

**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 heterolepis* (Freyn & Sint.) Bornm. ve *T. repens* (Freyn & Sint.) Bornm. (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, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını benden esirgemeyen Dr. Tuğba ERGİN’e ve 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.

Betül ERGİN

Trabzon 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Tehlike Altındaki Endemik *Tripleurospermum heterolepis* (Freyn & Sint.) Bornm. ve *T. repens* (Freyn & Sint.) Bornm. (Asteraceae) Türlerinin Mikroçoğaltımı ve Korunması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Hüseyin İNCEER’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda 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.

28/02/2025

Betül ERGİN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Literatür Özeti	3
1.2.1. Koruma Biyolojisi	3
1.2.2. Doku Kültürü.....	7
1.2.3. Genetik Stabilite Testleri	13
1.2.4. <i>Tripleurospermum</i> Cinsinde Yapılan Mikroçoğaltım Çalışmaları.....	15
1.2.5. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> (Freyn & Sint.) Bornm.'in Morfolojik Özellikleri.....	17
1.2.6. <i>Tripleurospermum repens</i> (Freyn & Sint.) Bornm.'in Morfolojik Özellikleri.....	18
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	19
2.1. Bitki Materyalinin Temin Edilmesi.....	19
2.2. Kültür Şartları.....	19
2.3. Yüzey Dezenfeksiyonu ve Aken Çimlendirme	20
2.4. Sürgün Çoğaltımı	21
2.5. Köklendirme.....	23
2.6. Aklimatizasyon.....	23
2.7. Genetik Stabilite Testleri	24
2.7.1. Kromozom Sayımı.....	24
2.7.2. Akım Sitometrik Analiz	25
2.7.3. Stoma Analizleri	26

2.8. İstatiksel Analizler.....	27
3. BULGULAR.....	28
3.1. <i>Tripleurospermum heterolepis</i>	28
3.1.1. <i>In vitro</i> Aken Çimlendirme.....	28
3.1.2. <i>In vitro</i> Sürgün Çoğaltımı.....	29
3.1.3. <i>In vitro</i> ile Köklendirme.....	44
3.1.4. Aklimatizasyon.....	49
3.1.5. Kromozom Sayımı.....	53
3.1.6. Akım Sitometrik Analiz.....	54
3.1.7. Stoma Özellikleri.....	54
3.2. <i>Tripleurospermum repens</i>	56
3.2.1. <i>In vitro</i> Aken Çimlendirme.....	56
3.2.2. <i>In vitro</i> Sürgün Çoğaltımı.....	57
3.2.3. <i>In vitro</i> Köklendirme.....	71
3.2.4. Aklimatizasyon.....	77
3.2.5. Kromozom Sayımı.....	81
3.2.6. Akım Sitometrik Analiz.....	82
3.2.7. Stoma Özellikleri.....	82
4. TARTIŞMA.....	84
5. SONUÇLAR.....	92
6. ÖNERİLER.....	94
7. KAYNAKLAR.....	95
ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

TEHLİKE ALTINDAKİ ENDEMİK *TRIPLEUROSPERMUM HETEROLEPIS* (FREYN & SINT.) BORNM. VE *T. REPENS* (FREYN & SINT.) BORNM. (ASTERACEAE) TÜRLERİNİN MİKROÇOĞALTIMI VE KORUNMASI

Betül ERGİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hüseyin İNCEER
2025, 120 Sayfa

Bu tez çalışmasında, endemik ve nesli tehlike altında olan *Tripleurospermum heterolepis* (Frey & Sint.) Bornm. ve *Tripleurospermum repens* (Frey & Sint.) Bornm. türlerinin mikroçoğaltım ile *ex situ* koruması yapılmıştır. Mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin genetik stabilitesi kromozom sayımı, akım sitometri ve stoma analizi ile test edilmiştir. Her iki türün akenlerinin *in vitro* ortamda çimlendirilmesiyle elde edilen bitkicikler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Sürgün çoğaltımında, 0,25, 0,5, 1,0 mg L⁻¹ 6-BA, 0,25, 0,5, 1,0 mg L⁻¹ KIN, 0,25, 0,5, 1,0 mg L⁻¹ 2iP ile 0,1 mg L⁻¹ IBA ve 0,1 mg L⁻¹ NAA'nın kombinasyonlarını içeren MS besiyeri kullanılmıştır. *Tripleurospermum heterolepis*'de ortalama en fazla sürgün sayısı (5,25 ± 1,57) 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir. *Tripleurospermum repens*'de ise ortalama en fazla sürgün sayısı (3,80 ± 1,15) 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir. Köklendirmede 0,25, 0,5 ve 1,0 mg L⁻¹ IBA ile 0,25, 0,5 ve 1,0 mg L⁻¹ NAA'nın kombinasyonlarını içeren MS besiyeri kullanılmıştır. *Tripleurospermum heterolepis*'de ortalama en fazla kök sayısı (2,19 ± 0,98) 1,0 mg L⁻¹ NAA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir. *Tripleurospermum repens*'de ise ortalama en fazla kök sayısı (4,95 ± 1,10) 1,0 mg L⁻¹ IBA içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir. *In vitro* çoğaltımı yapılan *T. heterolepis* ve *T. repens*'in genetik stabilitesi kromozom sayımı, akım sitometri ve stoma analizleri ile test edilmiştir. *Tripleurospermum heterolepis* ve *T. repens*'in nuklear DNA miktarı sırasıyla 8,38 pg/2C ve 8,66 pg/2C olarak, kromozom sayısı ise 2n = 4x = 36 olarak belirlenmiş ve böylece her iki türün genetik olarak stabil olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, *in vitro* olarak çoğaltılan bitkiler ile doğal popülasyonların stoma uzunluğunun benzer olduğu görülmüştür. Aklimatizasyon başarı oranı *T. heterolepis*'in %82, *T. repens*'in %83 olarak belirlenmiştir. Bitkiler dış ortama aktarıldıktan iki yıl sonra çiçeklenmiş ve aken oluşturmuşlardır. Elde edilen bu veriler ile *T. heterolepis* ve *T. repens*'in koruma biyolojisine katkılar sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Tripleurospermum heterolepis*, *Tripleurospermum repens*, Mikroçoğaltım, Koruma biyolojisi, Endemik

PhD. Thesis

SUMMARY

MICROPROPAGATION AND CONSERVATION OF THREATENED ENDEMIC *TRIPLEUROSPERMUM HETEROLEPIS* (FREYN & SINT.) BORN. AND *T. REPENS* (FREYN & SINT.) BORN. (ASTERACEAE) SPECIES

Betül ERGİN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Hüseyin İNCEER
2025, 120 Pages

In this thesis, the endemic and endangered species *Tripleurospermum heterolepis* (Frey & Sint.) Born. and *Tripleurospermum repens* (Frey & Sint.) Born. were protected *ex situ* by micropropagation. The results of chromosome counting, flow cytometry and stomata analysis and stability tests of the plants propagated *in vitro* were carried out. Plantlets obtained by germinating the achenes of both species *in vitro* were used as explant sources. For shoot multiplication, MS medium containing a combinations of 0,25, 0,5 and 1,0 mg L⁻¹ 6-BA, 0,25, 0,5 and 1,0 mg L⁻¹ KIN, 0,25, 0,5 and 1,0 mg L⁻¹ 2iP with 0,1 mg L⁻¹ IBA and 0,1 mg L⁻¹ NAA was used. In *T. heterolepis*, the highest average shoot number ($5,25 \pm 1,57$) was obtained from MS medium containing 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA. In *T. repens*, the highest average shoot number ($3,80 \pm 1,15$) was obtained from MS medium containing 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA. For rooting, an MS medium individually containing combinations of 0,25, 0,5 and 1,0 mg L⁻¹ IBA and 0,25, 0,5 and 1,0 mg L⁻¹ NAA was used. In *T. heterolepis*, the highest average root number ($2,19 \pm 0,98$) was obtained from MS medium containing 1,0 mg L⁻¹ NAA. In *T. repens*, the highest average root number ($4,95 \pm 1,10$) was obtained from MS medium containing 1,0 mg L⁻¹ IBA. The genetic stability of *in vitro* propagated *T. heterolepis* and *T. repens* was tested by chromosome counting, flow cytometry and stomatal analysis. The nuclear DNA amounts of *T. heterolepis* and *T. repens* was determined as 8.38 pg/2C and 8.66 pg/2C, respectively, and the chromosome number was determined as $2n = 4x = 36$, thus showing that both species were genetically stable. Similarly, it was observed that stomatal lengths of *in vitro* propagated plants and natural populations were similar. Acclimatization success rate was determined as 82% for *T. heterolepis* and 83% for *T. repens*. Two years after being transferred to the external environment, the plants flowered and formed achenes. With these data, contributions were made to the conservation biology of *T. heterolepis* and *T. repens*.

Key Words: *Tripleurospermum heterolepis*, *Tripleurospermum repens*, Micropropagation, Conservation biology, Endemic

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>In vitro</i> çoğaltım döngüsü	9
Şekil 2. Genetik stabilite testleri. a: Akım sitometrik analiz, b: Stoma analizi, c: Krozomozom sayısı	14
Şekil 3. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de kültür başlangıç aşaması. a: <i>In vitro</i> aken çimlendirme, b: Birinci hafta. Ölçek: 5 cm.....	28
Şekil 4. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de kültür başlangıç aşaması. a: İkinci hafta, b: Dördüncü hafta. Ölçek: 5 cm.....	29
Şekil 5. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 0,25 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, b: 0,25 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, c: Kontrol içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	31
Şekil 6. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 0,25 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, b: 0,25 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	32
Şekil 7. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 0,25 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ NAA, b: 0,25 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	33
Şekil 8. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 0,5 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, b: 0,5 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, c: Kontrol içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	35
Şekil 9. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 0,5 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, b: 0,5 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	36
Şekil 10. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 0,5 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ NAA, b: 0,5 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	37
Şekil 11. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 1,0 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, b: 1,0 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, c: Kontrol içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	39
Şekil 12. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 1,0 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, b: 1,0 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	40
Şekil 13. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 1,0 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ NAA, b: 1,0 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	41
Şekil 14. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün sayısı üzerine etkisi.....	42

Şekil 15.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün boyu üzerine etkisi.....	42
Şekil 16.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de bitki büyüme düzenleyicilerinin yaprak sayısı üzerine etkisi.....	43
Şekil 17.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de bitki büyüme düzenleyicilerinin nod sayısı üzerine etkisi.....	43
Şekil 18.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,25 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm.....	45
Şekil 19.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,25 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm.....	45
Şekil 20.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,5 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm.....	46
Şekil 21.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,5 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm.....	47
Şekil 22.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 1,0 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm.....	47
Şekil 23.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 1,0 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm.....	48
Şekil 24.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın kök sayısı üzerine etkisi.....	48
Şekil 25.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın kök boyu üzerine etkisi.....	49
Şekil 26.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın sekonder kök sayısı üzerine etkisi	49
Şekil 27.	a: Vermikülit ortamı b: Turba ortamı. Ölçek a: 20 mm, b: 10 mm.....	50
Şekil 28.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de aklimatizasyon aşamaları. a: <i>Ex situ</i> birinci hafta, b: <i>Ex situ</i> ortam ikinci hafta, c-d: Botanik bahçesi. Ölçek a-b-c: 40 mm, d: 80 mm.....	51
Şekil 29.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> çiçek ve meyve dönemleri. a: Çiçeklenme evresi, b: Meyve evresi. Ölçek a: 15 mm, b: 6 mm. (Foto.: a: Betül ERGİN; b: Prof. Dr. Hüseyin İNCEER).....	51
Şekil 30.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'in olgun akenleri. a-b: Botanik bahçesindeki <i>ex situ</i> koleksiyonlarından elde edilen akenler, c-d: Doğal populasyonlardan elde edilen akenler. Ölçek: 1 mm.....	52
Şekil 31.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de <i>in vitro</i> somatik kromozomlar (2n=36). a: Kontrol, b: 0,25 mg L ⁻¹ NAA, c: 0,25 mg L ⁻¹ IBA, d: 0,5 mg L ⁻¹ NAA. Ölçek: 10 µm	53
Şekil 32.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'in akım sitometri histogramı	54
Şekil 33.	<i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de yapraktan yüzeysel kesit. a: Üst yüzey, b: Alt yüzey. Ölçek: 30 µm	55

Şekil 34.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de kültür başlangıç aşaması. a: <i>In vitro</i> aken çimlenmesi, b: Birinci hafta. Ölçek: 5 mm.....	56
Şekil 35.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de kültür başlangıç aşaması. a: İkinci hafta, b: Dördüncü hafta. Ölçek: 5 mm	57
Şekil 36.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 0,25 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, b: 0,25 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, c: Kontrol içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	59
Şekil 37.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 0,25 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, b: 0,25 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	60
Şekil 38.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 0,25 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ NAA, b: 0,25 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	61
Şekil 39.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 0,5 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, b: 0,5 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, c: Kontrol içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	63
Şekil 40.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 0,5 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, b: 0,5 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	64
Şekil 41.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 0,5 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ NAA, b: 0,5 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	65
Şekil 42.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 1,0 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, b: 1,0 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, c: Kontrol içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	67
Şekil 43.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 1,0 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ IBA, b: 1,0 mg L ⁻¹ KIN + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	68
Şekil 44.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de sürgün çoğaltımı. a: 1,0 mg L ⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L ⁻¹ NAA, b: 1,0 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm	69
Şekil 45.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün sayısı üzerine etkisi.....	70
Şekil 46.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün boyu üzerine etkisi	70
Şekil 47.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de bitki büyüme düzenleyicilerinin yaprak sayısı üzerine etkisi.....	71
Şekil 48.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de bitki büyüme düzenleyicilerinin nod sayısı üzerine etkisi.....	71
Şekil 49.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,25 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm.....	72

Şekil 50.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,25 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm	73
Şekil 51.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,5 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm	73
Şekil 52.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,5 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm	74
Şekil 53.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 1,0 mg L ⁻¹ IBA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm	75
Şekil 54.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 1,0 mg L ⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm	75
Şekil 55.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın kök sayısı üzerine etkisi.....	76
Şekil 56.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın kök boyu üzerine etkisi.....	76
Şekil 57.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın sekonder kök sayısı üzerine etkisi	77
Şekil 58.	a: Vermikülit ortamı b: Turba ortamı. Ölçek a: 20 mm, b: 10 mm	78
Şekil 59.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de aklimatizasyon aşamaları. a: <i>Ex situ</i> birinci hafta, b: <i>Ex vitro</i> ortam ikinci hafta, c-d: Botanik bahçesi, e: Çiçeklenme evresi. Ölçek a-b-c: 40 mm, d: 80 mm	79
Şekil 60.	<i>Tripleurospermum repens</i> çiçek ve meyve dönemleri. a: Çiçeklenme evresi, b: Meyve evresi. Ölçek a: 15 mm, b: 15 mm. (Foto.: a: Betül ERGİN; b: Prof. Dr. Hüseyin İNCEER).....	79
Şekil 61.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'in olgun akenleri. a-b: Botanik bahçesindeki <i>ex situ</i> koleksiyonlarından elde edilen akenler, c-d: Doğal populasyonlardan elde edilen akenler. Ölçek: 1 mm	80
Şekil 62.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de <i>in vitro</i> somatik kromozomlar (2n=36). a: Kontrol, b: 0,25 mg L ⁻¹ IBA, c: 0,5 mg L ⁻¹ IBA, d: 1,0 mg L ⁻¹ NAA. Ölçek: 10 µm	81
Şekil 63.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'in akım sitometri histogramı	82
Şekil 64.	<i>Tripleurospermum repens</i> 'de yapraktan yüzeysel kesit. a: Üst yüzey, b: Alt yüzey. Ölçek: 30 µm	83

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> ve <i>T. repens</i> 'in lokalite ve koleksiyon bilgileri.....	19
Tablo 2. <i>In vitro</i> kültür şartları.....	19
Tablo 3. Yüzey dezenfeksiyonu.....	20
Tablo 4. MS temel besiyeri ortamı içeriği	21
Tablo 5. Sürgün çoğaltımı aşamasında MS temel besiyeri ortamının içerdiği bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonları.....	22
Tablo 6. Köklendirme aşamasında MS temel besiyeri ortamının içerdiği bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları	23
Tablo 7. Kromozom sayımı için preparasyon işlemi	25
Tablo 8. Akım sitometri analizi için örneklerin hazırlanması	25
Tablo 9. Stoma analizi için örneklerin hazırlanması.....	26
Tablo 10. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de sitokinin ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi	30
Tablo 11. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de sitokinin ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi	34
Tablo 12. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de sitokinin ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi	38
Tablo 13. <i>Tripleurospermum heterolepis</i> 'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın kök oluşumuna etkisi.....	44
Tablo 14. <i>Tripleurospermum repens</i> 'de sitokinin ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi	58
Tablo 15. <i>Tripleurospermum repens</i> 'de sitokinin ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi	62
Tablo 16. <i>Tripleurospermum repens</i> 'de sitokinin ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi	66
Tablo 17. <i>Tripleurospermum repens</i> 'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın kök oluşumuna etkisi.....	72
Tablo 18. <i>Tripleurospermum</i> ve diğer Asteraceae üyelerinde yapılan bazı <i>in vitro</i> çoğaltım çalışmalarında aklimatizasyon başarı oranları.....	90

SEMBOLLER DİZİNİ

ANOVA : Varyans Analizi

cm : Santimetre

CO₂ : Karbondioksit

CR : Kritik tehlike altında

dk : Dakika

DNA : Deoksiribonükleik asit

EDTA : Etilendiamintetraasetikasit

EtOH : Etanol

Foto: Fotoğraf

gr : Gram

HCl : Hidroklorik Asit

IAA : İndol-3-Asetik Asit

IBA : İndol-3-Bütirik Asit

IUCN: International Union for Conservation of Nature and Natural
Resources/Uluslararası Doğa Koruma Birliği

KIN : Kinetin

L : Litre

M : Molar

mg : Miligram

ml : Mililitre

mm : Milimetre

mM : Milimolar

MS :	Murashige ve Skoog (1962)
NAA :	α -Naftalenasetik asit
NaOCl :	Sodyum Hipoklorit
NaOH :	Sodyum Hidroksit
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PVP :	Polivinilpirolidon
sn :	Saniye
vb :	Ve benzeri
vd :	Ve diğlerleri
μ l :	Mikrolitre
μ M :	Mikromol
% :	Yüzde
$^{\circ}$ C :	Santigrad derece
2iP :	6-(y,ydimethylallylamino)-purine
6-BA :	6-Benzilaminopürin

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bitkiler dünya üzerindeki ekosistemlerin temel bileşenleridir. Ekosistemlerin başlıca temellerini ve fiziksel yapılarını oluştururlar ve diğer organizmaların çeşitliliğini destekleyen kaynaklar üretirler. Ayrıca bitkiler, insanların geçimi için gerekli olan gıda ve diğer malzemeleri sağlarlar ve insanlar için faydalı olan birçok ekolojik sürece dahil olurlar (Hamilton, 2013).

Bitki çeşitliliği, tüm doğal ekosistemlerin işleyişinde önemli bir rol oynamasının yanı sıra, insanlara gıda ilaç, yabani ve evcil hayvanlara ise gıda açısından doğrudan fayda sağlar. İnsanoğlu en eski zamanlardan bu yana bitki çeşitliliğinden farklı şekillerde yararlanmıştır. Bitki çeşitliliğinin dikkatsizce kaybedilmesi veya sürdürülemez tüketimle birlikte hızlı nüfus artışından kaynaklanabilecek sonuçların bitki kaynaklarımız üzerinde yıkıcı bir etkisi olması muhtemeldir ve bu da bir bütün olarak insanlık üzerinde doğrudan bir etkiye yol açacaktır (Hawkes vd., 2012).

Bitki biyoçeşitliliğinin korunması sürdürülebilir bir yaşam ve gelecek açısından oldukça önemlidir. Bitki çeşitliliğinin korunması *in situ* ve *ex situ* olmak üzere başlıca iki şekilde gerçekleştirilebilir (Cruz-Cruz, 2013). Bitki türlerinin doğal ortamlarında muhafaza edilmesi, kültüre alınmış türlerin kendine özgü özelliklerini geliştirdikleri çevrede muhafaza edilmesi *in situ* koruma stratejileri olarak bilinmektedir. Ancak, habitat tahribatı ve bu doğal ortamların dönüşümü nedeniyle popülasyonlarda ve ekosistemlerde ağır bir kayıplar veya azalmalar söz konusudur. Bu nedenle, nesli tehlike altında olan türlerin korunmasında yerinde yöntemler tek başına yeterli değildir. Tohum bankalarında depolama, gen koleksiyonları, *in vitro* koleksiyonlar ve botanik bahçeleri gibi ek yaklaşımlar, bitki biyolojik çeşitliliğine yönelik koruma programlarını tamamlamaktadır. Bunlar biyolojik materyali doğal yaşam ortamlarının dışında tutmak anlamına gelen *ex situ* koruma stratejileri olarak sınıflandırılırlar. *In situ* ve *ex situ* koruma yöntemleri birbirlerinin tamamlayıcıdır ve koruma için farklı alternatifler sunarlar (Cruz-Cruz, 2013).

Bitki biyoteknolojisindeki, özellikle de *in vitro* teknikler ve moleküler biyolojiyle ilişkili ilerlemeler, bitki çeşitliliğinin korunmasını ve yönetimini desteklemek ve

geliştirmek için güçlü araçlar sağlamıştır. Günümüzde, nesli tehlike altında olan, nadir ve/veya endemik bitki türlerini korumak için biyoteknolojik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler kısa, orta ve uzun vadede, istenen özellikteki materyalin genetik çeşitliliğinin korunmasına olanak sağlamaktadır. *In vitro* teknikler, vejetatif olarak çoğaltılan bitki türleri için özellikle önemlidir. Ayrıca *in vitro* teknikler, minimum alan kullanarak kapsamlı koleksiyonların oluşturulmasına olanak tanır, yabancı populasyonun geri kazanılması için değerli materyalin tedarikine izin verirler ve böylece moleküler araştırmaları ve ekolojik çalışmaları kolaylaştırırlar (Cruz-Cruz, 2013).

In vitro teknikler kullanılarak yapılan bitki çoğaltımları sırasında bitkiler, somoklonal varyasyonlar olarak da bilinen sitolojik anormallikler ile sonuçlanan süreçlerden geçebilirler. Somaklonal varyasyon olarak bilinen bu durum eksplantın genotipi, kültür rejimi ve bitki büyüme düzenleyicileri tarafından oluşturulabilir (Bairu vd., 2011). *In vitro* ortamlarda çoğaltılan bitkilerin genetik stabilitesinin belirlenmesi fenotipik, sitolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde çeşitli tekniklerle gerçekleştirilebilir (Benson, 1999; Hawkes vd., 2000). Mikroçoğaltım/*in vitro* çoğaltım ile elde edilen bitkilerin genetik stabilitesinin belirlenmesi için sitolojik tekniklerden biri olan kromozom sayımı güvenilir bir yöntem olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Godo vd., 1998; Inceer vd., 2022; Ergin, 2023; Cuce ve Inceer, 2024). Akım sitometri yöntemi de *in vitro* çoğaltım ile elde edilen bitkilerin genetik stabilitesini belirlemek için yaygın olarak kullanılan başka bir yöntemdir. Nükleik asit-spesifik floresan boyalar kullanılan akım sitometri, bitki doku kültürlerinde DNA içeriğinin ve ploidi varyasyonlarının değerlendirilmesi için hızlı, kolay ve tekrarlanabilir olduğundan dolayı sıklıkla kullanılan bir tekniktir (Escobedo-Gracia-Medrano vd., 2018; Inceer vd., 2022; Ergin, 2023; Cuce ve Inceer, 2024).

Çiçekli bitkilerdeki en büyük familyalardan biri olan Asteraceae familyası, yaklaşık olarak 1600-1700 cinse ve 25000-35000 türe sahiptir (Funk vd., 2009; Mandel vd., 2019). Ülkemizde ise 137 cinse ve 1209 türe sahiptir ve tür sayısı bakımından ilk sırada yer almaktadır (Davis ve Tan, 1988). Aynı zamanda, endemik tür bakımından ülkemizin en zengin familyası olarak bilinmektedir ve sahip olduğu türlerin 447 tanesi endemiktir (Özhatay ve Kültür, 2006). Bu familyadaki bitkiler, süs bitkisi ve sebze olarak kullanılmasının yanı sıra, uçucu yağlar ve etken maddelerden dolayı tıbbi kullanımı olan, içerdiği sabit yağlar ve inulinden dolayı gıda amacıyla kullanılan, kauçuktan dolayı ise sanayi ve ekonomik önemi olan bir familya olarak bilinmektedir (Baytop, 1991).

Asteraceae familyasının Anthemideae tribusunda bulunan *Tripleurospermum* Sch. Bip. cinsi 40'in üzerinde tür içermektedir (Oberprieler vd., 2007; Inceer vd., 2018). Ülkemizde bu cinse ait 33 takson bulunmaktadır ve bunlardan 17 tanesi endemiktir (Inceer vd., 2012a; Cuce; Inceer, 2024). Endemizm oranı oldukça yüksek olan bu cinsteki türlerin çoğu, antropojenik faktörlerin etkisiyle yok olma tehlikesi altındadır (Ekim vd., 2000).

Tripleurospermum taksonları Kuzey yarımkürede, özellikle Avrupa, ılıman Asya ve Kuzey Afrika'yı kapsayan Akdeniz havzasında yayılış göstermektedir (Oberprieler vd., 2007). Etnobotanik çalışmalar, *Tripleurospermum* türlerinin yatıştırıcı, iltihap giderici, kas ağrısı dindirici, yorgunluk giderici özelliklerinin yanı sıra böbrek taşı, boğaz ağrısı, diyabet, kalp rahatsızlıkları, mide ağrısı dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığını ortaya koymuştur (Sheydaei ve Duarte, 2023). Ayrıca yapılan çalışmalarda *Tripleurospermum* türlerinin antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar gibi tıbbi özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Sheydaei ve Duarte, 2023).

Tripleurospermum heterolepis (Freyn & Sint.) Bornm. ve *T. repens* (Freyn & Sint.) Bornm. Türkiye için endemik türlerdir. Aynı zamanda bu türler güncel IUCN Kırmızı Liste Kategorileri ve Ölçütlerine göre *Tripleurospermum*'un nesli tehlike altında olan türleri arasında yer almaktadır (IUCN, 2024). Diğer yandan *Tripleurospermum* türlerinin *ex situ* korunmasıyla ilgili çalışmalar; *T. fissurale* (Sosn.) E. Hossain, *T. insularum* Inceer & Hayirlioglu-Ayaz, *T. conoclinium* (Boiss. & Bal.) Hayek, *T. hygrophilum* (Bornm.) Bornm. ve *T. ziganaense* Inceer and Hayirlioglu-Ayaz türlerinin *in vitro* çoğaltımı ile sınırlıdır (Cuce vd., 2022; Inceer vd., 2022, Ergin, 2023; Cuce ve Inceer, 2024). Dolayısıyla, gerek *T. heterolepis* gerekse *T. repens*'in *ex situ* korunmasına yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu tez çalışmasında nesli tehlike altında olan endemik *T. heterolepis* ve *T. repens* türlerinin mikroçoğaltım ile *ex situ* korunması amaçlanmıştır.

1.2. Literatür Özeti

1.2.1. Koruma Biyolojisi

Koruma biyolojisi, 1980'lerden bu yana gelişen başta ekoloji, demografi, populasyon biyolojisi, populasyon genetiği, biyocoğrafya, peyzaj ekolojisi, çevre yönetimi ve ekonomi olmak üzere çeşitli alanlardan beslenen bir bilimdir (Heywood ve Iriondo, 2003). Koruma, “bir yandan gelecek nesillerin ihtiyaçlarını ve isteklerini karşılama potansiyelini korurken,

bir yandan da mevcut nesillere en büyük sürdürülebilir faydayı sağlayacak şekilde biyosferin insan tarafından kullanılmasının yönetimi” olarak tanımlamıştır ve doğal çevrenin korunmasını, bakımını, sürdürülebilir kullanımını, restorasyonunu ve geliştirilmesini kapsar. Tek cümle ile tanımlanacak olursa; koruma, çevreyi yağmalamayacak, tüketmeyecek veya yok etmeyecek şekilde yönetme felsefesidir (Heywood ve Iriondo, 2003). Koruma stratejileri *in situ* ve *ex situ* olmak üzere ikiye ayrılır;

- *In situ* ve *Ex situ* Koruma

In situ koruma, türleri doğal habitatında koruma olarak bilinir. Hayvan ve bitki ekosistemlerini içeren biyomların tamamı koruma yerleri olarak belirlenebilir. Bu seviye, tropik ormanların yok olma oranlarının yavaşlatılmasında veya ılıman ormanlardaki kereste rezervlerinin kontrol edilmesinde son derece önemlidir, ancak genel olarak genetik kaynaklar üzerinde çok az etkisi vardır. Yerinde koruma, biyosfer rezervleri, milli parklar, dünya mirası alanları ve diğer korunan alanlar aracılığıyla ulusal hükümetlerin himayesi altında gerçekleştirilmektedir (Benson, 1999).

Ex situ koruma habitatı dışında koruma olarak bilinir. Belirli kriterleri kullanarak türleri kendi doğal yaşam alanı dışında korur (Heywood ve Iriondo, 2003). Bitki genetik kaynaklarının korunmasına yönelik geleneksel olan bu teknik, tohum veya bitkilerin elde edilmesini ve bunların uzun vadeli depolama için uygun koşullar altındaki yerlere taşınmasını içerir. *Ex situ* koruma daha fazla tercih edilen koruma yöntemidir. *Ex situ* numuneler gen bankalarında, tarımsal araştırmalarda veya germplazm mahsul merkezlerinde, klonal depolarda, botanik bahçelerinde ve arboretumlarda saklanabilir (Benson, 1999). *Ex situ* koruma tipleri;

- Tohum Bankaları

Tohumları soğuk ve kuru koşullar altında depolayan tesisler, yabani türler de dahil olmak üzere bitki genlerini korumanın en popüler yoludur. Tohumların uzun vadeli korunmasında en önemli husus, kuru koşullar ve düşük sıcaklıklar altında depolama sırasında korunması gereken her bir türün tohum davranışının belirlenmesidir. Tohumlar

%8'in altındaki düşük bir nem yüzdesine kadar kurutulabilirse, 20°C'nin altındaki çok düşük sıcaklıklara dayanabilirler (Laliberté, 1997).

Tohum bankacılığının temel avantajı, optimum koşulları sağlayarak ve yenilenme ihtiyacını azaltarak büyük populasyonların korunmasına ve genetik erozyonun en aza indirilmesine olanak sağlamasıdır. Tohumların uzun süreli muhafaza edilebilmesi, canlılığın sürekli izlenmesi ve numunenin yaşayabilirliği minimum seviyenin altına düştüğünde yenilenmesine veya yeniden toplanmasına bağlıdır. Tohum bankalarındaki faaliyetler toplama, tohum hazırlama, tohum kurutma, paketleme, depolama, periyodik çimlenme testleri, tohum yenileme, yeniden depolama ve faaliyetin her aşamasının belgelemesi şeklindedir. Ancak çimlenme hızı çok yavaş olan, çimlenmeye dirençli olan veya hemen çimlenen ve depolanamayan türler için tohum bankalarının kullanımı uygun değildir (Laliberté, 1997).

▪ Botanik Bahçeleri

Canlı koleksiyonlar, botanik bahçelerinde eskiden beri uygulanan alternatif bir *ex situ* yöntemdir (Laliberté, 1997). Botanik bahçelerinin uzun bir geçmişi vardır. Modern botanik bahçesi kökleri; bitkilerin şifalı otlar ve baharatlar olarak incelenmek ve kullanılmak üzere düzenlendiği orta çağ manastır bahçelerine kadar uzanır. Avrupa'nın ilk botanik bahçeleri, 16. yüzyılın ortalarında İtalya'da kurulmuştur. Botanik bahçelerinin dünya genelindeki dağılımı, bitki çeşitliliğinin küresel dağılımı açısından oldukça dengesizdir. Botanik bahçeleri ve arboretumlarda korunan genetik materyalin çoğunluğu, Avrupa ve Kuzey Amerika'da bulunmaktadır. Kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerindeki botanik bahçeleri, çok fazla türe ev sahipliği yaparken, tropikal bölgelerde ve güney yarımkürede durum tam tersidir. Botanik bahçeleri 'doğa dışındaki en büyük biyoçeşitlilik topluluğunu' barındıran alanlardır. Örneğin, Kew'deki Kraliyet Botanik Bahçelerinde bulunan tür miktarı, çoğu ülkenin doğal ortamlarındaki tür sayılarından daha fazladır. Bununla birlikte, tüm botanik bahçelerinin yalnızca %45'inin germplazm koleksiyonlarına (genotip veya populasyon toplulukları), yani yeterli sayıda numuneye ve koleksiyonları yönetmek için yeterli kapasiteye sahip olduğu kabul edilmektedir. Birçok botanik bahçesi yüksek bilimsel değere sahip özel koleksiyonlara ev sahipliği yapmaktadır. Bu koleksiyonlar, ilgili cins ve türlere ait çok çeşitli yabancı materyali içerir (Hurka vd., 2003). Botanik bahçeleri, son yıllarda nesli tükenmekte olan bitki türlerinin korunmasına

doğrudan katkıda bulunan veya özellikle koruma amacıyla yönetilen *ex situ* tesisler haline gelmiştir (Laliberté, 1997).

- Saha Gen Bankaları

Saha gen bankaları veya canlı koleksiyonları; uzun ömürlü çok yıllık bitkiler, dirençli türler ve vejetatif olarak üreyen türler için ana koruma stratejisidir. Başlıca sınırlamaları ise; çok fazla yer kaplamaları, bakımının ve doğal afetlerden korunmasının zor olmasıdır. Hastalıkların yayılmasına karşı hassastırlar ve ihmalden zarar görebilirler. Çoğu durumda, önemli genetik kaynakların korunması için mevcut tek seçenek budur. Bitkiler sergilendiğinde önemli bir eğitim değerine sahiptir ve araştırma amacıyla kolayca erişilebilir (Laliberté, 1997).

- Polen Bankaları

Polenlerin korunması, bazı türlerin temel koleksiyonları için yararlı olabilir. Küçük bir alan gerektirir. Tohumlar gibi polen de kurumaya dayanıklı ve dayanıksız olarak ikiye ayrılabilir. Bununla birlikte, başta tıbbi açıdan ve ormancılık açısından önemli türler olmak üzere yabani türlerden gelen polenlerin depolanma özelliklerine ilişkin bilgiler kısıtlıdır (Laliberté, 1997).

- DNA Bankaları

DNA bankaları oluşturulması, germplazm koleksiyonları, büyük miktarda genetik kaynağın (genler, DNA) hızlı ve düşük maliyetle depolanmasına olanak sağlayabilir. Gen bankaları, gen havuzunun hızlı kaybına karşı bir sigorta poliçesi görevi görebilir. Soyu tükenmiş taksonların moleküler filogenetiği ve sistematğinde kullanılabilir. DNA örnekleri esas olarak biyolojik araştırma ve biyolojik çeşitlilik çalışmalarının değerlendirilmesi için kullanılır. Koruma çalışmalarında kullanımı sınırlıdır ancak genetik materyal, bitki yetiştirme ve geliştirme amacıyla diğer genotiplere aktarılabilir (Laliberté, 1997).

1.2.2. Doku Kùltürü

Biyoteknolojinin koruma biyolojisi programlarına doğrudan yardımcı olduğu alanlardan biri bitki doku kùltürüdür. Bitki doku kùltürü teknolojileri bitki genetik kaynaklarının *ex situ* korunmasında önemli bir etkiye sahiptir. Somatik embriyo ve organ kùltürü tekniklerini kullanan mikroçoğaltım, pek çok bitki geliştirme programına yardımcı olur ve bu yöntemler, nesli tükenmekte olan bitki türlerinin korunması için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Vejetatif olarak çoğaltılan bazı bitkilerin tohumları depolamaya uygun olmadığından, özel koruma sorunları ortaya çıkmaktadır. Saha gen bankaları önemli koruma seçenekleri sunarken, bu şekilde muhafaza edilen genetik materyal, patojen saldırısı ve iklimsel hasara karşı risk altında olabilir. Doku kùltürü teknikleri ile çoğaltılan türler için *in vitro* koruma, tek güvenilir ve uzun vadeli koruma yöntemidir. Aktif büyüme durumunda, yavaşlatılmış büyüme altında depolama, uygun maliyetli ve orta vadeli koruma seçenekleri sağlar. Çoğu büyük uluslararası germplazm merkezi, vejetatif olarak çoğaltılan ürünler için tercih ettikleri yöntem olarak *in vitro* koruma yöntemini tercih etmektedir. Bunlar; Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı, Ulusal Klonal Germplazm Deposu (Oregon), Uluslararası Patates Merkezi (CIP, Peru), Uluslararası Tropikal Enstitüsü Tarım (IITA, Nijerya), ve Ulusal Bitki Genetik Kaynakları Bürosu (NBPGR, Hindistan) (Benson, 1999).

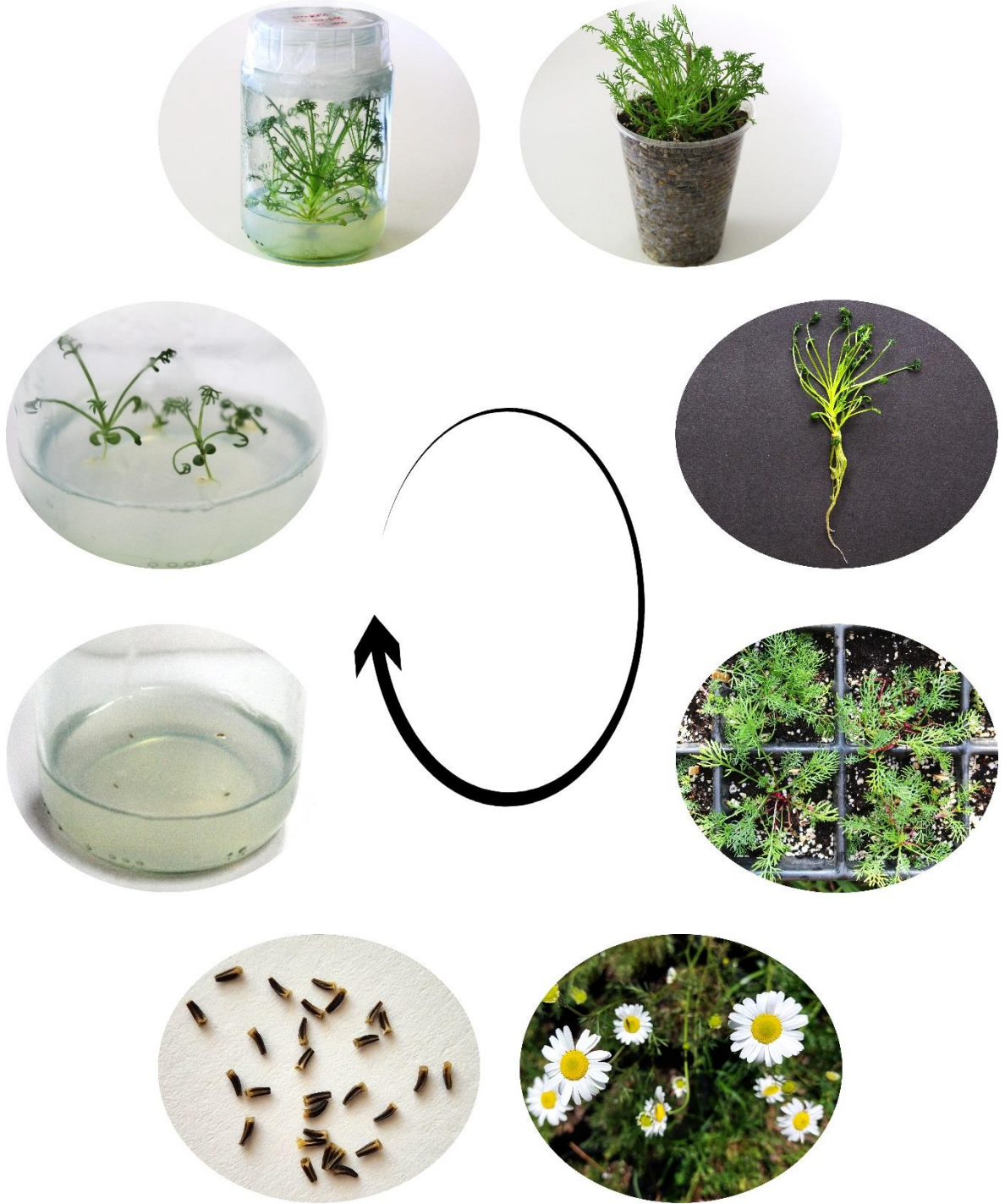
Bitki genetik materyalinin aktif veya yavaş büyüme durumunda muhafaza edilmesi, orta vadeli bir depolama seçeneği sağlar. Ancak *in vitro* olarak üretilen bitki genetik materyalinin sıvı nitrojende kriyoprezervasyon yöntemi ile uzun vadeli korunması, giderek daha yaygın hale gelmektedir. Bu nedenle, kriyo-koruma, geleneksel tohum bankacılığı teknikleri kullanılarak muhafaza edilemeyen bitki genetik materyaline ve/veya vejetatif olarak çoğaltılmış genetik materyale uygulanır. İnatçı tohumların (ve embriyoların) dondurularak saklanması özellikle önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Benson, 1999).

Bitki biyoteknolojisinde, klonal çoğaltım, yeni varyantların üretilmesi, somatik hibridizasyon ve genetik transformasyon yoluyla genetiği değiştirilmiş bitkilerin üretimi dahil olmak üzere bir dizi *in vitro* teknik kullanılmaktadır. Ayrıca *in vitro* kùltürler, bitki gen kaynaklarının korunmasında da önemli bir role sahiptir. Bitki biyoteknolojisi programlarında *in vitro* germplazm koleksiyonları, araştırma faaliyetlerinin verimliliğini arttırdığı ve bu tür faaliyetlerden elde edilen ürünleri hem bilimsel hem de ticari amaçlarla güvence altına aldığı için giderek artan bir öneme sahiptir. Bitki germplazmasının

korunması, mikroçoğaltım gibi tekniklerin kullanılmasıyla *in vitro* bitki, hücre ve doku kültürü programlarının amacı olabilir. Doku kültürü teknikleri, nesli tükenmekte olan bitki türlerinin çoğaltılıp korunmasında hayati öneme sahiptir. Bununla birlikte, *in vitro* bitki genetik kaynaklarının korunması, farklı bitki türlerinin özel kültür gereksinimlerinin anlaşılmasını gerektirir (Benson, 1999).

Mikroçoğaltım/*in vitro* çoğaltım, seçilen germplazmanın *in vitro* teknikler kullanılarak çoğaltılması için çeşitli yolları tanımlayan genel bir terimdir. Bitki çoğaltma tekniklerinde yöntemler ve detaylar önemli ölçüde farklılık gösterse de başarılı mikroçoğaltımın beş temel aşaması bulunmaktadır (Şekil 1);

- ❖ Germplazm seçimini içeren hazırlık aşaması
- ❖ Aseptik kültürlerin oluşturulması
- ❖ Sürgün çoğaltımı
- ❖ Köklendirme
- ❖ Aklimatizasyon



Şekil 1. *In vitro* çoğaltım döngüsü

- Germplazm Seçimini İçeren Hazırlık Aşaması

In vitro korumaya yönelik ilk adım germplazmanın elde edilmesidir. Bu aşama basit gibi görünse de germplazm için *in vitro* kültür oluşturma kapasitesini önemli ölçüde etkileyebilecek mevsimsel etkilerin bile dikkate alınması önemlidir. Hedef bitkilerin doğru

şekilde tanımlanmasını ve kalan doğal popülasyonu tehlikeye atmadan yeterli sayıda bireyden bitki örnekleri toplanabildiğinden emin olmak da bu aşamada önemlidir (Yidana vd., 1985).

In vitro kültür için doku seçimi, bir eksplantın *in vitro* davranışını önemli ölçüde etkilemektedir. Koleksiyon için doku seçerken dikkate alınması gereken bir dizi faktörün olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Bunlar;

- ❖ Kaynak bitkinin genotipi
- ❖ Eksplantın doku tipi
- ❖ Eksplantın fizyolojik yaşı
- ❖ Eksplantın elde edildiği sezondur.

Bazı bitki türlerinde, başarılı *in vitro* bitki rejenerasyonu için spesifik bir eksplant gerekli olabilir. Örneğin olgunlaşmamış embriyolar, embriyojenik kallus oluşumunun başlatılacağı birkaç eksplant türü arasındadır. Genel olarak daha büyük eksplantlar, küçük eksplantlara kıyasla daha iyi hayatta kalma ve yenilenme oranları sağlasa da küçük eksplantların kullanılması sonraki kültürlerde mikroorganizmaların görülme sıklığını azaltabilir. Benzer şekilde, araziden toplanan eksplantların kurak mevsimle karşılaştırıldığında yağmurlu mevsimde daha fazla mikrobiyal kontaminasyon taşıdığı bilinmektedir (Kenneth, 1989).

- Aseptik Kültürlerin Oluşturulması

Bu aşama ana bitkilerin yüzey dezenfeksiyonu ve eksplantların kültür edilmesini içerir. *In vitro* tekniklerin en meşakkatli kısımları, bitki materyallerinin dezenfeksiyonu, besiyerlerinin sterilize edilmesi ve bu şartlara ulaşıldığında aseptik koşulların muhafaza edilmesidir. Bakteriler ve mantarlar hücre kültürlerinde gözlenen en yaygın iki kontaminasyon kaynağıdır. Mantar sporları hafiftir ve çevremizde bol miktarda bulunur. Bir mantar sporu doku kültüründe kullanılan kültür ortamı ile temas geçtiğinde, koşullar sporun çimlenmesi ve daha sonra kültürün kontaminasyonu için optimaldir (Torres, 2012).

Mikroplardan arı bitki materyali elde etmek zordur ve alınan tüm önlemlere rağmen, eksplant iyi bir şekilde dezenfekte edilmezse kültürlerin çoğu kontamine olacaktır. Canlı materyaller aşırı ısıya maruz kaldığında biyolojik özelliklerini koruyamadığı için bitki doku ve organları aşırı ısı yerine dezenfekte edici bir solüsyonla dezenfekte edilir. En yaygın kullanılan solüsyonlar, kalsiyum hipoklorit, sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit,

etanol, gümüş nitrat vb. kimyasallardır. Eksplantları dezenfekte etmek için kullanılan solüsyonlar bitki dokusunu korumalı ancak aynı zamanda mantar veya bakteri gibi mikroorganizmaları da yok etmelidir. Eksplantlar elde edildikten sonra, solüsyon muamelesi işleminden önce hafif sabunlu bir deterjanla yıkanmalıdır. Bazı otsu bitki materyalleri bu adımı gerektirmeyebilir ancak odunsu materyaller, yumrular vb. iyice yıkanmalıdır (Torres, 2012).

- Sürgün Çoğaltımı

Tek bir tomurcuk içeren bir eksplant, türe ve kültür ortamına bağlı olarak tek bir sürgün halinde gelişebilir veya birden fazla sürgün oluşturabilir. Yeni sürgünler geliştikçe kendi eksenleri boyunca tomurcuklar üretirler ve tekrarlanan alt kültür yoluyla bu süreç devam eder. Tomurcuk gelişimi ile bağlantılı olarak kallus oluşumu meydana gelebilir ve kallus içindeki meristematik bölgelerden yeni sürgünler ortaya çıkabilir, böylece daha fazla bitkicik üretilir. Sürgün çoğalmasını arttırmak için farklı sitokinin konsantrasyonları kullanılır, yaygın olarak kullanılan sitokininler 6-BA (6-benzilaminopürin), 2iP (6-(y, ydimetilallilamino)-pürin), KIN (kinetin), ZEA (zeatin)'dir. Birkaç alt kültürden sonra, *in vitro*'da üretilmiş bitkicikler materyalin köklenmesini arttırmak için köklendirme ortamına aktarılabilir. Bu yöntem, mikroçoğaltımın en yaygın uygulanabilir yöntemidir. Sürgünlerin sayısı, *in vitro*'da üretilmiş organların veya kallusun alt bölümlere ayrılması ve yeniden kültürlenmesiyle artırılır. Bu şekilde elde edilen sürgünler daha sonra köklenme için köklendirme ortamına aktarılabilir (Torres, 2012).

- Köklendirme

Sürgün çoğaltım aşamasında sürgün oluşumunu teşvik etmek için kullanılan koşullar altında çok az bitki köklenebilir. Çoğu durumda sürgün çoğaltım ortamındaki sitokininlerin varlığı, kök oluşumunu engellediği için bu aşamada ayrı bir kök indükleyici ortam kullanılmalıdır. Bitkiciklerin köklenmesini etkileyen faktörler arasında; büyüme düzenleyicileri, makro besinler, mikro besinler, organik takviyeler, ışık ve sıcaklık yer alır. Bazı türlerde köklenmeyi teşvik etmek için gerekli olan tek şey, sürgünleri veya sürgün kümelerini sitokinin içermeyen bir ortama aktarmaktır. Ancak birçok türde köklenmenin başlatılması yalnızca oksinin varlığında gerçekleşir. Köklenmeyi teşvik etmek için ortama

en sık dahil edilen oksinler; IAA (indol-3-asetik asit), NAA (1-naftalen asetik asit) ve IBA (indol-3-bütirik asit)'dır. Sürgünlerin bu oksinlere tepkisi ve bunların varlığında köklerin oluşumu bitki türüne göre farklılık göstermektedir.

Bazı türlerde ise köklenme sağlanabilmesi için besiyeri içeriği değiştirilerek, makro ve mikro besin konsantrasyonları normal değerlerinin yarısına düşürülmelidir. (Torres, 2012).

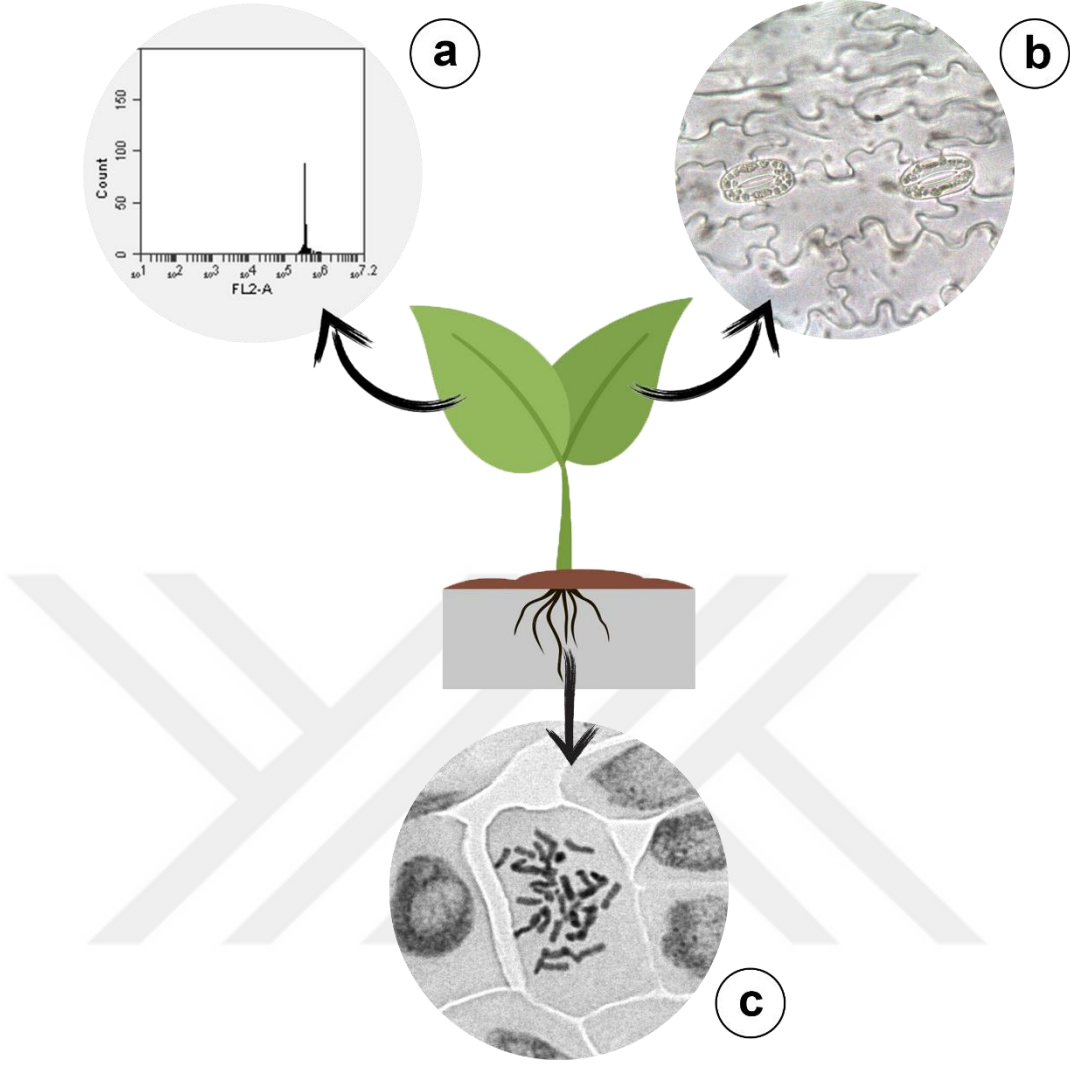
- Aklimatizasyon

Sürgünler köklenme için kültür kabının dışına aktarıldığında, büyümelerini destekleyecek bir ortama yerleştirilmelidirler. Köklendirme karışımları genellikle turba, ağaç kabuğu, perlit, vermikülit, pomza, kum ve toprak gibi malzemeleri içerir ve az miktarda kireç veya gübre ile desteklenebilir. Bu çeşitli malzemelerle kök oluşumunda belirgin farklılıklar gözlenebilir. Aklimatizasyon, *in vitro* ortamda büyüyen bir bitkinin çevresel değişime uyum sağlama süreci olarak tanımlanmaktadır. *In vitro* üretilmiş bitkicikler dış ortam koşullarına adapte edilmediğinden veya uygun olmadığından iklimlendirme gereklidir. *In vitro* ortamda köklendirilen bitkilerin, bir köklendirme karışımına aktarılmalrı ve birkaç gün boyunca yüksek bağıl nem altında tutulmaları gerekmektedir. Uygun bir ortam genellikle bitkilerin şeffaf bir plastik torbaya, kutuya veya aralıklı su buharı altına yerleştirilmesiyle oluşturulabilir. Bitkiler, bulundukları ortamdaki bağıl nem kademeli olarak azaltılarak ortama alıştırlırlar. Bu işlem, bitkilerin maruz kaldığı nem miktarını azaltarak, bitkicikleri tutan plastik torbaları veya kutuları kademeli olarak keserek ya da açarak basitçe gerçekleştirilebilir.

In vitro ortamda üretilmiş bitkiciklerin hayatta kalma oranının düşük olması, fotosentez hızı ve yapraklardaki kütikula tabakası dahil olmak üzere çeşitli faktörlerle ilişkilendirilmiştir. *In vitro* olarak çoğaltılan bitkilerin iç yapısı ve anatomisi, genellikle başlangıçta dış ortamda yetiştirilen bitkilerden farklıdır. Anatomilerindeki değişiklikler, bitkilerdeki fotosentetik süreci etkileyebilir. Karbonhidrat bakımından zenginleştirilmiş bir ortamda *in vitro* olarak yetiştirilen bitkicikler, genellikle karbonhidrat gereksinimlerinin yalnızca çok küçük bir kısmını fotosentetik CO₂ fiksasyonu yoluyla üretirler. Bitkicikler dış ortam koşullarına aktarıldığında tamamen ototrof hale gelmeleri gerekir (Torres, 2012).

1.2.3. Genetik Stabilit  Testleri

Koruma amaçlı yapılan mikrooaltım çalışmalarında en önemli hususlardan biri, çoğaltılan germplazmanın genetik stabilitesinin korunmasıdır. Alt kültür süreci uzadıkça *in vitro* bitki kültürlerinin fenotipi ve genotipi değişebilir. Bu nedenle, *in vitro*  retilen bitkilerde genetik varyasyonlarla karşılaşılabilmektedir. Bu tür değişiklikler, somaklonal varyasyonların da temelini oluşurmaktadır (Benson, 1999; Torres, 2012). Oluřan somaklonal varyasyonlar, biyokimyasal (kromatografik ayırma teknikleri vb.), moleküler (polimeraz zincir reaksiyonu vb.) sitogenetik (kromozom sayısı, akım sitometrik analiz vb.) ve histolojik (stoma özellikleri vb.) düzeylerde tespit edilebilir (Benson, 1999; Hawkes vd., 2000; Joshi vd., 2006; Inceer vd., 2022; Cuce ve Inceer, 2024) (şekil 2).



Şekil 2. Genetik stabilite testleri. a: Akım sitometrik analiz, b: Stoma analizi, c: Kromozom sayısı

- Kromozom Sayımı

In vitro yetiştirme koşulları mitotik stabiliteyi etkiler, dolayısıyla bitki doku kültürleri ile çoğaltılan bitkilerde kromozom sayısı ve yapısında değişimler görülebilir. Bu sitogenetik varyasyonlar, kallus kültürlerinde diğer kültür tiplerine göre daha sık görülmektedir. Çünkü kallus oluşumu, kontrolsüz bir hücre bölünmesinin takip ettiği bir farklılaşma fazını içermektedir.

Mikroçoğaltımı yapılan birçok türde, somoklonal varyasyonların olup olmadığı kromozom sayımı ile test edilmiştir (Wawrosch vd., 1994; Peixoto vd., 2006; Naing vd., 2010; Bhandari vd., 2021; Sakhanokho vd., 2022; Inceer vd., 2022; Cuce vd., 2022; Ergin, 2023; Cuce ve Inceer, 2024).

- Akım Sitometrik Analizler

Akım sitometrinin 1980'lerde bitki bilimine tanıtılmasından bu yana, bitki biyoteknolojisindeki uygulamaları yaygınlaşmıştır. Bitki biyoteknolojisinde yaygın olarak kullanılan akım sitometri yöntemleri, çoğaltımı yapılan bitkilerin, DNA ploidi seviyesi ve nuklear DNA içeriğinin stabilitelerini kontrol etmek için kullanılan önemli bir araçtır (George vd., 2008).

Mikroçoğaltımı yapılan birçok türde, somoklonal varyasyon olup olmadığı, akım sitometri yöntemi ile nuklear DNA miktarındaki değişimler analiz edilerek, ploidi seviyesindeki farklılıklar belirlenmiştir (Ejaz vd., 2021; Catalano vd., 2022; Stanilova vd., 2022; Sakhanokho vd., 2022; Inceer vd., 2022; Cuce vd., 2022; Ergin, 2023; Cuce ve Inceer, 2024).

- Histolojik Analizler

In vitro koşullar, birçok bitki türünde gelişimsel değişikliklere yol açabilmektedir. *In vitro* olarak çoğaltılan otsu ve odunsu bitkiler, morfolojik anormalliklere yol açan çeşitli faktörlerden etkilenirler (Ziv, 1991). *In vitro* ortamdaki nem, ozmotik potansiyel, sıcaklık, mineral bileşimi ve büyüme düzenleyicilerinin miktarları *in vitro* morfogenetik anormalliklere sebep olan ana faktörlerdir. Mikroçoğaltımı yapılan bitkilerde anormal stomalar (Blanke ve Belcher, 1989), stoma ve epidermis hücrelerinde morfolojik değişiklikler (Capellades vd., 1990), stoma uzunluğu ve genişliğinde değişiklikler (Joshi vd., 2006; Ergin, 2023), anatomik ve morfolojik anormallikler (Leshem vd., 1988) gibi farklılıkların tespiti histolojik çalışmalar ile rapor edilmiştir.

1.2.4. *Tripleurospermum* Cinsinde Yapılan Mikroçoğaltım Çalışmaları

Asteraceae familyasının Anthemideae tribusuna ait *Tripleurospermum* cinsinde yapılan mikroçoğaltım çalışmaları, nesli tükenmekte olan 5 endemik tür (*T. fissurale*, *T. insularum*, *T. conoclinium*, *T. hygrophilum* ve *T. ziganaense*) ile sınırlıdır:

Inceer vd. (2022), Türkiye'de nesli tehlike altındaki endemik türlerden biri olan *T. insularum*'un *ex situ* korunmasına yönelik mikroçoğaltımını yapmışlardır. Bu türün mikroçoğaltımı için farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklenen MS (Murashige ve

Skoog, 1962) ortamı kullanılmıştır. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı 4,6 μM zeatin ve 0,5 μM IAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Sürgünlerin *in vitro* köklenmesi, 2,9 μM IAA ile desteklenen MS ortamında %100 verimle sağlanmıştır. Köklenen bitkicikler %74 hayatta kalma oranıyla *ex vitro* olarak aktarılmıştır. Ayrıca, çoğaltılan bitkilerin sitogenetik kararlılığı, akım sitometri (DNA ploidi seviyesi) ve kromozom sayımı ile test edilmiştir. Üretilen tüm bitkilerde DNA ploidi seviyesinde ($2x$) ve somatik kromozom sayısında ($2n = 18$) herhangi bir değişiklik gözlemlendiği rapor edilmemiştir.

Cuce vd. (2022), *T. fissurale*'nin *ex situ* koruma amacıyla mikroçoğaltım protokolünü geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, sürgün sayısında 4,4 μM 6-BA ve 0,5 μM IBA içeren MS ortamının, diğer ortamlardan daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Tüm köklendirme ortamlarında köklenme oranı %100'e ulaşmış, en fazla kök sayısının elde edildiği ortam 2,7 μM NAA ile desteklenen MS ortamı olarak kaydedilmiştir. Köklenen bitkicikler ilk olarak iklimlendirmeye tabi tutulmuş ve daha sonra başarılı bir şekilde sera koşullarına aktarılmıştır. Adaptasyonu sağlanan bitkilerin hayatta kalma oranı %81 olarak belirlenmiş ve bu bitkilerin çiçeklendiği ve akene dönüştüğü bildirilmiştir. Sitogenetik analizler sonucu, çoğaltılan tüm bitkilerin, doğal ortamındaki bitkilerle aynı DNA ploidi seviyesine (x) ve kromozom sayısına ($2n = 18$) sahip olduğu rapor edilmiştir.

Ergin (2023), nesli tehlike altındaki *T. conoclinium*'un *ex situ* korunması kapsamında *in vitro* çoğaltım protokolünü oluşturmuştur. *Tripleurospermum conoclinium*'un en verimli sürgün ortamının 0,25 mg L^{-1} 6-BA + 0,1 mg L^{-1} NAA içeren MS besiyeri, en verimli kök ortamının ise 1,0 mg L^{-1} NAA içeren MS besiyeri olduğu bildirilmiştir. Botanik bahçesine aktarılan *T. conoclinium* 'un hayatta kalma oranı %95 olarak belirlenmiştir. Yapılan genetik kararlılık testlerinde hem kromozom sayımı hem nuklear DNA ölçümü yapılmıştır. Doğal ortamda büyüyen bitkilerle kıyaslandığında, kromozom sayısında ve DNA ploidi seviyesinde herhangi bir değişiklik olmadığı rapor edilmiştir. Dış ortama adapte edilen bitkilerin stoma uzunluğu ve stoma tipi tespit edilmiş, doğal ortamında büyüyen bitkilerle kıyasla yapısal bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca hayatta kalan bitkilerde çiçeklenme ve meyve oluşumu gözlenmiştir.

Ergin (2023), nesli tehlike altındaki *T. hygrophilum*'un *ex situ* korunması kapsamında *in vitro* çoğaltım protokolünü oluşturmuştur. *Tripleurospermum hygrophilum*'un en verimli sürgün ortamının 0,25 mg L^{-1} 6-BA + 0,1 mg L^{-1} IBA içeren MS besiyeri, en verimli kök ortamının ise 0,25 mg L^{-1} NAA içeren MS besiyeri olduğu bildirilmiştir. Botanik bahçesine aktarılan *T. hygrophilum*'un hayatta kalma oranı %98 olarak belirlenmiştir.

Yapılan genetik kararlılık testlerinde hem kromozom sayımı hem nuklear DNA ölçümü yapılmıştır. Doğal ortamda büyüyen bitkilerle kıyaslandığında, kromozom sayısında ve DNA ploidi seviyesinde herhangi bir değişiklik olmadığı rapor edilmiştir. Dış ortama adapte edilen bitkilerin stoma uzunluğu ve stoma tipi tespit edilmiş, doğal ortamında büyüyen bitkilerle kıyasla yapısal bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca hayatta kalan bitkilerde çiçeklenme ve meyve oluşumu gözlenmiştir.

Cuce ve Inceer (2024), Türkiye'de kritik tehlike altındaki endemik türlerinden biri olan *T. ziganaense* ile yaptığı çalışmada bu türün *ex situ* korunması amacıyla mikroçoğaltımını yapmışlardır. Oluşturulan *ex situ* koleksiyonların translokasyonları yapılarak popülasyonun güçlendirilmesi sağlanmıştır. Eksplant başına en fazla sürgün sayısını $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamından, en fazla kök sayısını ise $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS ortamından elde etmişlerdir. Köklenen bitkicikler %95 hayatta kalma oranıyla *ex situ* ortama adapte edilmiştir. Dış ortama adaptasyonu sağlanan bitkiler yaklaşık altı ay sonra doğal habitatına aktarılmış ve bu ortamda hayatta kalma yüzdesi %90 olarak kaydedilmiştir. Doğal ortamdaki bitkiler ile mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin fenolojisi her hafta izlenerek, doğal ortama adaptasyon süreci rapor edilmiştir. Akım sitometri ve kromozom sayım yöntemi kullanılarak çoğaltılan bitkilerin genetik stabiliteleri test edilmiştir. Çoğaltımı yapılan tüm bitkilerde DNA ploidi seviyesinde ve somatik kromozom sayısında herhangi bir değişiklik gözlenmediği rapor edilmiştir.

1.2.5. *Tripleurospermum heterolepis* (Freyn & Sint.) Bornm.'in Morfolojik Özellikleri

İki yıllık, boyu 20-30 cm'ye kadar uzar. Gövdeler bir veya çok sayıda, çiçek durumunun altında dallanmamış. Yapraklar 2-3-pinnatisek; yaprak lopları lacinae lanseolat-filiform, uçlarda beyaz mukronat. Kapitulum çok sayıda, radiat, ligullar hariç 6-8 cm genişliğinde, yoğun korimboz, pedunkullar kısa, pubescent tüylü. Fillariler üçgenimsi-akut, subobtus, bütün fillariler beyaz zarsı kenarlı, tüysüz. Ligullar 3,5-5 mm, tüpsü çiçeklerin korolla lopları uçlarda salgı bezli. Reseptakulum ovoid veya yarımküresel. Akenler 1,2-1,5 x 0,3-0,5 mm, ters piramit şeklinde, müsilaşsız, anterior tuberkulat-ruguloz; posterior üç damarlı, damarlar oldukça ince, akut, beyaz, araları tuberkulat-ruguloz; korona oldukça küçük, marjiniiform, beyaz, dişli, akenin 1/10-1/8'i kadar (Inceer, 2015).

Çiçeklenme ve meyve zamanı: Haziran-Temmuz.

Habitat: Yol kenarları, nemli alpin çayırlar.

Türkiye'deki yayılışı: Kuzey Anadolu.

1.2.6. *Tripleurospermum repens* (Freyn & Sint.) Bornm.'in Morfolojik Özellikleri

Çok yıllık, 25-40 cm. Gövdeler tek. Tabanda bölünmüş veya rizomdan çok sayıda, dallanmış ya da dallanmamış. Yapraklar 3-6 cm, hepsi pinnatipartiteyt veya 2-pinnatisek; yaprak lopları seyrek, linear-lanseolat, akut veya subakut, mukronulat. Kapitulum radiat, ligullar hariç 0,8-1,2 cm genişliğinde; genellikle 2-6, seyrek korimboz, nadiren bir. Pedinküller uzun ya da kısa, kalınlaşmış, pubescent tüylü veya tüysüz. Fillariler pubescent tüylü, orta damarlar yeşil, dıştaki fillariler üçgenimsi-akut, içtekiler oblanseolat, subobtus, kenarları kahverengimsi zarsı. Reseptakulum yarımküresel. Ligullar 12-16 cm uzunluğunda, tüpsü çiçeklerin korolla lopları uçlarda salgı bezli. Akenler ters piramit şeklinde veya köşeli, 1,5-2 x 0,7-1 mm, anterior tuberkulat-ruguloz, posterior 3 damarlı, damarlar kalın; korona beyaz, loblu, akenin 1/6-1/5'i kadar (Enayet Hossain, 1975).

Çiçeklenme ve meyve zamanı: Mayıs-Haziran.

Habitat: Çayırılık ve kırsal alanlar.

Türkiye'deki yayılışı: Kuzey ve İç Anadolu bölgeleri.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitki Materyalinin Temin Edilmesi

Tripleurospermum heterolepis ve *T. repens* türlerinin mikroçoğaltımında başlangıç materyali olarak kullanılan olgun akenler, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan, Prof. Dr. Hüseyin İNCEER'e ait tohum/meyve koleksiyonundan temin edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. *Tripleurospermum heterolepis* ve *T. repens*'in lokalite ve koleksiyon bilgileri

Tür	Lokalite	Koleksiyon Numarası
<i>T. heterolepis</i>	A7 Gümüşhane: Keçikaya Köyü, 1579 m, 13.06.2009	İnceer 734
<i>T. repens</i>	A7 Gümüşhane: Gezge Köyü, 1987 m, 08.07.2007	İnceer 385

2.2. Kültür Şartları

Tripleurospermum heterolepis ve *T. repens*'in olgun akenlerini çimlendirme amacıyla, bitki büyüme düzenleyicileri ihtiva etmeyen MS temel besiyeri ortamı oluşturulmuştur. Hazırlanan besiyerinin agar ve karbon kaynağı bilgileri, pH değeri ve sterilizasyon şartları (Tablo 2)'de verilmiştir.

Tablo 2. *In vitro* kültür şartları

Magenta hacmi (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)	98,5 x 59 mm
Magenta başına besiyeri miktarı	40 ml
Karbon kaynağı	%2 (w/v) sukroz (Duchefa Biochemie, Hollanda, Haarlem)
Agar	%0,8 (w/v) agar (Duchefa Biochemie, Hollanda, Haarlem)
pH değerleri	1 M HCl veya 1 M NaOH ile otoklav öncesi 5,8
Sterilizasyon şartları	121°C'de, 1,1 kPa basınç altında, 20 dk

2.3. Yüzey Dezenfeksiyonu ve Aken Çimlendirme

Elde edilen sağlıklı ve olgun akenler önce musluk suyuyla yıkanmıştır. Ardından sırasıyla EtOH (etanol) ve NaOCl (sodyum hipoklorit) ile muamele edilerek yüzey dezenfeksiyonu yapılmıştır. Son olarak, deionize steril suyla yıkanan akenler bitki büyüme düzenleyici bulundurmayan MS temel besiyerine (Duchefa Biochemie, Hollanda, Haarlem) steril kabinde ekilmiştir (Tablo 3, 4).

Tablo 3. Yüzey dezenfeksiyonu

Ön muamele	30 dk musluk suyu
Dezenfeksiyon	30 sn, %70'lik etanol; 10 dk, %30 NaOCl
Yıkama	15 dk deionize steril su, 3 kere
Kültür Şartları	50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık, 16 sa gündüz-8 sa gece, $24 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık, MS temel besiyeri ortamı

Dezenfeksiyon işleminden sonra steril kabin içerisinde, her iki tür için yirmişer tane aken MS kültür ortamında çimlenmeye bırakılmıştır.

Tablo 4. MS temel besiyeri ortamı içeriği

Makro Elementler	mg L⁻¹
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

Sürgün çoğaltımında eksplant kaynağı olarak, akenlerin çimlenmesiyle elde edilen bitkiciklerin nodal segmentleri kullanılmıştır. Bu eksplantlar, içerisinde bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS temel besiyeri ortamı bulunan kültür kaplarına yerleştirilerek kültüre alınmıştır. Eksplantlar, dört haftada bir olmak koşulu ile 3 defa altkültür yapılmıştır.

Sürgün çoğaltımı aşamasında, bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyerine çimlenmeye bırakılan bitkiler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Sitokinin ve oksinlerin farklı konsantrasyonlarda kombine edilmesiyle

oluşturulan MS temel besiyeri ortamında kültüre alınan bitkiler ise uygulama grupları olarak değerlendirilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Sürgün çoğaltımı aşamasında MS temel besiyeri ortamının içerdiği bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonları

Kontrol	Sitokinin (mg L ⁻¹)			Oksin (mg L ⁻¹)	
	KIN	6-BA	2iP	IBA	NAA
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0,25			0,1	
		0,25		0,1	
			0,25	0,1	
	0,25				0,1
		0,25	0,25		0,1
			0,25		0,1
	0,5			0,1	
		0,5		0,1	
			0,5	0,1	
	0,5				0,1
		0,5	0,5		0,1
			0,5		0,1
	1,0			0,1	
		1,0		0,1	
			1,0	0,1	
	1,0				0,1
		1,0	1,0		0,1
			1,0		0,1

Bu besiyerlerinde kullanılmış olan tüm bitki büyüme düzenleyicileri otoklav edilmeden önce 0,22 µm filtrelerle steril edilmiştir. Sadece 6-BA ve NAA filtreyle steril edilmeden otoklav öncesi besiyerine eklenmiştir. Besiyerinin pH değerleri 1 M HCl ya da 1 M NaOH ile 5,8'e ayarlanmıştır. Daha sonra kültür ortamlarının tamamı, otoklav ile 1,1 kPa basınç altında, 121°C'de 20 dk boyunca sterilize edilmiştir. Besiyeri ortamı yaklaşık 40°C'ye kadar soğutulduktan sonra, filtrelerle steril edilen bitki büyüme düzenleyicileri besiyerine ilave edilmiştir.

Bitki büyüme odasının kültür şartları, 50 µmol m⁻²s⁻¹ fotosentetik ışık yoğunluğunda 16/8 saat (aydınlık/karanlık) fotoperiyodu ile 24 ± 2°C'ye ayarlanmıştır. Işıklandırma için soğuk gün ışığı floresan lambaları (Philips HO 49 W/840, Polonya) kullanılmıştır. Sürgün çoğaltım aşamasında, kontrol ve bitki büyüme düzenleyicisi içeren her bir ortama yirmi eksplant ekilmiştir. Dört haftanın sonunda her eksplant için sürgün sayısı, sürgün boyu, yaprak sayısı ve kallus oluşumu hesaplanmıştır.

2.5. Köklendirme

Köklendirme işlemi, IBA ve NAA bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarını içeren MS besiyeri ortamlarında yapılmıştır (Tablo 6). Sürgün çoğaltım aşamasında olduğu gibi, bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı MS besiyerine ekilen sürgünler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Sürgün ortamlarında en az 20 mm boyuna ulaşan sağlıklı bitkiler köklendirme ortamına alınmıştır.

Tablo 6. Köklendirme aşamasında MS temel besiyeri ortamının içerdiği bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları

Kontrol	Oksin (mg L ⁻¹)	
	IBA (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)
0,0	0,0	0,0
	0,25	
	0,5	
	1,0	
		0,25
		0,5
		1,0

Bitki büyüme odasındaki kültür şartları, 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fotosentetik ışık yoğunluğunda 16/8 saat (aydınlık/karanlık) fotoperiyodu ile $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmıştır. Köklendirme ortamlarında, bitki büyüme düzenleyicisi içeren ve içermeyen her bir ortama yirmi eksplant ekilmiştir. Dört hafta sonra kök sayısı, kök boyu, sekonder kök sayısı hesaplanarak kaydedilmiştir.

2.6. Aklimatizasyon

Köklendirme işleminden sonra, bitkicikler bulundukları besiyerinden çıkarılarak köklerindeki besiyeri kalıntıları musluk suyuyla temizlenmiştir. Bu bitkicikler, 71×71 mm ebatındaki şeffaf plastik kaplarda pH 5,8 olan Hoagland ile desteklenmiş vermikülit ortamına aktarılmıştır. Bu aşamada bitkilerin inkübasyonuna, 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fotosentetik ışık yoğunluğunda 16/8 saat (aydınlık/karanlık) fotoperiyodu ile $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış olan bitki büyüme odasında devam edilmiştir. Bitkilerin büyüme ve gelişimleri dört hafta

boyunca takip edilmiştir. Bu süreç boyunca bitkilerin ve ortamın sıcaklık/nem kontrolü yapılmıştır.

Dört haftanın sonunda sağlıklı olan bitkiler 1:1 (v/v) oranında orman toprağı ve turba karışımından dış ortama aktarılmıştır. Botanik bahçesine aktarılan ve aklimatizasyonu başarı ile tamamlayan bitkilerin bir yıl boyunca büyüme ve gelişimleri takip edilerek, fenolojik (çiçeklenme ve meyvelenme) gözlemleri yapılmıştır. Bir yılın sonunda, *ex situ* koleksiyonlardan olgun akenler elde edilmiş ve stereo-binoküler mikroskop yardımı ile görüntüleri çekilmiştir.

2.7. Genetik Stabilite Testleri

In vitro olarak çoğaltımı yapılan bitkilerin genetik stabilitesi; kromozom sayısı, akım sitometrik (nuklear DNA miktarı) ve stoma analizleri ile test edilmiştir.

2.7.1. Kromozom Sayımı

Köklenme aşamasındaki kontrol ve bitki büyüme düzenleyicilerini içeren ortamlardan elde edilen bitkilerin aktif kök uçları kullanılarak kromozom sayısı yapılmıştır. Bu işlem için ilk olarak, kök uçları 8-hidroksikinolin çözeltisinde 6 saat ön muamele edilmiştir. Daha sonra %96'lık etanol – glasiyel asetik asit karışımı ile fikse edilmiştir. Fiksatiften alınan kök uçları %70'lik etanol ile yıkanmış ve 1 M HCl ile 12 dk hidroliz edilmiştir. Ardından saf su içerisinde yıkanıp Schiff-Reagent ile oda sıcaklığında 2-3 saat boyanmıştır. Son olarak, asetik asit çözeltisi ile ezme preparatları yapılarak Entellan ile daimi preparat haline getirilmiştir (Inceer ve Beyazoğlu, 2004) (Tablo 7).

Tablo 7. Kromozom sayımı için preparasyon işlemi

Ön muamele	2 mM 8-hidroksikinolin (18°C’de, 6 saat)
Fiksasyon	3:1 oranında %96’lık etanol – glasiyel asetik asit (+4°C’de 24 saat)
Yıkama	%70’lik etanol ile 3 kez
Hidroliz	1M HCl (60°C, 10 - 12 dk)
Boyama	Shiff-Reagent (2-3 saat)
Preparasyon	%45’lik asetik asit

Kromozom sayımı, köklendirme aşamasındaki her türün her bir deneme grubunda, kromozomların en iyi dağıldığı metafaz evresinde 3 farklı preparat üzerinden yapılmıştır.

2.7.2. Akım Sitometrik Analiz

In vitro ortamda aklimatizasyonu yapılan bitkilerin akım sitometri ile nuklear DNA miktarı tespit edilmiştir. Akım sitometrik analizlerde, botanik bahçesindeki *ex situ* koleksiyonlardan elde edilen (3 farklı birey) genç ve sağlıklı yapraklar, modifiye woody plant buffer (WPB) (Loureiro vd., 2007) tamponu içerisinde keskin bir jilet ile mekaniksel olarak parçalanmış ve sonra naylon filtre ile tüplere süzölmüştür. Elde edilen nukleus süspansiyonuna RNase eklendikten sonra ışısız bir ortamda propodium iodide (PI) eklenerek boyama işlemi gerçekleştirilmiştir (Tablo 8). Ölçüm yapılan kadar, örnekler buz içerisinde ve ışısız ortamda inkübe edilmiştir. Örneklerin analizi, BD Accuri C6 akım sitometri ile yapılmıştır (Inceer vd., 2016).

Tablo 8. Akım sitometri analizi için örneklerin hazırlanması

Ön muamele	1 ml modifiye WPB (4 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 0,2 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, 86 mM NaCl, Na ₂ ·2H ₂ O, 10 Mm K ₂ S ₂ O ₅ , %1 (v/v) Triton X-100, %1 PVP-10, pH 7,5)
Filtrasyon	30 µM naylon filtre
Boyama	50 µg/ml propodium iodide (PI) ve 50 µg/ml RNase

Akım sitometrik analizler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Her örneğin analizi yapılırken, sadece G₀/G₁ pikinin varyasyon katsayısının (CV) %5'ten daha düşük olduğu histogramlar değerlendirilmiştir (Doležel vd., 2007a). *In vitro* çoğaltımı yapılan örnekler ile standart (*Pisum sativum* L. 9,56 pg/2C) olarak kullanılan bitkinin G₀/G₁ pik konumlarının floresan yoğunluklarına ait değerler karşılaştırılmış ve aşağıdaki formül kullanılarak nuklear DNA miktarı (2C) pikogram (pg) cinsinden hesaplanmıştır (Doležel ve Bartoš, 2005; Doležel vd., 2007b).

$$\text{Örneğin 2C DNA değeri (pg)} = \frac{\text{Örneğin G}_0/\text{G}_1 \text{ pik ortalaması}}{\text{Standartın G}_0/\text{G}_1 \text{ pik ortalaması}} \times \text{Standartın 2C DNA değeri (pg)}$$

1pg = 978 Mbp (Doležel vd., 2003).

2.7.3. Stoma Analizleri

Stoma analizleri için botanik bahçesindeki *ex situ* koleksiyonlardan elde edilen genç yapraklar ilk olarak FAA (formaldehit: glasiyel asetik asit: etanol) karışımında fiks edilmiştir. Daha sonra, bitki materyalleri %70 lik EtOH çözeltisinde stoklanmıştır. Bitki yapraklarının üst ve alt yüzeyinden elle alınan yüzeysel kesitler, gliserinli su ile kapatılarak yarı daimi preparatlar haline getirilmiştir (Tablo 9). Mikrometrik oküler kullanılarak Olympus CX21 ışık mikroskobunda stomaların uzunluğu ölçülmüştür. Stoma ölçümleri rastgele 5 farklı birey üzerinden, 5 tekrarlı olarak yapılmıştır. Stoma görüntüleri Leica DM 1000 mikroskobu aracılığıyla çekilmiştir.

Tablo 9. Stoma analizi için örneklerin hazırlanması

Fiksasyon	FAA, en az 48 saat (5 ml %37'lik Formaldehit + 5 ml glasiyel asetik asit + 90 ml %70' lik etanol)
Stok	%70 etanol
Yaprak yüzeysel kesit	Üst ve alt epidermis
Preparasyon	Gliserinli su, yarı daimi preparat

2.8. İstatiksel Analizler

In vitro çoğaltım ile elde edilen tüm veriler, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi ($P = 0,05$) kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. İstatistik analizler SPSS (versiyon 25) bilgisayar programı ile yapılmıştır.

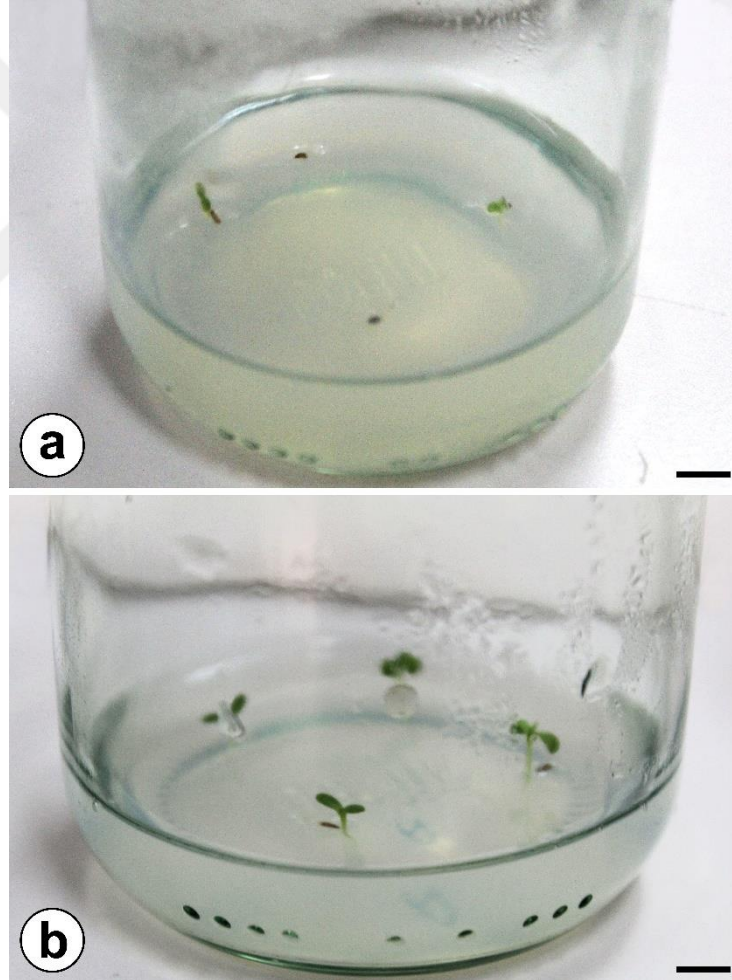


3. BULGULAR

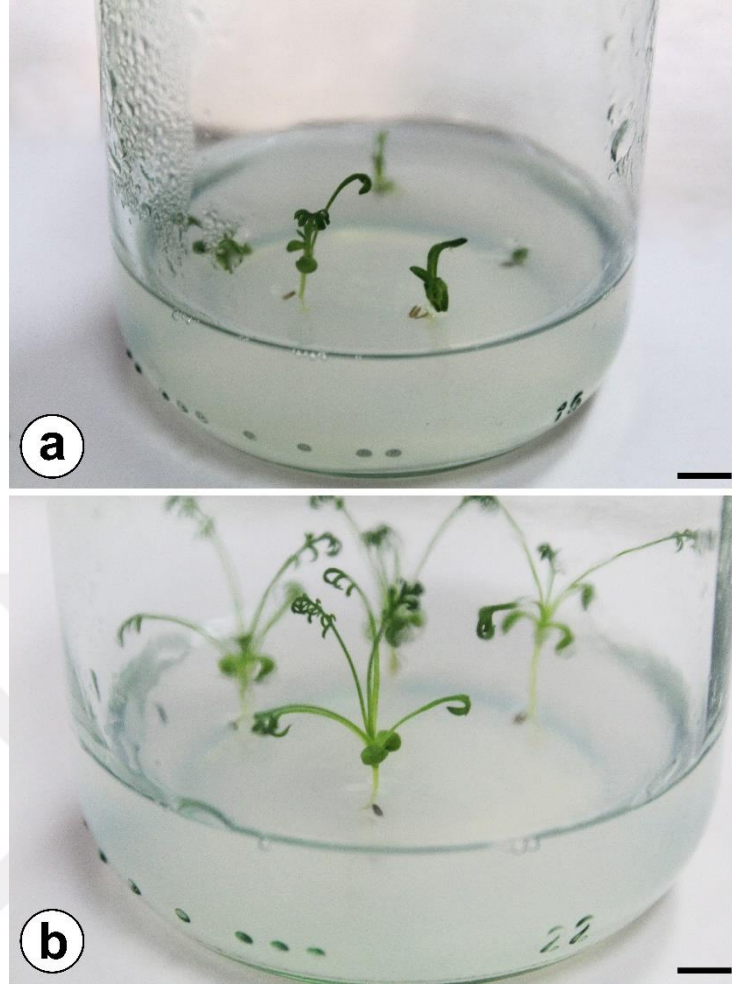
3.1. *Tripleurospermum heterolepis*

3.1.1. *In vitro* Aken Çimlendirme

Bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı MS ortamına ekilen *T. heterolepis* akenlerinde kontaminasyon görülmemiştir. Yedinci günde ilk çimlenme kaydedilmiştir. İki hafta sonra çimlenme oranı %94 ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Şekil 3, 4).



Şekil 3. *Tripleurospermum heterolepis*'de kültür başlangıç aşaması. a: *In vitro* aken çimlendirme, b: Birinci hafta. Ölçek: 5 cm



Şekil 4. *Tripleurospermum heterolepis*'de kültür başlangıç aşaması. a: İkinci hafta, b: Dördüncü hafta. Ölçek: 5 cm

3.1.2. *In vitro* Sürgün Çoğaltımı

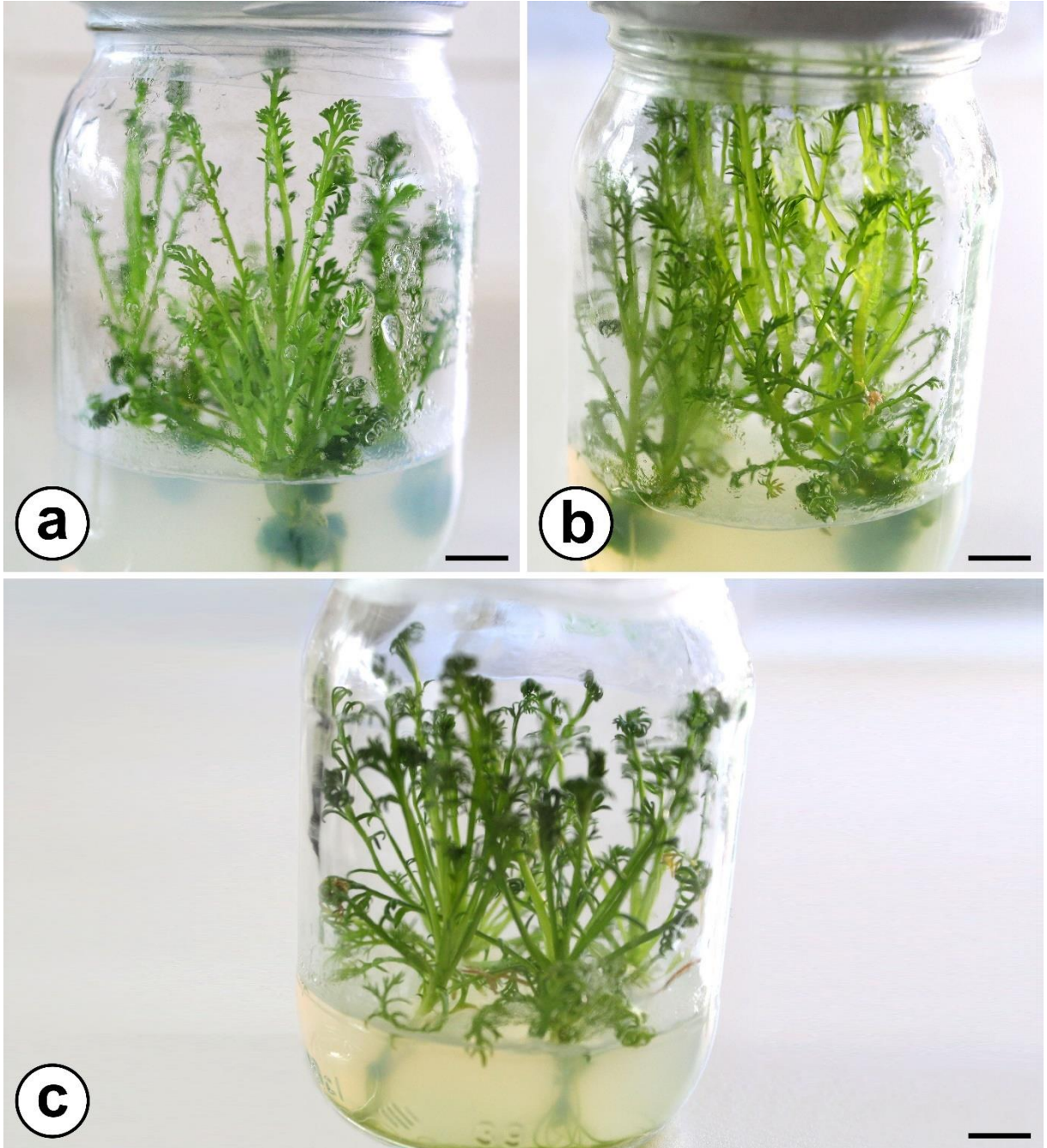
Tripleurospermum heterolepis'in 0,25-0,5-1,0 mg L⁻¹ konsantrasyonundaki bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS besiyerlerinden elde edilen bitkilerin sürgün sayısı, sürgün boyu, yaprak sayısı ve nod sayısının en yüksek ve en düşük olduğu ortamlar belirlenmiştir.

Tablo 10. *Tripleurospermum heterolepis*'de sitokinin ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi

Kontrol	Sitokinin (mg L ⁻¹)			Oksin (mg L ⁻¹)		Sürgün Sayısı	Sürgün Boyu (mm)	Yaprak Sayısı	Nod Sayısı
	KIN	6-BA	2iP	IBA	NAA				
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,25 ± 0,86a	38,18 ± 1,96cd	30,69 ± 2,77de	10,94 ± 1,53d
	0,25			0,1		3,19 ± 0,75bc	40,30 ± 2,22e	30,19 ± 2,95de	11,69 ± 1,45de
		0,25		0,1		5,00 ± 1,21e	53,71 ± 2,04k	36,00 ± 2,45ij	19,25 ± 1,29h
			0,25	0,1		5,06 ± 1,24e	37,69 ± 2,50cd	37,19 ± 2,81j	20,63 ± 1,86i
	0,25				0,1	3,75 ± 1,13cd	45,52 ± 2,33g	34,25 ± 2,44hi	16,44 ± 1,82f
		0,25			0,1	5,25 ± 1,57e	49,15 ± 2,60ij	33,63 ± 2,78gh	20,56 ± 1,59i
			0,25		0,1	3,19 ± 1,05bc	39,04 ± 2,13de	30,69 ± 3,36de	11,81 ± 1,52de

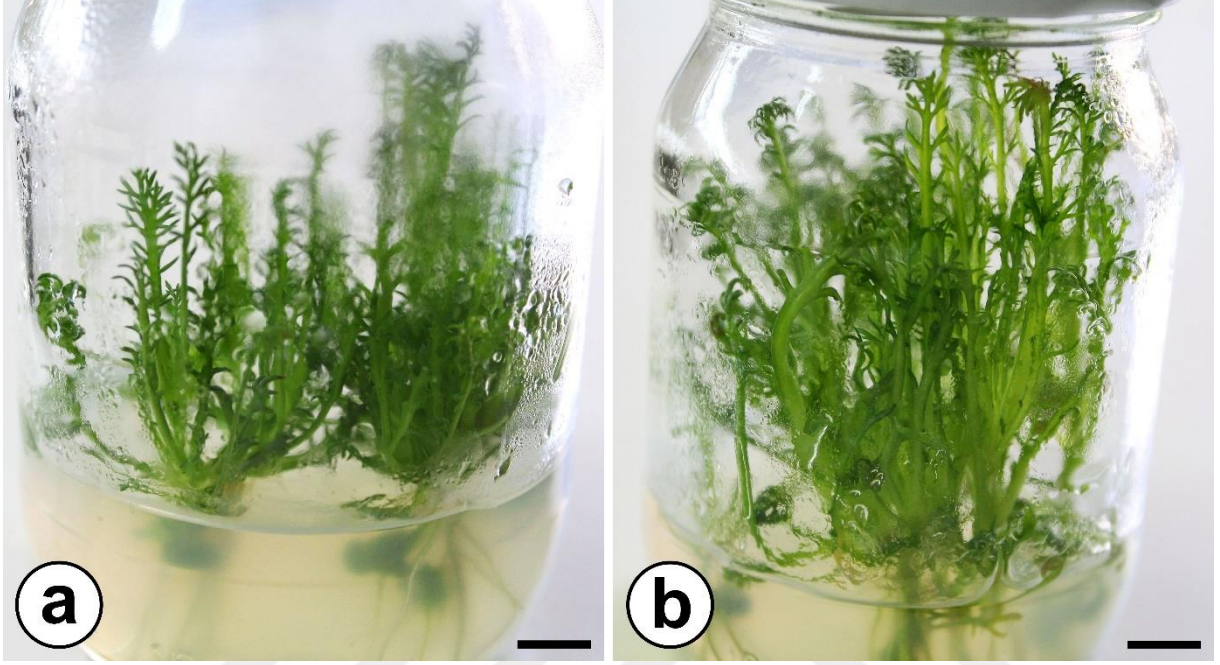
Aynı harflerle gösterilen değerler (ortalama ± standart sapma) önemli ölçüde farklı değildir (P = 0,05, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi)

En fazla sürgün sayısı $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin (KIN, 6-BA, 2iP) ve $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyerinde ($5,25 \pm 1,57$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 10 ve Şekil 7a, 14), en az sürgün sayısı sırasıyla ($2,25 \pm 0,86$) kontrol (Tablo 10 ve Şekil 5c, 14), ($3,19 \pm 0,75$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 10 ve Şekil 5a, 14) ve ($3,19 \pm 1,05$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 10 ve Şekil 7b, 14) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



Şekil 5. *Tripleurospermum heterolepis*'de sürgün çoğaltımı. a: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, b: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, c: Kontrol içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

En uzun sürgün boyu ($53,71 \pm 2,04$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 10 ve Şekil 5b, 15), en kısa sürgün boyu ($37,69 \pm 2,50$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 10 ve Şekil 6a, 15) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



Şekil 6. *Tripleurospermum heterolepis*'de sürgün çoğaltımı. a: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, b: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

En fazla yaprak sayısı $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin (KIN, 6-BA, 2iP) ve $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyerinde ($37,19 \pm 2,8$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 10 ve Şekil 6a, 16), en az yaprak sayısı ($30,19 \pm 2,95$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 10 ve Şekil 5a, 16) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



Şekil 7. *Tripleurospermum heterolepis*'de sürgün çoğaltımı. a: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, b: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

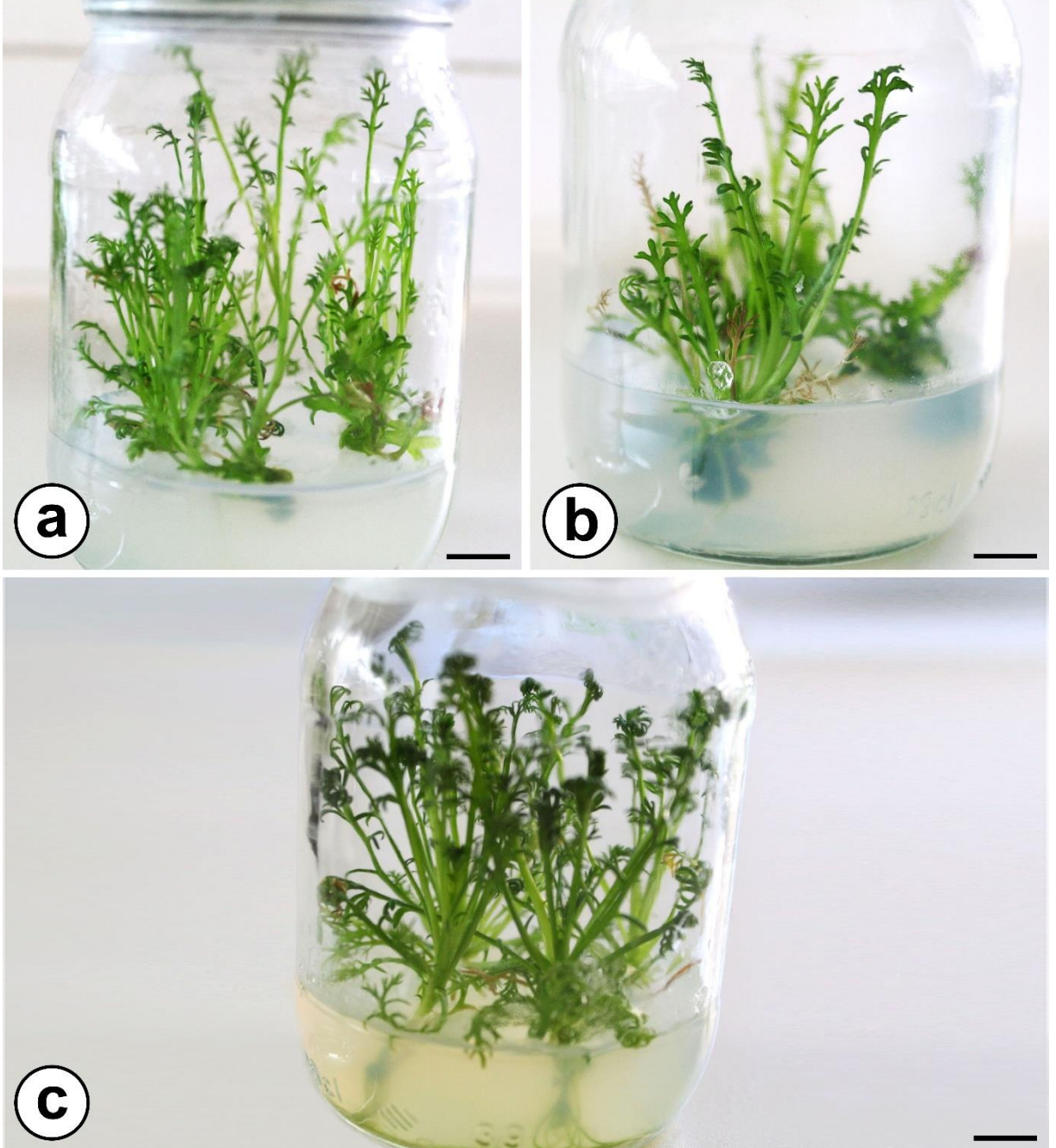
En fazla nod sayısı ($20,63 \pm 1,86$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 10 ve Şekil 6a, 17), en az nod sayısı sırasıyla ($10,94 \pm 1,53$) kontrol (Tablo 10 ve Şekil 5c, 17) ve ($11,69 \pm 1,45$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 10 ve Şekil 5a, 17) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.

Tablo 11. *Tripleurospermum heterolepis*'de sitokinin ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi

Kontrol	Sitokinin (mg L ⁻¹)			Oksin (mg L ⁻¹)		Sürgün Sayısı	Sürgün Boyu (mm)	Yaprak Sayısı	Nod Sayısı
	KIN	6-BA	2iP	IBA	NAA				
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,25 ± 0,86a	38,18 ± 1,96cd	30,69 ± 2,77de	10,94 ± 1,53d
	0,5			0,1		3,25 ± 0,77bc	43,00 ± 2,50f	28,63 ± 2,66cd	12,13 ± 1,96de
		0,5		0,1		3,06 ± 1,24abc	37,12 ± 2,60c	26,25 ± 2,54b	11,63 ± 1,54de
			0,5	0,1		3,63 ± 1,09c	49,94 ± 2,51j	27,56 ± 2,16bc	12,06 ± 1,88de
	0,5				0,1	2,94 ± 1,24abc	45,49 ± 2,55g	20,63 ± 1,82a	9,56 ± 1,21c
		0,5			0,1	5,00 ± 1,37e	47,34 ± 2,70h	34,19 ± 2,34hi	17,56 ± 1,63g
			0,5		0,1	4,44 ± 1,09de	47,51 ± 2,56hi	28,63 ± 3,83cd	12,31 ± 1,49e

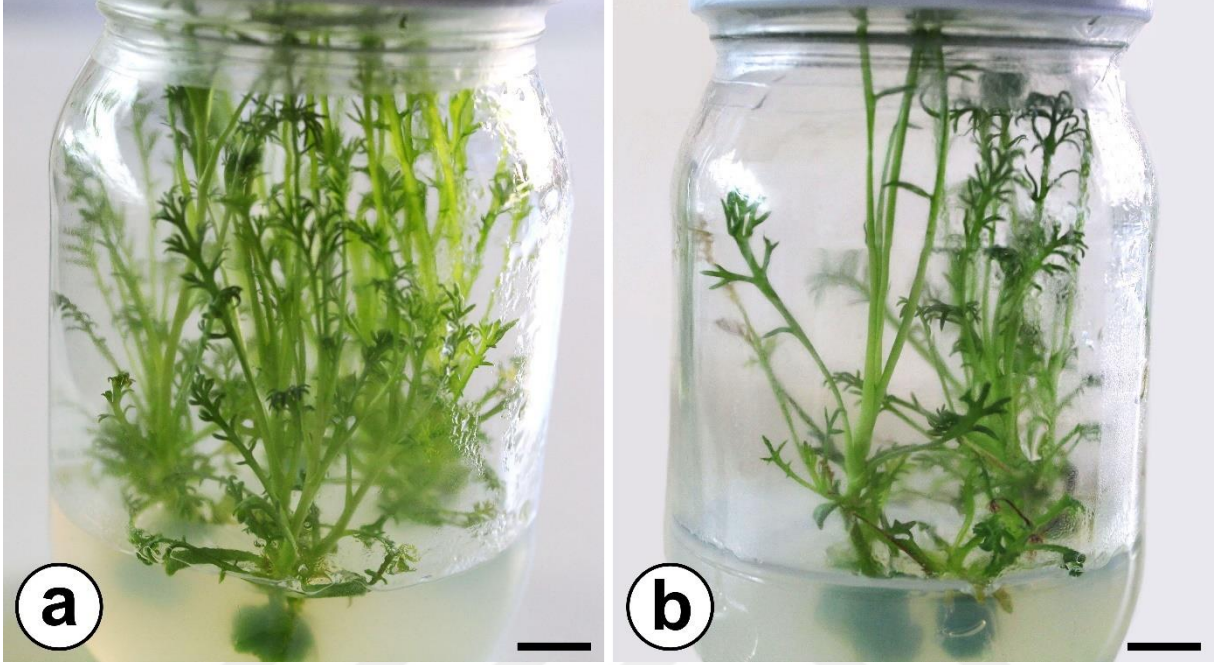
Aynı harflerle gösterilen değerler (ortalama ± standart sapma) önemli ölçüde farklı değildir (P = 0,05, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi)

En fazla sürgün sayısı $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin (KIN, 6-BA, 2iP) ve $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyerinde ($5,00 \pm 1,37$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 11 ve Şekil 10a, 14), en az sürgün sayısı ($2,94 \pm 1,24$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 11 ve Şekil 9b, 14) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



Şekil 8. *Tripleurospermum heterolepis*'de sürgün çoğaltımı. a: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, b: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, c: Kontrol içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

Aynı zamanda en uzun sürgün boyu ($49,94 \pm 2,5$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 11 ve Şekil 9a, 15), en kısa sürgün boyu ($37,12 \pm 2,60$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 11 ve Şekil 8b, 15) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



Şekil 9. *Tripleurospermum heterolepis*'de sürgün çoğaltımı. a: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, b: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

En fazla yaprak sayısı $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin (KIN, 6-BA, 2iP) ve $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyerinde ($34,19 \pm 2,34$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 11 ve Şekil 10a, 16), en az yaprak sayısı ($20,63 \pm 1,82$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 11 ve Şekil 9b, 16) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



Şekil 10. *Tripleurospermum heterolepis*'de sürgün çoğaltımı. a: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, b: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

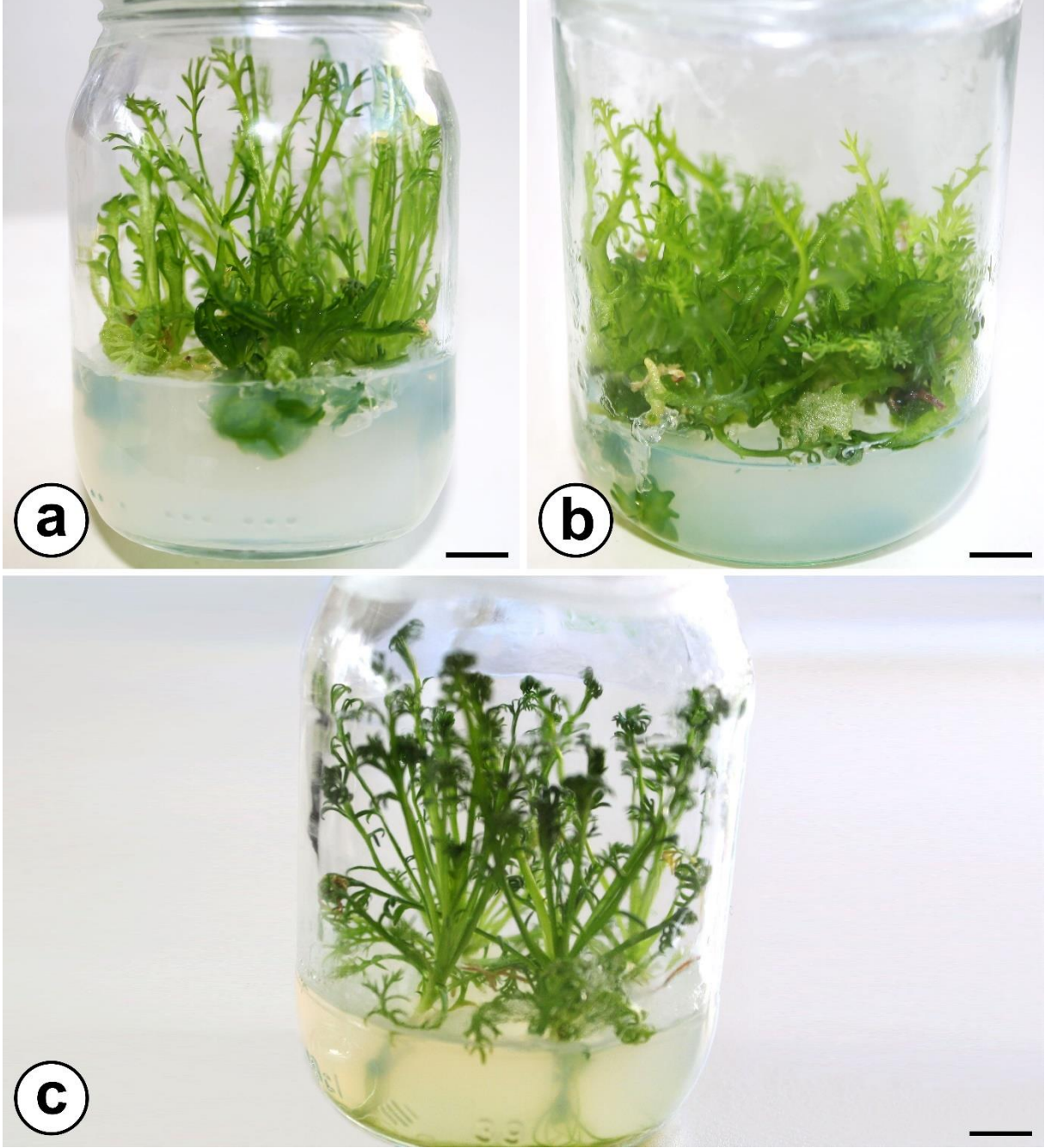
En fazla nod sayısı ($17,56 \pm 1,63$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 11 ve Şekil 10a, 17), en az nod sayısı ($9,56 \pm 1,21$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 11 ve Şekil 9b, 17) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.

Tablo 12. *Tripleurospermum heterolepis*'de sitokinin ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi

Kontrol	Sitokinin (mg L ⁻¹)			Oksin (mg L ⁻¹)		Sürgün Sayısı	Sürgün Boyu (mm)	Yaprak Sayısı	Nod Sayısı
	KIN	6-BA	2iP	IBA	NAA				
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,25 ± 0,86a	38,18 ± 1,96cd	30,69 ± 2,77de	10,94 ± 1,53d
	1,0			0,1		3,38 ± 1,02bc	39,41 ± 2,00de	33,06 ± 2,32fgh	4,31 ± 1,70ab
		1,0		0,1		3,50 ± 0,97bc	27,18 ± 2,71b	31,69 ± 2,50efg	4,63 ± 1,41ab
			1,0	0,1		2,69 ± 1,01ab	49,08 ± 2,06ij	30,25 ± 2,98de	4,81 ± 1,28ab
	1,0				0,1	3,06 ± 1,00abc	38,86 ± 1,97cde	30,00 ± 2,78de	5,44 ± 1,50b
		1,0			0,1	2,88 ± 0,96abc	24,41 ± 1,74a	31,50 ± 3,50ef	4,13 ± 1,96a
			1,0		0,1	3,44 ± 0,96bc	49,88 ± 2,63j	37,38 ± 2,85j	9,31 ± 1,62c

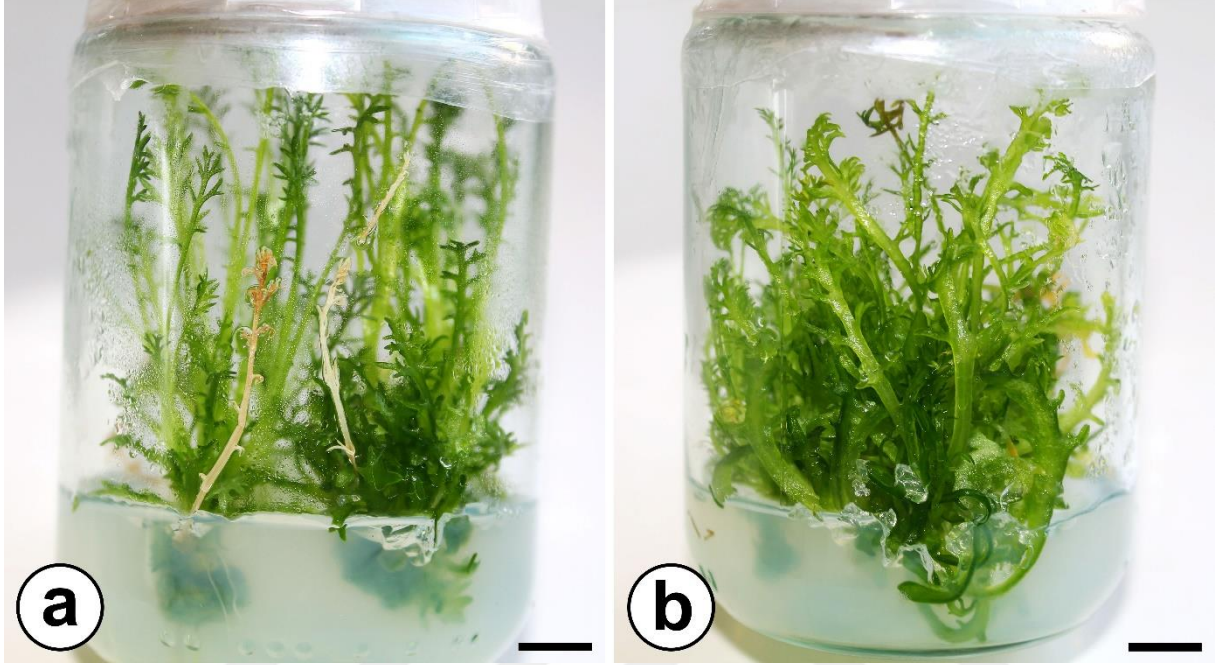
Aynı harflerle gösterilen değerler (ortalama ± standart sapma) önemli ölçüde farklı değildir (P = 0,05, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi)

Tripleurospermum heterolepis'in $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin (KIN, 6-BA, 2iP) ve $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyerinde en fazla sürgün sayısı ($3,50 \pm 0,97$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 12 ve Şekil 11b, 14), en az sürgün sayısı ($2,25 \pm 0,86$) kontrol (Tablo 12 ve Şekil 11c, 14) ve ($2,69 \pm 1,01$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 12 ve Şekil 12a, 14) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



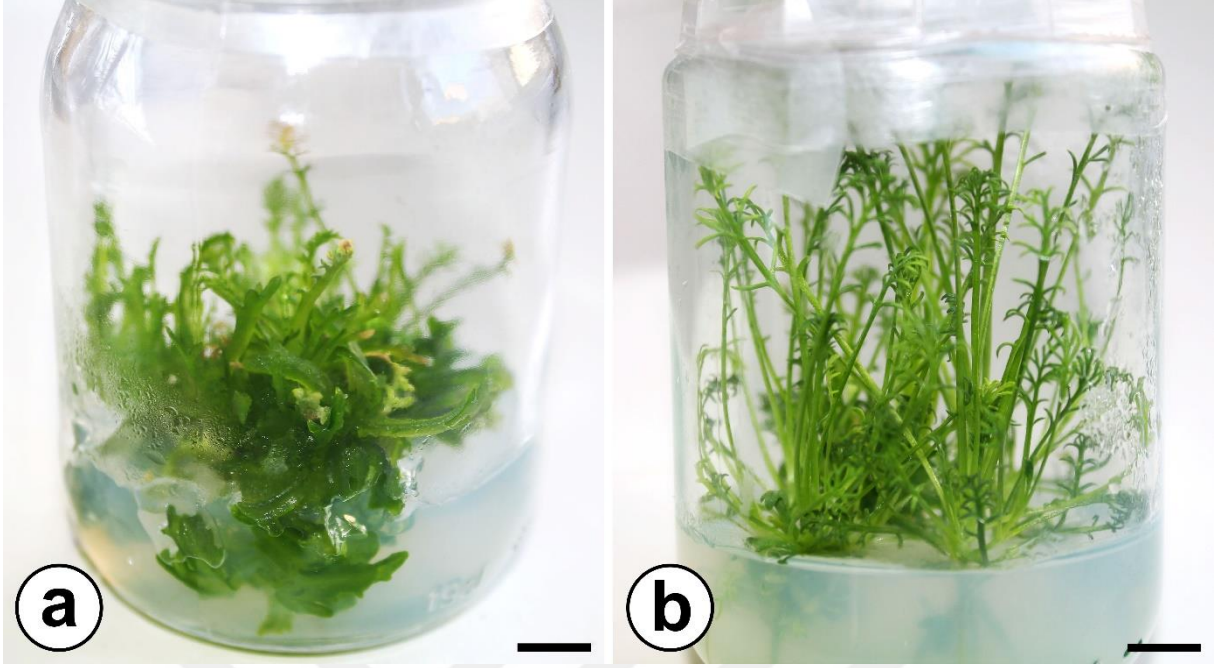
Şekil 11. *Tripleurospermum heterolepis*'de sürgün çoğaltımı. a: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, b: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, c: Kontrol içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

Aynı zamanda en uzun sürgün boyu ($49,88 \pm 2,63$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 12 ve Şekil 13b, 15), en kısa sürgün boyu ($24,41 \pm 1,74$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 12 ve Şekil 13a, 15) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



Şekil 12. *Tripleurospermum heterolepis*'de sürgün çoğaltımı. a: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, b: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

En fazla yaprak sayısı $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin (KIN, 6-BA, 2iP) ve $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyerinde ($37,38 \pm 2,85$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 12 ve Şekil 13b, 16), en az yaprak sayısı ($30,00 \pm 2,78$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 12 ve Şekil 12b, 16) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



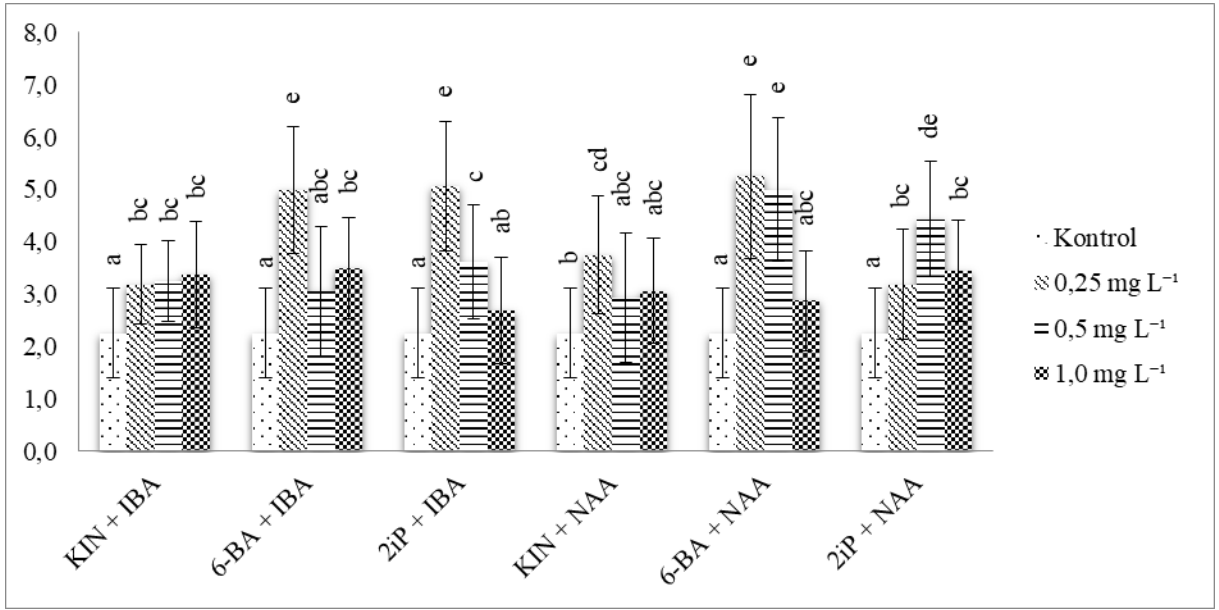
Şekil 13. *Tripleurospermum heterolepis*'de sürgün çoğaltımı. a: 1,0 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA, b: 1,0 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

En fazla nod sayısı ($10,94 \pm 1,53$) kontrol (Tablo 12 ve Şekil 11c, 14) ve ($9,31 \pm 1,62$) 1,0 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 12 ve Şekil 13b, 17), en az nod sayısı ($4,13 \pm 1,96$) 1,0 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 12 ve Şekil 13a, 17) içeren MS besiyeri ortamlarından elde edilmiştir.

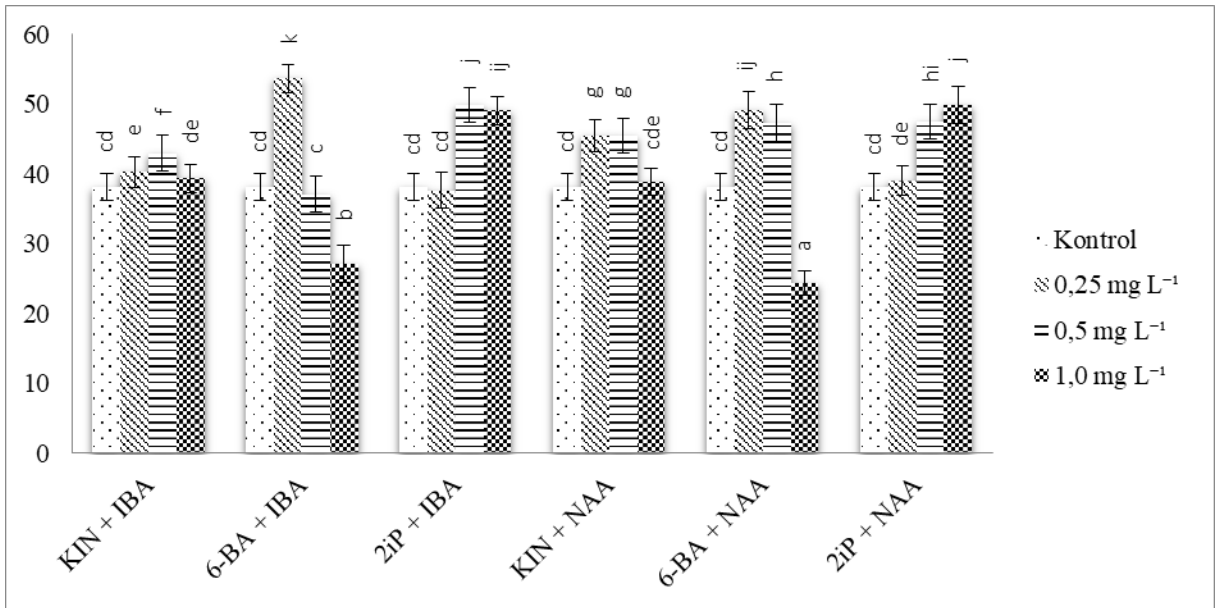
Tüm bitki büyüme düzenleyicileri; sürgün sayısı, sürgün boyu, yaprak sayısı ve nod sayısı açısından incelendiğinde en yüksek ve en düşük değerlere sahip ortamlar belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en fazla sürgün sayısı ($5,25 \pm 1,57$) 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 10 ve Şekil 7a, 14) içeren MS besiyerinde, en az sürgün sayısı sırasıyla ($2,25 \pm 0,86$) kontrol (Tablo 10 ve Şekil 5c, 14) ve ($2,69 \pm 1,01$) 1,0 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA (Tablo 12 ve Şekil 12a, 14) içeren MS besiyerinde tespit edilmiştir. En uzun sürgün boyunun ($53,71 \pm 2,04$) 0,25 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA (Tablo 10 ve Şekil 5b, 15) içeren MS besiyeri ortamında, en kısa sürgün boyunun ise ($24,41 \pm 1,74$) 1,0 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 12 ve Şekil 13a, 15) içeren MS besiyeri ortamında olduğu gözlenmiştir. En fazla yaprak sayısının ($37,38 \pm 2,85$) 1,0 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 12 ve Şekil 13b, 16) içeren MS besiyerinde, en az yaprak sayısının ise ($20,63 \pm 1,82$) 0,5 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 11 ve Şekil 9b, 16) içeren MS besiyeri ortamında olduğu tespit edilmiştir. En fazla nod sayısı ($20,63 \pm 1,86$) 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA (Tablo 10 ve Şekil 6a, 17)

içeren MS besiyeri ortamında gözlenirken, en az nod sayısı ($4,13 \pm 1,96$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 12 ve Şekil 13a, 17) içeren MS besiyerinden elde edilmiştir.

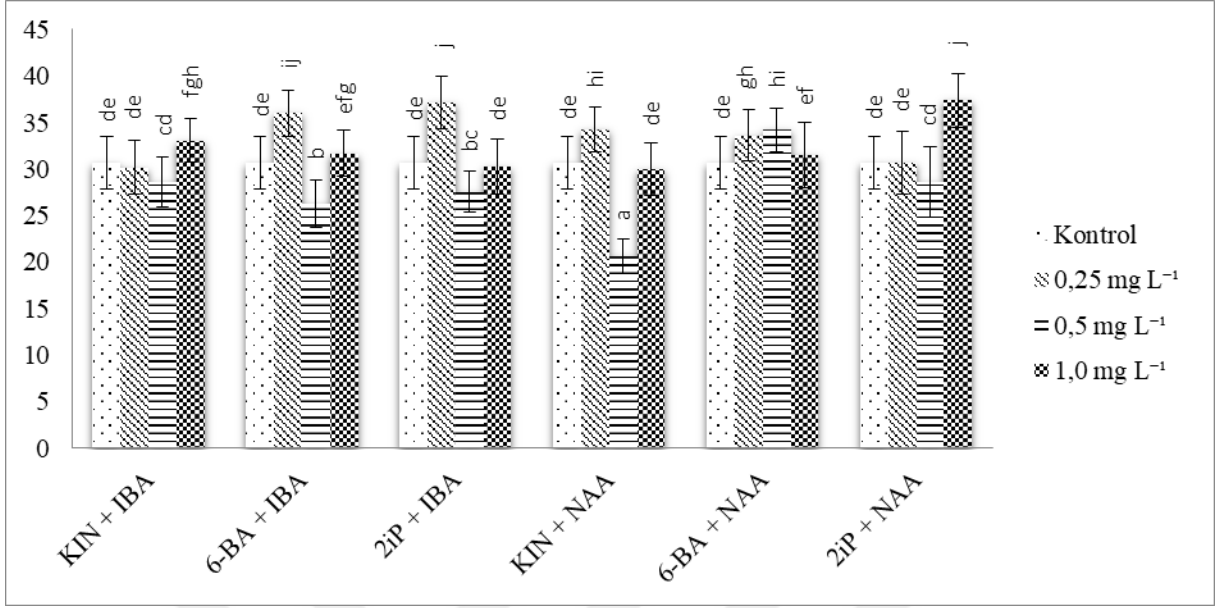
Kontrol grubu hariç tüm uygulama gruplarında kallus oluşumu gözlenmiştir. Sürgün çoğaltımında sitokinin konsantrasyonunun $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ olduğu ortamlarda kallus oranı daha az, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ olduğu ortamlarda orta, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ olduğu ortamlarda ise yüksek olduğu gözlenmiştir.



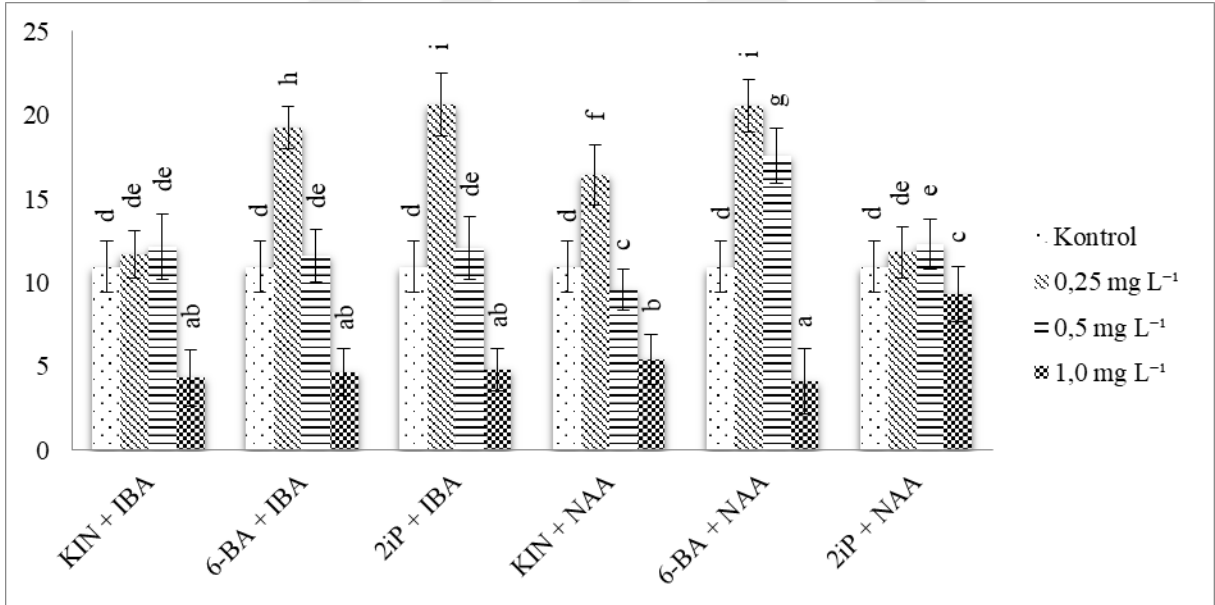
Şekil 14. *Tripleurospermum heterolepis*'de bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün sayısı üzerine etkisi



Şekil 15. *Tripleurospermum heterolepis*'de bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün boyu üzerine etkisi



Şekil 16. *Tripleurospermum heterolepis*'de bitki büyüme düzenleyicilerinin yaprak sayısı üzerine etkisi



Şekil 17. *Tripleurospermum heterolepis*'de bitki büyüme düzenleyicilerinin nod sayısı üzerine etkisi

3.1.3. *In vitro* ile Köklendirme

Tripleurospermum heterolepis'in 0,25-0,5-1,0 mg L⁻¹ konsantrasyonundaki IBA ve NAA bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS besiyerlerinden elde edilen bitkilerin kök sayısı, kök boyu ve sekonder kök sayısının en yüksek ve en düşük olduğu ortamlar belirlenmiştir.

Tablo 13. *Tripleurospermum heterolepis*'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın kök oluşumuna etkisi

Kontrol	IBA (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	Kök sayısı	Kök boyu (mm)	Sekonder kök sayısı
0,0	0,0	0,0	1,50 ± 0,63a	36,41 ± 3,09d	14,00 ± 2,63c
	0,25		1,56 ± 0,63ab	28,38 ± 3,89b	11,69 ± 2,06b
	0,5		1,63 ± 0,50ab	30,66 ± 2,63c	17,31 ± 2,98d
	1,0		2,06 ± 0,85bc	57,24 ± 2,94f	18,13 ± 1,78d
		0,25	1,25 ± 0,45a	26,08 ± 2,60a	13,50 ± 2,50c
		0,5	1,69 ± 0,48ab	37,56 ± 2,41d	10,00 ± 1,46a
		1,0	2,19 ± 0,98c	54,39 ± 3,50e	17,56 ± 2,13d

Aynı harflerle gösterilen değerler (ortalama ± standart sapma) önemli ölçüde farklı değildir (P = 0,05, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi)



Şekil 18. *Tripleurospermum heterolepis*'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,25 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm



Şekil 19. *Tripleurospermum heterolepis*'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,25 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm



Şekil 20. *Tripleurospermum heterolepis*'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,5 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm

En fazla kök sayısı ($2,19 \pm 0,98$) 1,0 mg L⁻¹ NAA (Tablo 13 ve Şekil 23b, 24), en az kök sayısı ($1,25 \pm 0,45$) 0,25 mg L⁻¹ NAA (Tablo 13 ve Şekil 19b, 24) içeren MS besiyeri ortamlarından elde edilmiştir. En uzun kök boyu ($57,24 \pm 2,94$) 1,0 mg L⁻¹ IBA (Tablo 13 ve Şekil 22b, 25), en kısa kök boyu ($26,08 \pm 2,60$) 0,25 mg L⁻¹ NAA (Tablo 13 ve Şekil 19b, 25) içeren MS besiyeri ortamlarından elde edilmiştir. En fazla sekonder kök sayısı ($18,13 \pm 1,78$) 1,0 mg L⁻¹ IBA (Tablo 13 ve Şekil 22b, 26), en az sekonder kök sayısı ($10,00 \pm 1,46$) 0,5 mg L⁻¹ NAA (Tablo 13 ve Şekil 21b, 26) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



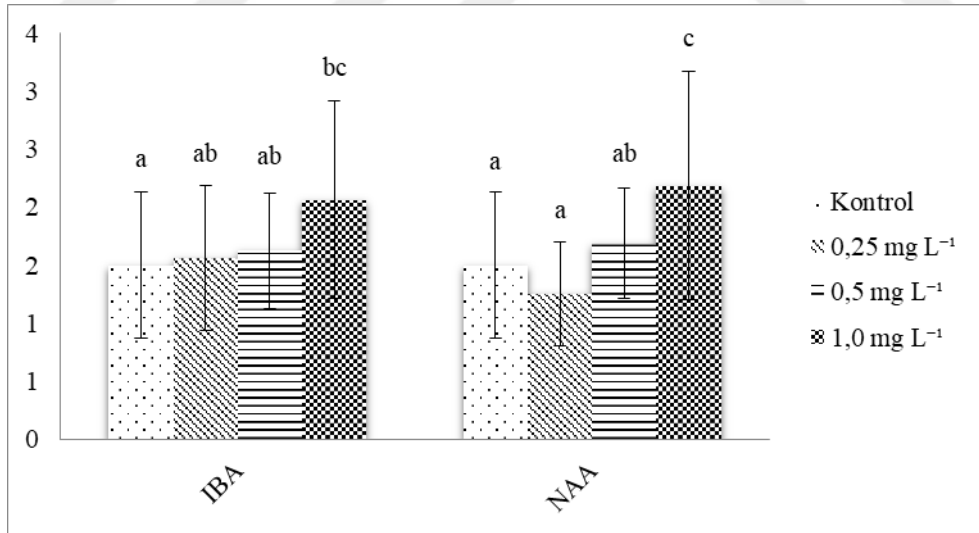
Şekil 21. *Tripleurospermum heterolepis*'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,5 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm



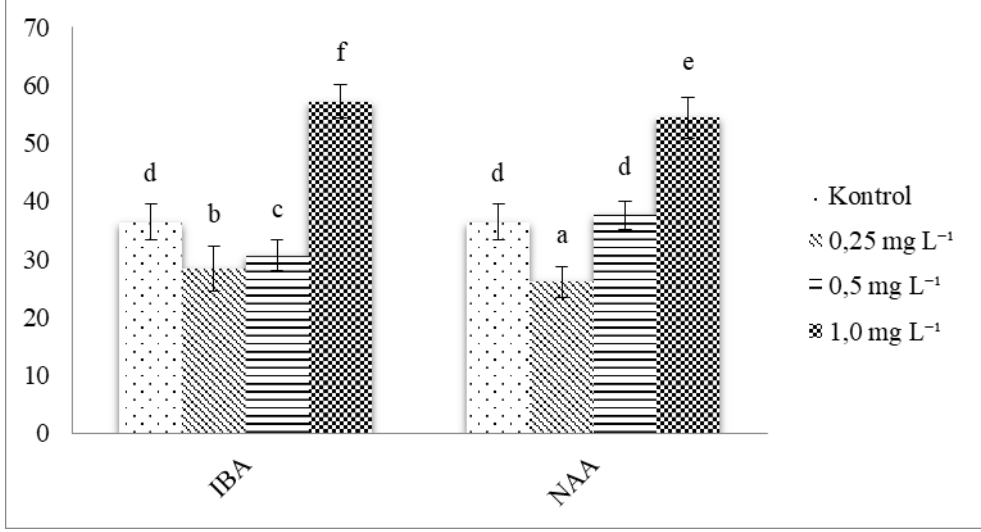
Şekil 22. *Tripleurospermum heterolepis*'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 1,0 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm



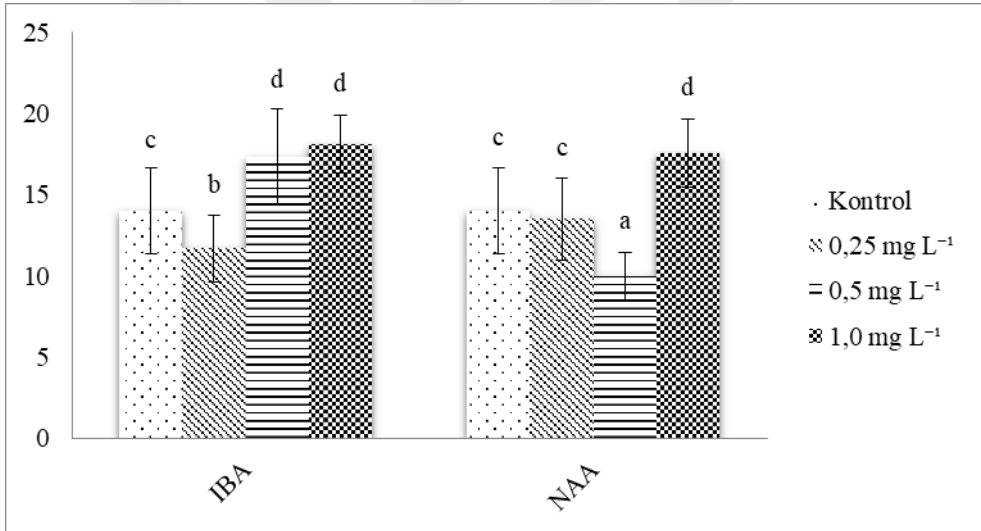
Şekil 23. *Tripleurospermum heterolepis*'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 1,0 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm



Şekil 24. *Tripleurospermum heterolepis*'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın kök sayısı üzerine etkisi



Şekil 25. *Tripleurospermum heterolepis*'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın kök boyu üzerine etkisi



Şekil 26. *Tripleurospermum heterolepis*'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın sekonder kök sayısı üzerine etkisi

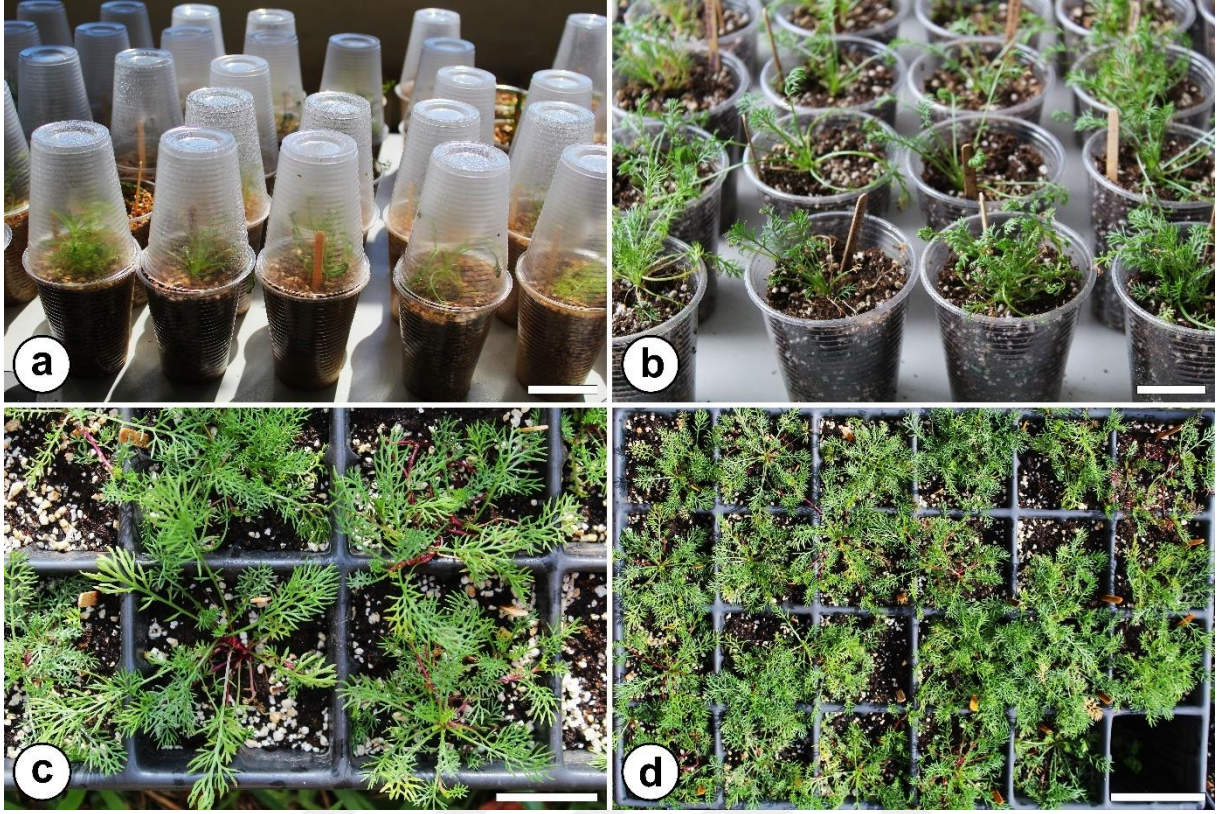
3.1.4. Aklimatizasyon

In vitro köklendirme ortamındaki sağlıklı bitkiler, vermikülit ortamlarına (Hoogland içeren) alınarak *ex vitro* ortama alıştırılmıştır (Şekil 27a, 28a). Daha sonra *ex vitro* ortama aklimatizasyonu başarılı şekilde sağlanan bitkiler, 1:1 (v/v) oranında orman toprağı ve turba karışımına alınarak botanik bahçesine aktarılmıştır (Şekil 27b, 28b-c-d). Botanik bahçesine aktarılan birkilerde %82 yaşama oranı elde edilmiştir.



Şekil 27. a: Vermikülit ortamı b: Turba ortamı. Ölçek a: 20 mm, b: 10 mm

Botanik bahçesinde aklimatizasyonu başarı ile tamamlayan bitkiler yaklaşık bir yıl sonra, nisan ayının sonunda çiçeklenmeye başlamış (Şekil 29a), çiçeklenen bitkiler haziran ayında meyve (aken) oluşturmuştur (Şekil 29b, 30).



Şekil 28. *Tripleurospermum heterolepis*'de aklimatizasyon aşamaları. a: *Ex situ* birinci hafta, b: *Ex situ* ortam ikinci hafta, c-d: Botanik bahçesi. Ölçek a-b-c: 40 mm, d: 80 mm



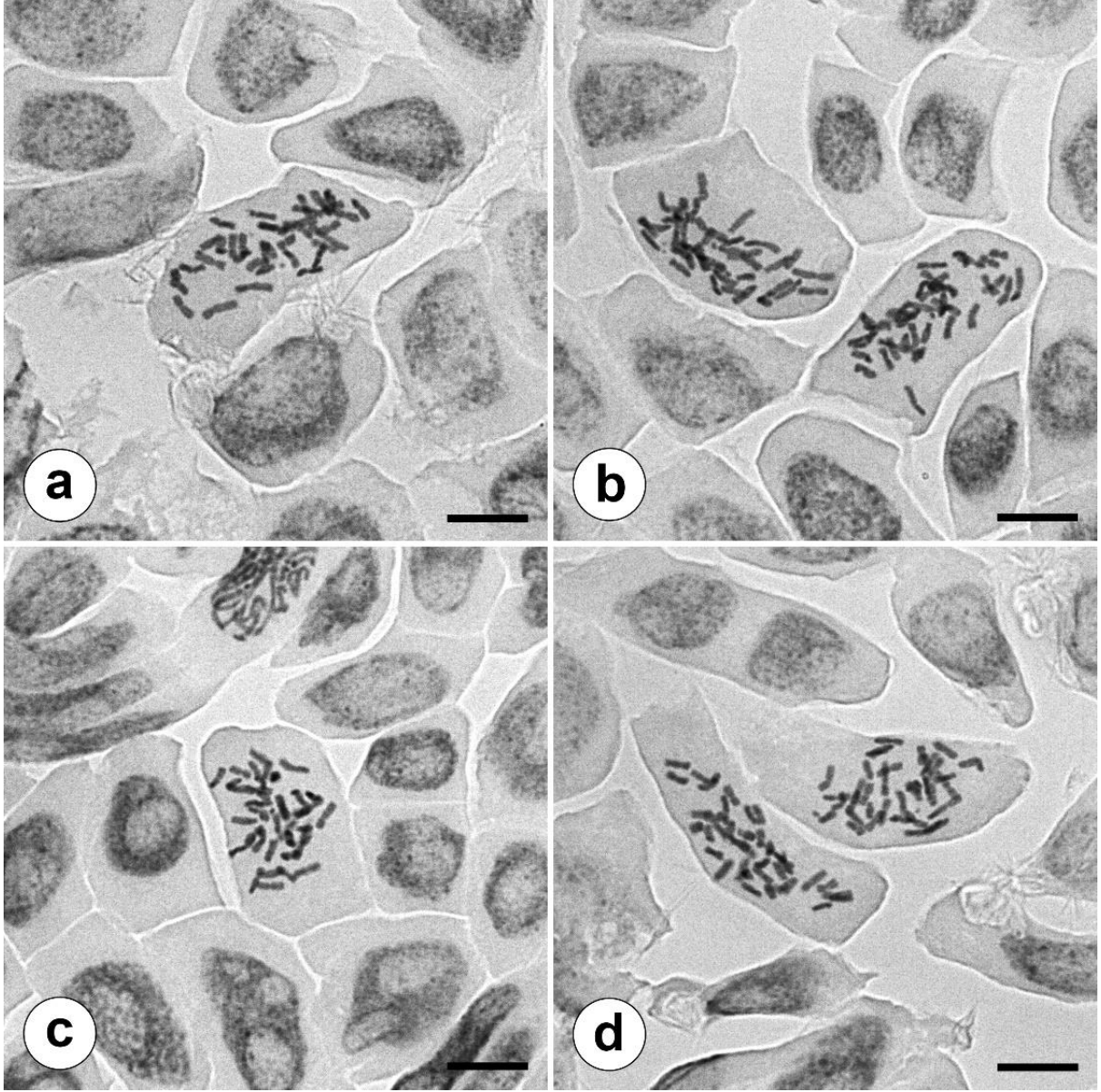
Şekil 29. *Tripleurospermum heterolepis* çiçek ve meyve dönemleri. a: Çiçeklenme evresi, b: Meyve evresi. Ölçek a: 15 mm, b: 6 mm. (Foto.: a: Betül ERGİN; b: Prof. Dr. Hüseyin İNCEER)



Şekil 30. *Tripleurospermum heterolepis*'in olgun akenleri. a-b: Botanik bahçesindeki *ex situ* koleksiyonlarından elde edilen akenler, c-d: Doğal populasyonlardan elde edilen akenler.
Ölçek: 1 mm

3.1.5. Kromozom Sayımı

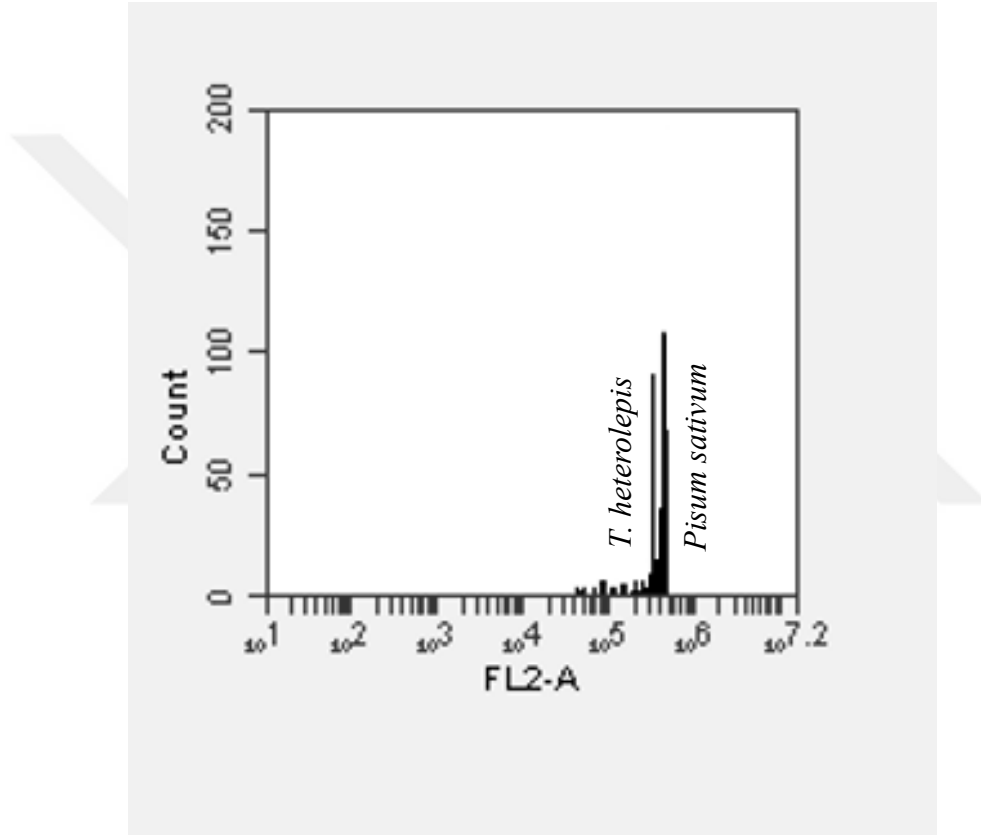
In vitro ortamda köklendirilen bitkiciklerin aktif kök uçlarından kromozom sayımı yapılmıştır. Yapılan sitolojik incelemelerde tüm uygulama gruplarında (Kontrol, IBA ve NAA) kromozom sayısının $2n = 4x = 36$ olduğu tespit edilmiştir (Şekil 31).



Şekil 31. *Tripleurospermum heterolepis*'de *in vitro* somatik kromozomlar ($2n=36$). a: Kontrol, b: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, c: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, d: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA. Ölçek: $10 \text{ }\mu\text{m}$

3.1.6. Akım Sitometrik Analiz

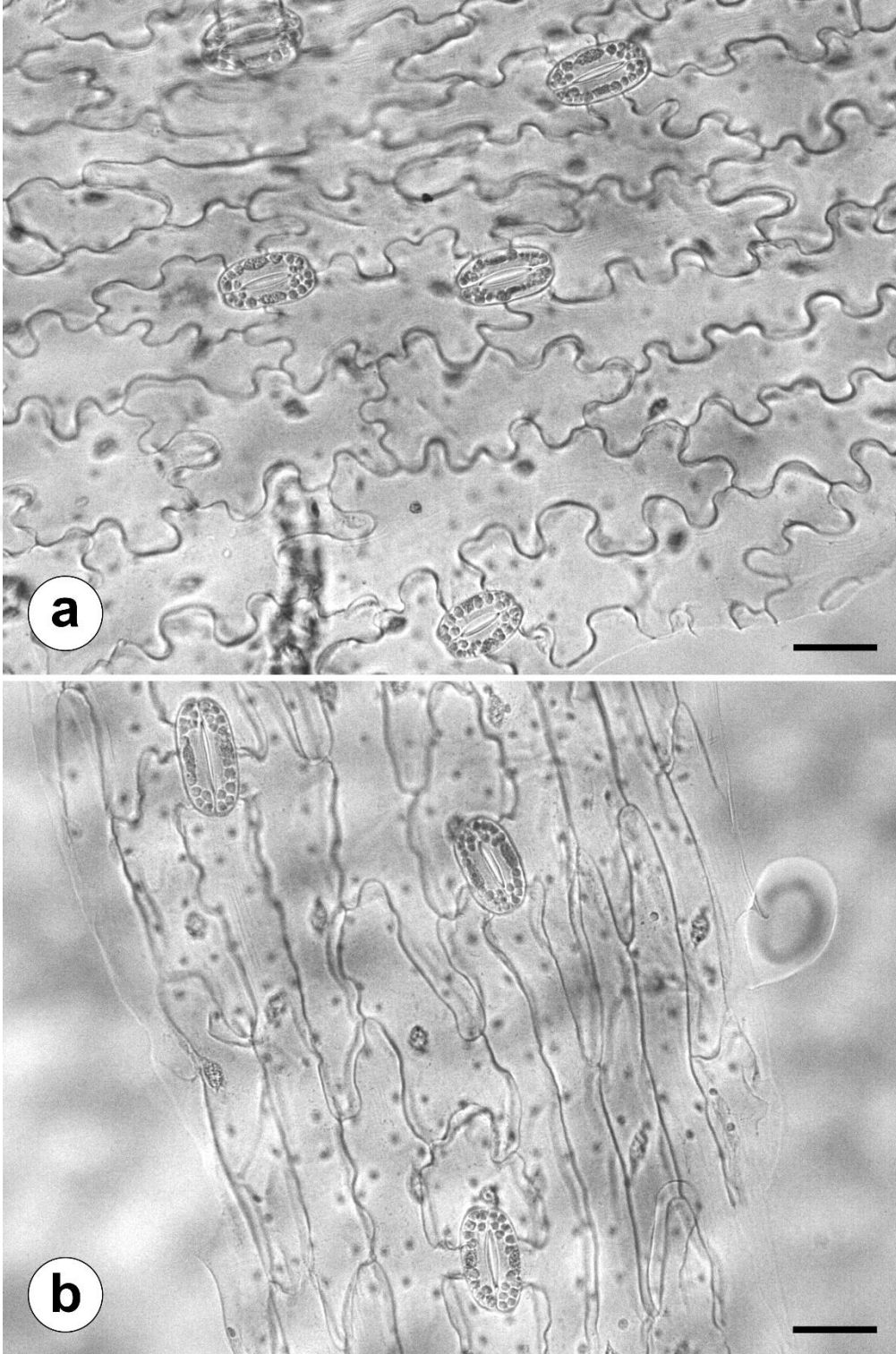
Botanik bahçesinde aklimatizasyonu sağlıklı bir şekilde yapılan bitkilerin akım sitometrik analizi yapılmıştır. Yapılan akım sitometrik analizler sonucunda *T. heterolepis*'in *ex situ* koleksiyonlarında nuklear DNA miktarının $8,38 \pm 0,26$ pg/2C (CV: 1,24), 8195,64 Mbp/2C, monoploid genom büyüklüğünün ise $2,10 \pm 0,02$ pg/1C, 2048,91Mbp/1C olduğu belirlenmiştir (Şekil 32).



Şekil 32. *Tripleurospermum heterolepis*'in akım sitometri histogramı

3.1.7. Stoma Özellikleri

Yapılan incelemeler sonucunda yaprakların amfistomatik, stomaların ise anomositik tipte olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yaprakların üst yüzeyindeki stoma uzunluğunun $34,35 \pm 1,66$ μ m (Şekil 33a), alt yüzeyindeki stoma uzunluğunun ise $34,06 \pm 1,50$ μ m (Şekil 33b) olduğu tespit edilmiştir.

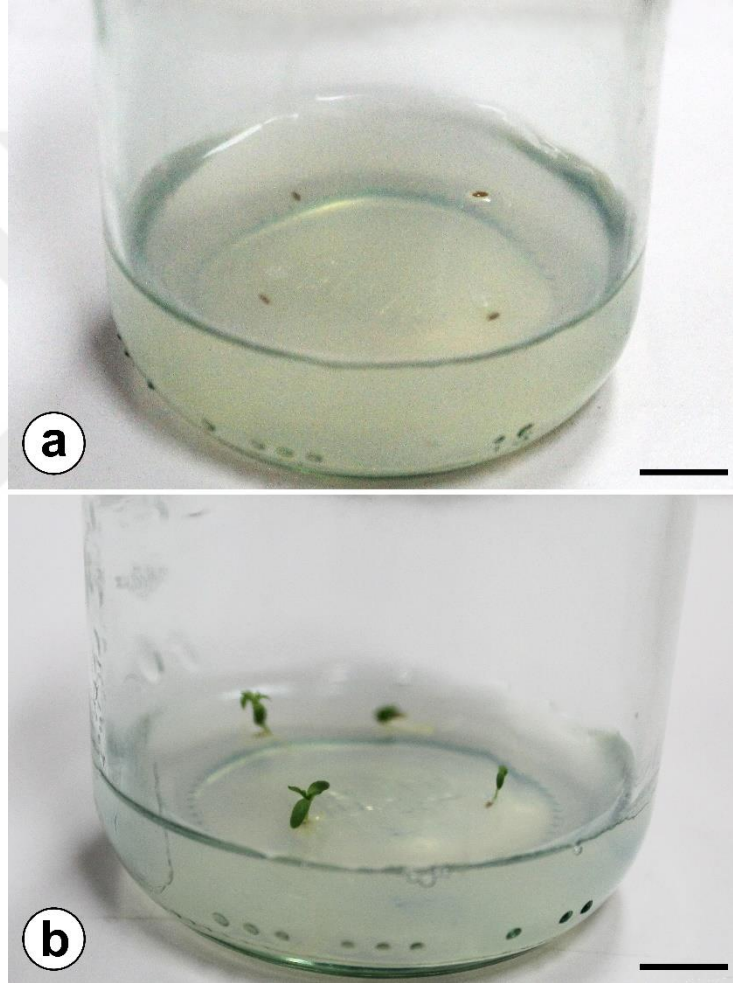


Şekil 33. *Tripleurospermum heterolepis*'de yapraktan yüzeysel kesit. a: Üst yüzey, b: Alt yüzey. Ölçek: 30 μ m

3.2. *Tripleurospermum repens*

3.2.1. *In vitro* Aken Çimlendirme

Bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı MS ortamına ekilen *T. repens* akenlerinde kontaminasyon görülmemiştir. Yedinci günde ilk çimlenme kaydedilmiştir. İki hafta sonra çimlenme oranı %100 ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Şekil 34, 35).



Şekil 34. *Tripleurospermum repens*'de kültür başlangıç aşaması. a: *In vitro* aken çimlenmesi, b: Birinci hafta. Ölçek: 5 mm



Şekil 35. *Tripleurospermum repens*'de kültür başlangıç aşaması. a: İkinci hafta, b: Dördüncü hafta. Ölçek: 5 mm

3.2.2. *In vitro* Sürgün Çoğaltımı

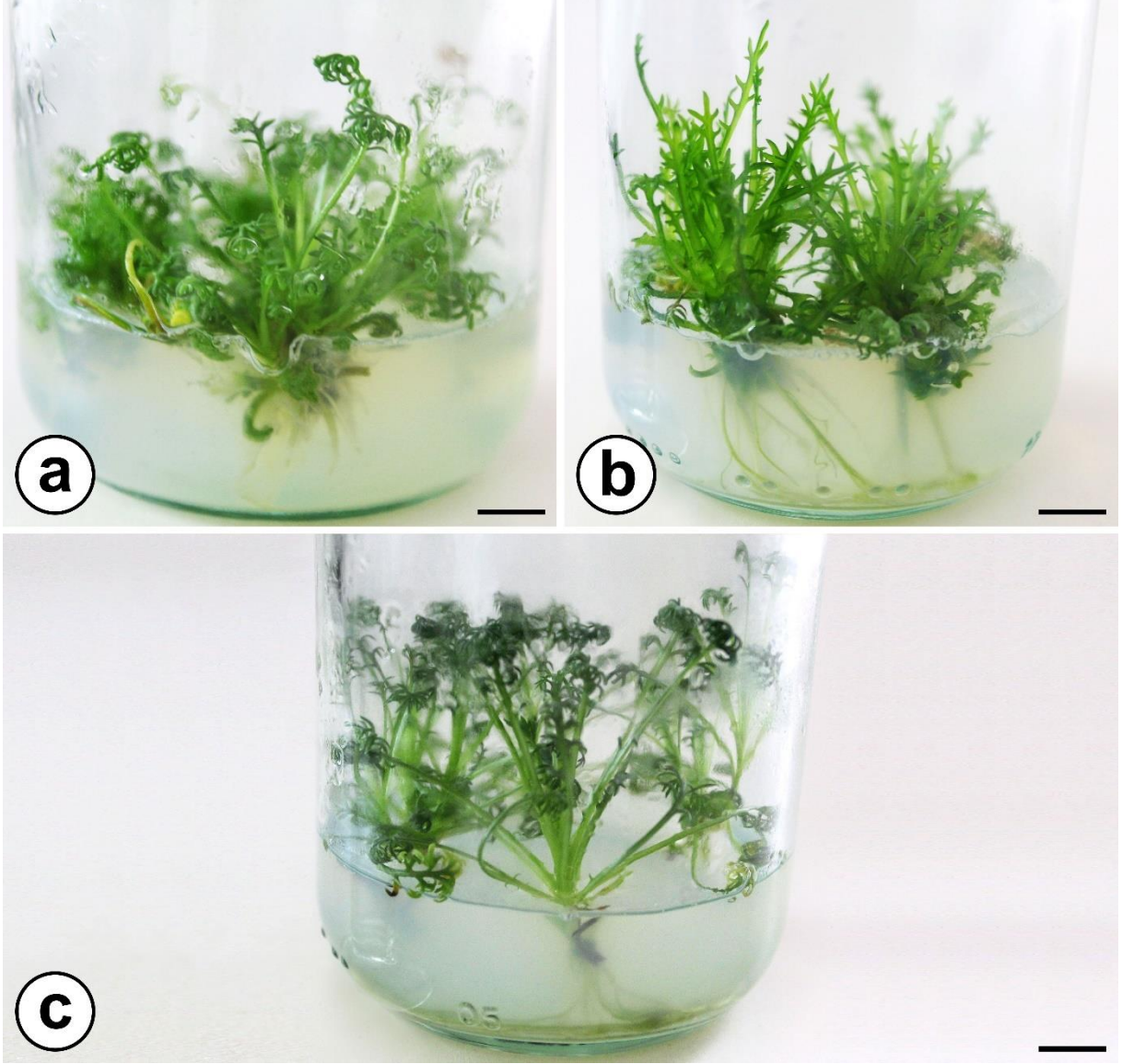
Tripleurospermum repens'in 0,25-0,5-1,0 mg L⁻¹ konsantrasyonundaki bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS besiyerlerinden elde edilen bitkilerin sürgün sayısı, sürgün boyu, yaprak sayısı ve nod sayısının en yüksek ve en düşük olduğu ortamlar belirlenmiştir.

Tablo 14. *Tripleurospermum repens*'de sitokinin ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi

Kontrol	Sitokinin (mg L ⁻¹)			Oksin (mg L ⁻¹)		Sürgün Sayısı	Sürgün Boyu (mm)	Yaprak Sayısı	Nod Sayısı
	KIN	6-BA	2iP	IBA	NAA				
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,75 ± 0,85abcd	33,76 ± 2,92fg	26,15 ± 3,20ef	3,25 ± 1,02cde
	0,25			0,1		2,65 ± 0,93efg	32,43 ± 2,61ef	29,30 ± 4,03ghi	4,45 ± 0,94f
		0,25		0,1		1,80 ± 1,01abcd	32,14 ± 2,88ef	28,95 ± 3,90gh	3,30 ± 0,92de
			0,25	0,1		3,80 ± 1,15h	40,81 ± 1,94i	30,80 ± 3,24hij	6,15 ± 0,88h
	0,25				0,1	2,00 ± 0,86bcd	28,23 ± 2,71cd	25,55 ± 4,22def	3,40 ± 0,82de
		0,25			0,1	2,75 ± 1,12fg	37,84 ± 3,01h	31,55 ± 3,30ijk	4,85 ± 0,99fg
			0,25		0,1	2,15 ± 0,75cde	34,39 ± 2,65g	23,35 ± 3,00ab	3,65 ± 0,88e

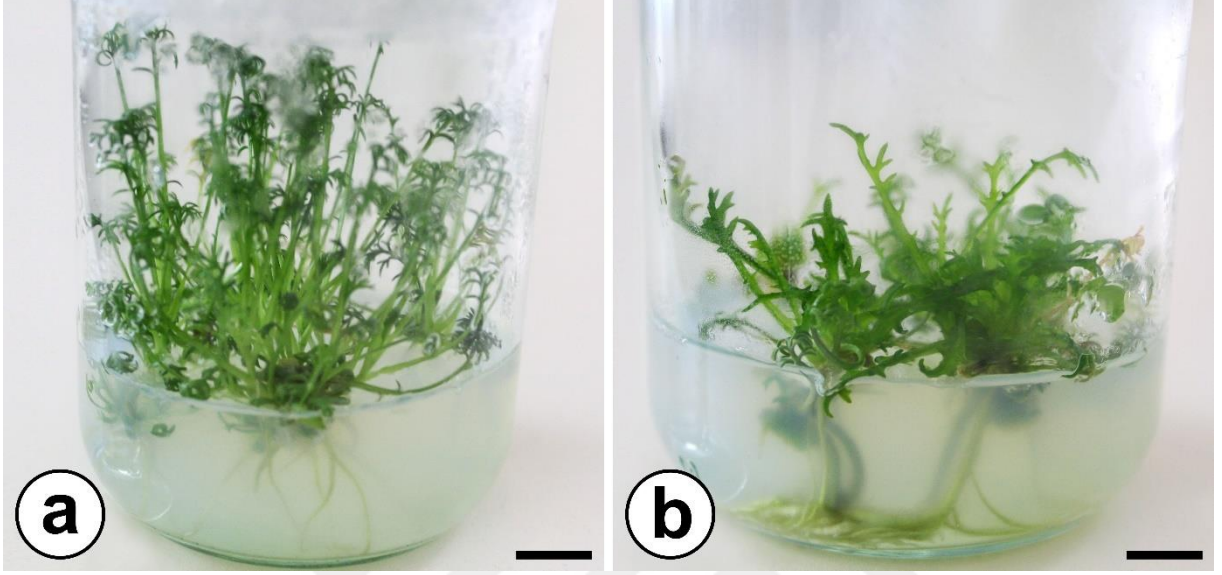
Aynı harflerle gösterilen değerler (ortalama ± standart sapma) önemli ölçüde farklı değildir (P = 0,05, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi)

En fazla sürgün sayısı $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin (KIN, 6-BA, 2iP) ve $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyerinde ($3,80 \pm 1,15$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 14 ve Şekil 37a, 45), en az sürgün sayısı sırasıyla ($1,75 \pm 0,85$) kontrol (Tablo 14 ve Şekil 36c, 45) ve ($1,80 \pm 1,01$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 14 ve Şekil 36b, 45) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



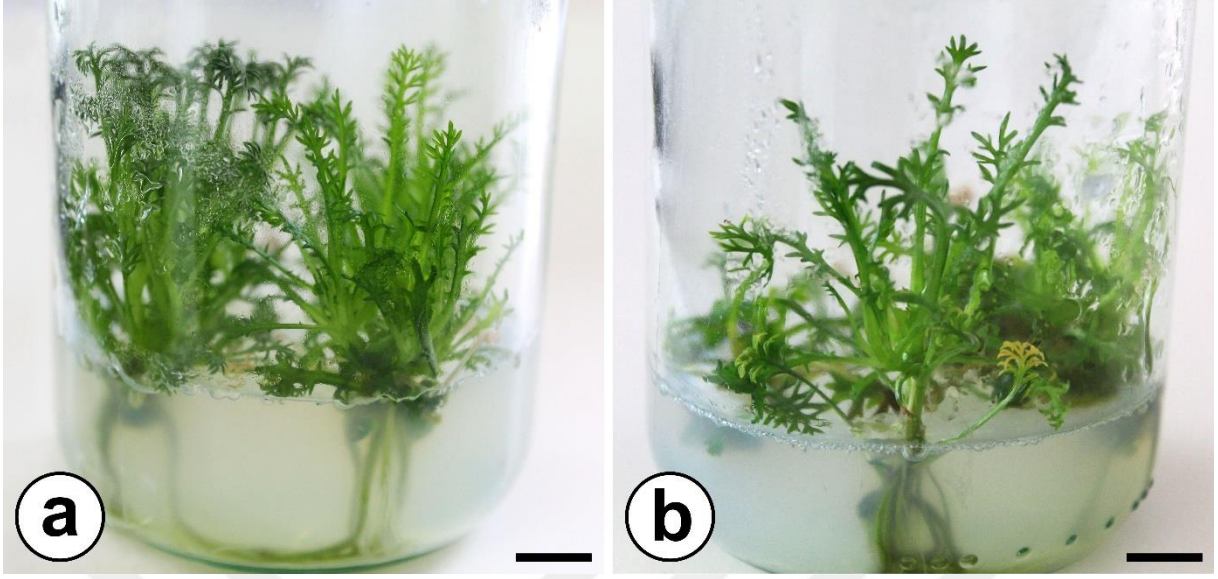
Şekil 36. *Tripleurospermum repens*'de sürgün çoğaltımı. a: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, b: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, c: Kontrol içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

En uzun sürgün boyu ($40,81 \pm 1,94$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 14 ve Şekil 37a, 46), en kısa sürgün boyu ($28,23 \pm 2,71$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 14 ve Şekil 37b, 46) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



Şekil 37. *Tripleurospermum repens*'de sürgün çoğaltımı. a: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, b: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

En fazla yaprak sayısı $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin (KIN, 6-BA, 2iP) ve $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyerinde ($31,55 \pm 3,30$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 14 ve Şekil 38a, 47), en az yaprak sayısı ($23,35 \pm 3,00$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 14 ve Şekil 38b, 47) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



Şekil 38. *Tripleurospermum repens*'de sürgün çoğaltımı. a: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, b: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

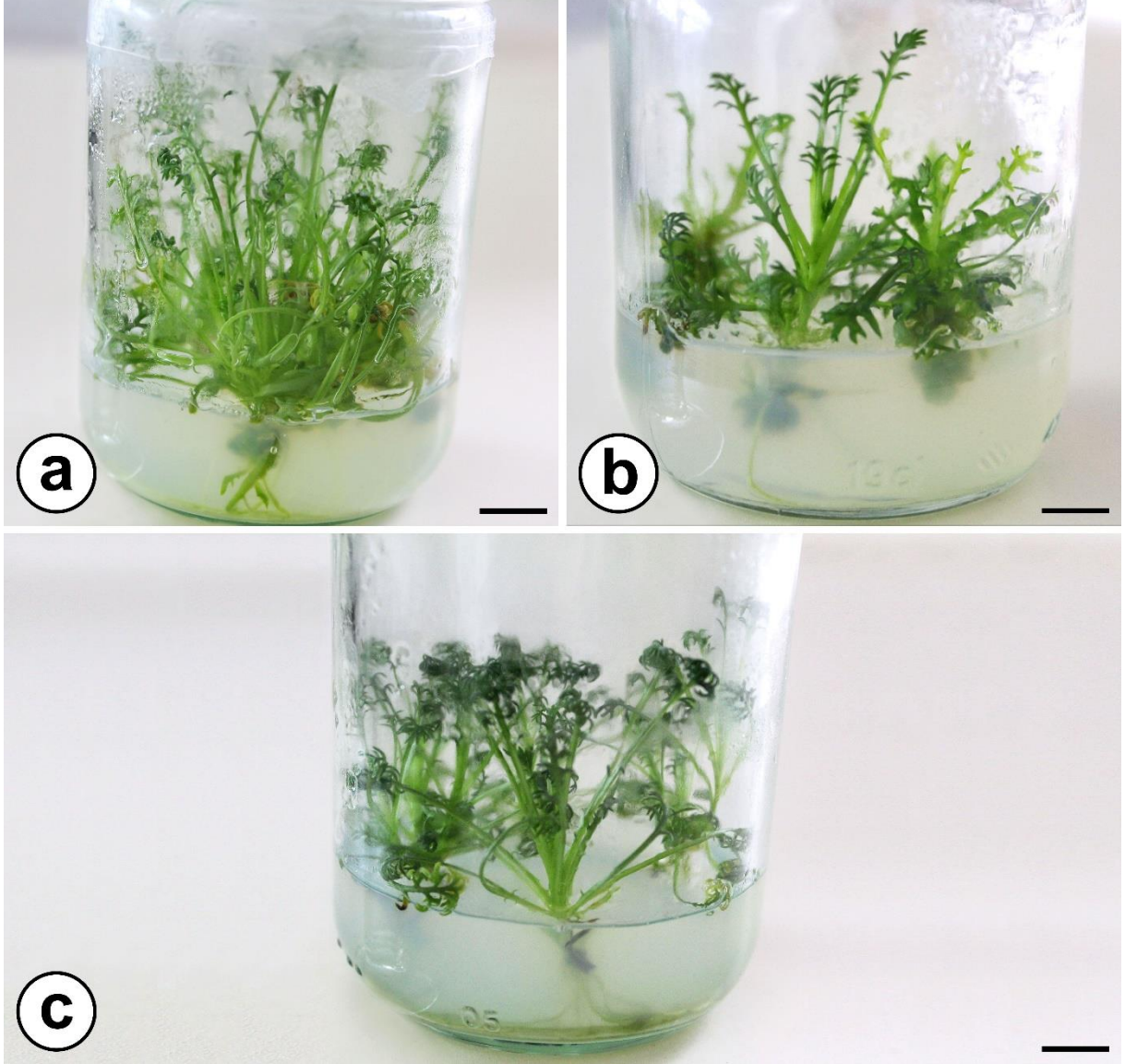
En fazla nod sayısı ($6,15 \pm 0,88$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 14 ve Şekil 37a, 48), en az nod sayısı sırasıyla ($3,25 \pm 1,02$) kontrol (Tablo 14 ve Şekil 36c, 48) ve ($3,30 \pm 0,92$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 14 ve Şekil 36b, 48) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.

Tablo 15. *Tripleurospermum repens*'de sitokinin ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi

Kontrol	Sitokinin (mg L ⁻¹)			Oksin (mg L ⁻¹)		Sürgün Sayısı	Sürgün Boyu (mm)	Yaprak Sayısı	Nod Sayısı
	KIN	6-BA	2iP	IBA	NAA				
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,75 ± 0,85abcd	33,76 ± 2,92fg	26,15 ± 3,20ef	3,25 ± 1,02cde
	0,5			0,1		3,55 ± 0,76h	43,62 ± 2,91j	33,45 ± 2,68k	5,20 ± 0,77g
		0,5		0,1		1,75 ± 0,72abcd	31,79 ± 2,08e	27,10 ± 3,68efg	3,70 ± 0,92e
			0,5	0,1		2,90 ± 1,02g	41,96 ± 2,76i	31,95 ± 4,21jk	4,75 ± 0,91fg
	0,5				0,1	1,55 ± 0,51abc	33,80 ± 1,66fg	21,60 ± 4,22bc	2,45 ± 0,51ab
		0,5			0,1	1,65 ± 0,75abcd	28,81 ± 2,76d	19,35 ± 3,91a	2,80 ± 0,70abcd
			0,5		0,1	1,25 ± 0,44a	29,30 ± 3,39d	20,45 ± 4,19ab	2,30 ± 0,47ab

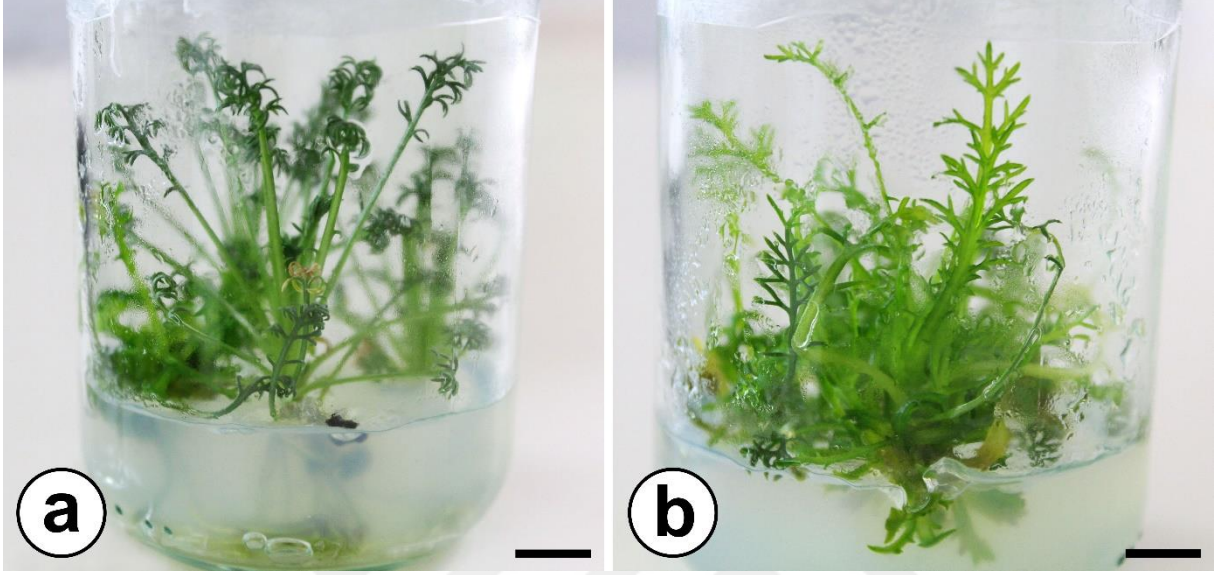
Aynı harflerle gösterilen değerler (ortalama ± standart sapma) önemli ölçüde farklı değildir (P = 0,05, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi)

En fazla sürgün sayısı 0,5 mg L⁻¹ sitokinin (KIN, 6-BA, 2iP) ve 0,1 mg L⁻¹ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyerinde ($3,55 \pm 0,76$) 0,5 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ IBA (Tablo 15 ve Şekil 39a, 45), en az sürgün sayısı ($1,25 \pm 0,44$) 0,5 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 15 ve Şekil 41b, 45) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



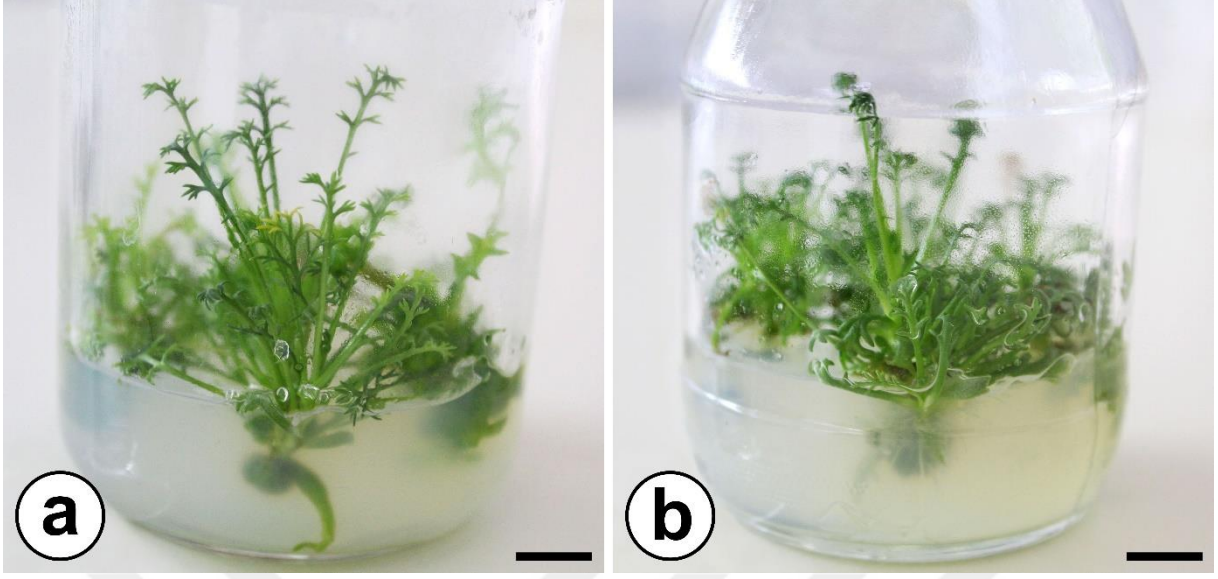
Şekil 39. *Tripleurospermum repens*'de sürgün çoğaltımı. a: 0,5 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ IBA, b: 0,5 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA, c: Kontrol içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

En uzun sürgün boyu ($43,62 \pm 2,91$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 15 ve Şekil 39a, 46), en kısa sürgün boyu ($28,81 \pm 2,76$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 15 ve Şekil 41a, 46) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



Şekil 40. *Tripleurospermum repens*'de sürgün çoğaltımı. a: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, b: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

En fazla yaprak sayısı $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin (KIN, 6-BA, 2iP) ve $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyerinde ($33,45 \pm 2,68$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 15 ve Şekil 39a, 47), en az yaprak sayısı ($19,35 \pm 3,91$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 15 ve Şekil 41a, 47) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



Şekil 41. *Tripleurospermum repens*'de sürgün çoğaltımı. a: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, b: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

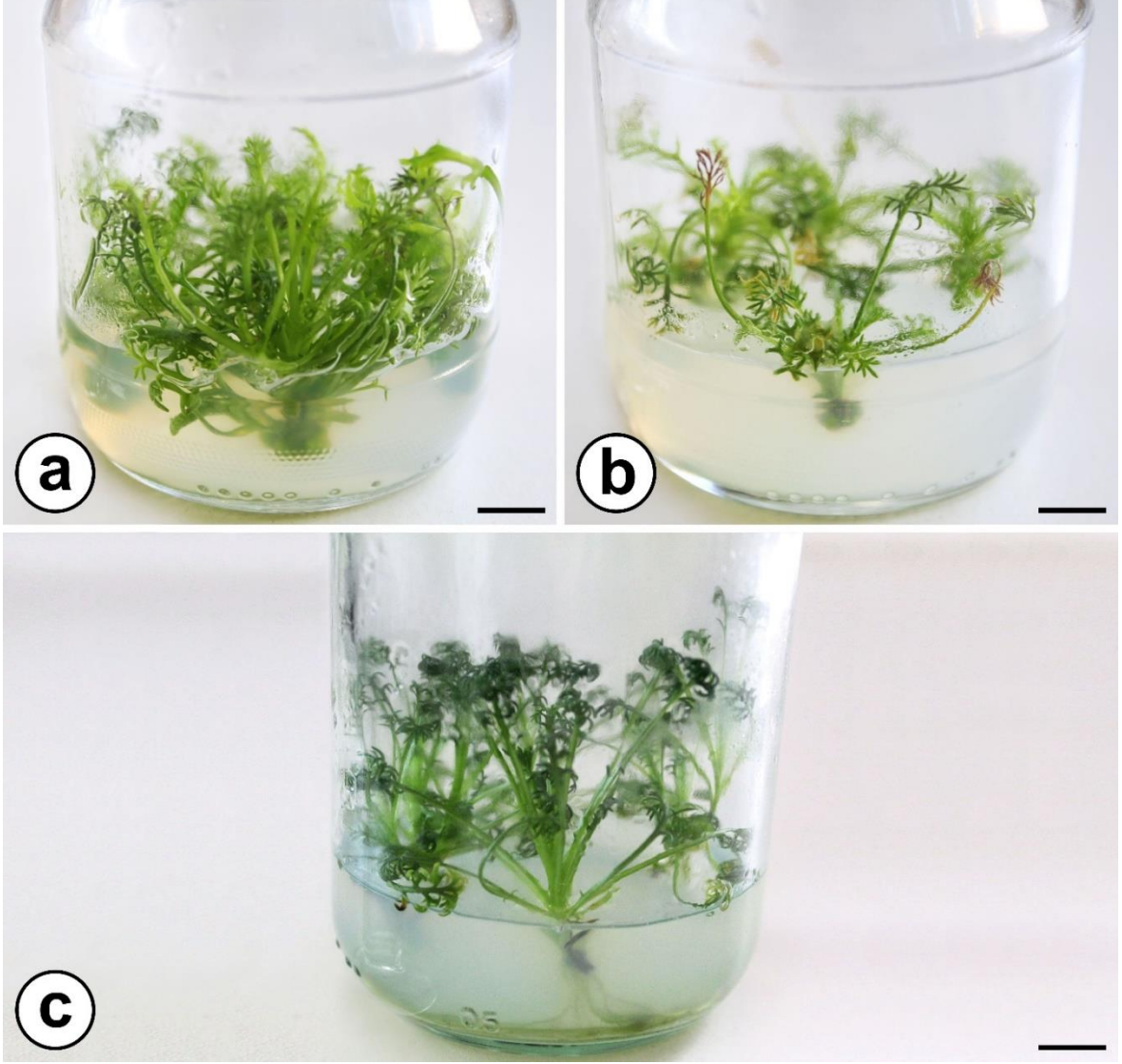
En fazla nod sayısı ($5,20 \pm 0,77$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 15 ve Şekil 39a, 48), en az nod sayısı ($2,30 \pm 0,47$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 15 ve Şekil 41b, 48) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.

Tablo 16. *Tripleurospermum repens*'de sitokinin ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi

Kontrol	Sitokinin (mg L ⁻¹)			Oksin (mg L ⁻¹)		Sürgün Sayısı	Sürgün Boyu (mm)	Yaprak Sayısı	Nod Sayısı
	KIN	6-BA	2iP	IBA	NAA				
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,75 ± 0,85abcd	33,76 ± 2,92fg	26,15 ± 3,20ef	3,25 ± 1,02cde
	1,0			0,1		1,90 ± 0,97bcd	28,57 ± 2,79cd	27,95 ± 2,89fg	2,45 ± 0,94ab
		1,0		0,1		2,20 ± 1,20def	24,11 ± 2,84b	29,30 ± 3,34ghi	3,20 ± 1,15cde
			1,0	0,1		1,60 ± 0,68abcd	31,16 ± 2,63e	27,20 ± 2,59efg	2,65 ± 1,04abc
	1,0				0,1	1,65 ± 0,75abcd	26,96 ± 2,01c	25,90 ± 3,16ef	2,55 ± 1,10ab
		1,0			0,1	1,70 ± 0,66abcd	22,10 ± 2,20a	25,95 ± 2,28ef	2,20 ± 0,89a
			1,0		0,1	1,50 ± 0,69ab	37,96 ± 2,35h	24,80 ± 1,91de	2,85 ± 0,88bcd

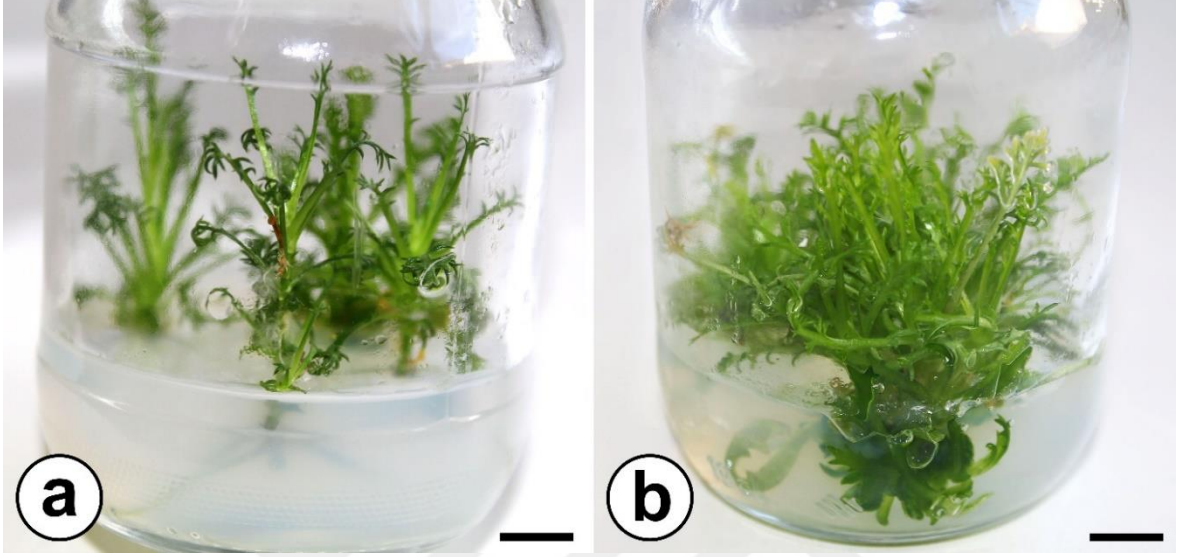
Aynı harflerle gösterilen değerler (ortalama ± standart sapma) önemli ölçüde farklı değildir (P = 0,05, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi)

En fazla sürgün sayısı $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin (KIN, 6-BA, 2iP) ve $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyerinde ($2,20 \pm 1,20$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 16 ve Şekil 42b, 45), en az sürgün sayısı ($1,50 \pm 0,69$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 16 ve Şekil 44b, 45) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



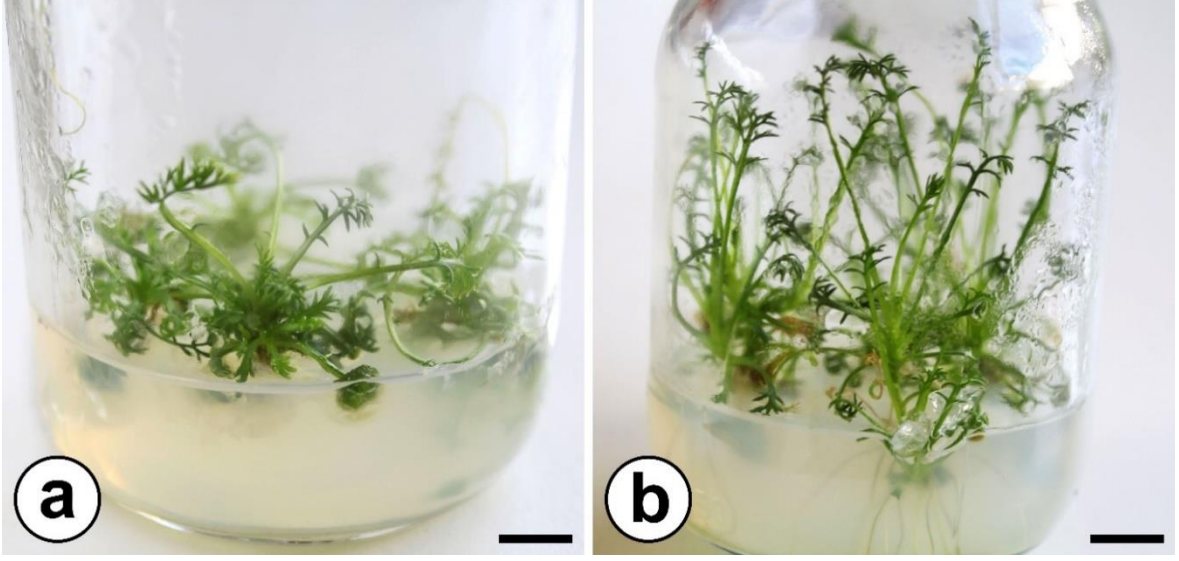
Şekil 42. *Tripleurospermum repens*'de sürgün çoğaltımı. a: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, b: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, c: Kontrol içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

En uzun sürgün boyu ($37,96 \pm 2,35$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 16 ve Şekil 44b, 46), en kısa sürgün boyu ($22,10 \pm 2,20$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 16 ve Şekil 44a, 46) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



Şekil 43. *Tripleurospermum repens*'de sürgün çoğaltımı. a: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, b: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

En fazla yaprak sayısı $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin (KIN, 6-BA, 2iP) ve $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin (IBA, NAA) içeren MS besiyerinde ($29,30 \pm 3,34$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 16 ve Şekil 42b, 47), en az yaprak sayısı ($24,80 \pm 1,91$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 16 ve Şekil 44b, 47) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.

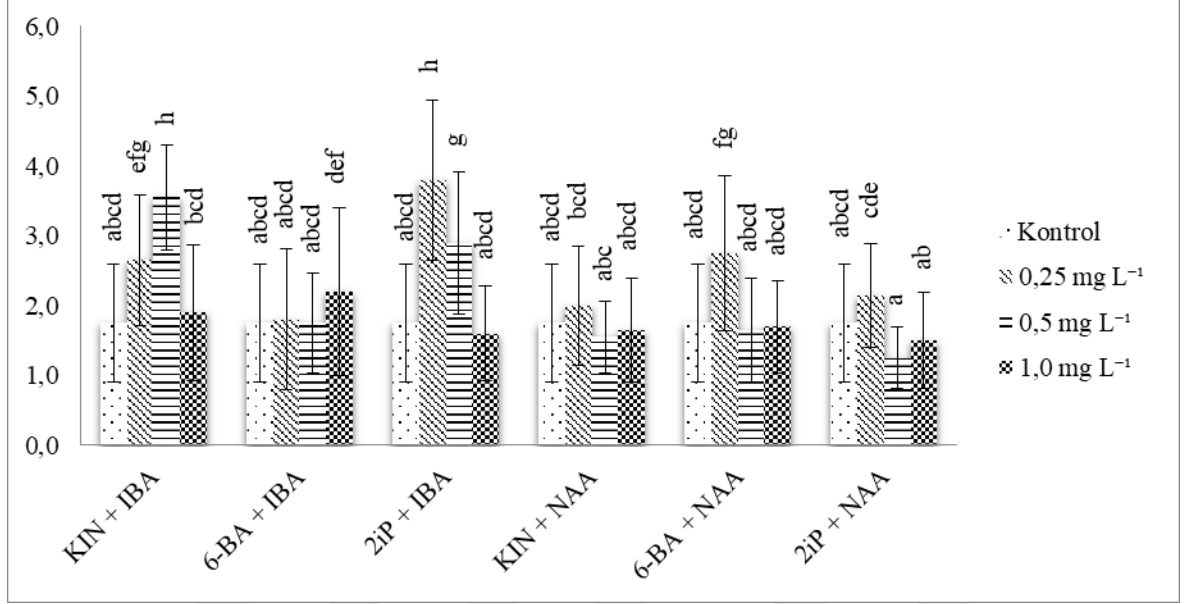


Şekil 44. *Tripleurospermum repens*'de sürgün çoğaltımı. a: 1,0 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA, b: 1,0 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 10 mm

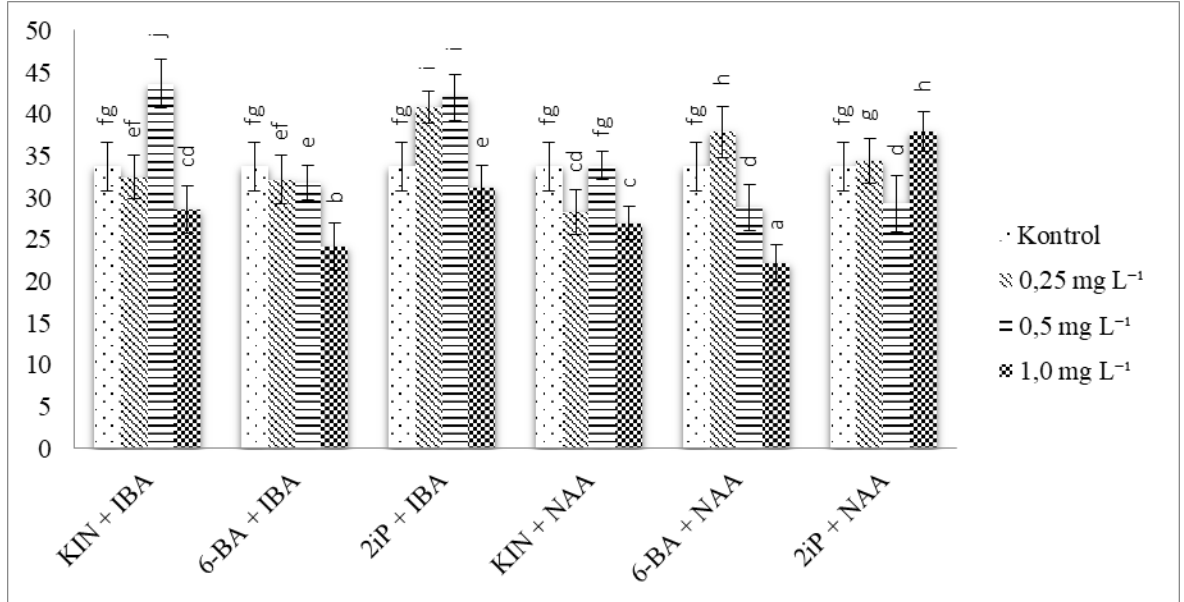
En fazla nod sayısı ($3,25 \pm 1,02$) kontrol ve ($3,20 \pm 1,15$) 1,0 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ IBA (Tablo 16 ve Şekil 42b, 48), en az nod sayısı ($2,20 \pm 0,89$) 1,0 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 16 ve Şekil 44a, 48) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.

Tüm bitki büyüme düzenleyicileri; sürgün sayısı, sürgün boyu, yaprak sayısı ve nod sayısı açısından incelendiğinde en yüksek ve en düşük değerlere sahip ortamlar belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en fazla sürgün sayısı ($3,80 \pm 1,15$) 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA (Tablo 14 ve Şekil 37a, 45) içeren MS besiyerinden, en az sürgün sayısı sırasıyla ($1,25 \pm 0,44$) 0,5 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 15 ve Şekil 41b, 45) içeren MS besiyerinde tespit edilmiştir. En uzun sürgün boyunun ($43,62 \pm 2,91$) 0,5 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ IBA (Tablo 15 ve Şekil 39a, 46) içeren MS besiyeri ortamında, en kısa sürgün boyunun ise ($22,10 \pm 2,20$) 1,0 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 16 ve Şekil 44a, 46) içeren MS besiyeri ortamında olduğu gözlemlenmiştir. En fazla yaprak sayısının ($33,45 \pm 2,68$) 0,5 mg L⁻¹ KIN + 0,1 mg L⁻¹ IBA (Tablo 15 ve Şekil 39a, 47) içeren MS besiyerinde, en az yaprak sayısının ise ($19,35 \pm 3,91$) 0,5 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 15 ve Şekil 41a, 47) içeren MS besiyeri ortamında olduğu tespit edilmiştir. En fazla nod sayısı ($6,15 \pm 0,88$) 0,25 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ IBA (Tablo 14 ve Şekil 37a, 48) içeren MS besiyeri ortamında gözlenirken, en az nod sayısı ($2,20 \pm 0,89$) 1,0 mg L⁻¹ 6-BA + 0,1 mg L⁻¹ NAA (Tablo 16 ve Şekil 44a, 48) içeren MS besiyeri ortamından elde edilmiştir.

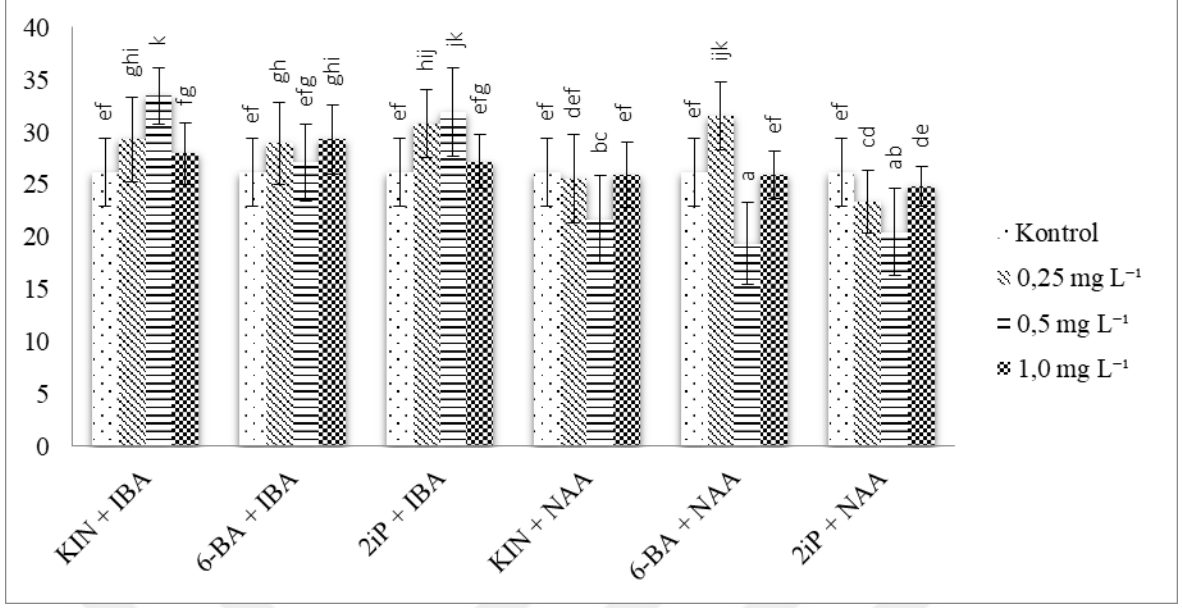
Kontrol grubu hariç tüm uygulama gruplarında kallus oluşumu gözlenmiştir. Sürgün çoğaltımında sitokinin konsantrasyonunun $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ olduğu ortamlarda kallus oranı daha az, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ olduğu ortamlarda orta, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ olduğu ortamlarda ise yüksek olduğu gözlenmiştir.



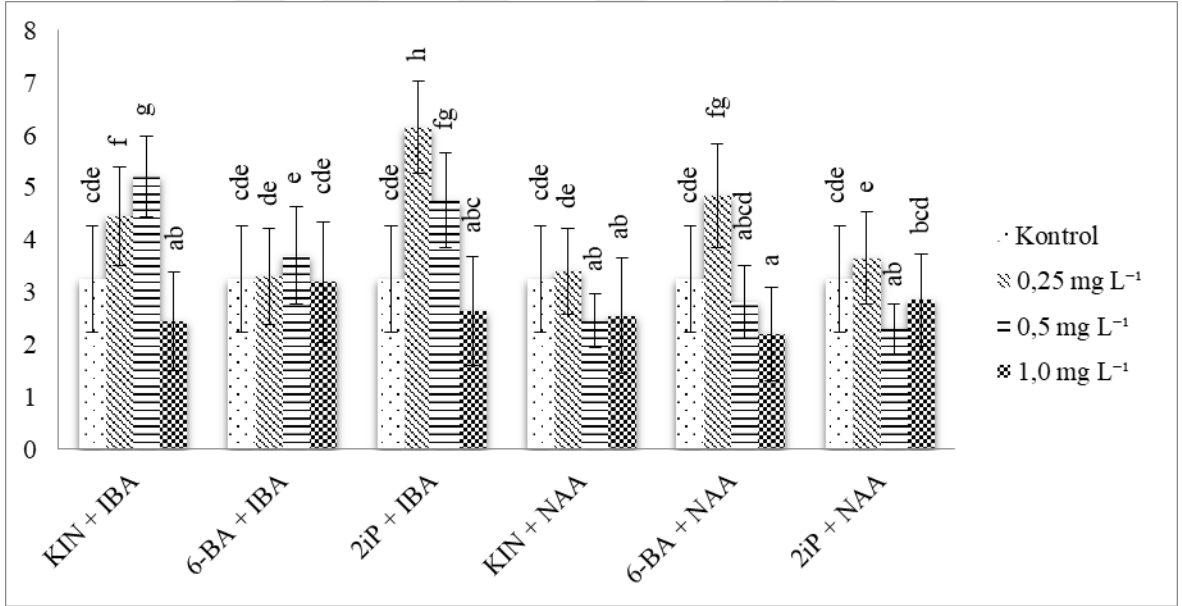
Şekil 45. *Tripleurospermum repens*'de bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün sayısı üzerine etkisi



Şekil 46. *Tripleurospermum repens*'de bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün boyu üzerine etkisi



Şekil 47. *Tripleurospermum repens*'de bitki büyüme düzenleyicilerinin yaprak sayısı üzerine etkisi



Şekil 48. *Tripleurospermum repens*'de bitki büyüme düzenleyicilerinin nod sayısı üzerine etkisi

3.2.3. *In vitro* Köklendirme

Tripleurospermum repens'in 0,25-0,5-1,0 mg L⁻¹ konsantrasyonundaki IBA ve NAA bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS besiyerlerinden elde edilen bitkilerin kök sayısı, kök boyu ve sekonder kök sayısının en yüksek ve en düşük olduğu ortamlar belirlenmiştir.

Tablo 17. *Tripleurospermum repens*'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın kök oluşumuna etkisi

Kontrol	IBA (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	Kök sayısı	Kök boyu (mm)	Sekonder kök sayısı
0,0	0,0	0,0	3,75 ± 0,97c	50,34 ± 2,32c	18,40 ± 1,79d
	0,25		3,05 ± 0,83b	39,25 ± 1,84a	17,35 ± 1,46c
	0,5		4,80 ± 1,06d	52,11 ± 2,74d	7,50 ± 1,32b
	1,0		4,95 ± 1,10d	54,18 ± 2,67e	23,60 ± 1,96e
		0,25	1,50 ± 0,51a	41,43 ± 2,36b	5,00 ± 1,12a
		0,5	3,00 ± 0,73b	70,93 ± 2,24g	7,20 ± 1,36b
		1,0	2,95 ± 0,76b	63,50 ± 3,08f	17,45 ± 1,73cd

Aynı harflerle gösterilen değerler (ortalama ± standart sapma) önemli ölçüde farklı değildir (P = 0,05, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi)



Şekil 49. *Tripleurospermum repens*'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,25 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm



Şekil 50. *Tripleurospermum repens*'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,25 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm



Şekil 51. *Tripleurospermum repens*'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 0,5 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm

En fazla kök sayısı ($4,95 \pm 1,10$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 17 ve Şekil 53b, 55), en az kök sayısı ($1,50 \pm 0,51$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 17 ve Şekil 50b, 55) içeren MS besiyeri ortamlarından elde edilmiştir. En uzun kök boyu ($70,93 \pm 2,24$) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 17 ve Şekil 52b, 56), en kısa kök boyu ($39,25 \pm 1,84$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 17 ve Şekil 49b, 56) içeren MS besiyeri ortamlarından elde edilmiştir. En fazla sekonder kök sayısı ($23,60 \pm 1,96$) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 17 ve Şekil 53b, 57), en az sekonder kök sayısı ($5,00 \pm 1,12$) $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Tablo 17 ve Şekil 50b, 57) içeren MS besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir.



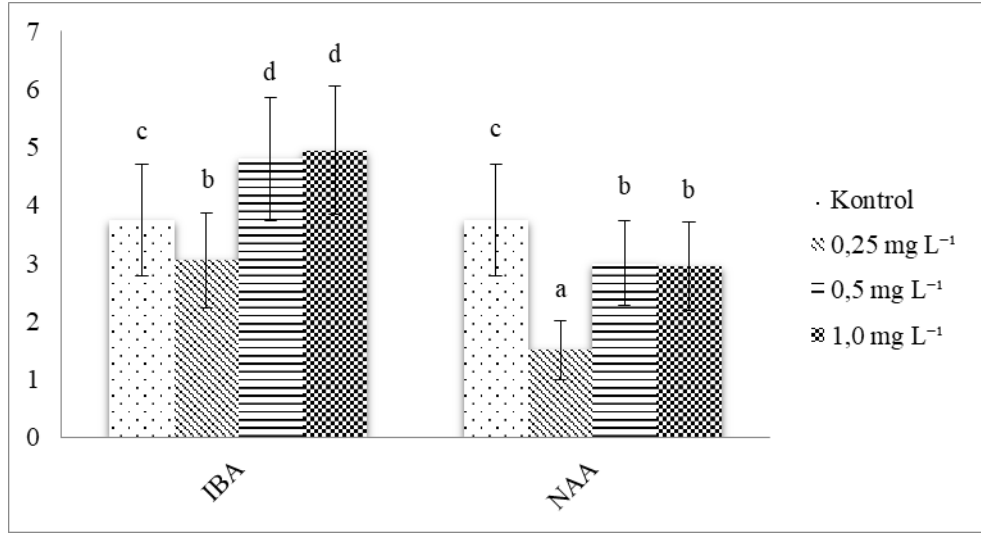
Şekil 52. *Tripleurospermum repens*'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm



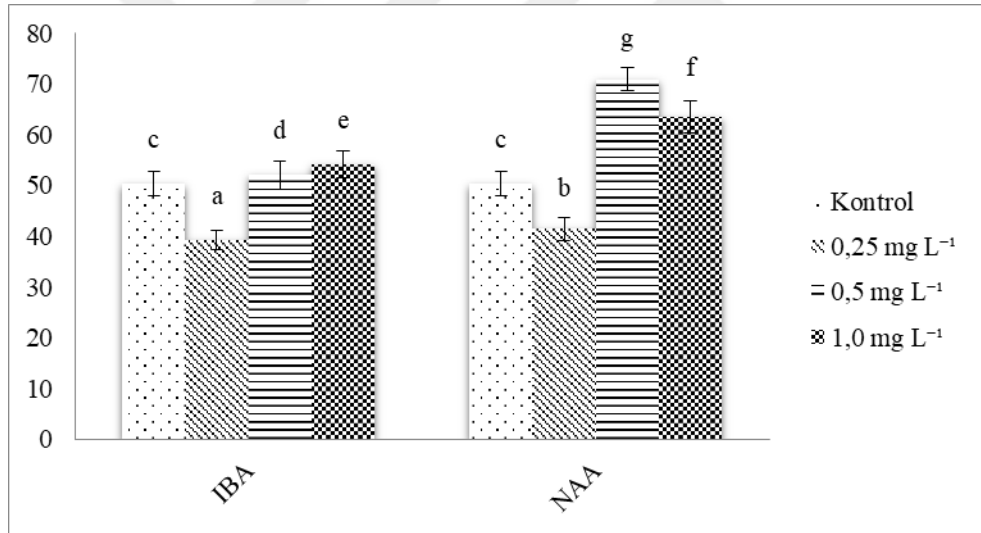
Şekil 53. *Tripleurospermum repens*'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 1,0 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm



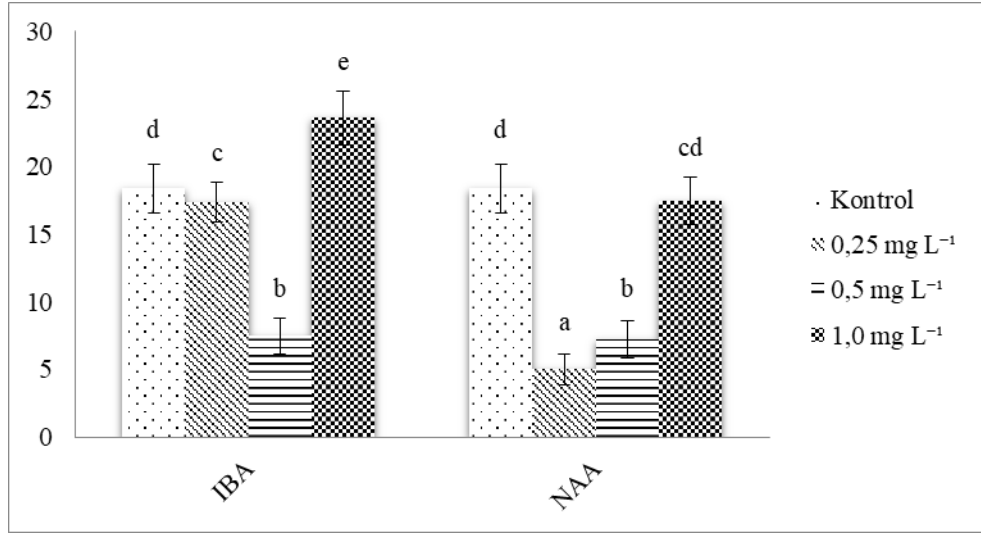
Şekil 54. *Tripleurospermum repens*'de köklendirme evresi. a: Kontrol, b: 1,0 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamı. Ölçek: 15 mm



Şekil 55. *Tripleurospermum repens*'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın kök sayısı üzerine etkisi



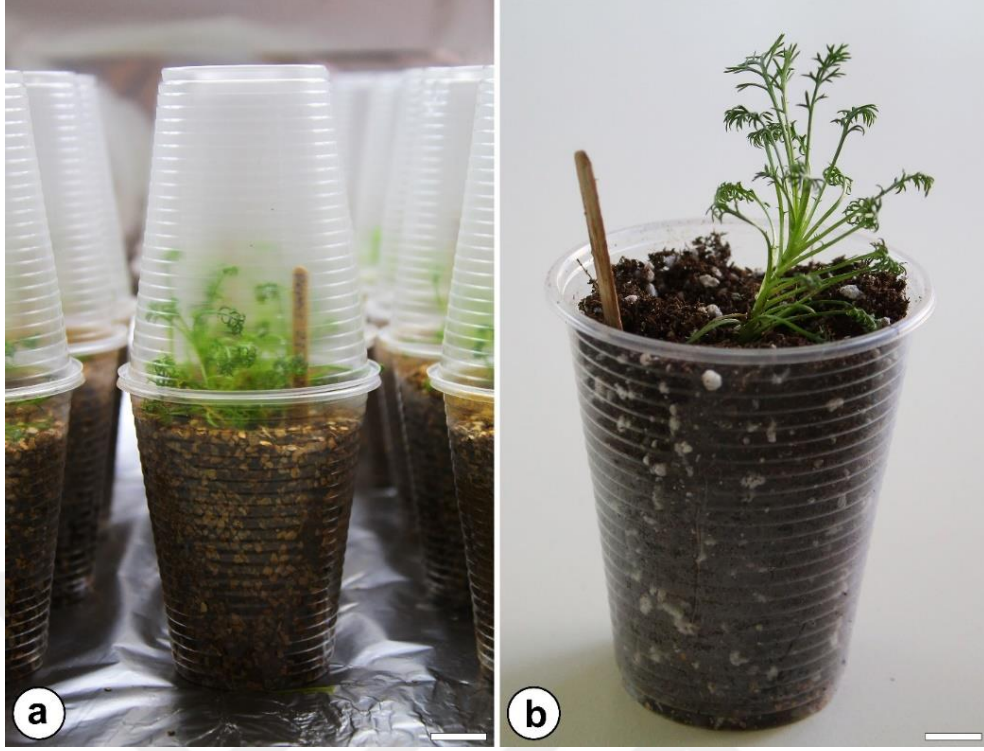
Şekil 56. *Tripleurospermum repens*'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın kök boyu üzerine etkisi



Şekil 57. *Tripleurospermum repens*'de farklı konsantrasyonlardaki IBA ve NAA'nın sekonder kök sayısı üzerine etkisi

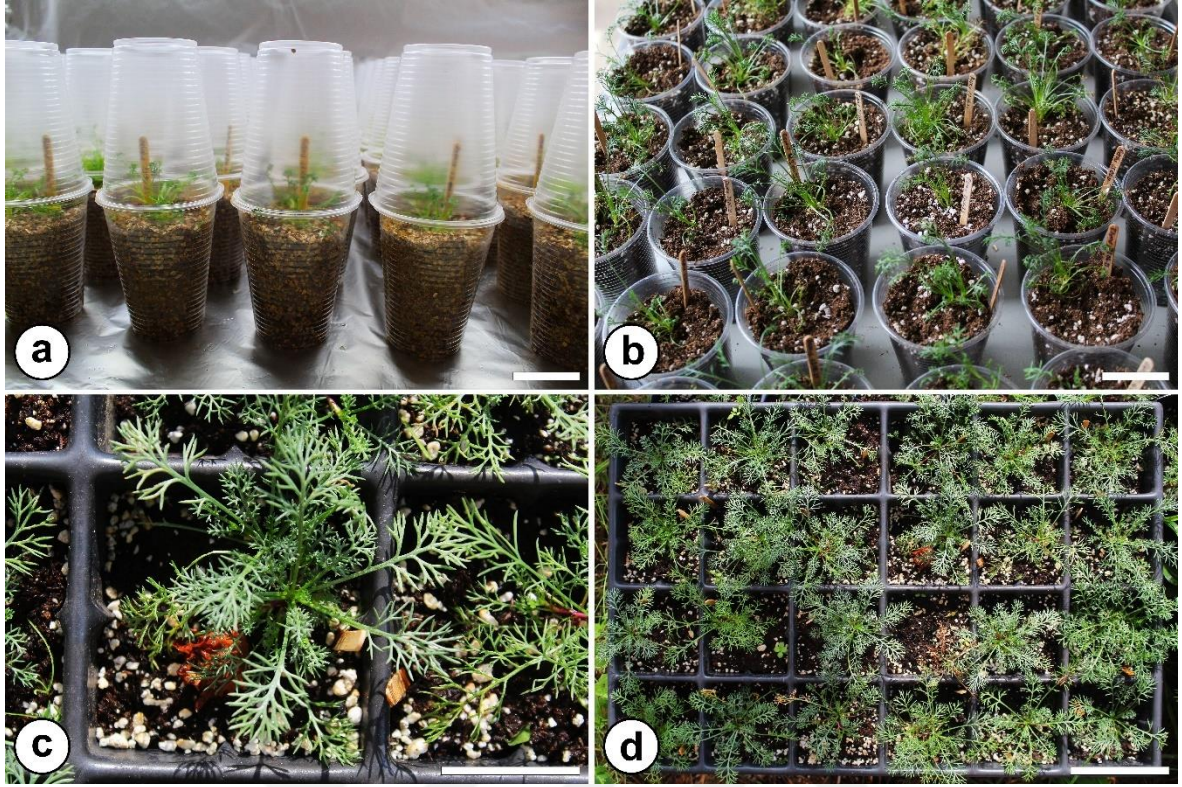
3.2.4. Aklimatizasyon

In vitro köklendirme ortamındaki sağlıklı bitkiler, vermikülit ortamlarına (Hoogland içeren) alınarak *ex vitro* ortama alıştırılmıştır (Şekil 58a, 59a). Daha sonra *ex vitro* ortama aklimatizasyonu başarılı şekilde sağlanan bitkiler, 1:1 (v/v) oranında orman toprağı ve turba karışımına alınarak botanik bahçesine aktarılmıştır (Şekil 58b, 59b-c-d). Botanik bahçesine aktarılan birkilerde %83 yaşama oranı elde edilmiştir.



Şekil 58. a: Vermikülit ortamı b: Turba ortamı. Ölçek a: 20 mm, b: 10 mm

Botanik bahçesinde aklimatizasyonu başarı ile tamamlayan bitkiler yaklaşık bir yıl sonra, Mayıs ayında çiçeklenmeye başlamış (Şekil 60a), çiçeklenen bitkiler Temmuz ayında meyve (aken) oluşturmuştur (Şekil 60b, 61).



Şekil 59. *Tripleurospermum repens*'de aklimatizasyon aşamaları. a: *Ex situ* birinci hafta, b: *Ex vitro* ortam ikinci hafta, c-d: Botanik bahçesi, e: Çiçeklenme evresi. Ölçek a-b-c: 40 mm, d: 80 mm



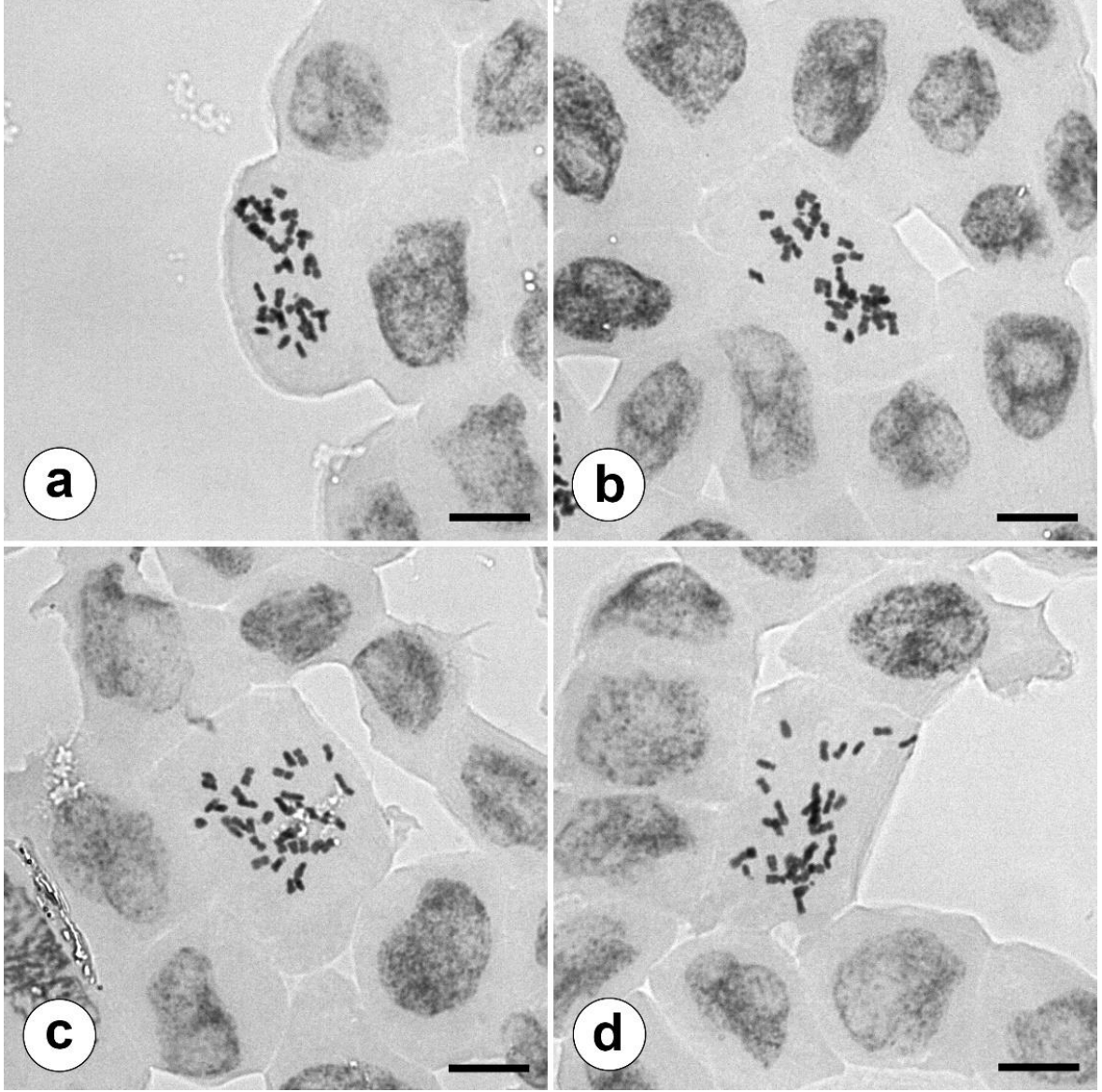
Şekil 60. *Tripleurospermum repens* çiçek ve meyve dönemleri. a: Çiçeklenme evresi, b: Meyve evresi. Ölçek a: 15 mm, b: 15 mm. (Foto.: a: Betül ERGİN; b: Prof. Dr. Hüseyin İNCEER)



Şekil 61. *Tripleurospermum repens*'in olgun akenleri. a-b: Botanik bahçesindeki *ex situ* koleksiyonlarından elde edilen akenler, c-d: Doğal populasyonlardan elde edilen akenler.
Ölçek: 1 mm

3.2.5. Kromozom Sayımı

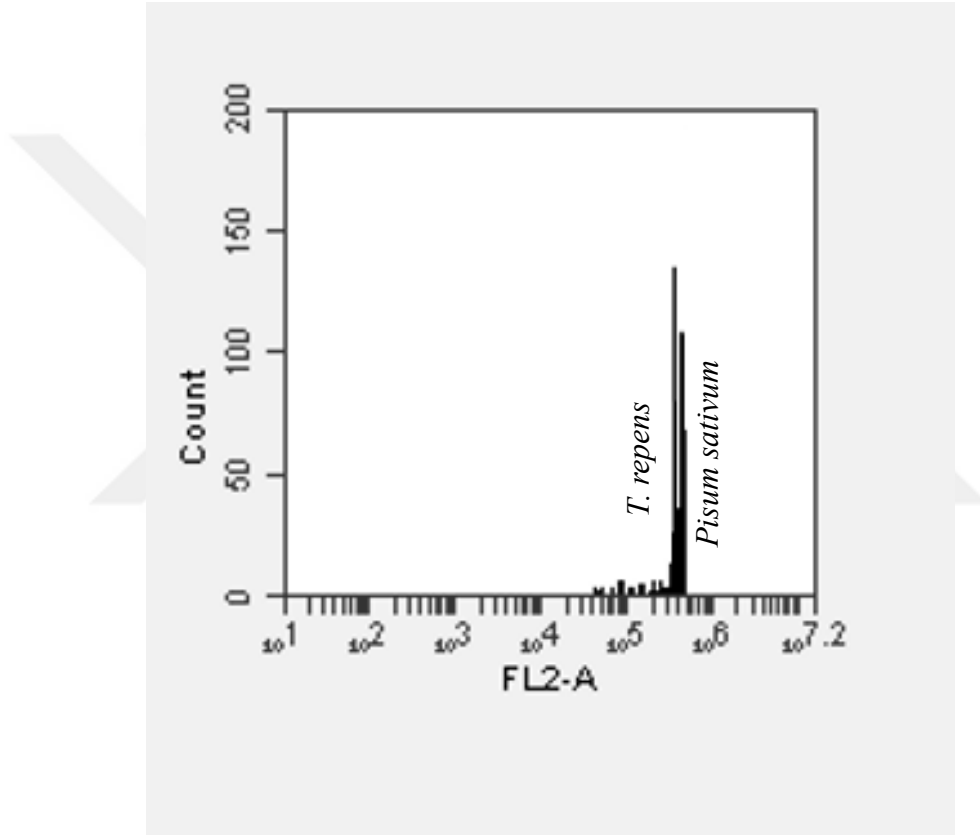
In vitro ortamda köklendirilen bitkiciklerin aktif kök uçlarından kromozom sayımı yapılmıştır. Yapılan sitolojik incelemelerde tüm uygulama gruplarında (Kontrol, IBA ve NAA) kromozom sayısının $2n = 4x = 36$ olduğu tespit edilmiştir (Şekil 62).



Şekil 62. *Tripleurospermum repens*'de *in vitro* somatik kromozomlar ($2n=36$). a: Kontrol, b: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, c: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, d: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ NAA. Ölçek: $10 \text{ }\mu\text{m}$

3.2.6. Akım Sitometrik Analiz

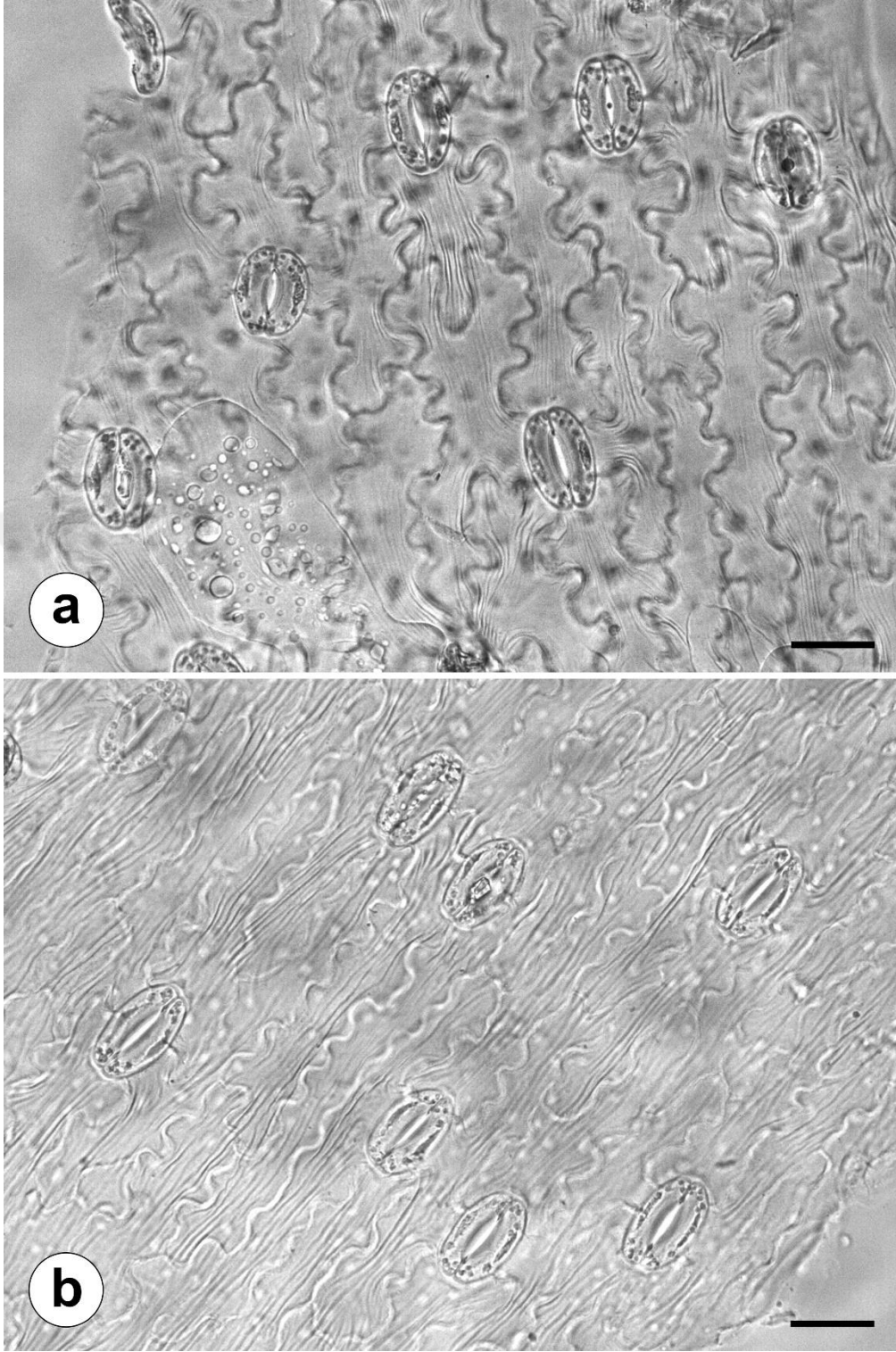
Botanik bahçesinde aklimatizasyonu sağlıklı bir şekilde yapılan bitkilerin akım sitometrik analizi yapılmıştır. Yapılan akım sitometrik analizler sonucunda *T. repens*'in *ex situ* koleksiyonlarında nuklear DNA miktarının $8,66 \pm 0,38$ pg/2C (CV: 1,24), 8469,48 Mbp/2C, monoploid genom büyüklüğünün ise $2,17 \pm 0,07$ pg/1C, 2117,37 Mbp/1C olduğu belirlenmiştir (Şekil 63).



Şekil 63. *Tripleurospermum repens*'in akım sitometri histogramı

3.2.7. Stoma Özellikleri

Yapılan incelemeler sonucunda yaprakların amfistomatik, stomaların ise anomositik tipte olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yaprakların üst yüzeyindeki stoma uzunluğunun $38,02 \pm 1,14$ μ m (Şekil 64a), alt yüzeyindeki stoma uzunluğunun ise $38,07 \pm 1,83$ μ m (Şekil 64b) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 64. *Tripleurospermum repens*'de yapraktan yüzeysel kesit. a: Üst yüzey, b: Alt yüzey.
Ölçek: 30 μ m

4. TARTIŞMA

Biyoçeşitliliğin korunması, ekosistem fonksiyonunun yanı sıra doğal kaynakların gelecek nesiller için korunması anlamına gelir. Geçtiğimiz birkaç on yılda, esas olarak *in situ* ve *ex situ* koruma politikası yöntemleri olmak üzere çeşitli koruma stratejileri önem kazanmıştır. Genetik çeşitliliğin korunması için nadir ve nesli tükenmekte olan bitki türlerinin korunması gereklidir. Nesli tehlike altındaki bitkilerin korunmasında ise oldukça kabul görmüş biyoteknolojik yaklaşımlardan biri olan bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki materyalinin çoğaltımı ve korunması sağlanmaktadır (Kasso ve Balakrishnan, 2013). Bu tez çalışmasında, endemik ve nesli tehlike altındaki *T. heterolepis* ve *T. repens* türlerinin *ex situ* koruma kapsamında, hızlı ve etkili bir *in vitro* çoğaltım protokolü geliştirilmiştir.

Doku kültürü yönteminde, bitkinin büyümesi için ihtiyaç duyduğu tüm besin elementlerini içeren yapay bir besiyeri ortamında, bitkinin doku ve organlarının *in vitro* çoğaltımı yapılmaktadır. Başarılı bir çoğaltım için bu yapay besiyerinin içeriği çok önemlidir. Yapay besiyeri ortamı, bitkinin topraktan aldığı inorganik elementleri (makro elementler, mikro elementler) içerir. Bu elementlerle birlikte başta karbon (C), oksijen (O) ve hidrojen (H) olmak üzere bitki büyüme gelişmesi için büyük önem taşıyan toplam 17 temel besin elementi içerir (George vd., 2008). Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılan en yaygın temel besiyeri MS'dir (George vd., 2008) (Tablo 4). *Tripleurospermum* cinsine ait türlerde yapılan önceki mikroçoğaltım çalışmalarında MS temel besiyeri kullanılmış ve bitkilerin *in vitro* çoğaltımı etkili bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Cuce vd., 2022; Inceer vd., 2022; Ergin, 2023; Cuce ve Inceer, 2024). Ayrıca, MS besiyeri Asteraceae familyasının diğer üyelerinde de yaygın olarak kullanılmıştır (Harbage, 2001; Souza vd., 2007; Corral vd., 2011; Chang vd., 2012; Emek ve Erdağ, 2013; Valletta vd., 2015; Stanilova vd., 2022). Benzer şekilde, bu çalışmada da MS besiyeri ortamı kullanılarak bitkilerin mikroçoğaltımı başarılı bir şekilde yapılmıştır (Şekil 3, 4, 34, 35).

Mikroçoğaltımda bitki materyalinden elde edilen eksplantın yüzey dezenfeksiyonu için kullanılan kimyasal maddelerden en yaygın olanı NaOCl (sodyum hipoklorit)'tir (Benson, 1999). *Tripleurospermum* cinsi ile yapılmış çalışmalarda akenlerin dezenfeksiyonu için *T. fissurale*'de %30 (v/v) (Cuce vd., 2022), *T. insularum*, *T.*

conoclinium, *T. hygrophilum* ve *T. ziganaense*'de %3 (v/v) NaOCl kullanılmıştır (Inceer vd., 2022; Ergin, 2023; Cuce ve Inceer 2024). Asteraceae familyasının diğer üyelerine bakıldığında, *Artemisia annua* L. ve *Achillea filipendulina* cv. 'Parker'in eksplant dezenfeksiyonu için %3 (v/v) NaOCl konsantrasyonu kullanılmıştır (Evenor ve Reuveni, 2004; Blando vd., 2021). Bu çalışmada da benzer şekilde, akenlerin yüzeyi %3 (v/v) NaOCl ile dezenfekte edilmiş, kültür başlangıç aşamasında ve daha sonra yapılan altkültür aşamalarında herhangi bir kontaminasyonla karşılaşmamıştır.

Mikroçoğaltımın dezenfeksiyondan sonraki en önemli aşaması sürgün çoğaltımıdır. *In vitro* sürgün çoğaltımı çalışmalarında oksin olmadan sitokininler kullanılsada, etkili bir sürgün çoğaltımı için oksin ve sitokinin birlikte kullanılması önerilmektedir (Pollard ve Walker, 1990). *Tripleurospermum fissurale*, *T. insularum*, *T. conoclinium*, *T. hygrophilum* ve *T. ziganaense* türleri üzerinde yapılan sürgün çoğaltımı çalışmalarında sitokinin ile birlikte düşük konsantrasyonlu oksin kombinasyonları kullanılmış olup, etkili bir sürgün çoğaltımı yapılmıştır (Cuce vd., 2022; Inceer vd., 2022; Ergin, 2023; Cuce ve Inceer 2024). Asteraceae familyasının diğer üyelerinde yapılan çalışmalarda sitokininler tek başına kullanılsada, oksin ile birlikte kombine edilerek kullanımı daha yaygındır (Bais vd., 2002; Koroch vd., 2002; Husain ve Anis, 2006; Pace vd., 2009; Grigoriadou vd., 2011; Al Khateeb vd., 2012; Archana vd., 2013; Khandakar vd., 2014; Kurian ve Thomas, 2015; Özel, 2016; Yordanova vd., 2017; Enyew ve Feyissa, 2019; Nowakowska vd., 2020; Panwar ve Joshi, 2020; Nithya ve Kamalam, 2021; Okello vd., 2021; Riahi vd., 2022). Bu çalışmada da benzer şekilde sürgün çoğaltım aşamasında oksin ve sitokinin kombinasyonu kullanılmış ve etkili bir sürgün çoğaltımı yapılmıştır.

Tripleurospermum heterolepis'in sürgün çoğaltım çalışmalarından elde edilen verilere göre; eksplant başına ortalama en fazla sürgün sayısı $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamından elde edilmiştir (Tablo 10 ve Şekil 7a, 14). Benzer şekilde Ergin (2023), *T. conoclinium* ile yaptığı çalışmada en fazla sürgün sayısını $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamında tespit etmiştir. Bu veriler, *T. heterolepis*'in en fazla sürgün sayısının literatür verileri ile uyumlu olduğunu göstermektedir. *Tripleurospermum heterolepis*'in en az sürgün sayısı ise $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (Tablo 12 ve Şekil 12a, 14) ve kontrol ortamından (Tablo 10 ve Şekil 5c, 14) elde edilmiştir. Ergin (2023), *T. conoclinium*'un en az sürgün sayısını, aynı sitokinin konsantrasyonunun farklı oksin kombinasyonundan ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA) elde etmiştir. *Tripleurospermum repens*'de ortalama en fazla sürgün sayısı $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA ortamından

elde edilmiştir (Tablo 14 ve Şekil 37a, 45). Cuce ve Inceer (2024), *T. ziganaense* ile yaptıkları çalışmada en fazla sürgün sayısını aynı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonunun farklı konsantrasyonunda ($1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2iP} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$) tespit etmişlerdir. *Tripleurospermum repens*'de en az sürgün sayısı ise $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2iP} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$ ortamından elde edilmiştir (Tablo 15 ve Şekil 41b, 45). Benzer şekilde Cuce ve Inceer (2024), *T. ziganaense*'nin en az sürgün sayısını $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2iP} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$ ortamında tespit etmişlerdir. Bu veriler, *Tripleurospermum repens*'in en az sürgün sayısının literatür verileri ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Tripleurospermum heterolepis'de eksplant başına ortalama en uzun sürgün boyu $0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$ ortamından elde edilmiştir (Tablo 10 ve Şekil 5b, 15). Ergin (2023), *T. hygrophilum* ile yapmış olduğu çalışmada, en uzun sürgün boyunu, aynı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunun farklı konsantrasyonundan ($0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$) elde etmiştir. *Tripleurospermum heterolepis*'in en kısa sürgün boyu $1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$ ortamından elde edilmiştir (Tablo 12 ve Şekil 13a, 15). Benzer şekilde Ergin (2023), *T. hygrophilum*'un en kısa sürgün boyunu $1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$ ortamında tespit etmiştir. Bu sonuçlara göre, *T. heterolepis*'in en kısa sürgün boyu verileri literatür ile örtüşmektedir. *Tripleurospermum repens*'de ise ortalama en uzun sürgün boyu $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ KIN} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$ ortamından elde edilmiştir (Tablo 15 ve Şekil 39a, 46). Buna benzer olarak, Ergin (2023), *T. conoclinium* ile yapmış olduğu çalışmada, en uzun sürgün boyunu $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ KIN} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$ ortamında tespit etmiştir. *Tripleurospermum repens*'de en kısa sürgün boyu $1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$ ortamından elde edilmiştir (Tablo 16 ve Şekil 44a, 46). Aynı şekilde Ergin (2023), *T. hygrophilum*'un en kısa sürgün boyunu $1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$ ortamından elde etmiştir. *Tripleurospermum repens*'in en uzun ve en kısa sürgün boyu verileri literatür ile örtüşmektedir.

Tripleurospermum heterolepis'de eksplant başına ortalama en fazla nod sayısı $0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2iP} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$ ortamından (Tablo 10 ve Şekil 6a, 17), en az nod sayısı $1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$ ortamından (Tablo 12 ve Şekil 13a, 17) elde edilmiştir. *Tripleurospermum repens*'de ise ortalama en fazla nod sayısı $0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2iP} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$ ortamından elde edilmiştir (Tablo 14 ve Şekil 37a, 48). Benzer şekilde Cuce ve Inceer (2024), *T. ziganaense* ile yaptıkları çalışmada, en fazla nod sayısını $0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2iP} + 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$ ortamında tespit etmişlerdir. Elde edilen bu verilere göre *T. heterolepis* ve *T. repens*'in en fazla nod sayısı, aynı MS ortamından elde edilmiştir ve literatür verileriyle

örtüşmektedir. *Tripleurospermum repens*'de en az nod sayısı ise $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamından elde edilmiştir (Tablo 16 ve Şekil 44a, 48).

Mikroçoğaltım çalışmalarında en sık görülen fizyolojik anormalliklerden biri hiperhidrisite oluşumudur. Sürgün çoğaltım aşamasında kullanılan besiyerinin içeriğinde yüksek oranda sitokinin kullanımı, bitkilerde hiperhidrisiteye neden olmaktadır (Blando vd., 2021). Benzer şekilde, Asteraceae familyasında yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında dahil birçok çalışmada *in vitro* çoğaltım aşamasında hiperhidrisite gözlemlendiği bildirilmiştir (Cuenca vd., 1999; Pérez-Tornero vd., 2001; Makunga vd., 2006; Grigoriadou vd., 2011; Badr-Elden vd., 2012; Hristova vd., 2013; Machado vd., 2014; Nikam vd., 2019; Gantait ve Mahanta, 2022). *Tripleurospermum* cinsine ait türlerden *T. fissurale*, *T. insularum* ve *T. ziganaense*'nin sürgün çoğaltımında hiperhidrisite görüldüğü rapor edilmemiştir (Cuce vd., 2022; Inceer vd., 2022 ve Cuce ve Inceer, 2024). *Tripleurospermum conoclinium* ve *T. hygrophilum* türlerinde ise $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin ile birlikte $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin kombinasyonlarında hiperhidrisite görüldüğü rapor edilmiştir (Ergin, 2023). Benzer şekilde bu tez çalışmasında da sürgün çoğaltımında $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin ile birlikte $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oksin içeren ortamlarda hiperhidrisite gözlenmiştir (Şekil 11a-b, 12, 13, 42a-b, 43, 44). Aynı cinsin farklı türlerinde hiperhidrisite oluşumu değişkenlik göstermektedir. Mezzetti vd. (1997) yaptıkları çalışmada, besiyeri ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicilerinin yanında bitkinin genotipinin de büyüme yanıtlarını etkileyen ana faktörlerden olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla, bazı *Tripleurospermum* türlerinde *in vitro* çoğaltım aşamasında hiperhidrisite görülmesinin, sitokinin kullanımı ve genotip farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Mikroçoğaltım çalışmalarında yaygın olarak görülen bir diğer fizyolojik anormallik ise kallus oluşumudur (Reed vd., 2013). *Tripleurospermum* ile yapılmış olan çalışmalara bakıldığında, Ergin (2023)'in çalışmasında tüm ortamlarda kallus oluşumu görülürken, en fazla $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ sitokinin içeren besiyerinde gözlemlendiği rapor edilmiştir. Cuce vd. (2022)'nin *T. fissurale* ile yaptığı çalışmada, kontrol ortamı hariç tüm *in vitro* kültür ortamlarında kallus oluştuğunu bildirilirken, Inceer vd. (2022), *T. insularum* üzerine yaptıkları çalışmada, kontrol ve KIN+NAA ortamı hariç, sürgün çoğaltım ortamlarının tamamında kallus oluşumunu rapor etmişlerdir. Asteraceae familyasının diğer üyelerinde yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında da kallus oluşumu rapor edilmiştir (Chakrabarty ve Datta, 2008; Stanilova vd., 2022). Benzer şekilde, bu tez çalışmasında kallus oluşumu tüm

uygulama gruplarında görülmekle birlikte, artan sitokinin konsantrasyonu ile paralel olarak, kallus oluşumunun da arttığı gözlenmiştir (Şekil 11a-b, 12, 13, 42a-b, 43, 44).

Tripleurospermum heterolepis'in köklendirme çalışmalarından elde edilen verilere göre; eksplant başına ortalama en fazla kök sayısı $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamından (Tablo 13 ve Şekil 23b, 24), en az kök sayısı $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamından (Tablo 13 ve Şekil 19b, 24) elde edilmiştir. Benzer şekilde Ergin (2023), *T. conoclinium* ile yaptığı çalışmada, ortalama en fazla ve en az kök sayısını sırasıyla $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ve $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamından elde etmiştir. Bu sonuca bakıldığında, *T. heterolepis*'in en fazla ve en az kök sayısının literatür verileri ile uyumlu olduğu görülmektedir. *Tripleurospermum repens*'de ise en fazla kök sayısı $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA ortamından (Tablo 17 ve Şekil 53b, 55) elde edilmiştir. Cuce ve Inceer (2024), *T. ziganaense* ile yaptıkları çalışmada en fazla kök sayısını, benzer şekilde $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA ortamında tespit etmişlerdir. *Tripleurospermum repens*'de en az kök sayısı $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamından elde edilmiştir (Tablo 17 ve Şekil 50b, 55). Bu veriler, *T. repens*'in en fazla kök sayısının literatür verileri ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Tripleurospermum heterolepis'de eksplant başına ortalama en uzun kök boyu $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA ortamında (Tablo 13 ve Şekil 22b, 25), en kısa kök boyu $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamından (Tablo 13 ve Şekil 19b, 25) elde edilmiştir. Ergin (2023), *T. conoclinium* ile yaptığı çalışmada ortalama en uzun ve en kısa kök boyunu sırasıyla $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA ve $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamlarında tespit etmiştir. Bu sonuçlara göre, *T. heterolepis*'in en uzun ve en kısa kök boyu literatür verileri ile örtüşmektedir. *Tripleurospermum repens*'in köklendirme aşamasında ise eksplant başına ortalama en uzun kök boyu $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamından (Tablo 17 ve Şekil 52b, 56) elde edilmiştir. Buna benzer olarak, *T. fissurale* ve *T. insularum* ile yapılan çalışmada, en uzun kök boyunun $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamından elde edildiği rapor edilmiştir (Cuce vd., 2022; Inceer vd., 2022). *Tripleurospermum repens*'in en kısa kök boyu $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ IBA ortamından elde edilmiştir (Tablo 17 ve Şekil 49b, 56). Bu verilere göre, *T. repens*'in en uzun kök boyu literatür verileri ile uygunluk göstermektedir.

Tripleurospermum heterolepis'de eksplant başına ortalama en fazla sekonder kök sayısı $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA ortamından (Tablo 13 ve Şekil 22b, 26), en az sekonder kök sayısı ise $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamından (Tablo 13 ve Şekil 21b, 26) elde edilmiştir. Ergin (2023), *T. conoclinium* ile yaptığı çalışmada, ortalama en az sekonder kök sayısını benzer şekilde $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ortamında tespit etmiştir. *Tripleurospermum repens*'de ise en fazla sekonder kök sayısı $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA ortamından (Tablo 17 ve Şekil 53b, 57) elde edilmiştir.

Benzer şekilde *T. ziganaense* ile yapılan çalışmada, en fazla sekonder kök sayısının 1,0 mg L⁻¹ IBA ortamından elde edildiği bildirilmiştir (Cuce ve Inceer, 2024). *Tripleurospermum repens*'de en az sekonder kök sayısı ise 0,25 mg L⁻¹ NAA ortamından elde edilmiştir (Tablo 17 ve Şekil 50b, 57).

In vitro çoğaltım ile elde edilen bitkilerin aklimatizasyon çalışmaları sonucunda *T. heterolepis* ve *T. repens* türlerinin botanik bahçesindeki *ex situ* koleksiyonlarında sırasıyla %82 ve %83 yaşama oranı elde edilmiştir. *Tripleurospermum* türleri ile yapılan daha önceki çalışmalarda botanik bahçesindeki yaşam oranları; *T. insularum*'da %76, *T. fissurale*'de %81, *T. conoclinium*'da %95, *T. hygrophilum*'da %98 ve *T. ziganaense*'de %90 olduğu rapor edilmiştir (Inceer vd., 2022; Cuce vd., 2022; Ergin, 2023; Cuce ve Inceer, 2024) (Tablo 18).

Tripleurospermum heterolepis ve *T. repens*'in botanik bahçesindeki *ex situ* koleksiyonları kültüre edildikten yaklaşık 1 yıl sonra fenolojik (çiçeklenme ve meyvelenme) evrelerini tamamladıkları tespit edilmiştir (Şekil 29, 60). Her iki türün morfolojik özellikleri (yaprak, kapitulum, aken) bakımından doğal ortamdaki bitkilerle benzer olduğu görülmüştür (Enayet Hossain, 1975; Inceer vd., 2012b; Inceer, 2015).

Tablo 18. *Tripleurospermum* ve diğer Asteraceae üyelerinde yapılan bazı *in vitro* çoğaltım çalışmalarında aklimatizasyon başarı oranları

Takson	Başarı oranı	Kaynak
<i>Artemisia annua</i> L.	%85	Gopinath vd. (2014)
<i>Achillea filipendulina</i> cv. 'Parker' Lam.	%90	Evenor ve Reuveni (2004)
<i>Achillea asplenifolia</i> Vent.	%100	Wawrosch vd. (1994)
<i>Centaurea paui</i> Loscos ex Wilk	%70	Cuenca vd. (1999)
<i>Centaurea cineraria</i> subsp. <i>circae</i> (Sommier) Cela Renz & Viegi	%90	Valletta vd. (2015)
<i>Elephantopus scaber</i> L.	%77	Rout ve Sahoo (2013)
<i>Pentanema indicum</i> (L.) Ling.	%96	Sivanesan ve Jeong (2007)
<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	%63	Patel ve Shah (2009)
<i>Saussurea obvallata</i> (DC.) Edgew.	%63	Joshi ve Dhar (2003)
<i>Tripleurospermum fissurale</i>	%81	Cuce vd. (2022)
<i>Tripleurospermum insularum</i>	%76	Inceer vd. (2022)
<i>Tripleurospermum conoclinium</i>	%95	Ergin (2023)
<i>Tripleurospermum hygrophilum</i>	%98	Ergin (2023)
<i>Tripleurospermum ziganaense</i>	%90	Cuce ve Inceer (2024)

Mikroçoğaltımı yapılan *T. insularum* ($2n = 2x = 18$), *T. fissurale* ($2n = 2x = 18$), *T. conoclinium* ($2n = 2x = 18$), *T. hygrophilum* ($2n = 2x = 18$) ve *T. ziganaense* ($2n = 2x = 18$), türlerinin genetik stabilite testleri yapılmış ve kromozom sayısının değişmediği rapor edilmiştir (Cuce vd., 2022; Inceer vd., 2022; Ergin, 2023; Cuce ve Inceer, 2024). Inceer ve Hayirlioglu-Ayaz (2010), *T. heterolepis* ve *T. repens*'in doğal populasyonlarından elde edilen örnekler üzerinde yapmış oldukları sitolojik çalışmada, her iki türün kromozom sayısının $2n = 4x = 36$ olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, bu çalışmada mikroçoğaltımı yapılan *T. heterolepis* ve *T. repens*'in kromozom sayısı $2n = 4x = 36$ olarak belirlenmiş ve köklendirme gruplarının tamamında bu sayının değişmediği görülmüştür (Şekil 31, 62). Elde ettiğimiz bu sonuçlar, mikroçoğaltımı yapılan bitkilerde kromozom sayısının değişmediğini göstermiştir.

Birçok çalışmada, *in vitro* çoğaltımı yapılan türlerin genetik stabilitesini test etmek amacıyla kullanılan araçlardan bir diğeri de akım sitometridir (Awoleye vd., 1994; Brito vd., 2010; Faizal vd., 2011; Rewers vd., 2012; Samarina vd., 2019; Parzymies vd., 2020; Ulvrova vd., 2021). *Tripleurospermum* türlerinden *T. insularum*, *T. fissurale*, *T. conoclinum*, *T. hygrophilum* ve *T. ziganense*'nin mikroçoğaltımında genetik stabilitenin incelenmesi için akım sitometrik analizler yapılmıştır. Inceer vd. (2018), *T. heterolepis*'in doğal populasyonlarında yapmış olduğu analizler sonucunda nuklear DNA miktarını 8,21 pg/2C, monoploid genom büyüklüğünü 2,05 pg/1C olarak, *T. repens*'in nuklear DNA miktarını 8,56 pg/2C, monoploid genom büyüklüğünü 2,14 pg/1C olarak belirlemiştir. Bu çalışmada ise *T. heterolepis*'in nuklear DNA miktarı 8,38 pg/2C, monoploid genom büyüklüğü 2,10 pg/1C olarak, *T. repens*'in nuklear DNA miktarı ise 8,66 pg/2C, monoploid genom büyüklüğü 2,17 pg/1C olarak tespit edilmiştir (Şekil 32, 63). Elde edilen bu sonuçlar, mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin nuklear DNA miktarında önemli bir değişikliğin olmadığını göstermiştir.

Inceer ve Özcan (2011), *T. heterolepis* ve *T. repens*'in doğal populasyonlarından elde ettikleri bitki materyalleri ile yaptıkları histolojik incelemeler sonucunda, yaprakların amfistomatik tipte, stomaların ise anomositik tipte olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada mikroçoğaltımı yapılan *T. heterolepis* ve *T. repens*'in yapraklarının amfistomatik tipte, stomaları anomositik tipte olduğu gözlenmiştir (Şekil 33, 64). Inceer ve Özcan (2011), *T. heterolepis*'in yaprak üst yüzeyinde bulunan stomaların uzunluğunu ortalama $34.5 \pm 1.1 \mu\text{m}$, *T. repens*'in yaprak üst yüzeyinde bulunan stomaların uzunluğunu ise ortalama $38.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$ olduğunu rapor etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise *T. heterolepis*'in yaprak üst yüzeyinde bulunan stomaların ortalama uzunluğu $34,35 \pm 1,66 \mu\text{m}$, *T. repens*'in yaprak üst yüzeyinde bulunan stomaların ortalama uzunluğu $38,02 \pm 1,14 \mu\text{m}$ olarak kaydedilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin stoma özelliklerinde önemli bir değişikliğin olmadığını göstermiştir.

Mikroçoğaltımı yapılan bitkilerde histolojik bazı anormallikler görülebilmektedir. Bu anormalliklerden biri de stoma boyutlarında görülen düzensizliklerdir (Gantait ve Mahanta, 2022). Bu tez çalışmasından elde edilen histolojik veriler, *T. heterolepis* ve *T. repens*'in, stoma tipi ve stoma uzunluğunun literatür verileri ile örtüştüğünü ve stomalarda herhangi bir yapısal değişikliğin olmadığını göstermektedir.

5. SONUÇLAR

1. Bu tez çalışmasında nesli tehlike altında olan endemik *T. heterolepis* ve *T. repens* türleri için ilk kez hızlı ve etkili bir mikroçoğaltım protokolü başarılı şekilde geliştirilmiştir. Bununla birlikte, bu türlerin genetik açıdan stabil *ex situ* koleksiyonları oluşturulmuştur.
2. *Tripleurospermum heterolepis*'de eksplant başına ortalama en yüksek sürgün sayısının elde edildiği $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 6-BA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besiyeri, sürgün çoğaltımı için en uygun ortam olarak belirlenmiştir.
3. *Tripleurospermum heterolepis*'in köklendirme aşamasında tüm uygulama gruplarında köklenme gözlenmiştir ve eksplant başına ortalama en yüksek kök sayısı $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ile desteklenen MS ortamında tespit edilmiştir.
4. *Tripleurospermum repens*'de sürgün çoğaltımında en uygun besiyeri ortamının, eksplant başına ortalama en yüksek sürgün sayısının elde edildiği $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA içeren MS besiyeri olduğu bulunmuştur.
5. *Tripleurospermum repens*'de köklendirmede tüm uygulama gruplarında köklenme sağlanırken, eksplant başına ortalama en yüksek kök sayısının elde edildiği ortam, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA ile desteklenen MS besiyeri olarak belirlenmiştir.
6. Mikroçoğaltım ile elde edilen *T. heterolepis* ve *T. repens*'in kromozom sayıları $2n = 4x = 36$ olarak tespit edilmiştir ve kromozom sayılarında farklılık olmadığı gözlenmiştir.
7. *Tripleurospermum heterolepis* ve *T. repens*'in akım sitometri analizleri yapılmış ve nuklear DNA miktarlarında önemli bir farklılık görülmemiştir. Mikroçoğaltımı yapılan *T. heterolepis*'in nuklear DNA miktarı $8,38 \text{ pg/2C}$ olarak bulunmuştur. *Tripleurospermum repens*'in nuklear DNA miktarı $8,66 \text{ pg/2C}$ olarak bulunmuştur.
8. Aklimatizasyonu başarıyla yapılmış olan *T. heterolepis*'in hayatta kalma oranı %82, *T. repens*'in ise %83 olarak bulunmuştur.
9. *Tripleurospermum heterolepis* ve *T. repens*'in yapraklarının amfistomatik ve stomaların anomositik tipte olduğu belirlenirkenmiştir. *Tripleurospermum heterolepis*'de yaprağın üst yüzeyindeki stomaların $34,35 \pm 1,66 \text{ }\mu\text{m}$, alt yüzeyindeki stomaların $34,06 \pm 1,50 \text{ }\mu\text{m}$ uzunluğunda, *T. repens*'de ise yaprağın üst yüzeyindeki stomaların $38,02 \pm 1,14 \text{ }\mu\text{m}$, alt yüzeyindeki stomaların $38,07 \pm 1,83 \text{ }\mu\text{m}$

uzunluğunda olduğu bulunmuştur. Stoma uzunluklarının doğal populasyonlarda yapılan çalışmaların sonuçları ile benzerlik gösterdiği mikroçoğaltımı yapılan türlerin stoma büyüklüğünde bir fark olmadığı ortaya konulmuştur.

10. Bu tez çalışmasından elde edilen veriler, *T. heterolepis* ve *T. repens* türleri ile nesli tehlike altında olan diğer *Tripleurospermum* türlerinin koruma biyolojisine önemli katkılar sağlamıştır.



6. ÖNERİLER

Bu çalışmada nesli tehlike altında olan endemik *T. heterolepis* ve *T. repens*'in mikroçoğaltımı ile *ex situ* korunması gerçekleştirilmiştir. İncelenen her iki türünde başarılı bir şekilde genetik açıdan stabil *ex situ* koleksiyonları oluşturulmuştur. Elde edilen veriler, başta *Tripleurospermum* üyeleri olmak üzere Asteraceae familyasının diğer üyeleri ile yapılacak *in vitro* çoğaltım çalışmalarına kaynak teşkil edecektir.

Tripleurospermum heterolepis ve *T. repens*'in genetik açıdan stabil *ex situ* koleksiyonları, bu türlerin doğal populasyonlarının restorasyon çalışmalarında kullanılabilir. Dolayısıyla, elde edilen veriler restorasyon ekolojisi çalışmaları içinde temel teşkil edebilir.

Tripleurospermum heterolepis ve *T. repens* türleri için oluşturulan mikroçoğaltım protokolleri kullanılarak çoğaltılan bitkilerle fizyoloji, üreme biyolojisi ve ekofizyoloji çalışmaları yapılabilir.

Mikroçoğaltımı yapılan bu bitkiler türün kentsel alanlardaki biyoçeşitliliğini artırmak için kullanılabilir.

Mikroçoğaltımı yapılan *T. heterolepis* ve *T. repens* türlerinin uzun vadeli korunması için kriyoprezervasyon çalışmaları yapılabilir.

Etnobotanik çalışmalarda tedavi edici özellikleri bilinen *Tripleurospermum* cinsi ile yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu birçok farklı bileşik tanımlanmıştır. Bu tez çalışmasından elde edilen *in vitro* protokoller, bu cinsin içerdiği sekonder metabolitlerin *in vitro* ortamlarda üretilibilmeleri için de bir kaynak teşkil edebilir.

7. KAYNAKLAR

- Al Khateeb, W., Hussein, E., Qouta, L., Alu'datt, M., Al-Shara, B., & 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.
- Archana, S., Shikha, B., & 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.
- Awoleye, F., Van Duren, M., Doležel, J., & Novak, F. J. (1994). Nuclear DNA content and *in vitro* induced somatic polyploidization cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding. *Euphytica*, 76(3), 195-202.
- Badr-Elden, A. M., Nower, A. A., Ibrahim, I. A., Ebrahim, M. K., & 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.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63, 147-173.
- Bais, H. P., Green, J. B., Walker, T. S., Okemo, P. O., & 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: İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi.
- Benson, E. (Ed.). (1999). *Plant Conservation Biotechnology*. CRC Press.
- Bhandari, A., Singh, H., Srivastava, A., Kumar, P., Panwar, G. S., & Mao, A. A. (2021). *In vitro* propagation and cytological analysis of *Sophora mollis* Royle: an endangered medicinal shrub. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-8.
- Blando, F., Rizzello, F., Durante, M., De Paolis, A., Caretto, S., & Mita, G. (2021). *In vitro* adventitious regeneration of *Artemisia annua* L. influencing artemisinin metabolism. *Horticulturae*, 7(11), 438.
- Blanke, M. M., & Belcher, A. R. (1989). Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19, 85-89.
- Brito, G., Lopes, T., Loureiro, J., Rodriguez, E., & Santos, C. (2010). Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers. *Trees*, 24(4), 723-732.

- Capellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C., & Debergh, P. (1990). Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(1), 141-145.
- Catalano, C., Carra, A., Carimi, F., Motisi, A., Abbate, L., Sarno, M., & Carrubba, A. (2022). Long-Term Field Evaluation of Conventional vs. Micropropagated Plants of *Chrysanthemum cinerariifolium*. *Agronomy*, 12(11), 2756.
- Chakrabarty, D., & Datta, S. K. (2008). Micropropagation of gerbera: lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities during acclimatization process. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 325-331.
- Chang, H., Gupta, S. K., Tsay, H., & Hung-Chi, C. (2012). *In vitro* propagation of an endangered medicinal plant *Taraxacum formosanum* Kitamura. *Abstracts. Phytopharm.*
- Corral, P., Mallón, R., Rodríguez-Oubiña, J., & 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.
- Cruz-Cruz, C. A., González-Arnao, M. T., & Engelmann, F. (2013). Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*, 2(2), 73-95.
- Cuce, M., & Inceer, H. (2024). Micropropagation and reintroduction of the endemic *Tripleurospermum ziganaense* (Asteraceae) to its natural habitat. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1-13.
- Cuce, M., Inceer, H., Imamoglu, K. V., Ergin, T., & 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.
- Cuenca, S., Amo-Marco, J. B., & 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.
- Davis, P. H., & Tan, K. (Ed.), (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press, Vol.10.
- Doležel, J., & 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., & Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Research Gate*, 51(2), 127-8.
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007a). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2(9), 2233-44.
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007b). Flow Cytometry with Plant Cells, Federal Republic of Germany.

- Ejaz, B., Mujib, A., Mamgain, J., Malik, M. Q., Syeed, R., Gulzar, B., & Bansal, Y. (2021). Comprehensive *in vitro* regeneration study with SCoT marker assisted clonal stability assessment and flow cytometric genome size analysis of *Carthamus tinctorius* L.: an important medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-16.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., & Adıgüzel, N. (2000). *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (The Red Data Book of Turkey's Plants)*. Ankara: Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van Y.Y. Üniversitesi Yayınları.
- Emek, Y., & 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*. Edinburgh: Edinburgh University Press, 5, 295–311.
- Enyew, M., & Feyissa, T. (2019). *In vitro* shoot regeneration from leaf explants of *Echinops kebericho*: an endangered endemic medicinal plant. *Plant Biosystems*, 153(2), 199-204.
- Ergin, E. (2023). *Tehlike Altındaki Endemik Tripleurospermum conoclinium ve T. hygrophilum (Asteraceae) Türlerinin Mikroçoğaltımı ve Korunması*. K. T. Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Trabzon.
- Escobedo-Gracia-Medrano, R. M., Burgos-Tan, M. J., Ku-Cauich, J. R. & Quiroz-Moreno, A. (2018). Using flow cytometry analysis in plant tissue culture derived plants. In *Plant Cell Culture Protocols*, Humana Press, New York, 317-332.
- Evenor, D., & 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., & 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., & Robinson, H. E. (2009). Classification of compositae, Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 171-189.
- Gantait, S., & 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., & De Klerk, G. J. (2008). Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. The Netherland. *The Back Ground Springer*.

- Godo, T., Kobayashi, K., Tagami, T., Matsui, K., & Kida, T. (1998). *In vitro* propagation utilizing suspension cultures of meristematic nodular cell clumps and chromosome stability of *Lilium* × *formolongi* hort. *Scientia Horticulturae*, 72(3-4), 193-202.
- Gopinath, B., Gandhi, K., & 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.
- Grigoriadou, K., Krigas, N., & 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.
- Hamilton, A. (2013). Plant conservation: an ecosystem approach. *Routledge*.
- 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., & Ford-Lloyd, B. V. (2000). *The ex situ conservation of plant genetic resources*. The University of Birmingham, UK.
- Hawkes, J. G., Maxted, N., & Ford-Lloyd, B. V. (2012). The *ex situ* conservation of plant genetic resources. *Springer Science & Business Media*.
- Heywood, V. H., & Iriondo, J. M. (2003). Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation*, 113(3), 321-335.
- Hristova, L., Damyanova, E., Doichinova, Z., & Kapchina-Toteva, V. (2013). Effect of 6-benzylaminopurine on micropropagation of *Artemisia chamaemelifolia* Vill.(Asteraceae). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19(2), 57-60.
- Hurka, H., Neuffer, B., & Friesen, N. (2003). Plant genetic resources in botanical gardens. *In XXI International Eucarpia Symposium on Classical versus Molecular Breeding of Ornamentals-Part II*, 651, 35-44.
- Husain, M. K., & 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.
- Inceer, H. (2015). Redescription of *Tripleurospermum heterolepis* (Asteraceae), endemic to Turkey. *Phytotaxa*, 202(3).
- Inceer, H., & Beyazoglu, O. (2004). Karyological studies in *Tripleurospermum* (Asteraceae, Anthemideae) from north-east Anatolia. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 146(4), 427-438.
- Inceer, H., & 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.

- Inceer, H., & 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.
- Inceer, H., Bal, M., Ceter, T., & Pinar, N. M. (2012b). Fruit structure of 12 Turkish endemic *Tripleurospermum* Sch. Bip. (Asteraceae) taxa and its taxonomic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 298(4), 845-855.
- Inceer, H., Cuce, M., İmamoglu, K. V., Ergin, T., & 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.
- Inceer, H., Garnatje, T., Hayirlioğlu-Ayaz, S., Pascual-Díaz, J., P., Vallès, J., & Garcia, S. (2018). A genome size and phylogenetic survey of Mediterranean *Tripleurospermum* and *Matricaria* (Anthemideae, Asteraceae). *Plos One*, 13, 10.
- Inceer, H., Guner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., & Babac, M. T. (Ed.), (2012a). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul, 212-214.
- Inceer, H., Kalmuk, N. A., İmamoglu, K. V., Duman, O., Hayirlioglu-Ayaz, S., & Arslan, G. (2016). Micromorphological, anatomical and cytogenetical studies in endemic *Crepis macropus* Boiss. & Heldr. (Asteraceae) from Turkey. *Acta Botanica Croatica*, 75(2), 173-178.
- IUCN, S. P. C. (2024). *IUCN Red List categories and criteria: version 16*. Prepared by the Standards and Petitions Committee of the IUCN Species Survival Commission.
- Joshi, M., & 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.
- Joshi, P., Joshi, N., & Purohit, S. D. (2006). Stomatal characteristics during micropropagation of *Wrightia tomentosa*. *Biologia plantarum*, 50, 275-278.
- Kasso, M., & Balakrishnan, M. (2013). *Ex situ* conservation of biodiversity with particular emphasis to Ethiopia. *International Scholarly Research Notices*, 2013(1), 985037.
- 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., & 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.
- Koroch, A., Juliani, H. R., Kapteyn, J., & 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., & 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.
- Laliberté, B. (1997). Botanic garden seed banks/genebanks worldwide, their facilities, collections and network. *Botanic Gardens Conservation News*, 2(9), 18-23.
- Leshem, B., Werker, E., & Shalev, D. P. (1988). The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany*, 62(3), 271-276.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležal, J., & Santos, C. (2007). Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Annals of Botany*, 100, 875-888.
- Machado, M. P., Silva, A. L. L. D., Biasi, L. A., Deschamps, C., Bessalho Filho, J. C., & 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., & 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.
- Mandel, J. R., Dikow, R. B., Siniscalchi, C. M., Thapa, R., Watson, L. E., & 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.
- Mezzetti, B., Savini, G., Carnevali, F., & Mott, D. (1997). Plant genotype and growth regulators interaction affecting *in vitro* morphogenesis of blackberry and raspberry. *Biologia Plantarum*, 39, 139-150.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Naing, A. H., Park, I. S., Hwang, Y. J., Chung, J. D., & Lim, K. B. (2010). *In vitro* micropropagation and conservation of *Rhynchosyris retusa* BL. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 51(5), 440-444.
- Nikam, T. D., Mulye, K. V., Chambhare, M. R., Nikule, H. A., & 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., & 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., & 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, J.W., 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.
- Okello, D., Yang, S., Komakech, R., Rahmat, E., Chung, Y., Gang, R., Kim, Y. G., Omujal, F., & 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., & 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., & 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.
- Panwar, G. S., & 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.
- Parzymies, M., Pogorzelec, M., Głębocka, K., & 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., & Shah, R. R. (2009). Regeneration of Stevia plant through callus culture. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 71(1), 46.
- Peixoto, P. H. P., Salimena, F. R. G., Santos, M. D. O., Garcia, L. D. S., Pierre, P. M. D. O., Viccini, L. F., & Otoni, W. C. (2006). *In vitro* propagation of endangered *Lippia filifolia* Mart. and Schauer ex Schauer. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42, 558-561.
- Pérez-Tornero, O., Egea, J., Olmos, E., & Burgos, L. (2001). Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(2), 250-254.
- Pollard, J. W. & Walker, J. M. (1990). *Plant cell and tissue culture*, Humana Press.
- Reed, B. M., Wada, S., DeNoma, J., & 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., & 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., & 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.
- Rout, J. R., & 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.
- Sakhanokho, H. F., Islam-Faridi, N., Babiker, E. M., & Smith, B. J. (2022). Micropropagation of *Hibiscus moscheutos* L. 'Luna White': effect of growth regulators and explants on nuclear DNA content and ploidy stability of regenerants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1-9.
- Samarina, L., Gvasaliya, M., Koninskaya, N., Rakhmangulov, R., Efremov, A., Kiselyova, N., Ryndin, A., & 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.
- Sheydaei, P., & Duarte, A. P. (2023). The Genus *Tripleurospermum* Sch. Bip. (Asteraceae): A Comprehensive Review of Its Ethnobotanical Utilizations, Pharmacology, Phytochemistry, and Toxicity. *Life*, 13(6), 1323.
- Sivanesan, I., & Jeong, B. R. (2007). Micropropagation and *in vitro* flowering in *Pentanema indicum* Ling. *Plant Biotechnology*, 24(5), 527-532.
- Souza, A. V., Pinto, J. E., Bertolucci, S. K., Corrêa, R. M., Costa, L. C. D. B., & 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., & 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.
- Torres, K. C. (2012). Tissue culture techniques for horticultural crops. *Springer Science & Business Media*.
- Ulvrova, T., Vitamvas, J., Cepkova, P. H., Eliasova, K., Janovska, D., Bazant, V., & 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., & 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.
- Wawrosch, C., Kopp, B., & Kubelka, W. (1994). *In vitro* propagation of *Achillea asplenifolia* Vent. through multiple shoot regeneration. *Plant Cell Reports*, 14(2), 161-164.
- Yidana, J. A., Withers, L. A., & Ivins, J. D. (1985). *Development of a simple method for collecting cocoa germplasm in vitro*. In Symposium on *in vitro* problems related to mass propagation of horticultural plants, Gembloux, Belgium, 16-20.
- Yordanova, Z. P., Rogova, M. A., Zhiponova, M. K., Georgiev, M. I., & 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.
- Ziv, M. (1991). Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht: Springer Netherlands, 45-69.

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. 2014-2017 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimi gördü. 2017 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.