

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON TÜRÜNÜN
IN VITRO BİYOKÜTLE GELİŞİMİ ÜZERİNE
FARKLI STRES FAKTÖRLERİNİN ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Damla ERDEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 14.01.2011

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Cüneyt AKI

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

DAMLA ERDEN, tarafından DOÇ. DR. CÜNEYT AKI yönetiminde hazırlanan “*CATHARANTHUS ROSEUS (L.) G. DON TÜRÜNÜN IN VITRO BİYOKÜTLE GELİŞİMİ ÜZERİNE FARKLI STRES FAKTÖRLERİNİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ*” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Cüneyt AKI

Danışman

Prof. Dr. Hakan TURHAN

Yrd. Doç. Dr. Okan ACAR

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

Sıra No:

Tez Savunma Tarihi: 14/01/2011

Prof. Dr. İsmail TARHAN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans BAP tarafından 2009/117 no’lu projeden desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel veyazlı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Damla ERDEN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince, her zaman bilgi ve önerileriyle yol gösteren, çalışmaya başlarken konu seçiminde fikir veren ve seçtiğimiz konuda beni destekleyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi sayın hocam **Doç.Dr. Cüneyt AKI**'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tezimin her aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen, her türlü bilgisini benimle paylaşarak tezimi tamamlamamda sonsuz yardımları bulunan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü **Araş. Gör. Nursen ÇÖRDÜK**'e çok teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında beni sevgiyle yönlendiren ve her aşamamda bana sonsuz destek olarak eğitimin ne kadar önemli olduğunu bana benimseten annem **Merih ERDEN** ve babam **Halil İbrahim ERDEN**'e hayatım boyunca teşekkürlerimi borç bilirim.

Manevi desteğini her zaman hissettiğim ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım **Fatih SEZER**'e, **Gözde NİŞLİ**'ye ve **İlknur Nezahat ÇILDIR**'a çok teşekkür ederim.

Damla ERDEN

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

μM :	:	Mikro Molar
2,4-D	:	2,4-diklorofenoksi asetik asit
2İP	:	2-izopentenil amino pürin
BA	:	N ⁶ benzil adenin
BAP	:	6-Benzil amino pürin
GA ₃	:	Gibberellik asit
HCl	:	Hidroklorik asit
IAA	:	İndol-3-asetik asit
IBA	:	İndol-3-butirik asit
Kin	:	Kinetin
Mg	:	Mili gram
MS	:	Murashige Skoog Besin Ortamı
NAA	:	α -Naftalen asetik asit
NaOH	:	Sodyum hidroksit
TIBA	:	2,4,5-triiodobenzoik asit
L	:	Litre

ÖZET

***CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON TÜRÜNÜN *IN VITRO* BİYOKÜTLE GELİŞİMİ ÜZERİNE FARKLI STRES FAKTÖRLERİNİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Damla ERDEN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç.Dr. Cüneyt AKI

14.01.2011, 70

Bu tezde, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don bitkisinin *in vitro* kallus biyokütle eldesi ve bu biyokütle üzerinde ortam ozmotik stresinin etkileri farklı kimyasal maddeler kullanılarak araştırılmıştır. *In vivo* ve *in vitro* yetiştirilen fidelerden alınan bitki parçaları MS ortamında kallus eldesinde kullanılmıştır. Daha sonra bu kalluslardan alt kültürlemeler yolu ile elde edilen biyokütlelerin ozmotik stres koşulları altındaki ağırlıkları ve morfolojik yapıları karşılaştırılmıştır. Biyokütle eldesinde MS ortamı ile birlikte kullanılan bitki büyüme hormonlarının en uygun kombinasyonu 5mg/mL NAA ve 2 mg/mL BAP olarak belirlenmiştir. Elde edilen 18 haftalık kallus biyokütlerine, Polietilenglikol (PEG) 4000, D-Mannitol ve hidrojen peroksit gibi bitki üzerinde ozmotik stres oluşturduğu bilinen kimyasal maddeler ile uygulamalar yapılmıştır. Biyokütlelerin altkültürlemeleri birer haftalık aralar ile yapılmıştır. Stres faktörü uygulamaları ile oluşan biyokütle değişimleri ile ilgili ölçümler ve hesaplamalar yapılarak, biyokütlerde oluşan morfolojik değişimler de incelenmiştir. Biyokütle değişimleri ikinci altkültürden itibaren hidrojen peroksit'in 100 mM ve 200 mM konsantrasyonlarında sırası ile kontrole göre %33 ve 37 azalma gösterirken, üçüncü altkültürden itibaren PEG-4000'in %5'lik konsantrasyonunda %19, %10'luk konsantrasyonunda %20, D-Mannitol'ün %5'lik konsantrasyonunda %10, %10'luk konsantrasyonunda ilk haftadan itibaren toplamda %18'lik azalma göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Catharanthus roseus*, Ozmotik Stres, Biyokütle, Kallus

ABSTRACT

EFFECTS OF DIFFERENT STRESS FACTORS ON *IN VITRO* BIOMASS DEVELOPMENT IN *CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON, PLANT

Damla ERDEN

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Chair for Biology Thesis of Master of Science

Advisor: Asso.Prof. Dr. Cüneyt AKI

14.01.2011, 70

In this thesis, production of *in vitro* callus biomass of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and effects of osmotic stress on biomass was investigated with several materials. Explants were obtained from *in vivo* and *in vitro* seedlings and used for callus production in callus MS medium. Subsequently, biomass obtained from subcultures of these callus were investigated for their weight and morphologic structure under different osmotic stress conditions. Plant growth regulators; 5mg/mL NAA and 2 mg/mL BAP with MS medium is identified as the best combination for biomass production.

In this thesis, PEG-4000, D-Mannitol and hydrogen peroxide which are known to induce osmotic stress on plants were used on 18 weeks old callus biomass. Subcultures of biomass were generated in one week intervals. Variations on the biomass as a result of stress factor applications were measured and calculated while morphological features were also observed. Subsequent to second subcultures biomass on 100 mM and 200 mM concentrations of hydrogen peroxide showed %33 and %37 reduction. Following third subcultures %5 and %10 concentrations of PEG-4000 caused %19 and %20 reductions. Following third subcultures %5 D-mannitol caused %10 reduction and %10 concentration of D-mannitol caused %18 reduction just after first week.

Keywords: *Catharanthus roseus*, Osmotic Stress, Biomass, Callus

İÇERİK

TEZ SINAVI SONUÇ BELGESİ.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
BÖLÜM 1 - GİRİŞ	1
1.1. Doku Kültürü	1
1.2.Doku Kültürü Besin Ortamı Bileşenleri.....	2
1.2.1.Makro ve Mikro Elementler	2
1.2.2. Organik Bileşikler	5
1.2.3. Karbon Kaynağı	5
1.2.4. Jelleşme Ajanları	5
1.2.5. Bitki Büyüme Düzenleyicileri.....	5
1.3.Bitkilerde Hücrel Totipotensi.....	7
1.4. Bitkilerde Rejenerasyon.....	8
1.5.Bitkilerde <i>In Vitro</i> Kültür Tipleri.....	9
1.5.1. Bitkilerde <i>In Vitro</i> Kallus Kültürü.....	9
1.5.2. Hücre Süspansiyon Kültürü.....	10
1.5.3. Sekonder Metabolitler	11
1.5.4. Protoplast Kültürü	12
1.5.5. Kök Kültürü	13
1.5.6. Sürgün Ucu ve Meristem Kültürleri	13
1.5.7. Embriyo Kültürü.....	13

1.5.8. Mikrospor Kültürü.....	13
1.6. Bitkilerde <i>In Vitro</i> Rejenerasyon	14
1.6.1. Somatik Embriyo oluşumu (Somatik embriyogenesis).....	14
1.6.2. Organogenesis (Organ Oluşumu).....	14
1.7. Bitkilerde Stres Faktörleri.....	15
BÖLÜM 2 - ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	18
BÖLÜM 3 - MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1. Bitki Materyali	27
3.2. Bitki Materyalinin Yetiştirilme Yöntemi	27
3.2.1. Bitki Materyalinin <i>In Vivo</i> Yetiştirilmesi.....	27
3.2.2. Bitki Materyalinin <i>In Vitro</i> Yetiştirilmesi.....	27
3.2.3. Sterilizasyon Yöntemleri	28
3.2.4. Tohum Yüzey Sterilizasyonu.....	28
3.2.5. Eksplant Kaynağı Olarak Kullanılan Yaprak ve Gövde Kısımlarının Sterilizasyonu	29
3.2.6. Besin Ortamlarının ve Cam Malzemelerin Sterilizasyonu.....	30
3.3. Besin Ortamının Ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanma Yöntemleri.....	30
3.3.1. Besin Ortamının Hazırlanması	30
3.3.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması	32
3.3.3. Hazırlanan Yapay Besin Ortamları	32
3.3.4. Kallus Teşvik Ortamları	32
3.3.4.1. <i>In Vitro</i> Yetiştirilen Bitkiler İçin Kallus Teşvik Ortamları	32
3.3.4.2. <i>In Vivo</i> Yetiştirilen Bitkiler İçin Kallus Teşvik Ortamları	33
3.3.5. Biyokütle Elde Edilmesi	36
3.3.6. Biyokütle Üzerine Stres Faktörü Uygulaması	36
3.3.7. Biyokütle ölçümlerinin yapılması ve Kütle Değişimlerinin İncelenmesi.....	37
BÖLÜM 4 - ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	39

4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi İle İlgili Sonuçlar	39
4.1.1. Bitki Materyalinin <i>In Vivo</i> Yetiştirilmesi.....	39
4.1.2. Bitki Materyalinin <i>In Vitro</i> Yetiştirilmesi.....	40
4.1.3. Tohum Yüzey Sterilizasyonuna İlişkin Sonuçlar.....	41
4.1.4. Eksplant Kaynağı Olarak Kullanılan Yaprak ve Gövde Kısımlarının Sterilizasyonuna Ait Sonuçlar	41
4.2. Kültür Ortamlarına İlişkin Sonuçlar	42
4.2.1. <i>In Vitro</i> Yetiştirilen Bitkilerden Alınan Eksplantlardan Elde Edilen Kallus Teşvik Ortamlarına İlişkin Sonuçlar	42
4.2.2. <i>In Vivo</i> Yetiştirilen Bitkilerden Alınan Eksplantlardan Elde Edilen Kallus Teşvik Ortamlarına İlişkin Sonuçlar	44
4.3. Biyokütle Elde Edilmesine Ait Sonuçlar	47
4.4. Biyokütle Üzerine Stres Faktörü Uygulamasına Ait Sonuçlar	48
BÖLÜM 5 - SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR	66
Çizelgeler	I
Şekiller.....	II
Özgeçmiş.....	IV

BÖLÜM 1**GİRİŞ****1.1. Doku Kültürü**

Bitki doku kültürü; aseptik şartlar altında, bitkinin hücre, doku veya organ gibi kısımlarının yapay besin ortamında yetiştirilmesiyle yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir. Doku kültürünün temelini, bitkilerin totipotensi ve yenilenebilme özellikleri oluşturmaktadır.

Bu özellikler bitki doku kültürü ve bitki doku rejenerasyonu konularını anlamak için temel oluşturmaktadır. Bitkiler, doğada sabit bir şekilde yaşamaları ve uzun yaşam süreleri nedeni ile zorlu koşullarda yaşamlarını devam ettirebilmek için hayvanlardan daha ileri bir yetenek geliştirmişlerdir. Bitkiler büyüme ve gelişmede birçok çevresel uyum ve adaptasyon süreci içine dahil olmaktadır. Rejenerasyon özellikleri bitkilere büyüme ve gelişme süreçlerinde çevreye en iyi uyumu sağlamaları için metabolizmalarını değiştirmelerini sağlamaktadır. Bu adaptasyonun bilhassa bitki doku kültürü ve rejenerasyonu ile alakalı önemli özelliği bitkinin herhangi bir hücresinden hücre bölünmesini başlatabilmesi ve kaybolmuş organların rejenerasyon olabilmeleri veya herhangi bir uyarıcıya karşı değişik gelişimsel yollara yönelebilmeleridir. Bitki hücreleri ve dokuları *in vitro* kültüre alındıkları zaman, genellikle çok yüksek derecede yenilenebilme özelliğine sahiptirler ki bu bir tip hücre ya da organlardan farklı tipte hücre ve organların oluşturulmasına olanak sağlamaktadır. Bu yol ile tüm bitkiler sonradan rejenerasyon olabirler. Tüm pratik uygulamalara rağmen, kültür koşullarının tamamı ve totipotensi özelliğinin uyarılması son derece zor gerçekleştirilebilir ve bu konu hala geniş deneysel süreçler içermektedir (Çördük, 2007).

Alman bilim adamı Haberlandt 1902 yılında, ilk *in vitro* kültür çalışmasını yapmıştır (Haberlandt, 1902). Bitki hücrelerini *in vitro* ortamda canlı tutmayı başarmıştır. Ancak bitki büyüme düzenleyicilerinin o yıllarda henüz keşfedilmemesinden dolayı çoğaltmada başarılı olamamıştır (Çördük, 2007)

Doku kültürü alanındaki çalışmalar, daha sonraki yıllarda çeşitlilik göstermeye başlamıştır. Germplazm muhafazası, somatik hibridizasyon, haploid bitki üretimi, doğada tozlaşması mümkün olmayan türlerin hibridizasyonu, somaklonal varyasyon ve gen transferi gibi bitki ıslahında uygulama alanlarının yanı sıra ticari ve ıslah dışı çalışmalarda,

hastaliksız bitki üretimi, mikroçoğaltım, sentetik tohum üretimi ve sekonder metabolit üretimi gibi çok çeşitli doku kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Günümüzde ise doku kültürü, daha çok genetik mühendisliğinde bir araç olarak kullanılmaktadır (Çördük, 2007).

1.2.Doku Kültürü Besin Ortamı Bileşenleri

Bazı elementler bitki beslenmesinde ve bitkilerin fizyolojik işlevlerini yerine getirmede önemlidir. Bu elementler, *in vitro* koşullarda bitkilerin sağlıklı gelişmeleri için mutlaka kültür ortamına ilave edilmelidir.

Besin ortamına ilave edilen mineral elementler, bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan elementlerdir. Doku kültüründe yaygın olarak kullanılan besin ortamlarında bitkilerin alabileceği formlarda eklenmektedirler. Makro ve mikro elementler olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Makro elementler; büyük miktarlarda besin ortamına ilave edilen elementler, mikro elementler ise az miktarlarda ilave edilen elementlerdir (Smith, 2000).

1.2.1.Makro ve Mikro Elementler

Makro elementler, ismiyle de gösterildiği gibi bitki büyüme ve gelişmesi için büyük miktarlarda stok solüsyon halinde bulunması gereken elementlerdir, bu unsurlar genellikle bitki kuru ağırlığının %0,1'lik kısmını oluşturmaktadır. Mikro elementler ise az miktarlarda ilave edilen elementlerdir. Tüm makro ve mikro elementler çizelge 1.1 ve 1.2'de belirtilmiştir;

Çizelge 1. 1. Besin ortamına ilave edilen makro elementler (Trigiano ve ark., 1996)

Element	Görevi	İlave Edilen Formu
Kalsiyum	Kalsiyum birçok enzimin ko-faktörü olarak görev alır ve özellikle hücre duvarı sentezi için önemlidir.	CaCl_2 veya Ca NO_3
Magnezyum	Enzimlerin fonksiyonları için kritiktir ve klorofil molekülü için gerekli bileşiktir. Bitkilerde negatif yüklü iyonları dengeleyen katyondur.	MgSO_4
Nitrojen	Genel büyüme için ve bitkinin yaşamı için gereklidir. Çoğunlukla inorganik nitrojen aminoasitlere sonrada proteinlere dönüştürülmektedir.	NO_3^- , NH_4^+
Fosfor	Nükleik asit ve diğer yapısal bileşiklerin önemli bir parçasıdır.	KH_2PO_4
Potasyum	Major pozitif iyon olarak gereksinimi karşılayarak negatif iyonları dengeler.	KCl
Sülfür	Birçok önemli sülfür içeren aminoasitlerde mevcut önemli proteinlerin yapıları için kritiktir.	$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Çizelge 1. 2. Besin ortamına ilave edilen mikro elementler (Trigiano ve ark., 1996)

Element	Görevi	İlave Edilen Formu
Bor	Lignin biyosentezinde ve fenolik asit metabolizması ile ilgili enzimatik aktivitelerde gereklidir.	H_3BO_3
Kobalt	Bazı vitaminlerin bileşenidir.	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$
Bakır	Sitokrom oksidaz sistemini de içeren birçok enzim reaksiyonu için kritiktir.	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$
İyot	İyotun etkisi bitki türüne göre çeşitlilik göstermektedir. Kültürde kallus ve kök büyümesini ilerlettiği bulunmuştur.	KI
Demir	Birçok oksidasyon redüksiyon reaksiyonları için gerekli olduğu kadar klorofil sentezi için de gereklidir.	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$
Mangan	Enzimatik reaksiyonlar için özellikle solunum ve fotosentezde gereklidir.	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$
Molibden	Nitratin amonyuma dönüşmesini içeren iki enzimatik reaksiyonda kofaktör olarak görev alır.	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
Çinko	Kloroplast gelişimi için önemlidir, birçok enzimatik reaksiyon için gereklidir.	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

1.2.2. Organik Bileşikler

Sadece iki vitamin, tiamin (B1 vitamini) ve myoinositol (B olarak kabul vitamin) *in vitro* bitki hücrelerinin kültürü için önemli olarak kabul edilir. Ancak, diğer vitaminler bitki hücre kültürü ortamına genellikle evrimsel nedenlerle eklenir. Amino asitler de yaygın organik tamamlayıcılar olarak yer almaktadırlar. En yüksek sıklıkta glycine kullanılmaktadır (arginin, asparagine, aspartik asit, alanin, glutamik asit, glutamin ve proline de kullanılabilir), fakat pek çok durumda kapsamı çok gerekli değildir (Smith, 2000).

1.2.3. Karbon Kaynağı

Sükroz, kolay ulaşılabilir, ucuz, kolayca asimile edilebilen ve nispeten kararlı olması nedeniyle en sık kullanılan karbon kaynağıdır. Diğer karbonhidratlar da (glukoz, maltoz, galaktoz ve sorbitol gibi) kullanılabilir (Smith, 2000).

1.2.4. Jelleşme Ajanları

In vitro bitki hücre kültürü ortamları sıvı ya da “katı” olarak kullanılabilir, bu farklı kültür formlarına bağlanmıştır. Herhangi bir kültür tipi için ki bu bitki hücre veya dokularının ortam yüzeyinde geliştirilmeli ise, ortam katılaştırılmış olmalıdır (en doğru şekliyle ‘jelleşmiş’). Agar, deniz yosunlarından elde edilen rutin uygulamada da en sık biçimde kullanılan jelleşme ajanı olarak idealdir. Agar doğal bir ürün olması nedeniyle kalitelidir fakat bu tedarikçiden tedarikçiye ve gruptan gruba farklılık gösterebilir (Smith, 2000).

1.2.5. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Bitki hücre kültüründe kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin beş ana sınıfları vardır ve fonksiyonları çizelge 1.3, 1.4 ve 1.5’te verilmiştir;

Çizelge 1. 3. Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Genel Etkileri (Smith, 2000)

Hormon	Genel Etkisi
Oksinler	Fotoperiyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişimi.
Sitokininler	Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, bitki rejenerasyonu, sürgün çoğaltımını etkiler, sürgünlerde köklenmeyi ve embriyogenesisi engeller.
Giberellinler	Meristemlerden bitki rejenerasyonun uyarılması, sürgünlerin boylarının uzatılması, embriyo ve ovül kültürlerinin gelişiminde, kallus gelişimi, organogenesis ve adventif kök oluşumunu engeller.
Absisik Asit	Doku kültüründeki rolü tam olarak bilinmemekle beraber somatik embriyoların geliştirilmesinde kullanılmaktadır.
Etilen	Köklerin uzamasını engelleyerek enine büyüme ve çoğalmayı arttırmaktadır.

Çizelge 1. 4. Yaygın biçimde kullanılan oksinlerin kısaltma ve kimyasal isimleri (Smith, 2000)

Kısaltma	Kimyasal isim
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
2,4,5-T	2,4,5-Triklorofenoksiasetik asit
Dicamba	2-metoksi-3,6-diklorobenzoik asit
IAA	İndole-3-asetik asit
IBA	İndole-3-butirik asit
MCPA	2-metil-4-klorofenoksi asit
NAA	1-naftalenasetik asit
Picloram	4-amino-2,5,6-Trikloropikolinik asit

Çizelge 1. 5. Yaygın biçimde kullanılan sitokininlerin kısaltma ve kimyasal isimleri (Smith, 2000)

Kısaltma	Kimyasal isim
BAP	6-benzilaminopürin
2iP (IPA)	[N6-(2-isopentil) adenin]
Kinetin	6-furfurilaminopürin
Thidiazuron	1-fenil-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl) urea
Zeatin	4-hidroksi-3-metil-trans-2-butenilaminopürin

1.3.Bitkilerde Hücrel Totipotensi

Organizmalarda hücre bölünmesi ile meydana gelen her bir hücre, hücre dışından gelen sinyallere göre farklılaşma geçirerek bulunduğu dokuya özgü hücreye dönüşmektedir. Yüksek oranda olgunlaşmış ve farklılaşmış bitki hücreleri böyle bir farklılaşma geçirdikten sonra, hücre membranına ve işlevsel bir çekirdeğe sahip oldukları sürece meristematik bir safhaya geri dönme yeteneğine sahiptirler (Çördük, 2007). Bitki hücrelerinin sahip olduğu bu özellik, totipotensi yani bütünü verme yeteneği olarak adlandırılmaktadır. Bitki hücreleri, bu yetenekleri sayesinde, bir hücre tipinden diğer hücre tipine dönüşebilir ve tam organizasyonlu bir bitkiyi oluşturabilmektedir.

Totipotensi özelliği, çoğunlukla bitkide bir hücrenin son farklılaşmaya uğramasından sonra tamamıyla kalır. Farklılaşmış bir hücre, totipotensi özelliğini ifade etmek için ilk önce yeniden farklılaşmanın izlediği tersine farklılaşmaya uğrar ve daha sonra yeniden farklılaşma geçirir. Bir bitki hücresinin meristematik bir safhaya geri dönme, derecesi *in situ* de ulaştığı fizyolojik ve sitolojik duruma bağlı olarak gerçekleşmektedir (Gautheret, 1966). Bölünmedeyken, çoğalmalarını destekleyen besin ortamında büyüyen farklılaşmış dokulardaki durgun hücreler, ilk önce meristematik safhaya kesin değişimi başarırlar. Bu aşamada hücre içerisinde fonksiyonel olmayan hücresel bileşenlerin lizozomal aktivite ortadan kaldırılmaları gerçekleşmektedir (Bornman, 1974).

Doku kültürü tekniği, sadece hücrelerin totipotensi özelliğini ortaya koyan etkenleri çalışmak için mükemmel bir fırsat değil aynı zamanda sitolojik ve histolojik farklılaşmayı kontrol eden etkenlerin araştırılmasına izin veren bir tekniktir.

1.4. Bitkilerde Rejenerasyon

Bir bitkinin hücre, doku, organ, meristem, embriyo gibi çeşitli parçalarından yeni bitki veya bitkiler elde edilmesine bitki rejenerasyonu denilmektedir. Çok hücreli ökaryotik organizmalar totipotensi özellikleri sayesinde tek bir hücreden tam organizasyonlu bir organizmaya rejenerasyon olabilmeye yeteneğine sahiptirler. Bitki doku kültürü işlemlerinde kullanılan temel sistem, bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu; organize olmuş meristematik hücreleri içeren somatik hücrelerden rejenerasyon, meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon, mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon olarak ayrılmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2002).

Adventif organlardan ya da somatik embriyolardan rejenerasyon; seçilen bitkinin türüne olduğu kadar endojen ve ekzojen birçok faktörlere de bağlıdır. Bu faktörler; seçilen bitki eksplantı, kültürün çevresel koşulları, besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri olarak sıralanabilmektedir. Bu faktörler arasında bulunan ve başlıca role sahip olan bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonları ve kombinasyonlarının bitki rejenerasyonunu yönettiği birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Molnár ve ark., 2005). Özellikle oksin/sitokinin oranı, *in vitro* morfogenez işlemlerinde rejenerasyonu sağlayan en önemli faktör olarak görülmektedir (Christianson ve ark., 1983). Yüksek oksin/sitokinin oranı, genellikle kök oluşumunu teşvik ederken, düşük oksin/sitokinin oranı ise sürgün oluşumunu teşvik etmektedir. Diğer taraftan eşit oksin/sitokinin oranı organize olmamış

hücrel çoğalmaya ve kallus oluşumuna sebep olmaktadır (Yamaguchi ve ark., 2003). Kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin miktarlarının yanı sıra çeşitlerinin de farklı kök ve sürgün oluşumundan sorumlu olduğu ortaya konmuştur (D'Onofrio ve ark., 2006). Yapılan bir çalışmada sitokininlerden kinetin (Kin)'in, benzilaminopürine (BAP) göre daha düşük biyolojik etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur (Khanam ve ark., 2000).

1.5.Bitkilerde *In Vitro* Kültür Tipleri

Kültürler genellikle bir bütün bitkinin steril parçalarından başlatılır. Bu parçalar “eksplant” olarak adlandırılır ve bunlar organ parçalarından, yaprak veya köklerden, polen ve endosperm gibi özel hücre tiplerinden elde edilebilirler. Kültür başlatılmasında birçok neden eksplantı etkileyebilir. Genellikle genç ve daha hızlı büyüyen (veya dokuların erken gelişim evreleri) dokuların daha etkili olduğu bilinmektedir (Smith, 2000).

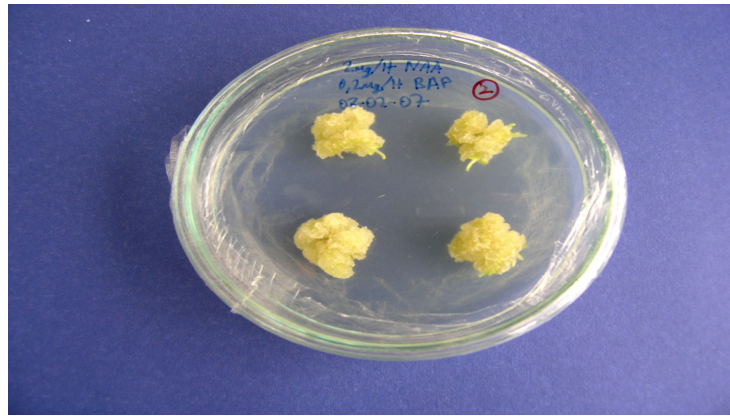
1.5.1. Bitkilerde *In Vitro* Kallus Kültürü

Bazı bitki türlerinde mekanik yaralanmaya reaksiyon olarak yaralanma yerlerinde oluşan farklılaşmamış parankimatik hücreleri içeren yığına kallus dokusu adı verilmektedir. Uyarılmayı birçok faktör etkileyebilmektedir. Mineral besin elementleri ve bitki büyüme düzenleyicileri gibi kimyasal faktörler, ışık sıcaklık, nem gibi çevresel faktörler ve bitkinin genetik yapısı, genotipi bu faktörler arasında sayılabilmektedir. Bu yüzden, bir bitki türünde kallus oluşumu, bir ortamda teşvik edilebilirken diğer bir türde başarısız olabilmektedir. Kallus kültüründe genellikle gövde ve köklerdeki kambiyal dokular kullanılmakla birlikte; meyve, polen, endosperm, olgun ya da olgun olmayan embriyo da başlangıç materyali olarak kullanılmaktadır (Çördük, 2007).

Oksin ve sitokinin değerleri bitki rejenerasyonu için önemli bir aşamadır. Özellikle oksin/sitokinin oranı *in vitro* morfogenez işlemlerde rejenerasyonu sağlayan en önemli faktör olarak görülmektedir. Yüksek oksin/sitokinin oranı genellikle kök oluşumunu teşvik ederken, düşük oksin/sitokinin oranı ise sürgün oluşumunu teşvik etmektedir. Diğer taraftan eşit oksin/sitokinin oranı organize olmamış hücrel çoğalmaya ve kallus oluşumuna sebep olmaktadır. Kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin miktarlarının yanı sıra çeşitlerinin de farklı kök ve sürgün oluşumundan sorumlu olduğu ortaya konmuştur. Oksin ve sitokinin hormonlarının farklı konsantrasyonları kullanılarak kallus gelişimi sağlanır.

Kallus, genetik, patoloji, biyokimya, anatomi, morfoloji, fizyoloji, sitoloji alanındaki araştırılan temel problemlerin incelenmesi ve çözümü için deneysel sistem olarak işlev görmektedir. Bitki biyoteknolojisinde ise, kallus kültürü *in vitro* çoğaltım, somaklonal varyasyon ve hücre kültürlerinin oluşturulması amacıyla kullanılır.

Besin ortamına konulan kallus dokusundan bitki rejenerasyonu, adventif organ oluşumu (organogenesis) ve somatik embriyoların oluşumu (embriyogenesis) yolu ile meydana gelmektedir. Besin ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları kallus dokusunun hangi yolu izleyeceğini belirler.



Şekil 1.1. Yapay besin ortamında gelişen kallus kültürü (Çördük, 2007)

1.5.2. Hücre Süspansiyon Kültürü

Kallus kültürleri kabaca sıkı ve kolay dağılabilir olarak sıkı ve gevrek şeklinde iki kategoriden oluşur;. Sıkı kallus hücreleri daha yoğundur ve hücreler daha sert bir yapıdadır buna karşın diğer tipteki kallus hücreleri ise daha gevşek yapıda ve kolay ufalanabilir haldedir. Hücre süspansiyon kültürüne gevrek yapıdaki kallus hücreleri kaynaklık eder. Bu şekilde kallus kültürünün korunabilmesi için genellikle çok sık alt kültüre alınmaları gerekmektedir. Kırılgan kalluslar katı ortamlarda oluşturulabileceği gibi kimi zaman yarı katı (düşük konsantrasyonda jelleşme ajanı kullanılarak) ortamlarda da kullanılmaktadır. Hücre süspansiyon kültürü ortamı kurulmak istenildiğinde bu kırılgan kallus hücre kümeleri alınarak sıvı ortama konularak sürekli şekilde çalkalanır. Uygun koşullar altında bu hücreler çoğalmaya devam edecek ve hücre süspansiyon kültürünün devamlılığı sağlanacaktır.

Hücre süspansiyon kültürlerinin devamlılığı koni şeklinde erlenler kullanılarak daha kolay sağlanmaktadır. Bu kültürler devamlı olarak alt kültürleme yapılarak taze kalmaları sağlanır. Alt kültürleme sırasında seyreltme oranı her kültür için ampirik olarak belirlenmelidir. Alt kültürleme sırasında seyreltme oranı çok fazla olduğunda büyümede zaman kaybı olacaktır bunun dışında çok az oranda seyreltme gerçekleştirildiğinde ise transfer sonrası ölümler gerçekleşecektir.

1.5.3. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler bitkiler tarafından üretilen ve günümüzde birçok sektörde hammadde olarak kullanılan bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, buna karşılık en az bitkinin yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili primer metabolitler (protein, yağ, karbonhidrat) kadar önemli olan kimyasal maddelerdir. Bu kimyasal maddelerin önceden hiçbir işe yaramadığı bitkiler tarafından üretilen atık madde olduğu varsayıyordu. Ancak daha sonraları anlaşıldı ki bu maddelerin bitkide; savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini devam ettirmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleri olduğu anlaşıldı. Sekonder metabolitler, organizma herhangi bir stres durumuyla karşılaştığı zaman faaliyete geçen özelleşmiş metabolik yollar tarafından üretilirler. Bu ürünlerin ara metabolizma ürünlerinden farkı, organizmanın büyümesi ve üremesi için mutlak gerekli olmamalarıdır. Buna rağmen organizma için önemli birtakım fonksiyonlar üstlenirler. Atıkların uzaklaştırılması, detoksifikasyon, savunma ve hücreler arası haberleşme bu fonksiyonlar arasındadır. Üretildikleri organizma için üstlendikleri bu çeşitli görevlerin dışında sekonder metabolitler antibiyotik, kemoterapötik, pestisid, immünsüpresif, antilipolitik ajan gibi çok çeşitli farmasötik fonksiyonlara da sahiptir ve bu etkileri nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadır. Fonksiyonlarındaki çeşitliliğe benzer şekilde, bu bileşikler kimyasal yapıları bakımından da çok büyük çeşitlilik gösterirler (Verpoorte ve ark., 2002).

Sekonder metabolitlerin günlük hayattaki önemine gelince bu kimyasallar başta ilaç sanayisinin hammaddesi olup kozmetik, besin katkı maddesi, zirai ilaç sanayiinde ve birçok kimya sektöründe kullanılmaktadır. Çizelge 1.6'da başlıca sekonder metabolitler verilmiştir;

Çizelge 1. 6. Bitkilerde Sekonder Metabolitler ve Kültür Tipleri (Oskay ve ark., 2009)

Bitki İsmi	Aktif Madde	Kültür Tipi
<i>Catharanthus roseus</i>	İndol alkaloidleri	Hücre süspansiyon
<i>Allium sativum</i> L	Alliin	Kallus
<i>Capsicum annum</i> L	Capsaisin	Hücre Süspansiyon
<i>Catharanthus roseus</i>	Catharanthin	Hücre Süspansiyon
<i>Coffea arabica</i> L	Kafein	Kallus
<i>Digitalis purpurea</i>	Cardenolides	Hücre Süspansiyon
<i>Nicotiana tabacum</i> L	Nikotin	Hücre Süspansiyon
<i>Papaver somniferum</i> L	Alkaloidler	Kallus
<i>Papaver somniferum</i> L	Morfin, Codein	Hücre Süspansiyon
<i>Portulaca grandiflora</i>	Betasiyanin	Kallus

1.5.4. Protoplast Kültürü

Protoplast hücre duvarından arındırılmış hücre yapısıdır. Protoplast füzyonları genellikle yaprak mezofil hücrelerinden ve süspansiyon kültürlerinden elde edilirler fakat diğer kaynaklarında avantajlı olabileceği bilinmektedir. Hücre duvarının ortadan kaldırılması iki farklı yöntemle; mekanik ve enzimatik izolasyon uygulanarak yapılabilmektedir.

Mekanik izolasyonda hasarlı kültür hücrelerinden salınan bazı kimyasal nedeniyle kaliteli olmayan kötü bir performans oluşsada sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Enzimatik izolasyon yönteminde ise, genellikle basit bir tuz çözeltisi ile sağlanır. Yüksek

kalitede ve saflıkta elde edilmek istendiğinde selüloz ve pektinaz enzimlerinin bir karışımını kullanmak olağandır (Babaoğlu ve ark., 2002).

1.5.5. Kök Kültürü

Kök kültürleri *in vitro* eksplant kaynağından, birincil ya da lateral kök ucu eksplantlarından kolayca kurulabilecek bir kültür tipidir. Kökler belirsiz organ oluşları ile *in vitro* kültürde sınırsız gelişim potansiyeline sahiptirler. Kök kültürleri modern bitki hücre kültürü çalışmalarında ilk olarak kullanılan ve oluşturulan kültür tipi olmalarına rağmen yaygın bitki rejenerasyon çalışmalarında çok sık kullanılmazlar (Smith, 2000).

1.5.6. Sürgün Ucu ve Meristem Kültürleri

In vitro sürgün ucu kültürü, aksiler veya adventif tomurcuklardan oluşan sürgün yığından elde edilerek kurulurlar. Bu yöntem klonal çoğaltım için kullanılabilir. Bu yöntem klonal çoğaltım için kullanılabilir.

Sürgün meristem kültürlerinin kurulumu daha fazla verimlilik ve genotipik bağımlılık nedenleriyle tahıl ürünleri rejenerasyonlarında yaygın olarak uygulanmaktadır (Smith, 2000).

1.5.7. Embriyo Kültürü

Embriyolar kallus kültürleri veya somatik embriyo oluşturmak için eksplant olarak kullanılabilirler. Hem olgunlaşmamış hem de olgun embriyolar eksplant kaynağı olarak kullanılabilir. Olgunlaşmamış, embriyo kökenli embriyogenik kallus monokot bitki rejenerasyonunda kullanılan en popüler yöntemdir (Smith, 2000).

1.5.8. Mikrospor Kültürü

Haploid doku bir eksplant kaynağı olarak polen veya anter kullanarak *in vitro* kültür şeklinde oluşturulabilir. Erkek gametofitin içerdiği polen “mikrospor” olarak isimlendirilir. Hem de kallus hem de embriyo polenden elde edilebilir. Haploid dokulardan *in vitro* kültür üretmek için iki ana yaklaşım kullanılmaktadır. İlk yöntem eksplant olarak anter kullanılarak *in vitro* kültür kurulumudur. Anterler, katı kültür ortamına alınır (agar içerdiği engelleyici maddeler nedeniyle kullanılmamalıdır) (Smith, 2000).

1.6. Bitkilerde *In Vitro* Rejenerasyon

Bir bitkinin hücre, doku, organ, meristem, embriyo gibi çeşitli parçalarından yeni bitki veya bitkiler elde edilmesine bitki rejenerasyonu denilmektedir.

1.6.1. Somatik Embriyo oluşumu (Somatik embriyogenesis)

Somatik embriyogenesis, *in vitro* bir bitkinin herhangi bir somatik hücre, doku veya organından embriyo elde edilmesidir. Somatik embriyogenesis bağımsız vasküler sistemi olan ve kök ile sürgün aksisini içeren iki kutuplu yapı meydana gelmektedir.

In vitro kültür şartları ve besin ortamı bileşenlerinden özellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarının uygun olması sonucu bir bitkinin herhangi bir somatik hücre, doku veya organından somatik embriyo elde etmek mümkün olabilmektedir.

1.6.2. Organogenesis (Organ Oluşumu)

Organogenesis, hücrelere ve dokulara baskı uygulayıp bazı değişikliklere sebep olunarak sürgün veya kök primordiyumu (taslağı) diye isimlendirilen tek kutuplu bir yapının meydana gelme sürecidir. *In vitro* organ gelişimi, indirekt organogenesis ve direkt organogenesis olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Indirekt organogenesis, meristematik bir merkezin ve bunu takip eden sürgün veya kök oluşumundan önce alınan eksplant dokusu organize olmamış kallus kümesinin oluşması için uyarılmaktadır. Doğrudan organogenesis ise, kallus gelişimi olmaksızın sürgün veya kök oluşumu gerçekleşmektedir (Babaoğlu ve ark., 2002).

Eksplantın ortama konulmasından belirgin bir organ ortaya çıkmasına kadar geçen sürede, üç ayrı aşamada değerlendirilebilecek olaylar gerçekleşir. Bu aşamalar sırasıyla yeterlilik, kararlılık, morfolojik farklılaşmadır. Yeterlilik aşamasında, ortama konulan bitki hücre veya dokular organogenik bir uyarım için belli bir yetenek, yeterlilik kazanmaktadır. Bu aşamada öncelikle olgun eksplant dokusunun tersine farklılaşması gerçekleşmektedir. İkinci aşamada; ortamdaki bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları ve kombinasyonları ile hücreler belirli bir gelişme tipi (kök, sürgün, veya kallus) için şartlandırılmaları yani kararlı bir hale gelmeleri gerçekleşir. Son aşama ise, morfolojik farklılaşma ve gelişme tamamlandığı ve belirgin organın gözükmeye başladığı aşamadır. Bu gelişmenin tamamlanması herhangi bir ortamda gerçekleşebilir. İkinci aşama sonunda

hücre veya hücreler herhangi bir organogenik yol için bir kere kararlı hale gelmişlerse bundan sonra meydana getireceği organ tipini değiştirmek mümkün değildir.

Organogenesisdeki anahtar morfolojik özellik, meristematik merkezlerin oluşumudur. Direkt ve indirekt organogenesisin her ikisinde de meristematik merkezler vakuollü parankima hücrelerinden oluşmaktadır (Ross ve ark., 1973). Bu hücreler yapı olarak küçük, izodiyametrik, ince duvarlı ve yoğun bir şekilde boyanan belirgin çekirdeklere sahip hücrelerdir. Meristemoidler ise bu hücrelerin bir araya toplanması ile karakterize edilmektedir. Meristemoidler, gelişimlerinin erken döneminde, morfogjenik olarak plastisite ve embriyo, çiçek, yaprak, sürgün, köke farklılaşan birçok tipte primordiya hücrelerine gelişme yeteneğine sahiptir.

Organogenesis sürecinin, beceri kazanma, morfogjenik izyolların belirlenmesi ya da atanması, morfolojik farklılaşma ve gelişme içeren birçok farklı safhaların içinde ilerlediği gösterilmiştir (Christianson ve ark., 1983). Morfogjenik izyolların belirlenmesi, ekzojen bitki büyüme düzenleyicileri yokluğunda devam edebildiği zaman tamamlanmaktadır (Dhaliwal ve ark., 2003).

1.7.Bitkilerde Stres Faktörleri

Biyotik ve abiyotik çevre etmenlerinin bitkilerde meydana getirdiği değişiklikleri stres olarak ifade ederiz. Stres, önemli fizyolojik ve metabolik değişmelere yol açarken, bitkide büyüme ve gelişmeyi olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Bitkilerde farklı metabolik ürünler üretimine ya da üretilen metabolik ürünlerde nitelik ve nicelik bakımından kayıplara neden olurlar. Bitkilerde stres koşulları aşağıdaki tabloda incelenebilir;

Çizelge 1. 7. Bitkilerde Biyotik ve Abiyotik Stres Faktörleri

Biyotik Stres Faktörleri	Abiyotik Stres Faktörleri
Patojenler	Sıcaklık
Zararlılar	Su
Diğer Organizmalarla Rekabet	Radyasyon
	Kimyasallar
	Diğer Stres Faktörleri (ses vb.)

Su stresi ile ilgili denemeler *in vitro* olarak yapılmaktadır. *In vitro*da yapılan bu stres denemelerinin pratikliği ve çabuk sonuç alınabilmesi büyük bir avantajdır. Bu tür denemelerde doku kültürü şartlarında kuraklık stresi oluşturmak için ortamın su potansiyelini düşüren NaCl, Mannitol, Sakkaroz, Polietilenglikol gibi osmotik ayarlayıcılar araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır. Polyetilenglikol, sahip olduğu yüksek molekül ağırlığı nedeni ile diğerlerine tercih edilmektedir. PEG molekülünün iri boyutta olması, plazmalemma ve symplasta girişini engellemekte ve metabolik ürünleri doğrudan etkilemediği ileri sürülmektedir (Yürekli ve ark., 1995).

Catharanthus genusu 8 tür içermektedir ki bunlar yarı çalimsı (30-90 cm. uzunluğunda) genellikle dik veya yatık, beyaz latex üreten aynı zamanda zarar gördüğünde çok güçlü keskin bir koku yayan türlerdir (Anonymous, 1992). *Catharanthus roseus* (L) G Don, İngilizce yaygın adıyla Madagascar periwinkle veya Türkçe halk arasında kullanılan adıyla “Pervane”; (Seçmen ve ark., 1987) içerdiği alkaloidlerin sayıca çokluğu (90’dan fazla indol alkaloidi) sebebi ile uzun yıllar çok sayıda araştırmaya konu olmuştur (Akçam ve ark., 2000). *Catharanthus roseus* pantropik bir dağılım gösteren; doğal yaşam alanı Afrika, Amerika, Asya, Avustralya, Güney Amerika ve bazı Pasifik okyanusu adalarında olan bir bitkidir (Aslam ve ark., 2008). Fakat genel bilgi olarak bu bitkinin Madagaskar endemiği olduğu bilinmektedir, bunun dışında farklı alanlarda insansal yollarla geliştirilmişlerdir. *Catharanthus roseus*, çeşitli kanser türlerinde kullanılan vinblastin ve vincristin metabolitlerinin tek kaynağı olması bakımından önemli dikotil tıbbi bir bitkidir

(Aslam ve ark., 2009). *Catharanthus roseus* bitkisinden elde edilen vinca alkaloidleri kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılır. Vinblastin ve vincristin kan kanserine karşı etkilidir. Bununla beraber amotin (indol alkaloidi) güçlü bir anti-lösemi aktivitesine sahiptir. Vindesin; vincristin ve vinblastin sitotoksik aktiviteye sahiptir. Zengin içerikli sekonder metabolitleri *in vitro* koşullarda elde edebilmek için farklı yöntemler kullanılmıştır. Bu çalışmalarda; bitkiye ait yaprak, kök, gövde ve hipokotil gibi kısımlardan alınan eksplantlarla kallus üretimi yapılarak kallustan sekonder metabolit üretimiyle orantılı olarak kallus biyokütlesinin arttırılmasına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır.

Bu çalışmada; tıbbi açıdan önemli vinblastin ve vincristin gibi bileşikler salgılayan *Catharanthus roseus* türünden *in vitro* ve *in vivo* eksplant kaynağı kullanılarak farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme hormonları kullanılarak kallus elde edilmesi ve en uygun bitki büyüme hormonu şekli ile en uygun konsantrasyonun seçilmesi amaçlanmıştır.

Elde edilen kallus hücreleri belirli zamanlarda alt kültürleme ile belli bir kallus biyokütlesi oluşturulması ve bu kallus biyokütlesine ortamda su tutan ajanlardan D-mannitol, polietilen glikol ve hidrojen peroksit gibi kimyasallar kullanılarak bu kallus biyokütlesine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

In vitro koşullarda MS ortamına alınan ve buradan bitki gelişimi sağlanan tohumlardan gelişen direkt sürgün, kök ve gövde eksplantları alınarak farklı konsantrasyonlarda 2,4-D, Kinetin ve BAP içeren MS ortamlarına yerleştirilirler. Bu eksplantlardan elde edilen kallus kültürleri ise devamlı olarak alt kültüre alınarak biyokütlece arttırılmıştır ve kallus taze ve kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Kallus alt kültürleme ortamlarında MS ortamına 2,4-D, Kinetin, BAP ve NAA büyüme düzenleyicileri farklı konsantrasyonlarda eklenmiştir. Bu kalluslardan oluşan direkt sürgünlerinde kuru veya ağırlıkları incelenmiştir. Alt kültürleme ile biyokütlesi arttırılan kalluslarda (Arvind ve ark., 2007) metodu ile alkaloid saptanması yapılmıştır (Kyung-Hwan, 2001).

In vitro koşullarda MS ortamında tohum çimlenmesi sonucu elde edilen bitkicikler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Eksplant kaynağı olarak kullanılan bitkiciklerden kallus eldesi için eksplantlar farklı konsantrasyonlarda NAA ve BAP içeren MS ortamlarına aktarılmışlardır. Kallus oluşumundan sonra bu kalluslar eksplantlardan ayrılmış ve taze ortamlara aktarılmışlardır. Kallusların düzenli olarak alt kültürlemesi yapılarak çoğalması (biyokütlesinde artış) sağlanmıştır. Bunlar kontrol grubunda yapıldıktan sonra kalluslar farklı oranlarda PEG 600 stres faktörünü içeren MS ortamlarına alınarak kallus dokusundaki farklılıklar incelenmiş ve rapor edilmiştir. Diğer bir stres faktörü olan PEG 3350 de kallusların aktarıldığı ortama farklı oranlarda eklenerek PEG 600 gibi dokular üzerine etkisi rapor edilmiştir. Bu kallusların tamamı hücre süspansiyon kültürü oluşturmak için yapılmıştır ve hücre süspansiyon kültürü oluşturularak sekonder metabolit eldesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın sonunda elde edilen sekonder metabolit miktarı ve kallus biyokütlelerindeki değişimlerin tamamı rapor edilmiştir (Akçam ve ark., 2000).

MS ortamında çimlendirilen *Capsicum annuum* türünün farklı varyetelerinin bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarında polietilen glikol ile yaratılan stresi ne şekilde düzeltebildiğinin saptandığı bir araştırmada, farklı oranlarda polietilen glikol

içeren MS ortamlarının farklı çeşitler üzerindeki biyokütle değişimi kallus oluşumundan sonra biyokütle ölçümlerinin saptanması ile gerçekleştirilmiştir (Akı, 2005).

Bu çalışmada bitki rejenerasyonu vasıtasıyla gelişen somatik embriyolarına oluşturulan *in vitro* ortamın etkileri incelenmiştir. *Catharanthus roseus* bitkisinden somatik embriyo oluşum basamakları üçe ayrılmıştır; başlatılma ve çoğalma, olgunlaşma ve filizlenme veya yeni bitkicik oluşturma. Somatik embriyo gelişimine etki eden ortam koşullarını bulmak için farklı kombinasyonlarda ve farklı konsantrasyonlarda BAP, 2,4-D, NAA, GA3, PEG (polyethylene glycol) hormonları MS ortamına ilave edilerek uygun kombinasyonların ve uygun konsantrasyonların seçimi incelenmiştir (Dhandapani ve ark., 2008).

Bu çalışmada farklı oksin ve sitokininler farklı konsantrasyonlarda kullanılarak embriyonik kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Embriyonik kallus oluşumu için MS ortamına farklı konsantrasyonlarda CPA (chlorophenoxyacetic acid) ve 2,4-D hormonları eklenmiştir ve sonuçlar incelenmiştir. Oluşan embriyonik kalluslar ise farklı konsantrasyonlarda BAP ve GA3 içeren MS ortamlarına alınmıştır. Daha sonra, olgun yeşil embriyonik kalluslar köklenmeleri için farklı konsantrasyonlarda oksin içeren MS ortamlarına aktarılmıştır. Bunun dışında bitki rejenerasyonu içinde yine oksin ve sitokininlerin eklendiği MS ortamları kullanılmıştır (Çördük, 2007).

Farklı besin ortamı ve eksplant çeşitlerinin *Catharanthus roseus* (L.) G. Don bitkisinde kallus oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada , bitkinin yaprak ve gövde parçaları ekplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Besin ortamı olarak 2 mg/L NAA + 3 mg/L BA veya 2 mg/L NAA + 5 mg/L BA ilave edilmiş MS ortamı , 2 mg/L Kin veya 2 mg/L NAA + 5 mg/L BAP Philips-Collins ortamı ve 2 mg/L NAA + 5 mg/L BA içeren modifiye edilmiş MS ortamı, çalışmada kullanılmıştır. En iyi kallus oluşumu 2 mg/L NAA ve 3 mg/L BA ilave edilmiş MS ortamında gözlenmiştir (Akçam ve ark., 2000).

Catharanthus roseus (L.) G. Don bitkisinin materyal kullanıldığı diğer bir çalışmada, gövde parçaları 2 mg/L NAA ve 5 mg/L BAP içeren MS ortamına alınmış ve kallus dokusu meydana gelmiştir. Bu ortamda oluşan kallus dokusu farklı oranlarda bitki büyüme

düzenleyicileri içeren sürgün rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. 4 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP ilave edilmiş ortama aktarılan kallus dokusunda, gram başına 11,9 ±0,8 sürgün oluşumu gözlenmiştir. Rejenerasyonu sağlanan sürgünler, daha sonra farklı miktarda oksin içeren MS ortamına aktarılmış ve 1 mg/L NAA içeren MS ortamına aktarılan sürgünlerin iyi bir şekilde geliştikleri gözlenmiştir. Çalışma sonunda, olgun sürgünler köklendikten sonra dış ortama aktarılmıştır (Akçam ve ark., 2001).

Bu çalışma da, *Catharanthus roseus* bitkisinden elde edilen sıkı kallus kütlesini (CCC) belirli derecelerde etkileyen hücresel ve doku farklılaşması gibi kesin değerler belirtilmiştir. Sıkı kallus kütlesi daha normal dağılmış hücre kültürlerine oranla iki kat daha fazla indol alkaloidleri sentezlediği gösterilmiştir. Çalışmada ortama ilave edilen KCL, mannitol, çeşitli sentetik öncüler ve bio-regülatörlerin indol alkaloidlerinin üretimi ve alkaloidin ortama bırakılması üzerine olumlu etkileri kaydedilmiştir. 250 mM mannitol ve 4 g / l KCl eklenen ortamlarda sırasıyla 42.3 mg / l⁻¹ ve 33,6 mg / l⁻¹ ajmalisin üretimi gözlemlenmiştir ve bu miktarlar kontrol grubunun 4 katı değerdedir. Süksinik asit, tryptamine ve triptofan eklenmiş ortamlarda kaydedilen ajmalisin değerleri sırasıyla; 41.5 mg l⁻¹, 36.9 mg l⁻¹ ve 31.8 mg l⁻¹ şeklindedir, katharin üretimi değerleri sırasıyla; 21.1 mg l⁻¹, 17.2 mg l⁻¹ ve 18 mg l⁻¹ şeklinde kaydedilmiştir, sıkı kallus kültürü ortamına ilave edilen geraniol ise biyokütle artışını ve alkaloid üretimini inhibe etmiştir. Ayrıca sıkı kallus kültürü ortamına tetrametil amonyum bromür ilavesinde de ajmalisin (49.3 mg l⁻¹) ve katharin (18.3 mg l⁻¹) üretiminde belirli bir artış gözlenmiştir (Zhao ve ark., 2001).

Bu çalışmada, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don bitkisi uygulanan ozmotik stres ve prolin (PRO) metabolizması, antioksidan enzim aktiviteleri ve indol alkaloid birikimine bağlı kuraklık gibi farklı faktörler için çeşitli su düzenleme sistemleri geliştirmiştir. Saksıda büyütülen bitkilerde 10,15,20 ve 30. günlerde düzenli olarak stres faktörleri ve sulama yapılarak kontrol edildi. Bitkilerden 41 tanesi 10 gün periyodunda, 46 tanesi 15 gün periyodunda ve 51 tanesi 20 gün periyodunda köklerinden alınarak söküldüler. Kuraklık stresi altındaki bitkilerde aminoasit (AA), glisin betain (GB), PRO içeriğinde artış, prolin oksidaz (PROX) enzim aktivitesinde ise azalma ve γ -glutamil kinaz (γ -GK) aktivitesinde ise kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir. Peroksidaz (POX) ve polifenol oksidaz gibi antioksidan enzimlerin (PPO) kuraklık stresi uygulanan bitkilerde kontrol grubu bitkilerinde oranlar artış gözlenmiştir. Kuraklık stresi altındaki *Catharanthus roseus*

bitkilerinde kontrol gurubundan farklı olarak sürgünler ve köklerde toplan indol alkaloid üretiminde artış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, kuraklık stresi altındaki *C.roseus* gibi tıbbi önemi yüksek bitkilerde PRO metabolizmasında, osmotik regülasyonda, savunma sistemlerinde belirgin artışlar rapor edilmiştir (Jaleel ve ark., 2007).

Catharanthus roseus olgunlaşmamış zigotik embriyo kaynaklı embriogenic hücre süspansiyon kültürlerinde (Madagaskar periwinkle) bitki rejenerasyonu için gerekli kültür koşulları 'Little Bright Eye' olarak açıklanmıştır. 4,52 µM 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ile desteklenmiş % 20 oranında Murashige ve Skoog (MS) ortamında kültüre alınan olgunlaşmamış zigotik embriyo kültüründe 8. hafta sonunda yarı berrak ve kolay dağılır şekilde kalluslar oluşmuştur. 4 haftalık aralıklarla MS ortamında alt kültüre alınan toplam embriyonik kalluslarda yarı berrak kolay ufalanabilir ve düşük oranda sarımsı kalluslar gözlemlenmiştir. MS bazal ortamına aktarım sırasında, birçok sayıda embriyonik kallusun somatik kallus şekline geçmesine neden olmuştur. Hücre süspansiyon kültürlerinde 4,52 µM 2,4-D eklenen sıvı MS ortamı kullanarak embriyonik kallus eldesi sağlanmıştır. Hücre süspansiyon kültürü ortamında gelişen ve MS basal ortamı alınan embriyonik hücre yığınları %56.7 oranında küçük bitkicikler vermişlerdir. Bitkiciklerin toprak saksı içine aktarımları gerçekleştirildi ve bir büyüme odasında büyümeleri beklendi (Kim ve ark., 2004).

Su stresine tolere olmuş seçilen hücrelerdeki mekanizmalar halen araştırılmaktadır (Singh ve ark., 1989). Polietilenglikol' ün %15'den %30' a kadar artan konsantrasyonlarının hücre hatlarının kuraklığa toleranslarını artırdığı fakat bu toleransın osmotik koşullar içermeyen ortamlarda polietilenglikole adapte olmuş hücrelerin subkültüre alınması sonucunda hızla kaybedildiği gözlenmiştir (Bressan ve ark., 1982). Farklı ürünlerde osmotik ayarlama kapasitesi ve kuraklığa tolerans arasında pozitif bir ilişki bulunduğu belirlenmiştir (Parsons ve ark., 1984). Polietilenglikol'ün kırmızı biberlerin hücre kolonilerinin gelişimi, osmotik potansiyelleri ve iyon değişimleri üzerine etkileri de çalışılmıştır. Farklı hücre kolonilerinden bir tanesi %20 ve %25 PEG 8000' in konsantrasyonlarında gelişebilmiştir. Diğer koloni ise %5 ve %10 PEG 8000'in varlığında subkültüre alındıktan sonra en yüksek hücre kütle üretimi değerlerini vermiştir, %15 veya daha yüksek PEG varlığında ise gelişme önemli ölçüde engellenmiştir (Santos-Díaz ve ark., 1994). Kuraklığa tolerant hücre hatlarında osmotik ayarlamaya katkıda bulunan

hücreler arası eriyebilen maddelerin ölçümleri ile ilgili olarak sınırlı sayıda araştırmalar yapılmıştır (Handa ve ark.). Kuraklık stresi altında bulunan farklı bitki türlerinde K⁺, Şeker, Prolin ve glisinbetain düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir (Corchete ve ark., 1986). Su stresi genellikle birbirine uygun olan prolin ve glisinbetain gibi eriyebilen maddelerin birikiminde bir artışa neden olmaktadır. Bu maddeler, organellerin stabilizasyonunu ve proteinlerin korunması gibi rolleri olan toksik olmayan osmotik eriyici maddeler olarak kabul edilmektedir (Pahlich ve ark.). Benzer sonuçlara *in vitro* kültüre alınan domates embriyolarında da elde edilmiştir. Tuz arttıkça Na⁺ ve Cl⁻ iyonları artmış, K⁺ iyonu azalmıştır. Prolin ve glisinbetain uygulamaları ise Na⁺ ve Cl⁻ miktarını azaltmış K⁺ ' u arttırmıştır (Tıprıdamaz ve ark., 1993).

Bu çalışmada, *Catharanthus roseus* fidelerinde dış kaynaklı H₂O₂ uygulaması sonucunun vinblastin (VBL) ve onun öncüleri olan vindoline (VIN), katharin (CAT) ve α-3',4'-anhidovinblastin (AVBL) üretimine etkilerinin araştırılması için bu oksidatif stres altında vinblastin aktivitesi ve öncülerinin aktiviteleri sırasıyla ölçüldü. VBL birikiminin önceden *in vitro* koşullarda H₂O₂ bağımlı peroksidaz (POD) gibi sentaz aktivitesi ile düzenlendiği gösterilmiştir. Bitkilerde deneysel olarak farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ ye maruz bırakıldıklarında, endojenik H₂O₂ veyapraklarda alkoloid birikiminin pozitif seviyelerde arttığı gözlenmiştir. Farklı zaman periyotlarında alkaloid konsantrasyonları, redoks tepkimesi sonucunda farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ değerleri, askorbik asit (AA), oksidatif üretim sonucunda ki glutathion (GSSG) ve POD aktivitesi gibi tepkime ürünleri farklı H₂O₂ uygulamaları sonucu değiştirilmiştir. Alkaloidler ve redoks durumu arasındaki korelasyon analizi sonucunda VBL üretiminin redoks tepkimeleri ile yakından ilişkili olduğunu gösterilmektedir. Bu sonuçlar ışığında *C. roseus* bitkisi içinde VBL metabolizmaları ve redoks durumu arasında yeni bir bağlantı sağlanmıştır (Tang ve ark., 2009).

Catharanthus roseus bitkisi için yeterli bir seviyede kriyoprezervasyon protokolü ile embriyonik hücre süspansiyon kültürü kurulmuştur. Bu ilkin kurulan embriyonik hücreler vitrifikasyon tabanlı kriyoprezervasyon metoduna göre korunmasız olmaları nedeniyle alt kültür ortamına alınmadan önce sıvı azot içerisine batırılmıştır. Bu birincil hücre süspansiyon kültürleri *C.roseus* bitkisinin hipokotillerinin 4.52µM 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) içeren ortamlardan elde edilen ve dondurulan embriyonik hücreler ile

kurulmuştur. İlk alt kültür ortamında farklı aralıklarda sükröz (0.09-0.6 M) ve sorbitol (0.2-0.6 M) uygulamaları denenmiştir ve hücrel büyümenin en yüksek şekilde teşvik edildiği ortamın 0.4 M'lık sükröz içeriğine sahip ortam olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, altı farklı seviyede dimetil sülfoksit (DMSO) (%5-10) ve PT 1-PT 6 şeklinde farklı kombinasyonlar halinde gliserol (%5-10) tek olarak veya kriyoprezervasyon kombinasyonları muamelesiyle uygulanması sonucunda en yüksek frekansta embriyonik kültür verimliliğinin ya 0.4 M sükröz, %5 DMSO ve %5 gliserol PT-5 ya da .4 M. sükröz, %5 DMSO (PT-1) şeklinde olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ancak PT-1 muamelesi sonucu tekrar kültürünü takip eden hücre kolonilerinin en çok kriyoprezervasyon kültürlerinin en çok ($10,06 \pm 0.55$) oranında ürettiği bulunmuştur. Tüm kalluslar için optimize edilerek ortamlar 6.62 μ M (BAP) ve 5.37 μ M (NAA) şeklinde hazırlanmıştır ve normal büyüme yeniden başlatılmıştır ve dondurulmamış embriyonik kültürlerden somatik embriyo benzeri yapılar üretilmiştir. Bu oluşan somatik embriyoların rejenerasyonu sonucunda oluşan bitkicikler ve diğer tüm bitkicikler normal morfoloji sergilemiştir (Fatima ve ark., 2009).

Bu çalışmada; Osmotik stresin kallus gelişimi üzerindeki etkileri hakkında farklı görüşler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar osmotik potansiyel artışının kallus büyümesini uyardığını (Kristiansen ve ark., 1975) belirtmelerine rağmen, Bornman ve Huber (1979), %5, %10 polietilenglikol ile oluşturulan osmotik potansiyelin, tütün kalluslarının kuru ağırlığı, protein ve klorofil içeriğini artırırken, %30 polietilenglikollü ortamların bunu inhibe ettiğini saptamışlardır. Bizim sonuçlarımızda ise; Kandil Dolma' veyağlık 28 çeşitlerinde kallus kütle artışı tüm alt kültürler boyunca MS+PEG'li ortamlarda, MS ortamlarına göre engellenmiştir. Ancak Yağlık 28' in kallus oluşum yüzdesi ikinci alt kültürde PEG'li ortamda Kandil Dolma'nın MS Normaldeki kallus oluşumundan bile fazladır. Bu sonucumuz çeşitler arasındaki farkların önemini göstermektedir. *C. annuum* cv. Kandil Dolma ve *C. annuum* cv. Yağlık 28'in MS normalde oluşan kallusların kalitesi (renk, büyüklük, gelişim hızı) açısından bir karşılaştırma yapıldığında ise Kandil Dolma çeşitlerinin daha avantajlı olduğu söylenebilir. Tabii ki kullanılacak değişik dozlardaki polietilenglikolün çeşitlerinde farklı tepkiler yaratacağı da düşünülmektedir.

PEG ile büyüme düzenleyicileri birlikte kullanıldığında; Kandil Dolma çeşitlerinin canlı kütle değişiminde 10 ppm. NAA eklenmesi, tek başına % 10 PEG' in kullanıldığı ortamlara oranla belirgin bir artış meydana getirmiştir. Bu % 10' luk polietilenglikolün

azaltmış olduğu kallus verimindeki düşüşün ortama oksin eklenmesi sonucunda geri kazanılmış olduğunun bir göstergesidir. Yağlık 28 çeşitlerinde ise ortama 10 ppm. NAA eklenmesi kallus verimini PEG' li ortama göre azaltmıştır. Olasılıkla bu zıtlık çeşitlerinin içsel hormon düzeylerinin farkından kökenlenmektedir. Bu sonuçlar da doku kültüründe kullanılan materyalin genetik önemini tekrar vurgulamaktadır.

Oksin ve sitokininin % 10 PEG' li MS ortamlarına birlikte eklendiğinde, Kandil Dolma'da canlı kütlede, sadece oksin eklenmiş ortamlara nazaran, tüm alt kültürler boyunca bir düşüş meydana getirmiştir. Bu ise ortama eklenen 10 ppm KIN'in polietilenglikol ile sinergistik etki göstererek kallus verimini inhibe ettiğini göstermektedir. Yağlık 28 çeşitlerinde ilk alt kültürde yalnızca oksin eklenmiş ortamlara nazaran kütlede bir artış gelmesine rağmen daha sonraki alt kültürlerde canlı kütle değişimi en düşük değerlerine ulaşmıştır (Akı, 1997).

Catharanthus roseus bitkisi; ajmalin, vinblastin ve vincristin gibi ilaç kullanımına ait önemli alkaloidleri üretmesi dışında çok sayıda farklı indol alkaloidi üretimini gerçekleştiren bir bitkidir. Bu çalışmada, *C.roseus* bitkisindeki birbiriyle bağlantılı oksijen yetmezliği ile ajmalin üretimi için kurulan hücre süspansiyon kültürlerindeki hücre büyüme siklusuna etki eden farklı büyüme etkenleri incelendi. Sonuçlar doğrultusunda C20D hücrelerinde oluşan oksijen yetersizliği durumlarında alkaloid üretiminin çok yüksek seviyelerde inhibe edildiği gözlemlendi. Büyüme logaritmasında bulunan hücreler oksijen yetmezliği durumunda bir metabolik biyosentez yolu ile alkaloid üretimini yeniden yapılandırabildiler. Ayrıca, benzilaminopürin (BAP) eklenmesi ile oksijen yetmezliği durumunda gerçekleşen inhibasyon etkisinin neredeyse yok denecek kadar az duruma getirildiği gözlemlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda ajmalin üretimi için kurulan hücre süspansiyon kültürlerinde eklenecek BAP ile hipoksi durumunun etkilerinin azaltılabileceği şüphesizdir (Senoussi ve ark., 2009).

Bu çalışmada iki farklı *Catharanthus roseus* varyetesi olan rosea ve alba türleri üzerinde %60 ve %100 oranında farklı seviyelerde su uygulaması yapılarak alınan sonuçlar incelendi. Kuraklık stresi altındaki bitkilerde %60 oranında sulama gerçekleştirilen ve kontrol grubu olarak seçilen %100 sulama gerçekleştirilen bitkiler arasındaki farklar büyüme periyotlarına göre 30 ila 70. günler arasında rapor edilmiştir. Yaprak alanı süresi,

toplu su çıkarımı, su kullanım etkinliği, net asimilasyon oranı, terleme oranı, hasat indeksi, biyokütle ortalaması ve su kullanımındaki verimlilik kontrol grubu ve uygulama grubu şeklinde incelendi. Su kullanım etkinliği önemli ölçüde su stresi altında her iki çeşit de artmıştır. Kuraklık stresi altında her iki tür için terleme oranı, hasat indeksi, ortalama biyokütle, birikimli su aktarımı, net asimilasyon oranı yaprak alanı genişletme sürelerinin azaldığı gösterildi. Bu iki tür için alınan sonuçların en iyisi rosea türünden elde edildi (Jaleel ve ark., 2008).

Bu çalışmada, *Catharanthus roseus* bitkisinin kuraklık stresi altında H₂O₂ içeriği, lipid peroksidasyonu ve serbest radikalleri süpürme metabolizması reaktif oksijen değişim metabolizması analiz edilmiştir. Buna ek olarak, kökte ajmaline ekstratları ve birikim miktarları kontrol grubu ve uygulama grubunda rapor edildi. H₂O₂ içeriği stres altındaki uygulama grubunda ve stres altında bulunmayan kontrol grubunda analiz edildi. Lipid peroksidasyonunda tiyobarbitürik asit reaktif maddeler olarak tahmin edilmiştir. Enzimatik olmayan antioksidanlar yani, askorbik asit, tokoferol ve redükte glutatyon içeriği, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimler alındı ve örneklerden tahminler yapıldı. Kontrol olarak gölgede kurutulmuş kök örneklerinden ölçülen ajmalin alkaloid üretiminde sayılabilir ve anlamlı düzeyde artış saptandı. Bu araştırmanın sonuçlarına göre *Catharanthus roseus* bitkisinde ekonomik ve tıbbi açıdan çok önemli olan ajmalin üretiminin yüksek düzeylerde arttırılabileceği ortaya konuldu (Jaleel ve ark., 2008).

Bu çalışmada *in vitro* kültürlerde soğuk depolamaya ilişkin kontaminasyon ve somoklonal varyasyon etkilerinin azaltılmasına yönelik bir inceleme yapılmıştır. Bu çalışmada hazırlanan ortamlara ya 116.8 mM. sorbitol (SO) ya da 58.4 mM. sükroz (SU) yalnız başına eklenmiştir. Daha sonraki aşamalarda 5°C de 7 aylık bitkilere farklı konsantrasyonlar mannitol eklenmiştir. SO içeren ortamlardaki sürgünler, daha düşük oranlarda hayatta kaldı ve depolama sırasında diğer tedavilere göre daha az büyüdüler, standart kültür koşullarına transferleri sonrasında ise çok sayıda sürgün öldü. Diğer tedavi yöntemleri ile karşılaştırıldığında, Mand boths (M) türü ağırlık artışı ve aksiller sürgünlerin gelişimi en iyi şekilde kaydedildi ve hayatta kalanların oranı %100 şeklinde bildirildi. Bunlara ek olarak M kültürleri SU içerikli ortamlarda gelişim gösterdi. Sonuçlar doğrultusunda SOD ve CAT aktivitesinin SO kullanılarak muhafaza edilen ortamlarda

kontrole oranla daha yüksek oranda olduğu ve M türü sürgünlerde daha az olduğu gösterilmiştir (Marino ve ark.).

Bu çalışmada; Polonya iklim koşulları altında, *Catharanthus roseus* bitkisinin seralardan ya da plastik tünel biçimli alanlardan dış ortama aktarılarak ürün elde edilmesine ilişkin incelemeler anlatılmıştır. Topraksız kültür oluşturulmasına yönelik yeni bir yöntem test edilmiş ve geliştirilmiştir. Suda geliştirilen bu bitkilerden önemli konsantrasyonlarda alkaloid üretimi gerçekleştirilmiştir. *C. roseus* tohumları da bu şartlar altında üretilmiş olabilir. Bu çalışmada tohum özelliklerinin yanı sıra farklı depolama yöntemlerinin etkisi de sunulmaktadır. Oda sıcaklığında kağıt torbalar içinde saklanan tohumların 7 yıla kadar ve 5°C de buzdolabında saklanan tohumların ise 15 yıla kadar gelişim açısından verimli olduğu gösterilmiştir. -10°C de dondurularak saklanan tohumlarda ise çimlenme oranında çok büyük düşüşler gözlenmiştir (Buchwald ve ark., 2007).

2005 yılında yapılan bir çalışmada; doku kültürünün gelişimini hızlandırmak ve optimize edilmiş morfogenezis metodu geliştirmek için, çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin doku kültüründe metabolizma ve gelişimi nasıl etkilediği araştırılmıştır. MS tuzları, vitaminler ve farklı konsantrasyonlarda 2,4 D (2,5- 5,0- 7,5- 10,0- 12,5 µM) içeren kallus indüksiyon ortamı kullanılmıştır. Sürgün rejenerasyon ortamı olarak ise, tek ya da kombinasyonlu olarak BAP ve NAA (2,5- 5,0-7,5- 10,0-12,5 µM) eklenen MS tuzları, vitamin içeren ortam kullanılmıştır. En iyi kallus indüksiyon ortamı, yaprak disk eksplantlarının kuru madde ağırlıklarındaki artış temel alınarak belirlenmiştir. Sürgün rejenerasyonu için en uygun konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ortam, 3 hafta inkübasyondan sonra sürgün farklılaşmasındaki etkisi temel alınarak belirlenmiştir. 5,0 µM 2,4 D içeren ortamda, kallusların kuru madde ağırlığında en yüksek artış gözlenmiştir. Sürgün farklılaşma sıklığı BAP (5 µM) ve NAA (2,5 µM) kombinasyonunda eklendiğinde daha etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca DNA metilasyonu, solunum oranı ve fotosentetik performansın birleştirilmesinin, eksplantın verdiği cevap hakkında erken bilgi sağladığı belirtilmiştir. Bu kombine metodun, yeni doku kültürü işlemlerinin optimizasyonu sırasında deneysel araç olarak kullanılabilirliği vurgulanmıştır (Toldi ve ark., 2005).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Catharanthus roseus hibrid çiçek tohumları Damla Tarım Zirai İlaç ve Tohum Ltd.Şti.'den temin edilmiştir. Bu tohumlar yüzey sterilizasyonu sonunda *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda yetiştirilmiştir.

3.2. Bitki Materyalinin Yetiştirilme Yöntemi

Eksplant kaynağı olarak kullanılacak bitkilerin yetiştirilmesi için iki farklı yöntem kullanılmıştır.

3.2.1. Bitki Materyalinin *In Vivo* Yetiştirilmesi

Dış ortamda saksılarda yetiştirilen bitkiler için tohumlar öncelikle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuşlardır. Yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlar 1 cm kadar altta kalacak şekilde steril edilmiş 4:1 oranında torf:perlit karışımı viyollere aktarılmıştır. Sulama işleminden sonra toprağın yeterli nem seviyesinde kalması ve çimlenmenin kolaylaşması için viyollerin üzeri streç film ile kaplanmış ve hava girişi sağlanması için birkaç delik bu alanda oluşturulmuştur. Altı gün sonra çimlenme gözlenmiştir ve onaltıncı günün sonunda viyoldeki bitkiler aynı oranda steril edilmiş torf:perlit karışımı içeren çapı 12 cm, derinliği 10 cm olan saksılara aktarılmışlardır. 16 saat ışık, 8 saat karanlık uzun gün koşulları, 25±2°C, 28.080 lüks floresan ışık şiddetine sahip bitki yetiştirme odasında büyümeleri sağlanmıştır. Bitkiler her gün düzenli olarak saf su ile sulanmıştır.

3.2.2. Bitki Materyalinin *In Vitro* Yetiştirilmesi

Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, bu işlemin ardından bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen 20 mL Murashige Skoog (1962) bazal ortamı (MSO) içeren 100 mL'lik cam şişelerde kültüre alınmıştır. 20 ml'lik petrilere otoklavdan alınan sıvı haldeki besin ortamının 45°C ye indiğinde aktarımı yapılmıştır. Petri kapları, 16 saat ışık, 8 saat karanlık uzun gün koşulları, 25±2°C, 28.080 lux floresan ışık şiddetine ayarlanmış bitki yetiştirme kabineye yerleştirilmiştir. Bu kültür şişelerinde çimlenen ve büyüyen bitkiler,

besinlerin tükenmesi sonucu gelişimlerinin yavaşlamaması için taze besiyeri içeren daha büyük magenta kaplarına aktarılmıştır. Bu magenta kaplarındaki MS ortamında 3-4 haftalık süre sonunda içeriğindeki besinlerin bitkinin bu besinleri kullanıyor olması ve tükenmesi nedeniyle belirli aralıklara yeni ortamlar hazırlanmış ve bitkiler bu yeni ortamlara aktarılmıştır.

3.2.3. Sterilizasyon Yöntemleri

Bitki doku kültürü şartlarında yapay besin ortamları kullanılarak çalışılmaktadır. Bu yapay besin ortamı mikroorganizmaların gelişimi içinde gerekli besin bileşenlerini barındırdığı için mikroorganizma gelişimine açıktır. Kullanılan bitki materyalinin mikroorganizmalarla bulaşmış hale geçmesine kontaminasyon denilmektedir. Bitki doku kültürü çalışmalarında bu kontaminasyon faktörünü ortadan kaldırmak için malzemeler ve hazırlanan besin ortamlarının sterilizasyonu çok önemlidir.

Kullanılacak her türlü malzemenin, hazırlanan besin ortamlarınının, kullanılacak bitkiye ait olan tohumların ve her türlü bitkisel materyalin sterilizasyon yöntemlerinden birisi ile steril edilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda kullandığımız laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonunda, besin ortamının sterilizasyonunda ve eksplant sterilizasyonunda çeşitli yöntemler kullanılmıştır.

3.2.4. Tohum Yüzey Sterilizasyonu

Catharanthus roseus tohumları küçük olmaları sebebiyle Epenndorf tüpleri içerisinde steril edilmiştir. *C.roseus* bitkisinin tohumları çok sert ve pürüzlü bir tohum kabuğuna sahip olması nedeniyle yüzey sterilizasyonu seçimi farklı makalelerin incelenmesi ile oluşturulmuştur (Aslam ve ark., 2008).

Bu seçilen yöntem sırasıyla şu şekildedir; tohumlar öncelikle %70'lik etik alkolde 30 saniye boyunca vortex yardımıyla karıştırılmışlardır. Bu işlem sonrasında etil alkol mikropipet yardımı ile alınarak ortama içine 3 damla Tween 20 damlatılmış ticari olarak satılan %25'lik sodyum hipoklorit eklenmiştir. Bu şekilde 10 dakika boyunca vortex yardımıyla karıştırılmıştır ve bu süre sonunda %25'lik sodyum hipoklorit mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Son olarak epenndorflara steril saf su eklenmiş ve bu şekilde 5 dakika boyunca vortex yardımıyla karıştırılmıştır, bu sürenin sonunda steril saf su

mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Saf ile durulama olarak tanımlanan bu işlem 4 defa tekrarlanmıştır ve 5. durulama aşamasında steril saf su eklendikten sonra epenndorf etrafı alüminyum folyo ile kaplanarak +4°C de 3 gün süreyle tohum dormansisini ortadan kaldırmak için bekletilmiştir. Steril edilen bu tohumlar MS ortamlarında çimlenmesi için aktarılmıştır.

3.2.5. Eksplant Kaynağı Olarak Kullanılan Yaprak ve Gövde Kısımlarının Sterilizasyonu

Bitki yetiştirme kabininde yetiştirilmiş bitkilerin eksplant olarak kullanılacak yaprakları ve gövde parçaları %15'lik sodyum hipokorit (%5'lik) içerisinde 15 dakika boyunca vorteks yardımıyla çalkanarak bekletilmiş ve sterilize edilmiştir. Daha sonra steril kabin içerisinde üç defa steril saf sudan geçirilerek sodyum hipokloritin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

In vitro şartlar altında yetiştirilen fideler zaten steril olduklarından bu bitkisel materyal için sterilizasyon işlemine gerek duyulmamıştır. Bu *in vitro* fidecikler kesilerek doğrudan besin ortamlarına aktarılmıştır.



Şekil 3.1. Bitki yetiştirme odasındaki petriler

3.2.6. Besin Ortamlarının ve Cam Malzemelerin Sterilizasyonu

Belirlenen miktarlarda hazırlanan yapay besin ortamları cam şişeler içerisinde 121°C de 1 atmosfer basınçta 15 dakika boyunca otoklavda steril edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan yapay besin ortamlarının içine agar eklediğimizden dolayı ortamlar tamamen soğuyup katılaşmadan önce yaklaşık 45-50°C ye geldiğinde steril cam petrilere 20 ml olacak şekilde dökülmüştür. Bu şekilde henüz sıcakken petrilere dökülen besin ortamlarında kontaminasyon riski azalmıştır. Kullanılan petrilerin etrafları ise streç film ya da parafilm ile kapatılmıştır.

Denemelerimizde kullanılan cam malzemelerin tümü öncelikle deterjanlı ve sodyum hipokloritli su ile yıkanarak organik maddelerden arındırılmaya çalışılmıştır. Kurutulan bütün cam malzemeler ve eksplant kesimi için kullanılan fayanslar alüminyum folyo ile kaplanıp 121° C 'de 1 atmosfer basınçta otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan bu malzemeler üzerlerine sprey yardımı ile %70'lık etil alkol püskürtülerek steril kabine aktarılmışlardır. Kullanılan pensler ve bistüriler 350°C de cam boncuklu sterilizatör içine batırılarak 3-5 dakika bekletilerek steril edilmiştir ve soğuduktan sonra kullanılmıştır.

3.3. Besin Ortamının ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanma Yöntemleri

3.3.1. Besin Ortamının Hazırlanması

Çalışmamızda bütün eksplantlar, Murashige Skoog (1962) besin ortamında kültüre alınmışlardır. Çizelge 3.1'de bileşenleri verilen hazır (Sigma-S5519) Murashige Skoog bazal besin ortamının yanı sıra, karbon kaynağı olarak sükroz (%3) (Sigma-S-5391) ve ortam yarı-katılaştırıcı olarak agar (%0,8) (Merck-1.01613.0500) kullanılmıştır.

Ortamın pH'sı otoklavlamadan önce 1N NaOH ve 1N HCl kullanılarak 5,70- 5,80 olarak ayarlanmıştır ve bu ayarlamadan sonra agar ortama ilave edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri besin ortamına otoklavlamadan önce ilave edilmiştir.

Çizelge 3. 1. Murashige ve Skoog Besin Ortamının Bileşenleri (1962)

Makro elementler	mg/L
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	
MnSO ₄ .4H 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
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FESO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
Organik Maddeler	
Nikotinik asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5
Thiamin-HCl	0,1
<i>myo</i> -inositol	100
Glisin	2,0

3.3.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması

Bitki büyüme düzenleyicilerinden sentetik olarak kullanılan oksinlerden 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve Naftalen asetik asit (NAA), sitokininlerden 6-benzilaminopürin (BAP) ve Kinetin (Kin) kullanılmıştır. Bu bitkisel büyüme hormonları stok solüsyon halinde hazırlanarak kullanılmışlardır. Stok solüsyon hazırlanırken 1mg/mL şeklinde hazırlanır. Stok solüsyonlar 5mL olarak bu büyüme hormonlarının çözücüleri ve saf su ile hazırlanır. BAP, Kin ve NAA'in çözücüleri NaOH ve 2,4-D'nin çözücüsü ise EtOH'dur.

3.3.3. Hazırlanan MS Besin Ortamları

Çalışmamızda *in vitro* şartlarda yetiştirilen tohumların çimlenmesi için MS ortamına herhangi bir bitki büyüme hormonu eklenmeden MS0 şeklinde hazırlanmıştır. *In vitro* ve *in vivo*'da gelişen bitkilerin yaprak ve gövde kısımlarından alınan eksplantlar ise farklı konsantrasyonlarda NAA+BAP ve 2,4-D+Kin içeren MS ortamlarına alınarak kallus oluşumları gözlemlenmiştir. Kallus oluşumları sonrasında gözlenmesi beklenen rejenerasyonları engellemek amacıyla eksplantlar 2 haftalık periyotlarda alt kültüre alınmışlardır. Sonuçlar doğrultusunda oluşan en iyi biyokütleler stres faktörü uygulama aşaması için seçilerek kullanılmıştır.

Hazırlanan kültür ortamlarına aktarılan eksplantlardaki değişimler Olympus SZ51 stereomikroskop altında günlük olarak incelenmiştir. Olympus C5060WZ fotoğraf makinesi ile fotoğraflandırılmıştır. Eksplantların kültür ortamlarına aktarımlarının tamamı Dan-Laf Marka VFRS 1806 Model Laminar Flow Kabin içerisinde yapılmıştır.

3.3.4. Kallus Teşvik Ortamları

3.3.4.1. *In Vitro* Yetiştirilen Bitkiler İçin Kallus Teşvik Ortamları

In vitro şartlarda tamamen steril olarak yetiştirilen bitkilerden elde edilen eksplant kaynakları için kullanılan kallus teşvik ortamları aşağıdaki çizelge 3.2'deki gibidir;

Çizelge 3. 2. Kallus Teşvik Ortamları

Ortam no	NAA (mg/ml)	BAP(mg/ml)
1	2,0 mg/L	2,0 mg/L
2	2,0 mg/L	3,0 mg/L
3	2,0 mg/L	5,0 mg/L
4	3,0 mg/L	2,0 mg/L
5	5,0 mg/L	2,0 mg/L
6	0,5 mg/L	1,0 mg/L
7	1,0 mg/L	0,5 mg/L
8 (MSO)	-	-

3.3.4.2. *In Vivo* Yetiştirilen Bitkiler İçin Kallus Teşvik Ortamları

Çalışmada *C. roseus* yaprak eksplantlarından kallus teşviki üzerine farklı oksin sitokinin oranının etkileri araştırılmıştır. Çizelge 3.2 ve 3.3'de verilen farklı konsantrasyonlarda NAA+BAP ve 2,4-D+Kin içeren MS besin ortamları kallus teşvik ortamı olarak kullanılmıştır. Kabinde yetiştirilen 12 haftalık bitkilerden alınan ve yüzey sterilizasyonu yapılan genç yapraklar küçük kareler şeklinde kesilip her bir petriye on adet gelecek şekilde alt yüzeyleri altta bırakılarak farklı konsantrasyonlarda NAA+BAP ve 2,4-D+Kin ilave edilen 20 ml MS ortamı içeren 9 cm çapındaki petrilere yerleştirilmiştir.

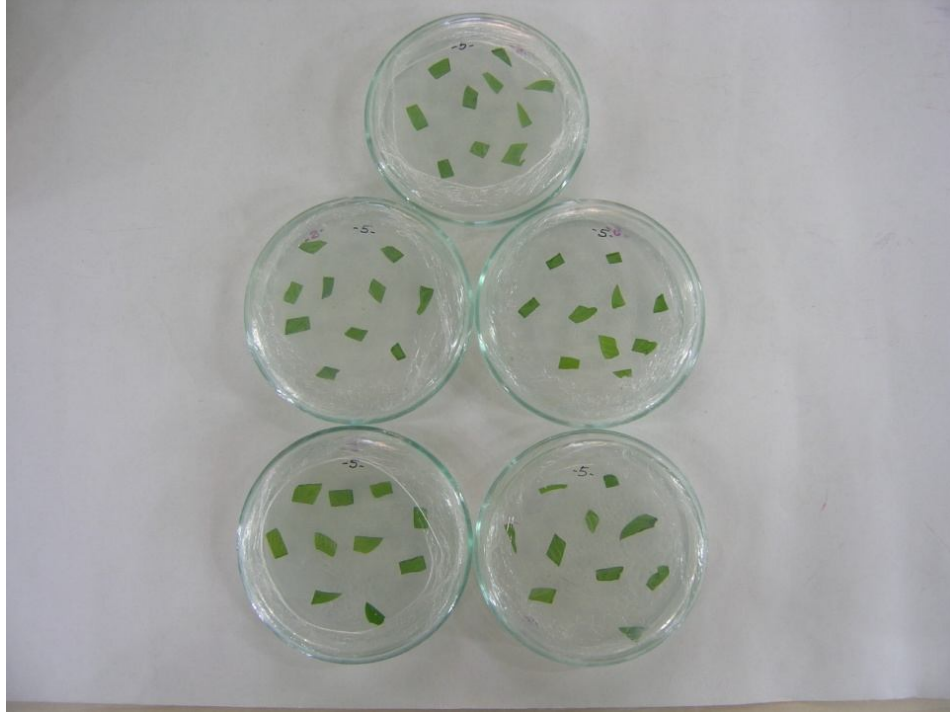
Petrilerin etrafı streç film ile kaplanmıştır. Petriler, daha sonra 16/8 fotoperiyoda ve 25±2 °C ve 28.080 lüks floresan ışık şiddetine ayarlanmış bitki yetiştirme kabinine yerleştirilmiştir. Her bir kallus teşvik ortamı beş tekrarlı şekilde oluşturulmuştur. Yirmi dört farklı kallus teşvik ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarından oluşan kalluslar incelenmiştir. Yaprak eksplantlarından oluşan kalluslar gözlemlenerek en iyi kallus teşvik ortamı ilerideki çalışmalarda kullanılmak üzere belirlenmiştir. Seçilen en iyi kallus teşvik ortamı stres faktörü uygulamasında kullanılacak ortam olarak tasarlanmıştır.

Çizelge 3. 3. NAA ve BAP İçeren Kallus Teşvik Ortamları

Ortam No	NAA+BAP yoğunlukları
MS 1	2,0 mg/L NAA + 2,0 mg/L BAP
MS 2	2,0 mg/L NAA + 3,0 mg/L BAP
MS 3	2,0 mg/L NAA + 5,0 mg/L BAP
MS 4	3,0 mg/L NAA + 2,0 mg/L BAP
MS 5	5,0 mg/L NAA + 2,0 mg/L BAP
MS 6	0,5 mg/L NAA + 1,0 mg/L BAP
MS 7	1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP
MS 8	0,1 mg/L NAA + 1,0 mg/L BAP
MS 9	1,0 mg/L NAA + 0,1 mg/L BAP
MS 10	1,0 mg/L NAA + 3,0 mg/L BAP
MS 11	3,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BAP
M50	-

Çizelge 3. 4. 2,4-D ve Kinetin İçeren Kallus Teşvik Ortamları

Ortam No	2,4-D + Kin yoğunlukları
MS 1	2,0 mg/L 2,4-D + 2,0 mg/L Kin
MS 2	2,0 mg/L 2,4-D + 3,0 mg/L Kin
MS 3	2,0 mg/L 2,4-D + 5,0 mg/L Kin
MS 4	3,0 mg/L 2,4-D + 2,0 mg/L Kin
MS 5	5,0 mg/L 2,4-D + 2,0 mg/L Kin
MS 6	0,5 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L Kin
MS 7	1,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kin
MS 8	0,1 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L Kin
MS 9	1,0 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L Kin
MS 10	1,0 mg/L 2,4-D + 3,0 mg/L Kin
MS 11	3,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L Kin
M50	-



Şekil 3.2. Belirlenmiş ortamlara aktarılmış eksplantların genel olarak ilk görüntüsü (NAA+BAP içeren ortamlar)

3.3.5. Biyokütle Elde Edilmesi

Biyokütlesi elde edilmek için oluşturulan kalluslarda, rejenerasyonun engellenmesi için oluşan belirli periyotlarda alt kültüre alınarak taze ortamlarda geliştirilmelidir. Bu nedenle çalışmamızda oluşturulan kallus teşvik ortamlarında gelişen kalluslar 2 haftalık periyotlarda 18 hafta boyunca alt kültüre alınarak biyokütle eldesi sağlanmıştır.

3.3.6. Biyokütle Üzerine Stres Faktörü Uygulaması

Çalışmamızda elde ettiğimiz biyokütle üzerine farklı stres faktörü uygulamaları yapılmıştır. Uygulanan stres faktörleri ve uygulama dozları çizelge 3.4'de belirtilmiştir. Stres faktörlerinden PEG ve D-Mannitol hazırlanan besin ortamına pH ayarlamadan önce eklenerek balık yardımı ile 50-100°C aralığında manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür ve 121°C ve 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak steril edilmiştir. H₂O₂ ise sıcaklık altında bozulduğu için 0,22 mikronluk filtre kağıdı ile laminar flow içinde steril edilerek hazırlanarak otoklavlanmış MS besin ortamına 45-50°C'ye geldiğinde eklenerek bozulması engellenmiştir. Kullanılan tüm besin ortamlarına en iyi sonuçlar alınan kallus teşvik ortamı seçilerek bu konsantrasyonda oksin/sitokin eklenmiştir. Bu uygulama 1 haftalık

periyotlarda 4 tekrarlı şekilde yapılmıştır. Tüm çalışma boyunca eklenen stres faktörleri beş tekrarlı şekilde incelenmiştir.

Çizelge 3. 5. Biyokütle Üzerine Uygulanan Stres Faktörleri ve Dozları

Kullanılan Stres Faktörü	Kullanılan Dozlar
Kontrol Grubu	Uygulama Yok
PEG-4000	%5
	%10
D-Mannitol	%5
	%10
H ₂ O ₂	100 mM.
	200 mM.

3.3.7. Biyokütle Ölçümlerinin Yapılması ve Kütle Değişimlerinin İncelenmesi

En uygun kallus oluşum ortamı seçildikten sonra eklenen stres faktörleri ile hazırlanan yeni yapay besin ortamına aktarılacak olan kallusların öncelikle ağırlıklarının ölçümünü gerçekleştirdik. Ölçüm işlemlerinin tamamen steril şartlar altında olması için ve tartım aletinin kabin içine alınmamasından dolayı ölçümler falkon tüpleri ile yapıldı. Bu işlem için falkon tüplerinin ağırlıkları önceden ölçülerek hesaplandı ve tümü 121°C de 1 atmosfer basınç altında otoklavlanarak steril edildi. Bu falkon tüpleri laminar flow içerisinde açılarak tamamen steril şartlar sağlanmıştır. Falkon tüpleri içine alınan kallusların ölçümü dışarıda olacağı için falkon tüplerinin kapakları kapatıldı ve ölçüm işlemi bittikten sonra falkon tüplerindeki kalluslar stres faktörü ve belirlenen oranlarda bitki büyüme hormonu içeren yapay besin ortamına alınmak için pulverizator yardımı ile %70'lik etil alkol püskürtülerek laminar flow içersine alındı ve ortamlara aktarımları

gerçekleştirildi. Bu işlem bir haftalık periyotlarda 4 defa tekrarlanarak 4 haftanın sonunda biyokütle değişim sonuçları elde edildi. Bu biyokütle değişim verileri matematiksel ve denklemsel olarak belirtildi.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi İle İlgili Sonuçlar

4.1.1. Bitki Materyalinin *In Vivo* Yetiştirilmesi

In vivo şartlarda yetiştirilen bitkilerin tümünde çimlenme gerçekleşmiş ve 25 adet bitki elde edilmiştir. Bu bitkiler 32. haftalarında eksplant kaynağı olarak kullanılmışlardır. Kullanılan bu bitkilerin yaşı nedeniyle kallus eldesi, *in vitro* şartlarda yetiştirilen ve eksplant kaynağı olarak kullanılan bitkilerden elde edilen kalluslardan daha az verimli olmuştur. Bu bitkilerde kontaminasyon oranı yaklaşık %20 olarak belirlenmiştir. Bu oranın yüksek olmasının nedeni bitkilerin dış ortamda büyümeleri ve besin ortamına alındıklarında yüzey sterilizasyonunun ilk anda %10'luk sodyum hipoklorit olarak seçilmesi olmuştur. Daha sonraki denemede %15'lik sodyum hipoklorit kullanıldığında kontaminasyon oranı %5 seviyelerine çekilebilmiştir. Fenolik bileşikler nedeniyle bazı eksplantlarda kararmalar gözlenmiştir fakat bu kararmaların etrafında da kallus oluşumları gerçekleşmiştir.



A

B

Şekil 4.1. A. *In vivo* ortamda geliştirilen *C. roseus* fidesinin 3 haftalık görünümü B. *In vivo* ortamda geliştirilen *C.roseus* bitkisinin 13 haftalık görüntüsü



Şekil 4.2. *In vivo* koşullarda *C.roseus* bitkisinin yetiştirilme ortamları (32 haftalık bitkiler)

4.1.2. Bitki Materyalinin *In Vitro* Yetiştirilmesi

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlar MSO besin ortamlarına alınarak çimlenme kapasiteleri belirlenmiştir. İlk denemelerde kullanılan tohumlar daha yaşlı olduğu için çimlenme kapasiteleri çok düşük olmuştur bu nedenle yeni alınan tohumlarla çalışmalara devam edilmiştir. Çimlenen bitkiler yeterli zamanlarda alt kültüre alınarak bitkilerin büyümesi sağlanmış ve bu bitkiler eksplant kaynağı olarak 12. haftalarında kullanılmışlardır. Kullanılan tohumların çimlenme kapasitesi %90 üzerinde olduğu için bitki geliştirmede herhangi bir sorun ile karşılaşılmamıştır. Toplamda 100 tohum 10 adet petride çimlendirilmiştir. Çimlendirme ve bitkilerin gelişimi için düzenlenen MS besin ortamlarında herhangi bir bitki büyüme hormonu ilavesi yapılmamıştır.



Şekil 4.3. A. MSO ortamına alınmış *C.roseus* tohumları B. 6 günlük çimlenmiş tohumun stereo mikroskop görünümü

4.1.3. Tohum Yüzey Sterilizasyonuna İlişkin Sonuçlar

In vitro yetiştiricilikte kullanılmak üzere steril edilen tohumlar için seçilecek yüzey sterilizasyon yöntemi farklı makalelerin incelenmesi sonucu derlenmiş ve denendiğinde herhangi bir kontaminasyon sorunu yaşamadığı için bu yöntemle tohum yüzey sterilizasyonuna devam edilmiş ve bu *in vivo* yetiştiricilikte de yöntem olarak kullanılmıştır.

4.1.4. Eksplant Kaynağı Olarak Kullanılan Yaprak ve Gövde Kısımlarının Sterilizasyonuna Ait Sonuçlar

Bitki yetiştirme kabininde *in vivo* şartlarda yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantlar ilk deneme olarak %20'lik sodyum hipoklorit ile 20 dakika muamele edilerek 3 defa saf su ile durulanmıştır. Bu işlem sonunda eksplantların birçoğu kararmıştır ve kallus açısından verimsiz olmuşlardır. Bu nedenle ikinci deneme olarak %15'lik sodyum hipoklorit kullanılarak 20 dakika boyunca uygulanmıştır ve yine 3 defa saf su ile durulanmıştır. Bu uygulama sonucu ilk uygulama sonucuna göre daha verimli olduğundan ve eksplantlar daha az zarar gördüğünden bu işlem sterilizasyon yöntemi olarak seçilmiştir.

4.2. Kültür Ortamlarına İlişkin Sonuçlar

4.2.1. *In Vitro* Yetiştirilen Bitkilerden Alınan Eksplantlardan Elde Edilen Kallus Teşvik Ortamlarına İlişkin Sonuçlar

Kallus teşvik ortamlarından MSO olan yani herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortama yerleştirilen eksplantlarda herhangi bir kallus gelişimi gözlemlenmemiştir. Bu ortamlara konulan eksplantlarda sadece kabarma veyaprak yüzeyinde büyüme oluşmuştur.

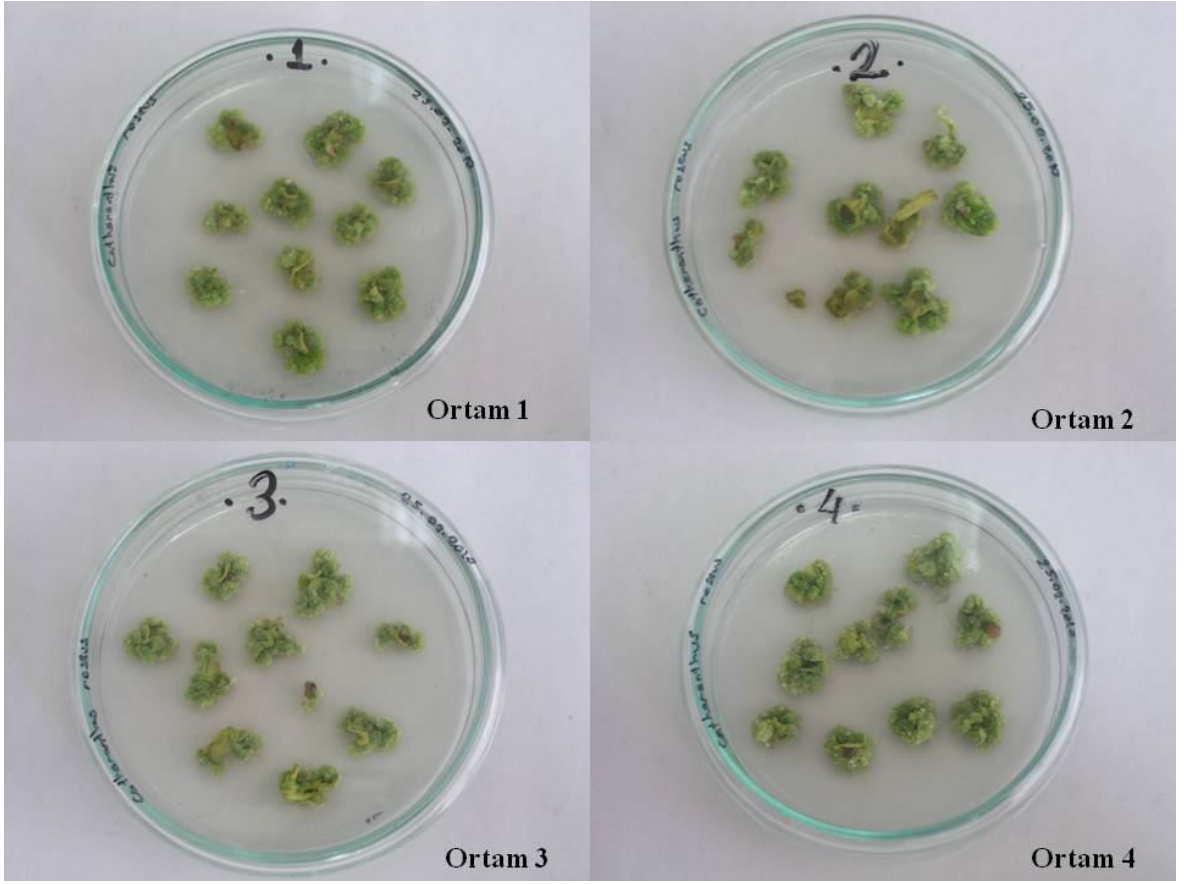
NAA ve BAP içeren ortamlardan 1, 2, 3 ve 7 nolu ortamlarda yaklaşık olarak aynı seviyede kallus gelişimi gözlemlenmiştir. Bunlar kallus biyokütlesi elde etmek için yeterli seviyede kallus gelişimi gösteren ortamlar olmuştur.

NAA ve BAP içeren 4 ve 5 nolu ortam ise en yoğun şekilde kallus gelişimi gözlenen ortamlar olmuştur, bu ortamlar *in vitro* yetiştirilen bitkilerden elde edilen eksplant kaynaklarının kullanıldığı kallus teşvik ortamlarından en iyi verim alınan ortamlar olmuştur.

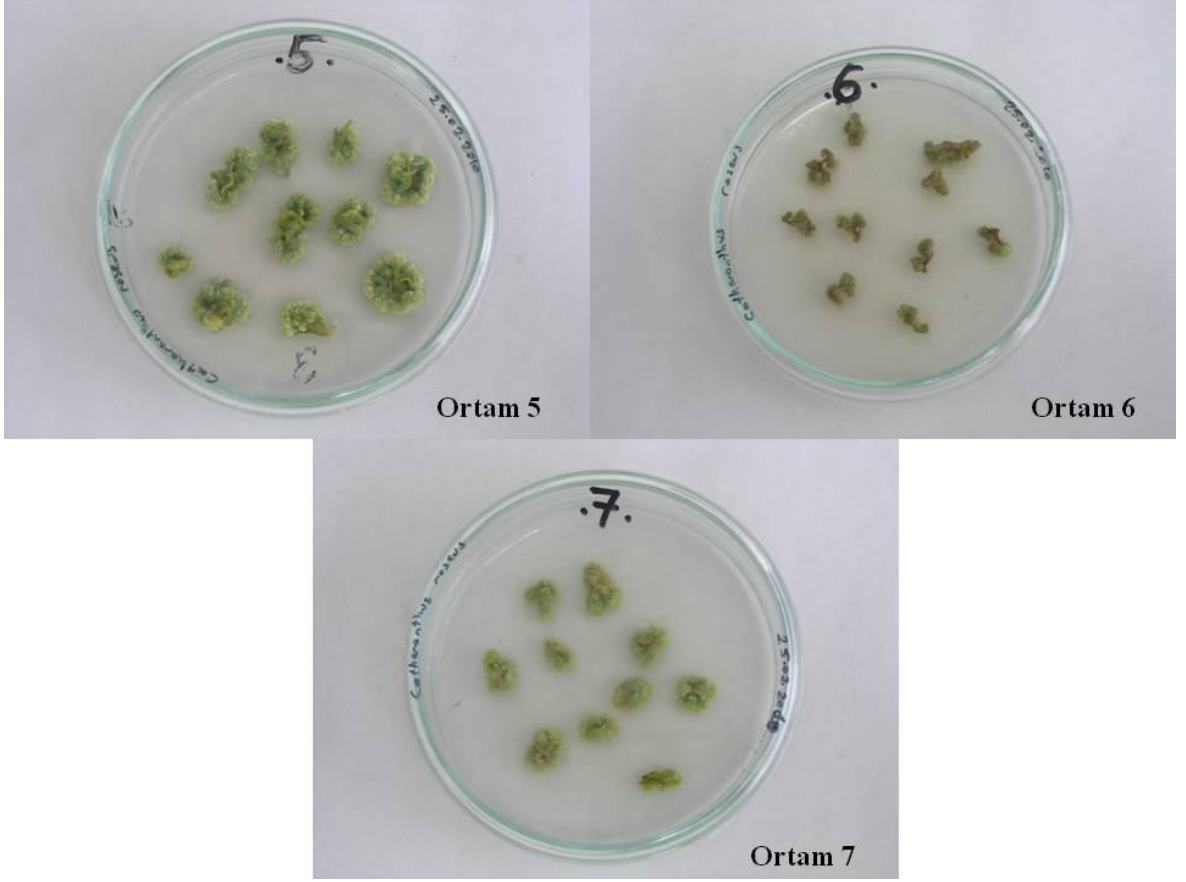
NAA ve BAP içeren 6 nolu kallus teşvik ortamındaki eksplantlarda ise kararmalar oluşmuş veyaralı kısımlardan kallus eldesi çok az olmuştur.



Şekil 4.4. MSO ortamına aktarılan 14 günlük eksplantlar



Şekil 4.5. Kallus teşvik ortamlarındaki eksplantların 10 haftalık görüntüleri



Şekil 4.6. Kallus teşvik ortamlarının 10 haftalık görüntüleri

4.2.2. *In Vivo* Yetiştirilen Bitkilerden Alınan Eksplantlardan Elde Edilen Kallus Teşvik Ortamlarına İlişkin Sonuçlar

Alınan sonuçlarda kallus teşvik ortamlarında kullanılan bitki büyüme hormonlarından BAP+NAA kombinasyonunun 2,4-D+Kin kombinasyonuna oranla kallus gelişimini daha iyi teşvik ettiği bulunmuştur. Farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda ki kallus oluşumları kısaca özetlenirse;

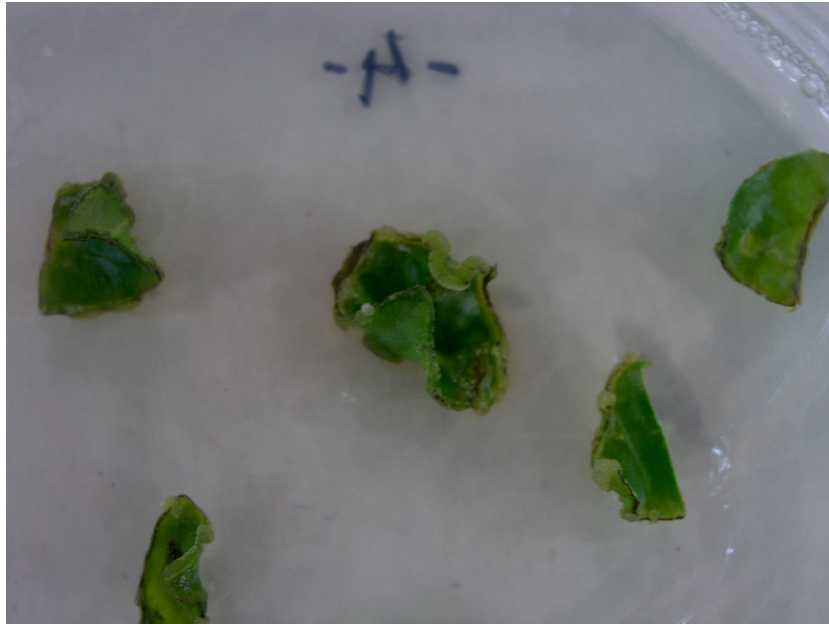
NAA+BAP içeren 10 ve 11 numaralı ortamlarda kallus gelişimi çok az gözlenmiştir ve eksplantlar kararmıştır.

MSO ortamında herhangi bir büyüme hormonu bulunmadığından kalluslar uzun süre boyunca kararmamış olmasına rağmen herhangi bir kallus oluşumu gözlenmemiştir.

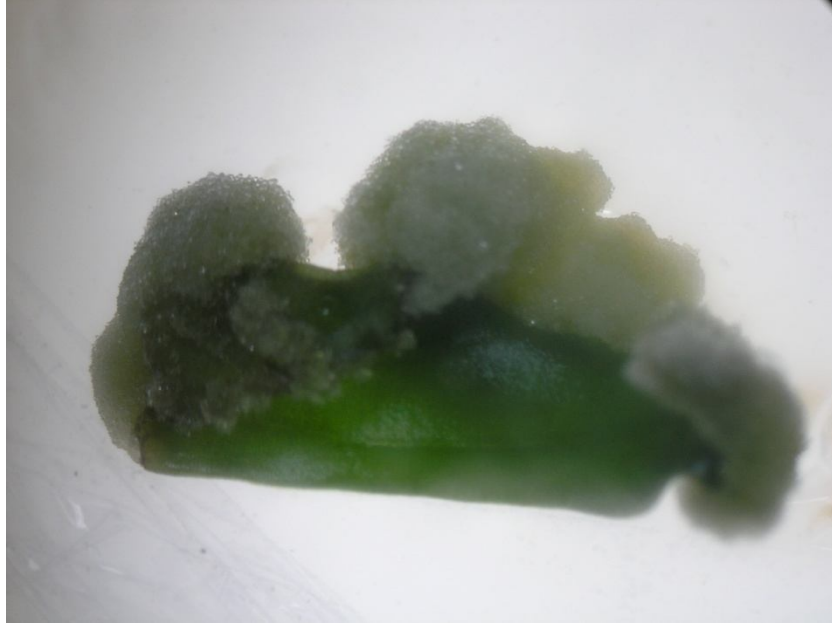
NAA+BAP içeren 1, 2, 3 ve 4 nolu ortamlarda yapraklar kararmasına rağmen kallus gelişimi gözlenmiştir. Gelişen kalluslar kütlece çok az olsada devamlı alt kültürleme ile kaybedilmeden yeterli biyokütleyle ulaşmışlardır.

NAA+BAP içeren 5, 6 ve 7 nolu ortamlarda kallus gelişimi en yoğun şekilde gözlenmiştir, bu yoğunluğa rağmen kalluslarda kararma yine gözlenmiştir.

NAA+BAP içeren 8 ve 9 nolu ortamlarda kallus gelişimi 1, 2, 3 ve 4 nolu ortamlara göre daha yoğun biçimde olmuştur fakat eksplantlar karardığı için bu ortamlardaki kallusların çoğu kullanılmadan kaybedilmiştir.



Şekil 4.7. Ortama alınan eksplantlarda meydana gelen kabarmalar veyaralı bölgelerden 17 günün sonundaki kallus oluşumları



Şekil 4.8. NAA+BAP içeren ortamlarda gelişen kallusların 7. haftada stereo mikroskop altındaki görüntüleri

2,4-D+Kin içeren ortamlara alınan kalluslarda meydana gelen değişimler ise şu şekilde özetlenebilir;

MSO ortamında beklenildiği gibi herhangi bir kallus gelişimi olmamıştır. Bir süre sonra yapraklar tamamen kararmıştır.

2,4-D+Kin içeren 1, 2, 3 ve 4 nolu ortamlardaki eksplantlarda kararmalar gözlenmede en iyi biçimde kallus gelişimi incelenen bu ortamlar olmuştur.

2,4-D+Kin içeren 5, 6 ve 10 nolu ortamlara alınan eksplantlarda kararmalar yoğun biçimde gözlemlenmiştir. Kallus gelişimi ise bu ortamlarda ya çok az ya da hiç gözlemlenmemiştir.

2,4-D+Kin içeren 7, 8 ve 9 nolu ortamlarda ise kallus gelişimi daha az gözlenmiştir bununla birlikte yapraklarda kararmalar da oluşmuştur.

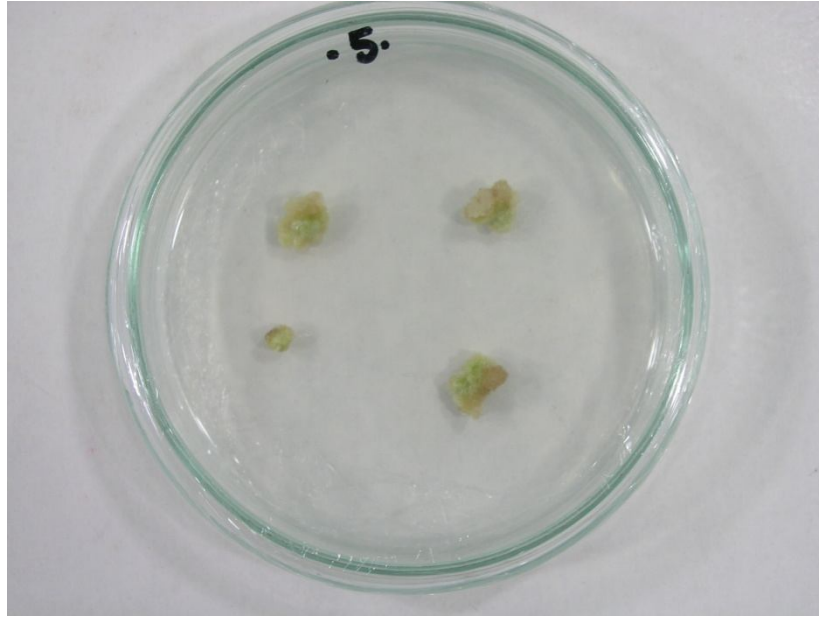


Şekil 4.9. Ortama alınan eksplantlarda oluşan kararmaların genel görüntüsü

Tüm incelenen kallus teşvik ortamlarında en iyi sonuçlar kombinasyon olarak NAA+BAP kombinasyonundan alınmıştır. Bu kombinasyondaki en yoğun kallus eldesi olan konsantrasyonlar ise 5 nolu ortam olan 5 mg/mL NAA ve 2 mg/mL BAP içeren ortam olmuştur. Bu ortamın en uygun kallus gelişim ortamı olduğu gösterildiği için biyokütle gelişimi ve biyokütle üzerine stres faktörü uygulamasında bu konsantrasyon ve kombinasyonlar kullanılmıştır.

4.3. Biyokütle Elde Edilmesine Ait Sonuçlar

İki haftalık periyotlarda alt kültürleme yapılarak elde edilen 18 haftalık biyokütlelerden NAA+BAP içeren ortamlara alınan eksplantların yaralı bölgelerinden elde edilen kalluslar 6. haftada sadece kallus kısımları kesilerek yine alt kültürleme devam edilmiştir. Bu şekilde yapılan alt kültürleme ile 12 hafta sonunda bu kalluslardan elde edilen yeterli biyokütle ile stres faktörü uygulama aşamasına geçilmiştir. Stres faktörü uygulaması için seçilen ortam 4 haftalık uygulama aşamasında stres faktörlerinin de ilavesi ile oluşturulmuştur. Uygulama grupları dışında 5 tekrarlı şekilde kontrol grubu oluşturulmuştur ve sonuçlar incelenmiştir.



Şekil 4.10. 6. haftada yaralı bölgelerden kesilerek alınan kallusların biyokütle oluşumu için alt kültüre alınması

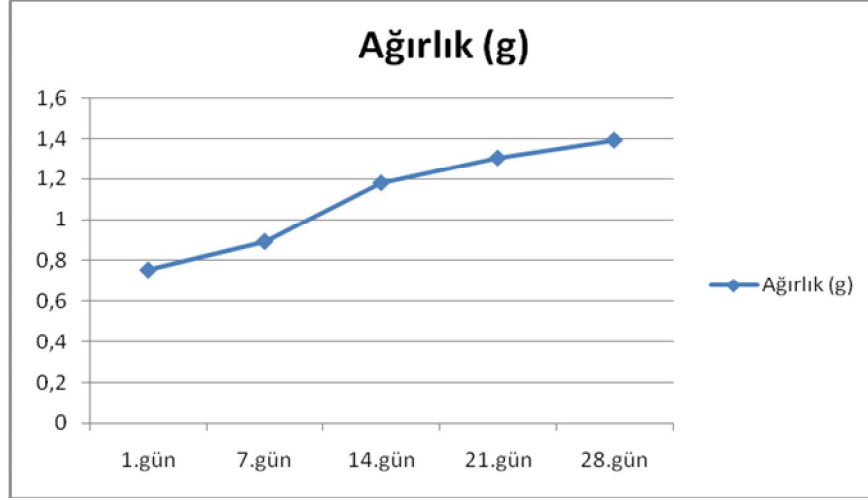
4.4. Biyokütle Üzerine Stres Faktörü Uygulamasına Ait Sonuçlar

Biyokütle üzerinde stres faktörü uygulaması 6 uygulama grubu ve 1 kontrol grubu olacak şekilde 5 tekrarlı halde yapılmıştır. Uygulamalar 7 günlük periyotlarda 28 gün boyunca devam ettirilmiş ve her 7 günlük periyotta kütle değişimleri incelenerek yeni alt kültür ortamlarına aktarımları yapılmıştır. Bu uygulamaların sonuçları aşağıda verildiği gibidir;

Çizelge 4. 1. Altkültürler boyunca biyokütle değişimleri (g)

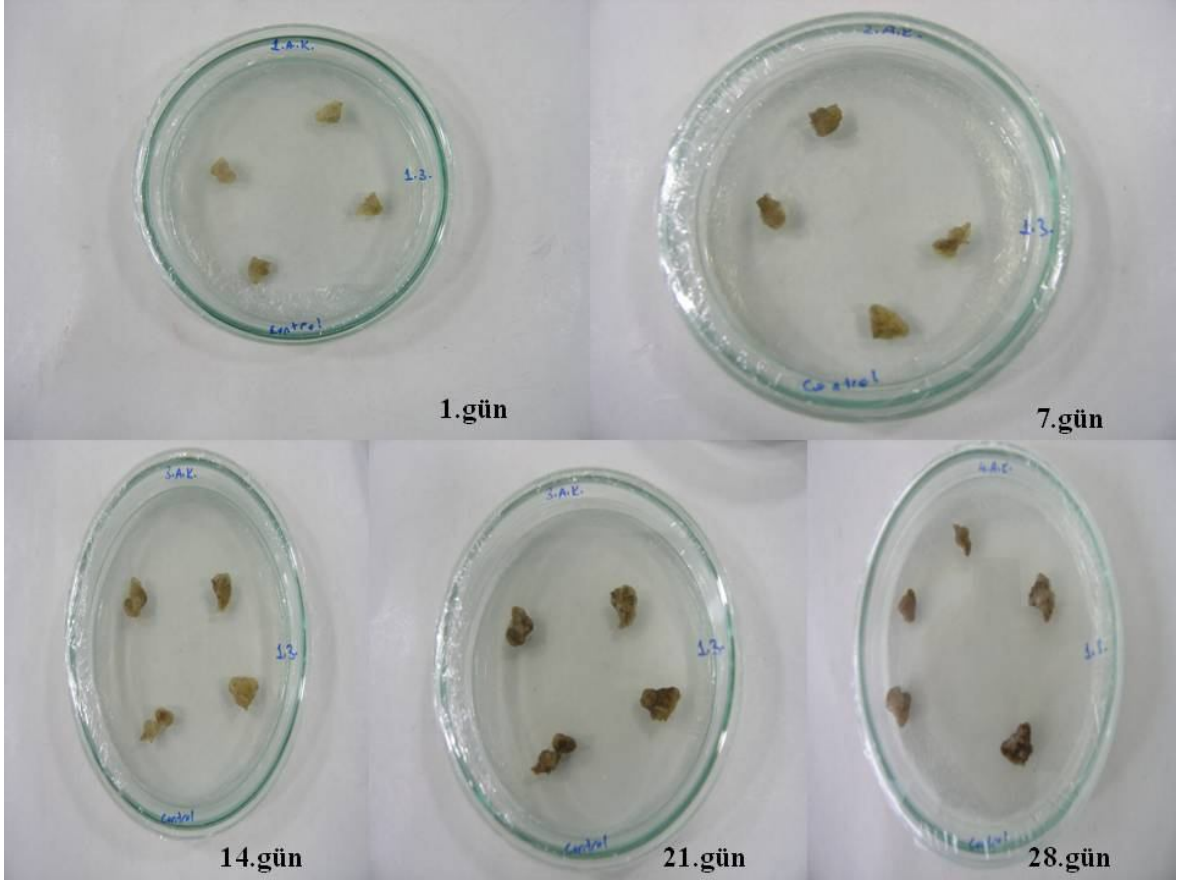
Gruplar	Kodları	İlk Ağırlık	1.Altkültür Biyokütlesi	2.Altkültür Biyokütlesi	3.Altkültür Biyokütlesi	4. Altkültür Biyokütlesi
Kontrol grubu	C-1.1	0,9924	1,1951	1,494	1,6	1,7596
	C-1.2	0,659	0,7979	1,0005	1,2957	1,3503
	C-1.3	0,5732	0,7381	1,0436	1,1077	1,1245
	C-1.4	0,8228	0,922	1,1664	1,2557	1,3448
	C-1.5	0,7292	0,8097	1,197	1,2604	1,3786
PEG 4000 %5	P-1.1	0,7533	0,8503	0,9988	1,1719	1,0692
	P-1.2	0,7713	0,8855	1,0769	1,2022	1,0369
	P-1.3	0,8481	1,0419	1,2376	1,5144	1,3219
	P-1.4	0,8492	0,9777	1,1046	1,2681	1,1017
	P-1.5	0,9079	1,007	1,3065	1,4299	1,2583
PEG 4000 %10	P-2.1	0,867	0,8894	0,9767	1,1154	0,8756
	P-2.2	1,0287	1,0848	1,1337	1,1606	1,0378
	P-2.3	0,4496	0,5598	0,6386	0,7271	0,6232
	P-2.4	0,6739	0,7867	0,8008	0,8493	0,689
	P-2.5	1,256	1,503	1,5298	1,5879	1,3771
D-Mannitol %5	D-1.1	0,5767	0,5621	0,6113	0,7062	0,6387
	D-1.2	0,9562	1,0176	0,9729	1,1367	0,9652
	D-1.3	0,6515	0,525	0,5755	0,6799	0,6671
	D-1.4	0,5966	0,6437	0,6922	0,7275	0,6726
	D-1.5	0,8979	0,9426	1,065	1,1536	1,0756
D-Mannitol %10	D-2.1	0,4775	0,5111	0,4589	0,4922	0,3985
	D-2.2	0,5676	0,5699	0,5695	0,6779	0,5804
	D-2.3	0,4835	0,4894	0,437	0,4658	0,3861
	D-2.4	0,9471	0,8643	0,8456	0,6436	0,5284
	D-2.5	0,874	0,8497	0,8345	0,9108	0,8405
Hidrojen Peroksit %5	H-1.1	0,6888	0,6846	0,628	0,6159	0,4913
	H-1.2	0,6726	0,7009	0,663	0,5975	0,4422
	H-1.3	1,1329	1,1283	1,0132	1,0008	0,8433
	H-1.4	0,8844	0,8369	0,6962	0,6516	0,5135
	H-1.5	0,5598	0,5514	0,4611	0,4524	0,3382
Hidrojen Peroksit %10	H-2.1	0,7298	0,6779	0,6138	0,6397	0,5056
	H-2.2	0,6453	0,608	0,4874	0,4916	0,3453
	H-2.3	0,6691	0,6511	0,6118	0,6213	0,4221
	H-2.4	0,9648	0,893	0,8245	0,7589	0,6345
	H-2.5	0,7138	0,6844	0,579	0,5107	0,4035

Kontrol grubu için alınan sonuçlar;



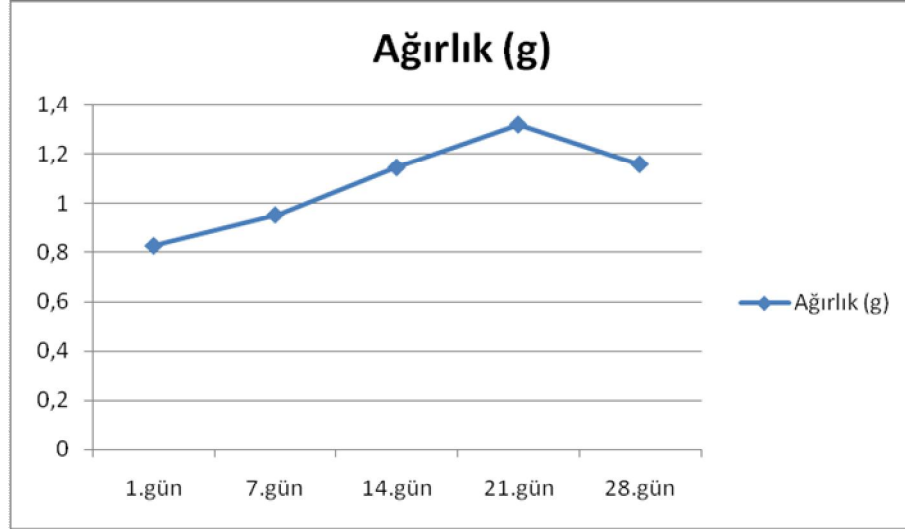
Şekil 4.11. Kontrol Grubuna Ait Biyokütle Değişimleri

Kontrol grubunda genel kütle artışı %84 oranında bulunmuştur. Bu kütle artışı 4 haftalık düzende devamlı artış olarak kaydedilmiştir.



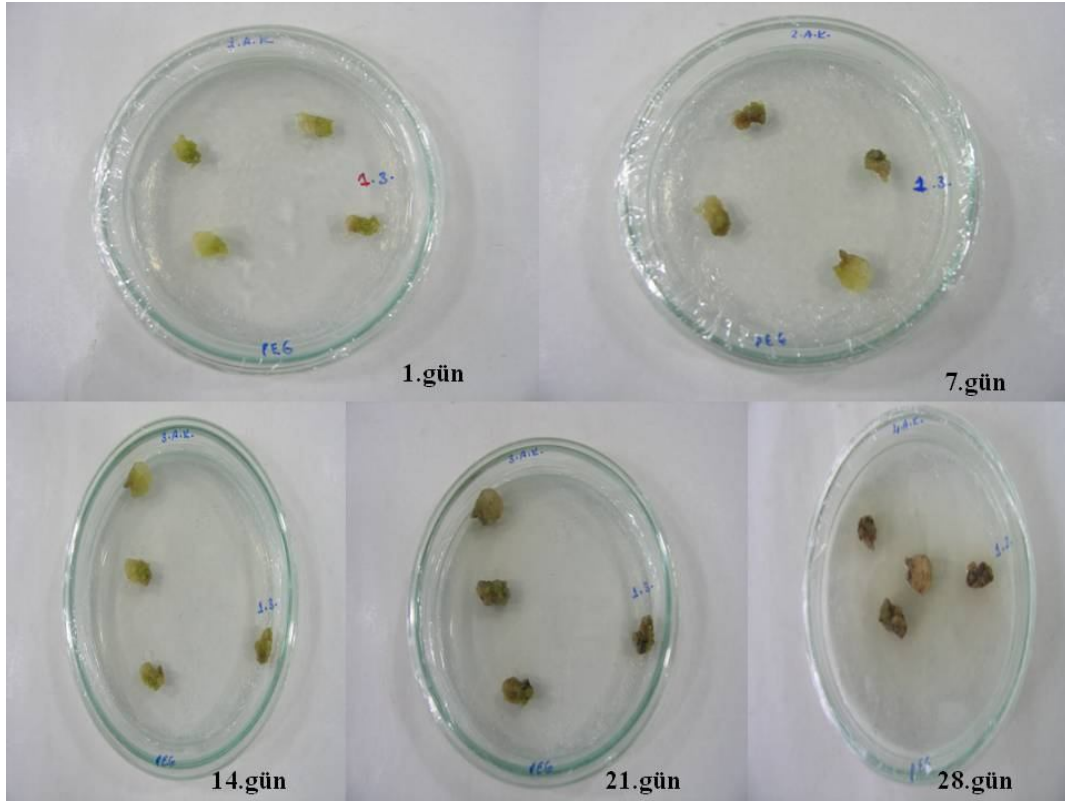
Şekil 4.12. Kontrol grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü

PEG 4000 %5'lik uygulama grubuna ait sonuçlar;



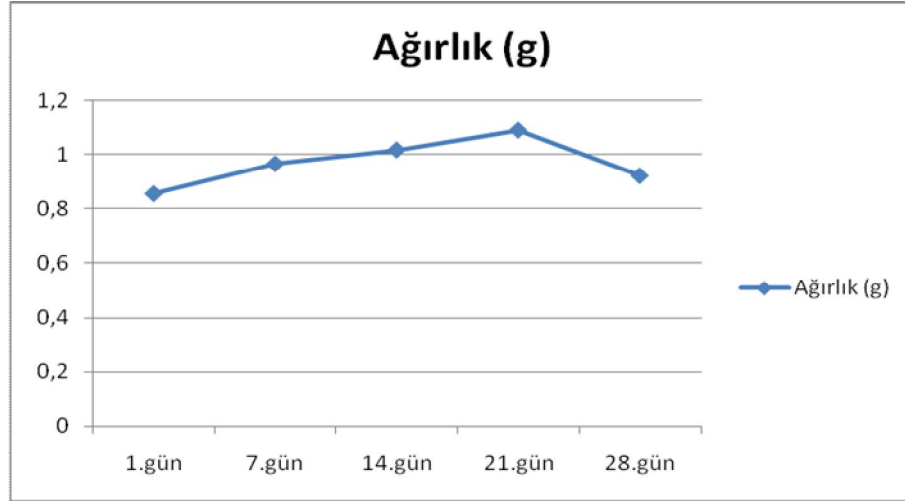
Şekil 4.13. PEG 4000 (%5) Uygulama Grubuna Ait Biyokütle Değişimi

Bu uygulama grubunda alınan sonuçlar ilk üç haftada %59 oranında artış gösterdikten sonra dördüncü haftada %40 oranına gerilemiştir.



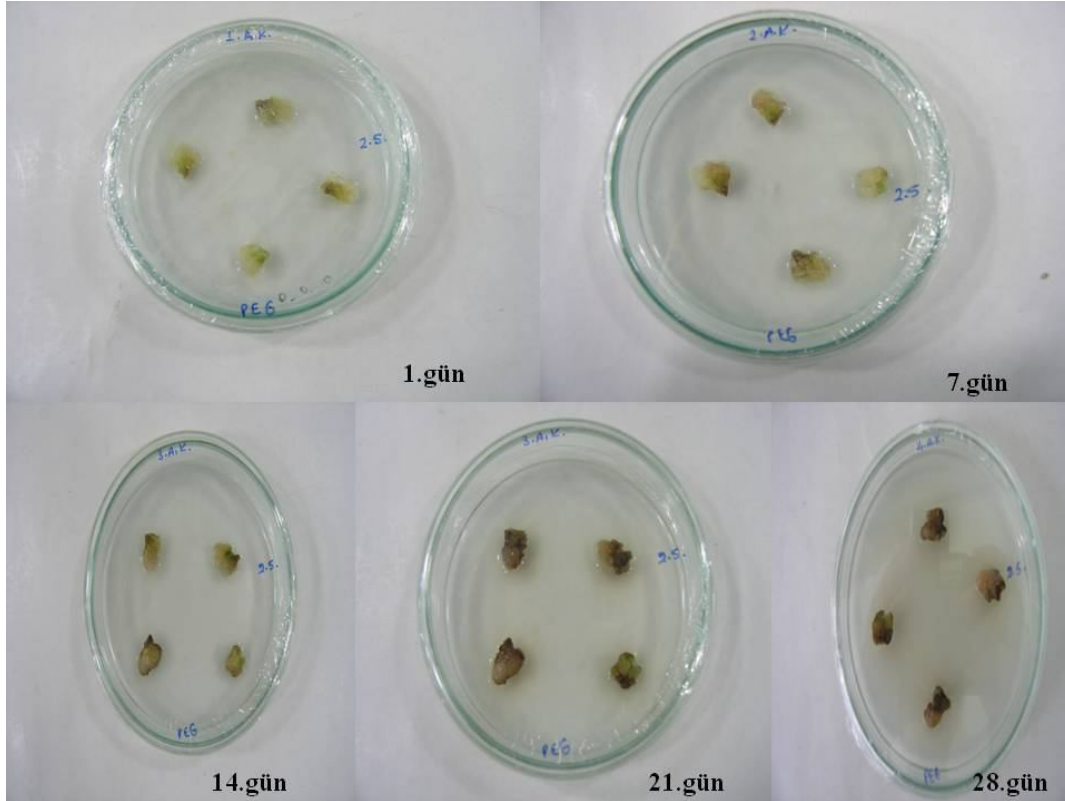
Şekil 4.14. PEG-4000 (%5) uygulama grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü

PEG 4000 %10'luk uygulama grubuna ait sonuçlar;



Şekil 4.15. PEG 4000 (%10) Uygulama Grubuna Ait Biyokütle Değişimi

Bu uygulama grubunda alınan sonuçlar ilk üç haftada %27 oranında artış gösterdikten sonra dördüncü haftada %7 oranına gerilemiştir.



Şekil 4.16. PEG-4000 (%10) uygulama grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü

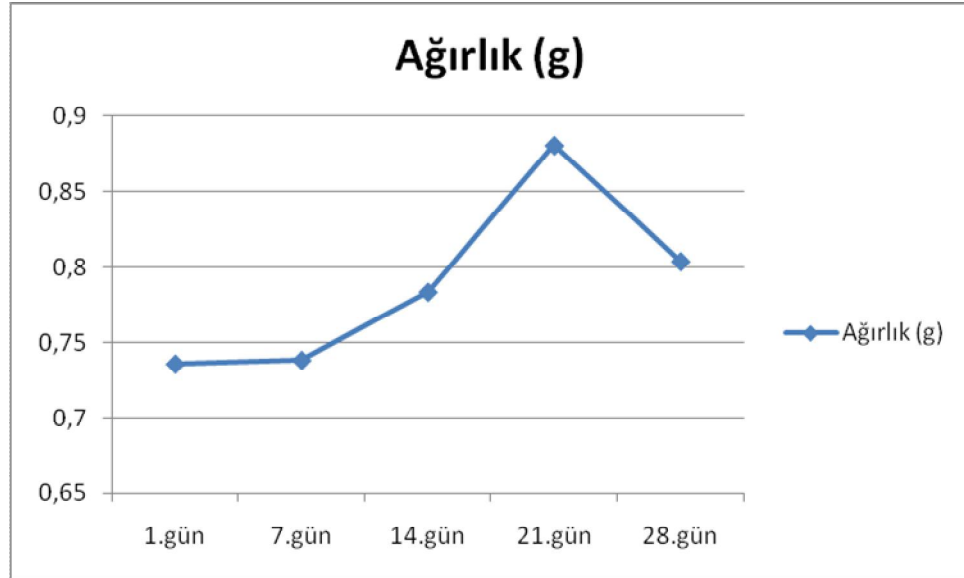
PEG-4000 ile yapılan uygulama grubu kontrol grubu ile incelenerek varyans analizi yapıldığında;

ANOVA

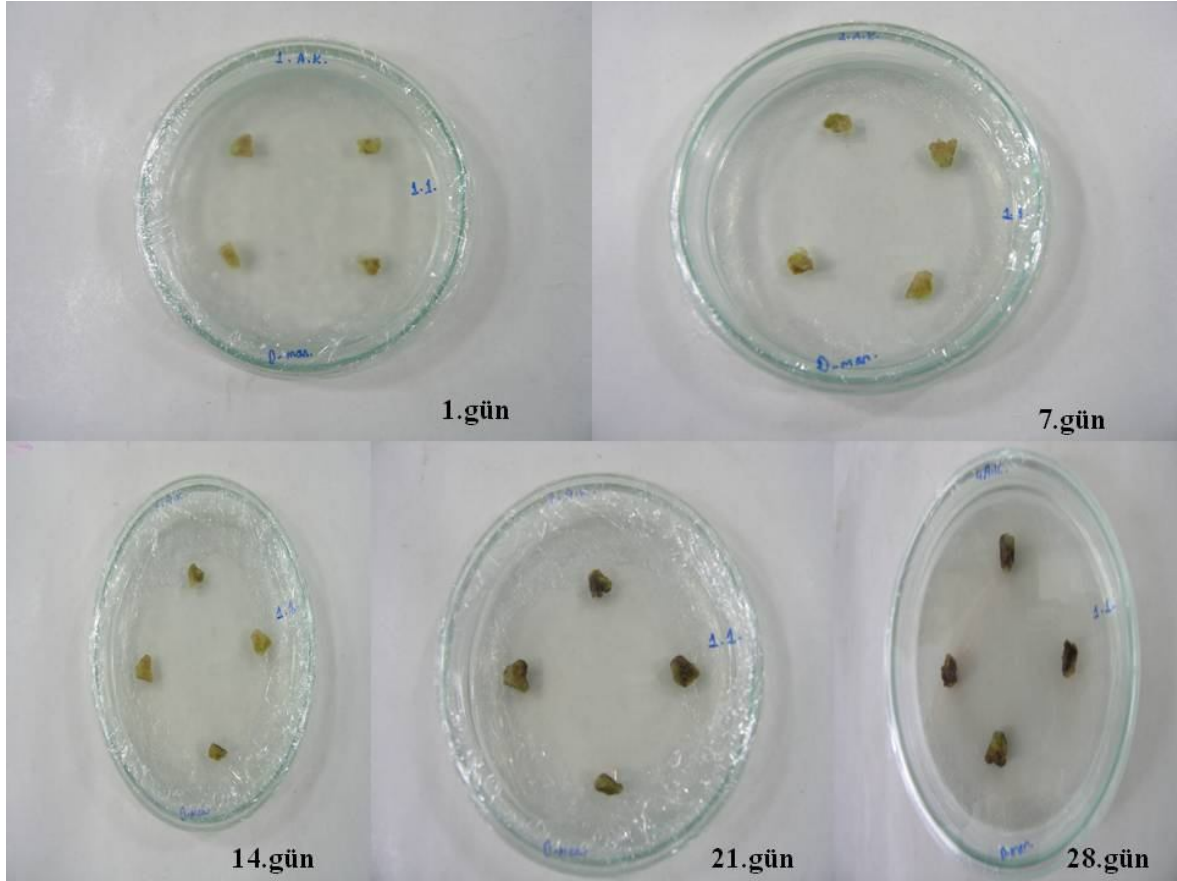
VAR00001

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,052	2	,026	,662	,534
Within Groups	,474	12	,039		
Total	,526	14			

$P \geq 0,05$ olduğundan dolayı LSD ve Duncan analiz sonuçları verilmemiştir. Bu değerlere göre alınan sonuçlar göz ardı edilecek şekildedir.

D-Mannitol %5'lik uygulama grubuna ait sonuçlar;

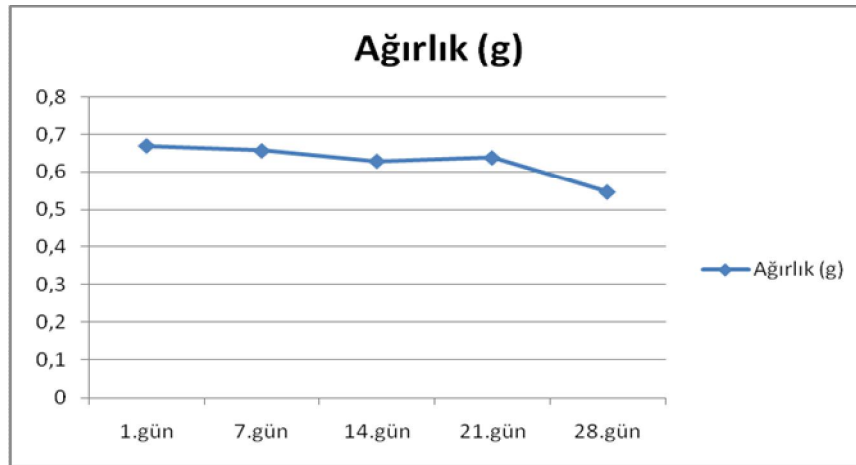
Şekil 4.17. D-Mannitol (%5) Uygulama Grubuna Ait Biyokütle Değişimi



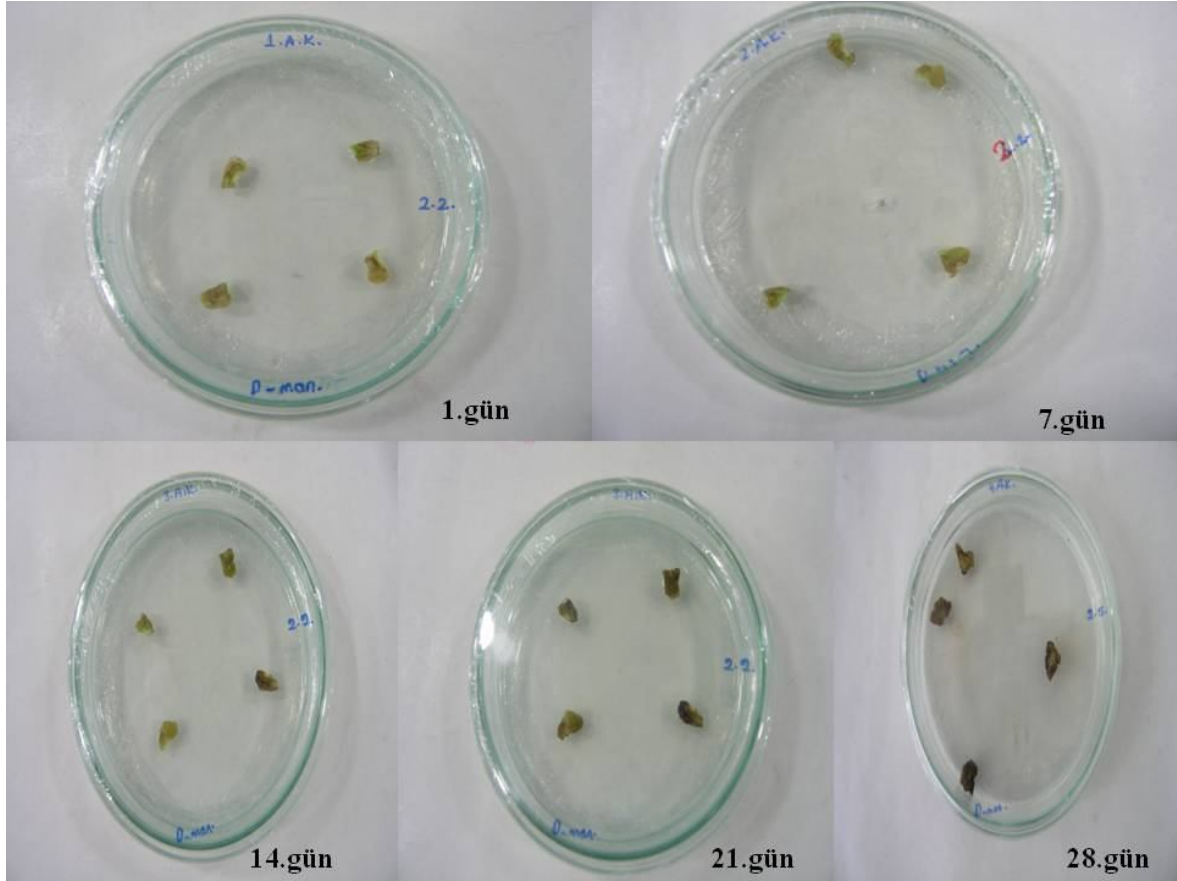
Şekil 4.18. D-Mannitol (%5) uygulama grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü

Bu uygulama grubunda alınan sonuçlar ilk üç haftada %19 oranında artış gösterdikten sonra dördüncü haftada %9 oranına gerilemiştir.

D-Mannitol %10luk uygulama grubuna ait sonuçlar;



Şekil 4.19. D-Mannitol (%10) Uygulama Grubuna Ait Biyokütle Değişimi



Şekil 4.20. D-Mannitol (%10) uygulama grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü

Bu uygulama grubundan alınan sonuçlar ilk haftadan itibaren toplamda %18 oranında azalmıştır.

D-Mannitol ile yapılan uygulama grubu kontrol grubu ile incelenerek varyans analizi yapıldığında 1= kontrol grubu, 2=D-mannitol (%5), 3=D-mannitol (%10);

ANOVA

VAR00001

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,588	2	,294	11,092	,002
Within Groups	,318	12	,027		
Total	,906	14			

$P \leq 0,05$ olduğundan dolayı LSD ve Duncan analiz sonuçları incelenmiştir bu sonuçlar aşağıdaki gibidir;

Çoklu Karşılaştırma Tablosu

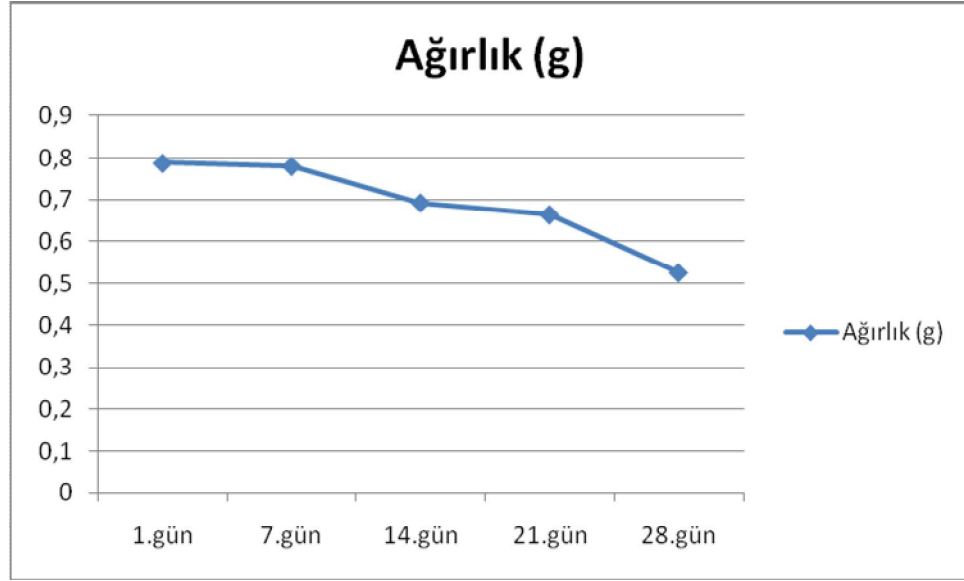
Dependent Variable:VAR00001

(I) VAR00002	(J) VAR00002	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval			
					Lower Bound	Upper Bound		
LSD	1,00	2,00	,316332000*	,102977827	,010	,09196259	,54070141	
		3,00	,476576000*	,102977827	,001	,25220659	,70094541	
	2,00	1,00	-,316332000*	,102977827	,010	-,54070141	-,09196259	
		3,00	,160244000	,102977827	,146	-,06412541	,38461341	
	3,00	1,00	-,476576000*	,102977827	,001	-,70094541	-,25220659	
		2,00	-,160244000	,102977827	,146	-,38461341	,06412541	
	Dunnett T3	1,00	2,00	,316332000	,124266042	,142	-,12962718	,76229118
			3,00	,476576000*	,123297693	,041	,02807250	,92507950
2,00		1,00	-,316332000	,124266042	,142	-,76229118	,12962718	
		3,00	,160244000*	,034189594	,005	,05814564	,26234236	
3,00		1,00	-,476576000*	,123297693	,041	-,92507950	-,02807250	
		2,00	-,160244000*	,034189594	,005	-,26234236	-,05814564	

VAR00001

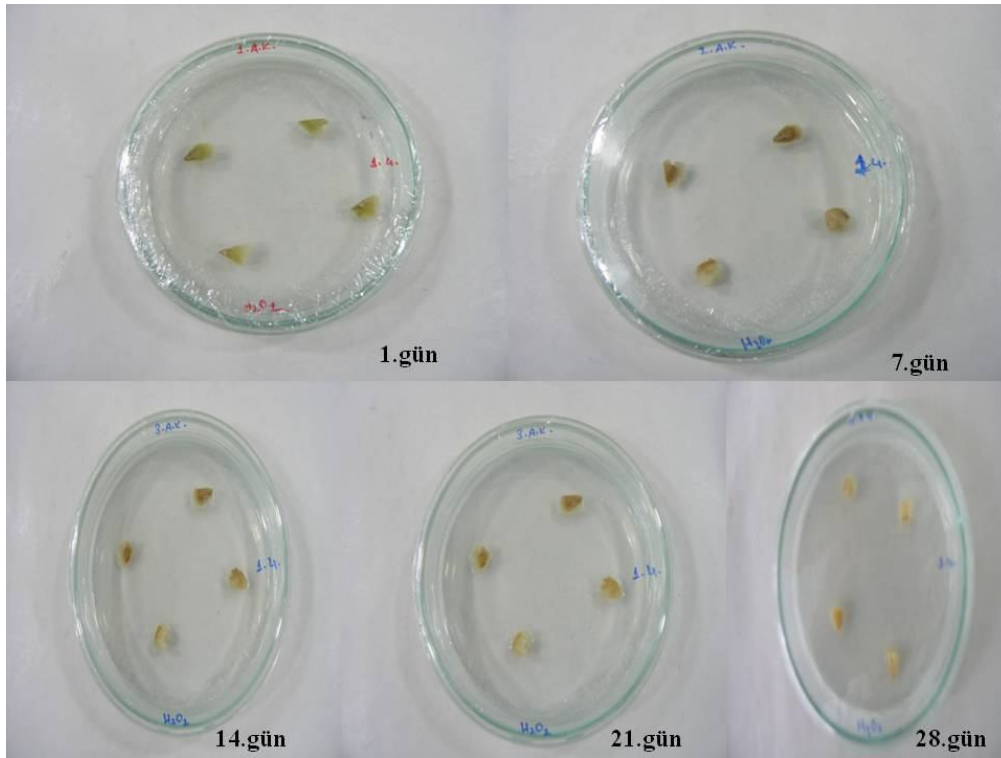
VAR00002	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan ^a	3,00	5	,62815200
	2,00	5	,78839600
	1,00	5	1,10472800
	Sig.		,146
			1,000

Hidrojen Peroksit 100 mM'lik uygulama grubuna ait sonuçlar;



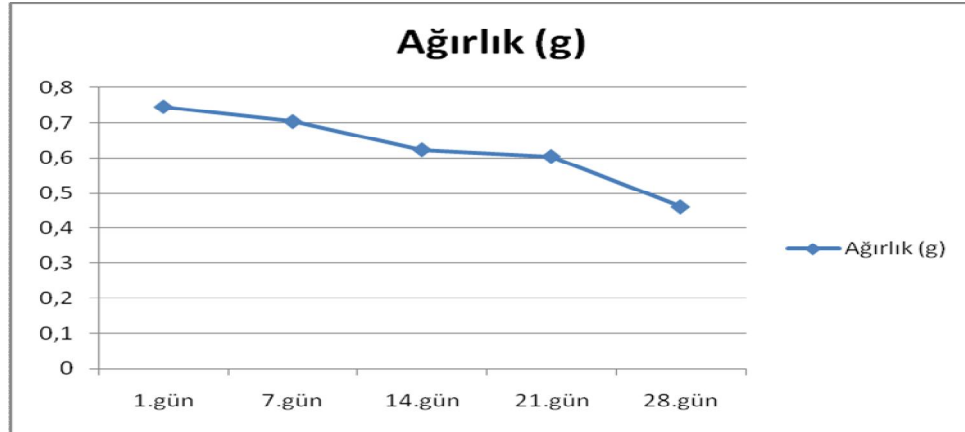
Şekil 4.21. Hidrojen Peroksit (100 mM) Uygulama Grubuna Ait Biyokütle Değişimi

Bu uygulama grubundan alınan sonuçlar ilk haftadan itibaren toplamda %33 oranında azalmıştır.



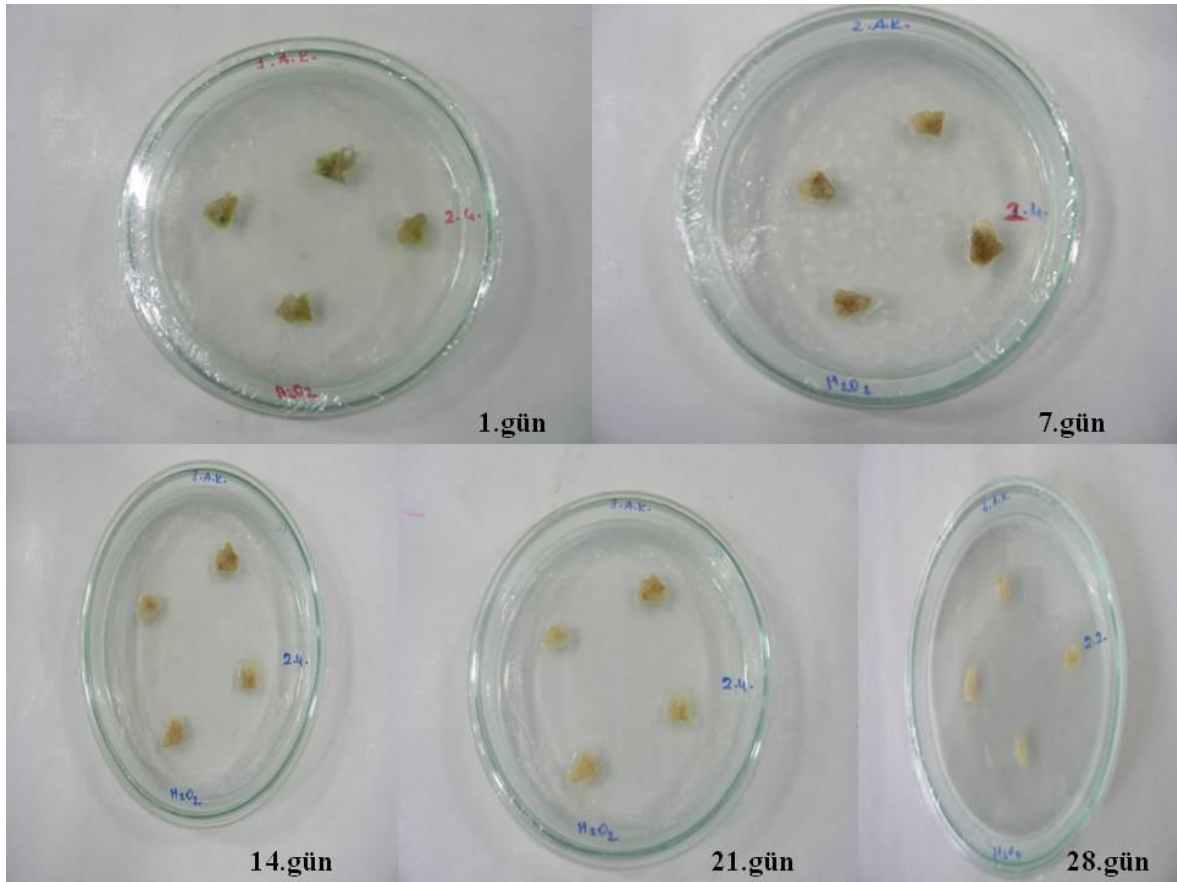
Şekil 4.22. Hidrojen peroksit (100 mM) uygulama grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü

Hidrojen Peroksit 200 mM'lık uygulama grubuna ait sonuçlar;



Şekil 4.23. Hidrojen Peroksit (200 mM) Uygulama Grubuna Ait Biyokütle Değişimi

Bu uygulama grubundan alınan sonuçlar ilk haftadan itibaren toplamda %37 oranında azalmıştır.



Şekil 4.24. Hidrojen peroksit (200 mM) uygulama grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü

Hidrojen peroksit ile yapılan uygulama grubu kontrol grubu ile incelenerek varyans analizi yapıldığında 1= kontrol grubu, 2=hidrojen peroksit (100 mM), 3=hidrojen peroksit (200 mM);

ANOVA

VAR00001

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,673	2	,336	10,420	,002
Within Groups	,387	12	,032		
Total	1,060	14			

$P \leq 0,05$ olduğundan dolayı LSD ve Duncan analiz sonuçları incelenmiştir bu sonuçlar aşağıdaki gibidir;

Çoklu Karşılaştırma Tablosu

Dependent Variable:VAR00001

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval			
					Lower Bound	Upper Bound		
LSD	1,00	2,00	,414776000 [*]	,113641070	,003	,16717338	,66237862	
		3,00	,477252000 [*]	,113641070	,001	,22964938	,72485462	
	2,00	1,00	-,414776000 [*]	,113641070	,003	-,66237862	-,16717338	
		3,00	,062476000	,113641070	,593	-,18512662	,31007862	
	3,00	1,00	-,477252000 [*]	,113641070	,001	-,72485462	-,22964938	
		2,00	-,062476000	,113641070	,593	-,31007862	,18512662	
	Dunnett T3	1,00	2,00	,414776000	,130416660	,060	-,02199100	,85154300
			3,00	,477252000 [*]	,130769472	,036	,04071011	,91379389
2,00		1,00	-,414776000	,130416660	,060	-,85154300	,02199100	
		3,00	,062476000	,068071420	,743	-,13889782	,26384982	
3,00		1,00	-,477252000 [*]	,130769472	,036	-,91379389	-,04071011	
		2,00	-,062476000	,068071420	,743	-,26384982	,13889782	

VAR00001

VAR00002	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan ^a	3,00	5	,62747600
	2,00	5	,68995200
	1,00	5	1,10472800
	Sig.		,593

Elde edilen tüm sonuçlar incelendiğinde,

Kontrol grubuna ait sayısal verilerde %84'lük düzenli bir artış bulunmuştur. Bununla birlikte kontrol grubundaki tüm kalluslar sağlıklı bir biyokütle oluşumu göstermiştir. Uygulama gruplarına ait sonuçlarda kalluslar kontrol grubuna oranla morfolojik olarak daha sağlıklı olarak elde edilmiştir.

Kontrol grubunda devamlı sayısal artış gözlemlenmesine karşın fenolik bileşiklerin yoğun biçimde bulunması nedeni ile biyokütlerde kararmalar tespit edilmiştir. Bu kararmalar çok yoğun düzeyde olmamasından dolayı tüm biyokütlerin ilerideki çalışmalarda kullanabilecek şekilde olduğu gösterilmiştir.

PEG 4000 ile muamele edilen kalluslarda 21 günün sonunda sayısal veri olarak azalmaya gidilmiştir. İlk 21 günde %5'lik uygulamada %59 ve %10'luk uygulamada %27'lik düzenli artış gözlenmesi bitkinin stres faktörüne verdiği cevapla ilişkilidir. 21 günün sonunda yirmi sekizinci güne kadar ise biyokütlerde %5'lik uygulamada %19 ve %10'luk uygulamada %20'lik düzenli bir azalma bulunmuştur. 21 gün boyunca biyokütlerde artış gözlenmesine rağmen kallusların tamamı 14 günün sonunda kararmıştır ve vitrifikasyon başlamıştır. Bu nedenle biyokütlerde artış olması kallus veriminin arttığından ziyade kallus morfolojisindeki değişimler ele alınmaktadır. 28 günün sonunda kalluslar kararmış ve vitrifikasyona uğramış olmasına rağmen henüz canlılığını tamamen kaybetmemiş olduğu gözlenmiştir.

D-Mannitol ilk 21 günde %5'lik uygulamada %19 oranında bir artış gözlemlenirken 21.günden sonra %10'luk bir azalma olduğu belirlenmiştir. D-Mannitol %10'luk uygulamada ise ilk haftadan itibaren %18 oranında bir biyokütle azalması kaydedilmiştir. Bununla birlikte uygulama yapılan kallusların %75'i 21 günün sonunda tamamen kararak canlılığını yitirmiştir. %25 lik biyokütle kısmı ise 28 günün sonunda kaybedilmiş ve kallus canlılığı bu uygulama sonucunda tamamen kaybedilmiştir.

Hidrojen peroksit uygulamasında sırasıyla %5 ve %10'luk uygulamalarda %33 ve %37 oranında biyokütlerin azaldığı bulunmuştur. Hidrojen peroksit uygulanan biyokütlerde çok kırılabilir ve ufalanabilir kallus biyokütleri elde edilmiştir. Bu kallus tipi

hücre süspansiyon kültürlerinde beklenen bir kallus biyokütlesi olmasına karşın bu uygulama grubunda biyokütlerde çok yoğun kayıplar gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmada ki veriler varyans analizi programı ile incelendiğinde ise PEG-4000 ile yapılan uygulamada anlamlı sonuçlar alınmamıştır. Bu sonucun ışığında PEG-4000'in bitki üzerinde %5 ve %10'luk uygulamasının çok yoğun ozmotik strese neden olmadığını ve daha yüksek oranlarda uygulama yapılarak ozmotik stresin oluşmaya başladığı yoğunlukların bulunabileceği gösterilmiştir. D-Mannitol ile yapılan uygulamada ise ozmotik stresin anlamlı değerlerde olduğu varyans analizi sonucunda belirlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında D-Mannitol'ün aynı oranlarda kullanılan PEG-4000'e oranla bitkiye daha yoğun şekilde ozmotik stres oluşturduğu saptanmıştır. Hidrojen peroksit ile yapılan uygulamada ise yine varyans analizi sonucunda anlamlı sonuçlar alınmıştır. Alınan bu anlamlı sonuçlar ile hidrojen peroksitin bitkilerde uygulanan oranlarda strese neden olduğu saptanmıştır. Hidrojen peroksit ile yapılan uygulamada diğer kimyasallara oranla çok daha anlamlı sonuçlar alınması ise bu kimyasalın ozmotik stres dışında bitki üzerinde oksidatif stresede neden açmış olabileceği düşünülmüştür.

Capsicum annuum L. ile yapılan *in vitro* çalışmada, yalnızca ozmotik stres faktörü olarak eklenen %10 PEG içeren ortamdan alınan sonuçlara bakıldığında, bu ortam üzerinde geliştirilen Kandil Dolma çeşitlerine ait olan kalluslardaki kütle değişimi ilk alt kültürde %19.7 iken ikinci alt kültürde % 41.2'ye yükselmiş, üçüncü ve dördüncü alt kültürlerde ise %29.2-26.8 seviyesine düştüğü gözlemlenmiştir. Bununla birlikte %10 PEG 3350 ve bitki büyüme hormonlarının kullanıldığı stresli ortamlarda ilk alt kültürlerde sadece %10 PEG eklenmiş ortamlara göre ilk alt kültürlerin üçünde de kallus kütle değişimlerinde bir artış olduğu gözlemlenmiştir. İlk alt kültürde %44.9 olan değişimin, ikinci alt kültürde %74.5'e yükselmiş fakat üçüncü alt kültürde %44.4 ve dördüncü alt kültürde %23.9 seviyelerine gerilediği belirtilmiştir. Stres faktörleri ilk ve genellikle ikinci alt kültürlemede kallus biyokütlesini arttırmıştır. Daha sonraki altkültürlerde ise biyokütle oranı hızla azalmıştır. (Akı, 2005). Araştırmamızda da ilk üç altkültürlemede PEG 4000 ve D-Mannitol eklenen stresli ortamlarda artış gözlemlenmemiz yine bu çalışmalarla orantılı olarak stres faktörü uygulama sonuçlarımızın doğruluğunu göstermiştir. Hidrojen peroksit eklenen stresli ortamda ise kütle azalması olması ve kallus hücrelerinin çok kolay ufalanan daha yumuşak

kallus hücreleri şeklinde gözlemlenmesi ozmotik stres sonucunda kallus hücrelerinin bunu tolare edemediği bu kimyasalda gösterilmiştir.

BÖLÜM 5**SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

C. roseus bitkisinden elde edilen vinca alkaloidleri kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılır. Vinblastin ve vinkristin kan kanserine karşı etkilidir. Bunun yanı sıra amotin adlı indol alkaloidinin de kan kanserine karşı güçlü bir koruyucu aktivitesi vardır. Vindesin, vinkristin ve vinblastin sitotoksik aktiviteye sahiptir. Vinblastin sülfat; neoplazma tedavisinde deneysel olarak kullanılmaktadır ve Hodgking's rahatsızlığı ile dirençli Khlorio sarkoma tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir (Taha ve ark., 2009).

C.roseus bitkisinden elde edilen eksplantlardan elde edilen kallusların hücre süspanسیون kültürlerinde kullanılması için 2 mg/L NAA ve 5 mg/L BAP konsantrasyonunda diğer oranlardaki bitki büyüme hormonlarına oranla kallus tipinin daha kırılğan ve hücrelerin birbirinden ayrılmaya daha yatkın olması nedeni ile en uygun konsatrasyon olduğu bildirilmiştir (Akçam ve ark., 2000).

Yaptığımız araştırmada en uygun kallus gelişim ortamı kombinasyonu ve konsantrasyonu 5 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP olarak bulunmuştur ve bu ortam stres faktörü eklenerek alt kültürleme yapılan kalluslar için kullanılmıştır. Elde edilen kalluslar sert yapılı ve kolayca hücrelere ayrılacak şekilde değildir bu nedenle tüm alınan sonuçlar ışığında elde edilen bu sert yapılı kalluslara bir haftalık hidrojen peroksitli yapay besin ortamında altkültürleme yapıldığında elde edilen kallusların biyokütlesinde göz ardı edilecek miktarda azalma olmasına rağmen kalluslar daha yumuşak ve daha kolay şekilde hücrelerine ayrılacak hale geldiğinden bu stresli ortamın kullanılabileceği söylenebilir.

Yine çalışmamızda *in vivo* geliştirilmiş daha yaşlı bitkilerden elde edilen eksplantlar ve *in vitro* ortamda yetiştirilmiş daha genç bitkilerden elde edilen eksplantlardan elde ettiğimiz kallus oranları karşılaştırıldığında genç bitkilerin eksplant kaynağı olarak tercih edilmesinin gerekliliğini bir kez daha gözlemlenmiştir. Kallus eldesinde tüm ortam şartları ve büyüme hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonları dışında eksplant kaynağının önemi unutulmamalıdır.

C. roseus bitkisinde daha önceki bir çalışmada (Akçam ve ark., 2000), stres faktörü olarak PEG 600 ve PEG 3350 kullanılarak bu ortamlarda geliştirilen kalluslardan PEG 600 eklendiğinde kallusların canlılığına ket vurucu etki gösterilmiştir. 100 ve 200 g/L PEG 600 kullanımının özellikle 15. günden itibaren tartımlarda kallus kütlelerinde ve taze ağırlıklarında düşüş olmuştur ve bu düşüşün nedeni dokuların su kaybetmesine bağlı olarak PEG 600'ün hücrelere giriş yaparak kallus hücreleri üzerinde strese neden olduğu düşünülmüştür. PEG 3350 ise 30, 60, 90 ve 120 g/L eklenen ortamlarda kontrol grubuna oranla daha hızlı seviyede taze ağırlık artışı 2. altkültür ortamına kadar kaydedilmiştir. Özellikle ikinci altkültürlerde gözlenen en yoğun artış kallus hücrelerinin bu stresli ortama karşı giderek adaptasyon geliştirdiğini vurgulamışlardır. Ozmotik stres yaratılan ortamlarda kullanılan stres faktörüne ve altkültürleme süresine göre kallus gelişiminde farklılıklar bulunmuştur.

Yaptığımız çalışmada PEG 4000 içeren stresli ortamlarda 21. güne kadar sırasıyla için %5 ve %10 uygulamalarda; %59 ve %40 biyokütle artışı olmasına rağmen 21 günün sonunda 1 haftalık periyotta biyokütlede sırasıyla %19 ve %20 oranında azalma gözlemlenmiştir. D-Mannitol için %5'lik uygulamada ilk 21 gün %19'luk bir kütle biyokütle artışı olmasına karşın 21 günün sonunda 1 haftalık periyotta %10'luk bir biyokütle azalması gözlemlenmiştir. D-Mannitol %10'luk uygulama grubunda ise ilk haftadan itibaren genel olarak %18'lik bir biyokütle azalması gözlemlenmiştir. Öncelikle meydana gelen kütle artışlarında bitkinin strese karşı oluşturduğu tepki nedeniyle hızlı artış gösterdiği düşünülebilir. Fakat anlatılan çalışmadaki gibi kullandığım hidrojen peroksit ilk haftadan itibaren sırasıyla %5'lik ve %10'luk uygulama gruplarında %33 ve %37'lik biyokütle azalmalara neden olmuştur. Buda tıpkı önceki çalışmada kullanılan PEG 600 gibi ortamda ozmotik strese neden olarak su kayıplarına ve genel kütlede azalmalara neden olduğunu göstermiştir.

Catharanthus roseus türü ile ilgili olarak bugüne kadar tamamlanmış olan bilimsel araştırmaların ve tamamlanan Yüksek Lisans Tezi Projesinin ışığında *Catharanthus roseus* türünde hücre süspansiyon kültürü oluşturmadaki ilk aşama olan kallus biyokütle eldesi başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. Elde edilen sağlıklı kallus biyokütlesinin 2,4-D, Kinetin, BAP, NAA gibi bitki büyüme hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarında, ortam şartlarına ve stres faktörlerine bağlı olarak

değişimler gösterdiği söylenebilir. Stres faktörleri biyokütlerde ilk altkültürlemelerde çok yoğun kütle artışlarına neden olduğu için bu uygulama birkaç altkültürleme süresince kullanılmasının uygun olduğu söylenebilir. Fakat bununla birlikte stres faktörü uygulamalarında belirli sürelerde yapılmayan uzun vadeli altkültürleme ile canlı kallus biyokütlesinde kayıplar yaşanacağı da anlaşılmıştır.

Bu çalışma ileri aşamalarda gerçekleştirilecek olan hücre süspansiyon kültürü ortamı ve sekonder metabolitlerin eldesi ile ilgili çalışmalara ön bir çalışma olarak katkıda bulunacaktır. Kallus eldesinin en yüksek oranda olduğu ve hem ortam koşulları hem de biyotik stres faktörleri ile çok değişken olabileceği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Akçam, E.ve H. Demiray, (2000). Habitüe edilmiş *Catharanthus roseus* Hücre Süspansiyon Kùltürlerinde Alkaloid Miktarları Değişiminin Araştırılması. *Bornova-İzmir*, TBAG-1506 ((196T034)):
- Akçam, E.ve K. A. Yürekli, (2001). Regeneration Through Callus Cultures of *Cantharanthus roseus* (L) G Don. *Pak. J. PL Sci.* , 7(1-2): 67-73
- Akı, C., (1997). *Capsicum annum*'un Çeşitli Varyeteleri Üzerinde Doku Kùltürü Çalışmaları (Doktora Tezi). *Ege Üniversitesi, İzmir*,
- Akı, C., (2005). Effect of Plant Growth Regulators on Osmotically Stressed Callus Cultures of Some *Capsicum annum* var. *grossum* L Cultivars. *Journal of Biological Science*, 5(3):257-259
- Anonymous, (1992). The Wealth of India: A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products. *Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi*, 3 (pp. 388-396):
- Arvind, V., I. L, T. S.L, A. H.ve M. LR., (2007). A simplified procedure for indole alkaloid extraction from *Catharanthus roseus* combined with a semi-synthetic production process for vinblastine. *Molecules*, 12: 1307-1315
- Aslam, J., A. Mujib, S. Fatima ve M. Sharma, (2008). Cultural conditions affect somatic embryogenesis in *Catharanthus roseus* (L) G Don. *Plant Biotechnology Reports*, 2 (3): 179-189.
- Aslam, J., A. Mujib, S. A. Nasim ve M. P. Sharma, (2009). Screening of vincristine yield in ex vitro and in vitro somatic embryos derived plantlets of *Catharanthus roseus* L (G) Don. *Scientia Horticulturae*, 119 (3): 325-329.
- Babaoğlu, M., M. Yorgancılar ve A. M. Akbulak, (2002). Doku Kùltürü: Temel Laboratuar Teknikleri. *Bitki Biyoteknolojisi, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Selçuk Üniversitesi (Cilt-1)*:
- Bornman, C. H., (1974). Cytodifferentiation in Tissue Culture.In:H.E. Street (Ed.). *Tissue Culture and Plant Science.Academic Press London* (43-70):
- Bressan, R. A., A. K. Handa, S. Handa ve P. M. Hasegawa, (1982). Growth and Water Relations of Cultured Tomato Cells After Adjustment to External Water Potentials *Plant Physiol*, 70:1303-1309

- Buchwald, W., I. Dedio, J. Kozłowski ve B. Łata, (2007). Hydroponic culture of *Catharanthus roseus* (L) G Don and studies on seed production. *Phytochemistry Reviews*, 6 (2): 413-417.
- Christianson, M. L ve D. A. Warnick, (1983). Competence and Determination in The Process of *In vitro* Shoot Organogenesis. *Dev. BioL*, 95 (2): 288-293
- Corchete, P.ve H. Guerra, (1986). Effect of NaCl and polyethylene glycol on solute content and glycosidase activities during germination of lentil seeds. *Plant, Cell & Environment*, 9 (7): 589-593.
- Çördük, N., (2007). *Nicotiana tabacum* L Samsun (tütün)'da *in vitro* Rejenerasyon Sistemlerinin Geliştirilmesi (Yüksek Lisans Tezi). *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye*
- D'Onofrio, C. ve S. Morini, (2006). Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration in *in vitro* grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. *Scientia Horticulturae*, 107 (2): 194-199.
- Dhaliwal, H. S., N. S. Ramesar-Fortner, E. C. Yeung ve T. A. Thorpe, (2003). Competence, determination, and meristemoid plasticity in tobacco organogenesis *in vitro*. *Can. J. Bot.*, 81(6): 611–621
- Dhandapani, M., D. Kim ve S.-B. Hong, (2008). Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from the explants of *Catharanthus roseus*. *in vitro Cellular ; Developmental Biology - Plant*, 44 (1): 18-25.
- Fatima, S., A. Mujib, S. A. Nasim ve Z. H. Siddiqui, (2009). Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of *Catharanthus roseus* (L) G Don. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98 (1): 1-9.
- Gautheret, R. J., (1966). Affecting Differentiation of Plant Tissues Grown *in vitro*. *W.Beermann (Ed), Cell Differentiation and Morphogenesis*, North-Holland, Amsterdam (55-95): 95.
- Haberlandt, G., (1902). Culturversuche Mit Isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Mat. Naturwiss, KI, Kais. Akad. Wiss. Wien*, 111:69-92
- Handa, A. K., R. A. Bressan, S. Handa ve P. M. Hasegawa Clonal Variation for Tolerance to Polyethylene Glycol-Induced Water Stress in Cultured Tomato Cells 1.
- Jaleel, C. A., R. Gopi, B. Sankar, M. Gomathinayagam ve R. Panneerselvam, (2008). Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *Comptes Rendus Biologies*, 331 (1): 42-47.

- Jaleel, C. A., P. Manivannan, A. Kishorekumar, B. Sankar, R. Gopi, R. Somasundaram ve R. Panneerselvam, (2007). Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59 (2): 150-157.
- Jaleel, C. A., B. Sankar, P. V. Murali, M. Gomathinayagam, G M. A. Lakshmanan ve R. Panneerselvam, (2008). Water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62 (1): 105-111.
- Khanam, N., C. Khoo ve A. G Khan, (2000). Effects of cytokinin/auxin combinations on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloid production in *Duboisia myoporoides*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62 (2): 125-133.
- Kim, S. W., D. S. In, P. S. Choi ve J. R. Liu, (2004). Plant regeneration from immature zygotic embryo-derived embryogenic calluses and cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 76 (2): 131-135.
- Kristiansen, K. ve S. B. Andersen, (1975). Influence of Osmotic Potential on The Growth and Development of Soybean Tissue Cultures
Crop. Sci., 15:750-752
- Kyung-Hwan, H., (2001). Molecular Biology of Secondary Growth. *J. Plant Biotechnology*, 3(2). pp. 45~57
- Marino, G, P. Negri, A. Cellini ve A. Masia, Effect of carbohydrates on *in vitro* low-temperature storage of shoot cultures of apricot. *Scientia Horticulturae*, In Press, Corrected Proof
- Molnár, Z. ve V. Ördög, (2005). Microalgal and cyanobacterial extracts in the tissue cultures of higher plants (pea, tobacco, beet). *Proceedings of the 8th Hungarian Congress on Plant Physiology and the 6th Hungarian Conference on Photosynthesis*, 49(1-2):39-40 (Acta Biologica Szegediensis):
- Pahlich, E., R. Kerres ve H.-J. r. Jäger Influence of Water Stress on the Vacuole/Extravacuole Distribution of Proline in Protoplasts of *Nicotiana rustica*.
- Parsons, L R. ve T. K. Howe, (1984). Effects of Water Stress on The Water Relations of *Phaseolus vulgaris* and The Drought Resistant *Phaseolus acutifolius*. *Physiol Plant*, 60:197-202

- Ross, M. K. ve T. A. Thorpe, (1973). Physiological gradients and shoot initiation in tobacco callus cultures. *Department of Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada*, 14: 473-480
- Santos-Díaz, M. d. S. ve N. Ochoa-Alejo, (1994). PEG-tolerant cell clones of chili pepper: Growth, osmotic potentials and solute accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37 (1): 1-8.
- Seçmen, Ö. ve E. Leblebici, (1987). Yurdumuzun zehirli Bitkileri. *Ege Üniv. Fen Fak. Biy. Böl, Bot. ABD. Bornova-İZMİR*,
- Senoussi, M., B. Nora ve C. Joël, (2009). Impact of hypoxia on the growth and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell suspension. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31 (2): 359-362.
- Singh, N. K., D. E. Nelson, P. M. Hasegawa ve R. A. Bressan, (1989). Molecular Cloning of Osmotin and Regulation of Its Expression by ABA and Adaptation to Low Water Potential *Plant Physiol*, 90:1096-1101
- Smith, R., (2000). Plant Tissue Culture. *Texas Agricultural Experiment Station, Texas A&M University, College Station, U.S.A.*, 2 231.
- Taha, H. S., M. K. El-Bahr ve M. M. Seif-El-Nasr, (2009). *In vitro* Studies on Egyptian *Catharanthus Roseus* (L) G Don. : 1- Calli Production, Direct Shootlets Regeneration and Alkaloids Determination. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4): 3137-3144
- Tang, Z., L Yang, Y. Zu ve X. Guo, (2009). Variations of vinblastine accumulation and redox state affected by exogenous in *Catharanthus roseus* (L) G Don. *Plant Growth Regulation*, 57 (1): 15-20.
- Tıprıdamaz, R. ve Ş. Karakullukçu, (1993). Prolin ve Glisinbetainin Tuzlu Koşullarda Kültüre Alınmış Domates Embriyolarının Gelişmesi ve Bazı İçsel Madde Değişimleri Üzerine Etkileri. *Doğa Tr. J. of Botany*, 17:57-64
- Toldi, O., K. Ahanen, G Kovács, S. Sorvari, S. Tóth, S. Dulai ve P. Scott, (2005). Integrated Application of Physiological and Molecular Methods to Forecast Determinative Morphogenetic Events in Tissue Cultured Tobacco (L cv Samsun) Leaf Discs. *Plant Growth Regulation*, 47 (1): 59-64.
- Trigiano, R. N. ve D. J. Gray, (1996). Plant Tissue Culture Concept and Laboratory Exercises. *CRS Pres. Boca Raton, Florida*,

- Verpoorte, R., A. Contin ve J. Memelink, (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1 (1): 13-25.
- Yamaguchi, M., H. Kato, S. Yoshida, S. Yamamura, H. Uchimiya ve M. Umeda, (2003). Control of *in vitro* organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100(13): 8019–8023
- Yürekli, K. ve N. Çay, (1995). Tütün Rejenerantlarının Su Stresine Dayanıklılığının *in vitro* Koşullarda Araştırılması. *Tr.J. of Botany*, 19 (3) :287-291
- Zhao, J., Q. Hu, Y. Q. Guo ve W. H. Zhu, (2001). Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures *Catharanthus roseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55 (6): 693-698.

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 1. 1. Besin ortamına ilave edilen makro elementler (Trigiano ve ark., 1996).....	3
Çizelge 1. 2. Besin ortamına ilave edilen mikro elementler (Trigiano ve ark., 1996).....	4
Çizelge 1. 3. Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Genel Etkileri (Smith, 2000).....	6
Çizelge 1. 4. Yaygın biçimde kullanılan oksinlerin kısaltma ve kimyasal isimleri (Smith, 2000).....	7
Çizelge 1. 5. Yaygın biçimde kullanılan sitokininlerin kısaltma ve kimyasal isimleri (Smith, 2000).....	7
Çizelge 1. 6. Bitkilerde Sekonder Metabolitler ve Kültür Tipleri (Oskay ve ark., 2009)...	12
Çizelge 1. 7. Bitkilerde Biyotik ve Abiyotik Stres Faktörleri.....	16
Çizelge 3. 1. Murashige ve Skoog Besin Ortamının Bileşenleri (1962).....	31
Çizelge 3. 2. Kallus Teşvik Ortamları.....	33
Çizelge 3. 3. NAA ve BAP İçeren Kallus Teşvik Ortamları.....	34
Çizelge 3. 4. 2,4-D ve Kinetin İçeren Kallus Teşvik Ortamları.....	35
Çizelge 3. 5. Biyokütle Üzerine Uygulanan Stres Faktörleri ve Dozları.....	37
Çizelge 4. 1. Altkültürler boyunca biyokütle değişimleri (g).....	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Yapay besin ortamında gelişen kallus kültürü (Çördük, 2007)	10
Şekil 3.1. Bitki yetiştirme odasındaki petripler	29
Şekil 3.2. Belirlenmiş ortamlara aktarılmış eksplantların genel olarak ilk görüntüsü (NAA+BAP içeren ortamlar).....	36
Şekil 4.1. A. In vivo ortamda geliştirilen C. roseus fidesinin 3 haftalık görünümü B. In vivo ortamda geliştirilen C.roseus bitkisinin 13 haftalık görüntüsü	39
Şekil 4.2. In vivo koşullarda C.roseus bitkisinin yetiştirilme ortamları (32 haftalık bitkiler)	40
Şekil 4.3. A. MSO ortamına alınmış C.roseus tohumları B. 6 günlük çimlenmiş tohumun stereo mikroskop görünümü	41
Şekil 4.4. MSO ortamına aktarılan 14 günlük eksplantlar	42
Şekil 4.5. Kallus teşvik ortamlarındaki eksplantların 10 haftalık görüntüleri.....	43
Şekil 4.6. Kallus teşvik ortamlarının 10 haftalık görüntüleri	44
Şekil 4.7. Ortama alınan eksplantlarda meydana gelen kabarmalar veyaralı bölgelerden 17 günün sonundaki kallus oluşumları.....	45
Şekil 4.8. NAA+BAP içeren ortamlarda gelişen kallusların 7. haftada stereo mikroskop altındaki görüntüleri	46
Şekil 4.9. Ortama alınan eksplantlarda oluşan kabarmaların genel görüntüsü	47
Şekil 4.10. 6. haftada yaralı bölgelerden kesilerek alınan kallusların biyokütle oluşumu için alt kültüre alınması	48
Şekil 4.11. Kontrol Grubuna Ait Biyokütle Değişimleri	50
Şekil 4.12. Kontrol grubu alt kültürlenme sonucu elde edilen kallusların görünümü	50
Şekil 4.13. PEG 4000 (%5) Uygulama Grubuna Ait Biyokütle Değişimi	51

Şekil 4.14. PEG-4000 (%5) uygulama grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü.....	51
Şekil 4.15. PEG 4000 (%10) Uygulama Grubuna Ait Biyokütle Değişimi.....	52
Şekil 4.16. PEG-4000 (%10) uygulama grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü.....	52
Şekil 4.17. D-Mannitol (%5) Uygulama Grubuna Ait Biyokütle Değişimi.....	53
Şekil 4.18. D-Mannitol (%5) uygulama grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü.....	54
Şekil 4.19. D-Mannitol (%10) Uygulama Grubuna Ait Biyokütle Değişimi.....	54
Şekil 4.20. D-Mannitol (%10) uygulama grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü.....	55
Şekil 4.21. Hidrojen Peroksit (100 mM) Uygulama Grubuna Ait Biyokütle Değişimi.....	57
Şekil 4.22. Hidrojen peroksit (100 mM) uygulama grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü.....	57
Şekil 4.23. Hidrojen Peroksit (200 mM) Uygulama Grubuna Ait Biyokütle Değişimi.....	58
Şekil 4.24. Hidrojen peroksit (200 mM) uygulama grubu alt kültürleme sonucu elde edilen kallusların görünümü.....	58

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Damla ERDEN

Doğum Yeri: İSTANBUL

Doğum Tarihi: 01/01/1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (Biyoloji)

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (Biyoloji Anabilim Dalı)

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI –Diğer :

Bildiriler -Uluslararası –Ulusal :

İŞ DENEYİMİ

-

İLETİŞİM

E-mail: erdendamla@gmail.com

