

PAPER DETAILS

TITLE: BITKİ BİYOÇESİTLİLİĞİNİN KORUNMASINDA BİYOTEKNOLOJİNİN KULLANIMI VE
TÜRKİYE'DEKİ ÇALIŞMALAR

AUTHORS: Betül BÜRÜN

PAGES: 1-16

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/759757>



DERLEME / REVIEW

BİTKİ BİYOÇEŞİTLİLİĞİNİN KORUNMASINDA BİYOTEKNOLOJİNİN KULLANIMI VE
TÜRKİYE’DEKİ ÇALIŞMALAR

Betül BÜRÜN *

¹ Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, Türkiye

ÖZET

Doğa, çeşitli faktörlerin etkisi ile tahrip edilmekte bu da biyoçeşitlilik kayıplarına neden olmaktadır. Biyoçeşitlilik kayıplarının dünyada ciddi bir problem olması nedeniyle Uluslararası Doğayı Koruma Birliği (IUCN) bu konuda birtakım çalışmalar yapmaktadır. Biyoçeşitlilik kayıplarını önlemek için *in situ* ve *ex situ* koruma stratejileri geliştirilmiştir. *Ex situ* korumada, tohum gen bankaları ve arazide bitki koleksiyonları uygulamaları gibi geleneksel yöntemlerin yanısıra modern yöntemlerin de önemli bir yeri vardır. Özellikle yok olma tehlikesi altında olan türlerin korunmasında *ex situ* koruma stratejileri kapsamında *in vitro* teknolojinin kullanılması önemli avantajlar sunmaktadır. Bitki materyalini toplamada, çoğaltmada, uluslararası değişimde ve muhafaza etmede *in vitro* tekniklerden yararlanılmaktadır. Bu derlemede, *in vitro* teknikler kullanarak bitki biyoçeşitliliğinin korunması ve Türkiye’deki çalışmalar sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Bitki doku kültürleri, *Ex situ* koruma, *in vitro* depolama, Mikroçoğaltım, Doğal türler

THE USE OF BIOTECHNOLOGY IN CONSERVATION OF PLANT BIODIVERSITY AND
STUDIES IN TURKEY

ABSTRACT

Nature is destroyed by the influence of various factors and this causes biodiversity losses. Biodiversity losses are a serious problem in the world and the International Union for Conservation of Nature (IUCN) carries out some studies on this subject. *In situ* and *ex situ* conservation strategies have been developed to prevent biodiversity losses. In *ex situ* conservation, modern methods have an important role as well as traditional methods such as seed gene banks and plant collections in the field. The use of *in vitro* technology within the scope of *ex-situ* conservation strategies for the preservation of species under threat of extinction in particular offers significant advantages. *In vitro* techniques are used for collecting, propagating, international exchange and storage of plant material. In this review, the conservation of plant biodiversity using *in vitro* techniques and studies in Turkey are presented.

Keywords: Plant tissue culture, *Ex situ* conservation, *in vitro* storage, Micropropagation, Native species

1. GİRİŞ

Biyolojik çeşitlilik (biyoçeşitlilik); bir yaşam ortamındaki canlı türlerin, bunlara ait genel özelliklerin, habitatların ve bu habitatlarda cereyan eden ekolojik ilişkilerin zenginliğini ifade eden bir kavramdır. Kısaca bir bölgedeki genlerin, türlerin, ekosistemlerin ve ekolojik olayların oluşturduğu bir bütündür. Biyoçeşitlilikte bazı kayıplar olmaktadır ve bunlar habitat kaybolması, tür kaybolması ve tür içi genetik çeşitliliğin azalması olarak belirtilebilir [1]. Biyoçeşitlilik kaybına sebep olan etkenler, canlı türlerinin yaşadığı habitatların parçalanması ve/veya bozulması, toprak, su ve hava kirlenmesi, ekzotik tür ve yeni varyetelerin getirilmesi, aşırı toplama ve hayvan otlatma, kentleşme, nüfus artışı, endüstriyel tarım ve endüstriyel ormancılık, erozyona sebep olan yanlış tarım uygulamaları, küresel iklim değişikliği, ormanları yok etme vb.’dir [2-8]. Uluslararası Doğayı ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği (IUCN-

*Sorumlu Yazar: bbetul@mu.edu.tr

Geliş: 11.07.2019 Yayın: 25.01.2021

International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) dünyada var olan bitki türlerinin üçte birinin farklı düzeylerde tehlike altında olduğunu belirtmektedir [6]. Ayrıca dünyadaki bitki türlerinin %50'den daha fazlasının 34 küresel biyoçeşitlilik sıcak noktalarına (GBH-Global Biodiversity Hotspots) endemik olduğu belirtilerek artan yokolma tehlikesi nedeniyle IUCN tehdit altında olan bitkilerin listesini (kırmızı liste) ilk kez 1998'de yayımlamış [9] ve 2013'de listelenen 18292 türden 10065'i tehdit altında olarak verilmiştir [10]. Yok olma tehlikesi altında olan türleri korumak için de *in situ* (yerinde, doğal habitatı içinde) koruma ve *ex situ* (doğal habitatı dışında) koruma stratejileri geliştirilmiştir. *Ex situ* koruma ile tehdit ve tehlike altında olan biyoçeşitlilik öğelerinden tür çeşitliliği ve genetik çeşitlilik koruma altına alınabilmektedir ancak, ekosistem çeşitliliğinin *ex situ* korunması mümkün değildir [1]. *Ex situ* koruma, arboretumlar, botanik bahçeleri, arazi koleksiyonları, tohum bahçeleri, tohum depolama, doku kültürü teknikleri/in vitro gen bankaları, DNA bankaları ve polen depolamanın yanı sıra bitki materyallerinin çeşitli kısımlarının kültürü ile kısa, orta ve uzun süreli depolanmasıyla olmaktadır [8]. *Ex situ* koruma stratejileri kapsamında doğal türlerin çoğaltılması çalışmaları da önemli bir yer tutmaktadır ve çoğaltma çalışmalarında tohum bankalarından da yararlanılmaktadır. Ancak tohum bankalarından yararlanılması mümkün olmayan türlere ait genetik çeşitliliği korumada, in vitro teknolojinin kullanılması (örneğin mikroçoğaltım) önemli bir avantaj olmaktadır [11].

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeşitli etkenlerin sonucu olarak biyoçeşitliliğin ve endemik türlerin kaybolma tehlikesi ile yüz yüze kalınmış ve korunması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Ülkemizde 1960'lı yıllarda "Bitki Genetik Kaynakların/Çeşitliliğin Muhafazası Ulusal Programı" ile bitki biyoçeşitliliğini *in situ* ve *ex situ* koruma çalışmaları başlamış ve devam etmektedir. Ulusal Bitki Genetik Kaynakları Araştırma Programı Çerçevesinde, Türkiye'nin endemik türlerinin toplanması ve korunması sürdürülmektedir. "Türkiye'nin Önemli Bitki Kaynakları" yayını, "Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler)" [12] ve ilk baskısı 2012 olan "Türkiye Bitkileri Listesi, Damarlı Bitkiler" kitabı bitki çeşitliliğinin belirlenmesi ve korunmasına yönelik önemli çalışmalarır.

Bu derlemede, bitki genetik kaynakların korunmasının önemi nedeniyle *ex situ* korumada in vitro kültür tekniklerinin kullanımı ve avantajları açıklanmış ayrıca, ülkemizde tehlike altında olan nadir ve endemik türlere ilişkin yapılmış olan in vitro kültür çalışmaları çizelge olarak sunulmuş ve değerlendirilmiştir.

2. EX SITU KORUMA YÖNTEMLERİ

Ex situ koruma yöntemleri, geleneksel yöntemler ve modern yöntemler olarak değerlendirildiğinde; geleneksel yöntemler arboretumlar, botanik bahçeleri, arazi gen bankaları, tohum bahçeleri ve tohum gen bankalarıdır [8,13]. Geleneksel yöntemlerden olan tohum depolama, genellikle tercih edilen bir metottur fakat klonal çoğaltılan ya da tohum üretmeyen bitkiler için mümkün olmamaktadır. Bu bitkiler arazi gen bankalarında ve dormant vegetatif üreme parçasının (gözlerden henüz sürgün gelişimi olmayan-gözler uyanmamış olan) soğukta muhafazası şeklinde korunabilmekte ancak, bu metotlar yeterli gelmemektedir. Vegetatif olarak çoğaltılan türler, rekalsitrant (recalcitrant-unorthodox) tohumlu türler (tohumu kısa ömürlü olan ve kurumaya toleranslı olmayan türler) ve farklı sorunlarla karşılaşan bazı türler için in vitro çoğaltma ve koruma yöntemleri yani biyoteknolojik yöntemler uygulanabilmektedir [3,7,14-19].

Modern yöntemler yani in vitro koruma yöntemleri; in vitro kültür teknikleri/in vitro gen bankaları, DNA depolama, polen depolama, kriyoprezervasyon (bitki materyalini düşük sıcaklıkta ve sıvı azotta depolama) teknikleri olarak sıralanabilir [2,13-15,18].

2.1. Biyoteknolojik Yöntemler ile Koruma

Bitki biyoteknolojisi ve moleküler biyoloji alanındaki ilerlemeler, bitki biyoçeşitliliğinin yönetimini ve korunmasını destekleyen güçlü bir yol olmuştur. İn vitro kültür teknikleri hem bitkilerin mikroçoğaltımı

hemde bitki genetik kaynakların korunması için verimli bir şekilde kullanılmaktadır. İn vitro teknikler ile koruma; materyali toplama, yüzeysel sterilizasyon, kültüre alma, in vitro çoğaltma ve çoğaltılan bitkileri dış ortama alıştırdıktan sonra doğal habitatlarına aktarmanın yanısıra materyalin kısa, orta ve uzun süreli depolanması adımlarını içerir [2,6,13-15,20,21].

2.1.1. İn vitro kültürler için bitki materyali toplama

Doku kültürlerini başlatmak için ilk adım, bitki materyalini temin etmektir ve doğal türlerin kültürü için materyal doğadan toplanmaktadır. Botanik bakımdan bol miktarda ve küçük tohum üreten türlerde toplama kolay olabilmektedir. Ancak tohumların toplanmasını sınırlandıran bazı faktörler de sözkonusudur. Bazı türlerin tohumlarının yaşam süresi çok kısa olabilir, veya dormansi (durgunluk-çeşitli iç ve dış faktörler sebebiyle tohumların çimlenmesinin önlenmesi) görülebilir, bitki sağlıklı olmayabilir (hastalık ve zararlı etkisi, otlatma nedeniyle zarar görmesi vb.) veya tohum olgunlaşmamış olabilir. Ayrıca, taşınması zor olan büyük ve ağır meyveler veya materyalin yetiştiği alanının gen bankasına uzak olması nedeniyle taşıma sırasında örneklerin canlılığının korunamaması tohum toplamada önemli problemler olarak ortaya çıkmaktadır. İn vitro teknoloji, böyle problemler için çözüm sunmakta ve canlı dokuları toplamada olanakları genişletmekte ve örnek toplama yeterliliği önemli derecede artırılabilir. Örnek olarak tüm bitkiyi almak yerine kültürde kullanılacak bitki kısımlarını (embriyo, nod-boğum, tomurcuk, yaprak vb.) almak daha etkili bir toplama metodu olmakta ve bu uygulama, doku kültürlerini arazide başlatma işlemidir [2,9,15,21,22]. Buna göre bitki materyalini toplamada dikkate alınması gereken faktörler olarak: 1. Uygun doku nedir ve toplanacak dokunun boyutu ne olmalıdır? 2. Materyalde toprak kalıntıları ve hastalıklı doku var mıdır? 3. Bitki dokusunun sterilizasyonu nasıl yapılmalıdır? Sorularının yanıtlanması gereklidir [21].

İN vitro teknolojide, doğadan toplanan bitki materyalinden mikroorganizmaların uzaklaştırılması tam olarak kontrol edilmesi gereken kritik bir faktördür. Eksplantın (kültüre alınacak bitki parçası) kontaminasyon düzeyini dokunun yaşı (genellikle yaşlı dokular genç dokulardan daha fazla bulaşıktır), dokunun yeri (toprak üstü veya toprak altı dokuları) ve yetiştiği çevre gibi farklı faktörler de etkilemektedir. Bitkiden kültür için alınan bitki parçası toplama yerinde veya laboratuvarında yüzeysel olarak sterilize edilir ve sterilizasyon, doku kültürlerini başlatmada başarılması gerekli ilk aşama olmaktadır [21,23].

İN vitro kültür için bitki parçası toplama sistemi, ilk olarak kakao (*Theobroma cocoa*) ve hindistan cevizi (*Cocos nucifera*)’nde geliştirilmiş ve diğer bitkiler için model olacak iki metot ortaya konmuştur. Tohum ve çelik ile çoğaltılan kakao’da tohumlar rekalsitranttır ve olgun tohum ve çelikler canlılıklarını hızla kaybettiklerinden materyali uzun zaman canlı muhafaza etmek pek mümkün olmamaktadır. Yidana ve ark. (1987) kakao için nod (boğum) içeren sürgün çeliklerini toplama, çelikleri sterilize etme ve fungusit içeren semi-solid ortamda kültüre alma şeklinde basit bir in vitro teknik rapor etmişlerdir [2,21]. Benzer olarak hindistan cevizi tohumlarının da geleneksel yöntemler ile toplanması yetersiz ve pahalıdır. Tohumların büyük hacimli, ağır ve rekalsitrant olması nedeniyle bir materyal toplama yöntemi olarak embriyoların alınması önerilmektedir. Burada amaç, embriyoların kültürü için uygun bir in vitro kültür tekniği geliştirmek ayrıca, germplazmanın uluslararası değişiminde embriyoları kullanmaktır. Embriyoların toplanması iki temel adımı içermektedir. Sert kabuklu meyvenin kabuklarının temizlenmesi ve kırılıp açılması, embriyoyu içeren endosperm kısmının bir tıkaç gibi çıkarılarak embriyonun endospermden izole edilmesi ve embriyonun kültüre alınmasıdır. Bu konuda rapor edilen in vitro kültür tekniklerinden biri, arazide yüzeysel sterilizasyonu yapılan embriyoları laboratuvara getirinceye kadar potasyum klorid (KCl) çözeltisinde muhafaza etmeyi, laboratuvarında yeniden yüzeysel olarak sterilize etmeyi, steril koşullar altında sükröz ve aktif karbon ilaveli semi-solid ortamda kültüre almayı, kültürlerin önce karanlık koşulda, sürgün ve köklenme başladıktan sonra ise aydınlık koşulda bırakılmasını önermektedir. Kakao ve hindistan cevizi dışında *Coffea arabica* L. (kahve), *Musa* L. (muz) türleri, *Citrus* L. (narenciye) türleri, *Ipomoea batatas* L. (tatlı patates), *Vitis* (asma) türleri, *Prunus* (erik) türleri, *Persea americana* Miller (avokado), *Erythrina* L. (flame tree-ateş ağacı) türleri, *Vanilla*

planifolia Jackson (vanilya), *Pouteria* Aublet (Sapodilla-sakız ağacı) türleri, *Colocasia esculenta* var. *esculenta* (Taro-kulkas) ve *Gossypium hirsutum* L. (Pamuk) bitkileri için kültüre alınması uygun olan bitki kısımlarının toplanmasında yararlanılacak materyal toplama teknikleri belirlenmiştir [21,23].

Kültür için uygun olan bitki parçasını toplama, nadir ve nesli tükenmekte olan türler için de bir alternatiftir. Bu bitkiler sınırlı olduğundan örnek toplamada çok dikkatli olunmalıdır. Bitkiden kültüre alınması uygun olan bitki kısmı olarak küçük bir parçanın örnek olarak alınması ile oradaki bitki topluluğunun (*in situ* populasyonların) zarar görmesi engellenmektedir. Ancak *in vitro* kültür için örnek toplama protokolü türe özgü olacaktır ve bu nedenle de türe uygun protokolü ortaya koymak gereklidir. Öncelikle literatürdeki ilişkili türler değerlendirilerek türe uygun yöntemi geliştirmek üzere çalışmalar yapılmalıdır [21,22].

2.1.2. Bitki materyalini çoğaltmada *in vitro* teknolojinin kullanımı

In vitro teknikler ile çoğaltma, mikroçoğaltım olarak ifade edilmekte ve bu teknikler, özellikle bir türün klasik yöntemler ile çoğaltılması güç olduğu zaman ve popülasyonu sınırlı olan bitki türlerinin korunması için çok avantajlı olmaktadır. *In vitro* çoğaltma teknolojisi, kısa bir zaman periyodunda, sınırlı alanda, daha az anaç bitki kullanarak çok sayıda bitkiyi mevsimden bağımsız olarak elde etme olanağı sağlamaktadır. Rekalsitrant tohumlu türleri, vegetatif olarak çoğaltılan türleri, nadir ve tehlike altındaki bitki türlerini, elit genotipleri ve genetik mühendislik materyalini bu teknikler ile çoğaltma, genetik kaynakların ve bitki çeşitliliğinin *ex situ* korunması için başlıca yollardan biri olmuştur [3,6,7,17,19,20,22,24-26]. Yok olma tehlikesi altındaki türleri korumak için bu türlerin mikroçoğaltılması ve çoğaltılan materyallerin tahrip edildikleri habitatlarına ve/veya yetişebilecekleri uygun bir bölgeye aktarılması *Decalepis arapyalpathra*, *Blepharistemma membranifolia*, *Morinda umbellata*, *Mahonia leschenaultii*, *Heracleum candolleianum* gibi bazı tıbbi bitki türlerinde başarıyla uygulanmıştır [27].

Herhangibir *in vitro* koruma protokolü ortaya koymak için öncelikle o bitki materyalinde rejenerasyon ve çoğaltımın sağlandığı bir doku kültürü yöntemi oluşturulması gereklidir. Bu yöntem, kültüre alınan bitki ile aynı olan bitkiler elde etmeyi ve *in vitro* muhafaza edilen bu materyalden tekrar yüksek oranda bitki elde etmeyi garanti etmelidir. Yok olma tehlikesi altında olan bazı doğal türlerin korunması amaçlı mikroçoğaltma çalışmaları başarıyla gerçekleştirilerek uygun *in vitro* yöntemler geliştirilmiştir [16,21]. Örneğin, *Lavandula pedunculata* (Karan)'nın esansiyel yağ üretimi amaçlı mikroçoğaltımı doğal kaynaklar korunarak başarıyla ortaya koyulmuştur [26].

Floranın korunmasına yönelik olarak mikroçoğaltmanın avantajları:

1. Ana bitki ile aynı veya ana bitkiye çok benzer olan çok sayıda bitki elde etmek,
2. Yeni bitkileri kısa zamanda, yüksek oranda ve sağlıklı olarak elde etmek,
3. Eşeyli üretilmeyen bitkileri ve tek eşeyli (uniseksüel) bitkileri çoğaltmak için doku kültürü tekniklerini kullanmak uygun bir yol olmaktadır [13].

Ancak doku kültürü tekniklerinin bazı dezavantajları da vardır. Az sayıda bulunan genotiplerden bir popülasyon oluşturma çabası genetik tabanın daralmasına sebep olabilir. Somaklonal varyasyon görülmesi de ana bitki ile aynı olan bitki üretimde istenmeyen bir durumdur. Ayrıca, *in vitro* teknikler genel olarak daha pahalıdır, özel ekipman ve nitelikli personel gerektirmektedir [13].

2.1.3. Bitki materyalinin uluslararası değişiminde *in vitro* teknolojinin kullanımı

Bitki materyalinin *in vitro*'da steril koşullarda, hastalık ve zararlılardan arınmış olması germplazmın uluslararası değişiminde karantina prosedürünü kolaylaştırmaktadır. Bu şekilde bitkinin hastaliksız olması ve çok daha fazla miktarda materyalin daha az yer kaplayarak taşınması (deney tüplerinde taşınması vb.) uluslararası materyal değişiminde büyük bir avantaj olmaktadır [2,21,28].

2.1.4. Bitki materyalini korumada in vitro teknolojinin kullanımı

1970’li yıllardan bu yana birçok bitki türünde doku kültürü teknikleri ile koruma uygulanmaktadır [29]. İn vitro koruma sistemini oluşturan temel teknolojiler, materyali toplama ve koleksiyon oluşturma, hastalıktan arındırma ve hastalık tarama, kültüre alma ve çoğaltma, muhafaza ve materyalin dağıtımıdır. İn vitro koruma teknikleri, kısa ve orta süreli muhafaza için büyümenin yavaşlatılması, uzun süreli muhafaza için kriyoprezervasyon uygulamalarıdır [2,8,17].

Kültürde büyümenin yavaşlatılması ile materyal, kısa ve orta süreli olarak muhafaza edilebilmektedir. Ancak bu süreçte kültürlerin canlılığını ve rejenerasyon kapasitesini kaybetmemesi gereklidir. Büyüme yavaşlatma, genellikle kültür ortamı bileşiminin ve kültür odası çevre koşullarının değiştirilmesi ile sağlanmaktadır [3,13,15,17,30]. Kültür ortamı bileşimindeki değişiklikler; mineral madde içeriğinin düşürülmesi, şeker konsantrasyonunun azaltılması, büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyon ve/veya çeşidinde değişikliklerin yapılması ve osmotik aktif bileşiklerin ilave edilmesi ile olmaktadır. Ayrıca, yağ tabakası veya likit ortam kullanarak oksijen düzeyinin azaltılması da yapılabilir. Kültür odasının çevre koşullarında sıcaklığı azaltma, ışık yoğunluğunu azaltma veya hem sıcaklık hemde ışık yoğunluğunu azaltma veya kültürleri tamamen karanlıkta depolama gibi değişimler de yapılabilmektedir [13,29,30]. Çoğunlukla yapılan uygulamalar sıcaklığın düşürülmesi, mineral maddelerin ve ortamdaki karbon kaynağı konsantrasyonunun azaltılması ile düşük ışık yoğunluğu kullanılması gibi fiziksel ve kimyasal faktörlerin kombinasyonudur [17]. Yavaş büyüme ile in vitro korumada sistemin yeterliliğini eksplant tipi, eksplantların fizyolojik durumu, kültür kaplarının hacmi ve kapak tipi gibi diğer bazı faktörler de etkileyebilmektedir. Ayrıca in vitro kültürler ile kısa ve uzun süreli korumada, çoğaltma yöntemindeki kültür ortamının kimyasal kompozisyonu değiştirilerek alt kültür periyotları uzatılabilmekte ve bu şekilde alt kültürler arasındaki zamanın arttırılması da birçok laboratuvar rutin olarak uygulanmaktadır [13,21]. Büyümenin yavaşlatılması ile materyali kısa ve orta süreli muhafaza etmek için materyal, depolama periyodunun sonunda (gelecek depolama döngüsüne girmeden önce) yeniden büyümeyi teşvik etmek için taze besin ortamına aktarılır ve kısa bir periyot için optimal koşullarda kültüre devam edilir sonra, tekrar depolama koşullarına alınır [21]. Bitki materyali yavaş büyüme yöntemi ile alt kültür yapmaksızın birkaç aydan iki-üç yıla kadar [13], alt kültür periyotları ayarlanarak yapılan alt kültürler ile de 15 yıla kadar korunabilmektedir [27]. Arda ve ark. (2016), bir Balkan endemiği olan *Dianthus ingoldbyi* sürgünlerinin 0.5 mg/l NAA’li MS ortamında 4°C’de karanlıkta, alt kültür yapmaksızın 6 ay muhafaza edildiğinde sürgünlerin %58’inin canlı kaldığını tesbit etmişler ve bu bitki için uyguladıkları yöntemi in vitro korumada etkili bir metot olarak belirtmişlerdir [31].

Büyüme yavaşlatmak için kültür ortamı bileşiminin ve depolama koşullarının değiştirilmesinin yanısıra eksplantların parafin, mineral yağ veya likit ortam ile kaplanması da bir alternatiftir. Hem mineral yağ hem de silikon yağ ile kaplama sonucu, 25°C’de muhafaza edilen tatlı patates sürgün kültürlerinin büyümesini sınırlandırmak mümkün olmuş ve birçok zencefil türünün sürgün kültürleri mineral yağda iki yıldan daha fazla süre muhafaza edilmiştir. Eksplantların yağ ile kaplanmasının yanısıra kapsül ile kaplama da diğer bir yöntemdir. Somatik embriyo, sürgün uçları ve aksiller tomurcuklar gibi bitki kısımlarının kapsül içine alınması ile yapay tohumlar yani sentetik tohumlar elde edilmektedir. Yapay tohumlar, başlıca klonal çoğaltmada, tohumları rekalsitrant olan türlerin veya tohum üretmeyen bitkilerin ıslahında kullanılmaktadır. Örneğin, orkide protokormlarının kapsülle kaplanması ile orta süreli koruma mümkün olmuştur [21].

Yavaş büyüme tekniklerinin avantajı, mikroçoğaltma için kullanılan temel tekniklerin yavaş büyüme için de kullanılıyor olması ve depolamada da bu tekniklerin modifikasyonlarının kullanılmasıdır. Bununla beraber mikroçoğaltmadaki yüksek laboratuvar maliyeti yavaş büyüme teknikleri için de sözkonusudur ayrıca, in vitro kültürlerin somaklonal varyasyon riski taşıdığı da unutulmamalıdır [13, 21].

Rekalsitrant tohumlu türler, tohumlarının muhafazası konvansiyonel metotlar ile mümkün olmayan türler, tohum üretmeyen ve klonal olarak çoğaltılan bitki türlerinin uzun süreli korunması için kriyoprezervasyon önemli bir yoldur. Kriyoprezervasyon; materyali özel koruyucu maddeler (kriyoprotektan) ile sıvı azotta, -196°C’de, uzun zaman periyodunda değişmeden saklamayı içermektedir yani uzun süreli muhafaza için likit fazda olan bir kriyobankadır [7]. Kriyoprezervasyonun avantajları; bitki materyalini kontaminasyondan koruması ve soğukta muhafaza edilmiş olan dokunun ülke ve bölgeler arasında germplazm değişiminde daha güvenilir olmasıdır [2,13,15-17,22,30]. Kriyoprezervasyon yöntemi bitki tür, çeşit hatta genotipe göre optimize edilerek başarıyla kullanılmaktadır ve uygulamaları hergeçen gün artmaktadır.

3. ÜLKEMİZDE NADİR ENDEMİK ve/veya TEHDİT ALTINDAKİ TÜRLERE AİT İN VİTRO KÜLTÜR ÇALIŞMALARI

3.1. Tohum Çimlendirme

Tohum, bitki germplazmını koruma ve kullanılacağı yere taşımada en yaygın olarak kullanılan bitki kısmıdır. Tohumun depolanmasından önce tohumun optimum olgunlaşma dönemi, tohum kalitesi, bitkinin yetiştirme koşulları ve hasat teknikleri, çimlenme ekofizyolojisi ve dormansi derecesi bilinmesi gereken konulardır ve bu konular tohum canlılığını muhafaza etmede son derece önemli rol oynamaktadır [32].

Biyçeşitliliğin korunması ve yönetimi için öncelikle tehlike altında olan türlerin üreme biyolojisi ve tohumu ile ilgili bilgiler araştırılmalı, tohum çimlenme gereksinimleri belirlenmelidir [33]. Biyolojik çeşitliliği çok zengin olan ülkemizde tehlike altındaki nadir, endemik ve/veya doğal türlerin tohumlarının gerek in vivo gerekse in vitro çimlendirilmesi çalışmaları koruma amacı da olan çeşitli projeler kapsamında yürütülmektedir. Yüksek bitki çeşitliliğine (tohumlu bitki tür, alttür ve varyeteleri 11707) ve endemizm oranına (%31.12) [34] sahip olan ülkemizde bu konu ile ilgili çalışmaların 2000’li yıllarda arttığı ancak yeterli olmadığı bilinmektedir [33].

3.2. Mikroçoğaltım Çalışmaları

Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (eksplant) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesidir. Mikroçoğaltım hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi, daha küçük alanda kısa sürede hızlı üretim, çoğaltılması zor olan türlerin daha kolay üretimi, yılın tüm sezonlarında bitkinin çoğaltılması gibi birçok avantajlara sahiptir. Doku kültürü tekniklerini kullanarak herhangi bir in vitro koruma protokolü ortaya koyabilmek için öncelikle o bitki materyaline uygun olan doku kültürü koşullarını belirlemek ve mikroçoğaltımını başarmak gerekmektedir.

Türkiye endemik bitkiler açısından çok zengin olmasına rağmen, zenginliği oluşturan bu türlerin bazıları yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır. IUCN 2001 kriterlerine göre, ülkemizdeki endemik türlerin yaklaşık 600 kadarı “Kritik tehlikede CR-Critically endangered”, 700 kadarı da “Tehlikede EN-Endangered” kategorisinde yer almaktadır [35]. Yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan türlerin sayısı, floradaki toplam bitki türü sayısının %23’ünü oluşturmaktadır [36]. Ülkemizdeki doğal bitki türlerinin *ex situ* koruma stratejileri kapsamında çoğaltılmaları ve popülasyonlarının yok olmasının önlenmesi bakımından mikroçoğaltım çalışmaları büyük önem taşımaktadır.

Ülkemizde nadir, endemik ve/veya yok olma tehlikesi altındaki türler üzerinde yapılan in vitro teknolojik çalışmalar genellikle mikroçoğaltım protokollerinin oluşturulması üzerinedir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Ülkemizin nadir, endemik ve/veya tehlike altında olan ve mikroçoğaltım amacı ile in vitro kültür çalışmaları yapılan doğal türleri (Türler alfabetik olarak verilmiştir)

Tür	Türün Durumu	Eksplant	Kaynak
<i>Ajuca vestita</i> Boiss.	Nadir, Endemik	<i>In vitro</i> sürgünler	[37]
<i>Allium tuncelianum</i> (Kollman) Özhatay, Matthews, Şiraneci	Endemik, EN	18 günlük bitkiciklerin sürgün ve kök uçları	[38]
<i>Amsonia orientalis</i>	CR	Yarım diş (clove)	[39]
<i>Anthemis pestalozzae</i> Boiss.	Nadir, Endemik, Tehdit altında	Olgun nod (node-boğum) eksplantları	[40]
<i>Anthemis xylopoda</i> O. Schwarz	Endemik, CR	Kotiledon ve yapraklar	[41]
		Ana kökten ayrılan 1-2 cm fideler	[42]
		Yaprak eksplantları	[43]
<i>Arabis drabiformis</i> Boiss.	Nadir, Relikt endemik	Sürgün ucu ve internod (boğum arası) eksplantları	[44]
<i>Astragalus cariensis</i> Boiss.	Endemik, NT	Yaprak ve yaprak sapı	[45]
<i>Astragalus chrysochlorus</i> Boiss. & Kotschy	Endemik	15 günlük fidelerin hipokotilleri (~1 cm uzunlukta)	[46]
<i>Astragalus condensatus</i> Ledeb.	Endemik	<i>In vitro</i> bitkicikler	[47]
<i>Astragalus nezaketae</i>	Endemik	30 günlük fidelerin yaprak ve yaprak sapı	[48]
<i>Astragalus schizopterus</i> L.	Endemik	30 günlük fidelerin lateral meristemleri	[49]
<i>Centaurea arifolia</i> Boiss.	Endemik, DD	6 haftalık fidelerin yaprakları	[50]
		Olgunlaşmamış zigotik embriyo	[51]
<i>Centaurea tchihatcheffii</i> Fisch et. Mey	CR	4 haftalık fidelerin sürgün uçları ve tek boğum içeren eksplantları	[52]
<i>Centaurea zeybekii</i> Wagenitz	Dar yayılışlı endemik, EN	Ana kökten ayrılmış olan 4 haftalık fideler	[53]
<i>Cyclamen cilicium</i> Boiss. et Heldr.	Endemik	Tohum taslağı, yumurtalık, yaprak ve yaprak sapı	[54]
		8 haftalık fidelerin yumru kısımları	[55]
<i>Cyclamen mirabile</i> Hildebr.	Endemik	Tohum taslağı, yumurtalık, yaprak ve yaprak sapı	[54]
<i>Cyclamen parviflorum</i> Pobed.	Endemik	Tohum taslağı, yumurtalık, yaprak ve yaprak sapı	[54]
<i>Cyclamen pseudibericum</i> Hildebr.	Endemik	Tohum taslağı, yumurtalık, yaprak ve yaprak sapı	[54]
<i>Dianthus ingoldbyi</i> Turrill	Balkan Endemiği, CR	1 aylık steril fidelerin aksillar tomurcukları	[31]
<i>Digitalis lamarckii</i> Ivan.	Endemik	Yaprak	[56]
<i>Digitalis trojana</i> Ivan	Endemik	Yaprak	[57]
<i>Dorystoechas hastata</i> Boiss. & Heldr. ex Benth	Endemik	Ana kökten ayrılmış olan 4 haftalık steril fideler	[58]
<i>Echium orientale</i>	Endemik, LC	4 haftalık steril fidelerin yaprak ve yaprak sapları	[59]
<i>Erodium sibthorpium</i> subsp. <i>sibthorpium</i>	Endemik, Tehdit altında	Sürgün uçları	[60]
<i>Erodium somanum</i> H. Peşmen	Endemik, CR	Sürgün uçları, yaprak	[61]
<i>Erodium olympicum</i>	Endemik	Genç bitkilerin nodları (boğumları)	[62]
<i>Fritillaria aurea</i> Schott	Endemik	½ soğan	[63]
<i>Gladiolus anatolicus</i> (Boiss.) Stapf.	Endemik, VU	<i>In vitro</i> 'da elde edilen kormel parçaları	[64]
<i>Hypericum adenotrichum</i>	Endemik	Yaprak	[65]
<i>Hypericum heterophyllum</i> Vent.	Endemik	Tohumdan kallus indüksiyonu, kallusdan rejenerasyon	[66]
<i>Hypericum scabroides</i> Robson & Poulter	Endemik	Apikal uçlar	[67]
<i>Iris pamphylica</i>	Endemik, EN	Taze soğanlar ve olgunlaşmamış embriyolar	[68]
<i>Iris sari</i> <i>Iris schachtii</i>	Endemik	Olgunlaşmamış embriyo	[69]

Çizelge 1 Devamı...

<i>Iris stenophylla</i> Hausskn and Siehe ex Baker subsp. <i>allisonii</i> B. Mathew	Endemik, CR	Olgunlaşmamış embriyo ve soğan pulu	[70]
<i>Lilium candidum</i> L.	Nadir	Soğan pulu, yaprak eksplantları	[71]
<i>Linaria genistifolia</i> (L.) Miller ssp. <i>praealta</i> (Boiss.) Davis	Endemik	Soğan pulu	[72,73]
<i>Liquidambar orientalis</i> Miller	Endemik	Aksillar sürgün uçları	[74]
		Yaprak	[75]
		Kotiledon ve hipokotil parçaları	[76]
<i>Muscari aucheri</i> (Boiss.) Baker	Endemik, EN	Soğan pulu	[77,78]
		Soğan pulu ve olgunlaşmamış embriyo	[79]
<i>Muscari azureum</i>	Endemik, EN	Sap eksplantı	[80]
		Soğan pulu	[81]
		Olgunlaşmamış embriyo	[82]
<i>Muscari mirum</i> Speta	Endemik, EN	Soğan pulu, yaprak ve olgunlaşmamış embriyo	[83]
<i>Muscari muscarimi</i> Medikus	Endemik, EN	Olgunlaşmamış zigotik embriyo	[84]
		İkiz soğan pulu	[85]
<i>Neotchihatchewia isatidea</i> (Boiss.)	EN	Olgunlaşmamış embriyo	[86]
<i>Origanum acutidens</i> (Hand.-Mazz.) Ietswaart	Endemik	Bir haftalık fidelerin yeraltı boğumu içeren eksplant	[87]
		Gövde boğumu içeren eksplant	[88]
<i>Origanum minutiflorum</i> O. Schwarz and Davis	Endemik	Hipokotil, sürgün uçları, yaprak parçaları ve tek boğum içeren eksplantlar	[89]
<i>Origanum sipyleum</i> L.	Endemik	17 günlük fidelerin sürgün uçları	[90]
<i>Ornithogalum isauricum</i> O. D. Düşen and H. Sümbül	Endemik	Soğan pulu	[91]
		Ana kökten ayrılmış fideler (2-3 cm)	[92]
<i>Rhaponticoides mykalea</i> (Hub.-Mor.) M.V. Agab & Greuter.	Endemik, CR	Olgunlaşmamış zigotik embriyo	[93]
		Epikotil ve fidelerin kotiledon yapraklarının sapları	[94]
<i>Sideritis sipylea</i> Boiss.	Endemik	Üç haftalık steril fideler	[95]
<i>Sphaerophysa kotschyana</i>	Endemik, Tehdit altında	Boğum (nod) içeren parçalar	[96]
<i>Stachys tmolea</i> Boiss.	Endemik	Steril fideler	[97]
<i>Sternbergia fischeriana</i> Herbert	Nadir, EN	Olgunlaşmamış embriyo	[98]
		Kotiledon (4x8 mm) ve kök (≤ 1 cm) eksplantları	[99]
<i>Thermopsis turcica</i> Kit Tan, Vural & Küçüködük	Endemik, CR	Epikotil	[100]
		Yaprak ve sap	[101]
		Tohum taslağı (Ovul)-embriyo	[102]
		Stamen	[103]
<i>Thymus sipyleus</i> Boiss.	Endemik	Steril fideler	[104]
<i>Trifolium pannonicum</i> Jacq. subsp. <i>elongatum</i> (Willd.)	Endemik	7-8 günlük fidelerin hipokotil, kotiledon ve kotiledon nodu içeren segment	[105]
<i>Tulipa sintenisii</i> <i>Tulipa armena</i>	Endemik	Olgunlaşmamış embriyo	[106]

IUCN kategorisine göre; CR: Kritik tehlikede (Critically Endangered), EN: Tehlikede (Endangered), VU: Hassas (Vulnerable), NT: Neredeyse tehdit altında (Near Threatened), LC: Asgari endişe (Least Concern), DD: Yetersiz veri (Data Deficient)

Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren bitki doku kültürlerindeki çalışmaların ortaya koyduğu önemli gelişmeler sayesinde bitki biyoçeşitliliğinin korunmasında da biyoteknolojik yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Ülkemizde ise doğal türlerdeki in vitro kültür çalışmalarına 2000'li yıllarda başlanmış olup (çizelge 1) günümüzde de tehlike altındaki ve/veya endemik bitkilerin mikroçoğaltım protokollerinin oluşturulması ve in vitro koruma üzerine çalışmalar devam etmektedir. İn vitro koruma amaçlı az sayıdaki çalışmalardan uzun süreli koruma olan kriyoprezervasyon konusunda ise *Fraxinus*

excelsior L. [107], *Thymus vulgaris* ve *Thymus cariensis* [108] türlerinde olmak üzere sadece birkaç çalışmaya rastlanmıştır.

Ülkemiz için doğal türlerde mikroçoğaltım çalışmaları öncelikle üretiminde problem olan türlerde yapılmalı, doğal türler için protokoller oluşturulmalı ve bu protokollerden yararlanarak yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan türler çoğaltılmalıdır. *Ex situ* koruma stratejileri kapsamında bu türlerin yetiştirilerek doğal popülasyonları güçlendirilmelidir.

4. SONUÇ

Biyçeşitliliğin korunması bir dünya sorunu olup son 25-30 yıldır üzerinde daha önemle durulmaktadır. Özellikle son yıllarda, bitki genetik kaynaklarının in vitro kültür teknikleri, moleküler teknikler gibi yeni teknolojiler ile korunmasına yönelik çalışmalar ağırlık kazanmıştır. Klasik yöntemlerle korumada karşılaşılan bazı önemli sorunlar (geniş alana gereksinim duyulması, bazı türlerin çoğaltılmasındaki problemler, heterozigot genotiplerdeki açılmalar vb.) in vitro teknikler ile aşılmaktadır. Bitki materyalini toplama, tanımlama, sterilize etme, mikroçoğaltma, değerlendirme ve muhafaza gibi materyalin korunması ile ilgili bu işlemlerde yeni teknolojiler başarıyla kullanılmaktadır. Ülkemizde de doğal türlerin tohumlarının çimlendirilmesi ve mikroçoğaltılmaları üzerine olan çalışmalar günden güne artmaktadır. In vitroda büyümenin yavaşlatılması ve materyali kriyoprezerve ederek koruma üzerinde çalışmalar da yapılmaktadır. Bu çalışmalara hızla devam edilmesi ve elde edilen sonuçların uygulamaya aktarılması, floranın korunması bakımından önemli bir kazanç olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Işık K. Biyolojik çeşitlilik, In: Kıvanç M, Yücel E, editors. Çevre ve İnsan. Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi, İlköğretim Öğretmenliği Lisans Tamamlama Programı, 1998. pp.15-39.
- [2] Rao NK. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. Afr J Biotechnol 2004; 3(2): 136-145.
- [3] Paunescu A. Biotechnology for endangered plant conservation: A critical overview. Rom Biotechnol Lett 2009; 14(1): 4095-4103.
- [4] Sharma DK, Sharma T. Biotechnological approaches for biodiversity conservation. IJSR 2013; 4(1): 183-186.
- [5] Yılmaz E, Aldemir G, Surgun Y, Bürün B. Bitki genetik kaynaklarının önemi, korunması ve yararlanılması. Biyolojik Çeşitlilik Sempozyumu, 22-23 Mayıs 2013, Marmaris-Muğla. pp. 267-271.
- [6] Pathak MR, Abido MS. The role of biotechnology in the conservation of biodiversity. JEBAS 2014; 2(4): 352-363.
- [7] Pandotra P, Gupta S. Biotechnological approaches for conservation of plant genetic resources and traditional knowledge. In: Salgotra RK, Gupta BB, editors. Plant Genetic Resources and Traditional Knowledge for Food Security, Springer Science+Business Media, Singapore, 2015. pp. 121-135.
- [8] Surgun Y, Bürün B. Biotechnology for conservation of plant biodiversity. In: SEAB2016 The 2nd International Symposium on EuroAsian Biodiversity; 23-27 May 2016, Antalya, Turkey. p. 301.

- [9] Reed BM, Sarasan V, Kane M, Bunn E, Pence VC. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 2011; 47:1-4.
- [10] Paunescu A. Biotechnology for endangered plant conservation. In: Ahuja MR, Ramawat KG, editors. *Biotechnology and Biodiversity, Sustainable Development and Biodiversity 4*, Springer International Publishing, Switzerland, 2014. pp. 181-202.
- [11] Surgun Acar Y, Bürün B. The studies in Turkey on use of in vitro cultures in the conservation of biodiversity. In: SEAB2017 International Symposium on EuroAsian Biodiversity, 05-08 July 2017, Belarus. p 426.
- [12] Tan A. Türkiye bitki genetik kaynakları ve muhafazası. *Anadolu J of AARI* 2010; 20(1): 9-37.
- [13] Vasile L, Simona V, Eliza A, Zăpârtan M. Methods of conservation of the plant germplasm, *In vitro* Techniques. *Analele Universității din Oreda, Fascicula Protectia Mediului* 2011; 17: 697-708.
- [14] Belokurova VB. Methods of biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation. *Cytology and Genetics* 2010; 44(3): 174-185.
- [15] Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cell Dev Biol-Plant* 2011; 47: 5-16.
- [16] Pence VC. Evaluating costs for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2011; 47: 176-187.
- [17] Rajasekharan PE, Sahijram L. In vitro conservation of plant germplasm. In: Bahadur B, Venkat Rajam M, Sahijram L, Krishnamurthy K, editors. *Plant Biology and Biotechnology (Volume II): Plant Genomics and Biotechnology*, Springer, India, 2015. pp. 417-443.
- [18] Rajpurohit D, Jhang T. In situ and ex situ conservation of plant genetic resources and traditional knowledge. In: Salgotra RK, Gupta BB, editors. *Plant Genetic Resources and Traditional Knowledge for Food Security*, Springer Science+Business Media, Singapore, 2015. pp. 137-162.
- [19] Oseni OM, Pande V, Nailwal TP. A review on plant tissue culture, A technique for propagation and conservation of endangered plant species. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2018; 7(7): 3778-3786.
- [20] Kasagana VN, Karumuri SS. Conservation of medicinal plants (past, present and future trends). *Journal of Pharmaceutical Science and Research* 2011; 3(8): 1378-1386.
- [21] Cruz-Cruz CA, González-Arno MT, Engelmann F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources* 2013; 2: 73-95.
- [22] Sarasan V, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK. Conservation in vitro of threatened plants – Progress in the past decade. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 2006; 42: 206-214.
- [23] Pence VC. In vitro collecting (IVC) I. The effect of collecting method and antimicrobial agents on contamination in temperate and tropical collections. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 2005; 41:324-332.

- [24] Fay MF. Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 1992; 28: 1-4.
- [25] Bunn E, Turner SR, Dixon KW. Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 2011; 47: 188-200.
- [26] Khan S, Al-Qurainy F, Nadeem M. Biotechnological approaches for conservation and improvement of rare and endangered plants of Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences 2012; 19: 1-11.
- [27] Krishnan PN, Decruse SW, Radha RK Conservation of medicinal plants of Western Ghats, India and its sustainable utilization through in vitro technology. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 2011; 47: 110-122.
- [28] Bürün B. Hastaliksız bitki üretimi. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S, editors. Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 2001. pp. 190-210.
- [29] Ogbu JU. Genetic resources and biodiversity conservation in Nigeria through biotechnology approaches. In: Ahuja MR, Ramawat KG, editors. Biotechnology and Biodiversity, Sustainable Development and Biodiversity. Springer International Publishing, Switzerland, 2014. pp. 271-285.
- [30] Bajaj YPS. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: Bajaj YPS, editör. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cryopresevation of Plant Germplasm I. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1995. pp. 3-28.
- [31] Arda H, Dayan S, Kartal Ç, Güler N. In vitro conservation of critically endangered *Dianthus ingoldbyi* Turill under slow growth conditions. TUJNS 2016; 17(1): 47-54.
- [32] Martínez-Gómez P, Majourhat K, Zeinalabedini M, Erogul D, Khayam-Nekoui M, Grigorian V, Hafidi A, Piqueras A, Gradziel TM. Use of biotechnology for preserving rare fruit germplasm. Biorem Biodiv Bioavail 2007; 1(1): 31-40.
- [33] Surgun Acar Y, Yokaş İ, Bürün B. Seed germination studies in native species for conservation of biodiversity. In: SEAB2017 International Symposium on EuroAsian Biodiversity, 05-08 July 2017, Belarus. p. 663.
- [34] Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT (edlr.). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul, 2012.
- [35] Anonim. Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Stratejisi ve Eylem Planı. T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, Ankara, 2007.
- [36] Ünalı EÜ. Tehdit ve tehlike altında bir kültür bitkisi: Safran (*Crocus sativus* L.). F. Ü. Sosyal Bil Dergi 2007; 4: 53-67.
- [37] Akbaş F, Kuru İS, Orcan PK. The effects of BAP and Kin on micropropagation of *Ajuga vestita* BOISS.; a rare endemic medicinal plant. In: ICAEAM'15 2nd International Conference on Advances in Environment, Agriculture & Medical Sciences; 11-12 June 2015; Antalya, Turkey.

- [38] Yanmaz R, Yazar E, Yaprak Kantoğlu K, Alper A. *In vitro* plant regeneration and bulblet formation of Tunceli garlic (*Allium tuncelianum* (Kollman) Özhatay, Mathew, Siraneci) by shoot and root culture. JFAE 2010; 8 (3&4): 572-576.
- [39] Aasım M. Adventitious bulblet regeneration of endemic Ovacık garlic (*Allium tuncelianum* Kollman, Özhatay, Mathew, Şiraneci) using wintered half clove explant. Rom Biotechnol Lett 2015; 20(5): 10845-10851.
- [40] Acemi A, Özen F, Kıran R. Development of an efficient callus production protocol for *Amsonia orientalis*: A critically endangered medicinal plant. Eurasia J Biosci 2012; 6: 105-112.
- [41] Özel ÇA. Micropropagation of *Anthemis pestalozzae* Boiss. from cotyledonary leaf and leaf explants. Bangladesh J Bot 2016; 45(1): 55-61.
- [42] Erdağ B, Emek Y. *In vitro* micropropagation of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz, a critically endangered species from Turkey. Pakistan Journal of Biological Sciences 2005; 8(5): 691-695
- [43] Erdağ B, Emek YÇ. Adventitious shoot regeneration and *in vitro* flowering of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz, a critically endangered Turkish endemic. Turk J Biol 2009; 33: 319-326.
- [44] Akin B, Kocaçaliskan İ. *In vitro* propagation of *Arabis drabiformis* Boiss. (Brassicaceae) an endemic rare species of Uludağ mountain (Bursa-Turkey). Afr J Biotechnol 2011; 10(80): 18356-18361.
- [45] Erişen S, Atalay E, Yorgancılar M. The effect of thidiazuron on the *in vitro* shoot development of endemic *Astragalus cariensis* in Turkey. Turk J Bot 2011; 35: 521-526.
- [46] Hasançebi S, Turgut Kara N, Çakır Ö, Arı Ş. Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). Turk J Bot 2011; 35: 203-210.
- [47] Erdağ B. A note on *in vitro* seed germination and shoot multiplication of *Astragalus condensatus* Ledeb., an endemic of Turkish flora. Bio-Science Research Bulletin 2002, 18(2): 93-97.
- [48] Erişen S, Yorgancılar M, Atalay E, Babaoğlu M, Duran A. Callus induction and plant regeneration of the endemic *Astragalus nezaketae* in Turkey. Electronic Journal of Biotechnology 2010; 13 (6).
- [49] Yorgancılar M, Erişen S. The effect of thidiazuron (TDZ) on shoot regeneration of *Astragalus schizopterus*. JAPS 2011; 21(3): 519-524.
- [50] Yüzbaşıoğlu E, Dalyan E, Bona M, Öz G. *In vitro* propagation of endemic plant *Centaurea arifolia* Boiss. Taxa. IUFS J Biol 2012; 71(2):121-127.
- [51] Özel ÇA, Khawar KM, Mirici S, Özcan S, Arslan O. Factors affecting *in vitro* plant regeneration of the critically endangered Mediterranean knapweed (*Centaurea tchihatcheffii* Fisch et. Mey). Naturwissenschaften, 2006; 93: 511-517.
- [52] Okay Y, Ellialtıoğlu Ş, Demir K, Tıprıdamaz R, Savcı AE, Özler H, Gümüş C, Günöz A. Sentorya (*Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey.) endemik bitkisinin çoğaltımı üzerinde çalışmalar. BİBAD 2014; 7(1): 42-48.

- [53] Kurt S, Erdağ B. *In vitro* germination and axillary shoot propagation of *Centaurea zeybekii*. Biologia Section Botany 2009; 64(1): 97-101.
- [54] İzgü T, Sevindik B, Çürük P, Şimşek Ö, Aka Kaçar Y, Teixeira da Silva JA, Yalçın Mendi Y. Development of an efficient regeneration protocol for four *Cyclamen* species endemic to Turkey. Plant Cell Tiss Organ Cult 2016; 127: 95-113.
- [55] Yamaner Ö, Erdağ B. Direct shoot formation and microtuberization from aseptic seedlings of *Cyclamen mirabile* Hildebr. Biotechnology 2008; 7(2): 328-332.
- [56] Verma SK, Yücesan BB, Şahin G, Gürel S & Gürel E. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Digitalis lamarckii*, an endemic medicinal species. Turk J Bot 2011; 35: 689-695.
- [57] Çördük N, Akı C. Doğal ortamda yayılış gösteren ve *in vitro* çoğaltılan *Digitalis trojana* türünde kardenolid içeriklerinin karşılaştırılması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi; 03-07 Eylül 2012; İzmir.
- [58] Erdağ B, Emek YÇ, Kurt Aydoğan S. Clonal propagation of *Dorystoechas hastata* via axillary shoot proliferation. Turk J Bot. 2010; 34: 233-240.
- [59] Uçar Türker A, Birinci Yıldırım A, Taş İ. *In vitro* adventitious plant regeneration of *Echium orientale* L., an endemic plant: The evaluation of biological activities and phenolic content. IJB 2018; 55, 264-272.
- [60] Akın B, Kocaçalışkan İ, Güleriyüz G. Micropropagation of *Erodium sibthorpiatum* subsp. *sibthorpiatum*, an endemic threatened species of Uludağ Mountain (Bursa-Turkey). Turk J Bot 2014; 38: 148-155.
- [61] Çetin B, Eren H, Oskay D, Akanıl Bingöl N. Kritik tehlikedeki (CR) endemik *Erodium somanum* türünün *in vitro* mikroçoğaltımı. CBU Fen Bil Derg 2016; 12(1): 115-120.
- [62] Sevindik B, Tütüncü M, İzgü T, Tagipur EM, Çürük P, Yılmaz Ö, Kaynak G, Yalçın Mendi Y. Micropropagation of *Erodium olympicum* endemic to Turkey. AJPB 2017; 2(3-1): 24-27.
- [63] Kızıl S, Sesiz U, Khalid Mahmood Khawar KM, Arslan N. Endemik *Fritillaria aurea* Schott'un *in vitro* çoğaltımı üzerine çalışmalar. V. Süs Bitkileri Kongresi, 06-09 Mayıs 2013, Yalova.
- [64] Erdağ BB, Emek YÇ, Aktaş LY. *In vitro* somatic embryogenesis from cormel-derived callus cultures of *Gladiolus anatolicus* (Boiss.) Stapf. Propagation of Ornamental Plants 2009; 9(4):176-180.
- [65] Yamaner Ö, Erdağ B. *Hypericum adenotrichum*'un doku kültürü teknikleri ile çoğaltılması. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir.
- [66] Ayan AK, Çırak C. *In vitro* multiplication of *Hypericum heterophyllum* an endemic Turkish species. American Journal of Plant Physiology 2006; 1(1): 76-81.
- [67] Asan HS, Özen HÇ, Onay A, Asan N. Effect of BAP on total hypericin production in shoot cultures of *Hypericum scabroides*: An endemic species in the Eastern Anatolia Region of Turkey. Eurasia J Biosci 2015; 9: 46-51.

- [68] Nasırcılar AG, Deniz İG. An alternative plant propagation and conservation process for *Iris pampylica* an endemic and endangered geophyte. AGROSYM 2014, Fifth International Scientific Agricultural Symposium, 23-26 October 2014, Saraybosna-Bosna Hersek. pp. 346-351.
- [69] Uzun S, İlbaş Aİ, İpek A, Arslan N & Barpete S. Efficient *in vitro* plant regeneration from immature embryos of endemic *Iris sari* and *I. schachtii*. Turk J Agric For 2014; 38: 348-353.
- [70] Nasırcılar AG, Mirici S, Eren O, Karagüzel O, Baktır İ. Micropropagation of Turkish endemic *Iris stenophylla* Hausskn & Siehe ex Baker subsp. *allisonii* B. Mathew. Acta Horticulturae 2011; 886: 19-26.
- [71] Khawar KM, Çöçü S, Parmaksız İ, Sarıhan EO, Özcan S. Mass proliferation of Madonna Lily (*Lilium candidum* L.) under in vitro conditions. Pak J Bot 2005; 37(2): 243-248.
- [72] Bürün B, Şahin O. Micropropagation of *Lilium candidum* L.: A rare and native bulbous flower of Turkey. Bangladesh J Bot 2013, 42(2): 185-187.
- [73] Daneshvar-Royandazagh S, Pehlivan EC, Teykin EE, Çiftçi HS. *Lilium candidum* L.'da in vitro mikroçoğaltım ile kozmetik sanayisine ham madde temini. TURKJANS 2014; 2 (Özel Sayı): 1911-1916.
- [74] Çağlar G, Bulunuz E, Eldoğan S. *In vitro* propagation of *Linaria genistifolia* (L.) Miller ssp. *praealta* (Boiss.) Davis. In: BIORARE Symposium 2010 International Symposium on the Biology of Rare and Endemic Plant Species; 26-29 May 2010, Muğla, Turkey.
- [75] Erdağ B, Emek Y. *In vitro* adventitious shoot regeneration of *Liquidambar orientalis* Miller. Journal of Biological Sciences 2005; 5(6): 805-808.
- [76] Surgun-Acar Y, Ayaz-Baran Ö, Bürün B. Adventitious shoot formation from hypocotyl and cotyledon explants of relict endemic *Liquidambar orientalis* Miller. MJST 2018; 4(2): 137-142.
- [77] Uranbey S. Stimulating effects of different basal media and cytokinin types on regeneration of endemic and endangered *Muscari aucheri*. Arch Biol Sci Belgr 2010; 62(3): 663-667.
- [78] Allahverdikhan Vaziri P, Uranbey S, Sancak C. Efficient *in vitro* micropropagation for the conservation of endemic and endangered aucher-eloy grape hyacinth [*Muscari aucheri* (Boiss.) Baker]. JABS 2014; 8 (1): 80-83.
- [79] Allahverdikhan Vaziri P. Endemik *Muscari aucheri*'nin *in vitro* klonal çoğaltımı üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 2009.
- [80] Özdemir FA, Kılıç Ö, Bağcı E. *In vitro* bulb regeneration from stem explants of endemic geophyt *Muscari aucheri* (Boiss.) Baker. IJSM 2017; 4(3): 50-54.
- [81] Uranbey S, İpek A, Çalışkan M, Dündar E, Çöçü S, Basalma D, Güneylioğlu H. *In vitro* bulblet induction from bulb scales of endangered ornamental plant *Muscari azureum*. Biotechnol Biotech Eq 2010; 24:2: 1843-1848.
- [82] Uranbey S. *In vitro* bulblet regeneration from immature embryos of *Muscari azureum*. Afr J Biotechnol 2010; 9(32): 5121-5125.

- [83] Nasırcılar AG, Mirici S, Karagüzel Ö, Eren Ö, Baktır İ. *In vitro* propagation of endemic and endangered *Muscari mirum* from different explant types. Turk J Bot 2011; 35: 37-43.
- [84] Uzun S, Parmaksız İ, Uranbey S, Mirici S, Sarıhan EO, İpek A, Kaya MD, Gürbüz B, Arslan N, Sancak C, Khawar KM, Özcan S. *In vitro* micropropagation from immature embryos of the endemic and endangered *Muscari muscarimi* Medik. Turk J Biol 2014; 38: 83-88.
- [85] Özel ÇA, Khawar KM, Ünal F. Factors affecting efficient *in vitro* micropropagation of *Muscari muscarimi* Medikus using twin bulb scale. Saudi Journal of Biological Sciences 2015; 22: 132-138.
- [86] Gümüşçü A, Çöçü S, Uranbey S, İpek A, Çalışkan M, Arslan N. *In vitro* micro-propagation of endangered ornamental plant-*Neotchihatchewia isatidea* (Boiss.) Rauschert. Afr J Biotechnol 2008; 7(3): 234-238.
- [87] Gürlek D, Özcan S, Khawar KM, Aasım M, Fakılı O. Efficient micropropagation of endemic *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Ietswaart. In: BIORARE Symposium 2010 International Symposium on the Biology of Rare and Endemic Plant Species; 26-29 May 2010, Muğla, Turkey.
- [88] Yıldırım MU. Micropropagation of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Ietswaart using stem node explants. The Scientific World Journal 2013; Article ID 276464, 3 pages.
- [89] Özkum D. *In vitro* shoot regeneration of oregano (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & Davis). HJBC 2007; 35(2): 97-100.
- [90] Akçam-Oluk E, Çakır A. Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey. Afr J Biotechnol 2009; 8(21): 5769-5772.
- [91] Karagüzel Ö, Kaya A, Biner B, Aydınsakir K. *In vitro* propagation of native *Ornithogalum* species in West Mediterranean region of Turkey. Afr J Agric Res 2012; 7(17): 2669-2673.
- [92] Emek Y, Erdağ B. *In vitro* propagation of critically endangered endemic *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) by axillary shoot proliferation. In: Current Progress in Biological Research, Intech, 2013. pp. 203-213.
- [93] Emek Y, Erdağ B. *In vitro* somatic embryogenesis and antioxidant enzyme activities in *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter critically endangered endemic plant. Fresen Environ Bull 2014; 23(4):1051-1057.
- [94] Hayta Ş, Bayraktar M, Baykan Erel S, Gürel A. Direct plant regeneration from different explants through micropropagation and determination of secondary metabolites in the critically endangered endemic *Rhaponticoides mykalea*. Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology 2015; 151(1): 20-28.
- [95] Baba Erdağ B, Yürekli AK. Callus induction and shoot regeneration of *Sideritis sipylea* Boiss. (Lamiaceae). Bulletin of Pure and Applied Sciences 2000; Section B 19 B(1): 41-46.
- [96] Erişen S, Öncel Z. *In vitro* propagation of the threatened plant *Sphaerophysa kotschyana* (Fabaceae): inter simple-sequence-repeat (ISSR) analysis and salt tolerance of the regenerants. Australian Journal of Botany 2013; 61(1): 67-72.

- [97] Erdağ B, Yürekli AK. In vitro propagation of *Stachys tmolea* Boiss. (Lamiaceae). Bulletin of Pure and Applied Sciences 2001; 20 B(2): 67-74.
- [98] Mirici S, Parmaksız İ, Özcan S, Sancak C, Uranbey S, Sarihan EO, Gümüşçü A, Gürbüz B, Arslan N. Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana*. Plant Cell Tissue Organ Cult 2005; 80: 239-246.
- [99] Cenkci S, Kargioğlu M, Dayan S, Konuk M. In vitro propagation of an endangered plant species, *Thermopsis turcica* (Fabaceae). Biologia Section Botany 2008; 63(5): 652-657.
- [100] Cenkci S, Temel M, Kargioğlu M, Dayan S. Propagation of endangered *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüködük using conventional and *in vitro* techniques. Turk J Biol 2009; 33: 327-333.
- [101] Tekdal D, Çetiner S. In vitro plant regeneration derived from leaf and stem explants of endemic *Thermopsis turcica*. Biologia Section Botany 2014; 69(7): 863-869.
- [102] Tekdal D, Çetiner S. In-ovule embryo culture of *Thermopsis turcica*. JAPS 2014; 24(6): 1673-1679.
- [103] Tekdal D, Çetiner S. Efficient embryogenic callus from filaments with anther in *Thermopsis turcica*. TurkJANS 2014; 1 (Special Issue): 1242-1246.
- [104] Baba Erdağ B, Yürekli AK *Thymus sipyleus* Boiss. (Lamiaceae)'un in vitro çoğaltılması. Turk J Biol 2000; 24 (Ek sayı): 81-86.
- [105] Şahin-Demirbağ N, Kendir H, Khawar KM, Aasim M. In Vitro regeneration of Turkish endemic *Trifolium pannonicum* JACQ. subsp. *elongatum* (Willd). Biotechnol Biotec Eq 2008; 22:4: 921-924.
- [106] Doğan-Kalyoncu D. Bazı yabani *Tulipa* türlerinde in vitro soğancık üretimi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 2007.
- [107] Özüdoğru EA, Capuana M, Kaya E, Panis B, Lambardi M. Cryopreservation of *Fraxinus excelsior* L. embryogenic callus by one-step freezing and slow cooling techniques. CryoLetters 2010; 31(1):63-75.
- [108] Özüdoğru AE, Kaya E. Cryopreservation of *Thymus cariensis* and *T. vulgaris* shoot tips: Comparison of three vitrification-based methods. CryoLetters 2012; 33 (5): 363-375.