

TC
MUĞLA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTUSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

ALKALOİD İÇEREN BAZI TIBBİ BİTKİLERDE KALLUS KÜLTÜRÜ
ÜZERİNDE BİR ÇALIŞMA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA SÖYLEMEZ

HAZİRAN 2006
MUĞLA

TC

**MUĞLA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTUSÜ**

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**ALKALOİD İÇEREN BAZI TIBBİ BİTKİLERDE KALLUS KÜLTÜRÜ
ÜZERİNDE BİR ÇALIŞMA**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA SÖYLEMEZ

MUĞLA 2006

.....danışmanlığında.....
.....tarafından hazırlanan bu çalışma,/..../.....tarihinde
aşağıdaki jüri tarafından.....
Anabilim Dalı'nda yüksek lisans/doktora tezi olarak oybirliği /oyçokluğu ile
kabul edilmiştir.

Başkan	:.....	İmza
Üye	:.....	İmza :
Üye	:.....	İmza
Üye	:.....	İmza :
Üye	:.....	İmza :

ÖNSÖZ

Bu çalışma esnasında beni yönlendiren çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Betül BÜRÜN'e, maddi manevi her türlü yardımlarını esirgemeyen ve yeryüzünde benzerlerinin olmadığını düşündüğüm başta annem ve babam olmak üzere bütün aileme, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını gördüğüm araştırma görevlisi arkadaşım Sayın Esin ÇOBAN'a, istatistik çalışmalarımda yardımlarını gördüğüm Muğla Üniversitesi İstatistik Bölümü Öğretim görevlisi Sayın Mehmet KARAHASAN'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	9
3.1. Materyal.....	9
3.2 Yöntem.....	10
3.2.1 Sterilizasyon İçin Kullanılan Metotlar.....	13
3.2.1.1 Tohum Sterilizasyonu.....	13
3.2.1.2 Kullanılan Aletlerin Sterilizasyonu.....	13
3.2.1.3 Besi yeri Sterilizasyonu.....	13
3.2.1.4 Transfer Ortamının Sterilizasyonu.....	13
3.2.2 Besi Yerinin Hazırlanması.....	13
3.2.2.1 Çimlenme Ortamının Hazırlanması.....	15
3.2.2.2 Kallus Ortamının Hazırlanması.....	15
3.2.2.3 Alt Kültür Ortamlarının Hazırlanması.....	15
3.2.3 Verilerin Değerlendirilmesi.....	16
4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR.....	17
4.1 Steril Fidelerin Elde Edilmesi.....	17
4.2 Kallus Kültürü Bulguları.....	17
4.2.1 <i>Catharanthus roseus</i> 'un Kallus Kültürü.....	17
4.2.2 <i>Berberis vulgaris</i> 'in Kallus Kültürü.....	19
4.3 I. Alt Kültür Bulguları.....	21
4.3.1 <i>Catharanthus roseus</i> 'un I. alt kültürü.....	21
4.3.2 <i>Berberis vulgaris</i> 'in I. alt kültürü.....	24
4.4 II. Alt Kültür Bulguları.....	27
4.4.1 <i>Catharanthus roseus</i> 'un II. alt kültürü.....	27
4.3.2 <i>Berberis vulgaris</i> 'in II. alt kültürü.....	28
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	30
KAYNAKLAR.....	36
ÖZGEÇMİŞ.....	38

ALKALOİD İÇEREN BAZI TIBBİ BİTKİLERDE KALLUS KÜLTÜRÜ ÜZERİNDE BİR ÇALIŞMA

(Yüksek Lisans Tezi)

Fatma SÖYLEMEZ

**MUĞLA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTUSÜ**

2006

ÖZET

Catharanthus roseus ve *Berberis vulgaris* bitkilerinin tohumları *in vitro*'da çimlendirilerek steril bitkiciklerin kök, hipokotil, epikotil ve kotiledon explantları kallus elde etmek için kullanılmıştır. *Catharanthus roseus*, pervane çiçeği, (Apocynaceae) bitkisinde 0.1 mg/l Kin + 1.0 mg/l NAA bitki büyüme düzenleyicilerini içeren Murashige Skoog (MS) ortamında kallus oluşumu %76.3 iken 0.1 mg/l Kin + 2.0 mg/l 2,4D bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS ortamında ise %47.3 bulunmuştur. Elde edilen kallusların yaş ve kuru ağırlıkları bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonuna göre istatistiki açıdan önemli bir farklılık göstermemiştir

Berberis vulgaris, kadın tuzluğu, (Berberidaceae) için ise 0.1 mg/l Kin + 2.0 mg/l 2,4D kombinasyonlu MS ortamında kallus oluşumu % 100 gerçekleşmiştir. Aynı bitkide 0.1 mg/l Kin + 1.0 mg/l NAA bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS ortamında kallus oluşumu başarısız olmuştur.

Anahtar Kelimeler : *Catharanthus roseus*, *Berberis vulgaris*, kallus kültürü.

Sayfa Adedi :35

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Betül BÜRÜN

**A WORK ABOUT OBTAINING CALLUS FROM SOME MEDICAL
PLANTS CONTAINING ALKALOID**

(M.Sc. Thesis)

Fatma SÖYLEMEZ

**MUĞLA UNIVERSITY
INSTITUTE of SCIENCE and TECHNOLOGY**

2006

ABSTRACT

Callus, the seeds of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) and *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) were germinated *in vitro* and epikotils, hipokotils, kotiledons explants of these plants' aseptic seedlings were used with aim to obtain calli. For *Catharanthus roseus*, the callus percentage (%76.3) obtained from the Murashige Skoog (MS) media which contained 0.1 mg/l Kin+ 1.0 mg/l NAA plant growth regulators combination were higher than MS media containing 0.2 mg/l Kin+2.0 mg/l 2,4D plant growth regulators combination, 47.3%. But the se calli provided the same dry and fresh weight average for both of the hormone types.

For *Berberis vulgaris*, the callus percentage obtained from the MS media containing 0.1 mg/l Kin+2.0 mg/l 2,4D plant growth regulators combination was 100%. The callus formation was unsuccessfully on MS media 0.1 mg/l Kin+ 1.0 mg/l NAA plant growth regulators combination.

Key Words : *Catharanthus roseus*, *Berberis vulgaris*, callus culture

Page Number :35

Adviser : Prof. Dr. Betül BÜRÜN

ŞEKİLLER DİZİNİ	Syf no
Şekil 1 <i>Catharanthus roseus</i> (Pervane çiçeği).....	9
Şekil 2 <i>Berberis vulgaris</i> (Kadın tuzluğu).....	10
Şekil 3 Kallus oluşumu ve kallustan bitki rejenerasyonu	12
Şekil 4 <i>Catharanthus roseus</i> 'un MS + 0,1mg/l Kin+2,0mg/l 2.4-D'li ortamında gelişen kallus.....	18
Şekil 5 <i>Catharanthus roseus</i> ' un MS + 0,1 mg/l Kin + 1,0 mg/l NAA'lı ortamda elde edilen kallus kültürleri.....	19
Şekil 6 <i>Berberis vulgaris</i> 'in 0,1mg/l Kin+2,0mg/l 2.4-D'lı ortamdan elde edilen kallus	20
Şekil 7 <i>Catharanthus</i> 'un MS + 0, 05mg/lKin+ 1 ,0mg/l 2.4-D 'li I.alt kültür ortamından elde edilen kallus	22
Şekil 8 <i>Catharanthus roseus</i> 'un MS + 0,05mg/l Kin+0,5mg/l NAA 'li ortamının I. alt kültürden elde edilen kallus ..	23
Şekil 9 <i>Berberis vulgaris</i> 'in MS + 0.05 mg/l Kin + 1.0 mg/ 2,4-D'li I. alt kültür ortamından elde edilen kallus	25
Şekil 10 <i>Catharanthus roseus</i> 'un 1. ve II. alt kültür yaş ağırlık ortalamaları grafiği.....	32

TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ**Syf no**

Tablo 1 İlaç sanayisinde kullanılan bazı önemli bitkisel kökenli maddeler	2
Tablo 2 Murashige-Skoog besi yeri bileşimi	14
Tablo 3 <i>Catharanthus roseus</i> ve <i>Berberis vulgaris</i> tohumlarının çimlenme oranları	17
Tablo 4 Eksplantlardan elde edilen kallus oluşumları.....	21
Tablo 5 <i>Catharanthus roseus</i> 'un I. alt kültür kalluslarının yaş ve kuru ağırlıkları.....	24
Tablo 6 I. alt kültürlerdeki kallus gelişimleri	26
Tablo 7 <i>Berberis vulgaris</i> MS +Kin + 2,4-D'li I. alt kültür kalluslarının yaş ve kuru ağırlıkları.....	26
Tablo 8 II. alt kültür deki kallus oluşum oranları	27
Tablo 9 <i>Catharanthus roseus</i> 'un II. alt kültür kalluslarının yaş ve kuru ağırlıkları	28
Tablo 10 <i>Berberis'in</i> MS + Kin+ 2,4D'li II. alt kültür kalluslarının yaş ve kuru ağırlıkları.....	29
Tablo 11 <i>C. roseus</i> ve <i>B. vulgaris</i> 'in <i>in vitro</i> tohum çimlenme yüzdeleri, b. b. d. kombinasyonlarına göre kallus oluşumu ve gelişimi.....	30
Tablo 12. <i>Catharanthus roseus</i> 'un I. ve II. alt kültür yaş ve kuru ağırlık verileri.....	31

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

Kin	:Kinetin
NAA	:Naftalen Asetik Asit
2,4-D	:2,4-Dikloro Fenoksi Asetik Asit
MS	:Murashige Skoog besi yeri
NH ₄ NO ₃	:Amonyum Nitrat
KNO ₃	:Potasyum Nitrat
CaCl ₂ .2H ₂ O	:Kalsiyum Klorür
MgSO ₄ .7H ₂ O	:Magnezyum Sülfat
KH ₂ PO ₄	:Potasyum Dihidroksi Fosfat
FeSO ₄ .7H ₂ O	:Demir sülfat-7
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	:Sodyum Diamin Tetra Asetik Asit
KI	:Potasyum İyodür
H ₃ BO ₃	:Borik Asit
MnSO ₄ .H ₂ O	:Magnezyum Sülfat
ZnSO ₄ .7H ₂ O	:Çinko Sülfat
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	:Sodyum Molibdat
CuSO ₄ .5H ₂ O	:Bakır Sülfat
CaCl ₂ .6H ₂ O	:Kalsiyum Klorür
NaOHCl	:Sodyum Hidroksi Klorür

1. GİRİŞ

Günümüzde hala bazı tıp çevrelerince bitkilerin tıbbi yararlarının oranlarının büyüklüğü reddedilse de insanoğlunun var olduğu günden bu yana vücudunda hissettiği herhangi bir rahatsızlıktan ötürü çare aradığı, ama ilk, ama son kapı doğa ve özellikle de bitkilerdir. “Folklorik Tıp” ya da “Alternatif Tıp” olarak adlandırılan bu çare arayışı geçtiğimiz yüz yılda dikkate değer görülerek bitkiler üzerinde çalışılmıştır (Kulkarni 2000).

Öteden beri bitkilerin temel besin gereksinimlerini gidermek için karbonhidrat, yağ ve protein ürettiği (primer metabolizma) bilinmektedir. Fakat yapılan araştırmalar insanoğlunu besinsel önemi çok büyük olan bu primer metabolizma ürünlerinden başka, bu gün başta ilaç sanayi olmak üzere kimya, besin, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz bazı kimyasalların metabolik yollarını çözmeye yöneltmiş ve sonuçta bulunan bu yeni metabolik yola Sekonder Metabolizma; sekonder metabolizma sonucu oluşan; alkaloidler, fenilpropanoidler, terpenoidler, kuinonesler ve steroidler gibi kimyasal maddelere de Sekonder Metabolitler ya da “Doğal Ürünler” denmiştir. Primer ve sekonder metabolizma arasında çok sıkı ve dinamik bir ilişki vardır. Sekonder metabolitlerin öncül maddeleri genellikle primer metabolizmanın ürünlerinden veya ara maddelerinden sağlanır. Hücre mevcut karbonun hepsini primer aktiviteler için kullanmadığı durumlarda, sekonder metabolitlerin oluşumunu teşvik eder (Collins ve ark., 1996). Örneğin vinblastin, vinkristin, ajmalisin gibi indol alkaloidlerinin öncül maddesi triptofandır (Payne ve ark., 1991).

Bu ürünler arasında, özellikle ilaç yapımında kullanılan kimyasalların bulunması, bazı drogların ana bitkiden ziyade bu bitkilerin doku kültürleri tarafından üretimini ekonomik açıdan cazip kılmıştır. Doğal bileşiklerin bu alternatif yöntem ile üretiminin avantajları aşağıda özetlenmiştir (Sökmen ve Gürel., 2001).

- Ana bitkinin kültürü veya toplanması esnasında karşılaşılan çevresel etkenlerin (iklim, coğrafi zorluklar, ulaşım güçlükleri, mevsimsel kısıtlamalar vs.) ortadan kaldırılması,
- Arz talep dengeleri göz önüne alınarak gerektiği zaman yeterli üretimin sağlanabilmesi ve böylece piyasanın düzenli bir şekilde kontrolü,
- Daha sabit kalite ve verimlilikte üretim,

- Kültürü yapılan bitkiler için daha az arazi kullanımı,
- Politik baskılardan uzak, daha serbest bir üretim.

Doku kültürlerinden sadece sekonder ürünlerin doğrudan üretiminde faydalanılmamış aynı zamanda, bu ürünlerin biyosentez mekanizmalarının anlaşılmasında da yararlanılmıştır (Kulkarni, 2000).

İlk yazılı tarih kaynaklarında, insanların çeşitli hastalıkların tedavisinde bitkilerden, yiyerek veya çeşitli droglar hazırlayarak yararlandıkları belirtilmiştir. Ülkemizde en yaygın drog türü bitki çaylarıdır (Başer, 1997). Bugün bile dünya nüfusunun % 64'ü bitkileri tedavi amaçlı kullanmaktadır (Sökmen ve ark., 2001). Yaklaşık 20.000 bitki türünün tıbbi olarak kullanıldığı tahmin edilmektedir (Phillipson, 1990). Gelişmiş ülkelerde ise reçete ile satılan ilaçların %25'ini bitkisel kökenli kimyasallar oluşturmaktadır (Collin ve Edwards, 1998). Bu kimyasallar arasında alkaloidler, anti kanserojen aktiviteleri sebebiyle çok büyük bir önem kazanmıştır.

Günümüzde ilaç sanayinde kullanılan bazı önemli bitkisel kökenli maddeler, elde edildiği kaynaklar ve işlevi Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo1 İlaç sanayisinde kullanılan bazı önemli bitkisel kökenli maddeler (Phillipson,1990; Scragg, 1994; Sökmen ve ark., 2001).

İlaç Etken Maddesi	Elde Edildiği Bitki	Tedavi işlevi
Ajmalisin	<i>Catharanthus roseus</i>	Anti hipertansif
Vinkristin, Vinblastin, Ajmalisin	<i>Catharanthus roseus</i>	Kanser tedavisi
Digitoksin	<i>Digitalis purpurea</i>	Kardiovasküler
Efedrin	<i>Ephedra sinica</i>	Bronş açıcı
Kinin, Kinidin	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Sıtma tedavisi
Kodein	<i>Papaver samniferum</i>	Öksürük kesici, Analjezik
Reserpin	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antihipertansif

Sekonder metabolitlerin üretimi; farklılaşmış kültürler (kök ve sürgün kültürleri) ve farklılaşmamış kültürler (kallus kültürleri, hücre süspansiyon kültürleri) ile gerçekleştirilmektedir. Bu teknikler istenilen sekonder metaboliti içeren bitkinin,

en çok üretim miktarına sahip doku veya organlarının yapay besin ortamında kültüre alınarak istenen maddeyi üretmesini sağlamaktır. Bu konudaki en büyük sorun, kültüre alınan doku veya hücrelerin üretim miktarlarının ana hücredekinden düşük seviyelerde olmasıdır (Sökmen ve Gürel., 2001). Buna karşılık her iki tip kültürden de seleksiyonlarla yüksek verimli hatlar izole edilebilir (Staba, 1985).

Kallus, farklılaşmış doku ve hücrelerin yaralanması ile yaraların üzerinde oluşan farklılaşmamış hücre yığını olarak tanımlanmıştır (Kulkarni, 2000). Kallus kültürleri ise ana bitkiden kesilip çıkartılan ve bölünme özelliğini yitirmemiş organ veya doku parçalarının karbon kaynağı (genellikle şükroz) ve bitki büyüme düzenleyicileri (genellikle bir oksin ve bir sitokinin) içeren yarı katı steril besin ortamında büyütülmesi sonucu oluşan morfolojik düzensizliğe sahip kütleler olarak tarif edilebilir (Sökmen ve Gürel., 2001). Kallus kültürleri sekonder metabolit elde etme, rejenerasyon veya ploidi düzeyi ile ilgili çalışmaların ilk basamağını teşkil eder.

Bu çalışmada, alkaloid içeren *Catharanthus roseus* ve *Berberis vulgaris*'in *in vitro*'da kinetin ile birlikte NAA (Naftalen Asetik Asit) ve 2.4-D (Di Klor Fenoksi Asetik Asit) kullanılarak bir doku kültürü yöntemi olan kallus kültürü yöntemi ile sekonder metabolit üretiminin ilk basamağı olan kallus elde etme işlemi gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Medeniyetin başlarından 21. yüzyıla kadar bitkiler, insanlık için ilaçların en önemli kaynakları olmuştur. Bu uzun yolculuk boyunca en heyecan verici buluşlardan biri, bitkilerden anti kanserojen aktiviteleri olan çeşitli kimyasalların izolasyonu olmuştur. Kanser, dünya çapında önemli bir ölümcül hastalıktır ve her yıl 6 milyondan fazla vaka rapor edilmektedir (Kulkarni, 2000).

Geçtiğimiz 40 yıl içinde biyolojik keşiflerin akışı; Bitki Doku Kültürü, Rekombinant DNA Teknolojisi, Monoklonal Antikorlar ve Mikrokimyasal Enstrümantasyon'daki geliştirilmiş yeni metotlar ile bir damladan bir sele dönüşmüştür (Anonim: Opportunities in biology, 1989). Tıp alanında yeni tedavi edici ilaçlar ve teşhis metotları; kanser, aids ve alzheimer gibi hastalıkların tedavisinde büyük mesafeler kat edilmesini sağlamıştır (Kulkarni, 2000).

Biyoloji ve müttefik bilimlerdeki yeni buluşlar, "Biyoteknoloji" terimiyle tek bir şemsiye altında toplanmıştır. Biyoteknoloji; biyolojik sistemlerin tarım, tıp, çevre ve endüstri alanındaki pratik problemleri çözmek için modern teknoloji yoluyla idaresi olarak tanımlanmıştır (Kulkarni, 2000). Bu, doku kültürlerini klonal üretimi, protoplast birleşmesini, gen klonlanmasını, DNA rekombinasyonu, genetik mühendisliğini, mutasyon indüksiyonunu, *in-vitro* genetik seleksiyonunu, moleküler işaret yoluyla genom analizini ve gen haritası oluşumunu içerir (Huang et al., 1993). Tıbbi değeri olan sekonder metabolitlerin doku kültürü yoluyla *in vitro* üretimi de buraya dahil edilebilir.

Yüksek yapılı bitkiler, havadan, sudan ve minerallerden hem primer, hem de sekonder metabolitler üreten güneş enerjili yenilenebilir biyokimyasal fabrikalardır. Buna rağmen insanoğlu artan yiyecek, endüstriyel hammadde, ilaç, pestisit, çeşni ve esans gereksinimleri için bitkileri yönetmeye ve değiştirmeye yönelmiştir. En ilkel tarımcılıktan bu yana insanoğlu sürekli olarak, bitki gelişimi için deneyler yaparak kendi ihtiyaçları doğrultusunda bitkileri kullanmıştır (Pauls, 1995). Ama, son 150 yıldır geliştirilen çok sayıdaki teknikler, tarımda da modern bilim kurulumunu sağlamıştır. Son 50 yıldır tarımdaki gelişim, genel olarak daha önce değinilen "Biyoteknoloji"nin özellikle "Bitki Doku Kültürü" ve "Genetik Mühendisliği"nin gelişimiyle desteklenmiştir (Brar and Khush, 1994). Bu teknikler mikrop plazma

idaresi, genotip seleksiyonu, sabitleştirme, çeşitlilik, ürün korunumu ve ürün üretimi gibi çeşitli ürün gelişimi aşamalarına katkıda bulunmuştur (Pauls, 1995).

Bitkilerin yetiştirildiği çevre, bitki fonksiyonunun her yönü üzerinde çok güçlü bir etkiye sahiptir. Bu sebeple, bitki gelişimi yüksek derecede bir elastikiyet gösterir. Çevresel uyarıcılar, bitkinin yaşama döngüsü boyunca tepki esnekliği sağlamak, gelişim programını hızla değiştirmek ve etkilemek için ipucu olarak kullanılmışlardır. “Bitki Doku Kültürü” teknolojisi, bitki hücrelerinin çevreleri ile etkileşimi ve kültür koşullarına bağlı olarak çeşitli organların büyümesini sağlama kabiliyetine dayanır (Bowles and Leyser, 1994).

Genel olarak doku kültürünün teorik temeli, Schlieden ve Schwan’ın “Hücre Teorisi” ile 1838-1939’da kurulmuştur. Haberlandt (1902), önce bu teoriyi monokotillerde ispatlamaya çalışmış ve her ne kadar bu atağı başarısız olsa da, o tek bir hücrenin bütün bir bitkiyi yeniden oluşturması potansiyeline işaret eden “Totipotency” kavramını genişletmiştir. Bu süreci bitki doku kültüründeki birçok başarısız girişim izlemiştir. Ancak, Kotte (1922) ve Robins (1922 a, b), steril koşullar altında sentetik ortamda bezelye ve mısır köklerinin *in vitro* kültürünü bağımsız olarak elde etmişlerdir. Bu kök hücreleri birçok kez elde edilmese de; onlar, meristematik hücre kültürlerinin elde edilmesinin daha kolay olduğunu kanıtlamışlardır. 1934 ve 1939 yıllarında White, Gautheret ve Nobecourt önce bitki dokularını *in vitro* da sınırsız olarak elde etmeyi başarmışlardır. Ayrıca White (1934) kök meristemlerinin virüssüz olduğunu da gözlemlemiştir. Gautheret, kültürler yaşlandıkça beslenme ortamında bitki büyüme regülatörleri (özellikle de oksin) olmaksızın da kallusun büyümesini ortamın en ilginç olayı olarak tanımlamıştır (Kulkarni, 2000).

1951-1961 yılları arasındaki on yıllık dönem boyunca, başarılı kallus kültürleri, dikotil, monokotil ve gimnospermlere ait bir dizi bitkinin normal veya tümör dokularından kallus başlatılması ile geliştirilmiştir (Gautheret, 1985).

Bitkilerdeki büyümenin hormonal regülasyonu, farklılaşma ve organ formasyonunun (Skoog and Miller, 1957), kallus kültüründen bitkicik oluşumunun (rejenerasyon) (Reinert,1958) ve hücre süspansiyon kültürlerinden rejenerasyonun (Stewart et al.,1958) gerçekleştirilmesi bilginin insanoğlunun yararına kullanımı için bir zemin hazırlamıştır(Kulkarni, 2000).

Mikrokültürdeki tek tek hücrelerden tam bir tütün bitkisinin oluşumu (Vasil and Hildebrandt, 1965) ve havucun tek bir kaplanmış hücresinden somatik embriyo oluşumu (Backs-Husseman and Reinert, 1970) gibi çalışmalar, Haberlandt'ın totipotensi teorisinden yaklaşık 65 yıl sonrasında tek başına izole edilen bitki hücrelerinden totipotensinin şüphe götürmeyen ispatı olmuştur. Totipotensi kavramı, Datura'nın mikrosporlarından (yarı kromozomlu polen hücreleri) embriyo oluşumu "androgenesis" ile ispatlanmıştır (Guha and Maheswari, 1964).

Sekonder metabolizma, ilk olarak 1873'de fark edilse de fonksiyonu ancak 1888'de açıklanmıştır. Ancak 1950'lere kadar sekonder metabolitler, metabolizmanın son ürünleri olarak değerlendirilmişler ve gereksiz ürün olarak addedilmişlerdir. Ekonomik önemleri 1960'lara gelindiğinde keşfedilmiştir (Kurz and Constabel, 1998).

Günümüzde, sekonder metabolitlerin bitkilerdeki önemli işlevi tam olarak bilinmemektedir fakat, genellikle elzem maddeler olarak kabul edilmektedirler. Bilinen başlıca işlevleri şu şekilde özetlenmiştir (Wink, 1990; Sökmen ve Gürel., 2001):

- Kuraklık, tuzluluk, UV ışınları vs gibi değişik çevresel etkenlerin oluşturduğu stres ortamına karşı koyma,
- Herbivorlara (böcekler, sürüngenler vb.) karşı savunma,
- Mikroorganizmalara (bakteriler, virüsler, mantarlar vb.) karşı savunma,
- Bazı metabolik ve daha gelişmiş ekolojik işlevler (polinasyonu ve tohum dağılımını sağlamak için taşıyıcıları cezbettirme gibi).

Sekonder metabolizma ürünlerinin primer metabolizma ürünü olan öncüllere sahip oldukları ve bu öncüllerin başlangıç materyali olarak kullanıldığı bir dizi reaksiyon sonucu meydana geldikleri bilinmektedir. Bu öncül bileşikler, kültür ortamına verilmek suretiyle sekonder metabolit üretiminde kullanılabilirler. Ortamda bol miktarda başlangıç materyalinin bulunması, bitki hücresini sekonder metabolitin üretileceği metabolik yola teşvik edecektir. Fakat, bu uygulamanın ürün verimi üzerinde çok küçük etkileri olduğu, bu etkinin de öncül madde ile ürün arasındaki basamak sayısının fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Yeoman ve ark., 1990). Öncüllerin kültürlere verilmesinde dikkat edilecek noktalar, zamanlama,

metabolik yolun ve hücrenin bu bileşiği içeri alma yollarının iyi bilinmesi ve hücrede birikim miktarlarının ve toksik olmayacak konsantrasyonlarının tespit edilmesi olarak belirtilmektedir (Sökmen ve Gürel., 2001).

Bitki doku ve hücre kültürü teknolojileri, tehlike altındaki en seçkin bitkilerin korunması, drogların ve drog içeriklerinin çevreye dost üretim yöntemleriyle üretilmesi ile insanlığın yararına doğa kaynaklarının kullanımını sağlamış ve bu sayede bir kurtarıcı pozisyonuna geçmiştir. Germplazmın soğukta muhafazası tehlike altındaki popülasyonun ve genetik çeşitliliğin korunmasına yardımcı olabilir ve geliştirilmiş hücre ve doku kültürü teknolojileri, doğal kaynakları yok etmeden daha iyi bir verimlilikle aktif bileşiklerin *in vitro*'da (laboratuvar koşullarında) üretmeye yardımcı olabilir (Kulkarni, 2000).

Hücre süspansiyon kültürleri, immobilize hücre kültürleri, farklılaşmış Kültürler gibi kallus kültürleri de sekonder metabolitlerin *in vitro* üretim yöntemlerinden biridir (Kulkarni, 2000).

Kallus kültürleri, genellikle farklılaşmış doku ve hücrelerin yaralanması ile oluşan yaralarda çoğalan farklılaşmamış hücre yığınlarını içerir. Bunlar ya sekonder metabolit sentezleyen ilgili kaynak dokudan ya da embriyo gibi başka dokulardan başlatılmışlardır. Genellikle, sekonder metabolitleri üreten doku kültürleri, spesifik sekonder metabolit ürünlerini biriktiren yüksek bitkilerden meydana gelmiş olabildiği gibi tam tersi de söz konusu olabilir. Bunun nedeni, sekonder metabolitlerin biyosentez kapasitesinin genetik olarak sınırlandırılmış olması olarak düşünülmüştür (Lindsey ve Yeoman, 1985). Hücre bölünmesi genellikle de-differansiyasyon yoluyla parankimatik hücrelerde meydana gelmiştir. Bu süreç boyunca olgun hücreler geçici olarak genç (juvenil) durumlarına dönerler (Rejuventasyon) ve bu yüzden yoğun büyüme ve bölünme aktivitesi gösterirler (Kulkarni, 2000). De-differansiyasyon (farklılaşmadan geri dönüş) derecesinin aynı eksplanttan olan farklı hücrelerde bile farklı farklı olduğu görülmüştür (Lindsey ve Yeoman, 1985). Normalde genç ve dolayısıyla fizyolojik olarak aktif dokular daha iyi kallus oluşumu sağlamışlardır. Kallus oluşumu için dışsal bitki büyüme regülatörü ihtiyacının, dokuların genotiplerine ve içsel hormon içeriklerine bağlı olduğu da görülmüştür (Pierik, 1987).

Son yıllarda kallus kültürleri sekonder metabolit üretiminde kullanılmaktadır. Konu ile ilgili çalışmalar, kallus indüksiyonu ve büyümesi için gerekli koşulların (büyüme ortamı) sekonder metabolit üretimi için yeterli olmadığını, bunun için kallusun farklı içeriğe sahip yeni bir ortama (üretim ortamı) transferine ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir (Kulkarni, 2000).

Kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde alt kültür sayısı arttıkça varyasyon artmış ve dolayısı ile başlangıçtakinden farklı kültürler oluşmuş, bazen de bazı hücre veya hücre gruplarının farklılaşarak kök veya sürgün oluşumu ile sonuçlanmıştır. Özellikle de bu dokularda sekonder metabolit birikiminin daha fazla olduğu gözlenmiştir (Kulkarni, 2000; Sökmen ve Gürel., 2001) .

Akçam (1993), *C. roseus* L. (*G*) *Don* bitkisinde kallus elde edilmesi ve kallustan rejenerasyon üzerinde çalışmış ve en iyi kallus oluşumu 2 mg/l NAA + 3 mg/l BA veya 2 mg/l NAA + 5 mg/l BA içeren MS ortamında gözlenmiş daha sonra bu kallus hatlarından rejenerasyona gidilmiş ve elde edilen rejenerant bitkiler *in vivo* koşullarda (tarlada) %92 oranında canlılık sağlamışlardır.

Bu çalışmada da *C. roseus* için en iyi kallus oluşumu ve gelişimi araştırılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, kanser tedavisinde kullanılan vinkristin ve vinblastin alkaloidlerini içeren Apocynaceae familyasına ait *Catharanthus roseus* (L.) G. (pervane çiçeği, madagaskar pervanesi) (Şekil 1) ile bakteriler ve protozoonlar üzerinde geniş spektrumlu etkiye sahip berberin alkaloidini içeren Berberidaceae familyasına ait *Berberis vulgaris* L. (kadın tuzluğu, karamuk) materyal olarak kullanılmıştır (Şekil 2).



(www.g.netz.de/Health_Center/helpflonzen/berberitze)

Şekil 1 *Catharanthus roseus* (Pervane çiçeği)



(<http://linneaus.nrm.se/floral/di/berberida/berbe/berbvul8.jpg>)

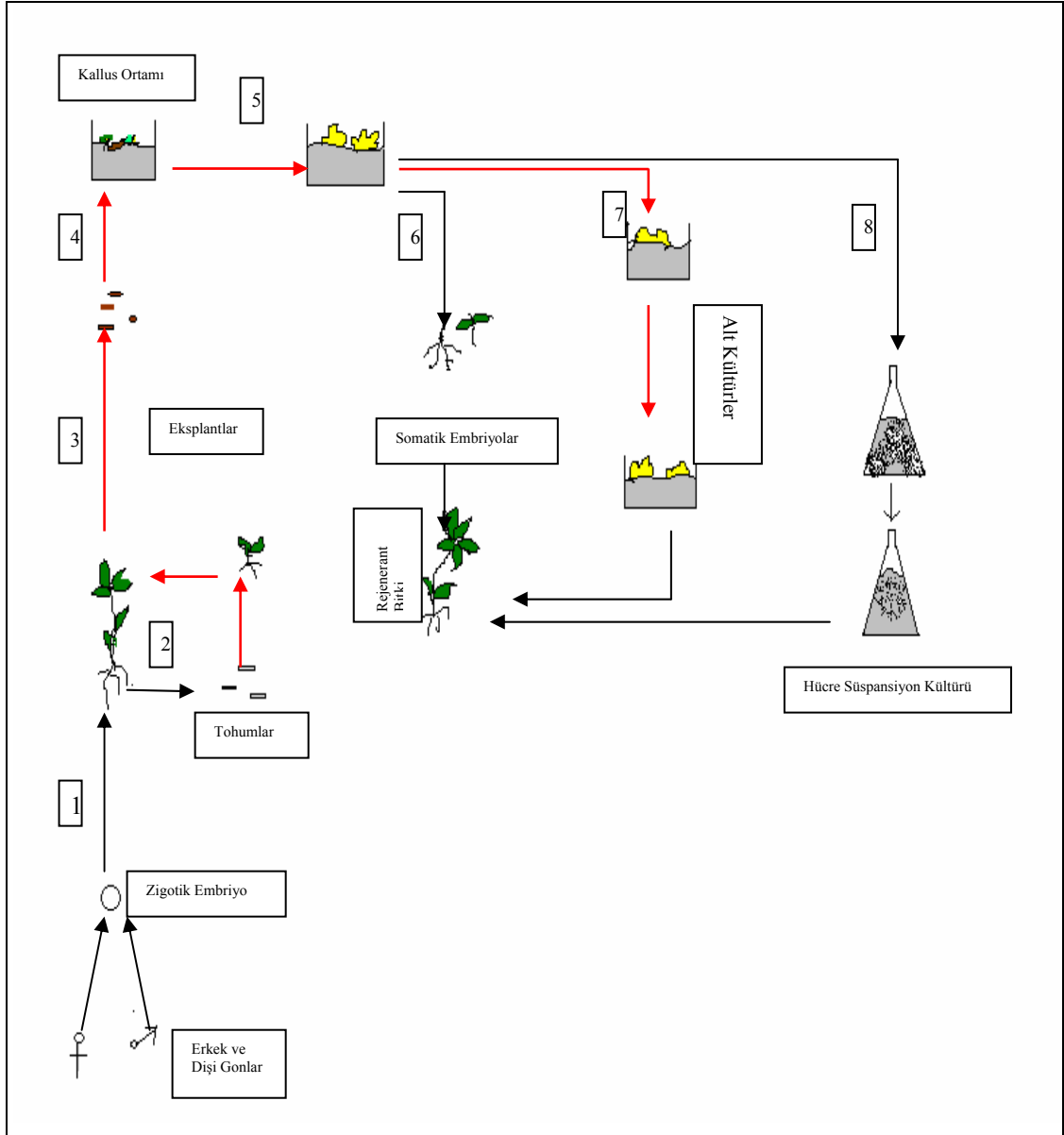
Şekil 2 *Berberis vulgaris* (Kadın tuzluğu)

Söz konusu bitkilerin tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesi ile elde edilen steril fidelerin kök, hipokotil, epikotil ve kotiledonları eksplant (bitki parçası) olarak kullanılmıştır. Gözlemler, eksplant tipine göre ayrı ayrı yapılmamış, eksplanttan kallus oluşumu olarak değerlendirilmiştir.

3.2. Yöntem

Bu çalışmada takip edilen yol Şekil 3’de şematize edilmiştir. Şekil 3 incelendiğinde görülecektir ki bitki tohumları, sterilize edildikten sonra çimlendirilmiş, elde edilen fidelerden alınan kök, gövde ve yaprak eksplantlarından kallus elde edilmiştir. Bu kalluslar iki defa alt kültüre alınmıştır. Kallus kültürü için bitki büyüme düzenleyicisi olarak kinetin(Kin), naftalen asetik asit (NAA) ve 2,4 dikloro fenoksi asetik asit (2.4-D)’in çeşitli kombinasyonları kullanılmıştır ve uygun kombinasyon

belirlenmeye çalışılmıştır. 2, 3, 4, 5, 7 numaralı oklarla gösterilen yol takip edilmiş ancak 7 nolu basamakta rejenerasyona gidilmemiş sadece alt kültürler ile kallus çoğaltılmıştır.



Şekil 3 Kallus oluşumu ve kallustan bitki rejenerasyonu (Gaines, 2004'den değiştirilerek)

1. Zigotik embriyodan bitki farklılaşması (Differansiyasyon).
2. Tohumlardan steril fideler elde etme.
3. Bu fidelerin kök, gövde ve yapraklarından steril eksplant elde etme.
4. Steril eksplantları kallus ortamına transfer etme.
5. Eksplantlardan kallus oluşumu.
6. Kallustan rejenerant bitki elde edilmesi.
7. Kallusu bir süre alt kültüre alarak rejenerasyona gitme
8. Kalluslardan hücre süspansiyon kültürüne gitme.

3.2.1. Sterilizasyon için Kullanılan Metotlar

Bir ortam veya maddenin tüm canlı mikroorganizmalarda arındırılması işlemine sterilizasyon denir (Kulkarni, 2000). *İn vitro* kültür çalışmalarının çalışmaların başarılı olmasındaki ilk basamak doğru sterilizasyon metotlarının seçilmiş olmasıdır.

3.2.1.1. Tohum sterilizasyonu

Meyvesinden ayrılan *C. roseus* ve *B. vulgaris* tohumları, önce %70 alkolden geçirilmiş, sonra 1:1 oranındaki sodyum hipoklorit (NaOHC1): steril distile suda *B. vulgaris* tohumları 10 dakika, *C. roseus* tohumları 15 dakika bekletilmiştir. Ardından tohumlar, 5 kez steril distile suda çalkalanmıştır (Babaoğlu ve ark., 2001).

3.2.1.2. Kullanılan Aletlerin Sterilizasyonu

Gerek tohum, gerekse eksplant transferinde kullanılan pens, makas, bistüri gibi el aletleri, alkole batırıldıktan sonra ateşten geçirilerek sterilize edilmiştir. Söz konusu işlem her tohum ve eksplantı kültüre alma işlemi için tekrarlanmıştır.

3.2.1.3. Besin Ortamının Sterilizasyonu

Cam tüp veya kavanozlara dökülen besin ortamı (kültür ortamı) yerlerinin ağızları pamuk ile kapatıldıktan sonra 1 atm basınçta, 121°C sıcaklıkta, otoklavda 20 dakika sterilize edilmiştir.

3.2.1.4. Transfer Ortamının Sterilizasyonu

Tohumların ve eksplantların steril bir şekilde kültüre alınması işlemi laminar flow kabinde yapılmıştır. Kültüre alma işleminden yaklaşık 1 saat önce flow kabin çalıştırılarak steril çalışma ortamı sağlanmıştır.

3.2.2. Besin Ortamının Hazırlanması

Çalışmamızda çimlenme ortamı, kallus ortamı ve alt kültür ortamları olarak belirttiğimiz tüm kültür ortamlarında sadece bitki büyüme düzenleyicisi ilaveleri değiştirilmek sureti ile Murashige-Skoog (1962) (MS) kültür ortamı kullanılmıştır. 1 litre MS kültür ortamı hazırlamak için gerekli kimyasalların bileşim ve miktarları **Tablo 2'** de verilmiştir. 1 litre besin ortamı için gerekli miktarlar alınarak sükröz ilavesi yapıldıktan sonra sükröz eritilerek litreye distile su ile tamamlanmış ve kültür

ortamının pH' sı, pH metre ile 5.5(\pm 0.1)' e ayarlanmıştır. pH ayarlamasından sonra agar eklenerek ağzı folyo ile kapatılmış ve önceden 95°C'ye ayarlanmış sıcak su banyosunda agar homojen dağılıncaya kadar pişirilmiştir. Steril kültür kaplarına aktarıldıktan sonra otoklavda sterilize edilmiştir.

Tablo 2 Murashige – Skoog (1962) (MS) Besin Ortamı Bileşimi (Babaoğlu ve ark., 2001)

<u>Komponentler</u>	<u>Kültür Ortamındaki Konsantrasyon (mg/l)</u>
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6.2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
KI	0.83
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Myo-inisitol	100
Nikotinik Asit	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Glycine	2.0
Sükroz	30 000

3.2.2.1. Çimlenme Ortamının Hazırlanması

Çimlendirme ortamı olarak yarı güçlü Murashige-Skoog ortamı (1/2 MS) kullanılmıştır. Tablo 2’de gösterilen kimyasal maddelerden 1/2 MS kültür ortamı için uygun miktarlar alınmış, çimlenme ortamı olarak hazırlanmıştır. Bu ortam için bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonları kullanılmamıştır. Hazırlanan besin ortamı tüplere dökülmüş ve sterilize edilen tohumlar kültür tüplerine yerleştirilmiştir.

Kültür tüpleri, tohumların çimlenmesi için 25°C ve karanlık koşulda kültür odasına yerleştirilmiştir. Her bir kültür tüpüne 3’er adet olmak üzere 340 adet *Catharanthus*, toplam 180 adet *Berberis* tohumu çimlenme ortamına ekilmiştir.

3.2.2.2. Kallus ortamlarının hazırlanması:

C. roseus bitkisinin kallus kültürü için Tablo 2’de verilen kimyasal maddelerden gerekli miktarlar alınarak aşağıdaki bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarını içeren Murashige-Skoog (1962) (MS) kültür ortamı hazırlanmıştır.

- MS + 0.1 mg/l Kin + 2.0 mg/l 2,4-D
- MS + 0.1 mg/l Kin + 1.0 mg/l NAA

10-20 ml besin ortamı içeren her bir tüpe eksplant transferi yapılmıştır. Çim bitkilerinin epikotil, hipokotil ve kotiledon eksplantları transfer edilmiştir. Böylece, ortalama 38 adet eksplant kinetin ve 2.4-D içeren MS kültür ortamına, 38 adet eksplant da kinetin ve NAA içeren MS kültür ortamına transfer edilerek tüpler kültür odasının karanlık bölümüne alınmıştır.

B. vulgaris için ise benzer şekilde, yukarıda verilen bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonunu içeren besin yerleri hazırlanmıştır. Ancak, 19 adet eksplant kinetin ve 2.4-D’li besin ortamına, 19 adet eksplant da kinetin ve NAA’lı besin ortamına transfer edilerek tüpler kültür odasının karanlık bölümüne yerleştirilmiştir.

3.2.2.3. Alt kültür ortamlarının hazırlanması

Elde edilen kallusların yarısının yaş ve kuru ağırlıkları alınmış, diğer yarısı ise alt kültüre transferleri yapılmıştır. Alt kültürler için besin ortamı, 1/2 MS kültür ortamı ve bitki büyüme düzenleyicisi miktarları yarıya indirilerek kullanılmıştır.

Eksplantların kültüründen elde edilen *C. roseus* kallusları alt kültür olarak;

- $\frac{1}{2}$ MS + 0,05 mg/l Kin + 1 mg/l 2,4-D'li besin ortamına aktarılmış, gelişmeler izlenmiş ve denemenin sonunda yaş ve kuru ağırlıkları alınmıştır.
- $\frac{1}{2}$ MS + 0,05 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA'lı besi yerine aktarılmış, gelişmeler izlenmiş ve denemenin sonunda kallusların yaş ve kuru ağırlıkları alınmıştır.

B. vulgaris kalluslarının alt kültürü:

- $\frac{1}{2}$ MS + 0,05 mg/l Kin + 1 mg/l 2.4-D'li besin ortamına yapılmış, gelişmeler izlenmiş ve denemenin sonunda kallusların yaş ve kuru ağırlıkları alınmıştır. Kallusların kurutulması oda şartlarında yapılmıştır.

3.2.3. Verilerin Değerlendirilmesi

Kallusların yaş ve kuru ağırlıklarının ölçümü hassas terazi ile yapılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda kallus oluşumu gözlenen, gözlenmeyen ve kontaminasyon görülen tüpler sayılmak suretiyle yüzdeleri bulunmuştur.

C. roseus ve *B. vulgaris*'in bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonuna göre kallus oluşturma oranlarının istatistiksel analizi yapılmıştır. Kallusların yaş ve kuru ağırlık verilerine T testi uygulanmıştır. T testinin uygulanmasındaki amaç her iki hormon grubundan hangisinin kallus oluşturma özelliğinin hangi bitki üzerinde daha etkili olduğunu tayin etmektir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Steril Fidelerin Elde Edilmesi

C. roseus ve *B. vulgaris* tohumları bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı güçlü MS kültür ortamında çimlendirmeye alınmıştır. *C. roseus*'da tohumların kültüre alınmasından itibaren 15 gün içerisinde çimlenme tamamlanmış, *B. vulgaris*'de ise çimlenme 30-35 gün devam etmiş ve 35 gün sonra çimlenme gözlenen tohum sayıları belirlenmiştir. Her iki bitki türüne ait tohumların % çimlenme oranları Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3 *C. roseus* ve *B. vulgaris* tohumlarının çimlenme oranları(%)

Bitki Adı	Ortam	Kültüre Alınan Tohum Sayısı	Çimlenme Gözlenen Tohum Sayısı	Çimlenme Oranı (%)
<i>C. roseus</i>	1/2 MS	340	340	% 100
<i>B. vulgaris</i>	1/2 MS	180	42	% 23.3

Tablo 3'den de görüldüğü gibi *C. roseus*'un kültüre alınan tüm tohumları çimlenmiştir (% 100). *B. vulgaris*'te ise çimlenme oranı düşük olmuştur (%23.3). *B. vulgaris*'te %36.7 çimlenmeyen tohum ve %40 enfeksiyon gözlenmiştir.

Sonuç olarak, tohumların çimlendirilmesi ile kallus kültüründe kullanılmak üzere her iki bitki türüne ait steril fideler elde edilmiştir.

4.2. Kallus Kültürü Bulguları

4.2.1 *Catharanthus roseus*'un kallus kültürü

MS+ 0,1 mg/l Kin + 2.0 mg/l 2,4-D ilaveli kültür ortamına eksplantlar aktarılmış, kallus gelişimleri gözlenmiştir. Steril fidelerin kültüre alınmasından 80 gün sonra 18 tüpte kallus oluşumları gözlenmiş, 2 tüpte kontaminasyon gözlenirken 18 tüpte de hiçbir gelişim gözlenmemiştir. Kallus oluşumu %47.3, kontaminasyon %5.8 olmuştur. Gelişen kallusların renklerinin sarımtırak kahverengi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4 *Catharanthus roseus*'un MS + 0,1 mg/l Kin + 2,0 mg/l 2.4-D'li kültür ortamda gelişen kallus (eksplantların kültüre alınmasından 80 gün sonra)

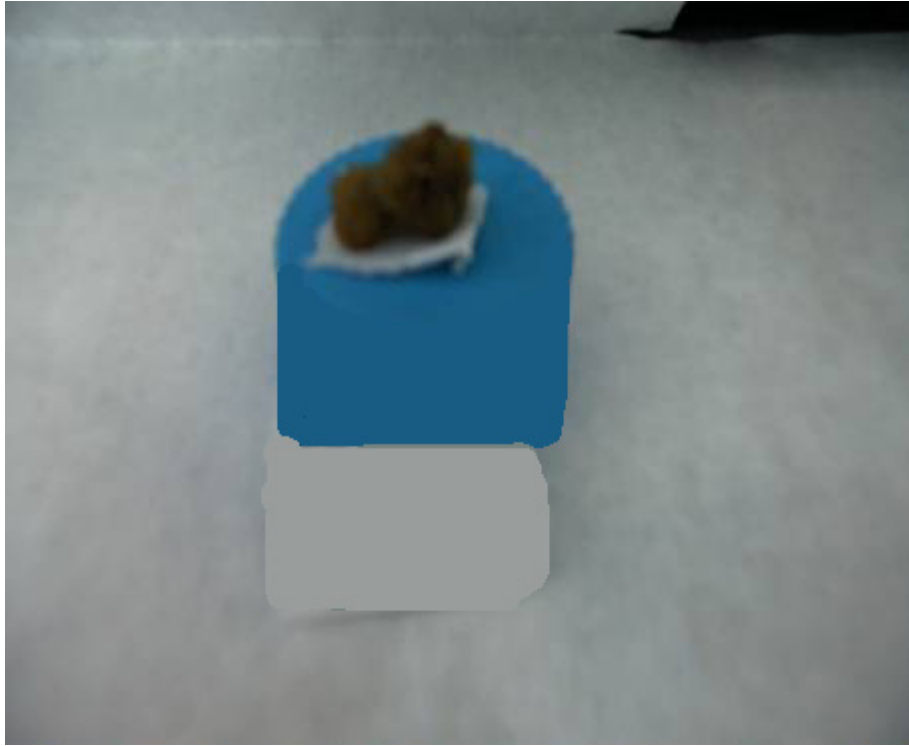
MS + 0,1 mg/l Kin + 1.0 mg/l NAA içeren besin ortamında, 29 tüpte, çapları 1mm ile 1cm arasında değişen, renkleri beyazdan sarıya ve kahverengine doğru olan kallus oluşumları gözlenmiştir(Şekil 5). Eksplantların kültüre alınmasından 80 gün sonra; kallus oluşumu %76.3 ve eksplantların %23.6'sında kallus gözlenmemiştir. Ayrıca, hiçbir kültür tüpünde kontaminasyon olmamıştır.



Şekil 5 *Catharanthus roseus*' un MS + 0,1 mg/l Kin + 1,0 mg/l NAA'lı kültür ortamında elde edilen kallus (eksplantların kültüre alınmasından 80 gün sonra)

4.2.2. *Berberis vulgaris*'in kallus kültürü

MS + 0,1 mg/l Kin + 2,0 mg/l 2,4-D içeren kallus kültürü ortamında eksplantların tamamında (%100), çapları 0.5 cm'den 2 cm'ye kadar değişim gösteren, fosforlu sarıdan kahverengine doğru farklı renklerde olan kallus yığınları gözlenmiştir (Şekil 6).



Şekil 6 *Berberis vulgaris*'in 0,1 mg/l Kin + 2,0 mg/l 2.4-D'lı kültür ortamda elde edilen kallus (eksplantların kültüre alınmasından 80 gün sonra)

MS + 0,1 mg/l Kin + 1,0 mg/l NAA içeren ortamdaki eksplantların hiçbirinde kallus oluşumu görülmemiştir ayrıca kontaminasyon da gözlenmemiştir.

Tablo 4 Eksplantlardan elde edilen kallus oluşumları (%)

Bitki Adı	MS Ortamı + Bitki Büyüme Düzenleyicisi	Toplam Eksplant Sayısı	Kallus Oluşumu Gözlenen Eksplant Sayısı	Gelişme Gözlenmeyen Eksplant Sayısı	Bulaşma Olan Eksplant Sayısı	Kallus %	Kontaminasyon
<i>C.roseus</i>	Kin+2,4-D	38	18	18	2	% 47.3	%5.8
<i>C.roseus</i>	Kin+NAA	38	29	9	-	% 76.3	-
<i>B.vulgaris</i>	Kin+2,4-D	19	19	-	-	% 100	-
<i>B.vulgaris</i>	Kin+NAA	19	-	19	-	-	-

Tablo 4'den de görüldüğü gibi *Catharanthus* bitkisinde kinetin ve NAA içeren MS ortamında % 76.3 kallus oluşumu gözlenirken, kinetin ve 2,4-D ilaveli besin ortamında % 47.3 kallus oluşumu gözlenmiş ve *Catharanthus*'un kallus kültürü için bitki büyüme düzenleyicisi olarak kinetin ve NAA ilavesi daha uygun bulunmuştur. *B. vulgaris* için kinetin ve 2,4-D ilaveli MS besin ortamında kallus oluşum oranı %100 iken NAA'lı ortamda bir gelişme gözlenmemiştir.

Genel olarak, % kallus gözlemleri eksplant tipi ayrımı yapılmadan belirtilmekle beraber, en erken ve en gelişmiş kallus oluşumu kotiledon eksplantlarında gözlenmiştir. Bunu kök eksplantlarının, hipokotil-epikotil eksplantlarının takip ettiği gözlenmiştir.

4.3. Birinci (I.) Alt Kültür Bulguları

4.3.1. *Catharanthus roseus*'un I. alt kültürü

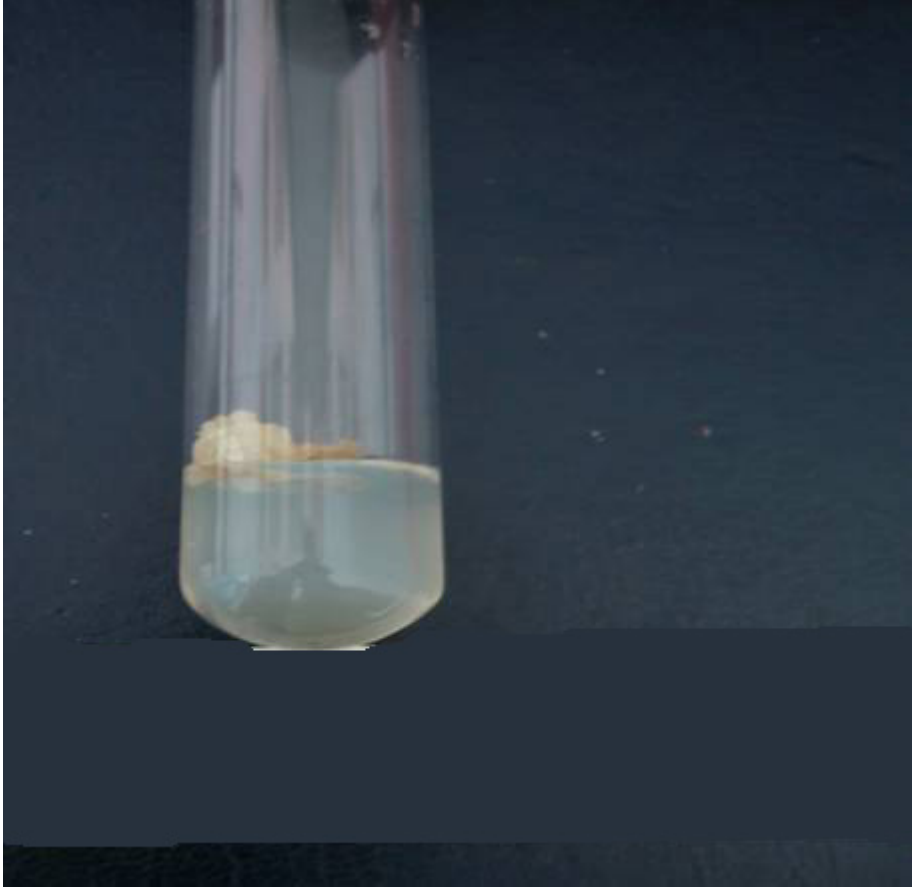
MS + 0.1 mg/l Kin + 2.0 mg/l 2,4-D ortamında gelişen kallusların, I. alt kültür ortamı olarak MS + 0,05 mg/l Kin + 1,0 mg/l 2,4-D ilaveli besin ortamına transferi yapılmış ve alt kültürde, 1 ay sonra kallusların %55.5 gelişme görülürken %5.5'inde kuruma ve %38.8'inde kontaminasyon görülmüştür. Kontaminasyon

oranındaki bu artışın sebebi, çalışmanın bu bölümünün yaz aylarında çok sıcak günlerde yapılmış olması olarak düşünülmüştür. Gelişen kallus yığınlarının çapları, 2 mm'den 1 cm'ye kadar değişmiştir(Şekil 7).



Şekil 7 *Catharthus*'un MS + 0,05 mg/l Kin + 1,0 mg/l 2.4-D ortamında I.alt kültürden elde edilen kallus yığını (kallus transferinden 1 ay sonra)

MS + 0.1 mg/l Kin + 1.0 mg/l NAA 'lı ortamda elde edilen kalluslar ise MS + 0,05 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA'lı MS besin ortamında alt kültüre alınmış ve kallus gelişimi % 68.9 olarak belirlenmiş olup, % 32.1'de hiçbir gelişme görülmemiştir. Ayrıca kontaminasyon gözlenmemiştir. Kallus oluşumları açık sarı süngerimsi yapıdadır (Şekil 8).



Şekil 8 *Catharanthus roseus* 'un MS + 0,05 mg/l Kin + 0,5mg/l NAA'li ortamda I. alt kültürden elde edilen kallus yığı (kallus transferinden 1ay sonra)

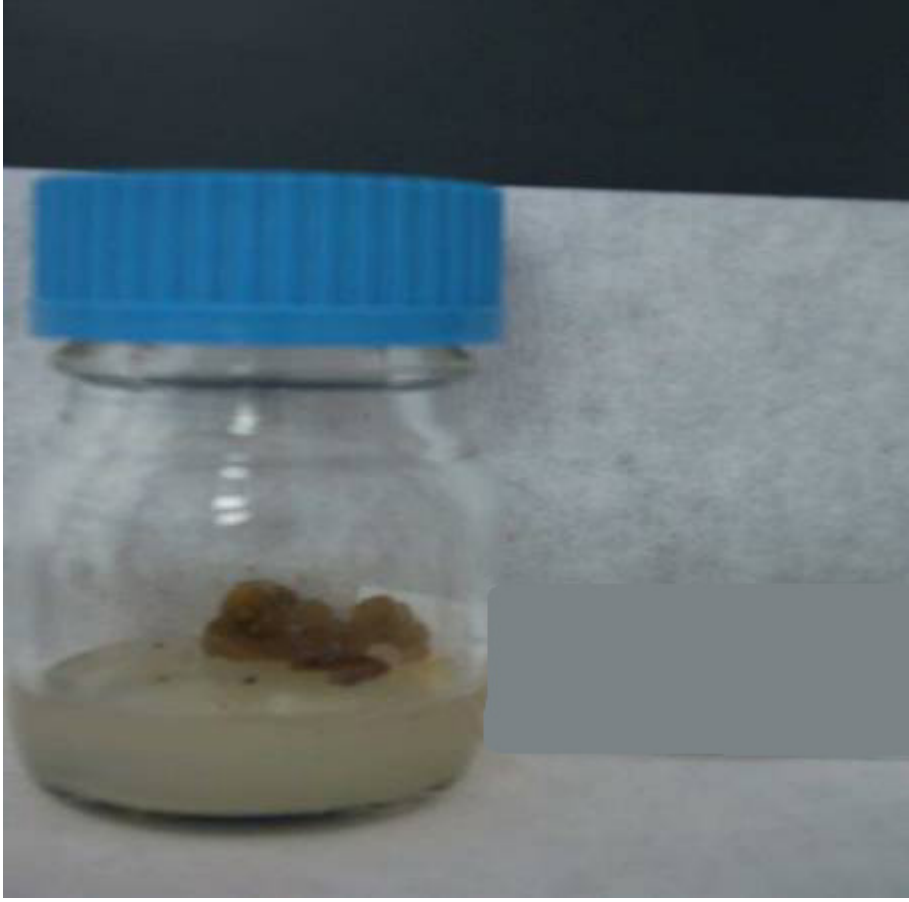
C. roseus'un I. alt kültüründen elde edilen kallusların yaş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir(Tablo 5).

Tablo 5 *Catharanthus roseus*'un I. alt kültür kalluslarının yaş ve kuru ağırlıkları

N o	Bitki	<i>Catharanthus roseus</i>			
	Ortam	MS + 0.05 mg/l Kin + 1.0mg/l 2,4-D		MS + 0,05 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA	
	Yaş ağırlık (g)	Kuru ağırlık (g)	Yaş ağırlık (g)	Kuru ağırlık (g)	
1	0.49	0.03	0.23	0.02	
2	0.08	0.01	0.02	0.01	
3	0.58	0.06	0.32	0.02	
4	0.63	0.3	0.35	0.01	
5	0.67	0.01	0.05	0.03	
6	0.05	0.01	0.55	0.02	
7	0.09	0.01	0.48	0.04	
8	0.48	0.04	0.52	0.01	
9	0.02	0.01	0.17	0.01	
10	0.49	0.01	0.03	0.01	
11	0.08	0.01	0.08	0.01	
12	0.46	0.01	0.10	0.01	
13	0.05	0.01	0.18	0.01	
14	0.19	0.02	0.13	0.01	
15	0.05	0.01	0.31	0.02	
16	0.46	0.04	0.52	0.04	
17	0.18	0.01	0.07	0.01	
18	0.05	0.01	0.16	0.01	
19			0.80	0.04	
20			0.11	0.02	
21			0.60	0.01	
22			0.48	0.02	
23			0.11	0.01	
24			0.49	0.03	
25			0.22	0.01	
26			0.03	0.01	
27			0.04	0.01	
28			0.57	0.04	
29			0.69	0.04	
Ort.	0.28	0.03	0.29	0.01	

4.3.2. *Berberis vulgaris*'in I. alt kültürü

Berberis vulgaris kültüründe sadece MS + 0.1 mg/l Kin + 2.0 mg/l 2,4-D'li ortamda kallus gözlenmiş olup, bu kalluslar MS + 0.05 mg/l Kin + 1.0 mg/l 2,4-D'li MS besin ortamında yerinde alt kültüre alınmıştır. Bir ay sonra sarıdan koyu kahverengine doğru renk değişimi gösteren kallusların gelişimi % 84.2 oranında gerçekleşmiş, % 10 kuruma, % 15.7 kontaminasyon gözlenmiştir(Şekil 9).



Şekil 9 *Berberis vulgaris*'in MS + 0.05 mg/l Kin + 1.0 mg/ 2,4-D'li I. alt kültür ortamından elde edilen kallus yığı (kallus transferinden 1 ay sonra)

Tablo 6'dan da görüldüğü gibi *Catharanthus* bitkisinde birinci alt kültürlerde kinetin ve NAA'lı ortamda %68.9 kallus gelişimi gözlenirken kinetin 2,4-D ilaveli besin ortamında % 55.5 kallus gelişimi gözlenmiş ve bitki büyüme düzenleyicisi olarak I. alt kültürde de kinetin ve NAA ilavesi uygun bulunmuştur. *B. vulgaris*'te ise kinetin ve 2,4-D ilaveli MS besi yerinde kallus gelişimi % 84.2 dir.

Tablo 6 I. Alt kültürlerdeki kallus gelişimleri (%)

Bitki Adı	MS Ortamı + Bitki Büyüme Düzenleyicisi	Toplam Tüp Sayısı	Kallus Gelişimi Gözlenen Tüp Sayısı	Gelişme Gözlenmeyen Tüp Sayısı	Bulaşma Olan Tüp Sayısı	Kallus Gelişimi(%)	Kontaminasyon Oranı
<i>C. roseus</i>	Kin+2.4-D	18	10	1	7	%55.5	% 38.8
<i>C. roseus</i>	Kin+NAA	29	20	9	-	%68.9	-
<i>B. vulgaris</i>	Kin+2.4-D	19	16	-	3	% 84.2	% 15.7

MS + 0.05 mg/l Kin + 1 mg/l 2.4-D kombinasyonlu besin ortamında I. alt kültürde elde edilen kallusların yaş ve kuru ağırlıkları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7 *Berberis vulgaris*'in Kin ve 2.4-D'li MS ortamında I. alt kültürde gelişen kallusların yaş ve kuru ağırlıkları

No	Bitki	<i>Berberis vulgaris</i>	
	Ortam	MS + 0.05 mg/l Kin + 1.0 mg/l 2,4-D	
		Yaş ağırlık (g)	Kuru ağırlık (g)
1		0.33	0.02
2		0.74	0.04
3		0.49	0.04
4		0.66	0.03
5		0.87	0.05
6		0.71	0.04
7		0.94	0.02
8		0.92	0.02
9		0.69	0.03
10		0.24	0.02
11		0.35	0.02
12		0.24	0.02
13		1.06	0.05
14		0.95	0.04
15		0.98	0.04
16		1.06	0.05
17		0.36	0.01
18		1.08	0.04
19		0.80	0.04
Ort.		0.67	0.03

Ortalama en yüksek kallus yaş ağırlığı (0.67g) *Berberis vulgaris*'de elde edilmiştir(Tablo7)

4.4. II. Alt Kültür Çalışması Bulguları

4.4.1. *Catharanthus roseus* 'un II. alt kültürü

MS + 0,025 mg/l Kin + 0,5 mg/l 2.4-D'li ortamdaki II. alt kültürlerde, 1 ay sonra % 40 kallus gelişimi gözlenmiştir. Ayrıca, %60 gibi oldukça yüksek oranda kontaminasyon olmuştur.

MS + 0,025 mg/l Kin + 0,25 mg/l NAA'lı II. alt kültür ortamında ise 1 ay sonra % 20 oranında kallus gelişimi gözlenirken % 40'ında hiçbir gelişme olmamıştır. Kültür tüplerinde kontaminasyon % 40 olarak belirlenmiştir(Tablo 8).

Tablo 8 II. Alt kültürdeki kallus gelişimi(%)

Bitki Adı	MS Ortamı + Bitki Büyüme Düzenleyicisi	Toplam Tüp Sayısı	Kallus Gelişimi Gözlenen Tüp Sayısı	Gelişim Gözlenmeyen Tüp Sayısı	Kontamine Olan Tüp Sayısı	Kallus Oranı	Kontaminasyon Oranı
<i>C.roseus</i>	Kin+2,4-D	10	4	-	6	% 40	% 60
<i>C.roseus</i>	Kin+NAA	5	1	2	2	% 20	% 40
<i>B.vulgaris</i>	Kin+2,4-D	8	6	-	2	% 75	% 25

C. roseus'un II. alt kültüründen elde edilen kallusların yaş ve kuru ağırlıkları tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9 *Catharanthus roseus*'un II. alt kültür kalluslarının yaş ve kuru ağırlıkları

	Bitki	<i>Catharanthus roseus</i>			
	Ortam	MS + 0.025mg/l Kin + 0.5 mg/l 2,4-D		MS + 0.025 mg/l Kin + 0,25 mg/l NAA	
	Yaş ağırlık (g)	Kuru ağırlık (g)	Yaş ağırlık (g)	Kuru ağırlık (g)	
1	0.12	0.01	0.78	0.03	
2	0.84	0.02	0.10	0.01	
3	0.81	0.04	0.16	0.10	
4	0.42	0.03	0.63	0.02	
5	0.42	0.02	0.08	0.01	
6	0.09	0.01			
7	1.17	0.04			
8	0.11	0.02			
9	0.43	0.02			
10	0.09	0.01			
Ort.	0.45	0.02	0.35	0.03	

C. roseus'un iki farklı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlu ortamda gelişen I. ve II. alt kültür kalluslarının yaş ve kuru ağırlıkları için bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarına göre fark olup olmadığı t testi ile değerlendirilmiş ve istatistik olarak önemli bulunmamıştır.

4.4.2. *Berberis vulgaris*'in II. alt kültürü

MS + 0,025mg/l Kin + 0,5 mg/l 2,4-D içeren II. alt kültür ortamında 1 ay sonraki kallus gelişimi %75, kontaminasyon %25 olarak gözlenmiştir (Tablo 8).

II. alt kültür çalışmalarında *C. roseus*'ta Kin + 2,4-D'li MS ortamının kallus gelişimi %40 iken *B. vulgaris*'te aynı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonunda gelişim % 75 olarak gözlenmiştir.

Tablo 8'e bakıldığında kontaminasyon oranlarının yüksek olduğu gözlenmektedir. Bunun en büyük sebebi II. alt kültür çalışmalarının çok sıcak aylara (Temmuz-Ağustos) rastlaması olarak düşünülmektedir.

B. vulgaris'in 0.025 mg/l Kin + 0.5 mg/l 2,4-D ilaveli MS besin ortamında II. alt kültürde elde edilen kallusların yaş ve kuru ağırlıkları Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10 *Berberis*'in Kin ve 2,4-D ilaveli MS kültür ortamında II. alt kültür kalluslarının yaş ve kuru ağırlıkları

N o	Bitki	<i>Berberis vulgaris</i>	
	Ortam	MS + 0.025 mg/l Kin + 0.5 mg/l 2,4-D	
		Yaş ağırlık (g)	Kuru ağırlık (g)
1		1.05	0.02
2		1.06	0.05
3		1.05	0.05
4		0.85	0.02
5		0.13	0.01
6		0.84	0.03
7		0.50	0.01
8		1.46	0.08
Ort.		0.86	0.03

Çalışmalar da eksplant tipine göre en iyi kallus oluşumu özellikle kotiledon eksplantlarında gözlenirken bunu kök eksplantları izlemiştir. Hipokotil ve epikotil eksplantlarındaki kallus oluşumu kotiledon ve köke göre daha az ve daha uzun sürede gerçekleşmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmalarımızda en yüksek kallus oluşum oranı (%100) ve gelişimi (ort. %79.6) *Berberis*'te Kin ve 2,4D ilaveli MS kültür ortamında görülmekle beraber *C. roseus* bitkisinde kallus oluşumu %76.3, I. alt kültürde kallus gelişimi %68.9 ile en iyi Kin ve NAA ilaveli MS kültür ortamında gözlenmiştir. Ancak bu bitkinin II. alt kültürde %40 kallus gelişimi ile daha iyi sonuç Kin ve 2,4-D ilaveli ortamda gözlenmiştir (Tablo 11).

Tablo 11 *Catharanthus roseus* ve *Berberis vulgaris*'in *in vitro* tohum çimlenme yüzdeleri, bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarına göre kallus oluşumu ve gelişimi

Bitki Adı	Çimlenme Oranı	Ortam	Kallus Oluşumu (%)	I.Alt Kültür Kallus Gelişimi (%)	II. Alt Kültürde Kallus Gelişimi (%)
<i>C. roseus</i>	% 100	MS + Kin + 2.4-D	%47.3	% 55.5	%40
<i>C. roseus</i>	% 100	MS + Kin + NAA	% 76.3	% 68.9	%20
<i>B. vulgaris</i>	% 23.3	MS + Kin + 2.4- D	% 100	% 84.2	%75
<i>B. vulgaris</i>	%23.3	MS + Kin + NAA	% 0	-	-

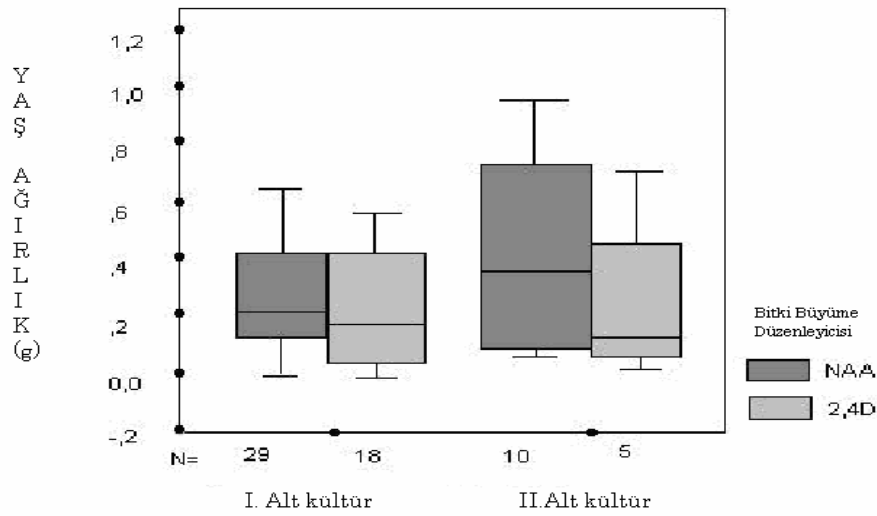
B. vulgaris ile yapılan çalışmalarda sadece kinetin ve 2,4-D içeren MS ortamından çok iyi sonuç alınırken kinetin ve NAA içeren MS ortamı başarısız bulunmuştur. Bu çalışmada *Berberis*'te kallus kültürü için MS ortamında Kinetin ve 2,4-D ilavesi başarılı bulunmuştur.

C. roseus ve *B. vulgaris*'in I. ve II. alt kültürde elde edilen kallusların ortalama yaş ve kuru ağırlıkları Tablo 12'de verilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonuna göre yaş ağırlıkları Şekil 11'de gösterilmiştir.

Tablo 12. *Catharanthus roseus* ve *Berberis vulgaris*'in I. ve II. alt kültürdeki kalluslarının ortalama yaş ve kuru ağırlıkları

Bitki	Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu	Yaş Ağırlık Ortalamaları (g)		Kuru Ağırlık Ortalamaları (g)	
		I. Alt kültür	II. Alt kültür	I. Alt kültür	II. Alt kültür
<i>Catharanthus roseus</i>	Kin + 2,4-D	0.28	0.45	0.03	0.02
	Kin + NAA	0.29	0.35	0.01	0.03
<i>Berberis vulgaris</i>	Kin + 2,4-D	0.67	0.86	0.03	0.03
	Kin + NAA	-	-	-	-

En büyük kallus yığınları *Berberis*'in Kin ve 2,4-D ilaveli MS ortamında elde edilmiştir. *C. roseus*'ta ise en büyük kallus yığınları I. alt kültürde Kin ve NAA ilaveli MS ortamından, II. alt kültürde ise Kin ve 2,4-D ilaveli MS ortamında gelişmiştir (Tablo 12).



Şekil 11 *Catharanthus roseus*'un I. ve II. alt kültür yaş ağırlık ortalamaları grafiği

Gelecekte çevre kirliliği sonucu tarım alanlarının azalacağı ve eldeki mevcut arazilerin de öncelikle gıda amaçlı ürünlerin üretimi için kullanılacağı varsayılarak ve doğadan toplanan bitkilerde de hızla bir azalış ve nesillerinin tükenme tehlikesi altında olduğu göz önüne alınırsa, doku kültürü ile sekonder metabolit üretiminin bir zorunluluk olduğu ve kesinlikle göz ardı edilmemesi gerektiği bariz bir gerçektir (Turasay, 2001).

Son yıllarda biyoteknolojinin gelişmesi ile bazı bitkilerdeki sekonder ürünlerin *in vitro* kültürler ile elde edilmesi çalışmaları gündeme gelmiştir ve bu amaçla çeşitli doku kültürü tekniklerinin sekonder metabolit üretimi için kullanılma çalışmaları büyük bir hızla devam etmektedir. Günümüzde vinblastin ve vinkristin, kanser tedavisindeki önemleri, ajmalisin ise anti hipertansif etkisi nedeni ile berberin ise bakteri ve protozoonların üzerindeki geniş spektrumunu nedeni ile en çok kullanılan sekonder metabolitlerdendir. Bu çalışmada da *C. roseus* vinblastin, vinkristin ve ajmalisin kaynağı, *B. vulgaris* ise berberin kaynağı olma nedeni ile çalışmada tercih edilmişlerdir.

In vitro kültür çalışmalarında başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri de bitki büyüme düzenleyicisi çeşit, doz ve kombinasyonudur. Çalışmanın amacına göre uygun çeşit, doz ve kombinasyonun belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada *Berberis* kültürlerinde Kin ve 2,4-D ilavesi ile *C. roseus*'ta ise Kin + NAA ve Kin + 2,4-D ilavesi ile kallus elde edilebileceği görülmüştür.

Bitki doku kültürü çalışmalarında planlanan bir çalışmanın başarılı olmasındaki ilk basamak bitki materyaline uygun sterilizasyon yönteminin seçimi ve steril koşullarda yetiştirilmesidir. Ancak, strelizasyon yönetimine bakılmaksızın kontaminasyonun, iklimsel ve mevsimsel etkenler ile değişmesi de söz konusu olabilir. Çalışmamızda da materyalin kültüre alınması dönemindeki iklim koşullarına göre kontaminasyon yüzdesi değişmiştir. Örneğin yaz aylarında kontaminasyon artmıştır.

Çalışmamızda *C. roseus* tohumlarının *B. vulgaris*'e nazaran daha kolay ve kısa sürede çimlendiği gözlenmiştir. *Catharanthus* tohumları, 13 günde %100 çimlenirken *Berberis*'te çimlenme 28 gün sonra %23.3 olarak gerçekleşmiştir. Bu sonuç tohumların çimlenme tabiatının farklı olduğunu, *Berberis*'in daha geç çimlendiğini göstermiştir.

Yapılan çalışmalar da eksplant tipine göre en iyi kallus oluşumu özellikle kotiledon eksplantlarında gözlenirken bunu kök eksplantları takip etmiştir. Hipokotil ve epikotil eksplantlarındaki kallus oluşumu kotiledon ve köke göre daha düşük az olmuş ve daha uzun sürede gerçekleşmiştir.

C. roseus'un 0,1 mg/l Kin + 2,0mg/l 2.4-D içeren MS besin ortamında 80 gün sonunda elde edilen kallus oluşumu, % 5.8'lik kontaminasyon göz önünde bulundurulmazsa % 47.3 ile yarı yarıyadır. Buna karşılık aynı bitkinin 0,1 mg/l Kin + 1,0 mg/l NAA kombinasyonlu besin ortamında 80 gün sonra elde edilen kallus oluşumu % 76.3'dır. Bu sonuçlar, *Catharanthus* için Kin + NAA kombinasyonunun daha uygun olduğunu göstermektedir. Aynı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlu ortamda I. alt kültürde kallus gelişimi % 68.9, II. alt kültürde ise % 20'ye düşmüştür. Ancak II. alt kültürde kontaminasyonun fazlalığı sebebiyle eksplant sayısında azalma olmuştur. Bu bitkide kinetin ve NAA'in kullanılmasının uygunluğunu belirtilirken kullanılacak doz üzerinde eksplant tipine göre farklı çalışmalar yapılmasının gerekliliği de ortaya çıkmaktadır.

Gamborg ve arkadaşları (1976)'na atfen Akçam (1993)'ın bildirdiğine göre *Catharanthus*'da NAA için uygulanabilecek en iyi konsantrasyon 0.1-2.0 mg/l'dir. Yaptığımız çalışmalarda söz konusu hormon için kullandığımız konsantrasyon 1.0 mg/l olup oldukça başarılı bir sonuç elde edilmiştir.

B. vulgaris'de steril bitkiciklerden alınan explantların Kin ve NAA içeren MS ortamında başarılı olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuç, Kin ve NAA kombinasyonunun *Berberis*'in kallus kültürü için uygun büyüme düzenleyicileri olmadıklarını göstermektedir. Öte yandan aynı bitkide Kin ve 2,4-D içerikli MS besin ortamında kallus oluşumu % 85'dir. Söz konusu bitkide Kin ve 2,4-D kombinasyonlu MS ortamında eksplantlardan kallus oluşumu % 100, I. alt kültürde kallus gelişimi % 84.2 ve II. alt kültürde kallus gelişimi % 75'tir. Bu sonuçlar bize *Berberis*'te Kin ve 2,4-D'li MS ortamının uygun olduğunu gösterirken, Kinetin ve diğer bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonları ile çalışmalar yapılması sonucuna da götürmektedir.

Her iki bitkiden elde edilen kallusların yaş ve kuru ağırlık ortalamaları olarak kallus gelişimi istatistiki olarak t testi ile değerlendirildiğinde, *C. roseus*'ta Kin + 2,4-D'li MS ortamı ile Kin + NAA'lı MS ortamından elde edilen kallusların yaş ve kuru ağırlık ortalamaları birbirine çok yakın olduğundan bu bitki için araştırılan bu iki bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonundan birinin diğerine üstünlüğü söz konusu değildir.

Çalışmalarımızdan elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. En iyi *in vitro* tohum çimlenme oranı %100 ile *C. roseus*'ta gerçekleşmiştir.
2. En iyi kallus verimi % 100 ile *Berberis* bitkisi eksplantlarından Kin ve 2,4-D ilaveli Murashige-Skoog (1962) kültür ortamından elde edilmiştir.
3. I. alt kültürde en yüksek kallus gelişimi % 84.2 ile yine *B. vulgaris*'te ve aynı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlu (Kinetin ve 2,4-D) MS ortamından elde edilmiştir.
4. II. alt kültürde de en yüksek kallus gelişimi % 75 ile yine *B. vulgaris*'te aynı ortamda (MS , Kinetin ve 2,4-D) gözlenmiştir
5. *C. roseus*'ta ise en yüksek kallus oluşumu (% 76.3) Kin ve NAA ilaveli Murashige-Skoog (1962) ortamında gerçekleşmiştir.

KAYNAKLAR

Akçam, E., 1993. *Catharanthus roseus*'un Kallus Kültürlerinden Rejenerant Eldesi, Doktora Tezi, E. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bornova, İzmir.

Anonim (Opportunities in Biology) 1989. by Committee on Research Opportunities in Biology, Board on Biology, Commission on Life Sciences, National Research Council. National Academic Press, Washington D. C.

Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., 2001. Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri 1:13 (Ed. M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan). Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.

Başer, H.C., 1997. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin İlaç ve Alkollü İçki Sanayilerinde Kullanımı. İstanbul Ticaret Odası, Yayın No:1997-39, İstanbul.

Bowles, D. and Leyser, O. 1994. 'The Big Green Book' Plant Biotechnology – Centre for exploitation of science and technology (CEST).

Brar, D. S. and Khush, G. S. 1994. Cell and Tissue Culture for Plant improvement. In: Mechanisms of Plant Growth and Improved Productivity. Modern Approaches. (Ed. Basra A. S.), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong. pp. 229-278.

Collins-Pavao M., Chin C. K. and Pedersen H. (1996) Taxol Partitioning in Two-phase Plant Cell Cultures of *Taxus brevifolia*. J. Biotechnol. 49: 95-100.

Collin, F., Edwards, S. 1998. Plant Cell Culture-Introduction to Biotechniques s.103-120 Scientific Publishers Limited, Oxford.

Gaines, L. J. 2004. Increasing Alkaloid Production From *Catharanthus roseus* Suspensions Through Methyl Cosmonate Elicitation. Pharmaceutical Engineering. The Official Journal of ISPE, Vol.24 No:4

Gautheret, R., J. 1985. History of Plant Tissue and Cell Culture: a Personal Account. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 2 (Ed. Vasil I. K.) Academic Press Inc., Florida. pp. 1-59.

Guha, S. and Maheshwari S. C. 1964. *In vitro* Production of Embryos from Anthers of *Datura*. Nature 204: 497.

Huang Y., Karnosky D. F. and Tauer C. G. 1993. Applications of Biotechnology and Molecular Genetics to Tree Improvement. J. Arboricult. 19: 84-98.

Kulkarni, A.A. 2000. Mikropropagation and Secondary Metabolite Study in *Taxus* spp. and *Withania somnifera* (L) Dunal, DSc Thesis, National Chemical Laboratory, Pune.

Kurz, W. G. W. and Constabel F.1998. Production of Secondary Metabolites. In: Agricultural Biotechnology (Ed. Altman A.) Marcel Dekker Inc., New York. pp. 183-224.

Lindsey, K. and Yeoman M. M. 1985. Dynamics of Plant Cell Cultures. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. (Editor-in-Chief Vasil I. K.) Vol. 2, Academic Press, London, New York. pp. 61-101.

Pauls K. P. (1995) Plant Biotechnology for Crop Improvement. Biotechnol. Adv. 13: 673- 693.

Payne, P.F., Bringi. V., Prince, C., Shuller, M. L., 1991. Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems. Hanser Publishers (Hanser Series in Bioteknoloji), Munich.

Phillipson, J.D., Plants As Source of Valuable Products From Plant Tissue Culture. P.1-21. Proceedings of The Phytochemical Society of Europe.30, Clarendon Press, Oxford.

Pierik R. L. M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Scragg, A. H., 1994. Secondary Products from Cultured Cells and Organs: II. Large Scale Culture. In: Dixon, R. A., Gonzales, R. A. (eds) Plant Cell Culture- A Practical Approach. P.199-223. Oxford University Press, New York.

Sökmen, A., Gürel, E., 2001. Sekonder Metabolit Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi, 1: Bitki Doku Kültürleri 211-267 (Ed. M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan). Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.

Staba, E. J., 1985. Milestones in Plant Tissue Culture Systems for The Production of Secondary Metabolites. Journal of Natural Products 48(2):203-209.

Turasay, B. 2001. Bitki Doku ve Hücre Kültürleri ile Sekonder Metabolitlerin Elde Edilmesi, Y.L Semineri, s:15, Muğla Üniv. Fen Bilimleri Ens, Muğla.

Wink, M., 1990. Physiology of Secondary Product Formation in Plants. In: Charlwood B., Rhodes, M. J. C. (eds) Secondary Products from Plant Tissue Culture. P.23-41. Proceedings of The Phytochemical Society of Europe.30, Clarendon Press, Oxford.

Yeoman, M.M., Holden, M.A., Corchet, P., Holden, P.R., Goy, J. G., Hobbs, M. C., 1990 Exploitation of Disorganized Plant Cultures for The Production of Secondary Metabolites. In: Charlwood, B. V., Rhodes, M. J. C. (eds) Secondary Products from Plant Tissue Culture. P. 139-166. Proceedings of The Phytochemical Society of Europe. 30, Clarendon Press, Oxford.

ÖZGEÇMİŞ

Fatma Söylemez, 07. 04. 1974 tarihinde Taşlıçay (Ağrı)'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Van'da tamamladıktan sonra üniversite öğrenimini Uludağ Üniversitesi Fen- Ed. Fakültesi Biyoloji Bölümünde 1996 'da tamamladı. Halen Muğla ili Yatağan ilçesine bağlı Turgut Beldesinde sınıf öğretmeni olarak görev yapmakta aynı zamanda Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans öğrenimini sürdürmektedir.