



T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

PEYZAJ MİMARLIĞI ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEBRA KAKTÜSÜ (*Haworthia sp.*)'NÜN DOKU KÜLTÜRÜ
YÖNTEMİ İLE ÇOĞALTIMI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

EMİNE SOLMAZ

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ CEVDET GÜMÜŞ

BARTIN-2023



T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
PEYZAJ MİMARLIĞI ANABİLİM DALI

**ZEBRA KAKTÜSÜ (*Haworthia* sp.)'NÜN DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE
ÇOĞALTIMI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine SOLMAZ

BARTIN-2023

KABUL VE ONAY



BEYANNAME

Bartın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Dr. Öğr. Üyesi Cevdet GÜMÜŞ danışmanlığında hazırlamış olduğum “ZEBRA KAKTÜSÜ (*Haworthia* sp.)’NÜN DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE ÇOĞALTIMI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR” başlıklı yüksek lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

16.12.2022

Emine SOLMAZ

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince benden her türlü maddi manevi desteğini, sabrını, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, yolumu aydınlatan, karşılaştığım imkânsızlıklarda pes etmeme engel olup imkân yaratan, bana inanan ve güvenen kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Cevdet GÜMÜŞ' e teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım.

Tez jüri üyeliğimi kabul ederek değerli katkılarda bulunan, bilimsel görüşlerinden faydalandığım hocalarım Prof. Dr. Murat ZENCİRKIRAN'a ve Doç. Dr. Yeliz SARI NAYİM'e teşekkürlerimi sunarım.

Doku kültürü ile tanışmamda etkisi büyük olan, ilk laboratuvar deneyimlerimi yanında kazandığım değerli hocam Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU' na bana katkıları için teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımı yürütmemde desteğini ve imkânlarını esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Gökhan GÜNDÜZ' e, Prof. Dr. Deniz AYDEMİR' e, Prof. Dr. Hüseyin SİVRİKAYA' ya, Prof. Dr. Ayben KILIÇ PEKGÖZLÜ' ye, Doç. Dr. Sezgin Koray GÜLSOY'a, Doç. Dr. Ahmet CAN' a, Doç. Dr. Eser SÖZEN' e, Arş. Gör. Esra CEYLAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de bana her türlü konuda destek olan ağabeyim Ahmet Ersin SOLMAZ' a, moral, motivasyon ve daimi sevgi kaynağım ablam Ceren Aylin KAPLAN' a, çok değerli ve kıymetli teyzem Nevin ADIGÜZEL' e, akademik vizyonumun gelişmesine katkıda bulunan, sevgisini ve ilgisini her an hissettiğim dayım Zir. Yük. Müh. Dr. Faruk ADIGÜZEL'e ve her koşulda yanımda olan can dostum Neslihan ÖZDEMİR' e tüm kalbimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Emine SOLMAZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZEBRA KAKTÜSÜ (*Haworthia* sp.)'NÜN DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE ÇOĞALTIMI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Emine SOLMAZ

Bartın Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Peyzaj Mimarlığı Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Cevdet GÜMÜŞ

Bartın-2022, sayfa: 45

Yeşil alanlara duyulan ihtiyacın ve kuraklığın giderek arttığı günümüzde ekstrem çevre koşullarına uyum sağlayabilecek çok sayıda bitkiye ihtiyaç duyulmaktadır. Sukulent bitkiler bu amaca hizmet eden önemli bir bitki grubunu oluşturmaktadır. *Haworthia* gerek süs bitkisi olarak gerekse tıbbi amaçlarla kullanılan ekonomik değeri yüksek önemli sukulent bitki cinslerinden biri olup *Xanthorrhoeaceae* familyasında yer almaktadır. Süs bitkileri yetiştiriciliğinde en önemli türlerinden biri olan *Haworthia fasciata* (Willd.) Haw., dekoratif yaprakları ile alana canlılık katan, bakımı kolay olması nedeniyle kullanıcılar tarafından tercih edilen, çok yıllık küçük yapılı bitkilerdir. Bu çalışmada *Haworthia fasciata* 'Alba' kültivarının doku kültürü yöntemi ile mikroçoğaltımı üzerinde çalışılmıştır. Temel besin ortamı olarak %3 sakaroz ile %0.7 agar içeren MS, eksplant kaynağı olarak ise genç yapraklar kullanılmıştır. İn vitro adventif sürgün rejenerasyonu üzerine eksplant tipi ve büyümeyi düzenleyici maddelerin etkisi araştırılmıştır. Yaprak tabanı içeren tam yaprakların eksplant olarak kullanıldığı ve büyümeyi düzenleyici içeren besin ortamı kombinasyonlarından olumlu sonuçlar alınmıştır. Büyümeyi düzenleyici içermeyen kontrol grubu (MS) uygulamalarında herhangi bir organogenesis meydana gelmemiş, 2,4-D içeren uygulamalarda ise gelişme kallus şeklinde olmuş, bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir. IAA içeren oksin sitokinin kombinasyonlarından en yüksek sayıda adventif sürgünler elde edilmiştir. En yüksek sayıda

sürgünler 1.0 mg/L BAP+0.5 mg/L IAA (4.67 ± 0.58 adet), 1.0 mg/L Kinetin+ 1.0 mg/L IAA (4.25 ± 0.50 adet) ve 2.0 mg/L Kinetin+ 1.0 mg/L IAA (4.00 ± 0.82 adet) uygulamalarında tespit edilmiştir. Elde edilen sürgünler in vitro koşullarda büyümeyi düzenleyici içeren veya içermeyen MS ve ½ MS ortamında başarılı bir şekilde köklendirilmiştir. Köklendirilen bitkicikler torf, perlit + torf (3:1) torf + pomza taşı (3:1) karışımı ile eşit oranlarda torf + perlit + pomza taşı karışımlarında başarılı bir şekilde %100 oranında dış koşullara alıştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mikroçoğaltım, bitki gelişim düzenleyiciler, eksplant tipi, organogenesis, *Haworthia fasciata*, iç mekân bitkilendirme.



ABSTRACT

M. Sc. Thesis

INVESTIGATIONS ON PRODUCTION OF ZEBRA PLANT (*Haworthia* sp.) BY TISSUE CULTURE

Emine SOLMAZ

Bartın University

Graduate School

Department of Landscape Architecture

Thesis Advisor: Assist. Prof. Dr. Cevdet GÜMÜŞ

Bartın-2022, pp: 45

Today, the need for green areas and drought is increasing daily, and there is a need for many plants that can adapt to extreme environmental conditions. Succulent plants constitute an important plant group that serves this purpose. *Haworthia*, it is one of the important succulent plant genera with high economic value, used both as an ornamental plant and for medicinal purposes, and is in the *Xanthorrhoeaceae* family. *Haworthia fasciata* (Willd.) Haw. which is one of the most important species in ornamental plant cultivation, is a small perennial plant that adds vitality to the area with its decorative leaves and is preferred by users due to its easy care. This study is about the micropropagation of *Haworthia fasciata* ‘Alba’ cultivar by tissue culture method. MS containing 3% sucrose and 0.7% agar was used as the basal nutrient medium, and young leaves were used as explant. The effects of explant type and growth regulators on in vitro adventitious shoot regeneration were investigated. Positive results were obtained from combining whole leaves containing leaf bases as explants and nutrient media containing growth regulators. No organogenesis occurred in the control group (MS) applications that did not contain growth regulators, while the development was in the form of callus in the applications containing 2,4-D, and no transformation into the plant occurred. The highest number of adventitious shoots were obtained from the combinations of auxin cytokinins containing IAA. The highest number of shoots 1.0 mg/L BAP+0.5 mg/L IAA (4.67±0.58 units), 1.0 mg/L Kinetin+ 1.0 mg/L IAA (4.25±0.50 units) and 2.0 mg/L Kinetin+ 1.0 mg/L IAA (4.00±0.82).

The resulting shoots were successfully rooted in MS and ½ MS medium with or without growth regulators in vitro. Rooted plantlets were successfully acclimatized to external conditions at a ratio of 100% in the mixture of peat, perlite + peat (3:1), peat + pumice stone (3:1) and peat + perlite + pumice stone in equal proportions.

Keywords: Micropropagation, plant growth regulators, explant type, organogenesis, *Haworthia fasciata*, indoor planting.



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
BEYANNAME.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1 Materyal	15
3.2 Metot.....	16
3.2.1 Genel in vitro Kültür Koşulları	16
3.2.2 Besin Ortamının Hazırlanması.....	16
3.2.3 Yüzeysel Sterilizasyon	17
3.2.4 Eksplantların Hazırlanması ve Dikimi	18
3.2.5 İnkübasyon Koşulları	19
3.2.6 Dış Koşullara Alıştırma (Akklimatizasyon)	19
3.2.8 Verilerin Analizi.....	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
4.1 Sürgün Rejenerasyonu Denemeleri	21
4.1.1 I. Deneme	21
4.1.2 II. Deneme	23
4.1.3 III. Deneme	30
4.2 İn vitro Sürgünlerde Köklendirme Denemeleri.....	34
4.3 Dış Koşullara Alıştırma (Akklimatizasyon) Denemeleri	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	38
KAYNAKLAR.....	40
BİBLİYOGRAFYA.....	44
ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
No	No
3.1: <i>Haworthia fasciata</i> ‘Alba’ kültivarına ait donör bitki örnekleri	25
3.2: Yüzeysel sterilizasyon aşamaları.....	29
3.3: Eksplantların kültür ortamına dikimi.....	30
4.1: Farklı besiyeri kombinasyonlarında gelişme göstermeyen yaprak eksplantları.....	23
4.2: Alt kültür ortamında kararma meydana gelen yaprak eksplantları	23
4.3: Gelişme göstermeyen kontrol grubu (MS) örnekleri.....	26
4.4: II. denemede BAP + IAA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler.....	27
4.5: II. denemede BAP + IBA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler.....	27
4.6: II. denemede BAP + 2,4-D kombinasyonlarında gelişen kalluslar.....	28
4.7: II. denemede Kinetin + IAA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler	28
4.8: II. denemede Kinetin + IBA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler.....	29
4.9: II. denemede Kinetin + 2,4-D kombinasyonlarında kültüre alınan eksplantlardaki gelişme durumları.....	29
4.10: III.denemede Kinetin + IAA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler.....	32
4.11: III.denemede Kinetin + IBA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler.....	32
4.12: III.denemede Kinetin + IAA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler.....	33
4.13: III.denemede Kinetin + IBA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler.....	33
4.14: Farklı besin ortamı bileşimlerinde köklendirilen in vitro <i>Haworthia fasciata</i> ‘Alba’ bitkicikleri.....	35
4.15: Köklendirme aşamasında kardeşlenme meydana gelmiş bir adventif sürgün.....	35
4.16: Dış koşullara alıştırmak üzere farklı yetiştirme ortamlarına dikilen in vitro bitkicikler.....	37
4.17. Dış koşullara alıştırıldıktan sonra 3 kısım torf + 1 kısım pomza taşı doldurulmuş fincan saksılarda gelişmeye bırakılan <i>Haworthia fasciata</i> “Alba” bitkilerinin bir yıl sonraki gelişme durumları.....	37

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
3.1 :Temel besin ortamı bileşimleri.....	27
4.1: I. denemede kullanılan besiyeri kombinasyonları ve eksplantların gelişme durumu.....	22
4.2: II. Denemede kullanılan besin ortamı bileşimleri, gelişme oranı ve eksplant başına düşen sürgün sayıları.....	24
4.3: III. Denemede kullanılan besin ortamı bileşimleri, gelişme oranı ve eksplantbaşına düşen sürgün sayıları.....	30



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Celcius derece
cm	: santimetre
g	: gram
HgCl ₂	: cıva (II) klorür
L	: litre
mg	: miligram
ml	: mililitre
pH	: asitlik derecesi
N	: normal
µL	: mikrolitre
µm	: mikrometre
µmol	: mikromol

KISALTMALAR

ABA	: Absisik Asit
BAP	: 6-Benzilaminopurin
BA	: 6-Benziladenin
CH	: Kazein Hidrolizat
BGD	: Bitki gelişimini düzenleyiciler
GA ₃	: Giberellik Asit
IAA	: Indol-3-Asetik Asit
IBA	: Indol-3-Butirik Asit
MS	: Murashige ve Skoog Besin Ortamı
NAA	: Naftalen Asetik Asit
NaOCI	: Sodyum Hipoklorit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
TDZ	: Thidiazuron
½ MS	: Yarı Kuvvetteki Murashige ve Skoog Besin Ortamı
2İP	: İzopentanil adenin
2,4-D	: 2,4 -Diklorofenoksi Asit

1. GİRİŞ

İklim değişikliğine bağlı olarak artış gösteren kuraklık, hem dünyada hem de Türkiye’de her geçen gün büyük bir çevre sorunu haline gelmektedir. Kuraklığa karşı alınabilecek önlemler içerisinde en etkili olanı kaynakların doğru ve verimli bir şekilde kullanılmasıdır. Bitkiler için de hayati öneme sahip olan suyun kullanımı sürdürülebilirlik açısından son derece önemlidir. Buna bağlı olarak peyzaj mimarlığı tasarım ve uygulamalarında, gerek iç mekân gerek dış mekân bitkilendirmesinde su ihtiyacı az olan bitkilere yönelim artmıştır. Kuraklığa dayanıklı bitkilerin başında ise sukulent bitkiler gelmektedir.

Sukulentler, kısıtlı su imkânlarına ve yüksek sıcaklıklara sahip çevre koşullarına habitusları ve yaşam biçimleriyle adaptasyon sağlayabilen önemli bir bitki grubudur. Etlı gövde ve yapraklarında su depolayan ve birçoğu kserofit olan sukulent bitkiler; çok katlı, kalın çeperli epidermis ve kalın kütikula tabakası sayesinde su kaybını önleyerek kuraklığa dayanıklı hale gelmektedirler. Sukulentlerin bu fonksiyonlarıyla birlikte yaprak ve çiçeklerinin biçim, doku, renk gibi ilgi çekici özellikleri nedeniyle de iç mekân ve dış mekân tasarımlarında tercih edilmektedirler (Öztan ve Arslan, 1992; Karahan ve Angın, 2008; Önder ve Polat, 2009).

Sukulent bitkiler peyzaj mimarlığında farklı mekanlarda değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Dış mekânlarda kaya bahçelerinde, çatı bahçelerinde, bitki parterlerinde, iç mekânlarda saksı bitkisi olarak, aranjmanlar içerisinde ve terraryumlarda kullanılmaktadır. Kullanım alanları çeşitliliği ve yüksek nitelikleri neticesinde süs bitkileri yetiştiriciliğindeki pazar payı da gün geçtikçe artmaktadır.

Sukulentler süs bitkisi olarak kullanımının yanında farmakolojik özelliklere sahip olması nedeniyle tıbbi amaçlarla da kullanılmaktadır. İçerdiği flavonoidler, tanenler, alkaloidler, fitosteroller ve aromatik asitler gibi fitokimyasallar nedeniyle antimikrobiyal, antioksidan, anti-enflamatuar aktiviteye sahiptirler (Aşkın Çelik ve Aslantürk, 2018). Ayrıca geleneksel şifacılar tarafından kötülükten korunmak için manevi bir çare olarak ve kan temizleyici, öksürük, deri döküntüleri, güneş yanıkları, yanıklar vb. hastalıklara karşı tedavi olarak da kullanılmaktadır (Coopoosamy ve Naidoo, 2011).

Tüketiciler arasında sukulent bitki grubu içerisinde yer alan kaktüslerin ortamdaki radyasyonu absorbe ettiği gibi bilimsel temele dayanmayan yaygın bir inanış bulunmaktadır. Bu inanışın temelinde kaktüslerin fazla miktarda su içerdiği için (%88-90) iyi bir radyasyon emici olduğu iddia edilmektedir. Suyun radyasyonu absorbe ettiği bilimsel bir gerçektir. Ancak kaktüslerden daha fazla su içeren bitkiler de bulunmaktadır. Örneğin; hıyar %96, kabak %95, turp %95, kereviz %95 domates %94, lahana %92-93, karpuz %92, greyfurt %91 oranında su içermektedir. Bu yaygın inanışa göre bu bitkilerin radyasyonu kaktüslerden daha iyi absorbe etmesi gerekir dolayısıyla bu inanışın bilimsel olarak doğruluk payı yoktur (Zencirkıran ve Zeybek, 2016).

Sukulent bitkilerin birçok familyaya ait cins, tür ve varyeteleri bulunmaktadır. Sukulentlere ait 30'dan fazla cins, 1300 kadar da tür tespit edilmiştir (Karahan ve Angın, 2008). *Cactaceae* familyası, sayı bakımından en fazla sukulent cins ve türünü barındıran familyadır. *Cactaceae* familyasını sırasıyla *Amaryllidaceae* ve *Euphorbiaceae* familyaları takip etmektedir (Arslan ve Erdinç, 2007; Karahan ve Angın, 2008). *Agave*, *Aloe*, *Crassula*., *Echeveria*., *Haworthia*., *Kalanchoe*., *Mammillaria*., *Sansevieria*., *Sedum* ve *Sempervivum* süs bitkileri yetiştiriciliğinde önemli sukulent cinsleridir.

Haworthia peyzaj mimarisinde gerek iç mekan gerekse dış mekan bitkilendirme tasarımlarında kullanılan önemli sukulent cinslerinden biridir. Genellikle dekoratif yaprakları için yetiştirilen çok yıllık küçük yapılı bitkilerdir. Estetik özelliklere sahip yaprakları ile bulundukları alana canlılık katarlar. Fazla bakım gerektirmeyen kanaatkar bir tür olması nedeniyle de kullanıcılar tarafından tercih edilmektedir.

Zebra Kaktüsü (*Haworthia fasciata*)'nın geleneksel üretimi tohum, çelik ve ayırma ile yapılmaktadır. Bu yöntemlerle çoğaltımda sınırlı sayıda bitki elde edilebilmekte ve uzun zamana ihtiyaç duyulmaktadır (Pilbeam, 1983; Chen vd., 2019). Bu da hem maliyet hem de iş gücü açısından dezavantajlı bir durum oluşturmaktadır. Doku kültürleri ise bu sınırlı üretim miktarlarını artırabilecek üretim teknikleri olarak kabul görmektedir. Basit olarak, laboratuvar koşullarında bitkilerin kısa bir sürede klonal olarak hızlı çoğaltımı şeklinde tanımlayabileceğimiz *in vitro* mikroçoğaltım günümüzde orkide, soğanlı bitkiler, *Anthurium* sp., *Spathiphyllum* sp., Afrika menekşesi, *Gerbera* sp. gibi süs bitkilerinde ticari olarak uygulanmaktadır.

Bazı *Haworthia* türlerinin klonal hızlı çoğaltımını araştırmak amacıyla doku kültürü yönteminin kullanıldığı birçok bilimsel çalışma bulunmaktadır. Üretimin daha hızlı ve seri hale gelebilmesi için *Haworthia* türlerinin mikroçoğaltım çalışmalarına ağırlık verilmesi ve bu konuda üretim protokolünün oluşturulması gerekmektedir.

Bu tez kapsamında, *H. fasciata* ‘Alba’ kùltivarının mikroçoğaltım olanaklarının araştırılması amaçlanmış olup, oksin ve sitokinin cinsi ve dozları, eksplant tipleri ve besin ortamı bileşimlerinin sürgün rejenerasyonu ve sürgünlerin köklenmesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

Xanthorrhoeaceae familyasında yer alan *Haworthia* Güney Afrika ve Namibya'ya özgü bir cinstir. Fransız doktor ve sukulent uzmanı Henri Auguste Duval, 1809 yılında *Haworthia* cinsini *Aloe* cinsinden ayırmıştır. Daha sonra Güney Afrika'dan Avrupa'ya gelen, hayatının çoğunu *Aizoaceae* ve *Asphodelaceae* familyalarının yeni türlerini tanımlamaya adanmış İngiliz tüccar Adrian Haworth'un onuruna adlandırmıştır (Nuzhyna ve Gaydarzhy, 2015).

Haworthia cinsi geniş bir morfolojik çeşitlilik göstermektedir. Eskiden taksonomistlerin bitkileri ayrı ayrı sınıflandırmaları nedeniyle cinsin taksonomisinde bir belirsizlik durumu oluşmuş, türaltı seviyede 400'ün üzerinde isim kullanılmıştır (Court, 1981; Mycock vd., 1997). Günümüz bitki sistematikçileri bunlardan birçoğunu sinonim olarak kabul ederek, tür ve türaltı seviyede 269 takson belirlemiştir (URL-1, 2022). Cinsin geniş bir varyasyona sahip olması nedeniyle bilim insanları bu cins için “taksonominin problem çocuğu” olarak bahsetmektedirler (Bayer, 2009). Tür teşhisini zorlaştıran diğer bir faktör de, özellikle kurak mevsimlerde yapraklarının tamamına yakınının yer altına çekilmesidir (Biko'o vd., 2011).

Süs bitkileri yetiştiriciliğinde kullanılan birçok ticari türü *Haworthia* bulunmaktadır. Bunlar *Haworthia attenuata* (Haw.) Haw., *H. bolusii* Baker, *H. cooperi* Baker, *H. cymbiformis* (Haw.) Duval, *H. glauca* Baker, *H. limifolia* Marloth, *H. mutica* Haw., *H. pumila* (L.) Duval, *H. reinwardtii* (Salm-Dyck) Haw., *H. retusa* (L.) Duval, *H. venossa* (Lam.) Haw. ve *H. fasciata* (Willd.) Haw.'dır.

Haworthia cinsinde yapılan sitolojik çalışmalarla bazı türlerin kromozom sayıları belirlenmiştir. Diploid yapıdaki kromozom sayıları türlere göre değişiklik göstermektedir. Vosa ve Bayer (1986), *H. aranea*, *H. chloracantha*, *H. decipiens*, *H. floribunda*, *H. glauca*, *H. magnifica*, *H. maughanii*, *H. mirabilis*, *H. nigra*, *H. radula*, *H. reticulata*, *H. scabra*, *H. serrata*, *H. starkiana*, *H. viscosa* türlerinin $2n=14$ kromozoma, Jessy vd. (2005) ise *H. limifolia* $2n=21$, *H. reinwardtii* $2n=35$, *H. papillosa* ve *H. fasciata* $2n=14$ kromozoma sahip olduğunu bildirmiştir.

Haworthia türleri dekoratif yaprakları için yetiştirilmektedir. Yapraklar genellikle rozet formunda, etli, sert, mızrak şeklinde, sapsız, doğrudan gövdeye bağlı olmakla birlikte uzunluğu

2,5-15 cm arasında değişmektedir. Yaprak renkleri türler arasında geniş bir çeşitlilik göstermektedir. Genellikle yeşil renkteki yapraklar stres koşullarında kırmızı veya mora dönüşebilmektedir. Bazı türlerde yaprakların arka yüzeyinde nokta veya çizgi şeklinde gümüşü/beyaz renkli lekeler bulunur. Çiçeklenme dönemi türlere göre değişkenlik göstermekle birlikte başak yapıdaki çiçekleri, bitkinin ortasından uzayan uzun bir sap üzerinde pembe veya beyaz renkli, oldukça küçük ve gösterişsizdir (Odabaş, 1993).

Haworthia türleri doğal habitatında kuvarsit üzerindeki kumlu topraklarda ya da riyolit üzerindeki killi topraklarda yetişmektedir. Direkt güneş ışığı ve sert rüzgarlara maruz kalmayan, yangın ihtimalinin minimum düzeyde olduğu çevre koşullarını tercih etmektedir. Uzun süreli kuraklıklar, yangın, habitat kaybı ve bitkinin doğadan kontrolsüzce toplanması türlerin popülasyonunu olumsuz etkilemektedir. *Haworthia* cinsinin bazı endemik türleri hem doğal etmenler hem de insan faaliyetleri sonucunda dar coğrafi alanlarının değişmesiyle yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır (Biko' o vd., 2011).

Haworthia cinsi ekstrem çevre koşullarına dayanıklıdır. Ancak iyi bir gelişme için optimum çevre koşulları sağlanmalıdır. En düşük 7°C en yüksek 24°C'de iyi bir gelişme göstermektedir. Yazın yarı gölge, kışın bol güneş ve aydınlık yerlerden hoşlanmaktadır. Yazın bol su ve düşük nispi nem isteyen bitki için kışın çok az ve düzenli sulama gerekmektedir (Odabaş, 1993). Dar yapraklı *Haworthia*. türleri pek çok etli bitkiye göre daha çok suya gereksinim duymaktadır. Kalın yapraklı türler de her mevsim dikkatle sulanmalıdır (Öge, 1997).

Zebra Kaktüsü (*Haworthia fasciata* yaprak çelikleri ile çoğaltılmaktadır. Bunun yanında tohum ve ayırma ile de üretilmektedir. Tohumla çoğaltım bitkilerde meydana gelen genetik açılım nedeniyle tercih edilmemektedir. Ana bitkinin tüm özelliklerine sahip büyük ölçekli üretimde vejetatif çoğaltım yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak vejetatif yöntemlerle çoğaltımda da sınırlı sayıda bitki elde edilebilmekte ve uzun zamana ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum ticari amaçlı üretim faaliyetlerinde dezavantaj oluşturmaktadır (Pilbeam, 1983; Chen vd., 2019). Bitki doku kültürü yöntemleri çoğaltma katsayısını artıran üretim sürecini kısaltan bir yöntem olarak son yıllarda birçok kültür bitkisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bitki doku kültürüne yönelik ilk çalışma 1902 yılında Alman botanikçi Gottlieb Haberlandt tarafından bitkilerin totipotensi özelliğinin keşfedilmesinden sonra yapılmıştır. Bu çalışmada, izole edilmiş bitki hücreleri bir besin çözeltisi içinde yetiştirilmiştir. Bununla birlikte, ilk

başarılı bitki hücresi kültürü 1922'de Kolte ve Robbins tarafından gerçekleştirilmiştir (Dias vd., 2016; İçigen, 2019).

Bitkilerin doku kültürü yoluyla üretimi 1940'lı yıllarda başlamış ve 1970'lere gelindiğinde tarımsal açıdan önemli bazı türlerin özellikle süs bitkilerinin büyük ölçekli üretimi başlamıştır. Son 40 yılda, doku kültürü yoluyla üretilen bitki türlerinin sayısı önemli ölçüde artmıştır. 1980'lerde doku kültürü ile elde edilmiş bitkiler yılda 500 milyon adedi aşmış olup, üretilen bu bitkilerin %50 ilâ %75'ini süs bitkileri kapsamaktadır (Debergh 1994). 1990'ların başında yıllık üretim 663 milyon adetken, 1990'ların sonlarında doku kültürü ile yıllık üretim 800 milyon adete ulaşmıştır (Ashloowalia vd. 2004; Kazaz vd., 2020).

Bitki doku kültürü; laboratuvarında steril koşullarda, yapay bir besin ortamı içerisinde, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (sekonder metabolitler gibi) üretilmesidir (Babaoğlu vd., 2002). Kültüre alınan doku veya organ kısmına göre isimlendirilir (Ör. meristem kültürü, embriyo kültürü, anter kültürü, protoplast kültürü vb.). Bitki ıslahında yeni çeşit geliştirmek, mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak, hastalıksız bitki elde etmek, bitkilerin üretim süresini kısaltarak çoğaltım katsayısını artırmak, çoğaltımı zor olan veya nesli tehlikede olan türleri çoğaltmak, bitkileri uzun süreli muhafaza etmek, yurtiçi veya yurt dışına bitkiciklerin transferini kolaylaştırmak gibi farklı amaçlar için kullanılmaktadır (Pierik, 1997; Zencirkıran, 1998; Gürel vd., 2001; Küçükahmetler vd., 2002).

Doku kültürleri tekniklerinde kısa sürede ve çok sayıda aynı genotipik yapıda bitki üretimi “mikroçoğaltım” olarak isimlendirilir. Mikroçoğaltım, eksplant - besin ortamlarının seçimi ve hazırlanması ile başlayan kallus ve hücre süspansiyonlarının kurulması, bitki rejenerasyonunun uyarılması, in vitro sürgünlerin çoğaltılması ve boylarının uzatılması, somatik embriyoların olgunlaştırılması, in vitro sürgünlerin köklendirilmesi ve köklü bitkiciklerin dış ortama alıştırılması (aklimatizasyon) gibi birbirini takip eden aşamalardan oluşan zincirleme bir üretim sürecini ifade etmektedir (Babaoğlu vd., 2002).

Bitkiler için optimum büyüme koşullarının sağlanması amacıyla temel madde olarak su, makro elementler, mikro elementler, vitaminler, amino asitler, bitki büyüme düzenleyiciler (oksinler, sitokininler, giberellinler, absisik asit, etilen), şekerler (sakkaroz, glikoz), jelleştirici maddeler

(agar, agarose) ihtiva eden besi yerleri kullanılmaktadır. Bitkinin türüne ve ihtiyacına göre bu maddelerin miktarı değişkenlik göstermektedir. Mikroçoğaltımda en çok kullanılan besin ortamı MS (Murashige ve Skoog, 1962)'dir. Bu maddelerin yanı sıra kültür koşulları (ortamın pH değeri, sıcaklık, ışık, nem oranı) da mikroçoğaltımın başarısını etkileyen önemli faktörlerdir. (Babaoğlu vd., 2002; Murashige ve Skoog 1962).

Doku kültürü teknikleri ile *Haworthia* türlerinin mikroçoğaltımının araştırıldığı birçok bilimsel çalışma bulunmaktadır. *Haworthia* türlerinde yapılan bu mikroçoğaltım çalışmaları derlenerek aşağıda kronolojik sıraya göre özetlenmiştir.

Literatür incelemesinde *Haworthia* cinsinde ilk doku kültürü yöntemi ile üretim çalışmasının Kaul ve Sabharwal (1969) tarafından yapıldığı görülmüştür. Araştırmacılar, bazı *Haworthia* türlerinde çiçek saplarını kullanarak in vitro sürgün rejenerasyonu elde etmeyi amaçlamıştır. Bu amaçla temel besin ortamı olarak değiştirilmiş White's ortamını kullanmışlar, besin ortamına ekledikleri kazein hidrolizat, hindistan cevizi sütü gibi organik maddeler ile büyümeyi düzenleyici maddelerden IAA, NAA ve Kinetin'in etkisini araştırmışlardır. Çalışmada kontrol grubu ile kazein hidrolizat ilave edilen uygulamalarda hiçbir gelişme olmadığı, IAA (1.0, 2.0mg/l) - Kinetin (0.5, 1.0) hormon kombinasyonlarında kültürün 12-15.haftasında, %20 oranında hindistan cevizi sütünün ilave edildiği ortamlarda ise kültürün 6-10. haftasında braktelerin ekseninde 1-4 adet arasında sürgün meydana geldiği rapor edilmiştir.

Ogihara (1979), üç farklı oksin (2,4-D, IAA, NAA) ve kinetinin *Haworthia setata* türünde kallus ve sürgün oluşumu üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışmada 50 mg/l dozundaki tüm oksinlerin kallus oluşumunu engellediği, kinetin ile birlikte kombine edilen NAA'nın kallus gelişimi ve sürgün farklılaşmasını teşvik ettiği tespit edilmiştir. Araştırmada, kinetin içermeyen düşük IAA konsantrasyonlarının sürgün farklılaşmasına olumlu etkide bulunduğu görülürken kalluslardaki klorofil oluşumunda ise etkisiz kaldığı görülmüştür. 0.1mg/l 2,4-D ilave edilen ortamlarda kalluslarda yeşillenme veya sürgün farklılaşması meydana gelmemiştir. Araştırmacı, en yüksek klorofil içeriğine sahip olan kallusların, 2.0 mg/l kinetin veya 2.0 mg/l Kinetin + 0.1 mg/l NAA içeren besiyerinde gözlemlendiğini, en yüksek sürgün farklılaşma oranının ise %67 ile 0.1 mg/l IAA içeren ortamlarda meydana geldiğini bildirmiştir.

Beyl ve Sharma (1983), *Gasteria verrucosa* Haw ve *Haworthia fasciata* Haw. türlerinde somatik embriyo oluşumu üzerine picloram ve 2,4-D'nin etkisini araştırmıştır. Bu amaçla farklı

yaprak kısımlarını (yaprak ucu, ortası ve tabanı) oksin olarak Picloram (0.5, 1.0, 2.0, 3.0mg/L) ve 2,4-D (0, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L) sitokinin olarak ise kinetin (0.25, 1.0 mg1/L) ilave ettikleri MS besin ortamında kültüre almışlardır. Çalışmada, karbon kaynağı olarak %2 oranında sukroz, jelleştirici madde olarak ise %0.8 oranında agar kullanılmış, tüm ortamların pH'sı 5.8 e ayarlanmıştır. Araştırmacılar kallus ve embriyo uyarımı bakımından kinetinin her iki dozunda da Picloramın 2,4-D'ye göre daha iyi performans gösterdiğini bildirmiştir. Embriyolar başlangıçta, yaprağın ana eksenine paralel olarak lineer düzende epidermisin hemen altındaki bölgeden sarı, kompakt küresel kütleler halinde ortaya çıkmış, daha sonra kalp şeklinde bir görünüm almıştır. Araştırmacılar kültürün 12.haftasında *Gasteria verrucosa* Haw türünde tüm yaprak kısımlarından somatik embriyo meydana gelirken, *Haworthia fasciata* Haw. türünde yaprak tabanından hazırlanan eksplantlardan somatik embriyo meydana geldiğini vurgulamıştır.

Kochhar (1983), *Haworthia mirabilis* türünde kinetin ile ABA (absisik asit) kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkilerini araştırmıştır. Araştırmada çiçek sapı eksplantları farklı cins ve dozda büyümeyi düzenleyici içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Büyümeyi engelleyici bir hormon olan ABA'in kinetin ile kombine edildiğinde *Haworthia mirabilis*'te kallus oluşumunu uyardığı rapor edilmiştir. Kallus gelişiminin düşük büyümeyi düzenleyici dozlarında gerçekleştiği, ABA ve kinetinin tek başlarına olumlu etkide bulunmadığı bilgisi paylaşılmıştır.

Hayashi (1987), *Aloe* cinsinin 23 türü ile *Haworthia*, *Astroloba*, *Poellnitzia*, *Chortolirion* cinslerinin tüm türleri ve çeşitleri de dahil olmak üzere 500'den fazla bitkiyi in vitro olarak kültüre almıştır. Ön araştırmalarda, MS + 1.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BA ortam bileşiminin incelenen bitkilerin çoğunda kallus büyümesi için uygun olduğu bulunmuştur. Bu yüzden, çalışma boyunca bu ortam kullanılmıştır. Bitkilerin çoğu kallus ve dolaylı adventif sürgünler üretmiştir. Araştırmada *Haworthia* türlerinde 2-3 ay içerisinde kallus uyarımı gerçekleştiği, oluşan kallusların ise yumuşak ve beyaz renkte, kolayca büyüdüğü ve çok sayıda sürgün ürettiği bilgisi paylaşılmıştır.

Sun vd. (1987), *Haworthia magnifica* v. Poelln'in protoplastlarından bitki rejenerasyonu çalışmıştır. Araştırmacı, çiçek tomurcukları, pistil ve çiçek saplarını eksplant kaynağı olarak kullanmıştır. Eksplantlar, kazein hidrolizat (250, 500 mg/l), 2,4 D (0.2, 1.0, 3.0 mg/l), NAA (0.25, 0.5 mg/l), IAA (1.0 mg/l), kinetin (0.2, 0.8, 1.5, 2.0 mg/l), BAP (0.5 mg/l) ve zeatin (0.5 mg/l) içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. 14 gün içerisinde tüm eksplant tiplerinde kallus

oluşumu gözlenmiştir. Kallus oluşumundan birkaç hafta sonra ise kök ve sürgünlerin geliştiği rapor edilmiştir.

Rogers (1993a), *Haworthia comptoniana*'nın yaprak eksplantlarını 0 - 10 mg/L BA içeren MS ortamlarında kültüre alarak BA seviyesinin kallus ve sürgün oluşumu üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışma sonucunda sürgün proliferasyonu ve uzunluğunun BA tarafından önemli derecede etkilendiği bildirilmiş, en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BA içeren ortamlarda meydana gelirken, en uzun sürgünler ise 0.1 mg/l BA içeren ortamda tespit edilmiştir. Çalışmada yüksek BA dozlarının sürgün boyunu azalttığı öne sürülmüştür.

Rogers (1993b)'ın bir diğer çalışmasında ise süs bitkisi olarak değerlendirilen beş nadir *Haworthia* türünün yaprak eksplantlarını 1.0, 2.0 veya 4.0 mg/L dozlarında kinetin veya BA içeren katı MS ortamında kültüre alarak in vitro çoğaltım prosedürü oluşturmaya çalışmıştır. *Haworthia retusa* 'Dekenahii', *Haworthia retusa* 'Giant Form', *Haworthia emelyae* 'Sandkraal', *Haworthia mirabilis* 'Mundula', ve *Haworthia mutica* 'da kültürün 8.haftasında adventif sürgün oluşumunun başladığı, sürgün rejenerasyonu ve gelişimi bakımından optimum sitokinin tipi ve dozunun türlere göre 1.0-2.0 mg/L arasında değiştiği, düşük sitokinin dozlarının sürgün sayısını ve uzunluğunu artırdığı tespit edilmiştir. Sürgünler in vitro koşullarda vermikulit içerisinde köklendirilmiştir. Somaklonal varyasyonun gözlenmediği bu çalışma nadir *Haworthia* genotiplerinin çoğaltımında tavsiye edilmiştir.

Richwine vd. (1995)'nin *Aloe*, *Gasteria* ve *Haworthia* cinsine ait bazı türlerde yaptığı çalışmada sürgün kültürlerinde başlangıç materyali olarak olgunlaşmamış çiçek saplarını kullanmıştır. 5,4 µm zeatin ribozit içeren modifiye edilmiş MS ortamında kültüre alınan eksplantlar 8-12 hafta içerisinde sürgün oluşturmaya başlamıştır. Sürgünler in vitro olarak kolaylıkla köklendirilmiş ve köklendirilen bitkiler toprağa aktarılmıştır.

Mycock vd. (1997) nesli tükenmekte olan *Haworthia koelmaniorum* ve *Haworthia limifolia*, türünün somatik embriyogenez kullanılarak mikroçoğaltımını araştırmıştır. Somatik embriyo oluşumu için temel besin ortamı olarak MS + 20 g/L sukroz + 10 g/L agar karışımı kullanılmış, besin ortamının pH' sı 5.6'ya ayarlanmıştır. *Haworthia limifolia* için 2,4-D (1.0, 2.0 ve 5.0 mg/l) + picloram (1.0 ve 2.0 mg/l) ve 0.25 mg/l kinetin + 1.0 veya 2.0 mg/l picloram kombinasyonları test edilmiştir. 2 mg/L 2,4 D içeren ortamlarda kültüre alınan eksplantlarda (yaprakların 1/3'lük uç kısmını) en iyi direkt somatik embriyogenesis meydana gelmiştir.

Bununla birlikte, embriyoidler bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortama transfer edildiklerinde çimlenmemiş, aksine kallus oluşumu gözlenmiş daha sonra sekonder embriyogeneze maruz kalmıştır. *Haworthia koelmaniorum* türünde ise embriyo uyartım ortamına 2.0 mg/l picloram ve 0.25 mg/l kinetin eklenerek 0.1, 0.2 ve 0.3 mg/l konsantrasyonlarında ABA'nın embriyoid uyartımı üzerindeki etkisi test edilmiştir. 0.2 veya 0.3 mg/L ABA'e maruz bırakılan yaprak eksplantlarının somatik hücrelerinden doğrudan çimlenme yeteneğindeki somatik embriyoidler gelişmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar yakın akraba türlerin bile farklı gereksinimleri olduğunu göstermiştir.

Lizumi ve Amaki (2011), *Haworthia cymbiformis* (Haw.) Duval türünün ince hücre tabakası (TCL) kültürü ile mikroçoğaltımını araştırmıştır. İnce hücre tabaka eksplantları yaprak ve gövde kısımlarından 1-3 mm kalınlığında hazırlanmıştır. Eksplantların yüzey sterilizasyonu önce %70 etanolde 10 saniye ardından %1'lik NaOCI'te 13 dakika tutularak sağlanmıştır. Eksplantlar pH'ı 5.6'ya ayarlanmış, 0.1 mg/l BA ile 0.5 veya 1.0 mg/l IAA ilave edilmiş MS + 30 g/L sukroz ortamında kültüre alınarak, 24±2 °C sıcaklıkta 16/8 aydınlık/karanlık fotoperiyodik düzende inkübe edilmiştir. Yalnızca gövde eksplantları üzerinde adventif sürgünler meydana gelmiş, en yüksek sürgün sayısı 0.1 mg/L BA ilave edilen ortamda eksplant başına 24.0 adet olarak gerçekleşmiştir. Yapraklardan hazırlanan eksplantlardan ise sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiştir.

Liu vd. (2017), *Haworthia turgida* Haw. türünün hızlı ve etkili bir mikroçoğaltım yöntemini oluşturmak için yaptığı çalışmalarda bitki büyüme düzenleyicilerinin kallus rejenerasyonu, adventif sürgün farklılaşması ve kök oluşumu üzerindeki etkisini araştırmıştır. Eksplant kaynağı olarak kullanılan genç yapraklar önce musluk suyu altında birkaç damla sıvı deterjanla 30 dakika boyunca yıkanmış ardından %70 etanolde 30 sn tutularak dezenfekte edilmiştir. Sterilize edilmiş yapraklar, 0.5-1.0 cm'lik parçalar halinde kesildikten sonra kültür ortamına aktarılmıştır. Kültür ortamı olarak Murashige ve Skoog tuzları, %3 sukroz ve %0.7 agar kullanılmıştır. Ortam pH'ı 5.8'e ayarlanmıştır. En yüksek kallus uyarımı yüzdesi (%95,6), 1.0 mg/L BA ve 0,1 mg/L NAA ilave edilen MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarından elde edilmiş ve bu kallus uyarım ortamına 2.5 mg/L TDZ eklendiğinde optimal kallus proliferasyonu tespit edilmiştir. En yüksek sürgün sayısı (25.7 adet) MS + 1.0 mg/L BA + 0.2 mg/L 2,4-D kombinasyonunda kültüre alınan kalluslardan elde edilmiştir. Sürgün başına en yüksek kök sayısı (6.2 adet) ve en yüksek köklenme yüzdesi (%82.0) MS + 0.05 mg/L NAA ortam bileşiminde inokule edilen adventif sürgünlerden elde edilmiştir. In vitro sürgünler

toprak ve vermikulit karışımına dikilerek serada dış koşullara alıştırılmıştır. Dış koşullara transfer edilen bitkiciklerin başarı oranı ise %91.6 olarak bildirilmiştir.

Hashemi vd. (2018), *Haworthia truncata* türünde sürgün rejenerasyonu üzerine sitokininlerin ve besin ortamının, sürgünlerin köklendirilmesinde ise oksinlerin etkisini araştırmıştır. Tomurcuk içeren yaprak eksplantlarını proliferasyon için BAP (0, 1.0, 2.0 mg/L) veya 2.0 mg/L Kinetin, köklenme için 1.0 ve 2.0 mg/L IBA ilave ettikleri MS ve ½ MS ortamında kültüre almıştır. Araştırma sonuçları iki temel besin ortamı (MS, ½ MS) arasında sürgünlerin yaş ağırlığı bakımından önemli bir fark olmadığını göstermiştir. En yüksek sürgün proliferasyonu (%87.7) 2.0 mg/L Kinetin içeren ortamlarda, eksplant başına düşen en yüksek ortalama sürgün sayısı ise (4.6 ve 4.4 adet) 2.0 ve 1.0 mg/L BAP içeren ortamlarda, en yüksek köklenme yüzdesi ise (%90.5 ve %80.5) 1.0 ve 2.0 mg/L IBA ilave edilen MS besin ortamında tespit edilmiştir.

Kim vd. (2018), *Haworthia maughanii*'nin in vitro kitlesel üretimi üzerine büyümeyi düzenleyici maddelerin etkisini araştırdığı çalışmada, kallus oluşumu için uygun eksplant kaynaklarını, sürgün oluşumu ve köklenme için de optimum büyümeyi düzenleyici konsantrasyonlarını belirlemeyi amaçlamıştır. Kallus oluşumu için uygun bitki kısımlarını tespit etmek için yaprak, çiçek ve çiçek sapı eksplantlarını 0 - 2.0 mg/l NAA ile 0 - 2.0 mg/l TDZ içeren MS besin ortamında kültüre almıştır. Çalışmada 1.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l TDZ, 2.0 mg/l NAA + 2 mg/l TDZ uygulamaları ile 1.0 - 2.0 mg/l NAA ilave edilen ortamlarda eksplantların tamamı %100 oranında kallus oluşturmuştur. En etkili bitki kısımlarının yapraklar olarak belirlendiği araştırmada, 0.1 mg/l NAA ve 0.1 mg/l BA uygulamaları en yüksek sürgün sayısını (22.0 adet) vermiştir.

Chen vd. (2019), ticari *Haworthia* 'Sansenju' (*H. obtusa*×*H. comptoniana*) çeşidinde kallus proliferasyonu ve sürgün rejenerasyonu üzerine büyümeyi düzenleyici maddelerin ve ışık intensitesinin etkisini araştırmıştır. Çalışma kapsamında 5 mm'lik çiçek sapı eksplantları farklı konsantrasyonlardaki BA ve NAA ilave edilmiş MS besin ortamında kültüre alınarak 10 µmol/m²/s veya 45 µmol /m²/s ışık intensitesinde inkübe edilmiştir. En yüksek kallus proliferasyon indeksi (%93.15) 10 µmol /m²/s ışık şiddetinde inkübe edilen 1.0 mg/ L BA + 0.1 mg /L NAA ortam bileşiminde kültüre alınan örneklerde, en iyi sürgün proliferasyon oranı (%65.57-81.01) ise 45 µmol /m²/s ışık intensitesinde inkübe edilen 1.0 mg/L BA + 0-0.4 mg/L NAA ortam bileşiminde kültüre alınan örneklerde tespit edilmiştir. Maksimum kök uzunluğu (15.57mm) ve köklenme frekansı (sürgün başına 17 kök) MS + 0.4 mg/L NAA + 0.4mg/L IBA ortam

kombinasyonunda inokule edilen adventif sürgünlerden elde edilmiştir. Dış koşullara transfer edilen bitkiciklerde canlılık oranı %100 olarak belirlenmiş, 11 hafta içerisinde çiçek saplarından etkili bir mikroçoğaltım prosedürü geliştirilmiştir.

Kim vd. (2019 a), *Haworthia retusa*'da somatik embriyogenez üzerine oksinlerin etkisini araştırmış ve etkili bir in vitro bitki rejenerasyon yöntemi oluşturmuştur. Serada yetiştirilen bitkilerin yaprakları önce akar su altında iyice yıkanarak steril distile su ile durulanmış, daha sonra, 60 saniye boyunca %70 (v/v) etanol ile, ardından birkaç damla Tween 20 içeren %2.0 (v/v) sodyum hipoklorit ile 10 dakika süreyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Ardından steril saf su ile beş kez durulanarak steril filtre kağıdı kullanılarak kurutulmuştur. Yaprak eksplantlarından MS ortamına farklı dozlarda 2,4-D, IAA, IBA ve NAA tek başlarına veya 4 µM TDZ ile kombine edilerek eklendiğinde somatik embriyo uyarımı gerçekleşmiştir. Çalışmada kullanılan dört oksin içerisinde somatik embriyo uyarımı bakımından en umut vadeden oksin IBA olarak belirlenmiş, en yüksek somatik embriyo uyarımı (%60.7) yaprak eksplantı başına 20.7 embriyo ortalaması ile 20 µM IBA ilave edilen MS besiyerinde gözlenmiştir. Oksin bulunan ortamlara 4 µM TDZ ilavesi, somatik embriyo frekansı ve somatik embriyo sayısını artırmıştır. Somatik embriyogenez için IBA + TDZ en iyi ortam kombinasyonu olmuştur. En yüksek somatik embriyo uyarım insidansı (%100) ortalama 55.8 somatik embriyo ile 16 µM IBA + 4 µM TDZ içeren kültür ortamlarında meydana gelmiştir. Somatik embriyolar 2 µM GA₃ ilave edilmiş MS besin ortamında en iyi çimlenmeyi göstermiştir. In vitro bitkicikler arasında bir miktar morfolojik varyasyonlar gözlenmiştir. Çimlendirme ortamından gelen iyi gelişmiş bitkicikler serada dış ortama alıştırılmıştır.

Kim vd. (2019 b), 2018 yılında *Haworthia maughanii* türünde yaptıkları çalışmaya benzer bir çalışmayı *Haworthia truncata* türünde tekrarlamışlardır. *H. truncata* türünün in vitro kitlesel üretimi üzerine büyümeyi düzenleyici maddelerin etkisini araştırdığı çalışmada, kallus oluşumu için uygun eksplant kaynaklarını, sürgün oluşumu ve köklenme için de optimum büyümeyi düzenleyici konsantrasyonlarını belirlemeyi amaçlamıştır. Eksplant olarak yapraklar, çiçek tomucuğu ve çiçek saplarını kullanmıştır. Çalışmada yaprak ve çiçek tomucuğu eksplantları 1.0-2.0 mg/L NAA ve 1.0mg/L NAA + 2.0mg/L TDZ uygulamalarında %100 oranında kallus oluşumu göstermiştir. Çiçek sapı eksplantları ise 2.0mg/L NAA + 2.0mg/L TDZ uygulamalarında %75 oranında kallus oluşturmuştur. Yapraklar en etkili eksplant kaynağı olarak belirlenmiştir. Kalluslardan en yüksek sürgün oluşumu oranı 0.1mg/L NAA uygulamasında, en fazla sürgün sayısı ise 66.3 adet ile 1.0mg/L NAA + 0.1 mg/l BA

uygulamasından elde edilmiştir. Farklı substrat karışımlarında akklimatizasyona alınan in vitro bitkiciklerde bitki boyu ve dış görünüş bakımından önemli bir farklılık görülmemiştir. Kültür koşullarının optimizasyonun *H.truncata* türünün in vitro kitlesel çoğaltımından sorumlu olduğu ifade edilmiştir.

Reshma vd. (2020) *Haworthia* cinsinin 5 farklı ticari çeşidi ile *H. splendens* türünde büyüme düzenleyicilerin somatik embriyogenez üzerine etkisini araştırmıştır. Çalışmada, *Haworthia* 'Natalie', 'Musin', 'Tiffany × Fertenon B Com', 'Baeckbong', 'White Wolf' çeşitleri ile *H. splendens* türüne ait bitkilerden hazırlanan çiçek sapı eksplantları büyüme düzenleyici içeren veya içermeyen MS veya ½ MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantlar musluk suyu altında yıkandıktan sonra %70'lik etanolde 60 saniye tutulmuş ardından 2 damla Tween-20 damlatılmış %1'lik NaOCl'te 10 dakika bekletilerek yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuştur. Araştırmada 8 farklı besiyeri kullanılmıştır. Besin ortamlarının hazırlanmasında büyüme düzenleyici içeren/içermeyen MS ve ½ MS ortamları, büyüme düzenleyici olarak kinetin ve BA, sakaroz (20.0 g/L), hindistan cevizi suyu (20.0 ml/L) ve Gelrite (2.0 g/L) kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH'sı 5.8'e ayarlandıktan sonra 121°C'de otoklavlanmıştır. Tüm kültürler 24 ± 1°C sıcaklıkta 16/8 saatlik bir fotoperiyodik düzende 40 µmol·m⁻²·s⁻¹'lik bir ışık yoğunluğunda flüoresan lambalar kullanılarak inkübe edilmiştir. Çalışma sonucunda, beş çeşitten üçünde sürgün ve kallus uyarımı gözlenirken, diğer iki çeşit ve bir türde sadece kallus uyarımı gözlenmiştir. Büyüme düzenleyici içermeyen ortamlardan ½ MS, sürgün ve kallus uyarımı bakımından MS ortamından daha iyi performans göstermiştir. Kinetin ve BA ilave edilen altı ortamda sürgün oluşumu gözlenmemiş, yalnızca *H. splendens* ve 'White Wolf' çeşidinde kallus oluşumu görülmüştür. Çiçek saplarının genç olan üst kısımlarından hazırlanan eksplantlarda organogenez daha başarılı bulunmuştur. Araştırmada, en yüksek sürgün ve kök oluşumu NAA içeren besiyerinde gözlenirken, BA içeren besiyerinde köklenme meydana gelmemiştir. 18 haftalık kültür süresinde en fazla sürgün sayısı (20,8 ± 0,29) 'Tiffany × Fertenon B Com' çeşidinde 1.4 mg/L BA içeren besiyerinde, en fazla kök sayısı ise 0.05 mg/L NAA içeren ortamda *Haworthia* 'Natalie' çeşidinde tespit edilmiştir.

Kharrazi vd. (2022), *H.cooperi* Baker türünün in vitro çoğaltımını optimize etmek amacıyla üç aşamalı bir çalışma yürütmüştür. Araştırmacılar, eksplant kaynağı olarak yaprakları kullanmıştır. Araştırmanın ilk aşamasında rejenerasyon üzerine farklı sitokinin (BA ve Kinetin) cinsi ve dozunun (0, 1, 2, 3 mg/l), ikinci aşamasında bitkicik gelişimi üzerine farklı besin ortamı reçetesi (MS ve B₅) ve konsantrasyonlarının (yarı ve tam kuvvetinde), üçüncü aşamasında ise

bitkiciklerin köklenmesi üzerine farklı oksin cinsi (NAA, IBA ve IAA) ve dozlarının (0, 0.5, 1.0 ve 1.5 mg/L) etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda BA ve Kinetin'in sürgün oluşumunu artırdığı, her iki hormonun dozunun artmasıyla sürgün sayısının da arttığı ancak bu hususta BA'in daha etkili olduğu, hormon içermeyen ortamlarda ise sürgün oluşumunun meydana gelmediği, en fazla bitkicik sayısını (5.50 adet) MS + 0.5 mg/l NAA + 3.0mg/L BA ortam kombinasyonunun verdiği, bitkicik gelişimi üzerine MS besin ortamının B5 ortamına göre daha iyi performans gösterdiği, en iyi köklenme sonuçları ise ½ MS + 1.0 mg/l IAA ortam bileşiminde tespit edilmiştir.

Bilimsel literatürün incelenmesi sonucu *Haworthia* cinsine ait birçok türde mikroçoğaltım çalışmalarına rastlanmıştır, *Haworthia fasciata* (Willd.) Haw. türünde ise sınırlı sayıda bilimsel çalışmanın olduğu anlaşılmıştır. Ülkemizde ise *Haworthia fasciata* (Willd.) Haw. türünün doku kültürü ile çoğaltımı ile ilgili bilimsel bir literatür ile karşılaşılmamıştır. Dolayısıyla bu tez çalışması *Haworthia fasciata* (Willd.) Haw. türünün mikroçoğaltımı konusunda ülkemizde yapılan ilk araştırma özelliği taşımaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında *Haworthia fasciata* 'Alba' kùltivarına ait bitkilerin yaprak eksplantları kullanarak adventif sürgün rejenerasyonu elde etme, *in vitro* adventif sürgünleri köklendirme ve *in vitro* bitkicikleri dış koşullara alıştırma aşamalarının tamamlanarak bir mikroçoğaltım prosedürünün oluşturulması amaçlanmıştır.

3. MATERİYAL VE METOT

Bu çalışmanın in vitro aşamaları 2019-2022 yılları arasında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı ile Bartın Üniversitesi Orman Fakültesi Orman Endüstri Mühendisliği Bölümü Laboratuvarlarında, ex vitro aşamaları ise Bartın Üniversitesi Bartın Meslek Yüksekokulu Uygulama Seraları'nda yürütülmüştür.

3.1 Materyal

Çalışmada *Haworthia fasciata* 'Alba' kùltivarına ait bitkilerin yaprakları materyal olarak kullanılmıştır. Ticari yetiştiricilikte fınan saksılarda (5.5 cm) satışa sunulan genç bireyler donör bitki olarak tercih edilmiştir. Denemelerde kullanılan bitki örneklerine ilişkin görüntüler Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Bitki materyali Bartın'da sukulent bitki üretimi yapan Çakırlar Tarımland firmasından temin edilmiştir.



Şekil 3.1: *Haworthia fasciata* 'Alba' kùltivarına ait donör bitki örnekleri

3.2 Metot

3.2.1 Genel in vitro Kùltür Koşulları

İn vitro çalışmlar hepa filtreli laminar akışlı steril kabin (Bilser Biosafety Cabinet Class II) içerisinde yapılmıştır. Steril kabin kontaminasyon riskini minimize etmek amacıyla her kullanımdan önce %70'lik etil alkol ile dezenfekte edildikten sonra 30 dakika boyunca UV lamba çalıştırılarak steril hale getirilmiştir. Çalışmada kullanılan cam kavanoz, durulama işleminde kullanılmak üzere hazırlanan 1 litrelik saf su dolu şişeler, alüminyum folyo ile sarılmış pens, bistüri, kurutma kağıdı gibi yardımcı materyaller 1.2 atm basınç altında, 121°C'de 60 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan ekipmanların tamamı %70'lik etil alkol püskürtölerek kabin içerisine alınmıştır. Dikim esnasında pens ve bistüri devamlı olarak önce % 96'lık etil alkole batırılıp daha sonra alev lambasına tutularak sterilize edilmiştir. Kabin içerisinde çalışırken steril ortamın devamlılığı için eller ve kabin içi düzenli aralıklarla %70'lik etil alkolle muamele edilmiştir.

3.2.2 Besin Ortamının Hazırlanması

Denemelerde temel besin ortamı olarak Murashige ve Skoog (MS) ortamı kullanılmıştır. Besin ortamlarının hazırlanmasında kullanılan %100 saf kimyasal maddelerin önce stok çözeltileri hazırlanmıştır. Organik maddelerin x100'lük stok çözeltileri -20°C'de derin dondurucuda, inorganik tuzların x10'luk stok çözeltileri ise +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Dikim yapılmasından önce stok çözeltilerden gerekli miktarlarda alınıp karıştırılmış ve sulandırılarak esas besin ortamı hazırlanmıştır. Ortamların pH'ı, agar ve şeker katılmasından önce, 0.1 M HCl (hidroklorik asit) ya da 1N NaOH (sodyum hidroksit) kullanılarak mikroçoğaltımda olumlu sonuçlar verdiği bildirilen 5.7'e ayarlanmıştır. Temel besin ortamı içerisine karbon kaynağı olarak %3 oranında sakaroz, jelleştirici madde olarak ise %0.7 oranında agar ilave edilmiştir.

Literatür araştırmasından elde edilen bilgiler ışığında sürgün rejenerasyonu elde edebilmek amacıyla oksin ve sitokininlerin farklı cins ve dozları denemeye alınmıştır. Bu amaçla oksin grubu hormonlardan IAA, IBA, 2,4-D'nin 0.2 0.5 ve 1.0 mg/l dozları, sitokinin grubu hormonlardan Kinetin ve BAP'ın 1.0 ve 2.0 mg/l dozları kullanılmıştır.

İn vitro sürgünlerin köklendirilmesinde hormonsuz MS ve ½ MS ile MS besin ortamına farklı konsantrasyonlarda ilave edilen oksin grubu hormonların tek olarak veya kombine olarak

etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan oksin veya oksin kombinasyonları şunlardır: IBA (0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l), NAA (0.1 ve 0.2), IBA (0.1 mg/l) + NAA (0.4 mg/l), IBA (0.4 mg/l) + NAA (0.4 mg/l) .

Besin ortamlarının sterilizasyonu 1.2 atm basınç altında, 121°C’de 20 dakika süre ile yapılmıştır. Son olarak otoklavlanan ortamlar kabin içerisinde bulunan 250 ml’lik cam kavanozlara 50’şer ml olacak şekilde paylaştırılmış ve agarın katılması için soğumaya bırakılmıştır. Temel besin ortamının (MS) bileşimi Tablo 3.2’de verilmiştir.

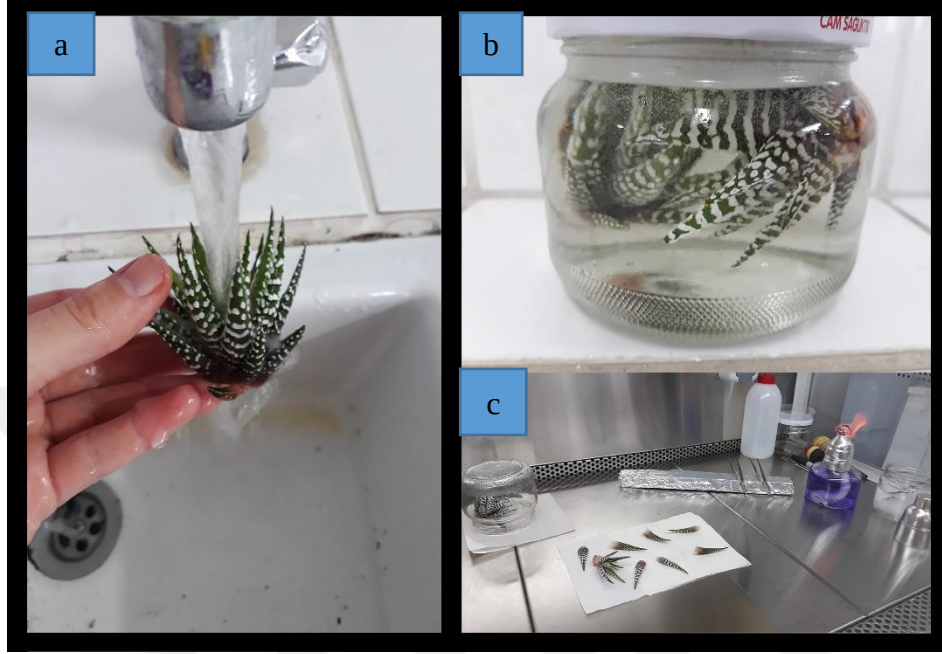
Tablo 3.1: Temel besin ortamı (MS) bileşimleri (Murashige ve Skoog, 1962).

BİLEŞENLER	MS (mg/l)
Makro Elementler	
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Mikro Elementler	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30
H ₃ BO ₃	6.2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
Na ₂ EDTA	37.3
Vitaminler	
Nikotinik Asit	0.5
Thiamin-HCl	0.1
Pridoksin-HCl	0.5
Glisin	2.0
Myo-inositol	100

3.2.3 Yüzeysel Sterilizasyon

Bitkisel materyalin yüzey sterilizasyonuna başlarken öncelikle bitki kök boğazından bistüri yardımı ile kesilerek, yetiştirme ortamındaki torf ve gözle görülebilecek diğer kalıntılardan arındırmak amacıyla musluk suyu altında 15 dakika yıkanmıştır. Daha sonra 2-3 damla Tween-20 ilave edilmiş %15’lik NaOCl içerisinde 30 dakika tutularak düzenli aralıklarla çalkalanmıştır. Bu aşamadan sonra sterilizasyon işlemlerine aseptik koşullar altında steril kabin

içerisinde devam edilmiştir. Eksplantlar steril saf su ile en az 3 defa olmak üzere 5'er dakika boyunca durulama işlemine tabi tutulmuştur. Durulanan eksplantlar kurutma kağıdı üzerine alınıp fazla sularından arındırılarak dikim için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.2: Yüzeysel sterilizasyon aşamaları a) Bitki örneklerinin musluk suyu altında yıkanması b) Ticari NaOCI içerisinde bekletme c) Durulama sonrası yapraklar üzerinde kalan saf suyun kaba filtre kağıtları ile uzaklaştırılması

3.2.4 Eksplantların Hazırlanması ve Kültür Ortamına Dikimi

Sterilizasyon işlemleri tamamlanan bitki örneklerinden pens ve bistüri yardımıyla yaprak eksplantları hazırlanmıştır. Yaprak eksplantlarının hazırlanmasında 2 farklı yöntem kullanılmıştır. I. yöntemde yaprak ayası her kısım 0.5-1.0 cm büyüklüğünde olacak şekilde parçalara ayrılmış, II. yöntemde ise eksplant olarak yaprak tabanını da içine alan tam yaprak kullanılmıştır. Eksplantlar 7.5 X 10 cm ebatlarındaki cam kavanozlarda her kavanozda 3-5 eksplant olacak şekilde kültüre alınmıştır. Dikim işlemleri tamamlanan kavanozların ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra streç filmle en az 3 tur sarılmış dış ortam ile bağlantısı tamamen kesilmiştir. Son olarak üzerine cam yazar kalem ile besin ortamı içeriği ve tarih bilgisi not edilmiştir.



Şekil 3.3: Eksplantların kültür ortamına dikimi

3.2.5 İnkübasyon Koşulları

Dikim işlemi tamamlanan kültürler sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, % 70 nem ve 2000lüx ışık şiddetindeki 16/8 aydınlık/karanlık fotoperiyodik düzene sahip iklimlendirme dolaplarında inkübe edilmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi aşaması da aynı iklim koşullarında gerçekleştirilmiştir. Eksplantlar her 3-4 haftada bir aynı ortamlarında alt kültürlerle alınmış, gelişen kallus ve sürgün sayıları haftalık olarak not edilmiştir.

3.2.6 Dış Koşullara Alıştırma (Akklimatizasyon)

Kök sayısı (3-5 adet) ve kök uzunluğu (1-3 cm) bakımından yeterli görülen bitkicikler kök kısımlarına zarar vermeden musluk suyu altında yıkanarak agardan arındırılmıştır. Agarlı besin ortamından arındırılan köklü bitkicikler, 121°C de 30 dakika süre ile otoklavlanarak sterilize edilen 4 farklı yetiştirme ortamına dikilmiştir. Yetiştirme ortamı olarak torf, perlit + torf (3:1 oranında) ve torf + pomza taşı (3:1 oranında) karışımı ile eşit oranlarda torf + perlit + pomza taşı karışımları kullanılmıştır. 3 x 3 cm ebatlarındaki viyoller içerisine doldurulan steril

yetiştirme ortamlarına in vitro bitkiciklerin dikim işlemi gerçekleştirilmiştir. Dikim işlemi tamamlanan viyoller 12 x 16 x 10 cm ebatlarındaki kapaklı polietilen kaplar içerisine yerleştirilmiş, dikimi izleyen ilk 2 hafta inkubasyon koşullarında belirtilen iklim dolabına, sonraki 2 hafta ise seraya alınarak dış koşullara alıştırılmaya çalışılmıştır. Dört haftalık alıştırma dönemi sonrası bitkiciklerin canlılık oranları belirlenmiştir. Dış ortama alıştırılan bitkiler serada içerisine 3:1 oranında torf + pomza taşı karışımı doldurulmuş 5.5 cm çapındaki fincan saksılar içerisinde gelişmeye bırakılmıştır.

3.2.7 Verilerin Analizi

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre her uygulamada 30-45 arasında örnek olacak şekilde kurulmuştur. Yapılan çalışmalarda kallus oluşumu, gelişme gösteren eksplant oranları, eksplant başına adventif sürgün sayısı, in vitro sürgünlerin köklenme oranı ve dış ortama alınan bitkiciklerin canlık oranları belirlenmiştir.

Yukarda belirtilen parametrelerde elde edilen bulgular Statistica 15 Paket programı ile varyans analizine tabi tutulmuş, farklı grupların harflendirilmesinde ise Duncan testinden yararlanılmıştır. Sonuçları yüzde olarak ifade edilen parametreler açı değerleri üzerinden istatistiki analize tabi tutulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Haworthia fasciata ‘Alba’ k ltivari için en uygun in vitro koşulların belirlenmesi amacıyla, yapılan literatür araştırmaları ışığında denemeler kurulmuştur. Sürgün rejenerasyonu çalışmalarında bitki büyüme düzenleyicileri ve eksplant tipi değiştirilerek    aşamada gerçekleştirilmiş, toplamda 45 farklı kombinasyon denenmiştir.  n vitro koşullarda gelişen sürgünler temel besin ortamı olan tam kuvvetteki MS ve yarı kuvvetteki MS (1/2 MS)’in de içinde bulunduğu 11 farklı ortamda köklendirmeye alınmıştır. Köklenen sürgünler ise 4 farklı yetiştirme ortamında dış koşullara alı tırılmaya çalışılmıştır. Elde edilen bulgular bu bölümde verilmiştir.

4.1 Sürgün Rejenerasyonu Denemeleri

Haworthia fasciata ‘Alba’ k ltivarının mikro o altımı    aşamada gerçekleştirilmiştir. Mikro o altımın ilk kültüre alma aşamasını sürgün rejenerasyonu çalışmaları oluşturmaktadır. Bu amaçla taksona ait bitkilerin yapraklarından hazırlanan farklı tipteki eksplantların farklı büyümeyi düzenleyici cins ve dozunu içeren besin ortamlarındaki gelişme durumları ve adventif sürgün sayıları kaydedilmiştir.

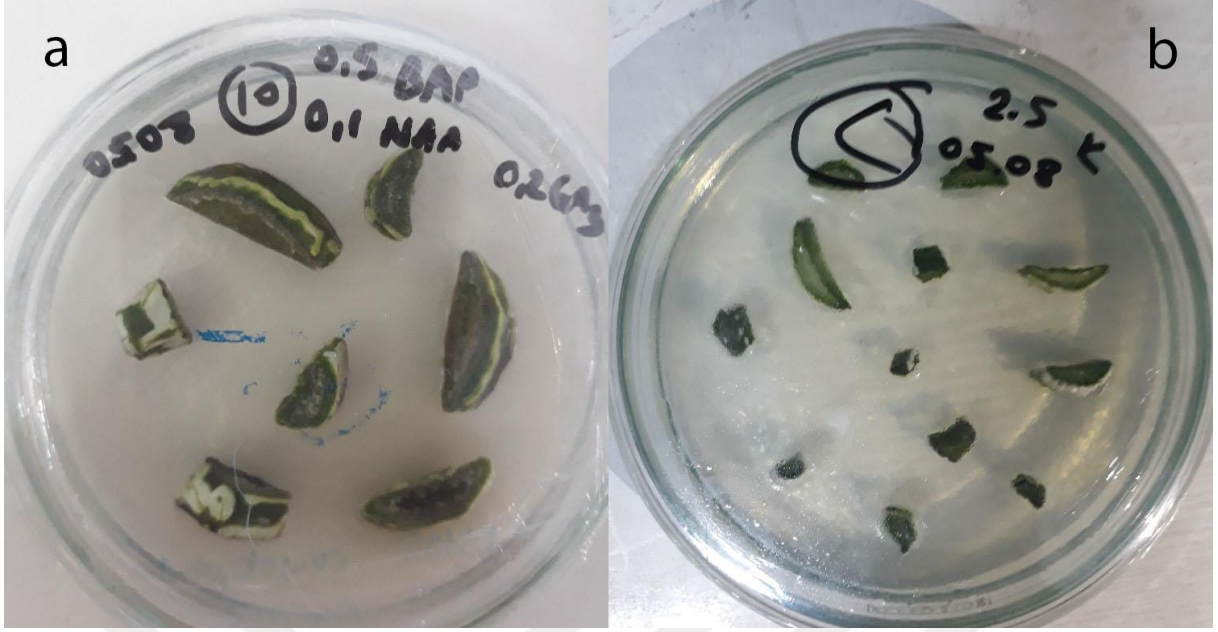
4.1.1 I. Deneme

 n deneme niteliğindeki bu araştırmada eksplant tipi ve büyümeyi düzenleyici maddelerin kallus ve sürgün oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla yaprak ucundan ba layarak yaprak tabanına doğru 0.5-1.0cm b y kl  nde kesilerek hazırlanan eksplantlar büyümeyi düzenleyici maddelerin eklendiği 14 farklı besin ortamı kombinasyonu ile Kontrol grubunu oluşturan tam kuvvetteki MS ortamında gelişmeye bırakılmıştır. Denemede kullanılan ortam bileşimleri ve eksplantların gelişme durumları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

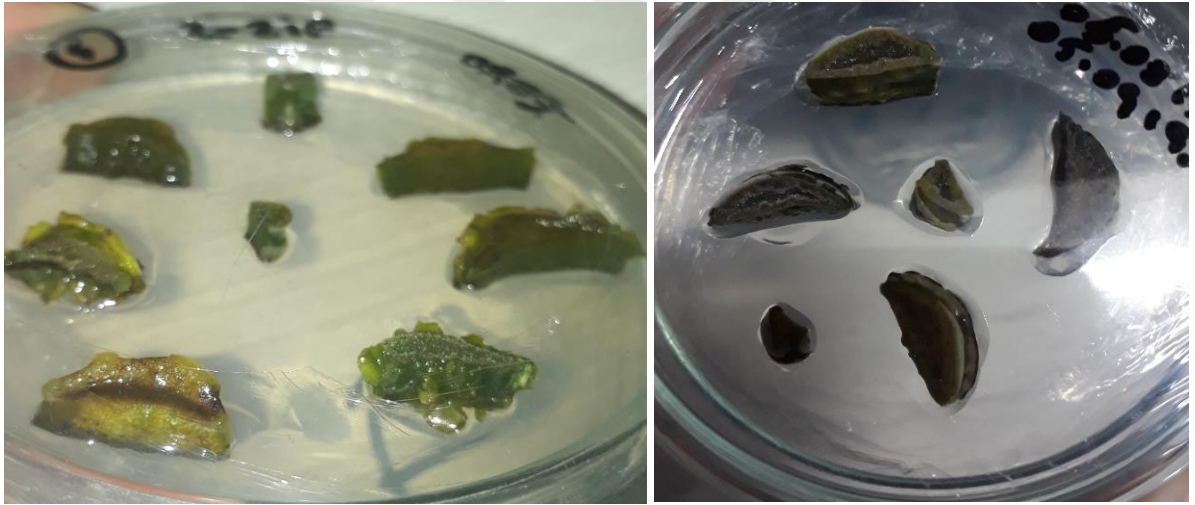
Tablo 4.1: I. denemede kullanılan besiyeri kombinasyonları ve eksplantların gelişme durumu

Besiyeri No	Besiyeri Kombinasyonları	Eksplantların Gelişme Durumu
1	MS	Gelişme yok
2	MS + 0.5 mg/l Kinetin	Gelişme yok
3	MS +1.25 mg/l Kinetin	Gelişme yok
4	MS + 2.5 mg/l Kinetin	Gelişme yok
5	MS + 5.0 mg/l Kinetin	Gelişme yok
6	MS + 0.5 mg/l 2İP	Gelişme yok
7	MS + 1.25 mg/l 2İP	Gelişme yok
8	MS + 2.5 mg/l 2İP	Gelişme yok
9	MS + 5.0 mg/l 2İP	Gelişme yok
10	MS + 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA + 0.2 mg/l GA ₃	Gelişme yok
11	MS + 1.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA + 0.2 mg/l GA ₃	Gelişme yok
12	MS + 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA + 0.2 mg/l GA ₃	Gelişme yok
13	MS + 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA + 0.2 mg/l GA ₃	Gelişme yok
14	MS + 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA	Gelişme yok
15	MS + 0.1 mg/l TDZ	Kallus benzeri yapılar

İlk denemede 14 farklı besiyeri kombinasyonunda kültüre alınan 0.5-1.0 cm büyüklüğündeki yaprak eksplantlarında 12.haftanın sonunda toplamda 3 kez alt kültür ortamına transfer edilmelerine rağmen kallus oluşumu veya sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiştir. Yalnızca MS + 0.1 mg/l TDZ ortam bileşiminde kallus benzeri yapılar gözlenmiştir. 12. haftanın sonunda meydana gelen kararırma nedeniyle tüm eksplantlar canlılıklarını yitirmiştir. Çalışmada kallus oluşumu veya sürgün rejenerasyonu elde edilememesinin eksplant tipinden kaynaklandığı, kültüre alınan yaprak ayasını oluşturan dokularının büyümeyi düzenleyicilerin etkisiyle sekonder meristeme dönüşmediği sonucuna varılmıştır. Nitekim *Haworthia fasciata* Haw. türünde tek mikroçoğaltım çalışmasının sahibi olan Beyl ve Sharma (1983), *Gasteria verrucosa* Haw ve *Haworthia fasciata* Haw. türlerinde farklı yaprak kısımlarından (yaprak ucu, ortası ve tabanı) rejenerasyon elde etmeyi amaçladığı çalışmada *Gasteria verrucosa* Haw türünün tüm yaprak kısımlarından somatik embriyo meydana geldiğini, *Haworthia fasciata* Haw. türünde ise yaprak ayasından ziyade yaprak tabanından hazırlanan eksplantlardan somatik embriyo meydana geldiğini vurgulamıştır. Bunun yanında Lizumi ve Amaki (2011), *Haworthia cymbiformis* (Haw.) Duval türünde yaptıkları mikroçoğaltım çalışmalarında yapraklardan hazırlanan eksplantlardan sürgün rejenerasyonunun gerçekleşmediğini bildirmiştir. Dolayısıyla ilk denemeden elde edilen bulgular Beyl ve Sharma (1983) ve Lizumi ve Amaki (2011)'nin araştırma sonuçları ile paralellik göstermektedir. Şekil 4.1'de I. deneme sonuçlarına ilişkin bazı görüntülere yer verilmiştir.



Şekil 4.1: Farklı besiyeri kombinasyonlarında gelişme göstermeyen yaprak eksplantları



Şekil 4.2: Alt kültür ortamında kararma meydana gelen yaprak eksplantları

4.1.2 II. Deneme

İlk denemeden elde edilen bulgular değerlendirilerek kapsamlı bir literatür araştırmasına ihtiyaç duyulduğu ve ticari doku kültürü laboratuvarları ile görüş alışverişinde bulunulması gerekliliği kanaati oluşmuştur. Bu amaçla yapılan araştırmalar neticesinde ilk denemeden olumlu cevap alınamamasında temel nedenin eksplant tipi olduğu görüşü ağırlık kazanmış, sonraki denemelerde yaprak ayası (lamina) ve yaprak tabanını (bазis) içeren tam yapraklar eksplant

olarak kullanılmıştır. İn vitro kültürlerin rejenerasyonunda temel faktörlerden biri de büyümeyi düzenleyiciler olup II. denemede temel besin ortamına (MS) iki farklı sitokin (BAP ve Kinetin) ile üç farklı oksin cinsi (IAA, IBA ve 2,4-D) ve dozu (0.2, 0.5 ve 1.0 mg/l) ilave edilmiştir. Bu çalışmada yapraklar, 18 farklı büyümeyi düzenleyici kombinasyonunda kültüre alınmış, gelişme gösteren eksplant oranları ve eksplant başına düşen sürgün sayıları tespit edilmiştir. Kontrol grubu (MS) örneklerinde ise herhangi bir gelişme olmadığından değerlendirmeye alınmamıştır. Denemede kullanılan besin ortamı kompozisyonları ile gelişme gösteren eksplant oranları ve eksplant başına düşen ortalama sürgün sayıları Tablo 4.2’de sunulmuştur.

Tablo 4.2. II. Denemede kullanılan besin ortamı bileşimleri, gelişme oranı ve eksplant başına düşen sürgün sayıları

Ortam No	BGD Dozları (mg/L)	Sağlıklı Eksplant sayısı / Dikilen Eksplant Sayısı	Gelişme gösteren Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Ortalama Sürgün Sayısı (Adet)
1	BAP IAA 1 0.2	34/45	17.65±1.86 i	2.50±0.58 ef
2	BAP IAA 1 0.5	35/45	8.57±0.70 k	4.67±0.58 a
3	BAP IAA 1 1	33/45	12.13±0.46 j	3.75±0.50 bc
4	BAP IBA 1 0.2	35/45	34.28±0.67 de	1.75±0.50 g
5	BAP IBA 1 0.5	36/45	33.33±0.58 ef	2.75±0.50 d-f
6	BAP IBA 1 1	34/45	35.3±0.36 d	3.25±0.50 cd
7	BAP 2,4 D 1 0.2	32/45	46.87±1.30 c	0
8	BAP 2,4 D 1 0.5	37/45	32.43±0.90 f	0
9	BA 2,4 D 1 1	31/45	29.03±0.66 g	0
10	Kinetin IAA 1 0.2	33/45	27.28±0.78 h	2.67±0.58 d-f
11	Kinetin IAA 1 0.5	34/45	35.28±0.91 d	2.25±0.50 fg
12	Kinetin IAA 1 1	32/45	37.5±0.93	4.25±0.50 ab
13	Kinetin IBA 1 0.2	35/45	34.28±0.54 de	1.75±0.50 g
14	Kinetin IBA 1 0.5	33/45	27.28±0.76 h	2.33±0.58 eg

15	Kinetin IBA	1 1	32/45	18.75±1.05 i	3.0±0.82 de
16	Kinetin 2,4 D	1 0.2	34/45	8.83±0.40 k	0
17	Kinetin 2,4 D	1 0.5	35/45	51.43±1.47 b	0
18	Kinetin 2,4 D	1 1	38/45	81.80±1.90 a	0
CV				3.48	20.59
Besin Ortamı				**	**

(**) Sütunda farklı harfleri alan gruplar arası farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($P \leq 0.05$)

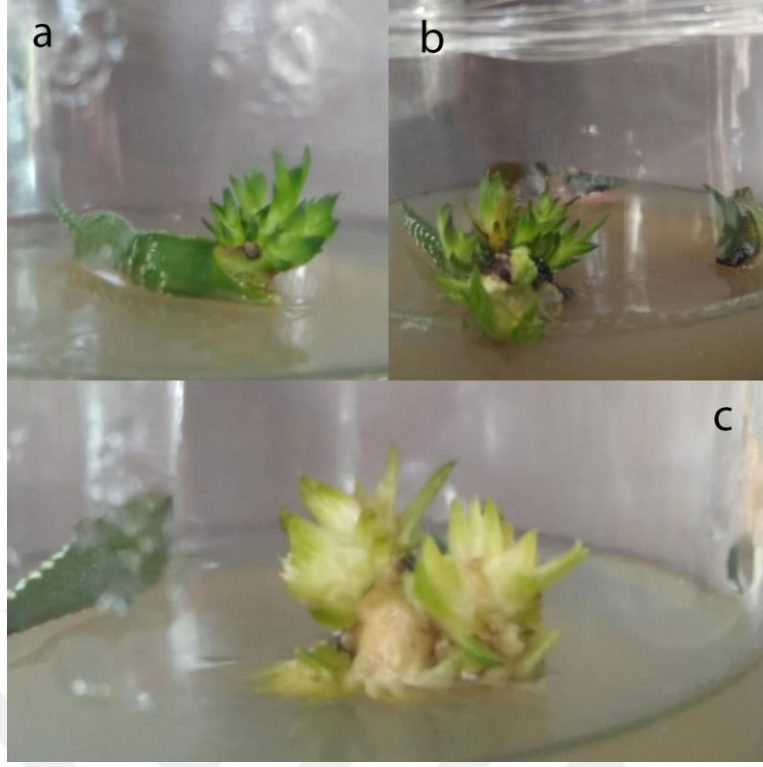
II. denemede, Kinetin + 2,4-D içeren büyümeyi düzenleyici kombinasyonlarında kültüre alınan örneklerde, gelişme gösteren eksplant oranlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmada en yüksek gelişme oranı (%81.80±1.90) Kinetin + 2,4-D kombinasyonunun 1.0 mg/L dozunda tespit edilmiştir. Bu oranı %51.43±1.47 ile 1.0mg/L Kinetin + 0.5 mg /L 2,4-D kombinasyonu izlemiştir. Yüksek oranda gelişme gösteren uygulamalarda gelişmenin yönü büyük oranda kallus şeklinde gerçekleşmiştir. Kontrol grubunu oluşturan MS ortamı dışındaki tüm uygulamalarda gelişme kaydedilmiştir. Oksinler genellikle hücre uzaması, hücre bölünmesi, adventif kök oluşumu, yan sürgün gelişiminin baskılanması, köklendirme ve embriyogenesis üzerinde etkilidirler. Doku kültürlerinde tek başlarına veya sitokininler ile birlikte kullanıldığında kallus uyarımını sağlayabilirler. Sentetik bir oksin olan 2,4-D çalışmamızda kallus oluşumunu uyarmıştır. Hashemi vd. (2018), *Haworthia truncata* türünde yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla yaptıkları çalışmada gelişme oranı bakımından en yüksek sonuçların Kinetin içeren ortamlarda meydana geldiğini bildirmiştir. Aynı cinste in vitro çoğaltım çalışmaları yapan Liu vd. (2017), *Haworthia turgida* türünde, Kim vd. (2018) ise, *Haworthia maughanii* türünde en iyi gelişmenin yaprak eksplantlarında meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Gelişme oranı bakımından elde edilen sonuçlar, Hashemi vd. (2018), Liu vd. (2017), ve Kim vd. (2018)'nin sonuçları ile örtüşmekte ve birbirini destekler niteliktedir.

Eksplant başına düşen sürgün sayısı bakımından yapılan değerlendirmelerde ise IAA içeren kombinasyonların öne çıktığı görülmüştür. Çalışmada en yüksek ortalama sürgün sayısı (4.67±0.58 adet) 2 numaralı ortam olan 1.0 mg/L BAP+ 0.5 mg/L IAA kombinasyonundan elde edilmiş, bunu 4.25±0.50 adet sürgün ile 12 numaralı ortam olan 1.0 mg/L Kinetin + 1.0 mg/L IAA ortam kombinasyonu izlemiştir. Gelişme oranı bakımından en yüksek verilerin elde edildiği 2,4-D içeren ortam ortam kombinasyonlarında ise adventif sürgün rejenerasyonu elde

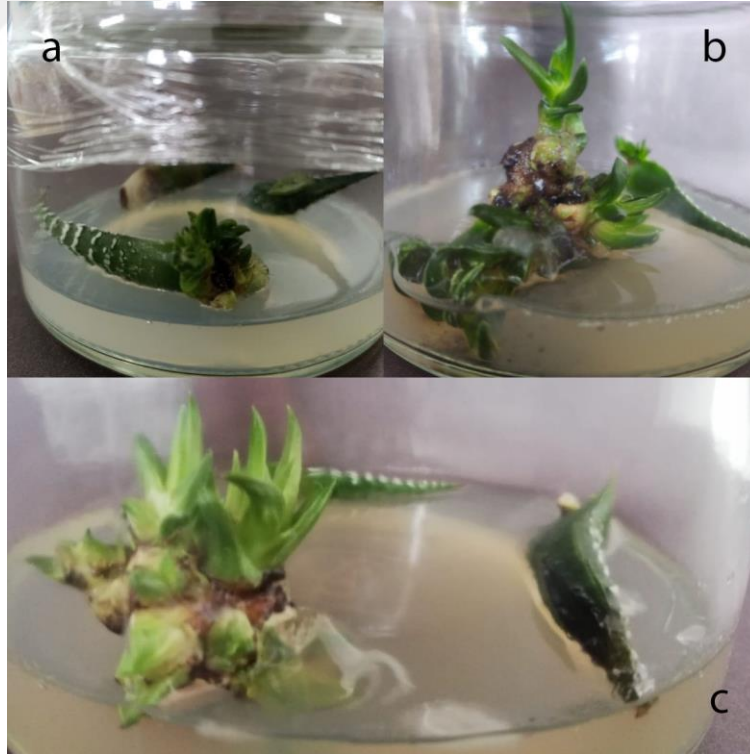
edilememiştir. Gelişmenin kallus şeklinde görüldüğü bu ortam kombinasyonunda kültüre alınan ekplantlar kallus oluşumu sonrasında MS + 0.2 mg/L GA₃ ortamına aktarılmış ancak sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiştir. Kaul ve Sabharwal (1969) bazı *Haworthia sp.* türlerinde in vitro sürgün rejenerasyonu elde etmeyi amaçladığı çalışmada Kinetin + IAA kombinasyonlarında 1-4 adet arasında sürgün meydana geldiğini bildirmiştir. Kharrazi vd. (2022) ise *H.cooperi* Baker türünde yaptıkları araştırmasında BAP ve Kinetin'in sürgün oluşumunu artırdığı, hormon içermeyen ortamlarda ise sürgün oluşumunun meydana gelmediğini vurgulamıştır. Bunun yanında Ogihara (1979) ise *Haworthia setata* türünde, kinetin sürgün farklılaşmasını teşvik ettiğini not etmiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısı bakımından elde edilen bulgular Kaul ve Sabharwal (1969) sonuçları ile uyumlu olup, Kharrazi vd. (2022) ve Ogihara (1979) ile de paralellik göstermektedir. II. denemede kullanılan büyümeyi düzenleyici kombinasyonlarının etkilerine ilişkin görüntüler sıra ile aşağıda sunulmuştur (Şekil 4:3-4:9).



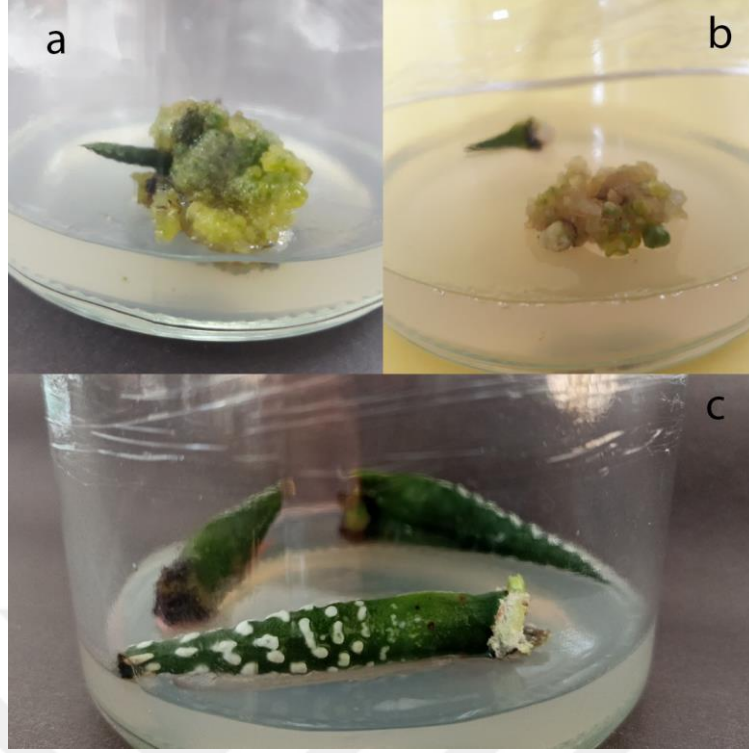
Şekil 4.3: Gelişme göstermeyen kontrol grubu (MS) örnekleri



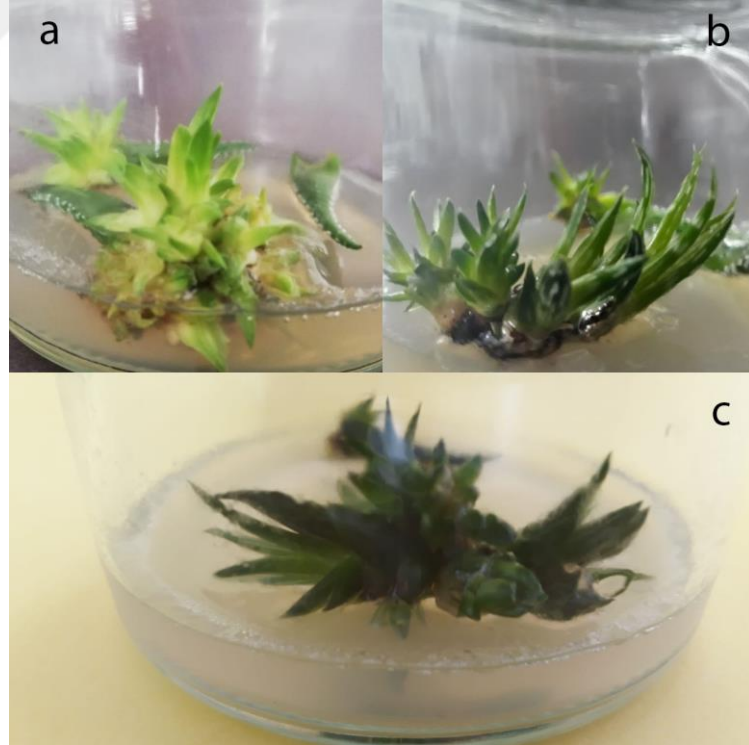
Şekil 4.4: II. denemede BAP + IAA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler
a) 1.0 mg/L BAP + 0.2 mg/L IAA b) 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L IAA
c) 1.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L IAA



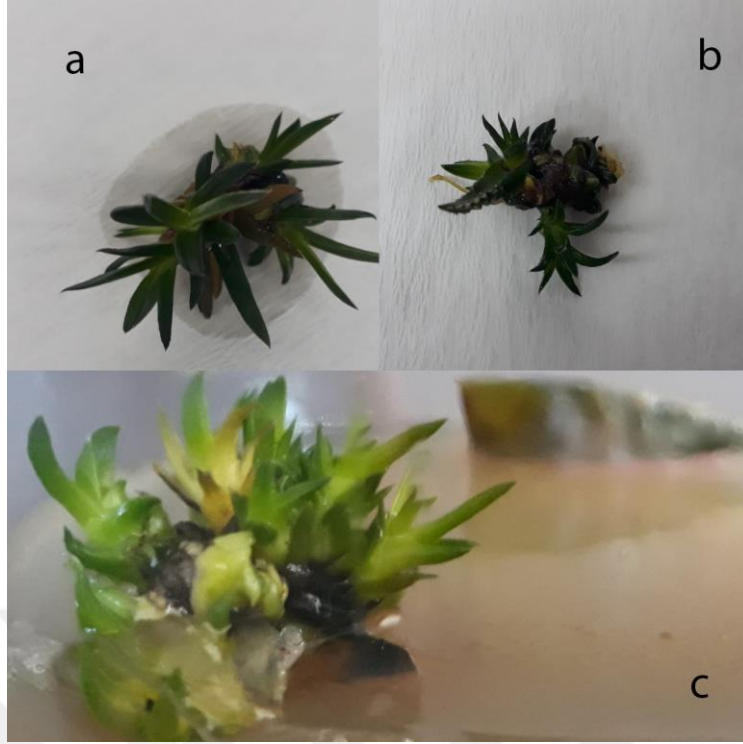
Şekil 4.5: II. denemede BAP + IBA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler
a) 1.0 mg/L BAP + 0.2 mg/L IBA b) 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L IBA
c) 1.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L IBA



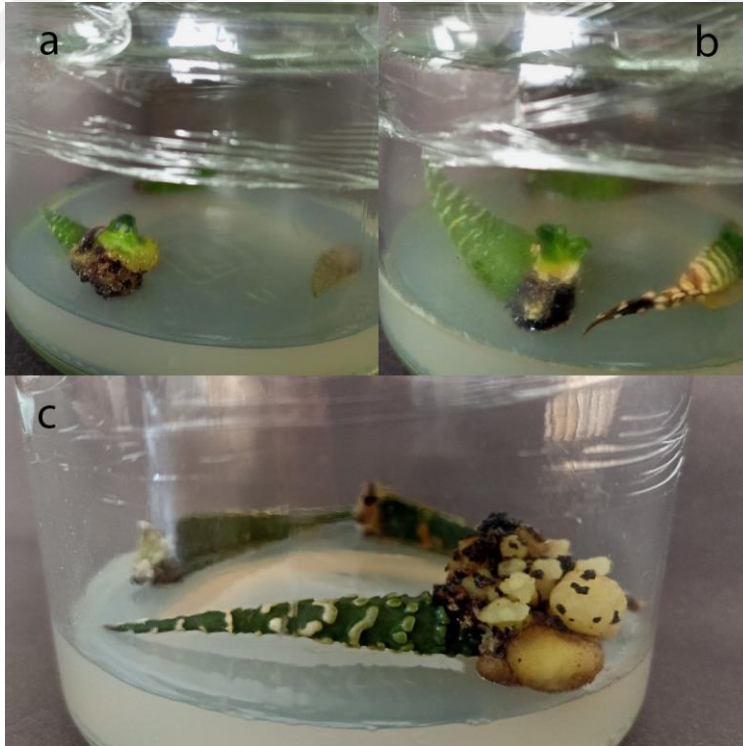
Şekil 4.6: II. denemede BAP + 2,4-D kombinasyonlarında gelişen kalluslar
a) 1.0 mg/L BAP + 0.2 mg/L 2,4-D b) 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D
c) 1.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L 2,4-D



Şekil 4.7: II. denemede Kinetin + IAA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler
a) 1.0 mg/L kinetin + 0.2 mg/L IAA b) 1.0 mg/L kinetin + 0.5 mg/L IAA
c) 1.0 mg/L kinetin + 1.0 mg/L IAA



Şekil 4.8: II. denemede Kinetin + IBA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler
a) 1.0 mg/L Kinetin +0.2 mg/L IBA b) 1.0 mg/L Kinetin + 0.5 mg/L IBA
c) 1.0 mg/L Kinetin +1.0 mg/L



Şekil 4.9: II. denemede Kinetin + 2,4-D kombinasyonlarında kültüre alınan eksplantlardaki gelişme durumları
a) 1.0 mg/l kin+0.2 mg/l 2,4-D b) 1.0 mg/l kin+0.5 mg/l 2,4-D
c) 1.0 mg/l kin+1.0 mg/l 2,4-D

4.1.3 III. Deneme

II. deneme sonuçları ile *Haworthia truncata* türünde sürgün rejenerasyonu bakımından en yüksek sonuçları Kinetin içeren ortamlardan aldıklarını bildiren Hashemi vd. (2018), *H.cooperi* Baker türünde artan sitokin dozu ile sürgün sayısının arttığını bildiren Kharrazi vd. (2022) ve süs bitkisi olarak değerlendirilen beş nadir *Haworthia* türünün sürgün rejenerasyonu ve gelişimi bakımından optimum sitokin tipi ve dozunun türlere göre 1.0-2.0 mg/L arasında değiştiğini bildiren Rogers (1993b)'in sonuçları birlikte değerlendirilerek III. deneme kurulmuştur. Büyümeyi düzenleyici olarak sitokin grubu hormonlardan kinetin, oksin grubu hormonlardan ise IAA ve IBA kullanılmıştır. Bu denemede MS temel besin ortamına Kinetin'in 1 mg/l ve 2 mg/l dozları ile IAA ve IBA hormonlarının 0.2 0.5 1.0 mg/l dozlarının ilave edildiği 12 farklı BGD kombinasyonun sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Üçüncü denemede kullanılan büyümeyi düzenleyici kombinasyonları, gelişme gösteren eksplant oranları ve eksplant başına düşen ortalama sürgün sayıları Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3: III. Denemede kullanılan besin ortamı bileşimleri, gelişme oranı ve eksplant başına düşen sürgün sayıları

Ortam No	BGD Dozları (mg/L)		Sağlıklı Eksplant sayısı / Dikilen Eksplant Sayısı (Adet)	Gelişme gösteren Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Ortalama Sürgün Sayısı (Adet)
1	Kinetin IAA	1 0.2	37/45	24.33±1.00 e	2.25±0.50 de
2	Kinetin IAA	1 0.5	36/45	16.68±0.83 f	2.50±0.58 cd
3	Kinetin IAA	1 1	34/45	17.65±1.12 f	4.50±0.58 a
4	Kinetin IBA	1 0.2	33/45	18.18±1.88 f	2.50±0.58 cd
5	Kinetin IBA	1 0.5	35/45	34.27±0.99 d	2.25±0.50 de
6	Kinetin IBA	1 1	36/45	58.33±3.22 b	3.25±0.50 bc
7	Kinetin IAA	2 0.2	38/45	15.80±1.06 f	2.50±0.58 cd
8	Kinetin IAA	1 0.5	36/45	33.30±1.39 d	1.50±0.58 e
9	Kinetin IAA	2 1	35/45	25.70±1.54 e	4.00±0.82 ab
10	Kinetin IBA	2 0.2	33/45	63.63±2.88 a	2.00±0.82 de
11	Kinetin	2	34/45	52.93±2.06 c	2.25±0.50 de

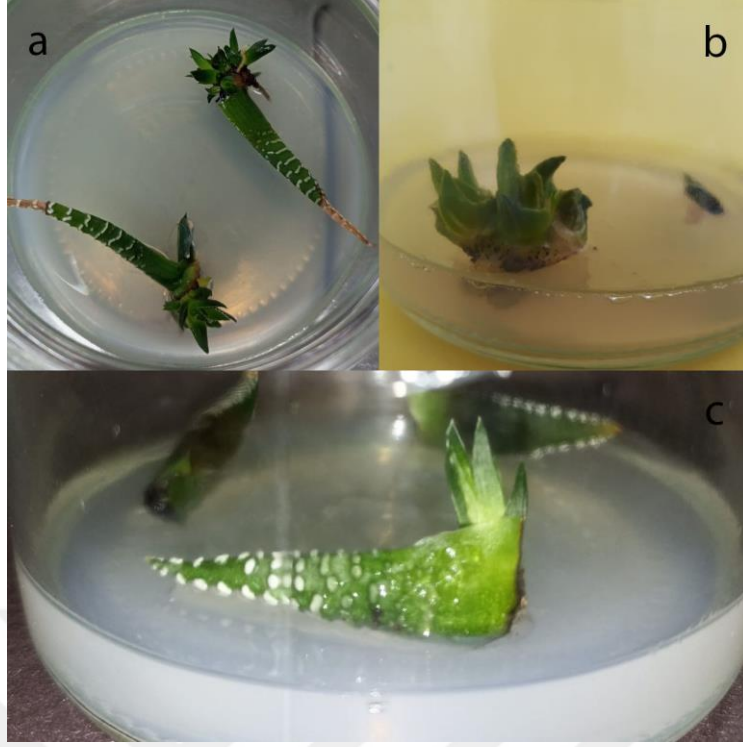
	IBA	0.5			
12	Kinetin IBA	2 1	32/45	56.25±2.80 b	2.75±0.50 cd
CV				5.37	23.49
Besin Ortamı				**	**

(**) Sütunda farklı harfleri alan gruplar arası farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($P \leq 0.05$)

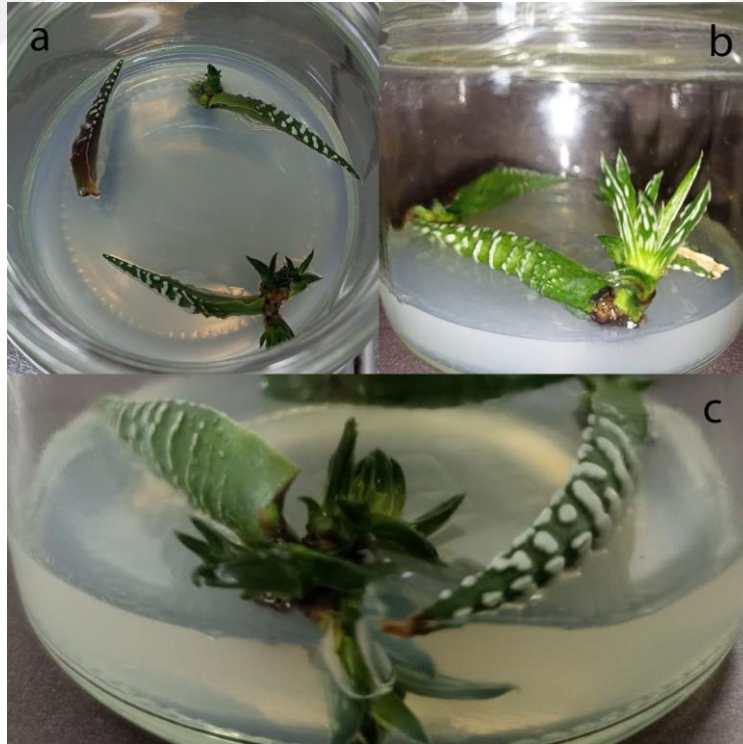
III. denemede gelişme gösteren eksplant oranları %15.80±1.06 ile %63.63±2.88 arasında değişiklik göstermiştir. 2.0mg/L Kinetin + 0.2mg/L IBA % 63.63±2.88 ile en başarılı kombinasyon olarak tespit edilirken bunu % 58.33±3.22 ile 1.0 mg/L Kinetin + 1.0 mg/L IBA ve % 56.25±2.80 ile 2.0 mg/L Kinetin + 1.0 mg/L IBA bileşimi izlemiştir. IAA içeren kombinasyonlar ise bu parametre bakımından genellikle son sıralarda yer almıştır.

Bu denemede II. denemenin aksine tüm büyümeyi düzenleyici kombinasyonlarından adventif sürgün rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Eksplant başına düşen en fazla sürgün sayısı aralarında istatistiki farklılık olmaksızın 1.0 mg/L Kinetin + 1.0 mg/L IAA (4.50±0.58 adet) ile 2.0 mg/L Kinetin + 1.0 mg/L IAA (4.00±0.82 adet) kombinasyonlarında meydana gelmiştir. Düşük dozda (0.2-0.5 mg/L) oksin içeren uygulamaların sürgün sayısı bakımından daha geride kaldıkları görülmüştür. Araştırma sonuçları, optimum sitokinin tipi ve dozunun türlere göre 1.0-2.0 mg/L arasında değiştiğini bildiren Rogers (1993b) ile örtüşmekle birlikte, artan sitokinin dozu ile sürgün sayısının arttığını bildiren Kharrazi vd. (2022) ile ise zıtlık göstermektedir. Bu farklılığın genotipten kaynaklandığı düşünülmektedir.

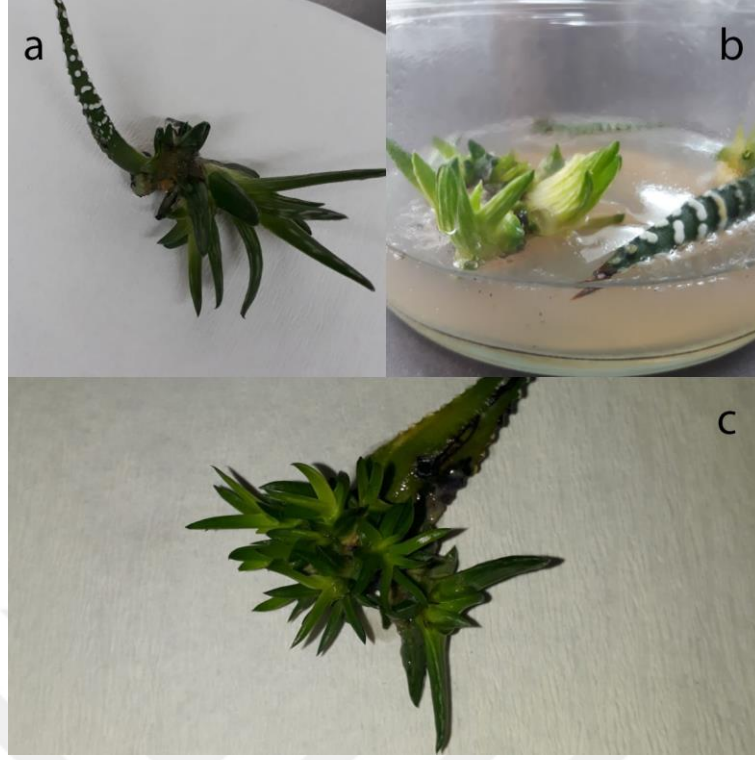
12 farklı büyümeyi düzenleyici kombinasyonun kullanıldığı III. denemede gelişme gösteren eksplant oranı bakımından IBA içeren ortamların, eksplant başına düşen sürgün sayısı bakımından ise IAA içeren ortamların genellikle daha başarılı olduğu görülmüştür. Eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı bakımından II. ve III. denemeden benzer sonuçlar alınmıştır. Bu parametre bakımından elde edilen sonuçlar birbiri ile uyumlu olup her iki denemede de 1mg/L Kinetin ve IAA içeren ortamlarda en yüksek sürgün sayıları tespit edilmiştir. Şekil 4.10-4.13'te III. deneme sonuçlarına ait görüntülere yer verilmiştir.



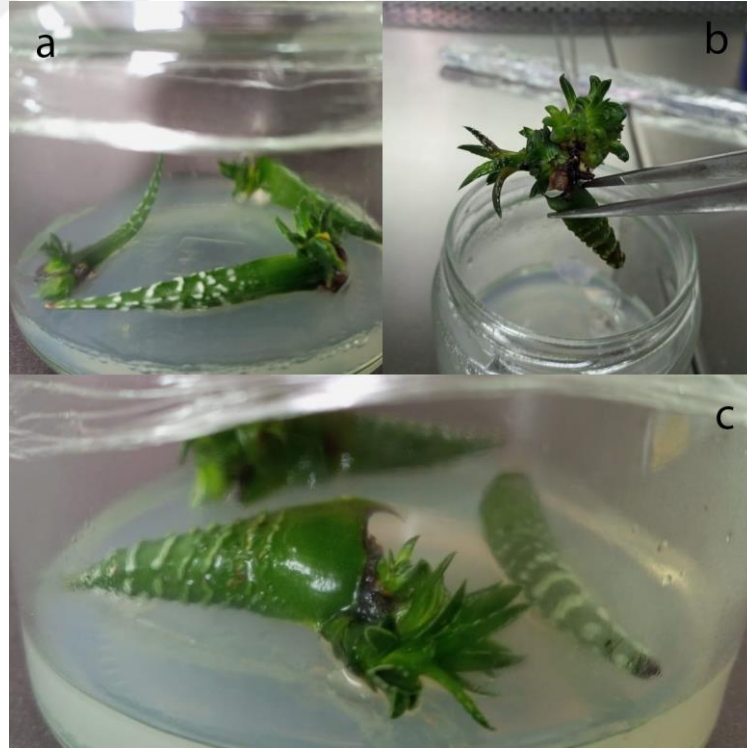
Şekil 4.10: III.denemede Kinetin + IAA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler
a) 1.0 mg/L kinetin + 0.2 mg/L IAA b) 1.0 mg/L kinetin + 0.5 mg/L IAA
c) 1.0 mg/L kinetin + 1.0 mg/L IAA



Şekil 4.11: III.denemede Kinetin + IBA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler a) 1.0 mg/L Kinetin + 0.2 mg/L IBA b) 1.0 mg/L Kinetin + 0.5 mg/L IBA c) 1.0 mg/L Kinetin + 1.0 mg/L IBA



Şekil 4.12: III. denemede Kinetin + IAA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler
a) 2.0 mg/L Kinetin + 0.2 mg/L IAA b) 2.0 mg/L Kinetin + 0.5 mg/L IAA
c) 2.0 mg/L Kinetin + 1.0 mg/L IAA

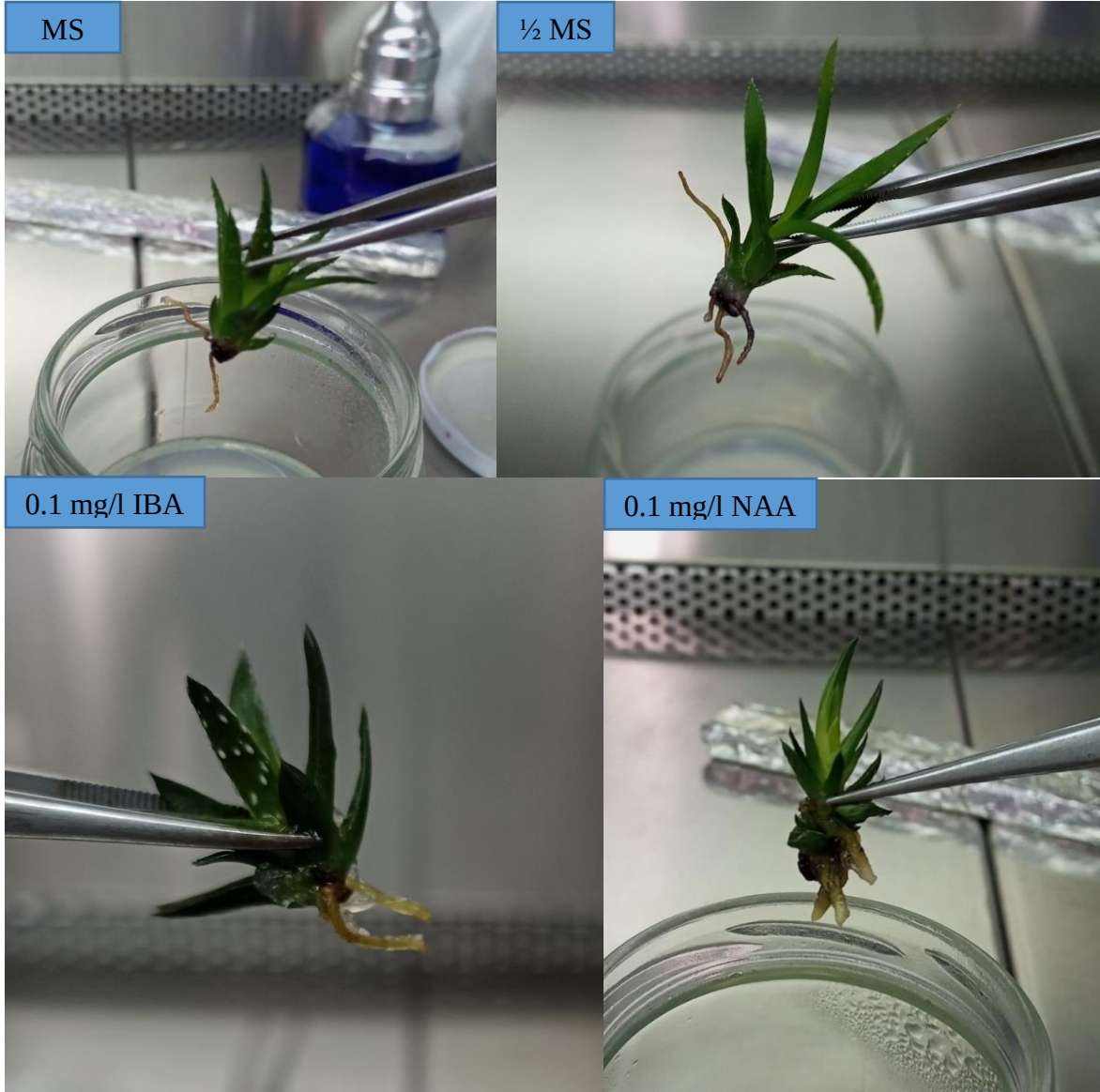


Şekil 4.13: III.denemede Kinetin + IBA kombinasyonlarında gelişen adventif sürgünler
a) 2.0 mg/L Kinetin+0.2 mg/L IBA b) 2.0 mg/L Kinetin +0.5 mg/L IBA
c) 2.0 mg/L Kinetin +1.0 mg/l IBA

4.2 İn vitro Sürgünlerde Köklendirme Denemeleri

Birinci ve ikinci denemelerden direkt organogenesis modeli elde edilen adventif sürgünler in vitro köklendirme aşamasına alınmıştır. İn vitro sürgünlerin köklendirilmesinde, büyümeyi düzenleyici içermeyen tam MS ve yarı kuvvetteki MS ($\frac{1}{2}$ MS) ile MS temel besin ortamına farklı konsantrasyonlarda IBA ile NAA ayrı ayrı veya birlikte ilave edilerek sürgünlerin köklenmesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla tek bir oksin cinsi içeren köklendirme ortamlarında IBA'nın 5 farklı dozu (0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) ve NAA'nın 2 farklı dozu (0.1 ve 0.2 mg/L) kullanılmıştır. IBA ve NAA'nın birlikte kullanıldığı iki farklı uygulamada IBA (0.1 mg/l) + NAA (0.4 mg/l), IBA (0.4 mg/l) + NAA (0.4 mg/l) kombinasyonlarının köklenme üzerine etkileri araştırılmıştır.

Sürgün rejenerasyonu çalışmalarından elde edilen adventif sürgünler 11 farklı köklendirme ortamına transfer edilerek köklenme süreçleri incelenmiştir. Köklendirme amacıyla transfer edilen tüm adventif sürgünler bütün ortamlarda başarılı bir şekilde %100 oranında köklenmiştir. *Haworthia* cinsinde araştırmalar yapan Richwine vd. (1995) *Aloe*, *Gasteria* ve *Haworthia* cinslerinin bazı türlerinde in vitro koşullarda elde ettikleri sürgünleri kolaylıkla köklendirdiklerini, Liu vd. (2017), *Haworthia turgida* Haw. türünde in vitro koşullarda elde ettikleri sürgünleri MS + 0.05 mg/L NAA ortam bileşiminde %82 oranında köklendirdiklerini, Hashemi vd. (2018) ise *Haworthia truncata* türünde % 90.5 oranında köklenme elde ettiklerini bilmişlerdir. İn vitro *Haworthia fasciata* 'Alba' sürgünlerinin köklendirilmesinde elde edilen sonuçlar benzer konularda çalışan araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermekte, küçük oranlardaki farklılıkların ise genotip ile kullanılan oksin cinsi ve dozundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Şekil 4.14'te bazı ortamlarda köklendirilen in vitro bitkiciklere ait görüntülere yer verilmiştir. Çalışmada ayrıca köklendirme ortamlarına aktarılan bazı sürgünlerde kardeşlenme meydana geldiği görülmüş (Şekil 4.15), bu durum örneklerin geldiği besin ortamı etkisinin devam ettiği şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 4.14: Farklı besin ortamı bileşimlerinde köklendirilen in vitro *Haworthia fasciata* 'Alba' bitkicikleri



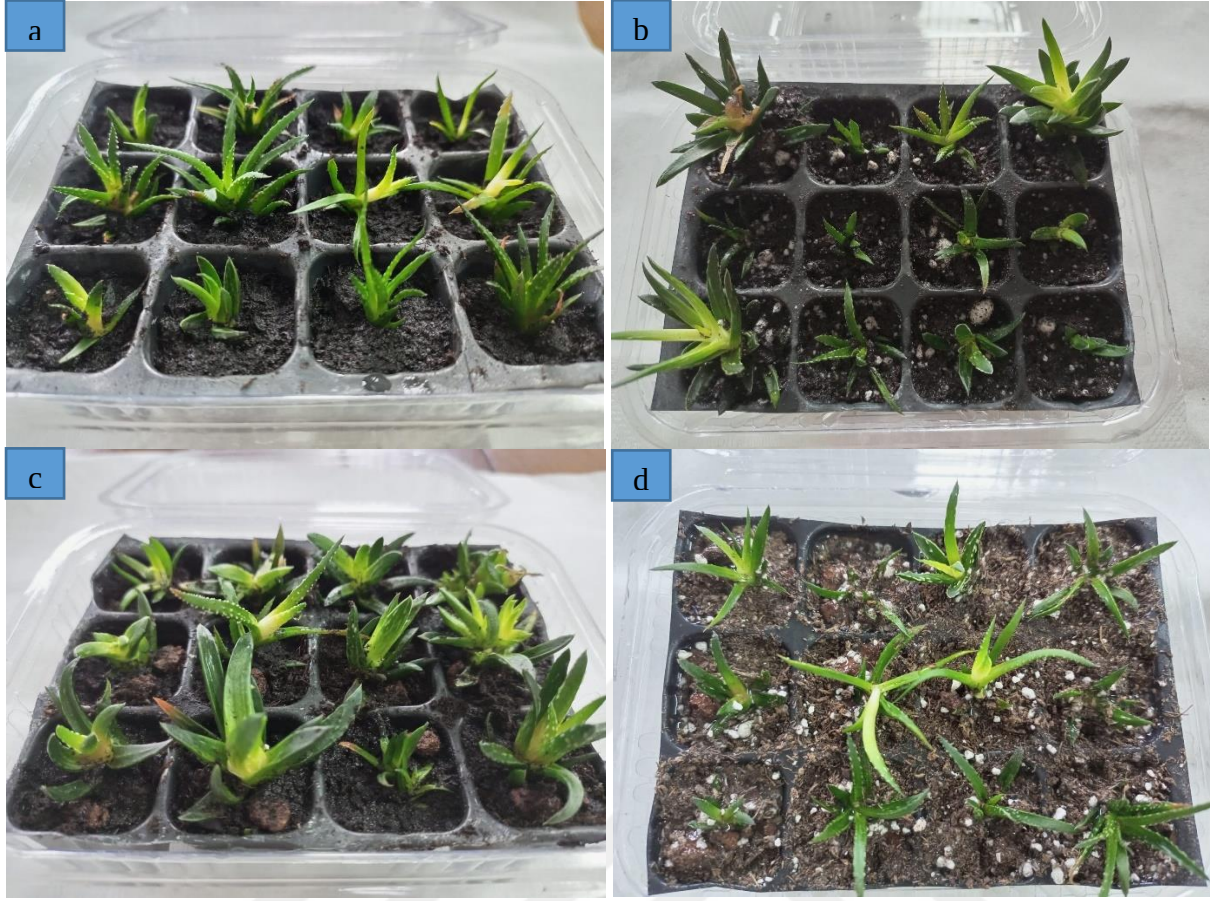
Şekil 4.15: Köklendirme aşamasında kardeşlenme meydana gelmiş bir adventif sürgün

4.3 Dış Koşullara Alıştırma (Akklimatizasyon) Denemeleri

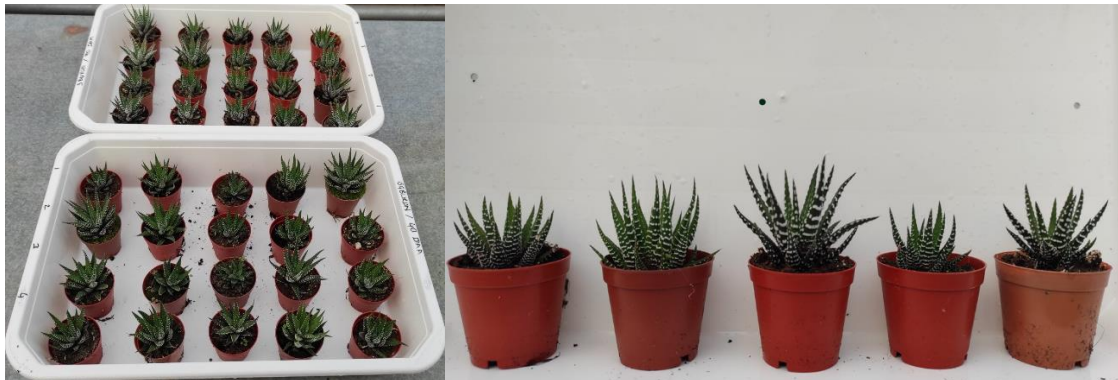
İn vitro koşullarda köklendirilen, kök sayısı (3-5 adet) ve kök uzunluğu (1-3 cm) bakımından yeterli gelişme gösteren bitkiciklerde dış koşullara alıştırma aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla bitkicikler kök kısımlarına zarar vermeden ağardan arındırılarak viyol içerisine doldurulan 4 farklı steril yetiştirme ortamına dikilmiştir. Yetiştirme ortamı olarak torf, 3 kısım perlit + 1 kısım torf ve 3 kısım torf + 1 kısım pomza taşı karışımı ile eşit oranlarda torf + perlit + pomza taşı karışımları kullanılmıştır. Dikim işlemi tamamlanan viyoller 12x16x10cm ebatlarındaki kapaklı polietilen kaplar içerisine yerleştirilerek, ilk 2 hafta iklim dolabında, izleyen 2 hafta boyunca ise serada bekletilmiştir. Akklimatizasyon dönemi boyunca her gün bitkilerin sulama durumları kontrol edilmiş, su gereksinimi gösteren bitkiler ½ MS ile sulanmıştır. Dış koşullara aktarımı yapılan bitkiciklerde 4. haftanın sonunda canlılık oranları belirlenmiştir.

Dört haftalık akklimatizasyon süresi sonunda farklı yetiştirme ortamlarına dikilen bitkiciklerin tamamının canlı olduğu ve yaşamını sağlıklı bir şekilde sürdürdüğü gözlenmiştir. Benzer konularda araştırmalar yapan Chen vd. (2019), *Haworthia* ‘Sansenju’ (*H. obtusa*×*H. comptoniana*) çeşidinde dış koşullara transfer edilen bitkiciklerde canlılık oranı %100 olarak belirlemiş, Richwine vd. (1995) ise farklı sukulent cinslerinin (*Aloe*, *Gasteria* ve *Haworthia*) bazı türlerinde in vitro sürgünleri kolaylıkla köklendirdiklerini, ve köklendirilen bitkileri de toprağa aktardıklarını bildirmiştir. Dolayısıyla araştırma bulgularımız Chen vd. (2019) ve Richwine vd. (1995) ile paralellik göstermekte ve birbirini destekler niteliktedir. Şekil 4.16’da dış ortama alıştırmak üzere farklı yetiştirme ortamlarına dikimi yapılan bazı bitkiciklerin 4. hafta sonundaki durumları gösterilmiştir.

Dış ortama adaptasyon sağlayan bitkiler büyütülmek üzere 3 kısım torf + 1 kısım pomza taşı karışımı doldurulmuş 5.5cm’lik fincan saksılar içerisine dikilerek sera koşullarında gelişmeye bırakılmıştır. Serada takibi yapılan bitkilerin bir yıl sonraki görünüşleri ise Şekil 4.17’de sunulmuştur. Böylece *Haworthia fasciata* “Alba” bitkisinin mikroçoğaltım aşamaları başarılı bir şekilde tamamlanmıştır.



Şekil 4.16: Dış koşullara alıştırmak üzere farklı yetiştirme ortamlarına dikilen in vitro bitkicikler a) Torf içerisinde dış ortama alıştırmaya alınan bitkicikler b) Torf + Perlit içerisinde dış ortama alıştırmaya alınan bitkicikler c) Torf + Pomza taşı içerisinde dış ortama alıştırmaya alınan bitkicikler d) Torf + Perlit + Pomza taşı içerisinde dış ortama alıştırmaya alınan bitkicikler



Şekil 4.17. Dış koşullara alıştırıldıktan sonra 3 kısım torf + 1 kısım pomza taşı doldurulmuş fincan saksılarda gelişmeye bırakılan *Haworthia fasciata* “Alba” bitkilerinin bir yıl sonraki gelişme durumları

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, *Haworthia fasciata* ‘Alba’ın yaprak eksplantları kullanılarak mikroçoğaltım prosedürü oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla in vitro sürgün çoğaltımı, elde edilen adventif sürgünlerin köklendirilmesi ve bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması aşamalarının tümü tamamlanmıştır. Çalışmada bu amaçla yapılan uygulamalar ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- 1) *Haworthia fasciata* ‘Alba’ kùltivarı in vitro çoğaltıma olumlu cevap vermektedir.
- 2) *Haworthia fasciata* ‘Alba’ nın mikroçoğaltımında eksplant tipi, büyümeyi düzenleyici cinsi ve dozu temel faktörlerdir.
- 3) Başlangıç materyali olarak kullanılan yapraklardan hazırlanan eksplantlar sürgün oluşturma oranı bakımından elverişli bulunmuştur. Uygun besin ortamı bileşimlerinde kùltüre alındığında direkt organogenesis oluşumu meydana gelmiştir.
- 4) Direkt organogenesisin yalnızca yaprak tabanından meydana geldiği, bazis içermeyen yaprak ayalarından 0.5-1.0 cm büyüklüğünde hazırlanan eksplantlarda adventif sürgün oluşmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla lamina ve bazis içeren yaprak, uygun eksplant olarak belirlenmiştir
- 5) Kùltürlere alınan örneklerde içsel kökenli fungal veya bakteriyel enfeksiyonlar ortaya çıksa da yaprakların 2-3 damla Tween-20 ilave edilmiş %15’lik NaOCI (ACE) içerisinde 30 dakika süreyle bekletme uygulamasının eksplantların yüzeysel sterilizasyon için yeterli olduğu ancak eksplant kaynağı olarak kullanılacak donör bitkilerin sistemik fungusitlerle muamelesinin enfeksiyonu azalttığı görülmüştür.
- 6) Gelişme gösteren eksplant oranları bakımından en yüksek değerler 2,4-D içeren kombinasyonlardan edilmiştir. Bu ortamda kùltüre alınan eksplantlarda gelişme kallus şeklinde kendini göstermiştir.
- 7) Kontrol ortamı olarak kullanılan hormonsuz MS ortamında herhangi bir organogenesis meydana gelmemiş, yalnızca dokularda şişme ve kesim yüzeylerinde çok hafif kabarma olmuştur. *In vitro* rejenerasyon için büyümeyi düzenleyici maddelere ihtiyaç olduğu görülmüştür.
- 8) 2,4-D içermeyen tüm büyümeyi düzenleyici kombinasyonlarında direkt organogenesis meydana gelmiştir. 2,4-D içeren oksin sitokinin kombinasyonlarında kallus şeklinde

gelişme görülmüştür. Bu kalluslar büyümeyi düzenleyici madde (0.2 mg/L GA₃) içeren besin ortamlarında alt kültüre alınmışlar ancak sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiştir.

- 9) Uygun eksplantların kullanıldığı denemelerde (II. ve III. deneme) 2,4-D dışındaki tüm büyümeyi düzenleyici kombinasyonlarından farklı sayılarda adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Genellikle oksin-sitokinin kombinasyonlarında oksin olarak IAA'nın kullanıldığı uygulamalarda daha yüksek sürgün sayısına ulaşılmıştır.
- 10) Eksplant başına düşen ortalama sürgün sayıları bakımından temel besin ortamına (MS) ilave dilen 1.0 mg/L Kinetin + 1.0 mg/L IAA kombinasyonları en uygun büyümeyi düzenleyici kombinasyonları olarak belirlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı besin ortamı kompozisyonuna göre 1.50 - 4.67 arasında değişmiştir.
- 11) İn vitro koşullarda elde edilen sürgünler büyüme ve gelişmeyi düzenleyici madde içeren veya içermeyen besin ortamlarında başarılı bir şekilde (%100 oranında) köklendirilmiş, adventif sürgünlerin köklendirilmesinde hormon kullanımına gerek olmadığı kanaatine varılmıştır. Bu amaçla MS veya ½ MS besin ortamının yeterli olduğu görülmüştür.
- 12) İn vitro sürgünlerin köklendirilmesiyle elde edilen bitkicikler yalnızca torf, 3 kısım torf + 1 kısım perlit, 3 kısım torf + 1 kısım pomza taşı karışımı ile eşit oranlardaki torf + perlit + pomza taşı karışımları içerisinde başarılı bir şekilde dış koşullara alıştırılmış, dış ortama alınan bitkilerde canlılık oranı %100 olarak tespit edilmiştir.

Haworthia fasciata 'Alba' günümüzde daha çok iç mekan bitkilendirme tasarımlarında kullanılan dekoratif bir bitkidir. Bilim insanlarının küresel iklim değişikliği etkilerinin artarak devam edeceği ve 2050 yılında tropikal ve subtropikal iklim kuşağına sahip bölgelerin çoğalacağı öngörüsünden hareketle gelecekte bitkinin kullanım alanlarının da artacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla bitkinin gerek dekoratif özellikleri, gerek sukulent karakterli yapısı, gerekse gelecekte kullanım alanlarının artma beklentisi bitkinin önemini artıran faktörlerdir.

Bu araştırma, tür bazında ikinci kültivar bazında ise ilk mikroçoğaltım çalışması olma niteliğindedir. Araştırmadan ümitvar sonuçlar elde edilmiş olup, elde edilen sonuçların hem ticari doku kültürü laboratuvarlarına hem de bundan sonra yapılacak bilimsel araştırmalara ışık tutacağı öngörülmektedir. Araştırma sonuçlarının bitkinin doku kültürü ile çoğaltımını yapan işletme sayısının artmasına, yeni istihdam olanaklarının sağlanmasına ve bitkinin ithalatının önüne geçilerek doğrudan ve dolaylı olarak ülke ekonomisine katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

- Ashloowalia, B., Prakash, J. ve Savangikar, V. (2004). Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna, 26–30 August 2002.
- Aşkın Çelik T. ve Aslantürk, Ö.S. (2018). *Carpobrotus Acinaciformis* L. Metanol Ekstresinin Fitokimyasal Taraması ve Kansere Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 2: 163-175.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (2002). *Bitki Biyoteknolojisi -1- Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 374 s.
- Bayer, B. (2009). *Haworthia*: the problem child of taxonomy. *Veld & Flora*, 95 (3): 158-159.
- Beyl, C.A. ve Sharma, G.C. (1983). Picloram induced somatic embryogenesis in *Gasteria* and *Haworthia*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2: 123-132.
- Biko'o, A.A., Du Plessis, D.G.C. ve Myburgh, W.J. (2011). Population size, structure and habitat features of *Haworthia koelmaniorum* var. *mcmurtryi*, an endemic plant from Mpumalanga Province, South Africa. *Koedoe* 53 (1): 1-8.
- Chen, Y.M., Huang, J. Z., Hou, T. W. ve Pan, I. C. (2019). Effects of light intensity and plant growth regulators on callus proliferation and shoot regeneration in the ornamental succulent *Haworthia*. *Botanical Studies*, 60: 1-8.
- Coopoosamy, R.M. ve Naidoo, K.K. (2011). Screening of traditional utilized *Haworthia limifolia* for antibacterial and antifungal properties. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (1): 109-113.
- Debergh, P. (1994). In vitro culture of ornamentals. In *Plant cell and tissue culture* (pp. 561-573). Springer, Dordrecht.
- Gürel, S. , Babaoğlu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak, M.A. (2001). Doku Kültürü Temel Laboratuvar Teknikleri. M. Babaoğlu, E. Özcan (Ed.), *Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü Uygulamaları içinde* (s.1-35). Konya: S.Ü. Vakfı Yayınları.
- Hashemi, M. (2018). Optimization of micropropagation of *Haworthia* (*Haworthia truncata*). *Yüksek Lisans Tezi, İslam Azad Üniversitesi, Ziraat ve Tabii Kaynaklar Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, İran*,
- Hayashi, M. (1987). Callus characteristics and classification of *Haworthia* and allied genera. *South African Journal of Botany*, 53 (6): 411-423.
- İçigen, H.Ö. (2019). Bitki Doku Kültürü Yöntemi İle Elde Edilen Bazı Bitki Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya*, 84 s.
- Jessy, N.S., Begum, R., Khatun, M. ve Alam, S.S. (2005). Differential Fluorescent

- Chromosome Banding of Four Species in *Haworthia* Duval (Aloaceae). *The Japan Mendel Society*, 70 (4): 435-440.
- Karahan, F. ve Angın, İ. (2008). Yeşil Alan Uygulamalarında Su Tüketiminin Asgariye İndirilmesi İçin Sukkulent Bitki Türlerinden Yararlanma. *TMMOB 2. Su Politikaları Kongresi*, s. 291-296.
- Kaul, K. ve Sabharwal, P. S. (1969). In vitro induction of vegetative buds on inflorescence segments of *Haworthia*. *Experientia*, 26 (4): 433-434.
- Kazaz, S., Kılıç, T., Doğan, E., Karagüzel, Ö. ve Mendi, Y.Y. (2020). Süs bitkileri üretiminde mevcut durum ve gelecek. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Türkiye Ziraat Mühendisliği IX. Teknik Kongresi, Bildiriler Kitabı-1: 673-698. 13-17 Ocak 2020, Ankara.
- Kharrazi, M., Moradian, M., Safari, N., Khadem, A. ve Sharifi, A. (2022). Optimization of in vitro Cultural Conditions of *Haworthia* (*Haworthia cooperi* Baker). *Plant Productions*, 45 (1): 53-66.
- Kim, Y.H., Kim, H.H., Lee, G.Y., Lee, J.H., Jung, J.H., Sanchez, P.D. ve Lee, S.D. (2018). Effect of growth regulators on In Vitro mass propagation of *Haworthia maughanii*. *Journal Plant Biotechnol*, 45: 369-374.
- Kim, D., Kang, K. ve Sivanesan, I. (2019a). Influence of auxins on somatic embryogenesis in *Haworthia retusa* Duval. *Biologia*, 74: 25-33.
- Kim, Y.H., Lee, G.Y., Kim, H.H., Lee, J.H., Jung, J.H. ve Lee, S.D. (2019b). In vitro mass propagation and acclimatization of *Haworthia truncata*. *Journal of Plant Biotechnology*, 46: 127-135.
- Küçükahmetler, Ö., Şeniz, V., Zencirkıran, M. (2002). Afrika Menekşesinin (*Saintpaulia ionantha* L.) Doku Kültürü ile Üretiminde Bazı Büyüme Düzenleyicilerin Verim ve Kaliteye Etkisi. (Poster). *II. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi*, Antalya. Bildiriler Kitabı, 264-270.
- Kochhar, T.S. (1983). Interaction of abscisic acid and kinetin on the growth of *Haworthia* callus in vitro. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 39 (7): 780-781.
- Liu, B., Fang, H., Meng, C., Chen, M. ve Chai, Q. (2017). Establishment of a Rapid and Efficient Micropropagation System for Succulent Plant *Haworthia turgida* Haw. *Hortscience*, 52 (9): 1278-1282.
- Lizumi, M. ve Amaki, W. (2011). Micropropagation of *Haworthia cymbiformis* Through Thin-Cell-Layer Tissue Culture. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*, 61: 288-291.
- Murashige, T. ve Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Mycock, D.J., Watt, M.P., Hannweg, K.F., Naickerl, K., Makwarela, M. ve Berjak, P. (1997).

- Somatic embryogenesis of two indigenous South African *Haworthia* spp. (*H. limifolia* and *H. koelmaniorum*). *South African Journal of Botany*, 63 (6): 345-350.
- Nuzhyna, N.V. ve Gaydarzhy, M. M. (2015). Comparative characteristics of anatomical and morphological adaptations of plants of two subgenera *Haworthia* Duval to arid environmental conditions. *Acta Agrobotanica*, 68 (1): 23-31.
- Odabaş, A. (1993). *Süs ve Sera Bitkileri Üretimden Bakıma Çiçeklerin Tüm Özellikleri*. Özgür Yayın Dağıtım, İstanbul. 288 s.
- Ogihara, Y. (1979). Tissue culture in *Haworthia* II. effects of three auxins and kinetin on greening and redifferentiation of calluses. *Botanical Magazine*. 92: 163-171.
- Öge, H.R. (1997). *Çiçekler Kaktüsler Ve Etli Bitkiler*. İnkılap Kitabevi, İstanbul, s. 298-299.
- Önder, S. ve Polat, A.T. (2009). Yeşil Alan Uygulamalarında Su Tasarrufuna Yönelik Olarak Sukkulent Yer Örtücü Bitki Türlerinden Yararlanma. *1. Ulusal Kuraklık Ve Çölleşme Sempozyumu*, Konya, s. 480-485.
- Pierik, R.L.M. (1997). In vitro culture of higher plants. Springer science & business media.
- Reshma, Y., Mazharul, M.I., Kim, H., Kim, C. ve Lim, K. (2020). Role of Growth Regulators in the Somatic Organogenesis of *Haworthia* Inflorescences in Vitro. *Horticultural Science and Technology*, 38 (3): 394-404.
- Richwine A.M., Tipton, J.L. ve Thompson, G.A. (1995). Establishment of *Aloe*, *Gasteria*, and *Haworthia* Shoot Cultures from Inflorescence Explants. *Hortscience*, 30 (7): 1443-1444.
- Rogers, S.M.D. (1993a). Culture Phenotype Affects On Regeneration Capacity In The Monocot *Haworthia comptoniana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 29: 9-12.
- Rogers, S.M.D. (1993b). Optimization of plant regeneration and rooting from leaf explants of five rare *Haworthia*. *Scientia Horticulturae*, 56: 157-161.
- Starling, R.J. ve Dodds, J.H. (1983). Tissue-culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya*, 1: 84-90.
- Sun, Y., Heil, B.M., Kahl, G. ve Kohlenbach, H.W. (1987). Plant regeneration from protoplasts of the monocotyledonous *Haworthia magnifica* v. Poelln. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8: 91-100.
- URL-1. (2022). <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=haworthia>, (04.12.2022).
- Vosa, C.G. ve Bayer, M.B. (1986). Chromosome Studies in the Southern African Flora. 38-57: *Haworthia*. *Caryologia, International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 39 (3-4): 325-334.
- Zencirkıran, M. 1998. Türkiye florasında bulunan bazı önemli soğanlı süs bitkilerinde çoğaltım yöntemleri üzerine araştırmalar. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe

Bitkileri Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi. 113 s. Bursa.

Zencirkıran, M. ve Zeybek, O. (2016). Kaktüsler ve Radyasyon. *Plant, Peyzaj ve Süs Bitkiciliği Dergisi*, 21: 240-247.



BİBLİYOGRAFYA

- Arslan, M. ve Erdinç, L. (2007). Sukkulent Yer Örtücü Bitkiler. “Gökyüzüne En Yakın Bitkiler Alpin Çiçekler” Projesi Flora Turizmi Eğitim Programı Bildiriler Kitabı (Ed. Faris Karahan), Erzurum, s: 41-51.
- Court, D. (1981). Succulent flora of Southern Africa. A.A. Balçma, Rotterdam, s: 158- 175.
- Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C. ve Ferreira, I. C. (2016). Exploring Plant Tissue Culture to Improve The Production of Phenolic Compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, 82: 9-22.
- Karahan, F. ve Angın, İ. (2008). Yeşil Alan Uygulamalarında Su Tüketiminin Asgariye İndirilmesi İçin Sukkulent Bitki Türlerinden Yararlanma. *TMMOB 2. Su Politikaları Kongresi*, s. 291-296.
- Öztaş, Y. ve Arslan, M. (1992). İç Anadolu Bölgesi Ekolojik Koşullarına Uygun Sukkulent (Etli Yapraklı) Bitki Türlerinde Peyzaj Mimarlığı Çalışmalarında Yer Örtücü Olarak Yararlanma Olanakları, Ankara, s. 169.
- Pilbeam, J. (1983). *Haworthia and Astroloba: a collector's guide*. B.T. Batsford, London.

ÖZGEÇMİŞ

