

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Senem UĞUR

**TÜRKİYE’DE DOĞAL YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI EĞRELİ
TÜRLERİNDE GAMETOFİT EVREDEN SPOROFİT EVREYE
GEÇİŞ SÜRECİNİN DOKU KÜLTÜRÜ VE YENİ NESİL
BİYOREAKTÖR SİSTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA-2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

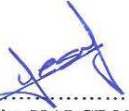
**TÜRKİYE'DE DOĞAL YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI EĞRELTİ TURLERİNDE
GAMETOFİT EVREDEN SPOROFİT EVREYE GEÇİŞ SÜRECİNİN DOKU
KÜLTÜRÜ VE YENİ NESİL BİYOREAKTÖR SİSTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Senem UĞUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 07/01/2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.


Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
DANIŞMAN


Doç. Dr. Nezihe KÖKSAL
ÜYE


Doç. Dr. Pembe EVCI ÇÜRÜK
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE’DE DOĞAL YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI EĞRELTİ TÜRLERİNDE GAMETOFİT EVREDEN SPOROFİT EVREYE GEÇİŞ SÜRECİNİN DOKU KÜLTÜRÜ VE YENİ NESİL BIYOREAKTÖR SİSTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Senem UĞUR

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Yıl : 2019, Sayfa: 59
Jüri : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Doç. Dr. Nezihe KÖKSAL
: Doç. Dr. Pembe EVCI ÇÜRÜK

Bu tez çalışmasında Türkiye’de doğal yayılış gösteren bazı eğrelti türlerinin gametofit evreden sporofit evreye geçişini sağlamak amacıyla *in vitro*’da katı kültür ile geçici daldırma sistemlerinden Plantform biyoreaktör sistemi kullanılmış ve bitkiye dönüşümleri sağlanmıştır. Çalışmada *Asplenium trichomanes*, *Asplenium scolopendrium* ve *Asplenium ceterach* türleri kullanılmıştır. Tez kapsamında ön çalışma olarak NAA (0, 1.0 mg/L), BA (0, 0.5, 1.0 mg/L) ve GA₃ (0.5 mg/L) kombinasyonlarını içeren 1/2 MS besin ortamında sporofit sayısı (bitkicik/kavanoz) ve sporofit boyu (cm) parametrelerine bakılmıştır. Ana deneme olarak NAA (0.1-0.5 mg/L) , BA (1.0 mg/L) ve KIN (1.0 mg/L) konsantrasyon kombinasyonlarını içeren 1/2 MS besin ortamı kullanılarak gametofitlerin *in vitro*’da gelişimleri gözlemlenmiştir. Plantform sistemi için *Asplenium trichomanes* türünde 1/2 MS içeren besin ortamında 3 saat ve 6 saat daldırma süresi denenmiştir. En iyi daldırma süresi 3 saat olarak belirlenmiş ve bu süre diğer 2 tür içinde uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda Plantform sisteminde bitkiye dönüşüm oranı ve kalitesinin daha iyi olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Eğrelti, doku kültürü, Plantform biyoreaktör sistemi

ABSTRACT

MSc THESIS

INVESTIGATION OF TRANSITION FROM GAMETOPHYTIC PHASE TO SPOROPHYTIC PHASE IN SOME FERN SPECIES NATURALLY SPREADED IN TURKEY BY TISSUE CULTURE AND NEW GENERATION BIOREACTOR SYSTEM

Senem UĞUR

ÇUKUROVA UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Supervisor : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Year : 2019, Pages: 59
Jury : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Assoc Prof. Dr. Nezihe KÖKSAL
: Assoc Prof. Dr. Pembe EVCI ÇÜRÜK

This thesis Plantform bioreactor system of temporary immersion system used by solid culture *in vitro* studies on some fern species naturally grown in Turkey to ensure the transition phase from sporophyte gametophyte stage and plant transformation are provided. *Asplenium trichomanes*, *Asplenium scolopendrium* and *Asplenium ceterach* species were used in the study. In the scope of the thesis, the number of sporophytes in a ½ MS nutrient medium containing combinations of NAA (0, 1.0 mg/L), BA (0, 0.5, 1.0 mg/L) and GA₃ (0.5 mg/L) as preliminary work plant height (cm) parameters were examined. As a main study, *in vitro* development of gametophytes was observed using ½ MS nutrient medium containing combinations of concentrations of NAA (0.1-0.5 mg/L), BA (1.0 mg/L) and KIN (1.0 mg/L). For the Plantform system, 3 hours and 6 hours immersion time was tested in a medium containing ½ MS of *Asplenium trichomanes*. The best immersion time was determined as 3 hours and this time was applied to the other 2 species. As a result of the study, it was observed that plant conversion rate and quality were better in Plantform system.

Key Words: Fern, tissue culture, Plantform bioreactor system

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Eğreltiler, özellikle atık ve kirleticilerin yok edilmesi konusunda çevre mühendisliği, kanser ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde etnomedikal ve tıp bilimlerinde ve süs bitkileri sektöründe son zamanlarda araştırmacıların büyük ilgi odağı haline gelmiştir. Süs bitkilerinde; aranjman, dikey bahçe ve kesme çiçekçilik olarak kullanılırken, sanayide ise endüstriyel atıkların temizlenmesinde, kozmetikte, tıpta kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Eğrelti otu yüksek klorofil, antimikrobiyal ve antioksidan madde içeriği için bulunduğu ortamın havasını temizleyerek, havada bulunan ve diğer canlıların ölümüne neden olan formaldehitin ortam havasından temizlemesinde çok etkili olmaktadır. Eğreltilerin, günümüzde süs bitkisi olarak temini, doğadan sökülerek sağlanmaktadır. Özellikle son zamanlarda eğreltilerin yaşam alanları tarla açma, sanayileşme, aşırı otlatma, çorak ve bataklık alanların ıslahı, orman yangınları ve insanların doğaya zarar veren bilinçsiz tutumları sebebiyle her yıl yok edilme tehlikesiyle karşı karşıyadır. Bu tür bilinçsizliklerle ve tahriplerle yok olmaya yüz tutmuş eğrelti türleri için doku kültürü tekniklerinden yararlanılarak üretilmesi ve yeniden doğaya ve hatta süs bitkileri sektörüne kazandırılması büyük önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de doğal yayılım gösteren bazı eğrelti türlerinin gametofit evreden sporofit evreye geçişini sağlamak amacıyla *in vitro*’da katı kültür ile geçici daldırma sistemlerinden Plantform sistemi kullanılmış, bitkiye dönüşümleri sağlanmıştır. Doku kültüründe gelişmekte olan gametofitlerin üzerindeki ankegonyum ve antridium arasında katı kültürde hareket olamayacağından dolayı döllenme ya gerçekleşmeyecek ya da kısmen gerçekleşerek sporotife dönüşüm düşük olacaktır. Bu yüzden döllenme, bitki stres altında olduğu için veya tesadüfi olarak meydana gelebilecektir. Gametofitler, katı kültürlerde ortamdan aldığı besin elementlerini homojen bir şekilde dağıtamamaktadırlar. Geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile, eğreltilerin kendi doğal ortamına benzer bir ortam yaratılarak hızlı döllenme ve bitkiye dönüşümün

sağlanması hedeflenmiştir. Çalışmada, *Asplenium trichomanes*, *Asplenium scolopendrium* ve *Asplenium ceterach* türleri kullanılmıştır. Tez kapsamında ön çalışma olarak NAA (0, 1.0 mg/L), BA (0, 0.5, 1.0 mg/L) ve GA₃ (0.5 mg/L) kombinasyonlarını içeren 1/2 MS besin ortamında gelişen sporofit sayısı (adet/bitkicik) ve bitki boyu (cm) parametrelerine bakılmıştır. Ana deneme olarak NAA(0.1-0.5 mg/L), BA(1.0 mg/L) ve KIN(1.0 mg/L) konsantrasyon kombinasyonlarını içeren 1/2 MS besin ortamı kullanılarak gametofitlerin *in vitro*'da gelişimi gözlemlenmiştir. *Asplenium trichomanes* türü için gametofit ağırlıkları tüm hormon konsantrasyonları için aynı çıkmıştır fakat en başarılı sonuç 6.76 g ile BA (1.0 mg/L) ve (NAA 0.5 mg/L) içeren ortamdan elde edilmiştir. *Asplenium trichomanes* eğreltisinde bitki sayısında istatistiksel olarak fark bulunmamış olup, en yüksek bitkicik sayısı 11.67 ile 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA içeren ortamda gözlenmiştir. *Asplenium scolopendrium* türü için en yüksek gametofit ağırlığı 4.47 g başta olmak üzere kontrol ortamı, BA 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA ve 1.0 mg/L KIN + 0.5 mg/L NAA'da olduğu belirlenmiştir. En yüksek sporofit gelişimi 8.03 (bitkicik) ile 1.0 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA ve 3.97 (bitkicik) ile 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. *Asplenium ceterach* türü için ise gametofit ağırlıkları istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ve sporofite dönüşüm sağlanamamıştır. Plantform sistemi için *Asplenium tricomones* türünde 1/2 MS içeren besin ortamında 3 saat ve 6 saat daldırma süresi denenmiştir. Sporofite dönüşüm sayısı 34.37 (bitkicik) olarak en iyi daldırma süresi 3 saat olan sistemde gözlemlenmiştir ve bu süre diğer 2 tür içinde uygulanmıştır. Plantform sistemiyle katı kültürü karşılaştırdığımız zaman *Asplenium trichomanes* için Plantform (6.32 g) ve katı kültür (4.74 g) arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. Sporofit dönüşüme bakıldığı zaman Plantform sisteminde bulunan gametofitler katı kültüre göre daha fazla ve daha kaliteli olarak belirlenmiştir. *Asplenium scolopendrium* ve *Asplenium ceterach* türü için gametofit ağırlığına bakıldığında her 2 sistem için aralarında istatistiksel fark bulunmamıştır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi yürüttüğüm süre boyunca, tezimin başlangıçtan sonuçlanana kadar olan her aşamada yardımlarını ve varlığını hissettiren çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yeşim Yalçın MENDİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi yürüttüğüm süre boyunca tezimde yardım ve desteklerini esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkez Müdürü Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a teşekkür ederim.

Tezimin değerlendirilmesi emek harcayan hocalarım Sayın Doç. Dr. Pembe EVCİ ÇÜRÜK ve Doç. Dr. Nezihe KÖKSAL'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Biyolog Tolga İZGÜ'ye, Dr. Başar SEVİNDİK'e ve Doktora öğrencisi Melike Cengiz'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında bana yardımcı olan Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanları Dr. Şaire Ramiz TÜRKOĞLU, Ziraat Yüksek Mühendis'i Belgin BİÇEN, Fatma KARA ve Eda ARSLANKILIÇ'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan başta annem Gülçiçek UĞUR olmak üzere değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
2.1. Klasik Yöntemlerle Yürütülen Doku Kültürü Çalışmaları.....	9
2.2. Plantform Biyoreaktör Sistemiyle Yürütülen Çalışmalar.....	14
3. MATERYAL VE METOD	19
3.1. Bitkisel Materyal	19
3.1.1. Asplenium trichomanes	19
3.1.2. Asplenium scolopendrium.....	20
3.1.3. Asplenium ceterach	21
3.2. Metod	21
3.2.1. Katı Kültür Denemeleri ile Gametofit Evredeki Eksplantların Çoğaltılması	21
3.2.2. Klasik Doku Kültürü Yöntemleriyle Gametofit Evredeki Eksplantların Sporofit Evresine Geçiş Denemelerinin Kurulması.....	22
3.2.3. Geçici Daldırma Yöntemi ile Sporofite Geçiş Denemelerinin Kurulması.....	23
3.2.4. Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması.....	24
3.2.5. Deneme Deseni, İstatiksel Analiz ve İncelenen Kriterler.....	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27

4.1. Katı Kùltür Denemelerine Ait Bulgular	27
4.1.1. <i>Asplenium trichomanes</i> Genotipine Ait Katı Kùltür Bulguları	27
4.1.2. <i>Asplenium scolopendrium</i> Genotipine Ait Katı Kùltür Bulguları	33
4.1.3. <i>Asplenium ceterach</i> Genotipine Ait Katı Kùltür Bulguları	37
4.2. Geçici Daldırma Sistemi (Plantform) Denemelerine Ait Bulgular.....	39
4.2.1. <i>Asplenium trichomanes</i> Genotipinde Plantform Bulguları.....	39
4.2.2. <i>Asplenium scolopendrium</i> Genotipine Ait Plantform Bulguları.....	41
4.2.3. <i>Asplenium ceterach</i> Genotipine Ait Plantform Bulguları.....	43
4.3. Dış Koşullara Alıştırma.....	44
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	Türkiye Süs Bitkileri Üretim Miktarı	1
Çizelge 3.1.	1/2 MS Besin Ortamının İçeriği.....	22
Çizelge 4.1.	<i>Asplenium trichomanes</i> eğreltisinin katı kültür ön çalışma denemesinde sporofit sayısına (bitkicik/kavanoz) ait veriler.....	28
Çizelge 4.2.	<i>Asplenium trichomanes</i> eğreltisinde katı kültüründen elde edilen sporofitlerin boyu'na (cm) ait veriler	29
Çizelge 4.3.	<i>Asplenium trichomanes</i> katı kültür gametofit ağırlığına (g) ait veriler	31
Çizelge 4.4.	<i>Asplenium trichomanes</i> türünde katı kültürde gametofitlerin sporofite dönüşme sayısına (bitkicik/kavanoz) ait veriler	32
Çizelge 4.5.	<i>Asplenium scolopendrium</i> türünde katı kültür gametofit ağırlığına (g) ait veriler	34
Çizelge 4.6.	<i>Asplenium scolopendrium</i> türünde katı kültür sporofit sayısına (bitkicik/kavanoz) ait veriler.....	35
Çizelge 4.7.	<i>Asplenium ceterach</i> türünde katı kültür gametofit ağırlığına (g) ait veriler	37
Çizelge 4.8.	<i>Asplenium trichomanes</i> eğreltisine ait Plantform sürelerinin karşılaştırılması.....	39
Çizelge 4.9.	<i>Asplenium trichomanes</i> eğreltisine ait Plantform ve katı kültür gametofit ağırlığı (g) sonuçları	40
Çizelge 4.10.	<i>Asplenium scolopendrium</i> eğreltisine ait Plantform ve katı kültür gametofit ağırlığı (g) sonuçları.....	42
Çizelge 4.11.	<i>Asplenium ceterach</i> eğreltisine ait Plantform ve katı kültür gametofit ağırlığı (g) sonuçları	43



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	<i>Asplenium ceterach</i> eğrelti türünün doğadaki görünümü.....	3
Şekil 1.2.	Eğrelti otunun doku kültüründe yaşam döngüsü	6
Şekil 3.1.	Gametofit evredeki eğrelti otunun görünümü	19
Şekil 3.2.	<i>Asplenium trichomanes</i> eğreltisi doğadaki görünümü.....	20
Şekil 3.3.	<i>Asplenium scolopendrium</i> eğreltisinin doğadaki görünümü	20
Şekil 3.4.	<i>Asplenium ceterach</i> eğreltisinin doğadaki görünümü	21
Şekil 3.5.	Gametofit evredeki materyallerin katı kültür denemesinde kavanozlara aktarımı	23
Şekil 3.6.	Hormonsuz ortamda çoğaltılan gametofitlerin Plantform sistemine aktarımı.....	24
Şekil 3.7.	Gelişen gametofitlerin dış koşullara aktarılması	25
Şekil 4.1.	<i>Asplenium trichomanes</i> sporofit sayısı (bitkicik/kavanoz).....	28
Şekil 4.2.	<i>Asplenium trichomanes</i> eğreltisinin sporofit uzunluğu (bitkicik/kavanoz).....	29
Şekil 4.3.	<i>Asplenium trichomanes</i> eğreltisinin katı kültür gametofit yapısı	30
Şekil 4.4.	<i>Asplenium trichomanes</i> gametofit ağırlığı (g).....	31
Şekil 4.5.	<i>Asplenium trichomanes</i> eğreltisinin katı kültürde sporofit sayısı (bitkicik/kavanoz).....	32
Şekil 4.6.	<i>Asplenium trichomanes</i> katı kültürde gametofit evreden sporofite evreye dönüşümü	33
Şekil 4.7.	<i>Asplenium scolopendrium</i> eğreltisinin katı kültürde gametofit ağırlığı (g).....	34
Şekil 4.8.	<i>Asplenium scolopendrium</i> katı kültürde sporofit sayısı (bitkicik/kavanoz).....	35
Şekil 4.9.	<i>Asplenium scolopendrium</i> eğreltisinin gametofit evredeki genel görünümü	36

Şekil 4.10. <i>Asplenium scolopendrium</i> eğreltisinin gametofit evredeki farklılaşması	36
Şekil 4.11. <i>Asplenium ceterach</i> katı kültür gametofit ağırlığı (g)	37
Şekil 4.12. <i>Asplenium ceterach</i> eğreltisinin katı kültürdeki genel görünümü	38
Şekil 4.13. <i>Asplenium ceterach</i> eğreltisinin katı kültürdeki gametofit yapısı	38
Şekil 4.14. <i>Asplenium trichomanes</i> eğreltisinde daldırma sürelerinin sporofit sayısına (bitkicik/kavanoz) etkisi.....	40
Şekil 4.15. <i>Asplenium trichomanes</i> eğrelti türünün gametofit ağırlıklarının karşılaştırılması	41
Şekil 4.16. <i>Asplenium trichomanes</i> türünün Plantform sistemindeki gelişimi	41
Şekil 4.17. <i>Asplenium scolopendrium</i> eğreltisinin katı kültür ve Plantform'da gametofit ağırlıklarının (g) karşılaştırılması	42
Şekil 4.18. <i>Asplenium scolopendrium</i> türünün Plantform sistemindeki gelişimi	43
Şekil 4.19. <i>Asplenium ceterach</i> eğreltisinin katı kültür ve Plantform sisteminde gametofit ağırlıklarının (g) karşılaştırılması.....	44
Şekil 4.20. <i>Asplenium ceterach</i> türünün Plantform sistemindeki gelişimi	44
Şekil 4.21. Plantform sisteminde gelişim gösteren <i>Asplenium trichomanes</i> türünde aklimatizasyon.....	45

KISALTMALAR

μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
BAP	: 6-Benzylamino purine
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyici
dk	: Dakika
FAO	: Food and Agriculture Organisation (Gıda ve Tarım Örgütü)
g	: Gram
GA ₃	: Gibberallic acid
KİN	: Kinetin
L	: Litre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MS	: Murashige ve Skoog, 1962
NAA	: Naphtalaneacetic acid
Ö.D.	: Önemli Değil
TIS	: Temporary Immersion System
GDY	: Geçici Daldırma Yöntemi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu



1. GİRİŞ

Dünya’da süs bitkilerinin üretimi ve ticareti, gelişmiş ve gelişmekte olan bazı ülkelerde ekonomiye büyük katkı sağlamaktadır. Yaklaşık 100’den fazla ülkede 1.6 milyon hektar alanda süs bitkileri üretimi yapılmaktadır. Türkiye’nin coğrafi konumu sayesinde süs bitkilerinin üretim ve ticareti yıllara göre hızla artmaktadır. Dünyadaki süs bitkilerinin pazar payından, ülkemizde gün geçtikçe faydalanmaktadır. Türkiye’de 32 farklı ilde süs bitkileri üretimi yapılmaktadır. Üreticilerin büyük çoğunluğu Marmara Bölgesinde yoğunlaşmıştır. İl bazında bakıldığında ise Ankara, İstanbul, İzmir ve Yalova illeri ilk sıralarda görülmektedir.

Türkiye’de süs bitkileri üretim alanları 2002-2017 yılları arasında 2.5 kat artmıştır. Toplam 50.089 dekar alanda yapılan süs bitkileri üretiminin en çok üretimi kesme çiçekçilik sınıfındadır (Çizelge 1.1). Diğer üretim şekilleri; dış mekan süs bitkileri, iç mekan süs bitkileri ve çiçek soğanları olarak sıralanmaktadır.

Çizelge 1.1. Türkiye Süs Bitkileri Üretim Miktarı (TÜİK, 2017)

Üretim Miktarları	
Ürün Grubu	2017 (Adet)
Kesme Çiçekler	1.050.584.960
İç Mekân Süs Bitkileri	56.049.665
Dış Mekân Süs Bitkileri	490.559.391
Çiçek Soğanları	21.833.825
Toplam	1.619.027.841

Türkiye, süs bitkileri yetiştiriciliğinde uygun iklim, coğrafi koşullar, pazar, Avrupa ülkelerine yakınlık ve ucuz işgücüne sahip olması gibi nedenlerle önemli avantajlara sahiptir. Ülkemizde şimdiye kadar tanımlanmış 11.707 tane bitki türü bulunmaktadır. Bunların 11.621 tanesi tohumlu bitkilerdir ve 73 tanesi eğreltilerdir. Eğreltiler tohumсу bitkilerdir ve sporla çoğalırlar.

Eğreltilerin, günümüzden 300 milyon yıldan daha fazla yaşadığı bilinmektedir. Devoniyen Dönemi'nde karada hiçbir hayvanın yaşamadığı dönemlerde ortaya çıkmışlardır. 250 milyon yıl önceki Karbonifer Dönemi'nde yeryüzündeki karaların hemen hemen tamamı eğrelti otu ormanları ile kaplı olduğundan, bu döneme eğrelti otu dönemi denilmektedir. Karbonifer döneminde çoğu eğreltinin soyunun tükendiği ancak bazılarının soyunun bugüne kadar geldiği bilinmektedir. Dünyadaki kömür yataklarının temelleri bu dönemdeki eğrelti otlarına dayanmaktadır (Fernandez ve ark, 2011). Eğrelti otları, Antartika ve çoğu adalar dışındaki nemli ve keskin güneş ışıklarından korunmuş gölgeli yerlerde üremektedirler. Bazıları yosuna benzer biçimde küçük yapılıdır. Tropik bölgede yetişenleri ise 25 m uzunluğa varabilecek kadar büyük olabilmektedir. Eğrelti otları, damarlı bitkilerdir. Suyu köklerinden alıp, damarları ile yapraklarına kadar ulaştırabilirler. Türlerin çoğu toprakta yetişir. Yalnız Platycerium cinsinden geyik boynuzu gibi bazı eğreltiler başka bitkilerin üzerinde yaşayabilir (Chapman, 2009).

Bu eğreltiler besinlerini sarıldıkları ağaçtan sağlamadıkları için bunlar asalak bitki sayılmaz. Toprakta kökleri olmadığı için başka bitkilerden, özellikle ağaçlardan destek alan ve hava kökleriyle yağmur suyunu, atmosferin nemini emerek besin gereksinimini karşılayan bu tür bitkilere "epifit bitki" denir (Kekil, 2014).

Yeryüzünde yetişen yaklaşık 170 cins, 9000 kadar eğrelti türü bulunmaktadır (Özkara ve ark, 2003). Sporlu bitkilerin Polypodiopsida (ya da Filicopsida) sınıfını oluşturlar (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *Asplenium ceterach* eğrelti türünün doğadaki görünümü

Sporlu bitkiler arasında en iyi gelişme gösteren ve ototrof olarak yaşayan kara bitkileridir. Boyları, otsu olanlarda birkaç mm' den (*Trichomanes minutissimum*), ağaç şeklinde olanlarda ise (*Alsophila crinita*) 10-15m' ye kadar değişir. Jeolojik devirlerde (300 milyon yıl önce) yaşamış olanlar iyi gelişme göstermiş büyük ağaçlar şeklindedir. Günümüzde yaşayanların çoğu otsu, çok yıllık bitkilerdir; tropiklerde yetişen bazı türler ise ağaç formundadır (Tanker ve ark, 2007).

Eğreltilerde sporofit bitki üzerinde sporofil denilen yapraklar bulunmaktadır. Sporofillerin alt yüzeyinde insidyumların içinde spor taşıyan sporangiyum keselerinden meydana gelmiş soruslar mevcuttur. Sporangiyumlar içinde bulunan spor ana hücreleri mayoz bölünme geçirerek haploid sporları verir (Pınar ve ark, 2003).

Olgunlaşan sporların nemli toprağa düşmesiyle çimlenme meydana gelir ve hermafrodit yapıda olan gametofitler oluşur. Gametofitlerin üzerinde erkek (anteridyum) ve dişi (arkegonyum) eşey hücreleri oluşur. Oluşan sperm hücresi,

rüzgar, su gibi doğa olayları ile yumurta hücresine taşınarak döllenme sağlanır ve sporofit bitki meydana gelir. Meydana gelen yeni yavru bitki eğrelti otu gibi kök ve yaprak taslağından oluşur ve yıllar sonra olgunlaşıp spor üretecek duruma gelir. Erginliğe ulaştınca o da çevresine spor saçar sonra gamet (sperma ve yumurta hücresi) ürettiği evreler dönüşümlü olarak birbirini izler. Buna "döl değişimi" denir. Önçim olmaksızın çoğalabilen türleri de vardır. Bu grubun en tipik örneği olan yürüyen eğreltide (*Camptosorus sibiricus*) yaprakların toprağa değen uçları köklenerek yeni bitkiler oluşturur.

Eğreltilerin bazıları kesme çiçekçilikte aranjman ve süs bitkisi olarak, bazıları ise endüstriyel atıkların temizlenmesinde, dikey bahçelerde, kozmetikte, tıpta kanser tedavisinde kullanılmaktadır.

Eğrelti otu yüksek klorofil, antimikrobiyal ve antioksidan madde içeriği ile bulunduğu ortamın havasını temizler. Havada bulunan ve diğer canlıların ölümüne neden olan formaldehitin ortam havasından temizlemesinde çok etkilidir.

Eğreltilerin, günümüzde süs bitkisi olarak temini, doğadan sökülerek sağlanmaktadır. Özellikle son zamanlarda eğreltilerin yaşam alanları tarla açma, sanayileşme, aşırı otlatma, çorak ve bataklık alanların ıslahı, orman yangınları ve insanların doğaya zarar veren bilinçsiz tutumları sebebiyle her yıl yok edilme tehlikesiyle karşı karşıyadır. Bu tür bilinçsizliklerle ve tahriplerle yok olmaya yüz tutmuş türler için doku kültürü tekniklerinden yararlanılarak, türlerin yeniden doğaya ve hatta süs bitkileri sektörüne kazandırılması önem kazanmaktadır. Eğrelti otu türlerinin çoğaltılmasında da son dönemlerde klasik yöntemlere alternatif olarak, spor ve stolon eksplantları kullanılarak doku kültürü ve geçici daldırma sistemleri yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 1.2).

Doku kültürü, laboratuvar ortamında aseptik şartlarda yapay bir besin ortamında hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından (eksplant) kontrollü çevre koşullarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir. (Onay ve ark, 2012).

Odunsu ve çalı formundaki bitkilerin *in vitro* koşullarda çoğaltılması ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, klasik katı ve yarı-katı besin ortamları kullanılmaktadır. Fakat sıvı ortamda kullanım ile ilgili olarak çok az sayıda literatür mevcuttur. Katı kültürlerde, çeşitli polisakkarit bileşimlerini içeren agar, agaroz, aljinat, phytigel (Gelrite) gibi jel yapıcı maddeler kullanılmaktadır. Bu katılaştırıcılar bitkilerin besin ortamına tutunmasını sağlamaktadır. Bununla beraber bitkilerde vitrifikasyon (camlaşma) dediğimiz agar ile ilişkili bazı fizyolojik sorunlara da sebep olabilmektedir.

Yeni nesil doku kültürü teknikleri başlığı altında geçici daldırma biyoreaktör sistemleri ilk olarak Harris ve Mason (1983) tarafından geliştirilmiş olup, ilk başarılı bitki rejenerasyonu sonuçları, *Solanum tuberosum* ve *Coffea arabicana*'nın somatik embriyolarından elde edilmiştir (Etienne ve Berthouly, 2002; Yenice, 2010). Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin doku kültürü uygulama alanlarındaki avantajları; bitki maliyetlerinin azaltılması, otomasyon ve doku kültürü prosedürlerinin basite indirgenmesidir.

Doğada bulunan eğreltilerin fertilizasyonu; rüzgar, su gibi doğa olayları ile gametofit evrede olan bitkiciklerin sporofit evreye geçişi gerçekleşirken, doku kültüründe bu etkileşimin gerçekleştirilmesi için uygun şartların sağlanması gerekmektedir. Geçici daldırma sistemi son zamanların popüler olduğundan ve kullanım kolaylığı sağladığı için doku kültürü laboratuvarlarının vazgeçilmezi olmuştur. Düşük maliyetini ve iş gücünü azalttığı için diğer yapılan çalışmalara karşı tercih ediliyor. Otoklovlanabilirliği sayesinde tekrar tekrar kullanılabilir. Sistem gaz alış verişi sağlamaktadır ve ışığı homojen bir biçimde almaktadır. Diğer doku kültürü tekniklerine göre yerden tasarruf etmektedir. Bu sistemde kullanılan kapların daldırma - havalandırma süreleri bir güç kaynağına bağlıdır ve bu güç kaynağı sayesinde kullanılacak materyalin ortam ile temas sıklığı ayarlanmaktadır. Kültür kaplarına konulacak materyalin oldukça temiz olması gerekmektedir.



Şekil 1.2. Eğrelti otunun doku kültüründe yaşam döngüsü A. *Pteris vittata* eğreltisinin doğadaki görünümü; B. Yaprak altında gelişen sporlar; C,D. Sporlar; E, F: Çimlenme, gametofit oluşumu ve gametofit gelişimi sağlanan eksplantın farklılaşması; G; Döllenme, Apikal uç, Arkegonyum, Rizoid Anteridyum ve Lateral uç yapılarının görünümü (AU: Apikal uç, AR: Arkegonyum, R: Rizoid, AN: Anteridyum, LU: Lateral uç); H,I,J. Sporofit gelişimi ; K,L; Aklimatizasyon

Bu çalışmada, TAGEM 13 ARGE-20 ve TUBİTAK-TEYDEB 5140026 nolu proje kapsamında bitkiye dönüşemeyen ve özellikle de gametofit evrede kalarak sporofite dönüşemeyen bazı doğal yayılış gösteren eğrelti türlerinin, sporofite geçişini sağlamak amacıyla doku kültürü ve geçici daldırma sistemleri kullanılarak bitkiye dönüşümleri gerçekleştirilmiştir.





2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Klasik Yöntemlerle Yürütülen Doku Kültürü Çalışmaları

Vijayakumar ark (1990), nesli tükenme tehlikesi altında olan eğreltilerden *Batula uber*'in dormansi gösteren tomurcuklarını araziden ve seradan toplamıştır, MS besin ortamına aktarmışlardır. Bu besin ortamı içerisinde mineral tuzlar, organik mineraller ve büyüme düzenleyici eklenmiştir. Bir ay içerisinde sürgünlerden 3-4 yaprak oluşumu gözlemlenmiştir. 16/8 fotoperiyodisite gösteren büyütme odasında 20 °C'de, yoğun nemli ortamda, torf içerisinde 4-6 hafta sürecinde kök oluşumunun gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Morini (2000), *in vitro* rejenerasyon ve mikroçoğaltımı optimize etmek için *Osmundo regalis* türünde çalışmalar yapmıştır. Gametofit ve sporofit elde etmek için; sporlar, olgun bitkilerden alınarak Hoagland ve Arnon besi yerine transfer edilmiştir. Hormonsuz besi yerinde sporofitler normal gelişim göstermiştir. Yüksek oranda çimlenme gözlenen Haogland ve Arnon ortamında bulunan sporların yine aynı ortamda farklılaşarak geliştikleri saptanmıştır. Gametofit evredeki bitkicikler daha sonra sporofit gelişimi meydana getirerek başarılı şekilde dış ortama uyum sağlamışlardır.

Fernandez ve Revilla (2003), Süs eğreltilerinde yaşam döngüleri, sporofit gametofit ve tekrar sporofit aşamalarını doku kültürü tekniklerini kullanarak inceleme yapan araştırmacıları kapsayan bir derleme yapmışlardır.

Ambrósio (2004), *Nephrolepis biserrata* türünün *in vitro*'da sükroz ve pH etkileşimlerini incelemiştir. Stolon segmentlerini, 0, 15, 30, 45, 60g/L sükroz ve 3, 5, 7 ve 9 pH aralıklarında yarı-katı MS besi yerinde kültüre almıştır. Ortamda sükroz olmadığı zaman sürgün ve yaprak rejenerasyonunun azaldığı saptanmıştır. Besi yerine sükroz ilavesi ile pH 5 ve 7'de, sürgün sayısının her eksplant başına ortalama ve maksimum 51.25 ve 38.25 değerlerine ulaştığı saptanmıştır. Sükroz oranları, 15-45 g/L aralığında iken yaprak uzunluğunda artış olduğu gözlenmiştir; ancak besi ortamındaki pH 9 olduğunda kuru madde ağırlığı etkilenmezken, yeni

yaprakların oluşumu için de yeterli olmadığı saptanmıştır. Genç sporofitlerin dışarı aktarımı başarılı bir şekilde sonuçlanmıştır

Goller ve Rybczynski (2007), farklı cinslere ait 16 eğrelti türünde spor kültürü için MS besi yeri kullanmışlardır. Türlerin, aynı besi yerinde gelişim safhalarına göre farklı olduğu gözlemlenmiştir. Spor çimlenme süresinde türler arasında farklılık görülmüş ve çimlenme süresi ortalama 16 hafta olarak belirlenmiştir. Araştırılan bütün eğrelti türleri için uzun süreli gametofit kültür protokolleri yayınlanmıştır. Olgun gametofitlerde anteridyum ve arkegonyum oluşumu sağlanmış, doğal döllenmeyle genç sporofit oluşumu gözlemlenmiştir. 6 aylık kültüre alınan genç eğrelti yapraklarında apospori gözlenmiş ve yeni evrede gametofitlerin geliştiği saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda 12 türe ait sporofit evrede bitki elde edilmiş ve dış ortama aktararak serada kültüre alınmıştır.

Chang ve ark (2007), *Drynaria fortunei* eğrelti türünde *in vitro* koşullarda spor çimlenmesi, erken gametofit gelişim ve üreme fazındaki değişim üzerine pH'nın ve ışık spektrumlarının etkilerini araştırmışlardır. *D. fortunei*'nin sporları pH 3.7 ile 9.7 arasında oluşmuştur. En yüksek çimlenme oranı (%63.3), beyaz ışık altında pH 7.1'de %2 sukroz içeren 1/2 MS bazal ortamında meydana gelmiştir. Farklı ışık spektrumlarının spor çimlenmesi üzerine etkileri test edilmiş (kırmızı, kırmızı ötesi, mavi ve beyaz), beyaz ve mavi ışıkta gelişen gametofitler arasında fark saptanmamıştır. Ancak farklı ışık spektrumlarının gametofitlerdeki anteridyum ve arkegonyum gelişimlerini etkiledikleri belirlenmiştir.

Khan ve ark (2008), Klasik yöntemler ile üretilmesi zor olan *Asplenium nidus*'un *in vitro*'da mikroçoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. Başlangıç materyali olarak sporlar kullanılmıştır. Denemeler sonucunda, %20'lik NaOCl ve buna ek olarak birkaç damla tween 20 kullanımı ile en iyi sterilizasyonun sağlandığı saptanmıştır. Eksplantlar, 1/2 MS besi yerinde kültüre alınmış ve ± 25 °C karanlıkta muhafaza edilmiştir. Sporlar 12 haftada çimlenmiş ve gametofitler saptanmıştır. Çimlenmenin sonrasında bitkiciklere 4 haftada bir alt kültür yapılmıştır. Gametofitler, içerisinde NAA (0.1-0.5 mg/L) ve BAP (1-4 mg/L) bulunan 1/2 MS

besiyerine aktarılmış ve çoğaltımı sağlanmıştır. MS besiyerine NaH_2PO_4 ilavesinin gametofitik evreden sporofitik evreye geçişte büyük bir rol oynadığı saptanmıştır. Köklenme için 2.0 mg/L IBA'nın en etkin olduğu ve aklimatizasyon için en uygun maddenin bahçe kumu olduğu belirlenmiştir.

Ludwik ve ark (2008), nesli tükenmeye başlayan *Asplenium adulterinum* eğreltisiyle çalışmışlardır. Son zamanlarda *in vitro* çoğaltım ve *ex situ* koruma yöntemleri ile nesli tükenmekte olan popülasyonların gen bankalarını oluşturmaya imkan sağlamışlardır. Yapılan çalışmalarda, farklı konsantrasyonlarda sukroz ve agarın gelişimi üzerine etkilerine bakılmıştır. En etkin çimlenme, hormonsuz 1/2 MS ortamında olur iken, sporofit oluşumu için en etkili ortamın ise 1 mg/L KIN ve 0.1 mg/L NAA içeren 1/2 MS olduğu belirtilmiştir. Oluşturulacak yöntem ile gelecekte nesli tükenmesi muhtemel popülasyonların da koruma altına alınmasının sağlanacağını belirtmişlerdir.

Soare ve ark (2010), *Dryopteris affinis* eğreltisinde spor kültürü yapmışlardır. Bu tür apogami özelliği göstermektedir. Gametofit ve sporofit evrelerindeki farklılaşmayı ve *in vitro* rejenerasyon yeteneğini araştırmışlardır. Sporlar, hormonsuz MS besiyerinde 16/8 fotoperiyodisite gösteren büyütme odalarında kültüre alınmışlardır. Yaklaşık 100 gametofit kolonisi elde edilmiştir. Sporofit evredeki bitkiler, 2-3 yaprağa sahip olduğunda farklılaşma olduğu gözlenmiştir. Sporlar kültüre alındıktan 10 ay sonra bitkiler oluşmuş ve dış ortama aktarılmıştır.

Barnicoat ve ark (2011) nadir ve tehlike altındaki eğreltilerde *in vitro* ve *ex vitro* şartlarında korumanın önemini belirtmişlerdir.

Marimuthu ve ManiCkam (2011), Nesli tükenmekte olan *Pronephrium triphyllum* ve *Sphaerostephanos unitus* eğrelti türlerini korumak amacıyla *in vitro*'da spor kültürü yapmışlar ve mikroçoğaltım protokolü oluşturmuşlardır. Spor çimlenmesini, gametofit gelişimini ve sporofit evreyi incelemişlerdir. Knop's bazal ortamında *Pronephrium triphyllum* türünün sporlarını besiyerine almışlar ve yüksek oranda gelişim sağlamışlardır. Knop's sıvı besiyerinde en iyi sporofit

evresi gelişimi meydana geldiğini belirtmişlerdir. Knop's bazal ortamında, *Sphaerostephanos unitus* eğreltisi için en yüksek çimlenme oranı saptamışlardır. *In vitro*'da gelişimi tamamlanan eğrelti bitkileri, doğal ortamlarında ve çeşitli botanik bahçelerinde koruma altına alınmıştır.

Mazumder ve ark (2011), *Drynaria quercifolia* eğreltisinde *in vitro*'da çoğaltım ve dış koşullarda korumak amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Sporları Z4 besi yerinde çimlendirmek amacıyla kültüre almışlardır. Denenen diğer besi yerlerinde protal oluşumunda başarısız olunmuştur. Doku içerisine yerleştirildikten yaklaşık 30 gün sonra çimlenme olduğu gözlenmiştir. Gametofit evrede ve sonrasında sporofit gelişiminin incelenmesi amacıyla bitkicikler PNT-2 besi yerinde kültüre alınmış ve en yüksek farklılaşmanın meydana geldiği saptanmıştır.

Liao ve Wu (2011), *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C.Chr'de *in vitro* çoğaltımı araştırmışlardır. Yeşil globüler gövdeleri, ilk olarak NAA, 2İP ve BA içeren MS ortamından elde edilmiştir. 5.37 µM NAA'nın en iyi başlangıç konsantrasyonu olduğu saptanmış daha sonra çoğaltım amacıyla bu ortama 2.22 µM 2İP eklenmiştir. Sporofit gelişimi, hormon içermeyen MS ortamından sağlanmıştır.

Winarto ve Da silva (2012), Gametofit evrenin ve sonrasında sporofit gelişiminin incelenmesi amacıyla bitkicikleri, PNT-2 besi yerinde kültüre almışlar ve en yüksek farklılaşmanın meydana geldiğini saptamışlardır. *Rumohra adiantiformis* eğreltisinde mikroçoğaltım protokolünü geliştirmişlerdir. Başlangıç eksplantı olarak rizomlar kullanılmış, 0.25 mg/l 2.4D, 0.2 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA, 0.5 mg/l TDZ ve 30 g/l sukroz içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Yeni üretilmiş rizomların çoğaltım oranı, 0.05 mg/l IAA, 0.25 mg/l BA, 0.5 mg/l Kin, 1 g/l aktif kömür ve 20 g/l sukroz içeren 1/2 MS ortamında 5.7 rizom/eksplant oranında artış göstermiştir. Rejenere olmuş rizomlar köklendirilerek dış ortama aktarılmış ve yaşama oranı %97-100 olarak bulunmuştur.

Srivastava ve Uniyal (2013), *Asplenium nidus* eğreltisinin döllenme biyolojisi ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Bu eğrelti türü süs bitkisi olarak

kullanılma özelliğine sahiptir ve kuş kafesi eğreltisi olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda karışık popülasyonlardan izole edilmiş popülasyonlara kıyasla daha fazla sporofit bitkicik elde edilmiştir. Yapılan spor kültürü denemelerinde Parker-Thompson besi yeri kullanılmış ve 16/8 saat peryodisite gösteren, $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de büyütme odalarına alınmıştır. *Asplenium nidus*'un kendine döllenme özelliğine sahip olmasının yanı sıra yabancı döllenmeye de açık olduğu belirlenmiştir.

Willyams ve Daws (2013), Austral Bracken (*Pteridium esculentum*) eğreltisinde *in vitro* gametofitlerden sporofitlerin mikroçoğaltımını incelemişlerdir. *In vitro*'da çimlendirilmiş sporelerden üretilen gametofit kültürler, sporofite dönüşmüştür. %72.4-85 oranında başarılı bir aklimatizasyon sağlanmıştır.

Mikula ve ark (2015), *Cyathea delgadii* Sternb eğrelti türünde somatik embriyogenesisin etkinliği ve sporofit gelişimi üzerine eksplant tipinin (etiolleşme, yaş, uzunluk), fiziksel koşulların (fotoperiyod, karanlık) ve kimyasalların (sukroz ve mineral tuz konsantrasyonlarının) etkisini araştırmışlardır. Etiolleşmiş sporofitlerin, somatik embriyo teşvikinde en etkili faktörler olduğu belirlenmiştir. En yüksek SE oluşumu, %1 sukroz içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamından elde edilmiştir (%84 eksplant gelişimi ve 42.3 somatik embriyo/eksplant).

Rolli ve ark (2015), sucul eğrelti türü olan *Marsilea quadrifolia* L.'de *invitro* mikroçoğaltım gerçekleştirilmiş ve RAPD yöntemleri kullanılarak genetik kararlılıkları araştırılmıştır. Araştırmacılar, farklı sitokininlerin (6-benzylaminopurine, zeatine riboside, ve N-6-(2-isopentenyl)adenine) mikroçoğaltım üzerine etkilerini incelemişlerdir. *In vitro*'dan elde edilmiş olan bitkiciklerde, RAPD analizi uygulanarak genetik kararlılıkları kontrol edilmiş ve 18 farklı primerle çalışılmış, 100 ile 3250 bp arasında değişen 189 bant saptanarak bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Kodym ve ark (2016), *Pteridium esculentum* sporlarını yaz mevsimi bitiminde toplamış ve *in vitro*'da $\frac{1}{2}$ MS ve %0.15 aktif karbonlu ortamda çimlendirmişlerdir. Aynı ortamda hızlıca katmerli şekilde gametofit yapı oluşmuştur. Gametofit çoğalmanın iyi olmasına rağmen *in vitro*'da sporofit gelişim

sağlanamamıştır. Gametofitler, sislemeli serada hindistan cevizi lifi ile çam kabuğu eklenmiş ortama aktarılmıştır. Sporofitler üretilmiştir. Populasyon ve bölge farklılığına karşı gametofitlerin %75-100 oranında 9 haftada sporofite dönüştüğü saptanmıştır. Bitkicikler, 3-4 ay sonra oluşmuştur.

Luna ve ark (2016), Pteriaceae familyasına ait *Anogramma chaerophylla* eğreltisinde üreme durumu ve *in vitro* spor kültürü üzerinde çalışmışlardır.

Makovski ve ark (2016), *Osmunda regalis* eğrelti türünün *invitro* çoğaltımını ve kriyoprezervasyon yöntemi ile muhafazasını araştırmışlardır. Gametofit çoğaltımı ve sporofit üretimi üzerine Knop's ortamının, MS tuzlarının (1/2, 1/4 ve 1/8) farklı konsantrasyonlarının, hem amonyum nitratın hem de tüm vitaminlerin ortamda bulunup bulunmamasının etkisini incelemişlerdir. En yüksek gametofit çoğaltımı (%89), amonyum nitrat ve vitamin bulunmayan ve 1/2 veya 1/4 oranında mineral tuz içeren MS ortamından elde edilmiştir. En iyi sporofit üretimi ise, amonyum nitrat ve vitamin bulunmayan 1/8 oranındaki MS ortamından elde edilmiştir.

2.2. Plantform Biyoreaktör Sistemiyle Yürütülen Çalışmalar

Etienne ve Berthouly (2001), bitki çoğaltımı için geçici daldırma sistemini 4 kategoride toplamış ve tanımlamışlardır. Bunlar; 1. Yatık ve çalkalıyıcı makinalar, 2. Bitki materyalinin tamamının daldırıldığı ve besin ortamını kendi kendine değiştirebilen makinalar, 3. Kısmi daldırma yapılan ve sıvı besin ortamı değiştirilebilen makinalar, 4. Tamamı havayla çalışan, daldırma sistemi sıvı besin aktarıldıktan sonra hareket eden ve besin ortamı yenilenmeksizin çalışan makinalardır. Mikroçoğaltımda bitkinin sürgün kısmının geçici daldırma sisteminde kullanımı yaygınlaştığı ortaya çıkmıştır. Daldırma zamanı, süresi ya da sıklığı, sistemin verimliliği için en belirleyici faktördür. Besin ortamı hacminin ve kültür kabının hacminin optimum hale getirilmesi, özellikle sürgün çoğalma etkinliğini büyük ölçüde geliştirir. Üretim maliyetlerini azaltmada en çok yer alan parametreler şunlardır:

- (1)çalışmada iş gücünde azalma;
- (2)raf alanında azalma;
- (3)kullanılan kapların sayısındaki azalma;
- (4)daha iyi biyolojik ürün.

Yenice ve ark (2010), Protein yönünden oldukça zengin olan *Lemna minor* L. bitkisi Türkiye’de bol miktarda bulunduğunu, *Lemna minor* L. bitkisinin ekolojik olarak su kirliliğinin ortadan kaldırılmasında ve akuakültürde ortam dengesinin korunmasında çok önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktör ile bu bitkinin *in vitro* çoğaltımının yapılması ve kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin bitkinin protein miktarına etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, farklı oranlarda BAP, KIN ve TDZ içeren şekerli ve şekersiz sıvı MS ortamları kullanılmıştır. Mikroçoğaltım için yapılan denemeler 8 saat karanlıkta ve 16 saat beyaz floresan ışığı fotoperiyot altında ve $24\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Welander ve ark (2014), mikroçoğaltım için geçici daldırma sisteminde kullanılan Plantform kapları kullanmışlardır. *Digitalis lutea x purpurea*, *Echinacea purpurea* ve *Rubus idaeus* mikroçoğaltım için geçici daldırma sistemine aktarılmıştır. Biyoreaktörde çoğalma oranı ve sürgün kalitesi agar ortamına oranla ya benzer etki yada daha iyi sonuç vermiştir. Sürgün miktarı, *Digitalis* ve *Rubus* için her iki sistemde de benzerlik göstermiştir. *Echinacea*’da önemli derecede kaliteli sürgün miktarı biyoreaktör sisteminde oluşmuştur. Biyoreaktör’de *Digitalis* ve *Echinacea* için yaş ağırlık oranı fazla iken, *Rubus* için ise agar ortamında fazla çıkmıştır. Ancak kuru ağırlık tüm üç tür için iki sistemde de benzerlik göstermiştir. Bu kapların mikroçoğaltımda kullanımının uygun olduğu saptanmıştır.

Gao ve ark (2014), Geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanarak Çin su kestanesinin yüksek etkili çoğaltımını sağlamışlardır. Birçok çalışmada çin su kestanesinin farklı çoğaltma metodları rapor edilmiştir. Şimdiye kadar olan çalışmalarda etkili çoğalma başarılamamıştır. Bu çalışma, çin su kestanesinin bitki

gövdesinden ve rizom kısmından ayrılmış sürgün kısmı, geçici daldırmayla birlikte klasik yarı-katı ortamda incelenmiş ve her 8 saatte bir 15 dakika besin ortamına daldırılmıştır. Elde edilen bulgular, geçici daldırma sisteminin, küçük çin su kestanesi bitkisinin çoğaltımı için güvenli ve etkili metot olduğunu göstermiştir.

Vilchez ve ark (2014), Ticari değeri olan *Adiantum capillus-veneris L.*,’de mikroçoğaltım protokolünü geliştirmişlerdir. Sükroz’un 3 farklı konsantrasyonu (%1.5,%3,%4.5) spor çimlenmesi için denenmiştir. Jel ortamı, sıvı ortam ve geçici daldırma sistemleri uygulanmıştır. Dışarı aktarımda ise taban kısmına solucan gübresi (%0, %0.5, %10) kullanılmıştır. Sporlar da, %1.5 sükroz ile %80.6 oranında çimlenmiştir. En iyi yaş ağırlık ise geçici daldırma sisteminde kaydedilmiştir. Tüm eğreltiler %5-%10 solucan gübresine alınmış ve dışarıya alıştırılmıştır.

Lambardi ve ark (2015), bu çalışmada süs bitkilerinden *Carex oshimensis* ve *Chrysanthemum morifolium* ile meyve türlerinden *Ficus carica* ve *Ribes rubrum* bitkilerinde geçici daldırma sistemi ile sürgünlerin çoğaltımını çalışmışlardır. Platform sistemiyle daha yüksek kalitede bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmada bazı bitkilerin direk köklenme gösterdiklerini ve doğrudan dış koşullara aktarımlarının sağlandığı belirtmişlerdir.

Şimşek ve ark (2016), *Myrtus communis*, güney Avrupanın ve kuzey Afrikanın yerli olduğunu belirtmişlerdir. Akdeniz iklimi olan bölgelerde süs bitkisi olarak kullanıldığını vurgulamışlardır. Bu çalışmada mersin bitkisinin geçici daldırma sistemleriyle çoğalmasını ve köklenmesi incelenmiştir. *Myrtus communis* bitkisinin sürgün uçlarını 1 mg/L BAP içeren MS besiyeri ortamında kültüre almışlardır. Sürgünler agarlı ortamlara ve Platform sistemine aktarmışlardır. Her 6 haftada 1 alt kültür olacak şekilde 3 alt kültür yapmışlardır. Her iki ortamda da çoğalma oranı, bitki boyu, yaprak sayısı, kuru ve taze bitki ağırlığı kriterlerine bakmışlardır. Alt kültürden çıkan sürgünleri 1 mg/L IBA içeren MS ortamına aktarmışlardır ve kök, kök uzunluğu, bitki boyu, kuru ve yaş ağırlığa bakılmıştır. Geçici daldırma sistemi ve agar ortamını karşılaştırmışlardır. Geçici daldırma sisteminde bulunan bitkiler

agarlı ortamda bulunanlara göre daha iyi sonuçlar verdiğini ortaya çıkarmışlardır. Doku kültüründen çıkan bitkileri dış koşullara aktarımı başarılı bir şekilde sağlanmıştır.

Biçen (2017), iki farklı Mersin bitkisinin (*Myrtus communis*), mikroçoğaltımı amacıyla 1 mg/L BAP içeren katı kültür ve geçici daldırma sistemlerini karşılaştırmıştır. Geçici daldırma sisteminde ise 4 saat ve 8 saat daldırma süresi karşılaştırılması incelenmiştir. Mikroçoğaltımı gerçekleştirilen bitkicikleri, 1 mg/L IBA içeren kök ortamına almışlardır. Geçici daldırma sistemindeki bitkilerin katı kültüre oranla daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Geçici daldırma sisteminin, katı kültüre göre az maliyet, az işçilikle kısa zamanda fazla çoğaltım yapılabileceğini belirlemişlerdir.

Cengiz (2018), tez çalışmasında C-35 sitranjı ve Tuzcu 31-31 turuncu anaçlarının, katı kültür ortamları ve Plantform sistemindeki mikroçoğaltımlarını ve köklendirme aşamasındaki karşılaştırmalarını incelemiştir. Katı kültür mikroçoğaltım denemeleri için, MS ve WPM besin ortamları ile BAP (0, 1.0, 2.0 mg/L), Kinetin (0, 0.5, 1.0 mg/L) ve 2IP (0, 1.0, 2.0 mg/L) denenmiştir. Katı kültür köklenme denemeleri için MS, ½ MS, WPM besin ortamları ile NAA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) ve IBA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) denenmiştir. En iyi mikroçoğaltım sonuçları 2.0 mg/L BAP içeren MS besin ortamından ve en iyi köklenme sonuçları ise 0.5 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamından elde edilmiştir. Mikroçoğaltım ve köklenme için belirlenen en iyi besin ortamı içeriği ile Plantform sisteminde çalışılmıştır. Plantform sisteminde katı kültüre göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. SSR markırları ile yapılan tarama sonucunda da Plantform sisteminde çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde herhangi bir genetik açılımın olmadığı belirlenmiştir.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Bitkisel Materyal

Tez çalışması kapsamında, üç farklı eğrelti türünün gametofit yapıları, bitkisel materyal olarak kullanılmıştır. Bunlar; *Asplenium trichomanes* L. sensu lato (Balıkesir, Denizli, Antalya), *Asplenium scolopendrium* L. subsp. *Scolopendrium* (Antalya, Mersin, Adana), *Asplenium ceterach* L. subsp. *ceterach* (Mersin, Adana, Osmaniye)'dir.

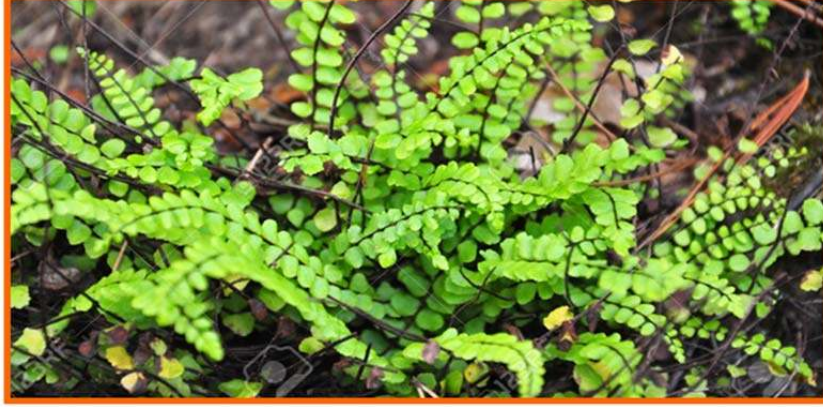
Gametofitler, sporların nemli ortamlarda çimlenmesi ile meydana gelmiş olan ve üzerlerinde erkek (anteridyum) ve dişi (arkegonyum) bireyleri bulunduran hermofrodit yapıdaki oluşumlardır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Gametofit evredeki eğrelti otunun görünümü

3.1.1. *Asplenium trichomanes*

Bitki, 5-25 cm küme şeklindedir. Yapraklar linear, 1-pinnat, 3-8 cm petiol ve eksen eflatun-kahverenkli. Kayalıklarda görülen kumlu-tınlı topraklarda yetişirler. Çok yıllık bitkilerdir. *Asplenium trichomanes* eğrelti türüne ait görüntü Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. *Asplenium trichomanes* eğreltisi doğadaki görünümü (https://www.123rf.com/profile_rbiedermann)

3.1.2. *Asplenium scolopendrium*

Bu türün boyu 20-50 cm'dir. Yapraklar küme şeklinde, petiol çok kısa ve zarımsı pullarla örtülü, lamina düz, basit ve kayış şeklindedir. Soruslar kayık biçimli ve uzamış, orta damarın her iki yanında eğik dizilişlidir. Ormanlık alanlarda nemli ve gölgeli kayalıkların altında yetişen nadir yayılışlı bir eğreltidir. *Asplenium scolopendrium* eğreltisine ait görüntü Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. *Asplenium scolopendrium* eğreltisinin doğadaki görünümü (<https://www.gardeningexpress.co.uk/e15176-asplenium-scolopendrium-harts-tongue-fern-phyllitis>)

3.1.3. *Asplenium ceterach*

Bitki 10-12 cm'dir. Nemli kayaların yarıklarında ve eski duvarlarda büyür.

Yapraklar kalın, üzeri açık yeşil, yaprakların alt kısmı yoğun ölçüde pas rengi ve pulludur. *Asplenium ceterach* eğrelti türüne ait görüntü Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4. *Asplenium ceterach* eğreltisinin doğadaki görünümü

3.2. Metod

Tez çalışmasında, *in vitro* koşullarda yürütülen denemeler ve dış ortama aktarma işlemleri, Ç.Ü. Biyoteknoloji Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

TAGEM 13 ARGE-20 ve TUBİTAK-TEYDEB 5140026 nolu proje kapsamında spor eksplantlarından elde edilen gametofitler, bitkisel başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

3.2.1. Katı Kültür Denemeleri ile Gametofit Evredeki Eksplantların Çoğaltılması

Gametofit evrede olan eksplantlar, bitki büyüme düzenleyicisi bulunmayan, 20 gr sukroz, 0.5 g/L aktif karbon, 2 g/L gelrite içeren 1/2 MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamına aktarılmıştır. Ortamın pH'sı 5.6-5.7

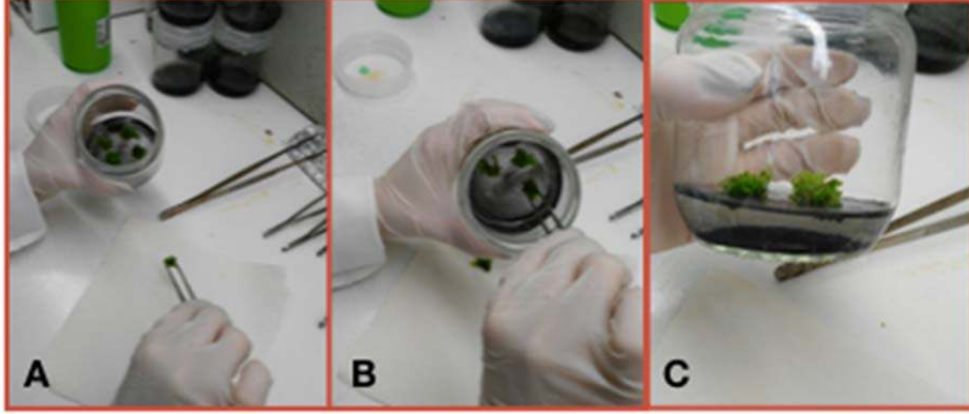
olacak şekilde ayarlanmıştır. Aktarılan gametofit evredeki eksplantların, 6 haftada bir alt kültürleri yapılmıştır. 1/2 MS besin ortamı içeriği Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. 1/2 MS Besin Ortamının İçeriği

Makro Elementler (1/2 MS)	(mg/L)
KNO ₃	950
MgSO ₄ x 7H ₂ O	185
CaCl ₂ x 2H ₂ O	220
NH ₄ NO ₃	825
KH ₂ PO ₄	85
Mikro elementler (1/2 MS)	(mg/L)
H ₃ BO ₃	3.1
MnSO ₄ x 1H ₂ O	8.45
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	5.3
KI	0.415
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.0125
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.125
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.0125
Diğer Maddeler	(g/L)
Aktif Karbon	0.5
Sükroz	20
Gelrite	2

3.2.2. Klasik Doku Kültürü Yöntemleriyle Gametofit Evredeki Eksplantların Sporofit Evresine Geçiş Denemelerinin Kurulması

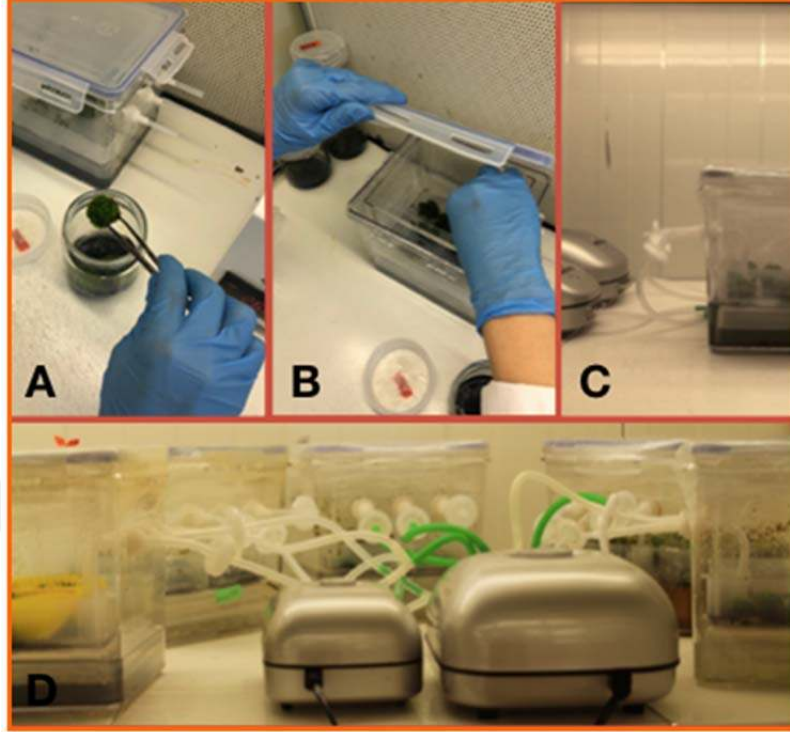
Klasik doku kültürü yöntemleri ile gametofit evredeki eksplant kümeleri, 1/2 MS besin ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.5). Bitki büyüme düzenleyicilerinden NAA (0.1, 0.5 mg/L), BA (1.0 mg/L) ve KIN (1.0 mg/L) kombinasyonları uygulanmıştır. Besin ortamları içerisine 20 g/L sükroz, 0.5 g/L aktif karbon, 2 g/L gelrite eklenmiştir. Ortamların pH’sı 5.6-5.7’ye ayarlanmıştır. Hazırlanacak besin ortamı, her kültür kabına 50 ml olacak şekilde dağıtılmış ve her kültür kabına 4’er kümecik konulmuştur. Aktarılan eksplantlar, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve 25 °C olacak şekilde ayarlanmış büyütme odalarında kültüre alınmışlardır. Her 4 haftada bir, aynı besin içeriği hazırlanarak alt kültür işlemleri yapılmıştır.



Şekil 3.5. Gametofit evredeki materyallerin katı kültür denemesinde kavanozlara aktarımı

3.2.3. Geçici Daldırma Yöntemi ile Sporofite Geçiş Denemelerinin Kurulması

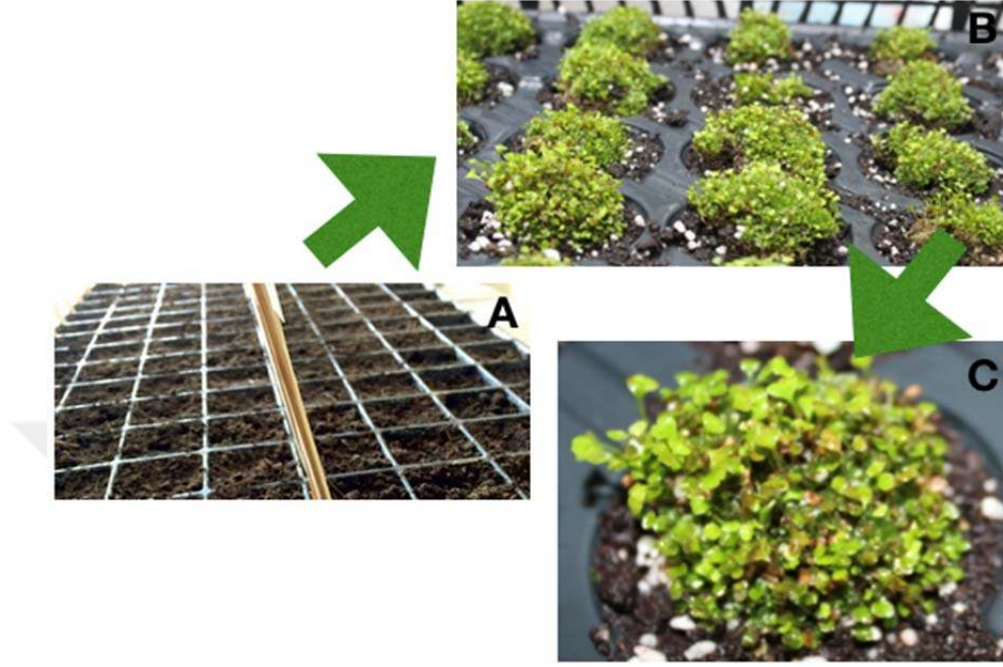
Üç türün eksplantları klasik doku kültüründe 1/2 MS besiyeri içeren bitki büyüme düzenleyicisiz ortama aktarılmıştır. Eksplantların bir kısmı katı ortamda gelişme gösterirken, diğer kısmı ise Plantform sistemine aktarılmıştır. Sistemin optimizasyonunda, *Asplenium trichomanes* türü kullanılmıştır. Sistem her 3 ve 6 saatte 10'ar dk. daldırma, 3 saatte bir 15 dk. havalandırma olacak şekilde ayarlanmıştır ve 24 °C sıcaklıkta 8 saat karanlık 16 saat aydınlık ortamdaki büyütme odasında kültüre alınmıştır. Eğrelti bitkileri Plantform kültür kaplarında 8 hafta süresince kültüre alınmıştır (Şekil 3.6). Sporofit denemelerinden sonra Plantformda gelişen gametofitlere, 3 saat ve 6 saat daldırma sıklığı olan kültür kapları içinde bulunan 1/2 MS besiyerine 1.0 mg/L IBA eklenmiştir.



Şekil 3.6. Hormonsuz ortamda çoğaltılan gametofitlerin Plantform sistemine aktarımı

3.2.4. Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması

Gametofit evrede bulunan bitkicikler sporofite dönüşmüş ancak köklenmemişlerdir. Bu yüzden sporofit evrede olan bitkicikler, 1.0 mg/L IBA ve fungusit çözeltilerine batırılarak steril 2:1 torf perlit karışımı bulunan viyollere aktarılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Gelişen gametofitlerin dış koşullara aktarılması A: Gametofitlerin aktarılacağı torf-perlit karışımı B: Gametofitlerin dikilmesi C: Gametofit evrenin sporofit evredeki gelişimi

3.2.5. Deneme Deseni, İstatiksel Analiz ve İncelenen Kriterler

Asplenium trichomanes, *Asplenium scolopendrium* ve *Asplenium ceterach* eğreltilerinin, gametofit evreden sporofit evreye geçişini sağlamak amacıyla denemeler faktöriyel düzende tesadüf parsellerinde 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Eğreltilerin gametofit evreden sporofit evreye geçişini sağlamak amacıyla yapılan bu tezde, katı kültür ile Plantform sisteminin bitkiye dönüşüm sayısı, bitki ağırlığı ve bitki kalitesine etkileri incelenmiştir. Gametofit ağırlığı için katı kültür denemelerinde 3 alt kültürün ortalamaları alınmıştır. Bu denemede gametofitler 5 haftada bir alt kültüre alınmışlardır. Plantform sisteminde ise gametofitler 8 haftada bir alt kültüre aktarılmışlardır. Alt kültür sonrasında 13'er gametofit incelenmiştir. Bu iki sistemde gametofitlerin sporofite dönüşümü (bitkicik/kavanoz), bitki ağırlığı (g) ve gametofitlerin genel durumlarına ait

kriterler incelenmiştir. Bu denemedeki verilerin analizi için JMP 8.01 programı kullanılmıştır. Çalışma sonucunda ulaşılan verilere varyans analizleri ve t testi uygulanmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında, *Asplenium trichomanes* L., *Asplenium scolopendrium* L., *Asplenium ceterach* L. genotiplerinin *in vitro* koşullarda gametofitten sporofite geçişinin sağlanması ve köklenmesi üzerine katı 1/2 MS besin ortamının ve Plantform sisteminin etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Çalışmada, Plantform sisteminde *Asplenium trichomanes* için 3 saatte bir 10 dk ve 6 saatte bir 10 dk olmak üzere 2 farklı daldırma süresi uygulanmıştır. Her iki kültür kabı için 3 saatte 15 dk havalandırma yapacak şekilde sistem ayarlanmıştır. En iyi gelişim 3 saatte bir 10 dk daldırma süresi, 6 saatte 10 dk'daki kültür kabında gözlemlenmiştir. Kültür kapları, *Asplenium scolopendrium* ve *Asplenium ceterach* için ise 3 saatte bir 10 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen sporofit bitkiler dış koşullara alıştırılmıştır.

4.1. Katı Kültür Denemelerine Ait Bulgular

Tez kapsamında gametofit evreden sporofit evreye geçiş denemelerinde ön çalışma olarak NAA (0, 1.0 mg/L), BA (0, 0.5, 1 .0 mg/L) ve GA₃ (0.5 mg/L) kombinasyonlarını içeren 1/2 MS besin ortamında sporofit sayısı (bitkicik/kavanoz) ve sporofit boyu (cm) parametrelerine bakılmıştır. Ana deneme olarak NAA(0.1-0.5 mg/L), BA(1.0 mg/L) ve KIN(1.0 mg/L) kombinasyonlarını içeren 1/2 MS besin ortamı kullanılarak gametofitler'in *in vitro*'da gelişimleri gözlemlenmiştir. Denemelerinde türlere ait sporofite (bitkicik) dönüşüm sayısı ve gametofit ağırlığı (g) parametreleri incelenmiştir.

4.1.1. *Asplenium trichomanes* Genotipine Ait Katı Kültür Bulguları

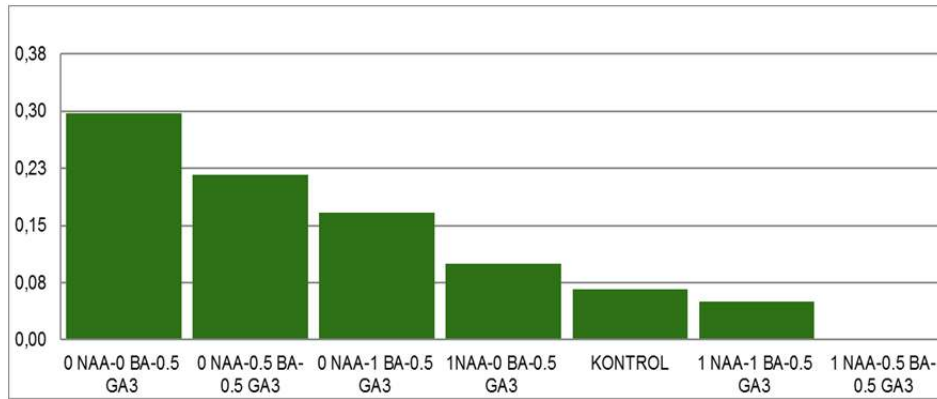
Asplenium trichomanes eğreltisinde ön çalışma sonrası katı kültürde farklı hormon konsantrasyonlarının sporofit (bitkicik/kavanoz) sayısı üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.1). *Asplenium trichomanes* eğreltisinde ise Giberellik Asit (GA₃)'in etkisi önemli bulunmuştur. Çizelge 4.1'e

bakıldığında en fazla sporofit sayısı, 0.30 (bitkicik) ile 0.5 mg/L GA₃ içeren besin ortamında saptanmıştır. Çalışılan 7 konsantrasyonun 6'sında gametofit evreden sporofit evreye geçiş sağlanırken 1 konsantrasyonda gelişim gözlenmemiştir (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. *Asplenium trichomanes* eğreltisinin katı kültür ön çalışma denemesinde sporofit sayısına (bitkicik/kavanoz) ait veriler

Bitki Büyüme Düzenleyici (mg/L)	<i>Asplenium trichomanes</i> Sporofit Sayısı
0 NAA, 0 BA, 0.5 GA ₃	0,30
0 NAA, 0.5 BA, 0.5 GA ₃	0,22
0 NAA, 1.0 BA, 0.5 GA ₃	0,17
1.0 NAA, 1.0 BA, 0.5 GA ₃	0,10
Kontrol (0 NAA, 0 BA, 0 GA ₃)	0,07
1.0 NAA, 1.0 BA, 0.5 GA ₃	0,05
1.0 NAA, 0.5 BA, 0.5 GA ₃	0,00

LSD_{Ortam} : Ö.D.



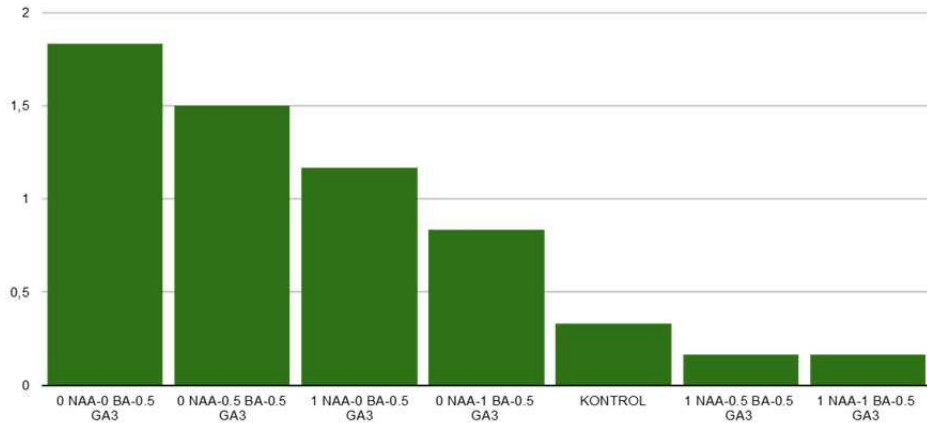
Şekil 4.1. *Asplenium trichomanes* sporofit sayısı (bitkicik/kavanoz)

Asplenium trichomanes eğreltisinde farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin sporofit boyu üzerine etkisi Çizelge 4.2’ de sunulmuştur. Bitki boyu verileri incelendiğinde, bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. En yüksek bitki boyu, 1.83 cm ile 0,5 mg/L GA₃ içeren besin ortamında görülmüştür (Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. *Asplenium trichomanes* eğreltisinde katı kültüründen elde edilen sporofitlerin boyu’na (cm) ait veriler

Bitki Büyüme Düzenleyici (mg/L)	<i>Asplenium trichomanes</i> Sporofit Boyu
0 NAA, 0 BA, 0.5 GA ₃	1,83
0 NAA, 0.5 BA, 0.5 GA ₃	1,50
1.0 NAA, 0 BA, 0.5 GA ₃	1,17
0 NAA, 1.0 BA, 0.5 GA ₃	0,83
Kontrol	0,33
1.0 NAA, 0.5 BA, 0.5 GA ₃	0,17
1.0 NAA, 1.0 B, 0.5 GA ₃	0,17

LSD Ortam : Ö.D.



Şekil 4.2. *Asplenium trichomanes* eğreltisinin sporofit uzunluğu (bitkicik/kavanoz)

Ana deneme olarak *Asplenium trichomanes* eğreltisinde farklı büyüme düzenleyicilerinin gametofit ağırlığı üzerine etkisi Çizelge 4.3’de verilmiştir. Bitki ağırlığı verilerine bakıldığında, bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Su ve bitki büyüme düzenleyicilerini bünyesine alan en iyi konsantrasyon, 1mg/L BA ve 0.5mg/L NAA (6.76 a) olarak belirlenmiştir. Bunu, sırasıyla 1 mg/L KIN, 0.5 mg/L NAA (5.52a) ve 1 mg/L BA, 0.1 NAA (4.76a) içeren ortamlar takip etmiştir (Şekil 4.4). *Asplenium trichomanes* eğreltisinin katı kültürde genel görünümü Şekil 4.3’de verilmiştir.

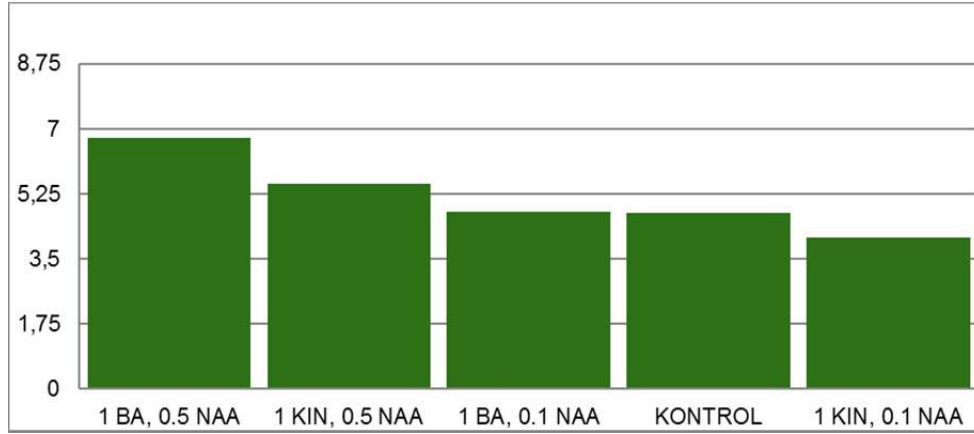


Şekil 4.3. *Asplenium trichomanes* eğreltisinin katı kültür gametofit yapısı

Çizelge 4.3. *Asplenium trichomanes* katı kültür gametofit ağırlığına (g) ait veriler

Bitki Büyüme Düzenleyici (mg/L)	<i>Asplenium trichomanes</i> Gametofit Ağırlığı
1.0 BA, 0.5 NAA	6,76
1.0 KIN, 0.5 NAA	5,52
1.0 BA, 0.1 NAA	4,76
Kontrol	4,75
1.0 KIN, 0.1 NAA	4,07

LSD Ortam : Ö.D.

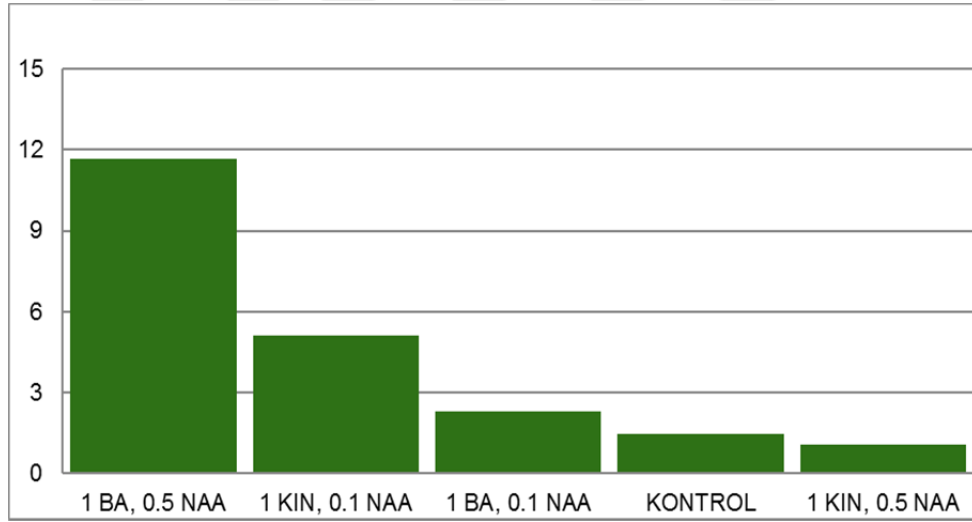
Şekil 4.4. *Asplenium trichomanes* gametofit ağırlığı (g)

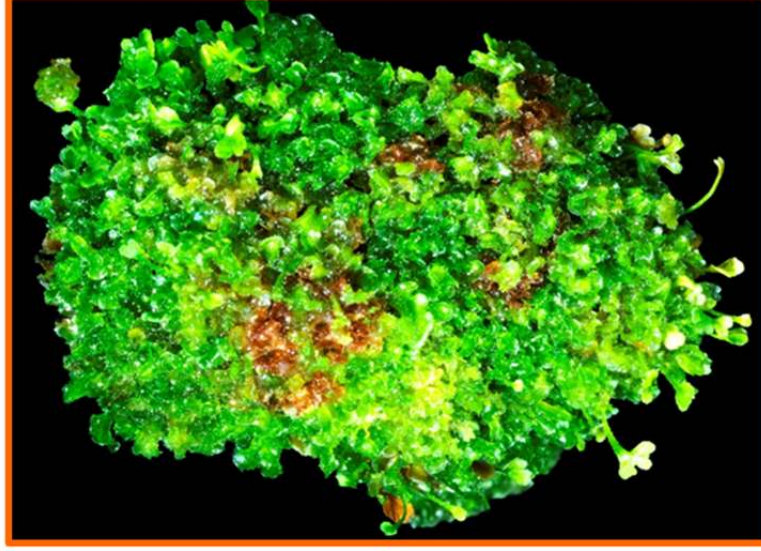
Asplenium tricomones eğreltisinde farklı büyüme düzenleyicilerinin sporofit sayısı (bitkicik/kavanoz) üzerine etkisini gösteren sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir. Farklı konsantrasyondaki bitki büyüme düzenleyicileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. En iyi sporofit sayısı (11.67 bitkicik/kavanoz), 1 mg/L BA ve 0.5mg/L NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.5). *Asplenium trichomanes* eğreltisinde gametofit evreden sporofit evreye dönüşümü Şekil 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.4. *Asplenium trichomanes* türünde katı kültürde gametofitlerin sporofite dönüşme sayısına (bitkicik/kavanoz) ait veriler

Bitki Büyüme Düzenleyici (mg/L)	<i>Asplenium trichomanes</i> sporofit sayısı
1.0 BA, 0.5 NAA	11,67 a
1.0 KIN, 0.1 NAA	5,10 b
1.0 BA, 0.1 NAA	2,30 b
Kontrol	1,47 b
1.0 KIN, 0.5 NAA	1,07 b

LSD Ortam : 5.59***

Şekil 4.5. *Asplenium trichomanes* eğreltisinin katı kültürde sporofit sayısı (bitkicik/kavanoz)



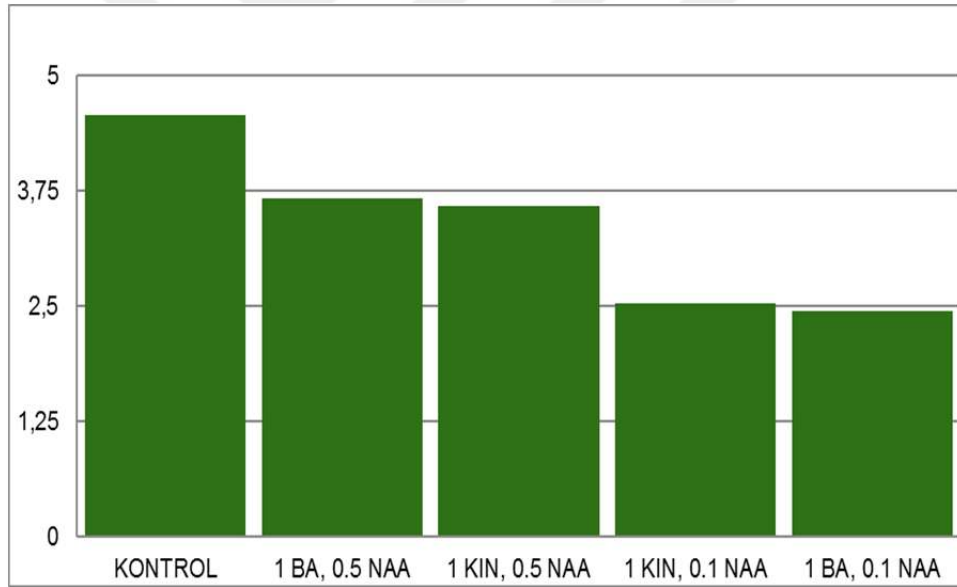
Şekil 4.6. *Asplenium trichomanes* katı kültürde gametofit evreden sporofite evreye dönüşümü

4.1.2. *Asplenium scolopendrium* Genotipine Ait Katı Kültür Bulguları

Asplenium scolopendrium eğreltisine ait katı kültürde bitki büyüme düzenleyicilerinin gametofit küme ağırlığı üzerine olan etkilerini gösteren veriler Çizelge 4.5’te sunulmuştur. Bitki büyüme düzenleyicilerinin gametofit ağırlığı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır fakat *Asplenium scolopendrium* eğreltisinde gametofitlerin en iyi gelişimi hormonluların yanı sıra hormonsuz besi ortamında sağlanmıştır (Şekil 4.7). En iyi besin ortamları sırasıyla kontrol ortamı (4.57a), 1mg/L BA + 0.5mg/L NAA (3,66ab) ve 1mg/L KIN + 0.5mg/L NAA (3,58ab) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. *Asplenium scolopendrium* türünde katı kültür gametofit ağırlığına (g) ait veriler

Bitki Büyüme Düzenleyici (mg/L)	<i>Asplenium scolopendrium</i> Gametofit Ağırlığı(g)
Kontrol	4,57
BA-1.0, NAA-0.5	3,66
KIN-1.0, NAA 0.5	3,58
KIN-1.0, NAA 0.1	2,53
BA-1.0, NAA-0.1	2,45

LSD_{Ortam} : Ö.D.Şekil 4.7. *Asplenium scolopendrium* eğreltisinin katı kültürde gametofit ağırlığı (g)

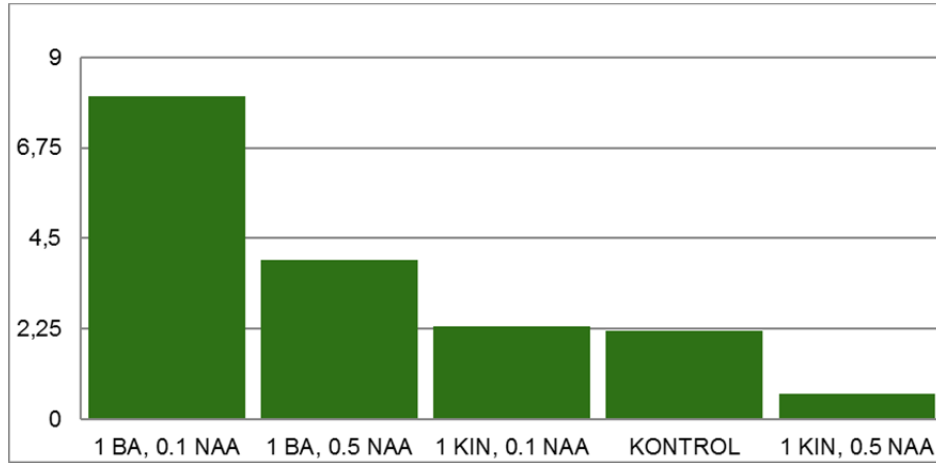
Asplenium scolopendrium eğreltisine ait katı kültür bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarının sporofit sayısı üzerine etkileri Çizelge 4.6'da ve Şekil 8'de verilmiştir. Bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarının *Asplenium scolopendrium*'da sporofit sayısına etkisi istatistiksel olarak önemli olmamasının

yanı sıra, en yüksek sporofit sayısı verileri 1mg/L BA + 0.1mg/L NAA'da (8.03a) (bitkicik) ve 1mg/L BA + 0.5mg/L NAA (3.97ab) (bitkicik) içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. *Asplenium scolopendrium* eğreltisine ait katı kültürde gelişen bitki görüntüleri Şekil 4.9 ve 4.10'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. *Asplenium scolopendrium* türünde katı kültür sporofit sayısına (bitkicik/kavanoz) ait veriler

Bitki Büyüme Düzenleyici (mg/L)	<i>Asplenium scolopendrium</i> - Sporofit Sayısı
1.0 BA, 0.1 NAA	8,03
1.0 BA, 0.5NAA	3,97
1.0 KIN, 0.1 NAA	2,30
Kontrol	2,20
1.0 KIN, 0.5 NAA	0,63

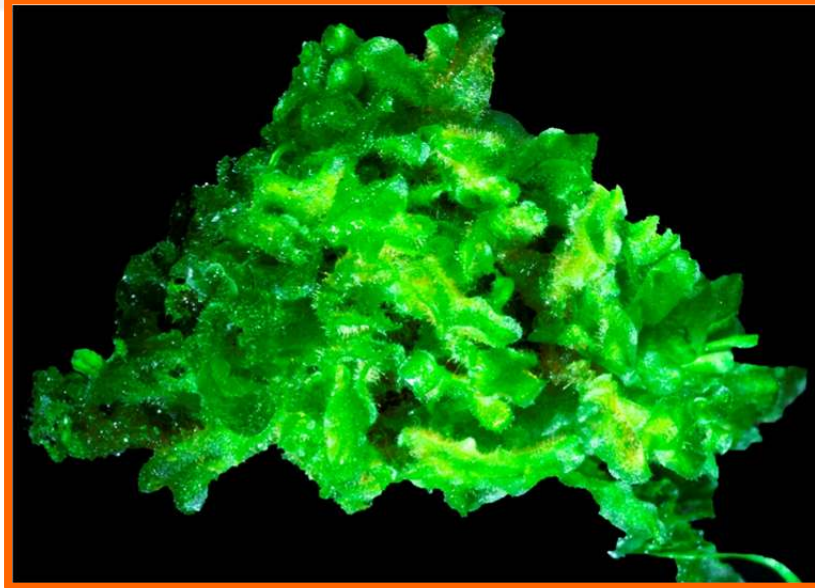
LSD Ortam : Ö.D.



Şekil 4.8. *Asplenium scolopendrium* katı kültürde sporofit sayısı (bitkicik/kavanoz)



şekil 4.9. *Asplenium scolopendrium* eğreltisinin gametofit evredeki genel görünümü



şekil 4.10. *Asplenium scolopendrium* eğreltisinin gametofit evredeki farklılaşması

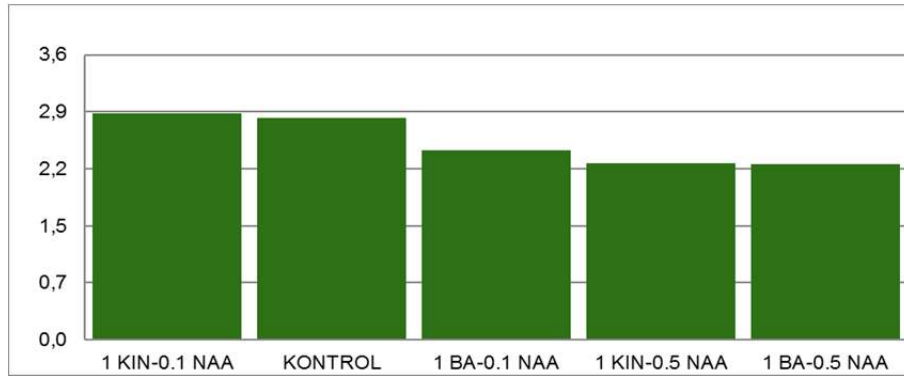
4.1.3. *Asplenium ceterach* Genotipine Ait Katı Kültür Bulguları

Asplenium ceterach eğreltisinde farklı hormon konsantrasyonlarının gametofit ağırlığı üzerine olan etkileri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin gametofit küme ağırlığı üzerine olan etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Bitki büyüme düzenleyicilerinin gametofit evrede olan kümelerinin sporofit evreye geçişi sağlanamadığı için bitkiciğe dönüşüm sağlanamamıştır. *Asplenium ceterach* eğreltisinde gametofitler besinleri ve hormonları bünyesine eşit bir şekilde aldığı Şekil 4.11’de verilmiştir. *Asplenium ceterach* eğreltisine ait katı kültür görüntüsü Şekil 4.12 ve 4.13’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. *Asplenium ceterach* türünde katı kültür gametofit ağırlığına (g) ait veriler

Bitki büyüme Düzenleyici (mg/L)	<i>Asplenium ceterach</i> - Gametofit Ağırlığı
1.0 KIN, 0.1 NAA	2,88
Kontrol	2,82
1.0 BA, 0.1 NAA	2,40
1.0 KIN, 0.5 NAA	2,25
1.0 BA, 0.5 NAA	2,23

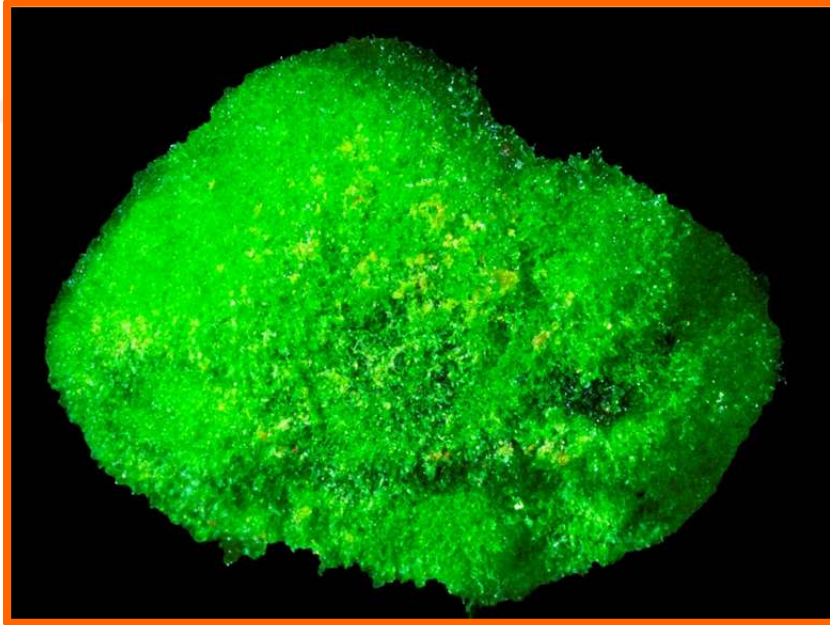
LSD Ortam : Ö.D.



Şekil 4.11. *Asplenium ceterach* katı kültür gametofit ağırlığı (g)



Şekil 4.12. *Asplenium ceterach* eğreltisinin katı kültürdeki genel görünümü



Şekil 4.13. *Asplenium ceterach* eğreltisinin katı kültürdeki gametofit yapısı

4.2. Geçici Daldırma Sistemi (Plantform) Denemelerine Ait Bulgular

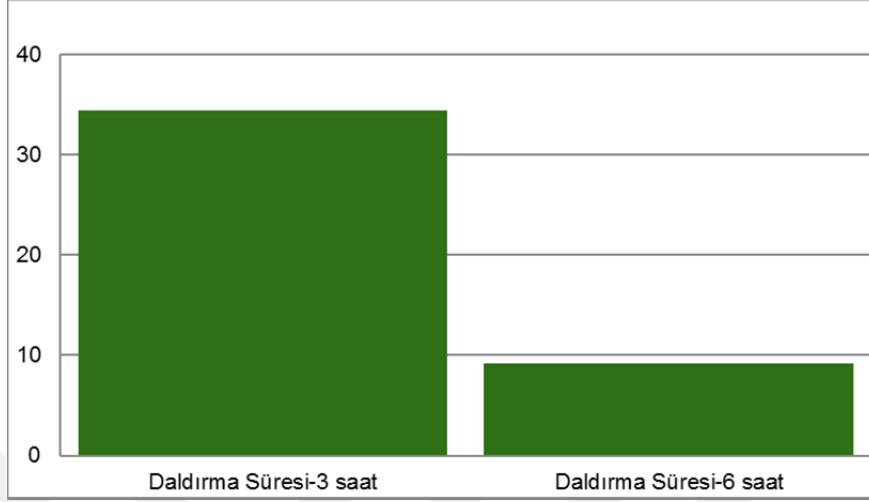
Katı kültür denemeleri sonucu elde edilen verilere göre geçici daldırma sisteminde, hormonsuz 1/2 MS ortamı kullanılmıştır. *Asplenium trichomanes* eğreltisinde 3 saat ve 6 saat olmak üzere iki farklı daldırma süresi denenmiştir. Gametofit küme ağırlıklılıklarına bakılarak katı kültürle geçici daldırma sisteminin verileri karşılaştırılmıştır.

4.2.1. *Asplenium trichomanes* Genotipinde Plantform Bulguları

Asplenium trichomanes eğreltisinde daldırma sürelerinin gametofit kümelerine olan etkilerine bakılmıştır. 2 farklı daldırma süresinin arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8). Geçici daldırma sisteminde 3 saat daldırma süresinde en başarılı sporofite geçiş sağlanmış olup, bitki kalitesi de oldukça iyi bulunmuştur (34.37a). Daldırma süresi 6 saat olan bitkilerde sararmalar meydana gelmiş ve sporofite geçiş oranı daha düşük bulunmuştur (9.15b). Katı kültür ve Plantform sistemi daldırma süresinin sporofit oluşumu etkisi karşılaştırılması Şekil 4.14’de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. *Asplenium trichomanes* eğreltisine ait Plantform sürelerinin karşılaştırılması

Daldırma Süresi	<i>Asplenium trichomanes</i> Sporofit Sayısı
Plantform-3saat	34,37 a
Plantform-6saat	9,15 b

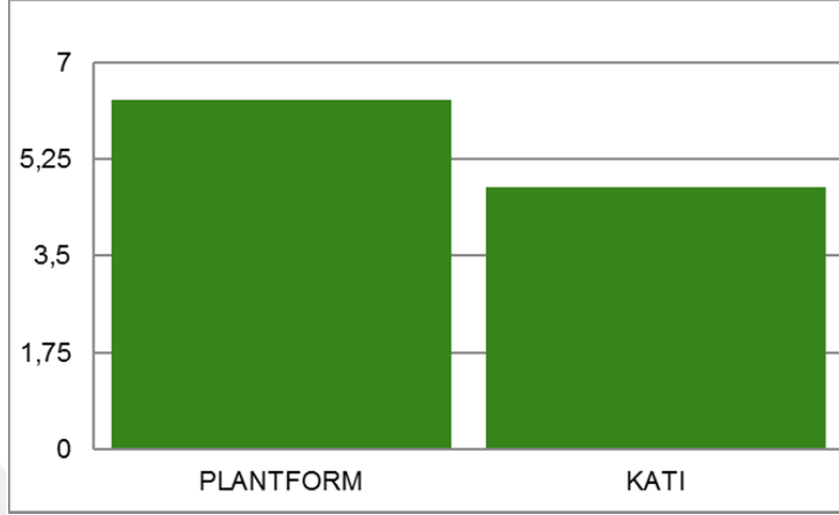


Şekil 4.14. *Asplenium trichomanes* eğreltisinde daldırma sürelerinin sporofit sayısına (bitkicik/kavanoz) etkisi

Asplenium trichomanes eğreltisinde geçici daldırma sistemi (Plantform) ve katı kültür karşılaştırılmasına bakıldığı zaman, aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.9). Plantform sisteminde bitki ağırlığı 6.32a g iken, katı kültürde 4.74 g elde edilmiştir. Plantform sisteminin bitki kalitesi daha canlı ve yeşil olarak gözlenirken, besin ortamındaki elementlerin bünyesine alınması da, katı kültür denemesine göre daha iyi olarak saptanmıştır (Şekil 4.15). *Asplenium trichomanes* eğreltisinin gametofit evreden sporofit evreye dönüşümün Plantform sistemindeki gelişimi Şekil 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. *Asplenium trichomanes* eğreltisine ait Plantform ve katı kültür gametofit ağırlığı (g) sonuçları

	<i>Asplenium trichomanes</i> Gametofit Ağırlığı (g)
Plantform	6,32a
Katı Kültür	4,74b



Şekil 4.15. *Asplenium trichomanes* eğrelti türünün gametofit ağırlıklarının karşılaştırılması



Şekil 4.16. *Asplenium trichomanes* türünün Plantform sistemindeki gelişimi

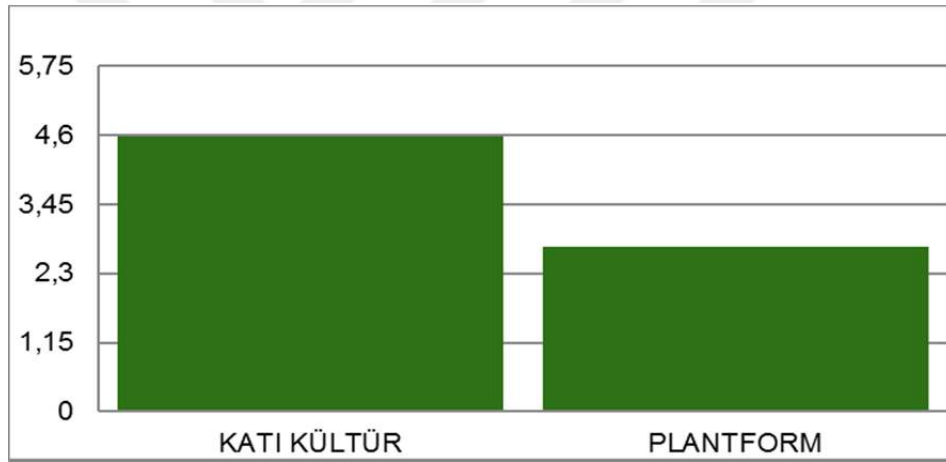
4.2.2. *Asplenium scolopendrium* Genotipine Ait Plantform Bulguları

Asplenium scolopendrium eğreltisinde geçici daldırma (PlanForm) sistemi ile katı kültür denemesindeki bitkilerin ağırlıklarının karşılaştırılması Çizelge 4.10 'da sunulmuştur. Katı kültür ve Plantform sistemi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Gametofit ağırlık katı kültürde 4.57 g olarak bulunurken, Plantform sisteminde 2.75 g olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17). *Asplenium scolopendrium*

eğreltisinin Plantform sisteminde daha dayanıklı ve daha kompakt yapıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18).

Çizelge 4.10. *Asplenium scolopendrium* eğreltisine ait Plantform ve katı kültür gametofit ağırlığı (g) sonuçları

	<i>Asplenium scolopendrium</i> Gametofit Ağırlığı (g)
Katı Kültür	4,57 a
Plantform	2,75 a



Şekil 4.17. *Asplenium scolopendrium* eğreltisinin katı kültür ve Plantform'da gametofit ağırlıklarının (g) karşılaştırılması



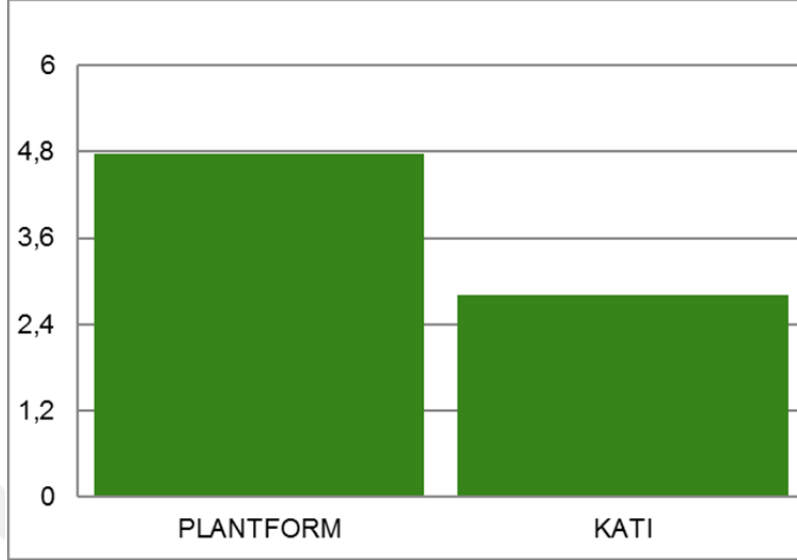
Şekil 4.18. *Asplenium scolopendrium* türünün Plantform sistemindeki gelişimi

4.2.3. *Asplenium ceterach* Genotipine Ait Plantform Bulguları

Asplenium ceterach eğreltisinde gametofit evrede olan kümelerin ağırlıkları katı kültür ve Plantform sistemlerinde karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.11). Geçici daldırma sistemi ve katı kültürden alınan sonuçlar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. En iyi gametofit küme ağırlığı 4.76a ile Plantform sisteminden elde edilirken, katı kültürde 2.81a olarak belirlenmiştir (Şekil 4.19). Gametofit kümelerin PlanForm sistemde daha kaliteli ve yeşil olduğu Şekil 4.20’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. *Asplenium ceterach* eğreltisine ait Plantform ve katı kültür gametofit ağırlığı (g) sonuçları

	<i>Asplenium ceterach</i> Gametofit Ağırlığı (g)
Plantform	4,76 a
Katı Kültür	2,81 a



Şekil 4.19. *Asplenium ceterach* eğreltisinin katı kültür ve Plantform sisteminde gametofit ağırlıklarının (g) karşılaştırılması



Şekil 4.20. *Asplenium ceterach* türünün Plantform sistemindeki gelişimi

4.3. Dış Koşullara Alıştırma

Tez kapsamında, Plantform sisteminde 2 farklı daldırma süresinde gelişen *Asplenium trichomanes* bitkileri dış koşullara adapte edilmiştir. Dış koşullara aktarılan bitkilerin yaşama oranları incelendiğinde %100 olarak gözlemlenmiştir. Katı kültürdeki sporofitlerin gelişim oranı düşük olduğu için dış koşullara aktarılamamıştır. Şekil 4.21’de dış koşullara bitkilerin aktarımı gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Plantform sisteminde gelişim gösteren *Asplenium trichomanes* türünde aklimatizasyon

Yürütülen tez çalışmasında explant olarak gametofitler kullanılmış ve yapılan çalışmalar temel alınarak 1/2 MS besi yeri kullanılmıştır. MS besi yerinin yanı sıra gametofitlere hormon konsantrasyonlarının etkisinin daha önemli olduğu saptanmıştır. Türlerin, aynı besi ortamında gelişimlerinin farklı olduğu gözlemlenmiştir. Diğer çalışmalarda da düşük dozlarda kullanılan NAA'nın gametofitlerin sporofite geçişlerinde uyartımlarını sağladığı görülmektedir. Katı kültür denemelerinde *Asplenium trichomanes* ve *Asplenium scolopendrium*'da gametofitten sporofite dönüşümü sağlayan en iyi ortamın 1 mg/L BA ve 0.1 mg/L NAA içeren 1/2 MS olduğu saptanmıştır. **Goller ve Rybczynski, (2007)**'nin yapmış oldukları çalışmada; farklı cinslere ait 16 eğrelti türünde spor kültürü için MS besi yeri kullanılmıştır. Spor çimlenme süresinde türler arasında farklılık görülmüş ve çimlenme süresi ortalama 16 hafta olarak belirlenmiştir. **Chang ve ark, (2007)** *Drynaria fortunei* eğrelti türünde en yüksek çimlenme oranı, 1/2 MS bazal ortamında meydana gelmiştir. **Khan ve ark, (2008)** Klasik yöntemler ile üretilmesi zor olan *Asplenium nidus*'un *in vitro*'da 1/2 MS besi yerinde mikroçoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Başlangıç materyali olarak sporlar kullanılmış ve ± 25 °C karanlıkta muhafaza edilmiştir. Sporlar 12 haftada çimlenmiş ve gametofitler saptanmıştır. Gametofitler, içerisinde NAA (0.1-0.5 mg/L) ve BAP (1-4 mg/L) bulunan 1/2 MS besi yerine aktarılmış ve çoğaltımı sağlanmıştır. MS besi

yerine Mono sodyum fosfat (NaH_2PO_4) ilavesinin gametofitik evreden sporofitik evreye geçişte büyük bir rol oynadığı saptanmıştır. Köklenme için 2.0 mg/L IBA'nın en etkin olduğu belirlenmiştir. **Winarto ve Da silva, (2012)** Gametofit evrede ve sonrasında sporofit gelişiminin incelenmesi amacıyla bitkicikler, PNT-2 besi yerinde kültüre alınmış ve en yüksek farklılaşmanın meydana geldiği saptanmıştır. **Ludwik ve ark, (2008)** Son zamanlarda *in vitro* çoğaltım ve ex sitü koruma yöntemleri, nesli tükenmekte olan popülasyonların gen bankalarını oluşturmaya imkan sağlamışlardır. *Asplenium adulterinum* eğreltisinde en etkin çimlenme, hormonsuz 1/2 MS ortamında olur iken, sporofit oluşumu için en etkili ortamın ise 1 mg/L KIN ve 0.1 mg/L NAA içeren 1/2 MS olduğu belirtilmiştir. **Kodym ve ark, (2016)** *Pteridium esculentum* sporları yaz mevsimi bitiminde toplanmış ve *in vitro*'da 1/2 MS ve %0.15 aktif karbonlu ortamda çimlendirilmiştir. Aynı ortamda hızlıca kıvrımlı şekilde gametofit yapı oluşmuştur. **Winarto ve Da silva, (2012)** *Rumohra adiantiformis* eğreltisinde mikroçoğaltım protokolü geliştirilmiştir. Başlangıç eksplantı olarak rizomlar kullanılarak, 0.25 mg/l 2.4D, 0.2 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA, 0.5 mg/l TDZ ve 30 g/l sukroz içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Yeni üretilmiş rizomların çoğaltım oranı, 0.05 mg/l IAA, 0.25 mg/l BA, 0.5 mg/l KIN, 1 g/l aktif kömür ve 20 g/l sukroz içeren 1/2 MS ortamında 5.7 rizom/eksplant artış göstermiştir.

Ambrósio (2004)'nın yaptıkları çalışmada *Nephrolepis biserrata* eğrelti türünün *in vitro*'da sukroz ve pH etkileşimlerini incelemişlerdir. Stolon segmentlerini, 0, 15, 30, 45, 60 g/L sukroz ve 3, 5, 7 ve 9 pH aralıklarında yarı-katı MS besi yerinde kültüre almışlardır. Ortamda sukroz olmadığı zaman sürgün ve yaprak rejenerasyonunun azaldığı saptanmıştır. Besi yerine sukroz ilavesi ile pH 5 ve 7'de, sürgün sayısının her eksplant başına ortalama ve maksimum 51.25 ve 38.25 değerlerine ulaştığı belirlenmiştir. Sukroz oranları, 15-45 g/L aralığında iken, yaprak uzunluğunda artış olduğu gözlenmiştir; ancak besi ortamındaki pH 9 olduğunda kuru madde ağırlığı etkilenmezken, yeni yaprakların oluşumu için de yeterli olmadığı saptanmıştır. Genç sporofitlerin dışarı aktarımı başarılı bir şekilde

sonuçlanmıştır . **Chang ve ark, (2007)**, *Drynaria fortunei* eğrelti türünde *in vitro* koşullarda spor çimlenmesi, erken gametofit gelişim ve üreme fazındaki değişim üzerine pH'nın ve ışık spektrumlarının etkilerini araştırmışlardır. *D. fortunei*'nin sporları, pH3.7 ile 9.7 arasında oluşmuştur. En yüksek çimlenme oranı (%63.3), beyaz ışık altında pH 7.1'de %2 sukroz içeren 1/2 MS bazal ortamında meydana gelmiştir.

W. Alpina Asplenium cuneifolium, *Woodsia* genus, *Polypodium vulgare*, *Woodsia ilvensis*, *Asplenium adulterinum* ve *Asplenium septentrionale* eğreltilerinde *in vitro* mikroçoğaltım, dış koşullarda koruma ve gen bankalarının oluşturulması çalışmaları yapılmıştır. Gametofit gelişimlerine bakılmıştır. 1/2 MS besi yerinin en iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. *Asplenium adulterinum* ve *Polypodium vulgare* eğrelti türlerinde gametofit gelişimi için ortamdaki optimum sakkaroz konsantrasyonun 20 - 30 g/L olması gerektiği saptanmıştır. Ortamda yüksek miktarda şeker bulunması durumunda ise gametofit gelişim sürecinde renk değişimi gözlenmiştir (Kromer ve ark., 2006). Sukrozun eğrelti türlerinde etkisi oldukça fazladır örneğin sukroz oranı düştükçe bitkideki gametofit gelişimin arttığı biliniyorken, bu oran arttığı zaman gametofitlerin rengine değişim veya çürüme olduğunu gözlemlenmiştir. Tez çalışmasında *Asplenium trichomanes*, *Asplenium scolopendrium* ve *Asplenium ceterach* türlerinde gametofitlerin sporofite dönüşümünde %2'lik sukroz kullanılmıştır. Gametofitlerde renk değişimi veya olumsuz bir etki görülmemiştir. *Asplenium trichomanes* ve *Asplenium scolopendrium* türlerinde sporofite dönüşüm sağlanmıştır fakat *Asplenium ceterach* gametofit evreden sporofit evreye geçişi sağlanamamıştır. Ülkemizde doğal olarak yetişen bazı eğrelti türlerinin spor kültürü yöntemi ile çoğaltımları incelenmiştir. Gametofit evre ve sporofit evrede histolojik analizler yapılmıştır. Tüm bu çalışmaları yaparken 1/2 MS besi yeri ile birlikte farklı hormon konsantrasyonları denenmiştir. Besi yerinin pH'sı 5.5-5.6 olarak ayarlanmıştır (**Kekil, 2014**). pH dengesi, bitkilerin besin elementleri ve hormonları bünyesine alma konusunda çok

etkilidir. Eğrelti türlerinin en iyi gelişim gösterdiği pH aralığı 5.5 - 5.6 olarak ayarlanmıştır.

Asplenium nidus'un dış ortama aktarımı için en uygun materyalin bahçe kumu olduğu belirlenmiştir (**Khan ve ark, 2008**). Gametofitler sislemeli serada hindistan cevizi lifi ile çam kabuğu eklenmiş ortama aktarılmıştır. Populasyon ve bölge farklılığına karşı gametofitlerin %75-100 oranında 9 haftada sporofite dönüştüğü saptanmıştır. Bitkicikler, 3-4 ay sonra oluşmuştur (**Kodym ve ark, 2016**). Rejenere olmuş rizomlar köklendirilerek dış ortama aktarılmış ve yaşama oranı %97-100 olarak bulunmuştur (**Winarto ve Da silva, 2012**). *Austral Bracken* (*Pteridium esculentum*) eğreltisinde *in vitro* gametofitlerden sporofitlerin mikro çoğaltımını incelemişlerdir. *In vitro*'da çimlendirilmiş sporlardan üretilen gametofit kültürler, sporofit kültürlerinde kullanılmıştır. %72.4-85 oranında başarılı bir aklimatizasyon sağlanmıştır (**Willyams ve Daws, 2013**). Sporofite dönüş sağlanan bitkilerde kök yapısı oluşmadığı için **Kodym ve ark, (2016)**'nın yaptığı metot uygulanmış ve sporofite dönüşen gametofitler uygun koşullarda sera ortamına her gün sisleme altında dış koşullara aktarılmıştır.

Nesli tükenmekte olan *Pronephrium triphyllum* ve *Sphaerostephanos unitus* eğrelti türlerini korumak amacıyla *in vitro* da spor kültürü yapmışlar ve mikroçoğaltım protokolü oluşturmuşlardır. Spor çimlenmesini, gametofit gelişimini ve sporofit evreyi incelemişlerdir. Knop's bazal ortamında *Pronephrium triphyllum* türünün sporlarını besi yerine almışlar ve yüksek oranda gelişim sağlamışlardır. Knop's sıvı besi yerinde en iyi sporofit evresi gelişimi meydana geldiğini belirtmişlerdir. Knop's bazal ortamında, *Sphaerostephanos unitus* eğreltisi için ise en yüksek çimlenme oranı olduğunu saptamışlardır. *In vitro*'da gelişimi tamamlanan eğrelti bitkileri, doğal ortamlarında ve çeşitli botanik bahçelerinde koruma altına alınmıştır (**Marimuthu ve Manicham, 2011**).

Protein yönünden oldukça zengin olan *Lemnaminor L.* bitkisinin Türkiye'de bol miktarda bulunduğunu, *Lemnaminor L.* bitkisinin ekolojik olarak su kirliliğinin ortadan kaldırılmasında ve akuakültürde ortam dengesinin

korunmasında çok önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktör ile bu bitkinin *in vitro* çoğaltımının yapılması ve kullanılmış bitki büyüme düzenleyicilerin bitkinin protein miktarına etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır (Yenice ve ark, 2010). Mikroçoğaltım için geçici daldırma sisteminde Plantform kapları kullanılmıştır. *Digitalis lutea x purpurea*, *Echinacea purpurea* ve *Rubus idaeus*'un mikroçoğaltım için geçici daldırma sistemine aktarılmıştır. Biyoreaktörde çoğalma oranı ve sürgün kalitesi agar ortamına oranla ya benzer etki yada daha iyi sonuç vermiştir. Sürgün miktarı, *Digitalis* ve *Rubus* için her iki sistemde de benzerlik göstermiştir. *Echinacea*'da önemli derecede kaliteli sürgün miktarı biyoreaktör sisteminde oluşmuştur. Bu kapların mikroçoğaltımda kullanımının uygun olduğu saptanmıştır (Welande ve ark, 2014). Geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak çin su kestanesinin çoğaltımı başarılı bir şekilde yapılmıştır. Şimdiye kadar olan çalışmalarda etkili bir çoğalma sağlanamamıştır. Bu çalışma ile, çin su kestanesinin bitki gövdesinden ve rizom kısmından ayrılmış sürgün kısmı, geçici daldırmayla birlikte klasik yarı-katı ortamda incelenmiştir ve her 8 saatte bir 15 dakika besin ortamına daldırılmıştır. Elde edilen bulgular, geçici daldırma sisteminin, küçük çin su kestanesi bitkisinin çoğaltımı için güvenli ve etkili metot olduğunu göstermiştir (Gao ve ark, 2014). Süs bitkilerinden *Carex oshimensis* ve *Chrysanthemum morifolium* ile meyve türlerinden *Ficus carica* ve *Ribes rubrum* bitkilerinde geçici daldırma sistemi ile sürgünlerin çoğaltımını çalışılmıştır. Araştırmacılar, Plantform sistemiyle daha yüksek kalitede bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir (Lambardi ve ark, 2015). İki farklı Mersin bitkisinin (*Myrtus communis*), katı kültür ve geçici daldırma sisteminin karşılaştırılmasına bakılmıştır. Geçici daldırma sisteminde ise 4 saat ve 8 saat daldırma süresi karşılaştırılması incelenmiştir. 8 saat süre sıklığında olan bitkicikler daldırma süresi 4 saat olan sisteme göre daha başarılı çıkmıştır (Biçen, 2017). C-35 sitranjı ve Tuzcu 31-31 turuncu anaçlarının, katı kültür ortamları ve Plantform sistemindeki mikroçoğaltımları ve köklendirme karşılaştırmasına bakılmıştır. Mikroçoğaltım ve köklenme için belirlenen en iyi besin ortamı içeriği

ile Plantform sisteminde çalışılmıştır. Plantform sisteminde katı kültüre göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Cengiz, 2018). Denemelerde bitkilerin ve çeşitlerin önemli olacağı gibi sistemler de önemlidir ve birbirinden farklı sonuçlar ortaya çıkarmaktadırlar. Geçici daldırma sistemleri BIG, RITA, PLANTFORM, PLANTIMA, SETIS vb. çeşitleri mevcuttur. Deneme kapsamında Plantform sistemi kullanılmış ve eğreltilerin doğadaki ortamının aynısı olan sisteme aktarılmıştır. Daldırmanın önemi eğreltilerde oldukça fazladır bunun yanı sıra daldırma süresinin sıklığında önemlidir. Yapılan önceki çalışmalarda genellikle 8 saatte bir daldırma süresinde olumlu sonuçlar alınırken, bu süre sıklığını suyu seven bir bitki olarak bilenen eğreltilerde en iyi 3 saat daldırma süresinde gözlenmiştir.

Ticari değeri olan *Adiantum capillus-veneris* L. 'de mikroçoğaltım protokolünü geliştirilmiştir. Sukroz'un 3 farklı konsantrasyonu (%1.5, %3, %4.5) spor çimlenmesi için denenmiştir. Jel ortamı, sıvı ortam ve geçici daldırma sistemleri uygulanmıştır. Sporlar da %1.5 sukroz ile %80.6 oranında çimlenmiştir. En iyi yaş ağırlık ise geçici daldırma sisteminde kaydedilmiştir (Vilchez ve ark, 2014). Eğreltilerde literatürlere bakacak olduğumuzda geçici daldırma sistemiyle ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bundan önceki çalışmalarda da görüldüğü gibi Vilchez yaptığı çalışmada, materyal olarak sporları kullanmıştır ve en başarılı sonucu düşük konsantrasyonlu sukroz'dan almıştır. Yapılan tez çalışmasında 3 farklı gametofit evrede olan eğrelti türünün Plantform sisteminde daldırma sıklığı 3 saat ve 6 saat sürelerinin gametofitlere etkisine, yaş ağırlığına ve sporofite dönüşümüne bakılmıştır. En iyi daldırma süresi 3 saat olan eğreltiler daha yeşil, daha canlı ve sporofite dönüşüm oranı fazladır bunun yanı sıra 6 saatlik sürede olan gametofitler de sararlamalar meydana gelmiş ve bitkiye dönüşüm oranı daha az olarak bulunmuştur. Eğreltilerin doğasındaki ortamda olduğu gibi su ve nemi sevdiği için Plantform sistemi bu bitki için birebir uygundur.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında, üç eğrelti türünün (*Asplenium trichomanes*, *Asplenium scolopendrium*, *Asplenium ceterach*) katı kültürde gametofitten sporofite dönüşümü denemeleri yapılmış olup, sporofite dönüşümüne ve gametofit ağırlığına göre Plantform sisteminde sonuçları karşılaştırılmıştır. Katı kültürde gametofit evrede sporofit evreye geçiş denemelerinde ön çalışma olarak 1/2 MS besin ortamı içeren NAA (0, 1.0 mg/L), BA (0, 0.5, 1.0 mg/L) ve GA₃ (0.5 mg/L) kombinasyonlarında sporofit sayısı (adet/bitkicik) ve bitki boyu (cm) parametrelerine bakılmıştır. Ana deneme olarak 1/2 MS içeren NAA (0.1-0.5 mg/L), BA (1.0 mg/L) ve KIN (1.0 mg/L) konsantrasyonlarının kombinasyonları kullanılmıştır. Denemelerinde türlere ait sporofit'e (bitkicik) dönüşüm ve gametofit ağırlığı (g) parametreleri alınmıştır. *Asplenium trichomanes* türü için gametofit ağırlık tüm hormon konsantrasyonu için aynı çıkmıştır fakat en iyi sporofite dönüşüm BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 'de meydana gelmiştir. *Asplenium scolopendrium* türü için en iyi gametofit ağırlık kontrol ortamı, BA 1.0 mg/L+NAA 0.5mg/L ve KIN 1.0 mg/L + NAA 0.5mg/L 'da olduğu belirlenmiştir. En yüksek sporofit gelişimi BA 1.0 mg/L+NAA 0.1mg/L ve BA 1.0 mg/L + NAA 0.5mg/L olan besin ortamlarında elde edilmiştir. *Asplenium ceterach* türü için gametofit ağırlık istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ve sporofit'e dönüşüm sağlanamamıştır. *Asplenium tricomones* türünde 3 saat ve 6 saat daldırma süresi denenmiştir. En iyi daldırma süresi 3 saat olarak belirlenmiştir ve bu süre diğer 2 tür içinde uygulanmıştır. Plantform sistemi için 1/2 MS içeren besin ortamları kullanılmıştır. Plantform sistemiyle katı kültürü karşılaştırdığımız zaman *Asplenium trichomanes* için gametofit ağırlıklar arasında fark önemli bulunmuştur. Sporofit dönüşüme bakıldığı zaman Plantform sisteminde bulunan kümelerdeki bitkicikler katı kültüre göre daha fazladır. *Asplenium scolopendrium* türü için gametofit ağırlık katı kültür ve Plantform karşılaştırıldığı zaman önemsiz bulunmuştur. *Asplenium ceterach* türünde ise Plantform sistemi katı kültüre göre

daha başarılı ve kaliteli gametofitler elde edilmiştir fakat her iki sistem arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. *Asplenium tricomones* türünde daldırma süresi 3 saat olan sporofitlerin gelişim iyi olduğu için başarılı bir şekilde dışarıya aktarılmıştır. Genel olarak Plantform sistemindeki gametofitlere bakıldığında nem ve su bakımından doğal yaşamıyla bire bir olduğundan döllenme ve besin ihtiyacını normal ve homojen biçimde gerçekleştirmektedir. Katı kültüre bakıldığı zaman gametofitler sadece besin alımı sağlamaktadır. Gametofitlerin canlılığı ve kalitesine baktığımızda Plantformda bulunan gametofitler daha kaliteli ve daha yeşil bitkiler elde edilmiştir.

Yapılan tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre önerilen metodlar;

1. Doku kültüründe geliştirilen gametofit evrede olan eğreltiler dış ortama aktarılabilir serada sisleme yapılabilir.
2. Kullanılan besi ortamı konsantrasyonları değiştirilmeli ve ortama NaH_2PO_4 eklenerek farklılaşma gözlemlenebilir.
3. Plantform sisteminde bitki büyüme düzenleyici kullanılarak gametofitlere etkisi incelenmelidir.
4. Plantform sisteminde daldırma ve havalandırma süreleri daha kısa tutularak eğrelti otunun doğadaki döngüsüyle benzerliğine bakılabilir.
5. Plantform sisteminin yanı sıra başka geçici daldırma sistemleri kullanılarak gametofitlerin sporofite dönüşümü sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Ambrosio, S.T., 2004. Interaction Between Sucrose And Ph During In Vitro Culture Of *Nephrolepis Bisserrata* (Sw.) Schott. Brazil.
- Barnicoat, H., Cripps, R., Kendon, J ., Sarasan, V., 2011. 'Conservation In Vitro Of Rare And Threatened Ferns-Case Studies Of Biodiversity Hotspot And Island Species.'
- Backes, Cl., Hoch, Wa., 2010. 'In Vitro Propagation Of Wavy-Leaved Indian Paintbrush (*Castilleja Applegatei* Fern.).'
- Biçen, B., 2017. 'Mersin Bitkisinin (*Myrtus Communis* L.) Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleri ile Çoğaltılması ve Köklendirilmesi' Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).
- Chapman A.D., (2009). *Numbers of Living Species in Australia and the World*. Report for the Australian Biological Resources Study. Canberra, Australia.
- Chang, Hc., Agrawal, Dc., Kuo, Cl., Wen, Jl., Chen, Cc., Tsay, Hs., 2007. 'In Vitro Culture Of *Drynaria Fortunei*, A Fern Species Source Of Chinese Medicine "Gu-Sui-Bu".'
- Cengiz, M., 2018. ' Bazı Turuncgöl Genotiplerinin Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleri ile Mikroçoğaltımı ve Genetik Kararlılığının Belirlenmesi' Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).
- Etienne, H., and Berthouly, M., 2002. "Temporary Immersion Systems In Plant Micropropagation." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69.3: 215-231
- Fernandez, H., and M. A, ReviLla., 2003. *In Vitro Culture Of Ornamental Ferns*. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture* 73.1:1-13.
- Fernandez, H., Kumar, A. ve Revilla, A., 2011. ' Working With Fern.' Book

- Gao, M., Jiang W., Wei S., Lin Z., Cai B., Yang L., Luo C., He X., Tan J., Chen L., 2014. 'High-efficiency propagation of Chinese water chestnut [*Eleocharis dulcis* (Burm.f.) Trin. ex Hensch] using a temporary immersion bioreactor system'
- Goller, K., Rybczynski, J.J., 2007. Gametophyte and Sporophyte Of Tree Ferns In Vitro Culture." *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 76.3.
- Harris, R. ve Mason, E., 1983. 'Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media.' *Can. J. Plant Sci.* 63:311–316.
- Kekil M.B., 2014. ' Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen Bazı Eğrelti Türlerinde Spor Kültürü Yöntemi ile Mikroçoğaltım ve Histolojik Analizler' Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).
- Khan, S., Razıq, M., Kayani, H.A., 2008. *In Vitro* Propagation Of Bird’s Nest Fern (*Asplenium Nidus*) From Spores. Pakistan.
- Kodym, A., Lang, M., Delpratt, J., 2016. 'Propagation By Partial Tissue Culture Of Austral Bracken (*Pteridium Esculentum*) For Revegetation.'
- Kromer, K., Marszał-Jagacka, J., Kempinska, K., Nowak, T., Zolnierz, L., Poturla, D. ve Swierkosz, K., 2006. ' *In Vitro* Propagation And *Ex Situ* Preservetaion Of Endangered Ferns Form Lower Silesia.'
- Lambardi, M., Roncasaglia, R., Bujasha, D., Baileiro, F., Correia Da Silva, D. P., and Ozudogru, E. A., 2015. Improvement of shoot proliferation by liquid culture in temporary immersion. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants Abstract Book.
- Luna, Ml., Yanez, A., Giacosa, Jpr., Gorrer, D., Berrueta, Pc., Giudice, Ge., 2016. 'In Vitro Spore Culture And Reproductive Aspects Of The Annual Fern Anogramma Chaerophylla (Pteridaceae).'
- Liao, Yk., Wu, Yh., 2011. ' In Vitro Propagation Of *Platyserium Bifurcatum* (Cav.) C. Chr. Via Green Globular Body Initiation.'

- Makowski, D ., Tomiczak, K., Rybczynski, Jj., Mikula, A., 2016. 'Integration Of Tissue Culture And Cryopreservation Methods For Propagation And Conservation Of The Fern *Osmunda Regalis* L.'
- MariMuthu J., ManiCkam V. S., 2011. Ex Situ Conservation Of Two Threatened Ferns Of The Western Ghats Through In Vitro Spore Culture."Journal Of Threatened Taxa 3.7: 1919-1928.
- Mazumder, P. B., Mazumder, B., Choudlhury, M.D., Sharma, G.D., 2011. In Vitro Propagation Of *Drynaria Quercifolia* (L.) J.Sm., A Medicinal Fern. Assam University Journal Of Science And Technology 7.1: 79-83.
- Morini, S., 2000. In Vitro Culture Of *Osmunda Regalis* Fern. Journal Of Horticultural Science And Biotechnology 75.1 :31-34.
- Mikula, A., Pozoga, M., Grzyb, M., Rybczynski, Jj., 2015. 'An Unique System Of Somatic Embryogenesis In The Tree Fern *Cyathea Delgadii* Sternb.: The Importance Of Explant Type, And Physical And Chemical Factors.'
- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, 15:473-497.
- Rolli, E., Brunoni, F., Marieschi, M., Torelli, A., Ricci, A., 2015. 'In Vitro Micropropagation Of The Aquatic Fern *Marsilea Quadrifolia* L. And Genetic Stability Assessment By Rapd Markers.'
- Pınar, M., Akgül, G. ve Tuğ, N., 2003. 'Palinoloji Laboratuvar Kılavuzu.' Syf:8
- Onay, A., 2012. "Batman University International Participated Science And Culture Symposium. " Batman, Turkey
- Özkara, T., Or, E. ve Toplan, S., 2003. 'Eğreltiotu'nun İnsan ve Hayvanlardaki Kanserojenik Etkileri.'
- Shin, Sl., Lee, Ch., 2009. In Vitro Medium Composition And Culture Method Affecting Masspropagation Of *Osmunda Japonica* Thunb. Prothalli.'
- SriVastava, R., Uniyal P. L., 2013. *Asplenium Nidus*; The Bird's Nest Fern: Developmental Studies And Its Conservation. *American Journal Of Plant Sciences* 4 :45-48.

- Soare, L.C., Vişoiu. E., Dobrescu, M.C., 2010. In Vitro Culture And Regeneration Of The Fern *Dryopteris Affinis*, Species Growing In A Protected Area. Romanian Biotechnological Letters 50.1: 45-54.
- Süsbir 2018 haziran raporu <http://www.susbir.org.tr/index.php/raporlar>
- Şimşek, Ö., Biçen, B., Dönmez, D., Aka Kaçar, Y., 2016. Evaluation And Comparison Of A New Type Of Temporary Immersion System (TİS) Bioreactors For Myrtle (*Myrtus Communis* L)
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M., 2007. ‘Farmasötik Botanik.’ Ankara Üniveristesi Eczacılık Fakültesi. Syf.93-94
- Tüik, 2017 [Http://Www.Tuik.Gov.Tr](http://www.tuik.gov.tr)
- Vilchez, J., Albany, N., Martinez, L., Molina, M., Fernandez, C., 2014. ‘Micropropagation Of *Adiantum Capillus-Veneris* L.’
- Welander, M., Persson, J., Asp, H., and Zhu, L. H., 2014. Evaluation of a New Vessel System Based on Temporary Immersion System for Micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 179:227-232.
- Winarto, B., Da Silva, Jat., 2012. Improved Micropropagation Protocol For Leatherleaf Fern (*Rumohra Adiantiformis*) Using Rhizomes As Donor Explant.’
- Willyams, D., Daws, Mi., 2013. ‘Mass Propagation Of Austral Bracken Fern (*Pteridium Esculentum*) Sporophytes From In Vitro Gametophyte Cultures’
- Vijayakumar, NK., Feret, PP. and Sharik, TL., 1990. ‘Invitro-Propagation Of The Endangered Virginia Roundleaf Birch (*Betula Uber* [Ashe] Fern) Using Dormant Buds.’
- Yenice, Z., 2010. Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktörlerle Su Mercimeği (*Lemna minor* L.) Bitkisinin *in vitro* Çoğaltımı. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).

<http://biyologlar.com/egreli-otu-pteridium-aquilinum> Eriřim Tarihi: 08.10.18

15:29

<https://www.gardeningexpress.co.uk/e15176-asplenium-scolopendrium-harts-tongue-fern-phyllitis>

https://www.123rf.com/profile_rbiedermann





ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Osmaniye / Kadirli’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kadirli 80. Yıl Cumhuriyet Lisesi’nde tamamladı. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümünde başladığı üniversite eğitimini 2015 yılında bitirdi. 2016 yılında Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri bölümünde Prof. Dr. N. Yeşim Yalçın Mendi danışmanlığında yüksek lisansa başladı ve 2019 yılında tamamladı.

