

## Farklı Jel Yapıcı Maddelerin *Haworthia cymbiformis* (Haw.) Duval Mikro Çoğaltımında Sürgün Rejenerasyonu ve Gelişimi Üzerine Etkisi

### The Effect of Different Gelling Agents on Shoot Regeneration and Development in *Haworthia cymbiformis* (Haw.) Duval Micropropagation

 Merve KABAKCI<sup>1</sup>,  Cansu DİNDAR<sup>1</sup>,  Uğur ŞİRİN<sup>1</sup>,  
 Mustafa Ercan ÖZZAMBAK<sup>2</sup>

#### Özet

Sukulent bitkiler, yapraklarında, gövdelerinde veya köklerinde su depolayabilen ve dayanıklı yapıda olmasıyla birlikte süs bitkisi olarak oldukça önemli yere sahiptir. *Xanthorrhoeaceae* familyasına ait *Haworthia cymbiformis* dikkat çekici yaprakları ile estetik görüntüsünün yanında bakımının kolaylığı gibi avantajlarıyla ön plana çıkan ve süs bitkisi olarak kullanılan ticari değeri yüksek bir sukulent türüdür.

Son yıllarda süs bitkilerinin ticari üretimi, mikroçoğaltım ile yapılabilmektedir. Besin ortamlarını yarı katı hale getirmek için kullanılan jel yapıcı maddelerin niteliği, cinsi ve konsantrasyonu *in vitro* kültürde besin alınımını dolayısıyla gelişmeyi ve çoğalmayı etkileyen en önemli faktörlerdendir. Bu çalışma da farklı jel yapıcı maddelerin sürgün gelişmesi ve çoğalması üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada Plant Agar (9 g/l), Agar (8 g/l), Agar Gellan (4 g/l), Gelzan (2 g/l), Carrageenan (10 g/l), Bacto Agar (8 g/l) ve Gelrite (3 g/l) olmak üzere 7 farklı jel yapıcı madde belirtilen konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Denemede 3 mm boyunda 2 yapraklı *in vitro* köksüz yavru bitkicikler eksplant olarak kullanılmış, 1 mg/l BAP ve 0,1 mg/l NAA ilave edilen MS bazal ortamına 7 farklı jel yapıcı maddenin eklenmesiyle oluşturulan besin ortamlarında 8 hafta süresince kültüre alınmıştır. Deneme 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş ve kültür sonunda, kültüre alınan bitkiciklerin morfolojik özelliklerindeki değişimler incelenmiştir. Eksplant başına yavru bitki sayısı (kardeş sayısı/eksplant) (adet), sürgün boyu (cm), I. boy (2.0 < cm üzeri), II. boy (1.0-2.0 cm), III. boy (1.0 > cm) yavru bitki adedi, kök uzunluğu (cm), köklenme oranı (%) ve vitrifikasyon oranı (%) parametreleri incelenerek ölçümleri yapılmıştır.

Deneme sonucunda; en fazla eksplant başına yeni oluşan yavru bitki sayısı 30.6 adet ile Agar Gellan kullanılan besin ortamından elde edilirken en düşük kardeşlenme 3.33 adet ile Carrageenan kullanılan besin ortamından elde edilmiştir. En uzun sürgün uzunluğu 1.16 cm ile Plant Agar içeren besin ortamında meydana gelmiştir. Bunun yanı sıra en uzun kök uzunluğu Bacto Agar içeren besin ortamında 0.76 cm olarak saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *In vitro*, rejenerasyon, yarı katı, agar, sukulent

#### Abstract

Succulent plants have a very important place as ornamental plants because they can store water in their leaves, stems or roots and have a durable structure. Belonging to the *Xanthorrhoeaceae* family, *Haworthia cymbiformis* is a succulent species with high commercial value, used as an ornamental plant and stands out with its advantages such as easy care as well as its aesthetic appearance with its eye-catching leaves.

In recent years, commercial production of ornamental plants can be done by micropropagation. The quality, type and concentration of gelling agents used to make nutrient media semi-solid are the most important factors affecting nutrient uptake and therefore development and proliferation in *In vitro* culture. For the reason explained above, this study aimed to determine the effects of different gelling agents on development.

In the research, 7 different gelling agents were used: Plant agar (9 g/l), Agar (8 g/l), Agar Gellan (4 g/l), Gelzan (2 g/l), Carrageenan (10 g/l), Bacto Agar (8 g/l) and Gelrite (3 g/l). In the experiment, 3 mm long, 2-leaf rootless *in vitro* tiny plantlets were used as explants and cultured for 8 weeks in nutrient media created by adding 7 different gelling agents to MS basal medium supplemented with 1 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA. The experiment was carried out with 3 replications and at the end of the culture, changes in the morphological characteristics of the cultured plantlets were examined. Within the scope of morphological features; the number of shoots per explant (tillering-number), shoot length (cm), root length (cm), rooting rate (%) and vitrification rate (%) parameters were examined and measured.

As a result of the experiment, total the highest number of shoots per explant was obtained from the nutrient medium using Agar Gellan with 30.6 shoots, while the lowest number of shoots was obtained from the nutrient medium using Carrageenan with 3.33 shoots. The longest shoot length was 1.16 cm and occurred in the nutrient medium containing Plant Agar. In addition, the longest root length was determined as 0.76 cm in the nutrient medium containing Bacto Agar.

**Keywords:** *In vitro*, regeneration, semi solid, agar, succulent

Geliş Tarihi: 01.10.2024, Düzeltme Tarihi: 24.10.2024, Kabul Tarihi: 13.11.2024

Adres: <sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 09970, Aydın, Türkiye, <sup>2</sup>Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü.

E-mail: mervekabakci1401@gmail.com

## 1. Giriş

Sukulentler, morfolojik olarak kuraklığa adaptasyonu yüksek olan, çeşitli organlarında su depolayabilen dokuya sahip, yaprakları kalın, etli ve sulu yapıda bitkilerdir (Grace, 2019; Kharrazi vd., 2024). *Asphodelaceae* familyasına ait *Haworthia* cinsinin bitkileri, çok yıllık ve monokotiledon sukulentler grubundadır ve çeşitli türleri Güneydoğu Afrika, Namibya ve Madagaskar'da dağılmıştır (Bayer, 1982; Kharrazi vd., 2024). Düşük ışık koşullarında büyümesi ve kuraklığa dayanıklı olması, estetik görüntüsü nedeniyle iç mekanlarda bakımının sağlanabilmesi bu sukulent grubunu ön plana çıkarmaktadır (Cabahug vd., 2018). Bu familyadan olan *Haworthia cymbiformis* dikkat çekici yaprakları ile süs bitkisi olarak kullanılan ticari değeri yüksek bir sukulent türüdür. *Haworthia cymbiformis* yavrular üretir ve stolonludur; yavruların ayrılması (bölünmesi) ve yaprak çelikleri ile çoğalabilse de, çoğalma kapasitesi o kadar yüksek değildir (Iizumi ve Amaki, 2011). Bu bağlamda bazı süs bitkisi türlerinde hızlı ve kitlesel üretim mikroçoğaltım yani *in vitro* üretim yolu ile sağlanabilmiştir. Mikro çoğaltım yöntemi, bitkilerin ihtiyaç duydukları makro ve mikro elementler, su, şeker, bazı vitaminler ve bitki büyüme düzenleyiciler içeren yapay besin ortamlarında gelişim göstermesiyle, hastalıklardan arı olarak hızlı ve çok miktarda üretimine olanak sağlamaktadır (Charnysh vd., 2016).

Mikroçoğaltım ile üretimde genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu, bitkilerde dokunun fizyolojik olarak yenilenmesi, onarılması veya değiştirilmesi anlamına gelir (Ikeuchi vd., 2016). Rejenerasyon, tek bir dokudaki yarayı onarmaktan, birden fazla dokudan, organdan veya hatta bireylerden oluşabilen tamamen yeni bir yapı geliştirmeye kadar değişebilir (Ikeuchi vd., 2016; Sena, 2014; Mohamed vd., 2021). Bitki rejenerasyonunu etkileyen kimyasal faktörler; *in vitro* kültürde kullanılan besin ortamları, şeker, jel yapıcı maddeler, besin ortamının pH'sı, bitki büyüme düzenleyici maddeler ve fenolik bileşikler olarak sıralanabilmektedir. Bu kimyasal faktörlerin bitki türlerine göre değişmekle birlikte farklı içeriklere sahip olmaları nedeniyle bitki rejenerasyonu üzerinde farklı etkileri mevcuttur.

Kültür ortamına eklenen jel yapıcı maddeler, ortamı katı veya yarı katı hale getirerek sertleştirir ve eksplantların gelişimini sağlayabileceği yüzey oluştururlar. Bu maddeler, kültüre alınan eksplantların solunumu için gerekli havayla teması sürdürmek için gerekli fiziksel desteği sağlaması, büyüme desteklemesi, kültür ortamındaki besin çözünürlüğünü ve eksplantların bu besinleri absorbe etme yeteneğini düzenlemedeki rolleri nedeniyle en önemli unsurlardan biridir (Bhatia ve Ashwath, 2005; Sah vd., 2014; Jain vd., 2009; Nery vd., 2021;

Mohamed vd., 2021; Kim vd., 2023). Tüm bunların yanında jel yapıcı maddelerin türü ve konsantrasyonlarındaki değişiklikler de rejenerasyon kapasitesini etkilemektedir. Çeşitli konsantrasyonlarda jelleştirici maddelerin eklenmesiyle, eksplantlardaki sürgün rejenerasyonu ve sürgün uzunluğu, ortamın nem rejiminin kontrolünün yanında aynı jelleştirici maddenin farklı markaları arasında bile morfolojik tepkilerde farklılıklar bildirilmiştir (Bhatia ve Ashwath, 2005; Sulusoglu, 2014; Das vd., 2015; Repalli vd., 2019; Mohamed vd., 2021; Kim vd., 2023). Ayrıca jel yapıcı maddelerin farklı türleri, kültürdeki sürgünlerin ve yaprakların kırılma hale gelmesine ve camsı bir görünüme (vitrikasyona) sahip olmasına neden olabilirler (Amer ve Omar, 2019; Mohamed vd., 2021).

Bitki doku kültüründe jel yapıcı maddelerden yaygın olarak Agar, Agaroz, Aljinat, Phytigel, Gelrite, Silikajel, Jelatin, Plant Agar, Agar Gellan, Gellan Gum, Gelzan, Carrageenan, Bacto agar ve nişasta kullanılmaktadır (Babaoğlu vd., 2001). Farklı jel yapıcı maddelerin bitki rejenerasyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla çalışmalar yapılmış olup farklı etkiler gösterebileceği belirtilmiştir. Örneğin *Centaurea tchihatcheffii* ve *Papaver rhoeas* tohumlarının *in vitro* kültüründe en yüksek sürgün sayısı agar ile katılaştırılmış ortamlardan elde edilmiştir (Tıprıdamaz vd., 2006; Akın, 2011). Soare (2008) *Pteridophyta* bölümüne ait eğrelti türlerinde sporofit ve gametofit farklılaşmasındaki değişimlerinde, agar kullanılan besin ortamının daha geniş kolonilerin oluşumunda fiziksel olarak destek sağladığını belirtmiştir. Selluka (İzmir sarmaşığı) *Vigna caracalla* L. Verdc. tohumlarının Gelrite veya Plant Agar içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmasının sonucunda en yüksek kök rejenerasyonu, en yüksek çoğaltım katsayısı ve yaprak boyu Plant Agar içeren besin ortamında meydana gelirken çoklu sürgünler Gelrite ilave edilen MS besin ortamında meydana gelmiştir (Güngör vd., 2020). *Liriope platyphylla*, meristem eksplantlarının *in vitro* kültüründe Gellan gum, Plant agara göre sürgün rejenerasyonu ve sürgün uzunluğu açısından daha iyi bir performans gösterdiği belirtilmiştir (Kim vd., 2023). *Haworthia fasciata* Haw., *Haworthia fasciata* 'Alba', *Haworthia koelmaniorum*, *Haworthia limifolia*, *Haworthia cymbiformis* (Haw.) Duval ve *Haworthia turgida* Haw. türlerinin mikroçoğaltım aşamalarında jel yapıcı madde olarak agar ve agarın farklı konsantrasyonları (7 g/l, 8 g/l, 10 g/l) besin ortamına eklenerek başarılı sonuçlara ulaşılmıştır (Beyl ve Sharma, 1983; Mycock vd., 1997; Lizumi ve Amaki, 2011; Liu vd., 2017; Solmaz, 2022). *Haworthia splendens* türünün mikroçoğaltımında ise besin ortamını jelleştirmek amacıyla Gelrite (2 g/l) kullanılmış ve kallus oluşumu meydana gelmiştir (Reshma vd., 2020).

Bu çalışmada *Haworthia cymbiformis* (Haw.) Duval türünün *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımında farklı içerikteki jel yapıcı maddelerin eksplantlarda sürgün rejenerasyonuna

etkisinin belirlenmesi, birbirleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada ayrıca jel yapıcı maddelerin sürgün gelişimi üzerine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

## 1. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Materyal

Araştırma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait Süs Bitkileri Islahı ve Yetiştiriciliği Anabilim Dalı doku kültürü laboratuvarında Eylül- Kasım 2023 döneminde yürütülmüştür. Bitkisel materyal olarak daha önce doku kültüründe yetiştirilmiş *Haworthia cymbiformis* (Haw.) Duval türüne ait 3 mm boyunda 2 yapraklı *in vitro* köksüz yavru sürgünler (bitkicikler) eksplant olarak kullanılmıştır. Denemede jel yapıcı madde olarak Plant Agar, Agar, Agar Gellan, Gelzan, Carrageenan, Bacto Agar ve Gelrite kullanılmıştır.

### 2.2. Yöntem

*Haworthia cymbiformis* (Haw.) Duval türünün farklı jel yapıcı maddeler kullanılarak *in vitro* koşullarda kültüre alınması sonucu jel yapıcıların regenerasyon etkisini belirlemek amacı ile öncelikli olarak besin ortamlarının hazırlanması ile işe başlanmıştır.

#### 2.2.1. Besin ortamı hazırlanması

*In vitro* çalışmalar için kullanılan tüm besin ortamları ve kullanılan malzemeler aseptik koşullar altında hazırlanmıştır. Deneme besin ortamlarının hazırlanmasında hazır MS besin ortamına 1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA ilave edilmiş ve karbon kaynağı olarak 30 g/l sakkaroz kullanılmıştır. Bu bazal MS ortamına 7 farklı jel yapıcı madde eklenmiştir. Jel yapıcı madde olarak Plant agar (9 g/l), Agar (8 g/l), Agar Gellan (4 g/l), Gelzan (2 g/l), Carrageenan (10 g/l), Bacto Agar (8 g/l) ve Gelrite (3 g/l) kullanılmıştır. Bütün uygulamalarda, besin ortamı otoklavlanma işleminden önce pH 5.7' ye ayarlanmıştır. Besin ortamlarına eklenen jel yapıcı maddelerin erimesi için mikrodalgadan yararlanılmış olup kültür kabı olarak 330 ml'lik cam kavanozlar tercih edilmiştir. Hazırlanan besin ortamları kültür kaplarına 40 ml olacak şekilde döküldükten sonra sterilizasyonu 121°C sıcaklıkta 20 dk süre ile 1.2 atmosfer basınçta otoklavda gerçekleştirilmiştir.

#### 2.2.2. Eksplantların kültüre alınması

Her her bir kültür kabına, *in vitro* koşullarda çoğaltılan, 3 mm boyunda ve 2 yaprak bulunduran 3'er adet köksüz yavru bitkicikler (sürgünler) kültüre alınmış, her bir kültür kabı 1 tekerrür olarak kabul edilmiştir. Kültüre alınmış eksplantlar, 1200 lüks ışık şiddeti altında, 14

saat/gün aydınlık ortamda, 24±2°C sıcaklıkta ve nisbi nemi %65±5 olan kültür odasında 8 hafta süresince inkübe edilmişlerdir.

### 2.2.3. Çalışmada İncelenen Parametreler

Araştırmada 7 farklı jel yapıcı maddenin etkisini belirlemek amacıyla oluşturulan besin ortamlarında 8 hafta kültüre alınan bitkiciklerin morfolojik özelliklerindeki değişimler incelenmiştir. Morfolojik özellikler kapsamında; eksplant başına yavru bitki adedi (kardeş sayısı/eksplant) (adet), sürgün boyu (cm), I. boy (2.0 cm<), II. boy (1.0-2.0 cm), III. boy (1.0 cm>) yavru bitki adedi, kök uzunluğu (cm), köklenme oranı (%) ve vitrifikasyon oranı (%) parametreleri incelenerek ölçümleri yapılmıştır. Kültüre alınan bitkiciklerin her birinin oluşturduğu sürgünleri ayrılarak sürgün boyu cetvel ile ölçülerek ortalamaları alınmıştır. Ayrıca sürgün boyu ölçümlerinde sürgünler büyük boy (2.0 cm<), orta boy(1-2 cm), küçük boy (1 cm>) olarak gruplandırılarak adetleri belirlenmiştir. Eksplantlarda kök oluşturanların adedi belirlenerek köklenme oranı (köklenen eksplant/dikilen eksplant\*100) ve oluşan en uzun kökün uzunluğu (cm) ölçülmüştür. Vitrifikasyon oranı da camsılaşma gösteren eksplant adedinin /dikilen eksplanta oranının yüzdesi olarak belirlenmiştir.

Deneme tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olacak şekilde kurulmuştur. Denemeden elde edilen veriler SPSS programında varyans analizine tabi tutulmuş, ortalamalar Duncan çoklu testi ile  $p \leq 0.05$  seviyesinde karşılaştırılmıştır.

### 3. Bulgular

*Haworthia cymbiformis* (Haw.) Duval türünün *in vitro* çoğaltımında 7 farklı jel yapıcı maddenin sürgün rejenerasyonu üzerinde etkisini belirlemek amacıyla yapılan araştırmada incelenen parametrelerden elde edilen istatistiki analiz sonuçları Çizelge 1’de verilmiştir.

*Haworthia cymbiformis* türünün *in vitro* çoğaltımında 7 farklı jel yapıcı maddenin sürgün rejenerasyonu üzerinde etkisini belirlemek amacıyla kültüre alınması sonucunda eksplant başına yeni oluşan yavru bitki sayısı bakımından en yüksek kardeşlenme meydana gelen besin ortamı içeriği 30.66 ile Agar Gellan kullanılan besin ortamıdır. Agar Gellan içeriğinden sonra önemli kardeşlenme sayısına sahip besin ortamları Bacto Agar, Gelzan ve Agar içeren besin ortamlarında karşılaşılmıştır. En düşük yavru bitki oluşumu ise 3.33 adetle Carrageenan ile jelleştirilmiş besin ortamından elde edilmiştir (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** *Haworthia cymbiformis* türünün *in vitro* kültüründe farklı jel yapıcı maddelerin etkileri.

UYGULAMA	EBYS (adet)	SB (cm)	I.Boy sürgün 2 cm< (adet/eksp)	II.Boy sürgün 1-2 cm	III.Boy sürgün 1 cm>	KU (cm)	KO (%)	VO (%)
----------	----------------	------------	--------------------------------------	----------------------------	----------------------------	------------	-----------	-----------

				(adet/eksp)	(adet/eksp)			
Plant agar	13.77bc	3.50	4.11	5.77abc	3.89b	2.26	100	0
Agar	15.77b	1.96	2.66	3.44abc	9.66b	1.16	100	0
Agar Gellan	30.66a	2.13	1.00	6.55ab	23.11a	1.06	100	20
Gelzan	17.55b	2.53	0.89	8.33a	8.33b	1.63	75	0
Carrageenan	3.33c	1.83	0.55	0.66c	2.11b	0.50	25	25
Bacto Agar	18.00b	3.23	3.11	6.44ab	8.44b	2.30	60	20
Gelrite	9.89bc	2.26	0.11	2.11bc	7.66b	0.70	60	60

EBYS: eksplant başına yavru bitki sayısı ( kardeş adedi/eksplant), SB: sürgün boyu, KU: kök uzunluğu, KO: köklenme oranı, VO: vitrifikasyon oranı

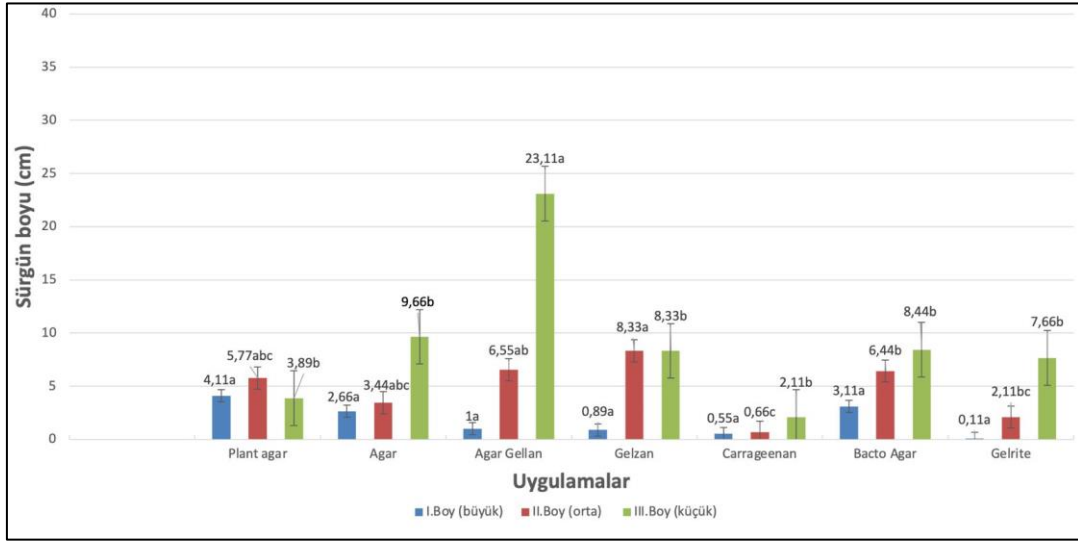
*Haworthia cymbiformis* türünün kültüre alınan bitkiciklerinin her birinin oluşturduğu sürgünleri ayrılarak elde edilen verilerin istatistiki analizi sonucunda en uzun sürgün boyu Plant Agar içeren besin ortamında 3.50 cm olarak elde edilmiştir. Plant Agar uygulamasından sonra sürgün boyu olarak Bacto Agar, Gelzan ve Gelrite ön plana çıkmıştır. En düşük sürgün boyu değeri 1.83 cm olarak Carrageenan içeriğine sahip besin ortamında meydana gelmiştir (Çizelge 1). En fazla yeni kardeş adedine sahip Agar Gellan besin ortamında elde edilen bitkiciklerin görünümü Şekil 1’de verilmiştir.



**Şekil 1.** *Haworthia cymbiformis* türünde en fazla yeni sürgün oluşan agar gellan besin ortamından elde edilen bitkiciklerin görünümü.

Kültürdeki eksplantlarda oluşan yeni yavru bitkilerin boy gelişimlerinin belirlenmesi amacı ile sürgün boyları 3 farklı boyda ölçülerek eksplant başına sayıları belirlenmiştir. Birinci boy (2 cm’den büyük) yavru bitki sayısı en fazla 4.11 adet/eksplant ile Plant Agar kullanılan besin ortamında meydana gelmiştir. İkinci boy olarak yani 1-2 cm arasındaki boya sahip yavru bitki sayısı belirlenmiş ve bu boy aralığına sahip sürgünler Gelzan besin ortamında 8.33 adet/eksplant olarak saptanmıştır. 1 cm’den küçük sürgün uzunluğuna sahip üçüncü boy yavru

bitki ise en fazla 23.11 adet/eksplant ile Agar Gellan besin ortamında meydana gelmiştir (Şekil 2).



**Şekil 2.** *Haworthia cymbiformis* türünün in vitro kültüründe büyük, orta ve küçük sürgün boyuna sahip yavru bitki adetlerinin uygulamalara göre değişimi

*Haworthia cymbiformis* türünün kültüre alınan bitkiciklerinde köklenme meydana gelmiştir. Her uygulamada bitkiciklerde oluşan kök parçalarının en uzununu cetvel ile ölçülerek alınan verilerin istatistiksel analiz sonucuna bakıldığında kök uzunluğunun elde edildiği uygulama Bacto Agar içeren besin ortamında 2.30 cm olarak belirlenmiştir. Bacto Agar içeren besin ortamını 2.26 cm ile Plant Agar ve 1.63 cm ile Gelzan takip etmiştir. Bununla birlikte uygulamalar içinde en düşük kök uzunluğu Carrageenan içeren uygulamada 0.50 cm olarak meydana gelmiştir. Kök uzunluğunun yanısıra tekerrürlerde kök oluşturan kültürler yüzde olarak hesaplanmıştır. Uygulamalar arasında %100 köklenme oranına sahip besin ortamları Plant Agar, Agar ve Agar Gellan içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. En düşük köklenme oranına sahip besin ortamı % 25 köklenme oranı ile Carrageenan kullanılan besin ortamında meydana gelmiştir (Çizelge 1).

Bir diğer parametre olan vitrifikasyon oranında istatistiksel analiz yapılmamış olup tekerrürlerde vitrifikasyon oranı hesaplanmıştır. Bu bağlamda elde edilen sonuçlara bakıldığında en yüksek vitrifikasyon oranı % 60 ile Gelrite bulunan besin ortamında meydana gelmiştir. Bununla birlikte hiç vitrifikasyona uğramayan besin ortamları da bulunmaktadır. Vitrifikasyon oranı %0 olan besin ortamları ise Plant Agar, Agar ve Gelzan içeren besin ortamları olmuştur (Çizelge 1). Vitrifikasyon oranı en yüksek çıkan Gelrite içeren besin ortamı Şekil 3’de verilmiştir.



**Şekil 3.** *Haworthia cymbiformis* türünün *in vitro* kültüründe en yüksek vitrifikasyon meydana gelen gelrite içeren besin kültür ortamının da sürgünlerin görünümü

#### 4. Tartışma ve Sonuç

*In vitro* kültürde bitkilerde dokunun yenilenmesi, onarılması veya değiştirilmesiyle sağlanan bitki rejenerasyonu için en önemli faktör besin ortamları ve bu besin ortamlarının içeriğidir. Besin ortamlarını, makro ve mikro elementler, su, şeker, jel yapıcı maddeler, bitki büyüme düzenleyiciler, besin ortamının pH'sı oluşturmaktadır. *In vitro* kültürde bitki rejenerasyonunu etkileyen kimyasal faktörlerin içerikleri ve konsantrasyonu rejenerasyon üzerine farklı etkileri bulunmaktadır. Jel yapıcı maddeler kültür ortamının kimyasal ve fiziksel özelliklerini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Jel yapıcı maddeler besin ortamını katılaştırarak ortamın difüzyon özelliklerini etkiler bununla birlikte eksplantlara fiziksel destek sağlar.

Doku kültüründe besin ortamlarına eklenen bitki büyüme düzenleyicilerin bitki rejenerasyonunda yerin oldukça önemlidir. Bu çalışmada MS bazal ortamına 1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA kombinasyonu eklenerek eksplantların gelişebileceği besin ortamı sağlanmış ve farklı jel yapıcı maddelerin etkilerinin belirlenmeleri sağlanmıştır. Sitokinin grubuna dahil olan maddeler, özellikle de BAP hücre bölünmesini, aksilar ve adventif sürgün oluşumunu teşvik ederken, kök gelişimini engeller (Pierik 1989; Gürel vd., 2013; Eken, 2019). Oksin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinden NAA ise hücre uzaması ile kallus oluşumunu teşvik etmek ve kök farklılaşmasını sağlamak amacıyla kullanılırlar (Gürel vd., 2013; Eken, 2019). Yapılan bu çalışmada *Haworthia cymbiformis* türünün *in vitro* kültüründe MS besin ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyiciler ile 8 hafta kültürde kalan eksplantlarda rejenerasyon, kallus farklılaşması ve kök oluşumu gerçekleşmiştir. Nitekim benzer şekilde yapılmış olan bir



çalışmada *Haworthia truncata* türünün *in vitro* kültüründe MS besin ortamına eklenen 1 mg/l BA konsantrasyonu rejenerasyon yüzdesini ve rejenerasyon eksplant sayısını önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Kharrazi vd., 2024).

*Haworthia cymbiformis* mikroçoğaltımında jel yapıcı maddelerin sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek için yapılan deneme sonucunda en fazla eksplant başına yavru bitki sayısı (kardeşlenme) 30.6 adet ile Agar Gellan kullanılan besin ortamından elde edilmiştir. Agar ve Gellan Gum poliploidleşme yoluyla *Arabidopsis thaliana*'daki kök uzamasındaki değişimi farklı şekilde etkilediğini göstermeyi ve farklılıklara neden olan temel faktörleri açıklamak için her bir jelleştirici maddedeki fiziko-kimyasal parametreleri incelemeyi amaçlayan bir çalışmada agar, poliploidilerin kök uzamasını Gellan Gum kullanılan ortama göre daha fazla teşvik ettiği bildirilmiştir. Bunun sebebinin agar ortamının su potansiyeli ve jel sertliği, Gellan Gum ortamından önemli ölçüde daha yüksek olması dolayısıyla meydana geldiğini belirtmişlerdir (Kikuchi vd., 2023). İki farklı pirinç çeşidinde (Sakha104 ve Giza178) rejenerasyonun çeşitli aşamaları üzerinde farklı jelleştirici maddelerin etkisi araştırılmış ve sonuç olarak Gellan Gum kullanılan ortam kallus rejenerasyonu için Agar ve Bacto Agara göre üstün olduğunu gösterdiği belirtilmiştir (Mohamed vd., 2021). *Rosa hybrida*, *Cordyline fruticosa* ve *Homalomena* sürgün kültürleri için farklı jel oluşturu maddelerle katılaştırılmış MS ortamlarında *in vitro* kültüre alınmış ve bu maddelerin hiçbir türün çoğalma oranını önemli ölçüde etkilemediğini belirtmişlerdir. Ancak 3.5 g/l Gellan Gum, *Homalomena* ve *Rosa hybrida* sürgün uzunluğunu; *Cordyline fruticosa* sürgünlerinin taze ağırlığını artırdığı bildirilmiştir (Podwyszynska ve Olszewski, 1995). Benzer jel yapıcı maddelerin besin ortamı içeriğine eklenmesiyle yapılan başka bir çalışmada ise *Liriope platyphylla*, meristem eksplantlarından bitki sürgünü organogenezi için MS ortamına eklenen Gellan Gum sürgün rejenerasyonu ve sürgün uzunluğu açısından iyi bir performans gösterdi. Gellan Gum 3 g/l kullanıldığında maksimum sürgün sayısı eksplant (5.8 adet) ve en uzun sürgün (45.8 mm) gözlenmiştir (Kim vd., 2023). Nitekim yapılan bu araştırma da 4 g/l Agar Gellan içeren MS besin ortamında en yüksek kardeşlenme sağlanmıştır.

Yapılan çalışmada *Haworthia cymbiformis* *in vitro* kültüründe en düşük kardeşlenme 3.33 adet ile Carrageenan kullanılan besin ortamından elde edilmiştir. *Comanthera mucugensis*'in çoğaltılmasında alternatif bir jelleştirici madde olarak  $\kappa$ -karragenan'ın etkisini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada tohumlar ve gövde eksplantları, 7 g/l konsantrasyonda  $\kappa$ -karragenan ile jelleştirilmiş ortamda kültüre alınmış ve sonuç olarak  $\kappa$ -karragenan içeren ortamda yetiştirilen bitkilerin uzunluğunda bir artış gösterdiğini, doğrudan organogenezi iyileştirdiği ve sürgün oluşumunu teşvik ettiğini göstermiştir. Ayrıca,  $\kappa$ -

karragenan ile jelleştirme, kallus oluşumunun sıklığını artırmada etkili olduğu gibi en yüksek kallus rejenerasyonunu ve eksplant başına sürgün sayısını da sağladığını belirtmişlerdir (Carmo vd., 2023). Fakat 7 Farklı jel yapıcı maddenin rejenerasyon üzerine etkisinin karşılaştırıldığı bu çalışmada Carrageenan kullanılan besin ortamında incelenen tüm parametrelerde en düşük veriler elde edilmiştir. Bunun sebebi çalışmada MS besin ortamına 10g/l Carrageenan eklenmiş olması ve konsantrasyonunun yüksek gelmesi olabileceği düşünülmektedir. *In vitro* kültürde jel yapıcı maddenin türünün yanısıra konsantrasyonu da önemli bir etkidir. Yapılacak yeni çalışmalarda farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı çalışmalar planlanabileceği önerilebilmektedir.

Jel yapıcı maddelerin etkisinin belirlendiği bu çalışmada en uzun sürgün boyu 3.50 cm ile Plant Agar içeren besin ortamında meydana gelmiştir. *Vigna caracalla* tohumlarının 7 g/l Plant Agar içeren besin ortamında kültüre alınmasının sonucunda sürgün ucu eksplantlarında en yüksek kök rejenerasyonu ve en yüksek çoğaltım katsayısı ve yaprak boyu besin ortamında meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca Plant Agar içeren MS besin ortamlarında kardeş sürgünler oluştuğu gözlemlenmiştir (Güngör vd., 2020). Nitekim yapılan bu çalışmada da en uzun sürgün boyunun yanında Plant Agar içeren besin ortamı en uzun kök uzunluğu olarak ikinci sırada yer almaktadır. Bu bağlamda çalışma bildirişle uyumlu sonuç vermiştir.

Yürütülen araştırma da diğer bir incelen parametre sonucu olarak en uzun kök uzunluğu Bacto Agar içeren besin ortamında 2.30 cm olarak saptanmıştır. *Juglans regia* L.'nin *in vitro* kültüründe Saadat vd. (2002) Difco Bacto agar jel yapıcı madde olarak kullanmış ve eksplantların rejenerasyon oranı ve gelişiminde önemli bir fark olmadığını saptamıştır. Buna karşılık, 2 farklı pirinç çeşidinde yapılan bir çalışmada sürgün rejenerasyonu için farklı jelleştirici maddeler arasında Bacto agar ile katlaştırılmış ortamın agardan önemli ölçüde daha yüksek kök rejenerasyonuna yol açtığı bulunduğu bildirilmiştir (Mohamed vd., 2021). Nitekim araştırmada da agara göre Bacto agar kök rejenerasyonunda önemli sonuç vermiştir.

Jel yapıcı maddelerin farklı türlerinin doku kültüründe kullanımında eksplantların şeffaf, kırılkan ve camsı bir görünüme (vitrifikasyona) neden olması istenmeyen bir durumdur. Gelrite içeren besin ortamında %60 vitrifikasyon oranı en yüksek vitrifikasyon durumu olarak meydana gelmiştir. Plant Agar, Agar ve Gelzan içeren besin ortamlarında hiç vitrifikasyon eksplant ortaya çıkmaması bu jel yapıcı maddelerin avantajlı olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak; *Haworthia cymbiformis in vitro* kültüründe 7 farklı jel yapıcı maddenin sürgün rejenerasyonu üzerinde etkisini belirlemek amacıyla yürütülen bu çalışmada kullanılan jel yapıcı maddelerin mikroçoğaltımda farklı etkileri olduğu belirlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısının Agar Gellan, en uzun sürgün boyunun Plant agar ve en uzun kök

uzunluğunun Bacto agar içeren besin ortamlarında en iyi çıkması *in vitro* kültürde agar türevlerinin daha iyi sonuç verdiğini göstermektedir. İncelenen tüm parametrelerde Carrageenan içeren besin ortamında en düşük sonuç vermesi besin ortamına eklenen Carrageenan konstrasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Jel yapıcı maddelerin *in vitro* kültürde bitki rejenerasyonu üzerinde etkisinin belirlenmesi sadece jel yapıcı maddelerin çeşitlerine değil, aynı zamanda besin ortamına eklenen konstrasyonlarına da bağlı olabilmektedir. Bununla birlikte *in vitro* kültürde tüm koşullar optimum sağlansa bile genotipe bağlı olarak sonuçların farklılık verebileceği unutulmamalıdır.

### **Teşekkür**

Bu çalışma VIII. Ulusal Süs Bitkileri Kongresinde sözlü sunum olarak sunulmuştur.

## Kaynaklar

- Akın, B. (2011). *Papaver rhoeas* tohumlarının *in vitro* ortamda çimlenmesi üzerine farklı uygulamaların etkileri. *Journal of Science and Technology of Dumlupınar University*, (026), 17-24.
- Amer, A., & Omar, H. (2019). In-vitro propagation of the multipurpose Egyptian medicinal plant *Pimpinella anisum*. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 18, 254–262. [https://doi.org/10.4103/epj.epj\\_12\\_19](https://doi.org/10.4103/epj.epj_12_19)
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., & Akbudak, M. A. (2001). Doku kültürü: temel laboratuvar teknikleri. *Bitki Biyoteknolojisi*, 1, 1-35.
- Bayer, M. B. (1982). *The new Haworthia handbook*. National Botanic Gardens of South Africa.
- Beyl, C. A., & Sharma, G. C. (1983). Picloram induced somatic embryogenesis in *Gasteria* and *Haworthia*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2, 123-132.
- Bhatia, P., & Ashwath, N. (2005). Effect of medium pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of tomato. *Biotechnology*, 4(1), 7-10. <https://doi.org/10.3923/biotech.2005.7.10>
- Cabahug, R. A. M., Nam, S. Y., Lim, K. B., Jeon, J. K., & Hwang, Y. J. (2018). Propagation techniques for ornamental succulents. *Flower Research Journal*, 26 (3), 90-101.
- Carmo, L. P., Moura, C. W. D. N., & Lima-Brito, A. (2023). Kültür ortamının K-Karragenan ile jelleşmesi, *Comanthera mucugensis* 'in (Giul.) *in vitro* üretiminin maliyetini iyileştirir ve azaltır. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 66, e23230191.
- Charnysh, M., Batuleu, A. V., & Demidchik, V. (2016). The effect of brassinosteroids on growth and development of *Phalenopsis* protocorm-like bodies.
- Das, N., Tripathi, N., Basu, S., Bose, C., Maitra, S., & Khurana, S. (2015). Progress in the development of gelling agents for improved culturability of microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 6, 698. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00698>
- Eken, L., Kabakçı, M., Dayar, İ., Şirin, U., & Özzambak, M. E. (2019). The effects of epibrassinolide and some other plant growth regulators on micropropagation of *Limonium sinuatum* (L.) Mill. *Researches in Landscape and Ornamental Plants*, 179-196.
- Grace, O. M. (2019). Succulent plant diversity as natural capital. *Plants, People, Planet*, 1 (4), 336-345.

- Güngör, H. H., Güler, B., Bayraktar, M., & Gürel, A. (2020). *Vigna caracalla* L. Verde bitkisinde *in vitro* klonal mikroçoğaltım. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 20 (4), 753-767.
- Gürel, A., Hayta, Ş., Nartop, P., Bayraktar, M., & Fedekar. (2013). Bitki Hücre ve Organ Kültürü Uygulamaları. Ege Üniversitesi Yayınları No.58.
- Iizumi, M., & Amaki, W. (2011). Micropropagation of *Haworthia cymbiformis* through thin-cell-layer tissue culture. In Comb. Proc. Int. Plant Propagators' Soc (Vol. 61, pp. 288-291).
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. Development, 143(9), 1442-1451.
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. Development, 143, 1442–1451. <https://doi.org/10.1242/dev.134668>
- Jain, A., Poling, M. D., Smith, A. P., Nagarajan, V. K., Lahner, B., Meagher, R. B., & Raghothama, K. G. (2009). Variations in the composition of gelling agents affect morphophysiological and molecular responses to deficiencies of phosphate and other nutrients. Plant Physiology, 150, 1033–1049. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136184>
- Kharrazi, M., Moghaddam, Z. S., Moradian, M., Safari, N., Khadem, A., & Sharifi, A. (2024). Optimization of the in-vitro culture protocol of *Haworthiopsis viscosa* and *Haworthia truncata* var. truncate. South African Journal of Botany, 169, 506-514.
- Kikuchi, S., Horiuchi, A., Nishimoto, Y., & Iwamoto, A. (2023). Different effects of gellan gum and agar on change in root elongation in *Arabidopsis thaliana* by polyploidization: The key role of aluminum. Journal of Plant Research, 136(2), 253-263.
- Kim, Y. C., Park, W. T., Sathasivam, R., Kim, H. H., Kim, J. K., & Park, S. U. (2023). Effect of media and gelling agents on shoot organogenesis of *Liriope platyphylla*. Journal of Phytology, 15, 52-56.
- Liu, B. L., Fang, H. Z., Meng, C. R., Chen, M., Chai, Q. D., Zhang, K., & Liu, S. J. (2017). Establishment of a rapid and efficient micropropagation system for succulent plant *Haworthia turgida*. HortScience, 52, 1278–1282.
- Mohamed, G. M., Amer, A. M., Osman, N. H., Sedick, M. Z., & Hussein, M. H. (2021). Effects of different gelling agents on the different stages of rice regeneration in two rice cultivars. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(10), 5738-5744.

- Mycock, D. J., Watt, M. P., Hannweg, K. F., Naicker, K., Makwarela, M., & Berjak, P. (1997). Somatic embryogenesis of two indigenous South African *Haworthia* spp. (*H. limifolia* and *H. koelmaniorum*). *South African Journal of Botany*, 63(6), 345-350.
- Nery, L. A., Batista, D. S., Rocha, D. I., Sérgio, H. S. F., Matheus da Costa, Q., Priscila, O. S., Marília, C. V., & Wagner, C. O. (2021). Leaf development and anatomy of *in vitro*-grown *Polygala paniculata* L. are affected by light quality, gelling agents, and sucrose. *Vegetos*, 34, 19–28. <https://doi.org/10.1007/s42535-021-00192-3>
- Pierik, R. L. M. (1989). *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers.
- Podwyszynska, M., & Olszewski, T. (1995). Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordyline and homalomena. *Scientia Horticulturae*, 64(1-2), 77-84.
- Repalli, S. K., Geda, C. K., Pradhan, N. S., & Rao, G. N. (2019). Influence of additional nutrients and gelling agents on *in vitro* response of selected Indica rice varieties. *International Journal of Biology*, 11, 26. <https://doi.org/10.5539/ijb.v11n4p26>
- Reshma, Y., Mazharul, M. I., Kim, H., Kim, C., & Lim, K. (2020). Role of growth regulators in the somatic organogenesis of *Haworthia* inflorescences *in vitro*. *Horticultural Science and Technology*, 38(3), 394-404.
- Saadat, Y. A., & Hennerty, M. J. (2002). Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Horticulturae*, 95 (3), 251-260.
- Sah, S. K., Kaur, A., & Jagdeep, S. S. (2014). High frequency embryogenic callus induction and whole plant regeneration in Japonica rice Cv. kitaake. *Journal of Rice Research*, 2, 125. <https://doi.org/10.4172/JRR.1000125>
- Sena, G. (2014). Stem cells and regeneration in plants. *Nephron Experimental Nephrology*, 126, 35–39. <https://doi.org/10.1159/000360658>
- Soare, L. C. (2008). Birkaç eğrelti otu türünde gametofit ve sporofitin *in vitro* gelişimi. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36 (1), 13-19.
- Solmaz, E. (2022). Zebra kaktüsü (*Haworthia* sp.)'nün doku kültürü yöntemi ile çoğaltımı üzerine araştırmalar (Master's thesis, Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Sulusoglu, M. (2014). Effects of agar types on rooting performance in tissue culture: Sample of Quince A rootstock cultures. *Turkish Journal of Agriculture and Natural Sciences*, Special (1). Available at: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/142207>
- Tıprıdamaz, R., Özkum, D., Özbek, N., & Ellialtıoğlu, Ş. (2006). *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. et Mey.'in doku kültürü yoluyla üretimi üzerinde araştırmalar. (Editör: A. Boşgelmez). Gölbaşı Mogan Gölü, Andezit Taşı, *Centaurea tchihatcheffii*, s: 569-579.