KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Amsonia orientalis Decne. (Apocynaceae)' DE SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE SENTETİK TOHUM ÜRETİMİ

RUHİYE KIRAN

KOCAELİ 2013

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Amsonia orientalis Decne. (Apocynaceae)'DE SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE SENTETİK TOHUM ÜRETİMİ

RUHİYE KIRAN

Prof.Dr. Fazıl ÖZEN
Danışman, Kocaeli Üniv. .....

Yrd.Doç.Dr. Özlem AKSOY
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv. .....

Doç.Dr. Yasemin ÖZDENER
Jüri Üyesi, Ondokuz Mayıs Üniv. .....

Tezin Savunulduğu Tarih: 28.06.2013

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Apocynaceae (Zakkumgiller)familyasına mensup *Amsonia orientalis* Decne. (syn. *Rhazya orientalis*) bitkisi Avrupa ve Türkiye ölçeğinde tükenme tehlikesinde olan ve CR (Çok Tehlikede) kategorisinde yer alan, aynı zamanda Avrupa Konseyi Bern Sözleşmesine göre "Florada Kesinlikle Korunması Gereken Türler" listesinde bildirilmiş bir bitkidir. Bitkinin tohumları düşük ve zor çimlenme yetenekleri ile bilinmektedirler. Bitkinin tükenme tehlikesine girmesinde bu faktörün de etkili olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma ile tohumları çimlenme güçlüğü çeken tıbbi öneme sahip tükenme tehlikesindeki bu türde in vitro koşullarda somatik embriyogenesis ve sentetik tohum üretimi gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca gerek eğitimim gerek diğer konularda her türlü desteğini esirgemeyen bölüm başkanım ve aynı zamanda danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fazıl ÖZEN'e;

Çalışmalarım esnasında bilgi ve önerileri ile yol gösteren ve her konuda destek sağlayan değerli çalışma arkadaşım Arş. Gör. Arda ACEMİ'ye;

Yüksek lisans öğrenimim ve çalışmam esnasında daima yardımlarını gördüğüm Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki değerli hocalarıma ve değerli arkadaşlarıma;

Yaşamım boyunca maddi ve manevi destekleriyle bana güç veren aileme sonsuz teşekkür ederim.

Haziran-2013 Ruhiye Kıran

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR vi
ÖZET vii
ABSTRACT viii
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 5
1.1. Bitkinin Genel Özellikleri 5
1.2. Ekonomik ve Tıbbi Önemi 7
1.3. Avrupa ve Türkiye'deki Yayılış Alanları 8
1.4. Bitki Doku Kültürü 10
1.5. Bitki Doku Kültürünün Dünü ve Bugünü 12
1.6. Nesli Tükenmekte Olan Bitkilerin Çoğaltımında Doku Kültürü 14
1.7. Somatik Embriyogenesis ve Diğer Kültür Teknikleri 15
1.8. Somatik Embriyogenesisin Kullanım Alanları 19
1.8.1. Klonal çoğaltım 19
1.8.2. Sentetik tohum üretimi 19
1.8.3. Gen aktarımı 20
1.9. Somatik Embriyogenesisi Etkileyen Faktörler 20
1.9.1. Eksplant kaynağı 20
1.9.2. Genotip 21
1.9.3. Besi ortamının içeriği 21
1.9.4. Çevre şartları 22
1.10. Somatik Embriyo Rejenerasyonu 22
1.10.1. Direkt embriyogenesis 22
1.10.2. İndirekt embriyogenesis 23
1.11. Angiospermlerde Embriyo Gelişim Evreleri 23
1.12. Apocynaceae Familyasına Ait Bitkilerde Somatik Embriyogenesis ve Sentetik Tohum Üretimi Üzerine Çalışmalar 24
2. MALZEME VE YÖNTEM 29
2.1. Bitki Materyali 29
2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar 29
2.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar 30
2.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltileri ve Hazırlanması 31
2.5. Besi Ortamı ve İçeriği 33
2.6. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Besi Ortamları 34
2.7. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu 41
2.8. Eksplant Kaynağının Belirlenmesi ve Çoğaltımı 42
2.9. Yaprak Eksplantının Alınması ve Besi Ortamına Aktarılması 43

2.10. Kültür Ortamının İklimsel Şartları 44
2.11. Yaprak Eksplantlarından Kallus İndüksiyonu 44
2.12. Yaprak Eksplantlarından Embriyogenik Kallus Elde Edilmesi 45
2.13. Elde Edilen Kalluslardan Embriyogenik Kallus Elde Edilmesi 45
2.14. Yaprak Eksplantlarında Kallus İndüksiyon Oranı (%) 45
2.15. Yaprak Eksplantlarında Kallus Ağırlığı (mg/petri) 46
2.16. Yaprak Eksplantlarında Embriyogenik Kallus Oluşum Oranı 46
2.17. Yaprak Eksplantlarından Elde Edilen Embriyogenik Kallus Ağırlığı 46
2.18. Embriyogenik Kalluslarda Somatik Embriyo Oluşumu 46
2.19. Somatik Embriyo Gelişimi 46
2.20. Somatik Embriyo Olgunlaştırma 46
2.21. Somatik Embriyo Sayısı 47
2.22. Sentetik Tohum Elde Edilmesi 47
2.23. Verilerin İstatistiksel Yönden Değerlendirilmesi 48
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 49
3.1. Elde Edilen Kallusların Ağırlık, Yapı ve Elde Edilen Somatik Embriyo Sayılarına Ait Bulgular 49
3.2. Somatik Embriyo Gelişimi 57
3.3. Somatik Embriyo Olgunlaştırma 57
3.4. Somatik Embriyo Sayısı 60
3.5. Sentetik Tohum 61
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 63
KAYNAKLAR 66
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 73
ÖZGEÇMİŞ 75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. *Amsonia orientalis*'in çiçek ve yapraklarının genel görünüşü…… 6
Şekil 1.2. *Amsonia orientalis*'in dünyadaki yayılışı……... 9
Şekil 1.3. Mikroçoğaltım metodları……..... 18
Şekil 1.4. Bir angiosperm olan *Arabidopsis*'te embriyo gelişimi……... 23
Şekil 2.1. 1,0 mg/l BAP besi ortamında çoğaltılan nodal eksplantlardan bitkicik gelişimi…….. 43
Şekil 2.2. Yaprak eksplantının besi ortamına aktarılması……... 44
Şekil 2.3. 4,0 mg/l Dicamba + 2,0 mg/l 2,4-D ortamında gelişen kallusların MS ortamına aktarımı sonucu görülen embriyogenik kallus…….. 45
Şekil 3.1. Kallus ağırlığı en fazla olan MS15 besi ortamı…….. 49
Şekil 3.2. Embriyogenik kallusların genel görünümleri……. 52
Şekil 3.3. 1,0mg/l 2,4,5-T besi ortamında görülen direkt somatik embriyogenesis oluşumları……. 53
Şekil 3.4. MS1 (Üstte solda), MS2 (Üstte sağda) ve MS3'ün (Altta) oluşturdukları kallus yapıları…….. 54
Şekil 3.5. MS5 besi ortamındaki kallus oluşumu (Solda), MS7 besi ortamındaki kallus oluşumu (Sağda)…….. 54
Şekil 3.6. MS19 besi ortamındaki kallus oluşumu (Solda), MS20 besi ortamındaki kallus oluşumu (Sağda)…….. 55
Şekil 3.7. L-Glutamin + Aktif Kömür besi ortamı (Solda), 0,5mg/l 2,4,5-T + 0,1 mg/l Pürin ribosid+Aktif Kömür besi ortamı (Sağda)…… 56
Şekil 3.8. MS26 besi ortamındaki kallus oluşumu (Solda), MS27 besi ortamındaki kallus oluşumu…… 56
Şekil 3.9. Direkt gelişen somatik embriyonun görünümü……... 57
Şekil 3.10 ABA olgunlaştırma ortamında oluşan somatik embriyoların görünümü…….. 58
Şekil 3.11 Sıvı kültürlerde somatik embriyo olgunlaştırma ortamlarının görünüşü…….. 60
Şekil 3.12 Somatik embriyoların kaplanması ile elde edilen sentetik tohumlar…….. 61
Şekil 3.13 Somatik embriyoların kaplama anındaki görüntüsü……... 62
Şekil 3.14 Çimlenme başlangıcındaki sentetik tohumdan bir görüntü…… 62

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. *A. orientalis*'ten izole edilen 6 yeni flavonoid glikozit……... 7
Tablo 1.2. *A. orientalis*'in alkoloit içeriği…… 8
Tablo 2.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler…….. 30
Tablo 2.2. MS besi ortamının içeriği…… 33
Tablo 2.3. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 1. denemede kullanılan ortam ve içerikleri……. 35
Tablo 2.4. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 2. denemede kullanılan ortam ve içerikleri……. 35
Tablo 2.5. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 3. denemede kullanılan ortam ve içerikleri……. 36
Tablo 2.6. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 4. denemede kullanılan ortam ve içerikleri…… 36
Tablo 2.7. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 5. denemede kullanılan ortam ve içerikleri……. 37
Tablo 2.8. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 6. denemede kullanılan ortam ve içerikleri……..... 37
Tablo 2.9. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 7. denemede kullanılan ortam ve içerikleri……..... 38
Tablo 2.10. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 8. denemede kullanılan ortam ve içerikleri……..... 38
Tablo 2.11. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 9. denemede kullanılan ortam ve içerikleri……. 39
Tablo 2.12. Çalışmada somatik embriyoları olgunlaştırmak için 1. denemede kullanılan ortam ve içerikleri…….. 40
Tablo 2.13. Çalışmada somatik embriyoları olgunlaştırmak için 2. denemede kullanılan ortam ve içerikleri…….. 40
Tablo 2.14. Çalışmada somatik embriyoları olgunlaştırmak için 3. denemede kullanılan ortam ve içerikleri…….. 41
Tablo 2.15. Çalışmada somatik embriyoları olgunlaştırmak için 4. denemede kullanılan ortam ve içerikleri…….. 41
Tablo 2.16. Sıvı hacmine göre otoklav süreleri……. 42
Tablo 2.17. Sentetik tohum elde edilmesinde kullanılan sodyum alginat ve kalsiyum klorit'in farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonları... 47
Tablo 3.1. Elde edilen kallusların ortalama kallus ağırlıkları, kallus yapısı, embriyogenik kallus ve somatik embriyo verileri…….. 50
Tablo 3.2. Mannitol olgunlaştırma ortamı……... 58
Tablo 3.3. Kanamisin olgunlaştırma ortamı……. 59
Tablo 3.4. ABA ve GA_3 olgunlaştırma ortamı……. 60

SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR

%	:	Yüzde
^0C	:	Santigrat Derece
µM	:	Mikromolar
cm	:	Santimetre
g	:	Gram
g/l	:	Gram/Litre
kg/cm^3	:	Kilogram/Santimetreküp
m	:	Metre
mg	:	Miligram
mg/dm^3	:	Miligram/Desimetreküp
mg/l	:	Miligram/Litre
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
mM	:	Milimolar

Kısaltmalar

2,4-D	:	2,4-Diklorofenoksi Asetik Asetik
2,4,5-T	:	2,4,5-Triklorofenoksiasetik Asit
ABA	:	Absisik Asit
B5	:	Gamborg Besi Ortamı
BAP	:	6-Benzilaminopürin
BBD	:	Bitki Büyüme Düzenleyicileri
dH2O	:	Distile Su
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
EtOH	:	Etil Alkol
GA_3	:	Giberellik Asit
HCl	:	Hidrojen Klorür
IAA	:	İndol-3-Asetik Asit
IBA	:	İndol-3-Bütirik Asit
K	:	Kinetin
MS	:	Murashige ve Skoog Besi Ortamı
NAA	:	α-Naftalenasetik Asit
NaOH	:	Sodyum Hidroksit
RAPD	:	Randomly Amplified Polimorphic DNA(Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Deoksiribonükleik Asit)
SH	:	Schenk ve Hildebrandt Besi Ortamı
WPM	:	Woody Plant Medium (Odunsu Bitki Ortamı)

Amsonia orientalis Decne. (Apocynaceae)' DE SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE SENTETİK TOHUM ÜRETİMİ

ÖZET

Bu tezde, *Amsonia orientalis* Decne. bitkisinde somatik embriyogenesis yoluyla sentetik tohum üretimi amaçlanmıştır. Deneylerde başlangıç eksplantı olarak yapraklar kullanılmıştır. Eksplantlar çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerin farklı konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamında kültüre alınmışlardır. Kallus uyarımı için en uygun ortamın 2,0 mg/l 2,4,5-T içeren ortam olduğu bulunmuştur. Embriyo büyütme ortamına aktarılan embriyogenik kalluslardan %35,29 oranında somatik embriyo oluşumu gözlenmiştir. Sıvı ortama aktarılan kallusların sadece 10 µM ABA içeren ortamda gelişip olgunlaştıkları gözlenmiştir. Embriyo büyütme ortamları arasında en yüksek verimlilik %5,5 D-Mannitol içeren ortamda gözlenmiştir. Somatik embriyolar %3 sodyum alginat (w/v) ve 100 mM kalsiyum klorit ile kaplanmıştır. Bu çalışma ile *Amsonia orientalis*'in yaprak eksplantları kullanılarak bu bitkinin sentetik tohumları ilk kez üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: 2,4,5-T, ABA, Mavi Yıldız, Sentetik Tohum, Somatik Embriyogenesis.

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND SYNTHETIC SEED PRODUCTION ON *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae)

ABSTRACT

In this thesis, it was aimed to produce synthetic seeds via somatic embryogenesis in *Amsonia orientalis* Decne. In the experiments, leaves were used as starting explants. Explants were cultured in MS medium containing various plant growth regulators at different concentrations. The medium containing 2.0 mg/l 2,4,5-T was found to be the best for callus induction. Somatic embriyo formation at 35.29% was observed from embriyogenic calli which were transferred to embryo growth medium. It was observed that the calli transferred to liquid culture were developed and matured only in liquid medium containing 10 μM ABA. The highest efficiency in embryo growth medium was observed from the medium containing 5.5% D-Mannitol. Somatic embryos were encapsulated with 3% (w/v) sodium alginate and 100 mM calcium chloride. Within this study, somatic embryogenesis using leaf explants and synthetic seed production in *A. orientalis* were achieved for the first time.

Keywords: 2,4,5-T, ABA, Blue Star, Synthetic Seed, Somatic Embryogenesis.

GİRİŞ

Bitki, hayvan veya mikroorganizmaların tamamı ya da bir parçası kullanılarak yeni bir organizma (bitki, hayvan veya mikroorganizma) elde etmek veya var olan bir organizmanın genetik yapısında arzu edilen yönde değişiklikler meydana getirmek amacı ile kullanılan yöntemlerin tamamına "biyoteknoloji" denmektedir. Biyoteknoloji, insan, hayvan ve bitki hücrelerinin fonksiyonlarınıanlamak ve değiştirmek amacıyla uygulanan çeşitli teknikleri ve işlemleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Canlıların iyileştirilmesi ya da endüstriyel kullanımına yönelik ürünler geliştirilmesini, modern teknolojinin doğa bilimlerine uygulanmasını kapsar [1]. Biyoteknolojinin uygulama alanları içinde en hızlı gelişme potansiyeline sahip olanlarının başında bitki biyoteknolojisi gelmektedir. Türkiye'de 1970'li yıllarda başlayan bitki biyoteknolojisi çalışmaları önce doku kültürleri üzerinde yoğunlaşmış, 1990'ların başında ise hücre kültürü, moleküler biyoloji ve moleküler genetik teknikleri uygulamaları başlamıştır. Bu nedenle bitki genetik mühendisliği ile birlikte bitki biyoteknolojisini oluşturan ana unsurlardan birisi bitki doku kültürüdür [2].

Bitki doku kültürü, bitki hücre ve dokularının *in vitro* koşullarda yönlendirilmesi olup, bitki biyoteknolojisinin önemli bir alanıdır. Steril koşullarda ve geliştirilmiş besiyerleri üzerinde kültüre alınmak suretiyle dokulardan, hücrelerden veya tek bir hücreden tam bir bitkiyi *in vitro* koşullarda elde etmek mümkündür [3]. Yöntemin diğer isimleri "Mikro üretim" veya "Aseptik kültür" dür [4]. Bitki doku kültürü, genetik olarak aynı ve çok sayıda bitkinin *in vitro* üretimi için kanıtlanmış bir teknolojidir [5]. Doku kültürünün bu özelliği, bitki hücrelerinin totipotensi özelliğine sahip olmaları ve büyüme ortamı ile hormonların etkisiyle yönlendirilebilir olmasından kaynaklanmaktadır. Totipotensi, bitki hücrelerine özgü olup, tek bir bitki hücresinden tüm bir bitkinin rejenerasyonunu mümkün kılar. Bu açıdan bitki hücreleri eşsizdirler [3].

Doku kültürü teknolojisinde, elit bitki çeşitleri klon olarak çoğaltılabilir, tehlike altındaki bitkiler korunabilir, meristem kültürü ile virüssüz bitkiler elde edilebilir, bitkisel gen kaynakları saklanabilir veya bitki hücre kültürlerinden sekonder metabolitler elde edilebilir. Bütün bu uygulama alanlarının yanında, doku kültürü ayrıca transgenik bitki üretimi içinde vazgeçilmez bir araçtır.

Ekonomik öneme sahip, endemik ve nesli tehlike altında olan bitkilerin korunması ve çoğaltılması için bitki doku kültürü çalışmaları önem kazanmıştır. Dünyada pek çok bilim adamı bu yolla endemik ve nesli tükenme tehlikesi altında olan bitkilerin çoğaltımı ve korunması yoluna başvurmuştur. Tehlike altındaki çok sayıda bitkinin çoğaltımında *in vitro* tekniklerin yararlı olduğu bulunmuştur [6,7].

Bütün bu veriler ışığında konu değerlendirildiğinde, doku kültürü tekniklerinin günümüzde hayli yaygın olarak kullanılan üretim ve ıslah tekniği olduğu açıkça görülmektedir. Bu tekniği özellikle endemik bitki türlerinin üretiminde ve gen kaynağı olarak korunmasında kullanmak bitki biyoteknolojisinin ana temalarından birisini oluşturmaktadır. Bitki biyoteknolojisi alanındaki önemli gelişmeler sayesinde, bugün artık ıslah çalışmaları çok daha hızlı ve başarılı olarak yürütülmekte ve bilimsel çalışmaların ticari sonuçları da alınmaya başlanmaktadır. Özellikle son yirmi, otuz yıllık dönemde temel ve uygulama kaynaklı problemlerin çözümlenmesinde, bitkilerin hızlı üretiminde, patojenlerin elenmesinde, ıslah programlarında, somaklonal varyasyon ve somatik melezleme çalışmalarında bu yöntem büyük ölçüde kullanılmaktadır. Ticari yönden büyük önem taşıyan doğal bitkisel kaynakların değerlendirilmesinde, tarımsal ürünlerin çeşitlendirilmesi ve geliştirilmesinde de bu yöntem kullanılmaktadır. Ayrıca koruma biyolojisinde bitki doku kültürü, son derece küçük populasyonları olan bitki türlerinin çoğaltımı yoluyla biyolojik çeşitliliği korumak için, sınırlı üreme kabiliyetleri olan türler için ve bunların geri kazanımı ile yeniden doğal habitatlarına tanıtılması için kullanılır [8].

Biyoteknolojik yöntemler; arzu edilen genotiplerin çok kısa sürede çoğaltılmalarına, klasik yöntemlerle başarılamayan cinsler ve türler arası melezlerin elde edilmesine, cinsler ve türler arası gen transferine, çok kısa sürede homozigot hatların elde edilmesine ve karakterleri kontrol eden genlerinorganizmadan izole edilerek diğer bir

organizmaya aktarılmasına olanak sağlayarak bitki ıslahında ıslah sürecinin kısaltılmasına katkıda bulunabilmektedir [9].

Bitki ıslahında yoğun bir şekilde kullanılan biyoteknolojik yöntemlerden birisi de somatik embriyogenesisdir. Somatik embriyogenesis, bitkinin somatik dokularından kapalı iletim sistemine sahip bipolar bir embriyonun üretilmesini sağlayan eşeysiz bir gelişme sürecidir. Somatik embriyogenesis doku kültüründe kitlesel klonal çoğaltım için en güçlü tekniklerden birisidir.

Somatik embriyogenesis birçok bitki türünün, özellikle de orman ağaçlarının hızla klonal çoğaltılmasında önemli bir potansiyele sahiptir. Teorik olarak tek bir eksplant sınırsız sayıda somatik embriyo üretebilir. Bu sınırsız üretim, anaç bitkiden alınan kısıtlımiktardaki materyale bağlıolan çelikle çoğaltım karşısında çok büyük bir avantaja sahip olmaktır. Özellikle, birçok bitki türü için geliştirilen hücre süspansiyon teknikleriyle az bir işçilikle, çok kısa bir sürede çok sayıda iyi gelişmişembriyo elde etmek mümkün olmaktadır [10].

Hücre süspansiyon kültürlerinden sınırsız sayıda somatik embriyo üretilmesi araştırıcılarıticari amaçla kullanılabilecek mekanik ve otomatik kültür sistemlerinin geliştirilmesine yöneltmiştir. Somatik embriyo kültürleri, bitkilerin hızlıçoğaltılmasıyanında diğer bazıönemli özellikleri de taşımaktadırlar.

Somatik embriyoların döllenme sonucunda gelişen zigotik embriyolara göre en önemli üstünlükleri genetik açılmaların olmamasıdır. Somatik embriyolar, kültüre alınan eksplantın somatik hücrelerinden gelişirler ve eksplantın alındığı bitkinin genotipini muhafaza ettirdiklerinden dolayı klon oluştururlar [11].

Somatik embriyogenesis yoluyla 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.

Sodyum alginatla kaplanmış somatik embriyolar sentetik tohum olarak adlandırılır. 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.

Bu tez çalışmasında; Avrupa ve Türkiye ölçeğinde tükenme tehlikesinde olan ve CR (Çok Tehlikede) kategorisinde yer alan, Apocynaceae (Zakkumgiller) familyasına mensup, *Amsonia orientalis* Decne. bitkisinde somatik embriyogenesis ve sentetik tohum üretimi amaçlanmıştır. Literatürde söz konusu bitki üzerinde bu amaçları taşıyan bir çalışma daha önce yapılmadığından, mevcut çalışma öncü niteliğindedir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Bitkinin Genel Özellikleri

Amsonia orientalis Decne. (syn. *Rhazya orientalis*), Apocynaceae (Zakkumgiller) familyasına ait bir türdür. Bu familya hemen hemen kozmopolittir fakat bazı ılıman bölgelerdeki kimi temsilcileri nedeniyle genellikle tropikal olarak nitelendirilir. Pek çoğu süs bitkisidir.Bazı türler kauçuk (*Funtumia, Landolphia*) ve drog eldesinde (*Strophanthus, Acokanthera, Catharanthus, Rauwolfia*) kullanılır. Birçok türü zehirlidir [12]. Apocynaceae familyası, genelde süt şeklinde salgıları olan (lateks) otlar çalılar veya küçük ağaçlardan oluşur. Familya üyelerinde yapraklar zıt veya halkavari diziliş gösterir. Almaşık diziliş daha az görülür. Ayrıca yapraklar stipulsuz ve basittir. Çiçek tek olarak yaprak koltuklarında veya kimöz şeklinde olup bazen panikül oluşturmaktadır. Çiçek kısımları beşlidir. Kaliks kaideye yakın kısma kadar 5 loblu ve kalıcı, korolla kampanamsı, hunimsi veya tüp kısmı uzun rozet şeklindedir. Beş lobun kıvrılmış olarak bulunduğu tomurcuk imbrikattır. Stamen sayısı 5 ve korollaya bitişiktir. Ovaryum 2 serbest karpelli veya karpeller kaideye yakın kısımda bitişik, yukarıda ise geniş ve değişik baş görünümüne sahip, stigması bulunan tek stilus şeklinde bitişmişlerdir. Meyve iki foliküle ayrılmakta, bazen indirgenme sonucu tek folikül gelişmektedir. *Amsonia orientalis*, tıbbi potansiyeli ve ekonomik değeri olan, 30-60 cm boyda, latekse sahip, dallı, çok yıllık bir bitkidir. Ülkemizde "Mavi Yıldız, Mavi Çiçek ve Doğu Razyası" gibi isimlerle anılmaktadır. Yaprakları neredeyse sapsız, dar yumurtamsı veya mızrağımsı, 3-7 × 0,5-3,5 cm, tabanı kama şeklinde veya yuvarlak, uç kısmı dar veya sivri uçlu, kenarı ve yaprak orta damarı haricinde tüylüdür. Genç yapraklar genelde tüylüdür ve birçok yan damara sahiptirler. Çiçek örtüsü yoğun veya seyrek olabilir fakat bol çiçeklidir. Kaliks 2-3 mm dir. Korolla yıldız şeklinde, soluk veya parlak mavidir. Çiçek rengi mavi-lavanta olabilir. Korolla tübü yaklaşık 10-12 mm ve lobları 4-5,5 mm uzunluğundadır. Tohumları 3-5 cm. uzunluğundaki meyvelerin içinde oluşurlar ve 6-8 mm boyundadırlar [13,14]. Bitkinin yaprakları bifasiyaldir. Epidermis bir katmanlı, hipodermis ise yoktur.

Palizat parankiması sünger parankiması ve epidermis arasında iki katman halinde uzanır. Anatomik yönden yapraklar hipostomatiktir ve stomaları amaryllis tiptir [15] (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. *Amsonia orientalis*'in çiçek ve yapraklarının genel görünüşü

Sistematik hiyerarşisi şu şekildedir;

Alem: Plantae

Şube: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Takım: Gentianales

Familya: Apocynaceae

Cins: Amsonia

Tür: *Amsonia orientalis*

1.2. Ekonomik ve Tıbbi Önemi

Amsonia orientalis parlak mavi-mor çiçeklere sahip çiçek durumundan dolayı Batı Avrupa ve Amerika'daki bahçelerde süs bitkisi olarak da kullanılmaktadır. *Amsonia* türleri diğer *Apocynaceae* (Zakkumgiller) familyası üyeleri gibi lateksli gövdeye sahiptirler. *Nerium* gibi kimi akrabalarının lateksi zehirli alkaloitlere sahip olsa da*Amsonia* türlerinin lateksi nisbeten zehirsizdir. Bu lateksin insanlara karşı zararlıolduğu bilinir fakat bitkinin geyik ve diğer memeliler tarafından yenmesine engel olur. Bu durum da bitkinin bahçelerde, peyzaj düzenlemelerinde kullanılmasında avantaj sağlar [14]. Ornamental öneminin dışında bitki zengin flavonoid içeriği ile de dikkat çekmektedir (Tablo 1.1.). Itoh ve diğ. [16], *A. Orientalis* üzerine yaptıkları bir çalışmada 6 yeni flavonoid glikozit izole etmişlerdir.

Tablo 1.1. *A. orientalis*'ten izole edilen 6 yeni flavonoid glikozit

	Tanımlanan Yeni Flavonoid glikozit
1	quercetin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-[α-L-rhamnopyranosyl(1→2)]-(4-O-trans-p-coumaroyl)-β-D-galactopyranoside-7-O-α-L-rhamnopyranoside
2	quercetin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-[α-L-rhamnopyranosyl(1→2)]-(3-O-trans-p-coumaroyl)-β-D-galactopyranoside-7-O-α-L-rhamnopyranoside
3	isorhamnetin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-[α-L-rhamnopyranosyl(1→2)]-(4-O-trans-p-coumaroyl)-β-D-galactopyranoside-7-O-α-L-rhamnopyranoside
4	isorhamnetin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-[α-L-rhamnopyranosyl(1→2)]-(3-O-trans-p-coumaroyl)-β-D-galactopyranoside-7-O-α-L-rhamnopyranoside
5	isorhamnetin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-[α-L-rhamnopyranosyl(1→2)]-(4-O-cis-p-coumaroyl)-β-D-galactopyranoside-7-O-α-L-rhamnopyranoside
6	isorhamnetin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-[α-L-rhamnopyranosyl(1→2)]-(4-O-trans-feruloyl)-β-D-galactopyranoside-7-O-α-L-rhamnopyranoside

Flavonoidler doğada birçok bitkide, yaygın olarak bulunan düşük molekül ağırlıklı, bifenolik bileşiklerdir. Bu gruba dahil olan glikozitler (flavonoid glikozitler) kardiyovasküler sistem düzenleyicileri olarak çok eskiden beri kullanılmaktadır. Flavonoidlerle *in vivo* ve *in vitro* olarak yapılan çalışmalar bunların kansere karşı koruyucu birçok mekanizmada rol oynadığını göstermiştir. Bunlar; östrojenik/antiöstrojenik aktivite, antiproliferasyon,hücre siklusunun durdurulmasıve apoptozisin indüksiyonu, oksidasyonun engellenmesi, deoksifikasyon enzimlerinin

indüksiyonu, immun sistemin düzenlenmesi ve hücre içi sinyal iletimindeki değişikliklerdir [17]. Bu bağlamda *A. orientalis*'in flavonoid içeriğinin önemi ortaya çıkmaktadır.

A. orientalis kökleri üzerine yapılan bir çalışmada sekologanine rastlanmıştır. Sekologanin isopirenoid glikozit olan bir biyo anahtardır. Çeşitli biyosentez yolaklarının merkez pozisyonunda bulunur ve diğer birçok doğal ürünün başlangıç bileşiğidir [18]. Özellikle *A. orientalis* üzerinde alkaloit içeriği yönünden önemli çalışmalar yapılmış ve bu taksonun 12 çeşit alkaloit bulundurduğu rapor edilmiştir [20]. Bu alkaloitlerin bir kısmı antikanser özellikleriyle tıbbi öneme sahiptirler [19].

Tablo 1.2. *A. orientalis'in* alkoloit içeriği

	Alkaloit	**Kimyasal Formülü**
1	Tabersonine	$C_{21}H_{24}N_2O_2$
2	15,20,15′,20′-Tetrahydropresecamine	$C_{42}H_{56}N_4O_4$
3	15,20,15′,20′-Tetrahydrosecamine	$C_{42}H_{56}N_4O_4$
4	Secamine	$C_{42}H_{52}N_4O_4$
5	Vallesiachotamine	$C_{21}H_{22}N_2O_3$
6	Picralinal	$C_{21}H_{22}N_2O_4$
7	Picrinine	$C_{20}H_{22}N_2O_3$
8	Tetrahydrosecodin-17-ol	$C_{21}H_{30}N_2O_3$
9	Dihydrosecodin-17-ol	$C_{21}H_{28}N_2O_3$
10	Tetrahydrosecodine	$C_{21}H_{30}N_2O_2$
11	5-α-Carboxystrictosidine	$C_{28}H_{34}N_2O_{11}$
12	Strictosidine	$C_{27}H_{34}N_2O_9$

1.3. Avrupa ve Türkiye' deki Yayılış Alanları

Amsonia orientalis Türkiye'de ve Yunanistan'ın Kuzeydoğusu'nda doğal olarak yayılış göstermektedir [21]. Davis (1978) [13], türün Türkiye ve Yunanistan'da yayılış gösterdiğini fakat Yunanistan'daki populasyonun tükenmeye yakın olduğunu rapor etmiştir. Yunanistan populasyonunun halen yayılış gösterdiğine dair yakın tarihli bir floristik kayıda rastlanmadığından, *A. orientalis*'in Yunanistan'da tükenmiş olma ihtimali oldukça yüksektir (Şekil 1.2.).

A. orientalis için ülkemizde ise Apolyont (Uluabat) Gölü, İstanbul Menekşe Deresi (Halkalı) ve Balıkesir Hıdırlık Tepe olmak üzere toplam üç lokalitede bulunduğu bildirilmektedir. Yapılan arazi çalışmalarına göre *A. orientalis* Türkiye'de sadece Balıkesir ilinde bulunmuş fakat daha sonra Ömerli Havzası'nda küçük bir populasyonun yayılış gösterdiği rapor edilmiştir. Bitki Balıkesir ilinde yaklaşık 10 km^2 alanda yayılış göstermektedir [15].



Şekil 1.2.*Amsonia orientalis*'in dünyadaki yayılışı

Arazi çalışmalarında bitkinin bulunduğu lokaliteler ve bunların GPS koordinatları şöyledir; Balıkesir Gazi Osman Paşa (175 m., N 39° 37' 26,3", EO 27° 52' 05,7"), Adnan Menderes (261 m., N 39° 38' 56,2", EO 27° 51' 06,2") ve Paşa Alanı Mahallesi (119 m., N 39° 39' 54,5", EO 27° 54' 26,0") [19].

Bitkinin bu alanlarda oldukça lokal populasyonlar halinde bulunduğu tespit edilmiştir. Tür, Türkiye'de de çok nadir veya neredeyse tükenmek üzeredir. Mavi yıldız bitkisinin tükenme tehlikesinde olmasının en önemli nedeni, doğal yayılış alanlarının yerleşim alanı sınırlarında kalmasıdır [13].

1.4. Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besi ortamında (besiyerinde), bütün bir bitki (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), hücre, doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir [2]. Doku kültürü ayrıca transgenik bitkilerin rejenerasyonu içinde önemli bir araçtır.Hemen hemen bütün transformasyon sistemleri için etkin bir rejenerasyon protokolü bir gerekliliktir. Doku kültürünün bu özelliği, bitki hücrelerinin totipotensi özelliğine sahip olmaları, geliştirilen farklı tip besiyerlerinin yönlendirilmesi ve bitki hormonlarının kullanımı ile mümkün olmuştur.Bununla beraber her bir bitki türünün ve eksplant (kültüre alınan bitki dokusu) tipinin bilinmesi, etkili bir rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi için gereklidir. Eksplantın fizyolojik durumu, kültüre vereceği tepki açısından çok önemli bir role sahiptir. Örneğin genç eksplantlar genellikle yaşlı olanlara göre daha başarılı sonuçlar verirler.

Çeşitli araştırıcılar tarafından bildirilen birçok besi ortamı formülasyonu bulunmaktadır. Ayrıca bazıları ihtiyaca ve bitkinin isteklerine göre modifiye edilerek kullanılmaktadır. Bunlardan en bilineni Murashige ve Skoog (1962)'un geliştirdikleri MS ortamıdır. MS ilk defa tütün bitkisi için geliştirilmiş olup yüksek tuz içeriklidir [22]. Gamborg ve ark. (1968) B5 ortamını soya kallus kültürleri için geliştirmişlerdir [23]. LS ortamı ise Linsmaier ve Skoog (1965) tarafından geliştirmiştir [24]. White 1963 yılında domates köklerinin kültürleri için düşük tuz formülasyonlu bir ortam olan WH besiyerini geliştirmiştir. Bu besi ortamı hem monokotiledonlar hem de dikotiledonlar için uygun olabilmektedir [25]. Ayrıca Schenk ve Hildebrandt (1972) [26] tarafından geliştirilen SH ve anter külürü için Nitsch tarafından geliştirilen NN ortamları da kullanılmaktadır [2].

Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) doku kültürü ortamlarının en önemli unsurudur. Kompleks yapılar gösteren yüksek organizasyonlu canlılar düzenli olarak büyüyüp gelişebilmek için hücreler arası iletişime ihtiyaç duyarlar. Bitkilerde bu iletişimi sağlayan temel araç, bilgiyi kimyasal mesaj olarak hücreden hücreye taşıyan, bitkisel hormonlar ya da fitohormonlardır. Bitki hormonları, bir dokuda üretilip büyüme ve gelişmenin olacağı diğer dokulara taşınan ve çok düşük konsantrasyonlarda etkili

olan endojen organik bileşiklerdir. Bitkinin kendi yapısındaki bu maddeler "hormon" olarak isimlendirilirken bitki doku kültürü ortamlarına sonradan eklendiklerinde dışardan eklendiklerini belirtmek için "bitki büyüme düzenleyicileri" olarak isimlendirilirler [27]. En çok kullanılan BBD'ler oksinler, sitokininler, gibberellinler, absisik asit ve etilen'dir. Bu BBD'ler dışında günümüzde karakterizasyonu yapılmış 4 farklı grup BBD daha bulunmaktadır. Bunlar; brassinosteroidler, jasmonik asit, strigogalakton ve salisilik asit'tir.

Oksinler; sürgün ve köklerin uçlarında üretilmektedirler. Bunlar yaprak, gövde ve köklerinin büyüyen hücrelerine yayılırlar. Oksinler ayrıca tropizma hareketlerinde de görev almaktadırlar [28]. Uygun konsantrasyonlarda, oksinler hücre duvarlarının plastisitesini (geri dönüşümsüz gerilme) artırarak genişlemesini uyarır. Oksinler meyve ve yaprak absisyonu aynı zamanda meyve olgunlaşması gibi gelişimsel süreçleri geciktirir ve lateral dallanmayı inhibe eder. Oksinler, doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını sağlarlar.

Sitokininler; adenin (aminopürin) türevleridir. Kök uçlarında ve çimlenmekte olan tohumlarda sentezlenirler. Sitokininler hücrelerin genişlemesi, dokuların farklılaşması, kloroplast gelişimi, kotiledon büyümesinin uyarılması ve yapraklarda yaşlanmanın gecikmesinde rol oynarlar [29]. Sürgünlerde köklenmeyi ve embriyogenesisi engellerler.

Gibberellinler; gibberellan türevleridir ve internodların uzamalarına neden olurlar [30]. Ayrıca giberellinler; çiçeklenmenin düzenlenmesi, dormansinin kırılması, meyve oluşumu ve büyümesi gibi olaylarda etkilidirler [31]. Son zamanlarda somatik embriyoların olgunlaştırma ortamlarında kullanılmaktadırlar. Olgunlaşma için GA_3 çok etkilidir [77].

Absisik asit (ABA); α-amilaz sentezinde ve su stresinde stoma açıklığının düzenlenmesinde önemli rol oynamasıyla bilinir [32]. Tohumların ve tomurcukların dormansiye girmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca yaprak ve meyve dökümü (absisyon) etkilidir. ABA somatik embriyoların büyümesi için gereklidir ve ancak ABA varlığında somatik embriyolar gelişimsel ve yapısal olarak zigotik embriyolara

yakından benzerler. Endojen ve/veya ekzojen ABA seviyesindeki artış, olgunluğa erişen embriyoların sayısının artmasına sebep olur [33].

Etilen; gaz halinde olan tek hormondur. Stres fonksiyonlarının dışında, meyve olgunlaşmasını düzenler vehem doğal hem de kuraklığa bağlı yaşlanma (senesens) başlangıcını belirler [34].

1.5. Bitki Doku Kültürünün Dünü ve Bugünü

Bitki doku kültürünün tarihsel temeli 1838 yılında, Schwann ve Schleiden'in her bir hücrenin tüm bitkiyi meydana getirebilecek özerk bir yapıda olduğunu belirttikleri Totipotensi Teorisi'ni öne sürmeleri ile atılır. Haberlandt, 1902 yılında, izole edilmiş bitki hücresini kültüre alma çalışmaları yapmış fakat başarılı olamamıştır. Hanning, 1904 yılında, çeşitli *Cruciferae* üyelerinin embriyo kültüründe ilk adımı atmıştır. Kuster, 1909 yılında, bitki protoplastlarının füzyonunu denemiş fakat başarılı olamamıştır. Karl Ereky, 1917 yılında ilk defa Biyoteknoloji terimini kullanılmıştır. Knudson, 1922 yılında, orkide tohumlarının *in vitro* asimbiyotik çimlendirilmesini yapmış ve aynı yıl Robbins kök uçlarının *in vitro* kültürünü başarmıştır. Laibach, 1925 yılında, *Linum* hibritlerinden embriyo kültürü ve 1929 yılında ise *Linum*'da çaprazlama uyumsuzluğunu gidermek için embriyo kültürü yapmıştır. White, 1934 yılında, *Lycopersicon esculentum*'dan aldığı kök uçlarının şeker, inorganik tuz ve bira mayası bulunan gıda ortamda aktif bir şekilde geliştiğini rapor etmiş ve ilk defa kalıcı kök ve meristem kültürlerini geliştirmiş, aynı yıllarda Gautheret ve Nobecourt *Daucus carota*'da ilk defa kalıcı kallus kültürünü başlatmıştır [35]. Gautheret, 1934 yılında yaptığı çalışmada kullandığı besi ortamlarına IAA (İndol-3-asetik asit) ve çeşitli vitaminler ekleyerek *Salix* kalluslarının kültür periyodunu 18 aya kadar uzatmayı ve dokuyu aseptik olarak alt kültüre almayı başarmıştır. LaRue, 1936 yılında, çeşitli açık tohumlu bitkilerin embriyo kültürünü yapmıştır. Gautheret, Nobecourt ve White, 1939 yılında sürekli kallus kültürleri kurmayı başarmıştır. Gautheret, 1940 yılında, *Ulmus* kambiyal dokuda *in vitro* adventif sürgün oluşturmuştur. Van Overbeek, 1941 yılında, *Datura* embriyo kültüründe ilk defa hindistan cevizi sütünü kullanmıştır. 1942'ye gelindiğinde ise Gautheret ilk defa *Daucus carota*'nın kallus kültürlerinde sekonder metabolitlerin üretimini gözlemlemiştir. Skoog, 1944 yılında, tütünün *in vitro* kültüründe ilk defa adventif

sürgün oluşumunu gözlemlemiştir. Loo, 1945 yılında, *Asparagus*gövde uçlarının ilk defa *in vitro* kültürünü yapmıştır. Ball, 1946 yılında, ilk defa *Lupinus* ve *Tropaeolum*' da sürgün ucu kültüründen tam bir bitki elde etmiştir. Skoog & Tsui, 1948 yılında, tütünde adventif sürgün ve kök oluşumunun oksin/adenin oranı ile belirlenmesini bulmuştur. Ball, 1950 yılında, *Seguoiasempervirens*' in kallus dokularından organ rejenerasyonunu gerçekleştirmiştir. Morel & Martin, 1952 yılında, meristem kültürü ile hastalıksız *Dahlia* üretimini gerçekleştirmiş olup ilk mikro-aşılamayı başarmıştır. Tulecke, 1953 yılında, polenden üretilen haploid *Ginkgo biloba* kallusu oluşturmuştur. Strauss, 1954 yılında, mısır endosperm kültürlerinde kromozom davranışında ve karyolojide değişimler gözlemlemiştir. Miller ve diğ. tarafından 1955 yılında kinetin keşfedilmiştir. Tulecke & Nickell, 1956 yılında, sekonder ürünlerin eldesi için süspansiyon kültürleri kurmuştur. Skoog & Miller, 1957 yılında, oksin/sitokinin oranının organ oluşumuna etkileri açıklanmıştır. Maheshwari & Rangaswamy, 1958 yılında, *Citrus ovules* nusellusundan somatik embriyo rejenerasyonunu başarmıştır. Yine aynı yıl Reinert, Steward havuç kallus ve hücre kültürlerinde pro-embriyo rejenerasyonunu yapmıştır. Gautheret, 1959 yılında, ilk bitki doku kültürü kitabını yayımlamıştır. Cocking, 1960 yılında, enzimleri kullanarak ilk canlı protoplast izolasyonunu yapmıştır. Murashige & Skoog, 1962 yılında, MS besi ortamını geliştirmiştir. Mathes, 1964 yılında, *Populus tremuloides* kallus dokusundan kök ve sürgün geliştirmiştir. Vasil & Hildebrandt, 1965 yılında, tek bir hücreden tütün bitkisinin rejenerasyonunu gerçekleştirmiştir. Bourgin & Nitsch, 1967 yılında, anter polen kültürüyle ilk haploid tütün üretimini başarmıştır. Gamborg, 1968 yılında, B5 besi ortamını geliştirmiştir. Eriksson & Jonassen, 1969 yılında, *Hapopappus gracilis* süspansiyon kültüründen ilk başarılı protoplast izolasyonunu yapmıştır. 1970 yılına gelindiğinde ise HEPA filtreleri kullanılmaya başlanmıştır. Yine aynı yılda Carlson *in vitro* biyolojik mutantların seçilimini gerçekleştirmiştir. Power ve diğ., 1970 yılında, başarılı ilk protoplast füzyonunu gerçekleştirmiştir. Takabe ve diğ., 1971 yılında, protoplastlardan ilk bitki rejenerasyonunu başarmıştır. Carlson, 1972 yılında, tütünde protoplast füzyonuyla türler arası ilk melezlemeyi yapmıştır. Murashige ve diğ., 1973 yılında, sitokininin dormansiyi kırmada başarılı olduğunu açıklamıştır. Murashige ve diğ., 1974 yılında ise sitokininle aksillar dallanmayı uyarmıştır ve aynı yıl Binding protoplasttan haploid petunya elde etmiştir. Yine 1974 yılında Reinhard, bitki doku

kültürlerinde transformasyonu bulmuştur. Seibert, 1976 yılında, dondurulmuş karanfil sürgün ucundan sürgün oluşumunu uyarmayı başarmıştır. Melchers ve ark., 1978 yılında, cinsler arası ilk somatik melezlemeyi bulmuştur. Murai ve ark., 1983 yılında, tütünden transgenik ilk bitkiyi elde etmiştir. 1990 yılına gelindiğinde ise sentetik tohum geliştirme ve hızlı dondurma yoluyla germplazm muhafazası çalışmalarına başlanmıştır [2,35]. Haberlandt'ın 1902'de ilk bitki doku kültürü denemelerinden sonra peşpeşe gelen yıllarda olgun embriyoların kültüre alınması, oksinin tanımlanması, kök ve sürgün uçlarının laboratuvarda çoğaltımı ve ilk kallus kültürlerinin başlatılması gibi gelişmeler 1995 yılına gelindiğinde insanlar için ilk rekombinant gıdanın üretimine kadar varmıştır. Son 20 yıl boyunca *in vitro* kültür teknikleri yoğun bir şekilde gelişmiş ve 1000 den fazla farklı türe uygulanmıştır [36].

1.6. Nesli Tükenmekte Olan Bitkilerin Çoğaltımında Doku Kültürü

Bitkilerin yaşam alanlarını korumak insanların geleceğini kurtarmak için büyük önem taşımaktadır. Türlerin korunması doğal habitatların ve yabanipopulasyonların yönetimi ile gerçekleştirilmesine karşın (in situ koruma) *ex situ* koruma yöntemleri bunlarıntamamlayıcısı olarak kullanılmaktadır. Bazı durumlarda bazı türler için *ex situ* koruma tek seçenektir [37,38]. In situ koruma, ilgili germplazmın doğal olarak oluştuğu herhangi bir habitatta; sadece doğal habitatlar değil, çiftliklerde, bahçelerde ve diğer insan yapımı habitatlarda da korunması olarak kabul edilir. *Ex situ* koruma ise germplazmın; sadece tohum koleksiyonları ve sadece *in vitro* koleksiyonlar değil, aynı zamanda inatçı tohum (çimlenme gücü düşük) üreten türlerin ve botanik bahçelerindeki canlı koleksiyonlarında doğal habitatı dışında sürdürülmesini ifade eder [39]. Aşırı toplama, uygunsuz tarım ve ormancılık, kentleşme, kirlilik, habitat tahribatı, istilacı türlerin yayılışı ve iklim değişikliği gibi çeşitli faktörlerin biraraya gelmesiyle bitki türlerinin nesilleri tükenmektedir [40]. Değerli genetik kaynaklarının yitirilmesine duyulan küresel boyuttaki endişe, bitki genetik kaynaklarının korunması için yeni birçok programın artmasına neden olmuştur [41]. Özellikle *in vitro* kültür teknikleri, moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanında gelişmeler, bitki genetik kaynaklarının korunması ve yönetimi için bazı önemli araçları sağlamaktadır. Geniş germplazm koleksiyonların kurulmasıyla birlikte çoğunlukla vejetatif olarak çoğaltılan ve inatçı tohum üreten türler için çeşitli *in vitro* teknikler geliştirilmiştir [42-45]. Koruma biyolojisinde bitki doku kültürü, son derece küçük populasyonları

olan bitki türlerinin çoğaltımı yoluyla biyolojik çeşitliliği korumak için, sınırlı üreme kabiliyetleri olan türler için ve bunların geri kazanımı ile yeniden doğal habitatlarına tanıtılması için kullanılır [8]. Bitkinin *in vitro* çoğaltımında başlangıç materyali olarak (eksplant kaynağı) tohumu, gövde apikal veya aksillar meristemleri, yaprak ve yaprak sapları gibi parçaları kullanılabilir. Bunların sterilizasyonları yapılıp besi ortamlarına ekim veya dikimleri gerçekleştirilir. Oluşan yeni sürgünler alt kültürlere alınarak istenilen sayıda *in vitro* sürgün oluşumu sağlanır. Elde edilen sürgünler köklendirme ortamlarına transfer edilerek sonrasında *in vitro* bitkicikler elde edilmiş olur. Bu bitkiciklerin kültür kaplarından dış ortam şartlarına alışmaları için aklimatizasyon uygulamaları yapılmaktadır. Köklendirme aşamasının son günlerinde kültür kaplarının kapaklarının açılması veya bitkiciklerin saksılara dikimi yapıldıktan sonra üzerlerinin şeffaf naylon torbalar ile kaplanması vedaha sonra bu torbaların kademeli olarak açılması gibi yöntemler ile dış ortama alıştırma çalışmaları yürütülür. Kapların ağzı açık olarak bir haftadan daha uzun süre kalmadıkça ortamın kontaminasyonu sorun yaratmamaktadır [46]. Bu şekilde dış ortama alıştırılan bitkiler daha sonra doğal habitatlarına dikilebilirler.

1.7. Somatik Embriyogenesis ve Diğer Kültür Teknikleri

Somatik embriyogenesis, bitkinin somatik dokularından kapalı iletim sistemine sahip bipolar bir embriyonun üretilmesini sağlayan eşeysiz bir gelişme sürecidir. Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak adlandırılmaktadır. Somatik embriyogenesis doku kültüründe kitlesel klonal çoğaltım için en güçlü tekniklerden birisidir.Somatik embriyolar, kültüre alınan eksplantın somatik hücrelerinden gelişirler ve eksplantın alındığı bitkinin genotipini muhafaza ettirdiklerinden dolayı klon oluştururlar. Somatik embriyogenesisin en önemli kullanım alanları; somatik hibridizasyon, partikül tabancası ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile bitkilere gen aktarımıdır. Somatik embriyogenesis hızlı çoğaltımda, sentetik tohum üretiminde ve genaktarımında önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak, eksplant kaynağı, genotip, bitki büyüme düzenleyicileri, azot kaynağı ve çevre şartları gibi etmenler somatik embriyogenesisi önemli ölçüde etkileyen faktörlerdir.

Somatik embriyo oluşturma frekansı bakımından türler arasında önemli farklılıklar gözlendiği gibi, aynı tür içerisindeki farklı genotip ve çeşitlerin dahi embriyo oluşturma kabiliyetleri farklı olmaktadır [2].

Besi ortamınailave edilen büyüme düzenleyicilerden oksinler, somatik embriyo oluşumunu en fazla etkileyen bileşiktir. Eksplantın önce kısa bir süre oksin içeren ortamda kültüre alınması daha sonra da oksin içermeyen ortama aktarılmasıyla birçok bitki türünde yüksek oranlarda somatik embriyo gelişimi teşvik edilmiştir. Tam bir embriyo olgunlaşması ve bitki gelişimi için içsel hormon seviyesine bağlı olarak çok düşük oranlarda sitokinin gerekli olmaktadır. MS temel besi ortamı somatik embriyogenesis çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek oranda indirgen N formu somatik embriyo oluşumunu ve gelişmesini teşvik etmektedir. Sakkaroz embriyogenesisi hızlandırmaktadır. Ancak sakkaroz oksin sentezini engelleyici etki yaptığından dolayı embriyo teşvik aşamasında düşük oranlarda %10-20 kullanılmalı, embriyo olgunlaştırma aşamasında ise yüksek oranlarda %50-60 kullanılmalıdır. Işık kaynağı, yoğunluğu ve süresi ile sıcaklık somatik embriyo oluşumunda önemli rol oynamaktadır.

Kültüre alınan eksplantlardan hızlı bölünen embriyogenik hücreleri elde etmek için öncelikle yüksek konsantrasyonlarda oksine (genellikle 2,4-D) ihtiyaç duyulmaktadır. Embriyogenik hücreler oldukça küçük olmakla birlikte, yoğun sitoplazma içeriğine, büyük çekirdek ve küçük vakuollere sahiptirler. Oksin içeren besi ortamlarında embriyo oluşumu teşvik edildikten sonra kültürler oksin içermeyen ortamlara aktarılmalıdır. Bu safhada ortama oksin ilave edilmesi embriyo gelişimini engellemektedir [2].

Embriyogenik kallus; kompakt yapıda ve beyazdan açık sarı renge kadar değişen renklerdedir [9].

Somatik embriyogenesis, somatik hibridizasyon ve gen aktarma çalışmalarında ara ürün olarak embriyogenik kallusların elde edilmesi çok önemlidir. Embriyogenik kalluslar tek hücre kaynaklı olduğundan özellikle gen aktarma çalışmalarında amaca ulaşmada önemli rol oynar. Bunların yanında hücre süspansiyonu hazırlama ve protoplast füzyonunda kaynak olarak yine embriyogenik kalluslar kullanılır [2].

Somatik embriyogenesis ilk defa havuç bitkisinin somatik dokularından elde edilmiştir. Genel olarak somatik embriyo üretimi için çok değişik bitkikısımları kullanılabilmektedir. Günümüzde buğday [47], mısır [48,49], çeltik [50], soya [51], bezelye [52] ve yonca [53] gibi birçok önemli kültür bitkisinde yüksek oranda somatik embriyo üreten yöntemler geliştirilmiştir [2].

Biyoreaktörleri kullanarak somatik embriyoların büyük ölçekli üretimi ve somatik embriyolardan sentetik tohum üretimi başarıyla sonuçlanmıştır. Somatik embriyolar, sentetik tohum olarak dondurularak muhafaza edilebilir ve ihtiyaç duyulduğunda çimlendirilebilir. Somatik embriyogenesisin diğer bir avantajı ise, somatik embriyoların organogeneze ihtiyaç duymadan direkt olarak çimlendirilerek, canlı ve bütün bir bitkiyi oluşturabilmesidir. Çünkü somatik embriyogenesis doğal çimlenme olayını taklit edebilen bir olaydır.

Bitki doku kültürü teknolojisi kullanılan materyale bağlı olarak 5 gruba ayrılabilir.

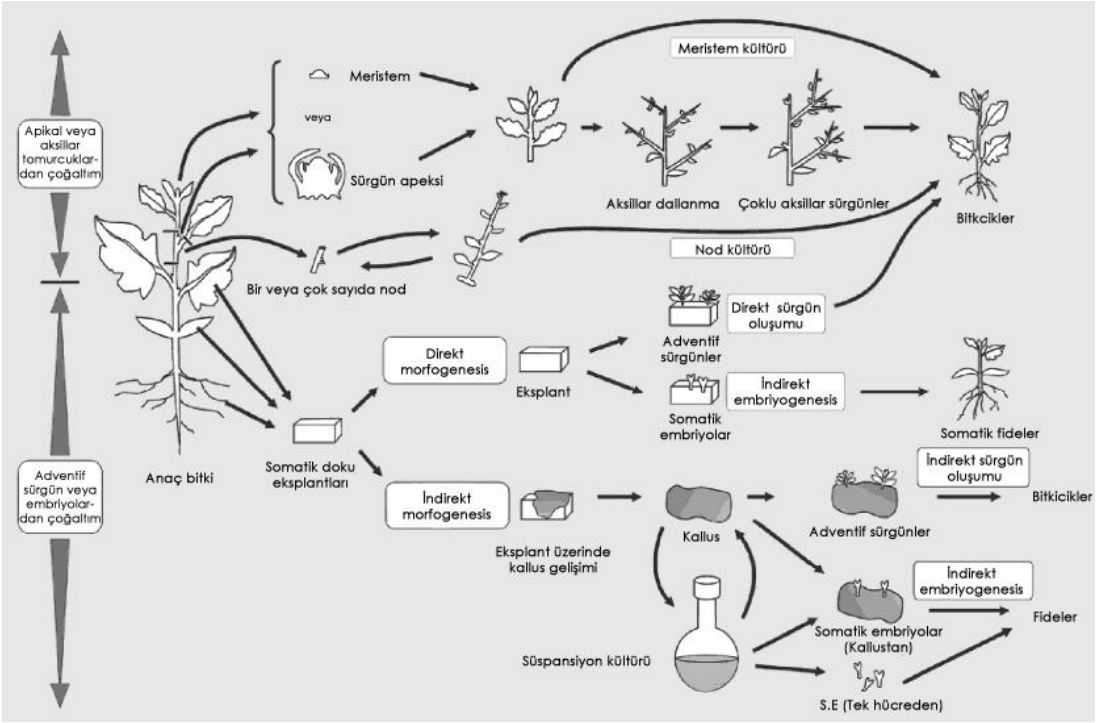
(i) Kallus kültürü: Kallus, hücreler yaralandığı zaman gelişen düzensiz bir hücre yığınıdır. Kallus kültürü ise, bitkiden alınacak bir parçadan (eksplant) uygun bir besiyeri üzerinde kallus dokusunun oluşturulması, yani izole edilmiş hücre yığınlarının steril kültürüdür [54]. Kallus üretimi çoğunlukla organogenese öncülük eder fakat kallus organ oluşturmaya bir kez başlarsa takibinde kallus oluşumu durur. Oksin ve sitokininlerin her ikisi de çoğu kallus hücrelerinin sürekli olarak çoğalmasına yol açarlar. Bitki büyüme hormonları kullanılarak kallus sürekli olarak çoğaltılabilir.

(ii) Hücre kültürü: Sıvı besi ortamlarında elde edilirler. Bitki hücre süspansiyonları, özellikle hücrelerin gelişme ve farklılaşma konularında yapılacak çalışmalar için önemli bir kaynaktır. Bitki hücre kültürleri, sekonder metabolitlerin ve rekombinant proteinlerin üretimi için oldukça yararlıdır. Ayrıca, bitki hücre kültürleri, arazide büyüyen bitkilere göre daha yüksek seviyede metabolit içerdiklerinden ve rekombinant proteinlerin ticari olarak üretilmesine imkan tanıdıklarından dolayı, moleküler tarım için daha avantajlıdır. Bugüne kadar, hücre süspansiyon kültürlerinden antikorlar, interlökinler, eritropitein, insan gronülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörü ve hepatit B antijeni dahil olmak üzere yirmiden fazla farmasötik bileşik elde edilmiştir [55].

(iii) Protoplast kültürü: Protoplastlar, hücre duvarı hariç bitki hücrelerinin bütün unsurlarını içerir. Protoplastları kullanarak, tek bir hücreden tam bir bitki rejenere etmek ve aynı zamanda somatik hibritleri geliştirmek mümkündür. Hücre duvarı, eksplant dokusundan mekanik olarak veya enzimatik olarak uzaklaştırılabilir. Protoplastlar bir bitki hücresine etkili ve direkt gen transferi olanağını sağlar.

(iv) Organ kültürü: Embriyoların, anterlerin, köklerin, sürgünlerin ve ovaryumların aseptik kültürüdür [56]. Embriyo kültürü, tohumların dormant, inatçı veya gelişmenin erken aşamasında yok olduğu türlerde direkt rejenerasyon için kullanılmanın yanı sıra olgunlaşmamış embriyo, embriyogenik kallus ve somatik embriyo [57] ile direkt somatik embriyoların [58] üretimi içinde kullanılır. Anter kültürü ise haploid bitki elde etmek amacıyla kullanılır.

(v) Meristem kültürü: Patojensiz bitkilerin üretimi için önemli bir araçtır. Bitkilerin apikal meristemleri, hemen hemen veya tamamen virüssüz olan doku bölgeleri içermeleri nedeniyle, virüssüz bitki üretimi için oldukça uygun eksplantlardır. Bakteri veya fungustan arı bitkilerin üretimini mümkün olmasına rağmen, meristem kültürü metodu daha çok virüslerin elenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [59, 60,61,62] Şekil (1.3).



Şekil 1.3. Mikroçoğaltım metodları

1.8. Somatik Embriyogenesisin Kullanım Alanları

1.8.1. Klonal çoğaltım

Somatik embriyogenesis birçok bitki türünün, özellikle de orman ağaçlarının hızla klonal çoğaltılmasında önemli bir potansiyele sahiptir. Teorik olarak tek bir eksplant sınırsız sayıda somatik 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 bir sürede çok sayıda iyi gelişmiş embriyo elde etmek mümkün olmaktadır [10].

Somatik embriyoların döllenme sonucunda gelişen zigotik embriyolara göre en önemli üstünlükleri genetik açılmaların olmamasıdır. Somatik embriyolar, kültüre alınan eksplantın somatik hücrelerinden gelişirler ve eksplantın alındığı bitkinin genotipini muhafaza ettiklerinden dolayı klon oluştururlar [11].

Somatik embriyogenesis sonucunda oluşan ürün bir embriyo olup, tohum içerisinde bulunan embriyonun benzeridir ve somatik embriyolar tam bir bitki oluşturabilme porogramına da sahiptirler. Bu yüzden, somatik embriyolar kaplanmış tohum olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptirler.

1.8.2. Sentetik tohum üretimi

Kaplanmış somatik embriyolar sentetik tohum olarak adlandırılır. Somatik embriyolar, yapay tohum kabuğu olarak görev yapacak olan bir aljinat matriksi ile kaplanır. Kaplanmış somatik embriyolar bitkiciklerin oluşturulması için *ex vitro* veya *in vitro* koşullarda çimlendirilebilir. Sentetik tohumlar birçok avantaja sahiptir; çalışılması kolaydır, potansiyel olarak uzun süre saklanabilirler ve büyük ölçekli üretimleri düşük maliyetlerle gerçekleştirilebilir. Üretim işleminin bütün aşamalarının otomasyona bağlanma imkanının olması diğer bir avantajdır. Çünkü somatik embriyogenesisin ticari uygulaması, çok büyük miktarlarda üretime ihtiyaç duyar. Sentetik tohumlar kısa süreli periyotlar için $+4^0$C'de saklanabilir veya uzun süreli muhafaza için sıvı azotta dondurularak saklanabilir [63]. Sentetik tohumların

üretimi ve bitkicik oluşturmak için çimlendirilmesi sandal ağacı, kahve, bambu ve birçok diğer bitki türünde başarıya ulaşmıştır.

1.8.3. Gen aktarımı

Somatik embriyogenesisin en önemli kullanım alanlarından bir diğeri de gen aktarımıdır. Bitkilere gen aktarımında değişik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar;

* *Agrobacterium tumefaciens*bakterisi,

* Partikül tabancası,

* Elektroporasyon,

* Mikroenjeksiyon'dur [64].

Kullanılan tüm gen aktarımı tekniklerinden en yaygın olarak kullanılan bitkilerin genel genetik mühendisi olarak adlandırılan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. Bu bakteri aracılığıyla tarımsal öneme sahip birçok gen, iki çenekli ve tek çenekli bitkilere kolaylıkla aktarılabilmiş sonucunda transgenik bitkiler elde edilmiştir.

Tüm gen aktarım tekniklerinde amaç istenilen gen veya genleri taşıyan bir DNA parçasının bitki hücrelerinin kromozomlarına kalıcı olarak yerleştirilmesi ve bu bitki hücrelerinden embriyogenesis veya organogenesis aracılığıyla yeni bitkilerin elde edilmesini sağlamaktır [64].

1.9. Somatik Embriyogenesisi Etkileyen Faktörler

1.9.1. Eksplant kaynağı

Yüksek oranda başarı için eksplantın hızlı hücre bölünmesine sahip iyi gelişen ve sağlıklı bitkilerden alınması gerekmektedir. Eksplant uygun gelişme fizyolojisindeki bitkilerden alındığı takdirde birçok bitki kısmı somatik embriyogenesis için kullanılabilmektedir. Ancak genç doku ve organlar genellikle yaşlı doku ve organlardan daha başarılı olmaktadır. Odunsu bitkileri ve buğdaygilleri de içine alan birçok bitki türünde somatik embriyogenesis için en uygun eksplantın olgunlaşmamış zigotik embriyoların olduğu belirlenmiştir. Baklagillerde ise olgunlaşmamış kotiledonlardan yüksek oranlarda somatik embriyo oluşumu gözlenebilmektedir [52].

Eksplant alınacak olan bitkilerin yetiştirme şartları da embriyogenesisin başarısında önemli rol oynamaktadır. Işık, nem, toprağın besi durumu ve mevsimsel faktörler etkili olmaktadır.

Tüm gelişme şartları optimum düzeyde olduğu için *in vitro* gelişen bitkiciklerden alınan eksplantlardan yüksek oranlarda başarı sağlanmaktadır [65].

1.9.2. Genotip

Otsu bitkiler ağaç ve çalılara göre daha kolay rejenerasyon sağlamaktadır [35]. Somatik embriyo oluşturma frekansı bakımından türler arasında önemli farklılıklar gözlendiği gibi, aynı tür içerisindeki farklı genotip ve çeşitlerin dahi embriyo oluşturma kabiliyetleri farklı olmaktadır [10].

Yapılan bir çalışmada, patateste anter kültürü yoluyla somatik embriyo üretimi kalıtsal olup, düşük embriyogenesis kapasitesine sahip genotipler arasında yapılan melezlemeler sonucunda rejenerasyon kabiliyeti daha yüksek olan döller elde edilmiştir [11,66].

1.9.3. Besi ortamının içeriği

Somatik embriyogenesiste en yaygın olarak kullanılan ortam Murashige ve Skoog (1962) tarafından geliştirilen MS temel besi ortamı olmasına karşın, B5 (Gamborg ve ark., 1968), SH (Schenk ve hildebrandt, 1972) ve N_6 (Chu ve ark., 1975) ortamları da başarılı sonuçlar vermektedir.

Somatik embriyogenesis için besi ortamında bulunan oksinler, sitokininler, absisik asit (ABA), aktif kömür, yüksek oranda indirgen azot (N) formu, sakkaroz, mineral maddeler ve vitaminler önemli parametrelerdir.

Besi ortamına ilave edilen büyüme düzenleyicilerden oksinler, somatik embriyo oluşumunu en fazla etkileyen bileşiklerdir. Embriyogenesis oluşumunu teşvik etmek için en fazla kullanılan oksin 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) olmakla beraber, α-naftalenasetik asit (NAA), pikloram, dicamba, 2,4,5-Triklorofenoksiasetik asit (2,4,5-T) gibi oksinler ya tek başlarına ya da 2,4-D ile birlikte kullanılmaktadır. Oksinler somatik embriyogenesisi teşvik etmek için kullanılmasına karşın, ortamda

sürekli olarak bulunmaları somatik embriyo gelişimini engellemektedir.Sitokininlerin besi ortamına ilave edilmesi genellikle somatik embriyo oluşumunu engellemektedir ancak tam bir somatik embriyo olgunlaşması ve bitki gelişimi için içsel hormon seviyesine bağlı olarak çok düşük oranlarda sitokinin ve özellikle en önemli sitokininlerden biri olan 6-Benzilaminopürin (BAP) gerekli olmaktadır [10].

Besi ortamına ABA ilave edilmesinin anormal embriyo gelişimini engellediği belirtilmektedir [67]. Yine yüksek oranda indirgen N formu somatik embriyo oluşumunu ve gelişmesini teşvik etmektedir [68]. Besi ortamına ilave edilen sakkarozda embriyogenesisi teşvik etmektedir. Ancak, sakkarozun oksin sentezini engelleyici etkiye sahip olduğuda unutulmamalıdır. Bu yüzden embriyo teşvik aşamasında sakkaroz düşük oranlarda kullanılırken olgunlaştırma aşamasında yüksek oranlarda kullanılmaktadır.

1.9.4. Çevre şartları

Sıcaklık, ışık kaynağı, yoğunluğu ve süresi somatik embriyo oluşumunda önemli bir role sahiptir. Işık, oksinleri parçalayıcı bir etkiye sahip olduğundan dolayı embriyogenik kallus gelişimini engellemektedir. Ancak, embriyogenik kallus oluşumundan sonra ışık embriyo gelişimini teşvik etmektedir. Bu yüzden genellikle kallus oluşum esnasında eksplantlar önce karanlıkta veya düşük ışık şiddetinde kültüre alınır. Daha sonra embriyo olgunlaşması ve bitkicik gelişimi için daha yüksek ışık şiddetine tabi tutulurlar [67].

1.10. Somatik Embriyo Rejenerasyonu

Somatik embriyogenesis kullanılan eksplant, bitki türü ve besi ortamının içeriğine göre direkt olacağı gibi, embriyogenik kalluslardan da indirekt somatik embriyo oluşumu elde edilebilir.

1.10.1. Direkt embriyogenesis

Direkt somatik embriyogenesiste; embriyo kallus oluşumu olmadan direkt olarak somatik bir hücreden (eksplant dokusundan) oluşur. Bu tip embriyogenesis için çok genç bitki doku ve hücreleri kullanılır. Direkt somatik embriyogenesis, somaklonal

varyasyon oluşturma şansının düşük olması nedeniyle klonal çoğaltım için daha çok tercih edilir.

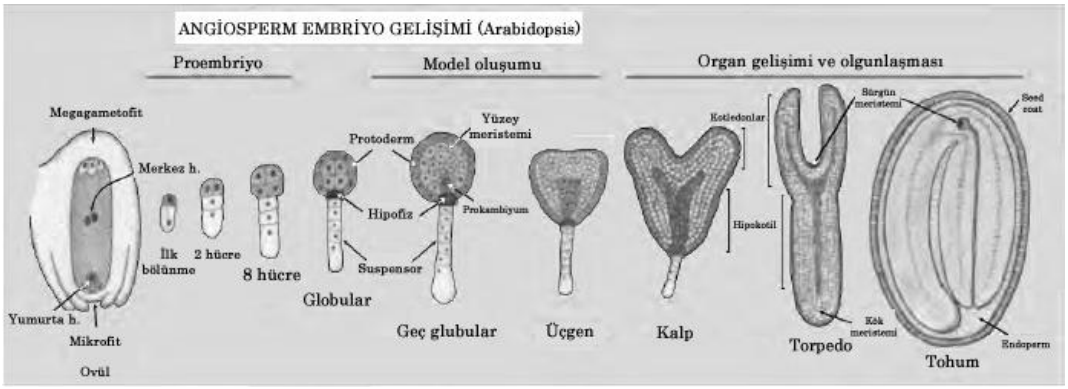
1.10.2. İndirekt embriyogenesis

İndirekt somatik embriyogenesiste önce kallus oluşur. Daha sonra bu kallustan somatik embriyolar oluşur. Somatik embriyo oluşturan kallusa embriyogenik kallus adı verilir. Embriyogenik kallusları elde etmek için kültüre alınacak eksplant öncelikle yüksek konsantrasyonlarda oksin içeren besi ortamına alınır. Embriyogenik hücreler; hızlı bölünen, büyük çekirdekli, yoğun sitoplazma içeriğine sahip, küçük vakuollü hücrelerdir. İndirekt somatik embriyogenesis, bazen istenilen somaklonal varyantların seleksiyonu ve transgenik bitkilerin üretimi için kullanılır.

1.11. Angiospermlerde Embriyo Gelişim Evreleri

Angiospermlerde embriyo gelişimi iki temel gruba ayrılabilir;

1. *Sensu stricto* embriyogenesis, zigotla başlar ve kotiledon evrede biter. Gelişme globular, kalp, torpedo ve kotiledon evrelere ayrılabilir: (Şekil 1.4.) [69,84]



Şekil 1.4. Bir angiosperm olan *Arabidopsis*'te embriyo gelişimi

* Zigotun asimetrik bölünmesiyle küçük bir apikal hücre ve geniş bir bazal hücre meydana gelir.

* Spesifik model oluşumu globular embriyoda meydana gelir.

* Kotiledon evreye geçiş, kök primordiyumlarının başlangıcına ve diğer uçta sürgün primordiyumlarına rastlanır.

2. Embriyonun olgunlaşmasını çimlenme takip eder.

1.12. Apocynaceae Familyasına Ait Bitkilerde Somatik Embriyogenesis ve Sentetik Tohum Üretimi Üzerine Çalışmalar

Tremouillaux ve diğ. (1991), *Rauvolfia vomitoria*'nın sürgün kültürlerinin yaprak protoplastlarından somatik embriyogenesis elde etmişlerdir. İzole ettikleri mezofil protoplastları 4,5µM 2,4-D+5,4µM NAA+0,4µM BAP+0,5µM K içeren Murashige ve Tucker sıvı besiyerinde kültüre almışlardır. 6-8 hafta sonra oluşan kallus ortamında proembriyoları gözlemlemişlerdir ve bunları katı besiyerine transfer etmişlerdir. Kalluslardan sürgünler üretilmiş fakat kök gözlemlenmemiştir. Somatik embriyoları geliştirmeyi başarmışlardır. Embriyogenik kallusların ya da primer embriyoların direkt çimlenmesi aracılığıyla bitkicikler elde edilmiştir [70].

Kumar (1992), Apocynaceae familyasına ait tıbbi bir ağaç olan *Thevetia peruviana*'da somatik embriyogenesis aracılığıyla bitkicik rejenerasyonunu başarmıştır. Öncelikle 9µM 2,4-D ve 4,6µM K içeren MS besiyerinde genç yaprak disklerinin kültüründen kallusları elde etmiştir ve bunu takiben yüksek oranda sitokinin muamelesi aracılığıyla çok miktarda somatik embriyo üretmiştir. 50mg embriyogenik kallustan ortalama 40-50 bitkicik elde etmiştir [71].

Kim ve diğ. (1993), *Catharanthus roseus*'la yaptıkları çalışmada anterlerden kurdukları hücre süspansiyon kültürlerden somatik embriyo elde etmişler ve bu somatik embriyoların çoğunu bitkiciğe dönüştürmeyi başarmışlardır. Anterleri 1mg/l NAA ve 0,1mg/l K içeren MS besiyerinde kültüre alarak kallus oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Katı besiyerinde ikinci alt kültüre alarak embriyogenik kallus oluşturmuşlar ve bunları sıvı besiyerine alarak süspansiyon kültürü başlatmışlardır. Hücreler 14 günde bir alt kültürlerine aldıktan sonra temel besiyeri içeren ortama aktarmışlardır ve %80 oranında somatik embriyo oluşturmuşlardır. Bu embriyolardanda bitkicikleri geliştirmişlerdir [72].

Yine Kim ve diğ. (2003), *Catharanthus roseus*'la yaptıkları diğer bir çalışmada hücre süspansiyon kültürü ile olgunlaşmamış zigotik embriyolardan embriyogenik kallus elde etmiş ve bunlardan bitkicik rejenerasyonunu geliştirmiştir. 4,2 µM 2,4-D ile hazırlanmış MS ortamına aldıkları olgunlaşmamış zigotik embriyolardan 8 hafta

sonra %20 oranında kırılgan kallus elde etmişlerdir. MS temel besiyerinde alt kültüre aldıkları kalluslardan sarımsı kompakt embriyogenik kallusları gözlemlemişler ve 4 haftada aynı besi ortamında bir alt kültüre aldıkları embriyogenik kalluslardan çok miktarda somatik embriyo elde etmişlerdir. 4,52 µM 2,4-D ile hazırlanmış sıvı MS besiyerlerinde embriyogenik kalluslarla hücre süspansiyon kültürlerini kurmuşlardır. Kurdukları hücre süspansiyon kültürlerinden MS temel besiortamına aktardıkları embriyolardan %56,7 oranında bitkicik gelişimini sağlamışlardır [73].

Sudha ve Seeni (2005), nadir tıbbi bir bitki olan *Rauvolfia micrantha*'da *in vitro* koşullarda tuz içeriği yarı yarıya azaltılmış MS ortamına %3 sükroz, 100 mg/l myo-inositol ve 0,5 mg/l NAA ekleyerek 6 haftada büyüttükleri sürgünlerin köklerinden direkt somatik embriyogenesis oluşumunu başarmışlardır.Kök segmentlerini 0,1 mg/l NAA ve 0,2 mg/l BAP altında 16 saat ışık periyodunda inkübe ettiklerinde maksimum somatik embriyo oluşumunun %39, aynı besi ortamında önce 4 hafta karanlıkta daha sonra 16 saat ışık periyodunda inkübe ettiklerinde ise %63 oranında somatik embriyo oluşumunu gözlemlemişlerdir. Geliştirdikleri embriyoları bitkiciklerin oluşması için 0,1 mg/l BA ile 0,05 mg/l NAA içeren yarı güçlü MS ortamına aktarmışlar ve gelişen bitkiciklerin %80'i hayatta kalmayı başarmıştır [74].

Nishitha ve diğ. (2006), tıbbi önemi olan *Chonemorpha grandiflora*'nın enkapsülasyonunu ve mikro çoğaltımını yapmışlardır.13,3 µM BA ve 2,46 µM IBA il kombine edilmiş besi ortamında sürgün indüklemesinin en iyi olduğunu gözlemlemişlerdir. Kök indüklemesi için ise diğer oksinlerden en etkili olanının IBA olduğunu bulmuşlardır. IBA ile birlikte ortama gümüş nitrat eklediklerinde kök sayısının, uzunluğunun ve dallanmasının arttığını görmüşlerdir. Sürgünleri 0,49 µM IBA ve 11,7 µM gümüş nitrat içeren MS ortamında enkapsüle etmişler ve %95 bitkiciklere dönüştüğünü görmüşlerdir. %90 oranında bitkicik hayatta kalmıştır [75].

Faisal ve diğ. (2006), *Rauvolfia tetraphylla*'nın mikro sürgünlerinin alginatla enkapsülasyonundan *in vitro* bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. MS besiyeri içeren kalsiyum alginat hidrojelde *in vitro* kültürlerden elde ettikleri nodal segmentleri kaplamışlardır. 10 µM BA ve 0,5 µM NAA ile kombine edilmiş MS besi ortamında enkapsüle edilmiş tomurcuklar en iyi sürgün gelişimini göstermiştir. Enkapsüle edilen nodal segmentler ayrıca $+4^0$C soğukta, beş farklı periyotta, 1-8

hafta depolanarak rejenerasyon potansiyelleri değerlendirilmiştir. Soğukta 4 hafta depolanan enkapsüle edilmiş sürgünlerde en iyi gelişim gözlenmiş olup bu oran %86,7 olarak hesaplanmıştır. Rejenere olan sürgünler kök oluşumu için 0,5 IBA içeren MS ortamına transfer edilmiştir. Sürgün ve kökleri gelişen bitkicikleri toprağa aktarmışlardır [76].

Junaid ve diğ. (2006), *Catharanthus roseus*'da somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonunu yapmıştır. 1,0 ve 2,0 mg/l 2,4-D ya da klorofenoksiasetik asit (CPA) ile birleştirilmiş MS besi ortamında hipokotil eksplantından embriyogenik kallus başlatmışlardır. NAA ile birleştirilmiş MS besiyerinde 2 hafta içinde primer kallustan çok sayıda somatik embriyo indüklenmiştir. Embriyo çoğaltımı BAP eklenmiş besiyerinde çok hızlıdır. Olgun yeşil embriyolar 1,0 mg/dm^3(GA_3) ile hazırlanmış besiyerine transfer edildiğinde gelişmiş ve çimlenmiştir. Kotiledon yapraklı embriyolar kök gelişimleri için farklı oksinlerle muamele edilmiştir. *Ex vitro* transferden önce bitkicikler %3 sükroz ve 0,5 mg/dm^3 BAP içeren yarı güçlü MS içinde 2 hafta süreyle kültüre alınmıştır [77].

Junaid ve diğ. (2009), *Catharanthus roseus* L. (G) Don.'un bitkiciklerinden elde edilen *in vitro* ve *ex vitro* somatik embriyolarda vinkristin verimi taranmıştır. Vinkristinin nicel tahmini çeşitli *in vitro* olgun dokularda kalluslar (embriyogenik ve embriyogenik olmayan kallus), embriyogenik aşamalar (çoğalma, olgunlaşma ve embriyoların çimlenmesi), bitkiciklerden elde edilen somatik embriyo (yaprak, kök ve tüm bitki) ve *ex vitro* gelişen bitkiciklerin yapraklarında yüksek performanslı sıvı kromotografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *İn vitro* ve *ex vitro* geliştirilen dokularda verim 30 hafta süreyle takip edilmiştir. Erken bir gecikme dönemi hariç olmak üzere, vinkristin üretimi eski bitki örneklerinde 20-25 hafta olarak belirlenmiştir. Vinkristin içeriği çimlenmiş embriyolar ve yaprak kalluslarında çok yüksektir. *İn vitro* büyütülen bitkilerin yaprakları benzer yaş *ex vitro* gelişen yapraklarla karşılaştırıldığı zaman yüksek miktar vinkristin içerdiği gözlenmiştir [78].

Singh ve diğ. (2009), nesli tükenmekte tıbbi bir bitki olan *Rauvolfia serpentina*'da somatik embriyogenesis ve *in vitro* rejenerasyonu başarmıştır. Genç yaprak eksplantları farklı büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarını içeren MS besi

ortamına transfer edilmiştir. BAP (1,0-3,0) ve IAA (0,1-0,5)'in çeşitli kombinasyonları arasında kallus başlatma yoğunluğu BAP (2,5)+IAA (2,0) mg/l ve BAP (1,0)+IAA (0,5) mg/l'de en yüksek bulunmuştur. Kallus başlatma sıklığı en yüksek %77,77 olarak BAP (1,0) + IAA (0,5) mg/l' de bulunmuştur. BAP ve IAA'in çeşitli kombinasyonları arasında sürgün rejenerasyonu sıklığı en yüksek %75 olarak BAP (2,5)+IAA (0,4) mg/l'te bulunmuştur. Sürgün uzaması için 1 ppm GA_3kullanılmıştır ve bu en iyi sonucu vermiştir. Sürgünler kök rejenerasyonu için bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besi ortamına transfer edilmiştir (2,5 mg/l BAP+0,3-0,5 mg/l IAA+0,3-0,5 mg/l NAA). Kök rejenerasyonu sıklığı %100 olarak 2,5 mg/l BAP+0,5 mg/l IAA+0,5 mg/l NAA içeren MS besi ortamında bulunmuştur. Köklenen bitkicikler aklimatizasyon için steril toprağa aktarılmıştır ve bu bitkiciklerden %67 oranında başarı sağlanmıştır [79].

Alatar ve Fasial (2012), *Rauvolfia tetraphylla*'nın mikro sürgünlerini sentetik tohum gibi kaplamış ve bunlarda RAPD ve ISSR markırlarını kullanarak genetik bağlılığı değerlendirmiştir. *Rauvolfia tetraphylla*'nın sentetik tohumları 100 mM kalsiyum klorit ve WPM ile hazırlanan %3'lük sodyum alginat karışımı kullanılarak *in vitro* mikro sürgünlerin çoğaltımı sağlanmıştır. Sentetik tohumlarda farklı besiyerlerinin etkileri, in vitro morfojenik cevapları değerlendirilmiştir. Enkapsüle tomurcukların bitkiciklere dönüşümü 6 hafta sonra maksimum olarak %90,3'tür ve 7,5 µM 6-benziladeni ve 2,5 µM NAA içeren WPM besiyerinde başarılmıştır. Enkapsüle edilen nodal segmentlerden 1-8 hafta arası $+4^0$C'de depolananlar bitkiciğe dönüşümde başarı göstermiştir. Sağlıklı kök oluşumu bitkiciklerin 0,5µM IBA içeren MS besi ortamına transfer edildiğinde başarılmıştır. Depolanan sentetik tohumlardan oluşan bitkiciklerin morfolojik olarak anaç bitkiyle benzer olduğu görülmüştür. Sentetik tohumlardan elde edilen bitkiciklerin genetik açıdan değerlendirilmiş ve RAPD ve ISSR analizleri anaç bitki ile karşılaştırılmıştır. Anaç bitki ve rejenere olan bitkicikler arasında RAPD ve ISSR profillerinde bir değişiklik gözlenmemiştir [80].

Faisal ve diğ. (2012), *Rauvolfia serpentina*'da $+4^0$C'de depolanan sentetik tohumlardan büyüyen *in vitro* bitkiciklerde genetik bağlılığı değerlendirmiştir. Sentetik tohumlar 100 mM kalsiyum klorit ve WPM ile hazırlanan %3'lük sodyum alginat karışımı kullanılarak *in vitro* mikro sürgünlerin çoğaltımı sağlanmıştır. Enkapsüle edilen nodal segmentlerin bitkiciğe dönüşüm yetenekleri $+4^0$C'de 1, 2, 4,

6 ve 8 hafta depolandıktan sonra değerlendirilmiştir ve enkapsüle edilmeyenlerle karşılaştırılmıştır. MS, B5, WPM, SH gibi farklı besiyerlerinin bitkiciğe dönüştürme etkileri incelenmiştir. Enkapsüle edilen nodal segmentlerin maksimum olarak bitkiciğe dönüşümü 4 hafta $+4^0$C'de depolananda ve 5,0 µM 6-benziladenin ve 1,0 µM NAA eklenen WPM besiyerinde başarılmıştır. Bitkiciklerde köklenme0,5 µM IBA içeren yarı güçlü MS sıvı besi ortamında başarılmıştır. Depolanan sentetik tohumlardan oluşan bitkiciklerin morfolojik olarak anaç bitkiyle benzer olduğu görülmüştür. Sentetik tohumlardan elde edilen bitkiciklerin genetik açıdan değerlendirilmiş ve RAPD ve ISSR analizleri anaç bitki ile karşılaştırılmıştır. Anaç bitki ve rejenere olan bitkicikler arasında RAPD ve ISSR profillerinde bir değişiklik gözlenmemiştir [81].

Literatürde bu türün doku kültürü ile çoğaltımı üzerine somatik embriyogenesis ve sentetik tohum üretimi üzerine yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında kullanılan bitki materyali, Kocaeli Üniversitesi Umuttepe Yerleşkesi içerisinde bulunan, *Amsoniaorientalis*'in Türkiye'de doğal yayılış gösterdiği tüm lokalitelerden toplanmış bireylerinin koruma altına alındığı özel koruma parselindeki bireylerden alınan eksplantların *in vitro* koşullarda çoğaltılması sonucunda oluşan bitkiciklerden sağlandı.

2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

• Hassas Terazi (AND GR-200)

• pH Metre (OhausStarter 3000 BenchpHMeter)

• Isıtıcılı Magnetik Karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standard)

• Laminar-Hava Akışlı Kabin (Tez-San Class II)

• Bitki Büyütme Kabini (Sanyo MCR-351H)

• Otoklav (HMC Hi-clave HG-80)

• Distile Su Cihazı (GFL 2001/4)

• Mikropipet (20µM, 200µM, 1000µM) (Eppendorf)

• Buzdolabı (+4ºC) (Arçelik 5243 NEB)

• Vakum Filtrasyon Sistemi (SartoriusMillipore)

• Mikrodalga fırın (Arçelik)

•Kabin İçi Sterilizatörü (LabAssociates)

• Çalkalamalı inkübatör (New Bruswick Innova 42R)

• Şırınga Filtre

2.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Madde Adı	**Üretici Firma**	**Katalog No**
Murashige&Skoog Bazal Tuz Karışımı	Duchefa	M0222
2,4-Diklorofenoksiasetik asit	Sigma	D7299
1-Naftalenasetik asit	Sigma	N0640
Dicamba	Duchefa	D0920
6-Benzilaminopürin	Duchefa	B0904
2,4,5-T Potasyum	Duchefa	T0915
Thidiazuron	Duchefa	T0916
İndol-3-asetik asit	Fluka	57333
Sodyum alginat	Duchefa	S1320
L-glutamin	Merck	3520
Kinetin	Sigma	K3378
Pürin ribosid	Duchefa	D0934
Aktif kömür	Duchefa	C1302
Kanamisin monosülfat	Duchefa	K0126
D-mannitol	Duchefa	M0803
Sükroz	Duchefa	S0809

Tablo 2.1. (Devam) Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Plant Agar	Duchefa	P1001
Tween 20	Duchefa	P1362
Sodyum hidroksit	Sigma	S8045
Hidroklorik asit	Sigma	H1758
Etanol	Tek-Kim	TK.200655
Sodyum hipoklorit	Unilever	-
Kalsiyum klorit	Bio Basic Inc.	CD0050

2.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltileri ve Hazırlanması

50 ml 2,4-D stok çözeltisi hazırlamak için hassas terazide bir miktar folyo üzerinde 50 mg 2,4-D'den tartıldı. Tartılan 2,4-D 100 ml hacimli kapaklı şişeye konuldu. Üzerine çözücüsü olan EtOH'tan 3 ml eklenerek çözünmesi sağlandı. Oluşan çözeltinin üzeri distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Böylece çözeltinin her mililitresinde 1 mg 2,4-D bulunması sağlandı. Diğer tüm BBD'lerinin stok solüsyonlarının hazırlanmasında da aynı yöntem kullanıldı. Işığa hassasiyetlerinin olup olmayacağı göz önünde bulundurularak şişelerin etrafı alüminyum folyo ile sarıldı. Tüm BBD stok çözeltileri +4°C'de saklandı ve her iki ayda bir yenilendi.

(i) 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ana solüsyonu:

2,4-D	50mg
EtOH	3ml
dH_2O	47ml

(ii) 2,4,5-T Potasyum (2,4,5-T) ana solüsyonu:

2,4,5-T	50mg
EtOH	3ml
dH_2O	47ml

(iii) 6-Benzilaminopürin (BAP) ana solüsyonu:

BAP	50mg
EtOH	3ml
dH_2O	47ml

(iv) 1-Naftalenasetik asit (NAA) ana solüsyonu:

NAA	50mg
EtOH	3ml
dH_2O	47ml

(v) Kanamisin monosülfat ana solüsyonu:

Kanamisin	50mg
EtOH	3ml
dH_2O	47ml

(vi) Thidiazuron (TDZ) ana solüsyonu:

TDZ	50mg
EtOH	3ml
dH_2O	47ml

2.5. Besi Ortamı ve İçeriği

Deneysel çalışmalarda besi ortamı olarak Murashige&Skoog tarafından önerilen MS besi ortamı kullanıldı. Kullanılan besi ortamı %3 sükroz ve farklı kombinasyon ve konsantrasyonlardaki çeşitli Bitki Büyüme Düzenleyiciler (BBD), aminoasitler ve vitaminler ile desteklendi, %0,7 agar ile katılaştırıldı. MS besi ortamının içeriği Tablo 2.2.'de belirtilmiştir.

Tablo 2.2. MS besi ortamının içeriği

Bileşenler	**Besi ortamlarındaki konsantrasyon (mg/l)**
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
$NH_4H_2PO_4$	-
$(NH_4)_2SO_4$	-
$MgSO_4.7H_2O$	370
$CaCl_2.2H_2O$	440
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-
KCl	-
KH_2PO_4	170
$NaH_2PO_4.H_2O$	-
NaH_2PO_4	-
Na_2SO_4	-
$MnSO_4.H_2O$	-
$MnSO_4.4H_2O$	22,3
KI	0,83
H_3BO_3	6,2
$ZnSO_4.7H_2O$	8,6
$CuSO_4.5H_2O$	0,025

Tablo 2.2. (Devam) MS besi ortamının içeriği

Bileşenler	**Besi ortamlarındaki konsantrasyon (mg/l)**
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25
$CoCl_2.6H_2O$	0,025
$FeSO_4.7H_2O$	27,8
$Fe_2(SO_4)_3$	-
Na_2EDTA	37,3
Nikotinik asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5
Thiamin-HCl	0,1
Biotin	-
Folik asit	-
myo-inositol	100
l-inositol	-
Glisin	2
Sakkaroz	30 000

2.6. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Besi Ortamları

Bu tez çalışmasında öncelikle doğal ortamlarında bulunan bitkilerden alınan nodal eksplantlardan *in vitro* bitkicik çoğaltımı yapıldı. Acemi ve ark., (2012) yaptığı bir çalışmaya göre her eksplant için en yüksek sürgün sayısı 1,0mg/l BAP ortamında elde edilmiştir. Acemi ve ark. belirttiği yöntemegöre bitkilerden alınan nodal eksplantlar 1,0mg/l BAP içeren besi ortamına aktarıldı. Gelişen bitkiciklerden yaprak eksplantları alınarak farklı büyüme düzenleyici içeren ortamlarına transfer edildi. Çalışmada kallus oluşturma ortamı olarak 2,4-D + BAP, NAA + BAP, 2,4-D, 2,4,5-T, Dicamba + 2,4-D, 2,4,5-T + Pürin ribosid + L-Glutamin kombinasyonlarının farklı konsantrasyonları kullanıldı. Bu denemelerde ayrıca herhangi bir BBD içermeyen MS besi ortamı ve tek başına 3 farklı BAP konsantrasyonu kullanıldı.

Tablo 2.3. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 1. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Besi ortamı içeriği	**Besi ortamı kodu**		
	MS1	**MS2**	**MS3**
MS	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l
Sükroz	30g/l	30g/l	30g/l
2,4-D	2,0mg/l	2,0mg/l	1,0mg/l
BAP	0,5mg/l	1,0mg/l	2,0mg/l
pH	5,7±1	5,7±1	5,7±1
Agar	7g/l	7g/l	7g/l

Tablo 2.4. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 2. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Besi ortamı içeriği	**Besi ortamı kodu**				
	MS4	**MS5**	**MS6**	**MS7**	**MS8**
MS	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l
Sükroz	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l
NAA	0,1mg/l	1,0mg/l	2,0mg/l	1,0mg/l	2,0mg/l
BAP	0,1mg/l	3,0mg/l	0,5mg/l	1,0mg/l	1,0mg/l
pH	5,7±1	5,7±1	5,7±1	5,7±1	5,7±1
Agar	7g/l	7g/l	7g/l	7g/l	7g/l

Tablo 2.5. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 3. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Besi ortamı içeriği	**Besi ortamı kodu**			
	MS9	**MS10**	**MS11**	**MS12**
MS	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l
Sükroz	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l
2,4-D	1,0mg/l	6,0mg/l	8,0mg/l	10 mg/l
pH	5,7±1	5,7±1	5,7±1	5,7±1
Agar	7g/l	7g/l	7g/l	7g/l

Tablo 2.6. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 4. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Besi ortamı içeriği	**Besi ortamı kodu**					
	MS13	**MS14**	**MS15**	**MS16**	**MS17**	**MS18**
MS	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l
Sükroz	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l
2,4,5-T	0,5mg/l	1,0mg/l	2,0mg/l	4,0mg/l	8,0mg/l	10 mg/l
pH	5,7±1	5,7±1	5,7±1	5,7±1	5,7±1	5,7±1
Agar	7g/l	7g/l	7g/l	7g/l	7g/l	7g/l

Tablo 2.7. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 5. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Besi ortamı içeriği	**Besi ortamı kodu**	
	MS19	**MS20**
MS	4,4g/l	4,4g/l
Sükroz	30g/l	30g/l
Dicamba	2,0mg/l	4,0mg/l
2,4-D	2,0mg/l	8,0mg/l
pH	5,7±1	5,7±1
Agar	7g/l	7g/l

Tablo 2.8. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 6. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Besi ortamı içeriği	**Besi ortamı kodu**		
	MS21	**MS22**	**MS23**
MS	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l
Sükroz	30g/l	30g/l	30g/l
2,4,5-T	0mg/l	0,5mg/l	2,0mg/l
Pürin ribosid	0mg/l	0,1mg/l	0,5mg/l
L-Glutamin	5g/l	5g/l	5g/l
Aktif kömür	5g/l	5g/l	5g/l
pH	5,7±1	5,7±1	5,7±1
Agar	7g/l	7g/l	7g/l

Tablo 2.9. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 7. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Besi ortamı içeriği	**Besi ortamı kodu**	
	MS24	**MS25**
MS	4,4g/l	4,4g/l
Sükroz	30g/l	30g/l
BAP	0,5mg/l	1,0mg/l
pH	5,7±1	5,7±1
Agar	7g/l	7g/l

Tablo 2.10. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 8. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Besi ortamı içeriği	**Besi ortamı kodu**	
	MS26	**MS27**
MS	4,4 g/l	4,4 g/l
Sükroz	30 g/l	30 g/l
NAA	0,2 mg/l	0 mg/l
2,4-D	0,5 mg/l	0,5 mg/l
K	0 mg/l	1,0 mg/l
pH	5,7±1	5,7±1
Agar	7 g/l	7 g/l

Tablo 2.11. Çalışmada yaprak eksplantından kallus oluşumu için 9. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Besi ortamı içeriği	**Besi ortamı kodu**	
	MS28	**MS29**
MS	4,4 g/l	4,4 g/l
Sükroz	30 g/l	30 g/l
TDZ	1,0 mg/l	0 mg/l
IAA	0,5 mg/l	0,5 mg/l
BAP	0 mg/l	1,0 mg/l
Aktif kömür	5 g/l	5 g/l
L-Glutamin	5 g/l	5 g/l
pH	5,7±1	5,7±1
Agar	7 g/l	7 g/l

Yukarıda verilen besi ortamlarında meydana gelen embriyogenik kalluslar ve globular safhadaki somatik embriyolar için olgunlaştırma ortamı olarak kanamisin monosülfat, ABA, GA_3 ve D-Mannitol'ün farklı konsantrasyonları kullanıldı.

Tablo 2.12. Çalışmada somatik embriyoları olgunlaştırmak için 1. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Ortam içeriği	**Olgunlaştırma Ortamı Kodu**			
	K1	**K2**	**K3**	**K4**
MS	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l
Sükroz	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l
Kanamisin	20µg	50µg	100µg	200µg
pH	5,7±1	5,7±1	5,7±1	5,7±1
Agar	7g/l	7g/l	7g/l	7g/l

Tablo 2.13. Çalışmada somatik embriyoları olgunlaştırmak için 2. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Ortam içeriği	**Olgunlaştırma Ortamı Kodu**			
	M1	**M2**	**M3**	**M4**
MS	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l
Sükroz	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l
Mannitol	%1,5	%3,0	%4,5	%5,5
pH	5,7±1	5,7±1	5,7±1	5,7±1
Agar	7g/l	7g/l	7g/l	7g/l

Tablo 2.14. Çalışmada somatik embriyoları olgunlaştırmak için 3. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Ortam içeriği	**Olgunlaştırma Ortamı Kodu**			
	A1	**A2**	**A3**	**A4**
MS	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l
Sükroz	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l
ABA	0µM	10µM	30µM	50µM
pH	5,7±1	5,7±1	5,7±1	5,7±1

Tablo 2.15. Çalışmada somatik embriyoları olgunlaştırmak için 4. denemede kullanılan ortam ve içerikleri

Ortam içeriği	**Olgunlaştırma Ortamı Kodu**			
	G1	**G2**	**G3**	**G4**
MS	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l	4,4g/l
Sükroz	30 g/l	30g/l	30g/l	30g/l
GA_3	0ml	0,5ml	1,0ml	2,0ml
pH	5,7±1	5,7±1	5,7±1	5,7±1

2.7. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Çalışmalarda MS tuzları ile hazırlanmış ortamlar kullanıldı. Öncelikle hangi hacimde besi ortamı hazırlanacaksa bu hacmin yarısı kadar distile su bir mezür yardımıyla ölçüldü ve kapaklı bir şişeye aktarıldı. Daha sonra bu kapaklı şişe manyetik karıştırıcı üzerine konulup içine bir adet manyetik balık atıldı. Hassas terazide bir parça alüminyum folyo üzerinde tartılan MS tuzu (4,4g/l) manyetik karıştırıcı üzerinde karışmakta olan kapaklı şişeye aktarıldı. Ardından hassas terazide tartılan

sükroz (30g/l) ilave edildi. Üzerine daha önce stok çözeltileri hazırlanmış olan BBD'lerden kullanılacak olan miktarlarda eklendi. Oluşan hacim distile su ile istenilen hacime tamamlandı ve çözeltinin pH'ı 0,5 N HCl ve 0,5 N NaOH ile 5,7±1'e ayarlandı. Son olarak katılaşmayı sağlamak amacıyla ortama agar (7g/l) eklendi. Hazırlanan besi ortamları hazırlandığı hacim göz önüne alınarak 121^0C'de 1,2 kg/cm^2basınç altında aşağıda verilen sıvı hacmine göre otoklav sürelerinde otoklavda steril edildi (Tablo 2.14).Sıcaklıkla bozulabilecek kimyasallar şırınga filtresi ile steril edildi.

Tablo 2.16. Sıvı hacmine göre otoklav süreleri

Kap Cinsi	**Sıvı Hacmi**	**Süre (d)**
Test tüpleri	5-15 ml	15
50 ml erlen	250-350 ml	20
1 l erlen	500-750 ml	25
2 l erlen	1-1,5 l	30
5 l erlen	2-3 l	35

Otoklavlanan besi ortamları steril kabin içerisine alındı. El yakmayacak kadar soğuduktan sonra bek alevi yanında 90 × 15mm'lik steril petri kaplarına içerilerinde 40 ml olacak şekilde döküldü.

2.8. Eksplant Kaynağının Belirlenmesi ve Çoğaltımı

Bu çalışmada *Amsoniaorientalis*bitkisinin yaprağı başlangıç eksplantı olarak seçildi ve kullanıldı. Yaprak eksplantının seçilmesinin nedeni bu bitki ile ilgili yapılan önceki çalışmalarda yaprak eksplantının kullanılmaması ve genel olarak yapılan literatür taramasında somatik embriyogenesis için kullanılan eksplantın çoğunlukla yaprak olmasından dolayıdır.

Bitkinin *in vitro* çoğaltımı koruma parselinden alınan gövde örneklerinden yapıldı. Yüzeysel steril edilen gövdelerin nodal eksplantları bu bitki için daha önce Acemi ve ark. (2012) tarafından belirlenen en iyi çoğaltım ortamı olan 1,0 mg/l BAP besi

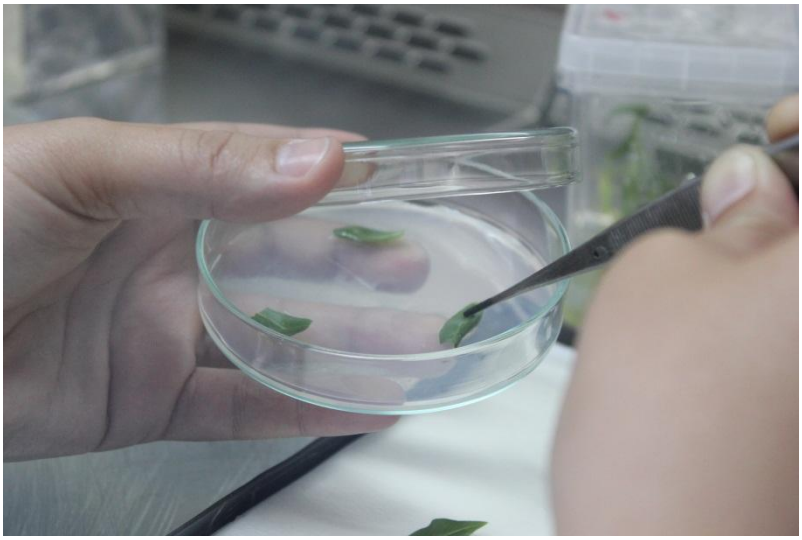
ortamına aktarıldı. Bu ortamda yaklaşık bir ay sonra bitkiciklerin gelişimi gözlendi ve bu bitkiciklerin yaprakları başlangıç eksplantı olarak kullanıldı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. 1,0 mg/l BAP besi ortamında çoğaltılan nodal eksplantlardan bitkicik gelişimi

2.9. Yaprak Eksplantının Alınması ve Besi Ortamına Aktarılması

İn vitro koşullarda oluşturulan bitkicikler, steril kabin içerisinde, steril pens ile steril kesme tablasının üzerine alındı ve steril bisturi yardımı ile yapraklar bitkicikten ayrıldı. Her bir yaprağın alt ve üst uçları kesildi. Yaprağın alt kısmı çevrildi ve damar çizgisi üzerine steril bisturi ile çizikler atıldı. Her petri kabının içerisinde 5 eksplant olacak şekilde besi ortamlarına aktarıldı (Şekil 2.2.). Çalışma 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Eksplantların kültüre alınması işlemi bittiğinde her bir petri kabının etrafı parafilm ile sarıldı. Son olarak üzerine kombinasyon, kültür tarihi ve tekrar numarası yazılarak bitki büyütme kabinine kaldırıldı.



Şekil 2.2. Yaprak eksplantının besi ortamına aktarılması

2.10. Kültür Ortamının İklimsel Şartları

Tüm kültürler 23 ± 0,5 ^{0}C kabin içi sıcaklıkta, %65 nispi nemde, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarda inkübe edildi. Gün ışığını ve gün içinde değişen ışık şiddetini yansıtması açısından kabin içi ışıklandırma yoğunluğu zaman periyoduna göre 3 kademe olarak ayarlandı. Sabah 05:00'dan 12:00'a kadar olan 7 saatlik zaman diliminde cihazın 3 lambası, 12:00'dan 16:00'a kadar olan 4 saatlik zaman diliminde cihazın 9 lambası, 16:00'dan 21:00'a kadar olan 5 saatlik zaman diliminde ise cihazın 3 lambası ve 21:00'dan sabah 05:00'a kadar olan8saatlik zaman diliminde ise cihazın hiçbir lambası açık olmayacak şekilde kullanıldı. Işık yoğunluğu her kademede cihaz tarafından otomatik olarak ayarlandı. Kültürler 4 haftada bir kez yeni besi ortamına aktarıldı. Alt kültürler boyunca elde edilen kalluslara ait gözlemler kaydedildi.

2.11. Yaprak Eksplantlarından Kallus İndüksiyonu

Bitki büyütme kabinine yerleştirilen kültürler periyodik olarak binoküler mikroskop altında incelendi. Kallus oluşturan ve oluşturmayan eksplantlar sayıldı. Kallus oluşumu hiç görülmeyen ortamlar belirlendi.

2.12. Yaprak Eksplantlarından Embriyogenik Kallus Elde Edilmesi

Yaprak eksplantlarının kültüre alınması sonucu farklı konsantrasyonlardaki 2,4,5-T ortamlarında embriyogenik kalluslar gözlendi. Bu ortamlarda gözlenen embriyogenik kalluslar alt kültürlere alınarak çoğaltıldı. Alt kültürlere inildikçe embriyogenik yapı daha fazla görüldü.

2.13. Elde Edilen Kalluslardan Embriyogenik Kallus Elde Edilmesi

Kültüre alınan yaprak eksplantlarından meydana gelen kalluslardan embriyogenik kallus elde etmek için oluşan kallus ortamları herhangi bir büyüme düzenleyici içermeyen MS besi ortamında (kontrol), 1,0 mg/l BAP ve 0,5 mg/l BAP içeren ortamlarda kültüre alındı.



Şekil 2.3. 4,0 mg/l Dicamba + 2,0 mg/l 2,4-D ortamında gelişen kallusların MS ortamına aktarımı sonucu görülen embriyogenik kallus

2.14. Yaprak Eksplantlarında Kallus İndüksiyon Oranı (%)

Kültür başlangıcından 4-6 hafta sonra, kültürler alt kültüre alınmadan önce yapılan incelemeler sonunda kallus oluşturan eksplantların sayısı tespit edildi ve bu sayımlardan yararlanarak petri kutusu başına eksplantların kallus oluşturma oranlarıher bir varyant için yüzde olarak saptandı.

2.15. Yaprak Eksplantlarında Kallus Ağırlığı (mg/petri)

Her bir petri kabında oluşan kalluslar alt kültürüne alınmadan önce, steril kabin içerisine yerleştirilen 0,001 mg hassasiyetli terazi yardımıile tartıldı, petri kutusu başına ağırlıkları saptandı.

2.16. Yaprak Eksplantlarında Embriyogenik Kallus Oluşum Oranı

Kültüre alınan yaprak eksplantlarından 4-6 hafta sonra, alt kültüre alınmadan önce yapılan incelemeler sonunda embriyogenik kallus oluşturan eksplantların sayısı tespit edildi ve bu sayımlardan yararlanarak petri kutusu başına eksplantların embriyogenik kallus oluşturma oranlarıher bir varyant için yüzde olarak saptandı.

2.17. Yaprak Eksplantlarından Elde Edilen Embriyogenik Kallus Ağırlığı

Her bir petri kabında oluşan kalluslar alt kültürüne alınmadan önce, steril kabin içerisine yerleştirilen 0,1 mg hassasiyetli terazi yardımı ile tartıldı, petri kutusu başına ağırlıkları saptandı.

2.18. Embriyogenik Kalluslarda Somatik Embriyo Oluşumu

Oransal hesaplamalarıyapılıp kallus ağırlıkları alınmış olan embriyogenikkallusların bazılarında bulundukları ortamlarda globular safhalarda somatik embriyolar gözlendi. Embriyogenik kalluslardan somatik embriyo oluşumunu teşvik etmek amacıyla bu kalluslar MS besi ortamı, 0,5 mg/l BAP, 1,0 mg/l BAP ve 8,0 mg/l 2,4-D içeren besi ortamlarında veya kendi ortamlarında alt kültüre alındı.

2.19. Somatik Embriyo Gelişimi

Embriyoidleri içeren kalluslar embriyo geliştirme ortamına aktarıldı. Petri kutularıparafilm ile sarıldı ve 23 °C sıcaklık ve %65 nem düzeyine ayarlanmış bitki büyüme dolabında tekrar inkübe edildi. 4-6 haftalık kültür süresinin sonunda stereo mikroskop altında embriyo sayımları yapıldı.

2.20. Somatik Embriyo Olgunlaştırma

Somatik embriyo olgunlaştırma ortamı için 4 farklı ortam kullanıldı. Sayımları yapılan somatik embriyolar ileri safha embriyolara dönüşmeleri amacıyla

kanamisinmonosülfat, ABA, GA_3 ve mannitol'ün farklı konsantrasyonlarında alt kültüre alındı. Bu besi ortamlarına proembriyolar ve ileri safha embriyoları içeren kültürler aktarıldı. Katı ortamdaki kültürler bitki büyütme kabinine, sıvı kültürdekiler ise çalkalamalı inkübatöre konuldu ve aynı şartlarda inkübe edildi.

2.21. Somatik Embriyo Sayısı

Olgunlaştırma ortamına alınan embriyoların sayısı daha önceden belirlendi. Kültür periyodu sonunda olgunlaştırma ortamında kaç tane embriyonun oluştuğu sayım yapılarak belirlendi.

2.22. Sentetik Tohum Elde Edilmesi

Farklıaşamalardan geçirilerek elde edilen somatik embriyolar sentetik tohum elde etmek amacı ile kaplandı. Sodyum alginat'ın ve kalsiyum klorit'in farklı konsantrasyonları kullanıldı.

Tablo 2.17. Sentetik tohum elde edilmesinde kullanılan sodyum alginat ve kalsiyum klorit'in farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonları (% Alginat- mM Kalsiyum klorit)

%2'lik 25 mM	%3'lük 25 mM	%4'lük 25 mM	%5'lik 25 mM	%6'lık 25 mM
%2'lik 50 mM	%3'lük 50 mM	%4'lük 50 mM	%5'lik 50 mM	%6'lık 50 mM
%2'lik 75 mM	%3'lük 75 mM	%4'lük 75 mM	%5'lik 75 mM	%6'lık 75 mM
%2'lik 100 mM	%3'lük 100 mM	%4'lük 100 mM	%5'lik 100 mM	%6'lık 100 mM
%2'lik 200 mM	%3'lük 200 mM	%4'lük 200 mM	%5'lik 200 mM	%6'lık 200 mM

Bu amaçla 100 ml %3'lik sodyum alginat ve 100 ml 100mM'lık kalsiyum klorit çözeltisi hazırlandı. Çözeltiler otoklavda steril edildi. Steril kabin içerisinde manyetik karıştırıcı üzerine alınan sodyum alginat çözeltisi içerisine steril manyetik balık konuldu. Olgunlaşan somatik embriyolar steril bir pens yardımıyla alınarak

çözeltinin içine bırakıldı ve bir müddet karışması sağlandı. Manyetik karıştırıcı üzerine alınan kalsiyum klorit çözeltisi içerisinede manyetik balık konuldu ve 5ml'lik mikropipet aracılığıyla alınan sodyum alginatlı olgunlaşmış embriyolar karışmakta olan kalsiyum klorit çözeltisi içerisine yavaş yavaş bırakıldı. 20-30 dk. Kalsiyum klorit çözeltisi içinde karışması için beklendi. Böylece sentetik tohumlar elde edildi ve oluşan sentetik tohumlar $+4^0$C'de muhafaza edildi. 2 gün $+4^0$C'de bekletildikten sonra bir miktar sentetik tohum çimlenme özelliğinin değerlendirilmesi için MS besiyeri ortamına ekildi. Geri kalan kısım ise saklanmak üzere yeniden $+4^0$C'ye kaldırıldı.

2.23. Verilerin İstatistiksel Yönden Değerlendirilmesi

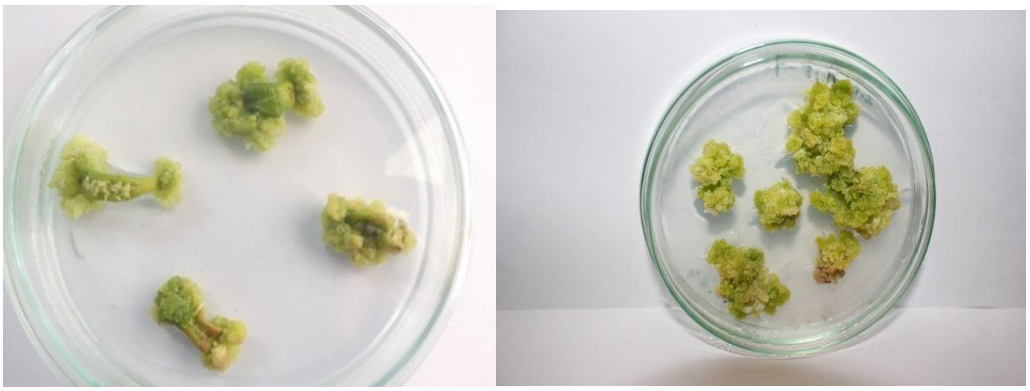
Kallus oluşturma denemeleri 3 tekrarlı olarak her denemede 5 eksplant kullanılarak gerçekleştirildi. Olgunlaştırma denemeleri 2 tekrarlı olarak ve her denemede 5'er kallus kullanılarak gerçekleştirildi.Denemeler, tesadüf blokları deneme deseni kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen verilere ANOVA testi uygulandı ve ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ayrıldı. Bu istatistik testleri SPSS 19 paket istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Elde Edilen Kallusların Ağırlık, Yapı ve Elde Edilen Somatik Embriyo Sayılarına Ait Bulgular

Yediortam haricinde diğer bütün ortamlarda %100 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir (Tablo 3.1). Ortamlar arasındaki kallus oluşturma oranları istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Besi ortamları arasında Pürin Ribosid+Aktif kömür, BAP ve L-Glutamin+Aktif kömür kombinasyonlarının yapıldığı denemelerde kallus oluşumu gözlenmemiştir.

30 farklı besi ortamı ve konsantrasyonu arasında ortalama kallus ağırlığı en fazla olan ortam MS15 (Şekil 3.1), en az olanların ise hiç kallus oluşturmayan ortamlar olan MS21, MS22, MS23, MS24, MS25, MS28 ve MS29 ortamlarının olduğu bulunmuştur. (Tablo 3.1).



Şekil 3.1. Kallus ağırlığı en fazla olan MS15 besi ortamı

Tablo 3.1. Elde edilen kallusların ortalama kallus ağırlıkları, kallus yapısı, embriyogenik kallus ve somatik embriyo verileri

Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Eksplant Sayısı	Uyarılan Eksplant	% E.S / U.E **	Ort. Kallus Ağırlığı (g) ± std.	Kallus Yapısı	Embriyogenik Kallus	Somatik Embriyo
MS0	15	15	100	$0,73^{gh} \pm 0,03$	Açık yeşil - Sert	-	-
MS1	15	15	100	$1,50^{def} \pm 0,03$	Yeşil - Sert	-	-
MS2	15	15	100	$1,49^{def} \pm 0,02$	Yeşil - Sert	-	-
MS3	15	15	100	$0,79^{gh} \pm 0,11$	Koyu yeşil - Sert	-	-
MS4	15	15	100	$0,63^{hi} \pm 0,05$	Koyu yeşil - Sert	-	-
MS5	15	15	100	$0,31^{ij} \pm 0,00$	Yeşil - Sert	-	-
MS6	15	15	100	$1,34^{ef} \pm 0,09$	Açık yeşil - Yumuşak	-	-
MS7	15	15	100	$1,12^{fg} \pm 0,06$	Koyu yeşil - Sert	-	-
MS8	15	15	100	$1,67^{de} \pm 0,19$	Koyu yeşil - Sert	-	-
MS9	15	15	100	$1,61^{de} \pm 0,21$	Açık yeşil - Yumuşak	-	-
MS10	15	15	100	$1,71^{de} \pm 0,14$	Açık kahve - Yumuşak	+	-
MS11	15	15	100	$2,69^{bc} \pm 0,25$	Beyaz - Yumuşak	-	-
MS12	15	15	100	$2,85^{b} \pm 0,23$	Açık yeşil - Yumuşak	+	-
MS13	15	15	100	$3,02^{b} \pm 0,06$	Açık yeşil - Kırılgan	+	-
MS14	15	15	100	$4,87^{a} \pm 0,23$	Açık kahve - Yumuşak	+	+
MS15	15	15	100	$4,88^{a} \pm 0,32$	Açık yeşil - Kırılgan	+	+

*Aynı harfle işaretli ortalamalar arasında P<0,05 seviyesinde farklılık yoktur.

**E.S /U.E: Eksplant Sayısı/ Uyarılan Eksplant

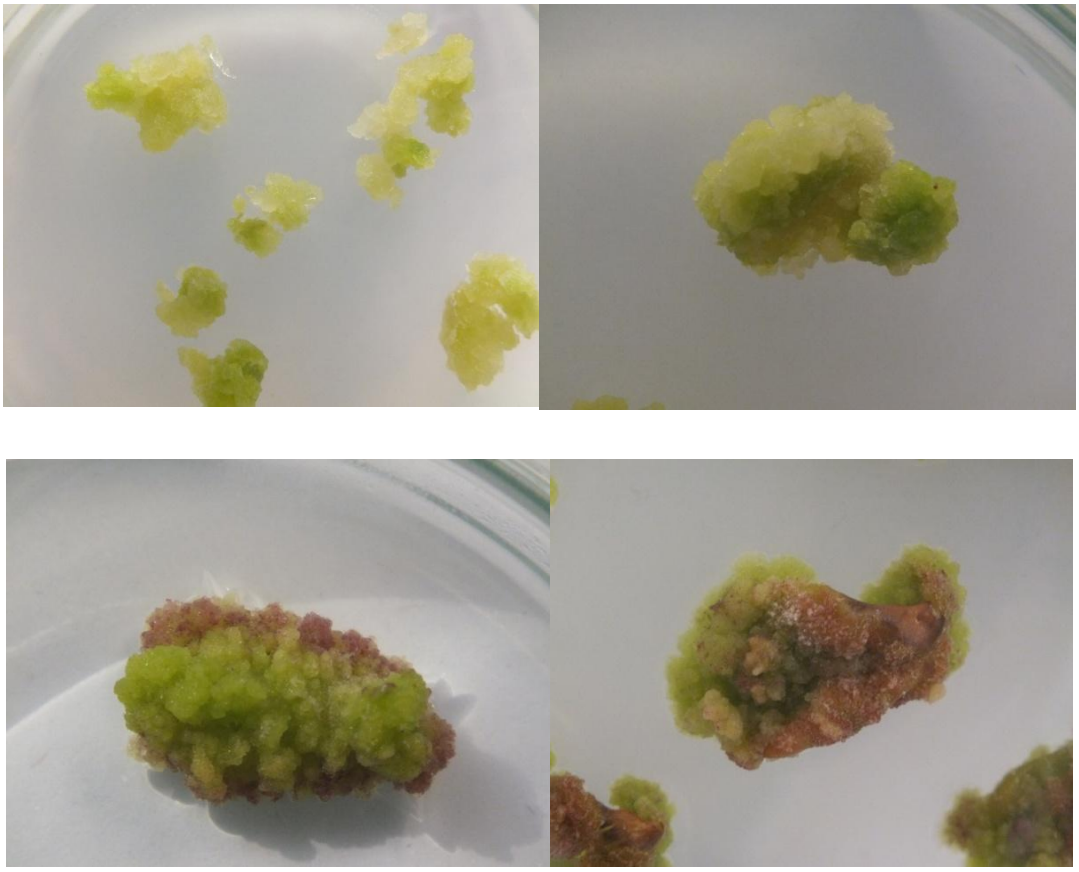
Tablo 3.1. (Devam) Elde edilen kallusların ortalama kallus ağırlıkları, kallus yapısı, embriyogenik kallus ve somatik embriyo verileri

Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Eksplant Sayısı	Uyarılan Eksplant	% E.S / U.E **	Ort. Kallus Ağırlığı (g) ± std.	Kallus Yapısı	Embriyogenik Kallus	Somatik Embriyo
MS16	15	15	100	$4,81^{a} \pm 0,27$	Açık yeşil - Kırılgan	+	+
MS17	15	15	100	$4,86^{a} \pm 0,29$	Açık yeşil / Beyaz - Yumuşak	+	+
MS18	15	15	100	$4,61^{a} \pm 0,02$	Opak - Kırılgan	+	+
MS19	15	15	100	$1,77^{c} \pm 0,00$	Yeşil - Yumuşak	-	-
MS20	15	15	100	$3,03^{b} \pm 0,11$	Açık kahve - Yumuşak	-	-
MS21	15	0	0	$0,00^{i} \pm 0,00$	-	-	-
MS22	15	0	0	$0,00^{i} \pm 0,00$	-	-	-
MS23	15	0	0	$0,00^{i} \pm 0,00$	-	-	-
MS24	15	0	0	$0,00^{i} \pm 0,00$	-	-	-
MS25	15	0	0	$0,00^{i} \pm 0,00$	-	-	-
MS26	15	15	100	$1,10^{fg} \pm 0,05$	Yeşil - Sert	-	-
MS27	15	15	100	$2,43^{a} \pm 0,16$	Beyaz - Kırılgan	-	-
MS28	15	0	0	$0,00^{i} \pm 0,00$	-	-	-
MS29	15	0	0	$0,00^{i} \pm 0,00$	-	-	-

*Aynı harfle işaretli ortalamalar arasında P<0,05 seviyesinde farklılık yoktur.

**E.S /U.E: Eksplant Sayısı/ Uyarılan Eksplant

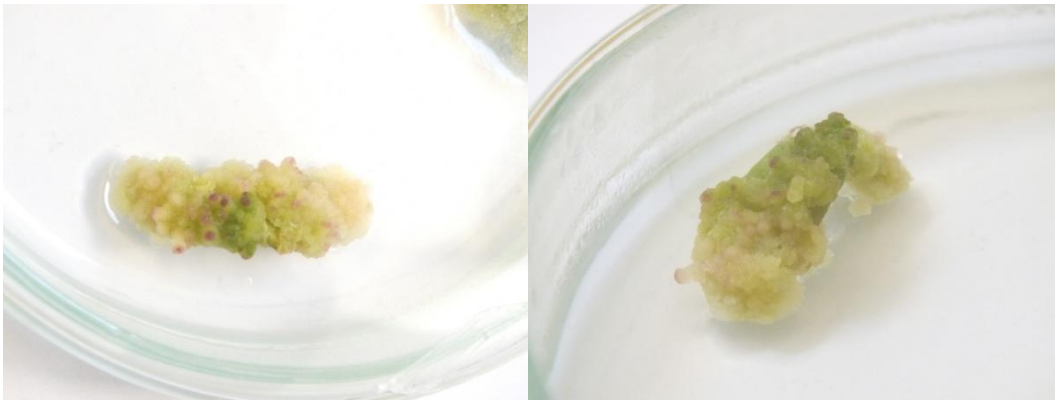
Kullanılan besi ortamı ve konsantrasyonlarında embriyogenik ve embriyogenik olmayan kallus oluşumları tespit edilmiştir. Renk ve yoğunluğuna göre farklı yapıda kallus oluşumu gözlenmesine rağmen, embriyogenik kallusların genelde açık yeşil, açık kahverengi, yumuşak ve kırılgan yapıda olduğu görülmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Embriyogenik kallusların genel görünümleri

Kırılgan kallus oluşumu gözlenen her ortamda somatik embriyo oluşumu tespit edilememiştir. Embriyogenik kallus ortalama ağırlığı en fazla olan ortamın MS15 olduğu bulunmuştur (Tablo 3.1).

Besi ortamlarının bazılarında eksplantın külüre alındığı ilk ortamında somatik embriyo oluşturmaya başladığı gözlemlenmiştir. Bunlar; MS14, MS15, MS16, MS17 ve MS18 ortamlarıdır (Şekil 3.3).



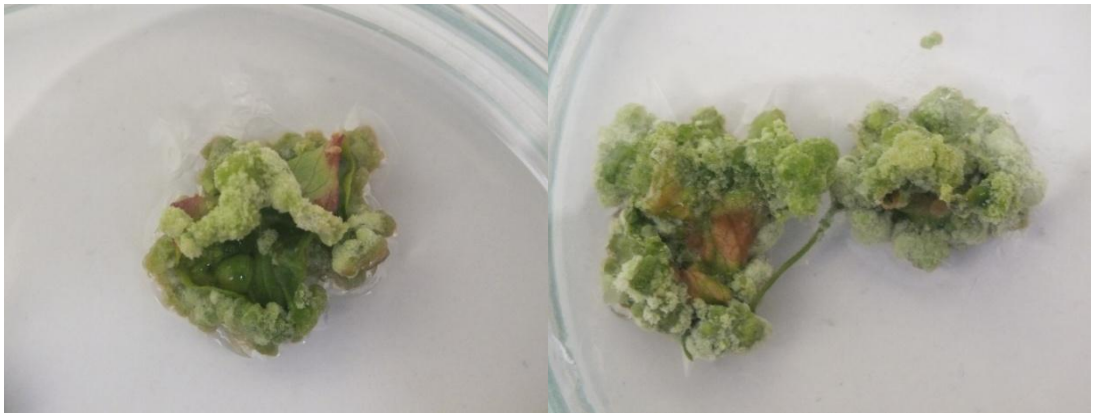
Şekil 3.3. 1,0mg/l 2,4,5-T (MS14) besi ortamında görülen direkt somatik embriyo oluşumları

MS1, MS2 ve MS3 ortamları karşılaştırıldığında ortamda sitokinin konsantrasyonu artmaya başladığında ortalama kallus ağırlığının düştüğü saptanmıştır. MS2 ve MS3 ortamlarında MS2'deki oksin miktarı yarıya indirilmiş ve sitokinin miktarı ise iki katına çıkarılarak MS3 ortamı oluşturulmuştur. Bu kombinasyon sonucunda MS2 ortamındaki ortalama kallus ağırlığının MS3 ortamında hemen hemen yarı yarıya düştüğü görülmüştür (Tablo 3.1). Ortalama kallus ağırlığının bu değişimine bakıldığında, sitokininin oksine oranla kallus teşvikinin az olduğu söylenebilir. Kallus yapısı incelendiğinde yeşil ve sert kallus oluşturdukları görülmüştür (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. MS1 (Üstte solda), MS2 (Üstte sağda) ve MS3'ün (Altta) oluşturdukları kallus yapıları

NAA ve BAP BBD'lerinin farklı konsantrasyonlarından oluşturulan MS4, MS5, MS6, MS7 ve MS8 ortamlarından MS5 ortamında ortalama kallus ağırlığının en düşük olduğu görülür. Bu ortamda kullanılan sitokinin miktarı en fazladır. Ortamdaki sitokinin miktarı artışı kallus ağırlığı üzerine olumsuz etki yapmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. MS5 besi ortamındaki kallus oluşumu (Solda), MS7 besi ortamındaki kallus oluşumu (Sağda)

MS9, MS10, MS11 ve MS12 ortamları sadece2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarındanoluşmaktadır. Bu ortamlardan elde edilen ortalama kallus ağırlıkları kıyaslanığında ortamdaki oksin miktarı arttıkça ortalama kallus oluşum ağırlıklarının arttığı saptanmıştır. Kallus yapısı incelendiğinde ise embriyogenik kallus oluşturduğu ve oluşan kallus renklerinin açık yeşil-kahverengi olduğu görülmüştür.

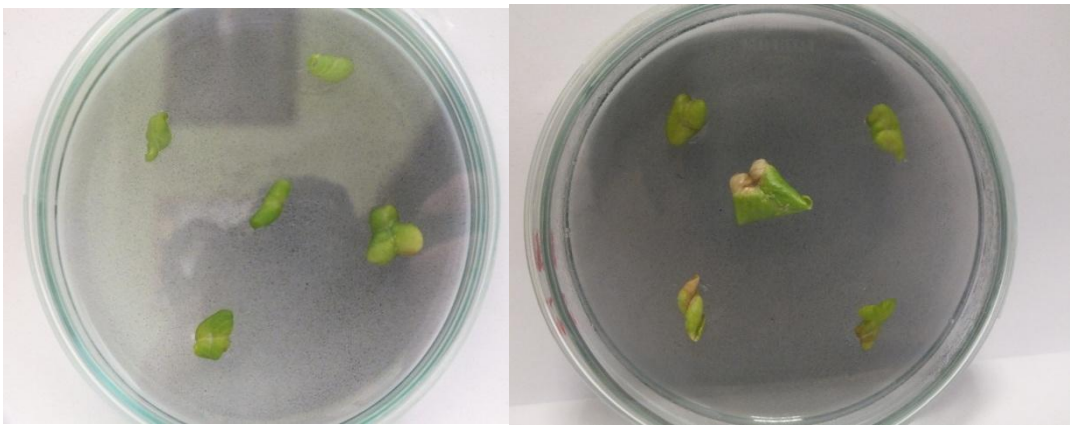
MS13, MS14, MS15, MS16, MS17 ve MS18 ortamları ise yine oksin ailesinden olan 2,4,5-T BBD'nin farklı konsantrasyonları kullanılarak hazırlanmıştır. Bu ortamlar deneysel çalışmamızın en yüksek ortalama kallus ağırlıklıklarına sahip grubunu oluşturmuştur. Bu grubu oluşturan ortamların hepsinde embriyogenik kallus oluşumu gözlenmiştir. En düşük 2,4,5-T miktarına sahip MS13 ortamı hariç hepsinde direkt somatik embriyogenesis gözlemlenmiştir. Ortalama kallus ağırlıklarının en fazla olması, embriyogenik kallus ve direkt somatik embriyogenesis oluşturması bakımından 2,4,5-T BBD'ni içeren ortamlar bu deneysel çalışmanın en iyi ortamları olarak belirlenmiştir.

MS19 ve MS20 ortamlarında 2 farklı oksin grubu kullanılmıştır. MS20 ortamında Dicamba konsantrasyonu 2 katına, 2,4-D konsantrasyonu ise 4 katına çıkarılmıştır. Bu ilişki ortalama kallus ağırlıkları üzerinde olumlu bir etki yapmıştır. Bunun sonucunda ortalama kallus ağırlığındaki artış yaklaşık olarak iki katına çıkmıştır (Tablo 3.1).



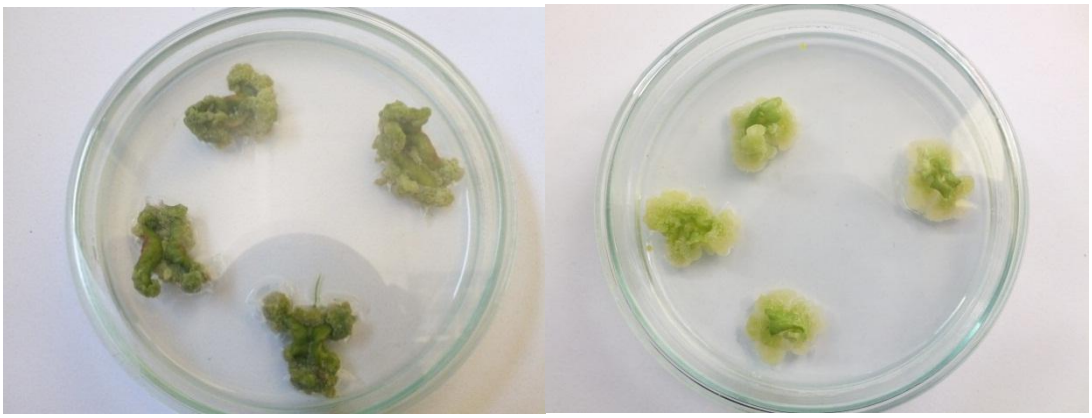
Şekil 3.6. MS19 besi ortamındaki kallus oluşumu (Solda), MS20 besi ortamındaki kallus oluşumu (Sağda)

MS21, MS22, MS23, MS24, MS25, MS28 ve MS29 ortamlarında herhangi bir kallus oluşumuna rastlanmamıştır. Bu ortamlardaki yaprak eksplantları 3-4 ay canlılıklarını korumuş olup hiçbir gelişme göstermemiştir.



Şekil 3.7.L-Glutamin + Aktif Kömür besi ortamı (Solda), 0,5mg/l 2,4,5-T+ 0,1mg/l Pürin ribosid + Aktif Kömür besi ortamı (Sağda)

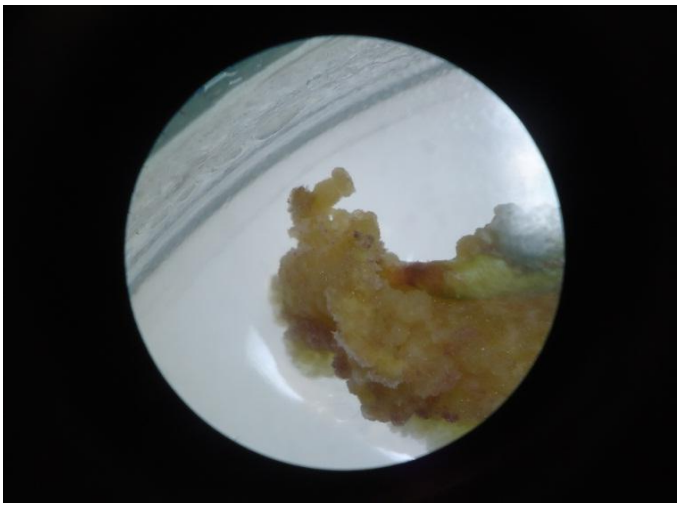
MS26 ve MS27 ortamlarını incelediğimizde her iki ortamında oksin BBD' sinin aynı ve eşit miktarda olduğu, fakat MS26 ortamının yine bir oksin BBD'si ile desteklendiği, MS27'nin ise bir sitokinin ile desteklendiği görülmektedir. MS27 ortamındaki ortalama kallus ağırlığı MS26 ortamınınkinden fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.8). Bu nedenle oksinin kallus uyarımını olumlu yönde etkilediği bir kez daha görülmüştür.



Şekil 3.8. MS26 besi ortamındaki kallus oluşumu (Solda), MS27 besi ortamındaki kallus oluşumu

3.2. Somatik Embriyo Gelişimi

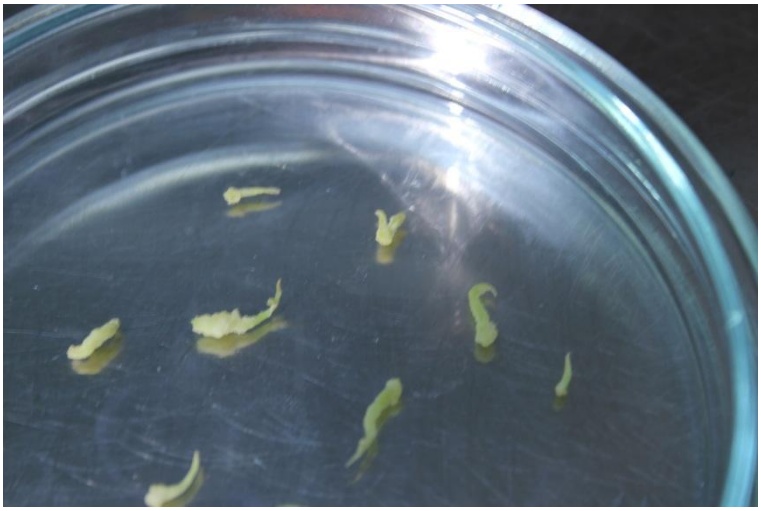
Yapılan çalışmalarda hem direkt hem de indirekt somatik embriyogenesis gözlemlenmiştir. 2,4,5-T'nin farklı konsantrasyonlarını içeren besi ortamlarında direkt somatik embriyogenesis gözlenmiştir (Tablo 3.1). Embriyogenik yapıda olan kallus yapıları ise indirekt somatik embriyogenesis oluşumunu teşvik etmek için farklı ortamlarda alt kültürlerine alınmıştır. Kültürler, katı ve sıvı ortamlar olmak üzere iki farklı ortamda kültüre alınmıştır. Şekil 3.9.'da direkt gelişen somatik embriyoların görünümü verilmiştir.



Şekil 3.9. Direkt gelişen somatik embriyonun görünümü

3.3. Somatik Embriyo Olgunlaştırma

Somatik embriyo olgunlaştırma ortamlarında destekleyici olarak 4 farklı kimyasal kullanılmıştır. Bunlar; ABA, D-Mannitol, Kanamisin ve GA_3'tür. D-Mannitol ve Kanamisin denemeleri katı ortamlarda somatik embriyo olgunlaştırmada kullanılırken (Tablo 3.2), ABA ve GA_3sıvı ortamlarda somatik embriyo olgunlaştırılması için kullanılmıştır. Somatik embriyo olgunlaştırmada katı ortamlarda D-Mannitol, sıvı ortamlarda ABA olumlu sonuçlar vermiştir (Şekil 3.10). D-Mannitol'ün kullanıldığı ortamlarda aşırı derecede köklenme olduğu görülmüştür. D-Mannitol'ün böyle oluşumlara sebep olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır. GA_3'in farklı konsantrasyonlarını içeren ortamlarda da benzer bir oluşuma rastlanmıştır.



Şekil 3.10. ABA olgunlaştırma ortamında oluşan somatik embriyoların görünümü

Tablo 3.2. Mannitol olgunlaştırma ortamı

Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Olgunlaştırma Ortamı (mg/l)	Somatik Embriyo Sayısı	Olgunlaşan Embriyo Sayısı	% S.E. Sayısı / O.E. Sayısı*
MS14	M1	33	7	21,21
MS14	M2	41	8	19,51
MS14	M3	16	3	18,75
MS14	M4	24	6	25,00
MS15	M1	38	10	26,31
MS15	M2	43	5	11,62
MS15	M3	23	2	8,69
MS15	M4	18	2	11,11
MS16	M1	52	1	1,92
MS16	M2	81	15	18,51
MS16	M3	15	2	13,33
MS16	M4	51	18	35,29

*S.E. Sayısı / O.E. Sayısı: Somatik Embriyo Sayısı / Olgunlaşan Embriyo Sayısı

Tablo 3.3. Kanamisin olgunlaştırma ortamı

Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Olgunlaştırma Ortamı (mg/l)	Somatik Embriyo Sayısı	Olgunlaşan Embriyo Sayısı	% S.E. Sayısı / O.E. Sayısı*
MS14	K1	0	0	0,00
MS14	K2	0	0	0,00
MS14	K3	0	0	0,00
MS14	K4	0	0	0,00
MS15	K1	22	2	9,09
MS15	K2	0	0	0,00
MS15	K3	0	0	0,00
MS15	K4	0	0	0,00
MS16	K1	0	0	0,00
MS16	K2	0	0	0,00
MS16	K3	0	0	0,00
MS16	K4	39	5	12,82

*S.E. Sayısı / O.E. Sayısı: Somatik Embriyo Sayısı / Olgunlaşan Embriyo Sayısı

Kanamycin olgunlaştırma ortamı Mathewz H. ve Litz R. E. (1990)'nin mango üzerinde yaptıkları çalışmada somatik embriyoların olgunlaştırılması için gerekli bulunmuştur [85]. Bizim çalışmamızda isesınırlı sayıda somatik embriyo olgunlaşmasına neden olmuştur.

Sıvı kültürde 2,0mg/l 2,4,5-T ortamında gelişen embriyojenik yapıdaki kalluslar kullanılmıştır. Sadece A2 ortamında somatik embriyo gelişimi olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.4). Junaid ve ark. (2007)'nın Apocynaceae familyasından *Catharanthus roseus* ile yaptığı çalışmada GA_3'ün olgunlaştırma için çok etkili olduğunu ve her bir erlenmayer başına 25 somatik embriyo olgunlaştırdıklarını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise GA_3'in farklı konsantrasyonlarını içeren ortamlarda somatik embriyoya ait herhangi bir gelişim görülmemiştir sadece dallanmış kök oluşumları dikkat çekmiştir. Sıvı kültürde somatik embriyo olgunlaştırma ortamlarının görünümü aşağıda Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11. Sıvı kültürlerde somatik embriyo olgunlaştırma ortamlarının görünüşü

Tablo 3.4. ABA ve GA_3 olgunlaştırma ortamı

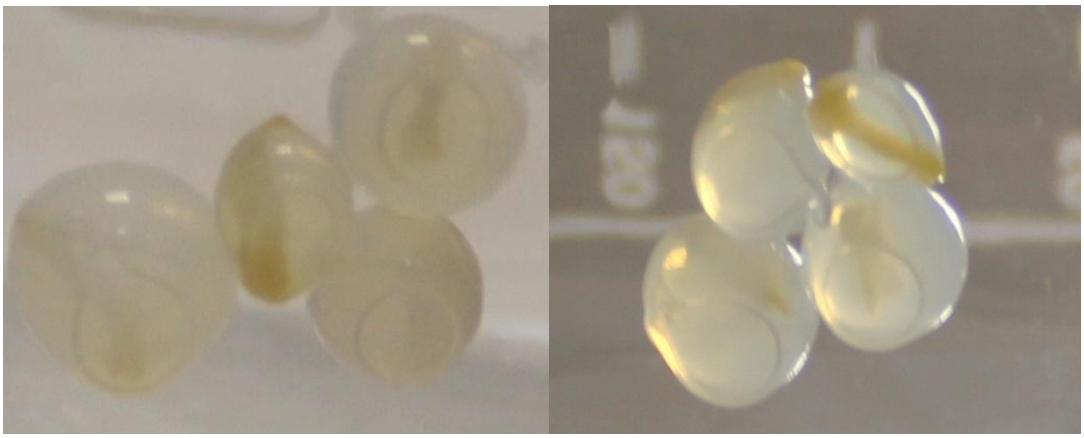
Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Olgunlaştırma Ortamı (mg/l)	Olgunlaşan Embriyo Sayısı	Olgunlaşan Embriyo Yüzdesi
MS15	A1	0	0,00
MS15	A2	15	6,66
MS15	A3	0	0,00
MS15	A4	0	0,00
MS15	G1	0	0,00
MS15	G2	0	0,00
MS15	G3	0	0,00
MS15	G4	0	0,00

3.4. Somatik Embriyo Sayısı

Somatik embriyo sayılarına ait veriler Tablo 3.2, Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'te verilmiştir. Katı kültür ortamında en fazla olgunlaşan embriyo yüzdesi %35,29 olarak M4 olgunlaştırma ortamında bulunmuştur. Kanamisin olgunlaştırma denemelerinde sadece 2 ortamda olgunlaştırma gözlenmiştir. Bunlar %12,82 K4 ortamı ve %9,09 ile K1 ortamıdır.

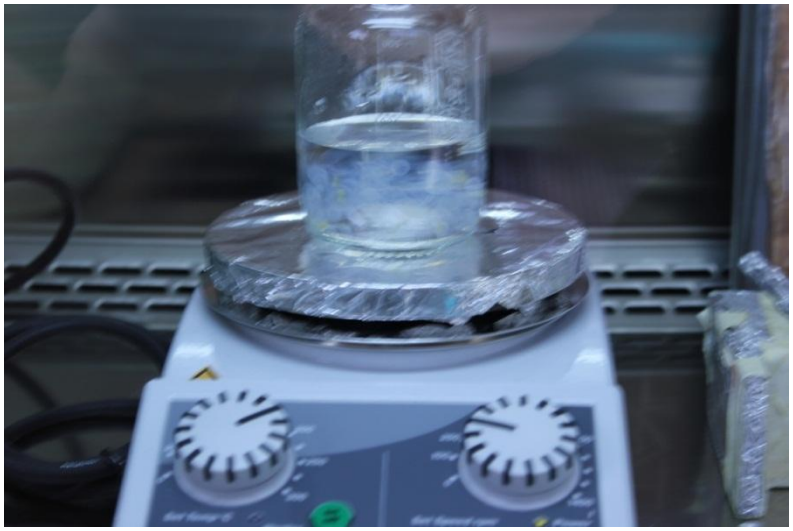
3.5. Sentetik Tohum

Çalışma boyunca farklı aşamalardan geçirilerek elde edilen farklı safhalardaki somatik embriyolar farklı kombinasyonlarda hazırlanan sodyum alginat ve kalsiyum klorit çözeltisi ile kaplanmak suretiyle 3-4 mm boyutunda kalsiyum alginat kapsülleri elde edilmiştir.(Şekil 3.12.)



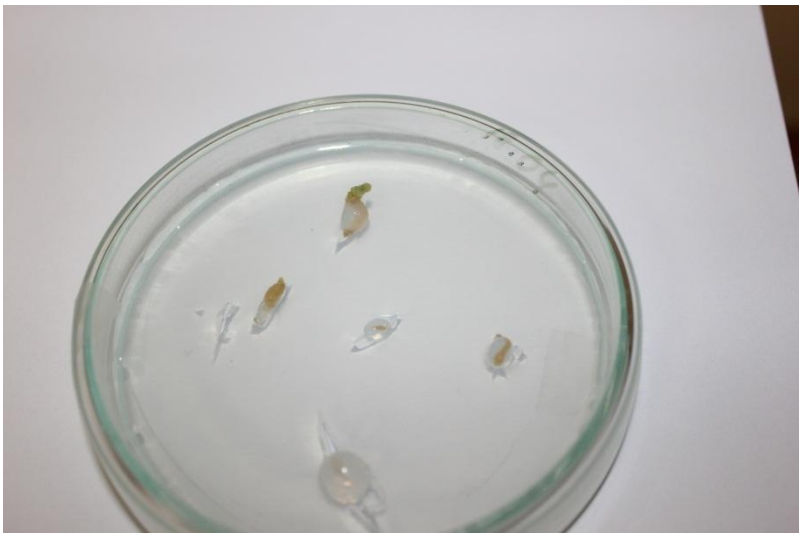
Şekil 3.12. Somatik embriyoların kaplanması ile elde edilen sentetik tohumlar

Yapılan 25 faklı deneme sonucunda elde edilen kapsüllerden %3'lük sodyum alginat ve 100 mM kasiyum klorit çözeltisi içeren kombinasyonda kapsüllerin çok fazla sertleşmediği ve elastik yapıda oldukları gözlenmiştir (Şekil 3.13). Bu durumun sentetik tohumları çimlendirmek için oldukça önemli olduğu pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Bu yüzden bu çalışmada en uygun enkapsülasyon ortamının %3'lük sodyum alginat ve 100 mM kalsiyum klorit çözeltisini içeren ortamın olduğu yapılan denemeler sonucunda saptanmıştır.



Şekil 3.13. Somatik embriyoların kaplama anındaki görüntüsü

Kaplanan sentetik tohumlar MS ortamına ekilmiştir ve bunun sonucunda çimlenmeye başladıkları gözlenmiştir (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. Çimlenme başlangıcındaki sentetik tohumdan bir görüntü

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Literatürde daha önce *Amsonia orientalis* türüile yapılan *in vitro* doku kültürü çalışmalarından biri Öz ve ark. (2008) bitkinin tohumundan elde ettikleri *in vitro* bitkiciklerden aldıkları eksplantları 1 mg/l IBA+0,5 mg/l Kinetin ortamına aktarmış ve sürgünlerin büyümesinde %33 oranında başarı sağlamışlardır. Araştırıcılar, besi ortamını değiştirmeden bitkiciklerin %15'inin köklendiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca kallus oluşumunu ise 2 mg/l BAP+ 0,2 mg/l NAA ortamında, gövde eksplantlarından gerçekleştirmişlerdir.

Acemi ve ark. (2012) [82] ise nesli tükenmekte tıbbi bir bitki olan *Amsonia orientalis* için etkin bir kallus üretim protokolünün geliştirilmesi ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Sekonder metabolit sentezi için hücre kültürlerinin başlatılmasına yönelik yaptıkları bu ön çalışmada olgun nodal eksplantları 0,5 mg/l BAP içeren MS ortamlarında kültüre almışlar, elde edilen sürgünleri farklı (0,5 mg/l, 1,0 mg/l, 2,0 mg/l ve 4,0mg/l) BAP konsantrasyonları ile desteklenmiş MS ortamlarında alt kültüre almış ve çoğaltılan sürgünlerden elde edilen eksplantları kallus oluşturma deneylerinde kullanılmışlardır. Çeşitli konsantrasyonlardaki BAP, K, IAA ve 2,4-D'nin kallus üretimi üzerine olan etkilerini denemiş ve kallus indüksiyonu üzerine en etkili ortamın BAP ile kombinasyondaki tüm 2,4-D konsantrasyonlarının olduğunu bulmuşlardır. En yüksek ortalama kallus ağırlığını 0,327 ± 0,07 g/kallus olarak ve 0,5 mg/l 2,4-D+ 0,5mg/l BAP kombinasyonunda rapor etmişlerdir. Ayrıca, IAA ve K kombinasyonları ile oluşturdukları ortamlarda kallusların kırılgan kallus üretimi için uygun, 2,4-D ve BAP kombinasyonları ile oluşturdukları ortamlarda ise fazla fakat sıkı kallus oluşumu meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Acemi ve ark. (2013) [83] tarafından aynı tür üzerine yapılan diğer bir çalışma ise *Amsonia orientalis* Decne.'in olgun bitkilerinin nodal segmentlerinden *in vitro* çoğaltımıdır. 7 yıllık olgun bitkilerden aldıkları nodal segmentleri sürgün çoğaltımı için farklı (0,5mg/l, 1,0mg/l, 2,0mg/l ve 4,0mg/l) BAP konsantrasyonlarını içeren MS ortamlarında kültüre almışlardır. 1,0mg/l BAP içeren besi ortamında sürgün

rejenerasyonunun en yüksek sayıda (ortalama sürgün sayısı 9,2± 0,2 ve sıklığı %91,1 ± 2,3) olduğunu bulmuşlardır. Çoğaltılan sürgünlerden elde edilen nodları BAP, K, IAA ve 2,4-D kombinasyonlarını içeren MS besi ortamlarında kültüre almışlar ve maksimum ortalama sürgün uzunluğunu 0,5mg/l IAA+1,5mg/l BAP ve 0,5mg/l IAA+0,5mg/l K içeren besi ortamlarında 4,4±0,7 olarak rapor etmişlerdir. Bütün sürgünler 0,5mg/l IAA içeren yarı güçlü MS besi ortamında 4 hafta içinde köklendirilmiş ve ortalama kök uzunluğunu en yüksek 7,9±0,3 ve en düşük 2,8±0,2 olarak kaydetmişlerdir. Bitkiciklerin %84'ünün aklimatizasyonunu başarıyla gerçekleştirmişlerdir.

Yapılan bütün bu çalışmalardasomatik embriyogenesis ve sentetik tohum üretimi üzerine herhangi bir bulgu belirtilmemiştir.

Bu tez çalışmasında ise *A. orientalis* bitkisinin olgun bireylerinden alınan nodal eksplantlar 1,0 mg/l BAP içeren MS besi ortamında kültüre alındı. Bu ortamda gelişen bitkiciklerin yaprakları ise çalışmamızın eksplant kaynağını oluşturdu. Yaprak eksplantları çeşitli BBD'in yer aldığı 30 farklı kombinasyonu içeren MS besi ortamına transfer edildi. Bu ortamlarda somatik embriyogenesis ve kallus oluşumları tespit edildi. Direkt somatik embriyogenesis oluşumları olgunlaştırma ortamlarına aktarılırken, embriyogenik ve embriyogenik olmayan kültürler ayrıldı ve embriyogenik kallus oluşumları somatik embriyo teşviki için alt kültürlerine alındı. Olgunlaşması tamamlanan somatik embriyolar sodyum alginatla kaplanarak sentetik tohumlar elde edildi. Çalışmada ortalama kallus ağırlığı en fazla MS15 besi ortamı 4,88±0,32 g olarak bulunurken en düşük kallus yapısına sahip ortamlar ise hiç kallus gelişimi gözlenmeyen MS21, MS22, MS23, MS24, MS25, MS28 ve MS29 besi ortamları olarak bulundu. Aktif kömür içeren besi ortamlarında yaprakların kültüre alındıkları ilk diriliklerini 2-3 ay boyunca korudukları fakat hiçbir kallus gelişimi göstermedikleri belirlendi. 1,0mg/l 2,4,5-T içeren MS besi ortamında ise direkt somatik embriyogenesis oluşumu tespit edildi. Katı kültür olgunlaştırma ortamlarından mannitolde en yüksek olgunlaşma oranı %35,29 olarak M4 ortamında gözlenirken en düşük olgunlaşma oranı %8,69 ile M3 ortamında bulundu. Kanamisin olgunlaştırma ortamında ise en yüksek olgunlaşma oranı %12,82 olarak K4 ortamında gözlenirken en düşük olgunlaştırma ortamı %9,09 ile K1 ortamında

bulundu. Sıvı kültür olgunlaştırma ortamlarında ise sadece 10 µM ABA'da %6,66 oranında bulundu.

Yapılan çalışmalarda bu türde kallus oluşumu ve somatik embriyogenesis oluşumu için en uygun BBD'nin 2,4,5-T olduğu tespit edildi. En fazla somatik embriyo oluşumu %5,5 Mannitol ortamında %35,29 olarak kaydedildi. Somatik embriyolar %3 sodyum alginat (w/v) ve 100 mM kalsiyum klorit ile kaplandı. Elde edilen sentetik tohumların bir kısmı MS besi ortamına ekildi ve çimlenmeye başladıkları görüldü.

Bu veriler eşliğinde çalışma değerlendirildiğinde somatik embriyogenesis ve embriyogenik kallus teşvik etme ve somatik embriyo olgunlaştırma üzerine bir protokol oluşturulmuştur. Ancak bu tez çalışmasına konu olan *Amsonia orientalis* bitkisinin tohumları düşük çimlenme yüzdeleri ve zor çimlenmeleri ile bilindiğinden ayrıca bitki tükenme tehlikesi içerisinde olduğundan daha fazla sayıda somatik embriyo elde edip olgunlaştırmak için daha etkin bir protokol oluşturulmalıdır. Bunun için;

Elde edilen embriyogenik kallus miktarını ve dolayısıyla somatik embriyo miktarını arttırmak için farklı sıvı kültür protokolleri üzerinde çalışılabilir. Farklı katılaştırıcılar üzerinde çalışılarak çalışmanın etkinliği arttırılabilir.

Somatik embriyo kalitesi açısından bitki büyüme düzenleyicilerinin yanı sıra ortamın diğer bileşenleri, özellikle de karbonhidrat kaynakları, amino asitler ve vitaminler üzerinde araştırmalar yapılabilir. Yüksek oranlarda indirgen N formu kullanılarak somatik embriyo oluşumu ve teşviki denenebilir.

*Amsonia orientalis*flavonoid glikozitler ve alkoloit içeriği yönünden zengin bir bitkidir. Bu sebeple yapılan bu çalışmada elde edilen kırılgan kallus protokolleri kullanılarak hücre süspansiyon kültürleri kurulabilir. Buradan da sekonder metabolit üretimine geçilebilir.

KAYNAKLAR

[1] http://www.binotek.org/tr/index.php?option=com_content&view=article&id=43&Itemid=78 (Ziyaret tarihi: 17 Eylül 2012).

[2] Özcan S., Babaoğlu M., Sancak C., Somatik Embriyogenesis, Editörler: Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S., *Bitki Biyoteknolojisi*, 1.Basım, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 71-88, 2001.

[3] Öktem H. A., Yücel M., Doku kültürü: Bitki gelişiminin yönlendirilmesi, Editörler: Steward N. C., JR., *Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik*, 1. Basım, Nobel Basımevi, Ankara, 113-134, 2012.

[4] Gönülşen N., *Bitki doku kültürleri, yöntemleri ve uygulama alanları*, 78, T.C. Tarım Orman ve Köy işleri Bakanlığı, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Menemen-İzmir, 1987.

[5] Aitken C. J., Kozai T., Takayama S., Automation in Plant Tissue Culture-General Introduction and Overview, Editörler: Aitken C. J., Kozai T., Smith M. L., *Automation and Envir. Cont. in Plant Tiss. Cult*., 1st ed., Kluwer A Press, Netherlands, 1-18, 1995.

[6] Liledo M. D., Crespo M. B., Del Amo-Marco J. B., Micropropagation of *Limoniumthiniense* Erben (Plumbaginaceae) using herbarium material, Botanic *Garden Micropropagation News*, 1996, **2**, 2.

[7] Dhar U., Upreti J., Bhatt I. D., Micropropagation of *Pittosporumna paulensis* Rehder&Wilson – a rare, endemic Himalayan medicinal tree, *Plant Cell Tiss.Organ. Cult.*, 2000, **63**, 231–235.

[8] Kapai V. Y., Kapoor P., Rao U., *In Vitro* Propagation for Conservation of Rare and Threatened Plants of India - A Review, *International Journal of Biological Technology*, 2010, **1**, 1-14.

[9] Hatipoğlu R., *Bitki Biyoteknolojisi*, 58., Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Adana, 1999.

[10] Parrot W. A., Bailey M. A., Characterization of Recurrent Somatic Embriyogenesis of Alfalfa on Auxin-Free Medium, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993, **32**, 69-76.

[11] Parrot W. A, Merkle S. A.,Williams E. G., Somatic Embryogenesis: Potential for Usein Propagation and Gene Transfer Systems, Editörler: Murray D. R., *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, 1st ed., C. A. B International Press, UK, 158-200, 1993.

[12] Raffauf R. F.,*Plant alkaloits a guide to their discovery and distribution*, 1st ed., Food Products Press, USA, 1996.

[13] Davis P. H.,*Flora of Turkey and East Aegean Islands*, 1st ed.,Univ. Press of Edinburg, 1978.

[14] Darke R., *Amsonia* in cultivation, *RHS The Plantsman*, 2005, **4**, 72-75.

[15] Akyalçın H., Özen F., Dülger B., Anatomy, Morphology, Palynology and Antimicrobial Activity of *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae) Growing in Turkey, *Intel. J. Bot*, 2006, **2**(1), 93-99.

[16] Itoh A., Kumashiro T., Tanahashi T., Nagakura N., Nishi T., Flavonoid Glycosides from *Rhazya orientalis*, *J. Nat. Prod.,* 2002, **65**, 352-357.

[17] Atasever B., Akgün K., Kuruca S. E., Turan N., Seyhanlı V., Meriçli A., *Cynarasyriaca*'dan Elde Edilen Flavonoidlerin Lösemi Hücreleri Üzerine Etkisi, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 2003, **32** (3), 143-150.

[18] Lengyel E. D., Turiak G. Y., Szabady J. N., Zambo I., Tetenyi P., Hermecz I., Determination of Secologanin Content from Shoots of *Rhazya orientalis* (DECNE) A. D. C. Using The HPLC Method, *HerbaHungarica*, 1986, **2**, 141-150.

[19] Özen F, Türkiye'de Tükenme Tehlikesinde Olan Bir Türün Otekolojisi: *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae), *BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi*, 2006, **8**(1), 4-9.

[20] Rahman A. U., Qureshi M. M., Zaman K., Malik S., Ali S. S., The Alkaloids of *Rhazya stricta* and *R. orientalis*- A Review, *Fitoterapia*, 1989, **60**(4), 291-322.

[21] Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A., *Flora Europea*, 3rd ed., Cambridge UniversityPress, UK, 1968.

[22] Murashige T., Skoog F., A Rewised Medium for Growth and Bioassays with Tobacco Cultures, *Physiol. Plant*, 1962, **15**, 473-497.

[23] Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., Nutrition Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells, *Exp. Cell. Res*., 1968, **50**, 151-159.

[24] Linsmaier E. M., Skoog F., Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures, *Physiol. Plant*, 1965, **18**, 100-127.

[25] White P. R., Neoplastic growth in plants, *Q. Rev. Biol*., 1951, ***26***, 1-16.

[26] Schenk R. U., Hildebrandt A. C., Medium and Techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Bot*., 1972, **50**, 199-204.

[27] Cleland R. E., Introduction: Nature, occurrence and functioning of plant hormones, In: Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones, *Elsevier Science B. V.*, 1999, Netherlands, **33**, 3-4.

[28] Anderson M., A closer look at plant reproduction, growth and ecology, *Britannica Educational Publishing*, 2011, **1**, 41-42.

[29] Bidlack J. E., Jansky S. H., *Stern's Introductory Plant Biology*, 1st ed, Mc Graw-Hill Press, New York, 2011.

[30] Kreis W., *In vitro* Culturing Technics of Medicinal Plants, Editors: Kayser O., Quax, W., *Medicinal Plant Biotechnology*, 1st ed., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA Press, Germany, 162, 2007.

[31] Heldt H. W., *Plant Biochemistry*, 1st ed., Elsevier Academic Press, USA, 2005.

[32] Katekar G. F., Structure-activity relationships of plant growth regulators, Editors: Hooykaas, Hall, Libbenga, *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*, 1st ed., Elsevier Science B. V. Press, Netherlands, 93-100, 1999.

[33] Ammirato P. V., Role of ABA in Regulation of Somatic Embryogenesis, *Hort. Science*, 1988, **23**, 520.

[34] Young T. E., Meeley R. B., Gallie D. R., ACC Synthase Expression Regulates Leaf Performance and Drought Tolerance in Maize, *Plant Journal*, 2004, **40**, 813–825.

[35] Pierik R. L. M., *In Vitro* Culture of Higher Plants, *Kluwer Academic Publishers*, 1997, **364**, 21-26.

[36] Bigot C., *In vitro* Manipulation of Higher Plants: Some Achievements, Problems and Perspectives, *Cell Culture Techniques Applied to Plant Production and Plant Breeding*, 1987, **27**, 5-17.

[37] Maunder M., Higgens S., Culham A., Neither Common nor Garden: the garden as a refuge for threatened plant species, *Curtis's Bot. Mag.*, 1998, **15**, 124–132.

[38] Ramsay M. M., Jackson A. D., Porley R. D., A Pilot Study for The *Ex situ* Conservation of UK Bryophytes, *BGCI EuroGard 2000–II European Botanic Gardens Congress*, Canary Islands, Spain, 28 May-2 June 2000.

[39] Callow J. A., Ford-Lloyd B. V., Newbury, H. J., Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use, *CAB International*, 1997, **49**, 76.

[40] Pitman N. C. A., Jorgensen P. M., Estimating The Size of The World's Threatened Flora, *Science*, 2002, 298-989.

[41] Paunescu A., Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview, *Romanian Biotechnological Letters*, 2008, **14**(1), 4095-4103.

[42] Zapartan M., Deliu C., Conservation of Endemic Rare and Endangered Species in The Romania Flora Using *In vitro* Methods, *8th Nat. Symp. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Bucharest, 10-15 September 1994.

[43] Engelmann F., Engels J. M. M., Technologies and Strategies for *Ex situ* Conservation, Managing Plant Genetic Diversity., *CAB International*, 2002, **7**, 89-104.

[44] Paunescu A., Holobiuc I., Preliminary Researches Concerning Micropropagation of Some Endemic Plants from Romanian Flora, *Acta Horti Bot.*, 2005, **32**, 103-108.

[45] Sarasan V., Cripps R., Ramsay M. M., Atherton C., Mcmichen M., Prendergast G., and Rowntree J. K., Conservation *In Vitro* of Threatened Plants Progress In The Past Decade, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2006, **42**, 206-214.

[46] Sherwood J. L., Applied Aspects of Plant Regeneration (Virus-free Plants), Editors: Dixon R. A., Gonzales R. A., *A Practical Approach*, 1st ed., Oxford Uni. Press, New York, 135-138, 1994.

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

[48] Bronsema F. B. F., Van oostveen W. J. F., Van Lammeren A. A. M., Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize ebryos of the inbred lines A188 and A632, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, 1997, **50**, 47-65.

[49] Emeklier Y., Özcan S., Avcı-Birsin M., Mirici S., Uranbey S., Mısırda *in vitro* somatik embriyogenesis üzerine araştırmalar, A.Ü. Araştırma Fonu Projesi, 1999.

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

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

[52] Özcan S., Barghchi M., Firek S., Draper J., Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embryogenesis in pea, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1993, **34**, 271-277.

[53] Lai F. M., Mckersie B. D., Scale-up somatic embryogenesis alfalfa (*Medicago sativa* L.) I subculture and indirect secondary somatic embryogenesis, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1994, **37**, 151-158.

[54] Hartmann H. T., Kester D. E., *Plant propagation: Principles and Practices*, 1st ed., Prentice- Hall, Inc. Engle Wood cliffs Press, U .S. A, 1975.

[55] Shadwick F. S., Doran P. M., Foreign protein expression using plant cell suspension and hairy root cultures, Editors: Fischer R., Schillberg S., Wiley, *In Molecular Farming: Plant-Made Pharmaceuticals and Technical Proteins*, 1st ed., Wiley-VCH Press, New York, 13-26, 2005.

[56] Harisha S., *Review of Biotechnology Procedures and Experiments Handbook*, 1st ed., Infinity Science Press, Canada, 2007.

[57] Ainsley P. J., Aryan A. P., Efficient plant regeneration system for immature embryos of triticale, *Plant Growth Reg.*, 1998, **24**, 23-30.

[58] Cardoza V., D'Souza L., Direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos incashew (*Anacardium occidentale*L.), *Phytomorphology*, 2000, **50**(2), 201-204.

[59] Kartha K. K., Gamborg O. L., Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture, *Phytopathology*, 1975, **65**, 826-828.

[60] Brown G. R., Kwiatkowski S., Martin M. W., Thomas P. E., Eradication of PVS from potato clones through excision of meristems from in vitro heat-treated shoot tips, *Am. Pot. J*., 1988, **65**, 633-638.

[61] Ayabe M., Sumi S., A novel and efficient tissue culture method stem-disc dome culture for producing virus-free garlic (*Allium sativum*L.), *Plant Cell Rep*., 2001, **20**, 503-507.

[62] George E. F., Debergh P. C., Micropropagation uses and methods, Editors: George E. F., Hall M. A., De Klerk G. J., *Plant propagation by tissue culture*, 3rd ed., Springer Press, Dordrecht, 29-65, 2008.

[63] Fang J., Wetten A., Hadley P., Cryopreservation of cocoa (Theobroma cacao L.) somatic embryos for long-term germplasm storage, *Plant Sci*., 2004, **166**, 669-675.

[64] Özcan S., Özgen M., *Bitki genetik mühendisliği Kükem Dergisi*, 1996, 69-95.

[65] Warren G., The regenaration of plants from cultured cells and tissues, Editors: Stafford A., Warren G., *Plant Cell and Tissue Culture*, 1st ed., Open University Press, Milton Keynes, 83-100, 1991.

[66] Sonnino A., Tanaka S., Iwanaga M., Schilde-Rentscheler L., Genetic control of embryo formation in anther culture of diploid potatoes, *Plant Cell Rep.*, 1989, **8** 105-107.

[67] Endress R., Significance of the degree of cell differentiation, *Plant Cell Biotechnology Springer*, 1994, 149-163.

[68] Halperin W., Wetherell D. F., Ontegny of adventive embryos in wild carrot., *Science*, 1965, **147**, 756-758.

[69] Dodeman V. L., Ducreux G., Kreis M., Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis., *J. Exp. Bot*., 1997, **48**, 1493-1509.

[70] Tremouillaux G. J., Cheniux J. C., Somatic embryogenesis from leaf protoplasts of *Rauvolfia vomitoria* shoot cultures, *Plant Cell Reports*, 1991, **10**, 102-105.

[71] Kumar A., Somatic embryogenesis and high frequency plantlet regeneration in callus cultures of *Thevetia peruviana*, *Plant Cell. Tiss. And Organ Culture*, 1992, **31**, 47-50.

[72] Kim S. W., Song N. H., Jung H. K., Kwak S. S., Liu J. R., High frequency plantlet regeneration from anther-derived cell suspension cultures via somatic embryogenesis in *Catharanthus roseus*, *Plant Cell Reports*, 1994, **13**, 319-322.

[73] Kim S. W., Su In D., Choi P. S., Liu R. J., Plant regeneration from immature zygotic embryo-derived embryogenic calluses and cell suspension cultures of *Catharanthus roseus, Plant Cell. Tiss. And Organ Culture*, 1994, **76**, 131-135.

[74] Sudha C. G., Seeni S., Spontaneous somatic embryogenesis on in vitro root segment cultures of *Rauvolfia micrantha* Hook. F. A rare medicinal plant, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2006, **42**, 119-123.

[75] Nishitha K., Martin K. P., Ligimol, Beegum A. S., Madhusoodanan P. V., Micropropagation and encapsulation of medicinally important *Chonemorpja grandiflora*, *Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2006, **42**, 385-388.

[76] Faisal M., Ahmad N., Anis M., *In vitro* plant regeneration from alginate-encapsulated microcuttings of *Rauvolfia tetraphylla* L., *American- Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 2006, **1**(1), 01-06.

[77] Junaid A., Mujib A., Bhat M. A., Sharma M. P., Smaj J., Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cantharanthus roseus*, *Biologia Plantarum*, 2007, **51**(4), 641-646.

[78] Junaid A., Abdul M., Sheik A. N., Maheshwar P. S., Screening of vincristine yield in *ex vitro* and *in vitro* somatic embryos derived plantlets of *Catharanthus roseus* L. (G) Don., *Scientia Horticulturea*, 2009, **119**, 325-329.

[79] Singh P., Singh A., Shukla A. K., Singh L., Pande V., Nailwal T. K., Somatic embryogenesis and in vitro regeneration of an endangered medicinal plant Sarpganda (*Rauvolfia serpentina*. L), *Life Science Journal*, 2009, **1**(3), 74-79.

[80] Alatar A., Faisal M., Encapsulation of *Rauvolfia tetraphylla* microshoots as artificial seeds and evaluation of genetic fidelity using RAPD and ISSR markers, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2012, **6**(7), 1367-1374.

[81] Faisal M., Alatar A., Ahmad N., Anis M., Hegazy A. K., Assessment of genetic fidelity in *Rauvolfia serpentina* plantlets grown from synthetic (encapsulated) seeds following *in vitro* storage at 4 °C, *Molecules*, 2012, **17**, 5050-5061.

[82] Acemi A., Özen F., Kıran R., Development of an efficient callus production protocol for Amsonia orientalis: A critically endangered medicinal plant, *Eurasian Journal of Biosciences*, 2012, **6**, 105-112.

[83] Acemi A., Özen F., Kıran R., *In vitro* propagation of *Amsonia orientalis* from nodal segments of field-grown adult plants, *Propagation of Ornamental Plants*, 2013, **13**(1), 25-32.

[84] Goldberg R. B., Depaiva G., Yadegari R., Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*, 1994, **226**, 605-614

[85] Mathews H. and Litz R. E., Kanamycin Sensitivity of Mango Somatic Embryos, *Hortscience*, 1990, **25**(8), 965-966.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

[1] Acemi A., Özen F., **Kıran R.**, Development of an efficient callus production protocol for Amsonia orientalis: A critically endangered medicinal plant, *Eurasian Journal of Biosciences*, 2012, **6**, 105-112.

[2] Acemi A., Özen F., **Kıran R.**, *In vitro* propagation of *Amsonia orientalis* from nodal segments of field-grown adult plants, *Propagation of Ornamental Plants*, 2013, **13**(1), 25-32.

[3] **Kıran R.**, Acemi A., Özen F., *Amsonia orientalis*'in (Apocynaceae) *in vitro* çoğaltımında farklı NaCl konsantrasyonlarının sürgün gelişimi üzerine etkisi ve bitkiciklerdeki kalsiyum miktarı değişimleri, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Ege Üniversitesi Prof. Dr. Yusuf VARDAR-MÖTBE, İzmir, 3-7 Eylül 2012.

[4] **Kıran R.**, Acemi A., Özen F., *Begonia semperflorens*'in *in vitro* çoğaltımında kullanılan farklı eksplantların rejenerasyon potansiyellerinin değerlendirilmesi, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Ege Üniversitesi Prof. Dr. Yusuf VARDAR-MÖTBE, İzmir, 3-7 Eylül 2012.

[5] Özen F., **Kıran R.**, Acemi A., Mavi yıldız'ın *in vitro* sürgünlerden elde edilen yapraklar kullanılarak mikroçoğaltımı, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Ege Üniversitesi Prof. Dr. Yusuf VARDAR-MÖTBE, İzmir, 3-7 Eylül 2012.

[6] Acemi A., Özen F., **Kıran R.**, Bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin *Amsoniaorientalis* (Apocynaceae)'in *in vitro* çoğaltımında sürgün gelişimi üzerine olan etkilerinin araştırılması, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Ege Üniversitesi Prof. Dr. Yusuf VARDAR-MÖTBE, İzmir, 3-7 Eylül 2012.

[7] Acemi A., **Kıran R.**, Özen F., Mavi yıldız (*Amsonia orientalis*)'in *in vitro* çoğaltımında farklı IAA ve IBA konsantrasyonlarının kök gelişimi üzerine olan etkilerinin araştırılması, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Ege Üniversitesi Prof. Dr. Yusuf VARDAR-MÖTBE, İzmir, 3-7 Eylül 2012.

[8] Özen F., **Kıran R.**, Acemi A., Tıbbi önemi olan ve gıda olarak kullanılan *Arum italicum* (Yılan yastığı)'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından indirekt sürgün rejenerasyonu, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Ege Üniversitesi Prof. Dr. Yusuf VARDAR-MÖTBE, İzmir, 3-7 Eylül 2012.

[9] Acemi A., **Kiran R.**, Özen F., *In vitro* germination and protocorm formation of a naturally growing salep orchid in Turkey: *Orchis sancta, 5Th International Orchid Workshop 2013*, Calabria University, Rende, İtaly, 17-19 May 2013.

[10] Acemi A., Özen F., **Kiran R.**, Effects of media, giberellic acid and sonication treatment on *in vitro* germination of *Serapias vomeracea* seeds, *5Th International Orchid Workshop 2013*, Calabria University, Rende, İtaly, 17-19 May 2013.

[11] Acemi A., **Kiran R.**, Özen F., The effects of plant growth regulators on the callus induction of *Amsonia orientalis*, *Plant Biology Congress 2012*, Albert Ludwigs University, Freiburg, 29 July-3 August 2012.

[12] Acemi A., **Kiran R.**, Özen F., Micropropagation of *Amsonia orientalis* from axillary buds of field-grown adult plants, *Plant Biology Congress 2012*, Albert Ludwigs University, Freiburg, 29 July-3 August 2012.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Kırklareli'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kırklareli'de tamamladı. 2005 yılında Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2009 yılında mezun oldu. 2010 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı' nda yüksek lisans öğrenimine başladı.