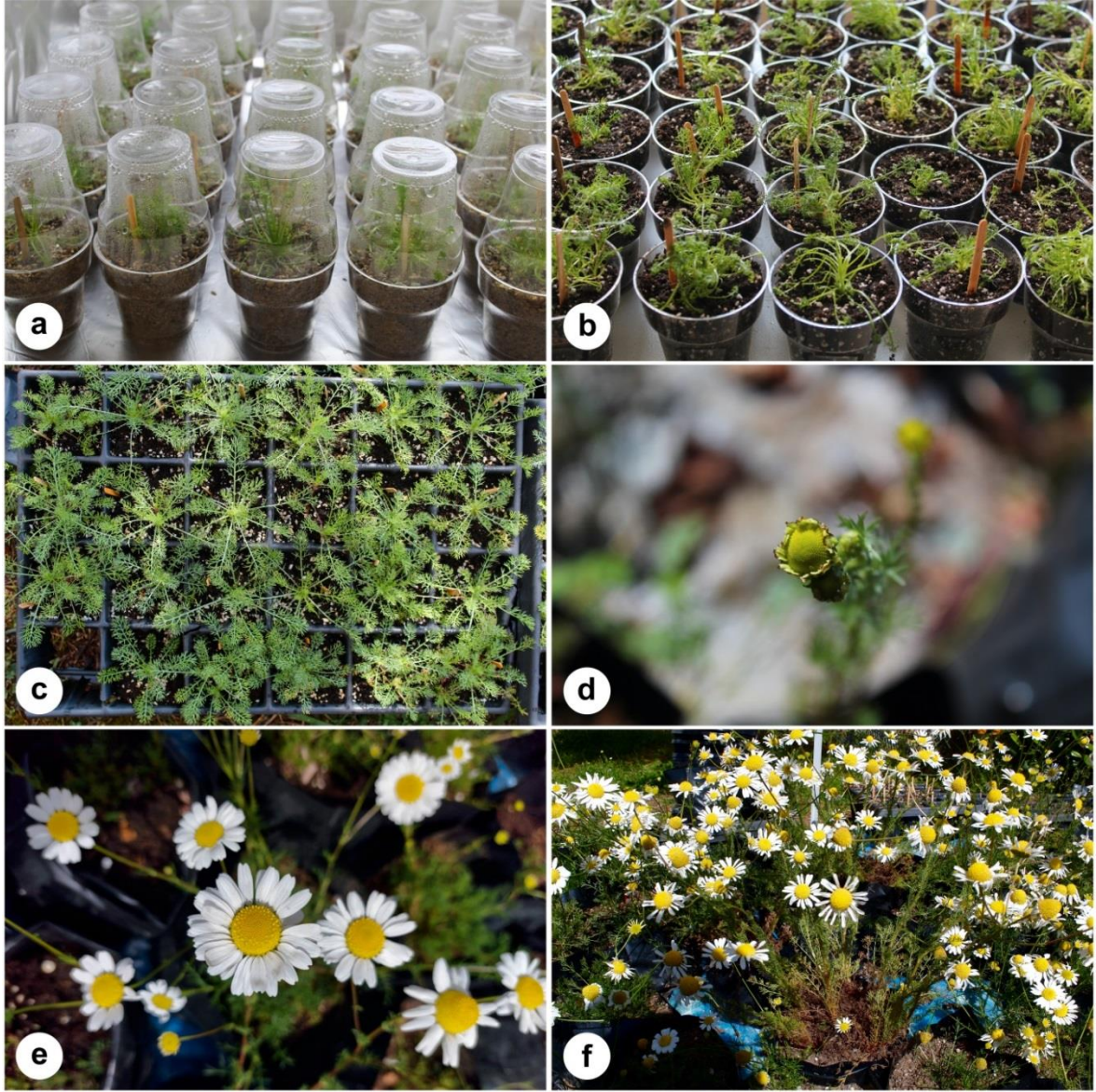
Şekil 27. *Tripleurospermum conoclinium* vermikülit ortamı

Ex vitro ortamda sağlıklı ve iyi gelişmiş olan bitkiler, otuz günün sonunda 1:1 (v/v) oranında turba ve orman toprağı içeren karışıma koyularak botanik bahçesine aktarılmıştır (Şekil 29b-c). Botanik bahçesinde bitkiler gelişimlerini sürdürmeye devam etmiş, bitkilerin %95 başarı ile bu ortama uyum sağladığı tespit edilmiştir.



Şekil 28. *Tripleurospermum conoclinium* çiçeklenme evresi

Botanik bahçesine başarılı bir şekilde adapte olup gelişimini sürdüren bitkilerin ikinci yılında çiçeklenmeye başladığı gözlenmiştir (Şekil 28, 29d-f). İlk çiçeklenmenin ise dış ortama aktarıldıktan 340 gün sonra gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 29d). Çiçeklenme evresini tamamlayan bitkiler aken oluşturmuştur (Şekil 30). Oluşan akenlerin müsilaaj içerdiği gözlenmiştir.



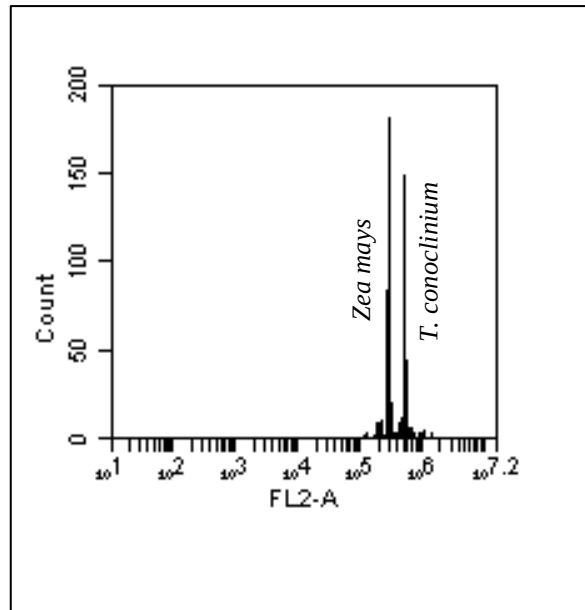
Şekil 29. *Tripleurospermum conoclinium*'da aklimatizasyon aşamaları. (a) *Ex vitro* ortam yedinci gün, (b) *Ex vitro* ortam on dördüncü gün, (c) Botanik bahçesi, (d) Botanik bahçesi çiçeklenme başlangıcı, (e-f) Çiçeklenme evresi



Şekil 30. *Tripleurospermum conoclinium*'un *ex situ* koleksiyonlarından elde edilen akenleri. Ölçek: 2 mm

3.1.6. Akım Sitometrik Analiz

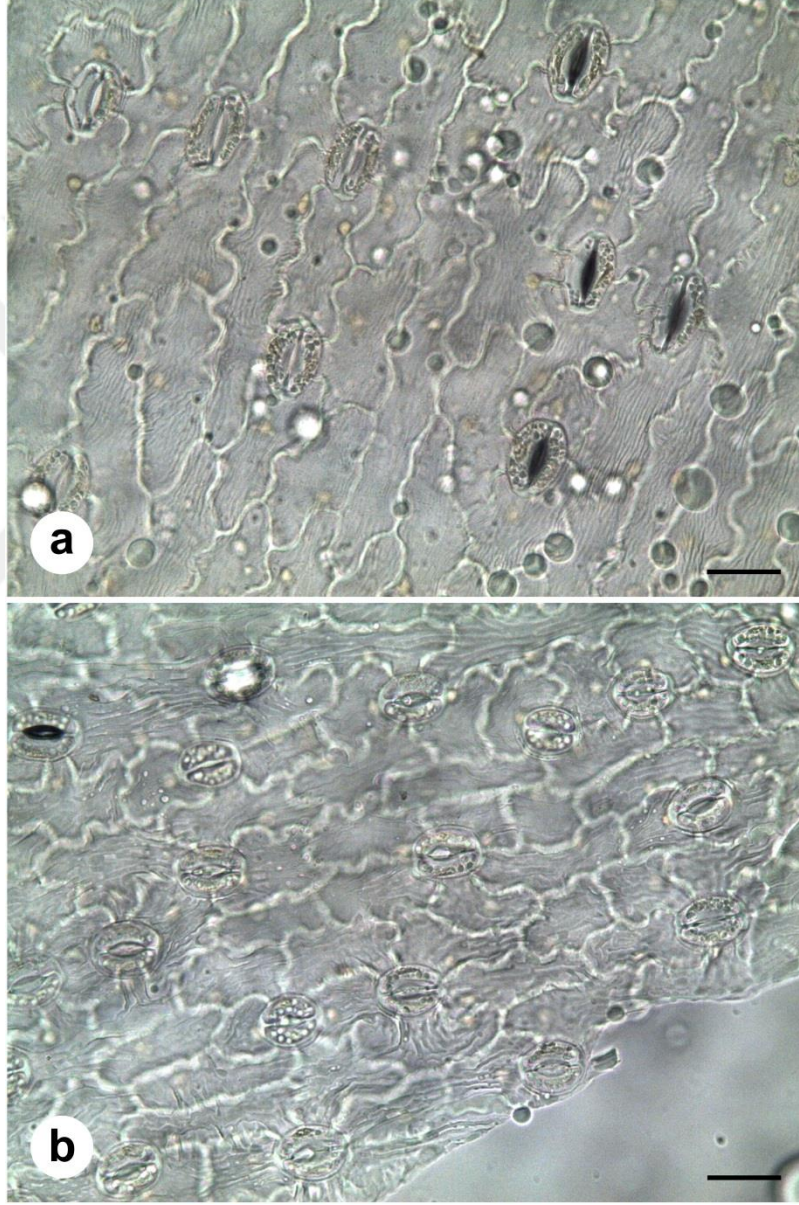
In vitro 'da büyütülüp aklimatizasyonu yapılmış bitkilerin nuklear DNA analizlerinde nuklear DNA miktarında herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır. Nuklear DNA miktarı 5,40 pg/2C olup, 5281,2 Mbp/2C'dir. 1C - değeri ise 2,70 pg olup 2640,6 Mbp/2C'dir (Şekil 31). 1pg = 978 Mbp (Doležel vd., 2003).



Şekil 31. *Tripleurospermum conoclinium*'un akım sitometrik histogramı

3.1.7. Stoma Özellikleri

Yapraklar amfistomatik ve stomalar anomositik tiptedir. Yaprığın üst yüzeyindeki stomalar $29,30 \pm 0,75 \mu\text{m}$, alt yüzeyindeki stomalar $29,45 \pm 1,15 \mu\text{m}$ uzunluğundadır (Şekil 32).

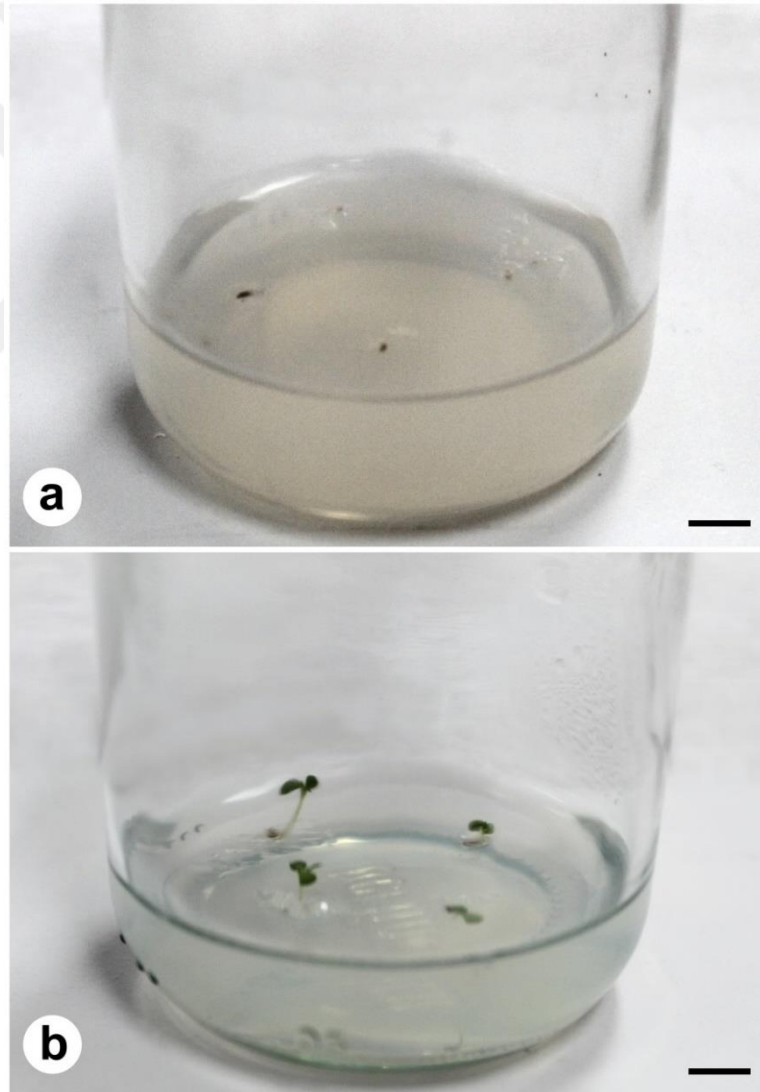


Şekil32. *Tripleurospermum conoclinium*'un stoma görüntüleri. (a) Yaprak üst yüzeyinden yüzeysel kesit, (b) Yaprak alt yüzeyinden yüzeysel kesit. Ölçekler: 30 μm

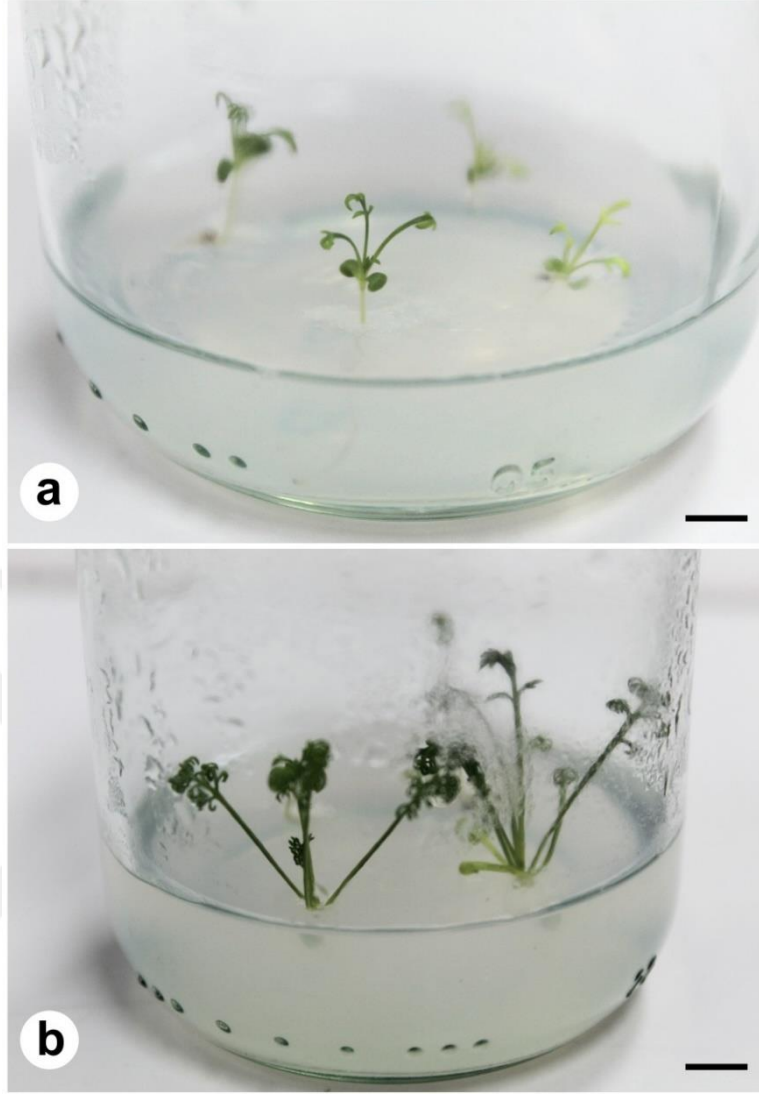
3.2. *Tripleurospermum hygrophilum* (Bornm.) Bornm.

3.2.1. Aken Çimlendirme

Bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS besiyeri ortamda *T. hygrophilum* akenlerinde ilk çimlenme beşinci günde tespit edilirken maksimum çimlenme yüzdesine iki haftanın sonunda ulaşılmıştır. Çimlenen akenlerde kontaminasyon gözlenmemiştir. *Tripleurospermum hygrophilum*'un çimlenme yüzdesi %92 olarak elde edilmiştir (Şekil 33, 34).



Şekil 33. *Tripleurospermum hygrophilum*'da kültür başlangıç aşaması. (a) *In vitro* aken çimlenmesi, (b) Yedinci gün. Ölçekler: 3 cm



Şekil 34. *Tripleurospermum hygrophilum*'da kültür başlangıç aşaması. (a) Ondördüncü gün, (b) Otuzuncu gün. Ölçekler: 3 cm

3.2.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Sürgün Çoğaltımına Etkisi

KIN'in IBA ve NAA ile kombinasyonlarından oluşan MS besiyerlerinde en yüksek sürgün sayısı ($2,25 \pm 0,55$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 5 ve Şekil 35, 40b), en düşük sürgün sayısı ($1,20 \pm 0,41$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 35, 40e). En yüksek sürgün boyu ($37,37 \pm 3,11$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 5 ve Şekil 36, 40b), en düşük sürgün boyu ($29,51 \pm 2,13$) ise 1 mg L^{-1} KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamında tespit edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 38, 41e). Nod sayısı verilerine göre en yüksek nod sayısı ($4,20 \pm 0,77$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$

KIN + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 5 ve Şekil 40, 40b), en düşük nod sayısı ($2,25 \pm 0,64$) 0,5 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamında bulunmuştur (Tablo 5 ve Şekil 38, 40e). En yüksek yaprak sayısı ($30,25 \pm 2,12$) 1 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 5 ve Şekil 30, 34e), en düşük yaprak sayısı ($21,60 \pm 2,54$) ise 0,5 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 37, 40e).

6-BA'nın IBA ve NAA ile kombinasyonundan oluşan MS besiyerlerinde en yüksek sürgün sayısı ($2,90 \pm 0,55$) 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 5 ve Şekil 35, 39c), en düşük sürgün sayısı ($1,25 \pm 0,44a$) ise 1 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 35, 41c). Sürgün boyuna etkisine bakıldığında en yüksek sürgün boyuna ($39,43 \pm 2,15$) 0,5 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 5 ve Şekil 36, 40c), en düşük sürgün boyuna ($26,88 \pm 1,91$) ise 1 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamında ulaşılmıştır (Tablo 5 ve Şekil 36, 41f). Nod sayısı açısından değerlendirildiğinde en yüksek nod sayısı ($3,90 \pm 0,85$) 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 5 ve Şekil 38, 39c), en düşük nod sayısı ($2,10 \pm 0,64$) ise 1 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamında tespit edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 38, 41f). En yüksek yaprak sayısı ($26,55 \pm 2,33$) 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 5 ve Şekil 37, 39c), en düşük yaprak sayısı ($19,50 \pm 1,67$) ise 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 37, 39c).

2iP'in IBA ve NAA ile kombinasyonundan oluşan MS besiyerlerinde en yüksek sürgün sayısı ($1,65 \pm 0,49$) 0,5 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 5 ve Şekil 35, 40g), en düşük sürgün sayısı ($1,10 \pm 0,31$) ise 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA ve 0,5 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamlarından elde edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 35, 40d). En yüksek sürgün boyu ($33,89 \pm 2,52$) 1 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 5 ve Şekil 36, 41g), en düşük sürgün boyu ($28,21 \pm 1,84$) ise 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamında tespit edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 36, 40d). En yüksek nod sayısı ($2,85 \pm 0,75$) 0,5 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA ve 1 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 5 ve Şekil 38, 40g), en düşük nod sayısı ($1,75 \pm 0,44$) ise 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamında bulunmuştur (Tablo 5 ve Şekil 38, 39g). Yaprak sayısı açısından incelendiğinde en yüksek yaprak sayısı ($28,40 \pm$

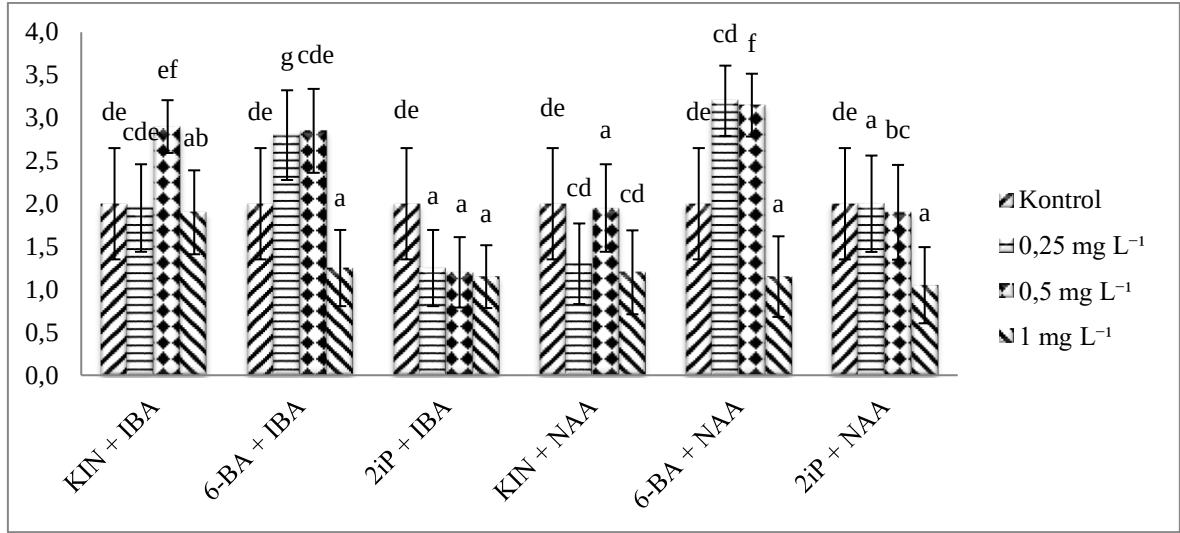
2,30) 1 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 5 ve Şekil 37, 41d), en düşük yaprak sayısı (12,95 ± 1,73) ise 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 37, 39g).



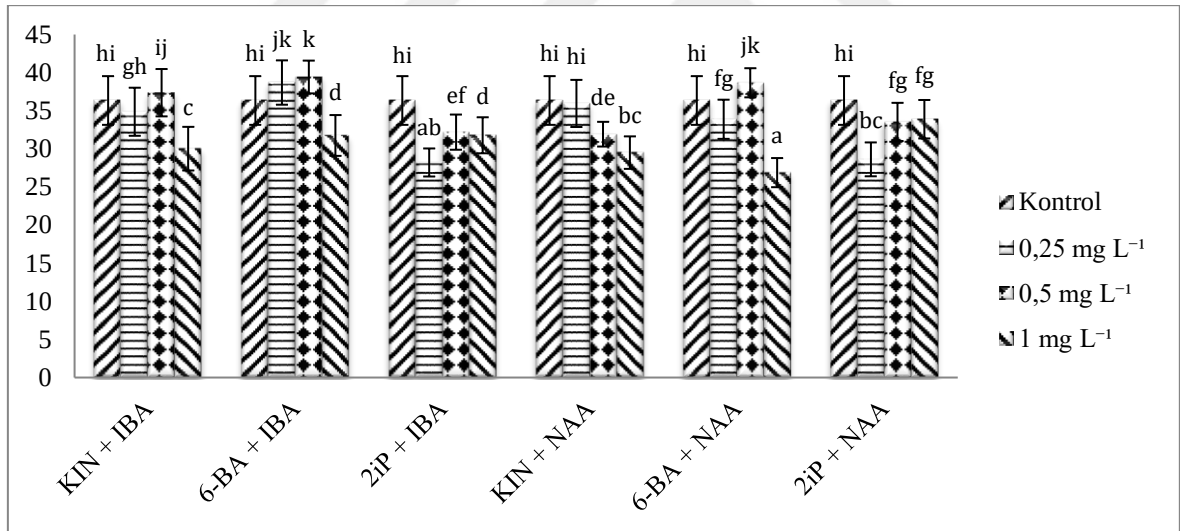
Tablo 5. *Tripleurospermum hygrophilum*'da bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün çoğaltımına etkisi

Kontrol	Sitokinin (mg L ⁻¹)			Oksin (mg L ⁻¹)		Sürgün Sayısı	Sürgün Boyu (mm)	Yaprak Sayısı	Nod Sayısı	Kallus
	KIN	6-BA	2iP	IBA	NAA					
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,00 ± 0,56de	36,34 ± 3,20hi	25,55 ± 2,78hi	3,10 ± 0,72e	-
	0,25			0,1		1,95 ± 0,51cde	34,87 ± 3,15gh	28,55 ± 2,82j	2,80 ± 0,70de	+
		0,25		0,1		2,90 ± 0,55g	38,70 ± 2,91jk	26,55 ± 2,33i	3,90 ± 0,85gh	+
			0,25	0,1		1,20 ± 0,41a	28,21 ± 1,84ab	13,35 ± 1,76a	1,90 ± 0,55ab	+
	0,25				0,1	1,85 ± 0,59cd	35,96 ± 3,09hi	28,20 ± 2,26j	3,60 ± 0,68fg	+
		0,25			0,1	1,90 ± 0,55cd	33,88 ± 2,57fg	19,50 ± 1,67d	3,05 ± 0,76de	+
			0,25		0,1	1,10 ± 0,31a	28,62 ± 2,22bc	12,95 ± 1,73a	1,75 ± 0,44a	+
	0,5			0,1		2,25 ± 0,55ef	37,37 ± 3,11ij	21,00 ± 1,89e	4,20 ± 0,77h	++
		0,5		0,1		1,95 ± 0,60cde	39,43 ± 2,15k	20,40 ± 1,39de	3,10 ± 0,64e	++
			0,5	0,1		1,10 ± 0,31a	32,19 ± 2,31def	14,95 ± 1,99b	2,05 ± 0,69ab	++
	0,5				0,1	1,20 ± 0,41a	31,93 ± 1,62de	21,60 ± 2,54efg	2,25 ± 0,64bc	++
		0,5			0,1	2,35 ± 0,49f	38,67 ± 1,91jk	21,35 ± 1,90ef	3,25 ± 0,72ef	++
			0,5		0,1	1,65 ± 0,49bc	33,53 ± 2,50efg	18,15 ± 1,76c	2,85 ± 0,75de	++
	1,0			0,1		1,35 ± 0,49ab	30,03 ± 2,86c	24,30 ± 1,84h	2,30 ± 0,66bc	+++
		1,0		0,1		1,25 ± 0,44a	31,76 ± 2,68d	22,95 ± 1,96g	2,15 ± 0,59abc	+++
			1,0	0,1		1,15 ± 0,37a	31,78 ± 2,36d	28,40 ± 2,30j	2,85 ± 0,75de	+++
	1,0				0,1	1,85 ± 0,49cd	29,51 ± 2,13bc	30,25 ± 2,12k	2,60 ± 0,68cd	+++
		1,0			0,1	1,30 ± 0,47a	26,88 ± 1,91a	22,55 ± 2,21fg	2,10 ± 0,64ab	+++
			1,0		0,1	1,25 ± 0,44a	33,89 ± 2,52fg	26,05 ± 2,50i	2,00 ± 0,65ab	+++

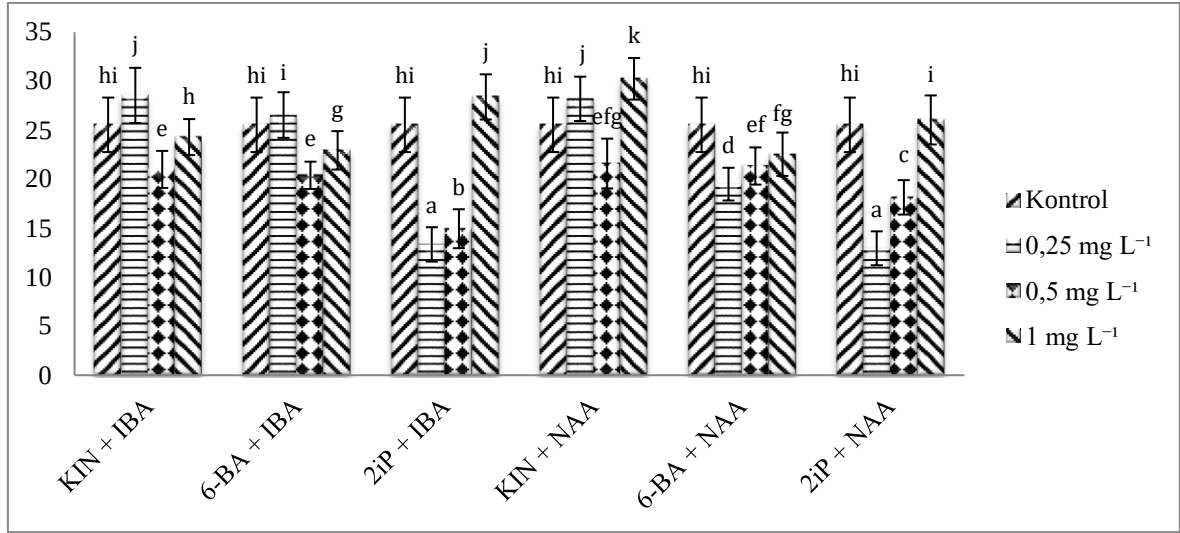
Aynı harflerle gösterilen değerler (ortalama ± standart sapma) önemli ölçüde farklı değildir (P = 0,05, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi). +++: Yüksek. ++: Orta. +: Hafif. -: Yok.



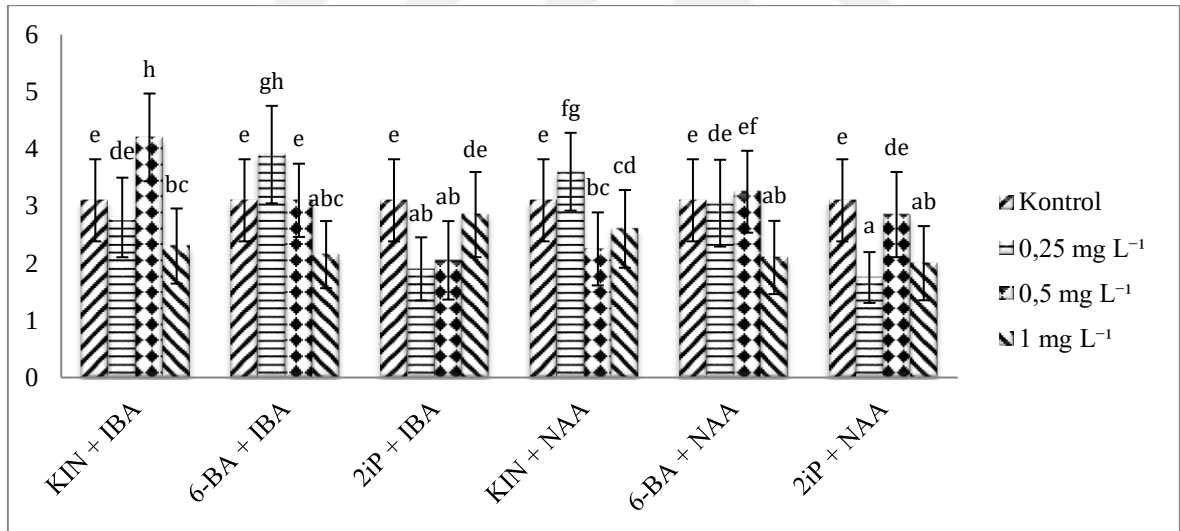
Şekil 35. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum hygrophilum*'da sürgün sayısına etkisi



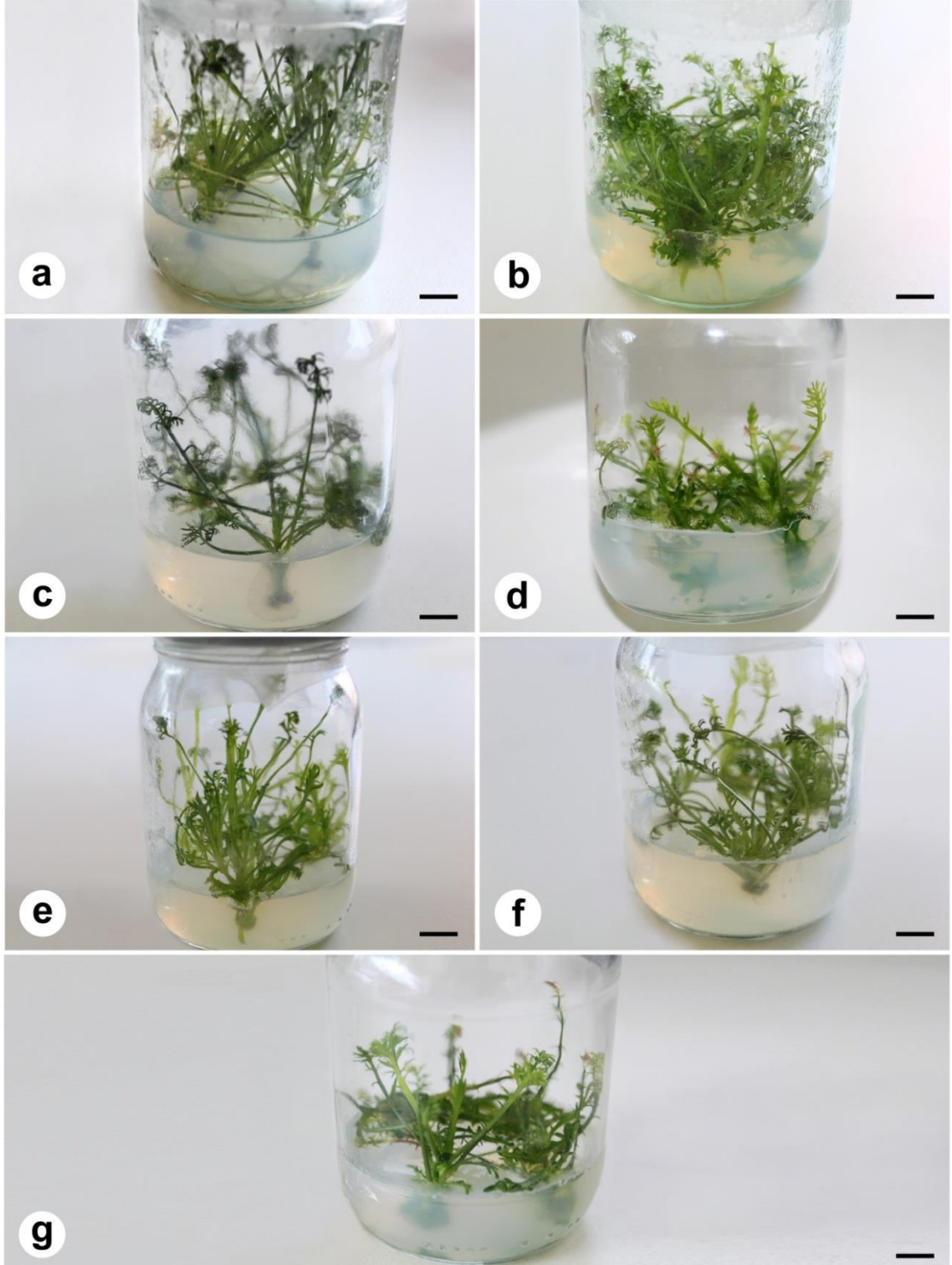
Şekil 36. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum hygrophilum*'da sürgün boyuna etkisi



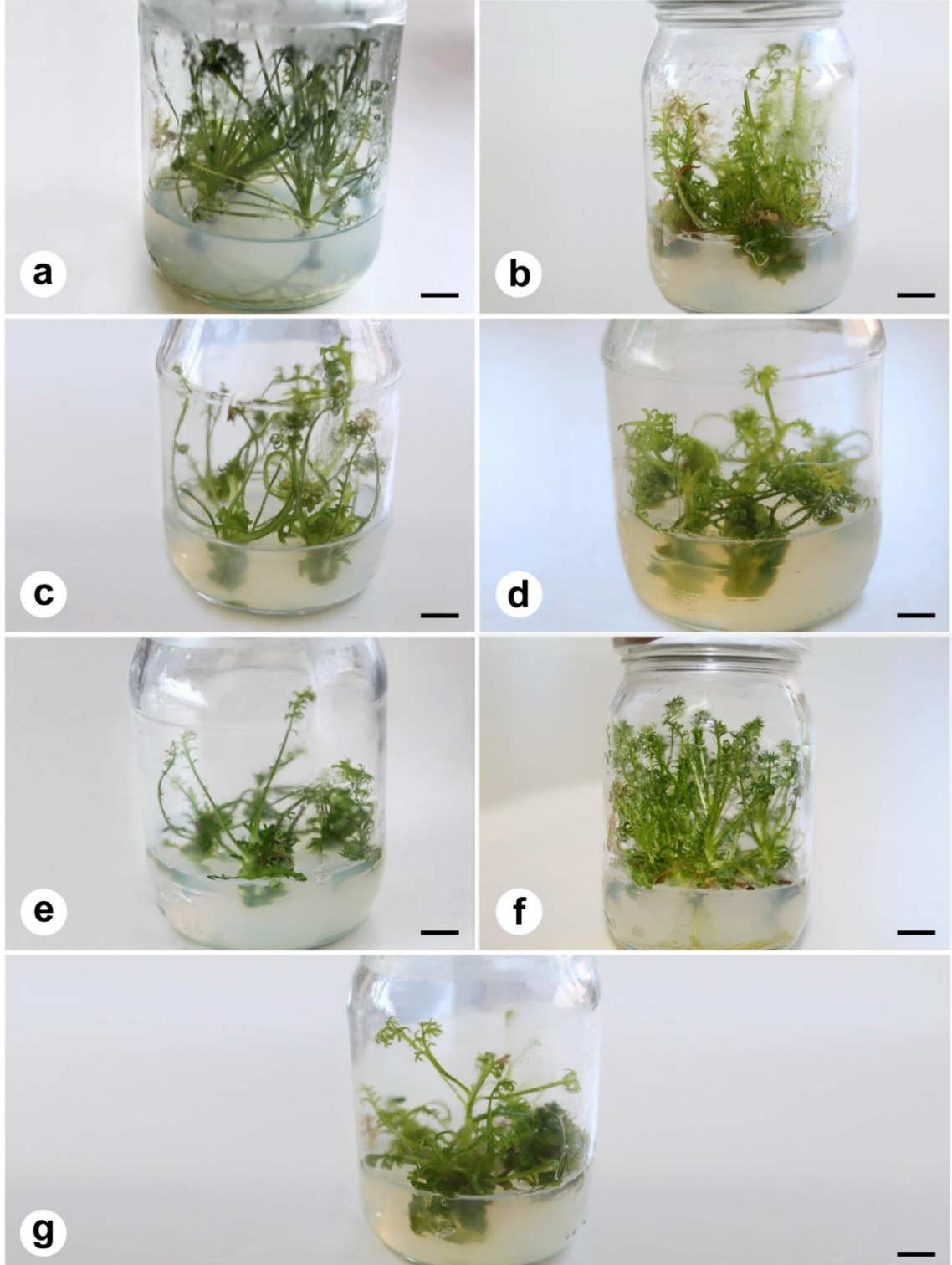
Şekil 37. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum hygrophilum*'da yaprak sayısına etkisi



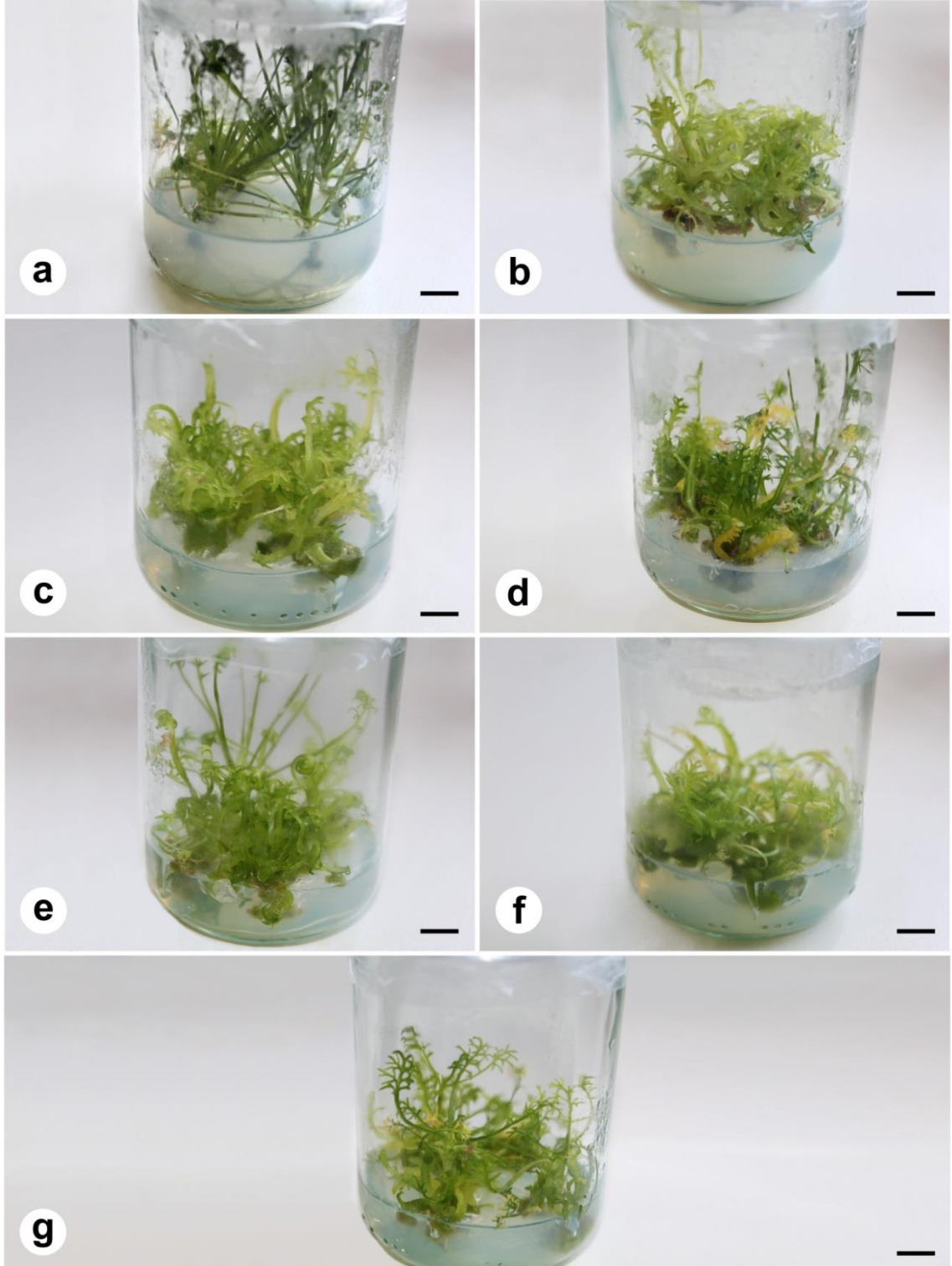
Şekil 38. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum hygrophilum*'da nod sayısına etkisi



Şekil 39. *Tripleurospermum hygrophilum*'un sürgün çoğaltımı. (a) Kontrol, (b) 0,25 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (d) 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 0,25 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (g) 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 3 cm



Şekil 40. *Tripleurospermum hygrophilum*'un sürgün çoğaltımı. (a) Kontrol, (b) 0,5 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 0,5 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (d) 0,5 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 0,5 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 0,5 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (g) 0,5 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 3 cm



Şekil 41. *Tripleurospermum hygrophilum*'un sürgün çoğaltımı. (a) Kontrol, (b) 1 mg L^{-1} KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamı, (c) 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamı, (d) 1 mg L^{-1} 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamı, (e) 1 mg L^{-1} KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı, (f) 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı, (g) 1 mg L^{-1} 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 3 cm

Tüm bitki büyüme düzenleyicileri sürgün sayısı açısından incelendiğinde en yüksek sürgün sayısının $(2,90 \pm 0,55)$ $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında olduğu (Şekil 42), bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol grubunda sürgün sayısının $2,00 \pm 0,56$ olduğu tespit edilmiştir. En düşük sürgün sayısı ise $(1,10 \pm 0,31)$ $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ve $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında tespit edilmiştir. Sürgün boyu açısından değerlendirildiğinde tüm bitki büyüme düzenleyicileri arasında $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamından en yüksek sürgün boyu $(39,43 \pm 2,15)$ elde edilmiştir. Sürgün boyunun kontrol grubunda $36,34 \pm 3,20$ olduğu tespit edilmiştir en düşük sürgün boyunun $(18,52 \pm 1,44)$ ise 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir. Nod sayısı $(4,20 \pm 0,77)$ açısından en iyi ortamın $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamı olduğu bu oranın kontrol grubunda $3,10 \pm 0,72$ ve en düşük nod sayısının $(1,75 \pm 0,44)$ ise $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamında olduğu tespit edilmiştir. Tüm bitki büyüme düzenleyicileri yaprak sayısı açısından incelendiğinde en yüksek yaprak sayısının $(30,25 \pm 2,12)$ 1 mg L^{-1} KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamında, en düşük yaprak sayısının $(12,95 \pm 1,73)$ ise $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamında olduğu bu oranın kontrol grubunda $25,55 \pm 2,78$ olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5).



Şekil 42. *Tripleurospermum hygrophilum* 0,5 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı

3.2.3. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Köklenme Üzerine Etkisi

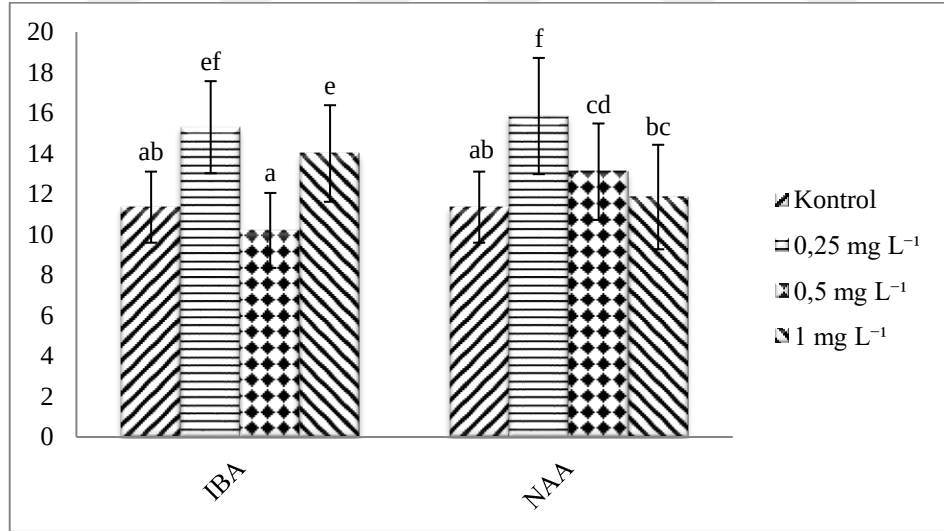
IBA ve NAA içeren MS besiyerleriyle oluşturulan köklenme ortamlarında; en yüksek kök sayısı ($15,85 \pm 2,87$) 0,25 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamında (Tablo 6 ve Şekil 44, 47c), en düşük kök sayısı ($10,20 \pm 1,85$) ise 0,5 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir (Tablo 6 ve Şekil 43, 46d). Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında kök sayısının $11,35 \pm 1,76$ olduğu tespit edilmiştir. Kök boyu açısından tüm ortamlar arasında en verimli ortamın en yüksek kök boyu ($50,89 \pm 2,89$) ile 0,25 mg L⁻¹ NAA olduğu (Tablo 6 ve Şekil 44, 46c), bu oranın kontrol grubunda $45,65 \pm 2,61$ en düşük kök boyunun ($23,49 \pm 3,14$) ise 1 mg L⁻¹ NAA ortamında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6 ve Şekil 44, 46g). Tüm köklendirme ortamları arasında en yüksek sekonder kök sayısı ($15,85 \pm 1,81$) 0,25 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamından (Tablo 6 ve Şekil 45, 46b), en düşük sekonder kök sayısı ($6,45 \pm 1,85$) ise 1 mg L⁻¹ NAA ortamından elde edilmiştir (Tablo 6 ve Şekil 45, 46g). Bitki büyüme düzenleyicisi

içermeyen kontrol ortamında sekonder kök sayısı $12,25 \pm 2,55$ olarak tespit edilmiştir (Tablo 6 ve Şekil 45, 46a).

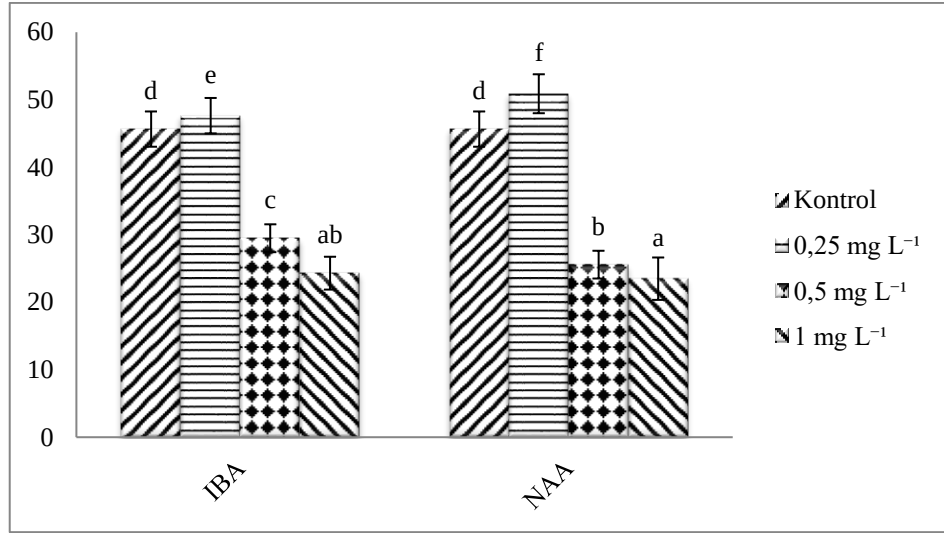
Tablo 6. *Tripleurospermum hygrophilum*'da bitki büyüme düzenleyicilerinin köklenmeye etkisi

Kontrol	IBA (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	Kök sayısı	Kök boyu (mm)	Sekonder kök sayısı
0,0	0,0	0,0	$11,35 \pm 1,76ab$	$45,65 \pm 2,61d$	$12,25 \pm 2,55d$
	0,25		$15,30 \pm 2,27ef$	$47,64 \pm 2,63e$	$15,85 \pm 1,81e$
	0,5		$10,20 \pm 1,85a$	$29,48 \pm 2,06c$	$11,75 \pm 2,73cd$
	1,0		$14,00 \pm 2,38de$	$24,31 \pm 2,43ab$	$10,70 \pm 1,59c$
		0,25	$15,85 \pm 2,87f$	$50,89 \pm 2,89f$	$14,40 \pm 2,70e$
		0,5	$13,10 \pm 2,38cd$	$25,57 \pm 2,06b$	$8,50 \pm 2,76b$
		1,0	$11,85 \pm 2,58bc$	$23,49 \pm 3,14a$	$6,45 \pm 1,85a$

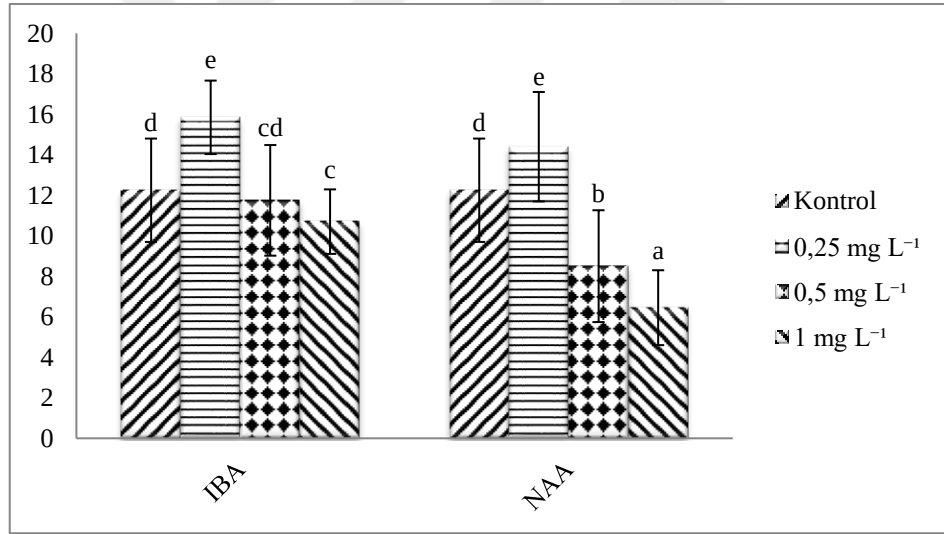
Aynı harflerle gösterilen değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) önemli ölçüde farklı değildir (P = 0,05, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi).



Şekil 43. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum hygrophilum*'da kök sayısına etkisi



Şekil 44. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum hygrophilum*'da kök boyuna etkisi



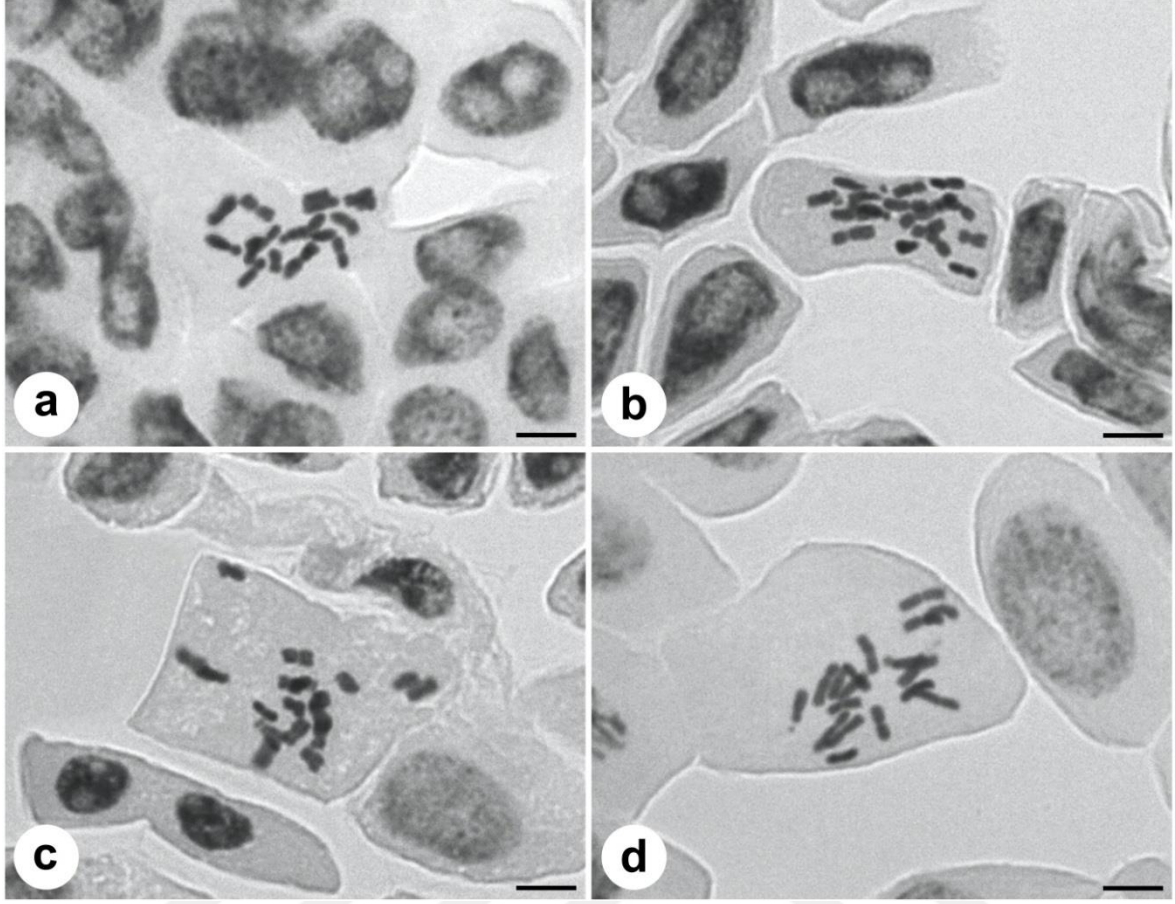
Şekil 45. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *Tripleurospermum hygrophilum*'da sekonder kök sayısına etkisi



Şekil 46. *Tripleurospermum hygrophilum*'da köklendirme. (a) Kontrol, (b) 0,25 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (c) 0,25 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (d) 0,5 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (e) 0,5 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı, (f) 1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı, (g) 1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçekler: 2 cm

3.2.4. Kromozom Sayımı

In vitro ortamda köklendirme aşamasındaki bitkilerin kromozom sayımı yapılmıştır, oksin içeren veya içermeyen her bir deneme grubunda kromozom sayısının $2n = 2x = 18$ olduğu tespit edilmiştir. Bütün deneme gruplarında kromozom sayısının sabit olduğu herhangi bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 47).



Şekil 47. *Tripleurospermum hygrophilum*'da mitotik metafaz ($2n=18$). (a) Kontrol, (b) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, (c) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, (d) 1 mg L^{-1} IBA. Ölçekler: $5 \text{ }\mu\text{m}$

3.2.5. Aklimatizasyon

In vitro ortamda köklenen bitkiler, Hoogland içeren vermikülit ortamlarında gelişimlerini sağlıklı bir şekilde sürdürmüş olup bu ortamda başarılı bir şekilde adaptasyonu sağlanmıştır (Şekil 48, 50a).



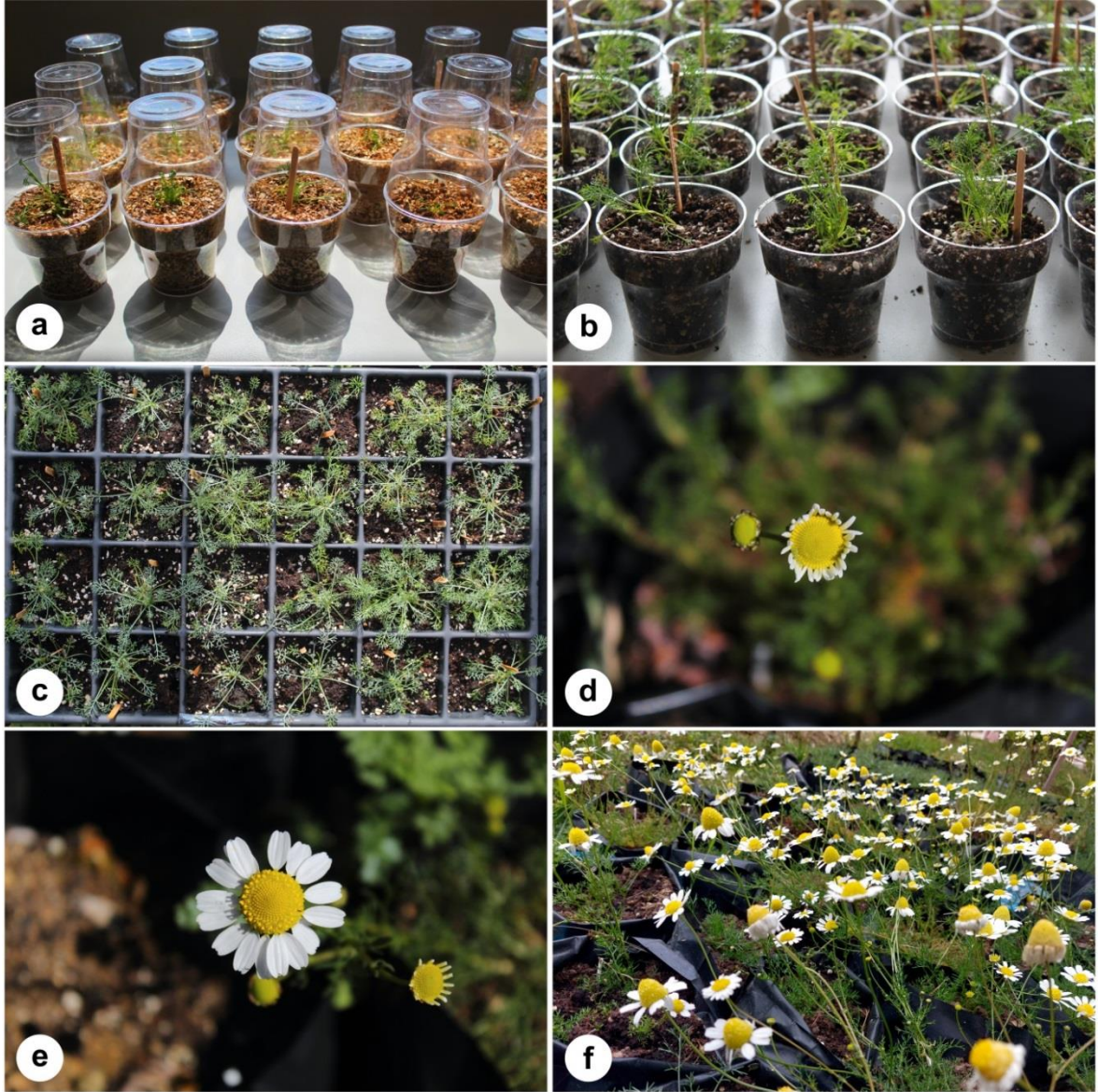
Şekil 48. *Tripleurospermum hygrophilum* vermikülit ortamı

Ex vitro ortamda sağlıklı ve iyi gelişmiş olan bitkiler, otuz günün sonunda 1:1 (v/v) oranında turba ve orman toprağı içeren karışıma koyularak botanik bahçesine aktarılmıştır (Şekil 50b-c). Botanik bahçesinde bitkiler gelişimlerini sürdürmeye devam etmiş, bitkilerin %98 başarı ile bu ortama uyum sağladığı tespit edilmiştir.

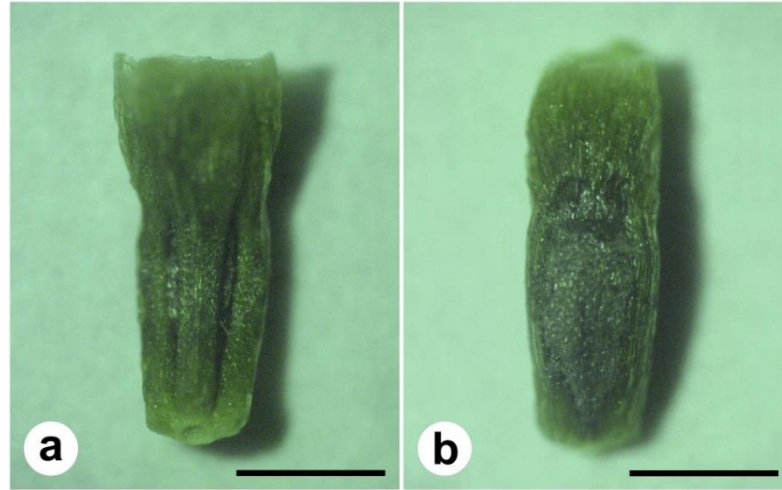


Şekil 49. *Tripleurospermum hygrophilum* çiçeklenme evresi

Botanik bahçesine başarılı bir şekilde adapte olup gelişimini sürdüren bitkilerin ikinci yılında çiçeklenmeye başladığı gözlenmiştir (Şekil 49, 50d-f). İlk çiçeklenmenin ise dış ortama aktarıldıktan 350 gün sonra gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 50d). Çiçeklenme evresini tamamlayan bitkiler aken oluşturmuştur (Şekil 51). Oluşan akenlerin müsilaaj içerdiği gözlenmiştir.



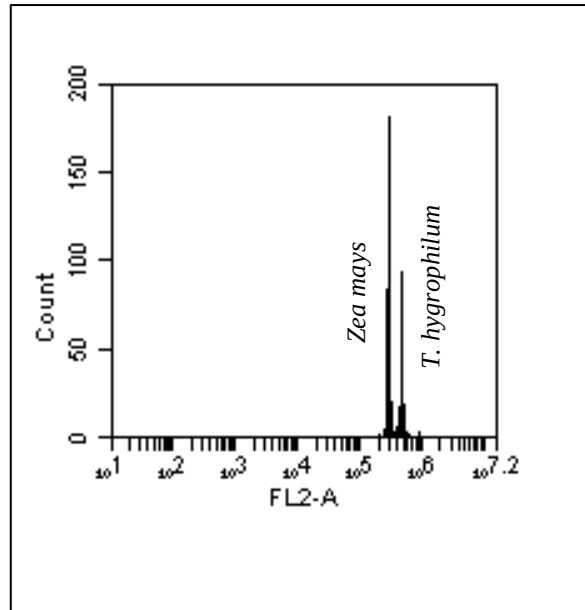
Şekil 50. *Tripleurospermum hygrophilum*'da aklimatizasyon aşamaları. (a) *Ex vitro* ortam yedinci gün, (b) *Ex vitro* ortam on dördüncü gün, (c) Botanik bahçesi, (d) Botanik bahçesi çiçeklenme başlangıcı, (e-f) Çiçeklenme evresi



Şekil 51. *Tripleurospermum hygrophilum*'un *ex situ* koleksiyonlarından elde edilen akenleri. Ölçekler: 2 mm

3.2.6. Akım Sitometrik Analiz

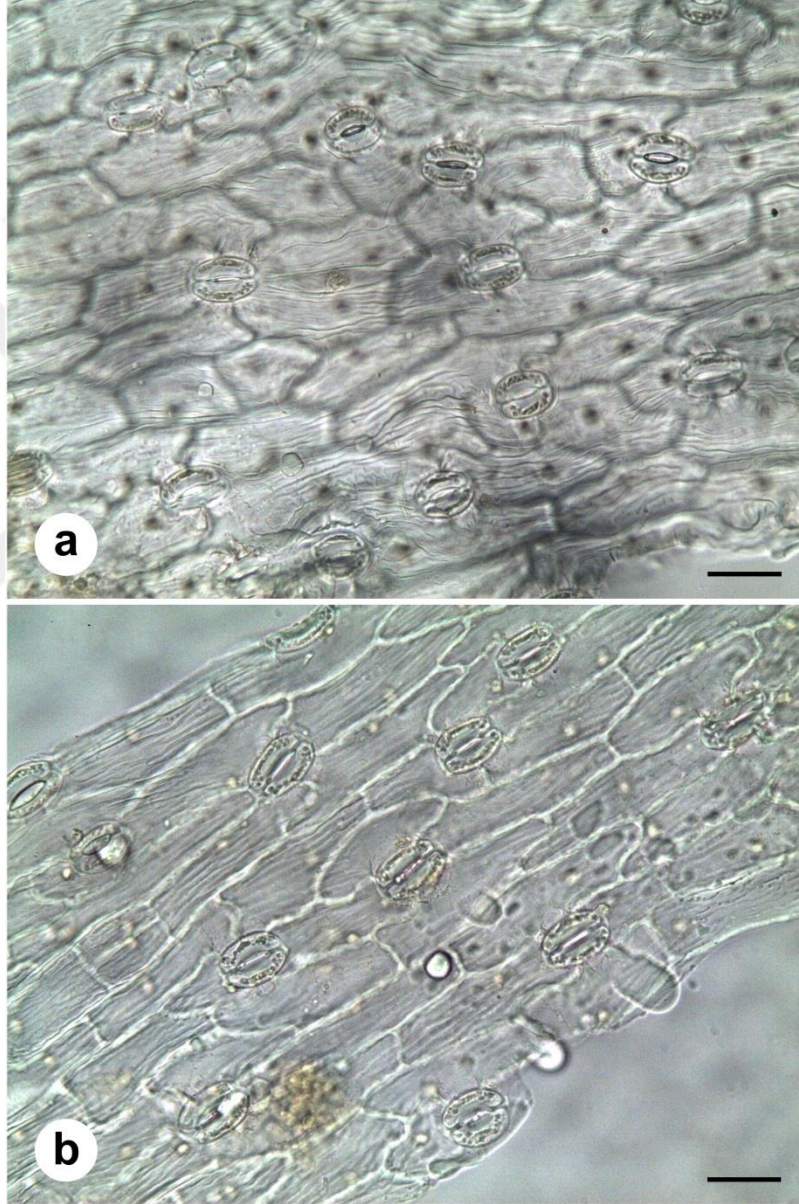
In vitro 'da büyütülüp aklimatizasyonu yapılmış bitkilerin nuklear DNA analizi akım sitometri ile yapılmıştır. Nuklear DNA miktarı 4,88 pg/2C olup, 4772,64 Mbp/2C'dir. 1C - değeri ise 2,44 pg olup 2386,32 Mbp/2C'dir (Şekil 52). 1pg = 978 Mbp (Doležel vd., 2003).



Şekil 52. *Tripleurospermum hygrophilum* 'un akım sitometrik histogramı

3.2.7. Stoma Özellikleri

Yapraklar amfistomatik ve stomalar anomositik tiptedir. Yaprığın üst yüzeyindeki stomalar $26,19 \pm 1,94 \mu\text{m}$, alt yüzeyindeki stomalar $26,28 \pm 1,00 \mu\text{m}$ uzunluğundadır (Şekil 53).



Şekil 53. *Tripleurospermum hygrophilum*'un stoma görüntüleri. (a) Yaprak üst yüzeyinden yüzeysel kesit, (b) Yaprak alt yüzeyinden yüzeysel kesit. Ölçekler: 30 μm

4. TARTIŞMA

Biyoteknolojik yöntemlerden biri olan doku kültürü; nadir, endemik veya tehdit altındaki bitki türlerinin korunması için, kullanışlı bir teknik olarak gün geçtikçe daha da önemli hale gelmiştir. (Cuenca vd., 1999; Benson, 1999). Bu teknik sayesinde küçük bir bitki materyali ile çoğaltım yapılabilir. Doku kültürü teknikleri ile Asteraceae üyeleriyle ilgili yapılmış çalışmalar olmakla birlikte, *Tripleurospermum* cinsi üzerine yapılmış çalışmalar sadece *T. insularum* ve *T. fissurale* ile sınırlıdır. Bu çalışma ile ilk kez doku kültürü teknikleri kullanılarak tehlike altındaki endemik *T. conoclinium* ve *T. hygrophilum* türlerinin mikroçoğaltım protokolü oluşturulmuştur.

Mikroçoğaltım tekniği, belirli alanlardaki bitki yetiştirme programları için büyük miktarda kaynak sağlar. *In vitro* bitki koleksiyonları oluşturmak, doğal flora bitkilerini bir koruma biçimi ve genel bitki koruma stratejisinin bir parçası olan *ex situ* biyolojik çeşitliliğin korunmasının etkili bir yöntemi olarak bilinir. Günümüzde mikroçoğaltım teknikleri, nadir ve tehlike altındaki bitki türlerinin gen havuzunun korunması ve restorasyon sorunlarının çözümü için yaygın olarak kullanılmaktadır (Chokheli vd., 2020). Bu teknik nesli tehlike altındaki türlerin başarılı bir şekilde çoğaltımı ve korunmasına olanak sağlar (Bais vd., 2002; Joshi ve Dhar, 2003; Pace vd., 2004; Erdağ ve Emek, 2009; Corral, 2011; Yüzbaşıoğlu vd., 2012; Valletta vd., 2015; Carra vd., 2016; Panwar ve Joshi, 2020; Panwar vd., 2020). Benzer şekilde bu çalışmada da nesli tehlike altındaki endemik *T. conoclinium* ve *T. hygrophilum* türlerinin her birinden az sayıda (20 aken) başlangıç materyali kullanılarak *in vitro* çoğaltım sonucunda çok sayıda (600) bitki materyali oluşturulmuştur. Klasik metot ile çoğaltımda, başlangıç materyali sayısı kadar bitki çoğaltımı yapılabilirken doku kültürü ile az sayıda bitki materyali kullanılarak çok sayıda bitkinin çoğaltımı ve korunması mümkün olabilmektedir.

Bitki dokuları ve organları, büyüme için gerekli besinleri sağlayan yapay ortamda *in vitro* olarak çoğaltılır. Bitki doku kültürünün başarısı, kullanılan besiyeri ortamı ile direk bağlantılıdır. Sağlıklı bir büyüme ve gelişme için, bitkilerin topraktan bazı inorganik elementleri (Makro elementler: nitrojen iyonları (N), potasyum (K) ve kalsiyum (Ca)) alması gerekir. Ayrıca nispeten küçük miktarlarda diğer elementlerden de (Mikro elementler: demir (Fe), nikel (Ni), klor (Cl), manganez (Mn), çinko (Zn), bor (B), bakır

(Cu) ve molibden (Mo)) alması gerekir. Bahsedilen elementler ile birlikte karbon (C), oksijen (O) ve hidrojen (H) bitki büyüme gelişmesi için elzem olan toplamda 17 temel besin elementi tanımlanmıştır (George vd., 2008). Bitki doku kültüründe kullanılan yapay besiyerleri, bitkinin büyüme ve gelişmesi için gerekli olan bu elementleri içerir. Bitki doku kültürlerinde en çok kullanılan temel besiyeri ortamı Murashige ve Skoog'un (MS) formülasyonudur (Tablo 2) (George vd., 2008). MS temel besiyeri ortamı, yüksek amonyum nitrat oranı nedeniyle iyi bir bitki rejenerasyon ortamı sağlar. Philips ve Garda (2019) *in vitro* çoğaltım çalışmalarında hem dikotlar hem de monokotlar için yaygın olarak MS besiyerinin kullanıldığını rapor etmiştir. Asteraceae familyasındaki türlerin mikroçoğaltımının yapıldığı çalışmalarda genel olarak MS temel besiyeri ortamı tercih edilmiştir (Kodja vd., 1998; Pevalek-Kozlina, 1998; Izquierdo, 2006; Corral vd., 2011; Chang vd., 2012; Emek ve Erdağ, 2013; Okay vd., 2014; Valletta vd., 2015; Bohórquez-Quintero vd., 2016; Carra vd., 2016; Trejgell vd., 2018; Sevindik vd., 2019; Harbage, 2001; Souza vd., 2007; Panwar vd., 2020; Stanilova vd., 2022). İnceer vd. (2022), *Tripleurospermum* cinsine ait türlerden *T. insularum* ile yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında MS besiyeri ortamı kullanmışlardır. Cüce vd. (2022), *T. fissurale* ile yaptıkları çalışmada MS besiyeri ortamının etkili olduğunu gözlemişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da MS temel besiyeri kullanılmış ve sağlıklı büyüme ve gelişme gösteren bitkiler elde edilmiştir (Şekil 12,13, 33,34).

Asteraceae üyeleri ile yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmalarında akenin (sipsela) başlangıç materyali olarak kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur (Harbage, 2001; Joshi ve Dhar, 2003; Pace vd., 2004; Stojakowska ve Malarz, 2004; Souza vd., 2007; Pace vd., 2009; Valletta vd., 2015; Trejgell vd., 2018; Panwar ve Joshi, 2020; Stanilova vd., 2022). *Tripleurospermum* cinsine ait türlerle yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmalarında başlangıç materyali olarak aken kullanılmıştır, İnceer vd. (2022), *T. insularum* ile yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında akenleri başlangıç materyali olarak kullanmışlardır. *Tripleurospermum* cinsine ait diğer bir tür olan *T. fissurale* ile yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmasında da akenler başlangıç materyali olarak kullanılmıştır (Cüce vd., 2022). Benzer şekilde bu tez çalışmasında da *T. conoclinium* ve *T. hygrophilum* akenleri başlangıç materyali olarak kullanılmıştır (Şekil 12a, 33a).

Bitki materyalinin yüzeyini sterilize etmek için birçok kimyasal (Calcium hypochlorite, Sodium Hypochlorite, commercial bleach, mercuric chloride, Ethanol) madde kullanılsa da bunlardan en yaygın kullanılanı sodyum hipokloritdir (NaOCl)

(Benson, 1999). Asteraceae üyelerinin *in vitro* çoğaltımlarının yapıldığı çalışmalarda eksplant sterilizasyonunda yaygın olarak farklı konsantrasyonlardaki sodyum hipoklorit (NaOCl) kullanılmıştır (Kodja vd., 1998; Harbage, 2001; Pace vd., 2004; Stojakowska ve Malarz, 2004; Izquierdo, 2006; Souza vd., 2007; Pace vd., 2009; Corral vd., 2011; Chang vd., 2012; Valletta vd., 2015; Trejgell vd., 2018; Stanilova vd., 2022). Cüce vd. (2022), *T. fissurale* türünün aken sterilizasyonunda %2 (v/v) sodyum hipoklorit kullanmış herhangi bir kontaminasyon problemi ile karşılaşmamışlardır. İnceer vd. (2022), *T. insularum* akenlerinin sterilizasyonunu %3 (v/v) sodyum hipoklorit ile yapmış sterilizasyonda başarı sağlamışlardır. Benzer şekilde bu çalışmada da yüzey sterilizasyonunda %3 (v/v) sodyum hipoklorit kullanılmış, *T. conoclinium* akenlerinde *in vitro* çimlenme aşamasında %10 oranında bir kontaminasyon gözlemlenirken sonraki altkültürlerde herhangi bir kontaminasyonla karşılaşmamıştır. *Tripleurospermum hygrophilum* akenlerinde *in vitro* çimlendirme aşamasında ve diğer aşamalarda herhangi bir kontaminasyon gözlenmemiştir. Kontaminasyon oranlarının düşük olması explant kaynağı olarak tohum kullanımının *in vitro* çoğaltım sırasında kontaminasyon riskini azalttığı bilgisi ile desteklenmektedir (Benson, 1999).

Asteraceae familyası üyeleri ile yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında sürgün çoğaltımında sitokininlerin tek başına kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. (Husain ve Anis, 2006; Erdağ ve Emek, 2009; Pace vd., 2009; Corral, 2011; Al Khateeb vd., 2012; Shatnawi, 2013; Kurian ve Thomas, 2015; Valletta vd., 2015; Yordanova vd., 2017; Kodym vd., 2018; Nowakowska, 2020; Okello vd., 2021). Sürgün çoğaltımında tek başına sitokininler kullanılabilse de oksin ve sitokinin birlikte kullanımındaki denge, etkili bir organogenez için önemlidir (Pollard ve Walker, 1990). Aynı familya üyelerinin, *in vitro* sürgün çoğaltımında sitokininlerle birlikte düşük konsantrasyonlarda oksin kullanımının sürgün çoğaltımında etkili olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir (Wildi vd., 1998; Bais vd., 2002; Koroch vd., 2002; Joshi ve Dhar, 2003; Grigoriadou vd., 2011; Mahesh vd., 2012; Archana vd., 2013; Gopinath vd., 2014; Khandakar vd., 2014; Abraham ve Thomas, 2015; Carra vd., 2016; Özel, 2016; Trejgell vd., 2018; Enyew, 2019; Talla vd., 2019; Panwar ve Joshi, 2020; Panwar vd., 2020; Nithya ve Kamalam, 2021; Riahi vd., 2022).

Tripleurospermum türleri ile yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında da sitokininler ve düşük konsantrasyondaki oksinlerin birlikte kullanımı etkili bir organogenez oluşturmuştur (Cüce vd., 2022; İnceer vd., 2022). Cüce vd. (2022), *T. fissurale* (Sosn.) ile yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında en yüksek sürgün sayısını 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA

içeren MS besiyeri ortamından elde etmişlerdir. İnceer vd. (2022), *T. insularum*'un mikroçoğaltımında en yüksek sürgün sayısının 1 mg L^{-1} ZEA + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamında olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde bu tez çalışmasında sitokininler ve düşük konsantrasyondaki oksinler birlikte kullanılmış *T. conoclinium* için explant başına en yüksek ortalama sürgün sayısı, $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 3 ve Şekil 14, 19f), *T. hygrophilum* için ise $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyerindeki bitkilerden elde edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 35, 39c).

Tripleurospermum conoclinium için explant başına en düşük ortalama sürgün sayısı 1 mg L^{-1} 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 3 ve Şekil 14, 20g), *T. hygrophilum* için ise $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ve $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyerindeki bitkilerden elde edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 35, 40d). Bu sonuçlara benzer şekilde Asteraceae üyelerinden *S. acmella* türünün *in vitro* çoğaltım protokolünün oluşturulduğu çalışmada sürgün parametreleri açısından 2iP + NAA içeren MS besiyeri ortamının diğer ortamlara göre daha az etkili olduğu bulunmuştur (Saritha vd., 2002). Bu sonuçlardan farklı olarak; İnceer vd. (2022), *T. insularum*'da en düşük sürgün sayısını 1 mg L^{-1} TDZ + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında tespit etmişlerdir. Cüce vd. (2022), ise *T. fissurale* için en düşük ortalama sürgün sayısını 1 mg L^{-1} TDZ + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IAA içeren MS besiyeri ortamında rapor etmişlerdir.

Sürgün boyu açısından incelendiğinde *T. conoclinium*'da explant başına en yüksek ortalama sürgün boyu $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 3 ve Şekil 17, 20b), *T. hygrophilum* için ise $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyerinde elde edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 36, 40c). Bu sonuçlardan farklı olarak Cüce vd. (2022), *T. fissurale* için en yüksek ortalama sürgün boyunu 1 mg L^{-1} 2iP + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamında olduğunu belirtmişlerdir. İnceer vd. (2022), ise *T. insularum*'da en yüksek ortalama sürgün boyununun 1 mg L^{-1} ZEA + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IAA içeren MS besiyeri ortamında ve kontrol ortamında olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı cinsin farklı türlerinde büyüme yanıtları farklı olabilmektedir. Yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında aynı türün farklı çeşitlerinde büyüme yanıtlarının genotipe bağlı olarak değiştiği rapor edilmiştir (Lu vd., 1991; Gana vd., 1995; Burbulis vd., 2011; Ahmad vd., 2021).

Tripleurospermum conoclinium için explant başına en düşük ortalama sürgün boyu $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 15, 20d). *Tripleurospermum hygrophilum* için ise 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyerindeki bitkilerden elde edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 36, 41f). Bu sonuca benzer

şekilde İnceer vd. (2022), *T. insularum*'da en düşük ortalama sürgün boyunu 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IAA içeren MS besiyeri ortamında elde etmişlerdir. Farklı olarak Cüce vd. (2022), *T. fissurale* için en düşük ortalama sürgün boyunu 1 mg L^{-1} TDZ + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IAA içeren MS ortamında bulmuşlardır.

Tripleurospermum conoclinium için explant başına en yüksek ortalama nod sayısı $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 3 ve Şekil 17, 19c), *T. hygrophilum* için ise $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyerinden elde edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 38, 40b). Bu sonuçlardan farklı olarak Cüce vd. (2022) *T. fissurale* için explant başına en yüksek ortalama nod sayısını $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamında bulmuşlardır. İnceer vd. (2022), ise *T. insularum* için en yüksek ortalama nod sayısını 1 mg L^{-1} ZEA + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri ortamında elde etmişlerdir.

Tripleurospermum conoclinium için explant başına en düşük ortalama nod sayısı 1 mg L^{-1} 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 3 ve Şekil 17, 19d) ve 1 mg L^{-1} 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 3 ve Şekil 17, 20c), *T. hygrophilum* için ise $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyerindenden elde edilmiştir (Tablo 5 ve Şekil 38, 39g). Cüce vd. (2022), *T. fissurale*'de explant başına en düşük ortalama nod sayısını 1 mg L^{-1} TDZ + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren ortamda rapor etmişlerdir. İnceer vd. (2022), ise *T. insularum* için 1 mg L^{-1} TDZ + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IAA içeren MS ortamında en düşük nod sayısını bulmuşlardır.

Besiyeri ortamının içeriği ve özellikle kullanılan sitokininlerin oranının artması sürgünlerde hiperhidrisite oluşumuna sebep olur (Blando vd., 2021). Birçok *in vitro* çoğaltım çalışmasında kültür ortamlarında hiperhidrisite görüldüğü rapor edilmiştir (Pérez-Tornero vd; 2001; Makunga vd., 2006; Tsay vd., 2006; Badr-Elden vd., 2012; Machado vd., 2014; Nikam vd., 2019; Pence vd., 2020). Asteraceae üyeleri ile yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında da *in vitro* kültür ortamlarında hiperhidrisite gözlenmiştir (Cuenca vd., 1999; Misra ve Datta, 2001; Lucchesini vd., 2009; Grigoriadou vd., 2011; Hristova vd., 2013; Kher vd., 2014; Gantait ve Mahanta, 2022; Stanilova vd., 2022). Benzer şekilde, bu çalışmada da sürgün çoğaltım ortamlarında 1 mg L^{-1} sitokinin (6-BA, KIN, 2iP) ile birlikte $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyeri ortamlarında hiperhidrisite gözlenmiştir (Şekil 20, 41).

Mikroçoğaltım çalışmalarında hiperhidrisite oluşumundan sonra en yaygın fizyolojik anormalliklerden biri de kallus oluşumudur (Reed vd., 2013). Asteraceae üyeleri ile yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmalarında da kallus oluşumu görülmüştür (Chakrabarty ve Datta 2008; Stanilova vd., 2022). İnceer vd. (2022), *T. insularum*'da ise KIN+NAA ve

kontrol ortamı hariç tüm sürgün çoğaltım ortamlarında kallus tespit etmişlerdir. Cüce vd. (2022), sürgün ortamlarında kontrol ortamı hariç kallus oluşumu gözlemişlerdir. Bu sonuçlara benzer şekilde bu çalışmada, sürgün çoğaltımı için yapılan tüm uygulama gruplarında kallus oluşumu görülürken bu oran kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarının artması ile orantılı olarak artmıştır (Şekil 20, 41).

Köklendirme aşaması, sürgün oluşturan bitkilerin köklendirilerek *in vitro* ortamdan *ex vitro* ortama aktarılmaya hazırlandığı aşamadır (Iliev vd., 2010). Asteraceae üyeleri ile yapılan birçok mikroçoğaltım çalışmasında köklendirme safhasında, en yüksek kök sayısı NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Rafiq vd., 2007; Moktaduzzaman ve Rahman, 2009; Corral vd., 2011; Thiyagarajan ve Venkatachalam, 2012; Rout ve Sahoo, 2013; Okello vd., 2021). *Tripleurospermum* türleri ile yapılan *in vitro* köklendirmelerde farklı konsantrasyonlardaki NAA'nın kök sayısını artırmada etkili olduğu bulunmuştur (Cüce vd., 2022; İnceer vd., 2022). İnceer vd. (2022), *T. insularum* için eksplant başına en yüksek ortalama kök sayısını 0,5 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde etmişlerdir. Cüce vd. (2022) ise *T. fissurale*'de explant başına en yüksek ortalama kök sayısını ise 0,5 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamında bulmuşlardır. Bu sonuçlara benzer şekilde, bu çalışmada da sürgün sayısını artırmada en etkili oksinin NAA olduğu bulunmuştur. *Tripleurospermum conoclinium*'da en yüksek ortalama kök sayısı 1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 4 ve Şekil 22, 25g), *T. hygrophilum*'da 0,25 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Tablo 6, Şekil 44, 47c).

Asteraceae üyeleri ile yapılan birçok *in vitro* köklendirme çalışmasında en uzun kökler IBA içeren MS ortamlarından elde edilmiştir (Husain ve Anis, 2006; Pace vd., 2009; Grigoriadou vd., 2011; Al Khateeb vd., 2012; Shatnawi, 2013; Thomas vd., 2015; Valletta vd., 2015; Panwar ve Joshi, 2020; Panwar vd., 2020; Riahi vd., 2022). Panwar ve Joshi (2020), Asteraceae üyelerinden *T. roylei* türüyle yaptıkları çalışmada en yüksek kök boyunu 1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamından elde etmişlerdir. Bu sonuca benzer şekilde bu çalışmada *T. conoclinium*'da en yüksek ortalama kök boyu 1 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamında bulunmuştur (Tablo 4 ve Şekil 23, 25f). *Tripleurospermum hygrophilum*'da ise en yüksek kök boyu 0,25 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Tablo 6, Şekil 44, 46c). Bu sonuca benzer olarak Asteraceae üyelerinden *S. rebaudiana* türünde en yüksek kök boyu 0,25 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamında bulunmuştur (Rafiq vd., 2007). *Tripleurospermum* türlerinde yapılan *in vitro* köklendirme çalışmalarında ise NAA'nın farklı konsantrasyonu kök uzamasında etkili bulunmuştur. İnceer vd. (2022), *T. insularum*

için en yüksek kök boyunu $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde etmişlerdir. Cüce vd. (2022) ise *T. fissurale*'de en yüksek kök sayısının $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamında olduğunu rapor etmişlerdir.

Tripleurospermum conoclinium'da en yüksek ortalama sekonder kök sayısı kontrol ortamından (Tablo 4 ve Şekil 23, 24a), *T. hygrophilum*'da $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Tablo 6, Şekil 44, 45b). *Tripleurospermum hygrophilum*'daki sonuca benzer şekilde İnceer vd. (2022), *T. insularum* için en yüksek ortalama sekonder kök sayısını $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde etmişlerdir. Farklı olarak Cüce vd. (2022), *T. fissurale*'de en yüksek ortalama sekonder kök sayısını $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamından elde etmişlerdir.

Tripleurospermum türleri ile yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmalarında, Cüce vd. (2022), *T. fissurale* için en düşük ortalama kök sayısını kontrol ortamında, en düşük ortalama kök boyunu $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, ve en düşük ortalama sekonder kök sayısını ise kontrol ortamında gözlemişlerdir. İnceer vd. (2022), *T. insularum* için en düşük ortalama kök sayısının $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA ortamında olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuca benzer şekilde *T. hygrophilum*'da en düşük ortalama kök sayısı $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Tablo 6, Şekil 43, 46d). Farklı olarak *T. conoclinium*'da en düşük ortalama kök sayısı $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Tablo 4, Şekil 22, 25c). İnceer vd. (2022), *T. insularum* için en düşük ortalama kök boyunu $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamından elde etmişlerdir, benzer şekilde *T. hygrophilum*'da en düşük ortalama kök boyu aynı oksinin farklı konsantrasyonu olan 1 mg L^{-1} NAA içeren MS ortamından (Tablo 6, Şekil 44, 46g), *T. conoclinium*'da ise en düşük ortalama kök boyu aynı oksinin farklı konsantrasyonu olan $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Tablo 4, Şekil 23, 25c).

İnceer vd. (2022), *T. insularum*'da en düşük sekonder kök sayısını kontrol ortamında gözlemişlerdir. Cüce vd. (2022), *T. fissurale* için benzer şekilde en düşük sekonder kök sayısını kontrol ortamında bulmuşlardır. Bu sonuçlardan farklı olarak bu çalışmada *T. conoclinium*'da en düşük ortalama sekonder kök sayısı $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamından (Tablo 4, Şekil 24, 25e), *T. hygrophilum*'da ise en düşük ortalama sekonder kök sayısı 1 mg L^{-1} NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Tablo 6, Şekil 45, 46g).

Aklimatizasyonu başarı ile sağlanan *T. conoclinium* %95, *T. hygrophilum* ise %98 oranla hayatta kalarak botanik bahçesinde dış ortama uyum sağlamıştır. Mikroçoğaltımı yapılan birçok türün aklimatizasyonları yapılsa da fenolojik evre gözlenememiştir. Bu tez

çalışmasında büyüme ve gelişimlerini sağlıklı bir şekilde devam ettiren bitkilerin çiçeklenme ve meyve safhaları başarıyla gerçekleşmiştir (Şekil 29, 50, 30, 51). Asteraceae türleri ile yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında aklimatizasyon başarı oranları %60 ile %100 arasında değişmektedir. *Achillea filipendulina* cv. 'Parker' ile yapılan çalışmada sera koşullarına adaptasyonda %90 başarı sağlanmıştır (Evenor ve Reuveni, 2004) bu oran *Achillea asplenifolia* VENT. bitkisinde ise %100 olarak belirtilmiştir (Wawrosch vd., 1994). Endemik bir tür olan *Centaurea paui* Loscos ex Wilk ile yapılan çalışmada bitkilerin %70'inin aklimatizasyonu sağlanarak sera ortamına aktarılabilmiştir (Cuenca vd., 1999). *E. scaber* türünün aklimatizasyon başarı oranı %77 olarak belirtilmiştir (Rout ve Sahoo, 2013). Yapılan çalışmalarda Asteraceae üyelerinin aklimatizasyon başarı oranlarının türe göre değiştiği görülmektedir. *Centaurea cineraria* subsp. *circae* da %90 (Valletta vd., 2015), *S. rebaudiana*' da %63 (Patel ve Shah, 2009), *A. annua* türünde %85 (Gopinath vd., 2014), *S. obvallata* türünde %63 (Joshi ve Dhar, 2003), *Pentanema indicum* (L.) Ling. türünde %96 (Sivanesan ve Jeong, 2007) olarak rapor edilmiştir. *Tripleurospermum* türleri ile yapılan çalışmada İnceer vd. (2022), *T. insularum*'un botanik bahçesinde yaşam oranını %76 olarak rapor etmişlerdir. Cüce vd. (2022), ise *T. fissurale*'nin botanik bahçesindeki yaşam oranını %81 olarak belirtilmişlerdir. Çiçeklenme ve meyve safhaları başarıyla gerçekleşip meyveye dönen *T. conoclinium*, *T. hygrophilum* türlerinin yaprak çiçek ve aken özelliklerinin doğal ortamdaki bitkilerle benzerlik gösterdiği gözlenmiştir (Enayet Hossain, 1975; İnceer vd., 2012)

Mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin genetik stabiliteelerini kontrol etmek için birçok çalışmada akım sitometri kullanılmıştır (Awolaye vd., 1994; Loureiro vd., 2007a; Brito vd., 2010; Mallón vd., 2010; Faizal vd., 2011; Clarindo vd., 2012; Rewers vd., 2012; Viehmannova vd., 2016; Samarina vd., 2019; Abdolinejad vd., 2020; Parzymies vd., 2020; Syeed vd., 2021; Ulvrova vd., 2021; Stanilova vd., 2022). *Tripleurospermum* türlerinden *T. insularum* ve *T. fissurale*'nin mikroçoğaltımında genetik stabilitenin incelenmesi akım sitometri ile yapılmıştır. İncelenen bitkilerin nuklear DNA miktarlarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiş olup ploidi seviyeleri doğal ortamdaki bitkilerin ploidi seviyeleri ile benzerlik göstermiştir (Cüce vd., 2022; İnceer vd., 2022). Aklimatizasyonları başarılı bir şekilde tamamlanan bitkilerin genetik stabilite testleri için yapılan akım sitometrik ölçümlerde *T. conoclinium*'un nuklear DNA miktarı 5,40 pg/2C olup, 1C - değeri ise 2,70 pg olarak belirlenmiştir (Şekil 31). İnceer vd. (2018), bu türün doğal popülasyonlarında nuklear DNA miktarını 5,18 pg/2C, 1C - değerini ise 2,59 pg olarak tespit etmişlerdir.

Tripleurospermum hygrophilum'un nuklear DNA miktarı ise 4,88 pg/2C olup, 1C - değeri 2,44 pg olarak tespit edilmiştir (Şekil 52). Bu türün doğal popülasyonunda nuklear DNA miktarı 4,95 pg/2C olup, 1C - değeri ise 2,48 pg olarak belirlenmiştir (İnceer vd., 2018). Elde edilen bu sonuçlar türün doğal popülasyonlarından yapılan akım sitometrik ölçümler ile kıyaslandığında literatür verileri ile uygunluk göstermektedir. Bu sonuçlar mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin nuklear DNA miktarı açısından stabil olduğunu, herhangi bir somaklonal varyasyonla karşılaşmadığını göstermektedir.

Genetik stabiliteyi kontrol amacıyla yapılan tamamlayıcı çalışmalardan biri de kromozom sayımıdır. Klasik metodlar arasında olan kromozom sayımı *in vitro* çoğaltım çalışmalarında tek başına ya da tamamlayıcı metot olarak birçok çalışmada kullanılmaktadır (Ulvrova vd., 2021). Mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin genetik stabiliteelerini kontrol amacıyla birçok çalışmada kromozom sayımı metodu uygulanmaktadır (Wawrosch vd., 1994; Godo vd., 1998; Chen vd., 2006; Mallón vd., 2010; Nasırcılar vd., 2011; Clarindo vd., 2012; Dafadar vd., 2012; Viehmannova vd., 2016; Ulvrova vd., 2021). *Tripleurospermum* türlerinden *T. insularum* ve *T. fissurale* ile yapılan stabilite testlerinde de kromozom sayımı yapılmış *in vitro* ortamdaki bitkilerde herhangi bir kromozom değişikliğine rastlanmamıştır (Cüce vd., 2022; İnceer vd., 2022). Bu tez çalışmasında *in vitro* ortamda çoğaltılan *T. conoclinium* ve *T. hygrophilum*'un kromozom sayısının $2n = 2x = 18$ olduğu tespit edilmiştir (Şekil 26, 47). Köklendirme aşamasındaki tüm uygulama gruplarında kromozom sayısının değişmediği gözlenmiştir. *Tripleurospermum conoclinium* ve *T. hygrophilum*'un doğal ortamdaki bitkileriyle yapılan çalışmalarda kromozom sayısının $2n = 2x = 18$ olduğu bildirilmektedir (İnceer ve Hayırlıoğlu-Ayaz, 2010). Elde edilen bu verilerin literatür verilerine uygunluk gösterdiği, mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin genetik olarak kararlı olduğu ve uygulanan mikroçoğaltım protokolünün kromozom sayısını değiştirmede bulunmuştur.

Aklimatizasyonu yapılan *T. conoclinium* ve *T. hygrophilum* türlerinin stomaları incelenmiş yaprakların amfistomatik ve stomaların ise anomositik olduğu görülmüştür (Şekil 32, 53). Bu türlerin doğal popülasyonlarında yapılan anatomik incelemelerde bu sonuçlara benzer şekilde yaprakların amfistomatik ve stomaların ise anomositik tipte olduğu rapor edilmiştir (İnceer ve Özcan, 2011). Bu çalışmada *T. conoclinium*'da yaprağın üst yüzeyindeki stomaların $29,30 \pm 0,75 \mu\text{m}$, alt yüzeyindeki stomaların $29,45 \pm 1,15 \mu\text{m}$ uzunluğunda olduğu görülmüştür (Şekil 32). Bu sonuca benzer şekilde *T. conoclinium*'un doğal popülasyonlarında yaprağın üst yüzeyindeki stomaların $29,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ uzunluğunda

olduğu bulunmuştur (İnceer ve Özcan, 2011). *Tripleurospermum hygrophilum*'da yaprağın üst yüzeyindeki stomaların $26,19 \pm 1,94 \mu\text{m}$, alt yüzeyindeki stomaların $26,28 \pm 1,00 \mu\text{m}$ uzunluğunda olduğu gözlenmiştir (Şekil 53). Bu sonuca benzer şekilde *T. hygrophilum*'un doğal popülasyonlarında yaprağın üst yüzeyindeki stomaların $26,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ uzunluğunda olduğu bulunmuştur (İnceer ve Özcan, 2011). Bu tez çalışmasında ölçülen stoma uzunluğu sonuçlarının literatür verilerine uygunluk gösterdiği ve stomalarda yapısal olarak herhangi bir değişim olmadığı gözlenmiştir. *In vitro* ortamda büyüyen bitkilerde stoma büyüklüğünde artma gibi bazı morfolojik anormallikler görülebilir (George vd., 2008). Bu çalışmada incelenen bitkilerde herhangi bir anormallik görülmemiş incelenen bitkiler morfojenik homojenite göstermiştir.

5. SONUÇLAR

1. Bu çalışma ile ilk kez nesli tehlike altında olan endemik *Tripleurospermum conoclinium* (Boiss. & Bal.) Hayek. ve *Tripleurospermum hygrophilum* (Bornm.) türlerinin *in vitro* çoğaltım protokolü başarı ile oluşturulmuştur.
2. Her iki tür için de 30 sn %70'lik (v/v) etanol ve 10 dk %3 (v/v) sodyum hipoklorit çözeltisi uygulamasının sterilizasyon için etkili olduğu belirlenmiştir.
3. *Tripleurospermum conoclinium*'da sürgün çoğaltımı için en uygun ortamın, eksplant başına en yüksek sürgün sayısı ile 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı olduğu belirlenmiştir.
4. *Tripleurospermum conoclinium*'da köklendirme için tüm uygulama gruplarının köklenmeyi sağladığı gözlenirken, en yüksek kök sayısının 1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamında olduğu sonucuna varılmıştır.
5. *Tripleurospermum hygrophilum*'da sürgün çoğaltımı aşaması için en uygun ortamın, eksplant başına en yüksek sürgün sayısı ile 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA olduğu belirlenmiştir.
6. *Tripleurospermum hygrophilum*'da köklendirme aşaması için tüm uygulama gruplarının köklenmeyi sağladığı gözlenirken, en yüksek kök sayısının 0,25 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamında olduğu sonucuna varılmıştır.
7. *In vitro* çoğaltım protokolü oluşturulan *T. conoclinium* ve *T. hygrophilum* türlerinin kromozom sayılarının $2n = 2x = 18$ olduğu tespit edilmiş ve kromozom sayısında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.
8. *Tripleurospermum conoclinium* ve *T. hygrophilum* türlerinin akım sitometrik analizleri yapılmış nuklear DNA miktarlarında önemli bir değişiklik görülmemiştir. Mikroçoğaltımı yapılan *T. conoclinium*'un nuklear DNA miktarı 5,40 pg/2C, 1C değeri ise 2,70 pg olarak bulunmuştur. *Tripleurospermum hygrophilum*'un nuklear DNA miktarı 4,88 pg/2C, 1C değeri ise 2,44 pg olarak bulunmuştur.
9. *Tripleurospermum conoclinium* ve *T. hygrophilum* türlerinin aklimatizasyonları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş, botanik bahçesinde hayatta kalma oranları sırası ile %96 ve %98 olarak bulunmuştur.

10. Stoma incelemeleri yapılan *T. conoclinium* ve *T. hygrophilum* türlerinin yapraklarının amfistomatik ve stomaların anomositik tipte olduğu görülmüştür. *Tripleurospermum conoclinium*'da yaprağın üst yüzeyindeki stomaların $29,30 \pm 0,75 \mu\text{m}$, alt yüzeyindeki stomaların $29,45 \pm 1,15 \mu\text{m}$ uzunluğunda, *T. hygrophilum*'da ise yaprağın üst yüzeyindeki stomaların $26,19 \pm 1,94 \mu\text{m}$, alt yüzeyindeki stomaların $26,28 \pm 1,00 \mu\text{m}$ uzunluğunda olduğu bulunmuştur. Stoma uzunluklarının doğal populasyonlarda yapılan çalışmalara benzer sonuçlar gösterdiği mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin yapısal olarak kararlı olduğu ve stoma büyüklüğünde bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir.
11. *Tripleurospermum conoclinium* ve *T. hygrophilum* için oluşturulan *in vitro* çoğaltım protokolü ile bu türlerin yapısal olarak stabil *ex situ* koleksiyonları oluşturulmuştur.

6. ÖNERİLER

Bu çalışma ile nesli tehlike altındaki endemik *T. conoclinium* ve *T. hygrophilum* türlerinin mikroçoğaltım ile *ex situ* koruması yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler *Tripleurospermum* cinsine ait diğer türlerin mikroçoğaltım çalışmaları için kaynak teşkil edecektir. *Tripleurospermum* cinsinin diğer türleri ile yapılacak *in vitro* çoğaltım çalışmalarında bu tez çalışması ile oluşturulan protokoller uygulanabilir.

Bu çalışma ile oluşturulan mikroçoğaltım protokolleri, *Anthemis* ve *Matricaria* gibi yakın akraba cinsler ile yapılacak *in vitro* çoğaltım çalışmalarında kaynak olarak kullanılabilir.

Tripleurospermum conoclinium, *T. hygrophilum* türleri için oluşturulan mikroçoğaltım protokolleri kullanılarak *in vitro* çoğaltımı yapılan bitkilerde üreme biyolojisi çalışmaları yapılabilir.

Tripleurospermum conoclinium, *T. hygrophilum* türleri ile oluşturulan mikroçoğaltım protokollerinden yararlanılarak sekonder metabolit çalışmaları yapılabilir.

In vitro çoğaltımı yapılan *T. conoclinium*, *T. hygrophilum* türlerinin uzun vadeli korunmasına yönelik kriyoprezervasyon çalışmaları yapılabilir.

Mikroçoğaltımı yapılarak *ex situ* koleksiyonları oluşturulan *T. conoclinium*, *T. hygrophilum* türleri *in situ* koruma kapsamında doğal habitat restorasyonlarında kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abdolinejad, R., Shekafandeh, A., Jowkar, A., Gharaghani, A. ve Alemzadeh, A., 2020. Indirect regeneration of *Ficus carica* by the TCL technique and genetic fidelity evaluation of the regenerated plants using flow cytometry and ISSR, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 143, 1, 131-144.
- Abraham, J. ve Thomas, T., D., 2015. An efficient shoot regeneration system for medicinally important *Elephantopus scaber* Linn., Crop Breeding and Applied Biotechnology, 15, 94-99.
- Ahmad, A., ul Qamar, M., T., Shoukat, A., Aslam, M., M., Tariq, M., Hakimian, M. ve Joyia, F., A., 2021. The effects of genotypes and media composition on callogenesis, regeneration and cell suspension culture of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), PeerJ, e11464.
- Al Khateeb, W., Hussein, E., Qouta, L., Alu'datt, M., Al-Shara, B. ve Abu-Zaiton, A., 2012. *In vitro* propagation and characterization of phenolic content along with antioxidant and antimicrobial activities of *Cichorium pumilum* Jacq, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 110, 103-110.
- Anderson, W., C., 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron, Journal of the American Society for Horticultural Science, 109, 3, 343-347.
- Angela, C., Marcella, B., Salvatore, P., Giuseppe, G., Ornella, B., Caterina, C., Francesco, C. ve Maurizio, S., 2016. *In-vitro* regeneration of *Calendula maritima* Guss. (Asteraceae), a threatened plant endemic to Western Sicily, Pakistan Journal of Botany, 48, 2, 589-593.
- Ansari, A., A., Gill, S., S., Abbas, Z., K. ve Naeem, M., (Eds.), 2016. Plant Biodiversity: Monitoring, Assessment and Conservation, CABI, USA.
- Archana, S., Shikha, B. ve Ashwani, K., 2013. *In vitro* callus induction and shoot regeneration in *Eclipta alba* (L.) Hassk, International Journal of Life Science & Pharma Research, 3, 2, 43-46.
- Armstrong, C., L. ve Phillips, R., L., 1988. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize, Crop Science, 28, 2, 363-369.
- Arora, N., K., 2018. Biodiversity Conservation for Sustainable Future, Environmental Sustainability, Environmental Sustainability, 1, 109-111.
- Avcı, M., 2005. Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü, İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi, 13, 27-55.
- Awolaye, F., Van Duren, M., Doležel, J. ve Novak, F., J., 1994. Nuclear DNA content and *in vitro* induced somatic polyploidization cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding, Euphytica, 76, 3, 195-202.
- Babaoğlu, M., Gurel, E. ve Ozcan, S., 2001. Bitki Biyoteknolojisi Doku kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, s, 374.

- Badr-Elden, A., M., Nower, A., A., Ibrahim, I., A., Ebrahim, M., K. ve Abd Elaziem, T., M., 2012. Minimizing the hyperhydricity associated with *in vitro* growth and development of watermelon by modifying the culture conditions, African Journal of Biotechnology, 11, 35, 8705-8717.
- Bais, H., P., Green, J., B., Walker, T., S., Okemo, P., O. ve Vivanco, J., M., 2002. *In vitro* propagation of *Spilanthes mauritiana* DC., an endangered medicinal herb, through axillary bud cultures, In Vitro Cellular & Developmental Biology, 38, 6, 598-601.
- Baytop, A., 1991. Farmasötik Botanik Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi, İstanbul.
- Benson, E., (Ed.), 1999. Plant Conservation Biotechnology, CRC Press.
- Betz, C., Scheuerer, M. ve Reisch, C., 2013. Population reinforcement – A glimmer of hope for the conservation of the highly endangered Spring Pasque flower (*Pulsatilla vernalis*), Biological Conservation, 168, 161-167.
- Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R. ve Tanmoy, B., 2015. Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences, Academic Press.
- Blando, F., Rizzello, F., Durante, M., De Paolis, A., Caretto, S. ve Mita, G., 2021. *In vitro* adventitious regeneration of *Artemisia annua* L. influencing artemisinin metabolism, Horticulturae, 7, 11, 438.
- Bohórquez-Quintero, M., A., Araque-Barrera, E., J. ve Pacheco-Maldonado, J., C., 2016. Propagación *in vitro* de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza, frailejón endémico en peligro de extinción, Actualidades Biológicas, 38, 104.
- Brigham, C., A. ve Schwartz, M., W., (Ed.), 2003. Population Viability In Plants: Conservation, Management, and Modeling of Rare Plants, Vol. 165, Springer Science & Business Media, Berlin.
- Brito, G., Lopes, T., Loureiro, J., Rodriguez, E. ve Santos, C., 2010. Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers, Trees, 24, 4, 723-732.
- Brusa, G., Ceriani, R. ve Cerabolini, B., 2007. Seed germination in a narrow endemic species (*Telekia speciosissima*, Asteraceae): Implications for *ex situ* conservation, Plant Biosystems, 141, 1, 56-61.
- Burbulis, N., Blinstrubienė, A. ve Kuprienė, R., 2011. Effect of genotype and medium composition on linseed (*Linum usitatissimum*) ovary culture, Biologia, 66, 3, 465-469.
- Cardoso, J., C., Sheng Gerald, L., T. ve Teixeira da Silva, J., A., 2018. Micropropagation in the twenty-first century, Plant Cell Culture Protocols, 17-46.
- Cassells, A., C., 2000. Contamination and its impact in tissue culture, IV International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding, 560, 353-359.
- Cassells, A., C., 1997. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation—an overview, Pathogen And Microbial Contamination Management In Micropropagation, 1-13.

- Cavar Zeljkovic, S., Ayaz, F. A., Inceer, H., Hayirlioglu-Ayaz, S. ve Colak, N., 2015. Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of *Tripleurospermum insularum*, a new species from Turkey, Natural Product Research, 29, 3, 293-296.
- Chandrika, R., Shivakameshwari, M., N. ve Saraswathi, K., T., 2015. Reduction of vitrification in *in vitro* shoot cultures of *Eryngium foetidum* L.-a potential aromatic and medicinal herb, Indian Journal of Plant Sciences, 4, 2.
- Chang, H., Gupta, S., K., Tsay, H. ve Hung-Chi, C., 2012. *In vitro* propagation of an endangered medicinal plant *Taraxacum formosanum* Kitamura, Abstracts. Phytopharm.
- Chen, L., Wang, Y., Xu, C., Zhao, M. ve Wu, J., 2006. *In vitro* propagation of *Lychnis senno* Siebold et Zucc., a rare plant with potential ornamental value, Scientia Horticulturae, 107, 2, 183-186.
- Chen, M., He, X., Sun, H., Sun, Y., Li, L., Zhu, J., Xia, G., Guo, X. ve Zang, H., 2022. Phytochemical analysis, UPLC-ESI-Orbitrap-MS analysis, biological activity, and toxicity of extracts from *Tripleurospermum limosum* (Maxim.) Pobed, Arabian Journal of Chemistry, 15, 5.
- Chokheli, V., A., Dmitriev, P., A., Rajput, V., D., Bakulin, S., D., Azarov, A., S., Varduni, T., V., Stepanenko, V., V., Tarigholizadeh, S., Singh, R., K., Verma K., K. ve Minkina, T., M., 2020. Recent development in micropropagation techniques for rare plant species, Plants, 9, 12, 1733.
- Clarindo, W., R., Carvalho, C., R. ve Mendonça, M., A., C., 2012. Ploidy instability in long-term *in vitro* cultures of *Coffea arabica* L. monitored by flow cytometry, Plant Growth Regulation, 68, 3, 533-538.
- Coelho, N., Gonçalves, S. ve Romano, A., 2020. Endemic Plant Species Conservation: Biotechnological Approaches, Plants, 9, 3, 345.
- Corral, P., Mallón, R., Rodríguez-Oubiña, J. ve González, M., L., 2011. Multiple shoot induction and plant regeneration of the endangered species *Crepis novoana*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 105, 211-217.
- Cuenca, S., Amo-Marco, J., B. ve Parra, R., 1999. Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk.(Compositae), Plant Cell Reports, 18, 7, 674-679.
- Cüce, M., Inceer, H., Imamoglu, K., V., Ergin, T. ve Ucler, A., O., 2022. Towards *ex situ* conservation of globally rare Turkish endemic *Tripleurospermum fissurale* (Asteraceae), In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 58, 6, 1002-1011.
- Dafadar, A., Das, A., Bandyopadhyay, S. ve Baran Jha, T., 2012. *In vitro* propagation and molecular evaluation of a *Capsicum annum* L. cultivar with a high chromosome number (2n= 48), Scientia Horticulturae, 140, 119-124.
- Davis, P., H. ve Tan, K., (Ed.), 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.10, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Dhurvas Chandrasekaran, D., 2015. High-resolution NMR structure and functional studies of the oligomerization domain of PsIAA4, an auxin-inducible transcriptional repressor from pea (*Pisum sativum*), (Doctoral dissertation, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diss.).

- Doležel, J. ve Bartos, J., A., N., 2005. Plant DNA Flow cytometry and estimation of nuclear genome size, Annals of Botany, 95, 1, 99-110.
- Doležel, J., Bartos, J., Voglmayr, H. ve Greilhuber, J., 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human, Research Gate, 51, 2, 127-8.
- Doležel, J., Greilhuber, J. ve Suda, J., 2007a. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry, Nature Protocols, 2, 9, 2233-44.
- Doležel, J., Greilhuber, J. ve Suda, J., 2007b. Flow Cytometry with Plant Cells, Federal Republic of Germany.
- Driver, J., A. ve Kuniyuki, A., H., 1984. *In vitro* propagation of *Paradox walnut* rootstocks, Horticultural Science, 19, 507.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N., 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (The Red Data Book of Turkey's Plants), Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van Y.Y. Üniversitesi Yayınları, Ankara.
- Emek, Y. ve Erdağ, B., 2013. *In vitro* propagation of critically endangered endemic *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) by axillary shoot proliferation, Current Progress in Biological Research.
- Enayet Hossain, A., B., M., 1975. *Tripleurospermum* Schultz Bip. In: Davis P., H., (ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands 5, 295–311, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Enyew, M. ve Feyissa, T., 2019. *In vitro* shoot regeneration from leaf explants of *Echinops kebericho*: an endangered endemic medicinal plant, Plant Biosystems, 153, 2, 199-204.
- Erdağ, B., B. ve Emek, Y., Ç., 2009. Adventitious shoot regeneration and *in vitro* flowering of *Anthemis xylopoda* O.Schwarz, a critically endangered Turkish endemic, Turkish Journal of Biology, 33, 319-326.
- Erdoğan, T., F., Akkol, E., K., Süntar, I., Gönenç, T., M. ve Kivçak, B., 2015. Fatty Acid Compositions and Anti-inflammatory Activities of *Tripleurospermum parviflorum* (Willd.) Pobed. and *Tripleurospermum tenuifolium* (Kit.), Records of Natural Products, 9, 3, 394.
- Erdoğan, T., F., Gönenç, T., M. ve Oskay, M., 2013. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Tripleurospermum parviflorum* (Willd.) Pobed, Marmara Pharmaceutical Journal, 17, 1, 12-14.
- Escobedo-Gracia-Medrano, R., M., Burgos-Tan, M., J., Ku-Cauich, J., R. ve Quiroz-Moreno, A., 2018. Using flow cytometry analysis in plant tissue culture derived plants, In Plant Cell Culture Protocols, 317-332, Humana Press, New York.
- Evenor, D. ve Reuveni, M., 2004. Micropropagation of *Achillea filipendulina* cv. 'Parker', Plant Cell, Tissue And Organ Culture, 79, 1, 91-93.
- Faizal, A., Lambert, E., Foubert, K., Apers, S. ve Geelen, D., 2011. *In vitro* propagation of four saponin producing *Maesa* species, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 106, 2, 215-223.

- Funk, V., A., Susanna, A., Steussy, T., F. ve Robinson, H., E., 2009. Classification of compositae, Systematics, evolution, and biogeography of Compositae, 171-189, Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT).
- Gamborg, O., L., Miller, R., A. ve Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells, Experimental Cell Research, 50, 151-158.
- Gana, J., A., Sharma, G., C., Zipf, A., Saha, S., Roberts, J. ve Wesenberg, D., M., 1995. Genotype effects on plant regeneration in callus and suspension cultures of *Avena*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 40, 3, 217-224.
- Gantait, S. ve Mahanta, M., 2022. Hyperhydricity-induced changes among *in vitro* regenerants of gerbera, South African Journal of Botany, 149, 496-501.
- George, E., F., Hall, M., A. ve De Klerk, G., J., 2008. Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. The Netherland, The Back Ground Springer.
- Ghasempour, H., Soheilikhah, Z., Zebarjadi, A., R., Ghasempour, S. ve Karimi, N., 2014. *In vitro* micro propagation, callus induction and shoot regeneration in safflower L. cv. Lesaf, Iran Plant Physiol, 4, 999-1004.
- Godo, T., Kobayashi, K., Tagami, T., Matsui, K. ve Kida, T., 1998. *In vitro* propagation utilizing suspension cultures of meristematic nodular cell clumps and chromosome stability of *Lilium* $\times$ *formolongi* hort., Scientia Horticulturae, 72, 3-4, 193-202.
- Gómez-Campo, C. ve Herranz-Sanz J., M., 1993. Conservation of Iberian endemic plants: the botanical reserve of La Encantada (Villarobledo, Albacete, Spain), Biological Conservation, 64, 2, 155-160.
- Gopinath, B., Gandhi, K. ve Saravanan, S., 2014. *In vitro* propagation of an important medicinal plant *Artemisia annua* L. from axillary bud explants, Advances in Applied Science Research, 5, 1, 254-258.
- Gorgorov, R., Stanilova, M. ve Vitkova, A., 2011. *In vitro* cultivation of some endemic and rare *Alchemilla* species in Bulgaria, Romanian Biotechnological Letters, 16, 65-70.
- Grigoriadou, K., Krigas, N. ve Maloupa, E., 2011. GIS-facilitated *in vitro* propagation and *ex situ* conservation of *Achillea occulta*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 107, 3, 531-540.
- Grigoriadou, K., Sarropoulou, V., Krigas, N., Maloupa, E. ve Tsoktouridis, G., 2020. GIS-Facilitated Effective Propagation Protocols of the Endangered Local Endemic of Crete *Carlina diae* (Rech. f.) Meusel and A. Kástner (Asteraceae): Serving *Ex Situ* Conservation Needs and Its Future Sustainable Utilization as an Ornamental, Plants, 9, 11, 1465.
- Gu, X., F., Yang, A., F., Meng, H. ve Zhang, J., R., 2005. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua, Plant Cell Reports, 24, 11, 671-676.
- Harbage, J., F., 2001. Micropropagation of *Echinacea angustifolia*, *E. pallida*, and *E. purpurea* from stem and seed explants, HortScience, 36, 2, 360-364.
- Hawkes, J., G., Maxted, N., ve Ford-Lloyd, B., V., 2000. The *Ex situ* Conservation of Plant Genetic Resources, The University of Birmingham, UK.

- Hawksworth, D., L. ve Bull, A., T., (Ed.), 2007. Plant Conservation and Biodiversity, 1st Ed., Springer, London.
- Hazarika, B., N., 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants, Current Science, 85, 1704-1712.
- Henry, Y., Marcotte, J., L. ve De Buyser, J., 1996. The effect of aneuploidy on karyotype abnormalities in wheat plants regenerated from short-and long-term somatic embryogenesis, Plant Science, 114, 1, 101-109.
- Heywood, V., H. ve Iriondo, J., M., 2003. Plant conservation: old problems, new perspectives, Biological Conservation, 113, 3, 321-335.
- Hosseini, M., J., Parvini, S. ve Bakhtiarian, A., 2007. Anti-inflammatory, analgesic activity of *Tripleurospermum disciforme* extract in rats, Toxicology Letters, 172, 47.
- Hristova, L., Damyanova, E., Doichinova, Z. ve Kapchina-Toteva, V., 2013. Effect of 6-benzylaminopurine on micropropagation of *Artemisia chamaemelifolia* Vill.(Asteraceae), Bulgarian Journal of Agricultural Science, 19, 2, 57-60.
- Husain, M., K. ve Anis, M., R., 2006. Rapid *in vitro* propagation of *Eclipta alba* (L.) Hassk. through high frequency axillary shoot proliferation, Acta Physiologiae Plantarum, 28, 4, 325.
- Hwang, S., J., 2006. Rapid *in vitro* propagation and enhanced stevioside accumulation in *Stevia rebaudiana* Bert, Journal of Plant Biology, 49, 4, 267-270.
- Iliev, I., Gajdošova, A., Libiakova, G. ve Jain, S., 2010. Plant micropropagation Plant Cell Culture: Essential Methods, UK: John Wiley & Sons, 1-23.
- IUCN, S., P., C., 2022. IUCN Red List categories and criteria: version 15.1. Prepared by the Standards and Petitions Committee of the IUCN Species Survival Commission.
- Ivanova, M. ve Van Staden, J., 2011. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104, 1, 13-21.
- Ivanova, M., Novák, O., Strnad, M. ve Van Staden, J., 2006. Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured *in vitro* in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents, Plant Growth Regulation, 50, 2, 219-230.
- Izquierdo, P., 2006. Development of micropropagation protocols for two species critically endangered Asteraceae endemic of the Galapagos Island, Lyonia, 9, 2, 57-62.
- İnceer, H. ve Beyazoğlu, O., 2004. Karyological studies in *Tripleurospermum* (Asteraceae, Anthemideae) from north-east Anatolia, Botanical Journal of the Linnean Society, 146, 4, 427-438.
- İnceer, H. ve Hayirlioglu-Ayaz, S., 2010. Chromosome numbers in *Tripleurospermum* Sch. Bip. (Asteraceae) and closely related genera: relationships between ploidy level and stomatal length, Plant Systematics and Evolution, 285, 149-157.
- İnceer, H. ve Özcan, M., 2011. Leaf anatomy as an additional taxonomy tool for 18 taxa of *Matricaria* L. and *Tripleurospermum* Sch. Bip. (Anthemideae-Asteraceae) in Turkey, Plant Systematics and Evolution, 296, 3, 205-215.

- İnceer, H. ve Özcan, M., 2021. Taxonomic evaluations on the anatomical characters of leaf and achene in Turkish *Tripleurospermum* with its relative *Matricaria* (Asteraceae), Flora, 275.
- İnceer, H., Bal, M., Ceter, T. ve Pinar, N., M., 2012. Fruit structure of 12 Turkish endemic *Tripleurospermum* Sch. Bip. (Asteraceae) taxa and its taxonomic implications, Plant Systematics and Evolution, 298, 4, 845-855.
- İnceer, H., Cüce, M., İmamoglu, K., V., Ergin, T. ve Üçler, A., O., 2022. *In vitro* propagation and cytogenetic stability of *Tripleurospermum insularum* (Asteraceae) - a critically endangered insular endemic species from Turkey, Plant Biosystems, 156, 5, 1213-1221.
- İnceer, H., Garnatje, T., Hayırlıoğlu-Ayaz, S., Pascual-Díaz, J., P., Vallès, J. ve Garcia, S., 2018. A genome size and phylogenetic survey of Mediterranean *Tripleurospermum* and *Matricaria* (Anthemideae, Asteraceae), Plos One, 13, 10.
- İnceer, H., Kalmuk, N., A., İmamoglu, K., V., Duman, O., Hayirlioglu-Ayaz, S. ve Arslan, G., 2016. Micromorphological, anatomical and cytogenetical studies in endemic *Crepis macropus* Boiss. & Heldr. (Asteraceae) from Turkey, Acta Botanica Croatica, 75, 2, 173-178.
- İnceer, H., *Tripleurospermum*, Guner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babac, M., T., (Ed.), 2012. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul, 212-214.
- Joshi, M. ve Dhar, U., 2003. *In vitro* propagation of *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew.—an endangered ethnoreligious medicinal herb of Himalaya, Plant Cell Reports, 21, 10, 933-939.
- Kadis, K., Thanos, C., A. ve Lumbreras, E., L., (Ed.), 2013. Plant Micro-Reserves: From Theory to Practice, Utopia Publishing, Athens.
- Karagöz, A., 2003. Plant Genetic Resources Conservation in Turkey, Acta Horticulturae, 598, 17-25.
- Kenneth, C., 1989. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops.
- Khandakar, R., K., Yu, J., Min, S., K., Won, M., K., Choi, H., G., Park, H., S., Choi, J., J., Chae, S., C., Jung, J., Y., Lee, K., M., Kim, T., S. ve Park, Y., J., 2014. Regeneration of haploid plantlet through anther culture of *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflorum*), Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 42, 2, 482-487.
- Kher, M., M., Joshi, D., Nekkala, S., Nataraj, M. ve Raykundaliya, D., P., 2014. Micropropagation of *Pluchea lanceolata* (Oliver and Hiern.) using nodal explant, Journal of Horticultural Research, 22, 1.
- Kodja, H., Robene-Soustrade, I., Humeau, L., Figier, J., Govinden-Soulange, J. ve Gurib-Fakim, A., 1998. Micropropagation of *Psiadia arguta* through cotyledonary axillary bud culture, Plant Growth Regulation, 25, 2, 75-80.
- Kodym, A., Senula, A., Temsch, E. M., Hood-Nowotny, R., Schumacher, F., Sekurova, O. N., Zotchev, S., B. ve Kiehn, M., 2018. Micropropagation and cryoconservation of the endangered plant species *Artemisia laciniata* (Asteraceae), Cryoletters, 39, 3, 177-189.

- Koroch, A., Juliani, H., R., Kapteyn, J. ve Simon, J., E., 2002. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69, 1, 79-83.
- Kurian, E. ve Thomas, T., D., 2015. Multiple shoot induction from nodal segments of *Spilanthes acmella* (L.) Murr., a herbal pesticidal plant, STARS: Int J (Sci), 5, 1-9.
- Kurt, S. ve Erdağ, B., 2009. *In vitro* germination and axillary shoot propagation of *Centaurea zeybekii*, Biologia, 64, 1, 97-1.
- Laguna, E., 2001. The micro-reserves as a tool for conservation of threatened plants in Europe, Nature and Environment Series, Council of Europe Publishing, 121.
- Laliberte, B., 1997. Botanic garden seed banks/genebanks worldwide, their facilities, collections and network, Botanic Gardens Conservation News, 2, 9 18-23.
- Leifert, C., Waites, B., Keetley, J., W., Wright, S., M., Nicholas, J., R. ve Waites, W., M., 1994. Effect of medlium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminats in *Delphinium* tissue cultures, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 36, 2, 149-155.
- Liao, Z., Chen, M., Sun, X. ve Tang, K., 2006. Micropropagation of endangered plant species, In *Plant Cell Culture Protocols*, 179-185, Humana Press.
- Liu, M., Jiang, F., Kong, X., Tian, J., Wu, Z. ve Wu, Z., 2017. Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L., Scientia Horticulturae, 217, 285-296.
- Lloyd, G. ve McCown, B., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture, Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society, 30, 421-427.
- Loureiro, J., Capelo, A., Brito, G., Rodriguez, E., Silva, S., Pinto, G. ve Santos, C., 2007a. Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry, Biologia Plantarum, 51, 1, 7-14.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J. ve Santos, C., 2007b. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species, Annals of Botany, 100, 875-888.
- Loyola-Vargas, V., M. ve Vázquez-Flota, F., (Eds.), 2006. *Plant Cell Culture Protocols*, Vol. 318, USA: Humana Press.
- Lu, C. S., Sharma, H., C. ve Ohm, H., W., 1991. Wheat anther culture: effect of genotype and environmental conditions, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 24, 233-236.
- Lucchesini, M., Bertoli, A., Mensuali-Sodi, A. ve Pistelli, L., 2009. Establishment of *in vitro* tissue cultures from *Echinacea angustifolia* DC adult plants for the production of phytochemical compounds, Scientia Horticulturae, 122, 3, 484-490.
- Machado, M., P., Silva, A., L., L., D., Biasi, L., A., Deschamps, C., Bessalho Filho, J., C. ve Zanette, F., 2014. Influence of calcium content of tissue on hyperhydricity and shoot-tip necrosis of *in vitro* regenerated shoots of *Lavandula angustifolia* Mill., Brazilian Archives of Biology and Technology, 57, 636-643.

- Makunga, N., P., Jäger, A., K. ve van Staden, J., 2006. Improved *in vitro* rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsia garganica* L., Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 86, 1, 77-86.
- Mallón, R., Rodríguez-Oubiña, J. ve González, M., L., 2010. *In vitro* propagation of the endangered plant *Centaurea ultreiae*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 101, 1, 31-39.
- Mandel, J., R., Dikow, R., B., Siniscalchi, C., M., Thapa, R., Watson, L., E. ve Funk, V., A., 2019. A fully resolved backbone phylogeny reveals numerous dispersals and explosive diversifications throughout the history of Asteraceae, Proceedings of the National Academy of Sciences, 116, 28, 14083-14088.
- Maxted, N., Hunter, D. ve Ríos, R., O., 2020. Plant genetic conservation. Cambridge University Press.
- Meine, C., Soulé, M. ve Noss, R., F., 2006. "A mission-driven discipline": the growth of conservation biology, Conservation Biology, 20, 3, 631-651.
- Misra, P. ve Datta, S., K., 2001. Direct differentiation of shoot buds in leaf segments of white marigold (*Tagetes erecta* L.), In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 37, 4, 466-470.
- Nasircılar, A., G., Mirici, S., Karagüzel, Ü., Ö., Eren, Ö. ve Baktir, I. 2011. *In vitro* propagation of endemic and endangered *Muscari mirum* from different explant types, Turkish Journal of Botany, 35, 1, 37-43.
- Neumann, K., H., Kumar, A. ve Imani, J., 2009. Plant Cell and Tissue Culture: A Tool in Biotechnology, (12), Berlin: Springer.
- Nikam, T., D., Mulye, K., V., Chambhare, M., R., Nikule, H., A. ve Ahire, M., L., 2019. Reduction in hyperhydricity and improvement in *in vitro* propagation of commercial hard fibre and medicinal glycoside yielding *Agave sisalana* Perr. ex Engelm by NaCl and polyethylene glycol, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 138, 1, 67-78.
- Nithya, V. ve Kamalam, M., 2021. Standardization of a protocol for micropropagation of *Eupatorium glandulosum* L. an important medicinal plant, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 146, 339-344.
- Nowakowska, M., Pavlović, Ž., Nowicki, M., Boggess, S., L. ve Trigiano, R., N., 2020. *In vitro* propagation of an endangered *Helianthus verticillatus* by axillary bud proliferation, Plants, 9, 6, 712.
- Oberprieler, C., Vogt, R., Watson, L., E., 2007. XVI. Tribe Anthemideae Cass. (1819). In: Kadereit, JW, Jeffrey C, editors. Flowering plants, eudicots; In: Kubitzki K, editor. The families and genera of vascular plants. 8th ed. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 342-374.
- Okay, Y. ve Demir, K., 2010. Critically endangered endemic *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. and Mey. and its propagation possibilities, African Journal of Agricultural, 525, 25, 3536-3541.
- Okay, Y., Ellialtıoğlu, Ş., Demır, K., Tıpırdamaz, R., Savcı, A., E., Özler, H., Gümüş, C. ve Günöz, A., 2014. Studies on propagation of endemic knapweed (*Centaurea*

- tchihatcheffii* Fisch. & Mey.) plants, Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 7, 1, 42-48.
- Okello, D., Yang, S., Komakech, R., Rahmat, E., Chung, Y., Gang, R., Kim, Y., G., Omujal, F. ve Kang, Y., 2021. An *in vitro* propagation of *Aspilia africana* (Pers.) CD Adams, and evaluation of its anatomy and physiology of acclimatized plants, Frontiers in Plant Science, 12, 704896.
- Özel, Ç., A., 2016. Micropropagation of *Anthemis pestalozzae* Boiss. from cotyledonary leaf and leaf explants, Bangladesh Journal of Botany, 45, 1, 55-61.
- Özhatay, N. ve Kültür, Ş., 2006. Check- list of additional taxa to the supplement Flora of Turkey III, Turkish Journal of Botany, 30, 4, 281-316.
- Pace, L., G., Bruno, A., A. ve Spano, L., 2009. *In vitro* plant regeneration and clonal micropropagation of *Leontopodium nivale* (Ten.) Heut ex Hand.-Mazz.(Asteraceae), Plant Biosystems, 143, 1, 12-16.
- Pace, L., Pacioni, G. ve Spano, L., 2004. *In vitro* propagation of *Artemisia petrosa* ssp. *eriantha*: potential for the preservation of an endangered species, Plant Biosystems, 138, 291-294.
- Panwar, G., S. ve Joshi, B., 2020. Micropropagation of *Tricholepis roylei* Hook. F.—a point endemic species of the Western Himalaya, Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 18, 40.
- Panwar, G., S., Joshi, B., Srivastava, A. ve Ambrish, K., 2018. *In vitro* rescue and habitat restoration of critically endangered and endemic *Catamixis baccharoids* Thomson: a monotypic genus, Perspectives on Biodiversity of India, 4, 1-6.
- Parzymies, M., Pogorzelec, M., Głębocka, K. ve Śliwińska, E., 2020. Genetic stability of the endangered species *Salix lapponum* L. regenerated *in vitro* during the reintroduction process, Biology, 9, 11, 378.
- Patel, R., M. ve Shah, R., R., 2009. Regeneration of Stevia plant through callus culture, Indian journal of pharmaceutical sciences, 71, 1, 46.
- Pathak, M., R., ve Abido, M., S., 2014. The role of biotechnology in the conservation of biodiversity, Journal of Experimental Biology, 2, 352-363.
- Pence, V., C., Finke, L., R. ve Niedz, R., P., 2020. Evaluating a DOE screen to reduce hyperhydricity in the threatened plant, *Cycladenia humilis* var. *jonesii*, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 56, 2, 215-229.
- Pérez-Tornero, O., Egea, J., Olmos, E. ve Burgos, L., 2001. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars, In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 37, 2, 250-254.
- Pevalek-Kozlina, B., 1998. *In vitro* propagation of *Centaurea ragusina* L., a Croatian endemic species, Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 40, 21-24.
- Phillips, G., C. ve Garda, M., 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 55, 3, 242-257.
- Pollard, J., W. ve Walker, J., M., 1990. Plant cell and tissue culture, Humana Press.

- Quambusch, M. ve Winkelmann, T., 2018. Bacterial endophytes in plant tissue culture: mode of action, detection, and control, In *Plant Cell Culture Protocols*, 69-88, Humana Press, New York, NY.
- Rafiq, M., Dahot, M., U., Mangrio, S., M., Naqvi, H., A. ve Qarshi, I., A., 2007. *In vitro* clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* Bertoni, Pakistan Journal of Botany, 39, 7, 2467-2474.
- Rahman, S., M., M., 2009. Regeneration of *Stevia rebaudiana* and analysis of somaclonal variation by RAPD, Biotechnology, 8, 4, 449-455.
- Raven, P., H., 2004. *Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*, (3), Island Press.
- Reed, B., M., Wada, S., DeNoma, J. ve Niedz, R., P., 2013. Mineral nutrition influences physiological responses of pear *in vitro*, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 49, 6, 699-709.
- Rewers, M., Kisiala, A., Drouin, J., Sliwinska, E. ve Cholewa, E., 2012. *In vitro*-regenerated wetland sedge *Eriophorum vaginatum* L. is genetically stable, Acta Physiologiae Plantarum, 34, 6, 2197-2206.
- Riahi, L., Chograni, H., Ben Rejeb, F., Ben Romdhane, M., Masmoudi, A., S. ve Cherif, A., 2022. Efficient *in vitro* regeneration of the endangered species *Artemisia arborescens* L. through direct organogenesis and impact on secondary metabolites production, Horticulture, Environment, and Biotechnology, 63, 3, 439-450.
- Rogova, M., A., Dragolova, D., T., Dimitrova, M., A., Yordanova, Z., P., Mantovska, D., Zhiponova, M. ve Kapchina-Toteva, V., M., 2015. Micropropagation and *ex situ* conservation of *Achillea thracica* Velen, Medicine, 5, 1.
- Rout, J., R. ve Sahoo, S., L., 2013. *In vitro* propagation and antioxidant enzymes activities of *Elephantopus scaber* L., Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 21, 51-66.
- Samarina, L., Gvasaliya, M., Koninskaya, N., Rakhmangulov, R., Efremov, A., Kiselyova, N., Ryndin, A. ve Hanke, M., V., 2019. A comparison of genetic stability in tea [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] plantlets derived from callus with plantlets from long-term *in vitro* propagation, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 138, 3, 467-474.
- Saritha, K., V., Prakash, E., Ramamurthy, N. ve Naidu, C., V., 2002. Micropropagation of *Spilanthes acmella* Murr, Biologia Plantarum, 45, 4, 581-584.
- Sevindik, B., Tütüncü, M., İzgü, T., Çürük, P., Yılmaz, Ö., Kaynak, A., G. ve Mendi, Y., 2019. Investigation of *in vitro* micropropagation technique on *Achillea ketenoglui* H. Duman species, Alatarım, 18, 1, 37-42.
- Sharma, U. ve Mohan, J., S., S., 2006. Reduction of vitrification *in vitro* raised shoots of *Chlorophytum borivillianum* Sant. & Fernand., a rare potent medicinal herb, Indian Journal of Experimental Biology, 44, 499-506.
- Shatnawi, M., 2013. Multiplication and cryopreservation of yarrow (*Achillea millefolium* L., Asteraceae), Journal of Agricultural Science and Technology, 15, 1, 163-173.
- Sivanesan, I. ve Jeong, B., R., 2007. Micropropagation and *in vitro* flowering in *Pentanema indicum* Ling, Plant Biotechnology, 24, 5, 527-532.

- Souri, E., Sarkhail, P., Kaymanesh, P., Amini, M. ve Farsam, H., 2005. Antioxidant activity of extract and a new isolated dioxo-piran derivative of *Tripleurospermum disciforme*, Pharmaceutical Biology, 43, 620-623.
- Souza, A., V., Pinto, J., E., Bertolucci, S., K., Corrêa, R., M., Costa, L., C., D., B. ve Dyer, W., E., 2007. *In vitro* Propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): A Threatened Endemic Medicinal Plant, American Society for Horticultural Science, 42, 7, 1665-1669.
- Stanilova, M., Traykova, B., Vladimirov, V., Petrova, M., Semerdjieva, I. ve Yankova-Tsvetkova, E., 2022. *In vitro* Micropropagation of *Helichrysum arenarium* (Asteraceae) as a Tool for Introducing the Species in Agriculture, Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences, 75, 10, 1454-1461.
- Stojakowska, A. ve Malarz, J., 2004. *In vitro* propagation of *Inula royleana* DC, Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 73, 1.
- Syed, R., Mujib, A., Malik, M., Q., 2021. Mamgain, J., Ejaz, B., Gulzar, B. ve Zafar, N., Mass propagation through direct and indirect organogenesis in three species of genus *Zephyranthes* and ploidy assessment of regenerants through flow cytometry, Molecular Biology Reports, 48, 1, 513-526.
- Talla, S., K., Madam, E., Manga, S., Aileni, M. ve Mamidala, P., 2019. Efficient TDZ-induced regeneration from capitulum explants of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f.-an ornamental plant with high aesthetic value, Plant Biosystems, 153, 5, 679-685.
- Tekşen, M., Erkul, S., K., Duman, H., Ateş, M., A. ve Sağiroğlu, M., 2022. *Tripleurospermum eskilensis* (Asteraceae): a new halophytic species from Central Anatolia, Turkey, Turkish Journal of Botany, 46, 2, 160-175.
- Thiyagarajan, M. ve Venkatachalam, P., 2012. Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb, Industrial Crops and Products, 37, 1, 111-117.
- Trejgell, A., Kamińska, M., Lisowska, K. ve Tretyn, A., 2018. Micropropagation of *Inula germanica* L. from the Seedlings Explants, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 46, 1, 52-57.
- Tsay, H., S., Lee, C., Y., Agrawal, D., C. ve Basker, S., 2006. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae*—a medicinal plant, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 42, 5, 445-449.
- Ulvrova, T., Vitamvas, J., Cepkova, P., H., Eliasova, K., Janovska, D., Bazant, V. ve Viehmannova, I., 2021. Micropropagation of an ornamental shrub *Disanthus cercidifolius* Maxim. and assessment of genetic fidelity of regenerants using ISSR and flow cytometry, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 144, 3, 555-566.
- Valletta, A., Santamaria, A., R., Fabrini, G., Tocci, N., Filho, V., C., Wagner, T., Brasili, E. ve Pasqua, G., 2015. Strategies for *ex situ* conservation of *Centaurea cineraria* subsp. *circae* (Asteraceae), an endemic plant from Lazio (Italy), Plant Biosystems, 150, 2, 323-332.
- Viehmannova, I., Cepkova, P., H., Vitamvas, J., Streblova, P. ve Kisilova, J., 2016. Micropropagation of a giant ornamental bromeliad *Puya berteroniana* through

- adventitious shoots and assessment of their genetic stability through ISSR primers and flow cytometry, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 125, 2, 293-302.
- Watanabe, K., N., ve Pehu, E., 1997. Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity, Elsevier.
- Wawrosch, C., Kopp, B. ve Kubelka, W., 1994. *In vitro* propagation of *Achillea asplenifolia* Vent. through multiple shoot regeneration, Plant Cell Reports, 14, 2, 161-164.
- Wildi, E., Schaffner, W. ve Berger Bütter, K., 1998. *In vitro* propagation of *Petasites hybridus* (Asteraceae) from leaf and petiole explants and from inflorescence buds, Plant Cell Reports, 18, 336-340.
- Yang, X., M., Cao, Z., Y., An, L., Z., Wang, Y., M. ve Fang, X., W., 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.), Euphytica, 152, 2, 217-224.
- Yordanova, Z., P., Rogova, M., A., Zhiponova, M., K., Georgiev, M., I. ve Kapchina-Toteva, V., M., 2017. Comparative determination of the essential oil composition in Bulgarian endemic plant *Achillea thracica* Velen. during the process of *ex situ* conservation, Phytochemistry Letters, 20, 456-461.
- Yüzbaşıoğlu, E., Dalyan, E., Mehmet, B. ve Gül, Ö., 2012. *In vitro* propagation of endemic plant *Centaurea arifolia* Boiss. Taxa, Journal of Biology, 71, 2, 121-127.
- Zhilkina, V., Y., Marakhova, A., I., Elapov, A., A., Bobkova, N., V., Vasilenko, I., A., Sergunova, E., V. ve Botin, A., S., 2022. Antimicrobial and antimycotic activity of *Tripleurospermum perforatum* (Merat.) M. Lainz, FEBS Open Bio, 12, 170-170.

ÖZGEÇMİŞ

2007 yılında Süleyman Demirel Lisesi'nden mezun oldu. 2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı ve 2013 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programı'na başladı ve 2013 yılında mezun oldu. 2013-2016 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimi gördü. 2016 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladı. Trabzon Orman Bölge Müdürlüğü'ne bağlı Doku Kültürü Laboratuvarı'nda çalışmaktadır ve iyi derecede İngilizce bilmektedir.