ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Macide Burcu KEKİL

TÜRKİYE'DE DOĞAL OLARAK YETİŞEN BAZI EĞRELTİ TÜRLERİNDE SPOR KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE MİKROÇOĞALTIM VE HİSTOLOJİK ANALİZLER

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2014

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'de DOĞAL OLARAK YETİŞEN BAZI EĞRELTİ TÜRLERİNDE SPOR KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ ile MİKROÇOĞALTIM ve HİSTOLOJİK ANALİZLER

Macide Burcu KEKİL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 25/07/2014 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

.....	.....	.....
Prof.Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ	Prof.Dr. Yıldız AKA KAÇAR	Prof.Dr. Selim ÇETİNER
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

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

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2014-2675

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 OLARAK YETİŞEN BAZI EĞRELTİ TÜRLERİNDE SPOR KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ ile MİKROÇOĞALTIM ve HİSTOLOJİK ANALİZLER

Macide Burcu KEKİL

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof.Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Yıl : 2014, Sayfa : 83
Jüri : Prof.Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof.Dr. Selim ÇETİNER
: Prof.Dr. Yıldız AKA KAÇAR

Bu çalışma kapsamında; ülkemizde doğal olarak yetişen bazı eğrelti türlerinde (*Asplenium scolopendrium, Asplenium adiantum-nigrum, Asplenium trichomones, Asplenium septentrionale*) spor kültürü yöntemi ile mikroçoğaltımı ve gametofitik ve sporofitik evrelerin histolojik analizler ile farklılaşmalarının gözlenlenmesi amaçlanmıştır.

Ülkemizin önemli bir genetik zenginliği olan eğrelti türlerinin *in vitro* koşullarda çoğaltım olanaklarının araştırılması amacıyla, sporlar kullanılarak *in vitro* çimlendirme ve ardından gametofit oluşturan sporlardan farklılaşma denemeleri kurulmuştur. Denemede bitki büyüme düzenleyicilerinden; NAA (0, 0.5, 1, 2 mgL^{-1}), BA (0, 0.5, 1, 2 mg L^{-1}), IBA (0, 0.5, 1, 2 mg L^{-1}) ve KIN (0, 0.5, 1, 2 mg L^{-1})'nin farklı kombinasyon ve konsantrasyonları kullanılarak bitkilerin *in vitro*'da gelişim ve farklılaşmaları gözlenmiştir.

Çalışma sonucunda; tüm eğrelti türlerindeki, sporların canlılık oranları, sporların çimlenme oranları, gametofitlerin yapısı, gametofitlerin sporofitlere dönüşüm oranları ve bu evrelerde meydana farklılaşmalar histolojik analizler ile saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Eğrelti, Spor, Gametofitik ve Sporofitik Evre, Histolojik Analiz

ABSTRACT

MSc.THESİS

INVESTIGATION OF MICROPROPAGATION via SPORE CULTURE TECHNIQUE IN SOME FERN SPECIES (*Asplenium scolopendrium,, Asplenium septentrionale, Asplenium adiantum-nigrum L., Asplenium trichomanes*) GROWN NATURALLY IN TURKEY

Macide Burcu KEKİL

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Supervisor : Prof. Dr. N.Yeşim Yalçın MENDİ
Year : 2014, Pages: 83
Jury : Prof. Dr.N. Yeşim Yalçın MENDİ
: Prof. Dr. Selim ÇETİNER
: Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR

The aim of this study was to propagate some fern species which are grown naturally in our country (*Asplenium scolopendrium,, Asplenium septentrionale, Asplenium adiantum-nigrum L., Asplenium trichomonas)* using spore culture technique and to observe the stages of germination, gametophyte emergence and sporophyte formation. In addition to these, for four species histological analyses were applied to obtain differentiation stages.

In vitro regeneration experiments were conducted using spore explants belong to different *fern* species to search micropropagation possibilities of this plant which is a valuable genetic resource of Turkey. In the experiments, different plant growth regulators; NAA (0, 0.5, 1.0 mg L^{-1}), BA (0, 0.5, 1.0 mg L^{-1}), KIN (0, 0.5, 1.0 mgL^{-1}) and IBA (0, 0.5, 1.0 mgL^{-1}) combinations and concentrations were used to determine the growth and development of plants ,

As a result, ratio of the spores viability, ratio of germination, structure of gametophyte and sporophyte and their differentiation were determined via histological analyses.

Keywords: Fern, Spore Culture, Genetic Resources, Gametophyte, Sporophyte and Histological Analyses

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans ögrenimim boyunca bana her türlü anlayışı gösteren yardım ve teşviklerini esirgemeyen yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima bana ışık tutan danışman hocam Sayın Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN-MENDİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince vizyonu ile bana ilham veren, değerli bilgi ve tecrübeleriyle daima destek olan laboratuvarımızın kurucusu Prof. Dr. Selim ÇETİNER' e, eğitim ve tez dönemim içerisinde gösterdiği ilgi ve desteği için Prof. Dr.Yıldız AKA KAÇAR'a ve çalışmalarımın histolojik analiz kısımında beni yönlendiren Prof. Dr. Sinan ETİ'ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezim süresince laboratuvarda bana destek olan Dr. Pembe ÇÜRÜK, Biyolog Tolga İZGÜ, Biyolog Başar SEVİNDİK, Biyolog Ehsan TAGİPUR, Biyolog Dicle SÖNMEZ, Biyolog Gamze ŞEKER, Biyolog Özhan ŞİMŞEK'e ve histolojik analizlerde yardımcı olan Araştırma Görevlisi Şenay KARABIYIK'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölüm Başkanlığı'na, ve TAGEM 'e (Proje no:Tagem13/ARGE 20) teşekkür ederim.

Hayatım boyunca daima arkamda duran ve her kararımı destekleyen değerli aileme sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatıma girdiği ilk günden beri bana güç veren, yol arkadaşım Diren TİMUR'a içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ X
SİMGELER VE KISALTMALAR XII
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 15
3. MATERYAL VE METOD 23
3.1. Materyal 23
3.1.1. *Asplenium scolopendrium L.* subsp. *Scolopendrium* 23
3.1.2. *Asplenium septentrionale (L.) Hoffm.* subsp. *Septentrionale* 24
3.1.3. *Asplenium adiantum-nigrum L* 24
3.1.4. *Asplenium trichomanes L.* 25
3.1.5. Bitkisel materyallerin toplanması 26
3.2. Yöntem 26
3.2.1 Yüzey Sterilizasyonu 26
3.2.2. Çimlendirme Denemelerinin Kurulması ve Çimlenen Sporların Gametofit Gelişim Ortamına Aktarımı 27
3.2.3. Çimlenen Sporların Farklılaşma Ortamlarında Kültüre Alınması 30
3.2.4. Histolojik Analizler 33
3.2.4.1. Eksplantların Fiksasyon Solüsyonu İçerisine Alınması 33
3.2.4.2. Örneklerin Parafin Bloklar İçine Alınması 33
3.2.4.3. Parafin Bloklar İçerisindeki Örneklerin Kesitlerinin Alınması 34
3.2.4.4. Kesitlerden Alınan Örneklerin Boyanması 34
3.2.4.5. İncelenen Kriterler ve Deneme Planı 35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 35

4.1. *Asplenium scolopendrium, Asplenium septentrionale, Asplenium adiantum- nigrum L* ve *Asplenium trichomanes* Sporlarının Yüzey Sterilizasyonu 35
4.2. *Asplenium scolopendrium, Asplenium adiantum-nigrum, Asplenium trichomanes* ve *Asplenium septentrionale* Türlerinde Çimlenme Bulguları 35
4.3. *Asplenium scolopendrium, Asplenium septentrionale, Asplenium adiantum- nigrum* ve *Asplenium trichomanes* Türlerinde Protal yapısı ve Gametofit Gelişimi 41
4.4. *Asplenium scolopendrium, Asplenium septentrionale, Asplenium adiantum- nigrum* ve *Asplenium trichomanes* Türlerinde Farklılaşma ve Sporofite Dönüşüm Bulguları 44
4.5. Histolojik Analiz Bulguları 69
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 75
KAYNAKLAR 79
ÖZGEÇMİŞ 83

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Spor çimlendirme denemesi 28
Çizelge 3.2. Besin ortam içeriği 29
Çizelge 3.3. Gametofit Gelişim Besin Ortam İçeriği 30
Çizelge 3.4. Gametofit Farklılaşma Deneme Planı 31
Çizelge 3.5. Farklılaşma Besi Yeri İçeriği 32
Çizelge 3.6. Johansen Karışımları (Stösser ve ark., 1985) 33
Çizelge 4.1. Türler Arası Çimlenme Oranları..... 40
Çizelge 4.2. *Asplenium scolopendrium* Türünde Konsantrasyonlara Göre Farklılaşma ve Sporofite Dönüşüm Oranları 45
Çizelge 4.3. *Asplenium adiantum-nigrum* Türünde Konsantrasyonlara Göre Farklılaşma, Kallus ve Sporofite Dönüşüm Oranları..... 49
Çizelge 4.4. *Asplenium trichomanes* Türünde Konsantrasyonlara Göre Farklılaşma, Kallus ve Sporofite Dönüşüm Oranları 57
Çizelge 4.5. *Asplenium septentrionale* Türünde Konsantrasyonlara Göre Farklılaşma, Kallus ve Sporofite Dönüşüm Oranları..... 61
Çizelge 4.6. Türler Arası Farklılaşma, Kallus ve Bitkiye Dönüşüm Oranları 65

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Eğrelti Hayat Döngüsü 4

Şekil 1.2. Türkiye'de *Asplenium scolopendrium,, Asplenium septentrionale Asplenium adiantum-nigrum L., Asplenium trichomanes* türlerinin yayılışı 7

Şekil 1.3. Eğreltilerin otlatma nedeniyle tahribi (Sarı M., 2014) 9

Şekil 1.4. A. *Asplenium scolopendrium* B. *Asplenium adiantum nigrum* C. *Asplenium trichomanes* D. *Asplenium septentrionale* 12

Şekil 3.1 Kültüre alınmış *Asplenium scolopendrium* bitkisi 23

Şekil 3.2. *Asplenium septentrionale* bitkisi 24

Şekil 3.3. *Asplenium adiantum-nigrum* bitkisi 25

Şekil 3.4. *Asplenium trichomanes* bitkisi 25

Şekil 3.5 Sterilizasyon basamakları 27

Şekil.3.6. A-B. Üzerinde sporları bulunduran yaprak eksplantı C. Spor keseleri D. Spor kültürü çalışmaları 28

Şekil 4.1. *Asplenium scolopendrium*'un % çimlenme oranları 36

Şekil 4.2. A. Siyahlaşarak fonksiyonunu kaybeden sporlar; B. Çimlenen sporlar 37

Şekil 4.3. *Asplenium adiantum-nigrum* % çimlenme oranları 37

Şekil 4.4. *Asplenium trichomanes*'un % çimlenme oranları 38

Şekil 4.5. *Asplenium septentrionale* % çimlenme oranları 39

Şekil 4.6. A.Farklılaşmayan çimlenmiş sporlar; B. Çimlenme ve gametofit gelişimi sağlanan eksplantın farklılaşması 39

Şekil 4.7. *Asplenium scolopendrium* sporlarının çimlenmesi ile protal oluşumu 41

Şekil 4.8. A. Çimlenmenin başlaması; B. Apikal uç, Arkegonyum, Rizoid Anteridyum ve Lateral uç yapılarının görünümü(AU: Apikal uç, AR: Arkegonyum, R: Rizoid, AN: Anteridyum, LU: Lateral uç) 42

Şekil 4.9. A-B. *Asplenium trichomanes* ve *Asplenium adiantum-nigrum* Protal yapısı (AU: Apikal uç, AR: Arkegonyum, AN: Anteridyum,R: Rizoid, LU: Lateral uç) 43
Şekil 4.10. *Asplenium trichomanes* türünde gametofit gelişimi (AU: Apikal uç, AR: Arkegonyum, AN: Anteridyum, R: Rizoid) 43
Şekil 4.11. *Asplenium septentrionale* türünde protal oluşumu ve gametofit Gelişimi 44
Şekil 4.12. A. *Asplenium scolopendrium* sporlarının çimlenmesi; B. Çimlenen sporlardan protal oluşumu; C. Protal yapısı ve rizoid oluşumu;D-E Döllenme ile gametofit gelişimi; F. Sporofit gelişimi(P: Protal, R: Rizoid, G: Gametofit) 46
Şekil 4.13. .*Asplenium scolopendrium* farklılaşma, kallus ve sporofite dönüşüm % grafiği 47
Şekil 4.14. A. Farklılaşma safhasında kallus oluşumu; B. Kallustan bitki gelişimi 50
Şekil 4.15. .*Asplenium adiantum-nigrum* farklılaşma, kallus ve sporofite dönüşüm % grafiği 51
Şekil 4.16. A-B-C. *Asplenium adiantum-nigrum* türünde gametofit ve sporofit bitki yapısı (G: Gametofit, S: Sporofit) 54
Şekil 4.17. A. *Asplenium adiantum-nigrum* türünde protal yapısı, Arkegonyum ve Anteridyum oluşumu; B. Gametlerin gelişimi, fertilizasyon ve rizoid oluşumu; C. Gametofit gelişimi; D. Gametofitik evreden sporofitik evreye geçiş; E-F. Sporofit bitki (AR: Arkegonyum, AN: Anteridyum, F: Fertilizasyon, G: Gametofit, R: Rizoid) 55
Şekil 4.18. A-B. *Asplenium trichomanes* türünde farklılaşma evreleri, kompakt yapı üzerinden sporofitik evreye geçiş (S: Sporofitik yaprak, KY: Kompakt yapı) 56
Şekil 4.19. .*Asplenium trichomanes* farklılaşma, kallus ve sporofite dönüşüm % grafiği 59
Şekil 4.20. A. Protal oluşumu; B-C. Gametofit gelişimi; D. Kompakt yapı oluşumu; E. Kompakt yapı gelişimi ile sporofite dönüşüm; F.

Sporofit bitki (P: Protal, G: Gametofit, KY: Kompakt yapı, S: Sporofit bitki) 60
Şekil 4.21. .*Asplenium septentrionale* farklılaşma, kallus ve sporofite dönüşüm % grafiği 62
Şekil 4.22. A.Protal oluşumu; B. Arkegonyum ve anteridyum oluşumumu; C. Gametofit gelişimi ve fertilizasyon; D-E. Farklılaşma evresinde kallus oluşumu ve gelişimi; F. Sürgün oluşumu (P: Protal, AR: Arkegonyum, AN: Anteridyum, F: Fertilizasyon, K: Kallus, S: Sürgün) 64
Şekil 4.23. Farklılaşma ile oluşan kallustan sürgün gelişimi (K: Kallus, S:Sürgün 64
Şekil 4.24. A-B-C-D. Gametlerin oluşumu ve embriyo oluşumunun gerçekleştiği epidermal tabaka 70
Şekil 4.25. A-B-C. *Asplenium scolopendrium* türünde olgun yumurta ve embriyo yapılarının gözlenmesi (OY: Olgun yumurta, E: Embriyo, AU: Apikal uç) 71
Şekil 4.26. A-B-C-D-E-F-G. *Asplenium adiantum-nigrum* türünde olgun yumurta ve embriyo yapılarının gözlenmesi (OY: Olgun yumurta,E: Embriyo) 72
Şekil 4.27. A-B-C. *Asplenium trichomanes* türünde olgun yumurta ve embriyo yapılarının gözlenmesi (OY: Olgun yumurta, E: Embriyo) 73
Şekil 4.28. A-B-C. *Asplenium septentrionale* türünde olgun yumurta ve embriyo yapılarının gözlenmesi (OY: Olgun yumurta, E: Embriyo) 74

KISALTMALAR

NAA : Naftalen Asetik Asit

BA : Benzil adenin

^{o}C : Santigrat derece

IBA : Indol Butirik Asit

L **:** Litre

Mg : Miligram

mg/l : Miligram/Litre

MS : Murashige ve Skoog besi ortamı

KIN **:** Kinetin

Dk : Dakika

ETOH : Etil alkol

NaOCl : Sodyum HipoKlorit

GA_3 : Giberellik asit

1. GİRİŞ

Süs Bitkileri, Dünya'da ve Türkiye'de ekonomiye katkı sağlayan önemli bir sektördür. Hollanda ve Amerika gibi gelişmiş ülkelerin yanında gelişmekte olan bazı Afrika, Asya ve Güney Amerika ülkeleri de uygun ekoloji ve ucuz iş gücü olanaklarını kullanarak süs bitkileri üretimi ile ihracat geliri elde etmektedirler. Süs Bitkileri, 100 milyar ABD dolarına ulaşan üretim değeri ile birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkede önemli bir sektör haline gelmiştir.

Türkiye'de de süs bitkisi üretimi ve ticareti hızla gelişmektedir. Türkiye, süs bitkileri yetiştiriciliğinde uygun iklimsel ve coğrafik koşulları, pazar ülkelere yakınlığı ve ucuz iş gücüne sahip olması gibi nedenlerle önemli avantajlara sahiptir. Ülkemizin süs bitkilerinden aldığı pay yıllara göre artmaktadır. 2012 yılının 1 Ocak-31 Ekim döneminde 60 milyon dolar değerinde süs bitkisi ve mamulü ihraç edilirken, bu rakam 2013 yılının aynı döneminde 63.7 milyon dolar seviyesine yükselmiş, 2013'de 2012'ye göre artış oranı yüzde 6 olarak kayda geçmiştir. Türkiye'nin süs bitkileri ihracaatı 2008 yılında 45.5, 2009 yılında 49.1 ve 2010 yılında ise 56.2 milyon dolara ulaşmıştır.

Türkiye'de 28 ilde süs bitkileri üretimi yapılmaktadır. Üretimin en fazla yapıldığı iller; İzmir, Sakarya, Antalya, Yalova, Bursa ve Isparta'dır. Ülkemiz, biyolojik çeşitlilik zenginliği bakımından tüm kıta ülkeleri arasında 9. sıradadır. Dünyada 250000 tohumlu bitki, Türkiye'de son kayıtlara göre 8.897 çiçekli bitki ve eğrelti türü, yaklaşık 10.500 civarında da takson bulunmaktadır.

Başlangıcı çok eski çağlara dayanan eğrelti otları ilk kez günümüzden 300 milyon yıl önceki Devoniyen'de, henüz karada hiçbir hayvanın yaşamadığı çağlarda yeryüzünde belirmiştir. Bundan 250 milyon yıl önceki Karbonifer'de ise çiçekli bitkilerin ve ağaçların bulunmadığı yeryüzünde bütün bataklık yerler sık eğreltiotu ormanlarıyla kaplıydı. Bu yüzden bu döneme "Eğreltiler Dönemi" de denir. Dünyadaki kömür yataklarının başlıca kaynağı da bu eğreltiotu ormanlarıdır.

Eğreltiotları ya da kısa adıyla eğreltiler, genellikle kuş teleğine benzer parçalı yapraklarıyla tanınan çiçeksiz bitkilerdir. Bu yapraklardan her birinin ortasındaki uzun yaprak sapı iki yana doğru simetrik olarak dallanır ve bu ince dalcıkların iki

yanından küçük yaprakçıklar çıkar. Eğreltiotlarının en yaygın türlerinden biri ekvatordan Kuzey Kutbu'na, Amerika'dan Yeni Zellanda'ya kadar hemen her yerde görülen kartal eğreltisidir (*Pteridium aquilinum*). Koşullar uygun olduğunda 2 metreye kadar boylanabilen bu bitkinin yaprakları tipik eğrelti yaprağı görünümündedir. Sonbaharda kuruyup sararan yapraklar üstlerine güneş vurduğu zaman çok güzel görünür. Diğer türlerin çoğu nemli yerlerde yetiştiği halde, kartal eğreltisi çok derine inen uzun köksapları sayesinde fundalıklar gibi kuru topraklarda da çok geniş alanlara yayılabilir.

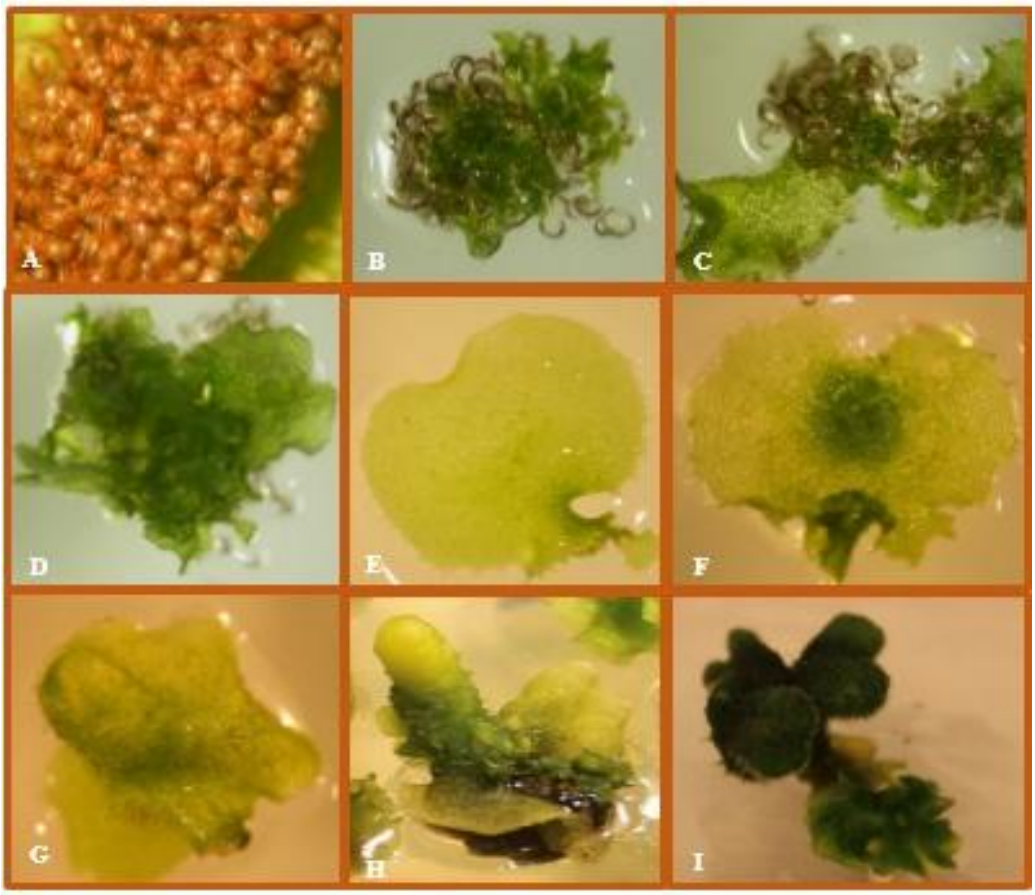
Kartal eğreltisinden sonra en yaygın eğreltiotu türleri ormanlık ve gölgelik yerlerde görülen erkek eğrelti (*Dryopteris filix-mas* L.) ile dişi eğreltidir (*Athyrium filix-femina*). Her ikisi de demetler oluşturan yapraklarıyla çok alımlı bitkilerdir. Kahverengi spor keseleri ve bozumsu yeşil renkli zarif yapraklarıyla tanınan kral eğreltisi (*Osmunda regalis*) de kuzey yarım küredeki en büyük eğrelti türüdür ve bazı yörelerde 3 metreye kadar boylanabilir. Kaya eğreltisi ya da benekli eğrelti (*Polypodium vulgare*) de kuzey yarım kürede yaygın olan türlerden birisidir. Bu bitkinin "besbaye" denen kurutulmuş köksapları kaynatılarak içildiğinde solunum yollarını açar ve bağırsakları çalıştırır.

Çiçeksiz bitkilerin *Polypodiopsida* (ya da Filicopsida) sınıfını oluşturan eğreltiotlarının 10 bin kadar türü tanımlanmıştır. Yeryüzünde çok geniş bir dağılım gösteren bu türlerin çoğu nemli ve gölge yerleri sever. Eğreltiotları, damarlı bitkilerdendir; gövde, kök ve yaprak dokularında suyu ve besin maddelerini taşıyan damarlar bulunur. Gövdeleri ya çok kısa ya da yere yatık olduğundan, yaprakları sanki doğrudan topraktan çıkmış gibi görünür. Ağaçsı eğreltilerin tepesinden yaprakların çıktığı sağlam, kalın ve dik bir gövdesi vardır; oysa kartal eğreltisi gibi türlerin gövdesi toprağın altında yatay olarak uzanır. Türlerin çoğu toprakta yetişir; yalnız *Platycerium* cinsinden geyik-boynuzu gibi bazı eğreltiler başka bitkilerin üzerinde yaşadıklarından "epifit bitki" olarak adlandırılırlar.

Eğreltiotlarından çoğunun yaprakları kışın kuruyup dökülür; ertesi bahar, köksap (rizom) denen etli toprakaltı gövdelerinden yeni yapraklar çıkar ve bu çevrim her yıl yinelenir. Sonbaharda, olgunlaşmış bir eğreltiotu yaprağının arka yüzünde çizgiler halinde dizilmiş ya da küçük öbekler biçiminde gruplaşmış toz gibi ufalanan

küçük kahverengi sporkesesi denen yuvarlak torbacıklardan oluşan lekeler bulunur. Bu keselerin her birinde spor denen yüzlerce üreme hücresi vardır. Bu sporlar doğrudan yeni bir eğreltiotuna dönüşmediği için gerçek anlamda tohum sayılmaz. Gerçekten de nemli toprağa düşen her spor çimlenerek öncim (protal) denen bir hücreler topluluğuna, yani bir gametofite dönüşür. Bir süre sonra, bu bitkiciğin erkek ve dişi üreme organları spermalar ile yumurta hücrelerini üretir. Spermalardan birinin bir yumurta hücresini döllemesiyle de yeni bir eğreltiotu gelişir. Bu bitki başlangıçta eğreltiotunun küçük bir kopyası gibidir; toprağın içine doğru uzanan minicik bir kökü ve havaya doğru yükselen bir yaprak taslağı vardır. Bu yavru bitkinin olgunlaşıp spor üretebilecek duruma gelmesi yıllar sürer. Erginleşince her sonbaharda o da çevresine binlerce spor saçar ve böylece bitkinin yaşam çevriminde önce spor sonra gamet (sperma ve yumurta hücresi) ürettiği evreler dönüşümlü olarak birbirini izler. Buna "döl değişimi" denir. Eğreltiler tohumlu bitkilerden haploid sporlarla üremeleri ile farklılık gösterirler ve hayat döngülerini özellikle bağımsız gametofit rejenerasyonlar ile sağlarlar. *A.scolopendrium* ve birçok türde gametofitler genelde kısa yaşamlı olarak düşünülmektedirler.

Sporofitler diploittirler (bazı poliploid türlerde vardır) ve olgun bireyler yılda milyonlarca spor oluşturur. Tohumlara nazaran sporlar küçük oldukları için rüzgârlarla daha uzağa yayılırlar. Ancak tohumlu bitkiler gibi üreme materyali ebeveynlerin yakın çevrelerinde yer alır. Erkek gametlerin dağılım mesafesi spermatozoidler gibi suyla hareket ettiği için daha sınırlıdır. Eğreltiler çok sayıda spor üretmelerine ve rüzgârla kolayca dağılmalarına rağmen, başarılı çiftleşme uzun mesafelere yayıldıktan sonra gerçekleşir, iki gametofitin yakın mesafelerde olması çok sık görülen bir durum değildir.



Şekil 1.1. A. Spor kesesi B. Sporların olgunlaşarak keselerinden ayrılmaları C. Çimlenmenin ilk safhası D. Çimlenme sonrasında protal oluşumu E. Kalpsi protal yapısı F. Protalden gametofit oluşumu G. Döllenmenin gerçekleşmesi ile oluşan zigotun gelişimi H. Gametofitten sporofite dönüşüm I. Sporofit gelişimi

Homospor eğreltiler, biseksüel üreme potansiyeline sahip tek tip sporlar oluştururlar. Haploid gametofitin kendine döllenmesi, intragametofitik kendine döllenmeden üstün ırklar elde etmemizi sağlar ve homozigot sporofitlere öncülük eder. Diploidlerle karşılaştırıldığında poliploid eğrelti türleri, kendine döllenme depresyonuna daha az hassastır ve yüksek oranda kendine döllenme meydana gelir. Hipoteze göre melez türler kendine döllenenlerden daha başarılıdır. Çünkü *A.scolopendrium* bir diploid taksondur ve ontogen gametofitler melezlemeyi destekler.

Üreme sistemleri ve genetik aktarımlar yeni populasyonların oluşturulması ve uzun dönem hayatta kalmalarını sağlayan en önemli etkenlerdir (Somer ve ark. 2009).

Eğreltiotlarının birkaç türü öncim olmaksızın da çoğalabilir. Bu grubun en tipik örneği olan yürüyen eğreltide (*Camptosorus sibiri-cus*), yaprakların toprağa değen uçları köklenerek tıpkı çilekte olduğu gibi yeni bitkiler oluşturur. Eğreltiler yeryüzünün bütün iklim bölgelerine yayılmakla beraber genellikle nemli ortamlarda yetişirler. Bunun yanısıra bazı türler kurak bölgelerde de yetişmelerine karşın tam bir kuraklığın hakim olduğu çöl bölgelerinde bulunmazlar (Kaynak ve ark., 1988). Türkiye'de toplanan eğrelti örneklerinin değerlendirildiği Türkiye Florası'nın 1. cildinin yayınlanmasından bugüne kadar araştırmacılar, değişik zamanlarda farklı bölgelerden eğrelti örnekleri toplamışlar ve yayınlamışlardır (Kaynak ve ark., 1988).

Ayrıca son yıllarda sayısı gittikçe artan flora çalışmalarında da eğrelti türleri yer almaktadır. Türkiye florasında 23 cins ve 57 takson ile temsil edilen Filicales takımı, yapılan revizyon ve flora çalışmaları sonucunda bugün 24 cins ve 71 takson, melez taksonlarla birlikte 86 takson ile temsil edilmektedir. Diğer taraftan bazı taksonlar yeniden adlandırılmış ve bazıları farklı familyalara alınmış olup bazı yeni taksonların da varlığı saptanarak Türkiye eğrelti florasına eklenmiştir (Kaynak ve ark., 1996).

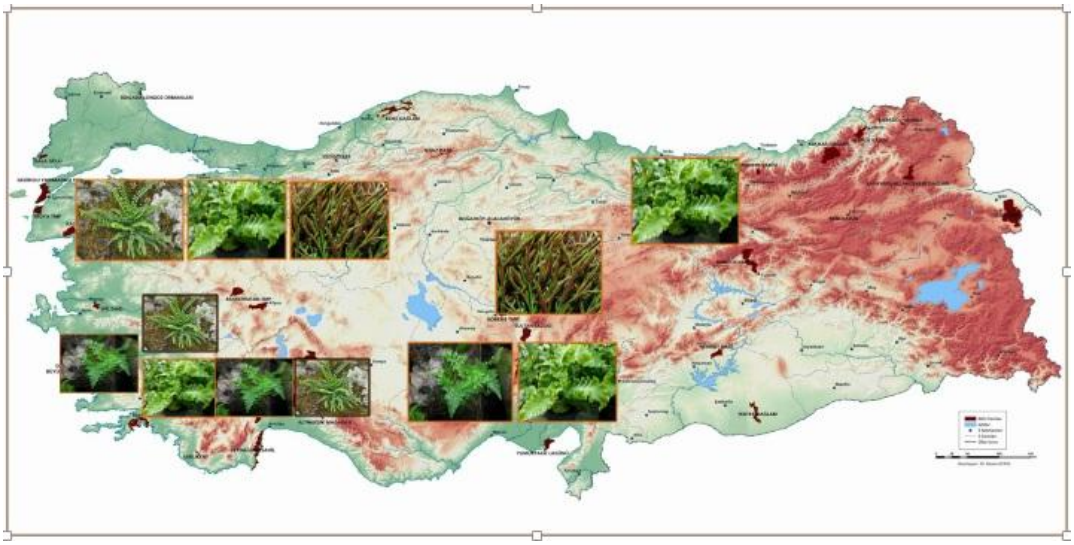
Balıkesir ilinde yapılan bir araştırma sonucunda, bölgede 16 eğrelti türünün bulunduğu saptanmıştır. Bu türlerden en yaygın olanlarının *Asplenium adiantum-nigrum, Asplenium ceterach* L. *subsp. trichomanes ve Pteridium aqualinum* olduğu görülmüştür (Kaynak ve ark., 1988). Diyarbakır ve çevre illeri olan Elazığ, Bitlis, Bingöl, Siirt, Mardin, Urfa ve Adıyaman illerinde yapılan bir başka araştırmada toplam 8 türe ait eğrelti örnekleri toplanmış ve morfolojik karakterizasyon sonucu bu türlerin *Cheilanthes pteridioides, Cheilanthes persica, Adiantum capillus- veneris, Asplenium ruta- muraria subsp. ruta-muraria, Asplenium lepidium subsp, haussknetchii, Asplenium ceterach subsp.ceterach* ve *Cystopteris fragilis* olduğu saptanmıştır (Kaynak ve ark., 1989). Kaynak ve ark.(1991)'larının Bursa ili ve çevresinde yapmış olduğu çalışmada ise, bu bölgede bulunan türlerin yetiştikleri ortama göre farklı ekolojik gruplar oluşturduğu görülmekte olup, bölgede mevcut olan alanların orman, maki ve step gibi farklı ekolojik ortamlar olduğu belirtilmiştir.

Yayılım gösteren türlerin bu ortamlardan birini, ikisini veya her üçünü birden tercih ettikleri görülmektedir. Buna göre araştırma alanında; 1.Step veya step

maki altında yetişen türler, 2.Orman veya orman maki altında yetişen türler, 3.Step, orman ve maki altında yetişen türler olmak üzere 3 grup bulunduğu tespit edilmiştir. Step ve maki altında yetişen türler arasında; *Cheilanthes persica, Cheilanthes marantae, Asplenium viride* Hudson türlerinin bulunduğu, orman veya orman maki altında yetişen türler arasında; *Asplenium onopetris, Asplenium septentrionale, Asplenium scolopendrium* türlerinin bulunduğu, step orman ve maki altında yetişen türler arasında ise; *Pteridium aquilinum, Asplenium trichomanes, Asplanium adiantum-nigrum, Asplenium ceterach, Dryopteris filix-mas* L. türlerinin bulunduğu saptanmıştır.

Kaynak ve ark. (2008), Türkiye'de yetişen Cheilanthoid 5 eğrelti taksonu (*Cheilanthes acrostica* (Balb.) Tod., *C. tinaei* Tod., *C. persica* (Bory) Mett. ex Kuhn, *Notholaena marantae* (L.) Desv. subsp. *marantae* and *Cosentinia vellea* (Aiton) Tod. subsp. *vellea*)'nun yayılışını ve ekolojisi incelemişlerdir. Bu eğreltilerden *Cheilanthes acrostica* ve *C. persica* oldukça geniş yayılışa sahipken, *C. tinaei*'nin çok nadir yayılışı olduğunu, *Notholaena marantae* subsp. *marantae* ve *Cosentinia vellea* subsp. *vellea*'nın ise nisbeten geniş yayılışlı olduğunu belirtmişlerdir.

İncelenen eğrelti türlerinin genel olarak Türkiye'nin güneyinde yayılış gösterdiğini belirlemişlerdir. Ekolojik olarak ise *Cheilanthes acrostica, C. persica* ve *Cosentinia vellea* subsp. *vellea*'nın kalsikol (alkali toprakları tercih eden), *C. tinaei*'nin asidofil (asidik toprakları tercih eden), *N. marantae* subsp. *marantae*'nin ise nötrofil-bazofil (nötr ve alkali toprakları tercih eden) olduğunu saptamışlardır.



Şekil.1.2. Türkiye'de *Asplenium scolopendrium,, Asplenium septentrionale, Asplenium adiantum-nigrum L., Asplenium trichomonas* türlerinin yayılışı

Eğreltiotları, özellikle atık ve kirleticilerin yok edilmesi konusunda, çevre mühendisliği, kanser ve inflamasyonlu hastalıkların tedavisinde etnomedikal ve tıbbın diğer alanlarında da aktif bir şekilde kullanılıyor olması, son zamanlarda büyük ilgi görmesine imkan tanımıştır. Eğrelti ve eğrelti yakın akrabalarını içeren *Pteridophyta* cinsi bitkilerin alternatif tıpta 2000 yıldan daha fazla süredir kullanıldığı bilinmekte olup antik kaynaklarda dahi adı geçen bitkilerdir (Kirtikar ve ark., 1935; Nayar, 1957; Chopra ve ark., 1958; Kumar ve Roy, 1972; Watt, 1972; Dixit ve Bhatt, 1975; Sharma ve Vyas, 1985). Bu bitkilerin mikrobiyal patojenler ile enfekte olmadığı gözlenmiş ve bu durumun *Pteridophyta* bitkilerinin evrim başarısının en önemli faktörü olabileceği düşünülmüştür (Singh et al., 2007).

Eğreltilerin, mikrobik aktivitelerinin sistematik araştırması nerdeyse hiç ele alınmamıştır. Khare (1996) ve Vasudeva (1999) pek çok bulaşıcı hastalığa karşı potansiyel *Adiantum* türlerinin tedavi amaçlı kullanımını tartışmışlardır. *Adiantum* türlerinin geleneksel kullanımı hakkındaki doğrulamalar sonucu, 4 *Adiantum* türünün metanol ekstraktları mikrobiyal ajanlar olarak kullanılarak 11 bakteriyel ve 8 fungal ırka karşı etkileri gözlemlenmiştir (Singh ve ark. 2007). *Adiantaceae* familyasına dâhil olan *Adiantum Linn.* en iyi bilinen ve yaygın türlerden bir tanesidir. Bu tür, etnomedikal'de (geleneksel tıp) büyük bir önem taşımaktadır ve etnobotanikte oldukça popüler olup, ayurvedik tıpta (Hindistan'ın alt kıtasında ortaya çıkan antik

bir sağlık sistemi) Hansraj adı ile tanınmaktadır (Singh ve ark., 2007). Singh ve ark.'nın yaptığı çalışmada, *Adiantaceae* familyasının 4 önemli türü; *Adiantum capillus-veneris, Adiantum peruvianum, Adiantum venustum* ve *Adiantum caudatum* doğadan toplanmış ve metanol ile ekstrakte edilmiştir. Türlerin metanolik ekstraksiyonları arasından maksimum aktivite *Adiantum venustum*'da görülürken, *A. capillus-veneris, A. peruvianum* ve *A. caudatum*'da gözlemlenmiştir.

Yonathan ve ark. (2006)'nın yapmış oldukları çalışma sonucunda *Cheilanthes farinosa* yapraklarının yüksek oranda anti-inflamatuvar ve antinosiseptif özelliğe sahip oluğu görülmüştür. Çalışmada, eğreltinin aktif bileşenleri olan flavonoid glikozit, doğal sinamik asit, kafeik asit, quinik asit ve kolorojenik asit bitkiden izole edilmiştir. Ayrıca izole edilen ekstraktın anti-inflamatuvar etkisine sahip olan asetil salisilik asitin etkisini arttırdığı belirtilmiştir. Radhika ve ark. (2009)'nın yapmış olduğu bir çalışmada, *Cheilanthes farinosa*'nın karaciğer kanser hücrelerinin apoptoz (hücre ölümü) teşviki ve bu hücrelere karşı sitotoksik etkisi belirlenmiştir.

Eğreltinin çevre mühendisliğinde de kullanımı oldukça yaygındır. Arsenik son zamanlarda, toksik ve kanserojenik etkileri sebebiyle çevre ile ilgili çalışmaların en büyük ilgi odağı haline gelmiştir. Batı Bengal, Bangladeş ve Vietnam'ı içine alan Güneydoğu Asya'da ortaya çıkan kriz arseniğe olan ilgiyi hat safhaya getirmiş ve Arsenik'in toksik etkisinin enzimler ve başka biyomoleküller ile etkileşimi ile meydana geldiği tanımlanmıştır (Zhao ve ark. 2009). Doğadan su ve toprak kirleticilerini uzaklaştırmak amacıyla etkili, ucuz ve çevre dostu bir remediasyon metodu gerekmektedir. Bu nedenle bitkilerin doğadaki kirleticileri temizlemek üzere kullanıldığı fitoremediasyon yöntemi hızla kabul görmektedir (Fayiga ve Ma, 2005; Kertulis-Tartar ve ark. 2006). Şimdiye kadar bu hiperakümülatorlerden *Pteridaceae* familyasına dâhil olan 12 tanesi tanımlanmıştır. İlk arsenik hiperakümülator - *Pteris vittata* L. (Çin çalı eğreltisi), 1500 mg / kg arsenik ile kirlenmiş toprakta yetiştirildiğinde %2,3 arsenik topladığı Ma ve ark. (2001) tarafından tanımlanmıştır. Ayrıca rizosferik toprağın bütün kısımlarındaki arseniğe ulaşma etkisinin oldukça fazla olduğu görülmüştür (Silva Gonzaga ve ark.,2006). Benzer şekilde arsenik için fitoremediasyon potansiyeline sahip özellikle endemik, kültüre alınmış ve tropik

iklime alıştırılmış başka bitkilerin de araştırılıp bulunması gerekmektedir (Singh ve ark., 2010).

Eğrelti taksonlarının yetiştikleri lokasyonların ve özellikle de endemik türlerinin tanımlanması ve bunların klonal çoğaltılması, birçok disiplin için de büyük önem arz etmektedir. Ülkemizin önemli genetik kaynaklarından biri olan eğrelti türlerinin, tarla açmalar ve aşırı otlatma, sanayileşme, tarımsal mücadeleler, orman yangınları, kara yollarının yol genişletme ve yeni yol açma faaliyetleri, izinsiz toplayıcılar nedeniyle tehdit altındadır.



Şekil.1.3. Eğreltilerin otlatma nedeniyle tahribi (Sarı M., 2014)

Dünyada bulunan toplam bitki türlerinin üçte birinden fazlasının yok olma tehlikesiyle yüzyüze olduğu belirlenmiştir. Sanayileşme, kentleşme ve özellikle de küresel ısınma bu durumu daha kötü hale getirmektedir (Esquinas-Alca´zar, 2005; Thuiller ve ark., 2005; Lynch ve ark., 2007).

Orman alanlarının aşırı tahribi, bitki habitatlarının yerleşke yapımları için yok edilmesi, maden işletmeciliği, kentselleşme sonucu ortaya çıkan sanayileşme ve

geniş ölçüde yapılan ziraat tarımı, doğada bulunan bitki türleri için çok büyük bir tehlike oluşturmaktadır (Vijayana ve ark., 2010).

Dünya nüfusunun bugün 6.992.000.000 olduğu ve 2050 yılından önce nüfus artışının bu rakamdan % 50 daha fazla olacağı belirlenmiştir (UNFPA, 2012). Bu derece hızlı büyüyen bir popülasyona güvenli bir şekilde gıda tedarik etmek, zirai ürün üretimini büyük oranda arttırmayı gerektirmektedir. Buna bağlı olarak zirai ürün kalitesini ve miktarını kontrol altına almak ve geliştirmek gün geçtikçe zorlaşmaktadır (Hobbs, 2007).

Gıda ve Tarım için Bitki Genetik Kaynakları Uluslararası Antlaşması; Gıda ve Tarım için bitki genetik kaynaklarının muhafazası, doğru kullanımı, adil dağıtımı konularıyla ilgili pek çok düzenlemeyi ortaya koymuştur. Bitki genetik kaynaklarının muhafazası ve akıllıca kullanımını esas alan uluslararası materyal transfer antlaşması 3 Kasım 2001 yılında FAO konferansında kabul edilmiştir. Bunu takiben Birleşmiş Milletler 2010 yılını 'Uluslararası Biyoçeşitlilik Yılı' ilan etmiş ve konunun hassasiyetine değinmiştir (FAO, 2012).

Bitki genetik çeşitliliğinin korunması ile ilgili problemler dikkate alındığında 1970'den bu yana biyoteknolojinin sunduğu imkanlardan yararlanarak özellikle *in vitro* veya doku kültürü kullanılarak problemlere çözüm bulma eğilimi gelişmiştir. Doku kültürü çalışmaları bitki germplazmını toplama, çoğaltma ve saklama konuları ile yoğun olarak ilgilenmektedir (Engelmann 1991; Bunn ve ark., 2007).

Bitkilerin doku kültürü uygulamasına tabi tutulması, sürgün uçlarının fizyolojik ve büyüme safhaları açısından dengelenmesine yardımcı olmaktadır (Engelmann, 2004). Bununla birlikte *in vitro*'da geliştirilen sürgün uçlarının kullanımı kolay, yılın her zamanı kullanılabilir ve bitki rejenerasyonuna oldukça uygundur (Reed, 2002).

Dünyada ve ülkemizde önemi gün geçtikçe artan süs bitkisi sektöründe yeni çeşitlerin ıslahı, tür ve çeşitlerinin tanımlanması, bitkilerin mikroçoğaltımı ve *in vitro* şartlarda muhafazası amacıyla şüphesiz biyoteknolojik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Mikroçoğaltım çalışmaları ile genetik mühendisliği ve mutasyon ıslahı çalışmalarına uygun eksplant kaynakları üretilebilmekte ve süs bitkileri için

çok önemli bir alan olan genetik mühendisliği çalışmalarının önü açılmaktadır. Bu açıdan bakıldığında ülkemiz için önemli olan ve doğal yayılış gösteren tür ve çeşitlerin *in vitro* muhafazasında mikroçoğaltım çalışmaları kilit bir rol oynamaktadır. Doku kültürü çalışmaları geleneksel çoğaltım yöntemleri ile kıyaslanacak olursa özellikle birçok bitki türü için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Geleneksel üretim yöntemleri çok yavaş olduğu için, doku kültürü yöntemi ile çoğaltım daha fazla önem kazanır hale gelmiştir. Birçok bitkide mikroçoğaltım amacıyla, farklı eksplant tipleri kullanılarak doku kültürü tekniklerinden geniş ölçüde yararlanılmaktadır (Zeybek ve ark., 2012).

Ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren bu türlerin bazılarının mikroçoğaltım çalışmalarının gerçekleştirilmesi, doğal ortamda yok olma tehlikesi altında olan bu türlerin, *in vitro* koşullarda çoğaltılarak süs bitkisi sektörüne kazandırılması, iç ve dış pazarlarda satışa sunulması ülkemiz açısından büyük önem arzetmektedir.

Tez kapsamında yürütülecek olan mikroçoğaltım çalışmaları *Asplenium scolopendrium, Asplenium adiantum-nigrum, Asplenium trichomones ve Asplenium septentrionale* türlerinde gerçekleştirilecektir (Şekil 1.4). Süs bitkisi potansiyeline sahip bu bitkilerin, hem saksı bitkisi hem de kesme yeşillik olarak kullanımı amaçlanmaktadır.



Şekil.1.4. A. *Asplenium scolopendrium* B. *Asplenium adiantum nigrum* C. *Asplenium trichomanes* D. *Asplenium septentrionale*

Kesme yeşilliklerin çiçek sepeti ve buket aranjmanlarında kullanımı dünyada olduğu gibi ülkemizde de giderek yaygınlaşmaktadır. *Ruscus, Aralia, Aspedistra, Asparagus* gibi yeşillikler cazip yapraklarıyla çiçek aranjmanlarında önemli yer tutmaktadır. Dünya kesme çiçek ve yeşillik sektöründe bazı *Asplenium* türleri (*A. nidus* vb.) kesme yeşillik olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde ise kesme çiçek sektörü tarafından en çok yetiştirilen ve satılan yeşillik türü 'İsrail ruscusu' diye bilinen *Ruscus hypophyllum*'dur. Ülkemizin doğal eğrelti türleri, cazip yaprak yapıları ile kesme yeşillik olarak kullanım potansiyeline sahiptir.

ABD'de 2004 yılı verilerine göre, eğreltiler dışındaki kesme yeşillik üretimi değeri 45 milyon dolar iken, kesme yeşillik olarak kullanılan eğreltilerden 47 milyon dolar satış elde edilmiştir (http://edocs.dlis.state.fl.us/fldocs/fass/horticulture/05.pdf).

Ülkemizde süs bitkileri ihracatından sağlanan gelir, 80 milyon dolara ulaşmıştır (Bagdatlıoğlu, 2014). Henüz 250 dekar alanda yetiştiriciliği yapılan kesme yeşilliklerin payı, toplam ihracatımız içerisinde çok azdır. Ancak, kesme çiçekler gibi kesme yeşilliklerde de üretim ve ihracatın hızla artacağı öngörülmektedir.

Bu amaçla ülkemizin önemli genetik zenginliği olan bu türlerin *in vitro* koşullarda çoğaltım olanaklarının araştırılması amacıyla farklı büyüme düzenleyicileri kullanılarak mikroçoğaltım çalışmaları yürütülecektir. Şu ana kadar yapılan araştırmalar, yalnızca belirli türlerde yoğunlaşmıştır. Geliştirilecek olan bu protokoller, hem diğer doğal yayılış gösteren türler için uygulanacak hem de ileride yürütülecek olan ıslah çalışmalarına temel oluşturacak bunun yanısıra, iç mekan ve dış mekan süs bitkisi potansiyeli olan bu eğreltilerin, biyoteknolojik yöntemlerle kısa sürede çoğaltılıp özel sektörle iş birliği içerisinde piyasaya sürülmesi ülke ekonomisine önemli katkılar sağlayacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hicks ve ark. (1986), *Matteuccia struthiopteris* eğrelti türünün sürgün uçlarından aldıkları tomurcukları, 10^{-5} ve 10^{-6} M kinetin içeren yarı-katı Knudson's besi yerinde kültüre almışlardır. Mikroçoğaltım ve köklenme aşamalarında, KIN, NAA ve GA_3 etkilerini araştırmışlardır.

Vijayakumar ark. (1990), nesli tükenme tehlikesi ile karşı karşıya olan eğrelti türlerinden biri olan *Betula uber*'in dormansi gösteren tomurcuklarını seradan ve araziden toplamışlar, içerisinde mineral tuzlar, organik mineraller ve tomurcuk gelişimini uyaran büyüme düzenleyicileri içeren MS ortamında kültüre almışlar ve sınırlı miktarda çoğalma gözlemişlerdir. Dört hafta içerisinde sürgünlerden, boyutu 2-3 cm'e ulaşan 3-4 yaprak oluşumu gö zlenmiştir. 20 ^{0}C'de 16/8 fotoperyodisite gösteren büyütme odasında, yoğun nemli koşullar altında, torf içerisinde 4-6 hafta sürecinde kök oluşumunun gerçekleştiği saptanmıştır.

Rogers ve ark (1992), *Notholaena spp* için mikroçoğaltım ve köklenme protokolü geliştirmişlerdir. Sürgün kültürü, üzerinde olgun sporları bulunan yapraklardan alınan eksplantların herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi bulunmayan MS besi ortamında kültüre alınması ile gerçekleştirilmiştir. Köklendirme ve bitki gelişimi, gelrite içeren MS, nemlendirilmiş vermikulit içeren sıvı MS veya su ile nemlendirilmiş vermikulit koşullarında sağlanmıştır. Vermikulit içeren sıvı MS ile yaprak ve kök gelişimi en iyi şekilde sağlanmıştır. Dış koşullara aklimatizasyonunda yüksek neme ihtiyaç duyulmamıştır.

Morini (2000), *Osmundo regalis* türünde *in vitro* rejenerasyon ve mikroçoğaltım koşullarını optimize etmek için çalışmalar yapmıştır. Sporlar, gametofit ve sporofit elde etmek amacıyla olgun bitkiden alınarak, Hoagland ve Arnon besiyerinde kültüre aktarılmışlardır. Hormon bulunmayan besi yerinde sporofitler normal gelişim göstermiş fakat sekonder meristemlerin nadir görüldüğü saptanmıştır. Yüksek oranda çimlenmenin gözlendiği besi yerinde bulunan sporların yine aynı besi yerinde farklılaşarak geliştikleri belirtilmiştir. Gametofitlerin daha sonra sporofitleri meydana getirerek başarılı bir şekilde aklimatize edildiği bildirilmiştir.

Ambrósio ve ark (2004), *Nephrolepis biserrata* türünün *in vitro* kültür sırasında sukroz ve pH etkileşimlerini incelemişlerdir. Stolon segmentlerini 0, 15, 30, 45, 60 g L^{-1} sukroz ve 3, 5, 7 ve 9 pH aralıklarında yarı-katı MS besi yerinde kültüre almışlardır. Ortamda sukrozun bulunmaması durumunda sürgün ve yaprak rejenerasyonunun inhibe edildiği saptanmıştır. Diğer taraftan besi yerine sukroz ilavesi ile pH 5 ve 7'de sürgün sayısı her eksplant başına sırasıyla ortalama ve maksimum 51.25 ve 38.25 değerlerine ulaştığı belirlenmiştir. Sakkaroz konsantrasyonları, 15-45 gL^{-1} aralığında tutulduğunda yaprak uzunluğunda artış olduğu gözlenmiş ve pH 9, kuru madde ağırlığını etkilemezken, yeni yaprakların oluşumu için de yeterli olmadığı saptanmıştır. Genç sporofitlerin aklimatizasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir.

Kromer ve ark. (2006), *Asplenium adulterinum, A. cuneifolium, Asplenium septentrionale, Polypodium vulgare, Woodsia genus, Woodsia ilvensis ve W. Alpina* eğrelti türlerinde *in vitro* mikroçoğaltım çalışmaları, dış koşullarda koruma ve gen bankalarının oluşturulması çalışmaları gerçekleştirilmişdir. Altı tür üzerinde yapılan çalışmada gametofit gelişimleri incelenmiş ve modifiye edilmiş ½ MS besiyerinin en iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. *Asplenium adulterinum* ve *Polypodium vulgare* eğrelti türlerinde gametofit gelişimi için ortamdaki optimum sakkaroz konsantrasyonun 20-30 gL^{-1} olması gerektiği saptanmıştır. Ortamda yüksek konsantrasyonlarda (40 gL^{-1}) şeker bulunması durumunda ise gametofit gelişim sürecinde renk değişiklikleri ve çürüme görüldüğü belirtilmiştir. Bunun yanısıra glikoz, sakkaroz, fruktoz, mannoz, laktoz gibi farklı şekerlerin besi ortamında gametofit gelişimi üzerinde etkileri incelenmiş, glikozun ortamda bulunması durumunda gametofit gelişiminde artış gözlenirken, fruktozun besi yerinde bulunması durumunda ise toksik etki yaptığı saptanmıştır. Serpentin eğrelti türlerine ait gen bankasının oluşturulması ve uzun süreli korunması amacıyla en uygun ortamın, +8°C koşullarında, beyaz floresans ışığı (0.15 µmol m^2 s) ve soğuk koşullar altında herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½ MS besi yerinde olduğu belirtilmiştir. Gametofitlerden ayrılan sporofitlerin KIN ve NAA ile desteklenen ½ MS besi yerinde en iyi gelişim gösterdiği saptanmıştır.

Goller ve ark. (2007), farklı cinslere ait 16 eğrelti türünde MS besiyeri kullanılarak spor kültürü çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Türlerin, besi yerinde gelişim safhalarına göre farklı yanıt verdiği belirlenmiştir. Spor çimlenme süresinde türler arasında farklılık görülmekle birlikte çimlenme süresinin ortalama 16 hafta olduğu saptanmıştır. Protal oluşumunun uç meristemlerin aktivitesi sonucunda meydana geldiği ve türler arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Araştırılan bütün türler için uzun süreli gametofit kültür protokolleri yayınlanmıştır. Olgun gametofitlerde anteridya ve arkegonya oluşumu gözlenmiş, doğal fertilizasyonunun genç sporofitlerin oluşumuna imkan verdiği saptanmıştır. Besiyerindeki sukroz konsantrasyonunun gametofit çoğalımını stimüle ettiği, sakkarozun az olması durumunda ise tomurcuk formasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Genç eğrelti yapraklarında 6 aylık bir kültür süreci sonrasında apospori gözlenmiş ve yeni generasyon gametofitlerin geliştiği saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda 12 türe ait sporofitler elde edilmiş ve serada yetiştirilmek üzere kültüre alınmıştır.

Soare ve ark. (2007), *Phegopteris connectilis* nesli tükenmekte olan ve apogami gösteren eğrelti türüdür. *Phegopteris connectilis'*in dış koşullarda korunması, *in vitro* gametofit üretimi ile birlikte embriyo, bitki oluşumu ve elde edilen eksplantların kriyoprezervasyon yöntemi ile saklanması ile nesli tehlikede olan bu türün korunması amaçlanmıştır. *Leptosporangiate sp*. eğrelti türlerine de protallik filament oluşumu, protallik yaprak ve kalpsi protal evrelerinin birbirini takip etmesi ile gametofit farklılaşmasının gerçekleştiğini gözlemişlerdir. Gametofiti hidrasyondan korumak amacıyla yapışkan sıvı salgılayan tek hücre uzantılarının farklılaştığı saptanmıştır. *In vitro*'da kültüre alma ile başlangıç kültüründen itibaren yalnızca 7 hafta sonra apogami özelliği gösteren embriyolar elde edilmiştir.

Soare (2008), kültüre alınan *Pteridophyta* bölümüne ait eğrelti türlerinde sporofit ve gametofit farklılaşmasındaki değişimlerin, besiyeri ile ilişkisini araştırmıştır. Spor kültürü ile tek protal elde etmiş, yeşil sporangiaların kültüre alınması ile tek eksplanttan çok sayıda protal (koloni) oluştuğunu gözlemiştir. Ortamda agar kullanımının daha geniş kolonilerin oluşumunda fiziksel olarak destek sağladığı saptanmıştır. Apikal bölgedeki hücrelerin uzaması ve protala ait

filamentlerin dallanması ile sekonder gametofit oluşumuna imkan tanıdığı belirlenmiştir. Sporofit formasyonun meydana gelmesinin *Cystopteris fragilis*'te olduğu gibi döllenme ile diğer yandan *Cyrtomium falcatum* ve *Phegopteris connectilis* türlerinde olduğu gibi ise apogami ile sonuçlanabildiğini belirtmiştir. Döllenen türlerde embriyonun başlangıç kültüründen 3 ay sonra meydana geldiği saptanmıştır. Apogami gösteren türlerin karakteristik özellikleri, gametofitlerde trakeit oluşumu ve gelişimin ilk safhalarında, kök gelişimin olmaması olarak tanımlanmıştır. Yeşil sporangiaların agar içeren besi yerinde kültüre alınması ile yüksek sayıda gametofitlerin meydana geleceği ve bitkiciklere dönüşebileceği belirtilmiştir.

Khan ve ark. (2008), geleneksel yöntemler ile üretilmesi zor olan *Asplenium nidus*'un *in vitro* koşullar altında mikroçoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. *Asplenium nidus* mikroçoğaltımında başlangıç materyali olarak sporlar kullanılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda en iyi sterilizasyon protokolünün, %20'lik NaOCl ve buna ek olarak birkaç damla tween 20 kullanımı ile en etkin sonucun sağlandığı belirlenmiştir. Eksplantlar $\pm 25\ ^0C$ karanlıkta ½ MS besiyerinde kültüre alınmıştır. 12 hafta sonrasında sporlar çimlenmiş ve protal formasyonu saptanmıştır. Çimlenmenin ardından kültürler 4 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Protaller, içerisinde BAP (1-4 mgL^{-1}) ve NAA (0.1-0.5 mgL^{-1}) bulunan ½ MS besiyerine aktarılmış ve çoğaltımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Farklılaşma ortamına alınan eksplantlarda maksimum sürgün sayısı, içerisinde NAA ve BAP'a ek olarak NaH_2PO_4 bulunan ½ MS besi yerinde saptanmıştır. MS besi yerine NaH_2PO_4 ilavesinin gametofitik safhadan sporofitik safhaya geçişte önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Köklenme için 2.0 mgL^{-1} IBA'in en etkin olduğu ve aklimatizasyon için en uygun materyalin bahçe kumu olduğu saptanmıştır.

Ludwık ve ark. (2008), kayalıklarda yetişen ve nesli tükenmekte olan eğrelti türü olan *Asplenium adulterinum* üzerinde çalışmışlardır. Gerçekleştirilecek koruma programları aktif bölgelerdeki populasyonun formunun korunmasını ve geliştirilmesini sağlamaktadır. Son zamanlarda geliştirilen *in vitro* çoğaltım ve *ex sitü* koruma metodları nesli tükenmekte olan popülasyonların gen bankalarını oluşturmaya imkan tanımaktadır. Yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında farklı

konsantrasyonlarda sükroz ve agarın gelişim üzerine etkilerini incelemişlerdir. En etkin çimlenme, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½ MS ortamında olur iken, sporofit oluşumu için en etkili ortamın ise 1 mgL^{-1} KIN ve 0.1 mgL^{-1} NAA içeren ½ MS olduğu saptanmıştır. Oluşturulacak metod ile gelecekte zarar görmesi muhtemel popülasyonların da koruma altına alınmasının sağlanacağı belirtilmiştir.

Aspiras (2009), *in vitro* kültür tekniği ile elde edilen sera ve tarla koşullarında çoğaltılan *Platycerium coronarium* ve *Platycerium grande* türlerinde gametofit ve sporofit gelişimi karşılaştırmışlardır. *Platycerium coronarium* ve *Platycerium.grande* türlerinde sporofit ve gametofitlerin morfolojileri, spor çimlenme şekli, sporların çimlenmesi ile oluşan ve eşey organlarını taşıyan haploid evrenin gelişimi kaydedilmiştir. *Platycerium coronarium* ve *Platycerium grande* gametofitleri farklı ortamlar kullanılarak *in vitro*'da kültüre alınmıştır. Gametofitler daha sonra ağaç eğreltisi kökleri ve bahçe toprağı karışımı içeren saksılara sporofite dönüşümü sağlamak için aktarılmıştır. *Platycerium*'un iki türüne ait sporofitler sera ve tarla koşullarında ağaç eğreltisinin yapraklarına, *Swietenia macrophylla*'nın gövdesi ve dallarına tutturulmuştur. *P.coronarium* ve *P.grande* sporofit morfolojilerinde çeşitlilik görülmesine karşılık, gametofit morfolojilerinde çeşitlilik söz konusu olmamıştır. *P. coronarium* ve *P.grande* spor kültürü ortamı ve % 2 glikoz içeren Knudson C kültür ortamlarında hızlı spor çimlenmesi ve gametofit gelişimi sergilemişlerdir. Saksı ortamına aktarılan gametofitler daha fazla sayıda sporofit oluşturmuşlardır. *Mahogany* ağacının dallarına tutturulan *P. grande* sporofitleri ağaç eğreltisine tutturulanlara göre daha fazla yaprak dolayısı ile daha fazla yaprak alanına sahip bitkiler oluşturmuşlardır. *P. coronarium* sporofitleri de benzer şekilde gözlem yapılan iki hafta süresince yeni yaprak oluşturmamış ve halihazırda aktarılan çevreye adapte olmuşlardır. *Mahogani* ağacı gövdesine tutturulmuş *P.grande* sporofitleri açık alanda ve yarı gölge koşullarında en iyi şekilde gelişme göstermişlerdir.

Soare ve ark. (2010), süs bitkisi olarak büyük bir öneme sahip olan ve apogami özelliği gösteren *Dryopteris affinis* eğrelti türünde spor kültürü yapmışlar, gametofit ve sporofit safhalarında farklılaşma ve *in vitro* rejenerasyon yeteneğini araştırmışlardır. Sporlar, hormon içermeyen MS besi yerinde 16/8 fotoperyodisite gösteren iklim odalarında besiyerlerinde kültüre alınmışlardır. Yaklaşık 100

gametofit bulunduran protal kolonileri elde edilmiştir. İlk köklerin, sporofit formasyonunun 2-3 yaprağa sahip olduğunda farklılaştığında oluşmaya başladığı gözlenmiştir. Sporların kültüre alınmasından 10 ay sonra bitkiler toprağa aktarılmıştır.

Marimuthu ve ark. (2011), nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan *Pronephrium triphyllum, Sphaerostephanos unitus* eğrelti türlerini koruma altına almak amacıyla *in vitro* spor kültürü yapmışlar ve mikroçoğaltım protokolü geliştirmişlerdir. Spor çimlenmesi, gametofit gelişimi, reprodüktif safhaların değişimi ve sporofit formasyonunu incelemişlerdir. *Pronephrium triphyllum* türünün sporlarını Knop's bazal ortamında kültüre almışlar ve yüksek oranda gelişim gözlemişlerdir. Sporofit formu için, en iyi gelişimin, Knop's sıvı besi yerinde meydana geldiğini belirlemişlerdir. *Sphaerostephanos unitus* türü için ise en yüksek çimlenme oranı Knop's bazal ortamında, spor formasyonu içinse en yüksek gelişimin Knop's besi yeri olduğunu saptamışlardır. *In vitro*'da gelişimi tamamlanan bitkiler, doğal ortamlarında ve çeşitli botanik bahçelerinde koruma altına alınmıştır.

Liao ve ark (2011), *Platycerium bifurcatum* eğrelti türünün genç yaprak eksplantlarından, yeşil globüler gövdeleri alarak *in vitro*'da mikroçoğaltım çalışmaları yapmışlardır. Yeşil globüler gövdeleri, NAA ve farklı sitokinin (2İP ve BA) konsantrasyonlarını içeren MS besiyerinde kültüre almışlardır. NAA içeren besi yerlerinde başlangıç aşamasında gelişimin daha etkili olduğu gözlenmiştir. Besiyerine eklenen sitokininlerin yeşil globüler gövde gelişimini hızlandırdığı saptanmıştır. Yeşil globüler gövdelerin, 5.37 μM NAA ve 2.22 μM 2 İP içeren ortamda kültüre alınması ile sporofit gelişimde yavaşlama gözlenmiş fakat çaplarında artış gözlenmiştir. Rejenerasyon safhasında en çok gelişim hormon içermeyen besi yerinde gözlenmiştir. Köklenmemiş ve gametofitten ayrılmış sporofitler, 1:1 oranında kuru yosun, vermikulit ve torf içeren saksılara alınmış ve köklenmenin 4 haftalık aklimatizasyon süreci sonrasında meydana geldiği saptanmıştır. Yapılan mikroçoğaltım çalışmaları sonucunda 32 haftalık bir sürecin ardından her bir yaprak eksplantından 170 adet sporofitin meydana geldiği belirtilmişdir.

Mazumder ve ark. (2011), *Drynaria quercifolia* eğrelti türünün korunması amacıyla *in vitro* çoğaltım ve dış koşullarda koruma programı üzerine çalışmalar

gerçekleştirmişlerdir. Sporlar çimlendirmek amacıyla, Z4 (Full MS+1mgL^{-1} IAA+5mg/L^{-1} KIN+20%CM+300mg/L^{-1} CH) besiyerinde kültüre alınmıştır. Denenen diğer besi yerlerinde protal oluşumu başarısızlıkla sonuçlanmıştır. İnokülasyondan sonra çimlenme sürecinin yaklaşık 30 gün olduğu belirtilmiştir. Protal formasyonunun ve devam eden sporofit gelişiminin incelenmesi amacıyla bitkicikler PNT-2 (Full strength Parker and Thompson +5mgL^{-1} IAA+2mgL^{-1} KIN) besi yerinde kültüre alınmış ve en yüksek farklılaşmanın bu besiyerinde meydana geldiği saptanmıştır.

Srivastava ve ark. (2013), kuş kafesi eğreltisi olarak anılan, süs bitkisi potansiyeline sahip ve nesli tükenmekte olan *Asplenium nidus* eğrelti türünün döllenme biyolojisi ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Yapılan gözlemlerde karışık popülasyonlardan izole edilmiş popülasyonlara kıyasla daha fazla sporofitin üretildiği saptanmıştır. Gerçekleştirilen spor kültürü çalışmalarında Parker-Thompson besi yeri kullanılmış ve eksplantlar ± 25 ^{0}C'de 16 saat peryodisite gösteren büyütme odalarında kültüre alınmışlardır. İzole edilen popülasyonlardaki sporofit üretim eksikliğinin zigotik genotipten kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Yapılan çalışmaların temelinde *Asplenium nidus*'un kabul edilebilir oranda kendine döllenme yeteneğine sahip olması ile birlikte yabancı döllenmeye adapte olduğu saptanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında, *Asplenium scolopendrium,, Asplenium septentrionale, Asplenium adiantum-nigrum* ve *Asplenium trichomonas* eğrelti türleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan türler, TAGEM 13-ARGE 20 no'lu proje kapsamında doğadan toplanmış ve Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Süs Bitkileri serasında saksılara alınmış ve muhafaza edilmiştir.

3.1.1. *Asplenium scolopendrium L.* subsp. *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.



Şekil 3.1. Kültüre alınmış *Asplenium scolopendrium* bitkisi

3.1.2. *Asplenium septentrionale (L.) Hoffm.* subsp. *septentrionale*

Bitki, 5-20 cm, çok sık demet görünümündedir. Yapraklar düzenli olmayan dikotomik dallanma gösterir. Petiol laminadan uzun, yeşil, tabanda siyahtır. Lamina çok küçük, ve dikotomik olarak dallanır, koyu yeşil, derimsi, lamina segmentleri linear, saplıdır. Soruslar oluştuğu zaman tüm segmentleri kaplar. Yüksek dağlık kesimlerde özellikle silisli kayalar üzerinde yetişen nadir yayılışlı bir eğrelti türüdür.



Şekil.3.2. *Asplenium septentrionale* bitkisi

3.1.3. *Asplenium adiantum-nigrum L.*

Bitki 10-25 cm'dir. Yapraklar küme şeklinde, kışın kurumaz. Petiol laminadan kısa, üstte yeşil altta yeşil, tabanı şişkindir. Lamina koyu parlak yeşil, son segmentler ovat-lanseolat ve akut dişlidir. Nemli ve kayaların altında yetişen geniş yayılışlı bir eğreltidir.



Şekil 3.3. *Asplenium adiantum nigrum* bitkisi

3.1.4. *Asplenium trichomanes L.*

Bitki 5-25 cm küme şeklindedir. Yapraklar linear, 1-pinnat, petiol 3-8 cm petiol ve eksen eflatun-kahverenklidir. *Asplenium trichomanes*, Avrupa'da 6 alttür ile temsil edilir. Türkiye'de iki alt türü kayıtlıdır. Kaynak ve ark.(2005)'nın yapmış oldukları çalışmada yeni alttürler saptanmıştır. Bunlar; *A.trichomanes* subsp. *trichomanes*, *A.trichomanes* subsp. *inexpectans*, *A.trichomanes* subsp. *quadrivalens*, *A. trichomanes* subsp. *pachyrachis*'dir.



Şekil 3.4. *Asplenium trichomanes* bitkisi

3.1.5. Bitkisel materyallerin toplanması

Türler, sporların üzerinde olduğu vejetasyon döneminde, TAGEM 13 ARGE 20 no'lu proje kapsamında Uludağ'dan toplanmıştır. Toplanan bitkiler seraya getirilerek topraklarından ayrıldıktan sonra 13 cm derinliği olan torf/perlit/kum karışımı (1:1:1) içeren 3 litrelik plastik saksılara dikilmiştir. Seradaki saksılarda fazla bekletilmeden *in vitro* koşullarda spor kültürü çalışmaları yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Yüzey Sterilizasyonu

Asplenium scolopendrium, Asplenium septentrionale, Asplenium adiantum-nigrum, ve *Asplenium trichomanes* türlerinde spor keseleri bulunduran yapraklar, eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

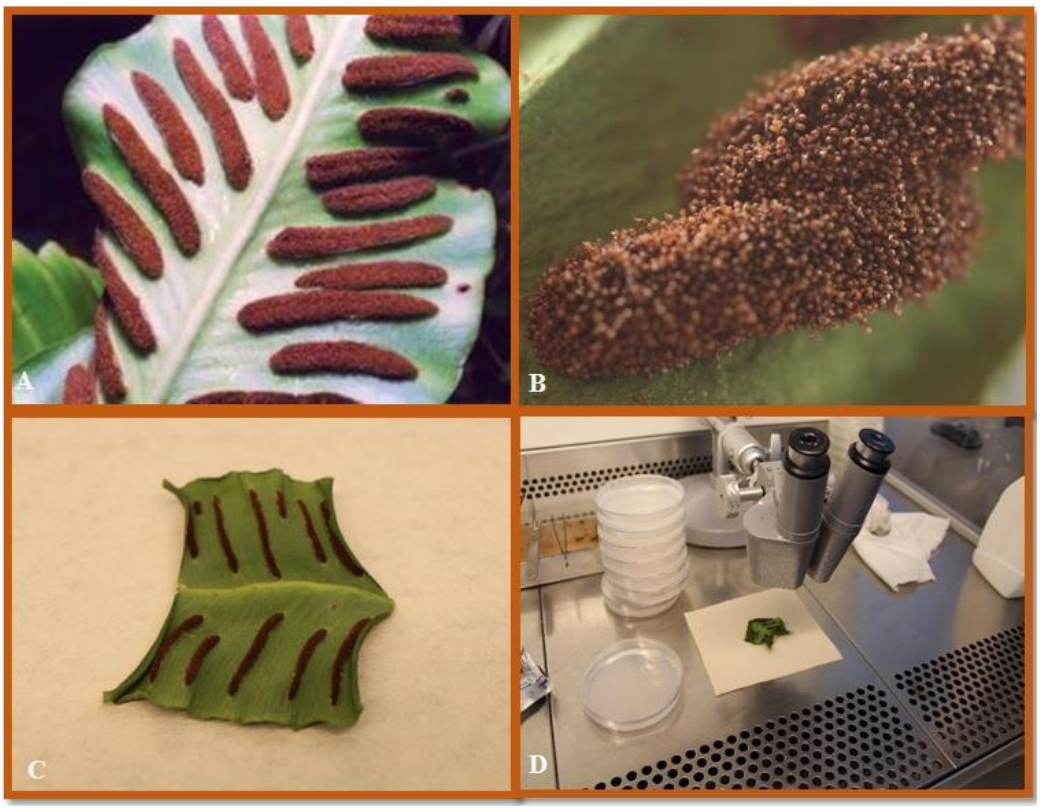
Sporları üzerinde bulunduran yaprakların yüzey sterilizasyonunda; yapraklar yüzey sterilizasyonundan önce 1-5-10 gün aralıklarla filtre kağıtları veya kese kağıtları içerisinde 65 ^{0}C'de etüvde bekletiletilerek, sporların olgunlaşması sağlanmıştır. Etüvde bekletilen örnekler steril kabin içerisine alındıktan sonra %70 lik etil (EtOH) alkolde 1-2 dk. bekletildikten sonra saf su ile yıkanmış, %10-15-20-25 ve 30'luk NaOCl içeren farklı yoğunluktaki çözeltilerde farklı zaman aralıklarında bekletilerek sterilizasyon tamamlanmıştır.



Şekil 3.5. A) Etüv'de 2 gün boyunca filtre kağıdı içerisinde inkübe edilmiş sporlar B) Sporların bulunduğu yaprakların sterilizasyon için behere aktarımı C) Eksplantların %70'lik EtOH'de 1 dk. bekletilmesi D) Eksplantların saf su ile yıkanması E) Ekplantların %30'luk NaOCl'de 20 dk. bekletilmesi F) Eksplantların saf su ile yıkanarak kültüre alınmak üzere hazırlanması

3.2.2. Çimlendirme denemelerinin kurulması ve çimlenen sporların gametofit geliştirme ortamlarına aktarılması

Yapılan literatür taramaları sonucunda bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen ½ MS, farklı konsantrasyonlarda GA_3 (0, 0,5, 1 mgL^{-1}) içeren ½ MS ve farklı konsantrasyonlarda ABA (1, 2, 3 mgL^{-1}) içeren ½ MS besiyerinde spor çimlendirme denemeleri kurulmuştur.



Şekil 3.6. A-B. Üzerinde sporları bulunduran yaprak eksplantı C. Spor keseleri D. Spor kültürü çalışmaları

Çizelge 3.1. Spor çimlendirme denemesi

Tür/Eksplant tipi	**Farklı MS Konsantrasyonları**		
	1\2 MS	1\2 MS+ABA	1\2 MS+GA_3
Asplenium scolopendrium	Her petride 20 spor x 8 tekerrür (petri)	Her petride 20 spor x 8 tekerrür (petri)	Her petride 20 spor x 8 tekerrür (petri)
Asplenium adiantum-nigrum L.	Her petride 20 spor x 8 tekerrür (petri)	Her petride 20 spor x 8 tekerrür (petri)	Her petride 20 spor x 8 tekerrür (petri)
Asplenium trichomanes L.	Her petride 20 spor x 8 tekerrür (petri)	Her petride 20 spor x 8 tekerrür (petri)	Her petride 20 spor x 8 tekerrür (petri)
Asplenium septentrionale	Her petride 20 spor x 8 tekerrür (petri)	Her petride 20 spor x 8 tekerrür (petri)	Her petride 20 spor x 8 tekerrür (petri)

Çizelge 3.2. Besin ortam içeriği

	½ MS	½ MS GA_3	½ MS ABA
Makroelementler (½MS)	mg L^{-1}	mg L^{-1}	mg L^{-1}
NH_4NO_3	825	825	825
KNO_3	950	950	950
$CaCl_2$ x $2H_2O$	220	220	220
$MgSO_4$ x $7H_2O$	185	185	185
KH_2PO_4	85	85	85
Mikroelementler**(½MS)**	mg l^{-1}	mg l^{-1}	mg l^{-1}
H_3BO_3	3,1	3,1	3,1
$MnSO_4$ x $1H_2O$	8,45	8,45	8,45
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	5,3	5,3	5,3
KJ	0,415	0,415	0,415
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0,125	0,125	0,125
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0,0125	0,0125	0,0125
$CoCl_2$ x $6H_2O$	0,0125	0,0125	0,0125
Sukroz	30	30	30
Gelrite	4	4	4
pH	5,5-5,6	5,5-5,6	5,5-5,6
GA	.....	1	.....
ABA	.....	.....	2,4

Etkin çimlendirme protokolü geliştirildikten sonra, çimlenen sporlar gametofit gelişimi için bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½ MS ve yine bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen modifiye edilmiş 1/2 MS besi yerlerine aktarılmıştır.

Çizelge 3.3. Gametofit gelişim besin ortam içeriği

	½ MS	Modifiye ½ MS
Makroelementler (1/2 MS)	mg l^{-1}	mg l^{-1}
NH_4NO_3	825	825
KNO_3	950	950
$CaCl_2$ x $2H_2O$	220	220
$MgSO_4$ x $7H_2O$	185 $MgSO_4$	185 $MgSO_4$
KH_2PO_4	85 KH_2PO_4	85 KH_2PO_4
Mikroelementler (1/2 MS)	Mg l^{-1}	Mg l^{-1}
H_3BO_3	3,1	3,1
$MnSO_4$ x $1H_2O$	8,45	8,45
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	5,3	5,3
KJ	0,415	0,415
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0,125	0,125
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0,0125	0,0125
$CoCl_2$ x $6H_2O$	0,0125	0,0125
MS Vitamin	.....	1000 µ
Fe-EDTA	.....	5000 µ
Pepton	.....	250 mg
Sukroz	30 gr	30 gr
Glukoz	.....	2 gr
Myoinositol	.....	0,05 gr
Gelrite	4 gr	4 gr
pH	5,5 – 5,6	5,5 – 5,6

3.2.3. Çimlenen sporların farklılaşma ortamlarında kültüre alınması

Anteridyum (erkek organ) ve arkegonyum (dişi organ) oluşumunu tamamlamış olan gametofitler, sporofit bitkiyi oluşturmak üzere farklılaşma ortamlarına ihtiyaç duymaktadırlar. Farklılaşma denemelerinde, her eğrelti türü için farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin (NAA, IBA ,BA, KIN) kombinasyonları (NAA + BA, IBA + BA, NAA+KIN, IBA+KIN) ve farklı konsantrasyonları (0, 0,5, 1 mgL^{-1}) ile kombine edilmiş ½ MS besi kullanılmış ve ortamlar 22-25 ^oC'de ve 16 saat fotoperyodisite gösteren büyütme odası koşullarında kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.4. Gametofit farklılaşma deneme planı

Hormone No	NAA (mgL^{-1})	BA (mgL^{-1})	Hormone No	IBA (mgL^{-1})	Kinetin (mgL^{-1})	Hormone No	IBA (mgL^{-1})	BA (mgL^{-1})	Hormone No	NAA (mgL^{-1})	Kinetin (mgL^{-1})
1	0	0.5	**9**	0	0.5	**17**	0	0.5	**25**	0	0.5
2	0	1	**10**	0	1	**18**	0	1	**26**	0	1
3	0.5	0	**11**	0.5	0	**19**	0.5	0	**27**	0.5	0
4	0,5	0.5	**12**	0,5	0.5	**20**	0,5	0.5	**28**	0,5	0.5
5	0.5	1	**13**	0.5	1	**21**	0.5	1	**29**	0.5	1
6	1	0	**14**	1	0	**22**	1	0	**30**	1	0
7	1	0.5	**15**	1	0.5	**23**	1	0.5	**31**	1	0.5
8	1	1	**16**	1	1	**24**	1	1	**32**	1	1

Çizelge 3.5. Farklılaşma besi yeri içeriği

	Modifiye ½ MS
Makroelementler (1/2 MS)	mg l^{-1}
NH_4NO_3	825
KNO_3	950
$CaCl_2$ x $2H_2O$	220
$MgSO_4$ x $7H_2O$	185 $MgSO_4$
KH_2PO_4	85 KH_2PO_4
Mikroelementler (1/2 MS)	Mg l^{-1}
H_3BO_3	3,1
$MnSO_4$ x $1H_2O$	8,45
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	5,3
KJ	0,415
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0,125
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0,0125
$CoCl_2$ x $6H_2O$	0,0125
MS Vitamin	1000 µ
Fe-EDTA	5000 µ
Pepton	250 mg
Sukroz	30 gr
Glukoz	2 gr
Myoinositol	0,05 gr
Gelrite	4 gr
pH	5,5 – 5,6

Gametofit safhasından sporofit safhasına geçen eksplantlar sürgün gelişimini teşvik etmek amacıyla çeşitli konsantasyonlarda BA (0, 0,5, 1 mgL^{-1}) ve KIN (0, 0,5, 1 mgL^{-1}) içeren ½ MS besi yerine aktarılmışlardır.

3.2.4. Histolojik analizler

Deneme sonucunda belirlenen en iyi konsantrasyonda histolojik analizler için tekrar bir deneme kurulmuştur. Analizler için örnekler çimlenmeden itibaren 3,4,5 ve 6. haftalarda alınmıştır.

3.2.4.1. Eksplantların Fiksasyon Solüsyonu İçerisine Alınması

Eksplantlar, ilk olarak hücresel gelişimlerinin incelenmesi amacıyla fiksasyon (FPA:formaldehit: propiyonik asit: alkol) (900 ml %70'lik alkol + 50 ml propiyonik asit +50 ml formaldehit) solüsyonu içerisine alınmıştır (Çizelge 4).

3.2.4.2.Örneklerin Parafin Bloklar İçine Alınması

Örnekler, parafin bloklar içerisine yerleştirilmeden önce sırasıyla %70, %85, %95, %100' lük Johansen çözeltisi içerisinde bekletilmiştir.

*In vitro'*dan alınmış ve FPA solüsyonu içerisinde bekletilmiş olan örnekler, her bir alkol serisinde yaklaşık 2 saat bekletilerek vakum altında 30-35 dakika süreyle havaları alınmıştır. Daha sonra, tersiyer butil alkol (TBA-1) sıvısı içerisinde 1 gece, TBA-2 ve TBA-3 sıvıları içerisinde 3'er saat bekletilmiş ve petri kapları içerisinde 60-65 ^{o}C'de eritilen sıvı parafin içerisine konulmuştur. Etüvde 60-65 ^{o}C'de 2-3 gün süreyle tutulduktan sonra, etüv dışına alınmış, buz üzerinde hızla soğumaya bırakılmış ve sertleşmesi sağlanmıştır.

3.2.4.3. Parafin Bloklar İçerisindeki Örneklerin Kesitlerinin Alınması

Örneklerin üzerindeki fazla parafin kesilip ayrıldıktan sonra, tahta bloklar üzerine yine parafin yardımı ile yapıştırılmıştır. Rotasyon mikrotom kullanılarak, tahta bloklar üzerine alınan örneklerden 8 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitlerin etiketleme işlemi, lamların kenarlarına yapılmıştır. Kesitlerin lamların üzerine yapışmasını sağlamak amacıyla daha önceden hazırlanmış olan 1:1 oranındaki yumurta akı:gliserin karışımından oluşan sıvı, lamların üzerine sürülmüştür. Daha sonra, örneklerden alınan kesitler lamlara yerleştirildikten sonra 35-40 ^{o}C sıcaklığındaki sıcak yüzey (hot plate) üzerine konulmuştur. Sıcak yüzey üzerindeki her bir lam'a bir damlalık yardımıyla saf su ilave edilmiştir.

Çizelge 3.6. Johansen Karışımları (Stösser ve ark., 1985)

Alkol Karışım Konsantrasyonları (%)	**Saf su (ml)**	**%96'lık Etil alkol (ml)**	**Tersiyer Bütil alkol (ml)**
%70	300	500	200
%85	100	500	350
%95	_	450	550
%100	_	200	800

3.2.4.4. Kesitlerden Alınan Örneklerin Boyanması

Lamlar, lam taşıyıcıları üzerine yerleştirilmiş ve 10'ar dk. ksilol-1, ksilol-2' de bekletilmiş, parafinin erimesi ve örneklerden ayrılması sağlanmıştır. Bu aşamada örnekler, ilk olarak izopropil alkol-1 ve izopropil alkol-2'de 5'er dk., daha sonra % 96'dan başlayarak sırasıyla % 70, % 40 ve % 20 olacak şekilde dereceleri azalan alkol küvetlerinde ve son olarak da saf su içerisinde 3'er dk. bekletilmiştir.

Bu işlemlerin sonunda örneklerin boyanması işlemine geçilmiştir. Boyama işlemi için hematoksilin boya çözeltisi kullanılmıştır. Hematoksilin boya çözeltisini hazırlamak için; 1 g hematoksilin, 6 ml etil alkol içerisinde eritilmiştir. Ayrıca, 12.5 g KAl_3SO_4 (potasyum alüminyum sülfat) 100 ml suda eritilip ve bu suya 0.18 g $KMnO_4$, 25 ml gliserin ve 25 ml metanol eklenmiş ve bundan sonra önceden eritilen hematoksilin ile karıştırılarak stok çözeltisi hazırlanmıştır. Örnekler, boyama sıvısı içerisinde 30 dk., daha sonra su dolu bir kap içerisinde hafif akan çeşme suyu altında 15 dk. bekletilmiştir.

Daha sonra boyanan örnekler başlangıçta izlenen alkol serilerinden ters yönde yeniden geçirilmiştir. Bu amaçla boyanan örnekler % 20, % 40, % 70, % 96'lık alkolde yine 3'er dk. ve izopropil alkolde 5'er dk. bekletilerek ayrı bir ksilol kabı içerisine alınmıştır. Ksilol kabı içerisinden alınan lamların üzerindeki ksilol iyice süzülmüş ve üzerlerine entellan yapıştırıcı damlatılarak birer lamel ile kapatılmıştır. Bu şekilde devamlı preperat haline getirilen örnekler, 30 ^{o}C'deki etüvde bekletilerek incelemeye hazır hale getirilmiştir (Eti, 1987).

3.2.4.5. İncelenen Kriterler ve Deneme Planı

Yapılan çalışmada, sporların canlılık ve çimlenme oranları, gametofitlerin yapısı, gametofitlerin sporofitlere dönüşümleri ve bitkicik elde etme oranları incelenmiştir. Deneme her konsantrasyonda 4 tekkürrür (4 petri), her tekerrüde 4 eksplant olacak şekilde faktöriyel düzende tesadüf blokları deneme desenine göre kurulmuştur. Elde edilen yüzde (%) değerlere açı transformasyonu yapıldıktan sonra SPSS 15.0 paket programı kullanılarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Asplenium scolopendrium, Asplenium septentrionale, Asplenium adiantum-nigrum L* ve *Asplenium trichomanes* Sporlarının Yüzey Sterilizasyonu

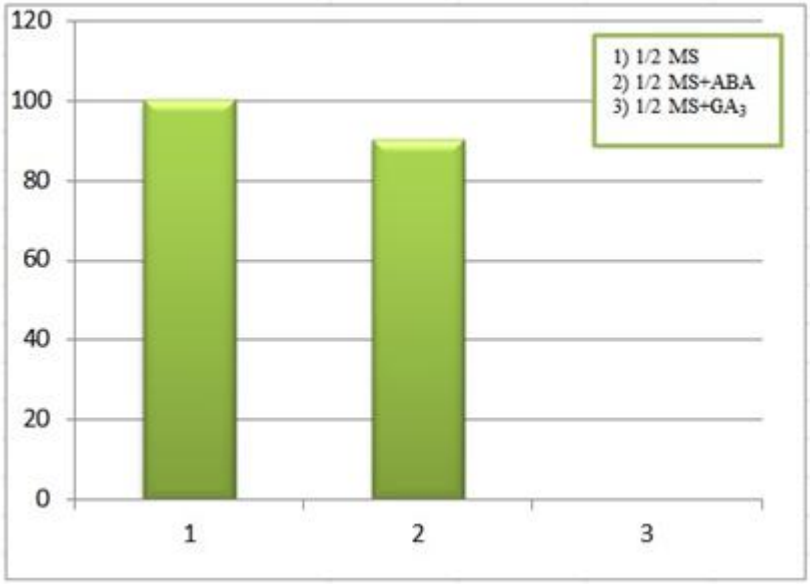
Yapılan çalışmada, *Asplenium scolopendrium* L. subsp.*scolopendrium* Antalya, Mersin ve Adana'dan, *Asplenium adiantum-nigrum* L. Mersin, Antalya ve Muğla'dan, *Asplenium trichomanes* L. sensu lato Balıkesir, Denizli ve Antalya'dan ve *Asplenium septentrionale* (L.) Hoffm. subsp.*septentrionale* Kütahya, Eskişehir ve Kayseri illerinden, TAGEM 13-ARGE 20 no'lu proje kapsamında üzerlerinde sporlarının bulunduğu uygun vejetasyon döneminde temin edilmiş ve Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Süs Bitkisi serasında 1:1 oranında torf ve perlit karışımı bulunan saksılarda kültüre alınmıştır.

Sporları üzerinde bulunduran yapraklar, yüzey sterilizasyonundan önce 1-5-10 gün aralıklarla filtre kağıtları veya kese kağıtları içerisinde 65 ^{0}C'de etüvde inkübe edilmiş ve sporların olgunlaşması sağlanmıştır. Etüvde bekletilen örnekler, steril kabin içerisine alındıktan sonra %70'lik EtOH'de 1-2 dk. bekletilmiş, sonra saf su ile yıkanmış, %10-15-20-25 ve 30'luk NaOCl içeren farklı yoğunluktaki çözeltilerde farklı zaman aralıklarında tutularak sterilizasyon tamamlanmış ve kontaminasyon problemi ile karşılaşılmamıştır. Bu nedenle sterilizasyonda farklı yöntemlere başvurulmamıştır.

4.2. *Asplenium scolopendrium, Asplenium adiantum-nigrum, Asplenium trichomanes* ve *Asplenium septentrionale* Türlerinde Çimlenme Bulguları

Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış olan *Asplenium scolopendrium, Asplenium adiantum-nigrum, Asplenium trichomanes* ve *Asplenium septentrionale* türleri, çimlendirilmek amacıyla bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½MS, farklı konsantrasyonlarda GA_3 (0, 0.5, 1 mgL^{-1}) içeren ½MS ve farklı konsantrasyonlarda ABA (1, 2, 3 mgL^{-1}) içeren ½ MS besiyerlerinde aydınlık ve karanlık olmak üzere iki farklı ortamda kültüre alınmış ve çimlendirme gerçekleştirilmiştir.

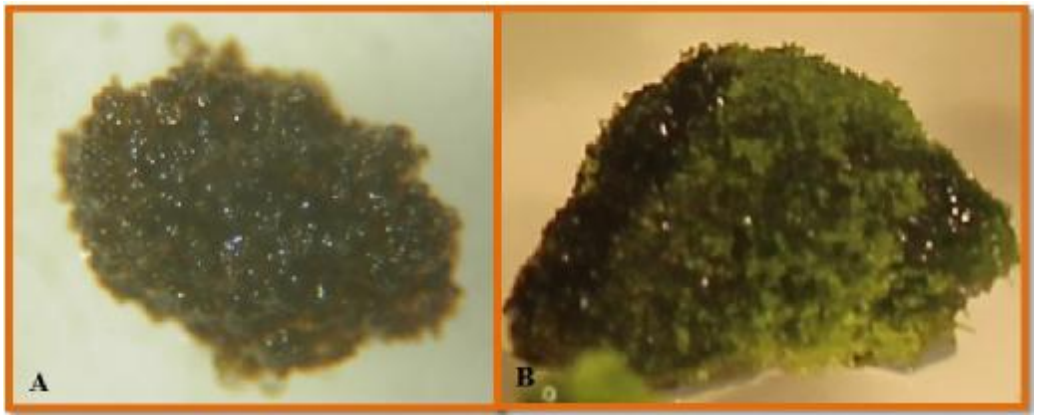
Yapılan çalışma sonucunda, farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerini içeren ortamlarda, çimlenme oranları istatistiksel olarak değişkenlik göstermiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Asplenium scolopendrium*'un % çimlenme oranları

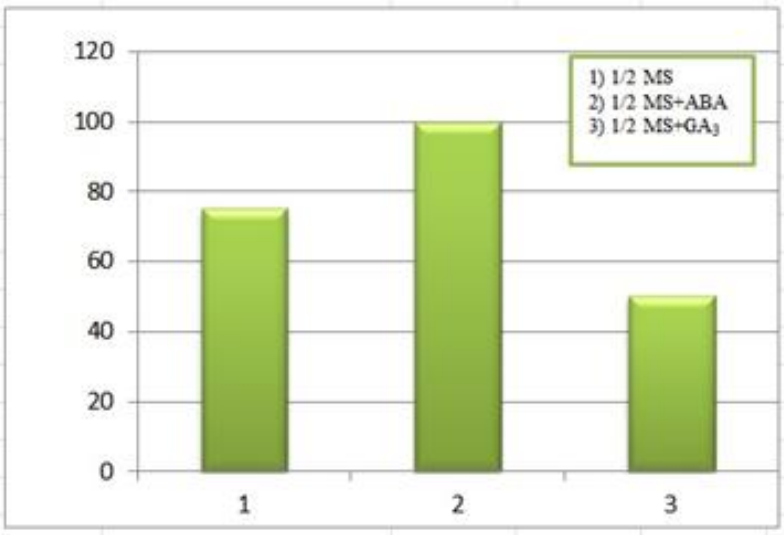
En yüksek çimlenme yüzdesi, aydınlık koşullardaki ortamda kültüre alınan ve bitki büyüme düzenleyicisi bulundurmayan ½MS besiyerindeki eksplantlardan %100 olarak sağlanmıştır. Başarı yüzdesi, 2.4 mgL^{-1} ABA ihtiva eden ½MS besi yerinde % 90 olarak saptanırken, 0.5 mgL^{-1} ve 1 mgL^{-1} GA_3 içeren ½MS besi yerinde çimlenme gerçekleşmemiştir (Şekil 4.1).

Yapılan ön denemeler sonucunda, 2.4 mgL^{-1} ABA içeren ½MS besi yerinde kültüre alınan *Asplenium scolopendrium* sporları 12 haftada çimlenirken, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½MS besi yerinde kültüre alınan sporlarda çimlenme 22 haftada gerçekleşmiştir. İlerleyen safhalarda, ABA içeren ortamlarda kültüre alınan sporların protal oluşumunun engellendiği saptanmış ve çimlenen sporların zamanla siyahlaşarak fonksiyonunu kaybettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



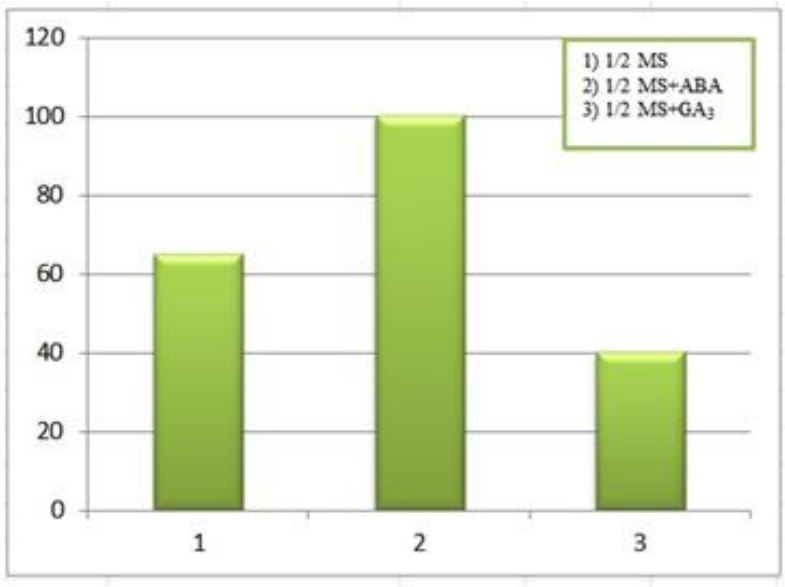
Şekil 4.2. A. Siyahlaşarak fonksiyonunu kaybeden sporlar; B. Çimlenen sporlar

Kültüre alınan *Asplenium adiantum-nigrum* sporlarında ise en iyi çimlenme yüzdesi, % 100 oranında ABA içeren ½MS besi yerinde aydınlık ortam koşullarında meydana gelmiş ve bu sürecin 6 hafta olduğu saptanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½MS besi yerinde, çimlenme yüzdesi % 75 iken, GA_3 bulunan ½MS besi yerinde çimlenme yüzdesi % 50 olarak saptanmıştır. Elde edilen istatistiksel değerler sonucunda, 2.4 mgL^{-1} ABA bulunan ½MS besi yerinde kültüre alınan sporların, diğer ortamlarda kültüre alınan sporlara kıyasla çok daha kısa bir sürede çimlendiği belirlenmiştir (Şekil 4.3).



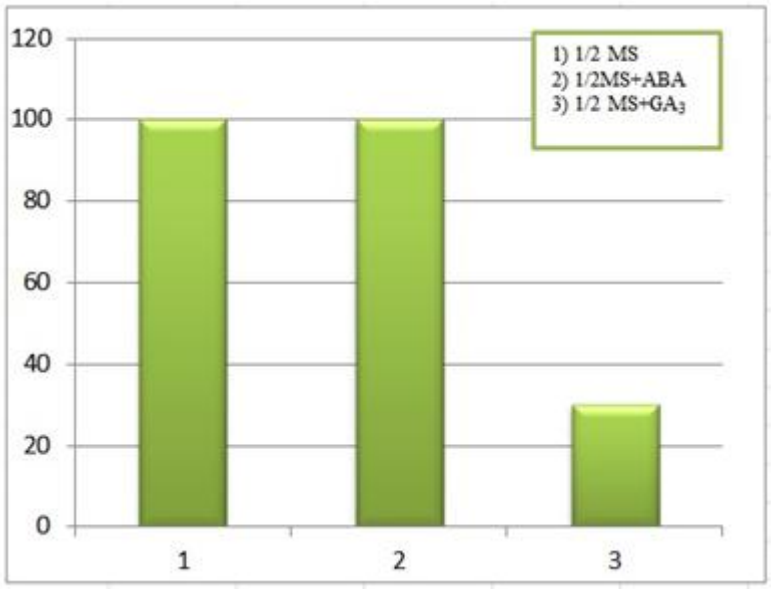
Şekil 4.3. *Asplenium adiantum-nigrum* % çimlenme oranları

Asplenium trichomanes türünde en iyi çimlenme oranı, 2.4 mgL^{-1} ABA içeren ½MS besi yerinde aydınlık ortam koşullarında %100 oranında elde edilmiş ve çimlenme 8 haftada gerçekleşmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi bulunmayan ½MS ortamında görülen çimlenme yüzdesi % 65 iken, 1 ve 2 mgL^{-1} GA_3 içeren ½MS besi yerinde bu değer % 30 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).

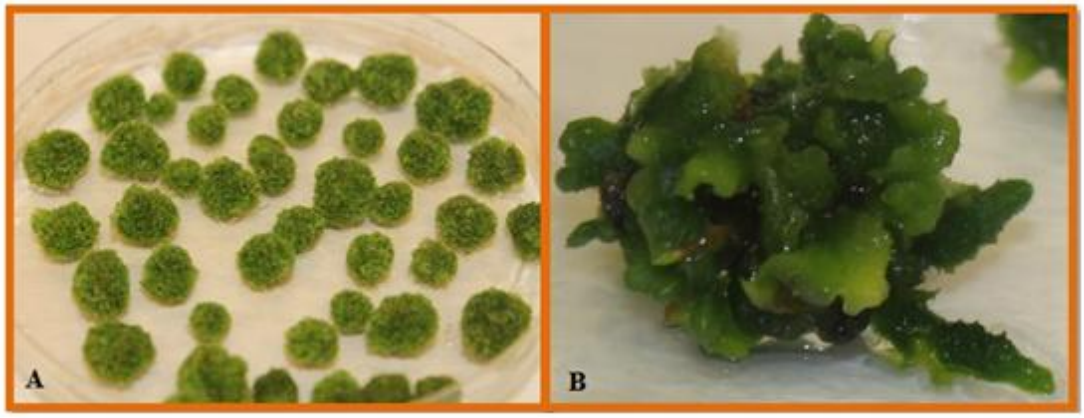


Şekil 4.4. *Asplenium trichomanes*'un % çimlenme oranları

Asplenium septentrionale en başarılı çimlenmenin, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½MS besi yerinde aydınlık ortam koşullarında %100 oranında meydana geldiği ve 7 haftada gerçekleştiği tespit edilmiştir. Buna karşılık, 2.4 mgL^{-1} ABA bulunan ½MS besi yerinde de %100 çimlenme gerçekleşirken, ilerleyen safhalarda protal oluşumu engellenerek farklılaşma gerçekleşmemiş ve bu nedenle çimlenmenin bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½MS besi yerinde yapılmasının daha etkili sonuç verdiği saptanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *Asplenium septentrionale* % çimlenme oranları



Şekil 4.6. A. Farklılaşmayan çimlenmiş sporlar; B. Çimlenme ve gametofit gelişimi sağlanan eksplantın farklılaşması

Abisisik asit (ABA) tohum ve tomurcuk dormansisisinin başlatılmasında ve sürdürülmesinde ve de özellikle su stresi olmak üzere strese karşı bitkilerin yanıtının düzenlenmesinde temel bir rol oynar. ABA, plastid içeren hücrelerin neredeyse tümünde sentezlenir hem ksilem hem de floem yoluyla taşınır. ABA üretmeyen embriyolarda erken çimlenme ve vivipari ortaya çıkabilir. ABA bitki gelişimini hem kısa dönemde hem de uzun dönemde denetlemektedir. Uzun süreli etkileri ABA'nın teşvik ettiği genin ifade olması ile denetlenmektedir. Aba su stresi ve tohum stresi sırasında GEB ailesi, proteazlar ve şaperoninler (ısı şoku proteinleri), iyon ve su

kanalları ve uyumlu çözünmüş madde metabolizması veya aktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunu katalize eden enzimler dahil çeşitli proteinlerin sentezini uyarmaktadır (Taiz ve Zeiger, 2008) ABA'nın bilinen görevlerinin aksine tez çalışmasında yapılan çimlendirme denemelerinde ABA kullanımı *Asplenium adiantum-nigrum* ve *Asplenium trichomanes* türlerinde süreci hızlandırmış ve gelişim evrelerinde herhangi bir negatif sonuç doğurmamıştır.

Shih ve ark (1982)'nın *Mohria caffrorum*'da eğrelti türünde yapmış oldukları çalışmada ABA'nın çimlenme üzerinde önemli bir etkisinin gözlenmediği fakat ilerleyen safhalarda gelişimi engellediğini saptamışlardır. Jarvis ve ark (1973) *Matteuccia struthiopteris* türünde yapmış oldukları çalışmada ise ABA'nın çimlenme üzerinde etisi olmadığını vurgulamışlardır. Elde edilen sonuçlar tez çalışması ile uyumludur.

Yapılan çalışma sonucunda *Asplenium adiantum-nigrum* ve *Asplenium trichomanes* türlerinde ABA olumlu katkıda bulunurken, *Asplenium scolopendrium* ve *Asplenium septentrionale* türlerinde farklılaşmayı engellemiştir.

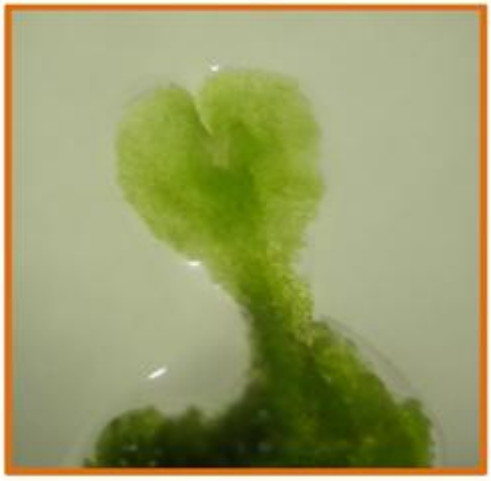
Çizelge 4.1. Türler arası çimlenme oranları

	Asplenium scolopendrium	***Asplenium adiantum nigrum***	***Asplenium trichomanes***	***Asplenium septentrionale***
1/2 MS HF	100.00 a (90.00)	75.00 bc (66.00)	65.00 cd (54.00)	100.00 a (90.00)
1/2 MS ABA	90.00 ab (78.00)	100.00 a (90.00)	100.00 a (90.00)	100.00 a (90.00)
1/2 MS GA_3	0.00 (0.00)	50.00 ef (45.00)	40.00 ef (36.00)	30.00 f (27.00)
Çimlenme : $LSD_{tür}$ = Ö.D.		**LSD_{ortam} = 8.6*** **		**$LSD_{tür*ortam}$ = 17.24*** **

Parantez içinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir. Ortalamlar arasındaki farklılıklar harflerle gösterilmiştir.
P<0.001***

4.3. *Asplenium scolopendrium, Asplenium septentrionale, Asplenium adiantum-nigrum* ve *Asplenium trichomanes* Türlerinde Protal yapısı ve Gametofit Gelişimi

Asplenium scolopendrium türünde çimlenmenin ardından 4 hafta içerisinde protal oluşumu başlamıştır (Şekil 4.7). Sporların çimlenerek oluşturduğu protal adı verilen opak, kalpsi yapı, ileride gametofitleri oluşturmak üzere farklılaşmıştır. Protal oluşumu tamamlanmış olan eksplantlar, gametofit gelişimini teşvik etmek amacıyla modifiye edilmiş ½MS besi yerine aktarılmıştır.

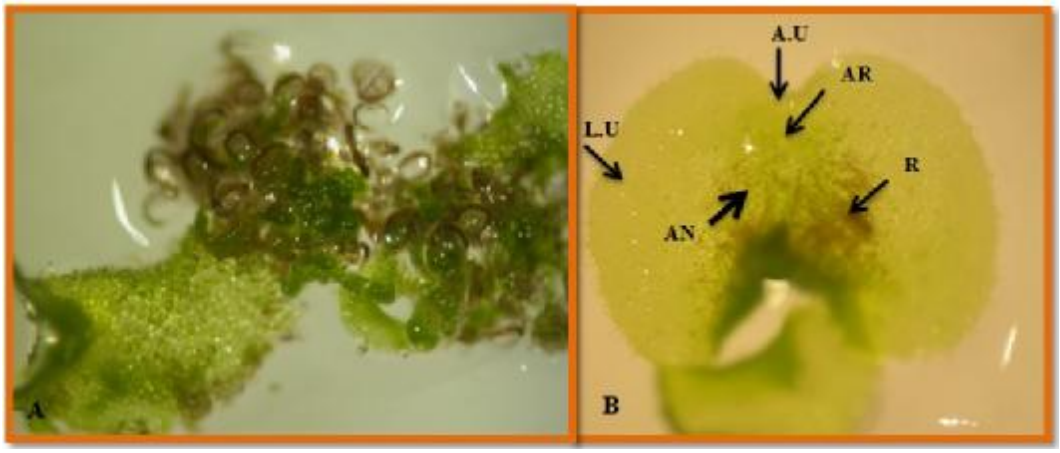


Şekil 4.7. *Asplenium scolopendrium* sporlarının çimlenmesi ile protal oluşumu

Asplenium adiantum-nigrum türünde çimlenen eksplantlar gametofit gelişimini sağlamak amacıyla bitki büyüme düzenleyici bulunmayan ½MS besi yerine aktarılmışlardır. Dört hafta sonra, eksplantların gametofit gelişiminin tamamlandığı gözlemlenmiştir.

Asplenium adiantum-nigrum sporlarının çimlenme süreci *Asplenium scolopendrium*'a kıyasla ABA bulunan ½MS besi ortamında hem daha hızlı bir

şekilde gerçekleşmiş hem de ilerleyen evrelerde farklılaşmayı mümkün kılacak şekilde gelişimi sağlayarak bu türde sporofite dönüşüm sürecini hızlandırmıştır.

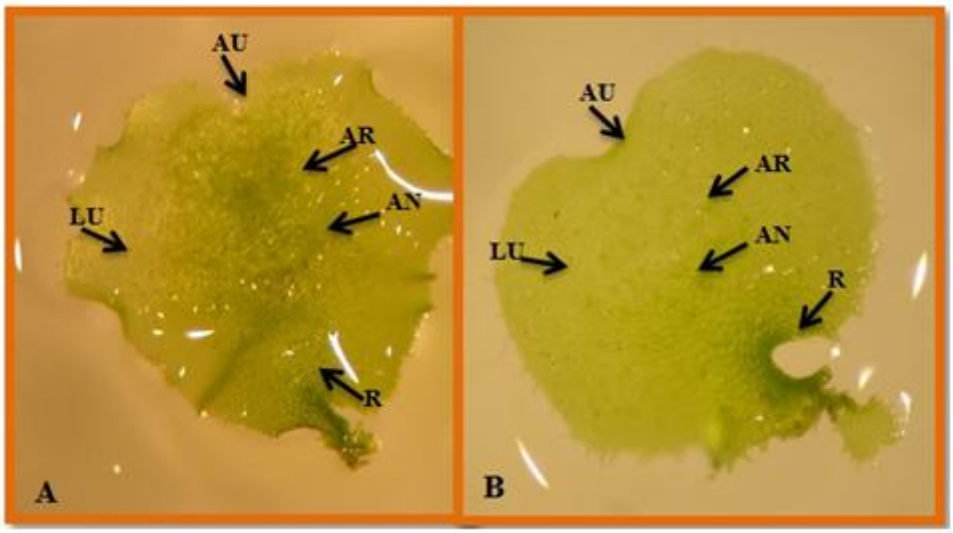


Şekil 4.8. A. Çimlenmenin başlaması; B. Apikal uç, Arkegonyum, Rizoid Anteridyum ve Lateral uç yapılarının görünümü (AU: Apikal uç, AR: Arkegonyum, R: Rizoid, AN: Anteridyum, LU: Lateral uç)

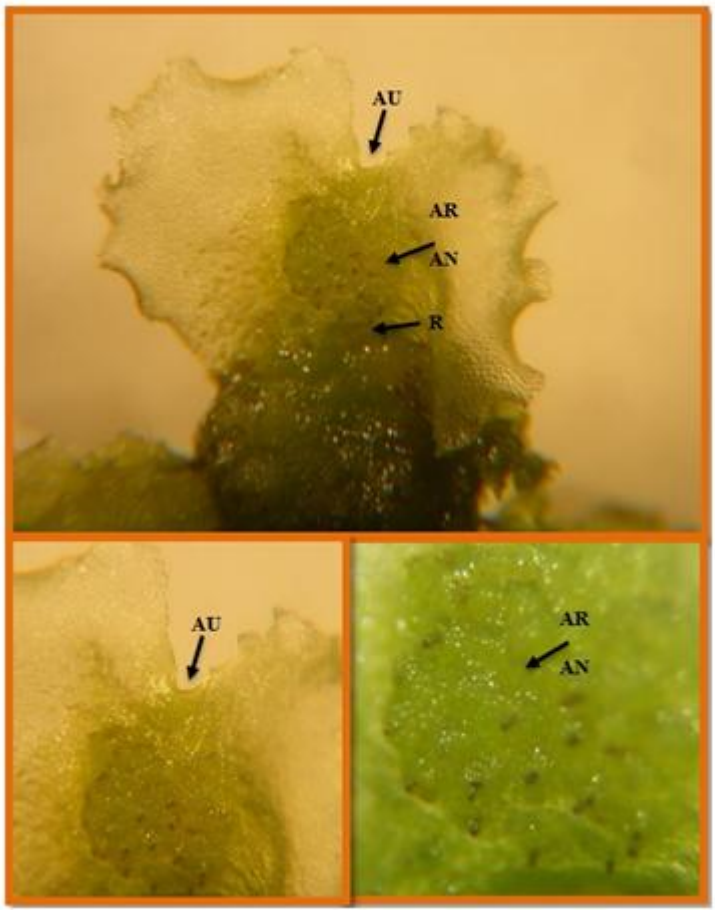
Meydana gelen protaller, tam bir kalp şeklinde, açık yeşil renkte ve şeffaf bir görünüme sahiptir. İlerleyen safhalarda uç meristemlerin aktivitesi ile erkek ve dişi organ oluşumu tamamlanmış ve sporofit oluşum sürecinde farklılaşma, kalpsi yapı olan protalin üzerinde gametlerin oluşmasıyla başlamıştır (Şekil 4.8).

Protalin meydana gelmesinin ardından, eksplantlar gametofit gelişimini sağlamak amacıyla bitki büyüme düzenleyicisi bulundurmayan ½MS besi yerinde kültüre alınmışlardır.

Asplenium trichomanes türünde çimlenen eksplantlar, bitki büyüme düzenleyicisi bulunmayan ½MS besi yerine aktarılmışlardır. Oluşan protallerin, *Asplenium adiantum-nigrum*'un protallerine çok büyük benzerlik göstermekle birlikte, açık yeşil, opak, sivri ve keskin hatlara sahip bir kalp şeklinde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9).

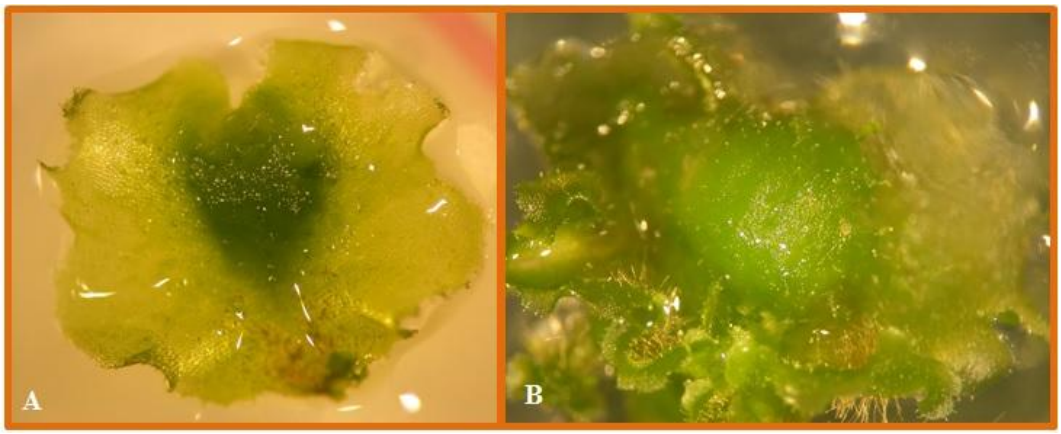


Şekil 4.9. A-B. *Asplenium trichomanes* ve *Asplenium adiantum-nigrum* protal yapısı (AU: Apikal uç, AR: Arkegonyum, AN: Anteridyum, R: Rizoid, LU: Lateral uç)



Şekil 4.10. *Asplenium trichomanes* türünde gametofit gelişimi (AU: Apikal uç, AR: Arkegonyum, AN: Anteridyum, R: Rizoid)

Asplenium septentrionale türünde ise, eksplantlar, gametofit gelişiminin teşvik edilmesi amacıyla çimlendirme besi ortamı olan bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½ MS'te alt kültüre alınmışlardır. Tüm türlerde protal oluşumu ve gametofit gelişimi çimlenmeden sonra ortalama 4 hafta olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.11. *Asplenium septentrionale* türünde protal oluşumu ve gametofit gelişimi

4.4. *Asplenium scolopendrium, Asplenium septentrionale, Asplenium adiantum-nigrum* ve *Asplenium trichomanes* Türlerinde Farklılaşma ve Sporofite Dönüşüm Bulguları

Asplenium scolopendrium, Asplenium septentrionale, Asplenium adiantum-nigrum L ve *Asplenium trichomanes* türlerinde anteridyum (erkek organ) ve arkegonyum (dişi organ) oluşumunun meydana gelmesiyle birlikte oluşan gametlerin döllenmesiyle, gametofit gelişimi tamamlanmış olan eksplantlar farklılaşma ortamlarına aktarılmışlardır.

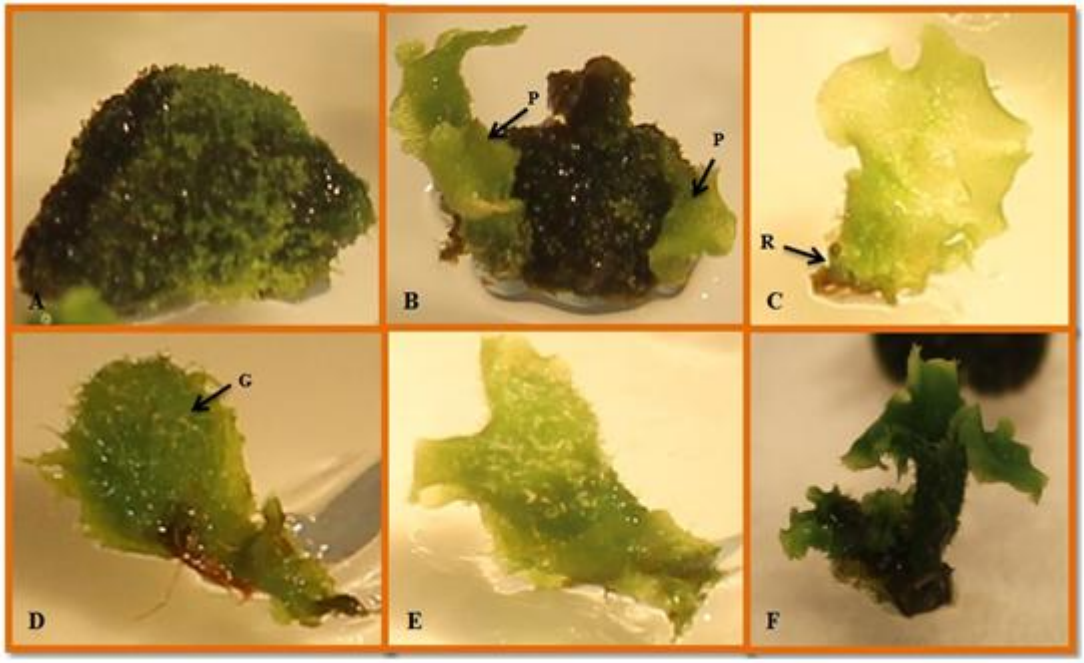
Asplenium scolopendrium türünde çimlenmenin çok uzun sürede gerçekleşmesi ve gametofit gelişiminin az olması nedeniyle çalışılan diğer eğrelti türlerinde en iyi sonucu veren konsantrasyonlar ve kombinasyonlar dikkate alınarak (NAA, KIN, IBA, BA) (0, 0.5, 1 mgL^{-1}) ½MS besi yerinde ±25 ^{0}C'de ve 16 saat fotoperyodisite gösteren büyütme odası koşullarında sporofit bitki gelişimini sağlamak amacıyla farklılaşma denemeleri kurulmuştur.

*Asplenium scolopendrium'*un farklılaşmasında en etkin konsantrasyonların 0.5 mgL^{-1} NAA + 1 mgL^{-1} KIN ve 1 mgL^{-1} IBA + 1 mgL^{-1} KIN kombinasyonlarından %100 oranında elde edildiği gözlenirken, aynı hormon kombinasyonlarının sporofit gelişimi üzerinde etkisi % 18.75 olarak saptanmıştır (Şekil 4.13).

En iyi farklılaşma; 1 mgL^{-1} NAA + 1 mgL^{-1} KIN (%87.5) ve 0.5 mgL^{-1} NAA + 0.5 mgL^{-1} KIN (%68.75), sporofite dönüşüm ise 0.5 mgL^{-1} NAA + 0.5 mgL^{-1} KIN (%12.50), 1 mgL^{-1} NAA + 1 mgL^{-1} KIN (%6.25) içeren ortamlardan elde edilmiştir.

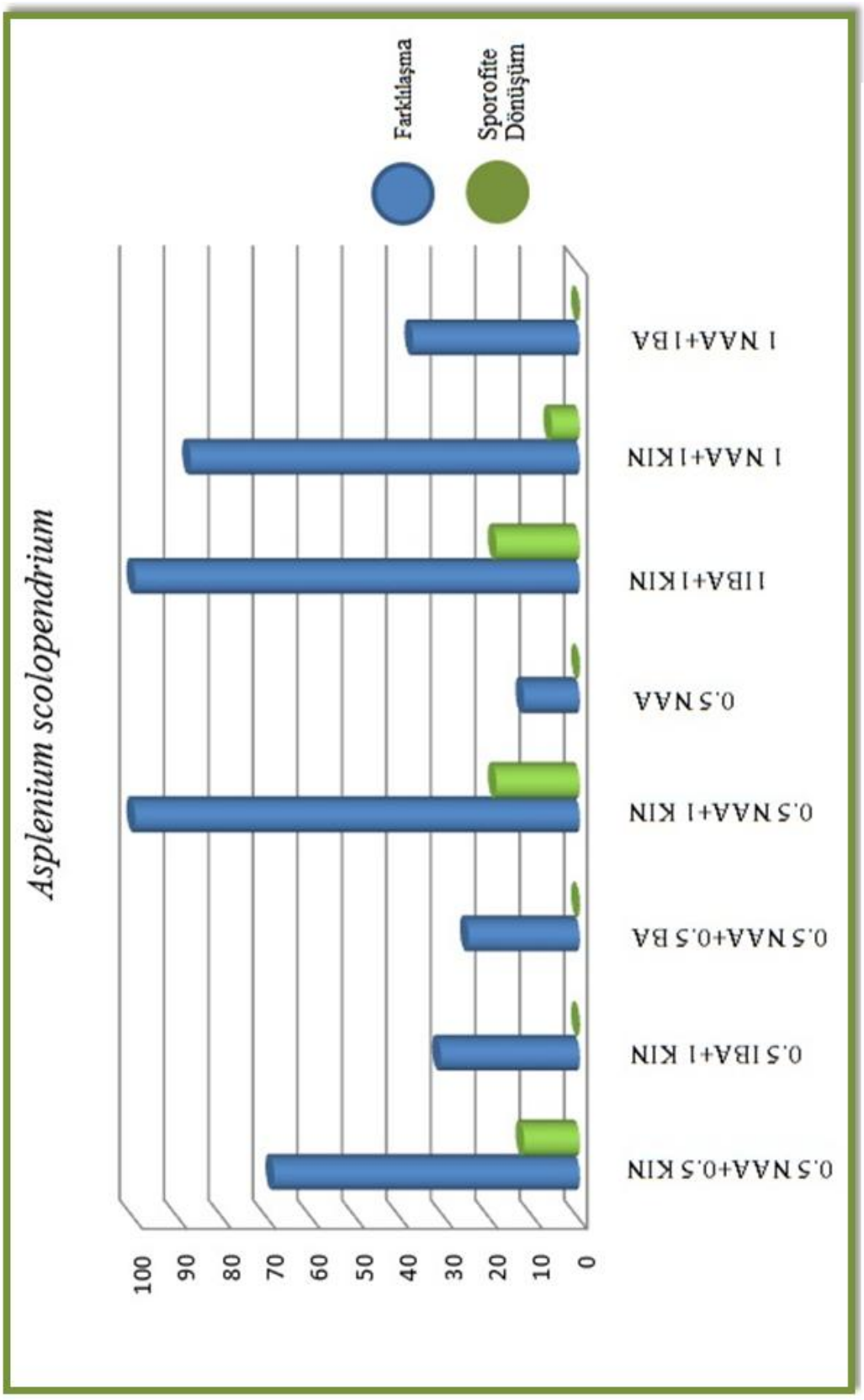
Çizelge 4.2. *Asplenium scolopendrium* türünde konsantrasyonlara göre farklılaşma ve sporofite dönüşüm oranları

Asplenium scolopendrium	**Konsantrasyonlar mgL^{-1}**	**Farklılaşma**	**Sporofite Dönüşüm**
1	0.5 NAA+0.5 KIN	68.75	12.50
2	0.5 IBA+1 KIN	31.25	0.00
3	0.5 NAA+0.5 BA	25.00	0.00
4	0.5 NAA+1 KIN	100.00	18.75
5	0.5 NAA	12.50	0.00
6	1IBA+1KIN	100.00	18.75
7	1 NAA+1KIN	87.50	6.25
8	1 NAA+1BA	37.50	0.00



Şekil 4.12. A. *Asplenium scolopendrium* sporlarının çimlenmesi; B. Çimlenen sporlardan protal oluşumu; C. Protal yapısı ve rizoid oluşumu; D-E. Döllenme ile gametofit gelişimi; F. Sporofit gelişimi (P: Protal, R: Rizoid, G: Gametofit)

Elde edilen veriler sonucunda, oksin olarak NAA kullanımının IBA'ya nazaran daha etkin sonuç verdiği saptanmıştır (Şekil 4.12). Kullanılan NAA miktarının iki katı oranında IBA kullanılması durumunda da, farklılaşma ve sporofite dönüşümde aynı sonuca ulaşılmıştır.



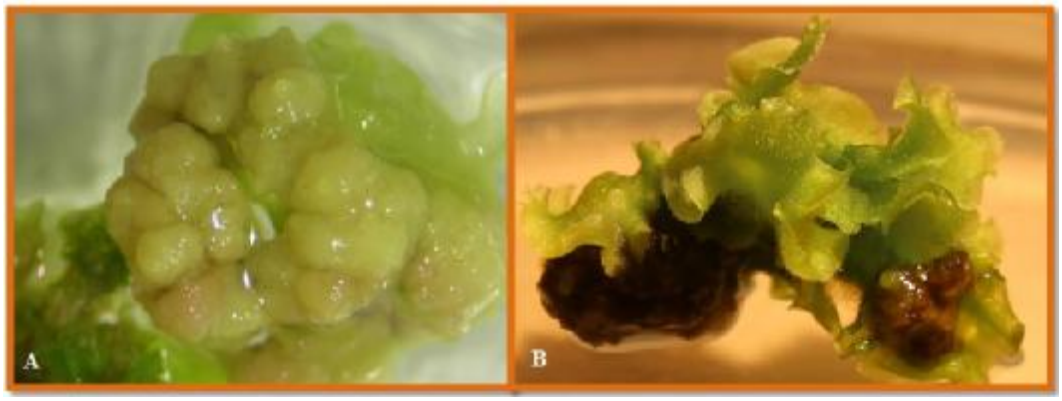
Şekil 4.13. *Asplenium scolopendrium* farklılaşma, kallus ve sporofite dönüşüm (%) grafiği

Asplenium adiantum-nigrum türünde yapılan gözlemlerde, farklılaşması tamamlanmış ve sporofit bitki gelişimi başlamış olan eksplantlardan en yüksek gelişim yüzdesi, % 93.75 ile 0.5 mgL^{-1} NAA içeren ½MS besi ortamından sağlanmıştır. Buna ek olarak, NAA (0.5, 1 mgL^{-1}) ve KIN (0.5, 1 mgL^{-1}) kombinasyonlarının bulunduğu besi ortamında da farklılaşma ve sporofit gelişimi saptanmış, fakat 0.5 mgL^{-1} NAA içeren besi ortamında bulunan eksplantların gelişiminin, olması gerekenden daha zayıf olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çalışılan 32 konsantrasyonun 30'unda farklılaşma gözlenirken, sadece 1 mgL^{-1} BA ve 0.5 mgL^{-1} IBA içeren konsantrasyonda gelişim gözlenmemiş ve eksplantlar sararark ölmüşlerdir. Bunun yanısıra diğer konsantrasyonlardan farklı olarak 0.5 mgL^{-1} IBA + 0.5 mgL^{-1} BA içeren konsantrasyonda, farklılaşma safhasında kallus oluşumu gözlenmiş ve sporofit evreye dönüşüm gerçekleşmiştir (Şekil 4.13).

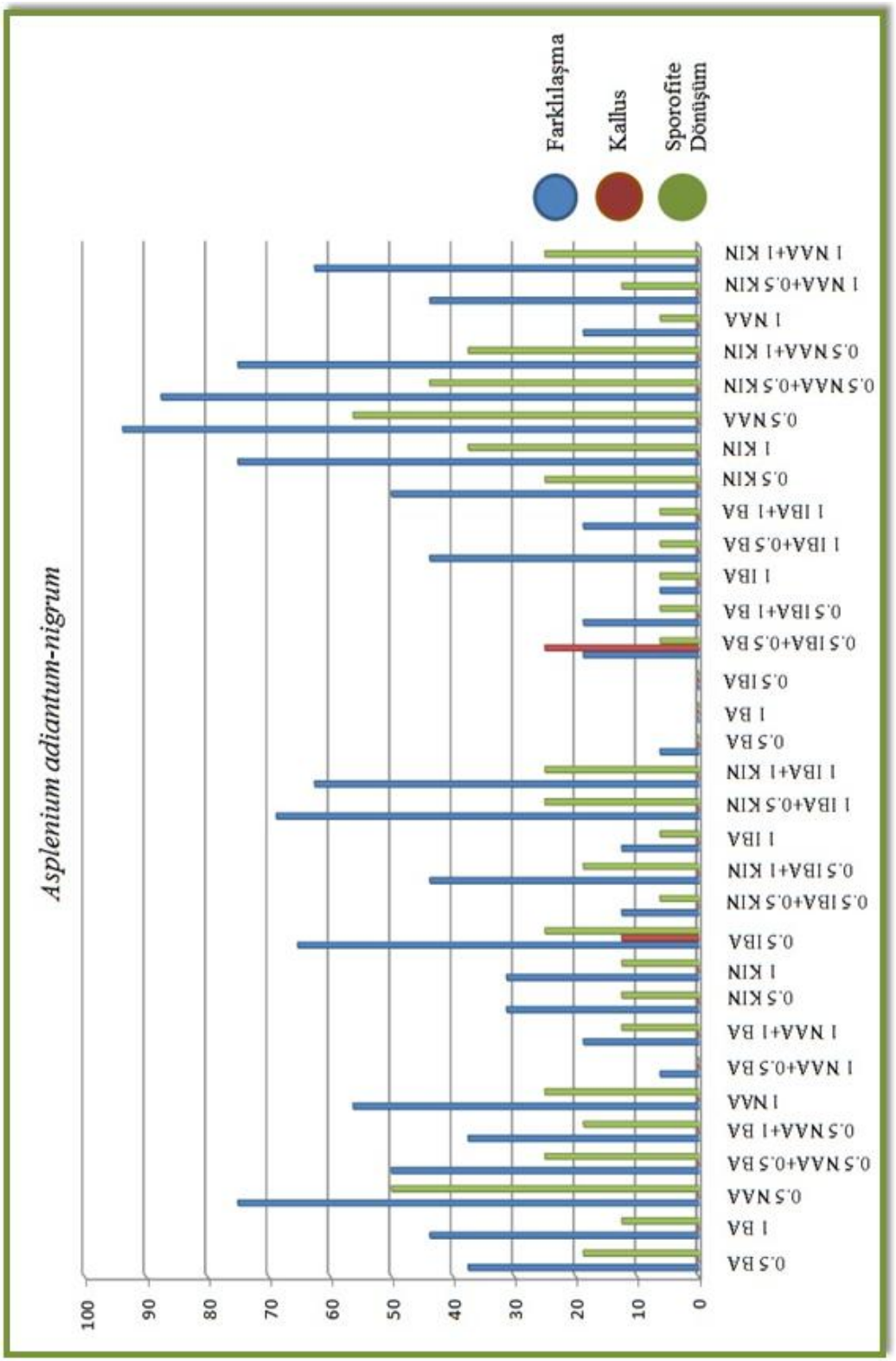
Çizelge 4.3. *Asplenium adiantum-nigrum* türünde konsantrasyonlara göre farklılaşma, kallus ve sporofite dönüşüm oranları

	Konsantrasyonlar (mg L^{-1})	**Farklılaşma (%)**	**Kallus (%)**	**Sporofite Dönüşüm (%)**
1	0.5 BA	37.50	0.00	18.75
2	1 BA	43.75	0.00	12.50
3	0.5 NAA	75.00	0.00	50.00
4	0.5 NAA+0.5 BA	50.00	0.00	25.00
5	0.5 NAA+1 BA	37.50	0.00	18.75
6	1 NAA	56.25	0.00	25.00
7	1 NAA+0.5 BA	6.25	0.00	0.00
8	1 NAA+1 BA	18.75	0.00	12.50
9	0.5 KIN	31.25	0.00	12.50
10	1 KIN	31.25	0.00	12.50
11	0.5 IBA	65.25	12.50	25.00
12	0.5 IBA+0.5 KIN	12.50	0.00	6.25
13	0.5 IBA+1 KIN	43.75	0.00	18.75
14	1 IBA	12.50	0.00	6.25
15	1 IBA+0.5 KIN	68.75	0.00	25.00
16	1 IBA+1 KIN	62.50	0.00	25.00
17	0.5 BA	6.25	0.00	0.00
18	1 BA	0.00	0.00	0.00
19	0.5 IBA	0.00	0.00	0.00
20	0.5 IBA+0.5 BA	18.75	25.00	6.25
21	0.5 IBA+1 BA	18.75	0.00	6.25
22	1 IBA	6.25	0.00	6.25
23	1 IBA+0.5 BA	43.75	0.00	6.25
24	1 IBA+1 BA	18.75	0.00	6.25
25	0.5 KIN	50.00	0.00	25.00
26	1 KIN	75.00	0.00	37.50
27	0.5 NAA	93.75	0.00	56.25
28	0.5 NAA+0.5 KIN	87.50	0.00	43.75
29	0.5 NAA+1 KIN	75.00	0.00	37.50
30	1 NAA	18.75	0.00	6.25
31	1 NAA+0.5 KIN	43.75	0.00	12.50
32	1 NAA+1 KIN	62.50	0.00	25.00



Şekil 4.14. A. Farklılaşma safhasında kallus oluşumu; B. Kallustan bitki gelişimi

En yüksek sporofite dönüşüm yüzdesi, % 56.25 ile 0.5 mgL^{-1} NAA içeren konsantrasyondan saptanmıştır. Farklılaşma ve sporofite dönüşüm yüzdelerinin doğru orantılı olarak gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Çalışılan 32 konsantrasyonun 28'inde, sporofite dönüşüm gerçekleşmiştir.1 mgL^{-1} NAA + 0.5 mgL^{-1} BA, 0.5 mg L^{-1} BA, 1 mgL^{-1} BA ve 0.5 mgL^{-1} IBA içeren konsantrasyonlardaki eksplantların farklılaşarak gelişim gösterdiği, fakat sporofite dönüşmediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.15. *Asplenium adiantum-nigrum* farklılaşma, kallus ve sporofite dönüşüm %

Konsantrasyon denemeleri sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda, NAA kullanımı IBA'ya nazaran daha etkin bulunmuştur. Besi ortamında yalnızca NAA kullanımının sporofite dönüşümü hızlandırarak sürgün gelişiminde etkili olduğu saptanmıştır. NAA'ya kombine olarak KIN kullanımı, farklılaşma ile birlikte sporofit gelişimini teşvik ederken, artan konsantrasyonlarda NAA ve KIN kullanımının gelişimi sınırladığı belirlenmiştir (Şekil 4.15).

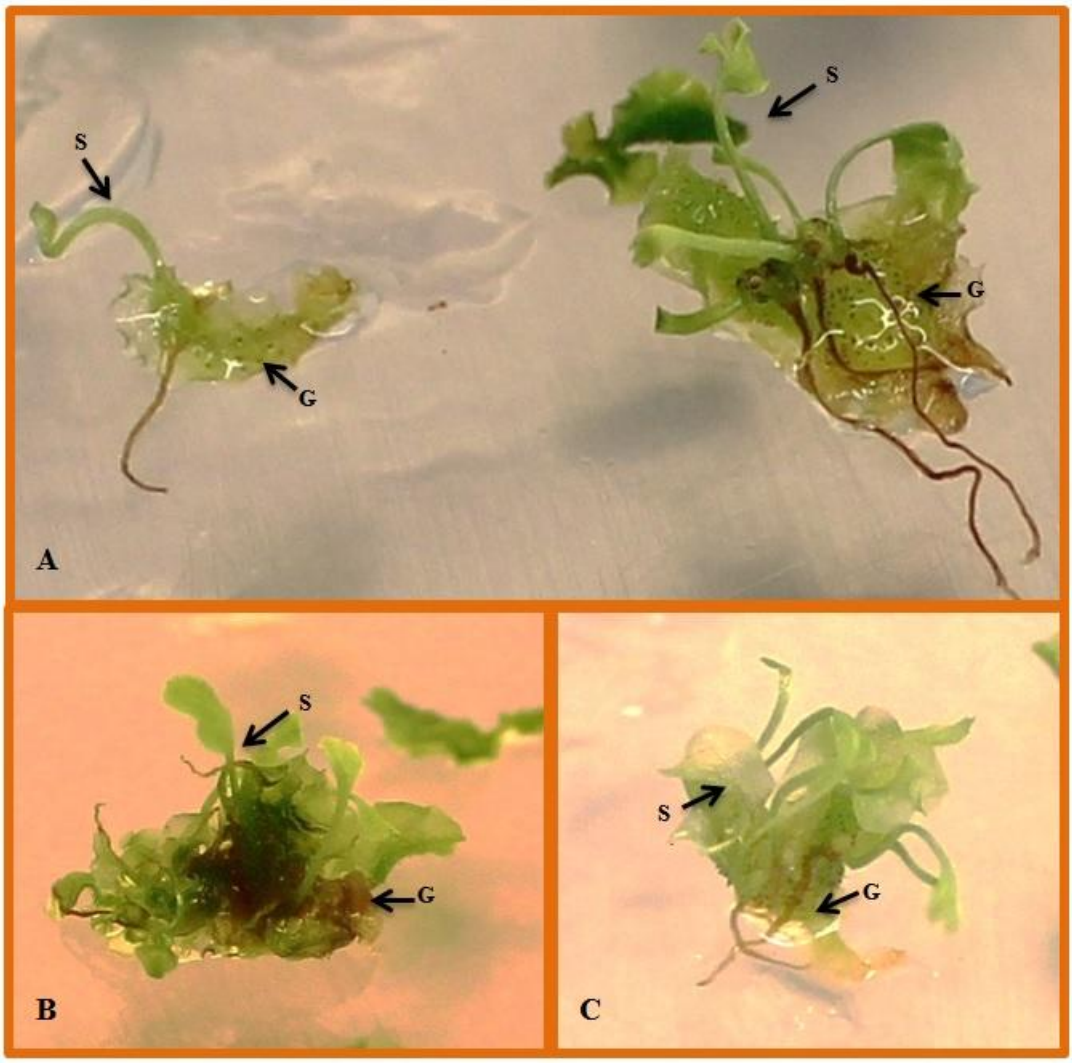
Soare (2008), kültüre alınan *Pteridophyta* bölümüne ait eğrelti türlerinde sporofit ve gametofit farklılaşmasındaki değişimlerin, besiyeri ile olan ilişkisini araştırmıştır. Ortamda agar kullanımının daha geniş kolonilerin oluşumunda fiziksel olarak destek sağladığını belirtmiştir. Tez çalışmasında ise agar yerine gelrite kullanılmıştır. Gelrite'ın agar'a kıyasla fiziksel anlamda daha serbest bir yapısı olması nedeniyle eksplantların konformasyonunda gelişimi teşvik edici olduğu saptanmıştır.

Ludwik ve ark. (2008), kayalıklarda yetişen ve nesli tükenmekte olan eğrelti türü olan *Asplenium adulterinum* üzerinde çalışmışlardır. Araştırıcılar, son zamanlarda geliştirilen *in vitro* çoğaltım ve *ex sitü* koruma metodlarının nesli tükenmekte olan popülasyonların gen bankalarını oluşturmaya imkan tanıdığını belirtmişlerdir. Yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında, farklı konsantrasyonlarda sakkaroz ve agarın gelişim üzerine etkilerini incelemişlerdir. En etkin çimlenmenin, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½MS ortamında, sporofit oluşumu için en etkili ortamın ise, 1 mgL^{-1} KIN ve 0.1 mgL^{-1} NAA içeren ½MS besi yerinde olduğunu saptamışlardır. Tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular, Ludwik ve ark. tarafından elde edilen bulgular ile korelasyon göstermektedir. Tez çalışmasında da en etkin çimlenme, *Asplenium scolopendrium* ve *Asplenium septentrionale* türlerinde bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½MS ortamında gerçekleşirken, sporofit oluşumu için özellikle *Asplenium adianum-nigrum* türünde NAA ve KIN kombinasyonlarının gelişimde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Bu da tür ve genotip farklılığının önemini açıkça vurgulamaktadır.

Khan ve ark. (2008), geleneksel yöntemler ile üretilmesi zor olan *Asplenium nidus*'un mikroçoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. *Asplenium nidus*'un çoğaltımında başlangıç materyali olarak sporlar kullanılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda, en

iyi sterilizasyon protokolünün, %20'lik NaOCl ve buna ek olarak birkaç damla tween 20 kullanımı ile sağlandığını belirtmişlerdir. Eksplantlar , ±25 ^{0}C ½MS besiyerinde kültüre alınmış, 12 hafta sonrasında sporlar çimlenmiş ve protal formasyonu saptanmıştır. Çimlenmenin ardından kültürler, 4 haftada bir alt kültüre alınmışlardır. Protaller, içerisinde BAP (1-4 mgL^{-1}) ve NAA (0.1-0.5 mgL^{1}) bulunan ½MS besiyerine aktarılmış ve çoğaltımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Farklılaşma ortamına alınan eksplantlarda maksimum sürgün sayısı, içerisinde NAA ve BAP'a ek olarak NaH_2PO_4 bulunan ½MS besi yerinde saptanmıştır. MS besi yerine NaH_2PO_4 ilavesinin, gametofitik safhadan sporofitik safhaya geçişte önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Tez çalışmasında herhangi bir sterilizasyon problemi yaşanmaması nedeniyle Tween 20 kullanımına ihtiyaç duyulmamıştır. Çimlenme optimizasyonu için yapılan ön denemeler sonucunda, kullanılan eğrelti türlerinin karanlık ortamda çimlenmediği belirlenmiştir. Türler arasında farklılık görülmekle birlikte farklılaşma safhasında oksin olarak NAA ve IBA kullanılmış ve IBA'in NAA'e kıyasla daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır. Sitokinin olarak da KIN kullanımının BA'e nazaran daha etkili olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.3)

Bunun yanısıra ABA ile çimlenmesi gerçekleştirilen ve bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½MS besi yerinde kontrol amacıyla gelişimi takip edilen eksplantlarda da sporofite dönüşüm gözlenmiştir (Şekil 4.16).

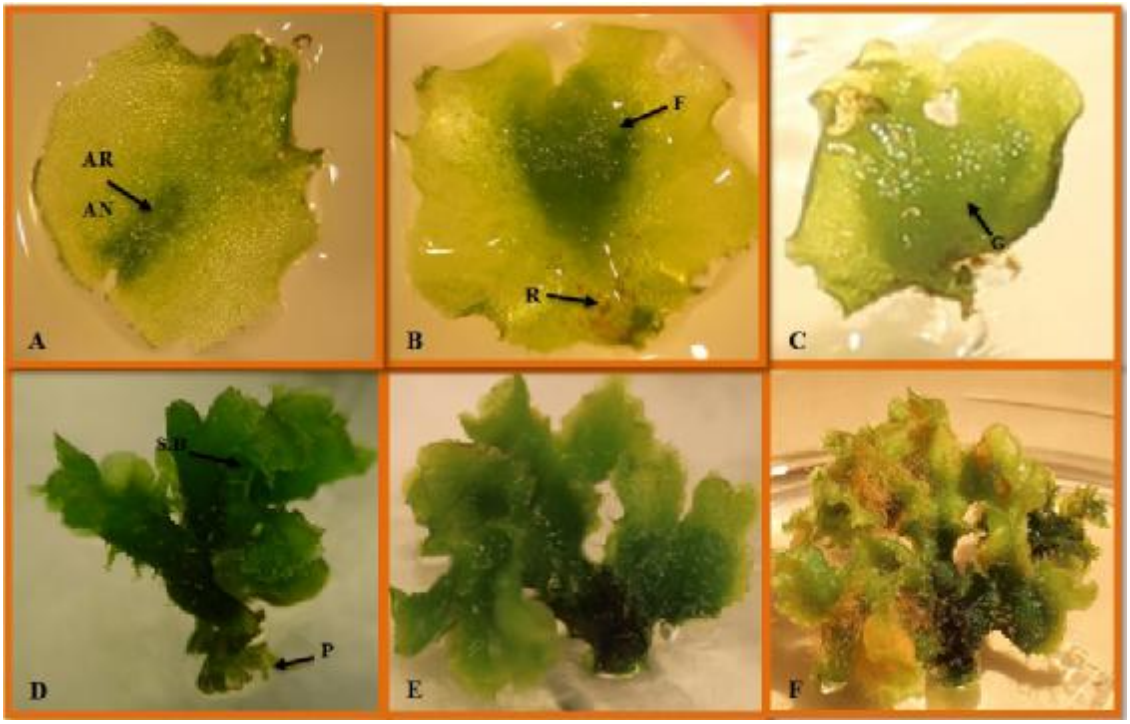


Şekil 4.16. A-B-C. *Asplenium adiantum-nigrum* türünde gametofit ve sporofit bitki yapısı (G: Gametofit, S: Sporofit)

Morini (2000), *Osmundo regalis* türünde, *in vitro* rejenerasyon ve mikroçoğaltım koşullarını optimize etmek amacıyla çalışmalar yapmıştır. Sporlar, gametofit ve sporofit elde etmek amacıyla olgun bitkiden alınarak, Hoagland ve Arnon besiyerinde kültüre alınmışlardır. Hormon bulunmayan besi yerinde sporofitler normal gelişim göstermiştir. Yüksek oranda çimlenmenin gözlendiği besi yerinde bulunan sporların, yine aynı besi yerinde farklılaşarak geliştikleri belirtilmiştir.

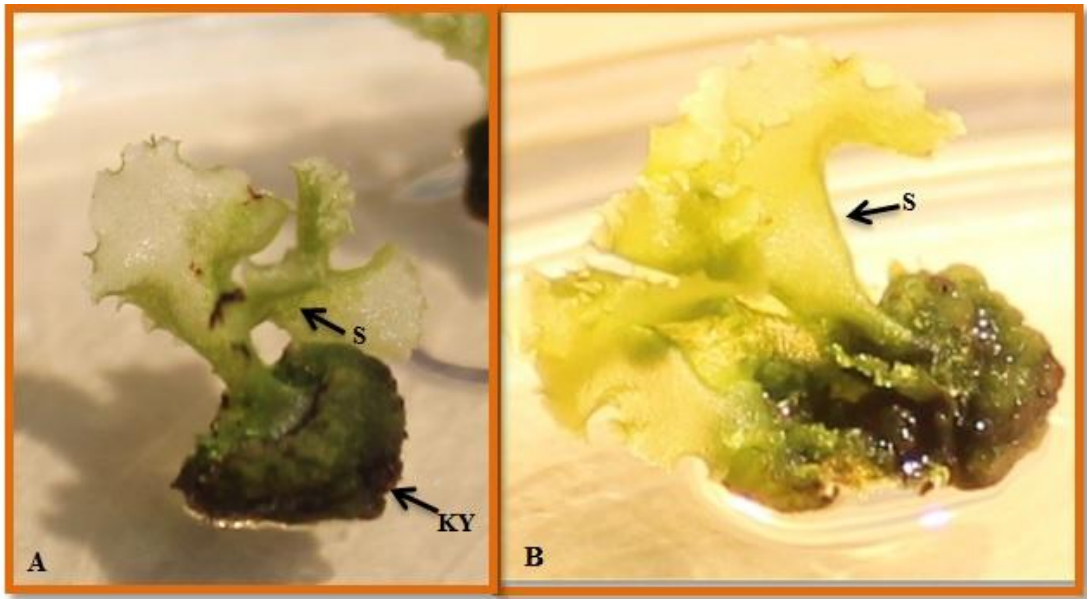
Tez çalışmasında kullanılan *Asplenium adiantum-nigrum* eğrelti türünde de kontrol amacıyla çimlenmenin ardından farklılaşma besi yerine alınmayıp aynı besi

ortamında gelişimi gözlenen eksplantların, farklılaşarak geliştikleri gözlenmiştir. Tez çalışması sonucunda elde edilen sonuçlar Morini ve ark.'nın bulguları ile paralellik göstermektedir.



Şekil 4.17. A. *Asplenium adiantum-nigrum* türünde protal yapısı, Arkegonyum ve Anteridyum oluşumu; B. Gametlerin gelişimi, fertilizasyon ve rizoid oluşumu; C. Gametofit gelişimi; D. Gametofitik evreden sporofitik evreye geçiş; E-F. Sporofit bitki (AR: Arkegonyum, AN: Anteridyum, F: Fertilizasyon, G: Gametofit, R: Rizoid)

Asplenium trichomanes türünde yapılan farklılaşma gözlemleri sonucunda ise, gametofitlerin farklılaşarak sporofitlere dönüşüm evresinde diğer türlerden farklı olarak bu türde kompakt ve sert bir yapı oluşumu gözlenmiş ve sporofitlerin bu yapılardan meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. A-B. *Asplenium trichomanes* türünde farklılaşma evreleri, kompakt yapı üzerinden sporofitik evreye geçiş (S: Sporofitik yaprak, KY: Kompakt yapı)

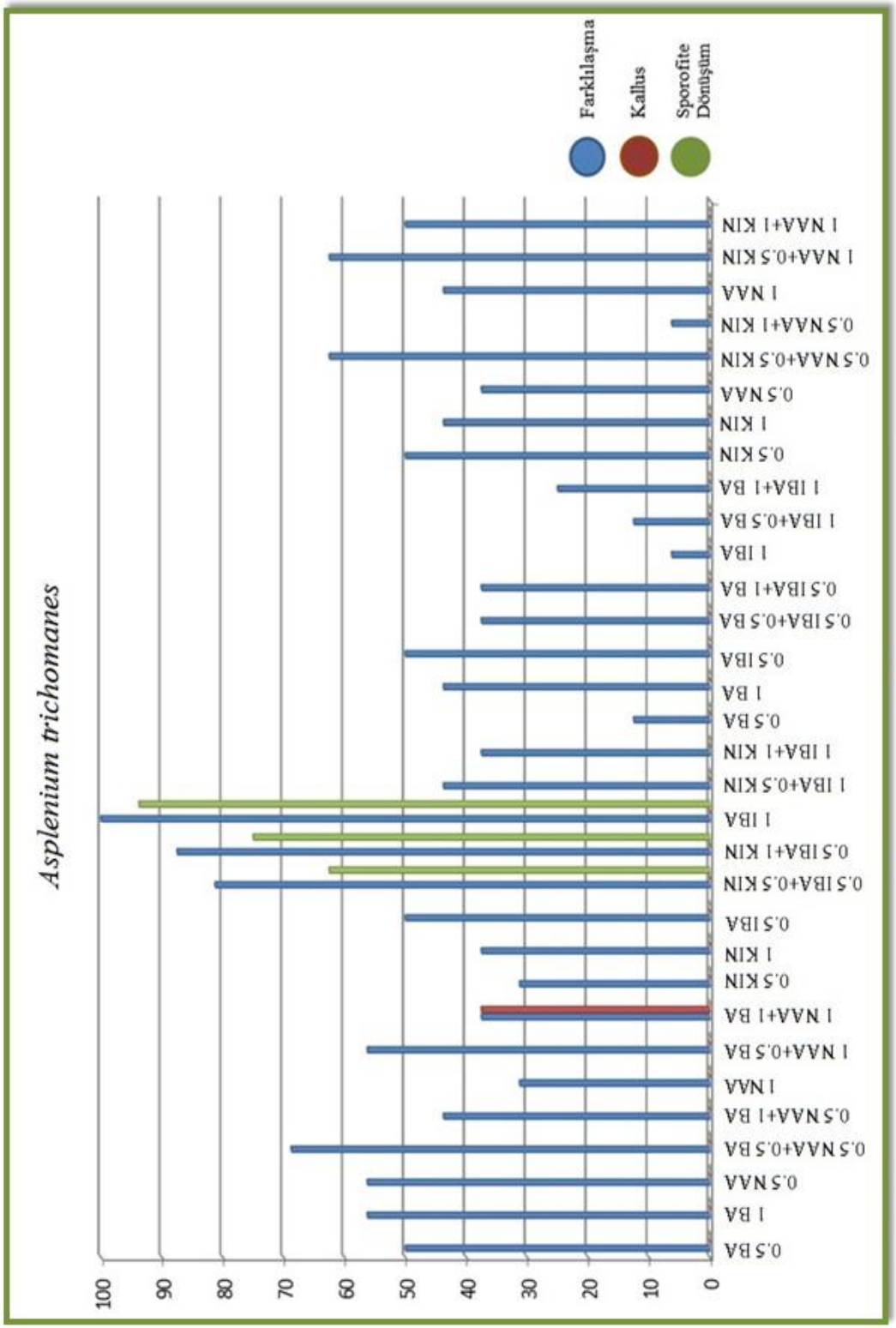
En yüksek farklılaşmanın, 1 mgL^{-1} IBA içeren ½MS besi yerinde %100 oranında meydana geldiği belirlenmiş, buna ek olarak 0.5 mgL^{-1} IBA + 0.5 mgL^{-1} KIN ve 0.5 mgL^{-1} IBA + 1 mgL^{-1} KIN kombinasyonlarının da sporofit gelişimlerinde önemli rol oynadığı saptanmıştır. Yapılan gözlemler sonucunda, tüm konsantrasyonlarda farklılaşma tespit edilmiştir. 1mgL^{-1} NAA + 1mgL^{-1} BA içeren konsantrasyonda % 37.50 oranında kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Sporofite dönüşüm yüzdeleri, yine farklılaşma yüzdeleri ile doğru orantılı olarak % 93.75 ile 1 mgL^{-1} IBA içeren ½MS besi yerinden saptanırken, bunu % 75 ile 0.5 mgL^{-1} IBA + 1 mgL^{-1} KIN ve % 62.50 ile 0.5 mgL^{-1} IBA + 0.5 mgL^{-1} KIN içeren besi ortamları takip etmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *Asplenium trichomanes'*in konsantrasyonlara göre farklılaşma, kallus ve sporofite dönüşüm oranı

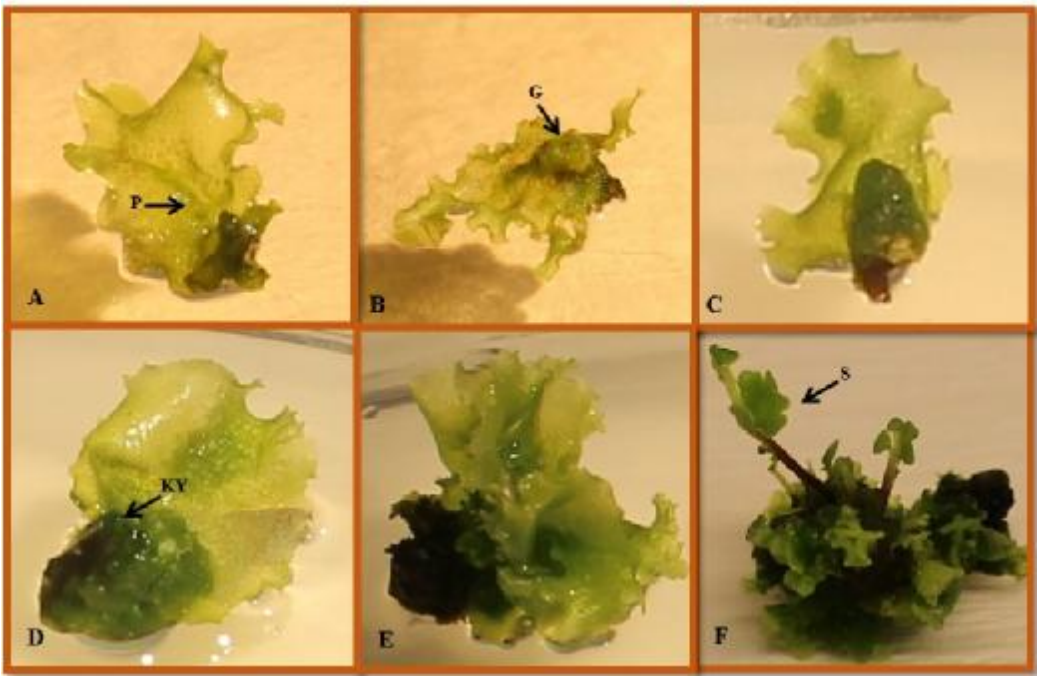
	Konsantrasyonlar (mg L^{-1})	Farklılaşma (%)	Kallus (%)	Sporofite Dönüşüm (%)
1	0.5 BA	50.00	0.00	0.00
2	1 BA	56.25	0.00	0.00
3	0.5 NAA	56.25	0.00	0.00
4	0.5 NAA+0.5 BA	68.75	0.00	0.00
5	0.5 NAA+1 BA	43.75	0.00	0.00
6	1 NAA	31.25	0.00	0.00
7	1 NAA+0.5 BA	56.25	0.00	0.00
8	1 NAA+1 BA	37.50	37.50	0.00
9	0.5 KIN	31.25	0.00	0.00
10	1 KIN	37.50	0.00	0.00
11	0.5 IBA	50.00	0.00	0.00
12	0.5 IBA+0.5 KIN	81.25	0.00	62.50
13	0.5 IBA+1 KIN	87.50	0.00	75.00
14	1 IBA	100.00	0.00	93.75
15	1 IBA+0.5 KIN	43.75	0.00	0.00
16	1 IBA+1 KIN	37.50	0.00	0.00
17	0.5 BA	12.50	0.00	0.00
18	1 BA	43.75	0.00	0.00
19	0.5 IBA	50.00	0.00	0.00
20	0.5 IBA+0.5 BA	37.50	0.00	0.00
21	0.5 IBA+1 BA	37.50	0.00	0.00
22	1 IBA	6.25	0.00	0.00
23	1 IBA+0.5 BA	12.50	0.00	0.00
24	1 IBA+1 BA	25.00	0.00	0.00
25	0.5 KIN	50.00	0.00	0.00
26	1 KIN	43.75	0.00	0.00
27	0.5 NAA	37.50	0.00	0.00
28	0.5 NAA+0.5 KIN	62.50	0.00	0.00
29	0.5 NAA+1 KIN	6.25	0.00	0.00
30	1 NAA	43.75	0.00	0.00
31	1 NAA+0.5 KIN	62.50	0.00	0.00
32	1 NAA+1 KIN	50.00	0.00	0.00

Asplenium trichomanes türünde, *Asplenium adiantum-nigrum* türünde olduğu gibi besi ortamında yalnızca oksin bulunması durumunda farklılaşma ve sporofite dönüşüm en etkili şekilde gerçekleşmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinden IBA'nın kullanımı, bu türde farklılaşmanın önemli bir basamağı olan sert kompakt yapı oluşumu ve gelişiminin teşvik edilmesi açısından etkili olmuştur.

Besi ortamında IBA'ya kombine olarak KIN kullanımının da farklılaşma ve sporofit gelişimine katkıda bulunduğu gözlenmiş, fakat bu kombinasyonun artan konsantrasyonlarında gelişim sınırlanmıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. *Asplenium trichomanes* farklılaşma, kallus ve sporofite dönüşüm % grafiği



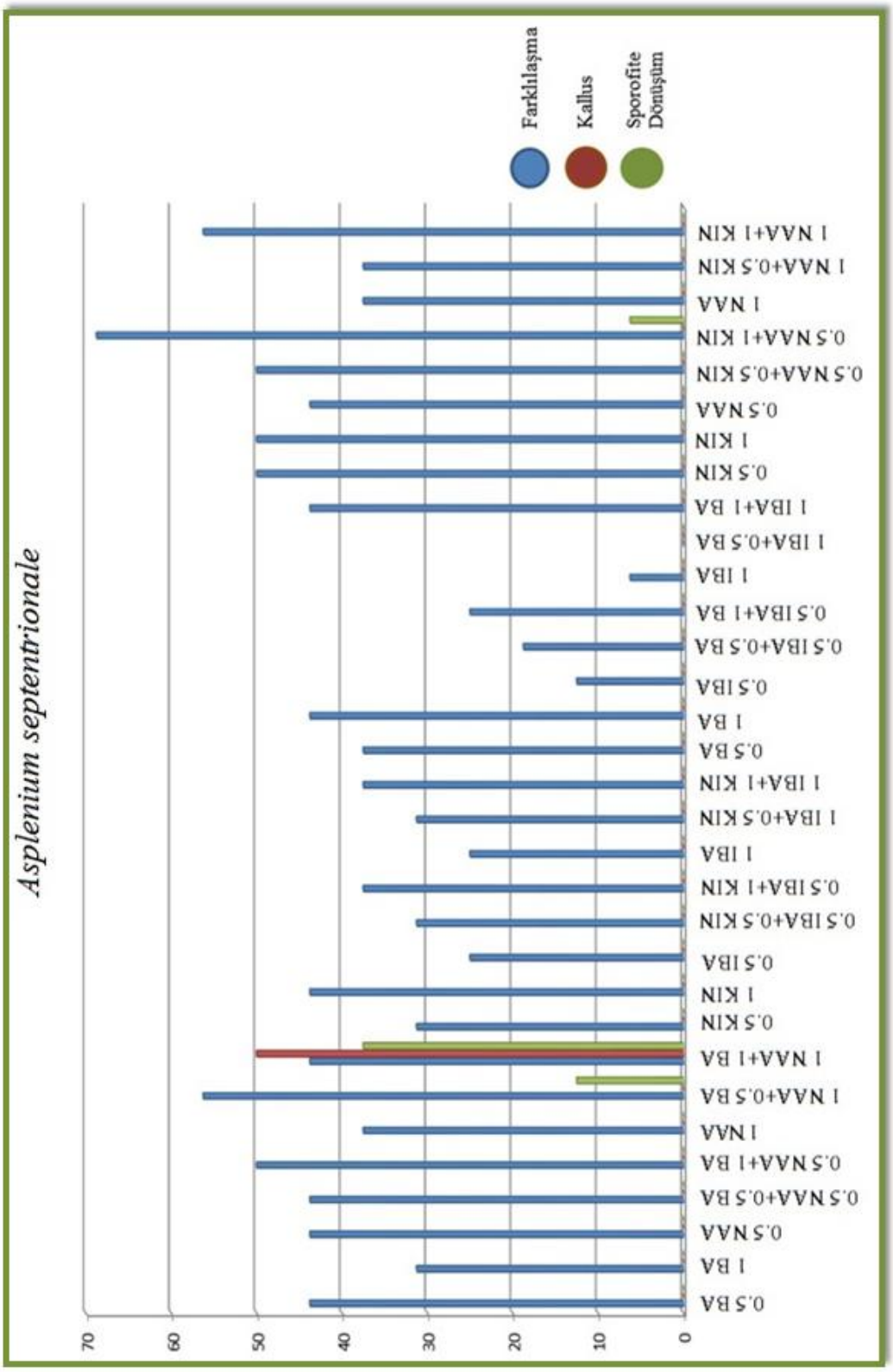
Şekil 4.20. A. Protal oluşumu; B-C. Gametofit gelişimi; D. Kompakt yapı oluşumu; E. Kompakt yapı gelişimi ile sporofite dönüşüm; F. Sporofit bitki (P: Protal, G: Gametofit, KY: Kompakt yapı, S: Sporofit bitki

Asplenium septentrionale türünde ise sporofit gelişimini sağlamak amacıyla kültüre alınan bitkilerde en başarılı farklılaşma oranı, % 37.5 oranı ile 1 mgL^{-1} NAA + 1 mgL^{-1} BA içeren besi ortamından sağlanmış ve bu sürecin 18 hafta olduğu tespit edilmiştir. Farklılaşmanın kallus oluşumu ile başladığı ve kallustan sürgün gelişimi ile de devam ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.23).

Oksin ve sitokininin birlikte kullanımının, kallus uyartımını teşvik ettiği bilinmektedir. Bu doğrultuda yapılan çalışma sonucunda da eşit miktarda NAA ve BA kullanımı ile kallus elde edilerek oluşan düzensiz yapı üzerinden sürgün gelişimi gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. *Asplenium septentrionale* farklılaşma, kallus ve sporofite dönüşüm oranları

	Konsantrasyonlar (mg L^{-1})	Farklılaşma (%)	Kallus (%)	Sporofite Dönüşüm (%)
1	0.5 BA	43.75	0.00	0.00
2	1 BA	31.25	0.00	0.00
3	0.5 NAA	43.75	0.00	0.00
4	0.5 NAA+0.5 BA	43.75	0.00	0.00
5	0.5 NAA+1 BA	50.00	0.00	0.00
6	1 NAA	37.50	0.00	0.00
7	1 NAA+0.5 BA	56.25	0.00	12.50
8	1 NAA+1 BA	43.75	50.00	37.50
9	0.5 KIN	31.25	0.00	0.00
10	1 KIN	43.75	0.00	0.00
11	0.5 IBA	25.00	0.00	0.00
12	0.5 IBA+0.5 KIN	31.25	0.00	0.00
13	0.5 IBA+1 KIN	37.50	0.00	0.00
14	1 IBA	25.00	0.00	0.00
15	1 IBA+0.5 KIN	31.25	0.00	0.00
16	1 IBA+1 KIN	37.50	0.00	0.00
17	0.5 BA	37.50	0.00	0.00
18	1 BA	43.75	0.00	0.00
19	0.5 IBA	12.50	0.00	0.00
20	0.5 IBA+0.5 BA	18.75	0.00	0.00
21	0.5 IBA+1 BA	25.00	0.00	0.00
22	1 IBA	6.25	0.00	0.00
23	1 IBA+0.5 BA	0.00	0.00	0.00
24	1 IBA+1 BA	43.75	0.00	0.00
25	0.5 KIN	50.00	0.00	0.00
26	1 KIN	50.00	0.00	0.00
27	0.5 NAA	43.75	0.00	0.00
28	0.5 NAA+0.5 KIN	50.00	0.00	0.00
29	0.5 NAA+1 KIN	68.75	0.00	6.25
30	1 NAA	37.50	0.00	0.00
31	1 NAA+0.5 KIN	37.50	0.00	0.00
32	1 NAA+1 KIN	56.25	0.00	0.00

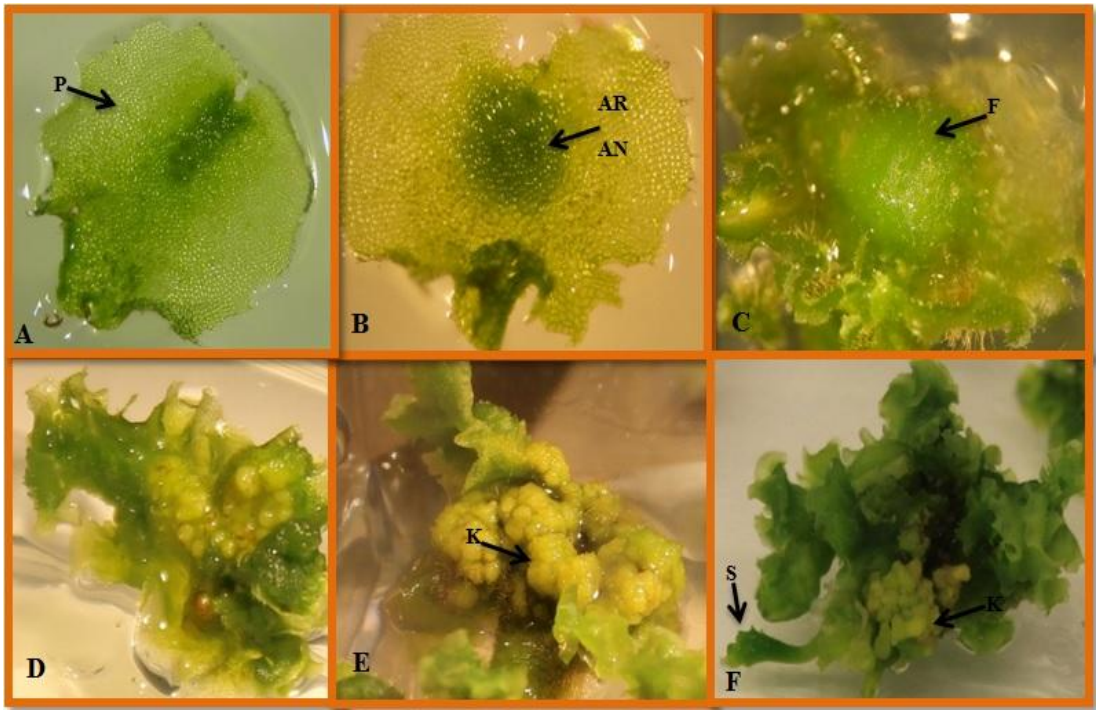


Şekil 4.21. Asplenium septentrionale farklılaşma, kallus ve sporofite dönüşüm (%) grafiği

Kromer ve ark. (2006), *Asplenium adulterinum, A. cuneifolium, Asplenium septentrionale, Polypodium vulgare, Woodsia genus, Woodsia ilvensis ve W. alpina* eğrelti türlerinde, *in vitro* mikroçoğaltım ve dış koşullarda koruma ve gen bankalarının oluşturulması çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Altı tür üzerinde yapılan çalışmada, türlerin gametofit gelişimleri incelenmiş ve modifiye edilmiş ½MS besiyerinin en iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. Çalışılan eğrelti türlerinde gametofit gelişimi için ortamdaki optimum sakkaroz konsantrasyonun, 20-30 gL^{-1} olması gerektiği ve gametofitlerden ayrılan sporofitlerin, Kin ve NAA ile desteklenen ½MS besi yerinde en iyi gelişimi gösterdiği saptanmıştır. Tez çalışmasında ise gametofit gelişimin incelenmesi amacıyla bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½MS besi yeri kullanılmıştır. Kromer ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmayla paralel olarak, kullandığımız eğrelti türlerinde de gametofit gelişimi için ortamdaki optimum sakkaroz konsantrasyonun, 20-30 gL^{-1} olması gerektiği ve sporofit gelişiminde ise BA ve NAA içeren ½MS besi yeri kullanılması gerektiği belirlenmiştir.

Goller ve ark. (2007), farklı cinslere ait 16 eğrelti türünde MS besiyerini kullanarak spor kültürü çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Sporların çimlenme süresinde türler arasında farklılık görülmekle birlikte, çimlenme süresinin ortalama 16 hafta olduğunu saptamışlardır. Protal oluşumunun uç meristemlerin aktivitesi sonucunda meydana geldiği ve türler arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Olgun gametofitlerde anteridya ve arkegonya oluşumu gözlenmiş, doğal fertilizasyonunun genç sporofitlerin oluşumuna imkan verdiği saptanmıştır. Besiyerindeki sakkaroz konsantrasyonunun gametofit çoğalımını stimüle ettiği, sakkarozun az olması durumunda ise tomurcuk formasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir.

Yapılan tez çalışmasında da spor çimlenme süresinde türler arasında farklılık gözlenmiş ve protal oluşumunun uç meristemlerin aktivitesi sonucunda meydana geldiği saptanmıştır. Buna ek olarak, protallerin sakkarozsuz ortamda gelişimleri incelenmiş fakat kültüre alındıktan 4 hafta sonra eksplantların siyahlaşarak öldüğü saptanmıştır.



Şekil 4.22. A.Protal oluşumu; B. Arkegonyum ve anteridyum oluşumumu; C. Gametofit gelişimi ve fertilizasyon; D-E. Farklılaşma evresinde kallus oluşumu ve gelişimi; F. Sürgün oluşumu (P: Protal, AR: Arkegonyum, AN: Anteridyum, F: Fertilizasyon, K: Kallus, S: Sürgün)



Şekil 4.23. Farklılaşma ile oluşan kallustan sürgün gelişimi (K: Kallus, S:Sürgün)

Çizelge 4.6. Türler arası farklılaşma, kallus ve bitkiye dönüşüm oranları

Konsantrasyon	*Asplenium adiantum nigrum*			*Asplenium trichomanes*			*Asplenium septentrionale*		
	Farklılaşma	Kallus	Sporofite Dönüşüm	Farklılaşma	Kallus	Sporofite Dönüşüm	*Farklılaşma*	Kallus	Sporofite Dönüşüm
1	37.50 ijklm (33.75)	0.00 e (0.00)	18.75 hı (18.75)	50.00 fghij (45.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
2	43.75 ghijk (41.25)	0.00 e (0.00)	12.50 hı (15.00)	56.25 efghı (48.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	31.25 ijklm (33.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
3	75.00 cde (63.75)	0.00 e (0.00)	50.00 cde (45.00)	56.25 efghı (48.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
4	50.00 fghij (45.00)	0.00 e (0.00)	25.00 fgh (26.25)	68.75 defg (56.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
5	37.50 ijklm (33.75)	0.00 e (0.00)	18.75 hı (18.75)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	50.00 fghij (45.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
6	56.25 efghı (48.75)	0.00 e (0.00)	25.00 fgh (26.25)	31.25 ijklm (33.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	37.50 hijkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
7	6.25 op (7.50)	0.00 e (0.00)	0.00 (0.00)	56.25 efghı (48.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	56.25 efghı (48.75)	0.00 (0.00)	12.50 hı (15.00)
8	18.75 mno (18.75)	0.00 e (0.00)	12.50 hı (15.00)	37.50 hijkl (37.50)	37.50 b (37.50)	0.00 (0.00)	43.75 ghijk (41.25)	50.00a (45.00)	37.50 def (37.50)
9	31.25 ijklm (33.75)	0.00 e (0.00)	12.50 hı (15.00)	31.25 ijklm (33.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	31.25 jklmn (30.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
10	31.25 (33.75)	0.00 e (0.00)	12.50 hı (15.00)	37.50 hijkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)

Çizelge 4.6. Devamı

Konsantrasyon	*Aspleniium adiantum nigrum*			*Aspleniium trichomanes*			*Aspleniium septentrionale*		
	Farklılaşma	Kallus	Sporofite Dönüşüm	Farklılaşma	Kallus	Sporofite Dönüşüm	*Farklılaşma*	Kallus	Sporofite Dönüşüm
1	37.50 ijklm (33.75)	0.00 e (0.00)	18.75 hı (18.75)	50.00 fghij (45.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
2	43.75 ghijk (41.25)	0.00 e (0.00)	12.50 hı (15.00)	56.25 efghı (48.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	31.25 ijklm (33.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
3	75.00 cde (63.75)	0.00 e (0.00)	50.00 cde (45.00)	56.25 efghı (48.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
4	50.00 fghij (45.00)	0.00 e (0.00)	25.00 fgh (26.25)	68.75 defg (56.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
5	37.50 ijklm (33.75)	0.00 e (0.00)	18.75 hı (18.75)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	50.00 fghij (45.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
6	56.25 efghı (48.75)	0.00 e (0.00)	25.00 fgh (26.25)	31.25 ijklm (33.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	37.50 hijkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
7	6.25 op (7.50)	0.00 e (0.00)	0.00 (0.00)	56.25 efghı (48.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	56.25 efghı (48.75)	0.00 (0.00)	12.50 hı (15.00)
8	18.75 mno (18.75)	0.00 e (0.00)	12.50 hı (15.00)	37.50 hijkl (37.50)	37.50 b (37.50)	0.00 (0.00)	43.75 ghijk (41.25)	50.00a (45.00)	37.50 def (37.50)
9	31.25 ijklm (33.75)	0.00 e (0.00)	12.50 hı (15.00)	31.25 ijklm (33.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	31.25 ijklmn (30.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
10	31.25 (33.75)	0.00 e (0.00)	12.50 hı (15.00)	37.50 hijkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)

Çizelge 4.6. Devamı

11	65.25 efghı (48.75)	12.50 d (11.25)	25.00 fgh (26.25)	50.00 fghıj (45.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	25.00 jklmn (30.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
12	12.50 nop (15.00)	0.00 e (0.00)	6.25 ij (7.50)	81.25 bcd (67.50)	0.00 (0.00)	62.50 bc (52.50)	31.25 ijklm (33.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
13	43.75 ghijk (41.25)	0.00 e (0.00)	18.75 gh (22.50)	87.50 abc (75.00)	0.00 (0.00)	75.00 b (60.00)	37.50 hijkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
14	12.50 nop (15.00)	0.00 e (0.00)	6.25 ij (7.50)	100.00 a (90.00)	0.00 (0.00)	93.75 a (82.50)	25.00 jklmn (30.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
15	68.75 def (56.25)	0.00 e (0.00)	25.00 fgh (26.25)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	31.25 ijklm (33.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
16	62.50 defgh (52.50)	0.00 e (0.00)	25.00 fgh (26.25)	37.50 hijkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	37.50 hijkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
17	6.25 op (7.50)	0.00 e (0.00)	0.00 (0.00)	12.50 nop (15.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	37.50 hijkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
18	0.00 p (0.00)	0.00 e (0.00)	0.00 (0.00)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	43.75 ghijk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
19	0.00 p (0.00)	0.00 e (0.00)	0.00 (0.00)	50.00 fghıj (45.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	12.50 nop (15.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
20	18.75 mno (18.75)	25.00 c (26.25)	6.25 ij (7.50)	37.50 hijkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	18.75 lmno (22.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
21	18.75 mno (18.75)	0.00 e (0.00)	6.25 ij (7.50)	37.50 hijkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	25.00 klmn (26.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
22	6.25 op (7.50)	0.00 e (0.00)	6.25 ij (7.50)	6.25 op (7.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	6.25 op (7.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)

Çizelge 4.6. Devamı

23	43.75 ghıjk (41.25)	0.00 e (0.00)	6.25 ıj (7.50)	12.50 nop (15.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 p (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
24	18.75 lmno (22.50)	0.00 e (0.00)	6.25 ıj (7.50)	25.00 jklmn (30.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	43.75 ghıjk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
25	50.00 fghıj (45.00)	0.00 e (0.00)	25.00 fgh (26.25)	50.00 fghıj (45.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	50.00 fghıj (45.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
26	75.00 cdef (60.00)	0.00 e (0.00)	37.50 efg (33.75)	43.75 ghıjk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	50.00 fghıj (45.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
27	93.75 a b (82.50)	0.00 e (0.00)	56.25 bcd (48.75)	37.50 hıjkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	43.75 ghıjk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
28	87.50 a b c (75.00)	0.00 e (0.00)	43.75 cde (41.25)	62.50 defgh (52.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	50.00 fghıj (45.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
29	75.00 cdef (60.00)	0.00 e (0.00)	37.50 efg (33.75)	6.25 op (7.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	68.75 defg (56.25)	0.00 (0.00)	6.25 ıj (7.50)
30	18.75 lmno (22.50)	0.00 e (0.00)	6.25 ıj (7.50)	43.75 ghıjk (41.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	37.50 hıjkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
31	43.75 ghıjk (41.25)	0.00 e (0.00)	12.50 hı (15.00)	62.50 defgh (52.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	37.50 hıjkl (37.50)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
32	62.50 defgh (52.50)	0.00 e (0.00)	25.00 gh (22.50)	50.00 fghıj (45.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	56.25 efghı (48.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
Kallus :		**$LSD_{tür}$ = Ö.D.**		**LSD_{ortam} = 2.70*****		**$LSD_{tür*ortam}$ = 4.68 *****			
Farklılaşma :		**$LSD_{tür}$ = 2.89*****		**LDS_{ortam} = 9.46*****		**$LSD_{tür*ortam}$ = 16.4*****			
Sporofite Dönüşüm :		**$LSD_{tür}$ = 2.50*****		**LSD_{ortam} = 8.19*****		**$LSD_{tür*ortam}$ = 14.18*****			

Parantez içinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar harflerle gösterilmiştir. P<0.001***

Yapılan tez çalışmasındaki gelişim basamakları özetlenecek olursa; her 4 türde de çimlenme süreçleri farklılık göstermiştir. Çimlenme, *Aspenium scolopendrium* türünde çimlenme 22., *Asplenium adiantum-nigrum* türünde 6., *Asplenium trichomanes* türünde 8. ve *Asplenium septentrionale* türünde ise 7. haftada meydana gelmiştir. Kromer ve ark. (2006)'da *Asplenium adulterinum, Asplenium cuneifolium, Asplenium septentrionale* ve *Polypodium vulgare* türlerinde yaptıkları çalışmada, çimlenme süresinin ortalama 5 hafta olduğunu saptamışlardır. Pangua ve ark. (1993)'da *Asplenium scolopendrium, Asplenium trichomanes* ve *Asplenium ruta-muraria* türlerinde yaptıkları çalışmada, çimlenmenin 4 haftada meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Srivastava ve ark. (2013) *Asplenium nidus*'ta yapmış oldukları çalışmada, çimlenmenin başlangıç kültüründen 6 hafta sonra başladığını belirlemişlerdir.

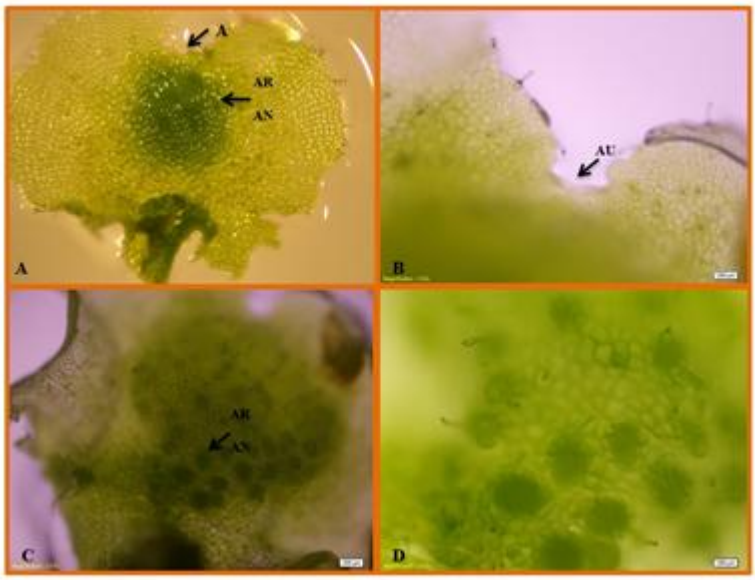
Gametofit gelişimlerinin ise çalışılan 4 eğrelti türünde de ortalama 4 hafta olduğu saptanmıştır. Gametofit gelişimi ile proembriyo oluşumu sonrasında sporofit evreye dönüşüm başlamıştır. Sporofit bitki gelişimi yine türler arasında farklılık göstermiştir. Tez çalışmasında, çoğaltımı gerçekleştirilen eğrelti türlerinde sporofitik evreye dönüşümün ardından bitkicikler oluşmuş ve gelişim halen devam etmektedir. Kromer ve ark.(2006)'ları sporofit bitki gelişim sürecinin 2-3 yıl olduğunu belirtirken, Soare ve ark.(2010) apogami gösteren *Dryopteris affinis* türünde yaptıkları çalışmada, sporofitlerin başlangıç kültüründen 3 ay sonra elde edildiklerini bildirmişlerdir. Çalışma bulguları ve farklı araştırıcıların elde etmiş oldukları sonuçlar, tür ve genotip farklılığının eğrelti gelişim süreci üzerine etkisini açıkça vurgulamaktadır.

4.5. Histolojik Analiz Bulguları

Embriyo oluşum sürecinin belirlenmesi amacıyla örnekler çimlenmeden itibaren 3, 4, 5 ve 6. haftalarda alınmıştır. Örneklerden alınan kesitler, Jian-Guo Cao ve ark.(2009)'nın yapmış oldukları çalışma referans alınarak incelenmiştir.

Jian-Guo Cao ve ark.(2009), *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn eğrelti türünde olgun yumurta yapısı ve döllenme olayını incelemişlerdir. Gözlemler,

elektron mikroskopu ile gerçekleştirilmiştir. İncelemeler sonucunda, yumurtanın çevresinde belirgin bir yumurta zarının bulunduğu gözlenmiş, ilk kez bu çalışmada döllenmenin gerçekleşebilmesi için olgun yumurtanın orta kısmında spermatozoidlerin geçişine imkan tanıyan bir döllenme porunun bulunduğu saptanmıştır. Döllenmenin gerçekleşmesi ile eş zamanlı olarak döllenmiş yumurtanın döllenmemiş yumurtaya oranla 1/3 oranında küçüldüğü gözlenmiştir. Bu tez kapsamında yapılan histolojik analiz gözlemleri sonucunda yumurta etrafında belirgin bir yumurta zarı belirlenmiştir. İnceleme sonucunda, apikal uç ve proembriyo oluşumları gözlenmiştir. İncelemeler ışık mikroskopunda gerçekleştirilmiştir. Proembriyo oluşumlarının büyük oranda kesit alınan eksplantların orta kısmında apikal ucun hemen altındaki epidermal tabakada oluşmaya başladığı görüntülenmiştir (Şekil 4.24).

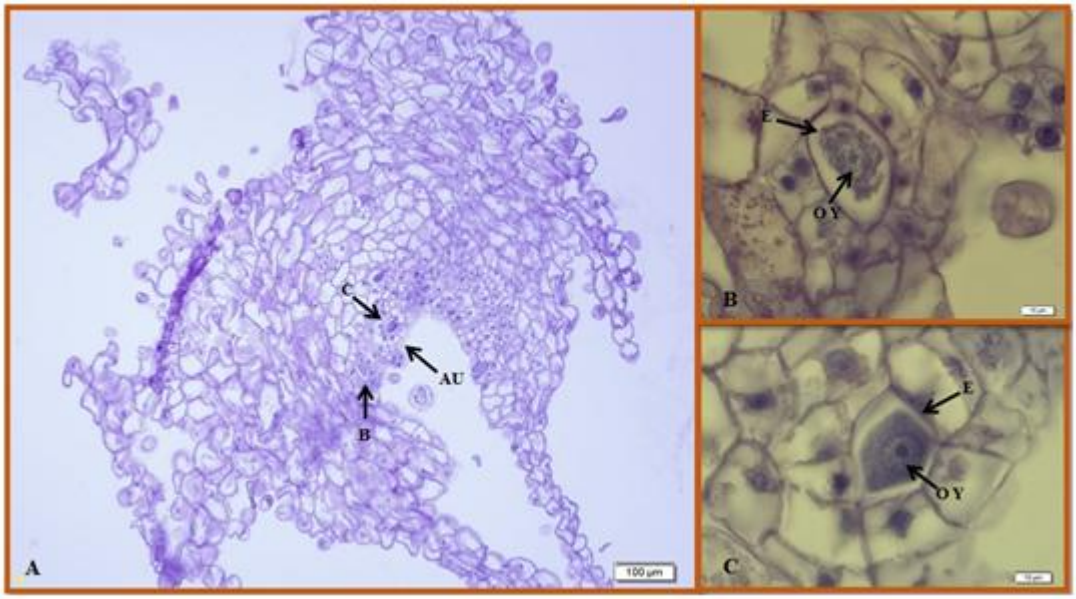


Şekil 4.24. A-B-C-D. Gametlerin oluşumu ve embriyo oluşumunun gerçekleştiği epidermal tabaka

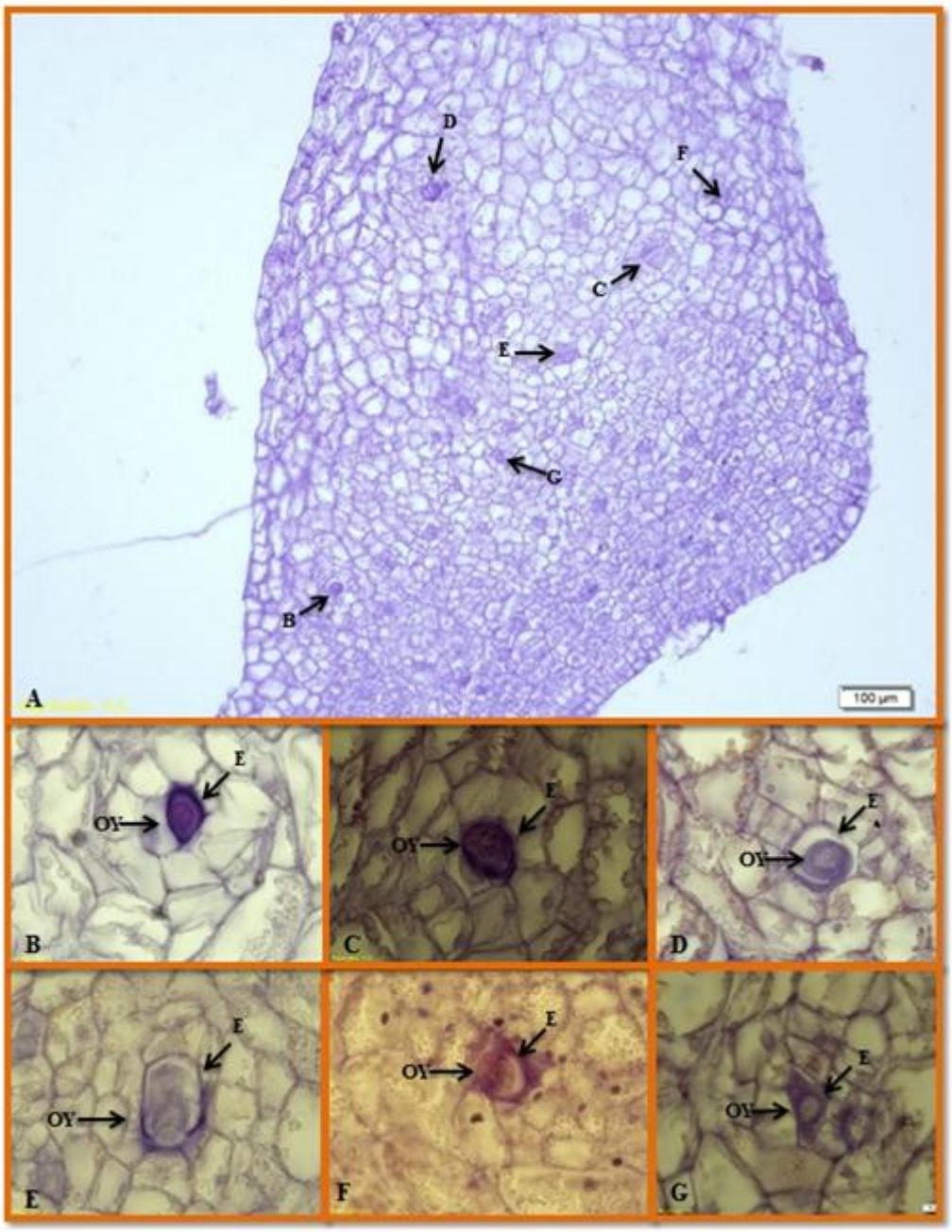
Embriyo oluşumu gerçekleşecek bölgelerde hücrelerin yogunlaşarak girdap şeklini aldığı gözlenmiştir (Şekil 4.23).

Yapılan histolojik analizler sonucunda, embriyo oluşum süresi türler arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. *Asplenium scolopendrium* türünde embriyo oluşumunun çimlenmeden sonra 6 (Şekil 4.25), *Asplenium adiantum-nigrum* türünde

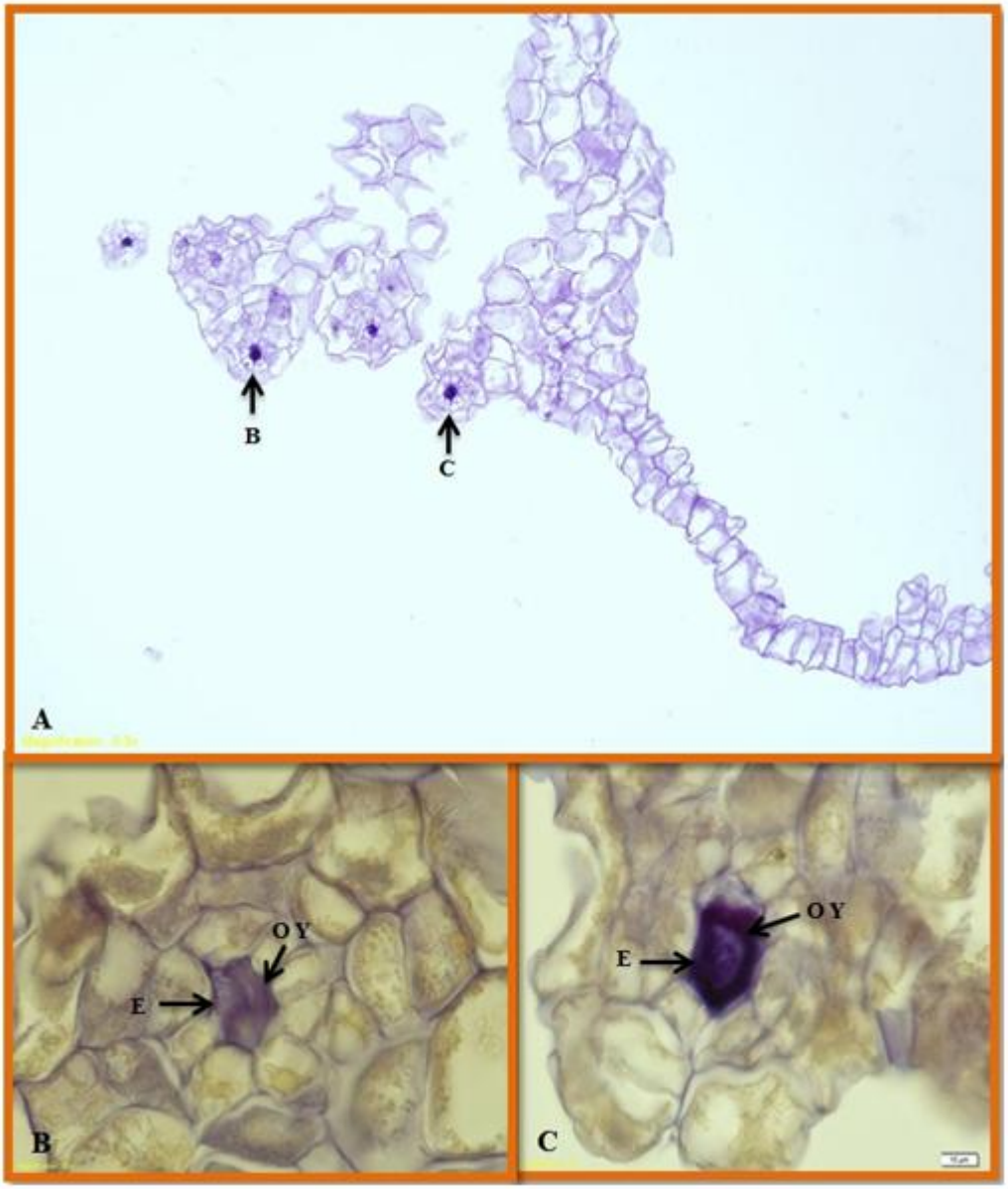
5 (Şekil 4.26), *Asplenium trichomanes* türünde 3 (Şekil 4.27), ve *Asplenium septentrionale* türünde ise 4. (Şekil 4.28.) haftadan itibaren oluşmaya başladığı saptanmıştır.



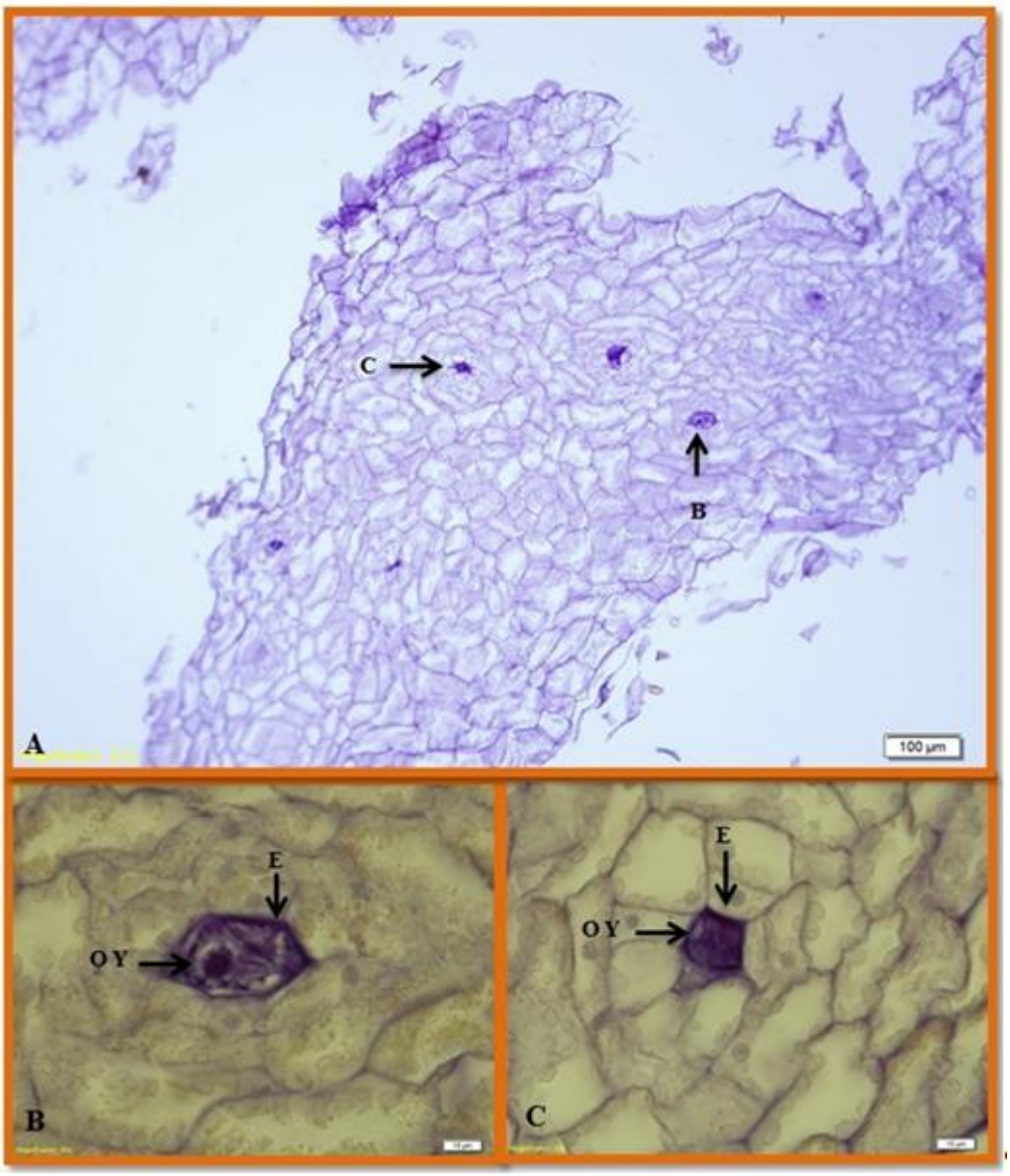
Şekil 4.25. A-B-C. *Asplenium scolopendrium* türünde olgun yumurta ve embriyo yapılarının gözlenmesi (OY: Olgun yumurta, E: Embriyo, AU: Apikal uç)



Şekil 4.26. A-B-C-D-E-F-G. *Asplenium adiantum-nigrum* türünde olgun yumurta ve embriyo yapılarının gözlenmesi (OY: Olgun yumurta, E: Embriyo)



Şekil 4.27. A-B-C. *Asplenium trichomanes* türünde olgun yumurta ve embriyo yapılarının gözlenmesi (OY: Olgun yumurta, E: Embriyo)



Şekil 4.28. A-B-C. *Asplenium septentrionale* türünde olgun yumurta ve embriyo yapılarının gözlenmesi (OY: Olgun yumurta, E: Embriyo)

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Eğreltilerin, özellikle atık ve kirleticilerin yok edilmesi konusunda, çevre mühendisliğinde, kanser ve inflamasyonlu hastalıkların tedavisinde, etnomedikal ve tıbbın diğer alanlarında da kullanılmasına ek olarak süs bitkisi sektöründe de saksılı çiçek ve kesme yeşillik olarak da değerlendirilme potansiyelinin yüksek olması nedeniyle Türkiye'de ve Dünya'da önemi gün geçtikçe artmaktadır.

Eğreltilerin, günümüzde süs bitkisi olarak temini doğadan sökülerek sağlanmaktadır. Bunun yanısıra gün geçtikçe artan şehirleşme, yol açma ve hayvan otlatma gibi bilinçsiz davranışlar da eğrelti neslinin devamlılığını tehdit etmektedir.

Yapılan tez çalışmasında, ülkemizde doğal olarak yetişen *Asplenium scolopendrium, Asplenium adiantum nigrum, Asplenium trichomanes ve Asplenium septentrionale* türlerinde mikroçoğaltım ve histolojik analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Başlangıç materyali olarak spor eksplantı kullanılmıştır. Çalışmada öncelikle sporlar çimlendirilmiş, ardından gametofit gelişimi sağlanmış ve son olarak da bitkilerin gametofitik safhadan farklılaşarak sporofitik safhaya geçmesi ve bitkiye dönüşümü olmak üzere çalışma 3 aşamada incelenmiştir.

Eğrelti türlerinde metagenez görülmesi nedeniyle gametofitik safhadan sporofitik safhaya geçiş süreci doku kültürü koşullarında takip edilmiş ve histolojik analiz çalışmaları ile embriyo oluşumu izlenerek süreleri saptanmıştır.

Çimlenme sürecini kısaltmak amacıyla, *Asplenium adiantum nigrum ve Asplenium trichomanes* türlerinde ABA kullanılarak çimlenme % 100 oranında sağlanmıştır fakat ABA'in çimlendirme amacıyla *Asplenium scolopendrium* ve *Asplenium septentrionale* türlerinde kullanımının ilerleyen evrelerde farklılaşmayı engellediği belirlenmiştir. *Asplenium scolopendrium* ve *Asplenium septentrionale* türlerinde ise çimlenme % 100 oranında bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde sağlanmıştır.

Çimlenme süreci genotipler arasında farklılık göstermiştir. *Asplenium scolopendrium* sporları 22 , *Asplenium adiantum-nigrum* sporları 6, *Asplenium trichomanes* sporları 8, *Asplenium septentrionale* sporları ise 7 haftada çimlenmiştir. Çimlenme denemeleri sonbaharda alınan sporlar ile kurulmuştur. Eksplantın alınma

dönemlerine göre çimlenme sürecinin değişeceği ve bu durumun bitkideki fizyolojik değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Gametofit gelişimini sağlamak amacıyla *Asplenium adiantum nigrum, Asplenium trichomanes ve Asplenium septentrionale* türlerinde eksplantlar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½ MS besi yerine alınırken, *Asplenium scolopendrium* türünde eksplantlar modifiye edilmiş ½ MS besi yerinde kültüre alınmıştır. Gametofit gelişim süreci tüm türlerde ortama 4 hafta olarak tespit edilmiştir.

Gametofit gelişimi sağlanan eksplantlar, sporofite dönüşüm sürecinde farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren 32 farklı konsantrasyondaki besi ortamlarına aktarılmışlardır.

Sporofite dönüşüm aşamasında *Asplenium scolopendrium* türünde en etkili besi yeri % 18.75 ile 1 mgL^{-1} IBA ve 1 mgL^{-1} KIN , *Asplenium adiantum-nigrum* türünde % 56.25 ile 0.5 mgL^{-1} NAA, *Asplenium trichomanes* türünde % 93.75 yüzde değeri ile 1 mgL^{-1} IBA, *Asplenium septentrionale* türünde ise %37.50 yüzde değeri ile 1 mgL^{-1} NAA ve 1 mgL^{-1} BA içeren besi yerinde ve diğer türlerden farklı olarak kallus oluşumu ile sürgün gelişimi şeklinde gözlenmiştir.

Histolojik inceleme sonucunda, apikal uç ve proembriyo oluşumları gözlenmiştir. Proembriyo oluşumlarının büyük oranda kesit alınan eksplantların orta kısmında apikal ucun hemen altındaki epidermal tabakada oluşmaya başladığı görüntülenmiştir. Yapılan analizler sonucunda embriyo oluşum süreci türler arasında farklılık göstermiştir. *Asplenium scolopendrium* türünde embriyo oluşumunun çimlenmeden sonra, *Asplenium adiantum-nigrum* türünde 5, *Asplenium trichomanes* türünde 3, ve *Asplenium septentrionale* türünde ise 4. haftadan itibaren oluşmaya başladığı saptanmıştır.

Eğrelti türleri saksılı süs bitkisi olarak süs bitkileri ticaretinde önemli bir yere sahiptir. Ancak bu amaçla yanlızca *Nephrolepis exaltata* türü yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Yapılan tez çalışmasında bu eğrelti türüne alternatif oluşturabilecek süs bitkisi potansiyeline sahip yeni türlerin kazandırılması amaçlanmıştır. Eğreltilerin yaşam döngüleri gereğince yeni bir bitki oluşturma süreci çok uzun olması nedeniyle, laboratuvar koşullarında doku kültürü şartlarında bu sürecin kısaltılarak

hızlı bir şekilde mikroçoğaltımı amaçlanmıştır. Laboratuvar şartlarında bu sürecin türler arasında farklılık göstermekle birlikte, ortalama dokuz ay olduğu saptanmıştır.

Akklimatizasyon aşaması için kök oluşumu görülmemiş dolayısıyla dış ortama adaptasyon gerçekleştirilememiştir. Bu amaçla sporofit bitkilerin farklı konsantasyonlarda oksin içeren besi yerlerine alınmaları halinde kök oluşumunun gerçekleşeceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar ve elde edilen bulgular sonucunda yapılması önerilen çalışmalar ;

1. Mikroçoğaltımda gametofitik safhadan sporofitik safhaya geçişte etkili olan diğer faktörler araştırılmalıdır.
2. Farklılaşma süreci için farklı büyüme düzenleyicileri ve farklı besi yerleri ile denemeler kurulmalı ve bunlara ek olarak besi ortamına NaH_2PO_4 ilavesinin farklılaşma üzerine etkisi gözlenmelidir.
3. Eğreltilerin büyük bir çoğunluğunda apogami görülmesi nedeniyle çalışılan türlerde ploidi seviyelerinin tespit edilmesi ve gerekli sitolojik analizlerin yapılması gerekmektedir.
4. Histolojik analizler sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda saptanan embriyoların, hematoksilini diğer dokulara oranla daha fazla absorbe etmesi nedeniyle embriyoların net bir şekilde görülmesi engellenmiştir. Bu nedenle ileride eğrelti türlerinde yapılacak olan histolojik analizlerde, farklı boya çeşitlerinin kullanılması önerilmektedir.
5. Türkiye'de doğal olarak yetişen ve süs bitkisi potansiyeline sahip birçok eğrelti türü bulunmaktadır. Bu eğrelti türlerinde de uygun mikroçoğaltım protokolü oluşturularak süs bitkileri sektörüne kazandırılması gerekmektedir.
6. Doğada bilinçsizce tahrip edilen eğrelti türlerinde genetik materyallerin biyoteknolojik yöntemler ile korunması amacıyla kriyoprezervasyon çalışmaları araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

ASPİRAS, R.A., 2010. Sporophyte and gametophyte development of ***Platycerium coronarium*** (Koenig) Desv. and P. grande (Fee) C. Presl. (Polypodiaceae) through ***in vitro*** propagation. Saudi Journal of Biological Sciences 13–22.

CAO, J,G., YANG N,Y., WANG, Q,X., 2009. "Ultrastructure of the Mature Egg and Fertilization in the Fern Ceratopteris thalictroides." *Journal of integrative plant biology* 51.3: 243-250.

CHANG, H.C., AGRAWAL, D.C., KUO, C.L., WEN, J.L., CHEN, C.C., TSAY, H.S., 2007. ***In vitro*** culture of ***Drynaria fortunei***, a fern species source of Chinese medicine "Gu-Sui-Bu". ***In Vitro*** Cellular & Developmental Biology – Plant. 43.2:133-139.

CHIA, S,G., RAGHAVAN, V., 1982. "Abscisic acid effects on spore germination and protonemal growth in the fern, Mohria caffrorum." *New Phytologist* 92.1:31-37.

ENGELMANN, F., 1991. ***In vitro*** conservation of tropical plant germplasm. Euphytica 57: 227–243.

ENGELMANN, F., 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. ***In Vitro*** Cell Development Biol Plant 40: 427–433.

ESQUİNAS ALCA'ZAR, J., 2005. Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges. Nature Reviews Genetics, 6, 946–953.

FAYİGA, O., MA L, Q., 2005. Arsenic Uptake by Two Hyperaccumulator Ferns from Four Arsenic Contaminated Soils, Water Air Soil Pollution 168: 71–89.

FERNANDEZ H., and M. A. REVİLLA., 2003. ***In vitro*** culture of ornamental ferns. Plant cell, tissue and organ culture 73.1:1-13.

GOLLER, K., RYBCZYNSKI, J.J., 2007. Gametophyte and sporophyte of tree ferns in vitro culture." Acta Societatis Botanicorum Poloniae76.3.

HOBBS, P.R., 2007. Conservation agriculture: what is it and why is it important for future sustainable food production. Journal of Agricultural Science, 145, 127–137.

HICKS, G., ADERKAS P.V., 1986. A tissue culture of the ostrich fern *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro. Plant cell, tissue and organ culture 5.3:199-204.

LIAO, Y.K., WU, Y.H., 2011. In vitro propagation of *Platycerium bifurcatum (Cav.)* Chr. via green globular body initiation. Bot Studies 52: 455-463.

LYNCH, P.T., BENSON, E.E., HARDİNG, K., 2007 Climate change: the role of ex situ and cryo-conservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 82, 157–160.

MARİMUTHU J., MANİCKAM 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.

MEIRA, Z., HADAR, A., 1991. Morphogenic pattern of *Nephrolepis exaltata* cv. Bostoniensis in agar or liquid cultures: implications for micropropagation. Israel Journal of Botany 40.1: 7-16.

MORİNİ, S., 2000. *In vitro* culture of *Osmunda regalis* fern. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 75.1 :31-34.

REED, B.M., 2002. Implementing cryopreservation for longterm germplasm preservation in vegetatively propagated species. In Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cryopreservation of Plant Germplasm. Volume 50,

ROGERS, S., DETHİER, M., BANİSTER, S., 1992. Micropropagation of *NotholaenaSun-Tuff* Fern. HortScience 27.11: 1224-1225.

SAIFULLAH. K., KAYANI, H.A., 2008. In vitro propagation of bird's nest fern (*Asplenium nidus*) from spores. Pakistan Journal of Botany 40.1: 91.

SINGHA, K.B., CHOUDHURY, M.D., MAZUMDER, P.B., 2013. In vitro propagation in *Pteridophytes*: a review.International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy 4.2.

SRİVASTAVA, 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., M. ANDREI., 2007. Researches concerning the in vitro differentiation of the fern *Phegopteris connectilis (Michx.)* Watt. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 35.1: 7-14.

SOARE. L.C., 2008. In vitro development of gametophyte and sporophyte in several fern species. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 36.1: 13-19.

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.

TAIZ, L., ZEIGER, E., 2008 Plant Physiology.

TEREZA, A.S., MELO N.F,. 2004. Interaction between sucrose and pH during *in vitro* culture of Nephrolepis biserrata (Sw.) Schott (Pteridophyta)." *Acta Botanica Brasilica* 18.4: 809-813.

THUILLER, W., LAVOREL S., ARAU´ JO, M.B., SYKES, M.T., PRENTİCE, I.C., 2005 Climate change threats to plant diversity in Europe. Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 8245–8250.

VIJAYANA, K., SARATCHANDRA, B., TEIXERIA DA SILVA, J. A., 2010. Germplasm conservation in *mulberry* (*Morus spp*.), 128. 371-379

ZEYBEK, E., ÖNDE, S., KAYA, Z., 2012. Improved *in vitro* micropropagation method with adventitious corms and roots for endangered saffron. Central European Journal Biology.7-1: 138-145.

ZHAO F. J., MA J. F., MEHARG A. A., McGRATH S. P., 2009. Arsenic Uptake and Metabolism in Plants, New Phytologist 181: 777–794.

ŻOLNİERZ, L., KROMER, K., ŚWIERKOSZ, K., 2008. Ladder spleenwort (*Asplenium adulterinum* Milde) in Poland distribution, population state and conservation plan framework. Club Mosses, Horsetails and Ferns in Poland–Resources and Protection, Ed. Szczęśniak E., Gola E: 29-45.

WHITTIER, D,P., STEEVES, T,A., 1960. "The induction of apogamy in the bracken fern." *Canadian Journal of Botany* 38.6:925-930.

http://www.fao.org/ (FAO) (Erişim tarihi: 3 Şubat 2012)

http://www.unfpa.org/public/ (UNFPA) (Erişim tarihi: 1 Şubat 2012)

ÖZGEÇMİŞ

Macide Burcu KEKİL 1990 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise ögrenimini Adana'da tamamladıktan sonra 2008-2012 yılları arasında Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde okuyarak mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümünde yüksek lisansa başladı ve 2014 yılında tamamladı.