

***GLOBULARIA TRICHOSANTHA* SSP. *TRICHOSANTHA* BİTKİSİNDEN ÜRETİLEN
KALLUSLARIN İNCE YAPISI**

Havva ATAR

**Bülent Ecevit Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**


ZONGULDAK

Ocak 2015

KABUL:

Havva ATAR tarafından hazırlanan "*GLOBULARIA TRICHOSANTHA* SSP. *TRICHOSANTHA* BİTKİSİNDEN ÜRETİLEN KALLUSLARIN İNCE YAPISI" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir.
30/01/2015

Başkan : Doç. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN
Bülent Ecevit Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Filiz VARDAR
Marmara Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Muhammet ÖREN
Bülent Ecevit Üniversitesi



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. .../.../2015



Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”


Havva ATAR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***GLOBULARIA TRICHOSANTHA* SSP. *TRICHOSANTHA* BİTKİSİNDEN ÜRETİLEN KALLUSLARIN İNCE YAPISI**

Havva ATAR

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN

Ocak 2015, 53 sayfa

Globularia cinsi Türkiye’de 10 takson ile temsil edilmektedir. *Globularia trichosantha* ssp. *trichosantha* hemoroit tedavisinde kullanılan tıbbi bir bitkidir. Ayrıca kan glukoz seviyesini düşürdüğü, histamin salgılanmasını azalttığı, idrar arttırıcı, mideyi ve kuvvet verici, başağrısını engelleyen ve terletici ajan olarak kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmada, bitki doku kültürü metoduyla *G. trichosantha* ssp. *trichosantha* bitkisinin tohumları çimlendirildikten sonra, aseptik fidelerinden alınan eksplantlar ile kallus üretimi gerçekleştirildi. Üretilen kallusların elektron mikroskobu preperasyonu yapılarak kallus hücrelerinin ince yapısı incelendi. *G. trichosantha* ssp. *trichosantha* tohumları steril edilerek bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen Murashige ve Skoog (MS) ortamında çimlendirildi. 30 günlük aseptik fidelerden hipokotil, kotiledon, ilk yaprak, epikotil, apikal meristem ve kök eksplantları alındı. Eksplantlar kallus üretimi için farklı konsantrasyonlarda 6-benzilaminopürin, indol asetik asit ve 2,4 dikloro fenoksi asetik asit içeren MS ortamına aktarıldı. En iyi kallus üretimi IAA+BAP içeren MS ortamında görülürken en iyi kallus üreten kök eksplantları oldu. İki Tip kallus gelişimi belirlendi. Üretilen sarı renkli kalluslar (Tip 1),

ÖZET (devam ediyor)

renk ve görünüm bakımından siyahlaşma görülen gelişim özelliklerini kaybetmeyen siyah kalluslar (Tip 2) geçirimli elektron mikroskobunda (TEM) incelendi. Tip 1 kalluslarda hücreler dairesel ve büyüktür. Kallus hücrelerinde genellikle bir tane nükleus ve nükleolus vardır. Aynı zamanda hücrelerde çok büyük bir vakuol, granüllü endoplazmik retikulum, golgi aygıtı, mitokondri, ribozomlar, plastidler gibi organeller vardır. Tip 2 kalluslarda dairesel hücreler ve şekil bozukluğu gösteren hücreler belirlendi. Tip 1 kalluslardan farklı olarak daha küçük vakuol ve daha çok sayıda mitokondri gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: *Globularia trichosantha* ssp. *trichosantha*, bitki doku kültürü, kallus üretimi, ince yapı.

Bilim Kodu: 401.03.00

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

ULTRASTRUCTURE OF PRODUCED CALLI FROM *GLOBULARIA TRICHOSANTHA* SSP. *TRICHOSANTHA*

Havva ATAR

**Bülent Ecevit University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Hatice ÇÖLGEÇEN

January 2015, 53 pages

Globularia genus is represented with 10 taxon in vegetation of Turkey. *Globularia trichosantha* ssp. *trichosantha* is a medical plant used in treatment hemorrhoid. It also decreases blood glucose level, reduces secretion of histamine, increases urine, has stomachic and supporting properties, prevents headache and is used as diaphoretic agent. In this study, callus production was realized with explants of aseptic seedlings that after *G. trichosantha* ssp. *trichosantha* seeds germinating, callus production by plant tissue culture method. Ultrastructure of produced calli was examined in ultra thin sections with electron microscope preparation. Seeds of *G. trichosantha* ssp. *trichosantha* were sterilized and germinated in plant growth regulators free Murashige and Skoog (MS) medium. Hypocotyls, epicotyls, cotyledon, young primer leaves, apical meristem and roots were taken from 30 day aseptic seedlings. These explants were transferred to MS medium for callus production which include different concentration of 6-benzilamynopurine, indole acetic acid and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid. The best callus production was recorded at the MS medium containing IAA+BAP and the best callus production in root explants. Two types of calli

ABSTRACT (continued)

were determined. Yellow calli (Type 1) and black calli (Type 2) with darkened in color and appearance that have not lose their development properties were examined in transmission electron microscope (TEM). The cells of Type 1 calli were spherical and large. The cells contained usually one nucleus and nucleolus. Also the cells contained a very large vacuole, endoplasmic reticulum, golgi complex, mitochondria, ribosomes, plastids. Deformed cells and spherical cells are determined in Type 2 calli. The cells were observed to smaller vacoules and higher number of mitochondria different from Type 1 calli.

Keywords: *Globularia trichosantha* ssp. *trichosantha*, plant tissue culture, callus production, utrastructure.

Science Cod: 401.03.00

TEŞEKKÜR

Tez konunun belirlenmesinde ve tez çalışmalarında her zaman yanımda olan bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Globularia trichosantha ssp. *trichosantha* bitkisi hakkındaki bilgilerini bizden esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Gençay AKGÜL'e çok teşekkür ederim.

Tezim, 2014-84906727-03 No'lu proje ile desteklenmiş olup, katkılarından dolayı Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (B.A.P)'ne teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Dr. Yasin HAZER'e çok teşekkür ederim. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Merkezi yöneticilerine ve aynı zamanda Doç. Dr. İlknur DAĞ ve uzman Tayfun ŞENGEL'e çok teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca manevi desteklerini her an arkamda hissettiğim annem Gönül ATAR'a, babam İlyas ATAR'a ve kardeşim Mert ATAR'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
BÖLÜM 2 KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 <i>GLOBULARIA TRICHOSANTHA</i> SSP. <i>TRICHOSANTHA</i> HAKKINDA GENEL BİLGİLER	3
2.1.1 <i>Globularia</i> Cinsinin Özellikleri.....	3
2.1.2 <i>Globularia</i> Cinsinin Taksonomideki Yeri	3
2.1.3 <i>Globularia trichosantha ssp. trichosantha</i> 'nın Morfolojisi.....	4
2.2 <i>GLOBULARIA</i> TÜRLERİNİN TIBBİ ÖZELLİKLERİ.....	5
2.3 <i>GLOBULARIA</i> TÜRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR	6
2.3.1 Fitokimyasal Çalışmalar	6
2.3.2 Analitik Çalışmalar.....	7
2.3.3 Biyolojik Aktivite ve Toksikite Çalışmaları.....	9
2.3.4 Doku Kültürü Çalışmaları.....	9
2.3.4.1 Kallus Kültürü.....	9
2.3.5 Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) Çalışmaları	10

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 3 KURAMSAL BİLGİLER	13
3.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ	13
3.1.1 Besin Ortamları	15
3.1.1.1 Makro Elementler	16
3.1.1.2 Mikro Elementler	16
3.1.1.3 Vitaminler	16
3.1.1.4 Karbohidratlar	17
3.1.1.5 Jel Yapıcı Maddeler.....	17
3.1.1.6 Bitki Büyüme Düzenleyicileri	17
3.2 ELEKTRON MİKROSKOBU (EM)	17
3.2.1 TEM'in Çalışma Prensibi.....	18
BÖLÜM 4 MATERYAL VE YÖNTEM	19
4.1 MATERYAL	19
4.1.1 Eksplantlar.....	20
4.2 YÖNTEM	21
4.2.1 Sterilizasyon	21
4.2.1.1 Laboratuvar Temizliği ve Sterilizasyonu	21
4.2.1.2 Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu	21
4.2.1.3 Besin Ortamlarının Sterilizasyonu	21
4.2.1.4 Ekim İçin Kullanılan Tohumların Sterilizasyonu	21
4.2.2 MS Ortamı.....	21
4.2.3 Tohum Çimlendirme Ortamı ve Hazırlanışı	24
4.2.4 Kallus Kültür Ortamı ve Hazırlanışı.....	25
4.2.5 Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) Preperasyonu	26
4.2.5.1 Tespit Çözeltilerinin Hazırlanışı ve Tespit	26
4.2.5.2 Dehidrasyon	28
4.2.5.3 Doyurma	29
4.2.5.4 Gömme	30

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
4.2.5.5 Kesit Alma	30
4.2.5.6 Boyama.....	30
4.2.5.7 TEM’de İnceleme.....	31
4.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ	31
BÖLÜM 5 ARAŞTIRMA BULGULARI	33
5.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ SONUÇLARI	33
5.2 ELEKTRON MİKROSKOBU SONUÇLARI.....	36
5.2.1 Tip 1 Kallus Hücrelerinin İnce Yapısı	37
5.2.2 Tip 2 Kallus Hücrelerinin İnce Yapısı.....	39
BÖLÜM 6 TARTIŞMA	43
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>		<u>Sayfa</u>
2.1	<i>G. trichosantha</i> ssp. <i>trichosantha</i> morfolojisi	5
2.2	İridoit glikozitlerin genel iskeleti	7
2.3	Feniletanoitlerin genel iskeleti	7
3.1	Işık mikroskobu, TEM ve SEM	18
4.1	<i>G. trichosantha</i> ssp. <i>trichosantha</i> 'nın genel görünümü	19
4.2	30 günlük aseptik fidenin genel görünümü.....	20
4.3	<i>G. trichosantha</i> spp. <i>trichosantha</i> 'nın MS tohum ortamında çimlendirilmesi	24
5.1	IAA+BAP içeren ortamlarda <i>G. trichosantha</i> ssp. <i>trichosantha</i> 'nın kalluslarının görünümü	34
5.2	2,4-D+BAP içeren ortamlarda <i>G. trichosantha</i> ssp. <i>trichosantha</i> 'nın kalluslarının görünümü.	34
5.3	IAA+BAP içeren ortamlardan elde edilen sarı kallusların ince yapısı	39
5.4	2,4-D+BAP içeren ortamlardan elde edilen siyah kallusların ince yapısı.	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>		<u>Sayfa</u>
2.1	<i>G. trichosantha</i> ssp. <i>trichosantha</i> 'nın taksonomideki yeri.....	3
4.1	MS ortamında kullanılan makro tuzları	22
4.2	MS ortamında kullanılan mikro tuzları	22
4.3	MS ortamında kullanılan demir stok.....	23
4.4	MS ortamında kullanılan vitamin stok	23
4.5	MS ortamında kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonları	25
4.6	A solüsyonu.	27
4.7	B solüsyonu.....	27
4.8	A+B solüsyonu.....	27
4.9	GA hazırlanışı.	28
4.10	OsO ₄ hazırlanışı	28
4.11	A karışımı	29
4.12	B karışımı.....	29
4.13	Epon hazırlanışı.....	29
4.14	UA hazırlanışı	30
4.15	SATO'nun hazırlanışı.....	30
4.16	Pb- sitrat hazırlanışı.....	31
5.1	Aseptik fide yaşının kallus yüzdesine etkisi	33
5.2	<i>G. trichosantha</i> ssp. <i>trichosantha</i> 'nın 1. alt kültürde bitki büyüme düzenleyicilerinin her bir eksplanttaki kallus yüzdesine etkisi.	35
5.3	<i>G. trichosantha</i> ssp. <i>trichosantha</i> 'nın <i>in vitro</i> kültüründe bitki büyüme düzenleyicileri, birleştirilmiş haldeki eksplantların kallus yüzdeleri ve kallus büyüme indeksleri.	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

cm	:	Santimetre
g	:	Gram
l	:	Litre
mg	:	Miligram
mm	:	Milimetre

KISALTMALAR

BAP	:	6-Benzilaminopürin
B5	:	Gamborg (1968)
EM	:	Elektron Mikroskopu
GA	:	Gluteraldehit
IAA	:	Indol Asetik Asit
LS	:	Linsmaier-Skoog (1965)
MS	:	Murashige-Skoog (1962)
NN	:	Nitsch-Nitsch (1969)
SH	:	Schenk-Hilderbrant (1979)
TEM	:	Geçirimli Elektron Mikroskopu
OsO ₄	:	Osmiyum Tetraoksit
UA	:	Uranil Asetat
WH	:	White (1963)
2,4- D	:	2,4 Dikloro Fenoksi Asetik Asit

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bitki doku kültürü teknikleri son 30 yılda bitki sekonder metabolitlerinin üretimi için en önemli araçlardan biri haline gelmiştir. Tıbbi bitki tarımında karşılaşılan zorluklar, toplayıcılık ile tıbbi bitkilerin üretiminin stabil olmaması alternatif yollardan biri olan bitki doku kültürü ile üretimin önemini arttırmıştır.

Bitkisel kökenli doğal ürünlerin elde edilmesinde zaman ve emek kaybının önlenmesi, maliyetin düşürülmesi ve doğa tahribatının önlenmesi bakımından, bitki doku kültürleri yöntemleri ile üretim önemli bir gelişme sağlamıştır. Ayrıca bitki doku kültürü yöntemleri; son zamanlarda ekim alanlarının azalması, iklimsel değişiklikler ve bazı türlerin yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalması gibi olumsuz durumlara alternatif bir çözüm sunmuştur. Bitki doku kültürü yöntemleri sayesinde bitkiler çoğaltılabilmiş, transgenik bitki üretimi sağlanabilmiş, ilaç hammaddesi olarak kullanılan sekonder metabolitlerin üretimi arttırılabilmıştır.

Globularia trichosantha ssp. *trichosantha* bir süs bitkisi olup aynı zamanda tıbbi ve ekonomik değere sahiptir. Güzel görünüşleri nedeniyle parklarda veya bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Laksatif (mushil), idrar arttırıcı, midevi ve kuvvet verici, kolagog (safra söktürücü), ağrı giderici gibi tıbbi yararları vardır. Hem süs bitkisi olduğu için hem tıbbi yararı olduğundan ekonomide de önemli bir yere sahiptir. Farmakolojik ve ekonomik anlamda değerli olduğundan bitki doku kültürü yöntemleri ile bu bitkinin üretiminin arttırılması sağlanmalı, bulundurduğu sekonder metabolitler araştırılmalı, bu maddeler izole edilip bilim dünyasına kazandırılmalıdır.

Bu konuda yapılan literatür taramalarına göre dünyada ve Türkiye’de *G. trichosantha* ssp. *trichosantha* bitkisinde gerek doku kültürü gerekse ince yapı analizi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan bu çalışmada *G. trichosantha* ssp. *trichosantha* bitkisinde ilk kez bitkinin kültür ortamına alınmasıyla farklı bitki büyüme düzenleyicileri denenerek MS ortamlarında (IAA+BAP ve 2,4-D+BAP) kallus üretmek, üretilen kallusların geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile ince yapılarını incelemek ve her iki kallus yapısı (sarı ve siyah kallus) arasındaki farklılıkları belirlemek amaçlandı.

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *GLOBULARIA TRICHOSANTHA* SSP. *TRICHOSANTHA* HAKKINDA GENEL BİLGİLER

2.1.1 *Globularia* Cinsinin Özellikleri

Globularia L. (Globulariaceae) dünyada 22 tür ile temsil edilmektedir. Cinsin üyeleri Avrupa kıtasından (15 tür) sonra en fazla Türkiyede (10 tür) bulunmaktadır. “Küreçiçeği” olarak adlandırılan bu cinsin bazı türleri süs bitkisi olarak değerlendirilmektedir. Cinsin üyeleri başta Akdeniz Fitocoğrafik Bölgesi olmak üzere İran Turan ve Avrupa Sibiryta fitocoğrafik bölgesinde de bulunmaktadır (Wagenitz 2004). Türkiye Florasının ilk 9 cildinde *Globularia* cinsine ait 9 tür ve türaltı takson verilmiştir. Daha sonraki yıllarda iki yeni takson ilavesi ile takson sayısı 11’e çıkmıştır (Davis et al. 1988). Bu taksonlardan 5 tanesi Türkiye için endemiktir ve endemizm oranı yaklaşık % 50’ dir (Duman 2001). *Globularia* türlerinin gerek tıbbi ve gerekse ekonomik önemi nedeni ile kullanılmaları yanında güzel görünüşleri nedeni ile park ve bahçelerde süs bitkisi olarak da yetiştirilmektedir.

2.1.2 *Globularia* Cinsinin Taksonomideki Yeri

Çizelge 2.1 *G. trichosantha* ssp. *trichosantha* ’nın taksonomideki yeri.

Alem	Plantae	
Şube	Spermatophyta	
Sınıf	Dicotyledones	PESI webseVICES
Takım	Lamiales	(simplified taxonomy)
Aile	Globulariaceae	(2012)
Cins	<i>Globularia</i>	
Tür	<i>G. trichosantha</i>	
Alttür	<i>G.trichosantha</i> Fisch & Mey. ssp. <i>trichosantha</i>	

Globularia cinsi Türkiye’ de tür ve alt düzeyde 10 takson ile temsil edilir:

- *Globularia alypum*
- *Globularia dumulosa*
- *Globularia orientalis*
- *Globularia hedgei*
- *Globularia sintenisii*
- *Globularia davisiana*
- *Globularia cordifolia*
- *Globularia aphyllanthes*
- *Globularia trichosantha*
- *Globularia trichosantha* spp. *trichosantha*
- *Globularia trichosantha* spp. *longisepala*

2.1.3 *Globularia trichosantha* ssp. *trichosantha* ’nın Morfolojisi

G. trichosantha ssp. *trichosantha* uzun toprak üstü stolonlar taşıyan, dallanmış odunsu gövdeli çok yıllık bir bitkidir (Şekil 2.1). Gövde yükselici 5-15 cm uzunluğundadır. Meyvede 35 cm’e kadardır. Taban yaprak rozet şeklinde 25 x 8 mm’e kadar, obovattan eliptiğe obsustan emarginata kadar attenuat; gövde yaprak 12 x 3 mm lineardan dar eliptiğe kadar sapsızdır. Kapitulum terminal 10-20 mm çapında involukrumdaki brakteler lanseolatdır. Kaliks yaklaşık 0. 7’sine kadar bölünmüş, loblar lenseolat, akuminat, diktir. Korollanın alt dudağı yaklaşık 0. 7’sine kadar 3 linear parçaya bölünmüş, üst dudak yaklaşık tüpün boğazına kadar 2 linear parçaya bölünmüştür. Çiçeklenme 3-7. aylar arasındadır. Bu bitki Anadolu’da yaygın olarak görülür (Kırmızıbekmez 2002).



Şekil 2.1 *G. trichosantha* ssp. *trichosantha* morfolojisi.

2.2 *GLOBULARIA* TÜRLERİNİN TIBBİ ÖZELLİKLERİ

G. alypum'un yaprak ekstraktlarının normal ve diyabetik ratlarda hipoglisemik etkisi araştırılmıştır. Yaprak ekstraktları normal ratlarda kan glukoz seviyelerini değiştirmezken, diyabetik ratlarda kan glukoz seviyelerini dūřürmüřtür (Skim et al. 1999a). *G. alypum*'un sulu ekstraktlarının normal ve streptozotosin (STZ) iğerikli diyabetik ratlarda hipoglisemik etkisi araştırılmıştır. Normal ratlarda kan glukoz seviyeleri değişmezken, STZ'li ratlarda kan glukoz seviyelerinin dūřtüęü görülmüştür (Skim et al. 1999b, Jouad et al. 2002). *G. alypum* L.'in yaprak ve gövdesinden elde edilen ekstraktlar serotonin ve histamin salgılanmasını azaltır

(Bello et al. 2002). *G. alypum*'un yaprakları geleneksel olarak hipoglisemik ajan, laksatif (mushil), idrar arttırıcı, midevi ve kuvvet verici, kolagog (safra söktürücü), ağrı giderici, terletici olarak kullanılır (Kırmızıbekmez 1999, Boutiti et al. 2008, Tundis et al. 2012). Ratlar üzerinde denenen toksikolojik bir çalışmada *G. alypum*'un toprak üstü parçalarının ekstraktlarının toksik bir etkisi olduğu görülmemiştir (Skim et al. 1998). Fakat *G. alypum* ile ilgili başka çalışmalarda yaprak ve çiçek ekstraktlarının antioksidan ve antigenotoksik aktivitesinin çok yüksek olduğu görülmüştür (Khlifi et al. 2005, Harzallah et al. 2010, Chograni et al. 2012). *G. alypum*'un sulu ekstraktlarının hipertrigliseridemiye azalttığı aynı zamanda yüksek fruktoz diyeti ile beslenen ratlarda kalp, böbrek ve kasın oksidatif durumunu iyileştirdiği görülmüştür (Taleb-Dida et al. 2011). Bu yönüyle tıbbi önemi olan bir bitkidir.

G. orientalis'de yapılan bir çalışmada toprak üstü ve toprak altı ekstraktlarının antioksidan etkisi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metodu ile yapılmış, önemli antioksidan etkiye sahip olduğu görülmüştür (Çalış vd. 2002).

G. trichosantha ssp. *trichosantha* hemoroit tedavisinde kullanılmaktadır ve aynı zamanda antitümör ve antimikrobiyal özelliği vardır (Tundis et al. 2012).

2.3 GLOBULARIA TÜRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.3.1 Fitokimyasal Çalışmalar

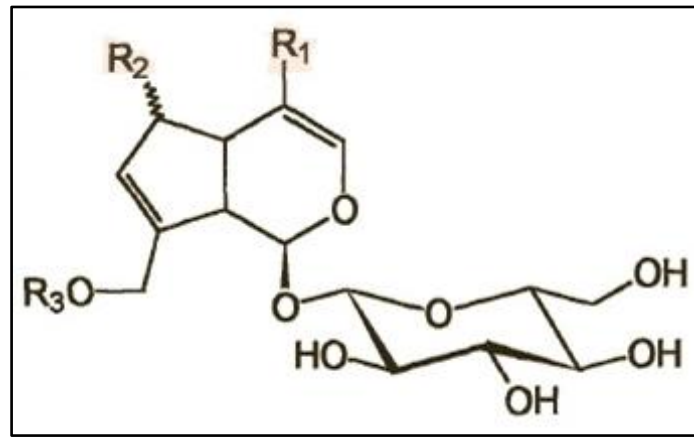
Fitokimyasallar, bitkilerde doğal olarak bulunan biyolojik olarak aktif kimyasal bileşiklerdir. Yapılan çalışmalarda *Globularia* türlerinde iridoit (Şekil 2.2), flavonoit, lignan, antosiyanidin, şeker esteri ve fenolik asit yapısında bileşikler taşıdığı gösterilmiştir.

Kırmızıbekmez vd. (2004) *G. cordifolia*'nın toprak altı kısımlarından elde ettiği metanolik ekstraktlardan yeni bir neolignan diglikozit bulmuş olmakla birlikte 2 flavon glikozit ve 5 feniletanoit glikozit (Şekil 2.3) bulmuşlardır.

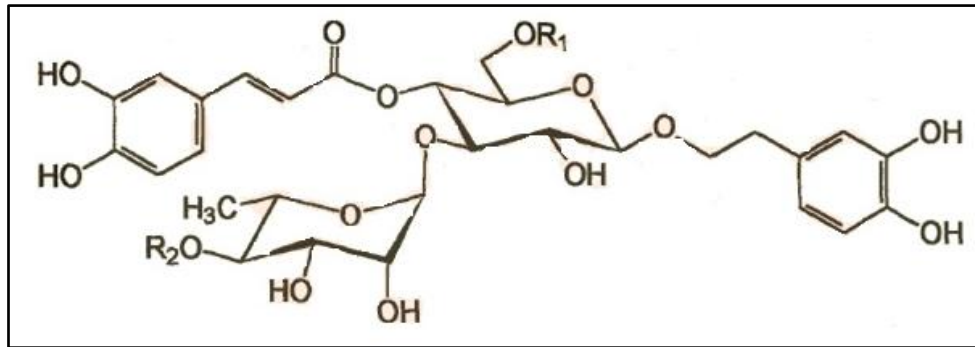
Tundis et al. (2012) *G. meridionalis*'in toprak üstü ve toprak altı parçalarından iridoit ve bisiridoit glikozitleri analizini yapmışlardır.

Kırmızıbekmez vd. (2004) *G. sintenisii* bitkisinin toprak altı kısımlarından feniletanoit glikozitler ve iridoit glikozitler elde etmişlerdir.

Kırmızıbekmez (1999) *G. trichosantha* ssp. *trichosantha* 'nın toprak üstü kısımlarından 10 iridoit glikozit ve 5 feniletanoit glikozit elde etmiştir. Kırmızıbekmez (1999) yaptığı çalışmada 10-benzoilkatalpol, asperulozit, alpinozit, deasetilasperulozit, okubin, katalpol, asperulozidik asit, genipozidik asit, skandozit deasetilalpinozit olarak bilinen iridoit heterozitleri ve krenatozit, verbaskozit, rossikazit A, trikosantozit A ve trikosantozit B olarak bilinen feniletanoit glikozitleri elde etmiştir.



Şekil 2.2 İridoit glikozitlerin genel iskeleti.



Şekil 2.3 Feniletanoitlerin genel iskeleti.

2.3.2 Analitik Çalışmalar

İridoit glikozitlerin miktar tayinini yapmak için; vakum sıvı kromatografisi, açık kolon kromatografisi, orta basınçlı sıvı kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC),

ESI-kütle (Elektrosprey İyonlaştırma) ve FAB-kütle (Hızlı Atom Bombardmanı) spektroskopisi gibi çeşitli cihazlar kullanılabilir.

İridoit glikozitlerin moleküler yapısını tayin etmede, ¹H-NMR (Hidrojen-1 Nükleer Magnetik Rezonans), ¹³C-NMR (Karbon-13 Nükleer Magnetik Rezonans), DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer: Polarizasyon Transferi ile Bozunumsuz Arttırma), 2D-NMR (İki Boyutlu Nükleer Magnetik Rezonans) gibi cihazlar kullanılabilir (Taidemir et al. 1999, Çalış vd. 1999, Çalış vd. 2000). Moleküler yapı tayin edildikten sonra iridoit glikozitlerin moleküler ağırlıkları da hesaplanabilir.

Kırmızıbekmez vd. (2004) yaptıkları çalışmada *G. cordifolia*'nın topraküstü parçalarının metanolik ekstraktlarından 1D ve 2D NMR, IR, UV ve MS cihazlarını kullanarak fitokimyasal analiz yapmışlardır. Neolignan glikozit olan dehidrodikoniferil alkol 9-*O*- β -D-glukopranosil 2 \rightarrow 2- β -D-glukopranozit ve dehidrodikoniferil alkol 9-*O*- β -D-glukopranozit, flavon glikozit olan krisoeriol 7-*O*- β -D-allopranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopranozit, stachyspinozit ve feniletanoit glikozitler olan verbaskozit, izoverbaskozit, lokosseptoit A, martinozit, rossikazit A bileşiklerini elde etmişlerdir.

Boutiti et al. (2008) yaptıkları çalışmada *G. eriocephala* ve *G. alypum*'un topraküstü parçalarının etanol, petroleum eter, triklorometan, etil asetat ve n- bütanol ekstraktlarından TLC (İnce Tabaka Kromatografisi), UV ve ¹H NMR cihazlarını kullanarak fitokimyasal analiz yapmışlardır. Apigenin ve luteolin bileşiklerini hem TLC ve hem de NMR ile gözlemlemişlerdir.

Çalış vd. (1999, 2000) *G. trichosantha* ssp. *trichosantha*'da toprak altı ve toprak üstü kısımlarının ekstraksiyonuyla sıvı kromatografisi, açık kolon kromatografisi, orta basınçlı sıvı kromatografisi, UV, İR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, 2D-NMR, ESI-kütle ve FAB-kütle spektroskopisi yöntemleri kullanılarak yapılan analiz sonucu iridoit glikozitler ve feniletanoitlerin varlığını ortaya koymuşlardır.

2.3.3 Biyolojik Aktivite ve Toksikite Çalışmaları

Skim et al. (1999) *G. alypum*'un sulu ekstraktlarının ratlar üzerindeki hipoglisemik aktivitesini incelemişlerdir. Sulu ekstraktların normal ratlardaki plazma insülin seviyesini arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Bello et al. (2002) *G. alypum*'un yaprak, çiçek ve gövdesinden elde etikleri metanolik ekstraktların guinea domuzu ileumu, rat uterusu, rat duodenum ve rat vas deferens üzerindeki farmakolojik aktivitesini araştırmışlardır. Ekstraktların bu dokularda noradrenalin, serotonin ve histamin salgısını uyardığı gözlemlenmiştir.

Dida et al. (2011) *G. alypum*'un sulu ekstraktları yüksek fruktoz diyeti ile beslenen ratlardaki oksidatif stresi ve metabolik bozuklukları azalttığını gözlemlemişlerdir.

G. trichosantha ssp. *trichosantha*'da yapılmış olan biyolojik aktivite ve toksisite çalışmaları bulunmamaktadır.

2.3.4 Doku Kültürü Çalışmaları

2.3.4.1 Kallus Kültürü

Kallus, yapay kültür ortamlarına koyulan bitki hücresi veya dokularından meydana gelen farklılaşmamış hücreler yığıdır (Babaoğlu 2001).

Bertsouklis ve arkadaşları *G. alypum* L. türü için tohum çimlendirme ortamını 20 gr/lt sükröz, 8 gr/lt agar ilave ederek hazırlamış olup rejenerasyon ortamını ise NAA ve BAP'ın çeşitli konsantrasyonlarını deneyerek hazırlamışlardır. 8 gr/lt agar olan ortamlarda kök oluşumu sağlanıyorken sürgünlerde hiperhidritasyon problemi ile karşılaşmışlardır. Fakat agar oranını arttırarak hiperhidritasyonu elemine etmişlerdir. Agar oranı arttırılmadan önce sürgün sayısı fazla, gövde uzunluğu normalken agar oranı arttırıldıktan sonra sürgün sayısı düşmüş, gövde uzunluğu azalmıştır.

G. trichosantha ssp. *trichosantha* türünde yapılan doku kültürü çalışması olmadığı gibi cins içinde de bitki doku kültürü çalışmaları pek fazla bulunmamaktadır.

2.3.5 Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) Çalışmaları

G. trichosantha ssp. *trichosantha* türünde yapılan TEM çalışması olmadığı gibi cins içinde de TEM çalışmaları bulunmamaktadır. Bu çalışma bu tür ile yapılan ilk TEM çalışması olacaktır.

Farklı türlere ait kallusda yapılan ince yapı çalışmaları:

Gnanapragasam and Vasil (1992) *Panicum maximum* bitkisinin hücre süspansiyon kültürü ile elektron mikroskopu preparasyonu yapmışlardır. Hücreleri %4'lük glutraldehitte (GA) tespit ettikten sonra 0.1M sodyum kakodilat tamponunda yıkamışlar ve sonra %2'lik osmiyum tetraoksit (OsO₄) ile fikse etmişlerdir. Daha sonra örnekleri Spurr's reçinesine gömmüşlerdir. Örnekleri kurşun sitrat ile 15 dk boyamışlardır. Araştırma sonucu olarak nükleus ve büyük vakuoller görmüşlerdir. Plazma membran pürüzsüzdür. Mannitoldeki hücreler daha küçük ve yoğun sitoplazmalıdır. Hücrelerde şişkin organeller ve sitoplazmada düz ER ve membranlı yapılar gözlenmiştir. -10°C'ye indikçe mitokondri hacmi ve ER artmıştır.

Jasik and arkadaşları (1995) *Pinus nigra* bitkisinden embriyonik kalluslar elde etmişlerdir. Kallusları %3'lük GA'da tespit ettikten sonra 0.2M fosfat tamponunda yıkamışlar ve sonra %1'lik osmiyum tetraoksit (OsO₄) ile fikse etmişlerdir. Örnekleri Durcupan ACM'ye gömmüşler ve kurşun sitrat ile boyamışlardır. Embriyonik kallusların anatomisini ve ince yapısını incelemişlerdir. Embriyogenezin tüm aşamalarında embriyolar bipolar organize olmuşlardır. Yoğun sitoplazmalı bir izodiametrik hücre içeren hücre parçaları ve vakuollenmiş hücrelerin en basit bipolar sistem olduğunu görmüşlerdir. Vakuollenmiş hücreler senesense uğramıştır. Sitoplazmaca yoğun hücreler ve türevleri transversal olarak bölünmüştür. Erken embriyonal hücre kütlesi uzunluğuna bölünmüştür.

Wang et al. (1998) *Allium sativum* bitkisinin yapraklarının kallus oluşumu sırasında kallusdaki nüklear yapının değişimini incelemişlerdir. Örnekleri %1'lik GA'da tespit etmişler, 0.2M ve pH 7.2 olan fosfat tamponunda yıkamışlar, %1'lik OsO₄ ile 2 saat bekletmişlerdir. Daha sonra örnekleri epona gömmüşlerdir. Kallusların gelişimi sırasında birkaç farklı hücre tipi görülmüştür: büyük vakuollü hücreler, aktif faz hücreleri, bölünen hücreler ve kallus hücreleri. Büyük vakuollü hücrelerde nükleus küçüktür ve nükleus vakuol ve hücre duvarı arasında görülmüştür. Aktif faz hücrelerinde nükleus hücre duvarından sitoplazmaya hareket ediyor olarak görülmüştür. Bölünme sırasında nükleus hücre duvarının hemen yanına

yerleşmiş olarak veya hücrenin merkezinde görülmüştür. Kallus hücrelerinde nükleus çok büyüktür, birçok nükleuslar yuvarlanmış fakat bazı nükleilerde zarf oluşumu gözlemlenmemiştir.

Ribeiro et al. (2012) muz bitkisinin kalluslarından preperasyon yapmışlardır. Bu kallusların morfolojik ve ince yapısını incelemişlerdir. Kallusları Karnovsky (%2.5 glutaraldehit ve %2.5 paraformaldehit) çözeltisi ve %1'lik osmiyum tetraoksit çözeltisinde tespit etmişler ve TEM ve SEM'de ince yapısını incelemişlerdir. Sulu kallus, küçük kümeli sarı kallus ve büyük kümeli sarı kallus olmak üzere üç tip kallusun ince yapıları üzerindeki farklara bakmışlardır. SEM'de sulu kallus hücrelerinin uzamış diğer kallusların ise daha izodiametrik görünümlü olduğunu görmüşlerdir. TEM'de sulu kallusların hücre duvarının daha ince olduğu, çok sayıda küçük vakuol bulundurduğu ve dağınık sitoplazmalı olduğu, küçük kümeli sarı kalluslarda yoğun sitoplazma ve çok sayıda mitokondri olduğu, büyük kümeli sarı kalluslarda ise kalın bir hücre duvarı ve hücrelerarası boşluk olduğunu görmüşlerdir.

BÖLÜM 3

KURAMSAL BİLGİLER

3.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Günümüzde bitki doku kültürünün tanımı: aseptik şartlarda yapay bir besin ortamında (*in vitro*), bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları= eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (sekonder metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitliliği oluşturmak dolayısıyla, genetiksel iyileştirme çalışmalarında bitki doku kültürü önemli bir role sahiptir. Aynı zamanda, doku kültürü uygulamalarıyla hızlı çoğaltım, gen kaynağı muhafazası, somaklonal varyasyon, dihaploid bitki üretimi, somatik hibridizasyon, genetik mühendisliği çalışmaları yapılabilir. Kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde çeşitli doku kültürü yöntemleri uygulanmaktadır (Babaoğlu 2001).

Bitki doku kültürlerinin bitki ıslahındaki uygulama alanları;

- a) Türler arası melezlemeden sonra embriyo kültürü
- b) Haploit bitki üretiminde anter kültürü
- c) Somaklonal varyasyon
- d) *İn vitro* seleksiyon
- e) *İn vitro* döllenme
- f) *İn vitro* germplazm muhafazası
- g) Somatik hücre melezlemesi (Protoplast füzyonu)
- h) Gen transferi

Bitki doku kültürlerinin ticari ve ıslah dışı uygulama alanları;

- a) Hastalısız bitki elde edilmesinde meristem kültürü
- b) Mikroçoğaltım

- c) Sentetik tohum üretimi (somatik embriyolar)
- d) Sekonder metabolit üretimi (kallus- hücre süspansiyonları)

Bitki doku kültüründe çok fazla kültür çeşitleri bulunmaktadır. Bunlar: kallus kültürü, hücre süspansiyon kültürü, gövde kültürü, saçak kök kültürüdür.

a) Kallus Kültürü

Kallus, yapay kültür ortamlarına koyulan bitki hücresi veya dokularından meydana gelen farklılaşmamış hücreler yığıdır. Kallus dokusu genellikle yaralanmış veya kesilmiş doku yüzeylerinde oluşur (Babaoğlu 2001). Her bitki dokusu kallus oluşturabilir, fakat her kallus kültürü ortamı her bitki için uygun olmayabilir. En uygun kültür ortamını seçebilmek ve çok miktarda kallus üretebilmek için kültür ortamına koyulan bitki büyüme düzenleyicileri, uygun eksplant kaynağı (yaprak, gövde, kök vs.), ısı- sıcaklık, karanlık- aydınlık periyotlar, sükröz konsantrasyonu, makro ve mikro elementler önemli yer tutar. Kallus kültürleri diğer sekonder metabolitlerde olduğu gibi iridoit glikozitlerin üretiminde de önemli bir yer tutar.

b) Hücre Süspansiyon Kültürü

Süspansiyon kültür ortamının kallus kültür ortamından farkı: kallus kültür ortamına katılaştırıcı ajan eklenebilirken süspansiyon kültür ortamına eklenememesidir. Dolayısıyla, süspansiyon kültür ortamı sıvı bir ortamdır. Süspansiyon kültürlerinden iyi bir sonuç alabilmek için kallus kültürlerinden yararlanılır. Bu durum teknik açıdan daha avantajlıdır. Çünkü *in vitro* ortama uyum sağlamış kallus kültüründen alınan parçalar, ana bitkiden alınan parçalara göre sıvı ortama daha çabuk adapte olabilmektedir.

Elde edilen kalluslar cam erlenler içindeki sıvı ortama aşılır ve orbital çalkalamalı inkübatörlerde geliştirilirler. Böylece kalluslar sıvı olan süspansiyon ortamında hücrelere ayrılır. Hücreler tek tek ayrıldıklarından hücreleri büyütebilmek ve her hücrenin büyüme aşamasını inceleyebilmek için süspansiyon kültürleri özel bir avantaj sağlar. Hücre süspansiyon kültürleri özellikle somatik embriyogenez ve somatik embriyogenezin örneğin; gelişim ve olgunlaşma aşamalarının fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmaları için uygun bir ortamdır (Babaoğlu 2001).

Tüm bu avantajlar sayesinde süspansiyon kültürlerinden sekonder metabolitler olan iridoit glikozitlerin üretimi gerçekleştirilebilir.

c) Gövde Kültürü

Koltuk altı veya sürgün ucundaki meristem dokusundan alınan parçaların uygun besin ortamında büyütülmeleri ile gerçekleşmektedir. Sürgün ucu kültürleri farklılaşmamış kültürlerle yani kallus ve hücre süspansiyon kültürlerine nazaran daha yüksek düzeyde sekonder metabolit üretmektedir. Hatta bazen üretilen madde miktarı ana bitkidekinden de yüksek olabilmektedir (Babaoğlu 2001).

d) Saçak Kök Kültürü

Saçak kök kültürü hızlı büyüme, genetik ve biyokimyasal kararlılık gibi birçok özelliğe sahip olduğundan sekonder metabolit üretimi konusunda diğer kültür sistemlerine göre daha avantajlı konuma gelmiştir. Saçak kök kültürleri bitki metabolizması ve fizyolojisi için model sistemler oluştururlar. Özel kimyasal maddeler ve ilaç üretiminde bitki hücre süspansiyon kültürü aşamalarından biridir. Saçak kökler aynı zamanda transgenik bitki rejenerasyonunda kaynak olarak kullanılır (Shanks and Morgan 1999).

Bir bitki patojeni olan *Agrobacterium rhizogenes* ile kök kültürlerini izole ederek sekonder metabolitlerin üretimi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Toprak grubu bakterisi olan bu patojen Ri-DNA adı verilen küçük DNA parçasını bitki genomuna aktararak “tüylü” kök fenotipinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Babaoğlu 2001). *Agrobacterium rhizogenes*; bir bitkinin yaprak, gövde, kök organlarına enfekte olabilir.

3.1.1 Besin Ortamları

Kallus kültürü, protoplast kültürleri, hücre süspansiyonu ve bitki rejenerasyonu gibi hücre ve doku kültürü işlemlerinde kullanılacak olan ortam önemli bir seçimdir. Çeşitli bilim insanları tarafından bildirilen çok sayıda besin ortamı bulunmakla birlikte en sık kullanılan ortamlar şunlardır:

MS (Murashige and Skoog 1962), tütün için geliştirilmiş, yüksek tuz içerikli bir ortamdır. Özellikle düşük yoğunluklarda köklendirme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. WH (White 1963), düşük tuz içeriği ile domates köklerinin kültürü için geliştirilmiş bir ortamdır. LS (Linsmaier and Skoog 1965), MS ortamının organik bileşikler bakımından farklı bir çeşididir. B5 (Gamborg et al. 1968), soya kallus kültürleri için geliştirilmiş nitrat azotu yüksek bir ortamdır. NN (Nitsch and Nitsch 1969), anter kültürü için geliştirilmiş bir ortam olup tuz içeriği MS ve WH arasındadır. SH (Schenk and Hilderbrant 1972), hem monokotiledonlar hem de dikotiledonlar için geliştirilmiş bir ortamdır.

Temel besin ortamları: sıvı ortamlar için makro ve mikro elementler, bazı vitaminler ve karbon kaynağı, yarı-katı ortamlar için ek olarak agar veya agaroz içeren ortamlardır. Temel besin ortamına bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak her türlü bitki, bitkinin herbir parçası, dokusu veya hücresi için farklı besin ortamları hazırlanabilir (Babaoğlu 2001).

3.1.1.1 Makro Elementler

Temel besin ortamı için en önemli bileşen azottur. Bazı besin ortamlarında yüksek miktarda azot bulunurken bazı besin ortamlarında çok az ya da hiç bulunmaz. Diğer makro elementler ise magnezyum, fosfor, kükürt, sodyum ve kalsiyumdur (George 1993).

3.1.1.2 Mikro Elementler

En çok kullanılan mikro elementler; demir (jelatlaşmış formda verilir), manganez, çinko, bor, molibden, kobalt ve iyottur (Gamborg and Philips 1995).

3.1.1.3 Vitaminler

Bitki kültürleri için en gerekli olan tiamin (B₁), nikotik asit (B₃), pridoksin (B₆) enzim reaksiyonlarında katalitik etkiye sahip vitaminlerdir (George 1993). Myo-inositol, biotin, askorbik asit, folik asit de gerekli olduğunda besin ortamına eklenebilir.

3.1.1.4 Karbohidratlar

Kültüre alınan bitki hücre ve dokuları yeterli miktarda karbohidrat sentezi yapamazlar. Bu nedenle enerji kaynağı olarak çeşitli şekerler kullanılabilir. En çok kullanılanı sakkaroz olup glikoz, maltoz, rafinoz ve fruktoz da kullanılabilir (George 1993).

3.1.1.5 Jel Yapıcı Maddeler

Besin ortamlarını yarı-katı hale getirmek için kullanılan bileşenlerdir. Bunlar genellikle kırmızı deniz alglerinden çıkarılan polisakkarit bileşenleridir. En çok kullanılanlar agar, agaroz, aljinat, silikajel, jelatin ve nişastadır (George 1993).

3.1.1.6 Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Oksinler; doku kültüründe kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini, somatik embriyo oluşumunun uyarımını sağlar. Aynı zamanda sitokinlerle birlikte kullanıldığında kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu, somatik embriyo oluşumunun uyarılmasında etkilidir (Smith 1992). Başlıca oksinler; IAA, IBA, NAA ve 2,4-D'dir.

Sitokinler; hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkilidir. Sürgünlerde köklenmeyi, embriyogenezisi engeller (Smith 1992). Başlıca sitokinler; kinetin, BAP ve zeatindir.

Gibberellinler; meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, sürgün boyunun uzamasında, embriyo ve ovül kültürlerinde kullanılmaktadır. Oksinlerin aksine kallus gelişimini, organogenezisi, adventif kök oluşumunu engeller (Smith 1992).

Absisik asit; strese maruz kalmış yapraklarda, dormant tomurcuklarda bulunur. Yaprak ve meyve dökümünde, dormanside, stomaların kapanmasının düzenlenmesinde etkilidir (Smith 1992).

3.2 ELEKTRON MİKROSKOBU (EM)

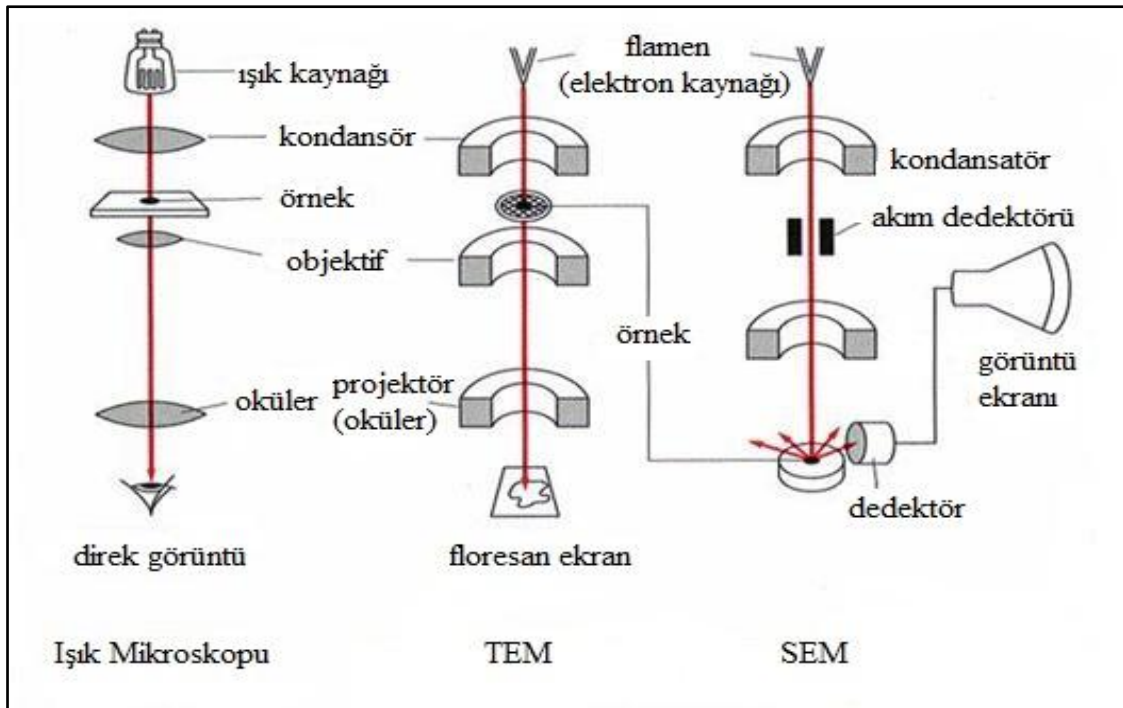
Biyolojik materyallerin (mikroorganizma ve hücreler gibi), çeşitli büyük moleküllerin, tıbbi biyopsi örneklerinin, kristal ve metal yapıların, çeşitli yüzeylerin tanımında EM kullanılır.

EM'den yayılan enerji iki ana yol ile örnekleri tanımlar: Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM). İlk TEM 1933 ve 1942 yılları arasında bulunmuştur ve daha sonra geliştirilmeye devam edilmiştir (Walker and Rapley 2008).

3.2.1 TEM'in Çalışma Prensibi

TEM yüksek vakumla çalışır. İyi görüntü alabilmek için yüksek miktarda sıvı içeren biyolojik örneklerin dehidrasyonu tamamen yapılmalıdır. Ayrıca kesitlerin çok ince olması ve bu kesitlerin kontrast oluşturabilmesi için ağır metaller ile boyanması önemlidir (Walker and Rapley 2008).

TEM'de geçirimli elektronlar sayesinde 2D (2 boyutlu) görüntü elde edilir. TEM'de ışık kaynağı silindirik kolonların en üstünde bulunan elektronları yayan bir filamenttir. Elektronlar vakumlu silindirden pozitif yüklü anoda doğru giderken hızlanır, manyetik kondensör lenslerden örneğe gelir ve örnekten geçerken yansır. Örnekten çıkan dağınık olan ve dağılmamış elektronlar manyetik objektif lensler tarafından toplanır böylece görüntü büyütülmüş olur (Şekil 3.1) (Walker and Rapley 2008).



Şekil 3.1 Işık mikroskobu, TEM ve SEM (Wilhelm 2007).

BÖLÜM 4

MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 MATERYAL

Bu tez çalışmasında, kromozom sayısı $2n=16$ olan *G. trichosantha* ssp. *trichosantha* bitkisi kullanıldı (Gagnidze et al. 2006, Davis et al. 1988). *G. trichosantha* ssp. *trichosantha*'nın tohumları Nevşehir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Yrd.Doç.Dr.Gencay AKGÜL'ün kendine ait herbaryum numunelerinden alındı. Haziran ayında kuruyan çiçeklerden tohumlar ayıklanarak çalışma için hazırlandı.

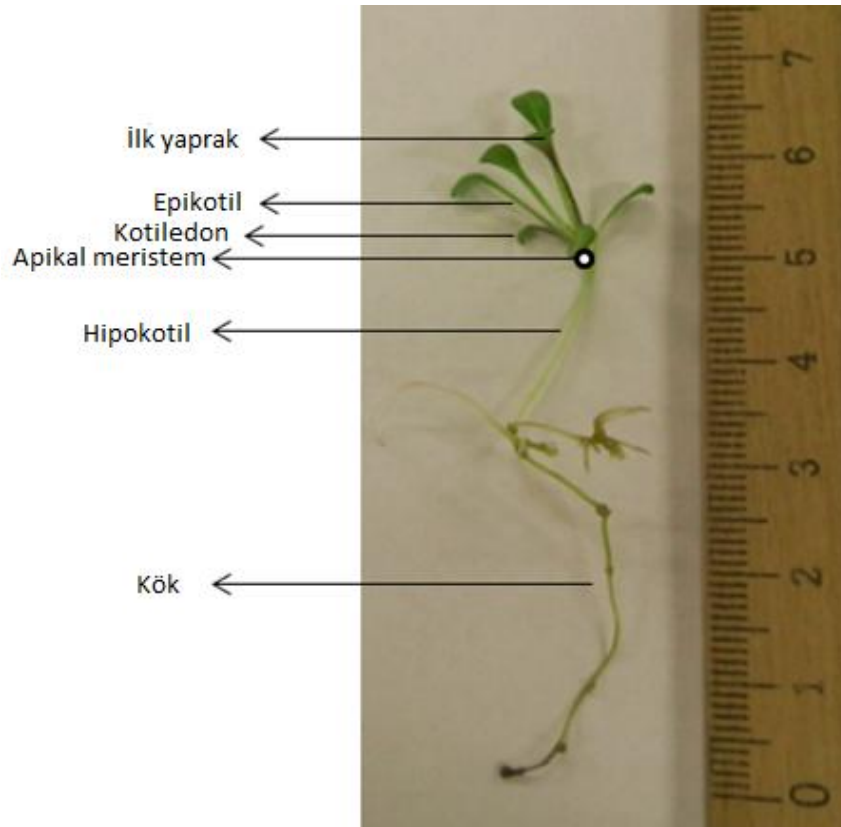


Şekil 4.1 *G. trichosantha* ssp. *trichosantha*'nın genel görünümü.

4.1.1 Eksplantlar

Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamlarına 10-15 tohum ekilerek 30 günlük ve 45 günlük aseptik fideler elde edildi. 30 günlük aseptik fideler; hipokotil 1 cm, kotiledon 0.7 cm, ilk yaprak 1.3 cm, epikotil 1.3 cm, apikal meristem 3 mm ve kök eksplantları 3 cm olmak üzere ortalama 7.5 cm uzunluğundadır.

45 günlük aseptik fideler ortalama 9 cm boyundadır aynı zamanda 30 günlük aseptik fidelerden daha sararmış görünümündedir. 30 günlük aseptik fideden kök (0.5 cm), hipokotil (0.5 cm), apikal meristem (1 mm), kotiledon (ikiye ayrılmış şekilde), epikotil (0.5 cm) ve ilk yaprak eksplantları (ikiye ayrılmış şekilde) alındı. Ön çalışmamızda ayrıca 45 günlük aseptik fidelerden de eksplantlar alındı fakat 30 günlük aseptik fidelerin daha iyi sonuç vermesi nedeniyle çalışmalara 30 günlük aseptik fideler ile devam edildi.



Şekil 4.2 30 günlük aseptik fidenin genel görünümü.

4.2 YÖNTEM

4.2.1 Sterilizasyon

4.2.1.1 Laboratuvar Temizliği ve Sterilizasyonu

Yaptığımız denemeler sterilizasyon üzerine kurulu olduğu için laboratuvar temizliği önemlidir. Steril şartlar altında ekimin yapıldığı yer laminar flow (kabin)dur. Zemin ve kabin çevresi %10'luk ticari sodyum hipoklorit (NaOCl) ile temizlendi. Kabin içi kullanılmadan önce %10'luk NaOCl ile temizlendi. %96'luk etanol ile silindi. Kabinin UV-c lambası açılarak kabinin içinin steril kalması sağlandı.

4.2.1.2 Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Tohum çimlendirmede kullanılan kavanozlar, filtre kağıtları, mezurlar, pens ve bisturiler, ekimde kullanılan petripler, alüminyum folyo otoklavda (121°C'de 20 dk) sterilize edildi.

4.2.1.3 Besin Ortamlarının Sterilizasyonu

Hazırlanan bütün tohum çimlendirme ve kültür ortamları, tohum ve eksplant yıkamada kullanılan distile su otoklavda (121°C'de 20 dk) sterilize edildi.

4.2.1.4 Ekim İçin Kullanılan Tohumların Sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonunu sağlamak için tohumlar %10'luk ticari NaOCl çözeltisi ile 10 dakika muamele edildi ve 3 kez distile su ile durulandıktan sonra %70'lik etil alkolde 1 dakika bekletildi ve 3 kez distile su ile durulandıktan sonra %10'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edildi. Son olarak 3 kez distile su ile durulandı.

4.2.2 MS Ortamı

Hazırlanan stok çözeltilerden gerekli hacimler alınarak MS ortamı hazırlandı. pH ayarı yapıldıktan sonra agar eklendi. Otoklavda 121°C'de 20 dk sterilizasyonu gerçekleştirildi. Stok çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan maddeler çizelgelerde gösterildi.

a) Makro elementler stoğu

Çizelge 4.1 MS ortamında kullanılan makro tuzları.

MAKRO STOK	g/lt (X10)
KNO ₃	19
NH ₄ NO ₃	16,5
CaCl ₂ .H ₂ O	4,4
MgSO ₄	3,7
KH ₂ PO ₄	1,7

Tüm makro tuzlar çizelgedeki (Çizelge 4.1) stok miktarı kadar tartıldı. Balon jodedeki saf suda sırasıyla karıştırılarak manyetik balıkla çözüldü. Hacmi 1 litreye tamamlandıktan sonra koyu renkli bir şişede etiketlenerek buzdolabında saklandı.

b) Mikro elementler stoğu

Çizelge 4.2 MS ortamında kullanılan mikro tuzları.

MİKRO STOK	g/lt (X10)
H ₃ BO ₃	62
KI	8,3
MnSO ₄ .4H ₂ O	168
Na ₂ NaO ₄ .2H ₂ O	2,5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	86
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25

Tüm mikro tuzlar çizelgedeki (Çizelge 4.2) miktar kadar tartıldı. Yarısına kadar saf su dolu bir litrelik balon jodede sırayla karıştırılarak çözüldü. 25 mg kobalt klorür (CoCl₂.6H₂O) ve 25 mg bakırsülfat (CuSO₄.5H₂O) 100 ml saf suda çözüldü. Bu çözültiden alınan 10 ml çözültide önceki karışıma eklendi. Hacmi 1 litreye tamamlandıktan sonra koyu renkli bir şişeye aktarıldı. Etiketlenerek buzdolabında saklandı.

c) Demir stoğu

Çizelge 4.3 MS ortamında kullanılan demir stok.

DEMİR STOK	g/lt (X10)
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,278
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,372

Demir sülfat (FeSO₄.7H₂O) ve sodyum EDTA (Na₂EDTA.2H₂O) çizelgedeki (Çizelge 4.3) miktar kadar tartıldı. Balon jojedeki saf suda sırasıyla karıştırılarak çözdürüldü. Hacmi 1 litreye tamamlandıktan sonra koyu renkli bir şişeye aktarıldı. Etiketlenerek buzdolabında saklandı.

d) Vitamin stok

Çizelge 4.4 MS ortamında kullanılan vitamin stok.

VİTAMİN STOK	g/lt (X10)
Tiamin-HCl	1
Piridoksin-HCl	0,4

Vitaminler çizelgedeki (Çizelge 4.4) miktar kadar tartılarak 1 litre saf suda çözdürüldü. Koyu renkli bir şişeye aktarıldı. Etiketlenerek buzdolabında saklandı.

e) Bitki büyüme düzenleyicilerinin stokları

- 6-benzilaminopürinin (BAP) stok çözelti olarak hazırlanması (mg/ml)

6-benzilaminopürin (BAP) 50 mg tartılıp 100 ml'lik ölçülü bir beherde 2-3 damla saf su içinde ezildi. Çözünmesini sağlamak için 2-3 damla 1M HCl ilave edildi. Çözelti 50 ml distile su ile tamamlandı. Etiketlenerek koyu renkli şişede buzdolabında saklandı.

- 2,4 dikloro fenoksi asetik asitin (2,4-D) stok çözelti olarak hazırlanması (mg/ml)

2,4 dikloro fenoksi asetik asit (2,4-D) 50 mg tartılıp 100 ml'lik ölçülü bir beherde 2-3 damla saf su içinde ezildi. İyice çözünmesini sağlamak için 2-3 damla 1M NaOH ilave edildi. Çözelti 50 ml distile su ile tamamlandı. Etiketlenerek koyu renkli şişede buzdolabında saklandı.

- Indol asetik asitin (IAA) stok çözelti olarak hazırlanması (mg/ml)

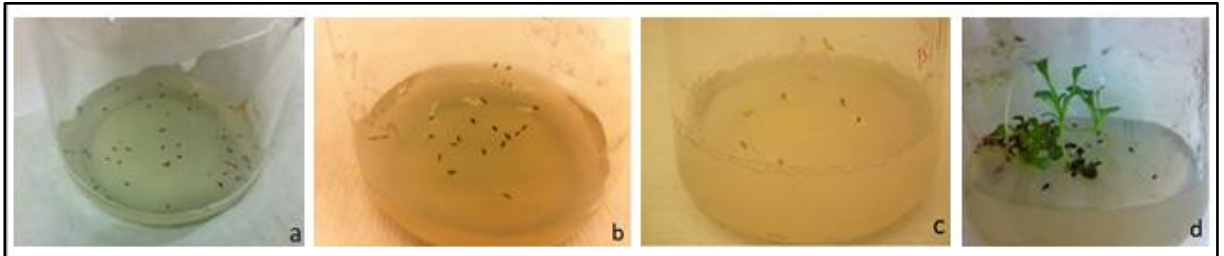
Indol asetik asit (IAA) 50 mg tartılıp 100 ml ölçülü bir beherde 2-3 damla saf su içinde ezildi. İyice çözünmesini sağlamak için 2-3 damla 1M NaOH ilave edildi. Çözelti 50 ml distile su ile tamamlandı. Etiketlenerek koyu renkli şişede buzdolabında saklandı.

f) pH ayarlanması

Kültür için hazırlanan ortamların agarları ilave edilmeden önce pH ayarlaması yapıldı. 1M HCl ve 1M NaOH çözeltileri kullanılarak, ortam pH'sı doku kültürü için en uygun olan 5.9'a ayarlandı. pH ayarı ortam manyetik karıştırıcı üzerinde sürekli karıştırılırken 1M HCl ve 1M NaOH damla damla ilave edilerek yapıldı.

4.2.3 Tohum Çimlendirme Ortamı ve Hazırlanışı

Tohum çimlendirme ortamı olarak bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS (Murashige and Skoog 1962) ortamı kullanıldı (Çizelge 4.1). Ortamlar steril şartlarda kavanozlara dökülüp, tohumlar kavanozlarda çimlendirildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 *G. trichosantha* spp. *trichosantha*'nın MS tohum ortamında çimlendirilmesi. (a); tohumun ekildiği ilk gün, (b); 3 günlük fide, (c); 15 günlük fide, (d); 30 günlük fide.

Tohum çimlendirme (bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS) ortamını hazırlamak için;

- 30 g sakkaroz tartıldı, balon jode çözüldü,
- 100 ml makro stok çözeltisi,
- 10 ml mikro stok çözeltisi,
- 10 ml vitamin stok çözeltisi,
- 10 ml demir stok çözeltisi eklendi,
- Tohum çimlendirmede kullanılan MS ortamı için bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmamıştır,
- 1000 ml'ye tamamlanan çözeltinin pH ayarı 1M HCl ve 1M NaOH kullanılarak yapıldı,
- pH 5.9'a ayarlandı ve 8 g agar eklendi,
- Otoklavda 121°C'de 20 dk sterilize edildi,
- Soğuduktan sonra 7x5x5 cm boyutlarında kavanozlara döküldü.

4.2.4 Kallus Kültür Ortamı ve Hazırlanışı

Hazırlanan stok çözeltilerden uygun hacimlerde alınıp ortam hazırlandı. Kallus oluşumu için farklı konsantrasyonlarda BAP, 2,4-D ve IAA içeren MS ortamı kullanıldı (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 MS ortamında kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonları.

	IAA+BAP (mg/lt)		2,4-D+BAP (mg/lt)
MS1	4 - 1	MS5	0,2 - 0,02
MS2	4 - 2	MS6	0,2 - 0,1
MS3	4 - 3	MS7	0,2 - 0,15
MS4	4 - 5	MS8	0,2 - 0,2

Bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS kültür ortamını hazırlamak için;

- 30 g sakkaroz tartıldı, balon joje içinde çözüldü,
- 100 ml makro stok çözeltisi,
- 10 ml mikro stok çözeltisi,
- 10 ml vitamin stok çözeltisi,
- 10 ml demir stok çözeltisi eklendi,

- Bitki büyüme düzenleyicisi olarak farklı konsantrasyonlarda (Çizelge 4.5) BAP, 2,4-D ve IAA eklendikten sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlandı,
- pH 5.9'a ayarlandı,
- 8 g agar eklendi, otoklavda 121°C'de 20 dk sterilize edildi.
- Ortamlar soğuduktan sonra petrilere döküldü.

Yetişen 30 günlük aseptik fidelerden kök (0.5 cm), hipokotil (0.5 cm), apikal meristem (1 mm), kotiledon (ikiye ayrılmış şekilde), epikotil (0.5 cm) ve ilk yaprak (ikiye ayrılmış şekilde) eksplantları alındı. Bu eksplantlar kallus üretimi için farklı konsantrasyonlarda ve farklı kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren (Çizelge 4.5) MS ortamlarına ekildi. Eksplantlar karanlık ortamda 25±2°C sıcaklık altında kültüre alındı. Üretilen kalluslar 3 haftada bir alt kültüre alınarak çoğaltıldı. Her ortamın farklı eksplantlarında üretilen kallusları birleştirildi. Birinci ve ikinci altkültür ağırlıkları kaydedilerek kallus büyüme indeksi hesaplandı.

Kallus büyüme indeksi şu şekilde hesaplandı (Erçetin vd. 2012):

$$\text{Kallus büyüme indeksi} = \frac{\text{Son ağırlık}}{\text{Başlangıç ağırlığı}}$$

Alt kültüre alırken her bir petride bulunan her 5 eksplant birleştirildi. Kallus büyüme indeksi birleştirilmiş olan eksplantlar dikkate alınarak hesaplandı.

4.2.5 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Preperasyonu

Üretilen kalluslardan preperasyon için kotiledon eksplantlarından oluşan sarı ve siyah kalluslar kullanıldı.

4.2.5.1 Tespit Çözeltilerinin Hazırlanışı ve Tespit

Öncelikle sodyum fosfat tampon çözeltisi (A ve B solüsyonları) hazırlandı:

- a) Sodyum fosfat monobazik (A solüsyonu) hazırlama:

Sodyum fosfat monobazik dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)'dan 36.14 g alındı. Balonjojeye döküldü ve saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı (Çizelge 4.6). Balık yardımıyla manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözünmesi beklendi.

Çizelge 4.6 A solüsyonu.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36.14 g
Saf su	1000 ml

b) Sodyum fosfat dibazik (B solüsyonu) hazırlama:

Disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)'dan 71.70 g alındı. Balonjojeye döküldü ve saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı (Çizelge 4.7). Manyetik yardımıyla karıştırılarak tamamen çözünmesi beklendi.

Çizelge 4.7 B solüsyonu.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	71.70 g
Saf su	1000 ml

c) A+B solüsyonu hazırlama:

A solüsyonundan 280 ml ve B solüsyonundan 720 ml alınarak karıştırıldı (Çizelge 4.8). pH: 7.2 olmalıdır. Çözeltinin pH'ı kontrol edilerek NaOH veya HCl ile pH 7.2'ye ayarlandı.

Çizelge 4.8 A+B solüsyonu.

A solüsyonu	280 ml
B solüsyonu	720 ml
Toplam	1000 ml

Tampon çözelti (A+B) hazırlandıktan sonra tespit çözeltileri hazırlandı:

d) Gluteraldehit (GA) Hazırlanışı:

%25'lik stok gluteraldehitten 12 ml alındı. Tampon çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı (Çizelge 4.9). Böylece %3'lük GA hazırlandı.

Çizelge 4.9 GA hazırlanışı.

Gluteraldehit	12 ml
Tampon çözelti	100 ml

e) Osmiyum Tetraoksit (OsO_4) Hazırlanışı:

0.1 g stok OsO_4 kırıldı ve 10 ml tampon çözeltisi eklenerek karıştırıldı (Çizelge 4.10). Böylece %1'lik OsO_4 hazırlandı.

Çizelge 4.10 OsO_4 hazırlanışı.

Osmiyum Tetraoksit	0.1 g
Tampon çözelti	10 ml

Tespit aşamasında örneklerin:

- %3'lük GA'da 2 saat bekletilerek ilk tespitleri (prefiksasyon) sağlandı,
- GA bir plastik pipet yardımıyla çekildi ve tampon çözeltisi ile iki kez yıkandı,
- Tampon çözelti bir plastik pipet yardımıyla çekildi, 2 saat OsO_4 'in içinde ikinci tespit (postfiksasyon) için bekletildi,
- Tespit işlemi karanlıkta ve $+4^\circ\text{C}$ 'de yapıldı.
- Tekrar tampon çözeltisi ile iki kez yıkandı, tampon çözelti içinde bırakılarak 4°C 'de bir gece bekletildi,
- Ertesi gün tampon çözelti bir plastik pipet yardımıyla çekildi, örneklerin üstüne blok boyama için UA eklendi ve yarım saat blok boyama yapıldı.

4.2.5.2 Dehidrasyon

Örnekler:

- UA'dan alınarak tampon eklendikten sonra %30, 50, 70, 80, 90, 96'lık etil alkolde 30'ar dk bekletildi,
- %100'lük etil alkolde ise iki kere 10 dk bekletildikten sonra
- Propilen oksitte iki kere 10 dk bekletildi.

4.2.5.3 Doyurma

Epon hazırlanışı:

- A karışımı: Epon 812'den 5 ml ve DDSA'dan 8 ml alınarak karıştırıldı (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 A karışımı.

Epon 812	5 ml
DDSA	8 ml
Toplam	13 ml

- B Karışımı: Epon 812'den 8 ml ve NMA'dan 7 ml alınarak karıştırıldı (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 B karışımı.

Epon 812	8 ml
NMA	7 ml
Toplam	15 ml

Bu iki ayrı karışımın içine katılaştırıcı ajan olan DMP-30'dan bir pipet yardımıyla 16 damla eklendi. Manyetik karıştırıcıda karıştırıldı (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 Epon hazırlanışı.

A karışımı	13 ml
B karışımı	15 ml
DMP-30	16 damla

Doyurma aşamasında örneklerin:

- Propilen oksiti çekmeden üzerine reçine (epon) eklendi,
- 2 saat boyunca 15 dk'da bir birer damla epon döküldü,
- Rotary'de örneklerin iyice doyması sağlandı.

4.2.5.4 Gömme

Gömme kalıplarının kuyucukları etiketlenerek hazırlandı. Kuyucuklara epon döküldü ve örnekler epona dikkatlice yerleştirildikten sonra etüvde 30°C’de bir gün, 45°C’de bir gün ve 60°C’de bir gün polimerize edildi.

4.2.5.5 Kesit Alma

Kesitler ultra mikrotom ile 50 nm kalınlığında alındı. TEM’de incelenecek kesitler gümüş-gri (400-600A) ya da altın sarısı (900-1500A) renklerinde olan kesitlerdir. Kesitler kaplı 100 mesh’lik ızgaralar üzerine alındı.

4.2.5.6 Boyama

a) Uranil asetat (UA) hazırlanışı:

0.125 g UA tartıldı. 25 ml saf su ile karıştırıldı (izelge 4.14). Böylece %0,5’lik UA hazırlandı.

Çizelge 4.14 UA hazırlanışı.

Uranil Asetat	0.125 g
Tampon zelti	25 ml

b) SATO’nun hazırlanışı (Sato 1967):

Öncelikle 1N NaOH hazırlandı:

- 4 g NaOH tartıldı ve 100 ml saf su ile çözdürüldü. Böylece %4’lk NaOH hazırlandı.

Çizelge 4.15 SATO’nun hazırlanışı.

Pb-sitrat	0.2 g
Pb-nitrat	0.15 g
Pb-asetat	0.15 g
Na-sitrat	1 g

Çizelge 4.15’de gösterilen boyar maddelerin hepsi belirtilen miktarda tartıldı. 41 ml kaynatılmış saf suyun içine koyulup karıştırıldı. Üzerine 9 ml 1N NaOH eklenerek çözünmesi beklendi. Boya hazırlandıktan sonra gridler üzerine alınan sarı kallus kesitleri 15 dk boyandı. Boyama işleminden sonra saf su ile çok iyi bir yıkama yapıldı.

c) Pb-sitrat hazırlanışı:

Çizelge 4.16 Pb-sitrat hazırlanışı.

Pb-sitrat	1.73 g
Na-sitrat	1.33 g
Saf su	30 ml

Çizelge 4.16’da gösterilen maddelerin hepsi belirtilen miktarda karıştırıldı. Üzerine 8 ml 1N NaOH eklendi. pH 12’e ayarlandı.

Boyamada UA, SATO ve Pb-sitrat boyamaları yapıldı. Tespitten sonra UA’da yarım saat blok boyama yapıldı. Kesit alındıktan sonra sarı kalluslar SATO ile siyah kalluslar Pb-sitrat ile boyandı.

4.2.5.7 TEM’de İnceleme

IAA+BAP içeren ortamlardan elde edilen 3 haftalık sarı kalluslar (kotiledon eksplantı ile üretilen) ve 2,4-D+BAP ortamlarından elde edilen 3 haftalık siyah kalluslar (kotiledon eksplantı ile üretilen) preperasyon ve boyamadan sonra Jeol-JEM-1220 marka ve modelinde olan TEM’de incelendi, mikrografları çekildi.

4.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Aseptik fidelerden alınan eksplantlar petrilere her petride 5’er tane eksplant olacak şekilde ekildi. Bu şekilde 3 tekrar yapıldı. Her petrideki eksplantların, kallus oluşturan eksplantın kallus oluşturmeyen eksplanta oranı hesaplanarak kallus yüzdesi belirlendi. Kallus yüzdesi belirlendikten sonra arksin dönüşümü (Snedecor and Cochran 1967) yapılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Tüm istatistiksel analiz ve hesaplamalar için “SPSS for Windows Ver.

19.0” (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) paket programları ile tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) kullanıldı. Duncan ayırma testi ile gruplar karşılaştırıldı (Duncan 1955). İstatistiksel kararlarda $p < 0,05$ düzeyi anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

BÖLÜM 5

ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ SONUÇLARI

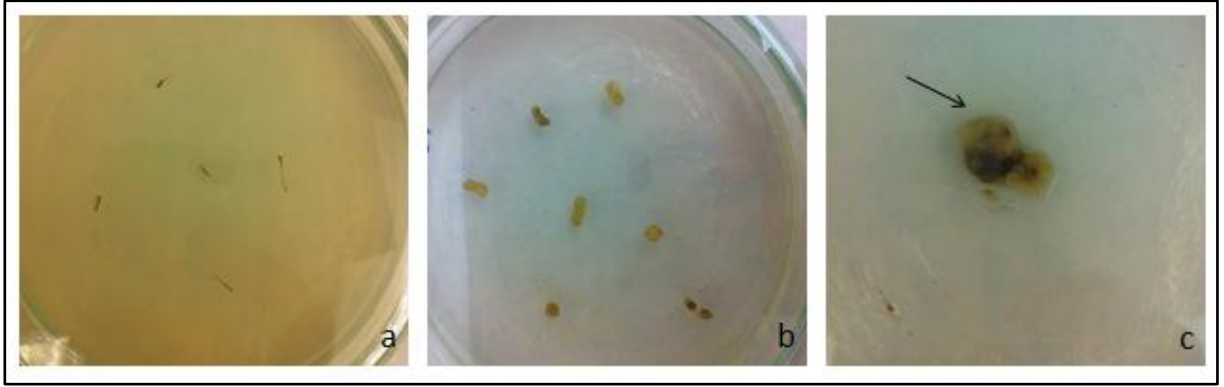
G. trichosantha ssp. *trichosantha*'nın tohumları bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamında %80 başarıyla çimlendirildi. İlk çimlenme 3 gün sonra görüldü. Öncelikle kökler sonra hipokotil ve kotiledonlar oluştu (Şekil 4.3c). 30 ve 45 günlük aseptik fidelerden hipokotil, kotiledon, ilk yaprak, epikotil, apikal meristem ve kök eksplantları alınarak farklı konsantrasyonlarda ve farklı kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS ortamlarına aktarıldı. Eksplantın yaşının kallus yüzdesine etkisi incelendi. Tohum sayısının az olması nedeniyle ön denemelerimize göre bu deneme için IAA+BAP (MS3 ortamı: 4-3 mg/lt) içeren MS ortamı kullanıldı. 30 günlük fidelerden alınan eksplantların 45 günlük fidelerden alınan eksplantlara göre genel olarak daha başarılı cevap verdiği, yüksek yüzdelerde kallus oluşturduğu görüldü. 30 günlük ilk yaprak ve epikotil eksplantlarının kallus oluşturma yüzdesinin 45 günlük olanlara göre daha düşük olduğu belirlendi (Çizelge 5.1). 30 günlük aseptik fidelerden alınan hipokotil, kotiledon, apikal meristem, kök eksplantlarından yüksek yüzdelerde kallus elde edildiği için denemelere daha genç olan 30 günlük aseptik fidelerle devam edildi.

Çizelge 5.1 Aseptik fide yaşının kallus yüzdesine etkisi.

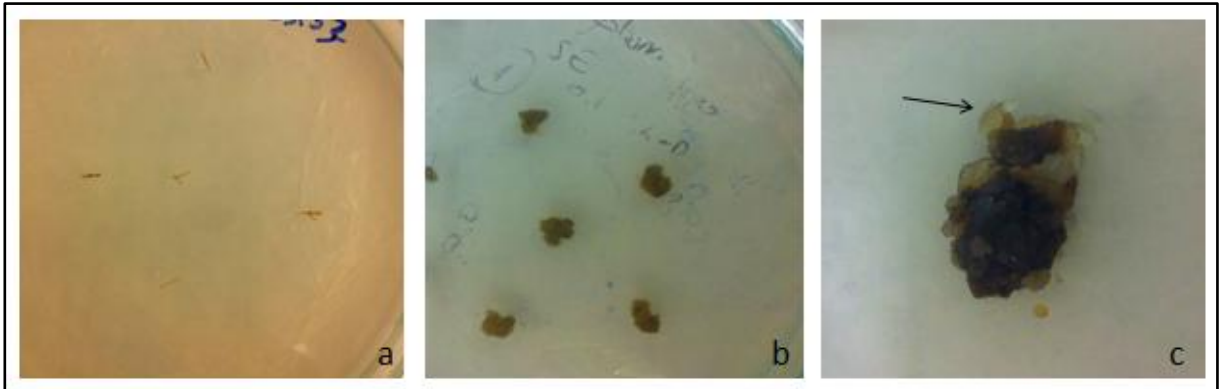
IAA+BAP (4-3 mg/lt)	30 günlük fideler	45 günlük fideler
Hipokotil	83.23± 1.48	60.00± 0.18
Kotiledon	84.26± 0.17	59.00± 0.18
İlk Yaprak	26.39± 0.44	84.56± 0.17
Epikotil	35.05± 0.35	85.26± 0.17
Apikal Meristem	85.76± 0.17	63.77± 0.20
Kök	86.16± 0.17	83.66± 0.17

Ort. ± SH

Bütün ortamlar için bitkinin en hızlı kallus oluşturan eksplantları kök (3 gün sonra), hipokotil (7 gün sonra) ve apikal meristem (7 gün sonra) oldu (Çizelge 5.2). IAA+BAP ve 2,4-D+BAP içeren ortamlarda kalluslar küresel ve düzenli kümelerden oluştu. 2,4-D+BAP içeren ortamlarda kalluslar çoğunlukla siyah renkli olarak gelişmişken (Şekil 5.2) IAA+BAP içeren ortamlarda kalluslar başta sarı renkte görüldü fakat 2. altkültürden sonra kararmaya başladı. Buna rağmen kallus üretimi sona ermeyip hücre bölünmesi devamlılık gösterdi. IAA+BAP içeren ortamlarda siyahlaşmış kalluslar yanında genç açık renkli, küresel kallus oluşumu devam etti (Şekil 5.1).



Şekil 5.1 IAA+BAP içeren ortamlarda *G. trichosantha* ssp. *trichosantha*'nın kalluslarının görünümü. (a); MS3 ortamında kotiledon eksplantının ekildiği ilk gün, (b); eksplantların 2 hafta sonraki kallus görünümü, (c); eksplantlar üzerinde 6 hafta sonra siyahlaşan kallus ve bu kallusun devamlılığını sağlayan genç sarı, beyaz renkli kallusların görünümü.



Şekil 5.2 2,4-D+BAP içeren ortamlarda *G. trichosantha* ssp. *trichosantha*'nın kalluslarının görünümü. (a); MS8 ortamında kotiledon eksplantının ekildiği ilk gün, (b); eksplantların 2 hafta sonraki kallus görünümü, (c); eksplantlar üzerinde 6 hafta sonra siyahlaşan kallus ve bu kallusun devamlılığını sağlayan genç sarı, beyaz renkli kallusların görünümü.

IAA+BAP içeren MS ortamlarında Çizelge 5.2’de görüldüğü gibi aseptik fideden alınan her bir eksplantın kallus yüzdesi hesaplandı. IAA+BAP içeren MS ortamlarında hipokotil eksplantı açısından en başarılı ortamın MS3 olduğu en zayıf ortamın ise MS1 olduğu görüldü. Kotiledon eksplantı açısından en başarılı ortamın MS4 olduğu en zayıf ortamın MS3 olduğu görüldü. İlk yaprak açısından en başarılı ortamın MS3 ortamı olduğu en zayıf ortamın ise MS2 olduğu görüldü. Epikotil eksplantı açısından en başarılı ortamın MS3 olduğu en zayıf ortamın MS2 olduğu görüldü. Apikal meristem eksplantı açısından en başarılı ortamın MS2 olduğu en zayıf ortamın MS1 ve MS3 olduğu görüldü. Kök eksplantı açısından en başarılı ortamın MS2 olduğu en zayıf ortamın ise MS4 olduğu görüldü (Çizelge 5.2).

2,4-D+BAP içeren MS ortamlarında hipokotil eksplantı açısından en başarılı ortamın MS8 olduğu en zayıf ortamın ise MS7 olduğu görüldü. Kotiledon eksplantı açısından en başarılı ortamın MS8 olduğu en zayıf ortamın ise MS7 olduğu görüldü. İlk yaprak eksplantı açısından en başarılı ortamın MS7 olduğu en zayıf ortamın MS5 olduğu görüldü. Epikotil eksplantı açısından en başarılı ortamın MS8 olduğu en zayıf ortamın ise MS7 olduğu görüldü. Apikal meristem eksplantı açısından en başarılı ortamın MS8 olduğu en zayıf ortamın ise MS7 olduğu görüldü. Kök eksplantı açısından en başarılı ortamın MS5 en zayıf ortamın ise MS7 olduğu görüldü (Çizelge 5.2).

İstatistiksel analiz sonuçlarına göre bütün eksplantların kallus oluşturma yüzdesi 2,4-D+BAP içeren ortamlar ile karşılaştırıldığında en yüksek IAA+BAP içeren ortamlarda gerçekleşti.

Çizelge 5.2 *G. trichosantha* ssp. *trichosantha*’nın 1.alt kültürde bitki büyüme düzenleyicilerinin her bir eksplanttaki kallus yüzdesine etkisi.

Ortam isimleri	Hipokotil	Kotiledon	İlk Yaprak	Epikotil	Apikal Meristem	Kök
IAA+BAP						
MS1	39.23± 0.33 ^d	63.77± 0.20 ^b	45.08± 0.41 ^b	45.10± 0.41 ^c	29.99±0.38 ^c	82.16± 0.91 ^b
MS2	45.10± 0.41 ^c	50.75± 0.35 ^c	21.76±0.47 ^d	35.24± 0.34 ^d	54.69±0.34^a	83.40± 1.01^a
MS3	83.56± 1.01^a	45.10± 0.41 ^d	45.10± 0.41^a	63.77± 0.20^a	29.99±0.38 ^c	70.46± 0.52 ^c
MS4	63.77± 0.20 ^b	83.16± 1.01^a	35.24± 0.34 ^c	50.75± 0.35 ^b	54.69±0.34 ^b	52.23± 0.34 ^d
2,4-D+BAP						
MS5	84.56± 0.17 ^a	34.92± 0.47 ^c	26.50± 0.62 ^d	83.56± 0.17 ^b	83.56±0.17 ^b	84.56± 0.17^a
MS6	45.10± 0.41 ^b	35.05± 0.7 ^b	35.07± 0.35 ^c	35.07± 0.35 ^c	45.10±0.41 ^c	45.10± 0.41 ^c
MS7	39.23± 0.33 ^c	21.96±0.47 ^d	84.56± 0.17^a	26.79± 0.62 ^d	33.27±0.47 ^d	25.45± 0.62 ^d
MS8	84.56± 0.17^a	37.11±0.20^a	45.10± 0.41 ^b	84.56± 0.17^a	84.56±0.15^a	63.77± 0.20 ^b
Ort. ± SH						

IAA+BAP içeren ortamlarda kallus yüzdesi açısından en başarılı ortamın MS3 olduğu en zayıf ortamın ise MS1 olduğu görüldü. Kallus büyüme indeksi açısından birinci alt kültür için en başarılı ortamın MS3 ve MS4 olduğu en zayıf ortamın MS2 olduğu görüldü. İkinci alt kültür için en başarılı ortamın MS3 en zayıf ortamın MS1 olduğu görüldü (Çizelge 5.3).

2,4-D+BAP içeren ortamlarda kallus yüzdesi açısından en başarılı ortamın MS8 olduğu en zayıf ortamın ise MS7 olduğu görüldü. Kallus büyüme indeksi açısından birinci alt kültür için en başarılı ortamın MS8 olduğu en zayıf ortamın MS5 olduğu görüldü. İkinci alt kültür için en başarılı ortamın MS6 en zayıf ortamın MS5 ve MS7 olduğu görüldü (Çizelge 5.3).

Kallus büyüme indeksi açısından 1. altkültürde IAA+BAP içeren ortamlarda en başarılı ortam MS3 ve MS4 olmuştur. 2,4-D+BAP içeren ortamlarda en başarılı ortam MS8 olmuştur. Kallus büyüme indeksi açısından 2. altkültürde ise IAA+BAP içeren ortamlarda en başarılı ortam MS3 olmuştur. 2,4-D+BAP içeren ortamlarda en başarılı ortam MS6 olmuştur (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.3 *G. trichosantha* ssp. *trichosantha*'nın *in vitro* kültüründe bitki büyüme düzenleyicileri, birleştirilmiş haldeki eksplantların kallus yüzdeleri ve kallus büyüme indeksleri.

Ortam isimleri	Hormon konsantrasyonları (mg/lt)	Kallus yüzdesi	Kallus büyüme indeksi (1. Altkültür)	Kallus büyüme indeksi (2. Altkültür)
IAA+ BAP				
MS1	4- 1	42.75± 0.64	0,95	0,82
MS2	4- 2	52.23± 0.34	0,94	1,52
MS3	4- 3	66.39± 0.56	0,98	2,16
MS4	4- 5	52.06± 0.34	0,98	1,39
2,4-D+ BAP				
MS5	0,2- 0,02	54.69± 0.34	0,63	10,80
MS6	0,2- 0,1	37.11± 0,20	0,76	27,17
MS7	0,2- 0,15	28.11± 0.16	0,46	10,38
MS8	0,2- 0,2	56.02± 2.99	0,78	13,04

Ort. ± SH

5.2 ELEKTRON MİKROSKOBU SONUÇLARI

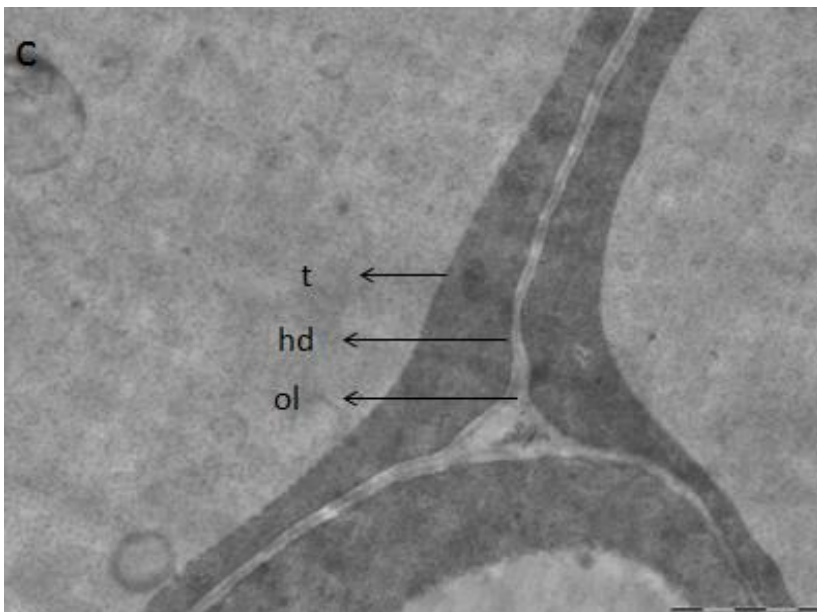
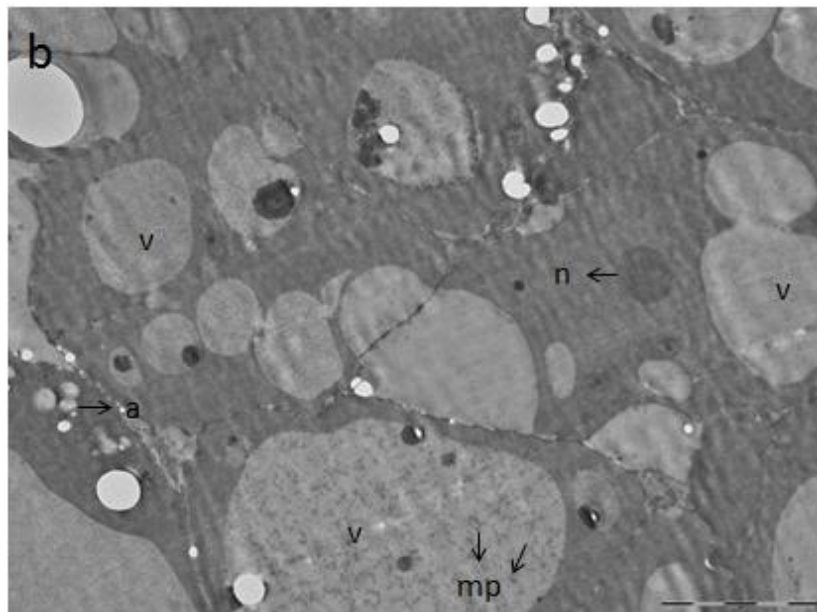
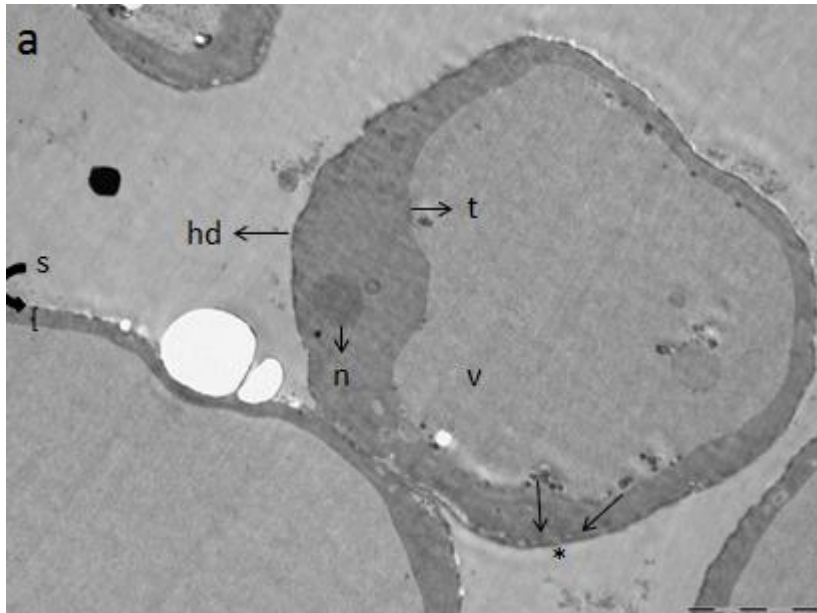
IAA+BAP içeren ortamlardan elde edilen sarı kalluslar (Tip 1) ve 2,4-D+BAP içeren ortamlardan elde edilen siyah kalluslar (Tip 2) TEM'de incelendi.

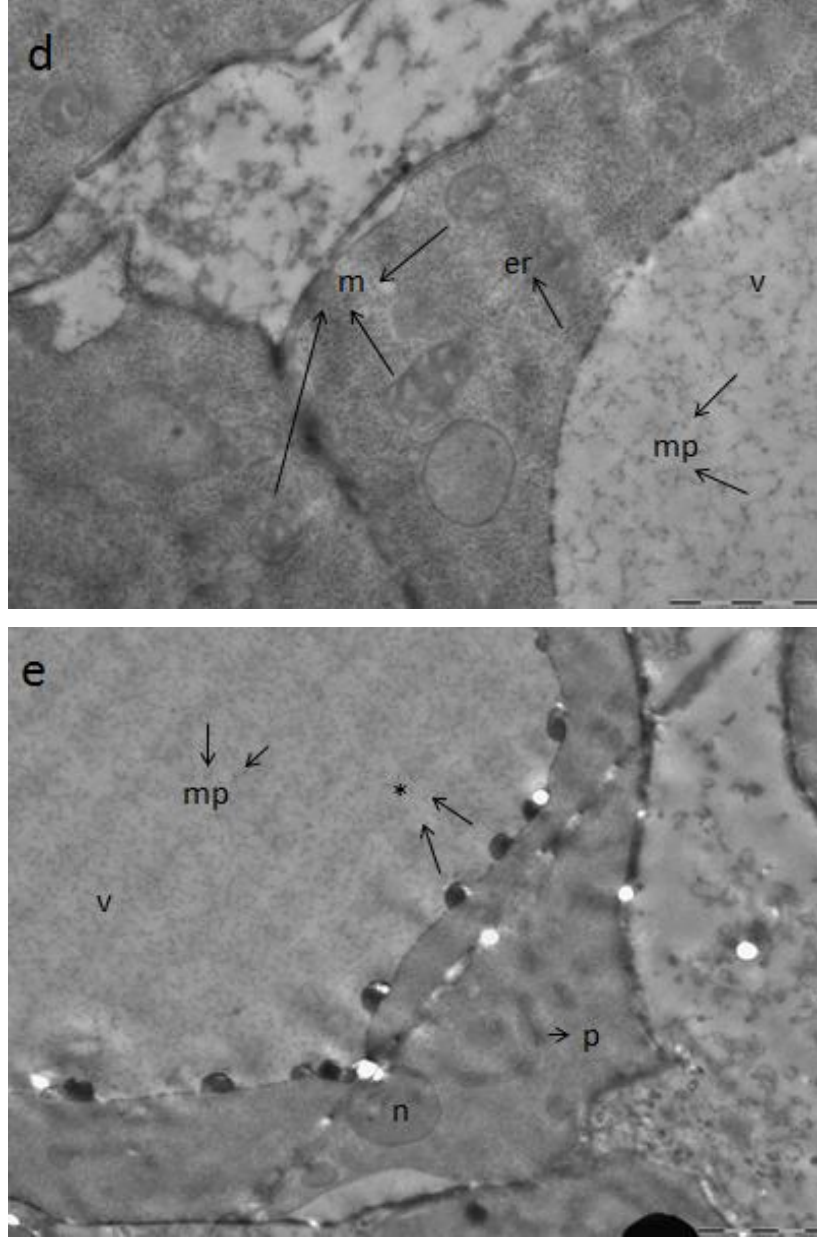
5.2.1 Tip 1 Kallus Hücrelerinin İnce Yapısı

Tip 1 kalluslarda büyük küresel parankimatik kallus hücreleri görüldü (Şekil 5.3a). Bu hücrelerde genelde bir tane nükleus, her nükleusta ise bir tane nükleolus bulunmaktadır (Şekil 5.3b). Nükleus vakuoller küçükken merkezdeyken vakuoller büyüdükçe çepere doğru itilmektedir. Plazma membranı pürüzsüzdür (Şekil 5.3c). Orta lamel net görülmekte ve hücre sınırları belirgindir (Şekil 5.3c). Hücreler arası boşluklarda farklı birikimler görülmektedir. Zira yakın bölgelerde granüllü endoplazmik retikulum vardır fakat katmanlı değildir (Şekil 5.3d).

Tip 1 kalluslarda hücreler büyük vakuollere sahiptir. Vakuollerde genelde tonoplasta bitişik elektron yoğun damlacıklar görülmektedir (Şekil 5.3a). Vakuoller içinde zar parçaları vardır (Şekil 5.3b). Vakuoller büyük ve çok miktarda su depo ettiği için sitoplazma hücre duvarı ve tonoplast arasında sıkışmıştır (Şekil 5.3c). Hücreler küçükken çok sayıda olan vakuoller hücreler büyüdükçe birbirleriyle birleşmektedir. Farklı büyüklüklerde proplastidler vardır. Vakuoller büyüdükçe hücrede nişasta depo edilip proplastidler amiloplasta dönüşmektedir (Şekil 5.3b). Her bir kallus hücresinde içinde nişasta taneleri bulunan amiloplastlar birkaç adet bulunmaktadır.

Tip 1 kallus hücrelerinde sitoplazmada küresel şekilli çok sayıda mitokondri bulunmaktadır (Şekil 5.3d). Mitokondriler çoğunlukla küreseldir. Hepsinde kristalar şişkindir. Bölünen mitokondriler görülmektedir. Sitoplazmada bol miktarda ribozom vardır. Bölünen plastidler görülmektedir (Şekil 5.3e).





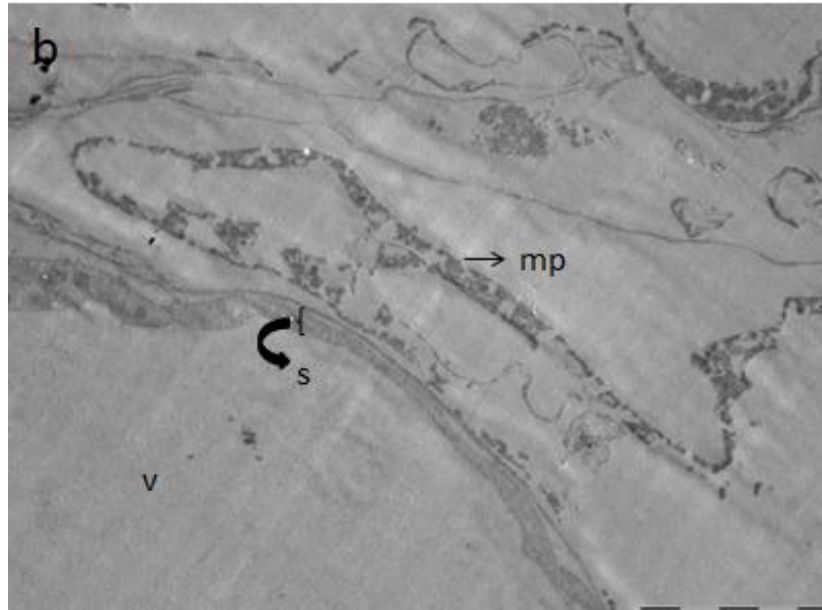
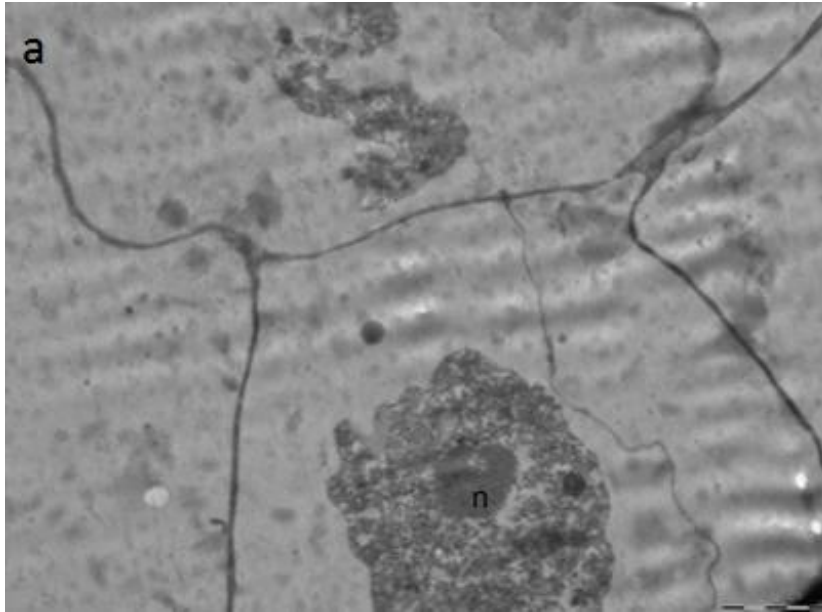
Şekil 5.3 IAA+BAP içeren ortamlardan elde edilen sarı kallusların ince yapısı. (a); küresel hücrelerin görünümü, bar=5 μ m, (b); nükleus ve vakuollerin görünümü, bar=5 μ m, (c); orta lamelin görünümü, bar=2 μ m, (d); mitokondrilerin görünümü, bar=1 μ m, (e); bölünen plastitlerin görünümü, bar=2 μ m'dir (hd: hücre duvarı, t: tonoplast, n: nükleus, v: vakuol, *: elektron yoğun damlacıklar, s: sitoplazma, a: amiloplast, mp: membran parçaları, ol: orta lamel, m: mitokondri, er: endoplazmik retikulum, p: plastid).

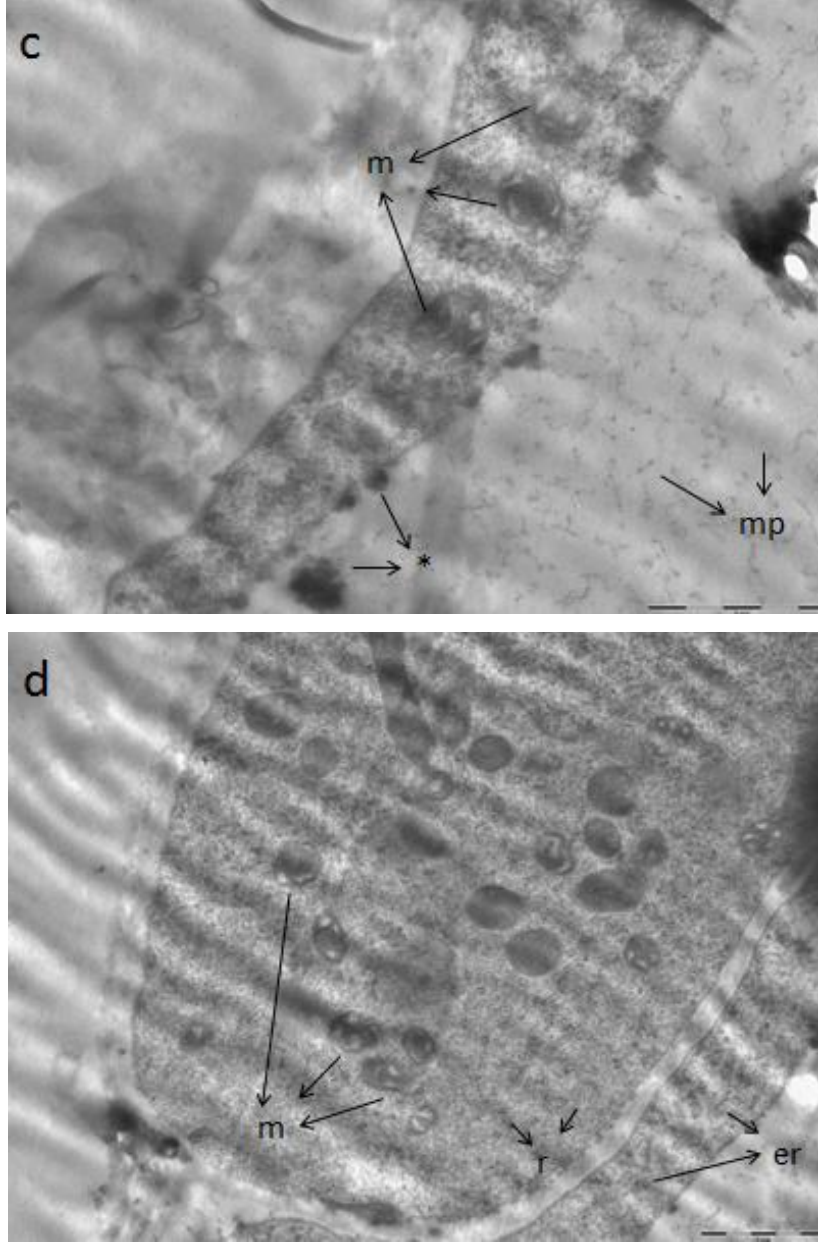
5.2.2 Tip 2 Kallus Hücrelerinin İnce Yapısı

Tip 2 kalluslarda büyük ve küresel hücreler görüldü (Şekil 5.4a). Tip 1 kalluslarda olduğu gibi genelde bir tane nükleus bulundu. Nükleus genellikle bir nükleolus bulundurmaktadır.

Nükleus dalgali bir görünümündedir. Hücre sınırları bazı hücrelerde belirginken bazılarında belirgin değildir. Hücre içe doğru çökmüş görünmektedir (Şekil 5.4a).

Tip 2 kalluslarda nadiren vakuoller vardır. Vakuoller plazmoliz olmuştur. Küresel kallus hücreleri bulunduğu gibi, şekli düzgün olmayan uzamış gibi görünen hücreler de görüldü (Şekil 5.4b). Tip 2 kalluslarda çok sayıda mitokondri vardır. Mitokondiriler çoğunlukla küresel bazıları eliptiktir. Hepsinde kristalar şişkindir (Şekil 5.4d). Vakuollerde elektron yoğun damlacıklar görüldü. Sitoplazmada bol miktarda ribozom vardır (Şekil 5.4c).





Şekil 5.4 2,4-D+BAP içeren ortamlardan elde edilen siyah kallusların ince yapısı. (a); küresel hücrelerin görünümü, bar=2 μ m, (b); plazma membranının görünümü, bar=5 μ m, (c); mitokondrilerin görünümü, bar=1 μ m, (d); ribozomlar ve endoplazmik retikulumun görünümü, bar=1 μ m'dir. (n: nükleus, *: elektron yoğun parçalar, s: sitoplazma, mp: membran parçaları, m: mitokondri, r: ribozomlar, er: endoplazmik retikulum).

Mikrograflarda en dikkat çeken nükleuslardır. Sarı kalluslardaki nükleus dairesel ve pürüzsüzken (Şekil 5.3a) siyah kalluslardaki nükleusların şekli bozulmuş olarak görüldü (Şekil 5.4a). Sarı kalluslar ile siyah kalluslar arasındaki nükleus çapları karşılaştırıldı. Sarı kallusların nükleus çapları ortalama 10 μ m'lik barda 7,12 μ m, siyah kallusların nükleus çapları ortalama 10 μ m'lik barda 9,61 μ m olduğu belirlendi.

BÖLÜM 6

TARTIŞMA

Çalışmamızda *G. trichosantha* ssp. *trichosantha*'nın tohumları başarıyla çimlendirildi. Elde edilen 30 günlük aseptik fidelerden eksplantlar alınarak bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS ortamlarına ekilerek kallus üretimi gerçekleştirildi.

Başta genotipik varyasyon olmak üzere çeşitli faktörler kültüre alınan eksplantın davranışını etkileyebilir (Babaoğlu et al. 2001). Bunlar doku kaynağı olarak kullanılan organlar ve organların ontogenik ve fizyolojik yaşı olabilir. Hipokotil, kotiledon, ilk yaprak, epikotil, apikal meristem ve kök eksplantlarının hepsi kallus elde etmemizde başarılı oldu. Fakat bunların içinde kök en başarılı sonuç veren eksplant oldu. Diğer eksplantlar daha geç kallus oluşturdu. Çalışmamızda IAA+BAP içeren ortamlara hem 30 günlük hem de 45 günlük fidelerden ekim yaparak eksplantın yaşının kallus potansiyeline etkisi incelendi. 30 günlük fidelerden alınan eksplantların 45 günlük fidelerden seçilen eksplantlara göre genel olarak daha hızlı ve daha çok kallus oluşturduğu görüldü (Çizelge 5.1). Bertsoyklis et al. (2003)'nin yaptığı çalışmada *G. alypum* L. türünden elde ettikleri 60 günlük aseptik fidelerden kallus oluşturmada başarılı olmuştur. Fakat bizim çalışmamızda *G. trichosantha* ssp. *trichosantha*'nın iki aylık aseptik fideleri sarardı. Bu yüzden 30 günlük aseptik fidelerin daha uygun olduğu görüldü. Aseptik fidelerden elde edilen eksplantlardan denemeler için yeterli miktarda kallus üretilmediği için çalışmamıza 30 günlük aseptik fidelerden devam edildi.

Yaptığımız çalışmada kallus kültürü başarıyla gerçekleştirildi. Oluşturduğumuz kalluslar IAA+BAP içeren ortamlarda başlangıçta sarı renkliydi ve ikinci altkültürden sonra siyahlanma gösterdi. 2,4-D+BAP içeren ortamlarda ilk haftada siyahlaşma gerçekleşerek büyüme bu şekilde devam etti. Fakat kültürlerde nekroz gelişmedi, siyah renkli kallusların yanında yeniden kallus oluşumu gerçekleşti. Dolayısıyla kallus kültürü devamlılık gösterdi ve

kallus cevabı olarak kallus yüzdesi ve kallus büyüme indeksi hesaplanabildi (Çizelge 5.2, Çizelge 5.3).

Kallus yüzdesi sonuçlarına göre IAA+BAP içeren MS3 ortamının 2,4-D+BAP içeren ortamlara göre daha başarılı sonuç verdiği belirlendi (Çizelge 5.2). Kallus büyüme indeksi sonuçlarına göre 2,4-D+BAP içeren ortamların IAA+BAP içeren ortamlara göre daha başarılı sonuçlar verdiği belirlendi. 2,4-D+BAP içeren ortamlar birinci alt kültüre göre kallus artışını 10-27 kat oranında ikinci alt kültürde gerçekleştirdi. 2,4-D+BAP içeren ortamlarda en başarılı ortam MS8' dir. IAA+BAP içeren ortamlarda ise yaklaşık 1-2 arasında oran artışı görüldü (Çizelge 5.3). 2,4-D oksin olarak kullanıldığında BAP düşük konsantrasyonlarda etkili olmuşken IAA oksin olarak kullanıldığında BAP yüksek konsantrasyonlarda sarı kallus üretmiş ama miktar artışında yeterince başarılı olamamıştır.

Yapılan literatür taramasına göre *G. trichosantha* ssp. *trichosantha* hakkında doku kültürü çalışması bulunmamaktadır. Bertsouklis et al. (2001) *G. alypum* L.'nin tohumlarını yarı katı (8 g/lt agar) ve katı 20 g/lt agar) MS ortamlarında çimlendirmiştir. Rejenerasyon ortamını ise NAA ve BAP'ın çeşitli konsantrasyonlarını deneyerek hazırlamışlardır. Aynı zamanda pH: 5.7 olarak ayarlamışlardır. Tohumların MS ortamında daha hızlı ve daha güçlü çimlendiğini görmüşlerdir. 8 gr/lt agar olan ortamlarda ise kök oluşumu sağlanıyorken, sürgünlerde hiperhidritasyon problemi ile karşılaşmışlardır. Fakat agar oranını arttırarak hiperhidritasyonu elemine etmişlerdir. Araştırmacılar NAA ve BAP içeren ortamları deneyerek kallus oluşumu gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda ise araştırmacılarla benzer olarak 8 g/lt agar kullanıldı, fakat yarı katı MS ortamı kullanılmasına rağmen araştırmacıların tersine fidelerde hiperhidritasyon görülmedi. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri (IAA+BAP ve 2,4-D+BAP) ile yaptığımız çalışmada hiperhidritasyon problemi görülmedi fakat 2,4-D+BAP kullanılarak üretilen kalluslarda siyahlaşmalar gözlemlendi. Aynı zamanda denemelerimizde Bertsouklis ve arkadaşlarından farklı olarak 30 g/lt sükroz kullanıldı, pH: 5.9'a ayarlandı. Yaptığımız çalışmada Çizelge 5.2'ye göre kallus yüzdesi açısından en iyi ortam IAA+BAP içeren MS3 ortamı oldu. Çizelge 5.3'ye göre birinci alt kültür için kallus indeksi açısından en iyi ortam IAA+BAP içeren MS3 ve MS4 ortamlarıyken ikinci alt kültür için 2,4-D+BAP içeren MS6 ortamı oldu.

Sarı kallusların (Tip 1) ve siyah kallusların (Tip 2) üretiminden sonra kallusların ince yapısını incelemek ve siyahlaşmanın nedenine bir cevap bulabilmek için TEM ile inceleme yapıldı.

Tip 1 ve 2’de kallus hücreleri büyük ve tek nükleusludur. Her iki kallus tipinde de vakuollerin büyük olması dikkat çekicidir. Vakuoller çeşitli proteinlerin, şekerlerin, CO²’in, suyun depo edildiği organeldir. Aynı zamanda bitkinin turgorunu düzenler (Marty 1999). Farklı bitki türlerinde de kallus hücrelerindeki vakuollerin büyük olması görülen bir durumdur (Gnanapragasam and Vasil 1992, Wang et al. 1998). Aynı zamanda çalışmamızda sitoplazmada bol miktarda kristaları şişkin mitokondri görüldü. Kallus hücrelerinde bulunan mitokondrilerde görülen bir durumdur (Urbanek et al. 2004). Bu bilgi ışığında *G. trichosantha* ssp. *trichosantha*’nın fazla miktarda enerjiye ihtiyaç duyduğu belirtilebilir (Doorn et al. 2011).

Laukkanen et al. (2000) çalışmalarında kallus gelişiminden iki hafta sonra kallusların karardığını görmüşlerdir. Kara kallus oluşmasının nedenini hücrede biriken fenollerin oksidasyonu olarak açıklamışlardır. Elde ettikleri TEM mikrograflarında gördükleri siyah damlacıkları fenol olarak belirlemişlerdir. Tang et al. (2004) yaptıkları kültür çalışmasında kararmanın nedeni olarak oksidatif stresi göstermişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada hücrelerde bazı elektron yoğun damlacıklar tonoplasta yapışık görüldü. Bu damlacıkların tanımı yapılamadı fakat kararmanın nedeni olabileceği düşünüldü. Aynı zamanda sarı kalluslarda görülmeyen şekil bozukluğu görülen hücelere siyah kalluslarda rastlandı.

Çalışmamızda nükleuslar açısından sarı ve siyah kalluslar arasında hem ölçüt ve hem de görüntü bakımından farklar vardır. Araştırmacılar nükleuslardaki değişimin sebebini çeşitli faktörlere dayandırır: senesens ya da elistörler (Woolhouse 1984, Lingua et al. 2001). Yaptığımız çalışmada siyah kalluslardaki hücre devamlılığı sona ermedi. Fakat nekroza uğramış hücreler ile canlı hücreler kalluslarda yan yana gelişim göstermektedir. Ayrıca bitkiye ya da kalluslara elistör uygulanmadı. Sarı ve siyah kalluslardaki nüklear değişimlere cevap bulmak için kapsamlı bir çalışma yapılmalıdır. Siyahlaşma etkeni olarak düşündüğümüz fenollerin oksidasyonu siyah kalluslarda nükleus şekil bozukluğu, nükleus büyüklüğü sonuçlarının ortaya çıkmasına sebep olmuş olabilir. Ya da kalluslar sarı renkten siyah renge dönüşürken kademeli olarak hücresel yaşlanma gerçekleşmiş olabilir.

Gnanapragasam and Vasil (1992) *Panicum maximum* bitkisinin hücre süspansiyon kültürü sırasında hücrede meydana gelen değişimleri incelemişlerdir. İnce kesitleri dondurarak almışlardır. Hücreleri dondurmadan önce koruyucu olarak mannitol, DMSO, sorbitol kullanmışlardır. -40°C’ye gelmeden önce ise hücreleri sıvı nitrojene transfer etmişlerdir.

Hücreleri %4'lük GA'da tespit ettikten sonra 0.1M sodyum kakodilat tamponunda yıkamışlar ve sonra %2'lik OsO₄ ile fikse ettikten sonra tekrar tampon çözeltisine almışlardır. Daha sonra örnekleri Spurr's reçinesine gömmüşlerdir. Örnekleri kurşun sitrat ile 15 dk boyamışlardır. Araştırma sonucu olarak mannitoldeki hücrelerde nükleus ve büyük vakuoller görmüşlerdir. Plazma membran pürüzsüzdür. Hücreler daha küçük ve yoğun sitoplazmalıdır. Hücrelerde şişkin organeller ve sitoplazmada düz endoplazmik retikulum ve membranlı yapılar gözlenmiştir. -10°C'ye indikçe mitokondri hacmi ve endoplazmik retikulum artmıştır. Bizim çalışmamızda her iki kallus tipinde hücrelerin ince kesitleri ultramikrotomda alınmıştır. Tespit çözeltisi olarak %3'lük GA, %1'lik OsO₄ ve reçine olarak epon kullanıldı. Kesitler benzer şekilde boyandı. Hücre süspansiyonunda hücrelerde bizim kalluslarımızda gözlediğimiz gibi büyük vakuoller gözlemiştir. Sitoplazmada granüllü ER vardır. Kristalları şişkin olan mitokondriler belirgindir.

Jasik et al. (1995) *Pinus nigra* bitkisinin erken gelişim aşamasında olan zigotik embriyolarını içeren megagametofitleri üzerinden embriyonik kalluslar elde etmişlerdir. Kallusları %3'lük GA'da tespit ettikten sonra 0.2M fosfat tamponunda yıkamışlar ve sonra %1'lik OsO₄ ile fikse ettikten sonra tekrar tampon çözeltisine almışlardır. Örnekleri Durcupan ACM'ye gömmüşler ve kurşun sitrat ile boyamışlardır. Erken somatik embriyoların kallus kültürünü yaparak bu hücrelerin anatomisini ve ince yapısını incelemişlerdir. Embriyogenezin tüm aşamalarında embriyolar bipolar organize olmuşlardır. Yoğun sitoplazmalı izodiametrik hücre içeren parçalarda vakuol miktarı fazladır. Vakuollenmiş hücreler senesense uğramıştır. Sitoplazmaca yoğun hücreler ve türevleri transversal olarak bölünmüştür. Erken embriyonal hücre kütlesi uzunluğuna bölünmüştür. Hücrelerin ince yapısında ise plazmodezmalın sayısı ve hücre duvar kalınlığına bakmışlardır. Bizim çalışmamızda ise bu çalışmadaki metottan farklı olarak gömme maddesi olarak epon kullanıldı. Hem sarı kalluslarda hemde siyah kalluslarda hücreler küreseldir. Her iki kallus tipinde de sitoplazma vakuol ve hücre duvarı arasına sıkışmış haldedir. Vakuoller çok büyük olarak gözlemlenmiştir.

Wang et al. (1998) *Allium sativum* bitkisinin yapraklarının kallus oluşumu sırasında kallusdaki nüklear yapının değişimini incelemişlerdir. Örnekleri %1'lik OsO₄ ile 2 saat bekletmişlerdir, 0.2M ve pH 7.2 olan fosfat tamponunda yıkamışlar. Dehidrasyonda aseton kullanmışlardır. Daha sonra örnekleri epona gömmüşlerdir. Kallusların gelişimi sırasında birkaç farklı hücre tipi görmüşlerdir: büyük vakuollü hücreler, aktif faz hücreleri, bölünen hücreler ve kallus hücreleri. Büyük vakuollü hücrelerde nükleus küçük olmakla birlikte

vakuol ve hücre duvarı arasında görülmüştür. Aktif faz hücrelerinde nükleus hücre duvarından sitoplazmaya hareket ediyor olarak görülmüştür. Bölünme sırasında nükleus hücre duvarının hemen yanına yerleşmiş olarak veya hücrenin merkezinde görülmüştür. Kallus hücrelerinde nükleus çok büyüktür, birçok nüklei daireseldir fakat bazı nükleide zarf oluşumu gözlemlenmemiştir. Bizim çalışmamızda ise ilk tespit için %3'lük GA kullanıldı. Dehidrasyon için ise etanol kullanıldı. Her iki tip kallusta büyük vakuollü hücrelerde nükleus küçük olmakla birlikte vakuol ve hücre duvarı arasında sıkışmış halde görüldü.

Urbanek et al. (2004) *Cucurbita pepo* L. bitkisinin kotiledon kalluslarından somatik embriyo üretmişlerdir. Kallusları %2.5'lük GA ile tespit etmişler, fosfat tamponu kullanmışlardır. Posfiksasyonu %1'lik OsO₄ ile sağlamışlardır. Dehidrasyonda aseton kullanmışlardır. Kallusların TEM'de ince yapısını incelemişlerdir. Büyük nükleoluslu kallus hücrelerinde çok miktarda plastid ve şişkin kristalleri bulunan mitokondri belirlemişlerdir. Aynı zamanda endoplazmik retikulumu nükleus etrafında bol miktarda görmüşlerdir. Bizim çalışmamızda ise tespit çözültisi olarak %3'lük GA ve dehidrasyon çözültisi olarak etanol kullanıldı. Kallus örnekleri TEM'de belirlendi. Araştırmacıların yaptığı çalışmaya benzer olarak her iki kallus hücrelerinin sitoplazmasında bol miktarda mitokondri görüldü. Fakat plastid ve endoplazmik retikuluma çok sayıda rastlanmadı.

Stein et al. (2010) *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* bitkisinin anter, ovaryum, yaprak ve nodal segmentlerinden kallus kültürü yaparak bu kalluslardan preperasyon yapmışlardır. Kallusları Karnovsky (%2.5'lük GA ve %2.5 paraformaldehit) çözültisi ve %1'lik OsO₄ çözültisinde tespit etmişler, dehidrasyonu aseton ile yapmışlardır. Gömme maddesi olarak Spurr reçinesi kullanmışlardır. Sitoplazmanın yoğun ve bol miktarda endoplazmik retikuluma sahip olduğu görülmüştür. Büyük bir nükleus ve nükleolus vardır. Büyük bir vakuol olduğu için sitoplazma hücre membranı ve tonoplast arasına sıkışmış haldedir. Bizim çalışmamızda ise tespit çözültisi olarak %3'lük GA ve dehidrasyon çözültisi olarak etanol kullanıldı. Kallus örnekleri TEM'de incelendi. Araştırmacıların yaptığı çalışmadan farklı olarak her iki kallus hücrelerinde de az miktarda endoplazmik retikulum görüldü. Benzer olarak ise sitoplazma mitokondrice zengindi. Nükleus ve nükleolusa sahip hücreler belirlendi. Sarı kalluslarda vakuollerin büyük siyah kalluslarda ise vakuollerin küçük ve çok sayıda olduğu belirlendi.

Ribeiro et al. (2012) muz bitkisinin kalluslarından preperasyon yapmışlardır. Bu kallusların morfolojik ve ince yapısını incelemişlerdir. Kallusları Karnovsky (%2.5 GA ve %2.5

paraformaldehit) çözeltisi ve %1'lik OsO₄ çözeltisinde tespit etmişler ve TEM ve SEM'de ince yapısını incelemişlerdir. Sulu kallus, küçük kümeli sarı kallus ve büyük kümeli sarı kallus olmak üzere üç tip kallusun ince yapıları üzerindeki farkları incelemişlerdir. SEM'de sulu kallus hücrelerinin uzamış diğer kallusların ise daha izodiametrik görünümlü olduğunu görmüşlerdir. TEM'de sulu kallusların hücre duvarının daha ince olduğu, çok sayıda küçük vakuol bulundurduğu ve dağınık sitoplazmalı olduğu, küçük kümeli sarı kalluslarda yoğun sitoplazma ve çok sayıda mitokondri olduğu, büyük kümeli sarı kalluslarda ise kalın bir hücre duvarı ve hücrelerarası boşluk olduğunu görmüşlerdir. Bizim çalışmamızda ise tespit çözeltisi olarak %3'lük GA ve reçine olarak epon kullanıldı. Çalışmamızda TEM kullanılmıştır. Sarı kalluslarda az miktarda sitoplazma fakat çok büyük vakuol görüldü. Hem sarı hemde siyah kalluslarda çok sayıda mitokondri görüldü. Sarı kalluslarda hücre duvarı net ve pürüzsüzken siyah kalluslarda hücre duvarı genelde parçalanmıştı.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ışığında *G. trichosantha* ssp. *trichosantha* bitkisi başarıyla doku kültürü ortamına alındı. *In vitro* çimlendirme %80 gibi yüksek bir oranda gerçekleştirildi. 30 günlük aseptik fideler *in vitro* kallus üretimi için en uygun eksplant kaynağı olarak tespit edildi. Kallus yüzdesi sonuçlarına göre IAA+BAP içeren MS3 ortamının daha başarılı sonuç verdiği belirlendi. Kallus büyüme indeksi sonuçlarına göre 2,4-D+BAP içeren MS8 ortamının kallus üretimi için bundan sonra kullanılacak ortam olduğu belirlendi. Sarı kallus ile siyah kallus arasındaki hücresel farklar incelendi. Bundan sonraki çalışmalarımızda bu bitki ve üretilen kalluslarda bulunan sekonder metabolitler çalışılarak etken maddelerin ne oranda üretildikleri tespit edilebilir ve bu sekonder metabolitlerin tıbbi değeri anlaşılabilir. Böylelikle bu bitkinin ileri biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabilmesi için temel bilgiler bilim dünyasına sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Babaoğlu M, Gürel E ve Özcan S** (2001) Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları. *Selçuk Üniversitesi Basımevi*, 374.
- Bello R, Moreno L, Primo-Yúfera E and Esplugues J** (2002) *Globularia alypum* L. extracts reduced histamine and serotonin contraction *in vitro*. *Phytotherapy Research*, 16: 389–392.
- Bertsouklis K, Papafotiou M and Balotis G** (2001) Effect of medium on *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of *Globularia alypum* L.. *ISHS Acta Horticulturae 616: I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants*.
- Boutiti A, Benguerba A, Kitouni R, Bouhroum M, Benayache S and Benayache F** (2008) Secondary Metabolites From *Globularia alypum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 44 (4): 543-544.
- Chograni H, Riahi L, Zaouali Y and Boussaid M** (2012) Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). *African Journal of Ecology*, 51 (2): 343-347.
- Çalış İ, Kırmızıpekmez H, Rüeegger H and Sticher O** (1999) Phenylethanoid Glycosides from *Globularia trichosantha*. *J. Nat. Prod.*, 62: 1165-1168.
- Çalış İ, Kırmızıpekmez H and Sticher O** (2000) Iridoid Glycosides from *Globularia trichosantha*. *J. Nat. Prod.*, 64: 60-64.
- Çalış İ, Kırmızıpekmez H, Tasdemir D, Sticher O and Ireland C M** (2002) Sugar Esters from *Globularia orientalis*. *Z. Naturforsch.*, 57: 591-596.
- Davis P H, Mill R R and Tan K** (1988) Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 10: Edinburgh: Edinburgh University Press, 201.
- Dida N, Krouf D and Bouchenak M** (2011) *Globularia alypum* aqueous extract decreases hypertriglyceridemia and ameliorates oxidative status of the muscle, kidney, and heart in rats fed a high-fructose diet. *Nutrition Research*, 31: 488-495.
- Duman H** (2001) A new species of *Globularia* L. (Globulariaceae) from South Anatolia. *Bot J. Linn Soc.*, 137 (4): 425-428.
- Duncan D B** (1955) Multiple range and multiple F-test. *Biometrics*, 11: 1-42.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Doorn W G, Beers E P, Dangl J L, Franklin-Tong V E, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones A M, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur L A J, Petersen M, Smertenko A, Taliansky M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhivotovsky B, Bozhkov P V** (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, 18: 1241-1246.
- Ercetin T, Toker G, Kartal M, Colgecen H and Toker M** (2012) *In vitro* isoflavonoid production and analysis in natural tetraploid *Trifolium pratense* (red clover) calluses. *Rev. bras. farmacogn.*, 22 (5): 964-970.
- Gagnidze R, Gviniashvili T and Jinjolia L** (2006) IAPT/IOPB chromosome data 2. *Taxon*, 55: 757-758.
- Gnanapragasam S and Vasil I K** (1992) Ultrastructural changes in suspension culture cells of *Panicum maximum* during cryopreservation. *Plant Cell Reports*, 11: 169-174.
- Harzallah H J, Neffati A, Skandrani I, Maaloul E, Chekir-Ghedira L and Mahjoub T** (2010) Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (19): 2048-2053.
- Jasik J, Salajova T and Salaj J** (1995) Developmental anatomy and ultrastructure of early somatic embryos in European black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Protoplasma*, 185: 205-211.
- Jouad H, Maghrani M and Eddouks M** (2002) Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 351-356.
- Khelifi S, Hachimi Y E, Khalil A, Es-Safi N and Abbouyi A E** (2005) *In vitro* antioxidant effect of *Globularia alypum* L. hydromethanolic extract. *Indian Pharmacol*, 37: 227-231.
- Kırmızıbekmez H** (1999) *Globularia trichosantha* fisch. ve mey: üzerinde fitokimyasal araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.
- Kırmızıbekmez H** (2002) *Globularia* Türleri Üzerinde Farmakognozık Çalışmalar. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.
- Kırmızıbekmez H, Çalış İ, Piacente S and Pizza C** (2004) Phenolic Compounds from *Globularia cordifolia*. *Turk J Chem*, 28: 455-460.
- Kırmızıbekmez H, Çalış İ, Piacente S and Pizza C** (2004) Iridoid and Phenylethyl Glycosides from *Globularia sintenisii*. *Helvetica Chimica Acta*, 87 (5): 1172-1179.
- Laukkanen H, Rautiainen L, Taulavuori R and Hohtola A** (2000) Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology*, 20: 467-475.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Lingua G, D'Agostino G, Fusconi A and Berta G** (2001) Nuclear changes in pathogen-infected tomato roots. *Eur. J. Histochem.* 45: 21-30.
- Murashige T and Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497.
- Padua M S, Paiva L V, Labory C R G, Alves E and Stein V C** (2013) Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85 (4): 1545-1556.
- Ribeiro L O, Paiva L V, Pádua M S, Santos B R, Alves E and Stein V C** (2012) Morphological and ultrastructural analysis of various Types of banana callus, cv. Prata anã. *Acta Scientiarum*, 34 (4): 423-429.
- Rumyantseva N I, Amaj J, Ensikat H J, Sal'nikov V V, Kostyukova Y A, Balu ka F and Volkmann D** (2003) Changes in the Extracellular Matrix Surface Network during Cyclic Reproduction of Proembryonic Cell Complexes in the *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn Callus. *Doklady Biological Sciences*, 391: 375-378.
- Sato T** (1967) A modified method for lead staining of thin sections. *J. Electron Microsc.*, 16: 133.
- Skim F, Lazrek B H, El Amri H, Kaaya A and Jana M** (1998) Toxicological studies on *Globularia alypum* and *Zygophyllum gaetulum* in rats. *Phytotherapy Research*, 12: 592-594.
- Skim F, Kaaya A, Jaouhari J T, Lazrek H B, Jana M and El Amri H** (1999a) Hypoglycaemic activity of *Globularia alypum* leaves in rats. *Fitoterapia*, 70: 382-389.
- Skim F, Lazrek H B, Kaaya A, El Amri H and Jana M** (1999b) Pharmacological studies of two antidiabetic plants: *Globularia alypum* and *Zygophyllum gaetulum*. *Therapie*, 54 (6): 711-715.
- Snedecor G W and Cochran W G** (1967) Statistical methods. Iowa, USA: *The Iowa State University Press*, 327-329.
- Stein V C, Paiva R, Vargas D P, Soares F P, Alves E and Nogueira G F** (2010) Ultrastructural calli analysis of *Inga vera Willd. subsp. Affinis* (DC.) T.D. *Penn. Rev. Árvore*, 34 (5): 789-796.
- Tang W, Newton R J and Outhavong V** (2004) Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. *Physiologia Plantarum*, 122: 386-395.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Tasdemir D, Scapozza L, Zerbe O, Linden A, Çalis I and Sticher O** (1999) Iridoid Glycosides of *Leonurus persicus*. *J. Nat. Prod.*, 62: 811-816.
- Tundis R, Peruzzi L, Colica C and Menichini F** (2012) Iridoid and bisiridoid glycosides from *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz aerial and underground parts. *Biochemical Systematics and Ecology*, 40: 71-74.
- Ueda S and Iwahashi Y A** (1991) Production of Anti-Tumor-Promoting Iridoid Glucosides in *Genipa americana* and its Cell Culture. *Journal of Natural Products*, 54 (6): 1677-1680.
- Urbanek A, Zechmann B and Muller M** (2004) Plant regeneration via somatic embryogenesis in Styrian pumpkin: cytological and biochemical investigations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79: 329-340.
- Wagenitz G** (2004) Globulariaceae-In: Kubitzki, K.(ed), The families and genera of vascular plants, *Springer*, 7: 159-162.
- Wang H L, Kang Y Q, Zhang C J, Ma Y and Wang T K** (1998) Changes in nuclear ultrastructure during callus development in tissue culture of *Allium sativum*. *Biologia Plantarum*, 41 (1): 49-55.
- Walker J M and Rapley R** (2008) Molecular Biomethods Handbook. *Humana Press*, a part of Springer Science-Business Media, LLC, Totowa N J, 974-1008.
- Wilhelm S** (2007) <http://www.nslc.wustl.edu/courses/Bio2960/labs/04Organelle/microscopy.html>.
- Woolhouse H W** (1984) Senescence in plant cells. Cambridge University Press, Cambridge, 25: 123-154.

ÖZGEÇMİŞ

Havva Atar, 1989 yılında Zonguldak' ta doğdu. Mimar Sinan İlköğretim Okulundan mezun olduktan sonra lise öğrenimini tamamladığı Hasan Ali Yücel Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'ni kazandı. 2007 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2012 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.

ADRES BİLGİLERİ

Adres : Birlik Mahallesi, Şifa Sokak No: 24
67100 Merkez/Zonguldak

Tel : 0 (531) 740 61 03

E-posta : havva01030@hotmail.com