

**T.C
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



***Satureja aintabensis* P. H. DAVIS'IN DOKU
KÜLTÜRÜ İLE ÇOĞALTIM
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**BIYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Sadiye Ceren Özkeçeci
Ocak 2010**

***Satureja aintabensis* P. H. DAVIS'IN DOKU KÜLTÜRÜ
İLE ÇOĞALTIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Gaziantep Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman
Doç. Dr. Canan Can**

**Sadiye Ceren Özkeçeci
Ocak 2010**

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: *Satureja aintabensis* P.H. Davis'in Doku Kültürü İle Çoğaltım Olanaklarının Araştırılması
Öğrencinin, Adı Soyadı: Sadiye Ceren ÖZKEÇECİ
Tez Savunma Tarihi: 19/01/2010

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Ramazan KOÇ

FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Canan CAN

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

İmzası

Doç. Dr. Canan CAN (Jüri Başkanı)

Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ

Yrd. Doç. Dr. Gülcihan GÜZELDAĞ

Yrd. Doç. Dr. Hasan AKGÜL

ÖZET

Satureja aintabensis P.H. Davis'in DOKU KÜLTÜRÜ İLE ÇOĞALTIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Özkeçeci, Sadiye Ceren
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Canan Can
Ocak 2010, 53 sayfa

Satureja aintabensis P. H. Davis Gaziantep- Dülükbaba' da küçük bir alanda bulunan endemik bir bitkidir. Antep kayakekiği olarak da bilinen bu bitkinin nesli, arkeolojik yerleşim alanı içinde küçük bir lokasyonda bulunması ve insanlar tarafından kekik olarak toplanma olasılığı nedenleri ile tehlike altındadır. Bu nedenle Uluslararası Doğa Koruma Kurumu (IUCN) Kırmızı Listesi'nde CR kategorisinde yer almaktadır. *S. aintabensis*'in *in vitro* doku ve hücre kültürü teknikleri ile çoğaltılması, bitkinin laboratuarda, mevsime bağlı olmaksızın, küçük bir alanda geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

Bu çalışmada *in vitro* koşullarda *S. aintabensis* bitkisinin yaprak ve gövde eksplantlarından 6-Benzil Amino Purin (BAP), Kinetin, İndol Asetik Asit (IAA), Naftalen asetik asit (NAA) ve 2,4 Diklorofenoksi Asetik Asit (2,4 D) hormonlarını içeren Murashige ve Skoog (1962)-MS ortamında somatik embriyogenez ile sürgün ve kök oluşumu teşvik edilmiştir. Doğadan toplanan tohumlardan elde edilen çimlenme çalışmalarında Sülfirik Asit uygulamasının etkili olduğu belirlenmiştir. Doğadan alınan bitkilerin sürgün ucu ve yaprak eksplantlarında 6- Benzil Amino Purin (BAP) ve İndol Asetik Asit (IAA) hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarında kallus gelişimi saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Satureja aintabensis*, *in vitro*, doku kültürü, somatik embriyogenez, kallus

ABSTRACT

TISSUE CULTURE WITH THE INVESTIGATION OF POSSIBILITIES REPRODUCTION OF *Satureja aintabensis* P. H. Davis

ÖZKEÇECİ, S.C

M.Sc. in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Canan Can

January 2010, 53 pages

Satureja aintabensis P. H. Davis is an endemic plant which is found in a restricted area of Gaziantep-Dülükbaba. The plant, known as Antep rock thyme, is under the risk of extinction since its location is within a small archaeological area and it is gathered as thyme by people. For these reasons, *S. aintabensis* is located in the Red list in CR category by the International Union for Conservation of Nature (IUCN). Application of plant tissue culture techniques to *S. aintabensis* could allow clonal propagation of this species without depending on seasons, in small laboratory areas.

In this study, somatic embryogenesis and root formation were induced by using Murashige and Skoog (1962)-MS media supplemented with 6-Benzylamino purine (BAP), Kinetin, Indole Acetic Acid (IAA), Naphtalene Acetic Acid (NAA) and 2,4 Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4 D). Sulfuric Acid was found to be effective in germination of seeds collected from nature. BAP and IAA combinations in different concentrations resulted callus formation in shoot tip and leaf explants of plants collected from nature.

Key words: *Satureja aintabensis*, *in vitro*, tissue culture, somatic embryogenesis, callus

TEŞEKKÜR

Tez konumu öneren ve alıŐmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen
danışman hocam sayın Doç. Dr. Canan Can' a,

Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü M¼d¼rl¼Đ¼' ne,

İstatistiksel analizleri çalıŐmalarım sırasında yardımcı olan Öğr. Gör. Dr.
Muhiitin Doğan' a,

Laboratuar çalıŐmalarım esnasında yardımcı olan Hilal Özkılınç' a,

Hayatımın her döneminde yanımda olan, maddi ve manevi her türlü
desteklerini benden esirgemeyen biricik Ailem' e

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
BÖLÜM 1: GİRİŞ	1
BÖLÜM 2: KAYNAK ÖZETLERİ	6
BÖLÜM 3: MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Bitki Materyali.....	16
3.1.2. Kültür Ortamında Kullanılan Kimyasallar.....	16
3.1.3. Kültür Ortamına İlave Edilen Hormonlar.....	16
3.1.3.1. Sitokininler.....	16
3.1.3.2. Oksinler.....	16
3.1.4. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	17
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Kültür Ortamının Hazırlanması.....	17
3.2.2. Somatik Embriyogenez Çalışmaları.....	18
3.2.2.1. Bitkilerin Sterilizasyonu.....	18

3.2.2.2. <i>İn vivo</i> 'da Gelişen Bitkilerden Somatik Embriyogenez Çalışmaları.....	18
3.2.2.3. Tohumların Sterilizasyonu ve <i>in vitro</i> 'da Çimlendirilmesi.....	19
3.2.2.4. Tohum Dormansi Kırma Çalışmaları.....	19
3.2.2.5. <i>İn vitro</i> 'da Gelişen Bitkilerden Somatik Embriyogenez ve Köklendirme Çalışmaları.....	20
3.2.2.6. İstatiksel Analizler.....	20
BÖLÜM 4: BULGULAR	21
4.1. Somatik Embriyogenez Çalışmaları.....	21
4.1.1. <i>İn vivo</i> 'da Gelişen Bitkilerden Somatik Embriyogenez Çalışmaları...	21
4.1.2. <i>İn vitro</i> 'da Gelişen Bitkilerden Somatik Embriyogenez ve Kök Oluşumu.....	25
4.1.2.1. Tohumların <i>in vitro</i> 'da Çimlendirilmesi.....	25
4.1.2.2. <i>İn vitro</i> 'da Tohumdan Çimlendirilen Bitkilerden Somatik Embriyogenez.....	29
4.1.2.3. <i>İn vitro</i> 'da Tohumdan Çimlenen Bitkilerde Köklendirme Çalışmaları.....	33
BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	36
KAYNAKLAR	43
EKLER	52
EK 1. Murashige ve Skoog-MS (1962) ortam içeriği.....	52
EK 2. 10x TBE Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

		Sayfa no
Şekil 2.1.	<i>Satureja aintabensis</i> P. H. Davis (Antep Kayakekiği)'nin Gaziantep ili 2008 Temmuz ayındaki görüntüsü.....	10
Şekil 4.1.	Farklı miktarlarda BAP ve NAA hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan <i>S. aintabensis</i> bitkisinin sürgün ucundan gelişen kallusların ortalama ağırlık değerleri.....	21
Şekil 4.2.	Farklı konsantrasyonlardaki BAP hormonlarının etkisiyle direkt, indirekt somatik embriyogenez ve kallus oluşumu A: 1,0 mg/lt BAP + 0,5 mg/lt NAA içeren MS ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından gelişen gelişen <i>S. aintabensis</i> bitkileri. B: 2,0 mg/lt BAP içeren MS ortamında gelişen kalluslar.....	22
Şekil 4.3.	2,4-D ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS+%3 Sakkaroz ortamında kültüre alınan <i>S. aintabensis</i> bitkisinin yaprak ve gövde eksplantlarından gelişen kallusların ortalama ağırlık değerleri...	23
Şekil 4.4.	Farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D ve Kinetin (Kin) hormonlarının etkisiyle kallus oluşumu. A: 0.5 mg 2,4-D + 2.0 mg/lt Kin içeren MS ortamında kültüre alınan ve yaprak eksplantından gelişen kallus görüntüsü. B: 0.5 mg 2,4-D + 1.0 mg/lt Kin içeren MS ortamında kültüre alınan ve gövde eksplantından gelişen kallus görüntüsü.....	24

Şekil 4.5.	40°C’de iki hafta boyunca bekletilen ve ½ MS ortamında kültüre alınan <i>S. aintabensis</i> tohumlarında çimlenme görüntüsü.....	26
Şekil 4.6.	Tohum kabuğunda %50’lik sülfürik asit uygulaması ile meydana gelen çatlamanın binokülerdeki görüntüsü(X20).....	28
Şekil 4.7.	BAP, NAA, IAA ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS+%3 Sakkaroz ortamında kültüre alınan <i>S. aintabensis</i> tohumlarında gelişen yaprak ve kök eksplantlarında gelişen kallusların ortalama ağırlık değerleri.....	29
Şekil 4.8.	BAP, NAA, IAA ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS+%3 Sakkaroz ortamında kültüre alınan <i>S. aintabensis</i> tohumundan gelişen yaprak eksplantlarında sürgün gelişimi.....	30
Şekil 4.9.	A: 2.0 mg Kin + 0.5 mg/lit NAA hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan ve yaprak eksplantından gelişen kallus görüntüsü B: 2.0 mg Kin + 0.5 mg/lit NAA hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan ve kök eksplantlarından gelişen kallus görüntüsü.....	31
Şekil 4.10.	<i>S. aintabensis</i> tohumlarının <i>in vitro</i> ’da çimlenen yaprak eksplantlarının farklı oksin ve sitokinin hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmasıyla elde edilen somatik embriyogenez. A: 2.0 mg/lit BAP ve 0.5 mg/lit IAA hormonlarını içeren MS kültür ortamında somatik embriyogenez. B: 2.0 mg/lit Kin ve 0.5 mg/lit IAA hormonlarını içeren MS ortamında somatik embriyogenez.....	31

Şekil 4.11.	<i>S. aintabensis</i> tohumlarının <i>in vitro</i> 'da çimlenen yaprak eksplantının 2.0 mg/lt Kin ve 0.5 mg/lt NAA hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmasıyla gelişen kök oluşumu.....	32
Şekil 4.12.	BAP, NAA, IAA ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS+%3 Sakkaroz ortamında kültüre alınan <i>in vitro</i> ' da <i>S. aintabensis</i> tohumundan gelişen yaprak ve kök eksplantlarından gelişen kallusların ortalama ağırlık değerleri.....	33
Şekil 4.13.	<i>S. aintabensis</i> yaprak ve kök eksplantlarında kallus morfolojisi. A: 2.0 mg/lt NAA + 0.5 mg/lt BAP hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan ve yaprak eksplantından gelişen kallus, B: 0.5 mg/lt Kin + 2.0 mg/lt NAA hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan ve kök eksplantından gelişen kallus oluşumu.....	34

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 4.1. BAP ve NAA hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS (1962) ortamı üzerinde kültüre alınan <i>S. aintabensis</i> sürgün ucu eksplantlarında meydana gelen kallus gelişim oranları.....	23
Tablo 4.2. 2,4-D ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS (1962) ortamı üzerinde kültüre alınan <i>S. aintabensis</i> yaprak ve gövde eksplantlarında meydana gelen kallus gelişim oranları.....	24
Tablo 4.3. Farklı sürelerde soğuk uygulaması yapılan <i>S. aintabensis</i> tohumlarının MS (1962) ortamındaki çimlenme oranları.....	25
Tablo 4.4. Farklı sürelerde soğuk uygulaması yapılan <i>S. aintabensis</i> tohumlarının ½ MS (1962) ortamındaki çimlenme oranları.....	26
Tablo 4.5. Farklı konsantrasyonlarda Sülfürik Asit uygulamasını takiben MS + %3 Sakkaroz ortamında kültüre alınan <i>S. aintabensis</i> tohumlarında meydana gelen çimlenme oranları.....	27
Tablo 4.6. Farklı konsantrasyonlarda Sülfürik Asit uygulamasını takiben ½ MS + %1 Sakkaroz ortamında kültüre alınan <i>S. aintabensis</i> tohumlarında meydana gelen çimlenme oranları.....	28
Tablo 4.7. NAA, BAP, IAA ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS (1962) ortamı üzerinde kültüre alınan <i>S. aintabensis</i> kök ve yaprak eksplantlarında meydana gelen kallus gelişim oranları.....	32

Tablo 4.8. BAP, NAA, IAA ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS (1962) ortamı üzerinde kültüre alınan *S. aintabensis* kök ve yaprak eksplantlarında meydana gelen kallus gelişim oranları.....

35

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

2,4-D	2,4 Dicholophenoxy acetic acid
AP-PCR	Arbitrarily PCR
atm	Atmosfer basıncı
BAP	6-Benzilaminopurin
°C	Santgrad Derece
CaCl ₂ .2H ₂ O	Kalsiyum klorür dihidrat
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat pentahidrat
dH ₂ O	Deiyonize su
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EtBr	Ethidyum bromür
FeSO ₄ .7H ₂ O	Demir sülfat heptahidrat
gr	Gram
GA	Giberellin
H ₃ BO ₃	Borik asit
IAA	İndol-3-asetik asit
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
KI	Potasyum iyodür
Kin	Kinetin
KNO ₃	Potasyum nitrat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat

$MnSO_4 \cdot H_2O$	Mangan sülfat
Na_2EDTA	Sodyum EDTA
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	Sodyum molibdat dihidrat
NH_4NO_3	Amonyum nitrat
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ppm	Milyonda bir değer
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
r.p.m.	Dakikada döngü sayısı
sp.	Cinsine ait tür
spp.	Cinsine ait türler
Taq	Taq polimeraz
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Çinko sülfat heptahidrat

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bitki doku kültürü; aseptik koşullar altında, yapay bir besi ortamında, bütün bir bitkiden, hücreden (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), dokudan (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni bir doku, yeni bir bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesine imkan veren bir tekniktir. .Doku kültürünün amaçları arasında; yeni çeşitler geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyasyon oluşturmak gibi amaçlar vardır. Bitki doku kültürleri, genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynarlar. Ayrıca bitki doku kültürleri, kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Babaoğlu vd., 2001).

Bitkiler insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir yer tutarlar ve bu amaçla geliştirilen iki önemli çalışma bulunmaktadır. Bunlardan birincisi Yeşil Devrim olarak adlandırılan ve klasik bitki ıslahı, ticari gübreler ve diğer agronomik tekniklerin gelişiminin etkili olduğu dönemdir. İkinci dönem ise Gen Devrimi olarak isimlendirilmektedir (Kung, 1993). Zaman içerisinde DNA yapısının anlaşılması, bakteri genetiği ve bitki doku kültürünün gelişimi gibi tekniklerin geliştirilmesi ve bu tekniklerin birçok bitkiye uygulanabilir olması, gen dönemi çalışmalarına hız kazandırmıştır (Babaoğlu vd., 2001).

Bitkilerin laboratuvar koşulları altında veya kontrollü şartlarda çoğaltım çalışmaları, bitkisel üretime alternatif bir çalışma olarak verilebilir. Klonal çoğaltım ise çevre ve besin kontrolü yapılabilen, steril yetiştirme şartlarında bir bitki eksplantının (tomurcuk, boğum, yaprak ve kök parçaları gibi) kültürü sonucu yeni bitkilerin üretilmesi tekniğidir. Üretilen bitkiler her bakımdan birbirinin aynısı olan bitkilerdir ve uygulanan bu teknikler bitki klonlaması olarak adlandırılırlar.

Bitki doku kültürü teknikleri uygulama alanları Bitki Biyoteknolojisi çalışmalarının da önemli bir bölümünü oluşturmaktadırlar. *In vitro*'da, birçok otsu ve odunsu bitki türü kültüre alınabilir ve bu bitki kültürlerinin bilimsel uygulamaların yanında ticari uygulamaları da yapılabilmektedir (Babaoğlu vd., 2001).

Bitki doku ve hücre kültürü teknikleri, 1902 yılından bu yana üzerinde çalışmalar yapılan teknikler arasındadır. Ayrıca Murashige ve Skoog (1962) tarafından ilk sentetik ortam geliştirilmiş, bu tarihten sonra *in vitro* bitki doku ve organ kültürü teknikleri hız kazanmıştır.

In vitro doku kültürü tekniklerinin, bitki üretimi ve ıslahında kullanılabilir olabilmesi için, kültüre alınan hücre veya dokulardan yüksek oranda embriyo gelişiminin sağlanması gerekmektedir. Bununla birlikte doku kültürlerinde embriyo gelişimini etkileyen faktörlerin de (ortamın bileşimi, ışık ve ısı dereceleri, kullanılacak doku tipi, ortam içerisindeki hormon kombinasyonu) neler olduğu kesin olarak bilinmelidir (Murashige ve Skoog, 1962; Thorpe vd., 1991).

Bitki hücrelerinden embriyo elde etmek sadece döllenmiş yumurta hücresi ile sınırlı değildir. Bunun için *in vitro* kültür şartları ve özellikle de bitki büyüme düzenleyicileri ayarlanarak, bir bitkinin herhangi bir somatik hücresinden, dokusundan ve organından embriyo elde etmek mümkündür. Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak isimlendirilirler. Somatik hücreleri öncelikle yüksek oranda Oksin içeren ortamlarda kültüre alır, daha sonra da Oksin içermeyen yeni bir ortama aktarılırsa, embriyo üretme yeteneği kazanmış olurlar. Oksin hormonlarının, somatik bitki hücrelerine embriyo üretimi için yeniden zigotik bir kapasite kazandırdıkları bilinmektedir (Monnier, 1990).

Somatik ve zigotik embriyogenez arasında önemli farklılıklar vardır. Bu farklılıklar, iki embriyogenez oluşumunun elde edilmiş şekliyle dolaylı meydana gelmiştir. Zigotik embriyo döllenmiş bir zigottan geliştiği için, elde edilen bitkiler potansiyel olarak açılma yeteneğine sahiptirler. Diğer taraftan, bireysel bitkilerin hücrelerinden geliştikleri için somatik embriyolardan elde edilen bitkiler, genetik olarak bir klon meydana getirirler (Bourman, 1994). Döllenmiş yumurtadan gelişen embriyoda olduğu gibi, aynı şekilde iki çenekli bitkilerdeki somatik embriyolar da globular,

kalp, torpedo ve kotiledon oluşum safhalarını geirmekteler (De Jong vd., 1993). Ayrıca somatik embriyolar, organogenez yoluyla gelişen sürgünlerden de farklılık göstermektedirler. Gövde- kök eksenine aynı zamanda sahip olup, asıl doku ile vasküler bağlantıları olmadığından dolayı dokudan kolaylıkla ayrılabilirler (De Jong vd., 1993).

Somatik embriyogenez çalışmaları, bitkilerin klonal hızlı çoğaltımında, sentetik tohum üretiminde ve gen aktarım çalışmaları gibi önemli alanlarda kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte, eksplant kaynağı, genotip, bitki büyüme düzenleyicileri, azot kaynağı ve çevre şartları gibi etmenler somatik embriyogenezi önemli ölçüde etkileyen temel faktörler arasındadırlar (Babaoğlu vd., 2001).

Bitki doku, organ ve hücre kültürü çalışmaları, bitki genetik kaynaklarının korunmasında, bitkilerin uzun süreli muhafazasında, genetik ıslah çalışmalarında, klonal çoğaltım ve hastalıksız bitki üretimi gibi birçok alanda çok sayıda bitki türünde rahatlıkla kullanılabilen çalışmalardır. Teknikte temel olarak aseptik koşullarda hazırlanan ve bitki tarafından gereksinim duyulan makro, mikro besin elementleri, vitaminler ve hormonları (Oksinler, Sitokininler ve Giberellinler) içeren sentetik besin ortamları üzerinde, doku, organ, hücre, ve protoplast gibi bitki eksplantları kültüre alınır ve kültürler klima odalarında bekletilirler (Babaoğlu vd.,2001).

Gen klonlanması veya gen mühendisliği olarak da isimlendirilen rekombinant DNA teknolojisi, doğal koşullarda bir arada bulunmayan yeni gen kombinasyonlarının meydana getirilmesinde sınırsız imkanlar sağlayan bir teknolojidir (Gelvin. 1998).

Genetiksel olarak modifiye edilmiş organizmalar (GMO) veya başka bir deyişle genomunda yabancı DNA parçası bulunduran transgenik organizmalar günümüzde üretilmiş durumdadır (Bright, 1998). Transgenik bitkileri üretmek için gerekli teknolojileri, üç ana aşamadan meydana gelmiştir (Mifflin, 2000). Bunlar; bitki moleküler biyolojisi ve fizyolojisindeki temel araştırmalar, transformasyon tekniklerinin geliştirilmesi ve bitki doku kültüründeki gelişmelerle transforme edilmiş hücre ve dokularının rejenerasyonunun olduğu aşamalardır (Watsons vd., 1992).

Ticari amaçlı transgenik bitkilerin üretildiği alanlar dört temel grup altında toplanılabilir; (i) hastalıklara ve böceklere dayanıklılık, (ii) herbisitlere tolerans, (iii) yüksek ürün kalite ve miktarı, (iv) abiyotik streslere dayanıklılık (Sağiroğlu, 1999).

RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) genetik polimorfizmi belirleyen PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelli bir tekniktir. Tekniğin en büyük avantajları arasında genom dizisi hakkında ön bilgiye, yüksek saflıktaki DNA'lardan çok miktarlara, Southern Blotlama veya radyoaktif kimyasallara ihtiyaç duymaması yer almaktadır. Ayrıca teknik hızlı ve düşük maliyetlidir. RAPD tekniği pek çok alanda olduğu gibi bitki türlerinin genetik değişikliklerinin belirlenmesinde yaygın olarak başarıyla kullanılan bir tekniktir (Aydın, 2004).

RAPD tekniği ilk defa 1990 yılında rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nu temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Williams vd., 1990). Aynı yıllarda diğer bir çalışma grubu tarafından uygulanmış ve AP-PZR (Arbitrarily Primed PZR) olarak isimlendirilmiştir (Welsch vd., 1990).

RAPD yönteminin temel prensibi, ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 nükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PZR ile çoğaltma yapmasına dayanmaktadır. Tekniğin devamında elde edilen çoğaltma ürünleri, radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Elde edilen bantların varlığı veya yokluğu ile sonuçlar değerlendirilmektedir (Welsch vd., 1990).

Türkiye'de bulunan *Satureja* cinsine (*Labiatae*) ait bazı türlerinin sistematik problemleri vardır. Bir kısım botanikçi tarafından *Satureja* cinsi , içerdiği bazı türler nedeniyle karmaşık bir cins olarak tanımlanmıştır. Bazı botanikçiler ise *Satureja* türlerinin farklı cins içerisinde değerlendirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Bu sistematik problemlerin çözümünde RAPD tekniği kullanılmıştır. RAPD tekniği sonuçları, sitogenetik, polen analizi ve morfolojik analizlerin sonuçlarıyla da desteklenmiştir (Aydın, 2004).

Satureja türleri, gerek tıbbi özellikleri, gerek ise baharat olarak kullanılması ve ihrac ürününü olması gibi nedenler ile ekonomik açıdan oldukça önemli bitkiler arasında yer almaktadırlar (Tümen vd., 2004).

S. aintabensis P. H. Davis bitkisinin *in vitro* doku kültürü teknikleri ile üretimi ve Gaziantep-Dülükbaba Ormanı'ndaki popülasyonunun genetik karakterizasyonu üzerinde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tez kapsamında *S. aintabensis* P. H. Davis bitkisinin doku kültürü teknikleri ile çoğaltım olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada bitkinin *in vitro* koşullarında mevsime bağlı olmaksızın, küçük bir alanda ve çok sayıda çoğaltılmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. Bu amaçla MS ortamına farklı Oksin ve Sitokinin hormonları ilave edilerek, direkt/indirekt somatik embriyogenez sağlanmaya çalışılmıştır.

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

Bitki doku kültürlerinin gelişmesinde etkili olan önemli çalışmaların başında, Haberlandt'ın 1902 yılında yapmış olduğu, izole edilmiş hücrelerin kültürü çalışması gelmektedir (Kung, 1993; Pierik, 1993; Endress, 1994). Bu çalışmanın ardından 1904 yılında olgun embriyoların kültürü çalışması Hannig tarafından rapor edilmiştir (Hannig, 1904). Biyoteknoloji terimi ise ilk kez 1917 yılında Karl Ereky tarafından kullanılmıştır. Bu çalışmaları 1934' de Gautheret tarafından yapılan önemli çalışmalar arasında yer alan ilk kallus kültürlerinin geliştirilmesi ve yine Gautheret tarafından 1942 yılında yapılan sekonder metabolit eldesi takip etmektedir (Kung, 1993; Pierik, 1993; Endress, 1994).

Babaoğlu vd., (2001) günümüzde en çok kullanılan yapay besi ortamının, 1962 yılında Murashige ve Skoog tarafından geliştirilen MS ortamı olduğunu belirtmişlerdir. 1962 yılında yine Murashige ve Skoog tarafından tütün bitkisi için geliştirilen yüksek tuz içerikli MS ortamının ise özellikle düşük yoğunluklarda bir çok bitki türünde köklendirme çalışmalarında kullanıldığını rapor etmişlerdir. B5 ortamı ise, Gamborg vd., tarafından 1968 yılında, soya kallus kültürleri için geliştirilmiş, nitrat azotu yüksek bir ortamdır. LS ortamı, Linsmainer ve Skoog tarafından 1965 yılında geliştirilmiştir ve MS ortamının organik bileşikler bakımından farklı bir versiyonudur. WH ortamı ise White tarafından (1943) düşük formülasyonlu ve domates köklerinin kültürü için geliştirilmiş bir ortamdır. SH ortamının ise Schenk ve Hilderbrant tarafından (1972) hem monokotiledon hem de dikotiledonlar için uygun olabileceği rapor edilmiştir.. Son olarak da NN ortamı ise, Nitsch ve Nitsch tarafından 1969 yılında anter kültürü için geliştirilmiştir, ayrıca ortamın tuz içeriğinin MS ve WH ortamlarının tuz içeriği arasında yer aldığı belirtilmiştir.

Pierik, (1997) ve Babaoğlu vd., (2001) bitki büyüme düzenleyicilerinin doku kültürü ortamlarının en önemli unsuru olduklarını vurgulamışlardır. Tür ve çeşitlere göre değişmekle birlikte uygun olmayan konsantrasyonlarda ortama ilave edildiklerinde genellikle hiçbir etki göstermediklerini ayrıca bitki hormonlarının, bir dokuda üretilip, büyüme ve gelişmenin olacağı diğer dokulara taşınan ve çok düşük konsantrasyonlarda etkili olan endojen organik bileşikler olduklarını rapor etmişlerdir. İndol Asetik Asit (IAA), Zeatin, Giberellik Asit (GA), Absisik Asit ve Etilen bitkilerce üretilen hormonlar olduklarını ve sentetik yollarla üretilenler de dahil olmak üzere genel olarak hepsine bitki büyüme düzenleyicileri adı verildiğini belirtmişlerdir. Bitki doku kültürü çalışmalarında en yoğun kullanılan hormonların ise Oksinler, Stokininler, Giberellinler, Absisik Asit ve Etilen olduğunu vurgulamışlardır.

Pierik, (1997) ve Babaoğlu vd., (2001) Oksinler, fotoperiyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellediğini ve hücre gelişiminde etkili olduklarını ayrıca, Oksinlerin doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını, sitokininlerle birlikte yine kallus oluşumunu, organogenez ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlayabildiklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca Oksinlerin elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde vazgeçilmez bir kullanıma sahip olduklarını, temel hormon formunun IAA (indol-3-asetik asit) olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca sentetik Oksin'ler arasında NAA (Naftalen asetik asit), IBA (İndol butirik asit), 2,4-D (Diklorofenoksi asetik asit) ve Piklorom hormonlarının da sayılabileceklerini bildirmişlerdir.

Smith, 1992 yılında en çok kullanılan Sitokinin'lerin Adenin (aminopürin) türevleri olduğunu belirtmiştir. Bunlar içinde de BAP (6-Benzilamino purin), *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarında geniş kullanım alanına sahip olduğunu bildirmiştir. İlave olarak Sitokininlerin, çoğunlukla kök ucu meristemi ve genç yapraklarda üretildiklerini, hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olduklarını ve antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirdiklerini bunların yanı sıra sürgünlerde köklenmeyi ve embriyogenezi engellediklerini rapor etmiştir.

Babaoğlu, (2001) Gibberellerinlerin, meristem bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, bitki boylarının uzatılmasında, embriyo ve ovül kültürlerinde kullanıldıklarını belirtmiştir. Ayrıca, kallus gelişimi, organogenez ve adventif kök oluşumunu engellediklerini ve bitkilerde gövdenin uzamasını ve çiçeklenmeyi de arttırdıklarını vurgulamıştır.

Babaoğlu, (2001) Absisik asitin, strese maruz kalmış bitkilerde, dormant tomurcuklarda ve tohumlarda bulunduğunu, ve bitki doku kültürlerindeki rolünün henüz tam olarak anlaşılmamış olduğunu ve halen somatik embriyoların olgunlaştırılmalarında kullanıldığını belirtmiştir.

Finer, (1995) bitki türü, kullanılan eksplant ve besin ortamının içeriğine bağlı olarak embriyogenez direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde gerçekleştiğini belirtmiştir. Direkt somatik embriyogenezde somatik embriyoların, ara bir kallus safhası olmadan eksplant doku üzerinde bulunan tek bir hücre veya hücre gruplarından geliştiklerini ayrıca, direkt embriyogenez için en fazla kullanılan eksplant kaynağının olgunlaşmamış somatik embriyolar olduklarını belirtmiştir. İndirekt embriyogenez oluşumunda ise kallus oluştuktan sonra yeni embriyoların oluşumları ile meydana geldiğini rapor etmiştir.

İlk somatik embriyogenez çalışması 1958 yılında Steward vd tarafından havuç bitkisinde yapılmıştır (Pierik, 1993; Kung, 1993; Endress, 1994).

Günümüzde buğday (Maes vd., 1996), mısır (Bronsema 1997; Emeklier vd., 1999), çeltik (Ozawa ve Komamine., 1989), soya (Hartweck vd., 1998), bezelye (Özcan vd., 1993), yonca (Lai ve McKersie., 1994) gibi birçok önemli kültür bitkisinde yüksek oranda somatik embriyo üreten yöntemler geliştirilmiştir.

Bitki doku kültürü tekniklerindeki ilerlemelere bağlı olarak transgenik bitkilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar da hız kazanmıştır. İlk transgenik bitki çalışması Murai vd., (1983) tarafından tütünün elde edilmesini takiben, 1990'lı yılların başında ABD'nde Calgene firması tarafından ilk ticari transgenik (gen nakli uygulanmış) bitki "Flavr Savr Tomatoes" piyasaya sunulmasıyla olmuştur. Daha sonra ise, Aydın, (2000) tarafından, gen nakli yöntemi ile bitki zararlılarına karşı dayanıklı ve kalite

özellikleri geliştirilmiş pamuk, soya, mısır ve kanola bitkilerinin geliştirildikleri rapor edilmiştir.

Tarımsal ürünlerin korunması için pestisitlerin kullanımı her ne kadar ürün miktarını arttırsa da, bu kimyasal maddelerin kalıntılarına, bitkilerden insanlara kadar doğada pek çok canlıda rastlamak mümkündür. Pestisitlerin kullanımına alternatif olarak ortaya çıkan biyolojik mücadele günümüzde daha fazla önem kazanmıştır. Örneğin Smith, (1996) tarafından yapılan bir çalışmada *Bacillus thuringiensis* (Bt) sporlarının biyolojik mücadelede kullanımı oldukça yaygın oldukları belirlenmiştir. Briggs vd., (1998) ve Steward vd., (1996) tarafından, bir gram pozitif bakteri olan Bt'nin, böcek öldürücü etkisinin içinde bulunan kristal proteinlerden kaynaklandığı ortaya çıkarılmış ve bu proteini kodlayan genin izolasyonundan sonra bitkilere aktarımıyla çeşitli patojenlere dayanıklı transgenik bitkiler elde edildiği bildirilmiştir. Mifflin, 2000 yılında, transgenik Bt pamuğunun kullanımı ile 1998'de pamuk için kullanılan total insektisit miktarının ABD'de 1000 tondan daha az olduğu bildirmiştir. Bu çalışmalara ilave olarak Smith (1996) yılında herbisitlere dayanıklı bitkilerin üretiminin, herbisitlere hassasiyet gösteren enzimlerin aktivitesinin değiştirilmesi veya herbisit toksik etkisini yok edecek olan yeni enzimlerin sentezinden sorumlu genlerin bitkiye transferi ile mümkün olabileceğini bildirmiştir. Örneğin Briggs vd., (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, glufosat, glufosinat ve bromoksinil gibi herbisitlere dayanıklı kanola, şeker kamışı, pirinç, mısır, pamuk gibi bitkilerin artık çiftçilerin kullanımına sunulduğu bildirilmiştir. Ayrıca herbisit acifluorfen'e toleranslı transgenik tütün bitkileri üzerinde de çalışmalar da Lermontova vd., (2000) tarafından yapılmaktadır.

Başer (1994) , *Satureja* spp. Lamiaceae familyasına bağlı bir cins olduğunu ve dünyada 30 tür ile temsil edildiğini rapor etmiştir. Bu çalışmada *Satureja* spp'nin yayılım olarak doğu Akdeniz ülkelerinde bulduklarını ve Lamiaceae familyasına ait türlerin ülkemizde Akdeniz'in dağlık alanlarında yayılım gösterdikleri ayrıca tek yıllık ve çok yıllık türleri olduğu ve yarı çalı özelliğinde olan bu bitkilerin güneşli, kurak, taşlı ve kayalık habitatları tercih ettiklerini rapor etmiştir. Başer vd (2002) yılında ülkemizde 15 *Satureja* türü belirlenmiş olduğunu ve bunların 5 tanesinin endemik bitki olduklarını rapor etmişlerdir. Tümen vd (2002) yılında *Satureja* türlerinin yöresel olarak "kekik", "sivri kekik", "kılıç kekik", "çatlı" ve "firibu"

isimlerini aldıklarını bildirmişlerdir. Başer (1995) ise Anadolu'da kekik adıyla bilinen bitkilerin, *Origanum* sp, *Satureja* sp, *Thymbra* sp, *Thymus* sp ve *Corydorthymus* sp olarak tanımlandıklarını rapor etmiştir.

Sivil Toplum Geliştirme Merkezi'nin raporuna göre, Antep kayakekiği olarak da bilinen *S. aintabensis*, dünyada sadece Gaziantep- Dülükbaba Ormanları'nda küçük bir alanda yetişen lokal endemik bir bitkidir. İlk olarak Havvsknekt tarafından Gaziantep'ten 1865'de toplanmıştır. *S. aintabensis* çok yıllık bir bitkidir ayrıca tabanda sert odunsu ve çok gövdelidir. Gövdesi basit dallanmış, kırılğan, ince yapılı ve 10-45 cm boyundadır (Şekil 1). Tüyleri geriye kıvrık ve diktir. Yapraklar açık yeşil, dikdörtgenimsi çizgisel 5-15 mm boyunda, 1-2 mm genişliğinde, sapsız, küt uçlu, kenarda düz, tabana doğru daralmış durumdadır. Tüyler kısa, yumuşak ve az sayıda, yoğun kırmızı renkli salgı noktalıdır. Çiçek durumu seyrek, çanak yapraklar 2-4 mm uzunluğunda belirgin iki dudaklı, taç yapraklar morumsu leylak, çiçeklenmenin başlangıcında beyaz renkli, 1-1,5 mm boyunda, genişçe dikdörtgen şeklindedir .

Yine bu çalışmada endemik bir bitki olan *S.aintabensis*'in çiçeklenme zamanının Temmuz–Ekim ayları olduğu belirtilmiştir. Bitkinin yarı açık, seyrek küçük boylu çalılıkların oluşturduğu açık kalker kayalıklarda ve kızılçam ağaçlarının altındaki kalker kayalıklar üzerinde, 900- 1250 m yükseklikler arasında yetiştiğini ve türün popülasyonunun Gaziantep–Adana karayolu üzerinde, Gaziantep şehir merkezine 12 km uzaklıkta olup, mesire alanı içerisinde, kaya mezarları çevresinde 0,3 km²'lik bir alanda yayılım gösterdiği rapor edilmiştir.



Şekil 2.1. *Satureja aintabensis* P. H. Davis (Antep Kayakekiği)'nin Gaziantep ili 2008 Temmuz ayındaki görüntüsü

Arazinin deniz seviyesinden yüksekliği 850m'den başlayıp Dülükbaba tepesinde 1250 m' ye kadar çıkmaktadır. Alanın hakim toprak grubu organik topraklardır. Bitkinin günümüzdeki popülasyonu oldukça küçüktür. Ayrıca, arkeolojik yerleşim alanı içerisinde bulunması ve kekik olarak toplanma olasılığı nedeniyle nesli tehdit altındadır. Bu nedenle uluslar arası Doğa Koruma Kurumu Kırmızı Listesi kategorilerinden CR (vahim =çok tehlikede) kategorisinde yer almaktadır (www.stgm.gov.tr).

Kürkçüoğlu vd., (2001) tarafından, ülkemizde Lamiaceae familyasına bağlı olan *Satureja* sp, *Origanum* sp, *Thymus* sp gibi türlerin bitki çayı olarak tüketildikleri ayrıca bu bitkilerin esansiyel yağ içeriği bakımından da zengin oldukları ve timol/karvakrol içeriğinden dolayı kekik olarak isimlendirildikleri rapor edilmiştir. Baydar vd., (2004 tarafından) *O. minutiflorum* O. Schwarz and P.H. Davis, *O. onites* L., *T. spicata* L. ve *S. cuneifolia* Ten. bitkilerinin özellikle Isparta yöresinde geniş bir yayılım alana sahip oldukları ve yabancı olarak yetişen bu türlerin toplanarak yıllık 1000 ton civarında ihraç edildikleri rapor edilmiştir.

Cavar vd., (2008) tarafından, *Satureja* cinsine bağlı türlerinin, aromatik bileşenler ve yağlarının izolasyonlarının, kimyasal bileşenlerinin ve antimikrobiyal etkileri üzerine yapılmış çok sayıda çalışma bulunduğu rapor edilmiştir.

Tümen vd., (2002) tarafından, *S. aintabensis*'in benzerlik ve farklılık gösterdiği diğer *Satureja* türleri olarak, Doğu Anadolu'da yayılış gösteren *Satureja macrantha* ve Türkiye'nin yaklaşık tüm bölgelerinde yayılış gösteren *S. hortensis* türleri rapor edilmiştir.

Tümen vd., (2002) tarafından ayrıca, Türkiye'deki *Satureja* türlerinin ticaretinin, özellikle Ege ve Akdeniz Bölgesinde yoğunlaştığı ve ticareti yapılan *Satureja* türlerinin: *S. cuneifolia*, *S. wiedemanniana*, *S. thymbtra*, *S. hortensis*, *S. cilicica* türleri olduğunu rapor etmişlerdir.

Krkuğlu vd., (2001), Baydar vd., (2004), Boyraz ve zcan (2005) Kan vd., (2006) ve Cavar vd., (2008) tarafından Lamiaceae familyasına bağlı *Satureja* sp, *Sideritis* sp, *Salvia origanum* ve *Thymus* sp gibi türler ülkemizde bitki ayı olarak tüketildikleri ve bu bitkilerde bulunan aromatik kimyasalların bileşiminin iklimsel, mevsimsel, jeolojik, hasat dönemi, toprak bileşimi, ve distilasyon yöntemlerine göre farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. Yine bu araştırmacılar tarafından, bu özelliklerinde dolaylı *Satureja* cinsine bağlı olan türlerde aromatik bileşik ve yağların izolasyonları, kimyasal bileşimleri ve antimikrobiyal etkileri üzerine yapılmış birçok çalışmanın mevcut olduğu bildirilmiştir.

Kan vd., 2006 yılında, Dağ Kekiği olarak da bilinen *S. cuneifolia* Ten bitkisinin esansiyel yağlarının kimyasal bileşimini GC-MS yöntemi ile belirlemişlerdir ve Karvakrol içeriğinin %59,28 oranıyla en yüksek miktarda olduğunu rapor edilmişlerdir.

Bir başka çalışma da, Baydar vd., (2004) ve Kan vd., (2006) tarafından yapılmıştır ve *S. cuneifolia* bitkisinde %15,72 oranında Timol, %9,69 oranında p-cymene, %4,16 oranında γ -terpinene, %1,70 oranında Linalool ve %1,25 oranında Borneol bulunduğu saptanmıştır. *S. cuneifolia*'nın, esansiyel yağ ve bileşenlerinin

antimikrobiyal etkisi *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *S. lutea*, *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde test edilmiş ve etkili olduğunu saptanmıştır.

Benzer çalışma Cavar vd., (2008) tarafından, Bosna-Hersek’de yayılış gösteren *S. montana* ve *S. subspicata* türleri üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada *S. montana*’nın %31,7 oranında Thymol ve %22,3 oranında Geraniol içerdiği belirlenmiştir. *S. subspicata*’nın ise %28,6 oranında Thymol ve %37,6 oranında Sparhulenol içerdiği rapor edilmiştir. Esansiyel yağların antimikrobiyal etkisi *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* bakterilerinde test edilmiş ve bu bakteri gelişimlerini inhibe ettiğini rapor etmişleridir.

Benzer bir başka çalışma da, Kürkçüoğlu vd., tarafından (2001), Adıyaman ilinden toplanan *S. boissieri*’nin esansiyel yağ içeriği GC-MS ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda bu türde Karvakrol (%40,8), g -terpinene (%26,4), ve p-cymene (%14,5) bileşiklerinin bulunduğu rapor edilmiştir.

Baydar vd. (2004) tarafından, ülkemizde yetişen endemik bir tür olan *O. minutiflorum*, *O. onites*, *T. spicata* ve *S. cuneifolia*’nın esentiyel yağlarının kimyasal bileşimi ile bunların antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. GC analizleri ile bu bitkilerde yüksek miktarda karvakrol bulunduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca esansiyel yağların, *A. hydrophila*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. xerosis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *M. smegmatis*, *P. vulgaris*, *S. aureus* ve *Y. enterocolitica* bakterilerine karşı inhibe edici etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu bitkilerdeki esansiyel yağlarının, besinlerde bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Boyras ve Özcan (2005) tarafından, *S. hortensis* bitkisinin hydrosol, ezilmiş materyal, ekstrakt ve esentiyel yağlarının *Alternaria mali* Roberts and *Botrytis cinerea* Pers. funguslarının misel gelişimi üzerine olan etkilerini araştırılmıştır. Bitki ekstraktlarının her iki fungusun misel gelişimini %100 oranında engellediği rapor etmişlerdir. Ayrıca esansiyel yağların düşük oranda fungustatik, yüksek oranda ise fungusit etkiye sahip olduğu belirlemişlerdir. Bu çalışmada besinlerin, funguslar

tarafından bozulmasının engellenmesinde çevre ile uyumlu ve sağlıklı bir yöntem olan bitki ekstraktlarının kullanılabilmesi vurgulanmıştır.

Benzer çalışmalar ülkemizde *S. cuneifolia* bitkisinde Oke vd., (2009), Schulz vd., (2005), Şahin vd., (2003) tarafından rapor edilmiştir.

Shetty vd., 1995; Shetty vd., 1996; Shetty, 1997; Andarwulan ve Shetty, 1999 yılları arasında Lamiaceae familyasına bağlı birçok türde *in vitro* bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak bitkilerin genetik yapılarının iyileştirilmesi ve antimikrobiyal yağ içeriklerinin belirlenmesi üzerinde araştırmalar yapılmıştır.

Strycharz ve Shetty 2002 yılında, *in vitro* doku kültürü teknikleri kullanılarak elde edilen *O. vulgare* hatlarında vitrifikasyonun engellenmesi üzerinde bakterilerin etkinliğini araştırmışlardır.

Goleniowski vd., (2003) Arjantin'de yetiştiriciliği yapılan *O. vulgare* x *Applii* bitkisinin meristem kültürü ile mikroçoğaltımı üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada MS ortamına Benzyladenine (BA) ve NAA hormonları farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda kullanılmıştır. En iyi çoğaltım 0,28 µM BAP ve 0,53 µM NAA kombinasyonunda gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Chun vd. (2005) fenolikler açısından zengin klonal *O. vulgare* hatlarını heterojen hatlar ile karşılaştırmışlar ve klonal hatlarda fenolik içeriğinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak elde edilen ve genetik açıdan iyileştirilmiş hatların kullanılabilirliği tartışılmıştır.

Morone-Fortunato ve Avato (2008) *O. vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart bitkisinin mikroçoğaltım ile elde edilen hatlarına mikoriza uygulaması yaparak yüksek esansiyel yağ üretimi sağladıklarını belirtmişlerdir.

Hadian vd. (2008) tarafından, İran'ın farklı bölgelerinden toplanan 28 *S. hortensis* ekotiplerinde tarımsal ve genetik incelemeler yapılmıştır. Genetik analizlerin 18 adet 10 merlik RAPD primerleri kullanılarak gerçekleştirildiği bu çalışmada, 12 primer polimorfik olarak saptanmış, ve çoğaltılan 218 bantın 181 adedi ekotipler arasında

farklılık belirlemiştir. Çalışmada kullanılan 28 *S. hortensis* ekotipi 3 grup oluşturacak şekilde karakterize edilmiştir.

Bu tez kapsamında *S. aintabensis* P. H. Davis bitkisinin doku kültürü teknikleri ile çoğaltım olanakları araştırılmıştır. Çalışmada bitkinin *in vitro* koşullarında mevsime bağlı olmaksızın, küçük bir alanda ve çok sayıda çoğaltılmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. Bu amaçla MS ortamına farklı Oksin ve Sitokinin hormonları ilave edilerek, somatik embriyogenez ve kök oluşumu sağlanmaya çalışılmıştır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Çalışmada Gaziantep-Dülükbaba Ormanları'nda yayılış gösteren Antep kayakekiği (*Satureja aintabensis* P. H. Davis) bitkisinin doğadan toplanan tohumları, gövde, sürgün ucu ve yaprak eksplantları kullanılmıştır.

3.1.2. Kültür Ortamının Hazırlamasında Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalar boyunca tüm denemelerde Murashige-Skoog (1962) MS ortamı (Sigma) kullanılmıştır. MS ortamının içerdiği kimyasallar ve bu kimyasalların miktarları Ek.1 de verilmiştir.

3.1.3. Kültür Ortamlarına İlave Edilen Hormonlar

3.1.3. 1. Sitokininler

In vitro köklenme ve somatik embriyo oluşumunu teşvik etmek amacı ile, %3 sakkaroz içeren MS bazal ortamına, 6- Benzilaminopürin (BAP, $C_{12}H_{11}N_5$) ve 6-Furfurilaminopürin (Kinetin, $C_{10}H_9N_5O$) hormonları farklı konsantrasyonlarda (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/lt) ilave edilerek kullanılmıştır.

3.1.3.2. Oksinler

Bu tez çalışmasında kök ve somatik embriyo gelişimini teşvik etmek amacı ile %3 sakkaroz içeren MS bazal ortamına 1-Naftalen Asetik Asit (NAA, $C_{10}H_7CH_2CO_2H$), İndol Asetik Asit (IAA, $C_{10}H_{10}O_2$) ve 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit (2,4-D, $C_8H_6Cl_2O_3$) hormonları ilave edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan tüm kimyasallar, Merck, Sigma ve Fermentas firmalarından temin edilmiştir.

Btiki doku kültürü çalışmalarında, steril kabin (Bilser, Ankara), etüv (Nüve), orbital karıştırıcı (Nüve), inkübatör (Nüve), karıştırıcılı ısıtıcı (Are), otoklav (Nüve), ters mikroskop (Optik Idyman System), ışık mikroskobu, dijital fotoğraf makinesi (Finepix S602 zoom), hassas terazi (Precisa 160M), buzdolabı (Profilo), mikrodalga fırın (Arçelik) kullanılmıştır.

Nükleik asit analizi çalışmalarında, soğutmalı santrifüj (Selecto), buz makinesi (Buzçelik), benmari (Nüve), mikropipetler (Thermo ve Sigma), ısıtıcılı karıştırıcı (Are), ısı döngücüsü (Thermo PX2), güç kaynağı (Biometra), yatay elektroforez düzenekleri (Biometra), mikrodalga fırın (Arçelik), derin dondurucular (-20, -40 ve -80 °C), bilgisayarlı jel dökümantasyon ve görüntüleme sistemi (WilberLourmat) kullanılmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1. Kültür Ortamının Hazırlanması

Bu tez çalışmasında bazal MS ortamı kullanılmıştır. Makro, mikro besin elementleri ve vitaminleri içeren bazal MS (1962) ortamından (Sigma) firma önerisi doğrultusunda 4,4 gr/lt tartılıp 1000 ml dH₂O' da çözülmüştür. Karışıma karbon kaynağı olarak 30 gr/lt olacak şekilde sakkaroz ilave edilmiş ve çözeltinin pH'sı 1 M NaOH ve 1 N HCl kullanılarak pH 5,7'ye ayarlanmıştır. Ortamlar 9 gr/lt agar ilave edilerek katılaştırılmıştır. Hormonlar otoklavdan önce belirli kombinasyon ve konsantrasyonlarda ilave edilmiş, ortamlar otoklavda 1 atm basınçta 121°C' ye ulaştıktan sonra 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Sterilizasyonu takiben ortamlar steril kabine alınmış, önceden hazırlanan steril kültür kaplarına (petriler, erlenler, macenta) belirli oranlarda dökülmüş ve katılaştıktan sonra kullanılmıştır.

3.2.2. Somatik Embriyogenez Çalışmaları

Somatik embriyogenez çalışmaları doğadan toplanan ve tohumdan çimlendirilen bitki eksplantları üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Bitkilerin Sterilizasyonu

Doğadan alınan bitkilerin yüzey sterilizasyonu için %70'lik etil alkol ve Tween-20 içeren %5'lik sodyum hipoklorit kullanılmıştır. Bitkiler ilk aşamada yarım saat süre ile akan çeşme suyunda yıkanmıştır. Daha sonra eksplantlar sırasıyla önce % 70'lik etil alkol içerisinde 2 dakika bekletilip 2 kez steril dH₂O ile yıkanmıştır. Bu işlemi takiben bitkiler % 5'lik sodyum hipoklorid içerisinde 10 dakika süre ile tutulmuştur. Süre sonunda eksplantlar 3 defa steril dH₂O'dan geçirilerek içinde kurutma kağıdı bulunan steril petrilere alınmıştır.

3.2.2.2. *İn vivo* ' da Gelişen Bitkilerden Somatik Embriyogenez Çalışmaları

Nisan-Temmuz aylarında gelişen *S. aintabensis* bitkilerinin, gövde, sürgün ucu ve yaprak eksplantları Oksin (NAA ve 2.4 D) ve Sitokinin (BAP ve Kinetin) hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını (0,0, 0,5, 1,0, 2,0 mg/lt) içeren bazal MS ortamda kültüre alınmıştır. Kontrol olarak kullanılan kültürlere herhangi bir hormon ilavesi yapılmamıştır. Somatik embriyo oluşumunun teşvik edilmesinin amaçlandığı çalışmalarda 7 farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonu kullanılmıştır. Her eksplant/kombinasyon 6 tekrarlı olarak hazırlanmış ve tüm denemeler en az 2 kez kurulmuştur. Otoklavı takiben hormon içeren kültür ortamları 9 cm (çapında) standart petrilere 25-30 ml olacak şekilde dökülerek hazırlanmış ve çalışma sırasında kullanılmıştır.

Kültür ortamlarına bitki transferini takiben, kültürler 26-28°C' de 16 saat ışık 8 saat karanlık olan klima odalarına yerleştirilmiştir. Değerlendirmeler inokülasyonu takiben 4 hafta sonra, kallus oluşumu, direkt ve indirekt somatik embriyogenez sonuçları alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3. Tohumların Sterilizasyonu ve *in vitro*'da Çimlendirilmesi

Gaziantep-Dülükbaba'da doğal olarak yetişen *S. aintabensis* tohumları Ekim-Kasım aylarında toplanmış ve *in vitro* çimlendirme denemelerinde kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonu amacı ile tohumlar Etanol (%70) içerisinde 5 dk. bekletilip, ardından 2 kez steril H₂O ile yıkanmıştır. Bu uygulamayı takiben %5'lik sodyum hipoklorid içerisinde 15 dk. bekletilmiştir. Bu işlemlerden sonra tohumlar 3 kez steril H₂O ile yıkanarak içlerinde steril kurutma kağıtları olan petrilere alınmıştır. Tohumlar kurutulduktan sonra, her petride 15-20 adet olacak şekilde içerisinde MS ve ½ MS ortamı bulunan petrilere (her özellik için 3 tekrar) üzerinde, 26-28°C' de 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullardaki klima odasında kültüre alınmıştır. Denemeler 2 kez tekrarlanmıştır.

3.2.2.4. Tohum Dormansi Kırma Çalışmaları

S. aintabensis tohumlarının *in vitro*'da çimlenme oranları oldukça düşüktür (Özkeçeci vd., 2008). Bu tez kapsamında *in vitro*'da tohum çimlenme oranını artırmak amacı ile denemeler yapılmıştır. Bu çalışmalarda soğuk (-20°C, -40°C ve -80°C) ve Sülfirik Asit uygulamalarının etkisi araştırılmıştır. *S. aintabensis* tohumları 7 gün, 14 gün ve 21 gün süre ile -20°C, -40°C ve -80°C'deki derin dondurucularda bekletildikten sonra MS ve ½ MS ortamları üzerinde kültüre alınmıştır. Bu amaçla her petri kabına 15-20 tohum ekimi yapılmış, her uygulama en az 2 kez tekrarlanmıştır. Kültürler, 26-28°C' de 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullardaki klima odalarına yerleştirilmiştir. Değerlendirmeler kültüre almayı takiben 10 gün sonra çimlenen ve çimlenmeyen tohum sayımları yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Sülfirik Asit uygulamalarında ise, %10, %20, %30, %40 ve %50 konsantrasyonları kullanılmıştır. Tohumlar, Sülfirik Asit içerisinde 5 dakika süre ile tutulmuş, ve bu süre sonunda steril dH₂O ile 3 kez yıkanmıştır. Bu uygulamayı takiben tohumlar, steril kurutma kağıtları üzerinde bekletilerek kurumaları sağlanmıştır. Tohumlar daha sonra MS ortamı içeren petri kapları üzerinde 15-20 tohum olacak şekilde, 5-6 petride kültüre alınmıştır. Kültürler, 26-28°C' de 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullardaki klima odalarına yerleştirilmiştir. Değerlendirmeler kültüre almayı

takiben 10 gün sonra çimlenen ve çimlenmeyen tohum sayımları yapılarak gerçekleştirilmiştir. Denemeler 2 kez tekrarlanmıştır.

3.2.2.5. *In vitro*'da Gelişen Bitkilerden Somatik Embriyogenez ve Köklendirme Çalışmaları

S. aintabensis tohumları 3.2.2.4.'de verildiği şekilde, *in vitro*'da çimlendirilmiş, çimlenmeyi takiben 3 hafta sonra gelişen bitkilerin kök ve kotiledon eksplantlarından somatik embriyogenez ve kök gelişimi teşvik edilmiştir. Bu amaçla MS (1962) ortamına Oksin (NAA ve IAA) ve Sitokinin (BAP ve Kinetin) hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonları (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) ilave edilmiştir.

Somatik embriyo ve kök gelişiminin amaçlandığı çalışmalarda 7 farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonu kullanılmıştır. Her kombinasyon en az 6 tekrarlı olarak hazırlanmış ve tüm denemeler 2 kez kurulmuştur. Otoklavı takiben hormon içeren kültür ortamları standard petrilere 25-30 ml olacak şekilde dökülmüş, katılaşmayı takiben aynı gün içerisinde veya ertesi gün olacak şekilde kullanılmıştır. Kültür ortamlarına bitki transferini takiben, kültürler 26-28°C' de 16 saat ışık 8 saat karanlık olan klima odalarına yerleştirilmiştir. Değerlendirilmeler kültüre alınmayı takiben 4 hafta sonra, kallus oluşumu, kök gelişimi, direk ve indirek somatik embriyogenez sonuçları alınarak gerçekleştirilmiştir.

Eksplantlar, kültür ortamları üzerinde 25-27 °C sıcaklıkta, 16 saat ışık, 8 saat karanlık koşullardaki klima odalarında kültüre alınmış, ve 4 hafta sonra değerlendirmeler yapılmıştır.

3.2.2.6. İstatiksel Analizler

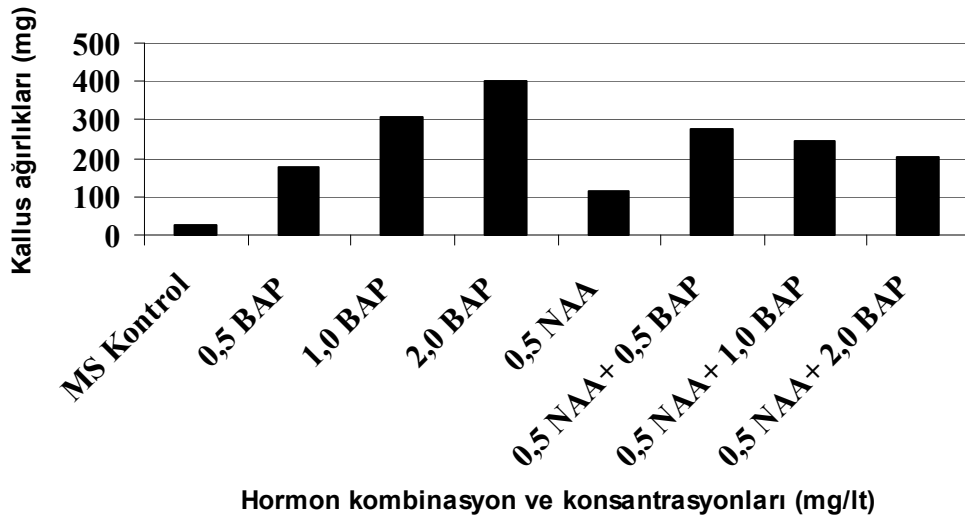
Bu çalışmadan elde edilen tüm veriler One-Way ANOVA LSD testi [SPSS (SPSS 11.0 for Windows)] ile analiz edilmiştir. Yapılan istatiksel analizlerde her parametre kendi arasında karşılaştırılmıştır.

BÖLÜM 4 BULGULAR

4.1. Somatik Embriyogenez Çalışmaları

4.1.1. *İn vivo*' da Gelişen Bitkilerden Somatik Embriyogenez Çalışmaları

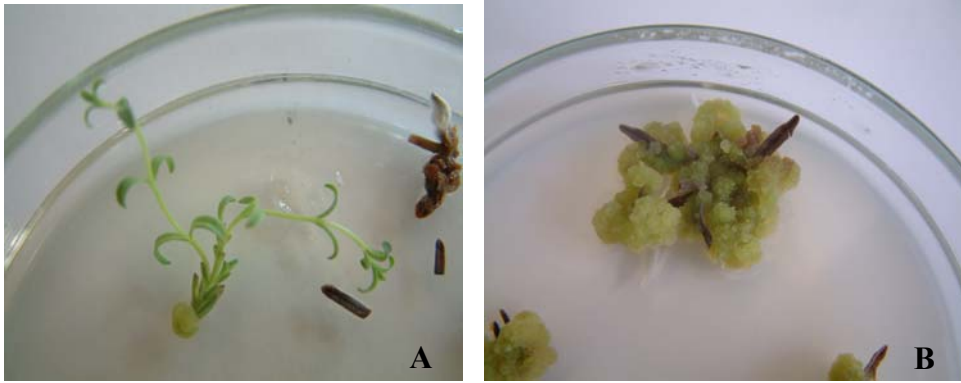
Somatik embriyogenez amaçlı çalışmalarda Oksin ve Sitokinin hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren bazal MS (1962) ortamında, kültüre alınmayı takiben 4 hafta sonra gerçekleştirilen değerlendirmede gövde ve yaprak eksplantlarında herhangi bir gelişme meydana gelmemiştir. Kültüre alınan sürgün uçlarında ise kallus ve bitki rejenerasyonu saptanmıştır. Kallusların ortalama ağırlık değerleri Şekil 4.1 ve Tablo 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı miktarlarda BAP ve NAA hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan *S. aintabensis* bitkisinin sürgün ucundan gelişen kallusların ortalama ağırlık değerleri

Şekil 4.1.' de görüldüğü gibi *S.aintabensis* bitkisinin sürgün ucu eksplantlarının kültüre alındığı denemede en yüksek kallus oluşumu (401,14 mg), 2,0 mg/lt BAP içeren MS ortamında meydana gelmiştir.

BAP ve NAA hormon denemesinde kullanılan tüm hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarında düzenli sürgün oluşumu meydana gelmemiştir. Bununla birlikte 1,0 mg/lt BAP + 0,5 mg/lt NAA içeren MS ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarında organogenez saptanmıştır (Şekil 4.2 A). Bu denemede gelişen kalluslar hızlı büyüyen, sarı-açık yeşil renkte, sert yapıda olmuştur (Şekil 4.2 B).



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki BAP hormonunun etkisiyle direkt, indirekt somatik embriyogenez ve kallus oluşumu. A: 1,0 mg/lt BAP + 0,5 mg/lt NAA içeren MS ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından gelişen gelişen *S. aintabensis* bitkileri. B: 2,0 mg/lt BAP içeren MS ortamında gelişen kalluslar

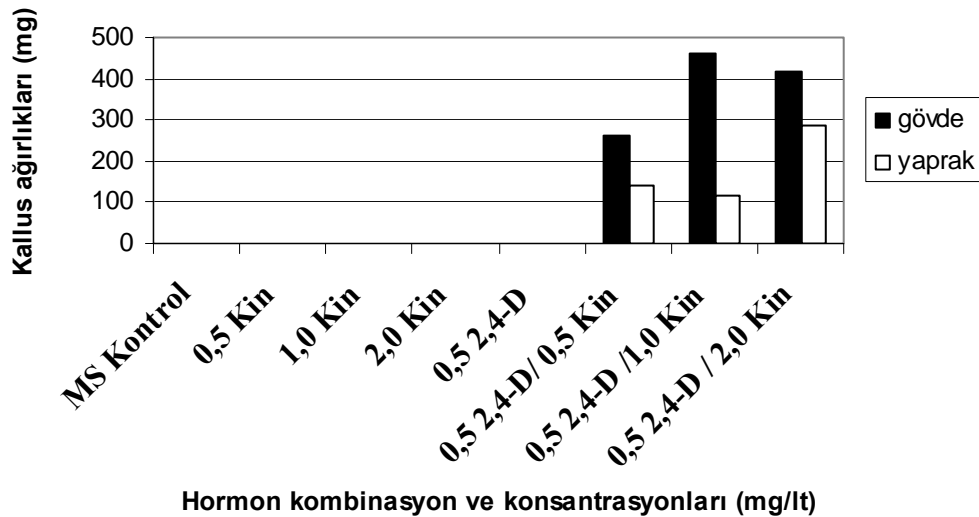
Somatik embriyogenezi teşvik etmek amacıyla kurulan denemede BAP hormonunu içeren MS bazal ortamlarında NAA hormonunu içeren ortamlara nazaran daha fazla miktarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca BAP ve NAA hormonlarının ikisinin beraber kullanıldığı kombinasyonlarda, BAP hormon miktarının artırılmasıyla kallus miktarında artış, daha sonra ise azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.1 ve Tablo 4.1).

Tablo 4.1. BAP ve NAA hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS (1962) ortamı üzerinde kültüre alınan *S. aintabensis* sürgün ucu eksplantlarında meydana gelen kallus gelişim oranları

Hormon kombinasyon ve konsantrasyonları (mg/l)	Eksplant kaynağı (Sürgün ucu)*
Kontrol (MS+%3 Sakkaroz)	25,41 ad
0,5 BAP	179,43 bdfg
1,0 BAP	308,42 cefg
2,0 BAP	401,14 c
0,5 NAA	115,63 d
0,5 NAA+ 0,5 BAP	274,58 efg
0,5 NAA+1,0 BAP	246,49 fg
0,5 NAA+ 2,0 BAP	204,0 g

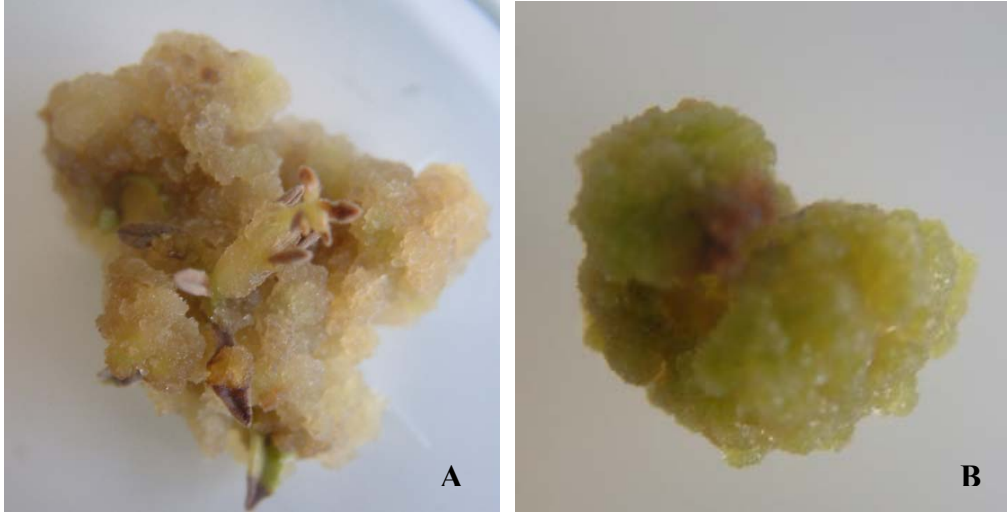
*Değerlerin yanındaki farklı harfler, LSD testi uygulanmış değerlerde $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak farklılık belirtir.

Somatik embriyogenezi teşvik etmek amacı ile kurulan bir diğer denemede ise farklı Oksin ve Sitokinin hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren bazal MS (1962) ortamında, yaprak, gövde ve sürgün ucu eksplantlarının kültüre alınmasını takiben 4 hafta sonra yapılan değerlendirmeler yapılmıştır. Buna göre sürgün ucu eksplantlarında herhangi bir gelişme kaydedilmemiştir. Bununla birlikte gövde ve yaprak eksplantlarında kallus oluşumu saptanmıştır. Çalışma ile ilgili sonuçlar Şekil 4.3 ve Tablo 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.3. 2,4-D ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS+%3 Sakkaroz ortamında kültüre alınan *S. aintabensis* bitkisinin yaprak ve gövde eksplantlarından gelişen kallusların ortalama ağırlık değerleri

Şekil 4.3' de görüldüğü gibi *S. aintabensis* bitkisinin gövde eksplantlarının kültüre alındığı denemede kallus ağırlığının en fazla olduğu hormon kombinasyonu, 460,52 mg ağırlığında kallusun geliştiği 0,5 mg/lt 2,4-D ve 1,0 mg/lt Kin içeren MS ortamında meydana gelmiştir. Yaprak eksplantlarının kültüre alındığı ve en fazla miktarda kallus oluşumunun gözlemlendiği kombinasyon ise 286,23 mg ağırlık değeri ile 0,5 mg/lt 2,4-D ve 2,0 mg/lt Kin içeren MS ortamında saptanmıştır. Bu denemede gelişen kalluslar açık kahverengi ve yeşil renkte kırılğan kalluslar olmuştur.



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D ve Kinetin (Kin) hormonlarının etkisiyle kallus oluşumu. A: 0,5 mg 2,4-D + 2,0 mg/lt Kin içeren MS ortamında kültüre alınan ve yaprak eksplantından gelişen kallus görüntüsü. B: 0,5 mg 2,4-D + 1,0 mg/lt Kin içeren MS ortamında kültüre alınan ve gövde eksplantından gelişen kallus görüntüsü

Tablo 4.2. 2,4-D ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS (1962) ortamı üzerinde kültüre alınan *S. aintabensis* yaprak ve gövde eksplantlarında meydana gelen kallus gelişim oranları

Hormon kombinasyonu (mg/lt)	Eksplant kaynağı	
	Gövde*	Yaprak
MS Kontrol	-	-
0,5 Kin	-	-
1,0 Kin	-	-
2,0 Kin	-	-
0,5 2,4-D	-	-
0,5 2,4-D/ 0,5 Kin	260,26 a	141,58 a
0,5 2,4-D/ 1,0 Kin	460,52 a	117,16 a
0,5 2,4-D/ 2,0 Kin	419,22 a	286,23 b

- : Gelişme yok. *Değerlerin yanındaki farklı harfler, LSD testi uygulanmış değerlerde p<0,05 düzeyinde istatistiksel olarak farklılık belirtir.

4.1.2. *In vitro*'da Gelişen Bitkilerden Somatik Embriyogenez ve Kök Oluşumu

4.1.2.1. Tohumların *in vitro*'da Çimlendirilmesi

S. aintabensis tohumlarının *in vitro*'da çimlenme oranı yüksek değildir (Özkekeci vd, 2008). Bu nedenle tohumda olası dormasinin kırılması amacı ile soğuk ve Sülfirik Asit uygulamaları yapılmıştır.

Ekim-Kasım aylarında Gaziantep-Dülükbaba mevkisinden toplanan *S. aintabensis* tohumları, 7 gün, 14 gün ve 21 gün süre ile -20°C, -40°C ve -80°C'deki derin dondurucularda bekletildikten sonra bazal MS ve ½ MS ortamları üzerinde kültüre alınmıştır. On gün sonra yapılan değerlendirmelerde iki farklı MS ortamında çimlenen tohum yüzdeleri belirlenmiştir.

7, 14 ve 21 gün süre ile soğuk uygulaması yapılan *S. aintabensis* tohumlarında meydana gelen çimlenme oranları Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Farklı sürelerde soğuk uygulaması yapılan *S. aintabensis* tohumlarının MS (1962) ortamındaki çimlenme oranları

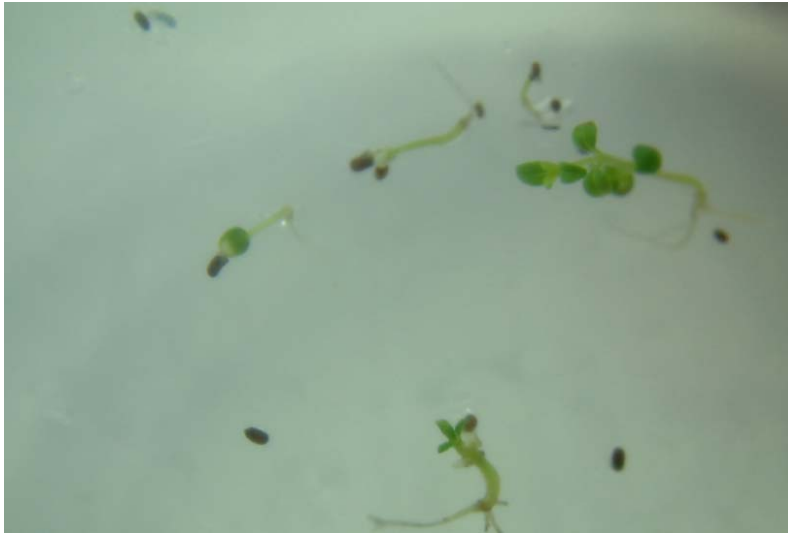
Oranlar	Kontrol	Uygulama süreleri ve sıcaklık değerleri								
		7 gün			14 gün			21 gün		
		-20 (°C)	-40 (°C)	-80 (°C)	-20 (°C)	-40 (°C)	80 (°C)	-20 (°C)	-40 (°C)	-80 (°C)
Çimlenen Tohum Sayısı	2	10	12	4	5	18	5	7	9	4
Çimlenmeyen Tohum Sayısı	21	91	138	125	85	104	64	63	55	22
Toplam Tohum Sayısı	23	101	150	129	90	122	69	70	64	26
Çimlenme Yüzdesi (%)	8,7	9,9	8,0	3,1	5,6	14,8	7,2	10,0	14,1	15,4

S. aintabensis tohumlarında çimlenme kültüre almayı takiben 3-4 gün içinde meydana gelmiştir. Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de görüldüğü gibi, tohumların kültüre alındıkları ortamlar kıyaslandığında, ½ MS ortamında, bazal MS ortamına göre daha fazla çimlenme oranı gözlenmiştir. Bazal MS ortamı üzerinde kültüre alınan tohumlarda en yüksek çimlenme oranı (%15,4), -80 °C'de 21 gün süre ile bekletilen tohumlardan elde edilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.4. Farklı sürelerde soğuk uygulaması yapılan *S. aintabensis* tohumlarının ½ MS (1962) ortamındaki çimlenme oranları

Oranlar	Kontrol	Uygulama süreleri ve sıcaklık değerleri								
		7 gün			14 gün			21 gün		
		-20 (°C)	-40 (°C)	-80 (°C)	-20 (°C)	-40 (°C)	80 (°C)	-20 (°C)	-40 (°C)	-80 (°C)
Çimlenen Tohum Sayısı	4	16	19	6	11	22	10	21	3	4
Çimlenmeyen Tohum Sayısı	44	95	78	69	90	105	64	70	18	19
Toplam Tohum Sayısı	48	111	97	75	111	127	74	91	21	23
Çimlenme Yüzdesi (%)	6.4	14,4	19,5	8,0	9,9	17,3	13,5	23,1	14,3	17,4

Soğuk uygulamasını takiben ½ MS ortamı üzerinde kültüre alınan *S. aintabensis* tohumlarında en yüksek çimlenme oranı -20 °C’de 21 gün bekletilen tohumlardan (%23,1) elde edilmiştir (Tablo 4.4).



Şekil 4.5. -40°C’de iki hafta boyunca bekletilen ve ½ MS ortamında kültüre alınan *S. aintabensis* tohumlarında çimlenme görüntüsü

Tohum kabuğunu Sülfürik Asit kullanarak aşındırıp tohum çimlenmesini teşvik etmek için yapılan çalışmada %3 oranında sakkaroz içeren bazal MS (1962) ortamı ile % 1 sakkaroz içeren ½ MS ortamları kullanılmıştır. Bu çalışmada *S. aintabensis* tohumları sırasıyla %10, %30, %40 ve %50'lik Sülfürik Asit içerisinde 5 dk süre ile bekletilmiştir. Değerlendirmeler bir ay sonra yapılmıştır. Tohum çimlenme oranları Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5. Farklı konsantrasyonlarda Sülfürik Asit uygulamasını takiben MS + %3 Sakkaroz ortamında kültüre alınan *S. aintabensis* tohumlarından elde edilen çimlenme oranları

Oranlar	Kontrol	Sülfirik Asit Konsantrasyonları				
		%10	%20	%30	%40	%50
Çimlenen Tohum Sayısı	3	1	0	5	4	10
Çimlenmeyen Tohum Sayısı	52	90	87	102	59	51
Toplam Tohum Sayısı	55	91	87	107	63	61
Çimlenme Oranı (%)	5,45	1,09	0,00	4,67	6,34	16,39

Tablo 4.5'de görüldüğü gibi Sülfürik Asit yüzdesi arttıkça *S. aintabensis*'in çimlenme değerleri de artış meydana gelmiştir. En fazla çimlenme oranı %50 Sülfürik Asit uygulaması yapılan tohumların MS ortamında kültüre alınması ile elde edilmiştir.

Aynı Sülfürik Asit konsantrasyon uygulamasını takiben ½ MS ve %1 oranında Sakkaroz içeren ortamda kültüre alınan *S. aintabensis* tohumlarının çimlenme oranları Tablo 4.6'de verilmiştir.

Tablo 4.6. Farklı konsantrasyonlarda Sülfürik Asit uygulamasını takiben ½ MS + %1 Sakkaroz ortamında kültüre alınan *S. aintabensis* tohumlarından elde edilen çimlenme oranları

Oranlar	Kontrol	Sülfirik Asit Konsantrasyonları				
		%10	%20	%30	%40	%50
Çimlenen Tohum Sayısı	1	4	0	5	26	9
Çimlenmeyen Tohum Sayısı	28	62	65	60	253	49
Toplam Tohum Sayısı	29	66	65	65	278	58
Çimlenme Oranı (%)	3,44	6,06	0,00	7,69	9,35	15,51

Tablo 4.6’da görüldüğü gibi en fazla çimlenme oranı %50 Sülfürik Asit uygulaması yapılan tohumların ½ MS ortamında kültüre alınması ile elde edilmiştir.

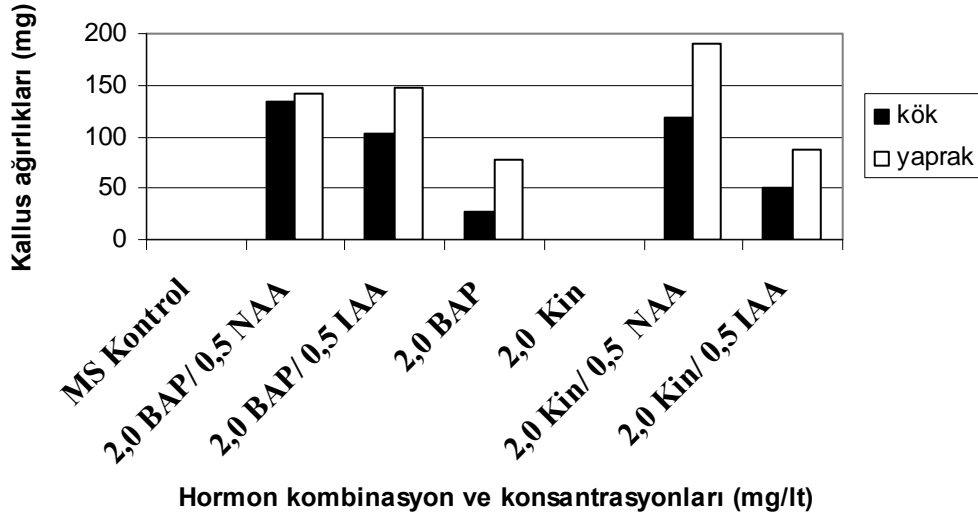


Şekil 4.6. Tohum kabuğunda %50’lik sülfürik asit uygulaması ile meydana gelen çatlamanın binokülerdeki görüntüsü (X20)

Tohum çimlendirme çalışmaları ayrıca %60, %70 ve %80 oranlarında Sülfürik Asit uygulamaları ile denenmiştir. Fakat bu asit yüzdelerinde tohumlar yanmıştır.

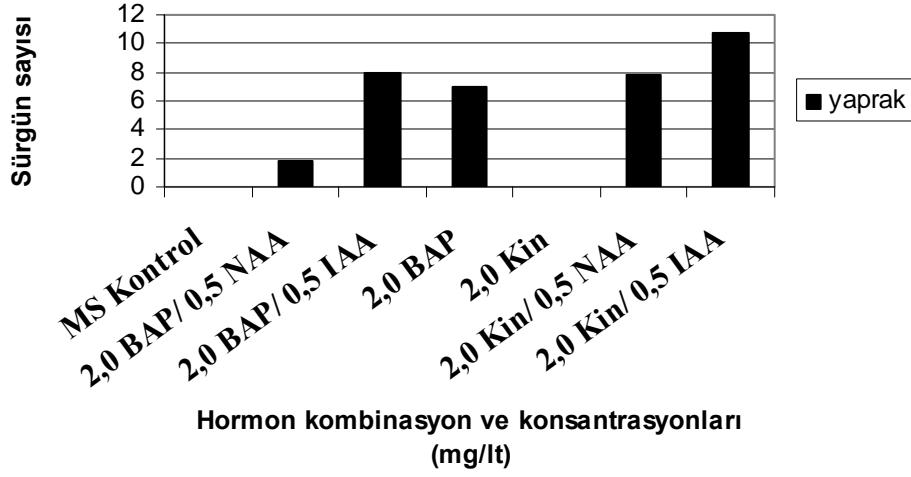
4.1.2.2. *In vitro*'da Tohumdan Çimlendirilen Bitkilerden Somatik Embriyogenez

Somatik embriyogenez amacı ile yapılan çalışmada Oksin ve Sitokin hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren bazal MS (Sigma) (%3 sakkaroz) ortamında yaprak ile kök eksplantları kültüre alındığı ve yaklaşık 4 hafta sonra yapılan değerlendirmelerde elde edilen kallus ağırlıkları Şekil 4.7' de, sürgün sayısı ise Şekil 4.8.'de verilmiştir.



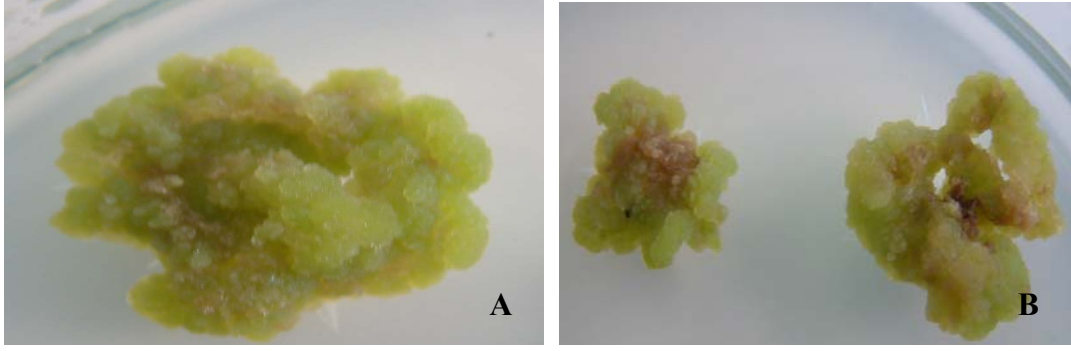
Şekil 4.7. BAP, NAA, IAA ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS+%3 Sakkaroz ortamında kültüre alınan *S. aintabensis* tohumlarında gelişen yaprak ve kök eksplantlarında gelişen kallusların ortalama ağırlık değerleri

Şekil 4.7.' de görüldüğü gibi *S. aintabensis* tohumlarından gelişen kök eksplantlarının kültüre alındığı denemede kallus ağırlığının en fazla olduğu hormon kombinasyonu 134,55 mg ağırlığında kallusun geliştiği 2,0 mg/lt BAP ve 0,5 mg/lt NAA içeren MS ortamında meydana gelmiştir. Yaprak eksplantlarının kültüre alındığı ve en fazla miktarda kallus oluşumunun gözlemlendiği kombinasyon ise 189,45 mg ağırlık değeri ile 2,0 mg/lt Kin ve 0,5 mg/lt NAA içeren MS ortamında saptanmıştır. Bu çalışmada gelişen kalluslar açık kahverengi ve yeşil renkte kırılğan kalluslar olmuştur.

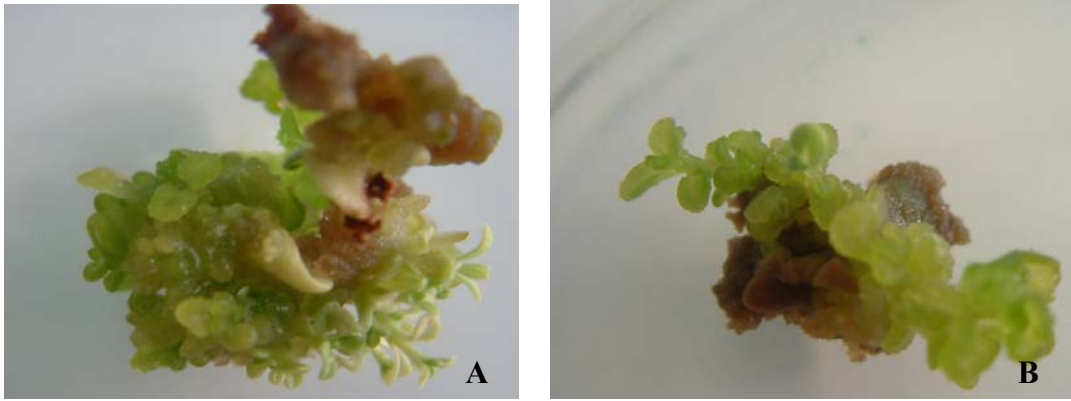


Şekil 4.8. BAP, NAA, IAA ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS+%3 Sakkaroz ortamında kültüre alınan *S. aintabensis* tohumundan gelişen yaprak eksplantlarında sürgün gelişimi

Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi *S. aintabensis* tohumundan gelişen yaprak eksplantlarının kültüre alındığı denemede en fazla sürgün sayısı 2,0 mg/lt Kin ve 0,5 mg/lt IAA hormonlarını içeren MS ortamında elde edilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda sürgün boyları ölçülüp, ortalamaları alınmıştır. Bu kombinasyondaki en uzun sürgün ise 6,3 cm uzunluğundadır. Kök eksplantlarının kültüre alındığı aynı denemede herhangi bir sürgün oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.9 A ve B).



Şekil 4.9. A: 2,0 mg Kin + 0,5 mg/lit NAA hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan ve yaprak eksplantından gelişen kallus görüntüsü B: 2,0 mg Kin + 0,5 mg/lit NAA hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan ve kök eksplantlarından gelişen kallus görüntüsü



Şekil 4.10. *S. aintabensis* tohumlarının *in vitro*'da çimlenen yaprak eksplantlarının farklı oksin ve sitokinin hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmasıyla elde edilen somatik embriyogenez. A: 2,0 mg/lit BAP ve 0,5 mg/lit IAA hormonlarını içeren MS kültür ortamında somatik embriyogenez. B: 2,0 mg/lit Kin ve 0,5 mg/lit IAA hormonlarını içeren MS ortamında somatik embriyogenez

BAP ve Kin hormonlarının IAA ile kombinasyonu yaprak eksplantlarında yüksek oranda somatik embriyo oluşumunu teşvik etmiştir (Şekil 4.10 A ve B).



Şekil 4.11. *S. aintabensis* tohumlarının *in vitro*'da çimlenen yaprak eksplantının 2,0 mg/lt Kin ve 0,5 mg/lt NAA hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmasıyla gelişen kök oluşumu

In vitro'da tohumdan çimlendirilen bitkilerin kök ve yaprak eksplantlarında somatik embriyo yanında kallus gelişimi de meydana gelmiştir. Kallus ağırlık ortalamaları Tablo 4.7.'de verilmiştir.

Tablo 4.7. NAA, BAP, IAA ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS (1962) ortamı üzerinde kültüre alınan *S. aintabensis* kök ve yaprak eksplantlarında meydana gelen kallus gelişim oranları

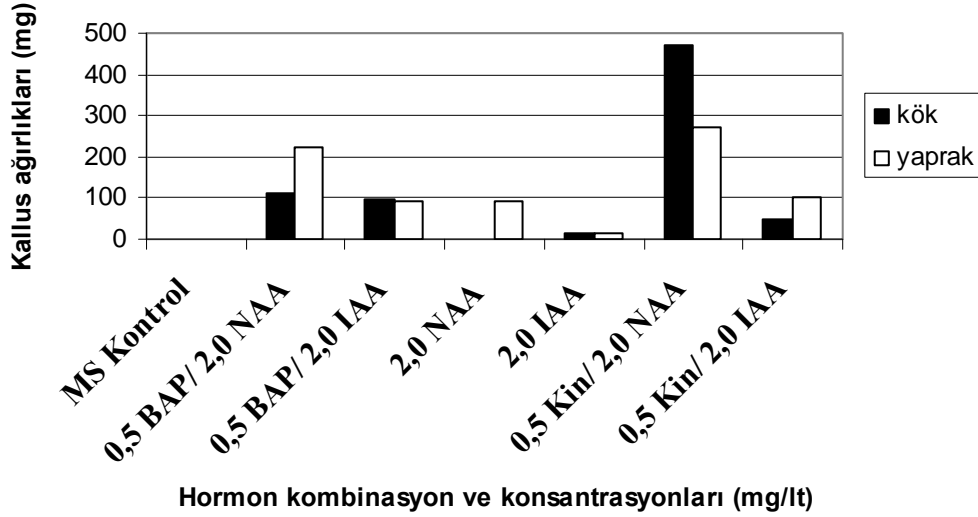
Hormon kombinasyonu (mg/lt)	Eksplant kaynağı	
	Kök*	Yaprak
MS Kontrol	-	-
0,5 NAA/ 2,0 BAP	134,55 a	141,85 abc
0,5 IAA/ 2,0 BAP	102,34 a	147,06 abc
2,0 BAP	27,97 b	77,63 ac
2,0 Kin	-	-
0,5 NAA/ 2,0 Kin	117,51 a	189,45 b
0,5 IAA/ 2,0 Kin	49,70 b	87,78 c

- : Gelişme yok.

*Değerlerin yanındaki farklı harfler, LSD testi uygulanmış değerlerde $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak farklılık belirtir.

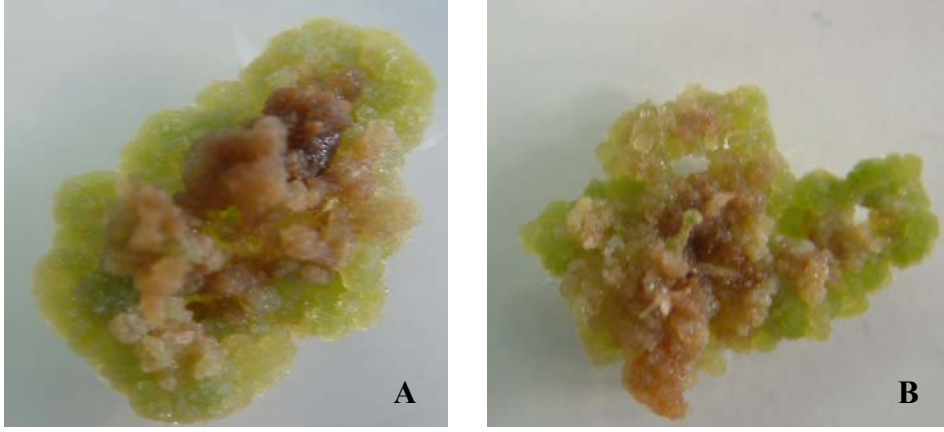
4.1.2.3. *In vitro*'da Tohumdan Çimlenen Bitkilerde Köklendirme Çalışmaları

In vitro'da köklendirme amacıyla yapılan denemede Oksin ve Sitokinin hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren bazal MS (Sigma) ortamında yaprak ve kök eksplantları kültüre alındığı ve yaklaşık 4 hafta sonra yapılan değerlendirmelerde elde edilen kallus ağırlıkları Şekil 4.12' de verilmiştir.



Şekil 4.12. BAP, NAA, IAA ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS+%3 Sakkaroz ortamında kültüre alınan *in vitro*' da *S. aintabensis* tohumundan gelişen yaprak ve kök eksplantlarından gelişen kallusların ortalama ağırlık değerleri

Şekil 4.12.'de gösterildiği gibi; *in vitro*'da tohumdan çimlendirilen kök ve yaprak eksplantları köklendirme amacıyla farklı miktarlarda Oksin ve Sitokinin hormonlarını içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Kök eksplantlarının kültüre alındığı ve en fazla gelişim gösteren kallus ağırlığı 471,10 mg değeri 0,5 mg/lt Kin ve 2,0 mg/lt NAA hormonlarını içeren MS ortamında gözlenmiştir. Ayrıca yaprak eksplantlarının kültüre alınmasıyla elde edilen en fazla miktardaki kallus ağırlığı ise 270,95 mg değeri ile 0,5 mg/lt Kin ve 2,0 mg/lt NAA hormonlarını içeren MS ortamında elde edilmiştir. Bu çalışmada gelişen kalluslar açık kahverengi ve yeşil renkte kırılğan kalluslar olmuştur.



Şekil 4.13. *S. aintabensis* yaprak ve kök eksplantlarında kallus morfolojisi. A: 2,0 mg/lt NAA + 0,5 mg/lt BAP hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan ve yaprak eksplantından gelişen kallus, B: 0,5 mg/lt Kin + 2,0 mg/lt NAA hormonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan ve kök eksplantından gelişen kallus oluşumu

İn vitro’ da elde edilen sürgünlerin köklendirilme çalışmalarında ise elde edilen veriler Tablo 4.8.’de de gösterildiği gibidir.

Tablo 4.8. BAP, NAA, IAA ve Kinetin (Kin) hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS (1962) ortamı üzerinde kültüre alınan *S. aintabensis* kök ve yaprak eksplantlarında meydana gelen kallus gelişim oranları

Hormon kombinasyonu (mg/lt)	Eksplant kaynağı	
	Kök	Yaprak
MS Kontrol	-	-
0,5 BAP/ 2,0 NAA	110,48 a	225,11 a
0,5 BAP/ 2,0 IAA	96,86 a	90,39 b
2,0 NAA	-	90,08 b
2,0 IAA	14,80 a	12,67 b
0,5 Kin/ 2,0 NAA	471,10 b	270,95 a
0,5 Kin/ 2,0 IAA	47,47 a	100,00 b

- : Gelişme yok. Değerlerin yanındaki farklı harfler $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak farklılık belirtir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki doku kültürü teknikleri ve uygulama alanları, bitki biyoteknolojisi kapsamında pek çok çalışmaya olanak sağlamaktadır. *In vitro* doku kültürü teknikleri kullanılarak bir çok otsu ve odunsu bitki kültüre alınmakta, ticari amaçlı çalışmalar yanında bitki ıslahına yönelik araştırmalar yürütülebilmektedir.

Bu tez kapsamında, ülkemizin lokal endemik bitkisi *Satureja aintabensis* P.H. Davis bitkisinin *in vitro*'da gelişim olanakları araştırılmıştır. Somatik embriyo oluşumunu teşvik etmek amacıyla doğadan alınan bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda, gövde ve yaprak eksplantlarında herhangi bir gelişme olmamıştır. Kültüre alınan sürgün uçlarında ise kallus ve bitki rejenerasyonu saptanmıştır. Doğadan alınan bitkiler ile yapılan somatik embriyogenez çalışmalarında kallus gelişimi ve organogenez sağlanmıştır.

Bu çalışmada, *S. aintabensis* bitkisinin sürgün ucu eksplantlarının kültüre alındığı denemede en yüksek kallus oluşumu (401,14 mg), 2,0 mg/lt BAP içeren MS ortamında meydana gelmiştir (Şekil 4.1). Hızlı büyüyen kırılğan kalluslar, hücre süspansiyon kültürlerinin kurulmasında kullanılabilir.

1,0 mg/lt BAP + 0,5 mg/lt NAA içeren MS ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarında organogenez saptanmıştır (Şekil 4.2A). Bununla birlikte 2,0 BAP içeren MS ortamında sürgün ucu eksplantlarında gelişen kallusların hızlı büyüyen, sarı-açık yeşil renkte, sert yapıda oldukları saptanmıştır (Şekil 4.2B). MS ortamına düşük oranda NAA ve yüksek oranda BAP hormonlarının ilavesi, *S. aintabensis*'in Nisan-Mayıs aylarında doğadan alınan sürgün ucu eksplantlarında kallus oluşumunu teşvik etmiştir.

Goleniowski vd. (2003), tarafından Arjantin’de yetiştiriciliği yapılan *O. vulgare x Applii* bitkisinin meristem kültürü ile mikroçoğaltımı üzerinde yapılan çalışmalarda MS ortamına Benzyladenine (BA) ve NAA hormonları farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda kullanılmıştır. Bu çalışmada en iyi mikroçoğaltımın 0,28 µM BAP ve 0,53 µM NAA kombinasyonunda gerçekleştiği rapor edilmiştir. Benzer bir diğer çalışma ise Morone-Fortunato ve Avato (2008) tarafından *O. vulgare* L. ssp. *hirtum* bitkisinde rapor edilmiştir. Bu çalışmada koltuk altı sürgünleri, farklı konsantrasyonlarda BAP içeren modifiye MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. En fazla sayıda sürgün oluşumu 1,0 mg/lt BAP içeren ortamda meydana gelmiştir. Tarafımızca gerçekleştirilen çalışmalarda ise BAP ve NAA hormonları sürgün ucu eksplantlarında organogenez oluşumunu teşvik etmiştir. Fakat yaprak ve gövde eksplantlarında ise yukarıda da belirtildiği gibi kallus meydana gelmiştir (Şekil 4.2B).

Doğadan alınan sürgün ucu, yaprak ve gövde eksplantlarının 2,4 D ve Kinetin hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde kültüre alındığı denemelerde ise sürgün ucu eksplantlarında herhangi bir gelişme kaydedilmemiştir. Bununla birlikte gövde ve yaprak eksplantlarında kallus oluşumu saptanmıştır. Gövde eksplantlarının kullanıldığı denemelerde kallus ağırlığının en fazla olduğu hormon kombinasyonu 460,52 mg ağırlığında kallusun geliştiği 0,5 mg/lt 2,4-D ve 1,0 mg/lt Kin içeren MS ortamında meydana gelmiştir (Şekil 4.3). Yaprak eksplantlarının kültüre alındığı ve en fazla miktarda kallus oluşumunun gözlemlendiği kombinasyon ise 286,23 mg ağırlık değeri ile 0,5 mg/lt 2,4-D ve 2,0 mg/lt Kin içeren MS ortamında saptanmıştır (Şekil 4.3). Bu çalışmada gelişen kalluslar açık kahverengi ve yeşil renkte kırılğan kalluslar olmuştur (Şekil 4.4).

S. aintabensis tohumlarında çimlenme oranı oldukça düşüktür (Özkeçeci vd, 2008). Bu tez kapsamında, tohumların *in vitro*’da çimlenme etkinliğini araştırmak amacı ile, tohumlar 7, 14 ve 21 gün süre ile -20°C, -40°C ve -80°C’deki derin dondurucularda bekletilmiş, sonra MS ve ½ MS ortamları üzerinde kültüre alınmıştır. MS ortamı üzerinde kültüre alınan tohumlarda en yüksek çimlenme oranı (%15,4), -80 °C’de 21 gün süre ile bekletilen tohumlarda meydana gelmiştir (Tablo 4.3). ½ MS ortamı üzerinde kültüre alınan *S. aintabensis* tohumlarında en yüksek çimlenme oranı %23,1 değeri ile -20 °C’de 21 gün bekletilen tohumlarda meydana gelmiştir (Tablo 4.4). Bu

sonuçlara göre ½ MS ortamında, bazal MS ortamına göre daha fazla çimlenme oranı belirlenmiştir.

Tohum kabuğunu Sülfürik Asit kullanarak aşındırıp tohum çimlenmesini teşvik etmek için yapılan çalışmalar ile tohumda çimlenme oranı artırılmıştır (Tablo 4.5). Sülfürik Asit yüzdesi arttıkça *S. aintabensis*'in çimlenme değerlerinde artış meydana gelmiştir. En fazla çimlenme oranı %16,39 çimlenme yüzdesi ile %50 Sülfürik Asit uygulaması yapılan tohumların MS ortamında kültüre alınması ile meydana gelmiştir.

Sülfürik Asit uygulanmış *S. aintabensis* tohumlarının ½ MS+%1 oranında Sakkaroz içeren MS ortamında kültüre alındığı çalışmalarda en fazla çimlenme oranı %15,51 değeri ile %50 Sülfürik Asit uygulaması yapılan tohumlarda meydana gelmiştir (Tablo 4.6). Göktürk vd. (1991) tarafından *Pailurus spina-christii* Miller (Karaçalı) tohumlarında rapor edilen çimlenme çalışmalarında, 20, 40 ve 60 gün soğuk katlama ile 40, 80 ve 120 dk. konsantre (%98) Sülfürik Asitte bekletme işlemleri uygulanmıştır. En iyi çimlenme yüzdesinin 40-80 dk. süre ile Sülfürik Asitte bekletme işlemi takiben sera koşullarında geliştirilen bitkilerde meydana geldiği rapor edilmiştir. Dormansiye kırmak amaçlı yapılan bir başka çalışma ise Taştan vd. (1991) tarafından *Galium tricorntum* Dandy (Yapışkan otu) tohumlarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada konsantre Sülfürik Asit uygulamasını takiben 250 ppm GA₃ etkisine maruz bırakılan tohumlarda %63 çimlenme oranı tespit edilmiştir. *S. aintabensis* tohumlarında çimlenme oranlarının artırılması üzerindeki çalışmaların devam etmesi gereklidir.

Bu tez kapsamında *in vitro*'da gelişen bitki eksplantlarından somatik embriyo ve kök gelişimini teşvik etmek amacı ile yapılan çalışmalarda, kök ve yaprak eksplantlarında kallus gelişimi saptanmıştır (Şekil 4.7). En yüksek kallus oluşumu, 134,55 mg değeri ile 2,0 mg/lt BAP ve 0,5 mg/lt NAA içeren MS ortamında meydana gelmiştir (Şekil 4.7). Yaprak eksplantlarında en fazla miktarda kallus oluşumu ise 189,45 mg değeri ile 2,0 mg/lt Kin ve 0,5 mg/lt NAA içeren MS ortamında saptanmıştır. Bu çalışmada gelişen kalluslar açık kahverengi ve yeşil renkte kırılğan kalluslar olmuştur (Şekil 4.9 A ve B).

S. aintabensis tohumlarının *in vitro*'da çimlendirilen tohumlarından gelişen bitkilerin yaprak eksplantlarının kültüre alındığı denemede en fazla sürgün sayısı 2,0 mg/lt Kin ve 0,5 mg/lt IAA hormonlarını içeren MS ortamında meydana gelmiştir (Şekil 4.8). Bu kombinasyondaki en uzun sürgün ise 6,3 cm olmuştur. Kök eksplantlarının kültüre alındığı aynı denemede herhangi bir sürgün oluşumuna rastlanmamıştır. Ayrıca *in vitro*'da çimlenen yaprak eksplantlarının kültüre alındığı denemede, BAP ve Kin hormonlarının IAA ile kombinasyonunun yaprak eksplantlarında yüksek oranda somatik embriyo oluşumunu sağladığı saptanmıştır (Şekil 4.10 A ve B). Denemede kök gelişimi yalnızca 2,0 mg/lt Kin ve 0,5 mg/lt NAA hormonlarını içeren bazal MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantından elde edilmiştir. (Şekil 4.11). Bouhouche vd. (2007) tarafından Lamiaceae familyasına ait değerli tıbbi bir bitki olan *Teucrium stocksianum* Boiss. Bitkisinde organogenez amaçlı yapılan çalışmada, bitki sürgünleri farklı konsantrasyonlardaki Kin ve IAA hormonlarını içeren MS bazal ortamında kültüre alınmışlardır. Optimal oluşum 3,0 mg/lt Kin ve 0,5 mg/lt NAA hormonlarını içeren hormon kombinasyonunda elde edilmiştir.

Sanchez-Gras ve Segura (1987) tarafından *Sideritis angustifolia* Lag. bitkisinde somatik embriyogenez çalışması rapor edilmiştir. Bu çalışmada, steril ortamda tohum çimlenmesini takiben gelişen bitkilerin hipokotil, kök ve kotiledon eksplantları, 2,4-D, NAA, IAA, BA ve Kinetin hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. En iyi sürgün oluşumu, hipokotil ve kök eksplantlarında, BA ve Kinetin hormonlarının IAA veya NAA ile kombinasyonunu içeren ortamlarda meydana gelmiştir. Tarafımızca gerçekleştirilen çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda *S. aintabensis* bitkisinin *in vitro*'da çoğaltılmasında, tohumdan çimlendirilen bitkilerin yaprak eksplantlarının uygun bir materyal olduğu belirtilebilir.

Bu tez kapsamında, *S. aintabensis* bitkisinde kök gelişimini teşvik etmek amacı ile araştırmalar yapılmıştır. *In vitro*'da tohumdan çimlenen bitki eksplantları kullanılarak yapılan köklendirme çalışmalarında, kök ve yaprakta kallus gelişimi saptanmıştır. En yüksek kallus oluşumu, 0,5 mg/lt Kin ve 2,0 mg/lt NAA hormonlarını içeren MS ortamında gözlenmiştir. Yaprak eksplantlarının kültüre alınmasıyla elde edilen en fazla miktardaki kallus ağırlığı ise 0,5 mg/lt Kin ve 2,0

mg/lt NAA hormonlarını içeren MS ortamında meydana gelmiştir (Şekil 4.12). Bu çalışmada gelişen kalluslar açık kahverengi ve yeşil renkte kırılğan kalluslar olmuştur (Şekil 4.13).

Ülkemizde 15 türü bulunan ve bu türlerin 5 tanesinin endemik olduğu *Satureja* türleri gerek aromatik özellikleri gerekse tıbbi bitki olmaları ve ihraç ürünü olmaları sebebiyle önemli bitki türleridir ve bu bitkilerin genetik kaynaklarının korunması gerekmektedir.

Ülkemiz *Satureja* cinsine (*Labiatae* familyasına bağlı) ait bazı türlerin sistematik problemler içerdikleri vurgulanmıştır (Aydın vd., 2008). Türlerle ait bu sistematik problemlerin çözümlenmesiyle türlerin soy ağaçları ve akrabalık dereceleri belirlenebilir, endemik olan türlerin gen kaynakları koruma altına alınabilir. Bu amaçlarla sıklıkla kullanılan RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) tekniği, türler arasındaki genetik varyasyonların belirlenmesinde etkili bir tekniktir (Aydın, 2004).

Bu tez kapsamında ayrıca *S. aintabensis* bitkisinin genetik karakterizasyon çalışmaları da yapılmıştır (Özkeçeci S.C., yayınlanmamış veri). Bu amaçla Gaziantep-Dülükbaba'dan toplanan *S. aintabensis* bitkilerinin genomik DNA varyasyonları, RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir. Denemelerde 15 adet RAPD primeri (OPA-01, OPA-02, OPA-05, OPA-10, OPB-15, OPB-16, OPD-17, OPD-18, OPD-20, OPF-16, OPF-18, OPF-20, OPR-13, OPR-16, OPR-17) kullanılmıştır. Fakat bu primerler ile skorlanabilir nitelikte bant oluşumu saptanamamıştır. Ülkemiz *S. aintabensis* popülasyonunun diğer *Satureja* türleri ile karşılaştırmalı moleküler filogenetik analizlerinin yapılması gereklidir. Nitekim literatürde *S. aintabensis* bitkisinin genomik varyasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Aydın vd., (2008) tarafından *Satureja* türleri üzerinde genetik karakterizasyon çalışması rapor edilmiştir. Bu çalışmada, farklı bölgelerden toplanan *S. wiedemanniana*, *S. cuneifolia*, *S. pilosa*, *S. icarica*, *Satureja* sp.1 (Bursa-Mezitler), *Satureja* sp.2 (Balıkesir-Zeytinli), *Satureja* sp.3 (Çanakkale-Küçükkuyu) türlerinde RAPD-PZR uygulaması yapılmıştır. Çalışmada farklı DNA izolasyon yöntemleri

denenmiş ve *Satureja* türleri için protokol rapor edilmiştir. Farklı izolasyon yöntemleri ile elde edilen genomik DNA örneklerinin görüntüleri karşılaştırılmıştır ve sadece modifiye yöntem ile elde edilen DNA'lar PZR'da çoğaltılabilemişlerdir. Bu çalışmada, *Satureja* türlerinin DNA izolasyonunda, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, daha az kimyasal gerektiren ve kolay uygulanabilen bir genomik DNA yöntemi belirlenmiştir. Belirlenen bu yöntemin, sekonder metabolitler ve uçucu yağ içerikleri bakımından zengin olan diğer *Labiata* türlerinin DNA izolasyonlarında da kullanılabilceği bildirilmiştir.

Diğer bir *Satureja* türü olan *S. hortensis* bitkisinde yapılan genomik çalışmaya örnek olarak ise Hadian ve ark (2008) tarafından gerçekleştirilen çalışma örnek verilebilir. 28 adet *S. hortensis* ekotipinde gerçekleştirilen bu çalışmada RAPD primerleri kullanılmıştır. 18 adet, 10 merlik RAPD primerleri kullanılarak gerçekleştirilen genetik analizler sonucunda, 12 primer polimorfik olarak saptanmış, ve çoğaltılan 218 bantın 181 adedi ekotipler arasında farklılık belirlemiştir. Araştırmacılar çalışmada kullanılan 28 *S. hortensis* ekotipini 3 grup oluşturacak şekilde karakterize etmişlerdir.

Literatürlerde bulunan bu eksikliği gidermek amacıyla, *S. aintabensis* bitkisinin genomik varyasyon çalışmaları için farklı RAPD primerler denenebilir ve AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) gibi yüksek oranda polimorfizm veren teknikler kullanılabilir. Bu sayede nesli tehlike altında olan bu endemik bitkinin genetik karakterizasyonları belirlenerek, bitkinin gen kaynakları bilinçli bir şekilde koruma altına alınabilir.

Bu tez çalışması kapsamında, nesli tehlike altında olan endemik *S. aintabensis* (Antep kayaykekiği) bitkisinin *in vitro* doku kültürü teknikleri kullanılarak çoğaltımı amaçlanmıştır. *S. aintabensis* bitkisinin laboratuvar koşullarında çoğaltımı ile nesli tükenmekte olan bu endemik bitki türünün yok olması önlenemez. Endemik olan bitkinin koruma altına alınması ve gelişi güzel toplanmasının önlenmesinde ciddi yaptırımlar uygulanmalıdır.

Antep kayakekiğinin *in vitro* doku kültürü teknikleri ile çoğaltımı üzerine uluslar arası literatürde herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Dolayısı ile, konuda ilk verilerin elde edildiği bu tez çalışması ile sağlanan sonuçlara ek olarak, farklı ortam ve hormon kombinasyonları test edilebilir. Bitkinin *in vitro*'da etkin kök oluşumu sağlanabilir ve aklimatizasyon çalışmaları yapılabilir.

S. aintabensis gibi endemik bitkilerin uzun süreli korunma ve saklanması için kryoprezervasyon ve sentetik tohum kullanımı tekniklerinin ülkemizde uygulanması gereklidir.

KAYNAKLAR

- Aydın, ÖZ., "Genetik Mühendisliği, Azgelişmiş Ülkelerde Yoksulluk ve Gıda Sorunu", Toplum ve Bilim Dergisi, Yaz 2000:108.
- Aydın, ÖZ (2004). "RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği", Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, sayı:6.
- Andarwulan N, Shetty K. (1999) Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Agrobacterium*-transformed roots of anise [*Pimpinella anisum* L.]. *Journey of Agriculture and Food Chemistry*. **47**, 1776–80.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., (2001). Doku Kültürü: Temel Laboratuar Teknikleri. M. Babaoğlu., M. Yorgancılar., M.A. Akbudak (Eds.), *Bitki Biyoteknolojisi-1-Doku kültürü ve uygulamaları* içinde (s.1-22). Konya: Selçuk Üniv. Vakfi Yayınları.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., (2001). Somatik Embriyogenesis. S. Özcan., M. Babaoğlu., C. Sancak (Eds.), *Bitki Biyoteknolojisi-1-Doku kültürü ve uygulamaları* içinde (s.70-71). Konya: Selçuk Üniv. Vakfi Yayınları.
- Başer, K. H. C. (1994). Essential oils of Labiatae from Turkey: Recent results. *Lamiales Newsletter*, **3**, 6-11.
- Başer, K.H.C (1995). *Essential oils from aromatic plants which are used as herbal tea in Turkey*. Proceedings of the 13 th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils, İstanbul, Turkey, 15-19 October s. 67-79.

- Başer, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Satıl, F., Demirci, F., Azaz, A.D (2002). *Bazı Satureja Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri*. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı'nda Sunulan Bildiri, 29-31 Mayıs, Eskişehir, s. 349-354.
- Baydar H., Sağdıç O., Özkan G., Karadoğan T. (2004) Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey, *Food Control*, **15**, 169–172.
- Bornman, C.H. (1994). Micropropagation and somatic embriyogenesis. In: Hayward, M.D., Bosmark, N.O. and Romagaso I. (Eds) , *Plant Breeding : principles and Prospects*, pp.246-260, Chapman & Hall, London.
- Boyraz N., Özcan M. (2005) Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey, *International Journal of Food Microbiology*, **107** , 238 – 242.
- Bouhouche N., Ksiksi T. (2007). An efficient *in vitro* plant generation system for the medical plant *Teucrium stocksianum* Boiss. *Plant Biotechnol Rep.*, **1**, 179-184
- Briggs, S.P., Koziel, M (1998). Engineering new plant strains for commercial markets, *Current Opinion Biotech.*, **9**, 233-235.
- Bright., S. (1998). Plant Biotechnology, *Current Opinion Bio.*, **1**, 159-160.
- Bronsema FBF, Van Oostveen WJF, Van Lammeren Aam (1997). Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize of the inbred lines A188 and A632. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **50**, 47-65.

- Cavar S., Maksimovic M., Solic M.E., Jerkovic-Mujkic A., Besta R. (2008) Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two Satureja essential oils, *Food Chemistry*, **111**, 648–653.
- Chun S-S, Vatter D.A., Lin Y-T, Shetty K. (2005) Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*, *Process Biochemistry*, **40**, 809–816.
- De Jong, A.J., Schimidt, E.D.L., De Vries, S.C. (1993). Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Molecular Biol.*, **22**, 367-377.
- Emeklier Y, Özcan S, Avcı-Birsin M, Mirici S, Uranbey S (1999). Mısırdaki *in vitro* somatik embriyogenesis üzerinde araştırmalar. A.Ü. Araştırma Fonu Projesi (No: 97110901), Ankara.
- Endress HR (1994) Basic techniques. In: *Plant Cell Biotechnologies*, pp. 59-81, Jones and Barlett Publishers, London, UK.
- Finer, J.J. (1995). Direct somatic embryogenesis. In : Gamborg, O.L., Philips, G.C. (Eds.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundemantal Methods*, pp. 92-102, Springer, Berlin.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirement of suspension culture of soybean root cells. *Experimental Cell Res.*, **50**, 151-158.
- Gelvin, S.B, (1998) The introduction and expression of transgenes in plants., *Current Opinion Biotech*, **9**, 227-238.
- Goleniowski M.E., Flamarique C., Bima P. (2003) Micropropagation of oregano (*Origanum vulgare x Applii*) from meristem tips, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, **39**, 125–128.
- Göktürk, A., Yahyaoğlu, A., Ölmez, Z., Temel, F (2006). Soğuk Katlama ve H₂SO₄ Önişlemlerinin Karaçalı (*Paiurus spina- christii* Miller) Tohumlarının

Çimlenmesi Üzerine Etkileri., *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, **2**, 58-66.

- Haberlandt, G. (1902). Hulturversuche mit isolierten pflanzencellen, *Sitzungsb. Akad. Wiss. Wien. Math-Natur.Kl.*, **111**, 69-92.
- Hadian J., Tabatabaei S.M.F., Naghavi M.R., Jamzad Z., Ramak-Masoumi T. (2008) Genetic diversity of Iranian accessions of *Satureja hortensis* L. based on horticultural traits and RAPD markers, *Scientia Horticulturae.*, **115**, 196–202.
- Hartweck LM, Lazzeri PA, Cui D, Collins GB, Williams EG (1998). Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. *In vitro Cell.Dev.Biol.*, **35**, 205-218.
- Kan Y., Uçan U S., Kartal M., Altun L., Aslan S., Sayar E., Ceyhan T. (2006) GC-MS Analysis and Antibacterial Activity of Cultivated *Satureja cuneifolia* Ten. Essential Oil, *Turkish Journal of Chem.*, **30**, 253 – 259.
- Kung S-D (1993) Introduction: From green revolution to gene revolution. Transgenic Plants Vol. 2. Present Status and Social and Economic Impacts, pp. 146-177, Academic Press.
- Kürkçuoğlu M., Tümen M., Başer KHC. (2001) Essential oil constituents of *Satureja boissieri* from Turkey, *Chemistry of Natural Compounds*, **37- 4**, 329-331.
- Lai FM, McKersie BD (1994) Scale-up somatic embryogenesis in alfaalfa (*Medicago sativa* L.) I subculture and indirect secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, **37**, 151-158.
- Lermontova, I., Grimm, B. (2000). Overexpression of plastidic protoporphyrinogen IX oxidase leads to resistance to the diphenyl-ether herbicide acifluorfen , *Plant Physicol*, **112**, 75-83.

- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **18**, 100-127.
- Maes OC, Chibbar RN, Caswell K, Leung N, Kartha KK (1996). Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors. *Plant Sci.*, **121**, 75-84.
- Mifflin, B.J, (2000) Crop biotechnology, Where now?, *Plant Physiol*, **123**, 17-28.
- Monnier M (1990) Induction of embryogenesis in callus culture. In: Pollard JW, Walker JM (Eds), *Plant Cell and Tissue Culture*, pp. 141-148, Humana Press, New Jersey.
- Morone-Fortunato I., Avato P. (2008) Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart, *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **93**, 139–149.
- Murai N, Sutton DW, Murray MG, Slightom JL, Merlo DJ, Reichert NA, Sengupta-Gopalan C, Stock CA, Barker RF, Kemp JD, Hall TC (1983). *Phaseolin gene from bean is expressed after transfer- to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors*. *Science* **22**, 476-482
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Nitsch JP, Nitsch C (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science*, **163**, 85-87.
- Oke F., Aslim B., Ozturk S., Altundag S. (2009) Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry.*, **112**, 874–879.

- Ozawa K, Komamine A (1989) Establishment of a system of high-frequency embriyogenesis from long-term cell suspensions cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genet.*, **77**, 205-211.
- Özcan S, Barghchi M, Firek S, Draper J (1993) Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embriyogenesis in pea. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **34**, 271-277.
- Özkeçeci, S.C., Can, C., Kırac, B., Bilecen, S., 2008. *Antep Kayakekiği (Satureja aintabensis P.H. DAVIS) Bitkisinin in vitro koşullarında gelişimi üzerine araştırmalar*. VIII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 20-23 Ekim, Girne, s .56.
- Özkeçeci, S.C. "S. aintabensis P.H. Davis'in DOKU KÜLTÜRÜ İLE ÇOĞALTIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI", Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniv. Fen Bilimleri Enst. Gaziantep 2010 (yayınlanmamış veri), s.40.
- Parrott WA., Merkle SA., Williams EG (1993) Somatic embriyogenesis: Potantial for use in propagation and gene transfer systems. In: Murray DR (ed), *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, pp.158-200, C.A.B International, UK.
- Pierik RLM. (1993) Micropropagation: Technology and oppurtunities. In: Prakash J, Pierik RLM (eds), *Plant Biotechnology. Commercial Prospects and Problems*. P. 9, Intercept Ltd. UK.
- Pierik RLM. (1997). *In vitro Culture of Higher Plants*. Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- Sağiroğlu, A.K. (1999). Genetik Mühendisliği, *Bilim ve Teknik*, **5**, 34-41.
- Sanchez-Gras, M.C. and Segura, J., 1987. In vitropropagation of *Sideritis angustifolia*. *J. Plant Physiol.*, **130**, 93-99.

- Sarah Strycharz S., Shetty K. (2002) Response of oregano (*Origanum vulgare* L.) clonal lines to *Pseudomonas* sp. Z strain and polydye R-478 and implications for hyperhydricity prevention in tissue culture, *Process Biochemistry*, **38**, 343-350.
- Schenk RU, Hilderbrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, **50**, 199-204.
- Schulz H., Ozkan G., Baranska M., Kru H., Ozcan M. (2005) Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, **39**, 249–256.
- Shetty K, Curtis OF, Levin RE, Witkowsky R, Ang W. (1995) Prevention of vitrification associated with in vitro shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *Journal of Plant Physiol.*, **147**, 447–51.
- Shetty K, Carpenter TL, Kwok D, Curtis OF, Potter TL. (1996) Selection of high phenolic containing clones of thyme (*Thymus vulgaris* L.) using *Pseudomonas* sp. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, **44**, 3408-11.
- Shetty K. (1997) Biotechnology to Harness the benefits of dietary phenolics: focus on Lamiaceae. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutr.*, **6**, 162–71.
- Smith R. (1992). *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*. pp. 1-27, Academic Press Inc., UK.
- Smith, J.E. (1996). *Biotechnology*, Cambridge University Press.
- Smith, R. (1992). *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*. pp. 1-27, Academic Press Inc., UK.

- Stewart, Jr., C.N., Adang, M., J., All, J.N., Boerma, H.R., Cardineau, G., Tucker, D., Parrott, W.A. (1996) .Genetic transformation, recovery, and chacterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAc gene, *Plant Physiol.*, **112**, 121-129.
- Strycharz, S. and Shetty, K. (2002). Response of oregano (*Origanum vulgare*) clonal lines to *Pseudomonas* sp. Z strain and polydye R-478 and implications for hyperhydricity prevention in tissue culture. *Process Biochemistry*, **38**, 343-350.
- Şahin F., I. M Karaman, Güllüce M., Ögütçü H., Sengul M., Adıgüzel A., Öztürk S., Kotan R. (2003) Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *Journal of Ethnopharmacology.*, **87**, 61–65.
- Taştan, B., Erciş, A., Yıldırım A (1991). “Yapışkan otu (*Galium Tricornutum* Dandy)’ nun Biyolojik ve Çıkış Özellikleri Üzerinde Araştırmalar” *Bitki Koruma Bülteni* **33**, 1-2.
- Thorpe, T.A., Harry, L.S., Kumar, P.P. (1991). Application of micropropagation to forestry. In: Micropragation, technology and application. Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (Eds.). *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, pp.311-336.
- Tümen, G., Satıl, F., Dirmenci, T., Öztekin, M. (2002). “Ticareti Yapılan *Satureja* L. Türlerinin Doğadaki Durumu” *TBAG/Ç.Sek. 1001T011*, yayınlanmamış proje notları.
- Watson, D.J., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M. (1992). *Recombinat DNA*, 2nd ed., Scientific American Books.
- Welsh, J., McClelland, M (1990). "Fingerprinting Genomes Using PCR With Arbitrary Primers", *Nucleic Acids Research*, Vol **18**, 7213-7218.

White PR (1943) Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. *Growth*, **7**, 53-65.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V (1990). "DNA Polimorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers", *Nucleic Acids Research*, Vol **18**, 6531-6535

[http://\(www.stgm.gov.tr\)](http://www.stgm.gov.tr)

EKLER

EK 1. Murashige ve Skoog-MS (1962) ortam içeriği (Babaoğlu vd., 2001)

KİMYASALLAR	mg/ lt
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ .H ₂ O	22.3
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
Nikotinic asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5
Thiamin-HCl	0,1
<i>myo</i> -inositol	100
Glisin	2,0
Sakkaroz	30 000

EK 2. 10x TBE Stok Solüsyonunun Hazırlanması
(1 M Tris, 1 M Boric acid, 20 mM EDTA, pH=8.3)

KİMYASALLAR	g/lt
Tris	121,1
Boric acid	61,8
EDTA	7,44

DNA analizi için hazırlanan TBE solüsyonunda bu miktarlar 1 lt' ye dH₂O ile tamamlanır.

Solüsyon pH'sı 8.3' e ayarlanıp, otoklavlanır.

