

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***IN VITRO* KOŞULLARDA *Gentiana cruciata* L.
BİTKİSİNDEN SENTETİK TOHUM ÜRETİMİ**

Osman TELLİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 612.01.00

Sunuş tarihi: 03/08/2010

Bornova-İZMİR

2010

Osman TELLİ tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “*In vitro* Koşullarda *Gentiana cruciata* L. Bitkisinden Sentetik Tohum Üretimi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 03/08/20010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Aynur GÜREL

Raportör Üye : Doç. Dr. Bahattin TANYOLAÇ

Üye : Yard. Doç. Dr. Bülent YAĞMUR

.....
.....
.....

ÖZET

***IN VITRO* KOŞULLARDA *Gentiana cruciata* L. BİTKİSİNDEN SENTETİK TOHUM ÜRETİMİ**

TELLİ, Osman

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez yöneticisi: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Ağustos 2010, 42 sayfa

Genellikle dağlık bölgelerde yetişen *Gentiana cruciata* L. bitkisinin kurutulmuş kök ve rizomları, halk hekimliğinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Kökleri, sekoiridoid glikozitlerce zengin olan *Gentiana* türlerinin sindirim sistemini uyarıcı ve sedatif etkileri vardır. Glikozid ekstraksiyonu için köklerinin kontrolsüz tüketilmesinden dolayı bazı *Gentiana* türleri özellikle *G. cruciata* doğal ortamında yok olmak üzeredir. Bu yüzden *G. cruciata* ve birkaç *Gentiana* türü tehlike altındaki türler olarak koruma altındadır. Bu tezde, *G. cruciata* L. bitkisinden sentetik tohum üretimi amaçlanmıştır.

Araştırmada eksplant olarak sap ve yapraklar kullanılmıştır. Eksplantlar farklı 2,4-D (0.5 ve 1 mg/l) ve Kinetin (0.1, 0.5, 1 ve 2 mg/l) konsantrasyonları içeren MS besin ortamına aktarılmışlardır. Kallus oluşum oranı % 49.04 ile % 100 arasında değişmiştir. Her iki eksplant içinde en iyi ortamın 0.5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin içeren ortam olduğu tespit edilmiştir. Sıvı ortama aktarılan kallusların sadece MS tuzları içeren ve 1 mg/l IAA + 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BA ve 80 mg/l Adenin Sülfat içeren ortamlarda gelişme potansiyeline sahip olduğu gözlenmiştir. Embriyo büyütme ortamına aktarılan embriyogenik kalluslardan 1 gram

kallus için 141 ile 250 arasında somatik embriyo oluşumu gözlenmiştir. Embriyo büyütme ortamları arasında en yüksek verimlilik 0.1 mg/l IAA + 0.1 mg/l Kinetin içeren ortamda gözlenmiştir. Somatik embriyolar %2 alginik asit (w/v) ile kaplanmıştır ve sentetik tohum üretimi başarılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Gentiana cruciata* L., Kallus, Somatik embriyogenesis, Sentetik tohum.

ABSTRACT**SYNTHETIC SEED PRODUCTION FROM *Gentiana cruciata* L.
UNDER IN VITRO CONDITIONS**

TELLI, Osman

M.Sc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Aynur GUREL

August, 2010, 42 pages

The dried roots and the rhizomes of the *Gentiana* which usually grows in mountainous regions are used in traditional medicine. *Gentiana* species, rich in secoiridoid glycosides, have been shown to stimulate digestive system and have sedative effects. Due to the uncontrolled use of roots for glucoside extraction, some of the *Gentiana* species especially *Gentiana cruciata* L. are close to extinction in their natural habits. Thus, *G. cruciata* L. and several gentians are under protection as endangered species. In this thesis, it was aimed to produce synthetic seed from *G. cruciata* L.

Explants source was used as stem and leaf in the treatments. Explants were cultured with 2,4-D (0.5, 1 mg/l) and Kinetin (0.1, 0.5, 1, and 2mg/l) MS medium. The callus formation ratio changed between 49.04 % and 100 %. The best medium of all explants is 0.5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin MS medium. Growing potential of embryonic callus in suspension medium was only observed the medium which contain 1 mg/l IAA + 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BA + 80 mg/l Adenin Sulfate + MS salts.

In order to obtain 1 g embryonic callus from embryonic callus transferred from embryo growing medium, 141 and 250 somatic embryo formation was observed. The highest efficiency in embryo growth medium was observed 0.1 mg/l IAA + 0.1 mg/l Kinetin medium. Somatic embryos were encapsulated with 2% (w/v) alginic acid and synthetic seed production was achieved.

Key words: *Gentiana cruciata* L., Callus, Somatic embryogenesis, Synthetic seed.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımız süresince bana her türlü desteği sağlayan ve çalışma konumda bana özgür karar verme şansı tanıyan danışmanım Prof. Dr. Aynur GÜREL'e; yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Şadiye HAYTA, Arş. Gör. Pınar NARTOP, Arş. Gör. Meltem BAYRAKTAR ve Elmira NAZİRİ'ye ve beni her zaman her konuda maddi ve manevi destekleyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL ve METOD	10
3.1 Materyal.....	10
3.2 Metot.....	10
3.2.1 Başlangıç Materyalinin Çoğaltımı	10
3.2.2. Besin Ortamlarının Hazırlanması	11
3.2.3. Kullanılan Besin Ortamları	11
3.2.3.1. Başlangıç Materyalini Çoğaltma Ortamları.....	11
3.2.3.2. Kallus İndüksiyon Ortamı	13
3.2.3.3. Sıvı Süspansiyon Kültür Ortamı	13
3.2.3.4. Embriyo Geliştirme Ortamı	15
3.2.4. Klon Bitkilerin Yetiştirilmesi	15
3.2.5. Kallus İndüksiyonu.....	16
3.2.6. Sıvı Süspansiyon Kültürü ve Somatik Embriyo Oluşumu.....	17

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

Sayfa

3.2.7. Somatik Embriyo Büyütme ve Geliştirme Ortamları.....	17
3.2.8. Sentetik Tohum Elde Edilmesi	18
3.2.9. İncelenen Özellikler	18
3.2.9.1. Kallus İndüksiyon Oranı	18
3.2.9.2. Embriyonik Kallus İndüksiyon Oranı (%).....	19
3.2.9.3. Süspanse Kültüre Aktarılan Kallusların İncelenmesi	19
3.2.9.4. Somatik Embriyo Oluşumunun İncelenmesi	19
3.2.9.5. Somatik Embriyo Sayısı (somatik embriyo / g kallus)	19
3.2.10. Araştırmada Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi.....	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	20
4.1. Kallus İndüksiyonu	20
4.1.1. Kallus İndüksiyon Oranı (%)	20
4.1.2. Embriyonik Kallus İndüksiyon Oranı (%).....	24
4.1.3. Süspanse Kültüre Aktarılan Kallusların İncelenmesi	26
4.1.4. Somatik Embriyo Oluşumunun İncelenmesi	27
4.1.5. Somatik Embriyo Sayısının (somatik embriyo/g kallus) İncelenmesi.....	29
4.1.6. Sentetik Tohum Elde Edilmesi	31
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	33
KAYNAKLAR DİZİNİ	37
ÖZGEÇMİŞ	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: (a) <i>Genitiana cruciata</i> L.'nin genel görünümü	1
1.1: (b) <i>Genitiana cruciata</i> L.'nin çiçek yapısı	1
3.1:Başlangıç materyali olarak kullanılan <i>Gentiana cruciata</i> L. bitkisine ait 7 no' lu klon.....	10
3.2: (a) Kallus indüksiyon ortamına aktarılan sap eksplantları	16
3.2: (b) Kallus indüksiyon ortamına aktarılan yaprak eksplantları..	16
4.1: Sap ve yaprak eksplantlarının 8 farklı kallus ortamında oluşturdukları kallus oluşum yüzdeleri	21
4.2: Sap ve yaprak eksplantlarının embriyogenik kallus oluşum yüzdesi....	24
4.3: (a) Kallus ortamlarında oluşan indirekt organogenez	26
4.3: (b) İndirekt somatik embriyogenez oluşumları	26
4.4: (a) Sıvı besin ortamına aktarılan embriyogenik	27
4.4: (b) Embriyogenik olmayan kalluslar	27
4.5: Sıvı besin ortamında gelişen kalluslar.....	27
4.6: Süspanse ortamdan çıkan pro-embriyo yapıdaki kalluslar.....	28

ŞEKİLER DİZİNİ (DEVAM)

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa</u>
4.7: (a) Embriyo büyütme ortamında oluşan kalp fazındaki embriyolar.....	31
4.7: (b) Torpedo fazındaki embriyolar	31
4.8: Somatik embriyoların kaplanması ile elde edilen sentetik tohumlar....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge No</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Başlangıç materyalini çoğaltma ortamının bileşimi	12
3.2: Kallus indüksiyon ortamlarının bileşimi	13
3.3: Sıvı süspansiyon ortamlarının bileşimi	14
3.4: Aktarılan kallusların ortam özelliği ve niteliği	14
3.5: Embriyo büyütme ortamlarının bileşimi	15
4.1: Sap ve yaprak eksplantlarının farklı besin ortamlarındaki kallus indüksiyon oranına ait varyans analiz sonuçları	21
4.2: <i>Gentiana cruciata</i> L. bitkisinin farklı hormon uygulamalarında oluşturduğu kallus indüksiyon oranı ortalamaları (%)	23
4.3: Embriyo büyütme ortamında (E.B.O) gelişimi gözlenen embrioidlerin sayısı	29

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
MS	Murashige ve Skoog
2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
Kinetin	6-furfurilaminopürin
NAA	Naftalin asetik asit
BAP	6-Benzil amino pürin
IAA	İndol-3 asetik asit
IBA	İndol-3-bütirik asit
TDZ	Thiadiazuran
CPPU	Forklorfenuron
Picloram	4-amino-3,5,6-trikloropiklonik asit
Dicamba	3,6-dikloro-2 metoksibenzoik asit
AS	Adenin sülfat
E.B.O.	Embriyo büyütme ortamı

1.GİRİŞ

Anavatanı tam olarak bilinmeyen *Gentiana* bitkisi, Kuzey Yarıküre'nin ılıman iklim bölgelerindeki dağlık yerlerde ve güneşli bayırlarda ağır ağır gelişerek yetişen, çok yıllık, dayanıklı bir otsu bitkidir. Ülkemizde Kuzey ve İç Anadolu'da yetişmektedir. Temmuz-Ağustos aylarında açan çiçekleri boru yapılı ve toplu durumda olmaktadır (Baytop, 1963). Bitki, tohumlarıyla çoğalmaktadır. *Gentiana* bitkisine ait yaklaşık 360 tür tespit edilmiştir, bunların 14 tanesi ile doku kültürü çalışmaları yapılmıştır. *Gentiana cruciata* L. bunlardan biridir, yaklaşık 50cm boyunda olup mavi çiçeği ve küt yapılı yapraklarıyla diğer türlerden ayrılmaktadır (Şekil 1.1) (Mikuta and Rybczynski, 2001).



(a) http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gentiana_cruciata_a1.jpg
(b) <http://www.wildgingerfarm.com/images/Gentianacruciataflowers.JPG>

Şekil 1.1: (a) *Gentiana cruciata* L.'nin genel görünümü , (b) *Gentiana cruciata* L.'nin çiçek yapısı

Genellikle dağlık bölgelerde yetişen *G. cruciata* L. bitkisinin kurutulmuş kök ve rizomları, halk hekimliğinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Kökleri, sekoiridoit glikozitleri içermektedir. Sindirim sistemini uyarıcı ve sedatif etkisi vardır (Baytop, 1963). Sinir uçlarını uyarıp sindirim salgılarını artırarak iştahı açar. Aynı nedenle sindirimi kolaylaştırır. Dispepsi (sindirim zorluğu) ve midenin gazlı olması durumlarında çok yararlı, iyileştirici etkiler yapmaktadır. Gastrit, hazımsızlık ve mide ekşimesinde etkili olan kökler, Avrupa ve Japon ilaç kodeksinde de yer almışlardır (Ando et al., 2007). C, H ve O içeren, terpenoid (nadiren sterol) yapıdaki toksik olmayan acı maddelerin mide salgısını arttırdığı

tespit edilmiştir (Sand et al., 2008). Alyuvarları artırıcı etkisi kanıtlanmıştır. Bu nedenle, kansızlık durumunda olumlu sonuçlar vermektedir (Ando et al., 2007).

Aktif bileşikler bitkinin köklerinden elde edildiği ve bu kökler de bilinçsizce toplandığı için doğal *G. cruciata* L. popülasyonunda büyük hasarlar meydana gelmiştir (Momcilović et al., 1997). Her yıl doğadan toplanan 6.000 ton bitkisel materyalden 1.500 ton'dan daha fazla *Gentiana* kökü elde edilmektedir (Ando et al., 2007). Ülkemizde olduğu gibi, Avrupa ülkelerinde de soyu tükenmek üzeredir. Bu nedenle, Almanya'da koruma altına alınmış ve toplanması kesinlikle yasaklanmıştır (Thomas, 2003).

Bitki hücre ve doku kültürleri, aseptik koşullar altında ve uygun besin ortamlarında bitki hücre, doku, organ ya da bitkiciklerin üretildiği ya da ürünlerin elde edildiği tekniklerdir (Sökmen ve Gürel, 2001). Doku kültürü tekniklerinden biri olan somatik embriyogenesis, birçok bitki türünün hızlı klonal çoğaltımında önemli bir potansiyele sahiptir. Teorik olarak tek bir eksplant sınırsız sayıda embriyo üretebilir. Bu sınırsız üretim, anaç bitkiden alınan kısıtlı miktardaki materyale bağlı olan çelikle çoğaltım karşısında çok büyük bir avantaja sahip olmaktadır. Özellikle, birçok bitki türü için geliştirilen hücre süspansiyon teknikleriyle az bir işçilikle, çok kısa sürede çok sayıda iyi gelişmiş embriyo elde etmek mümkün olmaktadır (Parrot et al., 1993).

Somatik embriyoların döllenme sonucunda gelişen zigotik embriyolara göre en önemli üstünlükleri genetik açılımların olmamasıdır. Somatik embriyolar, kültüre alınan eksplantın somatik hücrelerinden gelişirler ve eksplantın alındığı bitkinin genotipini muhafaza ettiklerinden dolayı klon oluştururlar (Parrot et al., 1993). Somatik embriyolar döllenmiş yumurtadan gelişen embriyoda olduğu gibi globular, kalp, torpedo ve kotiledon safhalarını geçirirler. Ancak, somatik embriyolar organogenesis yoluyla gelişen sürgünlerden farklılık gösterirler. Gövde-kök eksenine aynı zamanda sahip olup, asıl doku ile vaskular bağlantıları olmadığından dolayı dokudan kolaylıkla ayrılabilirler (De Jong et al., 1993).

Somatik embriyo kültürleri, bitkilerin hızlı çoğaltılması yanında diğer bazı önemli özellikleri de taşımaktadırlar. Somatik embriyogenesis sonucu oluşan ürün

bir embriyo olup, tohum içerisinde bulunan embriyonun bir benzeridir. Daha da önemlisi somatik embriyolar tam bir bitki oluşturabilme programına da sahiptirler. Bu yüzden, somatik embriyolar kaplanmış tohum olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptirler (Parrot et al., 1993).

Somatik embriyoların sentetik tohum olarak kullanımı büyük bir ekonomik öneme sahip olabilir. Somatik embriyolar bitkinin somatik hücrelerinden geliştikleri için zigotik embriyolardaki açılmalar olmamakta ve somatik embriyolardan elde edilen sentetik tohumlardan çoğaltma, klonal çoğaltım şeklinde olmaktadır. Ancak doku kültürlerinde mutasyon oluşma olasılığını göz ardı etmemek gerekmektedir. Özellikle kallus aracılığı ile oluşturulan somatik embriyolarda mutasyon oluşum riski daha yüksek olmaktadır. Çok düşük oranda gerçekleşen mutasyon oluşum riski dışında somatik embriyolar, önemli avantajlar içermektedir.

Somatik embriyoların kaplanması amacı gerçek tohumların bir analogunun üretilmesidir. Sentetik tohum üretim süreci, somatik embriyoların bir enkapsülasyon matriksi yani kaplama materyali ile karıştırılmasını kapsamaktadır. Embriyolar bu kaplama materyali içinde korunmaktadır (Chawla, 2002). Na-Ca aljinat boncukları içinde *in vitro* kaynaklı somatik embriyoların enkapsülasyonu hem laboratuvarlar arasında aseptik materyallerin transferi hem de değerli germiplasmların depolanması için faydalı bir araç olabilmektedir (Tsvetkov et al., 2006).

Enkapsülasyon tekniği *in vitro*'da üretilen bitkilerin tarlaya veya seraya aktarılmasını kolaylaştıran, mikroçoğaltımın önemli bir uygulamasıdır (Soneji et al., 2002). Ancak bitkiler somatik embriyogenesis ile üretildiğinde dahi *in vitro* bitkilerin aklimatizasyonu zahmetlidir. Sentetik tohum teknolojisi mekanik ekime imkan sağlamasıyla bu problemin üstesinden gelme potansiyeline sahiptir (Mamiya and Sakamoto, 2001).

Sentetik tohum üretimi için somatik embriyolardan başka, meristematik sürgün uçları veya aksillar tomurcuklar, endosperm yapısına sahip olmayan zigotik tohumlar, orkide protokormları ve protokorm benzeri yapılar, saçaklı

kökler de kullanılabilir (Khor and Loh, 2005). Ancak, sentetik tohum araştırmalarının çoğunda kullanılan bitki materyali somatik embriyolardır (Soneji et al., 2002). Sentetik olarak kapsüllenmiş somatik embriyolar, *in vitro* veya *ex vitro* koşullar altında ekilebilmekte ve uniform klonlar üretebilmektedirler (Khor and Loh, 2005).

G. cruciata L. bitkisinin sahip olduğu önemli sekonder metabolitler köklerinde bulunmaktadır ve bitkinin kökleri bu amaçla çok miktarlarda sökölerek kullanılmaktadır. Bunun sonucu olarak da bitki yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmıştır. Bu durum, bitkinin *in vitro* koşullar altında sentetik tohumunun üretimini önemli kılmaktadır. Bu amaçla, bu tez kapsamında *in vitro* koşullar altında *G. cruciata* L. bitkisinin sentetik tohumunun üretimi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Somatik embriyogenesis ilk defa havuç bitkisinin somatik dokularından elde edilmiştir. Genel olarak somatik embriyo üretimi için çok değişik bitki kısımları kullanılabilmektedir. Günümüzde buğday (Maes et al., 1996), mısır (Bronsema, 1997; Emeklier vd., 1999), çeltik (Ozawa and Komamine, 1989), soya (Hartweck et al., 1988), bezelye (Özcan vd., 1993) ve yonca (Lai and McKersier, 1994) gibi birçok önemli kültür bitkisinde yüksek oranda somatik embriyo üreten yöntemler geliştirilmiştir.

Momcilović et al., (1997), dört *Gentiana* türünün (*G. lutea*, L., *G. cruciata* L., *G. purpurea* L., ve *G. acaulis* L.) mikroçoğaltımı üzerine yaptıkları çalışmalarında, 1.14 µM IAA konsantrasyonuyla birlikte, BAP (1.11-17.75µM) miktarlarını arttırarak iyi gelişmiş sürgünler elde etmişlerdir. *G. lutea* L. dışında bu sürgünlerin % 35-70 oranında kök oluşturdıkları, *G. lutea*’ da ise ancak NAA içeren ortamlara aktarıldıklarında köklerin oluştuğu gözlenmiştir.

G. cruciata L. ve *G. tibetica* L.’nin embriyogenik süspanse kültürlerinden somatik embriyo gelişimi üzerine yapılan bir çalışmada, MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı içinde, Giberellik Asit (GA₃) (0, 1.49 veya 2.89 µmol), Kinetin (0, 2.32, 4.64 veya 9.28 µmol) ve Adenin Sülfat (0 veya 434 µmol) çeşitli konsantrasyonlarda birbirleriyle kombine edilerek denemiş ve *G. cruciata* L. bitkisinde somatik embriyo gelişimi için en iyi ortamın 1.49 µmol GA₃, 4.64 µmol Kinetin, 434 µmol Adenin Sülfat içeren MS ortamı olduğu, gelişimin en iyi 10. haftada gözlemlendiği rapor edilmiştir (Mikula et al., 2005).

Mikula and Rybczyfiski (2001), *G. cruciata* L., *G. pannonica*, *G. tibetica* türlerinden somatik embriyo elde etmek amacıyla yaptıkları araştırmada, MS besin ortamı içinde GA₃, Kinetin, NAA hormonlarını bir arada farklı konsantrasyonlarda denemişler ve en yüksek somatik embriyo oluşumunun 0.5 mg/l GA₃, 0.5 mg/l NAA, 1.0 mg/l Kinetin kombinasyonunu içeren ortamda oluştuğunu tespit etmişlerdir.

G. cruciata L.' nin yaprak eksplantlarından embriyogenik kallus ve bu kalluslardan da somatik embriyo elde etmek için yapılan başka bir çalışmada, 3 farklı oksin tipinin (2,4-D, NAA, Dicamba) 3 farklı konsantrasyonu (0.5, 1.0, 2.0 mg/l), 5 farklı sitokinin tipinin (Zeatin, Kinetin, TDZ, CPPU, BAP) 4 farklı konsantrasyonu (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) ile kombine edilerek sonuçları gözlenmiştir. 2,4- D' nin sadece Kinetin ile, NAA' nın ise Zeatin, Kinetin, TDZ, BAP ile embriyogenik kallus oluşturduğu gözlenmiştir. Dicamba' nın ise hiçbir sitokinin ile embriyogenik kallus oluşturamadığı tespit edilmiştir. Daha sonra, embriyogenik kalluslar, embriyo oluşumunu teşvik etmek için hazırlanan 1mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP içeren MS ortamına aktarıldıklarında eksplant başına somatik embriyo frekansının % 32.5, eksplant başına embriyo sayısının da 6.6 olduğu bildirilmiştir. Oluşan kalluslardan bej, zamanla kahverengi biçimi alanların embriyogenik kallus olduğu, açık yeşil kompakt yapılı kallusların ise embriyogenik olmadığı bildirilmiştir (Fiuk and Rybczyński, 2008).

Fiuk and Rybczyński (2008), yaptıkları çalışmada *G. kurroo* bitkisinin hipokotil eksplantlarından suspanse kültür aracılığıyla somatik embriyo elde etmişlerdir. Eksplantları önce, 0.5 mg/l 2.4-D ve 1 mg/l Kinetin içeren MS ortamına aktarıp 2 ay sonunda embriyogenik kallus oluşturmuşlar, daha sonra aynı hormon içeriğinde olan suspanse kültüre kallusları aktarıp, 6 hafta sonra oluşan somatik embriyoları Kinetin (0.0–2.0 mg/l), GA₃ (0.0–2.0 mg/l) ve AS (80.0 mg/l) içeren embriyo büyütme ortamlarına almışlardır. Sonuç olarak, en yüksek sayıda somatik embriyonun 0.5 mg/l GA₃, 1 mg/l Kinetin, 80 mg/l AS içeren embriyo büyütme ortamında oluştuğu bildirilmiştir.

Cangahuala-Inocente et al. (2007), feijoa bitkisinde sentetik tohum elde etmek için yaptıkları çalışmada, BAP (0.5 mM) ve GA₃ (1 mM) içeren ortamlarda oluşturdukları somatik embriyoları % 1 alginik asit ile karıştırmışlar daha sonra bu karışımı CaCl₂ (50mM) ile muamele ederek sentetik tohum elde etmişleridir.

Kamelyada yapılan sentetik tohum çalışmasında, kamelya bitkisinin kök eksplantları, somatik embriyo oluşturmak amacıyla 4.4 µM BAP ve 0.4 µM IBA hormon konsantrasyonlarına sahip MS besin ortamında 8 hafta bekletilmiştir. Elde edilen embriyolar embriyo büyümesi ve gelişimi için 14.4 µM GA₃ ve 28.5 µM

IAA hormon karışımını içeren MS besin ortamına aktarıldıktan 8 hafta sonra ayrıştırılarak kaplamak için hazır hale getirilmişlerdir. Ayrıştırılan embriyolar % 3 alginik asit ile karıştırıldıktan sonra, 0.1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisine aktarılmışlar ve yarım saat içinde istenen özellikte sentetik tohumların elde edildiği bildirilmiştir (Janeiro et al., 1997).

Mango bitkisinde yapılan çalışmada, nusellus eksplantlarından elde edilen embriyogenik kallusların kahverengi olduğu ve karanlıkta olduğu rapor edilmiştir. 4.5 μM 2,4-D içeren MS besin ortamında 4 haftada globular safhada embriyoların, 8 hafta sonunda ise kotiledon safhasında embriyoların olduğu gözlenmiştir. Oluşan somatik embriyolar 2%' lik alginik asit çözeltisi içinde karıştırıldıktan sonra 100 mM CaCl_2 ile birleştirilerek 40-45 dakika içinde sentetik tohum yapısının olduğu saptanmıştır (Ara et al., 1999).

Ganapathi et al. (2000), muz bitkisinden sentetik tohum üretimini amaçladıkları çalışmalarında, yaprak eksplantlarını MS vitaminleriyle birlikte 4.5 μM 2,4-D, 1 mg/l d-biotin, 100 mg/l L-glutamine ve 100 mg/l malt ekstraktı içeren ortamda 8 hafta beklemek suretiyle embriyogenik kalluslar elde etmişlerdir. Daha sonra, 10 mM Zeatin ilave edilmiş $\frac{1}{2}$ MS ortamı içeren suspanse kültüre aktarılan embriyogenik kalluslardan 6 haftada somatik embriyoların olduğu gözlemlenmiş, oluşan somatik embriyoların embriyo büyüme ortamına aktarılmadan direkt ayrıştırılarak % 5 'lik alginik asit ve CaCl_2 ile kaplandığı ve sentetik tohumların oluşturulduğu bildirilmiştir.

Papaya bitkisinde yapılan bir çalışmada, olgunlaşmamış meyvelere ait embriyolar eksplant olarak kullanılmıştır. 10 μM 2,4-D içeren MS besin ortamında bu embriyolar kültüre alınmış ve 12 hafta karanlık koşullarda muhafaza edilerek embriyogenik kallus oluşumu teşvik edilmiştir. Oluşan embriyogenik kalluslar, hormon içermeyen ve sukroz konsantrasyonu % 6 olan MS ortamında karanlık koşullar altında 2 hafta bekletilmiş ve somatik embriyo oluşumu gerçekleştirilmiştir. Bu somatik embriyoların 0.5 μM absisik asit içeren ortamda kotiledon safhasına geçmesi beklenmiş ve daha sonra alginik asit ve CaCl_2 çözeltisiyle karıştırılarak sentetik tohum elde edilmiştir. Kullanılan alginik asitlerin farklı konsantrasyonları (% 1.5, % 2.0, % 2.5 w/v) ve farklı ticari

markaları (Fluka, Sigma) birbirleriyle karşılaştırılmış, çimlenme yüzdeleri göz önüne alındığında en uygun alginik asit yüzdesinin % 2.5 ve alginik asit markasının Sigma (Chemical, St. Louis, Mo.) olduğu bildirilmiştir (Castillo et.al., 1998).

Paulownia elongata bitkisinin yaprak ve internod eksplantlarından direkt somatik embriyogenesis ve sonrasında da sentetik tohum oluşumu hedeflenen bir çalışmada, bitki eksplantları, somatik embriyo oluşturmak için BAP (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l) ile NAA (0.5 mg/l), IAA (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l) ile Kinetin (0.5, 2.0, 2.5 mg/l), ve sadece TDZ (8.0, 10.0, 15.0, 20.0 mg/l) hormon kombinasyonlarını içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmış, daha sonra elde edilen somatik embriyolar embriyo büyümesi için BAP (0, 0.1 mg/l) ile NAA (0, 0.1, 0.5 mg/l) ve IAA (0, 0.1 mg/l) ile Kinetin (0, 0.1, 0.5 mg/l) hormon kombinasyonlarıyla hazırlanmış MS besin ortamlarına aktarılmışlardır. Somatik embriyo oluşturma frekansının her iki eksplant türü içinde en yüksek 10 mg/l TDZ hormonu içeren besin ortamında gerçekleştiği gözlenmiştir. Embriyo büyütme ortamında ise yine her iki eksplant için en yüksek verim elde edilen ortamın hormon içermeyen MS besin ortamının olduğu bildirilmiştir. Daha sonra, oluşturulan somatik embriyolar, değişik konsantrasyonlarda (% 1.0, % 2.5, % 3.0 (w/v)) alginik asit ve CaCl₂ çözeltisiyle muamele edilerek sentetik tohum oluşumu sağlanmıştır. Bu 3 farklı alginik konsantrasyonundan sentetik tohum canlılığının en uzun süre korunduğu ve en yüksek çimlenme oranının görüldüğü konsantrasyonun %3 olduğu ve canlılık yüzdesinin %77.3, çimlenme yüzdesinin ise % 53.3 olduğu bildirilmiştir (İpekçi ve Gözükırmızı, 2003).

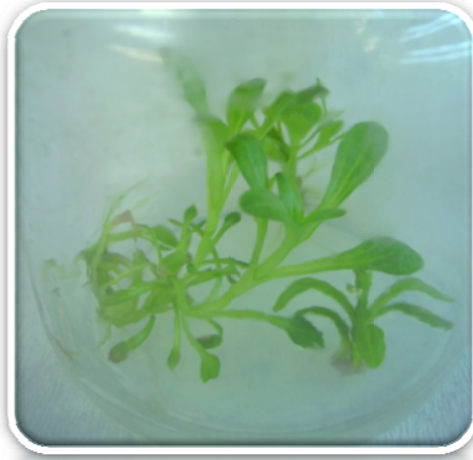
Süle (2005), yonca bitkisinde farklı oksin uygulamalarının kallus oluşumu ve somatik embriyo oluşumu üzerine etkilerini araştırdığı çalışmada, 2,4-D, NAA, Picloram, Dicamba oksinlerini içeren MS besin ortamını kullanmıştır. Kallus indüksiyon oranının en yüksek 2,4-D içeren ortamda olduğu gözlenirken, kallus ağırlığının en yüksek Picloram oksini içeren ortamda meydana geldiği gözlenmiştir. Somatik embriyo oluşmasında ise aynı oksinlerin etkisi kıyaslandığında, gram kallus başına düşen somatik embriyo sayısının en yüksek 2,4-D içeren ortamda olduğu gözlenmiştir. Kallus indüksiyon oranları % 23.7 ile % 50.8 arasında değişirken, kallus ağırlıkları ise petri başına 0.66 mg ile 1.47

mg arasında değişim göstermektedir. Somatik embriyoların sayımı yapıldığında ise gram kallus başına oluşan somatik embriyo sayısının 8.6 ile 25.9 arasında değiştii bildirilmiştir. En yüksek somatik embriyo oluşumunun 2,4-D oksini içeren besin ortamında gerçekleştiği bildirilmiştir.

3.MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan materyal, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Bitki Hücre ve Doku Kültürü Laboratuarında yürütülen 1060111 no'lu TÜBİTAK projesinden temin edilmiştir (Hayta, 2009). *Gentiana cruciata* L. bitkisine ait 7 no'lu klon başlangıç materyali olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Başlangıç materyali olarak kullanılan *Gentiana cruciata* L. bitkisine ait 7 no' lu klon.

3.2. Metot

3.2.1. Başlangıç Materyalinin Çoğaltılması

Başlangıç materyali olarak kullanılan *Gentiana cruciata* L. bitkisinin 7 no'lu klonuna ait bitkilerin sayısı, gerekli eksplantların temin edilebilmesi ve gerektiğinde tekrar kullanılabilmesi için arttırılmıştır. 7 no'lu klona ait steril bitkiler, 0.5 mg/l BAP büyüme düzenleyicisi içeren MS (Murashige and Skoog, 1962) besin ortamında yaklaşık 2 ay kültür süresinde çoğaltılmışlardır.

3.2.2. Besin Ortamlarının Hazırlanması

Çalışmada; başlangıç materyalinin çoğaltılması, kallus indüksiyonu, suspanse kültürde somatik embriyo oluşumu ve embriyo büyütme indüksiyonu için besin ortamları hazırlanmıştır. Besin ortamları hazırlanırken önceden oluşturulmuş stok çözeltilerden 1 litre için gerekli miktarlar alınarak behere aktarılmış, sonra gerekli bitki büyüme düzenleyici miktarları ilave edilmiştir. Ortama 30 g sukroz eklenip, hacim destile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Sukroz iyice eritildikten sonra çözeltinin pH' ı ölçülmüş, seyreltilmiş NaOH (sodyum hidroksit) veya HCl (hidrojen klorür) kullanılarak pH 5,8' e ayarlanmıştır. 7 g/l agar ilave edildikten sonra devamlı karıştırılarak kaynatılan ortam, sıcak olarak kültür kaplarına yaklaşık 20'şer ml olmak üzere dökülmüştür. Ağzıları kapatılan kültür kapları, otoklavda 121 °C' de 15 dakika bırakılarak sterilize edilmişlerdir. Sıvı besin ortamı hazırlanırken ise agar ilave edilmemiş, diğer prosedürler aynen uygulanmıştır.

3.2.3. Kullanılan Besin Ortamları

3.2.3.1. Başlangıç Materyalini Çoğaltma Ortamı

Araştırmada kullanılacak olan başlangıç materyalinin çoğaltılması amacı ile *Gentiana cruciata* L. bitkisinin 7 no' lu klonlarına ait bitkiler 0.5 mg/l BAP büyüme düzenleyicisi içeren MS (Murashige and Skoog, 1962) besin ortamına aktarılmışlardır. Bu ortamın içeriği Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1: Başlangıç materyalini çoğaltma ortamının bileşimi

Maddeler	Konsantrasyon (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
H ₃ BO ₃	6,2
KH ₂ PO ₄	170
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KI	0.83
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Myo-Inositol	100
Tritriplex (Na ₂ EDTA)	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Nikotinik asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Tiamin-HCl	0.1
BAP	0.5
Sukroz	30000
Agar	7000
pH	5.8

3.2.3.2. Kallus İndüksiyon Ortamı

Araştırmada elde edilen yaklaşık 2 aylık *in vitro* yaprak ve sap eksplantları kallus oluşturmak amacıyla farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS ortamlarına aktarılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2: Kallus indüksiyon ortamlarının bileşimi

Ortam No	Besin Ortamı	Bitki Büyüme Düzenleyicileri
1. Ortam	MS	0.1 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l 2,4-D
2. Ortam	MS	0.1 mg/l Kinetin + 1.0 mg/l 2,4-D
3. Ortam	MS	0.5 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l 2,4-D
4. Ortam	MS	0.5 mg/l Kinetin + 1.0 mg/l 2,4-D
5. Ortam	MS	1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l 2,4-D *
6. Ortam	MS	1.0 mg/l Kinetin + 1.0 mg/l 2,4-D
7. Ortam	MS	2.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l 2,4-D
8. Ortam	MS	2.0 mg/l Kinetin + 1.0 mg/l 2,4-D

* Fiuk and Rybczyński (2008)

3.2.3.3. Sıvı Suspansiyon Kültür Ortamı

MS besin ortamında elde edilen embriyogenik kalluslar ve embriyogenik olmayan kalluslar somatik embriyo oluşumunu teşvik etmek amacı ile MS vitamini içeren, biri bitki büyüme hormonlarını içermeyen diğer ikisi ise farklı bitki büyüme hormon konsantrasyonlarını içeren 3 farklı ortama aktarılmışlardır (Çizelge 3.3). Embriyogenik ve embriyogenik olmadığı düşünülen kalluslar birbirlerinden ayrılarak sıvı suspanse kültür ortamına aktarılmışlardır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.3: Sıvı suspansiyon ortamlarının bileşimi

Ortam Çeşitleri	Besin Ortamı İçerikleri
Suspanse Ortam 1	Hormonsuz MS
Suspanse Ortam 2	MS + 1 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP + 80 mg/l Adenin Sülfat
Suspanse Ortam 3	MS + 1 mg/l IAA + 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP + 80 mg/l Adenin Sülfat

Çizelge 3.4: Aktarılan kallusların ortam özelliği ve niteliği

Ortam Çeşidi	Erlen Hacmi	Ortam Hacmi	Kallus Ağırlığı	Kallus Cinsi
Suspanse Ortam 1	2 litre	250 ml	7.5 g	Embriyogenik
				Embriyogenik değil
Suspanse Ortam 2	2 litre	250 ml	7.5 g	Embriyogenik
				Embriyogenik değil
Suspanse Ortam 3	2 litre	250 ml	7.5 g	Embriyogenik
				Embriyogenik değil
Suspanse Ortam 1	1 litre	100 ml	3 g	Embriyogenik
				Embriyogenik değil
Suspanse Ortam 2	1 litre	100 ml	3 g	Embriyogenik
				Embriyogenik değil
Suspanse Ortam 3	1 litre	100 ml	3 g	Embriyogenik
				Embriyogenik değil

3.2.3.4. Embriyo Geliştirme Ortamı

Sıvı suspansiyon kültürleri içerisinde oluşan pro-embriyogenik yapılar MS vitamini içeren ancak bitki büyüme konsantrasyonlarına göre birbirinden farklı 7 ayrı ortama aktarılmıştır. Bu ortamların bileşimi Çizelge 3.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5: Embriyo büyütme ortamlarının bileşim

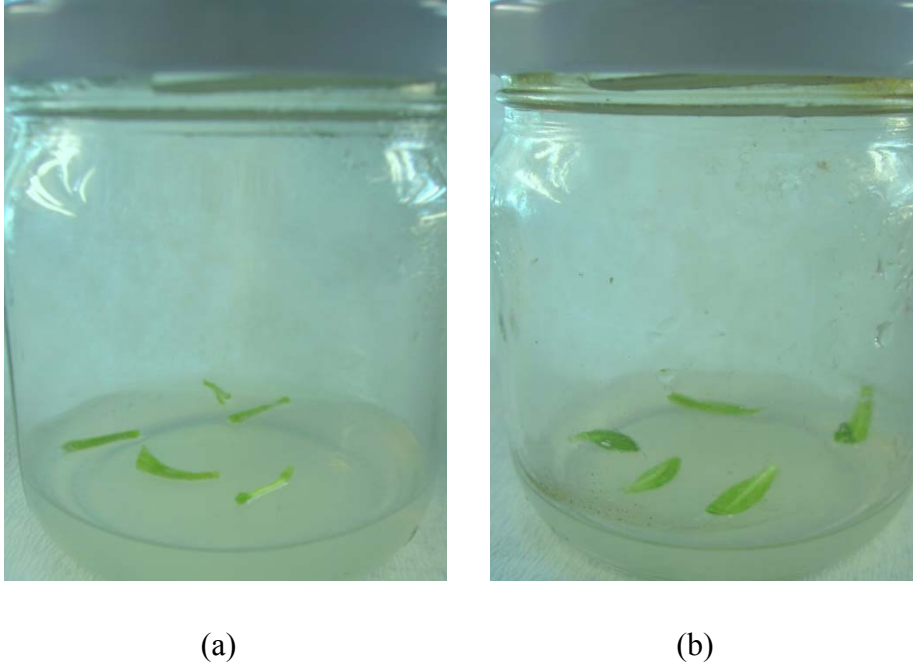
Ortam No.	Ortam İçeriği
Embriyo Büyütme Ortamı 1	Hormonsuz MS
Embriyo Büyütme Ortamı 2	MS + 0.1 mg/l IAA + 0.1 mg/l Kinetin
Embriyo Büyütme Ortamı 3	MS + 0.1 mg/l IAA + 0.5 mg/l Kinetin
Embriyo Büyütme Ortamı 4	MS + 0.1 mg/l IAA + 1.0 mg/l Kinetin
Embriyo Büyütme Ortamı 5	MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l Kinetin
Embriyo Büyütme Ortamı 6	MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kinetin
Embriyo Büyütme Ortamı 7	MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l Kinetin

Araştırmada kullanılan besin ortamlarının tamamında, birim hacimde bulunması gerekli birçok maddenin miktarları düşüktür ve bu maddelerin teker teker tartılarak hazırlanması zaman kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle, besin ortamını oluşturan maddelerin stok solüsyonları hazırlanmıştır.

3.2.4. Klon Bitkilerin Yetiştirilmesi

Çalışmada, 7 no’ lu klona ait bitkilerin yaprak ve sap eksplantları kullanılmıştır. Başlangıç materyali olarak kullanılan 7 no’ lu klon, Hayta (2009) tarafından çimlendirilen ve yetiştirilen *Gentiana cruciata* L. bitkisine ait tohumların oluşturduğu klonları arasından seçilmiştir. 7 no’ lu klon, hızlı gelişim

gösterdiği için ve yaprak ile sap yapısı diğer klonlara göre daha uygun olduğu için seçilmiştir. Başlangıç materyali steril olarak temin edildiğinden dolayı herhangi bir sterilizasyon işlemine gerek kalmamıştır. Bitkiler yeterli sayıya ve gelişmişliğe ulaştırılmak için besin ortamına aktarılarak sayıları çoğaltılmıştır. Kullanılan besin ortamının bileşiminde 0.5 mg/l BAP büyüme düzenleyicisi ile MS besin ortamını oluşturan bileşikler bulunmaktadır. Yaklaşık 2 ay boyunca besin ortamında gelişen bitkiler kesilerek tekrar alt kültüre alınmış, bu sayede sayıları çoğalmıştır. 2 Ay kültür süresi sonunda yeterli sayıya ve gelişmişliğe ulaşan bitkilerin sap ve yaprak parçaları, eksplant olarak alınarak kallus indüksiyon ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: (a) Kallus indüksiyon ortamına aktarılan sap ve (b) yaprak eksplantları

3.2.5. Kallus İndüksiyonu

Eksplant almak için yeterli sayıya ulaşan klon bitkilerin sap ve yaprakları kesilerek kallus indüksiyon ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 3.2). Deneme 3 tekerrürlü olarak kurulmuş ve her bir tekerrür için 1'er cm uzunluğunda 35 adet sap ve 35 adet yaprak eksplantı kullanılmıştır. Kültür kabı olarak 150 cc' lik cam kavanozlar kullanılmış ve her bir kavanoza 5'er adet eksplant aktarılmıştır. Kültürler, floresan ışığında 4000 lux aydınlatma altında, 16 saat aydınlık periyotta ve 25 °C sıcaklıkta 10 hafta süresince muhafaza edilmişlerdir.

3.2.6. Sıvı Suspansiyon Kültürü ve Somatik Embriyo Oluşumu

Yapısı ve rengine göre embriyogenik ve embriyogenik olmayan 2 kallus çeşidi (bej-kahverengi tonlarında, yumuşak ve birbirinden kolayca ayrılabilen yapıda olan embriyogenik kalluslar ile yeşil renkte kompakt yapıda olan embriyogenik olmayan kalluslar), birbirleriyle karışmaması için ayrılmış ve suspanse kültürlerine aktarım için hazır hale getirilmiştir. 3 Farklı suspanse kültür ortamına kallus aktarım oranı; 250 ml sıvı besin ortamı içinde 7.5 gr kallus, 100 ml sıvı besin ortamı içinde ise 3 gr kallus olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kalluslarla beraber sıvı besin ortamlarının bulunduğu erlenler, 120 rpm karıştırma hızında, 4000 lux ışık altında, 25 °C sıcaklıkta, 8 hafta boyunca somatik embriyo oluşturmak için kültüre alınmışlardır.

Sıvı besin ortamlarında 8 hafta sonunda oluşan somatik embriyo içeren kalluslar steril kabin içinde 0.3 mm por büyüklüğüne sahip 50'lik mesh'lerde süzülerek ayrılmıştır. Ayrılan ve embriyoid içeren kalluslar steril distile su ile yıkandıktan sonra, steril filtre kağıdı üzerinde 5 dakika boyunca nemlerinden arındırılmaya çalışılmıştır. Daha sonra embriyoid içeren kallusların yaş ağırlıkları ölçülmüş, embriyo büyütme ortamlarına aktarılacak için hazır hale getirilmişlerdir.

3.2.7. Somatik Embriyo Büyütme ve Geliştirme Ortamları

Nemlerinden arındırılmış embriyoid içeren kalluslar, hormon içeriklerine göre birbirinden farklı 7 ayrı embriyo büyütme ortamına aktarılmışlardır. Aktarım, besin ortamı içeren her bir kavanoza 1'er gram olacak şekilde yapılmıştır. Bu işlem, üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir tekerrür için 7 kültür kabı kullanılmıştır. Embriyoid içeren kallusların embriyo büyütme ortamına aktarılmasındaki amaç, embriyoidlerin sayım yapılabilecek ve sentetik tohum elde edilebilecek uygunluğa erişmesini sağlamaktır. Bu sebeple, besin ortamları içinde 6 hafta boyunca kalan embriyoidler, stereo-mikroskop altında incelenmiştir. Embriyoidlerin gelişim fazları incelenmiş, gram kallus başına embriyo sayıları ve sentetik tohum oluşturabilecek yeterlilikte olup olmadıkları tespit edilmiştir.

3.2.8. Sentetik Tohum Elde Edilmesi

Sayımı yapılan ve gram kallus başına oranı belirlenen embrioidler kaplanarak sentetik tohum haline getirilmiştir. Embrioidlerin sayımının yapılabilmesi ve kaplanarak sentetik tohum olarak kullanılabilmesi için gelişim safhalarının torpedo ve kotiledon fazında olması tercih edilmektedir. Stereo-mikroskop altında bu özellikte olan embrioidler bisturi ile ayrıştırılarak hazır hale getirilmişlerdir. Embrioidler, ½ MS besin ortamını içeren, içinde bitki büyüme düzenleyicisi olmayan, 15 g/l sukroz ve % 2 (w/v) alginik asit içeriğine sahip steril ortama aktarılmışlardır. Bu viskoz çözelti manyetik karıştırıcıda iyice karıştırılmıştır. Bununla beraber, % 2' lik (w/v) kalsiyum klorit (CaCl_2) çözeltisi hazırlanmıştır. Hem alginik asit içeren besin ortamı, hem de CaCl_2 çözeltisi, otoklavda 121 °C'de 15 dakika süresince steril edilmiştir. Steril edilen bu çözeltiler ve manyetik karıştırıcı, laminar hava akışlı kabin içerisine alınarak tohumların kaplanması işlemi burada gerçekleştirilmiştir. Alginik asit ve CaCl_2 çözeltisinin uygun soğukluğa gelmesi beklenmiştir. Embrioidler öncelikle alginik asit çözeltisi ile yavaş yavaş karıştırılmıştır. Daha sonra, manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılan 100 ml CaCl_2 çözeltisi içerisine pipet aracılığı ile yavaşça embrioidleri içeren alginik asit çözeltisi boşaltılmıştır. Yaklaşık 25-30 dakika içerisinde oluşan sentetik tohum tanecikleri steril distile su ile yıkandıktan sonra kabin içinde yaklaşık 5 dakika boyunca filtre kağıdı üzerinde nemlerinden arındırılması için bırakılmıştır. Neminden arındırılan sentetik tohumlar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.9. İncelenen Özellikler

3.2.9.1. Kallus İndüksiyon Oranı (%)

Kültür başlangıcından 10 hafta sonra farklı hormon kombinasyonları içeren ortamlarda oluşan kallusların oluşum yüzdeleri tespit edilmiştir. Sap ve yaprak eksplantı için oluşan kallus oluşum yüzdelerinin besin ortamları ile ilişkisi incelenmiştir.

3.2.9.2. Embriyonik Kallus İndüksiyon Oranı (%)

Oluşan kallusların renklerine ve yapısal özelliklerine göre embriyogenik olup olmadıkları tespit edilmiş ve embriyogenik kallus oluşum yüzdeleri hesaplanmıştır. Eksplant çeşidine ve besin ortamı içeriğine göre değişen embriyogenik kallus oluşum yüzdelerinin mukayesesi yapılmıştır.

3.2.9.3. Suspanse Kültüre Aktarılan Kallusların İncelenmesi

Oluşturulan kalluslar 3 farklı suspanse kültür ortamına aktarılmışlardır. 10 hafta boyunca gelişimi izlenen kültürlerin somatik embriyo oluşum safhalarını teşvik edip etmedikleri incelenmiştir.

3.2.9.4. Somatik Embriyo Oluşumunun İncelenmesi

Suspanse kültürde somatik embriyo oluşturması için bekletilen kalluslar kültür sonunda steril kabinde stereo-mikroskop altında incelenmişlerdir. Sayılabilecek nitelikte somatik embriyolar gözlenmiş, alginik asit ve kalsiyum klorit ile kaplamak için uygun koşullarda olup olmadığı incelenmiştir.

3.2.9.5. Somatik Embriyo Sayısı (somatik embriyo / g kallus)

Sıvı kültüre aktarılırken ağırlıkları saptanan kalluslar, sıvı kültür sonrasında embriyo büyütme ortamlarına aktarılmış ve bu ortamdaki kültür süresi sonunda torpedo ya da kotiledon fazındaki embriyo sayıları belirlenmiştir. Sıvı kültüre aktarılan kallus miktarı dikkate alınarak somatik embriyo/gram kallus olarak tespit edilmiştir.

3.2.10. Araştırmada Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırmada elde edilen verilere tesadüf parselleri deneme desenine uygun olarak SPSS istatistik programından yararlanılarak varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonucu önemli görülen eksplant çeşidi ve farklı hormon kombinasyonlarının sonuçları LSD testine göre değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kallus İndüksiyonu

Kallus teşviki için kültüre alınan eksplantlarda 10 hafta boyunca kallus oluşumu gözlenmiştir. Yapılan gözlemlerde 10. haftaya kadar kallus miktarında artış gözlenmiş, ilk kallus oluşumu ise 2. hafta içinde tespit edilmiştir. Oluşan embriyogenik olan ve olmayan kalluslar birbirinden renk ve yapı itibarıyla ayrılmaktadır. Başlangıçta krem ve bej renkli olan kallusların embriyogenik kalluslar olduğu, açık yeşil ve sarı renkli kallusların ise embriyogenik kallus olmadığı gözlenmiştir. Başlangıçta krem-bej tonlarında olan embriyogenik kallusların renkleri, zaman içinde kahverengi tonlarına doğru değişim göstermiştir. Embriyogenik olmayan kallusların renginde ise değişim gözlenmemiştir. Yapısal olarak embriyogenik kallusların daha sulu, yumuşak ve birbirinden kolayca ayrılabilen yapıda olduğu gözlenirken embriyogenik olmayan kallusların ise daha kompakt ve sert yapıda olduğu tespit edilmiştir. Fiuk and Rybczyński (2008), *G. cruciata* L. bitkisinin yaprak eksplantlarından yaptıkları çalışmada embriyogenik olan kallusların bej-kahverengi tonlarında olduğunu bildirmişler, açık yeşil-sarı tonlarında oluşan kallusların ise embriyogenik olmadığını bildirmişlerdir. Bu durum, yaptığımız çalışmada ulaştığımız gözlem parametreleri ile birebir paralellik göstermektedir. Ancak, Nolan et al., (1989), tarafından yoncada yapılan bir çalışmada ise yeşil-sarı renkli kallusların daha gevşek yapıda ve embriyogenik kallus olduğu sonucu bildirilmiştir. Bu farklılık, bitkiler arasında değişen genotipik farklılıklardan kaynaklanabilir.

Kültür başlangıcından itibaren geçen 10 haftalık süre içinde kallus oluşumu tamamlanmıştır. Kallusların oluşum yüzdeleri sap ve yaprak eksplantına göre hesaplanmış ve oluşan kallusların embriyogenik olma yüzdesi ile embriyogenik olamama yüzdesi hesaplanmıştır

4.1.1. Kallus İndüksiyon Oranı (%)

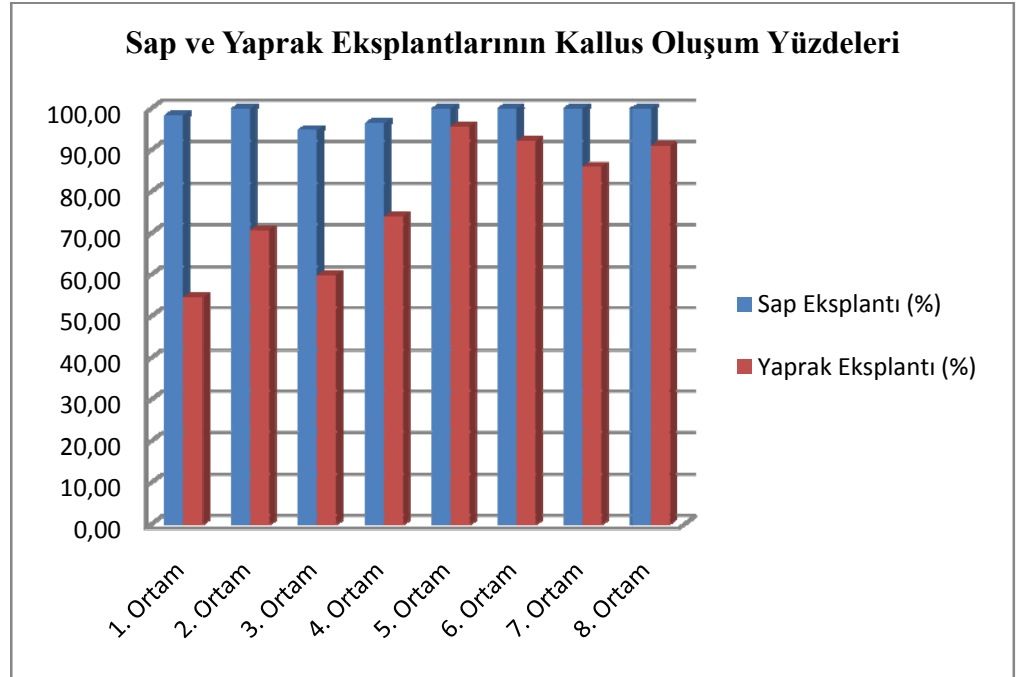
Farklı hormon kombinasyonları içeren besin ortamlarında kültüre alınan *G. cruciata* L. bitkisinin sap ve yaprak eksplantlarının kallus indüksiyon oranlarına

uygulanen varyans analizi sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Kallus oluşturan eksplantların yüzdesi ve embriyogenik olan kallusların yüzdesi de hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1: Sap ve yaprak eksplantlarının farklı besin ortamlarındaki kallus indüksiyon oranına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Besin Ortamı	7	519.578	35.845*
Eksplant	1	5472.348	377.528*
Besin Ortamı * Eksplant	7	376.885	26.001*
Hata	32	14.495	
Genel	48	CV= % 4.32	

* $p \leq 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak önemli



Şekil 4.1: Sap ve yaprak eksplantlarının 8 farklı kallus ortamında oluşturdukları kallus oluşum yüzdeleri

Çalışmada *Gentiana cruciata* L. bitkisine ait sap ve yaprak eksplantları kullanılmıştır. Eksplantların aktarıldığı besin ortamında ise 2,4-D ile Kinetin' den oluşan farklı hormon konsantrasyonlarındaki 8 ayrı ortam kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2' de verilmiştir. Sap eksplantında % 94.8 ile % 100 arasında kallus oluşum oranı gözlenirken, bu oran yaprak eksplantında % 49.04 ile % 93.50 arasında tespit edilmiştir. Eksplant başına oluşan kallus yüzdelерinden yola çıkarak, sap eksplantının yaprak eksplantına göre daha iyi bir eksplant kaynağı olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Besin ortamlarının içeriğinin kallus oluşumuna etkisi incelendiğinde ise, sap eksplantı için tüm ortamların kallus oluşum ortalamasının % 97.75 olduğu belirlenmiştir. Sonuçların istatistiki analizleri incelendiğinde, sap eksplantı için hormon kombinasyonları arasında önemli bir fark olmadığı, denenen tüm kombinasyonların çok yüksek oranda başarılı sonuç verdiği gözlenmiştir. Yaprak eksplantları için aynı mukayeseyi yaptığımızda ise, düşük oksin ve sitokin kombinasyonun en düşük kallus oluşum oranını ortaya çıkardığı gözlenmiştir. Besin ortamında kullanılan 2,4-D' nin oranı arttıkça kallus oluşum oranının arttığı belirlenmiştir. Yaprak eksplantı için en uygun ortamın ise, 0.5 mg/l 2,4-D ile 1 mg/l Kinetin içeren ortam olduğu tespit edilmiştir. 5. kallus ortamı olarak adlandırdığımız bu ortamın sap eksplantı için de % 100 verimlilikte kallus oluşturduğu göz önüne alınırsa kallus oluşumu için en iyi ortamın 5. kallus ortamı olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu ortam Fiuk and Rybczyński (2008)' nin *G. kurroo* bitkisinde kallus oluşturmak için kullandığı ve en iyi kallus veriminin elde edildiğini bildirdiği ortamdır. Çalışmanın başlangıcında kallus oluşumunu sağlayacak besin ortamları oluşturulurken bu literatür bilgisinden yola çıkılmıştır. Fiuk and Rybczyński (2008)' nin önerdiği bu ortam ile ortamı içeren hormonların farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Sonuç olarak literatürde belirtilen ile aynı sonuca ulaşılmış ve bu ortamı oluşturan 2,4-D ile Kinetin hormonlarının farklı kombinasyonlarının kallus verimi üzerine etkileri gözlenmiştir.

Çizelge 4.2: *G. cruciata* L. bitkisinin farklı hormon uygulamalarında oluşturduğu kallus indüksiyon oranı ortalamaları (%)

Eksplant Çeşidi	Kinetin (mg/l)	2,4-D (mg/l)	Ortam No	Ortalama (%)
Sap	0.1	0.5	1. Ortam	97.90 A
Sap	0.1	1.0	2. Ortam	100.0 A
Sap	0.5	0.5	3. Ortam	94.98 A
Sap	0.5	1.0	4. Ortam	97.20 A
Sap	1.0	0.5	5. Ortam	100.0 A
Sap	1.0	1.0	6. Ortam	100.0 A
Sap	2.0	0.5	7. Ortam	100.0 A
Sap	2.0	1.0	8. Ortam	100.0 A
Yaprak	0.1	0.5	1. Ortam	49.04 C
Yaprak	0.1	1.0	2. Ortam	76.10 B
Yaprak	0.5	0.5	3. Ortam	56.70 C
Yaprak	0.5	1.0	4. Ortam	72.20 B
Yaprak	1.0	0.5	5. Ortam	93.50 A
Yaprak	1.0	1.0	6. Ortam	92.70 A
Yaprak	2.0	0.5	7. Ortam	85.90 AB
Yaprak	2.0	1.0	8. Ortam	92.80 A

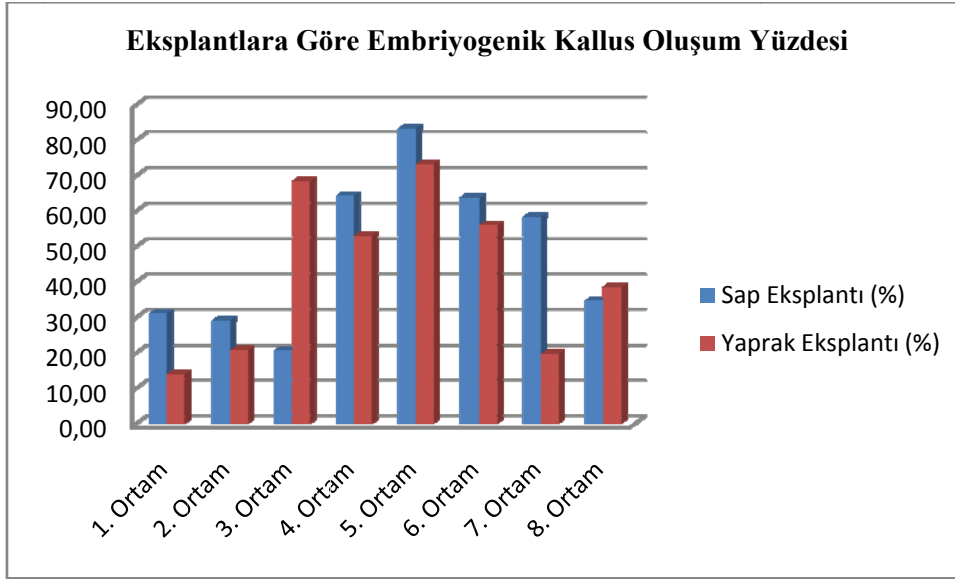
LSD değeri =14.28

Kallus indüksiyonu üzerinde 2,4-D büyüme düzenleyicisinin daha etkin olması ile ilgili bulgularımız Nolan et al., (1989), Denchev et al., (1991), Scarpa et al., (1993), Zafar et al., (1995), Li and Demarly (1996) tarafından farklı bitki türleriyle yapılan çalışmalar ile uyum göstermektedir. Ayrıca, bu sonuçları Gu (1987) and Pupilli et al., (1989) *Onobrychis sativa* 'da, Orczyk (1992)' in *Lupinus*

türlerinde, Özcan vd. (1993)' nin bezelyede, Nenz et al., (1996)' nin *Lotus angustissimus* türünde yaptıkları çalışmalar ve elde ettikleri bulgular da desteklemektedir. Bununla birlikte, Hiroshi and Zhuomeng (1993), korunga bitkisiyle yaptıkları bir doku kültürü çalışmasında, hipokotil ve kotiledon eksplantlarından kallus oluşumunda Kinetin ve NAA' nın 2,4-D' ye oranla daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Bu durum türler arasındaki genotipik farklılıktan kaynaklanmış olabilir.

4.1.2. Embriyogenik Kallus İndüksiyon Oranı (%)

Kallus oluşum yüzdesi kadar oluşan embriyogenik kallusların yüzdesi de önemlidir. İndirekt somatik embriyogenesis sürecinde embriyogenik kallusların oluşumu gereklidir. Bu nedenle, çalışmada embriyogenik kallus oluşum yüzdeleri hesaplanmıştır ve sonuçlar Şekil 4.2' de gösterilmiştir.



Şekil 4.2: Sap ve yaprak eksplantlarının embriyogenik kallus oluşum yüzdesi

Embriyogenik kallus oluşum yüzdeleri incelendiğinde, sap eksplantı için %29.07 ile % 83.15 arasında embriyogenik kallus oluştuğu gözlenmektedir. 8 farklı besin ortamında sap eksplantının oluşturduğu embriyogenik kallusların ortalaması % 48.1 olarak hesaplanmıştır. En düşük embriyogenik kallus oluşumu 3. kallus indüksiyon ortamı olan MS + 0.5 mg/l Kinetin + 0.5 2,4-D mg/l içerikli besin ortamında oluşurken, en yüksek embriyogenik kallus veren ortam bileşimi ise 5. kallus indüksiyon ortamı olan MS + 1.0 Kinetin mg/l + 0.5 mg/l 2,4-D

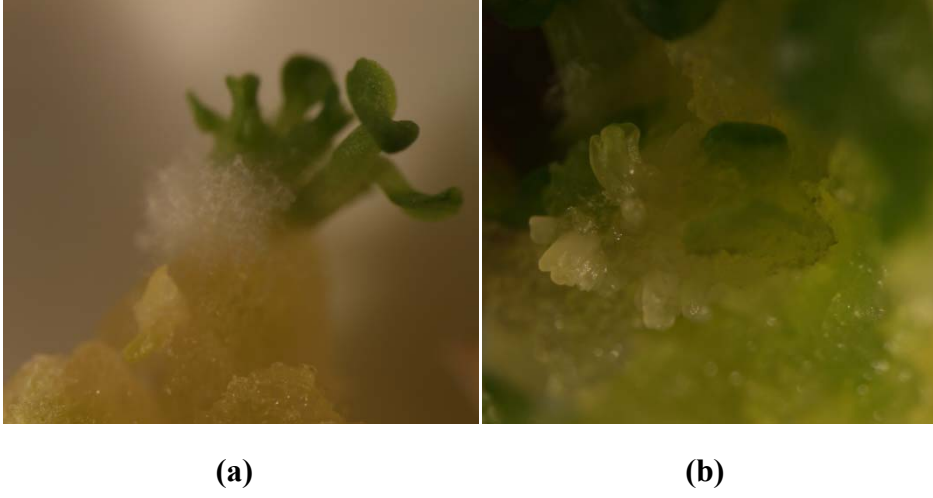
olarak belirlenmiştir. Sap eksplantı için en yüksek kallus indüksiyon ortamının embriyogenik kallus oluşumunda da en iyi ortam olması önemlidir.

Yaprak eksplantları için embriyogenik kallus oluşum yüzdesi %13.89 ile %73.33 arasında tespit edilmiştir. Tüm yaprak eksplantları için embriyogenik kallus oluşum ortalaması ise % 43 olarak hesaplanmıştır. Yaprak eksplantı için en düşük embriyogenik kallus veren ortam 1. kallus indüksiyon ortamı olan MS + 0.1 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l 2,4-D olurken, en yüksek kallus oluşum yüzdesi 5. kallus indüksiyon ortamı olan MS + 1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l 2,4-D' de belirlenmiştir. İki eksplant tipi kıyaslandığında, sap eksplantının, kallus oluşumunda gözlemlendiği gibi embriyogenik kallus oluşturmak için de daha uygun bir eksplant tipi olduğu sonucu tespit edilmiştir. Her iki eksplant tipinde kallus oluşum yüzdeleri için en iyi ortam olan 5. kallus indüksiyon ortamının embriyogenik kallus oluşumu içinde en iyi ortam olarak belirlenmesi önemlidir. 5. kallus indüksiyon ortamının en yüksek kallus oluşumunu sağladığı gibi en yüksek embriyogenik kallus oluşumunu da sağlaması bundan sonra *G. cruciata* L. bitkisi ile yapılacak somatik embriyo çalışmaları için dikkate değer bir veri oluşturacaktır. Çalışmamızda farklı hormon kombinasyonları kıyaslandığında daha iyi bir besin ortamı içeriğinin tespit edilememiş olması da Fiuk and Rybczyński (2008)' nin *Gentiana kurroo*' da yaptığı çalışma ile birebir paralellik göstermektedir.

Thorpe (1980), herhangi bir türde farklılaşmamış dokunun oluşması için endojen (hücreye ait) oksin/sitokinin dengesinin, eksojen oksin/sitokinin dengesinden daha önemli olduğunu bildirmiş ve bazen açıklamakta zorlandığımız, istenmeyen ya da beklenmeyen *in vitro* gelişimlerin ortaya çıkabileceğini ifade etmiştir. Bu tanım, çalışmamızda kullandığımız sap ve yaprak eksplantlarının aynı genotipe sahip olmasına rağmen besin ortamlarında farklı kallus oluşum tepkileri vermesinin sebebi olarak gösterilebilir.

Kallus oluşumunu indüklemek için besin ortamlarına aktardığımız eksplantlardan kallus gelişimi sırasında her iki eksplant içinde 4, 5 ve 6 no' lu indüksiyon ortamlarında indirekt somatik embriyogenesis oluşumu ve organogenesis oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.3). Gaspar et al. (1996), doku kültürü çalışmalarında direkt somatik embriyogenesis amaçlandığında, bizim

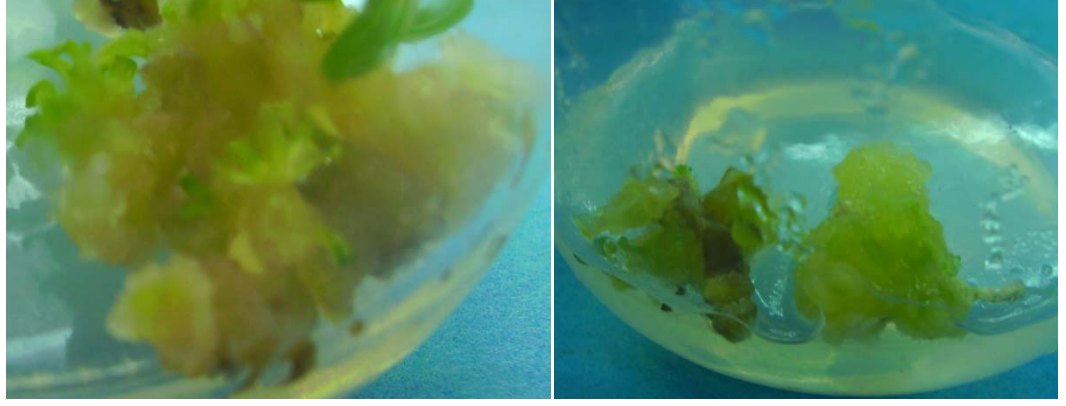
çalışmamızda da gözleendiği gibi, çoğunlukla Kinetin' in tercih edildiğini bildirmektedir.



Şekil 4.3: (a) Kallus ortamlarında oluşan indirekt organogenesis, (b) indirekt somatik embriyogenesis oluşumları

4.1.3. Suspanse Kültüre Aktarılan Kallusların İncelenmesi

Kallus indüksiyon ortamında oluşturulan kalluslar, renk ve yapılarına göre embriyogenik olan ve olmayan şeklinde ayrılmışlardır. Tüm ortamlarda oluşan her iki çeşit kallusların toplam ağırlıkları ölçülmüş, hazırlanan sıvı besin ortamlarını içeren farklı hacimdeki erlenlere aktarılmışlardır. Embriyogenik olmayan kallusların da suspanse ortama aktarılmasının sebebi embriyogenik kalluslarla mukayese edilebilmesine olanak sağlamak ve embriyogenik olma bakımından doğru ayrımın yapıldığına emin olmaktır. Kallus indüksiyon ortamında oluşan kalluslar (Şekil 4.4) sıvı ortamlara aktarılmıştır.

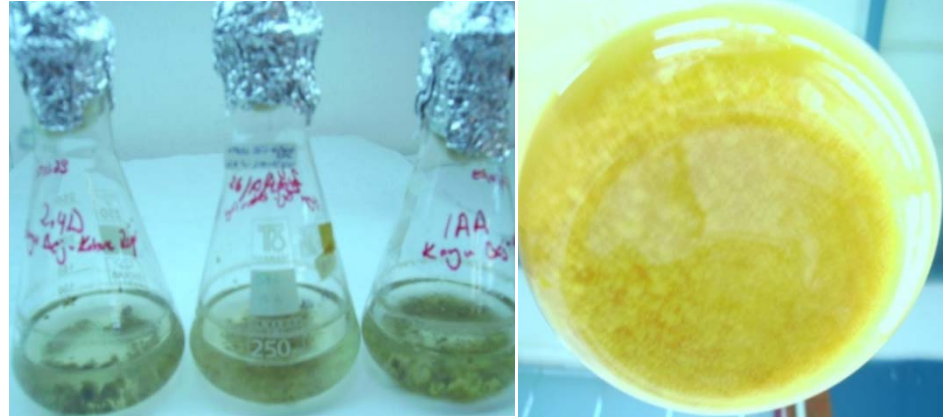


(a)

(b)

Şekil 4.4: (a) Sıvı besin ortamına aktarılan embriyogenik, (b) embriyogenik olmayan kalluslar

10 hafta boyunca sıvı ortam içinde gelişen kallusların gözlemleri yapılmış embriyoid oluşumu incelenmiştir. Bu süre sonunda oluşan embriyoidlerin bir kısmı gelişmesi için embriyo büyütme ortamlarına aktarılmış, diğer kısmı ise embriyo büyütme ortamına aktarılmadan steril kabin içinde gözlem ve sayım yapmak için incelemeye alınmıştır (Şekil 4.5).

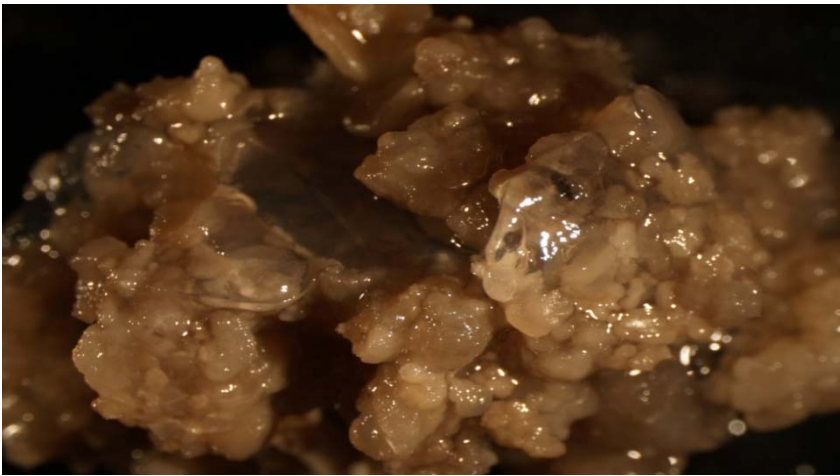


Şekil 4.5: Sıvı besin ortamında gelişen kalluslar

4.1.4. Somatik Embriyo Oluşumunun İncelenmesi

Sıvı besin ortamında 10 hafta boyunca gelişimi gözlenen embriyoid içeren kalluslar daha sonra sıvı ortamdan alınmış ve bir kısmı embriyo büyütme ortamlarına aktarılmıştır. Diğer kısmı ise gelişimleri incelenmek üzere steril kabin içinde stereo-mikroskop altında gözlenmiştir. Embriyoid içeren kallusların

embriyo büyütme ortamlarına aktarılmasındaki amaç, sentetik tohum için uygun kalitede ve sayılabilen embriyoid oluşturmaya temin etmektir. Embriyo büyütme ortamına aktarılmayan embriyogenik kalluslar ve başlangıçta embriyogenik olmayan kalluslar stero-mikroskop altında incelenmişlerdir. Embriyo büyütme ortamına aktarılmayan embriyogenik kalluslarda pro-embriyogenik ve globular safhada embriyoların olduğu, embriyo oluşumunun henüz başlangıç safhasında kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.6). Bu nedenle suspanse ortamdan çıkan ve embriyo geliştirme ortamına aktarılmayan embriyogenik kallusların, istenilen olgun embriyoidleri oluşturma safhasına gelemediği, sentetik tohum oluşturmak için ve embriyo sayısını tespit edebilmek için uygun durumda olmadığı sonucuna varılmıştır. Fiuk and Rybczyński (2008)'nin *G. cruciata* L. bitkisi ile yaptığı çalışmada kullandığı MS + 1 mg/l Dicamba + 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BA + 80.0 mg/l Adenin Sülfat içeren besin ortamında embriyo büyütme ortamına aktarım yapılmadan da torpedo seviyesinde embriyoid oluşumu gözlemlendiği bildirilmiş, ancak embriyo büyütme ortamına aktarıldıktan sonra embriyo gelişiminin ve kotiledon safhasında oluşan embriyoid sayısının arttığı vurgulanmıştır. Yaptığımız çalışmada sıvı ortamda oluşma aşamasına gelen embriyoidlerin henüz başlangıç safhasında olması, literatürde aktarılan ortamdaki oksinin çeşidinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ticari anlamda yüksek maliyet içeren Dicamba oksininin yerine kullanılan 2,4-D ve IAA oksinlerinin suspanse ortamda gelişmiş fazda embriyoid oluşturmak için yeterli indüklemeyi yapamadığı, suspanse ortamdan sonra embriyo büyütme ortamına ihtiyaç duyulduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.6: Suspanse ortamda oluşan pro-embriyogenik yapıdaki kalluslar

Embriyogenik olmayan kallusların aktarıldığı suspanse ortamda ise 10 hafta sonunda herhangi bir embriyoid başlangıcının gözlenmediği tespit edilmiştir.

4.1.5. Somatik Embriyo Sayısının (somatik embriyo/g kallus) İncelenmesi

Sayım yapılabilecek yapıya ulaşması ve sentetik tohum için uygun safhaya gelmesi için sıvı besin ortamından çıkartılan embriyoidler, embriyo büyütme ortamına aktarılmıştır. Embriyo büyütme ortamına aktarılan embriyoidler yaklaşık 8 hafta boyunca ortamda bırakılmıştır. Her bir embriyo büyütme ortamına 1 gr embriyoid içeren kalluslar aktarılmıştır. Daha sonra steril kabin içinde petrilere aktararak sayımı yapılan embriyoidlerin gram kallus başına düşen ortalama sayılarının gözlemleri yapılmıştır (Çizelge 4.3).

3 Farklı sıvı besin ortamında yetiştirilen başlangıç safhasındaki embriyoidlerin, embriyo büyütme ortamına aktarıldıklarında sentetik tohum oluşturabilmek için istenilen yapıda ve sayılabilir özellikte embriyoid oluşturması beklenmektedir. Ancak sadece IAA içeren suspanse ortam 3’de istenilen seviyede embriyoid oluşumu gözlenmiş ve sayımı yapılabilmektedir.

Çizelge 4.3: Embriyo büyütme ortamında (E.B.O) gelişimi gözlenen embriyoidlerin sayısı

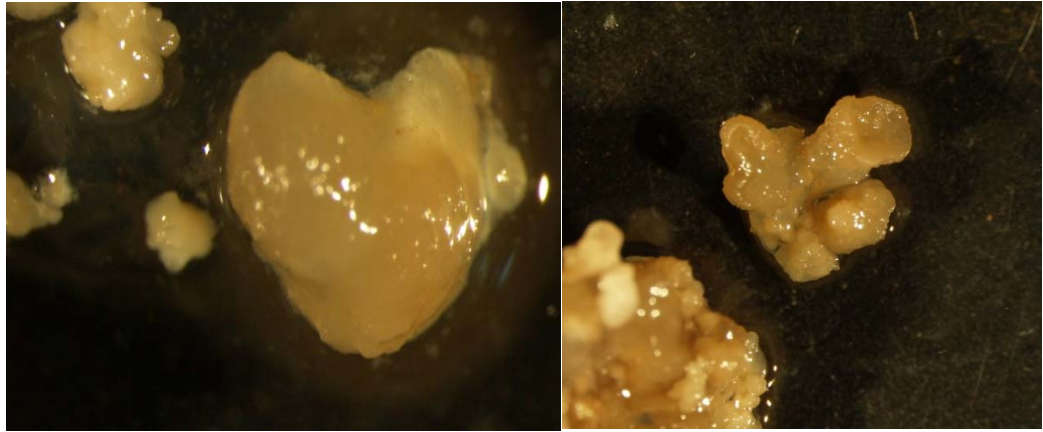
Ortam No.	Ortam İçeriği	Somatik Embriyo Sayısı (somatik embriyo/gr kallus)
Embriyo Büyütme Ortamı 1	Hormonsuz MS	181
Embriyo Büyütme Ortamı 2	MS + 0.1 mg/l IAA + 0.1 mg/l Kinetin	250
Embriyo Büyütme Ortamı 3	MS + 0.1 mg/l IAA + 0.5 mg/l Kinetin	213
Embriyo Büyütme Ortamı 4	MS + 0.1 mg/l IAA + 1.0 mg/l Kinetin	200
Embriyo Büyütme Ortamı 5	MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l Kinetin	144
Embriyo Büyütme Ortamı 6	MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kinetin	131
Embriyo Büyütme Ortamı 7	MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l Kinetin	133

Oluşan somatik embriyoların gram kallus başına oranları incelendiğinde 131 ile 250 arasında oldukça yüksek bir verimlilik gözlenmiştir. Süle (2005), yonca (*Medicago sativa* L.) bitkisinde yaptığı somatik embriyo çalışmasında embriyo büyütme ortamına aktarıldıktan sonra gelişen embriyoların sayısının gram kallus başına 9 ile 26 arasında değiştiğini bildirmiştir. Nolan et al., (1989)' ın ve Denchev et al. (1993)' in yaptıkları çalışmalardan elde ettikleri bulgular da Süle (2005)' nin bulgularına benzer niteliktedir. Yaptığımız çalışmada önceki çalışmalara oranla daha yüksek oranda gram kallus başına somatik embriyo sayısına ulaşılmasının sebebinin türler arasında genotipik farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, suspanse kültürde oluşmaya başlanan embriyoidlerin embriyo büyütme ortamlarında doğru hormon kompozisyonları ile indüklenmesi de önemlidir. Mikula et al., (2005), *G. cruciata* L. bitkisinde yaptığı çalışmada somatik embriyo oluşumu için hazırlanan GA₃ ve Kinetin içeren embriyo büyütme ortamlarının embriyo oluşumuna olumlu katkı yaptığını bildirmişlerdir. Ayrıca, oluşum evresinde olan embriyoidlerin gelişimini devam ettirebilmek, hızlandırmak ve yüksek verim sağlamak amacıyla embriyo büyütme ortamına aktarılmasının önemli olduğunu vurgulanmıştır. Bu durum çalışmamızda embriyo büyütme ortamına aktarılmadan gelişmiş safhada embriyo oluşmaması durumunu açıklar niteliktedir.

Embriyoidlerin sayısını embriyo büyütme ortam içeriklerine göre incelediğimizde en yüksek değerin düşük miktarda IAA ve Kinetin içeren E.B.O. 2 no' lu ortam kompozisyonunda gerçekleşmiştir. Oksin çeşidi ve miktarı serbest tutulup sitokinin miktarı arttırıldığında, oluşan embriyoid sayısının azaldığı gözlenmiştir. IAA yerine oksin olarak 2,4-D kullanıldığında ve Kinetin' in farklı konsantrasyonları ile denendiğinde ise en yüksek somatik embriyo sayısının yine düşük miktarda 2,4-D ve Kinetin içeren E.B.O. 5 no' lu ortamda oluştuğu gözlenmiştir. Ancak 2,4-D oksini içeren ortamdaki en yüksek embriyoid sayısı IAA oksini içeren ortama göre düşük olmuş ve somatik embriyo sayısı 144 olarak tespit edilmiştir. Hormon kullanılmayan kontrol ortamında ise oluşan embriyoid sayısı 181 olarak tespit edilmiştir. Bu değer, iki farklı oksin çeşidi içeren ortamların oluşturduğu ortalama embriyoid sayısının arasındadır. Bu verilere göre, IAA oksininin *G. cruciata* L. bitkisi üzerindeki somatik embriyo oluşturma potansiyelinin 2,4-D ye göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. 2,4-D

hormonu içeren besin ortamlarındaki embriyoid sayısı, kontrol ortamlarında oluşan embriyoid sayısından daha düşük kalmıştır. Nolan et al., (1989), IAA yerine 2,4-D kullanıldığı zaman somatik embriyo sayısında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum bizim bulgularımızı açıklar niteliktedir.

Çalışmamızda embriyo büyütme ortamına aktarıldıktan sonra oluşan embriyoidlerin genel olarak kalp ve torpedo fazında oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.7). Kotiledon fazında embriyoid sayısı diğerlerine oranla son derece azdır. Bu sebeple embriyo oluşumunun daha ileri fazda oluşmasını sağlamak için embriyo büyütme ortamında kalma süresinin arttırılması veya ortam içeriğinde bulunan hormon çeşitlerinin ve kombinasyonlarının değiştirilmesi önerilebilir. Mikula and Rybczyfiski (2001), *G. cruciata* L. bitkisinde yaptıkları çalışmada suspanse kültürde oluşan başlangıç safhasındaki embriyoidleri GA₃ ve Kinetin içeren embriyo büyütme ortamlarına aktarmışlar ve 6 hafta sonunda yüksek miktarda kotiledon safhasında embriyoid oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucu ile yaptığımız çalışmanın sonucunu mukayese edilirse embriyo büyüme ortamlarını oluşturan hormon çeşitlerinin önemli olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.



(a)

(b)

Şekil 4.7: (a) Embriyo büyütme ortamında oluşan kalp, (b) torpedo fazındaki embriyolar

4.1.6. Sentetik Tohum Elde Edilmesi

Yaptığımız çalışma sonucunda oluşan embriyoidler kaplanmak için hazır hale getirilmiştir. Embriyoidler, sayımı yapıldıktan sonra ayrılarak hazırlanan %2'lik (w/v) alginik asit çözeltisi içine ilave edilmiştir. Viskoz haldeki

bu çözelti karıştırılarak embriyoidlerin bir araya toplanmaması, çözelti içinde homojen dağılması amaçlanmıştır. Bu arada %2 (w/v) oranında CaCl_2 içeren ve otoklavlanıp steril olarak hazır bekleyen çözelti, bir kaba boşaltılarak manyetik karıştırıcı üzerine bırakılmıştır. Manyetik karıştırıcıda karışmakta olan CaCl_2 çözeltisi içerisine embriyoların bulunduğu alginik asit çözeltisi pipet yardımıyla boşaltılmıştır. Bu şekilde, yaklaşık 30 dakika içerisinde sentetik tohum oluşumu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Somatik Embriyoların Kaplanması ile Elde Edilen Sentetik Tohumlar

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

G. cruciata L. bitkisinden *in vitro* koşullar altında sentetik tohum elde edilmesi amacıyla yürütülen bu çalışmada başlangıç materyali olarak bitkinin 7 no' lu klonu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan materyal, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Bitki Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülen 1060111 no' lu TÜBİTAK projesinden temin edilmiştir.

Çoğaltımının yapılması amacıyla 7 no' lu klona ait bitkiler, 0.5mg/l BAP içeren MS besin ortamına aktarılmıştır. 8 Hafta sonunda çalışmaya başlamak için gerekli sayıya ve uygunluğa sahip bitki temini sağlanmıştır. Gelişimi sağlanan bitkilerin sap ve yaprak eksplantları 8 farklı kallus indüksiyon ortamına aktarılmıştır. Araştırma sonuçları incelendiğinde tüm besin ortamı kombinasyonlarında farklı oranlarda kallus indüksiyonu gerçekleşmiştir.

Araştırma sonucu kallus indüksiyon oranı sap eksplantı için % 94.98 ile % 100 arasında, yaprak eksplantı için ise % 40.04 ile % 93.50 arasında gerçekleşmiştir. Sap eksplantı için büyüme düzenleyicilerinin çok fazla etkisi gözlenmezken, yaprak eksplantı için ortama eklenen 2,4-D miktarı arttıkça kallus indüksiyon oranının arttığı gözlenmiştir. Embriyogenik kallus oluşum yüzdeleri incelendiğinde ise sap eksplantı için oluşum oranı % 29.07 ile % 83.15 arasında değişirken, yaprak eksplantı için bu oran % 13.89 ile % 73.33 arasında gözlenmiştir. Kallus indüksiyonu ve embriyogenik kallus oluşum yüzdelerini kıyasladığımızda, sap eksplantının yaprak eksplantından daha iyi bir eksplant kaynağı olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Kallus indüksiyonu için yapılan çalışmalarda en iyi ortamın her iki eksplant kaynağı içinde 5 numaralı kallus indüksiyon ortamı olduğu gözlenmiştir.

Elde edilen kalluslar embriyogenik olanlar ve olmayanlar olarak iki guruba ayrılmış ve hazırlanan sıvı besin ortamlarına aktarılmışlardır. 10 hafta boyunca kültürde kalan kalluslar kültür ortamından çıkarıldığında istenen seviyede somatik embriyo oluşturamadığı gözlenmiştir. Bu amaçla, embriyo büyütme ortamına aktarılan kalluslardan sadece IAA oksini içeren sıvı ortamda yetişmiş olanlar embriyo büyütme ortamında istenilen gelişimi göstermişlerdir.

Embriyo büyütme ortamında gelişme gösteren embriyoidler sayımı yapılarak gram kallus başına oluşturdukları somatik embriyo miktarı tespit edilmiştir. En yüksek somatik embriyo oluşumuna yardım eden büyütme ortamının düşük miktarda IAA ve Kinetin içeren ortam olduğu gözlenmiştir. Bu ortamda oluşan embriyoid sayısı gram kallus başına 250 adet olarak belirlenmiştir. IAA yerine kullanılan 2,4-D oksininde ise ortamlarda oluşan embriyoid sayısında azalma olmuştur ve embriyoid sayısı en fazla 144 adet olarak bulunmuştur. 2,4-D oksini içeren ortamlardaki embriyoid sayısının hormonsuz kontrol ortamında oluşan embriyoid sayısından daha az olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple, embriyo büyütme ortamında 2,4-D' nin kullanılmasının embriyoid sayısının artmasına olumlu katkıda bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Ortamlarda bulunan Kinetin miktarının artması da embriyoid sayısına olumlu bir etki yapmamıştır.

Elde edilen farklı dönemlerdeki somatik embriyolar alginik asit ile kaplanmak suretiyle tekrar doku kültürü aracılığı ile rejenere edilmelerine gerek kalmadan, direkt toprağa ekilebilecek ve tohum olarak kullanılabilir hale getirilmişlerdir.

Yürüttüğümüz araştırma, *G. cruciata* L. bitkisinin *in vitro* koşullarda yüksek verimlilikte ve istenilen kalitede üretimini temin eden sonuçlar içermektedir. Zira farklı aşamalar sonunda sadece 1 g kallustan 250 adet somatik embriyo elde edilebilmektedir. Dolayısıyla bu 250 tane somatik embriyo, mutasyon ile farklılaşanlar dışında donör bitki ile aynı genetik yapıya sahip birey demektir. Daha sonra, alginik asit ile kaplanarak tohum benzeri yapı oluşturulabilmekte ve saklanarak kullanıma hazır halde korunabilmektedir. Bu metot; ıslahı çalışmalarında, seçilmiş bireylerin hızlı çoğaltımında, yüksek kalite ve miktarda birey oluşturmada ve tohum teknolojisini geliştirme anlamında bize büyük avantajlar sunmaktadır.

Çalışmada kullandığımız büyüme düzenleyicilerinin farklı dozları ve farklı besin ortamları ile devam ettirilmesi önerilebilir. Aynı zamanda, farklı oksin-sitokinin veya oksin-oksin kombinasyonlarının denenmesi elde edilebilecek somatik embriyo sayı ve kalitesi üzerinde etkili bir uygulama olabilir.

Büyüme düzenleyicilerinin yanı sıra ortamın diğer bileşenleri (özellikle de karbonhidrat kaynakları, aminoasitler ve vitaminler) ve farklı kaplama materyalleri üzerinde de araştırmalar yapılarak daha etkili bir sentetik tohum üretim prosedürü geliştirilebilir.

Araştırma sonucunda, IAA büyüme düzenleyicisinin somatik embriyo oluşturma açısından daha etkili olduğu gözlenmiştir. Ancak, sıvı besin ortamında somatik embriyoların istenilen fazda oluşmadıkları, embriyo büyütme ortamında bu somatik embriyoların gelişimleri desteklendikten sonra kalp ve torpedo fazında embriyoların oluştukları gözlenmiştir. Somatik embriyoların kotiledon safhasında daha yüksek oranda oluşması için farklı oksin çeşitlerinin kullanılması önerilebilir. Daha spesifik ve pahalı olan Picloram ve Dicamba gibi oksinlerin bu tip çalışmalarda tercih edilmesi istenilen bu özelliklerin kazanılması açısından önemli olabilir. Çalışmanın amacı ve ticari niteliğine göre kullanılacak oksin çeşidinin belirlenmesi önerilebilir.

Araştırmada yaprak ve sap eksplantları kullanılmıştır. Ancak bitkilerin farklı vejetatif aksamalarında içsel hormon seviyesine bağlı olarak reaksiyon yüzdelerinde artışlar olması muhtemeldir. Bu nedenle yapılacak benzer çalışmalarda bitkinin hipokotil gibi tohum taslağı gibi farklı parçacıklarının kullanılması ayrıca kullanılan eksplantların farklı boyutlarının denenmesi de tavsiye edilebilir.

Sentetik tohum elde edilmesinde alginik asit ve kalsiyum klorit çözeltilerinin konsantrasyonları üzerinde de farklı uygulamalar yapılması önerilebilir. Böylece tarla performansları açısından en uygun korunumda ve çimlenmesi için gerekli olan elastikiyette tohumların elde edilmesi sağlanacaktır. Ayrıca çalışmamızda oluşan sentetik tohum taneciklerinin içinde birden fazla embriyo bulunduğu gözlenmiştir. Bu sorunun aşılması için hücre enkapsülasyonun da kullanılan, her bir hücreyi tek bir alginik asit boncuğunun içine hapsedebilen otomatik düzeneklerin benzerlerinin optimizasyonu yapılarak kullanılabilmesi önerilebilir.

Sentetik tohum eldesin de kullanılan alginik asit ve kalsiyum klorit en yoğun olarak kullanılan kaplama materyalidir. Alternatif olarak farklı hidrojeller veya kitozan gibi daha farklı yapıdaki kaplama materyallerinin kullanılması önerilebilir. Bu tarz farklı yapıdaki kaplama materyallerinin kullanılması bu çalışmaların geçmişi açısından bir öncüllük teşkil edecek ve farklı verim-kalite bulguları oluşturulacaktır

Oluşturulacak sentetik tohumların +4 °C derecede ne uzunlukta saklanabileceği ve veriminin nasıl etkileneceği konusunda ayrı bir çalışma düzeneği kurulmasını da önerilebilir. Direkt toprak üzerine aktarılarak çimlendirilen ve besin ortamı aracılığı ile çimlendirilen sentetik tohumların mukayesesinin yapılması da önerilebilir. Böylece ticari anlamda önem arz eden sentetik tohumlar oluşturulduktan sonraki muhafaza aşamasındaki gözlemleri yapılacak ve önemli verilere ulaşılabilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ando, H., Hirai Yasuaki, Fujii, M., Hori, Y., Fukumura, M., Niiho, Y., Nakajima, Y., Shibata, T., Toriizuka, K., Ida, Y.,** 2007, The Chemical Constituents of Fresh Gentian Root, J. Nat Med, 269-279.
- Ara, H. Jaiswal, U. and Jaiswal, V.S.** 1999, Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (*Mangifera indica* L.) Plant Cell Reports, 19 (2); 166-170.
- Baytop, T.,** 1963, Türkiyenin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri, Sayfa: 317-318, İstanbul Üniversitesi Yayınları.
- Bronsema, F.B.F., Van Oostveen, W.J.F., Van Lammaren, A.A.M.,** 1997, Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines A118 and A632. Plant CellTissue and Organ Culture, 50: 47-65.
- Castillo, B., Smith, M. A. L. , Yadava U.L.,** 1998, Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. Plant Cell Reports, 17: 172–176
- Cangahuala-Inocente G.C., Dal Vesco L.L., Steinmacher D., Torres A.C., Guerra M.P.,** 2007, Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. Scientia Horticulturae 111 (2007) 228–234.
- Chawla, H.S.,** 2002, Introduction to Plant Biotechnology Science Publishers Inc., Enfield, NH, USA
- De Jong, A.J., Schimidt, E., De Vries S.** (1993) Early events in higher plant embriyogenesis. Plant mol. Biol., 22: 129-140.
- Denchev, P., Velcheva, M. ve Atanassov, A.,** 1991, New approach to direct somatic embryogenesis in *Medicago*. Plant Cell Reports, 10: 338-341.

Emeklier, Y., Özcan, S., Avcı-Birsin, M., Mirici, S. ve Uranbey, S., 1999, Mısırdada *In Vitro* Somatik Embriyogenesis Üzerinde Araştırmalar. A.Ü. Araştırma Fonu Projesi, Ankara.

Fiuk, A., Rybczyn'ski, J.J, 2008, Factors influencing efficiency of somatic embryogenesis of *Gentiana kurroo* (Royle) cell suspension, *Plant Biotechnol Rep.*, 2: 33–39.

Fiuk, A., Rybczyn'ski, J.J, 2008, Genotype and plant growth regulator-dependent response of somatic embryogenesis from *Gentiana* spp. leaf explants, *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 44:90–99.

Ganapathi, T.R., Srinivas L., Suprasanna P., Bapat V.A , 2000, Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryos of Banana CV . Rasthali (Musa SPP. AAB Group), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37:178-181, March-April.

Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M. ve Thorpe, T.A., 1996, Plant hormones and growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant*, 32:272-289.

Gu, Z. 1987, Callus culture of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and plant regeneration through somatic embryogenesis. *Annals of Botany* 60 (3): 309-313.

Hartweck, L.M., Lazzeri, P.A, Cui, D., Collins, G.B., Williams, E.G, 1988, Auxin-Orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. *In Vitro Cell. Dev. Biol. .*, 24:821-828.

Hayta, Ş. 2009, Bazı Centiyane (*Gentiana spp.*) Türlerinde *Agrobacterium Rhizogenes* Aracılığı İle Transforme Saçaklı Kök Kùltürlerinin Oluşturulması Ve Sekonder Metabolit İçeriklerinin Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakùltesi, 144 sayfa.

Hiroshi, N. ve Zhuomeng, Y., 1993, Tissue Culture of Sainfoin. *Proceedings of The XVII International Grassland Congress*, 1044-1045.

Ipekçi, Z., Gözükmızı, N., 2003, Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*, *Plant Cell Rep*, 22:16–24.

Janeiro V.L., Ballester A., Vieitez A.M., 1997, In vitro response of encapsulated somatic embryos of camellia, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 119–125.

Khor, E., Loh, C.S., 2005, Artificial seeds, Applications of Cell Immobilization Biotechnology, (Eds) Nedovic V., Willaert, R., Springer, The Netherlands, 527–537.

Lai, F.M., McKersie, B.D., 1994, Regulation of starch and protein accumulation in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Plant Science*, 100: 211–219.

Li, X.Q. and Demarly, Y., 1996, Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Medicago suffruticosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44(1): 79–81.

Maes, O.C., Chibbar, R.N., Caswell, K., Leung, N., Kartha, K.K., 1996, Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat: Effects of physical, physiological and genetic factors. *Plant Sci.*, 121: 75–84

Mamiya, K., Sakamoto, Y., 2001, A method to produce encapsulatable units for synthetic seeds in *Asparagus officinalis*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 27–32.

Mikula A. and Rybczyfiski J.J., 2001, Somatic embryogenesis of gentiana genes I. The effect of preculture treatment and primary exsplant origin on somatic embryogenesis of *Gentiana cruciata* L., *G. pannonica* (Scop) and *G.tibetica* (King). *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol:23, No:1, 15–25.

Mikula, A., Rybczynski, J.J., Skierski, J., Latkowska, M.J., Fiuk, A., 2005, Somatic embryogenesis of *Gentiana* genus IV. characterization of *Gentiana cruciata* and *Gentiana tibetica* embryogenic cell suspensions, *Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation*, 345–358.

Momcilović, I., Grubisic, D., Neskovic, M., 1997, Micropropagation of four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* and *G. acaulis*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49: 141–144.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 56: 473-497.

Nenz, E., Pupilli, F., Damiani, F., Cenci, C.A. ve Arcioni, S., 1996, Plant regeneration and genetic transformation of *Lotus angustissimus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45: 145-152

Nolan, K.E., Rose, R.J. ve Gorts, J.R., 1989, Regeneration of *Medicago trunculata* from tissue culture: Increased somatic embryogenesis using explants from regenerated plants. *Plant Cell Reports*, 8: 278-281.

Orczyk, A.N., 1992, Somatic embryogenesis of agriculturally important Lupin species (*Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. mutabilis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28: 19-25.

Ozawa, K., Komamine, A., 1989, Establishment of a system of high frequency embryogenesis from long-term suspensions cultures of Rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 77: 205-211

Özcan, S., Barghchi, M., Firek, S. ve Draper, J., 1993, Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embryogenesis in Pea. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 34:271-277.

Parrot, W.A, Merkle, S.A., Williams, E.G., 1993, Somatic embryogenesis: Potential for use in propagation and gene transfer systems. In: Murray, D.R. (ed), *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, pp. 158-200, C.A.B International, UK.

Pupilli, F. D.Amiani, F., Pezzotti, M. ve Arcioni, S. 1989, Plant regeneration from callus protoplasts of *Onobrychis viciifolia* scop (Sainfoin). *Plant Science (Limerick)* 63 (1): 87-94.

Sand, C., Pop, M. R., Bobiț, D., Barbu, C. H., Lazurcă, D., 2008, Active Substances in Some *Gentiana lutea* L. Genotypes, *Proceedings., 43rd Croatian and 3rd International Symposium on Agriculture. Opatija. Croatia*, 508- 510.

Scarpa, G. M., Pupilli, F., Damiani, F. ve Arcioni, S., 1993, Plant regeneration from callus and protoplasts in *Medicago polymorpha*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 35: 49-57.

Soneji, J.R., Rao, P.S., Mhatre, M., 2002, Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.), Plant Cell Rep., 20:891–894.

Sökmen, A, Gürel, E., 2001, Sekonder Metabolit Üretimi, Ed.: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., *Bitki Biyoteknolojisi I., Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi, Konya, 211-261.

Süle, R., 2005, Farklı Oksin Çeşitlerinin Yonca (*Medicago sativa* L.)’ da Somatik Embriyo Oluşumuna Etkisi Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi (yayımlanmamış).

Thomas, M.B., 2003, Final Report for Kosovo Business Support Scope of Work Consultant Herbs Identification Specialist (KOS024), Centre for International Ethnomedicinal Education and Research.

Thorpe, T. A., 1980. Organogenesis in vitro: Structural, physiological and biochemical aspects. In: Vasil IK(ed), Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture, Int. Rev. Cytol. Suppl., 11A: 71-111.

Tsvetkov, I., Jouve, L., Hausman, J.F., 2006, Effect of alginate matrix composition on regrowth of *in vitro*-derived encapsulated apical microcuttings of hybrid apsen, Biologia Plantarum, 50 (4): 722-724.

Zafar, Y., Nenz, E., Damiani, F., Pupilli, F. ve Arcioni, S., 1995. Plant regeneration from explant and protoplast derived calluses of *Medicago littoralis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 41: 41-48.

Şeki 1.1. a : http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gentiana_cruciata_al.jpg

Şeki 1.1. b : <http://www.wildgingerfarm.com/images/Gentianacruciataflowers.JPG>

ÖZGEÇMİŞ

28.11.1982 İzmir doğumlu Osman TELLİ, ilk, orta ve öğrenimini İzmir’ de tamamladıktan 1996 yılında Halil Kale Fen Lisesinde eğitime başladı. 1999 yılında mezun olduktan sonra 2000 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü kazandı. 2006 yılında lisans öğrenimini tamamladı. 2007 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü’nde yüksek lisansa başladı. 2009 yılında Ahi Evran Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı ve 35. madde ile Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü’ne görevlendirildi. Halen Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir.