

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

AFRİKA MENEKŞESİ (*Saintpaulia ionantha*)
BİTKİSİNDE PROTOPLAST İZOLASYONU,
FÜZYONU VE REJENERASYONLARIN
SAĞLANMASI

Irmak ÇAKIN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 05.08.2015

Bornova-İZMİR
2015

Irmak ÇAKIN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Afrika Menekşesi (*Saintpaulia ionantha*) Bitkisinde Protoplast İzolasyonu, Füzyonu ve Rejenerasyonların Sağlanması**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesinin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **05.08.2015** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

.....

Raportör Üye :

.....

Üye :

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Afrika Menekşesi (*Saintpaulia ionantha*) Bitkisinde Protoplast İzolasyonu, Füzyonu ve Rejenerasyonların Sağlanması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

27/08/2015

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZET**AFRİKA MENEKŞESİ (*SAINTPAULIA İONANTHA*) BİTKİSİNDE
PROTOPLAST İZOLASYONU, FÜZYONU VE
REJENERASYONLARIN SAĞLANMASI**

ÇAKIN, Irmak

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Ağustos 2015, 74 sayfa

Bu çalışmada *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerin yapraklarından protoplast izolasyonu ve füzyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım protokolü de elde edilmiştir. Yüzey sterilizasyon denemeleri sonucunda, yaprak eksplantlarında STK2 sterilizasyon yöntemiyle, %94.7 oranında sterilizasyon başarısı sağlanmıştır. Bu sterilize edilen yaprak eksplantlarından direkt sürgün rejenerasyonu %100'lük bir başarı ile 2mg/L BAP ve 1mg/L NAA içerikli MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamında elde edilmiştir. Sürgünler, 8 haftalık kültür süresinin ardından MS ortamında %100 olarak başarılı şekilde köklendirilmişlerdir. Köklendirilen bu bitkiler torf/perlit (1:2) karışımına aktarılarak başarılı olarak aklimatize edilmişlerdir. *In vivo* ve *in vitro* koşullardaki mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinin yapraklarından gerçekleştirilen protoplast izolasyon denemelerinde en iyi sonuç, *in vivo* koşullardan alınan yapraklardan, ön uygulamasız 16 saat boyunca karanlık koşullarda, %1 Pektinaz, %2 Selülaz ve %2 Hemiselülaz içerikli enzim karışımı içerisindeki inkübasyon sonucunda mor çiçekli menekşeden 130×10^3 olarak elde edilmiştir. İzole edilen protoplastlardan, en yüksek mikrokallus rejenerasyonu, *in vivo* kökenli protoplastlardan (50 adet mikrokallus/10mL) mikrokallus oluşumu gerçekleşmiştir. *In vivo* ve *in vitro* koşullardaki mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinin yapraklarından izole edilen protoplastlar, PEG füzyonu öncesinde Hoechst 333422 floresan boyasıyla boyanmışlardır. Bu füzyon sonucunda, PEG 8000'de 397 çoklu füzyon sayısı ve PEG 6000'de 69 ikili füzyon sayısı *in vivo* kökenli protoplastlarda gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Afrika menekşesi, *Saintpaulia ionantha*, protoplast izolasyonu, PEG (Polietilen glikol), protoplast füzyonu, mikroçoğaltım

ABSTRACT**PROTOPLAST ISOLATION, FUSION AND PLANT REGENERATION
IN AFRICAN VIOLET (SAINTPAULIA IONANTHA)**

CAKIN, Irmak

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Aynur GUREL

Agust 2015, 74 pages

In this study, protoplast isolation and fusion were performed *in vivo* and *in vitro* grown purple and white flowering African violets. Also, *in vitro* micropropagation protocol was obtained. At the results of surface sterilization experiments, success rate of sterilization is achieved as 94.7% in leaf explants by STK2 sterilization method. Direct shoot regeneration was obtained as 100% success rate from these sterilized leaf explants cultivated in MS nutrient media (Murashige and Skoog, 1962) that contains 2mg/L BAP, 1mg/L NAA. After 8 weeks culture time, shoots were taken rooted on MS medium with successful rate of 100%. Rooted plantlets were transferred into a mixture of peat/perlite (1:2) for acclimatization. The best result of the protoplast isolation experiments established from the leaves of African violets having purple and white flowers grown *in vitro* and *in vivo* conditions, was obtained as 130×10^3 by incubation within enzyme mixture containing 1% Pectinase, 2% Cellulase and 2% Hemicellulase under dark conditions for 16 hours without pre-application from *in vivo* grown purple African violet leaves. The highest microcallus regeneration (50 microcallus number /10mL) was established in protoplasts originated from *in vivo*. Protoplasts isolated from leaves of purple and white flowering African violets grown *in vivo* and *in vitro* conditions were colored with fluorescent dye H \ddot{o} chst333422 before the PEG fusion. At the results of this fusions, 397 multiple fusions in PEG 8000 and 69 binary fusions. in PEG 6000 were observed in protoplasts originated from *in vivo*.

Key words: African violet, *Saintpaulia ionantha*, protoplast isolation, PEG (Polyethylene glycol), protoplast fusion, micropropagation

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bana her konuda yol gösterici olan sayın danışmanım Prof. Dr. Aynur GÜREL'e, desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Meltem BAYRAKTAR'a, sevgili laboratuvar arkadaşlarım Begüm AKYOL, Berk ÜNAL, Canan YILAN ve Esra İLHAN'a manevi desteği ile yanımda olan Münire EKMEKÇİGİL, Pervin GÜNTÜRKÜN KIR ve Alpaslan Şevket ACAR'a biricik eşim ve arkadaşım Arif ANSIZ'a, her zaman bana maddi manevi destek olan canım babam ve annem Ziya Murat ve Süreyya ÇAKIN'a ve canım aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ABSTRACT	ixx
TEŞEKKÜR	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. Afrika Menekşesinin Genel Özellikleri ve Önemi	5
2.2. Afrika Menekşesinde Yapılan Doku Kültürü Çalışmaları	8
2.3. Protoplast İzolasyonuna Yönelik Yapılan Bazı Çalışmalar	13
2.4. Protoplast Füzyonu ve Somatik Hibridizasyon	16
2.4.1 Spontan füzyon.....	16
2.4.2 Mekanik füzyon.....	16
2.4.3 Uyarılmış füzyon.....	16
2.4.4 Elektrofüzyon	17
2.4.5 Polietilen glikol (PEG) ile Kimyasal füzyon.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Materyal.....	19

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2. Yöntem.....	19
3.2.1 <i>In vivo</i> yaprak eksplantlarının yüzeysel sterilizasyonu	19
3.2.2 <i>In vitro</i> ortamda başlangıç kültürlerinin oluşturulması ve çoklu sürgünlerin elde edilmesi	21
3.2.3 Çoklu sürgün besin ortamı hazırlanması	22
3.2.4 Çoklu sürgünlerin köklendirilmesi ve aklimatizasyonu	24
3.2.5 Protoplast izolasyonu.....	25
3.2.6 Protoplast Füzyonu	30
3.2.7 Verilerin değerlendirilmesi.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Bitki Materyalinin Yüzey Sterilizasyonu.....	32
4.2. Afrika Menekşesinde Çoklu Sürgünlerin Elde Edilmesi, Köklendirilmesi ve Aklimatizasyonu	34
4.3. <i>In Vivo</i> ve <i>In Vitro</i> Kökenli Afrika Menekşelerinden Protoplast İzolasyonu ve Mikrokallus Oluşumu.....	38
4.4. Afrika Menekşesinde Protoplast Füzyonu ve Görüntülenmesi	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
6. ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR DİZİNİ	56
ÖZGEÇMİŞ	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 <i>Saintpaulia ioanantha</i> 'da kültür ortamı kombinasyonları ve rejenerasyon oranları (Gurel and Cakin, 2013).....	9
3.1 Afrika menekşesinde (<i>Saintpaulia ionantha</i>) uygulanan yüzeysel sterilizasyon işlemleri	21
3.2 MS bazal besin ortamının içerdiği bileşikler ve miktarları (Murashige and Skoog, 1962).....	23
3.3 Sürgün rejenerasyonu için kullanılan besin ortamları ve içerikleri	23
3.4 Enzim solüsyonu içeriği ve miktarları.....	26
3.5 Protoplast izolasyonunda kullanılan yıkama solüsyon (CPW) bileşikleri ve konsantrasyonları (pH: 5.8) (Bilkey et al., 1982).	28
3.6 İzole protoplastlardan mikrokallus teşvik edici ortamlar ve içerikleri	30
4.1 Beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşe yaprağından alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemlerinin başarı yüzdeleri.....	32
4.2 Beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerinde steril yaprak eksplant yüzdeleriyle ilgili varyans analiz sonuçları	33
4.3 Sürgün rejenerasyonu için kullanılan ortamlar ve sürgün oluşturma başarısı.....	34
4.4 Beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerinde sürgün rejenerasyon yüzdeleriyle ilgili varyans analiz sonuçları	35
4.5 Beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerinde ön uygulama ve enzim inkübasyon sürelerine göre <i>in vitro</i> kökenli izole edilen protoplast sayıları	40

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.6 Beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerinde ön uygulama ve enzim inkübasyon sürelerine göre <i>in vivo</i> kökenli izole edilen protoplast sayıları43	
4.7 <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> 'dan mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastların PEG 6000 ve 8000 kullanılarak elde edilen ikili ve çoklu füzyon sayıları.....50	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Tanzanya'dan Kenya'ya uzanan Doğu Arc Dağlarının görünümü (Kolehmainen, 2008)	6
3.1 Mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşeleri (<i>Saintpaulia ionantha</i>).....	19
3.2 Afrika menekşesinde kültüre alınan yaprak eksplantları.....	21
3.3 Köklenmiş bitki (a) ve aklimatize edilmiş bitkiler (b).....	24
3.4 İnkübasyon süreci sonunda oluşan hücre süspansiyonun (a) petrideki ve (b) 15 mL'lik falkondaki görünümü.....	27
3.5 Protoplast saflaştırma aşaması (a) %5 Mannitol(w/v) solüsyonu ile 15mL'ye tamamlanmış hücre süspansiyonu ve (b) santrifüjlemenin ardından 15mL'lik falkon tüpünün dibine çöken hücreler	27
3.6 İzole edilen protoplastların hemositometre ile sayımı (a) 10x ve (b) 40x ışık mikroskobunda hemositometredeki protoplastların görünümü	29
4.1 Afrika menekşesinde çoklu sürgün çoğaltımı (a) sterilize edilmiş yaprak eksplantı, (b) 2 hafta sonra SP besin ortamında oluşan sürgün öbekleri, (c) oluşan sürgün öbekleri altkültüre alındıktan 2 hafta sonra gelişen sürgün öbekleri, (d) 2. altkültüre alınan sürgün öbeklerinden 2 hafta sonra gelişen sürgün öbekleri, (e) sürgünlerin 3. altkültüre alınmasından 2 hafta sonra gelişen sürgünler, (f) seyreltilmiş sürgünlerin 4. altkültüre alınmasından 2 hafta sonraki gelişme durumları, (g, h ve i) gelişmiş sürgünlerin büyüme düzenleyicileri içermeyen MS ortamında gelişmesi ve köklendirilmesi.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

- 4.2 *In vitro* ' da elde edilen köklendirilmiş Afrika menekşesi bitkiciklerinin aklimatizasyonu (a) köklenen bitkiciklerin torf/perlit karışımı içeren paper pot'lara aktarılması, (b ve c) torf/perlit karışımına aktarılan sürgünlerin 2 ve 3 hafta sonundaki sonundaki gelişimleri, (d) 11cm çapındaki, torf/perlit içeren saksıya aktarılmış *in vitro* bitkici gelişim durumu.....38
- 4.3 %7'lik Mannitol(w/v) ile 1 saat ön uygulamaya tabi tutulan ve *in vitro* yapraklardan farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen protoplast sayılarının karşılaştırılma grafiği.....41
- 4.4 %7'lik Mannitol(w/v) ile 1 saat ön uygulamaya tabi tutulmayan ve *in vitro* yapraklardan farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen protoplast sayılarının karşılaştırılma grafiği41
- 4.5 %7'lik Mannitol(w/v) ile 1 saat ön uygulamaya tabi tutulan ve *in vivo* yapraklardan farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen protoplast sayılarının karşılaştırılma grafiği.....44
- 4.6 %7'lik Mannitol(w/v) ile 1 saat ön uygulamaya tabi tutulmayan ve *in vivo* yapraklardan farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen protoplast sayılarının karşılaştırılma grafiği.....44
- 4.7 İzole edilmiş protoplastlar (ışık mikroskopunda 10x büyüklükte)45
- 4.8 İzole edilmiş protoplast (ışık mikroskopunda 40x büyüklükte)45
- 4.9 Mor çiçekli Afrika menekşesinin protoplastlarından elde edilen mikrokallusların oluşum aşamaları (a) hücre duvarı oluşmuş hücreler (1. hafta), (b ve c) bölünerek çoğalarak oluşan mikrokoloniler (2. hafta) ve (d) mikrokallus oluşumu (4. hafta).....46

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

- 4.10 *In vitro*'da yetiştirilen mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden alınan eksplantlardan izole edilen protoplastların PEG 8000 ile füzyonu sonucu elde edilen ikili ve çoklu füzyon protoplastları. Floresan mikroskopunda (40x) Höechs 33342 boyasıyla boyanmış füzyona uğratılan protoplastlar (Ç: Çoklu füzyon, B: İkili füzyon).....47
- 4.11 *In vitro*'da yetiştirilen mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden alınan eksplantlardan izole edilen protoplastların PEG 8000 ile füzyonu sonucu elde edilen ikili ve çoklu füzyon protoplastları. Işık mikroskopunda (40x) füzyona uğrayan protoplastlar 48
- 4.12 *In vivo*'dan alınan mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşesi yaprak eksplantlardan izole edilen protoplastların PEG 8000 ile füzyonu sonucu elde edilen ikili ve çoklu füzyon protoplastları. Floresan mikroskopunda (40x) Höechs 33342 boyasıyla boyanmış füzyona uğratılan protoplastlar (Ç: Çoklu füzyon, B: İkili füzyon)..... 49
- 4.13 *In vivo*'dan alınan mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşesi yaprak eksplantlardan izole edilen protoplastların PEG 8000 ile füzyonu sonucu elde edilen ikili ve çoklu füzyon protoplastları. Işık mikroskopunda (40x) füzyona uğrayan protoplastlar.....50

1. GİRİŞ

Saintpaulia ionantha, Gesneriaceae ailesinin 20 türe sahip *Saintpaulia* cinsinin en önemli türüdür. Bu tür; çiçek rengi, yaprak şekli, vejetatif yapısı, çiçeklenme zamanı ve çiçeklenme süresi bakımından farklı birçok çeşide sahiptir (Gurel and Cakin, 2013; Kolehmainen, 2008; Al-Hussein, et al., 2006; Jain, 1997; Pack and Hahn, 1999).

Afrika menekşesi (*S. ionantha*), ticari ve amatör olmak üzere geniş çaplı üretilen bir saksı bitkisidir. Dünya çapında 20.000 çeşide yakın Afrika menekşesi klasik ıslah yöntemleriyle, esas olarak da melezleme olmak üzere, mutasyon ve seleksiyon ile üretilmiştir ve her yıl birkaç yüz yeni çeşit ortaya çıkmaktadır. 1993'de Winkelmann, Afrika menekşesinde bazı önemli süs özelliklerine dikkat çekmiştir. Bu önemli özelliklerden biri de Afrika menekşesinin çiçeklerinde gerçek kırmızı ve sarı rengin olmayışıdır. Bilindiği kadarıyla bu renkler, Afrika menekşesinin germplazmında henüz bulunmamaktadır (Mercuri et al., 2000).

S. ionantha türü çiçek, yaprak, renk ve şekilleri açısından farklı birçok kültür çeşidini barındırmaktadır. Görsel çekiciliği, iç mekânlar gibi gölgeli alanlardaki dayanıklılığı, yapay ışık altındaki çiçek verme yetisi ve tüm bir yıl boyunca vejetatif olarak çoğaltılabilmesi gibi karakteristik özellikleri Afrika menekşesini popüler bir iç mekan süs bitkisi yapmaktadır (Sunpui and Kanchanapoom, 2002).

Global çiçek endüstrisinde, çiçeklerin boyutu ve kokusu gibi özellikleri tüketicinin seçimini etkilemektedir. Süs bitkileri pazarında çiçek rengi; tüketicinin seçimini en çok belirleyen özelliklerden biridir. Bu sebeple istenen renklere sahip, yeni çeşitlerin geliştirilmesi süs bitkileri endüstrisinin geleceği açısından büyük bir değer taşımaktadır. Ayrıca, soğuğa tolerans, hastalık ve zararlılara dayanıklılık gibi önemli özelliklerin de geliştirilmesine hala gereksinim bulunmaktadır (Gurel and Cakin, 2013; Seneviratne and Wijesindara, 2007).

Klasik ıslah yöntemleriyle yeni genotipe sahip bitkilerin, daha ucuz ve kısa zamanda geliştirilmesi mümkündür (Seneviratne and Wijesindara, 2007). Bununla birlikte *S. ionantha* türünde; intraspesifik (tür içi) hibridizasyon ile yeni genotiplerin elde edilmesi mümkün olurken, interspesifik (türler arası) ve intergenerik (cinsler arası) hibridizasyonda henüz tam başarı sağlanamamıştır (Hoshino et al., 1995).

Afrika menekşesinin çoğaltımı, yapraklarının kullanıldığı vejetatif teknikle gerçekleştirilebilmektedir (Hoshino et al., 1995). Ayrıca Afrika menekşesi, yüksek rejenerasyon kabiliyeti ve kapasitesi sayesinde *in vitro* rejenerasyon çalışmaları için iyi bir model sistemi oluşturmaktadır. Yaprak ve tohumdan çoğaltım hariç, vejetatif ve çiçek kısımları kullanılarak, direkt ya da indirekt somatik organogenez ve embriyogenez rejenerasyonu ile mikroçoğaltımı, doku kültürü teknikleri açısından oldukça önemlidir (Gurel and Cakin, 2013; Daud and Taha, 2008; Lo, 1997).

Biyoteknolojik yöntemlerin; birçok türün geleneksel ıslah yöntemiyle üretim programlarını tamamlamada güçlü araçlar oldukları bilinmektedir (Mercuri et al., 2000). *In vitro* yöntemlerle daha büyük ölçeklerde üretim yapılabilen ve ticari öneme sahip çeşitler oluşturulabilmektedir (Mithila et al., 2003). Günümüzde, mikroçoğaltım teknikleriyle çok sayıda ve istenilen türün özelliklerini taşıyan bitkilerin üretimi kısa bir süre içinde gerçekleştirilmektedir. Afrika menekşesinin *in vitro* kültürleri, farklı eksplant kaynakları (yaprak, çiçek tomurcuğu, alt epidermis, anter ve protoplast) kullanılarak oluşturulabilmektedir (Khan et al., 2007; Sunpui and Kanchanapoom, 2002). Diğer bitki türleri gibi Afrika menekşesinin kültüründe de besin ortamındaki kimyasal kompozisyon, sürgün verimini etkileyen en büyük etkidir (Daud and Taha, 2008).

Genetik mühendisliği teknikleri mevcut gen havuzundan ticari değere sahip yeni çeşit geliştirmeyi teşvik edebilmesi için pahalı gözükmektedir (Hoshino et al., 1995). Ancak bitki biyoteknolojisindeki son gelişmeler, Afrika menekşesi genotiplerinin yeni tekniklerle geliştirilmesini mümkün kılmaktadır. Bu yeni teknikler arasından somatik hibridizasyon ve genetik transformasyon daha ön plana çıkmaktadır. Ancak bu teknikler için verimli bir protoplast kültürü ve

transformasyonu gerekmektedir. Son zamanlarda da Afrika menekşesinde protoplast kültürü çalışmalarında kayda değer sonuçlar elde edilmiştir (Gaj and Gaj, 1996).

Somatik hibridizasyon ve direkt gen transferi teknikleri Afrika menekşesindeki genetik çeşitliliği arttırmaya yönelik kullanılmaktadır. Uygun gen aktarım sisteminin belirlenmesi, rejenerasyon hızını artırmak için de gerekli olabilmektedir (Khan et al., 2007; Sunpui and Kanchanapoom, 2002). Son zamanlarda bitki hücrelerine genetik materyal girişini gerçekleştiren ve en geniş kullanım alanı olan *Agrabacterium* aracılığı ile transformasyon yöntemi, Afrika menekşelerinde ilk olarak 2000’li yıllarda gerçekleşmiştir (Mercuri et al., 2000).

Diğer taraftan somaklonal varyasyonlar; donör bitkinin genotipi ve yaşına, sitogenetik değişikliklere, DNA metilasyonuna, eksplant tipine, besin ortamı ve kültür sürecindeki bitki hormonlarına bağlı olarak genetik ve epigenetik değişikliklere öncülük etmektedir (Jain, 1997; Pierik, 1987).

Bitki protoplastları, diğer bir ifadeyle “çıplak hücreler”, modern biyoteknolojiye tek hücreli sistemlere dayalı farklı yaklaşımlar sunmaktadırlar. Genomiks, proteomiks ve metabolomikslerdeki gelişmeler; ozmotik özelliğe sahip, kırılğan ve çepersiz hücrelerin önemini ortaya çıkartarak bu hücrelere olan ilgiyi arttırmıştır (Davey and Anthony,2010).

Protoplastlar, somatik hücrelerin birleştirilmesi ile elde edilen somatik hibrit çalışmalarından gen transferi çalışmalarına kadar çok yaygın bir kullanım alanına sahiptirler (Jain, 1997). Protoplast kültürlerinin başlıca uygulama alanları; temel araştırmalar (histolojik, sitolojik, morfolojik, fizyolojik, metabolik, genetik, moleküler vb.) için kullanımı; protoplast füzyonu aracılığı ile somatik melezleme sonucu somatik hibritlerin ve sibritlerin elde edilmesi; çekirdek, organel, kromozom ve DNA parçalarının aktarımı; totipotensi özelliğinden yararlanılarak protoplastlardan tam bitkinin elde edilmesi; protoplastlar kullanılarak oluşturulan hücre süspansiyon kültürleri ya da kallus kültürleri aracılığı ile organ veya embriyo rejenerasyonlarının sağlanması; asimetrik hibrit bitkilerinin elde edilmesi; somaklonal varyabilitenin oluşturulması; gen aktarım teknikleri

kullanılarak genetiği değiştirilmiş bitkilerin elde edilmesi; geleneksel ışlah yöntemleri ile türler arası ve cinsler arası melezlemelerde ortaya çıkan sorunların aşılması; tek hücre klonlarının elde edilmesi; *in vitro* seleksiyon tekniğinin uygulanması; mutajen ajanlar kullanılarak elde edilen mutant hücrelerin seğilmesi; bitki patolojisi ile ilgili çalışmalara uygulanması; agar üzerinde sıvı kültür, agaroz blokları kültürü, ince aljinat tabaka kültürü ve immobilize kültürler gibi çeşitli protoplast kültür tekniklerinin oluşturulması olarak sayılabilir (Kolehmainen, 2008).

Protoplast izolasyonunda, enzimler aracılığı ile hücre duvarı parçalanarak protoplastların serbest kalmaları sağlamaktadır. Yüksek bitkilerde protoplast izolasyonu ve bunun geliştirilmesi Cocking (1960) tarafından gerçekleştirilmiştir. Cocking, izole ettiği selüloz enzimini, domates köklerinden elde edilen hücrelerin hücre duvarlarını parçalayarak protoplast izolasyonunu gerçekleştirmek için kullanmıştır. Daha sonra bu yöntem üzerinde enzim saflaştırılması da dahil çeşitli konular başka gruplar tarafından genişletilerek çalışılmıştır. Protoplast izolasyonu için kullanılan enzim solüsyonunda, enzim ve plazma membranının parçalanmasını önleyen ozmotik düzenleyicilerin (sükroz, mannitol, sorbitol vb.) varlığı önemlidir. Bazı tuz ve besin maddeleri de ozmotik düzenleyici olarak kullanılmaktadır (Tomar and Dantu, 2010). Bunlardan en sık ve yüksek miktarlarda kullanılan ozmotik düzenleyiciler, CaCl₂ ve mannitoldür (Babaoğlu vd., 2002; Tomar and Dantu, 2010). Ozmotik düzenleyiciler iyonik tuzlarla kullanıldıkları zaman enzimlerin degradasyonunu gerçekleştirirken, aynı zamanda protoplast oluşumunu stabil hale getirirler (Tomar and Dantu, 2010).

Afrika menekşesinin (*Saintpaulia ionantha*) hem çiçeklerinde, hem yapraklarında birçok renk ve Şekil çeşitliliği mevcuttur. Afrika menekşesi sahip olduğu bu çeşitlilik sayesinde ekonomik açıdan önemli bir süs bitki haline gelmiştir. Vejetatif olarak geleneksel yöntemlerle çoğaltımı yapılan Afrika menekşesinde yeni bitki üretimi sınırlı ve uzun üretim süreçleri gerektirmektedir (Ghorbanzade and Ahmadabadi, 2014). Bu yüzden Afrika menekşesinde yeni çeşitler geliştirilerek süs bitkisi olması açısından önemli özelliklerinin çoğaltılması ve hatta hızlı ve yüksek sayılarda üretimi süs bitki sektöründe büyük bir ekonomik fayda sağlayacaktır. Yapılan bu çalışmada; beyaz ve mor iekli

Afrika menekşesi (*Saintpaulia ionantha*) bitkilerinde etkili bir sterilizasyon protokolü ile verimli bir mikroçoğaltım protokolünün belirlenmesi, ayrıca daha sonraki ıslah çalışmalarında kullanılmak amacı ile *in vivo* ve *in vitro* kökenli etkili bir protoplast izolasyonu ve akabinde protoplast füzyonu protokolünün geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Afrika Menekşesinin Genel Özellikleri ve Önemi

Afrika menekşeleri (*Saintpaulia ionantha*); 125 cins ve yaklaşık 2000 tür barındıran, çoğunlukla tropikal, otsu ve çalı formundaki bitkilerden oluşan büyük bir bitki ailesi olan Gesneriaceae'ya ait bitkilerdir. *Saintpaulia* cinsi, doğal olarak Tanzanya'dan Kenya'ya doğru uzanan Doğu Arc Dağları'nın kıyı ovalarında (Şekil 2.1), tek yıllık otsu bitki formunda bulunmaktadır (Kolehmainen, 2008).

Afrika menekşeleri, Doğu Afrika florasının en iyi bilinen bitkileri arasında yer almaktadır. Bu bitkiler yaklaşık yüz yıldır bahçecilik endüstrisi tarafından yoğun ıslah çalışmalarında kullanılmışlardır. Bu çalışmalar sonucunda da Afrika menekşesinin melezleri dünyanın dört bir yanına yayılmış ve popüler süs bitkileri olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kolehmainen 2008).

2006 yılına kadar Afrika menekşelerinin, 4 çeşit ve 20 tür barındırdığı bilinmekteydi. Morfolojik varyasyondaki bilgi eksikliğinden kaynaklanan bu bilgi 2006 yılında Darbyshire tarafından yapılan filogenetik çalışmalar ve Usambara Dağlarının ovalarında keşfedilen yeni türler sayesinde Afrika menekşesinin tür ve çeşitleri hakkında daha çok bilgi elde edilmiştir (Kolehmainen 2008).



Şekil 2.1 Tanzanya'dan Kenya'ya uzanan Doğu Arc Dağlarının görünümü (Kolehmainen, 2008)

Afrika menekşesini ilk olarak 19. yy başlarında Baron Walter Von Saint Paul keşfetmiş ve kendi ismini vermiştir. 60'lı yıllarda ise *Saintpaulia* bitkisini çoğaltıp ticarileştiren Herman Holtkmap tarafından Afrika menekşesi ismi verilmiştir (Kolehmainen 2008). Afrika menekşesinin bitkiler âlemindeki yeri aşağıdaki gibidir:

Âlem: *Plantae*

Şube: *Magnoliophyta*

Sınıf: *Magnoliopsida*

Takım: *Zingiberales*

Familya: *Gesneriaceae*

Cins: *Saintpaulia*

Tür: *S. ionantha*

Afrika menekşeleri doğada deniz seviyesinden 1.400 metre yükseklikte bulunan ormanlarda, gölge ve nemli koşullar altında gelişmektedir. Ormanların yer yüzeylerinde, ağaçların gövdesinde ve taşların üzerinde sarılı şekilde bulunan bu bitkilerin, çoğaltımı tohumla veya vejetatif olarak gerçekleştirilebilmektedir (Kolehmainen 2008).

Afrika menekşelerinin doğada buldukları yerler ekvatora yakın bölgeler olduklarından *Saintpaulia ionantha* tropik bitki olarak sınıflandırılmıştır. Afrika menekşeleri 20-25°C'de köklendirilerek toprağa dikilirler. Bitki gelişiminin sağlandığı Afrika menekşeleri 24°C'de muhafaza edilirler. Aksi takdirde düşük sıcaklıklar Afrika menekşesinin gelişmesini engellemekle beraber, çiçek açma süresini de geciktirmektedir. Sıcaklık düştükçe bitkinin çeşitli fungal ve bakteriyel hastalıklara karşı olan direnci düşmektedir. Bu yüzden Afrika menekşesindeki gece ve gündüz sıcaklıkları oldukça önemlidir. Gece sıcaklığı, gündüz sıcaklığından en fazla 1-2 derece düşük olmalıdır (Kolehmainen 2008).

Afrika menekşeleri çok kuru atmosferlere karşı dayanıklılık gösterebilirler. Kuru ortamdaki Afrika menekşeleri çiçek açamazlar, ancak yeni yaprak gelişimleri gösterebilirler. *Saintpaulia ionantha*'nın doğal ortamındaki yağış oranı çok yüksektir, bu yüzden nem de %60-70 civarlarındadır. Havadaki nem miktarının azalması durumunda, Afrika menekşesinin yapraklarından su kaybı meydana gelerek bitki gelişimi olumsuz etkilemektedir. Havadaki fazla miktarda nem yaprakların çürümesine neden olurken, topraktaki fazla nem de köklerin çürümesine yol açmaktadır (Kolehmainen 2008).

Afrika menekşeleri doğal ortamında ormanların yüzeylerinde ve ağaç gövdelerine sarılı halde buldukları için direkt güneş ışığını almayan aydınlık ortamlarda yetişmektedirler. Afrika menekşesi doğrudan ışık alırsa, yapraklarında sarkmalara neden olmaktadır. Uzun ve sık büyümüş gövdeye ve az sayıda çiçeğe sahip Afrika menekşeleri ise yeteri kadar ışığa maruz kalmadıklarının göstergesidir (Kolehmainen 2008).

Doğada bulunan bitkilerin süs bitkisi olarak kullanımı amacıyla kültüre alınarak yetiştirilmesi çok eski tarihlere kadar uzanmaktadır. Ancak süs bitkilerinin önemli bir sektör haline gelmesi 20. yüzyılın başlarında gerçekleşen bir süreçtir. Bu süreç gelişmiş ülkelerin büyük şehirlerinde (ör: New York (ABD), Londra (İngiltere), Berlin (Almanya), Paris (Fransa), Amsterdam (Hollanda), Tokyo (Japonya)) ticari olarak süs bitkisi yetiştiriciliğinin başlamasıyla ivme kazanmış ve öncelikli olarak kesme çiçek ve iç ve dış mekan süs bitkilerinin yetiştiriciliğinin yapılmasıyla da süs bitkileri sektörü çok hızlı gelişmiştir. Süs bitkileri konusundaki ARGE çalışmaları artarak sektörün gelişmesine büyük katkıda bulunulmuştur (Hekimoğlu ve Altındeğer, 2012).

2.2. Afrika Menekşesinde Yapılan Doku Kültürü Çalışmaları

Afrika menekşesinde (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) mikroçoğaltım, hızlı bitki üretimi ve genetik çeşitlilik oluşturması için oldukça önemli bir yöntemdir. *In vitro* koşullarda başarılı bir bitki çoğaltımı; eksplant tipi, donör bitkinin fizyolojik durumu, besin ortamındaki bitki büyüme düzenleyicileri ve kültür koşulları gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Afrika menekşesinin mikroçoğaltımında yüksek oranlarda ve düşük maliyetli üretim için geliştirilen protokollerin ticari alanda uygulanabilir olması oldukça önemlidir (Shukla et al., 2013).

Afrika menekşesi, yüksek rejeneratif kapasiterinden dolayı, *in vitro* rejenerasyon araştırmaları için iyi bir model sistemi oluşturmaktadır. Yaprak çelikleriyle ve esas olarak da tohumlarla gerçekleştirilen çoğaltımın haricinde, doku kültürü teknikleri, vejetatif kısımların (yaprak segmentleri ve petiyolleri) ve ayrıca çiçek kısımlarını (sepal, petal ve ovaryum) kullanarak, direkt ve indirekt somatik embriyogenez ve embriyogenez rejenerasyon mekanizmalarıyla mikroçoğaltım açısından çok önem taşırlar (Gurel and Cakin, 2013; Shukla et al., 2013; Khan et al., 2007; Rout et al., 2006; Mercuri et al., 2000; Jain, 1997; Pierik, 1987). Sürgün rejenerasyon oranı, bu türün vejetatif segmentlerinden %90-100 arasında belirlenmiştir (Sunpui and Kanchanapoom, 2002).

Somatik embriyo oluşum oranları ise yaprak eksplantlarından %32.7 ve embriyonik kalluslardan ise %63.3 olarak elde edilmiştir (Gurel and Cakin, 2013; Rout et al., 2006). *In vitro* koşullarda çoğaltılan sürgünlerin köklenmeleri %100 oranında belirlenmiştir (Çizelge 2.1) (Gurel and Cakin, 2013; Sunpui and Kanchanapoom, 2002).

Çizelge 2.1 *Saintpaulia ionantha*'da kültür ortamı kombinasyonları ve rejenerasyon oranları (Gurel and Cakin, 2013)

	MS Bazal ortam	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)	IAA (mg/L)	TDZ (mg/L)	Zeatin (mg/L)	Katılaştırıcı Ajan	Rejenerasyon Oranı (%)	Referanslar
Sürgün Rejenerasyon Ortamı	+	-	-	-	-	-	-	6.5	Agar	97	(Al-Hussein et al., 2006)
Kallus Teşvik Ortamı	+	-	-	-	-	-	0,6	-	Agar	94	
Kök Teşvik Ortamı	+	0.3	0.3	-	-	0.3	-	-	Agar	100	
Sürgün Rejenerasyon Ortamı	+	-	1	-	3	-	-	-	Gelrite	100	(Sunpui and Kanchanapoom, 2002)
Kallus Teşvik Ortamı	+	-	-	-	-	-	0.5	-	Agar	100	
Kök Teşvik Ortamı	1/2	3	-	-	-	-	-	-	Agar	100	
Sürgün Rejenerasyon Ortamı	+	-	-	-	1	-	-	-	Gelrite	40	(Jain, 1997)
Kallus Teşvik Ortamı	+	-	0.1	0.2	0.1	-	-	-	Agar	100	
Kök Teşvik Ortamı	+	-	0.1	-	-	-	-	-	Agar	100	
Sürgün Rejenerasyon Ortamı	+	-	1	-	3	-	-	-	Agar	100	(Khan et al., 2007)
Kallus Teşvik Ortamı	+	-	1	-	-	-	-	-	Cotton	84	
Kök Teşvik Ortamı	+	-	-	-	-	-	-	-	Agar	100	

Lo, 1997'de Afrika menekşesinde sürgün organogenezini etkileyen faktörleri araştırdığında, eksplant tipinin (ör; petiol, sap, kök), eksplantın fizyolojik durumunun, eksplantın yaranmasının ve eksplantın ortamın üzerine konuş şeklinin (abaxial ve adaxial) önemli olduğunu vurgulamıştır.

Afrika menekşesinde gerçekteştirilen mikroçoğaltım çalışmalarının çoğunda sürgün rejenerasyon ortamlarında bitki büyüme düzenleyicileri olarak IAA (Indole-3-acetic acid) (Lo, 1997), Zeatin, BAP (6-Benzylaminopurine), NAA(1-Naphthaleneacetic acid) ve TDZ (N-phenyl- N'-1, 2, 3-thidiazol-5-ylurea) kullanılmıştır. Shukla vd.(2013)'nın hazırlamış olduğu Afrika menekşesinin mikroçoğaltımı protokolünde, MS (Murashige ve Skoog, 1962) bazal ortamında

2µM TDZ içerikli besin ortamında 9 günlük kültür sürecinin sonunda bir eksplanttan 20-28 adet yeni bitkicikler gelişmiştir. Sunpui ve Kanchanapoom (2002) ve Khan vd. (2007)'nin Afrika menekşesindeki bitki rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarında, 3mg/L BAP ve 1mg/L NAA içerikli, MS bazal ortamında %100 sürgün rejenerasyonu elde edildiği (Khan et al., 2007), 0.5mg/L TDZ içerikli ortamda ise kallustan sürgün rejenerasyonunun (%100) gerçekleştiği bildirilmiştir (Sunpui and Kanchanapoom, 2002).

Ghorbanzade ve Ahmadabadi (2014)'nin yaptığı bitki rejenerasyonu çalışmasında ise modifiye edilmiş MS bazal ortamında 1mg/L TDZ ile %100 sürgün rejenerasyon başarısı elde edildiği vurgulanmıştır. 2003 yılında Mithila vd. yaptıkları çalışmada, Afrika menekşesinde besin ortamlarındaki düşük TDZ konsantrasyonlarının sürgün organogenezini ve somatik embriyogenezi teşvik ettiği belirtilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda 5 - 10 µM TDZ içerikli MS ortamında 6 günlük kültür süresi boyunca en yüksek sürgün organogenezini ve somatik embriyogenezi gözlemlenmiştir.

Pack ve Han (1999)'nin Afrika menekşesinin yapraklarını homojenize ederek mikroçoğaltımdaki somaklonal varyasyonları araştırdıkları çalışma sonucunda, küçük bir gıda öğütücüsü ile *in vitro* koşullarda geliştirdikleri Afrika menekşelerinin yapraklarını homojenize ettikten sonra petrilere kültüre alarak bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu rejenerasyon sonucu elde edilen bitkiciklerde somaklonal varyasyonlar (%6) tespit etmişlerdir.

Somaklonal varyasyonlar, bitki doku kültüründe teşvik edilen rejenerasyonlar sonucunda genetik ve epigenetik kökenli olabilmektedir. Somatik hücrelerde daha önce etkin olmayan özellikleri tek gen mutasyonları, anöploid ve transpoze elementler aracılığı ile ortaya çıkabilmektedir. Somaklonal varyasyonlar genotipe, donör bitkinin yaşına, sitogenetik değişikliklere, DNA metilasyonuna ve besin ortamı içerisindeki hormonlara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Ghorbanzade and Ahmadabi, 2014; Jain, 1997). NAA, 2,4-D ve Kinetin gibi bitki büyüme düzenleyicilerin yüksek konsantrasyonlarda kullanımının da somaklonal varyasyona neden oldukları tespit edilmiştir (Ghorbanzade and Ahmadabi, 2014).

Vejetatif bitki üretimi, kallus kültürü, hücre süspansiyon kültürü ve protoplast kültürü gibi *in vitro*' da kullanılan yöntemlerde somaklonal varyasyonlar ve mutasyonların oluşma olasılığı vardır (Ghorbanzade and Ahmadabi, 2014). Organogenez ya da protoplast hücreleriyle gerçekleştirilen bitki rejenerasyonları genellikle daha çok somaklonal varyasyonlara yol açmaktadır. Bununla beraber kültür süresinin uzunluğu da somaklonal varyasyonu etkilemektedir (Ghorbanzade and Ahmadabi, 2014; Jain, 1997).

Anter ya da mikrospor kültürlerinden elde edilen haploit bitkiler, mutasyon çalışmalarında tercih edilmektedir, çünkü haploit bitkilerde resesif genler gizlenmemektedir. Smith vd. (1981)'nin yaptıkları çalışmada anterlerden elde edilen haploit Afrika menekşelerinin yaprak genişliklerinin ve uzunluklarının donör Afrika menekşesinden daha küçük olduğu tespit edilmiştir (Norris et al., 1982; Smith et al., 1981).

Salisilik asit (2-hidroksi asit) patojenlere karşı direnç göstermede ve çiçek oluşumu da dâhil olmak üzere birçok bitki işlevini düzenlemeye yardımcı olmaktadır (Jabbarzadeh et al., 2009; Senevriatne and Wijesundara, 2007; Martin-Mex et al., 2005). Yapılan araştırmalarda salisilik asitin bitkilerdeki bazı fizyolojik ve biyokimyasal işlemlerin kontrol edilmesinde önemli bir rol oynadı gösterilmiştir. Hatta bazı araştırmacılar tarafından bir fitohormon olarak kabul edilmiştir (Jabbarzadeh et al., 2009; Martin-Mex et al., 2005). Afrika menekşesi gerek çiçek, gerek yaprak renk ve şekilleri bakımından popüler bir iç mekân bitkisi olmuştur. Bu yüzden çiçeklerin saplarındaki kalış süreleri, çiçek sayıları, çiçek boyutları ve yaprak sayıları oldukça önemlidir.

Martin-Mex vd. (2005)'nin Salisilik asitin (SA) Afrika menekşesindeki çiçeklenme üzerine etkilerini inceledikleri araştırmada, düşük konsantrasyonlardaki salisilik asit (0.001 μ M) spreyi hazırlanarak seradaki Afrika menekşelerinin üzerlerine püskürtülmüştür. SA uygulaması sonucunda ise uygulanan bitkilerdeki yaprak sayısı, bitki büyüklüğü ve çiçek tomurcuklarındaki sayı kontrol grubuna göre artış gösterirken, çiçek açma süresi yine kontrol grubuna göre kısalmıştır. Jabbarzadeh vd. 2009 yılında, Afrika menekşesinde SA

etkilerini inceleyen benzer çalışmada da aynı parametreler kullanılmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir.

Seneviratne ve Wijesundara (2007)'nin Afrika menekşesindeki çiçeklerin rengini mutasyon ile değiştirmeyi hedefledikleri çalışmada, %0.06'lık kolşisin içerikli solüsyona 22,5 saat daldırılan bitki yaprakları serada dikildikten 2 ay sonra yeni sürgün gelişimleri gözlenmiştir. Bitkilerin üç nesli takip edilip bu bitkilerdeki fizyolojik değişiklikler gözlenmiştir. 18 aylık gözlem sürecinden sonra, ilk açan çiçeklerin renklerinde farklılık olduğu, ancak sonraki nesillerde bu renk farklılığının eski haline döndüğü tespit edilmiştir.

1981' de Espino ve Vazquez, Afrika menekşesinde kolşisin ve kafeinin bitki çoğaltımına ve poliploidizasyona etkilerini araştırmışlardır. Bu araştırmada Afrika menekşesinin yapraklarından alınan eksplantlar, uygun ortamlara kültüre alınıp belli konsantrasyon ve zaman periyodunda kolşisin ve kafein uygulamasına maruz bırakılmıştır.

Kryopreservasyon yöntemi ile canlı bir bitki materyali, sıvı nitrojende dondurulup $-196^{\circ} C$ 'de saklanarak, bu bitki materyalinin genetik kaynağının en güvenli ve verimli bir şekilde korunmasını sağlamak mümkündür. Kryopresevasyon yöntemi maliyetli bir yöntem olmasına karşın uzun süreli bir saklama yöntemidir. 2004' de Asmara vd. Afrika menekşesinde kryopresevasyon yöntemiyle sürgün uçlarının saklanma koşulları üzerine çalışmışlardır. Asmara vd. (2004), *in vitro*' da hızlı mikroçoğaltımı yapılan Afrika menekşesinin *in vitro* koşullarda daha az yer kaplayacak şekilde saklayabilmek ve aynı zamanda doku kültüründe sağlıklı donör bitki materyalini elde edebilmek üzere kryopreservasyon açısından uygun protokol oluşturmayı hedeflemiştir. Kryopreservasyon yöntemi ile *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı yapılan, hastalıktan arı bitkilerin saklanması ve bu bitkilerin saklanmasında steril ve kontrollü yer bulmadaki sıkıntılara karşın, büyük miktarlarda bitki materyalini az bir alanda saklamayı mümkün kılmaktadır.

Kryopreservasyonda dondurulan materyalin saklanma ömrü uzundur, ancak bu süreç uzadıkça bitkinin rejenerasyon özelliği azalmaktadır. Moges vd. (2004), Afrika menekşesinde kryopresevasyon yönteminde, %3 (w/v) Sodyum aljinat boncukları ile enkapsüle ettikleri sürgün uçlarını sıvı nitrojende dondurmuşlardır. Kryoprotektan (koruyucu) olarak %10 DMSO (Dimetil sülfoksit) ve 0.5 M süktroz içerikli solüsyon kullanıldığında sürgün uçlarında %100 canlılık , %80'inde yavaş büyüme tespit etmişlerdir.

10-12°C'lerin altında donma sıcaklarına maruz kalan tropik ve subtropik bitkilerde soğuktan kaynaklanan fizyolojik yaralanmalar olmaktadır. Soğuğa duyarlı ekonomik öneme sahip bitkilerden bazıları; muz, avokado, mısır, salatalık, şeker kamışı, tatlı patates ve domates gibi sebzelerdir. Süs bitkilerinde ise ilk aklı gelen soğuğa duyarlı tropik bitki olan Afrika menekşesidir. Soğğun neden olduğu fizyolojik zarar ise; fide canlılığın azalması ve metabolizmasının yavaşlamasından kaynaklı olarak bitki gelişiminin yavaşlamasıdır. Saltveit ve Hepler (2004) yaptıkları çalışmada, ısı şoku ve soğuk stresinin neden olduğu zararların giderilmesi üzerinde durmuşlardır. Yapılan çalışmada soğuk nedeniyle dokulardaki Ca⁺ iyonlarının geçişi engellenirken, 6 dakika boyunca 45°C'lik bir ısı şoku uygulanan dokularda, % 50'lik iyon akışının yeniden canlandığı tespit edilmiştir.

2.3. Protoplast İzolasyonuna Yönelik Yapılan Bazı Çalışmalar

Hücre duvarlarının uzaklaştırıldığı ve sadece plazma membranı (zar) ile çevrilen hareketli bir sitoplazmaya sahip hücreler “protoplast” olarak ifade edilmektedirler (Winkelmann and Grunewaldt, 1992). Protoplast hücreleri çok farklı bitki dokularından elde edilebilmekle birlikte, yaprak mezofil hücreleri bu amaçla en yaygın kullanılan kaynaklardır (Hopkins 2007). Ayrıca kallus ve hücre süspansiyon hatları da yaygın kullanılan bitki materyalleridir (Winkelmann and Grunewaldt, 1992).

Çekirdek ve organelere ait genlerin yeni kombinasyonlarını elde etmek için protoplastlardan ve farklı genotiplere ait protoplastlar arasında gerçekleştirilen füzyonlardan sürgün rejenerasyonu, Afrika menekşesinde genetik varyabiliteyi

arttırmak için çok önemlidir (Gurel and Cakin, 2013; Afkhami-Sarvestani et al., 2012).

Saintpaulia ionantha'da protoplastlardan *in vitro* sürgün rejenerasyon oranının %2 ile %68 arasında olduğu tespit edilmiştir. (Winkelmann,1993; Winkelmann and Grunewaldt, 1992, 1994, 1995(a,b), 1996). Afrika menekşesinde doku kültürüyle rejenere edilen bitkilerdeki somaklonal varyasyonlar %2-%10 aralığında yer almıştır (Gurel and Cakin, 2013; Rout et al., 2006).

Yaprak segmentlerinden doğrudan rejenere olan bitkilerdeki somaklonal varyasyonlar, Afrika menekşesinde çiçeklenme periyodu, bitki rejenerasyonu, bitki başına çiçek sayısı ve çiçek büyüklüğü ile ilgili olarak elde edilmişlerdir (Gurel and Cakin, 2013; Jain, 1997; Hoshino et al., 1995).

Saintpaulia ionantha bitkisinde Winkelmann ve Grunewaldt (1995(a)) tarafından yürütülen çalışmada, 11 farklı genotipin protoplast kültürü yöntemindeki verimlilikleri karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada, *in vitro* ortamlarda rejenerasyonu sağlanan genç sürgünlerin yaprak dokuları bitki materyali olarak kullanılmıştır. Genotiplerin tamamında hücre bölünmesi ve kallus oluşumları gözlenmiştir. Bitki materyalinin genotipi ve fizyolojik durumunun protoplast izolasyon verimi üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca farklı genotiplerin ve fizyolojik duruma sahip bitkilerin, protoplast kültürlerinin oluşturulmasından sonra hücre bölünmesi ve kallus oluşumu aşamalarında da farklılıklar gösterdikleri saptanmıştır. Bu araştırma sonucunda, 11 *Saintpaulia ionantha* genotipi için protoplast izolasyon protokolü geliştirilmiş ve 11 genotipin 10 tanesi için de protoplasttan bitki rejenerasyonu protokolü oluşturulmuştur .

Sulzinski ve Cimasky (1995); *Saintpaulia ionantha* bitkisinde etkili ve hızlı bir protoplast izolasyonu yöntemi geliştirmek üzere çalışma yürütmüşlerdir. Yapılan çalışmada, bitki yapraklarının farklı kısımları protoplast izolasyonu amacı ile eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Yapraklar iki parçaya ayrılarak sapa yakın kısımları ve yaprakların uç kısımları ayrı ayrı değerlendirilerek protoplast

izolasyon verimliliği ele alınmıştır. Enzimatik protoplast izolasyonunda izolasyon verimliliğinin artırılması için %2-7 konsantrasyonlarında mannitol uygulaması denenmiştir. Çalışma sonucunda yaprak kesimlerine göre protoplast verimlerinin de farklı olduğu görülmüştür .

Hoshino vd. (1995)'nin yaptıkları çalışmada ise *Saintpaulia ionantha* hücre kültürlerinden elde edilen protoplastlardan tam bitki rejenerasyonu hedeflenmiştir. *Saintpaulia ionantha*' ya ait yaprak eksplantları kallus oluşturma amacı ile 1 mg/L 2,4-D ve 2 g/L kasein hidrolizat içeren B5 ortamı içerisinde kültüre alınmıştır. Elde edilen kalluslarda 1 mg/L 2,4-D, 1 M Mannitol ve sükröz içeren sıvı ortamlarda hücre süspansiyon kültürleri oluşturulmuştur. Bu hücre kültürleri protoplast kültürleri için bitki materyali kaynağı olarak kullanılmıştır. İzole edilen protoplastlardan 2 ay içerisinde mikrokoloniler oluşmuştur. Elde edilen mikro kalluslar ilk 2 ay 1 mg/L NAA ve 1 mg/L BA içeren ortamda, daha sonraki 4 ay ise 1 mg/L NAA ve 5 mg/L BA içeren ortamda kültüre alınarak bitki rejenerasyonu sağlanmıştır. Rejenere olan bitkicikler sera ortamında aklimatize edilmişlerdir.

Protoplast izolasyonu ve kültürü çalışmaları *Saintpaulia ionantha* türü dışında birçok bitki türünde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Ling vd. 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada, *Orthosiphon stamineus* geleneksel adı ile 'kedi bıyığı' bitkisinde protoplast izolasyon üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada bitki materyali olarak *in vitro* sürgünler kullanılmıştır. Eksplant yaş ağırlığının, bitki dokusu tipinin ve enzim konsantrasyonunun protoplast izolasyon verimliliği üzerinde inkübasyon süresi kadar etkili oldukları gösterilmiştir. Bu amaçla, *in vitro* bitki materyallerinin köklerinden, gövdelerinden ve yapraklarından protoplast izolasyonu gerçekleştirilmiştir. En başarılı izolasyon yaprak ekplantlarının kullanıldığı çalışmalardan elde edilmiştir. Ayrıca kullanılan bitki materyali yaş ağırlığının protoplast verimliliği (hücre sayısı/bitki materyali yaş ağırlığı) üzerine etkisi olduğu saptanmıştır. Bu amaçla 0.05, 0.1, ve 0.15 g yaş ağırlığa sahip eksplantlardan en yüksek verimlilik 0.5g yaş ağırlıktaki eksplantlarla yapılan izolasyonlardan elde edilmiştir. Ayrıca ozmotik basıncı dengelemek için kullanılan sorbitol konsantrasyonunun da protoplast verimliliği üzerine etkili olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada, 0.5, 1, 1.5 M sorbitol

kullanılan izolasyonlarda en başarılı sonucunun 1.5 M sorbitol kullanılan denemelerden elde edildiği ifade edilmiştir (Ling et al., 2009).

2.4. Protoplast Füzyonu ve Somatik Hibridizasyon

Uygun koşullar altında iki farklı kaynaktan elde edilen protoplastların ve çekirdeklerin uygun yöntemlerle kaynaştırılmaları sonucunda (füzyona uğratarak) elde edilen tek bir hibrit hücreye “somatik hibrit” adı verilmektedir. Somatik hibrit terimi, eşeyssel hücreler (sperm, yumurta) yerine somatik (vejetatif) hücrelerin kaynaşarak oluşturdukları hibrit hücre olarak tanımlanmaktadır (Hopkins 2007).

Somatik hibrit elde edilmesi için kullanılan çok farklı füzyon yöntemler bulunmaktadır.

2.4.1. Spontan füzyon

Bu tür füzyonlara genellikle farklı türlere ait protoplastlar aynı enzim solüsyonu içerisinde izole edilirken karşılaşılır. Henüz enzim solüsyonu içerisinde bulunan farklı türlere ait, özellikle genç yapraklardan elde edilen protoplastlarda kolaylıkla gerçekleşebilmektedir (Gürel vd., 2013).

2.4.2. Mekanik füzyon

Bu yöntemde protoplastlar herhangi bir kaynaştırıcı ajana ihtiyaç duyulmadan, protoplastlar mekanik etki ile birbirlerine yaklaştırılarak kaynaşmaları sağlanmaktadır (Gürel vd., 2013).

2.4.3. Uyarılmış füzyon

Protoplastların; NaNO_3 , yapay deniz suyu, lizozim, yüksek pH/ Ca^{++} , polietilen glikol (PEG), antikorlar, polivinil alkol, elektriksel akım, dekstran ve dekstran sülfat, yağ asitleri ve esterleri gibi füzyon uyarıcı ajanlarla uyarılarak füzyona uğratılmalarını sağlayan yöntemdir (Gürel vd., 2013).

2.4.4. Elektrofüzyon

Bu yöntemde protoplastlar farklı büyüklükte ve tipteki elektrik akımlarına maruz bırakılarak kaynaştırılmaktadır (Verma et al., 2008) . Bu füzyon yöntemi diğer yöntemlere göre daha seçici bir füzyon olanağı sağlar. Ayrıca diğer yöntemlerde uyarıcı ajanların oluşturabileceği sitotoksik etkiler de gözlenmez (Gürel vd., 2013).

2.4.5. Polietilen glikol (PEG) ile kimyasal füzyon

Polietilen glikol kullanılarak gerçekleştirilen füzyon yöntemi elektrofüzyon yönteminden daha yaygın kullanılan bir yöntemdir (Gürel vd., 2013). Bu yöntemde uygun iyon kombinasyonunda ve konsantrasyonunda iyon (P^+ , Ca^{++} vb.) ve PEG çözeltisi içerisinde protoplastların adhezyonlarının artırılarak birbirlerine yaklaşması ve kaynaşması sağlanır (Verma et al., 2008). Füzyon çözeltisi içerisindeki PEG konsantrasyonu çok önemlidir. Düşük konsantrasyonlarda PEG kullanımı füzyon başarısını, yüksek konsantrasyonlar ise hücrelerin canlılık ve rejenerasyon yüzdelerini olumsuz yönde etkileyecektir.

Afkhami-Sarvestani vd. (2012), Afrika meneşesi (*Saintpaulia ionantha*) ve *Streptocarpus* da protoplast izolasyonu ve füzyonu gerçekleştirmişlerdir. PEG 6000 (%30) ile gerçekleştirmiş oldukları füzyon sonucunda ise %36 ikili füzyon oranı elde edildiği bildirilmiştir.

Günümüzde protoplast füzyonu birçok bitkide uygulanmış ve birçok türde somatik hibritler elde edilmiştir. Rezazadeh vd. tarafından 2011 yılında yürütülen çalışmada, mango bitkisinden (*Mangifera indica L.*) elde edilen proembriyonik yapılardan ve sera ortamındaki bitkilerden sağlanan yapraklardan protoplast izolasyonu ve protoplast füzyonu aracılığı ile somatik hibridizasyon sağlanmıştır. Bu amaçla 'Kensington Pride' çeşidinin 'Haden', 'Tommy Atkins' ve 'Keitt' çeşitleri ile oluşturduğu melezler kullanılmıştır. Yaprak dokuları sera ortamında bulundurulan bitkilerden sağlanmıştır. Proembriyolar ise olgunlaşmamış meyvelerin çekirdeklerinden elde edilmişlerdir. Protoplast izolasyonunda, protoplast yıkama çözeltisi olarak, CPW (Cell and Protoplast Washing) solüsyonu kullanılmıştır. Proembriyonik yapılar için 0.7 M ve yapraklar için ise 0.5 M

ozmolaritede Mannitol kullanılırken, enzim çözeltisi için 1.5% Selülaz R-10 (Yakult Honsha Co., Japan), 1.0% Hemiselülaz (Sigma) ve 0.75% Macerozim (Yakult Honsha Co., Japan) proembriyonik yapılar için 1.5% Macerozim ise yapraklar için hazırlanmıştır. İzolasyon sonrasında 6×10^5 protoplast/mL olacak şekilde hazırlanan protoplast çözeltisi petri kapları üzerinde yaklaşık 100 μ L'lik damlalar halinde damlatılmışlardır. Damlatılan protoplast çözeltisi 20 dakika boyunca protoplastların çökmesi için beklendikten sonra PEG çözeltisi (0.6 M Glikoz, 10 mM CaCl₂.2H₂O, 0.7 mM KH₂PO₄, pH 8.0) her bir damlanın üzerine damlatılarak füzyon gerçekleştirilmiştir. Füzyona uğratılan protoplastlardan hücre bölünmeleri, mikrokallus oluşumları ve somatik embriyogenez aracılığı ile tam bitki oluşumu sağlanmıştır .

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, bitkisel materyal olarak ticari olarak satılan Afrika menekşesinin (*Saintpaulia ionantha*) hem *in vivo* mor ve beyaz çiçekli bitkileri hem *in vitro* mikroçoğaltılan bitkicikleri kullanılmıştır (Şekil 3.1). Apikal sürgün etrafındaki genç yapraklar eksplant kaynağı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1 Mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşeleri (*Saintpaulia ionantha*)

3.2. Yöntem

3.2.1. *In vivo* yaprak eksplantlarının yüzeysel sterilizasyonu

Saksıda (*in vivo*) yetiştirilen Afrika menekşelerinin genç yaprakları yaprak sapları ile birlikte kesilerek alınmıştır. Genç yaprakların sterilizasyonunda 4 farklı sterilizasyon protokolü denenmiştir. Bu protokollerde sterilant olarak %70'lik alkol çözeltisi, %0.1'lik civa klorür ($HgCl_2$), %0.5'lik sodyum hipoklorit ($NaOCl$) ve %100'lük Crystalin® (NPS firması tarafından üretilen, aktif maddesi hipokloröz olan bir yüzey temizleyicisi) kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Afrika menekşesinin yaprakları tüylü oldukları için, saplarıyla birlikte alınan yapraklar çeşme suyuyla iyice yıkanarak sterilizasyonda kullanılacak olan çözeltilerin bitki materyali ile daha etkili bir şekilde temas etmeleri sağlanmıştır.

İlk sterilizasyon protokolünde (ST1), akan su altında iyice yıkanan yapraklar, %70'lik alkol çözeltisi içerisinde 1-2 dakika süre ile çalkalanarak bekletilmişlerdir. Ardından alkol çözeltisinin içerisinde alınan yapraklar durulama yapılmadan %0.1'lik civa klorür (HgCl_2) çözeltisinde 25 dakika boyunca çalkalanarak tutulmuşlardır. HgCl_2 çözeltisinden çıkartılan yapraklar, steril saf su içerisinde 2 dakika süreyle çalkalanarak durulanmışlardır. Durulama işlemi 3 kez tekrar edilmiştir (Çizelge 3.1).

İkinci sterilizasyon protokolünde (ST2) ise yine akan su altında yıkanan yapraklar, % 70'lik alkol çözeltisi içerisinde 1-2 dakika boyunca çalkalanarak bekletilmişlerdir. Yapraklar, daha sonra 1-2 damla tween 20 ilave edilen %0.5'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisi içerisinde 25 dakika süreyle çalkalanmışlardır. Ardından 2 dakika boyunca steril saf su içerisinde çalkalanarak durulama işlemi yapılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır (Çizelge 3.1).

Üçüncü sterilizasyon protokolünde (ST3) yine akan su altında yıkanan yapraklar, % 70'lik alkol çözeltisi içerisinde 1-2 dakika boyunca çalkalanarak bekletilmişlerdir. Sonrasında %100'lük Crystalin® içerisinde 25 dakika süreyle hafifçe çalkalanarak bırakılmışlardır. Crystalin® sıvısı içerisinde çıkartılan yapraklar steril saf su içerisinde 3 kez 2'şer dakikalık süreler içerisinde hafifçe çalkalanarak durulanmışlardır (Çizelge 3.1).

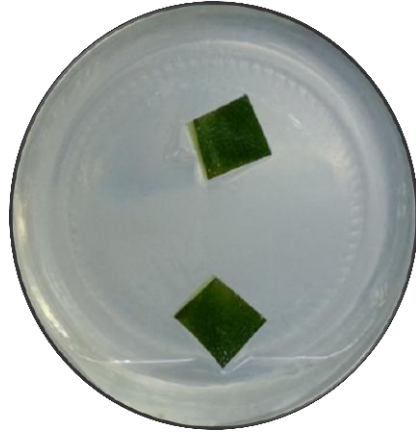
Dördüncü sterilizasyon protokolünde (ST4) ise akan su altında yıkanan yapraklar, % 100'lük Crystalin® sıvısı içerisinde 20 dakika hafifçe çalkalanarak bekletilmişlerdir. Bu işlem, 3 kez tekrar edildikten sonra Crystalin içerisinde çıkartılan yapraklar %0.1'lik HgCl_2 çözeltisi içerisinde 25 dakika süreyle hafifçe çalkalanarak bekletilmiştir. HgCl_2 çözeltisinden çıkartılan yapraklar 3 kez her biri 2'şer dakikalık sürelerde steril saf su içerisinde hafifçe çalkalanarak durulanmışlardır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Afrika menekşesinde (*Saintpaulia ionantha*) uygulanan yüzeysel sterilizasyon işlemleri

Yüzeysel Sterilizasyon İşlemleri	%70'lik Etil Alkol	NaClO + Tween 20	%0.1'lik HgCl ₂	Crystalin®	Durulama
ST1	1-2dk	-	25dk	-	3x2dk
ST2	1-2dk	25dk	-	-	3x2dk
ST3	1-2dk	-	-	25dk	3x2dk
ST4	-	-	25dk	3x20dk	-

3.2.2. *In vitro* ortamda başlangıç kültürlerinin oluşturulması ve çoklu sürgünlerin elde edilmesi

Yüzeysel sterilizasyonu tamamlanan yapraklar, 1x1cm boyutlarında kesilerek sürgün rejenerasyonu için belirlenen ortamlara her bir kültür kabında 2'şer adet eksplant olacak şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Afrika menekşesinde kültüre alınan yaprak eksplantları

3.2.3. Çoklu sürgün besin ortamı hazırlanması

Afrika menekşesi bitkisinde yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu elde etmek için üç farklı besin ortamı denenmiştir. Bu denemelerde bazal besin ortamı olarak MS (Murashige and Skoog, 1962) kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Farklı hormon kombinasyonlarıyla oluşturulan sürgün rejenerasyonuna yönelik besin ortamları Çizelge 3.3’de verilmiştir. SP, GS ve MS olarak kodlanmış üç ortamdan SP ortamı, 2008 yılında Daud ve Taha’nın yaptığı çalışmada kullandıkları bir ortamdır (Daud and Taha, 2008).

Çizelge 3.2 MS bazal besin ortamının içerdiği bileşikler ve miktarları (Murashige and Skoog, 1962)

Bileşikler	Miktarlar (mg/L)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Tritriplex(Na ₂ EDTA)	37.3
Nikotinic asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Thiamin-HCl	0.1
<i>myo</i> -inositol	100
Glisin	2.0
Sükroz	30000

Çizelge 3.3 Sürgün rejenerasyonu için kullanılan besin ortamları ve içerikleri

Ortam Kodu	Bazal Ortam	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)		Sükroz (g/L)	Agar (g/L)	pH
		BAP	NAA			
GS	MS	2	0.5	30	6	5.8
SP	MS	2	1	30	6	5.8
MS	MS	-	-	30	6	5.8

Sürgün rejenerasyonu için eksplantlar 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyotta, 24°C'de ve 4000 lüks ışık şiddetinde kültüre alınmışlardır. 2 haftanın sonunda elde edilen yeni sürgün öbekleri 4-5 yapraklı sürgün öbeklerine bölünerek ikişer haftalık aralıklarla altkültüre alınmışlardır.

3.2.4. Çoklu sürgünlerin köklendirilmesi ve aklimatizasyonu

Gelişmekte olan çoklu sürgünler, 2 haftalık kültür süresinin sonunda bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS ortamı içerisinde 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24°C'de ve 4000 lüks ışık şiddetinde kültüre alınarak köklenmeleri sağlanmıştır (Şekil 3.3a). Köklenen bitkiler, 4 cm çaplı kağıt ile sarılı paper potlardaki 1:2 (v/v) oranda torf/perlit karışımına dikilmişlerdir (Şekil 3.3b). Aklimatizasyon, yapay ışıklandırılmış ortamda yine 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyotta, 24°C'de ve 4000 lüks ışık şiddetinde gerçekleştirilmiştir. 10 günlük aklimatizasyon sürecinin ardından bitkiler doğrudan 1:2 (v/v) oranında torf/perlit karışımını içeren 11 cm çapındaki saksılara dikilmişlerdir.



Şekil 3.3 Köklenmiş bitki (a) ve aklimatize edilmiş bitkiler (b)

3.2.5. Protoplast izolasyonu

Protoplast izolasyonu, Afrika menekşesinin yaprak mezofil hücrelerinden gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, *in vivo* bitkilerden ve *in vitro* çoklu sürgünlerden alınan yaprak eksplantları kullanılmıştır.

In vivo'dan alınan Afrika menekşesinin genç yaprakları uygun yüzeysel sterilizasyon yöntemiyle sterilize edildikten sonra yaprak petiyolleri, steril bistüri ile kesilerek uzaklaştırılmıştır. Petiyollerinden arındırılan yapraklar tartılarak 1 g olacak şekilde 22 mm çapındaki cam steril petriye alınmışlardır. *In vitro*'dan alınan Afrika menekşesinin yaprakları ise sterilize edilmeden, steril cam petrilere 1 g yaprak olacak şekilde aktarılmıştır. Hazırlanan 1 g'lık yaprak eksplantları yine bistüri yardımı ile mümkün olduğunca küçük parçalara ayrılmıştır.

3.2.5.1. Protoplast izolasyonu öncesi ön uygulama

In vivo ve *in vitro* koşullarda bulunan mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşesi yaprakları ön uygulama açısından iki gruba ayrılmışlardır. Bu gruplardan birinde ön uygulama, yaprak eksplantlarının protoplast izolasyonu öncesinde %7 (w/v) Mannitol' de 1 saat boyunca bekletilmeleri ile gerçekleştirilmiştir. Diğer gruba ise protoplast izolasyonu öncesi herhangi bir uygulama yapılmamıştır.

3.2.5.2. Enzim karışımının hazırlanması ve inkübasyonu

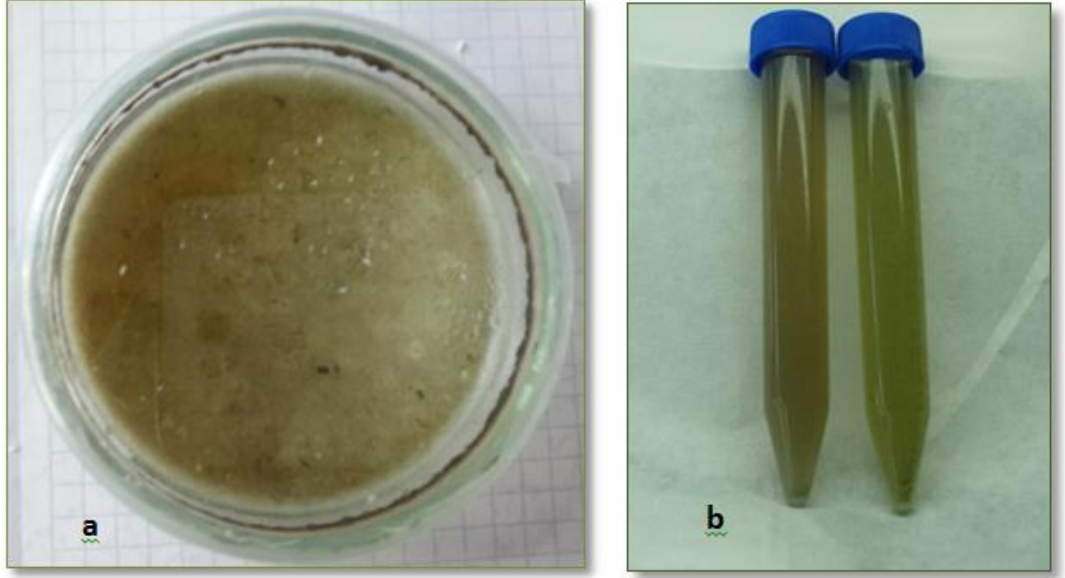
Ön uygulama aşamasından sonra protoplast izolasyonu için enzim karışımı hazırlanmıştır. Enzim solüsyonu; %2 (w/v) Selülaz (Sigma, from *Aspergillus niger*), %2 (w/v) Hemiselülaz (Sigma, from *Aspergillus niger*), %1 (w/v) Pektinaz (Sigma, from *Aspergillus niger*) ve %7 (w/v) Mannitol (Sigma) içermiştir ve pH'sı 5.8 olacak şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Enzim solüsyonu içeriği ve miktarları

Enzim Çeşitleri	Miktar (W/V)
Selülaz (Sigma)	%2
Hemiselülaz (Sigma)	%2
Pektinaz (Sigma)	%1
Mannitol (Sigma)	%7

Hazırlanan enzim solüsyonu; 0.20 µm'lik steril şırınga ucu filtre (Sartorius Stedim, Minisart® Hydrophilic Syringe Filter) ve steril 10 mL'lik şırınga (Omnifix®) aracılığı ile filtre edilerek sterilize edilmiştir. Sterilize edilen enzim karışımından alınan 10 mL solüsyon, bistüri yardımı ile iyice küçük parçalara ayrılmış olan 1 g yaprak parçalarının üzerine ilave edilmiştir.

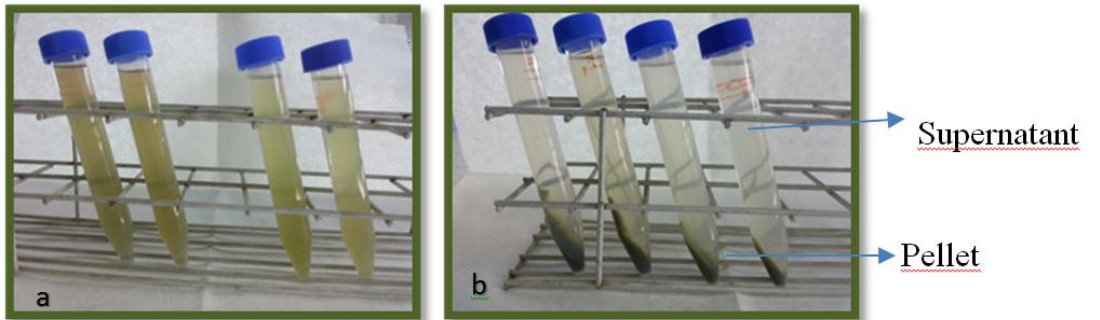
Cam petrilerdeki enzim ve yaprak karışımları; çalkalayıcıda (70 rpm) farklı sürelerde (13 saat, 14 saat, 15 saat ve 16 saat) inkübe edilmiştir. Enzim inkübasyonu süresince yaprak ve enzim karışımı oda sıcaklığında (24°C) ve karanlıkta bekletilmiştir. Bu süre içinde enzim karışımı bitki hücre duvarını parçalayarak protoplastların açığa çıkarmaktadır. İnkübasyon sürecinin sonunda iyice parçalanmış yapraklar (Şekil 3.4a), steril MESH (45µM) ile süzülerek, 15mL'lik steril falkon tüplerine (Şekil 3.4b) aktarılmıştır. Falkon tüplerine alınan hücre süspansiyonlarının üzerine %5 (w/v)'lik Mannitol solüsyonu 15 mL'ye tamamlanacak şekilde ilave edilmiştir.



Şekil 3.4 İnkübasyon süreci sonunda oluşan protoplast süspansiyonunun (a) petrideki ve (b) 15 mL'lik falkondaki görünümü

3.2.5.3. Protoplastların saflaştırılması

%5 Mannitol (w/v) solüsyonu ile 15 mL'ye tamamlanan protoplast süspansiyonu (Şekil 3.5a) 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek, protoplastların falkon tüpünün dibine çökmeleri sağlanmıştır (Şekil 3.5b). Dibe çöken protoplastların üzerindeki sıvı (süpernatant) pipet yardımıyla alınmış ve üzerine yıkama solüsyonu olarak adlandırılan CPW (Cell and Protoplast Washing) solüsyonu ilave edilmiştir (Bilkey et al., 1982) (Şekil 3.5 ve Çizelge 3.5).



Şekil 3.5 Protoplast saflaştırma aşaması (a) %5 Mannitol(w/v) solüsyonu ile 15 mL'ye tamamlanmış protoplast süspansiyonu ve (b) santrifüjlemenin ardından 15 mL'lik falkon tüpünün dibine çökelen protoplastlar

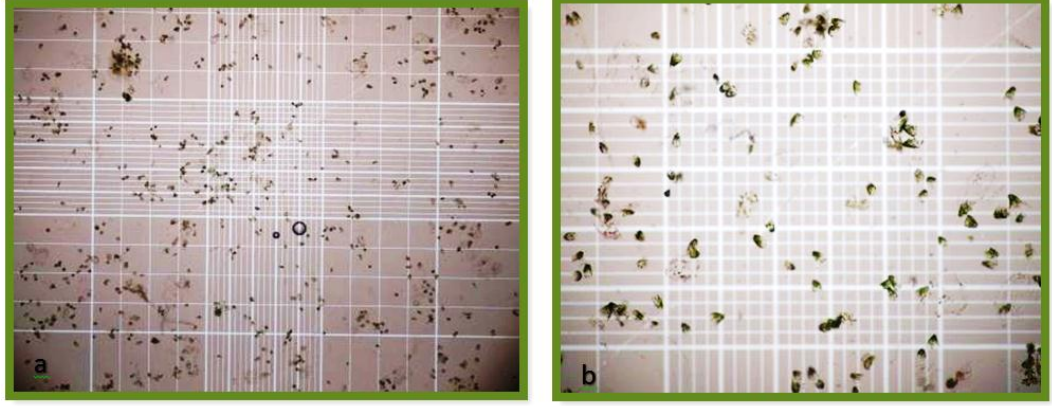
Çizelge 3.5 Protoplast izolasyonunda kullanılan yıkama solüsyon (CPW) bileşikleri ve konsantrasyonları (pH: 5.8) (Bilkey et al., 1982).

CPW BİLEŞİKLER	KONSANTRASYON (mg/L)
KNO₃	101
CaCl₂H₂O	1.480
MgSO₄ H₂O	2461
KH₂ PO₄	27.2
KI	0.16
Mannitol	7000

CPW solüsyonu, yine falkon tüpüne 15 mL'ye tamamlanacak şekilde ilave edilerek 1000 rpm'de 10 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonrasında protoplastlar falkonun dibine çökerek pellet oluşturmuştur (Şekil 3.5). Pelleti sarsmadan ve hareket ettirmeden, supernatan mikropipet (1000µl) yardımıyla alınmıştır (Şekil 3.5). %5'lik Mannitol (w/v) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yine 15 mL'ye tamamlayacak şekilde ilave edilen %5'lik Mannitol (w/v), 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Tekrardan supernatant dikkatlice mikropipet yardımıyla çekilmiş ve yine %5'lik Mannitol (w/v) eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Mannitol ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.5.4. İzole edilen protoplastların sayımı

Son yıkama işleminden sonra supernatan atılmış ve pellet tekrar süspanse edildikten sonra 0.1µL protoplast örneği alınarak protoplast sayımı yapılmıştır. Olympos ışık mikroskopunda (40x), 0.1mm'lik Neubauer hemositometrisiyle protoplast sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayım yapılan protoplastların, 1 mL'de ne kadar protoplast olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 İzole edilen protoplastların hemositometre ile sayımı (a)10x ve (b)40x ışık mikroskobunda hemositometrideki protoplastların görünümü

3.2.5.5. İzole edilen protoplastlardan mikrokallus oluşumu

In vivo ve *in vitro* koşullarda yetiştirilen mor ve beyaz Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastlardan mikrokallusun teşvik edildiği ortamlar, Winkelman ve Grunewaldt (1995)'in çalışmasında belirtilen ortamlar esas alınarak ve bazal ortamı MS ile değiştirilerek kullanılmıştır (Çizelge 3.6). Petrilere protoplastlar, 1×10^4 protoplast/mL sayıda protoplast olacak şekilde kültüre alınmışlar, üzerlerine 10 mL PR1 ortamı ilave edildikten sonra parafilmlelenerek alüminyum folyo ile sarılmışlar ve 1 hafta boyunca çalkalayıcıda (70 rpm) bırakılmışlardır (Çizelge 3.6). Bir hafta sonra, PR1 ortamı değiştirilerek yerine PR1a ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.6). Protoplastların inkübasyon süresince petriye yapışmalarından dolayı, protoplastlar hareket ettirilmeden mikropipet yardımıyla protoplast kültürünün ortamı değiştirilmiştir. Bir hafta sonra da bu kez protoplast kültürünün ortamı PR1b ortamı ile değiştirilmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 İzole protoplastlardan mikrokallus teşvik edici ortamlar ve içerikleri

Ortam Kodu	Bazal Ortam	Sükroz	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)		Agar
			NAA	BAP	
PR1	MS	125 g/L	1 mg/L	1 mg/L	-
PR1a	MS	90 g/L	0.5 mg/L	0.5 mg/L	-
PR1b	MS	65 g/L	0.5 mg/L	0.5 mg/L	6g/L

3.2.6. Protoplast füzyonu

In vivo ve *in vitro* 'dan alınan beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerinin yaprak mezofil hücrelerinden izole edilen protoplastlar füzyona uğratılmadan önce, eşit sayıda (5×10^3 sayıda) protoplast süspansiyonları oluşturulmuştur. Protoplast karışımları, iki farklı PEG (Polietilen Glikol) çeşidi (PEG 6000 ve 8000) kullanılarak füzyona uğratılmışlardır.

Her iki çeşit PEG denemesinde de, 15mL'lik falkon tüplerinin içerisine eşit protoplast sayılarına eklenen protoplast süspansiyonlarının üzerine hazırlanan PEG karışımı (8 mL) eklenmiştir. PEG karışımı, PEG 6000 (%40) ve PEG 8000 (%40) olmak üzere iki ayrı karışım olarak hazırlanmıştır. Her iki PEG çeşidinde de, protoplast ve PEG karışımına 20 dakika boyunca, 5'er dakika aralıklarla elde hafif döndürme hareketi yapılmıştır.

20 dakikanın sonunda füzyona uğratılmış protoplastlar, protoplast izolasyonunda da kullanılan CPW yıkama solüsyonuyla 15mL'ye tamamlanarak, 1000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek yıkanmıştır. %5'lik Mannitol(w/v) ilavesi yapılan füzyona uğratılmış protoplastlar tekrar 1000 rpm'de 10 dakika daha santrifüj edilmiştir ve santrifüj sonrası supernatan atılmıştır.

3.2.6.1. PEG 6000 ve 8000'nin hazırlanması

Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastlar, PEG (Polietilen glikol) 8000 (%40 (w/w)) ve 6000 (%50 (w/w)) (Sigma) aracılığı ile füzyona uğratılmışlardır. Füzyon için kullanılan iki adet füzyon karışımı hazırlanmıştır.

Karışım I: %40 (w/v) PEG 6000 solüsyonundan 80 mL çekilmiş ve üzerine 10 mL su içerisinde çözdürülmüş 66 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.97 g) ve 0.3 M Glukoz (5.41 g) karışı eklenmiştir. Bu karışım saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır (Davey and Anthony, 2010).

Karışım II: %40 (w/v) PEG 8000 solüsyonundan 80 mL çekilmiş ve üzerine 10 mL su içerisinde çözdürülmüş 66 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.97 g) ve 0.3 M Glukoz (5.41 g) karışı eklenmiştir. Bu karışım saf su ile 100 mL'ye tamamlanılarak kullanılmıştır (Davey and Anthony, 2010).

3.2.6.2. Protoplast çekirdeklerinin floresan boyasıyla boyanması

Füzyon edilmeden önce izole edilmiş protoplast miktarına göre boyama yapılmıştır. Protoplastların çekirdek boyaması için Hoechst 33342 (Sigma) floresan boyası kullanılmıştır. Hoechst floresan boyası 1 mg/3 mL olarak hazırlanmıştır. 1 mL hacmindeki protoplast süspansiyonlarına 10 μL hazırlanan floresan boyası ilave edilmiştir. Floresan boyanın, protoplast çekirdeklerini boyaması için 20 dakika boyunca karanlıkta protoplast süspansiyonları bekletilmiştir.

3.2.7. Verilerin değerlendirilmesi

Çalışma süresince yapılan uygulamalar, tesadüf parselleri deneme deseni esas alınarak üç tekerrürlü olarak düzenlenmiştir. Elde edilen veriler, TARİST istatistik programı (Açıkgöz vd., 2004) kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Bitki Materyalinin Yüzey Sterilizasyonu

Beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerinden alınan yaprak eksplantlarıyla 4 farklı şekilde sterilizasyon denemesi yapılmıştır. Dört farklı sterilizasyon yöntemi arasından %100'lük sterilizasyon başarısını ST1 uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerine ait yapraklı eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemlerinin başarı yüzdeleri

Uygulanan Sterilizasyon Yöntem Kodları	Steril Yaprak Eksplant Sayısı (Adet)						Steril Yaprak Eksplant Yüzdesi (%)						Sterilizasyon Başarı Yüzdesi (%)
	Beyaz Menekşe			Mor Menekşe			Beyaz Menekşe			Mor Menekşe			
	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.	
ST1	22	22	22	22	22	22	100	100	100	100	100	100	100a
ST2	21	22	21	20	20	21	95,4	100	95,4	91	91	95,4	94.7b
ST3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
ST4	18	18	19	19	17	19	81,8	81,8	86,3	86,3	77,2	86,3	83.2c

* Kültüre alınan yaprak eksplant sayısı tekerrür başına 22'dir.

**Sterilizasyon yöntemi için HKO değeri 7.954; LSD değeri 5.160'dir.

1. faktörün Afrika menekşesinin çeşidi (mor ve beyaz) ve 2. faktörün ise sterilizasyon yöntemleri (ST1, ST2, ST3, ST4) olduğu 3 tekerrürlü tesadüf parselleri deneme desenine göre steril yaprak eksplantı yüzde verilerine göre uygulanan istatistiki değerlendirme sonucunda; sterilizasyon yöntemleri %1'e göre önemli bulunmuştur (HKO= 7,954; LSD=5,160). Buna göre, %70 alkol (1-2dk) ve %0.1'lik civaklorür (25dk)'ün kullanıldığı 1 numaralı sterilizasyon yöntemi (ST1) 1. grupta (% 100) yer alırken, %70 alkol (1-2dk) ve %0.5 sodyum hipoklorit ve 1-2 damla tween 20 (25dk) içerikli 2. yöntem (ST2) 2. grupta (%94,5), %100'lük Crystalin® (25dk) içeren yöntem (ST4) 3. grupta (%82,7) yer almıştır. %0.1'lik civaklorür (25dk) yönteminde (ST3) ise hiç steril yaprak eksplantı elde edilmemiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerinde steril yaprak eksplant yüzdeleriyle ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	Bulunan F Değeri	F Tablo Değeri (%5)	F Tablo Değeri (%1)
Bitki Çeşiti	1	16.627	16.627	2.090ns	4.960	10.040
Sterilizasyon Yöntemi	3	931.923	310.641	39.055**	3.710	6.550
Bitki Çeşiti * Sterilizasyon Yöntemi	3	18.214	6.071	0.763ns	3.710	6.550
Hata	10	79.540	7.954			
Genel	17	1046.305	61.547			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız

4.2. Afrika Menekşesinde Çoklu Sürgünlerin Elde Edilmesi, Köklendirilmesi ve Aklimatizasyonu

Sterilize edilen yaprak eksplantları 3 farklı bitki rejenerasyon ortamına aktarılmışlardır. Bu ortamlardan, 2mg/L BAP ve 1mg/L NAA bitki büyüme düzenleyicilerini içeren SP ortamında % 93.8'lik sürgün rejenerasyon başarısı sağlanırken, 2mg/L BAP ve 0.5mg/L NAA bitki büyüme düzenleyicilerini içeren GS ortamı ise %54'lik bir sürgün rejenerasyonu gerçekleştirmiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS ortamında ise sürgün rejenerasyonu elde edilmemiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Sürgün rejenerasyonu için kullanılan besin ortamları ve sürgün oluşturma başarısı

Sürgün Rejenerasyon Ortam Kodları	Sürgün Oluşturan Yaprak Eksplant Sayısı (Adet)						Sürgün Oluşturan Yaprak Eksplant Yüzdesi (%)						Sürgün Oluşturma Başarı Ort. %
	Beyaz Menekşe			Mor Menekşe			Beyaz Menekşe			Mor Menekşe			
	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.	
SP	21	19	19	21	22	22	95.4	86.3	86.3	95.4	100	100	94a
GS	13	10	19	10	8	11	60	45.4	86.3	45.4	36.3	50	53.7b

* Kültüre alınan yaprak eksplant sayısı tekerrür başına 22'dir.

**Besin ortamı için HKO değeri 170.959; LSD değeri 27.997'dir.

1. Faktörün Afrika menekşesinin çeşidi (mor ve beyaz) ve 2. faktörün ise sürgün rejenerasyon besin ortamı olduğu 3 tekerrürlü tesadüf parselleri deneme desenine göre sürgün rejenerasyonu yüzde verilerine göre uygulanan istatistiki değerlendirmede; kullanılan besin ortamı %1'e göre önemli bulunmuştur (HKO=170,959; LSD=27,997;). Buna göre, 2mg/L BAP ve 1mg/L NAA içerikli MS bazal ortamının (SP) kullanıldığı 1 no'lu besin ortamı 1. grupta (%93.8) yer alırken, 2mg/L BAP ve 0.5mg/L NAA içerikli MS bazal ortam içerikli (GS) besin ortamı 2. grupta (%54) yer almıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS bazal ortam (MS) içerikli besin ortamında ise hiç sürgün elde edilememiştir. (Çizelge4.4).

Çizelge 4.4 Beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerinde sürgün rejenerasyon yüzdeleriyle ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	Bulunan F Değeri	F Tablo Değeri (%5)	F Tablo Değeri (%1)
Bitki çeşiti	1	88.563	88.563	0.518ns	5.990	13.750
Besin ortamı	2	4800.000	2400.000	14.038**	5.140	10.920
Bitki çeşiti * Besin Ortamı	2	636.563	318.282	1.862ns	5.140	10.920
Hata	6	1025.753	170.959			
Genel	11	6550.880	595.535			

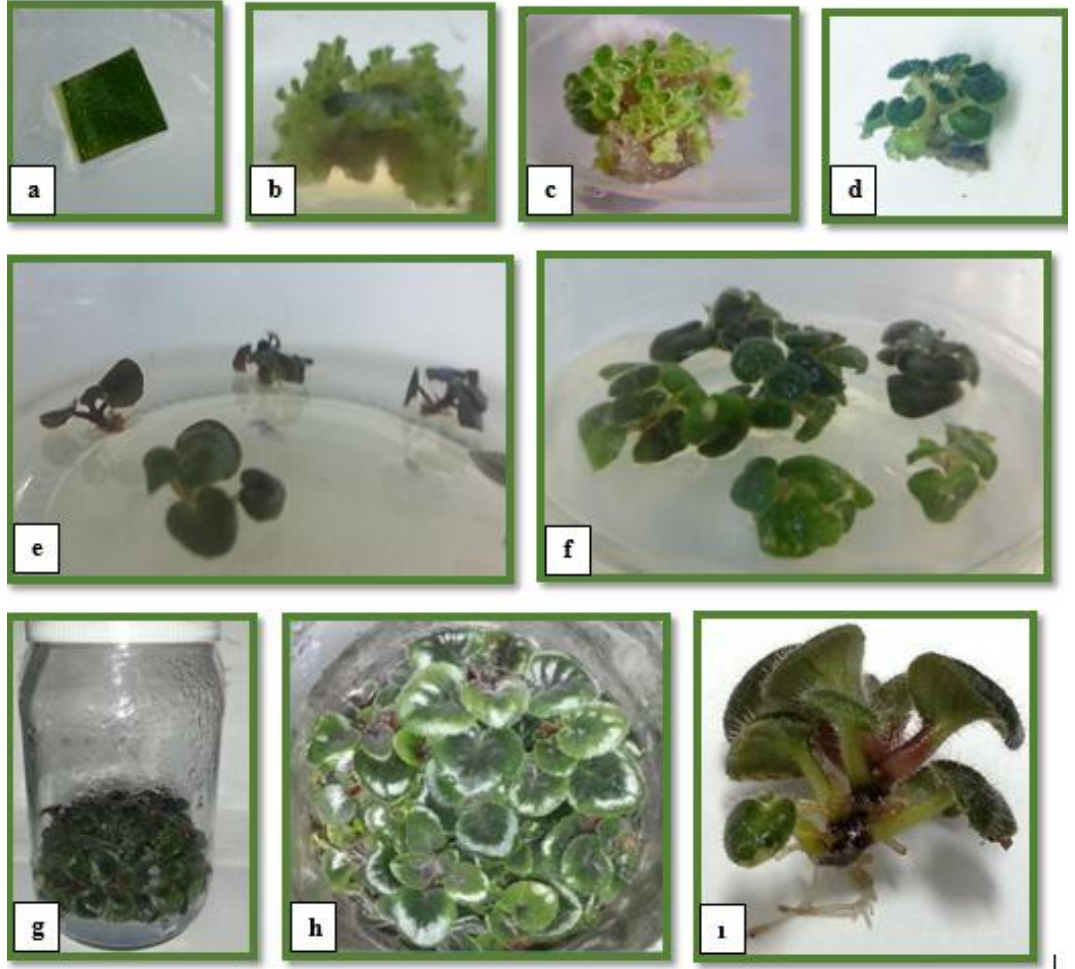
*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız

Sterilize edilen yaprak eksplantları sürgün rejenerasyon ortamlarına konulduktan 2 hafta sonra sürgün rejenerasyonları gerçekleşmiştir (Şekil 4.1a ve b). Sürgün rejenerasyonu gerçekleştirilen eksplantlar 4-5 yapraklı öbeklere bölünerek 2 haftalık aralıklarla altkültüre alınmışlardır (Şekil 4.1c, d, e ve f). İki hafta sonra gelişen sürgünler büyüme düzenleyicileri içermeyen temel MS ortamına aktarılarak köklendirilmişlerdir (Şekil 4.1g, h ve ı). Bu MS ortamı içerisinde %100'lük köklendirilme başarısı elde edilen çoklu sürgünler 3 haftanın sonunda *in vivo*'ya aktarılmaya hazır hale gelmiştir.

Üç haftalık kültür boyunca MS ortamında köklendirilen sürgünler Şekil 4.2a'daki gibi torf/perlit karışımı içeren paper pot'lara doğrudan dikilmiştir. Dikilen bitkiler 2. haftada Şekil 4.3b'deki gibi ve 3.haftada ise Şekil 4.2c'de gösterildiği gibi gelişim göstermişlerdir. Torf/perlit karışımı paper pot'lara aktarılan köklendirilmiş çoklu sürgünlerden. %100 başarı sağlanarak aklimatizasyon başarı sağlanmıştır. Dört haftalık aklimatizasyon süreci sonunda bitkiler yine %100'lük başarı ile 11cm çapındaki saksılara dikilmiştir (Şekil4.2d).



Şekil 4.1 Afrika menekşesinde çoklu sürgün çoğaltımı (a) sterilize edilmiş yaprak eksplantı, (b) 2 hafta sonra SP besin ortamında oluşan sürgün öbekleri, (c) oluşan sürgün öbekleri altkültüre alındıktan 2 hafta sonra gelişen sürgün öbekleri, (d) 2. altkültüre alınan sürgün öbeklerinden 2 hafta sonra gelişen sürgün öbekleri, (e) sürgünlerin 3. altkültüre alınmasından 2 hafta sonra gelişen sürgünler, (f) seyreltilmiş sürgünlerin 4. altkültüre alınmasından 2 hafta sonraki gelişme durumları, (g, h ve i) gelişmiş sürgünlerin büyüme düzenleyicileri içermeyen MS ortamında gelişmesi ve köklendirilmesi



Şekil 4.2 *In vitro*' da elde edilen köklendirilmiş Afrika menekşesi bitkiciklerinin aklimatizasyonu (a) köklenen bitkiciklerin torf/perlit karışımı içeren paper pot'lara aktarılması, (b ve c) torf/perlit karışımına aktarılan sürgünlerin 2 ve 3 hafta sonundaki sonundaki gelişimleri, (d) 11cm çapında, torf/perlit içeren saksıya aktarılmış *in vitro* bitkiciğin gelişim durumu.

4.3. *In Vivo* ve *In Vitro* Kökenli Afrika Menekşelerinden Protoplast İzolasyonu ve Mikrokallus Oluşumu

Protoplast izolasyonunda *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yetiştirilen beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerine ait yapraklar kullanılmıştır. *In vivo* ve *in vitro*'dan alınan yapraklardan protoplast izolasyonu ön uygulamalı ve uygulamasız olmak üzere iki gruba ayrılarak denemeler kurulmuştur. Bu grupların hepsinde enzim inkübasyon süreci ile ilgili denemeler yapılmıştır.

In vivo ve *in vitro*'dan alınan yapraklar, protoplast izolasyonu için cam petrilere 1'er g olacak şekilde gruplandırılmıştır. Petrilere konulan yapraklar bistüri ve pens yardımıyla ince ince kıyılarak bir grubu %7'lik Mannitol(w/v) ile izolasyon öncesi ön uygulamaya tabi tutulmuş, diğer grup ise herhangi bir uygulamaya maruz bırakılmadan doğrudan enzim solüsyonu ile muamele edilerek inkübasyon süreci başlatılmıştır. Bütün gruplara, % 1 Pektinaz, %2 Hemiselülaz %1 Selülaz ve %7'lik Mannitol(w/v) içerikli enzim karışımından ilave edilmiştir. Enzim inkübasyon süreci için 13, 14, 15 ve 16 saatlik denemeler kurulmuştur. Bu denemelerin hepsi karanlık şartlarda ve çalkalayıcıda 70 rpm'de gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6).

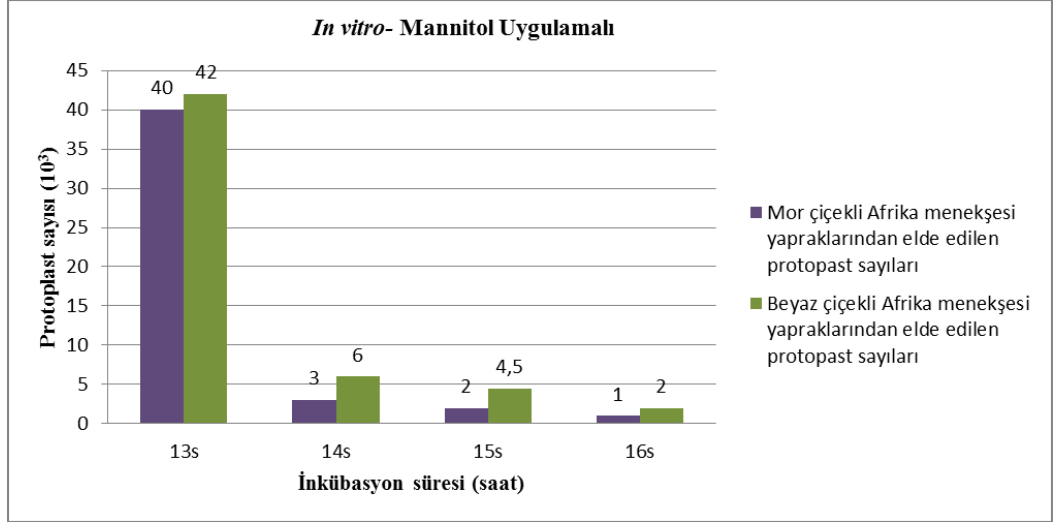
In vitro 'da üretilen Afrika menekşelerinden alınan yaprak eksplantlarından %7'lik Mannitol(w/v) ile ön uygulamalı en yüksek protoplast izolasyonu, beyaz çiçekli Afrika menekşesinden ve 13 saatlik enzim inkübasyon sürecinin ardından 42×10^3 olarak elde edilmiştir. Ön uygulamalı en az protoplast sayısı 1×10^3 olarak mor çiçekli Afrika menekşesinde, 16 saatlik inkübasyon süreci sonunda gözlemlenmiştir (Çizelge 4.5).

In vitro 'da üretilen Afrika menekşelerinden alınan yaprak eksplantlarından ön uygulamasız en yüksek protoplast izolasyonu, mor çiçekli Afrika menekşesinden ve 14 saatlik enzim inkübasyon sürecinin ardından 94×10^3 sayıda protoplast olarak elde edilmiştir. Ön uygulamasız en az protoplast sayısı 2×10^3 olarak mor çiçekli Afrika menekşesinde, 16 saatlik inkübasyon süreci sonunda gözlemlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerinde ön uygulama ve enzim inkübasyon sürelerine göre *in vitro* kökenli izole edilen protoplast sayıları

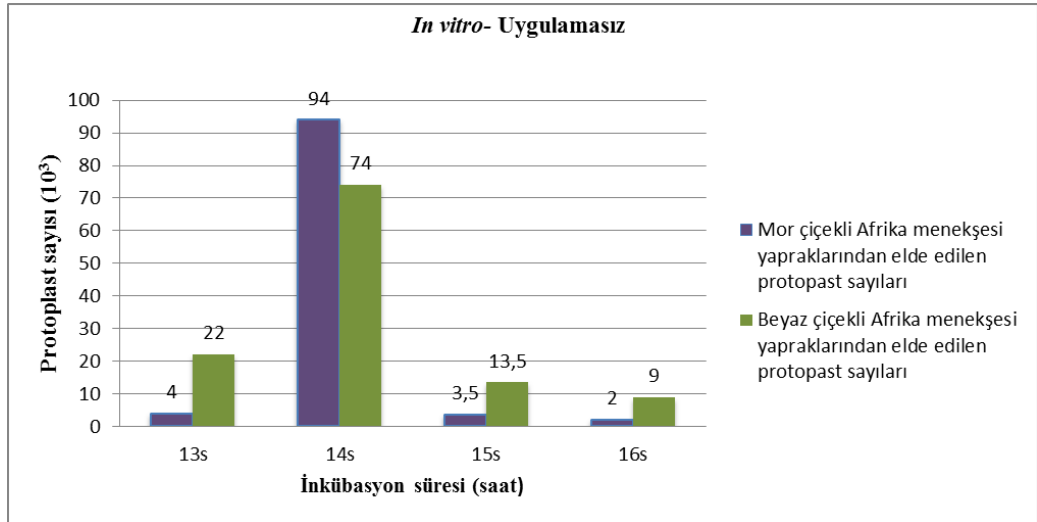
Genotip	Yaprak Ekplant Miktarı	Mannitol İle Ön Uygulama Durumu	Enzim karışımı	Inkübasyon Süresi (Saat)	Izole Edilen Protoplast Sayısı (Protoplast/mL)			
Mor	1 g Yaprak	%7 Mannitol (1 saat)	%1 Pektinaz %2 Selülaz %2 Hemiselülaz %7 Mannitol	13	40x10 ³			
				14	3x10 ³			
				15	2x10 ³			
				16	1x10 ³			
13				42x10 ³				
14				6x10 ³				
15				4.5x10 ³				
16				2x10 ³				
Mor		1 g Yaprak		Uygulamasız	%1 Pektinaz %2 Selülaz %2 Hemiselülaz %7 Mannitol	13	4x10 ³	
						14	94x10 ³	
						15	3.5x10 ³	
						16	2x10 ³	
Beyaz	1 g Yaprak		Uygulamasız			%1 Pektinaz %2 Selülaz %2 Hemiselülaz %7 Mannitol	13	22x10 ³
							14	74x10 ³
							15	13x10 ³

Şekil 4.3'de görüldüğü üzere *in vitro*'da üretilen Afrika menekşelerinin yapraklarından alınan eksplantlara ön uygulama yapıldıktan sonra beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerinde en yüksek izole protoplast sayıları 13 saatlik inkübasyon sürecinin ardından gerçekleşmiştir.



Şekil 4.3 %7'lik Mannitol(w/v) ile 1 saat ön uygulamaya tabi tutulan ve *in vitro* yapraklardan farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen protoplast sayılarının karşılaştırılma grafiği

In vitro' da üretilen Afrika menekşelerinin yapraklarından alınan eksplantlara ön uygulama yapılmadan, doğrudan enzim inkübasyonu başlatıldığında, Şekilde 4.4'de gösterildiği üzere en yüksek izole edilmiş protoplast sayısı 14 saatlik inkübasyon sürecinin ardından elde edilmiştir.



Şekil 4.4 %7'lik Mannitol(w/v) ile 1 saat ön uygulamaya tabi tutulmayan ve *in vitro* yapraklardan farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen protoplast sayılarının karşılaştırılma grafiği

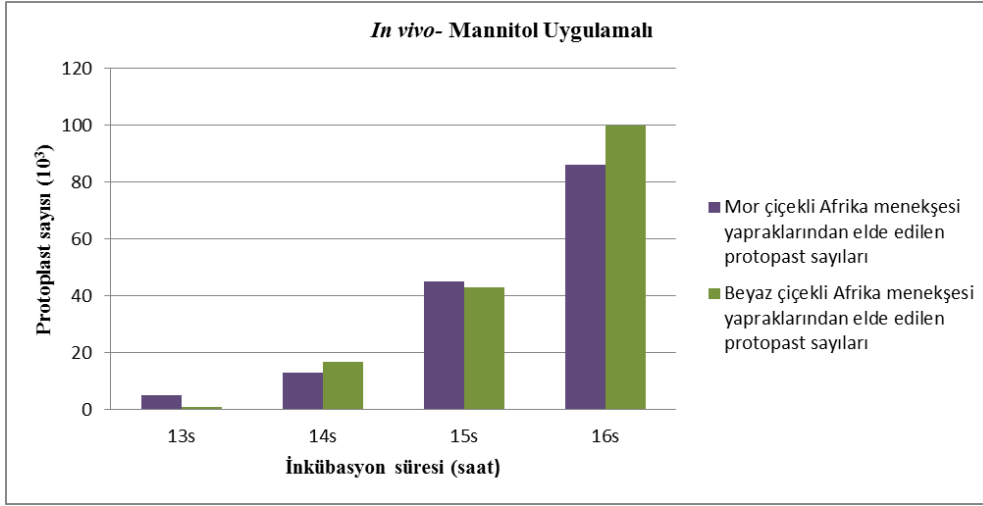
In vivo'da üretilen Afrika menekşelerinden alınan yaprak eksplantlarından %7'lik Mannitol(w/v) ile ön uygulamalıda en yüksek protoplast izolasyonu, beyaz çiçekli Afrika menekşesinden ve 16 saatlik enzim inkübasyon sürecinin ardından 100×10^3 sayıda protoplast olarak elde edilmiştir. Ön uygulamalı en az protoplast sayısı 1×10^3 olarak beyaz çiçekli Afrika menekşesinde, 13 saatlik inkübasyon süreci sonunda gözlemlenmiştir (Çizelge 4.6).

In vivo'da üretilen Afrika menekşelerinden alınan yaprak eksplantlarından ön uygulamasız en yüksek protoplast izolasyonu, mor çiçekli Afrika menekşesinden ve 16 saatlik enzim inkübasyon süreci ardından 130×10^3 sayıda protoplast olarak elde edilmiştir. Ön uygulamasız en az protoplast sayısı 6×10^3 olarak beyaz çiçekli Afrika menekşesinde, 13 saatlik inkübasyon süreci sonunda gözlemlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Beyaz ve mor çiçekli Afrika menekşelerinde ön uygulama ve enzim inkübasyon sürelerine göre *in vivo* kökenli izole edilen protoplast sayıları

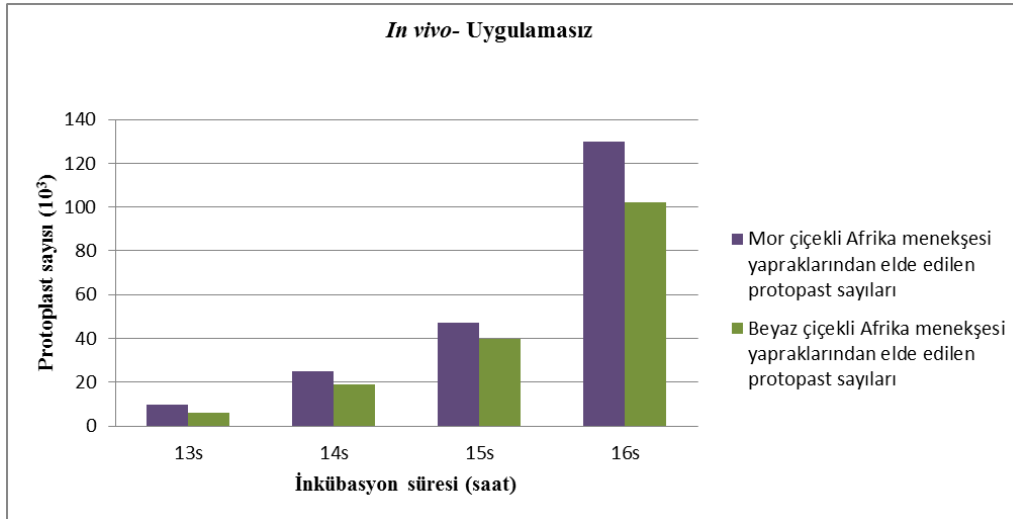
Genotip	Ekplant Miktarı	Mannitol ile On Uygulama Durumu	Enzim karışımı	Inkübasyon Süresi (Saat)	Izole Edilen Protoplast Sayısı (Protoplast/mL)
Mor	1 g yaprak	%7 Mannitol (1 saat)	%1 Pektinaz %2 Selülaz %2 Hemiselülaz %7 Mannitol	13	5 x10 ³
				14	13 x10 ³
				15	45x10 ³
				16	86x10 ³
Beyaz				13	1 x10 ³
				14	17 x10 ³
				15	43 x10 ³
				16	100x10 ³
Mor		Uygulama yok		13	10 x10 ³
				14	25 x10 ³
				15	47 x10 ³
				16	130x10 ³
Beyaz				13	6 x10 ³
				14	19 x10 ³
				15	40 x10 ³
				16	102x10 ³

In vivo'dan alınan Afrika menekşelerine ait yaprak eksplantları protoplast izolasyonu için %7'lik Mannitol(w/v) ile 1 saat süresince ön uygulamaya tabi tutulduktan sonra 16 saatlik inkübasyon sonucunda, hem mor, hem beyaz çiçekli menekşe eksplantlarından yüksek sayılarda protoplast izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6).



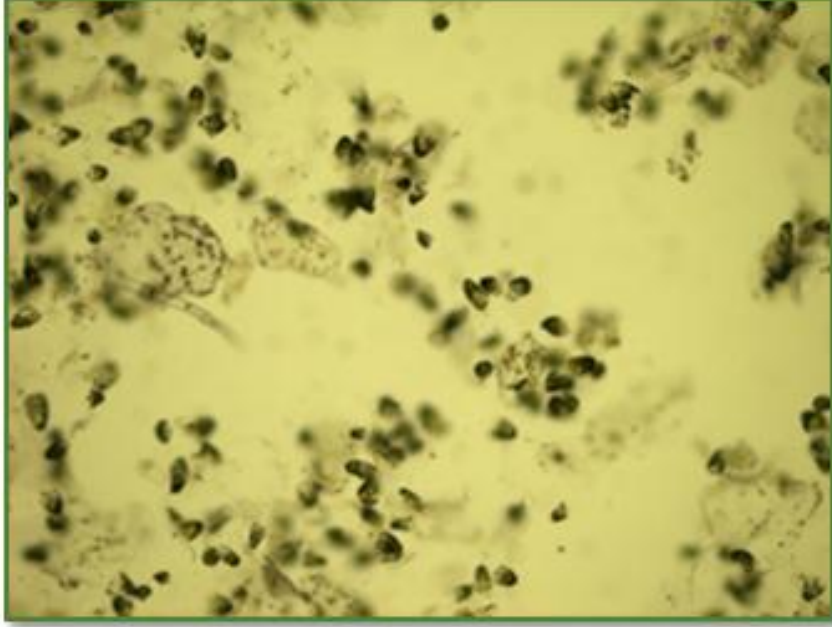
Şekil 4.5 %7'lik Mannitol(w/v) ile 1 saat ön uygulamaya tabi tutulan ve *in vivo* yapraklardan farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen protoplast sayılarının karşılaştırılma grafiği

In vivo'dan alınan eksplantlar da, ön uygulama yapılmadan doğrudan enzim inkübasyonu başlatıldığında mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşesi eksplantlarından en yüksek sayıda izole protoplastlar, 16 saatlik bir inkübasyon sürecinin sonunda elde edilmiştir (Şekil 4.5).

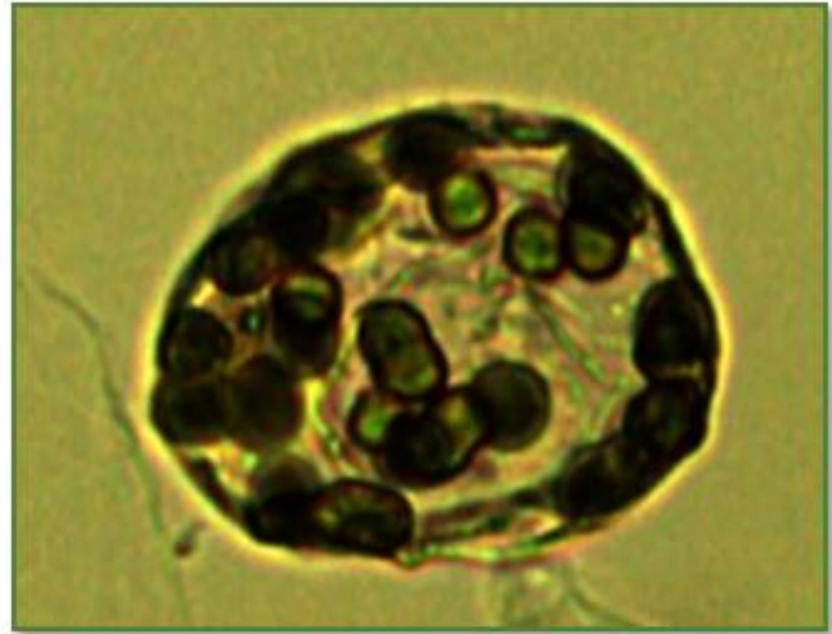


Şekil 4.6 %7'lik Mannitol(w/v) ile 1 saat ön uygulamaya tabi tutulmayan ve *in vivo* yapraklardan farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen protoplast sayılarının karşılaştırılma grafiği

Uygun izolasyon protokolü seçildikten sonra Şekil 4.7 ve 4.8'deki gibi gösterilmiş olan protoplastlar Winkelman ve Grunewaldt (1995)'e ait bazal ortamı değiştirilerek kullanılmıştır. Bu modifiye ortamlara protoplastlar aktarılarak mikrokallus oluşturmalarına çalışılmıştır.

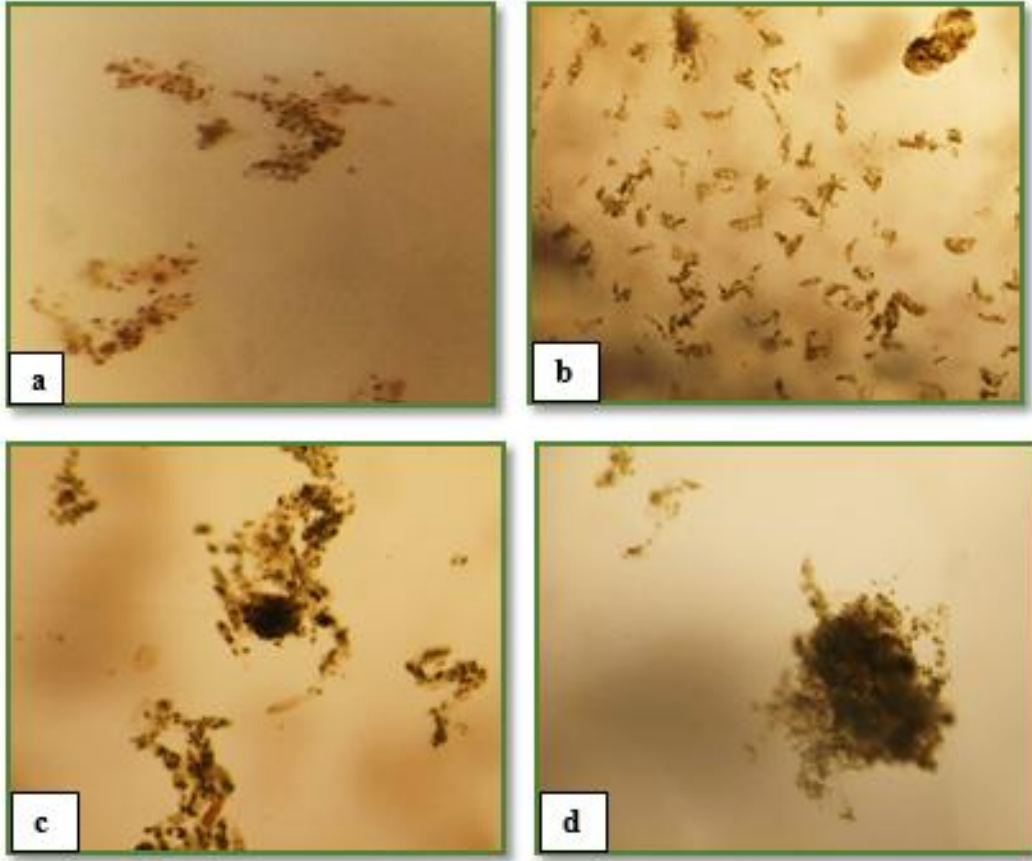


Şekil 4.7 İzole edilmiş protoplastlar (ışık mikroskopunda 10x büyüklükte)



Şekil 4.8 İzole edilmiş protoplast (Işık mikroskopunda 40x büyüklükte)

Kültüre alınan protoplastlardan yaklaşık 1 hafta sonra hücre duvarları oluşmuş, hücre bölünmeleri gerçekleşerek mikrokoloniler oluşmuş ve nihayetinde de 4. haftanın sonunda mikrokalluslar elde edilmiştir (Şekil 4.9a, b, c ve d).

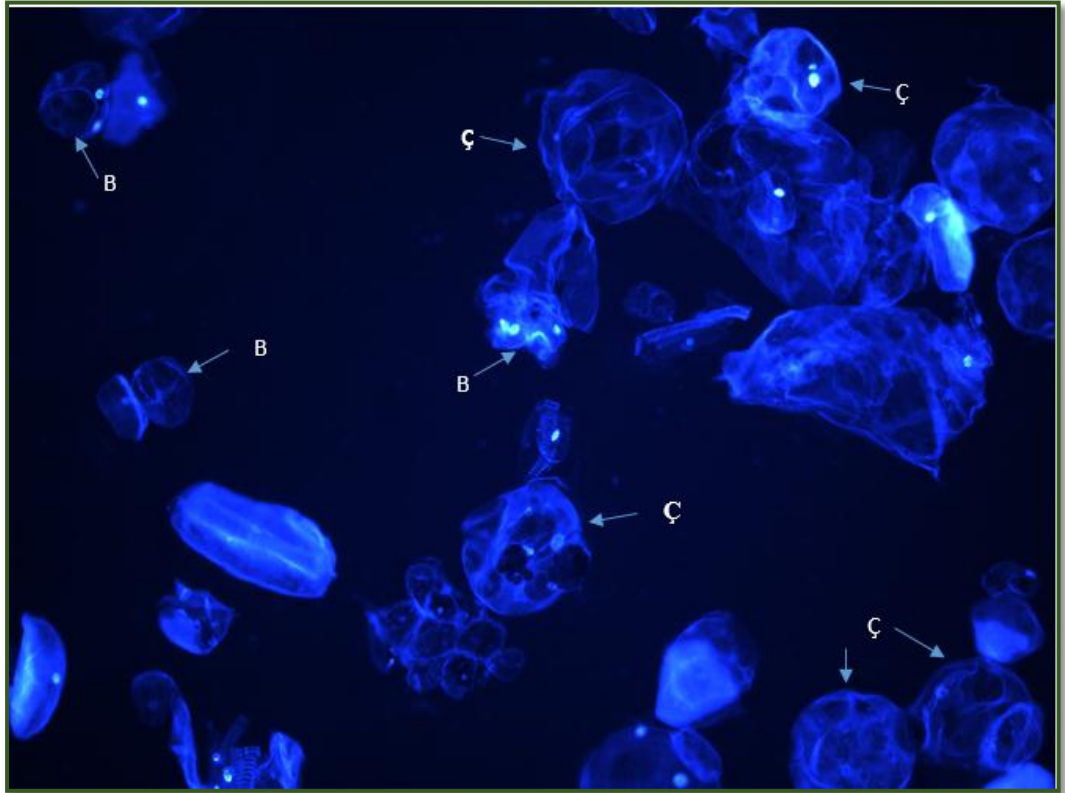


Şekil 4.9 Mor çiçekli Afrika menekşesinin protoplastlarından elde edilen mikrokallusların oluşum aşamaları (a) hücre duvarı oluşan hücreler (1. hafta), (b ve c) bölünerek çoğalarak oluşan mikrokoloniler (2. hafta) ve (d) mikrokallus oluşumu (4. hafta)

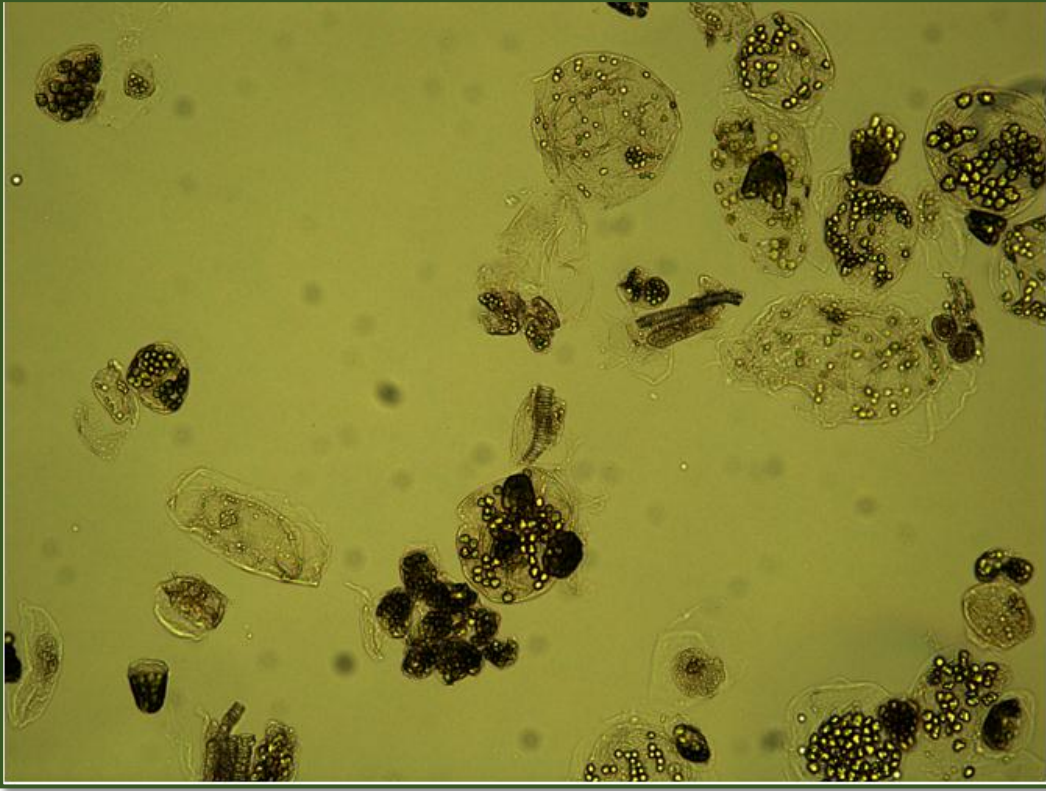
22 mm çaplı petri lede kültüre alınan mikrokallusların 4. haftanın sonunda Stero mikroskop altında, sayımları gerçekleştirilmiştir. *In vivo* koşullarda yetiştirilmiş mor çiçekli Afrika menekşesinden izole edilen protoplastlar 4 haftalık kültür sürecinin sonunda 10 mL’de 50 adet , beyaz çiçekli Afrika menekşesinden ise 32 adet mikrokallus olduğu tespit edilmiştir. *In vitro* koşullarda yetiştirilen mor çiçekli Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastlardan 45 adet elde edilirken, beyaz çiçekli Afrika menekşesinden kontaminasyon nedeniyle mikrokallus elde edilememiştir.

4.4. Afrika Menekşesinde Protoplast Füzyonu ve Görüntülenmesi

In vitro'da yetiştirilen mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastlar PEG 6000 ve 8000 ile füzyona uğratılmıştır. Füzyona uğratılan mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşesine ait protoplastların boyutları ve içerdikleri kloroplast miktarından ötürü birbirlerinden farklı yapılar olarak tespit edilmiştir. İki PEG karışımı ile füzyona uğratılan mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşesinden izole edilen protoplastlarda PEG 6000 ile çoklu füzyon adeti 49, ikili füzyon adeti ise 43 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). PEG 8000 ile füzyona uğratılan izole protoplastlardan elde edilen çoklu füzyon adeti 128, ikili füzyon adeti ise 43 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



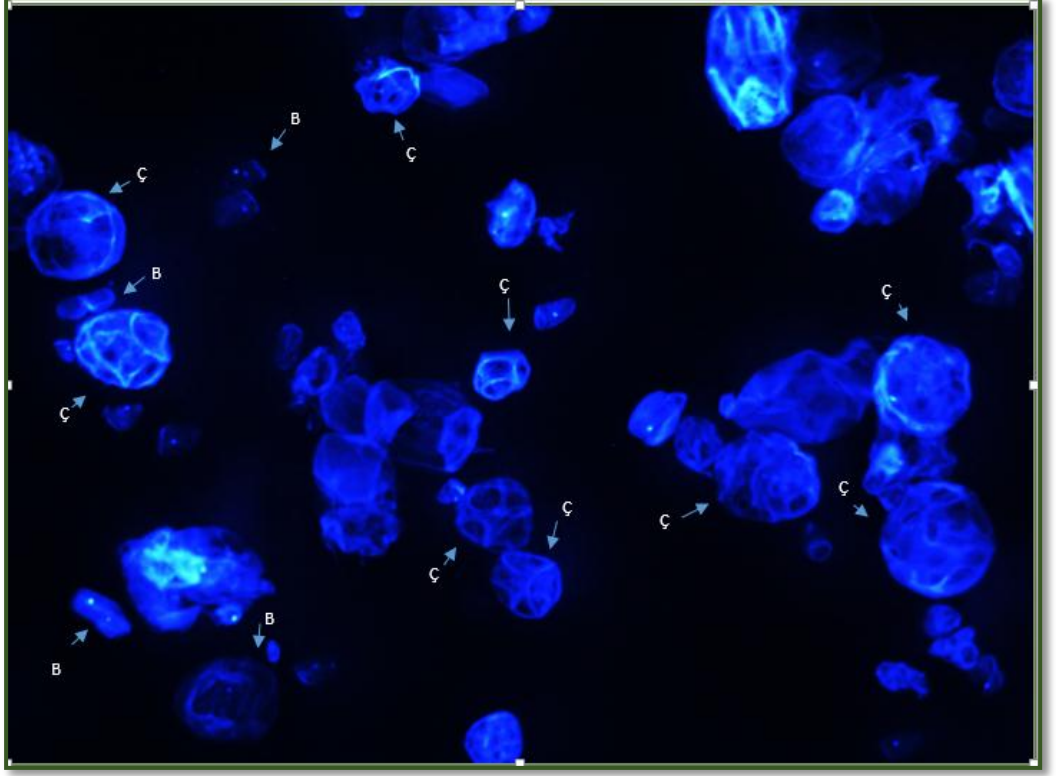
Şekil 4.10 *In vitro*'da yetiştirilen mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden alınan eksplantlardan izole edilen protoplastların PEG 8000 ile füzyonu sonucu elde edilen ikili ve çoklu füzyon protoplastları. Floresan mikroskopunda (40x) Höechts 33342 boyasıyla boyanmış füzyona uğratılan protoplastlar (Ç: Çoklu füzyon, B: İkili füzyon)



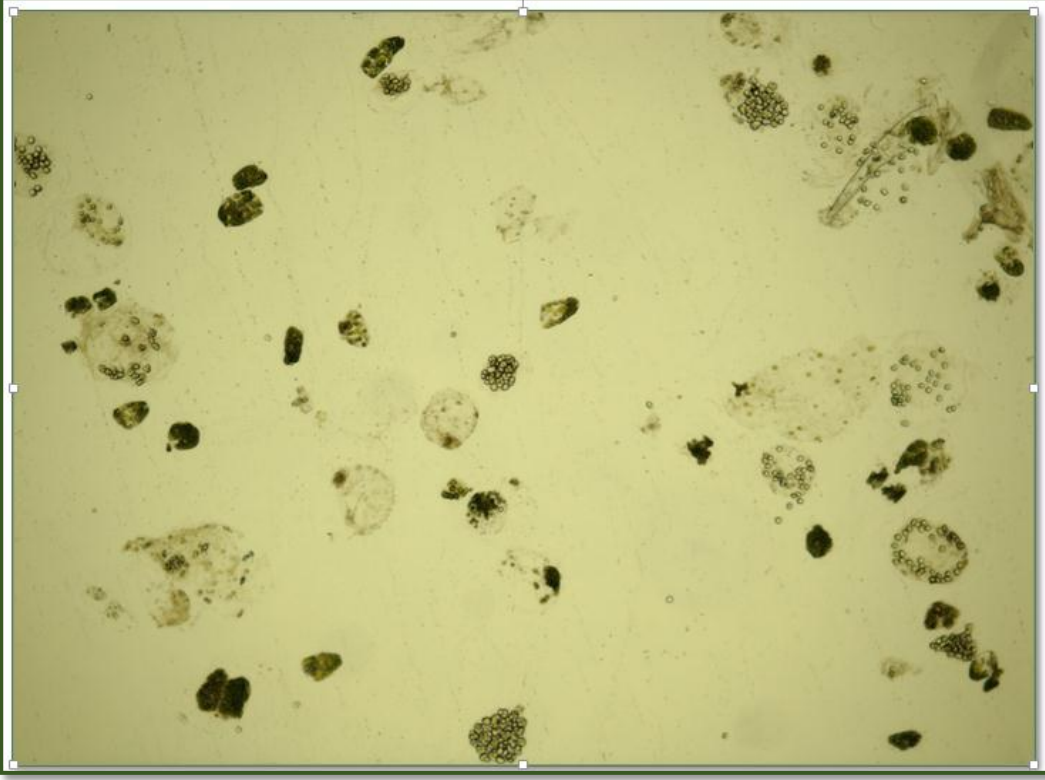
Şekil 4.11 *In vitro*'da yetiştirilen mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden alınan eksplantlardan izole edilen protoplastların PEG 8000 ile füzyonu sonucu elde edilen ikili ve çoklu füzyon protoplastları. Işık mikroskopunda (40x) füzyona uğrayan protoplastlar

In vivo'dan alınan mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastlar PEG 6000 ve 8000 ile füzyona uğratılmışlardır. *In vivo*'dan alınan mor çiçekli Afrika menekşesine ait protoplastların içerdikleri kloroplast miktarı beyaz çiçekli Afrika menekşesinden izole edilen protoplastların içerdikleri kloroplast miktarından daha fazla olmaları nedeniyle daha yeşil gözükmüşlerdir.

In vivo'dan alınan mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastların PEG 6000 ile füzyonu sonucu 238 adet çoklu füzyon sayımı elde edilirken, 69 adet de ikili füzyon elde edilmiştir (Çizelge 4.7). PEG 8000 ile füzyona uğratılan protoplastlardan 397 adet çoklu füzyon sayımı 48 adet ikili füzyon sayımı elde edilmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).



Şekil 4.12 *In vivo*'dan alınan mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşesi yaprak eksplantlarından izole edilen protoplastların PEG 8000 ile füzyonu sonucu elde edilen ikili ve çoklu füzyon protoplastları. Floresan mikroskobunda (40x) Höechts 33342 boyasıyla boyanmış füzyona uğratılan protoplastlar (Ç: Çoklu füzyon, B: İkili füzyon)



Şekil 4.13 *In vivo*'da yetiştirilen mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden alınan eksplantlardan izole edilen protoplastların PEG 8000 ile füzyonu sonucu elde edilen ikili ve çoklu füzyon protoplastları. Işık mikroskopunda (40x) füzyona uğrayan protoplastlar

Çizelge 4.7

In vivo ve *in vitro*'dan mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastların PEG 6000 ve 8000 kullanılarak elde edilen ikili ve çoklu füzyon sayıları*

Protoplast Kaynakları	Füzyon Ajanları	İkili Füzyon (Adet)	Çoklu Füzyon (Adet)
<i>In Vitro</i> Kaynaklı Protoplastlar	PEG 6000	43	49
	PEG 8000	43	128
<i>In Vivo</i> Kaynaklı Protoplastlar	PEG 6000	69	238
	PEG 8000	48	397

* Füzyon sayımı 100µl hücre süspansiyonunda gerçekleştirilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaptığımız bu çalışmada öncelikle, mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşesi (*Saintpaulia ioanantha*) bitkilerinden alınan yaprak eksplantları sterilize edilerek *in vitro* koşullardaki mikroçoğaltım protokolü oluşturulmuştur. Ardından hem *in vitro*, hem *in vivo* koşullarda yetiştirilen Afrika menekşelerinin yapraklarından protoplast izolasyonu ve izole edilen protoplastlardan mikrokalluslar oluşturularak uygun bir protokol belirlenmiştir. Mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinin yapraklarından izole edilen protoplastlar füzyona uğratarak ikili ve çoklu füzyonlar elde edilmiştir.

In vivo ortamdaki mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden alınan yapraklara 4 farklı sterilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu sterilizasyon yöntemleri arasından ST1 yönteminde %100'lük sterilizasyon başarısı elde edilmiştir. Ancak ST1 yönteminin uygulandığı yaprak eksplantlarında hiçbir bitki rejenerasyonu sağlanamamıştır. Bu yüzden %94.7 ile ikinci en yüksek sterilizasyon başarısına sahip olan, ST2 yöntemi kullanılarak sterilizasyon protokolüne devam edilmiştir. Afrika menekşesinde yaprak yüzey sterilizasyonunda, genellikle farklı konsantrasyon ve sürelerde sodyum hipoklorit kullanılmıştır (Ghorbanzade and Ahmadabi, 2014; Shukla et al., 2013; Sulzinski and Cimasky, 1995).

ST2 yöntemiyle sterilize edilen Afrika menekşesi yaprak eksplantları, direkt sürgün rejenerasyonu için 3 farklı besin ortamında kültüre alınmışlardır. İki haftalık kültür süresi sonunda en yüksek direkt sürgün rejenerasyonu, %100'lük başarı ile 2 mg/L BAP ve 1 mg/L NAA bitki büyüme düzenleyicilerin ve MS içeren SP ortamında elde edilmiştir. Bizimde esas aldığımız Daud ve Taha (2008)'nin *Saintpaulia ionantha* bitkisinde bitki rejenerasyonu çalışmasında; 1mg/L NAA ve 2mg/L BAP içerikli besin ortamından %100 rejenerasyon başarısı elde edilmiştir.

Al-Hussein vd. (2006), Afrika menekşesinde bitki rejenerasyonu için farklı eksplant tipleri ve sitokinin kaynakları üzerine araştırma yapmışlardır. Sunpui ve Kanchanapoom (2002) ise *in vitro* koşullarda Afrika menekşesinin

yapraklarından bitki rejenerasyonu üzerine çalışmışlardır. Her iki çalışma sonucunda da en iyi bitki rejenerasyonunun TDZ içerikli ortamlarda elde edildiği belirtilmiştir. Mithila vd. (2003), *Saintpaulia ionantha*'nın 5 çeşidinde (Benjamin, Ivan, Robin ve Reinheart) düşük konsantrasyonlarda TDZ (Thidiazuron)'nin sürgün organogenez ve somatik embriyogenez üzerindeki etkilerine yönelik yaptıkları çalışmalarında da TDZ içerikli ortamlar kullanıldığında sürgün organogenezinin ve somatik embriyogenezin arttığını tespit etmişlerdir. Ancak Al-Hussein vd. (2006)'nin de vurgulamış olduğu gibi, TDZ ile çoğaltım oldukça maliyetli ve uzun zaman aldığı için biz çalışmamızda BAP ve NAA içerikli ortamları kullanmayı tercih ettiğimizden, daha kısa sürede istenen başarı elde edilmiştir.

In vitro koşullarda çoğaltılan Afrika menekşelerinin köklendirilmesi, bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS ortamında %100'lük bir başarı ile gerçekleştirilmiştir. Köklendirilen Afrika menekşelerinin torf/perlit karışımlarına aktarılarak aklimatizasyonları gerçekleştirilmiştir. Köklendirilen bitkiler floresan ışık altında (4000 lux) hiçbir bitki kaybı yaşanmadan aklimatize edilmişlerdir. İki haftalık aklimatizasyon aşaması sonrasında bitkiler, 11 cm çapındaki saksılara dikilerek sera ortamına aktarılmışlardır. Sera ortamındaki bitkilerin gelişimi sırasında da herhangi bir bitki kaybı olmamıştır. Sunpui ve Kanchanapoom (2002)'un Afrika menekşesinde bitki rejenerasyonu çalışmalarında elde edilen sürgünler, bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen düz MS ortamında köklendirilmiştir. Sunpui ve Kanchanapoom (2002)'un yaptıkları çalışmada sürgünlerin köklendirilme yüzdesi bizim köklendirme yüzdemizle aynı olup, %100 başarı elde edilmiştir.

Tarafımızdan yapılan bu çalışmada, *in vitro*'dan ve *in vivo*'dan yetiştirilmiş mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerin yapraklarından protoplast izolasyonları gerçekleştirilmiştir. *In vivo*'dan alınan yaprak eksplantları ST2 sterilizasyon yöntemiyle sterilize edildikten sonra protoplast izolasyonu yapılmıştır. *In vitro* ve *in vivo*'dan alınan Afrika menekşelerinin yapraklarındaki mezofil hücrelerinden, protoplast izolasyon yöntemiyle protoplastlar elde edilmiştir. Protoplast izolasyonları %7 Mannitol(w/v) ile ön uygulamalı ve uygulamasız olarak iki gruba bölünmüştür. Aynı zamanda bu iki grupta da enzim inkübasyon sürelerine

göre protoplast izolasyon verimliliği araştırılmıştır. Yapılan tüm bu denemeler sonucunda, *in vivo*'dan alınan mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinin yaprak eksplantlarından en yüksek protoplast izolasyonu 130×10^3 ve 102×10^3 protoplast sayısı ile ön uygulama olmaksızın 16 saatlik enzim inkübasyon sürecinde elde edilirken, *in vitro*'daki mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinin yaprak eksplantlarından en yüksek protoplast izolasyonu 94×10^3 ve 74×10^3 protoplast sayısı ile ön uygulama olmaksızın 14 saatlik enzim inkübasyon sürecinde elde edilmiştir.

Sulzinski ve Cimasky (1995)'nin Afrika menekşesinde protoplast izolasyonu üzerine yaptıkları çalışma sonucunda 300×10^3 sayıda mezofil protoplastleri elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise izole edilmiş en yüksek mezofil protoplast sayısı 130×10^3 dür. Protoplast sayılarındaki bu farklılığın başlıca nedeni enzim çeşidinin ve karışımının farklı kullanılmış olmasıdır. Sulzinski ve Cimasky (1995) çalışmalarında %2'lik (w/v) Driselaz kullanırken biz çalışmamızda %1 (w/v) Selülaz, %2 (w/v) Pektinaz ve %2 (w/v) Hemiselülaz içerikli bir enzim karışımı kullandık. Ayrıca genotip ve kültür koşullarının farklılığı da bunda etkili olabilecekleri dikkate alınmalıdır.

Afrika menekşesinden protoplast izolasyonu için uygun bir protokol tespit edilmiştir. Bu yöntem kullanılarak izole edilen protoplastlar Winkelman ve Grunewaldt (1995) tarafından belirlenen, ancak bazal ortamı MS olarak modifiye edilerek kullanılan, mikrokallus teşvik ortamlarında kültüre alınmışlardır. Bu modifiye ortamlar PR1, PR1a ve PR1b olarak adlandırılmış ve bu ortamlar kullanılarak mikrokalluslar elde edilmiştir. *In vivo* ve *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastlar 4 haftalık kültür sürecinin ardından en yüksek sayıda mikrokallus oluşumunu *in vivo* koşullarda yetiştirilen mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinde göstermişlerdir. *In vivo*'da yetiştirilmiş mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastlardan elde edilen mikrokallus sayısı 10 mL'de 50 ve 32 adet olduğu tespit edilmiştir.

Yaptığımız bu çalışmada *in vitro* ve *in vivo* mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastlar PEG 6000 ve PEG 8000 ile füzyona uğratılmışlardır. Füzyona uğratılan protoplastlar, floresan boyasıyla (Hoechts 33342) boyandıktan sonra floresan mikroskopuyla görüntülenmişlerdir. Bu çalışmada kullanmış olduğumuz Hoechts 33342 floresan boyası öncelikli olarak hayvan hücre çekirdeklerini boyama için geliştirilmesine rağmen Iwabuchi, vd. (2010)'nin de yaptıkları çalışmada bitki hücrelerinin çekirdeklerini boyamak için de kullanılmıştır. Floresan mikroskopundaki görüntüler sonucunda, *in vivo* ve *in vitro*'dan elde edilen protoplastların füzyon sayıları karşılaştırıldığında; en yüksek çoklu füzyon sayısı 397 adet ile PEG 8000 aracılığıyla, *in vivo* koşullardan alınan Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastlarda gerçekleştirilmiştir. En yüksek ikili füzyon ise 69 adet ile PEG 6000 aracılığıyla, *in vivo* koşullarda alınan mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinden izole edilen protoplastlardan elde edildiği saptanmıştır.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş Afrika menekşelerinden (*Saintpaulia ionantha*) izole edilen protoplastların ve füzyona uğratılmış protoplastların aralarındaki farklar gösterilmiştir. Bu çalışma sayesinde, Afrika menekşesinde yapılacak bir sonraki füzyon çalışmalarında en verimli sonuç için elde ettiğimiz veriler kullanılarak daha kısa sürede ve daha yüksek füzyon sayıları elde edilebilecektir. Ayrıca çalışmamızda başarılı bir mikroçoğaltım protokolü oluşturulmuştur.

Bundan sonraki çalışmalarda; füzyona uğratılan hücrelerin genetik analizleri yapılarak hibrit ya da sibrit tespitine gidilebilir. Özellikle yeni çeşit geliştirmeye dayalı çalışmalar gerçekleştirilebilir. Tespit edilen hibrit ya da sibritlerin mikrokallus oluşturmalarının ardından bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmeleri sağlanarak, füzyon sonucu elde edilen Afrika menekşelerindeki herhangi bir fizyolojik ve morfolojik farklılıklar araştırılabilir.

In vivo ve *in vitro* koşullarda yetiştirilen mor ve beyaz çiçekli Afrika menekşelerinde çalıştığımız protoplast izolasyonu ve füzyonu ile ilgili elde ettiğimiz yeni bilgiler doğrultusunda bu protokoller geliştirilerek daha verimli, hızlı ve düşük maliyetli çalışmalar gerçekleştirilebilir. Elde ettiğimiz bu protokoller başka bitkilere uyarlanarak bitki ıslah çalışmalarında kullanılabilir. Özellikle de bitki ıslahçılarının, süs bitkilerinde istenen özelliklerin elde edilmesine yönelik somaklonal varyasyon gerçekleştirmeleri durumunda, somaklonal hatların mikroçoğaltımı ile kısa sürede yeni çeşit geliştirme potansiyelleri artabilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Al-Hussein, S., Shibli, R. and Karam, N.** 2006, Regeneration in African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) using different leaf explants, cytokinins sources and light regimes. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 2(4).
- Açıkgöz, N., İlker, E. ve Gökçöl, A.** 2004, *Biyoteknolojik Araştırmaların Bilgisayarda Değerlendirilmeleri*. Açıkgöz, N., İlker, E. ve Gökçöl, A., 2004, *Biyoteknolojik Araştırmaların Bilgisayarda E.Ü. Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi*.
- Afkhami-Sarvestani, R., Serek, M. and Winkelmann, T.** 2012, Protoplast isolation and culture from *Streptocarpus* followed by fusion with *Saintpaulia ionantha* protoplasts. *Eropean Journal of Horticultural Science*, 249-260pp.
- Asmara, D.M., Rida A.S. and Nabila S.K.** 2004. Cryopreservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) Shoot Tips. *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant*, 40, 389–395pp.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S.** 2002, *Bitki biyoteknolojisi*. Konya: Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Bilkey, P., Davey, M. and Cocking, E.** 1982, A non-enzymatic metod for the isolation of protoplast from callus of *Saintpaulia ionantha* (African violet). *Zeitschrift Pflanzenphysiologie*, 15, 285-286pp.
- Daud, N. and Taha, R.** 2008. Studies on plant regeneration and somaclonal variations in *Saintpaulia ioanantha* Wendl.(African violet). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(9), 1240-1245pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Davey, M. and Anthony, P.** 2010. *Plant cell culture essential methods*. A John Wiley and Sons, Ltd.
- Espino, F. and Vazquez, M.** 1981. Chromosome numbers of *Saintpaulia ionantha* plantlets regenerated from leaves cultured *in vitro* with caffeine and colchicine. *Euphytica*, 30, 847-853pp.
- Gaj, M. and Gaj, M.** 1996. The high frequency of variegated forms after *in vitro* mutagenesis in *Saintpaulia ionantha* Wendl. *Acta Societatis Botanicaorum Poloniae*, 65(3-4), 339-343pp.
- Ghorbanzade, Z. and Ahmadabi, M.** 2014. An improved system for rapid *in vitro* regeneration of *Saintpaulia ionantha*. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 24(1), 37-45pp.
- Gurel, A. and Cakin, I.** 2013. *In vitro* shoot regeneration from protoplasts and selection of somaclones in African violet (*Saintpaulia ionantha*). *Vth Bioengineering Congress Abstract Book*. Kuşadası.
- Gürel, A., Hayta, Ş., Nartop, P., Bayraktar, M. ve Fedakar, S.** 2013. *Bitki hücre, doku ve organ kültürü uygulamaları*. izmir: Ege Üniversitesi Yayınları.
- Hekimoğlu, B. ve Altındeğer, M.** 2012. Süs bitkileri endüstrisi sektör raporu. Gıda, tarım ve hayvancılık bakanlığı.
- Hopkins, W.** 2007. *Plant Biotechnology*. Infobase.
- Hoshino, Y., Nakano, M. and Mii, M.** 1995. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Saintpaulia ionantha* Wendl. *Plant Cell Reports*, 341-344pp.
- Iwabuchi, K., Minamino, R. and Takagi, S.** 2010. Actin reorganization underlies phototropin-dependent positioning of nuclei in Arabidopsis leaf cells. *Plant Physiol*, 1309-1319pp.
- Jabbarzadeh, Z., Khosh-Khui, M. and Salehi, H.** 2009. The effect of foliar-applied salicylic acid on flowering of African violet. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 4693-4696pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jain, S.** 1997. Micropropagation of selected somaclones of Begonia and Saintpaulia. *J.Biosci.*, 22(5), 585-592pp.
- Khan, S., Naseeb, S. and Ali, K.** 2007. Callus induction, plant regeneration and acclimatization of African violet (*Saintpaulia ionantha*) using leaves as explants. *Pak.J.Bot.*, 39(4), 1263-1268pp.
- Kolehmainen, J.** 2008. Ecology, population genetics and conservation of the African violet (*Saintpaulia*, *Gesneriaceae*). University of Helsinki, Finland.
- Ling, A., Ong, C., Tee, C. and Hussein, S.** 2009. Establishment of protoplast isolation protocols of Orthosiphon Stamineus. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 3(3), 587-596pp.
- Lo, K.** 1997. Factors effecting shoot organogenesis in leaf disc culture of African violet. *Scientia Horticulturae*, 72, 49-57pp.
- Martin-Mex, R., Villannueva-Couoh, E., Herrera-Campo, T. and Larque-Saavedra, A.** 2005. Possitive effect of salicylates on the flowering of African violet. *Scientia Horticulturae*, 499-502pp.
- Mercuri, A., De Benedetti, L., Burchi, G. and Schiva, T.** 2000. Agrobacterium-mediated transformation of African violet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60, 39-46pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mithila, J., Hall, J., Victor, J. and Saxena, P.** 2003. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Plant Cell Report*, 21, 408-414pp.
- Moges, A., Shibli, R. and Karam, N.** 2004. Cryopreservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) shoot tips. *In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 40, 389-395pp.
- Murashige, T. and Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15, 473-497pp.
- Norris, R., Smith, R. and Turner, P.** 1982. Phenotypic differences in haploid African violets. *In vitro*, 18(5), 443-446pp.
- Pierik, R.** 1987. Somaclonal variation . *In vitro culture of higher plants*, 231-238pp.
- Rezazadeh, R., Harrison, D. and Williams, R.** 2011. Intraspecific somatic hybridization of mango (*Mangifera indica* L.) through protoplast fusion. *Journal of Applied Horticulture*, 101-107pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pack, K.Y. and Hahn, E.J.** 1999. Variation in African violet 'Crimson Frost' micropropogated by homogenized leaf tissue culture. *HortTechnology* 9(4): 625-629pp.
- Rout, G., Mohapatra, A. and Jain, M.** 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24, 531-560pp.
- Saltveit, M.E. and Hepler, P.K.** 2004. Effect of heat shock on the chilling sensitivity of trichomes and petioles of African violet (*Saintpaulia*). *Physiologia Plantarum* 121, 35-43pp.
- Senevriatne, K. and Wijesundara, D.** 2007. First African violets (*Saintpaulia ionantha*, H.Wendl.) with a changing colour pattern in induced by mutattion. *American Journal of Plant Physiology*, 2(3), 233-236pp.
- Shukla, M., Sullivan, J., Jain, S., Murch, S. and Saxena, P.** 2013. Micropropogation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Protocols for Micropropogation of Selected Economically-Important Horticultural Plants Springer Science* 994: 279-289pp.
- Smith, R., Kamp, M. and Davies, R.** 1981. Reduced plant sized of haploid African violets. *In vitro*, 17(5), 385-387pp.
- Sulzinski, M. and Cimasky, L.** 1995. Leaf bisection for the enzymatic isolation of mesophyll protoplasts from *Saintpaulia ionantha*. *Biologia Plantarum*, 37(2), 297-300pp.
- Sunpui, K. and Kanchanapoom, K.** 2002. Plant regeneration from petiole and leaf of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured *in vitro*. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 24(3), 357-364pp.
- Tomar, U. and Dantu, P.** 2010. Protoplast culture and somatic hybridization. G. Tripathi , *Cellular and biochemical sciences book* ,876-890pp.
- Verma, N., Bansal, M. and Kumar , V.** 2008. Protoplast fusion technology and its biotechnological applications. *Chemical Engineering Transactions*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Winkelmann, T.** 1993. Use of a protoplast regeneration system for African violet improvment. *African violet*, 50-52pp.
- Winkelmann, T. and Grunewaldt, J.** 1992. Plant regeneration from protoplast of *Saintpaulia ionantha* H.Wendl. *Gartenbauwissenschaft*, 57(6), 284-287pp.
- Winkelmann, T. and Grunewaldt, J.** 1994. Genotypic variability for protoplast regeneration in *Saintpaulia ionantha*(H.Wendl.). *Plant Cell Reports*, 704-707pp.
- Winkelmann, T. and Grunewaldt, J.** 1995(a). Analaysis of protoplast-derived plants of *Saintpaulia ionantha* H.Wendl. *Plant Breeding*, 346-350pp.
- Winkelmann, T. and Grunewaldt, J.** 1995(b). Genotypic variablity for protoplast regeneration in *Saintpaulia ionantha*(H.wendl.). *Plant Cell Reports*, 14, 704-707pp.
- Winkelmann, T. and Grunewaldt, J.** 1996. Regeneration of plants from protoplasts of *Saintpaulia ionantha* H.Wendl.(African Violet). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 141-149 pp.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara da tamamladıktan sonra 2007 yılında İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünü kazandı. 2011 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak Biyolog ünvanını aldı. 2012 yılında Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı. Yüksek Lisans süresince özel bir bitki doku kültürü laboratuvarında çalışmaya başladı ve orada AR-GE Bitki Doku Kültürü Uzmanı olarak halen devam etmektedir.