

**NICOTIANA TABACUM L. SAMSUN
(TÜTÜN)'DA IN VITRO REJENERASYON
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı**

Nurşen ÇÖRDÜK

Doç. Dr. Cüneyt AKI

Ağustos, 2007

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

Nurşen ÇÖRDÜK tarafından Doç. Dr. Cüneyt AKI yönetiminde hazırlanan “*Nicotiana tabacum* L. Samsun (tütün)’da *in vitro* Rejenerasyon Sistemlerinin Geliştirilmesi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

.....
.....
Yönetici

.....
.....
Jüri Üyesi

.....
.....
Jüri Üyesi

.....
.....
Jüri Üyesi

.....
.....
Jüri Üyesi

(5 üyeli jürilerde)

(5 üyeli jürilerde)

.....
Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bilimsel birikimini benimle paylaşan, desteğini esirgemeyen danışmanım ve her konuda örnek aldığım hocam Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi, Doç.Dr. Cüneyt AKI'ya içtenlikle teşekkür ederim. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. K. Melik TAŞKIN'a doku kültürü alanındaki bilgilerini benimle paylaştığı, bana yol gösterdiği ve kimyasal malzeme temininde bana yardımcı olduğu için teşekkür ederim. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Öğretim Üyesi Doç.Dr. Hakan TURHAN'a tütün tohumlarının temininde yardımcı olduğu için teşekkür ederim. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Funda ARSLANOĞLU' na *Nicotiana tabacum* L. Samsun tohumlarını gönderdiği için teşekkür ederim. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Murat ŞEKER ve Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Uğur GÖZEL'e laboratuvarlarında çalışma imkanı tanıdıkları için teşekkür ederim. Yüksek lisans tez çalışmam boyunca yanımda olan iş arkadaşlarıma teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan Arş.Gör. Sibel YILMAZ'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bana destek olan, bana güvenen her zaman yanımda olan aileme çok teşekkür ediyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

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
İHT	:	İnce Hücre Tabakası
TIBA	:	2,4,5-triiodobenzoik asit

NICOTIANA TABACUM L. (TÜTÜN)'DA IN VITRO REJENERASYON SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Çalışmamızda, *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun (tütün)'un *in vitro* rejenerasyon sistemleri geliştirilmiştir. Bu doğrultuda, farklı *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun (tütün) eksplantlarından organogenesis gerçekleştirilmiştir. Yaprak eksplantından organogenesis indirekt, gövde eksplantından ise direkt yolla meydana getirilmiştir. Organogenesisin indirekt yolla gerçekleşmesi için yaprak eksplantları, önce farklı oranlarda NAA ve BAP ilave edilmiş MS içeren kallus teşvik ortamlarına aktarılmıştır. Bu ortamlarda meydana gelen kallus dokuları karşılaştırılarak, en iyi kallus teşvik ortamı olarak 2,0 mg/L NAA ve 0,2 mg/L BAP içeren ortam belirlenmiştir. Seçilen kallus dokusu alt kültürlemeler ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu 2,0 mg/L BAP, 0,5 mg/L NAA ilave edilmiş MS ortamında meydana gelmiştir. Bu sürgün rejenerasyon ortamında eksplant başına düşen sürgün sayısı 2,05 olarak hesaplanmıştır. Gövde eksplantından sürgün oluşumu ise 2,0 mg/L NAA ve 0,2 mg/L BAP ilave edilmiş ortamda meydana gelmiştir ve eksplant başına düşen sürgün sayısı 7 olarak hesaplanmıştır. Her iki yolla organogenesisi gerçekleştirilen sürgünler, bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen ortamda (MS0) devam eden alt kültürlemeler yolu ile köklendirilmiştir. *In vitro* koşullarda yaprak ve gövde eksplantlarından rejenerasyon sonucu elde edilen tam bitkilerin son aşamada, toprağa aktarılarak dış ortama alışmaları sağlanmıştır. Çalışmamız sonunda, rejenerasyon sonucu elde edilen bütün bitkilerin dış ortama uyum sağladıkları ve sağlıklı bir şekilde büyüdükleri gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Nicotiana tabacum*, *in vitro*, bitki büyüme düzenleyicileri, kallus, rejenerasyon.

IMPROVING IN VITRO REGENERATION SYSTEM IN NICOTIANA TABACUM L. (TOBACCO)

ABSTRACT

In this research, *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun regeneration system has been improved in *in vitro* conditions. Organogenesis were realized from different explants of *Nicotiana tabacum* L. Samsun. Organogenesis occurred directly from leaf explants and indirectly from stem explants. Callus induced from leaf explants, on MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with different concentration of plant growth regulators. When we compared different callus induction medium, best callus induced medium was included 2,0 mg/L NAA and 0,2 mg/L BAP. Callus in optimum medium subcultured and then regenerated to whole plant on MS medium with 2,0 mg/L BAP, 0,5 mg/L NAA. Shoots formed from stem explants on MS medium with 2,0 mg/L NAA and 0,2 mg/L BAP. Leaf explants formed 2,05 shoots per explants and stem explants formed 7 shoots per explants. Whole plants, which occurred directly or indirectly organogenesis, formed roots on basal MS medium. After a while *in vitro* regenerated plants transplanted to soil and acclimated to *ex vivo*. At the end of the research we claim that all regenerated plants adapted *ex vivo* conditions and grew healthy.

Key words: *Nicotiana tabacum*, *in vitro*, plant growth regulator, callus, regeneration.

İÇERİK

Sayfa

TEZ SINAVI SONUÇ BELGESİ	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
BÖLÜM 1- GİRİŞ	1
1.1. Doku Kültürü	1
1.1.1 Doku Kültürü Besin Ortamı Bileşenleri	2
1.2. Hücrel Totipotensi	5
1.3. Rejenerasyon	6
1.4. Kallus Kültürü	7
1.1.4.1.Somatik Embriyoların Oluşumu	8
1.1.4.2.Organ Oluşumu	9
BÖLÜM 2- ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
BÖLÜM 3 -MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Bitki Yetiştirme Yöntemleri	23
3.2.1.1. <i>In vivo</i> Bitki Yetiştirilmesi	23
3.2.1.2. <i>In vitro</i> Bitki Yetiştirilmesi	24
3.2.2. Sterilizasyon Yöntemleri	24
3.2.2.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu	24
3.2.2.2. Yaprak ve Gövde Parçalarının Sterilizasyonu	25
3.2.2.3. Besin Ortamlarının ve Cam Malzemelerin Sterilizasyonu	25
3.2.3 Besin Ortamlarının ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanma Yöntemleri	26

3.2.3.1. Besin Ortamının Hazırlanması	26
3.2.3.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması	27
3.2.4. Hazırlanan Kültür Ortamları	27
3.2.4.1. Kallus Teşvik Ortamları	28
3.2.4.2. Kallus Alt Kültür Ortamları	29
3.2.4.3. Sürgün Rejenerasyon Ortamları	29
3.2.4.3.1. Kallustan Sürgün Rejenerasyon Ortamları	29
3.2.4.3.2. Gövde Eksplantından Sürgün Rejenerasyon Ortamları	30
BÖLÜM 4– SONUÇ ve TARTIŞMA	31
4.1. Sonuçlar	31
4.1.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi İle İlgili Sonuçlar	31
4.1.2. Kültür Ortamları İle İlgili Sonuçlar	33
4.1.2.1. Kallus İndüksiyon Ortam Sonuçları.....	33
4.1.2.2. Kallus Dokularının Alt Kültüre Alınma Sonuçları	37
4.1.2.3. Sürgün Rejenerasyon Ortamları Sonuçları	38
4.1.2.3.1. Kallustan Sürgün Rejenerasyonu Sonuçları.....	38
4.1.2.3.2. Gövde Eksplantından Sürgün Rejenerasyonu	46
4.2. Tartışma.....	52
KAYNAKLAR.....	57
Tablolar	I
Şekiller	II
Yaşam Öyküsü.....	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 kültürü tekniğinin temelini, bitki hücrelerinin totipotensi yetenekleri ve rejenerere olabilme özellikleri oluşturmaktadır. Bitki hücrelerinin her birinin bütünü verme yeteneklerinin, *in vitro* bitki üretimi için kullanılma çalışmaları 1900'lü yıllara dayanmaktadır. Alman bilim adamı Haberlandt 1902 yılında, ilk *in vitro* kültür çalışmasını denemiştir. Bitki hücrelerini *in vitro* ortamda canlı tutmayı başarmıştır. Ancak bitki büyüme düzenleyicilerinin o yıllarda henüz keşfedilmemesinden dolayı çoğaltmada başarılı olamamıştır.

Bitki büyüme düzenleyicilerinin keşfedilmesi ile 1940'lı yıllarda asıl doku kültürü alanındaki çalışmalar başlamıştır. Yapılan ilk çalışmalar, besin ortamına konulan bitki hücre, doku ya da organ gibi kısımlarının *in vitro* çoğaltılması ve rejenerasyonun sağlanması üzerine olmuştur. Olgun embriyoların kültürü, kök kültürü, apikal meristem kültürü, kallus ve hücre süspansiyon kültürü ilk çalışmalar olarak sayılabilmektedir. Doku kültürü alandaki 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.

Gen aktarım çalışmalarında en önemli aşama, bitkinin *in vitro* rejenerasyonunun sağlanmasıdır. Bir bitki hücre, doku veya organ gibi kısımlarının *in vitro* ortama alınması ve çeşitli doku kültürü çalışmalarının yapılabilmesi için bu bitki kısımlarından *in vitro* rejenerasyonun başarılması gerekmektedir. Besin ortamına konulan bitki kısımlarından rejenerasyonun sağlanmasında ekzojen ve endojen birçok faktör etkili olabilmektedir. Bitki genotipi, fizyolojik durumu, bitkinin yaşı gibi faktörler arasında bitki büyüme düzenleyicileri en önemli faktör olarak rejenerasyonu yönetmektedir. Bir bitkinin hücre, doku veya organ gibi kısımlarından rejenerasyon uygun bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonu ve kombinasyonlarının seçilmesi ile aşılabilmektedir.

1.1.1. Doku Kültürü Besin Ortamı Bileşenleri

Bitki doku kültürü besin ortamları, tamamen yapay ortamda bitkiden alınan herhangi bir parçanın büyüme ve gelişmesine imkan verecek şekilde tasarlanmıştır. Tasarlanan bu besin ortamları ortamları üç temel bileşen içermektedirler. Bunlar; bitkinin ihtiyaç duyduğu ve çoğunlukla toprakta bulunabilen mineral elementler, organik maddeler (vitaminler, aminoasitler) ve karbon kaynağıdır.

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. Tablo 1.1 ve Tablo 1.2 'de makro ve mikro elementlerin bitki gelişmesi için önemleri ve besin ortamına ilave edilen formları verilmiştir.

Tablo 1.1. Besin ortamına ilave edilen makro elementler(Trigiano ve Gray,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 iyonların 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 ₂ PO ₄
Potasyum	Major pozitif iyon olarak gereksinimi karşılayarak negatif iyonları dengeler.	KCl
Sülfür	Birçok önemli sülfür içeren aminoasitlerde mevcut önemli proteinlerin yapıları için kritiktir.	MnSO ₄ 4H ₂ O

Tablo 1.2: Besin ortamına ilave edilen mikro elementler(Trigiano ve Gray,1996)

Element	Görevi	İlave Edilen Formu
Bor	Lignin biyosentezinde ve fenolik asit metabolizması ile ilgili enzimatik aktivitelerde gereklidir.	H ₃ BO ₃
Kobalt	Bazı vitaminlerin bileşenidir.	CoCl ₂ 6H ₂ O
Bakır	Sitokrom oksidaz sistemini de içeren birçok enzim reaksiyonu için kritiktir.	CuSO ₄ 5H ₂ O
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 7H ₂ O
Mangan	Enzimatik reaksiyonlar için özellikle solunum ve fotosentezde gereklidir.	MnSO ₄ 4H ₂ O
Molibden	Nitratın amonyuma dönüşmesini içeren iki enzimatik reaksiyonda kofaktör olarak görev alır.	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O
Çinko	Kloroplast gelişimi için önemlidir ve ayrıca birçok enzimatik reaksiyon için gereklidir.	ZnSO ₄ 7 H ₂ O

Besin ortamlarının ikinci önemli bileşeni ise, karbon kaynağıdır. Kültüre alınan bitki hücreleri ve dokularının fotosentez hızları, *in vitro* ortamda mevcut CO₂'in sınırlı olması nedeniyle düşüktür. Yeterli büyüme ve gelişme için ortama ilave edilen karbon kaynağına ihtiyaç duyarlar. Kolay elde edilebilir olması, kolay özümsemesi ve oldukça stabil olması nedeniyle en yaygın olarak kullanılan karbon kaynakları, şekerlerdir. Besin ortamında en sıklıkla kullanılan şekerler; sakkaroz, glukoz, maltoz, rafinoz ve fruktozdur.

Üçüncü önemli besin ortamı bileşeni, vitaminler ve aminoasitler gibi organik maddelerdir. Vitaminler, bitki hücre ve dokuları için enzimatik reaksiyonlarda katalitik etkiye sahip olmalarından dolayı gereklidir. Ortama yaygın olarak eklenen vitaminler; tiamin, nikotinik asit, pridoksin, myo-inositol ve d-biotindir. Aminoasitler ise indirgenmiş nitrojen kaynağı olarak ortamda bitki hücreleri ve dokuları tarafından kullanılmaktadır.

Besin ortamları, bulunan bu üç temel bileşen dışında; yarı-katılaştırıcılar, bitki büyüme düzenleyicileri ve su içermektedirler. Besin ortamları yapılacak kültür çeşidine göre katı veya sıvı olabilmektedir. Ortamı katılaştırmak için yaygın olarak agar kullanılmaktadır. Deiyonize olarak kullanılan su ise, besin ortamının %90'ından fazlasını oluşturmaktadır.

Besin ortamı bileşeni, bitki büyüme maddeleri veya bitki büyüme düzenleyicileri; bitkiler tarafından sentezlenen, çok küçük konsantrasyonlarda bile fizyolojik olaylarda etkili olabilen ve sentezlendikleri yerden uzaklarda veya hemen orada etkili olabilen organik bileşiklerdir (Palavan ve Ünsal, 1993). Bitki tarafından meydana getirilmediği halde hormon aktivitesine sahip sentetik maddeler, doğal nitelikte düşük konsantrasyonlarda etkin, fakat taşınamayan fitohormonlarda bu tanım içerisine girmektedirler. Bitki büyüme düzenleyicileri, besin ortamında kültüre alınan bitki hücrelerinin gelişimsel iz yollarının belirlenmesinde kritik ortam bileşenleridir. Besin ortamına yaygın olarak bitki hormonları ya da sentetik analogları olarak ilave edilmektedirler.

Bitki gelişme ve büyümesinin düzenlenmesinde öneme sahip beş esas bitki büyüme düzenleyicisi bulunmaktadır. Bunlar; oksinler, sitokininler, gibberellinler, absisik asit ve etilendir.

Oksinler; fotoperiyodizm, köklenme, hücre uzaması, adventif kök oluşumu, apikal dominansi, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkili olan bitki büyüme düzenleyicileridir. Doku kültüründe tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımı, hücre süspansiyon elde eldesi ve somatik embriyogenesis uyarımı, sitokininlerle birlikte kallus oluşumu, sürgün rejenerasyonu, somatik embriyogenesisi uyarmaktadır (Babaoğlu ve diğ., 2002). Doku kültüründe, doğal (Indol-3-asetik asit-IAA) ve sentetik oksinlerin (naftalen asetik asit-NAA, 2,4-Diklorofenoksiasetikasit-2,4D, indol-3-bütirik asit -IBA) her ikisinde kullanılabilir.

Sitokininler, bitki hücrelerinin bölünmesini teşvik edebilen madde olarak 1950’li yıllarda keşfedilmiştir. Apikal dominansi, sürgün meristem oluşumu, yaprak senesensi, besin maddelerinin taşınımı, tohum çimlenmesi, kök büyümesi ve stres yanıtını içeren birçok bitki gelişiminde rol oynamaktadır (Barciszewski ve diğ., 2007). Doğal sitokininler, zeatin ve 6-dimetil aminopürin (2-İP) ve sentetik sitokininlerden benziladenin (BA), benzilamino pürin (BAP), kinetin (6-furfurilaminopürin) doku kültüründe yaygın olarak kullanılmaktadır.

Günümüzde farklı bitki türleri için geliştirilmiş ve farklı oranlarda bileşenler içeren besin ortamları bulunmaktadır. Doku kültürü çalışmalarında en önemli etkenlerden birisi, besin ortamının seçimidir. Bir bitki türünün *in vitro* büyümesi ve gelişmesi için uygun olan bir ortam diğer bir bitki türünün *in vitro* gelişmesine olanak sağlamayabilir.

1.2. Hücresel 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. 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. Gautheret (1966)'e göre; bir bitki hücrelerinin meristematik bir safhaya geri dönme, derecesi *in situ* de ulaştığı fizyolojik ve sitolojik duruma bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bölünmemedeyken, 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.

1.3. 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 rejenere olabilme 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 diğ., 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 Ördög, 2005). Özellikle oksin/sitokin oranı, *in vitro* morfogenez işlemlerde rejenerasyonu sağlayan en önemli faktör olarak görülmektedir (Christianson ve Warnick, 1983). Yüksek oksin/sitokin oranı, genellikle kök oluşumunu teşvik ederken, düşük oksin/sitokin oranı ise sürgün oluşumunu teşvik etmektedir. Diğer taraftan eşit oksin/sitokin oranı organize olmamış hücreler çoğalmaya ve kallus oluşumuna sebep olmaktadır (Yamaguchi ve diğ., 2003). Kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin miktarlarının yanı sıra çeşitlerinin de farklı kök ve sürgün oluşumundan sorumlu olduğu ortaya konmuştur (D'Onofrio ve Morini, 2006). Yapılan bir çalışmada sitokinlerden kinetin (Kin)'in, benzilaminopürine (BAP) göre daha düşük biyolojik etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur (Khanam ve diğ., 2000).

1.4. Kallus Kültürü

Bazı bitki türlerinde mekanik yaralanmaya reaksiyon olarak yaralanma yerlerinde oluşan farklılaşmamış parankimatik hücreleri içeren yığına kallus dokusu adı verilmektedir. Birçok bitki türünün çeşitli hücre ve dokuları, doku kültüründe kallus oluşumu için uyarılabilmektedir. Bu 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 (Trigiano ve Gray, 1996).

Kallus, genetik, patoloji, biyokimya, anatomi, morfoloji, fizyoloji, sitoloji alanındaki araştırılan temel problemlerin incelenmesi ve çözümünü 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.

Tamamen farklılaşmış bitki dokusunun organize olmamış hücreler yığına dönüşmesine tersine farklılaşma (de-differentiation), böyle bir yığından sürgün ve ya kök şeklinde tekrar bir morfolojik farklılaşmaya gidilmesine ise yeniden farklılaşma (re-differentiation) denilmektedir (Babaoğlu ve diğ., 2002).

1.4.1. Somatik Embriyoların Oluşumu (Embriyogenesis)

Somatik embriyogenesis, *in vitro* bir bitkinin herhangi bir somatik hücre, doku veya organından embriyo elde edilmesidir. Somatik embriyogenesisinde 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.

1.4.2. Organ Oluşumu (Organogenesis)

Organogenesis, hürelere 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 organogenesisinde, meristematik bir merkezin ve bunu takip eden sürgün ve ya kök oluşumundan önce alınan eksplant dokusu organize olmamış kallus kümesinin oluşması için uyarılmaktadır. Doğrudan organogenesisinde ise, kallus gelişimi olmaksızın sürgün ve ya kök oluşumu gerçekleşmektedir (Babaoğlu ve diğ., 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.

Organogenesisindeki anahtar morfolojik özellik, meristematik merkezlerin oluşumudur. Direkt ve indirekt organogenesisinin her ikisinde de meristematik merkezler vakuollü parankima hücrelerinden oluşmaktadır (Ross ve diğ., 1973; Villalobos ve diğ., 1985). 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, morfogenik olarak plastisite ve embriyo, çiçek,

yaprak, sürgün, köke farklılaşan birçok tipte primordiya hücrelerine gelişme yeteneğine sahiptir.

In vitro organ oluşumu, eksplant kaynağı olarak kullanılan bitkinin genotipi ve fizyolojik durumu (Monacelli ve diğ.,1983; Torrigiani ve diğ., 1987;Almatura,1989), eksplantın kesildiği bitki kısmı, bitki büyüme düzenleyicileri, ışık, sıcaklık (Tran Than Van ve Dien, 1974; Van Den Ende ve diğ., 1984; Cousson ve Tran Than Van, 1981) , karbonhidrat (Thorpe ve Biondi, 1981) gibi faktörlerden etkilenmektedir.

Organogenesis sürecinin, beceri kazanma, morfogenik izyolların belirlenmesi ya da atanması, morfolojik farklılaşma ve gelişme içeren birçok farklı safhaların içinde ilerlediği gösterilmiştir (Christianson ve Warnick, 1983;1985). Morfogenik izyolların belirlenmesi, ekzojen bitki büyüme düzenleyicileri yokluğunda devam edebildiği zaman tamamlanmaktadır (Dhaliwal ve diğ., 2003).

Çalışmamızda, doku kültürü koşullarında *Nicotiana tabacum* L. (tütün)'un rejenerasyon sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun (tütün) farklı eksplantlarından organogenesis gerçekleştirilmiştir. Yaprak eksplantından organogenesis indirekt yolla, gövde eksplantından ise direkt yolla meydana getirilmiştir. Yaprak eksplantından kallus oluşumu farklı oranlarda oksin ve sitokin içeren ortamda gerçekleştirilmiştir. Bu ortamlarda meydana gelen kallus dokuları karşılaştırılarak en iyi kallus ortamı belirlenmiştir. Üretilen en iyi kallus dokusunun tam bitkiye rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Her iki yolla elde edilen tam bitkilerin saksı toprağına aktarımı gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Solanacea familyasının ekonomik açıdan önemli türleri, *in vitro* çalışmalarda model olarak kullanılmaktadır (Van Der Beek ve Ltifi, 1991; Akı, 2005) *Nicotiana tabacum* L. (tütün) doku kültürü *in vitro* organogenesis çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Tran Thanh Van ve diğ., 1974; Tran Thanh Van, 1981). Ayrıca, tütün doku kültürünün kullanılması aracılığı ile (Mandel ve diğ., 1992) fizyolojik, metabolik işlemlerde ve genetik çalışmalarda geniş ölçüde kullanılan önemli bir model bitkidir (Elleuch ve diğ., 2001). Totipotensi ilk olarak *Nicotiana tabacum* türünde tek hücrelerden olgun bitkilerin elde edilmesi ile gösterilmiştir (Vasil ve Hildebrandt, 1966). Bunu yanı sıra, izole edilen protoplastlardan ilk bitki rejenerasyonu *N. tabacum* ile gerçekleştirilmiştir (Takebe ve diğ., 1971).

Grady ve Bassham 'a (1982) göre; tütün kallus dokusundan sürgün oluşumu ilk kez 1939 yılında White tarafından ortaya konmuştur. Birkaç yıl sonra Skoog ve Miller (1957) ekzojen olarak eklenen oksin ve sitokininin tütün kallusun dokusunun, kök ya da sürgüne farklılaşmış ya da farklılaşmamış safhada kalmasını belirlediği ortaya konmuştur.

Yapılan bir çalışmada; sürgün oluşturan ve sürgün oluşturmeyen yaprak disk kültürü karşılaştırılarak 35 gün boyunca mineral içeriği izlenmiş büyüme, sürgün organogenesis ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, *Nicotiana tabacum* L. var. zz100 yaprak diskleri, sürgün oluşumu için 5 µM BA ilave edilmiş MS sıvı besin ortamında ve bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS sıvı besin ortamında kültüre alınmıştır. Bu ortamda kültüre alınan eksplantlar gözlemlendiğinde, eksplantın büyüme ve sürgün oluşumunun, sitokinin aracılığı ile uyarıldığı ortaya konmuştur. Çalışmada ayrıca sürgün oluşumu gözle görülür biçimde üç morfogenez safha ile karakterize edilmiştir. Birinci safha; ön meristem oluşumlarının gerçekleştiği 0-10 gün periyodundaki dönemdir. Bu safhada, eksplant çaplarının genişlemesi ve sitokinin sebebiyle morfogenez ilk belirti olan eksplantın kesik bölgelerinin çevresinde kallus

oluşumu meydana gelmektedir. İkinci safha ise 10-20. gün periyodunda sürgün meristeminin başlaması ve meristemoid adı verilen meristem hücrelerinin oluşturduğu, yeşil kümelerin ayrı yığınlarının eksplantın çevresinin etrafında kallus biyokütlesinin içinde görüldüğü safhadır. Bu oluşum kültürün 18. gününde eksplantın %50 'sinde, 20-22 günde ise eksplantın %100 'de görüldüğü belirtilmiştir. Son safha ise 20-35 günde ise teşvik edilmiş meristemin yapraksı sürgüne doğru büyüme ve farklılaşmasının gerçekleştiği safha olarak tanımlanmıştır. Ufak yapraksı sürgünlerin meristemoidlerde ortaya çıkması ve kültürde zamanla artan sürgün oluşumunun (%75-100) gerçekleştiği belirtilmiştir (Ramage ve Williams, 2003).

Tütün yaprak eksplantlarında *de novo* doğrudan sürgün ya da kök oluşumu, ortamdaki fitohormonlara bağlı olduğu bir çok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Attfield ve Evans, 1991a; b; Dhaliwal ve diğ., 2003). *De novo* organogenesis, meristematik merkezlerin, meristemoidlerin artışı veren, sürgün ve kök primordiyalara gelişen ve sonunda sırasıyla sürgün ve köke gelişen bölgesel hücre bölünmelerinin başladığını göstermektedir (Thorpe, 1980).

Kültüre alınmış *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. yaprak eksplantlarının kullanıldığı bir çalışmada, kallus oluşumu ve kök oluşum süreci ışık ve taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiş, kallus ve köklerinin ortaya çıkış zamanları kaydedilmiştir. Eksplantlardan yükselen sürgün ve köklerin gelişimleri aralarında ve bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı ortamdaki eksplantlar ile karşılaştırılması sonucunda sürgünlerin kültürde 12 gün sonra, köklerin ise 7 gün sonra görüldüğü belirtilmiştir. Işık ve taramalı elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler ile kallus oluşturacak nodüllerin (meristemoid) eksplant kenarında gözlemlendiği ve bu nodüllerden sürgün yükseldiği ortaya konmuştur. Nodüller başlıca palizat mezofil hücreleri, bazı sünger mezofil ve sınır kılıf hücreleri boyunca köken aldıkları belirtilmiştir (Attfield ve Evans, 1991; Dhaliwal ve diğ., 2003).

Tütün kallusunda sürgün oluşumuna yol gösteren en erken histolojik olaylar altıncı ve ondördüncü günler arasında (Thorpe ve Murashige, 1970) kallusun büyüdüğü ortam yüzeyinden kısa uzaklıkta gerçekleştiği belirtilmiştir (Ross ve Thorpe, 1973). Tercihli hücre bölünme aktivitelerinin gerçekleştiği bölgede nodüller

yapılar (meristemoidler) görüldüğü ve bu yapıların organ oluşturmada kalabildiği ya da sürgün, kök meydana getirebilir olduğu belirtilmiştir (Maeda ve Thorpe, 1979). Akı (1997) tarafından bitki büyüme düzenleyicilerinin, kullanılan bitkisel materyallerden ve buradan elde edilen kalluslardan morfojenetik değişiklikler meydana getirebilme yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir.

Convolvulus arvensis kullanıldığı bir çalışmada, yaprak eksplantlarının 0,05 mg/L IAA ve 7,0 mg/L 2-IP içeren Skoog tuzları, sukroz, vitaminler bulunan ortamda kültüre alınması sonucu sürgün oluşumu gözlenmiştir. Bu ortam, sürgün teşvik ortamı olarak belirlenmiş ve bu ortamda kültüre alınan eksplantların kesik bölgelerinde küçük miktarda kallus oluşumuna meydana geldiği belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca sürgün teşvik ortamında hücreler, hücre grupları sürgün oluşumu için kararlı hale geldikleri ve bu kararlılığın kuvvetlice sürgün oluşumu için kanalize edildiği ve sonradan eksplant kök teşvik ortamına aktarmanın sürgün oluşumunu etkilemediği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, organogenesisin oksin sitokin dengesiyle kontrolünün, dokunun yetenekli hale gelme zamanı ile sürgün ya da kök gelişiminin belirlenme zamanı arasında meydana gelmesi gerektiği belirtilmiştir (Christianson ve Warnick, 1983).

Farklı besin ortamı ve eksplant çeşitlerinin *Catharanthus roseus* L. G. Don bitkisinde kallus oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkinin yaprak ve gövde parçaları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Besin ortamı olarak 2 mg/L NAA + 3 mg/L BA ve ya 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 Yürekli, 1995).

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 yer aktarılan sürgünlerin iyi bir şekilde geliştikleri gözlenmiştir. Çalışma sonunda, olgun sürgünler köklendikten sonra dış ortama aktarılmıştır (Akçam-Oluk ve Yürekli, 2001)

Ross ve Thorpe (1973); kültürde tütün kallus dokusunun pozisyonunun farklı zamanlarda tersine çevrilmesi ile sürgünlerin kallusun üst ya da aşağı kısmında ortaya çıkabildiği gözlemiştir. Bu olayda, her iki bölgede ortamdaki dokuya hareket eden farklı maddelerin endojen dengelerinin sebep olduğu bir fizyolojik gradient etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca hücrelerde mevcut endojen maddelerin, hücre yeteneklerinin ayrılmasına neden olarak farklılaşmayı kontrol edebildiği kaydedilmiştir.

Christianson ve Warnick (1985) tarafından, organogenesis çeşitlerinin kontrolünün 2. aşamada ekzojen olarak ilave edilmiş fitohormonlar aracılığıyla gerçekleştiği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra kök, sürgün ve kallus indüksiyon ortamlarının sırasıyla, kök ve sürgün oluşumu için kullanılabilir oldukları belirtilmiştir. Ayrıca kökler kallusun üst kısmından sürgünlerin ortamla temas eden hücrelerden yükseldiği ortaya konmuştur.

Bir antioksin (Gaspar ve diğ., 1996) olan 2,4,5-triiodobenzoik asit (TIBA)'nın *de novo* tütün kallus dokusundan sürgün organogenesisini bloke ettiği, daha önce yapılan bir çalışma ile ortaya konmuştur (Murashige, 1965). *de novo* organogenesisin anlaşılmasında, organogenesisin sürecini engelleme yada bloke etme kullanılan bir yaklaşımdır. Böyle bir yaklaşımın denendiği bir çalışmada, tütün yaprak diskinde organogenesis üzerine etkisi araştırılmıştır. Yaprak eksplantları, en uygun sürgün ve kök oluşum ortamlarına farklı zaman periyotlarında ve farklı kültür sırasında (ilk önce SF yada RF ortamına daha sonra TIBA içeren SF ve RF ortamına alınarak bunun yanında ilk önce TIBA içeren SF ve ya RF ortamına daha sonra SF ve RF ortamına alınarak) eklenmiş TIBA ile maruz bırakılmıştır. Organ oluşum ortamı, MS

bazal medium, 10^{-5} M BA, (sürgün oluşum ortamı), kök oluşum ortamı olarak ise 10^{-4} M IBA ve kinetin 10^{-6} M içeren besin ortamı belirlenmiş, TIBA bu ortamlara $0,02 \times 10^{-5}$ 'ten $4,0 \times 10^{-5}$ M'a kadar farklı konsantrasyonlarda eklenip inhibisyon kapasitesi test edilmiştir. İnhibisyon zamanı, eksplantların TIBA içeren ve içermeyen sürgün oluşum ortamına, kültürün 0 ile 15. gün kadar farklı günlerde, kök oluşum ortamına ise 0 ile 12. güne kadar aktarılması ile denenmiştir. Kök oluşum ortamında ise, TIBA'nın kök sayısında önemli derecede azalmaya sebep olduğu ortaya konmuştur. $4,0 \times 10^{-5}$ M TIBA eklenen ortamda ise hiç kök oluşumu gözlenmemiştir. Sürgün oluşum ortamında $0,2 \times 10^{-5}$ M ya da daha artan miktarda TIBA'nın üretilen sürgün sayısında önemli derecede azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısı 19-21'den 1,6 'ya kadar düştüğü görülmüştür. Bunların yanı sıra TIBA'nın sürgün oluşumunu engelleme etkisinin kültürün ilk 6-8 gününde ortamda mevcutsa görüldüğü belirtilmiştir. TIBA'nın, meristemoid oluşum boyunca aynı gelişimsel safhadaki morfogenez işlemlerinin (sürgün ve kök oluşumu) her ikisini de organize olmuş hücre bölünmesine müdahale ederek ve endojen oksin ile yarışarak (Gaspar ve diğ., 1996; Taiz ve Zeiger, 2002) inhibe ettiği belirtilmiştir. Ayrıca TIBA inhibisyonunun meristemoid oluşum zamanında ve daha sonra organogenesisin belirlenmesinde etkili olduğu ortaya konulmuştur. Histolojik çalışmalar, dört günde kök oluşum ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarının vasküler yapı içinde ya da yakınında hücre bölünmelerinin meydana geldiğini göstermiştir (Dhaliwal ve diğ., 2003). Hücre bölünmeleri sonucu, meristemoid oluşumu ve daha sonra kültürün 8. gününde kök primordiyalarının oluşumunun gerçekleştiği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, TIBA inhibisyonunun kök meristemoid oluşumu ve kök belirlenmesi aşamasında meydana geldiği ortaya konmuştur (Harbinder ve diğ., 2004).

2005 yılında yapılan bir çalışmada; doku kültürünün gelişimini hızlandırmak ve optimize edilmiş morfogenez metodu geliştirmek için, çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin doku kültüründe metabolizma ve gelişimi nasıl etkilediği araştırılmıştır. MS tuzları, vitaminler ve farklı konsantrasyonlarda 2,4 D ($2,5- 5,0- 7,5- 10,0- 12,5 \mu\text{M}$) 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 diğ., 2005).

Amin ve hidrosinamikasit aminlerin, tütün yaprak eksplantlarında birikiminin araştırıldığı bir çalışmada, tütün yaprak diskleri beş günlük bitkilerden alınarak kallus safhası geçirmeden tomurcuk oluşumu için 2×10^{-5} M BA içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. Farklılaşma olmaksızın kallus oluşumu 2×10^{-5} M BA ve 10^{-5} M 2,4-D ya da sadece 10^{-5} M 2,4-D ile sağlanmıştır. Tomurcuk farklılaşmasının BA içeren ortamda kültürün 14. gününde başladığı ve 26. günde eksplant başına 200 tomurcuk oluştuğu gözlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmemiş ortamda kültüre alınan eksplant, değişmeden kalmış, sınırlı ya da hiç bölünme görülmemiştir. Yedinci günde kallus oluşumu görülmüş ve 20 günlük kültürde her iki ortamda da kültüre alınan kalluslar benzer morfoloji göstermişlerdir. Kalluslar, klorofil kaybetmiş, kahverengi ve şekilsiz hale gelmişlerdir. Bunun yanı sıra 2×10^{-5} M BA ve 10^{-5} M 2,4-D ortamda sadece 10^{-5} M 2,4-D içeren ortama göre kallus büyümesi daha yüksek olduğu kaydedilmiştir (Martin-Tanguy ve diğ., 1988).

İnce hücre tabakası (İHT), sonrasında herhangi bir organogenesis gerçekleşmeyen kallus oluşumu ya da ara kallus oluşumu olmayan düzensiz meristemler olduğu gibi kök, vejetatif ve çiçek tomurcukları oluşturan subepidermal hücreler gibi aynı farklılaşma seviyesinde olan hücre gruplarıdır (Tran Thanh Van,

1973). İnce hücre tabakası çok küçük boyutta bitkinin gövde, yaprak, çiçek gibi farklı organlarından; tek tabakalı epidermal hücreler gibi birkaç hücre tipinden oluşan boylamsal ince hücre tabakası ya da epidermal, kortikal, kambiyum, perivasküler, medullar doku, parankima hücreleri gibi çeşitli doku tiplerinin içeren enine ince hücre tabakası şeklinde kesilebilirler (Teixeira da Silva, 2005). İHT yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olması(Mohnen ve diğ., 1990) sebebiyle özel organların morfogenetik ve gelişim yollarının kolayca kontrol edildiği ve yüksek bitki doku ve organlarının kültürü ve genetik transformasyonda uygulanan bir model sistemdir.

Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) İHT sisteminin kullanılmasından bu yana diğer bitkilerdeki İHT çalışmalarının da temelini oluşturan bir model sistem haline gelmiş ve bu konuda en iyi çalışılmış türdür (Tran Thanh Van, 1973; Teixeira da Silva, 2003). Transformasyon çalışmalarında temel gereksinim olan kallus oluşumu gerçekleşmeden adventif sürgünden bütün bitki rejenerasyonu, *Nicotiana tabacum* bitkisinde yaprak, gövde, sürgün tipleri, çiçek kısımları, protoplast ya da hücre süspansiyonları gibi çeşitli eksplant kaynakları kullanılarak başarılmıştır (Teixeira da Silva, 2005).

Nicotiana tabacum L. cv. Samsun bitkisinin İHT tekniği kullanılan bir çalışmada, IBA ve Kin ilave edilen kültür ortamının başlangıçtaki pH'nın ve iyon alımının *in vitro* vejetatif organogenesis üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Gövde internodundan alınan TCL hücreleri, başlangıçtaki pH seviyeleri 3,0- 4,0- 5,0- 6,0 ve 7,0 olarak ayarlanan 1 µM IBA ve 5 µM Kin içeren sıvı ortamda kültüre alınmıştır. Farklı pH seviyelerinde gelişen eksplantların kültür sırasında iyon konsantrasyonlarında önemli değişiklikler görüldüğü saptanmıştır. Ayrıca farklı pH seviyelerinde kültüre alınan dokulardan meydana gelen vejetatif organogenesis farklılıklar gözlenmiştir. Eksplantların kültüre alınımından 25 gün sonra, pH 3,0 'te tek bir eksplantta vejetatif sürgün oluşumu görülmüştür. Özellikle başlangıç pH' sının 4,0 ve 5,0 olduğu ortamda gelişen eksplantlarda düzenli gelişen sürgünler görülmüştür. pH 7,0 ise apikal dominansi göstermeyen cam gibi görünüme sahip ve

çoğunlukla kümelenmiş sürgünlerin meydana geldiği gözlenmiştir (Pasqua ve diğ., 2002).

Farklı gen aktarım metodlarının sürgün rejenerasyon kapasitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun gövde internodyumundan çapraz olarak 300-500 µm enine kesilen ince hücre tabakası, sürgün rejenerasyonu için en uygun ortam olarak seçilen 2 mg/L BA ve 0,5 mg/L NAA ilave edilmiş MS ortamında kültüre alınmıştır (Teixeira da Silva, 2005).

Yapılan diğer bir çalışmada, *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun gövdesinden boyuna İHT alınmış eksplantlardan sürgün, kallus ve kök oluşumu farklı konsantrasyonlarda (0,05- 50 µM) BA ve NAA ilave edilmiş MS ortamında gerçekleştirilmiştir. 1-6 µM BA ve 0-5 µM NAA içeren ortamda optimal sürgün oluşumu, 0-5µM BA ve 1-6 µM NAA aynı eksplantta optimal kök ve sürgün oluşumu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra NAA konsantrasyonunun 16 µM'dan daha yüksek oluşu yalnızca kallus çoğalmasına sebep olduğu ortaya konmuştur. Sürgün oluşum ortamında sürgün primordiyaları kültürde makroskobik olarak bir hafta sonra eksplantın bütün kenarı boyunca geliştiği belirtilmiştir (Creemers-Molenaar ve diğ., 1994).

Nicotiana tabacum L. cv. Samsun türünün materyal olarak kullanıldığı bir diğer çalışmada; pH, indolbütirik asit (IBA), kinetin ve ışığın İHT morfogenezis üzerine etkisi ortaya konulmuş ve morfogenezis çalışmaları için duyarlı, tekrarlanabilir İHT kültür sistemi geliştirilmiştir. İHT morfogenezis üzerine ışığın etkisinin IBA'nın ortamdan fotokimyasal yıkılması ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. İHT yüksek (5- 20µM) IBA ve düşük (0,1-0,75 µM) kinetin konsantrasyonu içeren ortamda kültüre alındığında kök oluşumu, yüksek (2-10 µM) kinetin ve değişen konsantrasyonlarında IBA içeren ortamda vejetatif sürgün oluşumu gerçekleştiği gözlenmiştir. Düşük (0,1-2 µM) IBA ve düşük (0,2-2 µM) kinetin konsantrasyonları içeren ortamda kültüre alınan İHT ise çiçek oluşumu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra 5 µM IBA içeren ortamda pH 6,15 seviyesinde çiçek oluşumu istisnasının dışında, değişen pH seviyelerinin İHT eksplantından organ oluşumunda sadece küçük

değişikliklere sebep olduğu ve oluşacak organ tipinin üzerinde karar verme etkisine sahip olmadığı belirtilmiştir. Bunu yanı sıra oldukça düşük (0,1-2 μ M) IBA ve düşük (0,2-2 μ M) kinetin konsantrasyonlarında çiçek oluşumu gözlenmiştir. 55, 75, 95 ve 115 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluklarının TCL organogenesis üzerine etkisi incelendiğinde, IAA ışıkta stabil olmadığı (Yamakawa ve diğ., 1979) ve bu yüzden 55 ve 120 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluklarının IBA bozulmasına sebep olduğu belirlenmiştir (Mohnen ve ark., 1990).

Çiçek, gövde meristem oluşumu üzerine fotoperiyod ve büyüme düzenleyicilerinin etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, uzun gün çiçeklenen *Nicotiana glauca* ve fotoperiyodik nötral olan *Nicotiana glauca* kullanılmıştır. Epidermis ve üç altı subepidermal hücre tabakaları içeren çiçek sapı ince hücre tabakası eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. 16 saat uzun ve 8 saat kısa gün fotoperiyodunda çiçek ve vejetatif tomurcuk oluşumu için 1 μM IAA +1 μM BA içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantlar, kültüre alındıktan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 14 gün sonra hormon içermeyen ortama aktarılmıştır. Hormon içeren ortamda farklı sürelerde kalan eksplantlarda meydana gelen çiçek ve vejetatif tomurcuk sayısı karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda çiçek ve vejetatif sürgünlerin oluşumu için büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duyulduğu ortaya konmuştur. Kültürün ikinci günden üçüncü güne kadar IBA ve BA içeren ortamın kontrol ile karşılaştırıldığında vejetatif organların üretiminin uyarılmasında bitki büyüme düzenleyicilerinin etkili olduğu ortaya konulmuştur. Bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamda eksplantları iki günden altı güne kadar bulundurma oluşan vejetatif sürgün sayısının artışı devamını sağlamıştır. Vejetatif sürgünler uzun süre bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamda kaldıklarında rejenerasyonlarının azaldığı gözlenmiştir. Çiçek oluşumu dört günden daha uzun süre büyüme düzenleyicilerine maruz kaldığında ortaya çıkmıştır. Bunu yanı sıra çiçek sayısında değişiklik görülmemiştir. Uzun gün bitkisi *N. glauca* çiçek oluşumu sadece uzun gün fotoperiyodunda gözlenmiştir. Bunu yanı sıra *N. glauca* ise her iki fotoperiyotta da çiçek oluşumu meydana gelmiştir. Çalışmada bitki büyüme düzenleyicilerinin ortamdaki uzaklaşması ile vejetatif ve çiçek tomurcuk sayısındaki artışın gerçekleşmesi, büyüme

düzenleyicilerinin fazlasının *de novo* morfogenezisi baskıladığını göstermiştir. (Sauliene ve Rakleviciene, 2004).

Tütün bitkisinde çiçek sapı ince hücre tabakasında çiçek ve vejetatif sürgün oluşumu yaprak dokularıyla karşılaştırıldığında daha kısa süreli olarak bitki büyüme düzenleyicilerine maruz kalması gerektiği saptanmış ve bitki büyüme düzenleyicilerinin aşırı miktarlarının morfogenezisi engellediği belirtilmiştir (Šauliene ve Raklevičiene, 2002; 2004). Ayrıca eksplantları uzun dönem kültüre alma, büyüme düzenleyicilerinin ortamda ayrışması ve fenolik bileşiklerin ortaya çıkması yeni meristemlerin oluşumunu baskılayabildiği bir çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Scaramagli ve diğ., 1999; Mizukami ve Fischer 2000 ; Weyer ve Paterson 2001; Torrigiani ve diğ., 2003).

Sürgün oluşturan ve sürgün oluşturmeyen ortamda sükröz metabolizma değişimlerinin araştırıldığı bir çalışmada; materyal olarak kullanılan *Nicotiana tabacum* var. Wisconsin 38. yumuşak gövdesi modifiye edilmiş MS tuzları ve 3,0 mg/L NAA ve 0,3 mg/L 2İP içeren Linsmaier ve Skoog (1965) ortamında kültüre alınmıştır. Bu ortamda eksplantlardan sadece kallus oluşumu meydana gelmiş ve bu ortam sürgün oluşturmeyen ortam olarak belirlenmiştir. Kallus üç haftada bir alt kültüre alınarak farklılaşmamış olarak üç yıl çoğaltılmıştır. Sürgün oluşumu için 1,0 mg/L 2İP içeren ve sürgün oluşum ortamı olarak belirlenen ortam kullanılmıştır. Bu ortamda üç hafta kültüre alınan eksplantlarda santimetre küpte 50 sürgün taslağı rapor edilmiştir (Grady ve Bassham, 1982).

Tütün İHT 'sinden sürgün oluşumu sırasında yapısal değişimlerin araştırıldığı bir çalışmada, *Nicotiana tabacum* L.cv. Petit Havana bitkisinin internodları 2 mm kalınlıkta kesilerek sürgün oluşumu için 0,54 μ M NAA ve 0,44 μ M BA içeren MS besin ortamına konulmuştur. Taramalı elektron, ışık ve transmisyon mikroskobu ile sürgün oluşumu sırasında meydana gelen değişiklikler izlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu ile yapılan gözlemler, kültürün ikinci gününde epidermal yüzeyde birçok çıkıntının görüldüğü ve %80'ninin stomadan yükseldiği belirtilmiştir. Stomal kompleks çevresinin yükselmeye devam ettiği ve sürgün taslağının şişmiş bu

dokulardan kültürün 10. gününde ortaya çıktığı gözlenmiştir. Işık mikroskobu ile yapılan anatomik incelemelerde ise hücre bölünmelerinin özellikle doğrudan stoma altında yer alan kabuk hücrelerde kültürün ikinci gününde görüldüğü belirtilmiştir. Bu hücrelerin bölünmeye devam etmesi ile stoma etrafındaki hücreler şişmesi ile sonuçlanmıştır. Transmisyon elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar en göze çarpan değişiklik plastidlerde gözlenmiştir. Kültürün başlangıcında kabuk hücreleri yaygın grana demetli tipik kloroplastlara sahip olduğu ve stomaların altında yer alan bölünen hücrelerin plastidlerinde nişasta taneleri gözlenmiştir. Ayrıca kültürün 5. gününde hücrelerin birkaç lameler yapılı proplastidler içermekte oldukları gözlenmiştir. Kültürün onuncu gününde proplastid içeren hücreler çıkıntının üst kısmında yer alan hücrelerde ve kloroplast gelişen yaprak taslağında görülmüştür. Bunların yanı sıra kabuk hücrelerinin sürgüne farklılaşma yeteneği test edilmiştir. Protoplastları izole edilen kabuk hücrelerinin protoplastları *in vitro* kültüre alınmışlardır. İki gün sonra protoplastlar bölünmeleri başlamış ve dört hafta sonra mikrokallus oluşturmuştur. Oksin ve sitokinin içeren ortama aktarıldıklarında %50'sinde fazla mikrokallusta sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Çalışmada ayrıca stomal kompleks hücrelerin, komşu hücrelerin sitokinin alımında etkili olabileceği ve hücresele seviyede test edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Arai ve diğ., 1997).

Arai ve diğ., (1997)'ne göre histolojik çalışmalar İHT tütünden sürgün oluşumu sırasında hücre bölünmelerinin meristematik merkezler olarak organize haline gelen subepidermal hücrelerde meydana geldiği ortaya konmuştur (Creemers-Molenaar ve diğ., 1994; Monacelli ve diğ., 1992).

Farklılaşmış ve farklılaşmamış dokulardaki rejenerasyon işlemi, genetik mühendisliği ve bitkilerin klonal çoğaltımı için bir araç olarak uygulanma potansiyeli ile dikkati çekmektedir. Doku kültürü tekniğinin bitkileri iyileştirmede en önemli ve yaygın olarak kullanılan uygulamalarından birisi gen transferidir (Babaoğlu ve diğ., 2002). Farklı gen transfer protokollerinin farklı bitki türlerinde uygulanabilir olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Potrykus, 1995). Gen transferi çalışmalarında transformasyon sıklığını sınırlayan faktörlerden biri, hedef bitki materyali için rejenerasyon protokollerinin güvenilirliğidir. Bu yüzden transformasyon

çalışmalarında, bitki rejenerasyonu için kültür koşullarının; çalışılan bitki türüne ve eksplant çeşidine göre optimize edilmesi gerekmektedir.(Öktem, 1999).

Tütün bitkisi verimli bir doku kültürü ve organogenik rejenerasyon sistemine sahiptir. Bahsedilen bu her iki sistem eksplant kaynakları, kültivar ve kullanılacak olan gen aktarım metodlarına bağlı olarak başarılı bir transformasyon yapılmasına olanak sağlamaktadır. *Nicotiana tabacum* ile yapılan *in vitro* bazı araştırmalarda kallus eldesi ve bu kaynaktan transformasyon çalışmaları başarı ile sürdürülmektedir (Iida ve diğ., 1990).

Günümüze kadar yapılmış olan tüm araştırmalar toplu olarak değerlendirildiğinde, çeşitli bitki türlerine ait *in vitro* çalışmaların farklı amaçlara yönelik olarak gerçekleştirildiği gözlenmektedir. Rejenerasyon, totipotensi, sürgün oluşumu, organogenesis, morfogenez gibi biyolojik süreçleri temel alan araştırmalarda bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları kullanılmış, ince hücre tabaka tekniği de denenmiştir. Bunların yanı sıra farklı gen aktarım metodlarının, fotoperiyod ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün rejenerasyon kapasitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda daha önceki araştırmaların ışığında, *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun bitkisinde *in vitro* koşullar altında bitki büyüme düzenleyicileri ve rejenerasyon arasındaki ilişki optimize edilmiştir. Bundan sonraki aşamada, hücre süspansiyon kültürleri, mikroçoğaltım ve gen aktarım temelindeki çalışmaların gerçekleştirilmesi düşünülmektedir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmamızda Bafra tütünü özelliği gösteren ve Bafra Meslek Yüksekokulu'ndan temin edilen *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun türünün Esendal çeşidi kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki Yetiştirme Yöntemleri

Eksplant kaynağı olarak kullanılacak bitkilerin yetiştirilmesi için iki farklı yöntem kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumların bir kısmı saksılara aktarılıp kontrollü şartlarda yetiştirilmiştir. Bir kısmı ise *in vitro* koşullarda yetiştirilmiştir. Her iki yöntemle yetiştirilen bitkilerin tümü eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.2.1.1. *In vivo* Bitki Yetiştirilmesi

Yüzey sterilizasyonu yapılan *N. tabacum* tohumları 1:3 oranında sterilize edilmiş perlit: torf içeren çapı 12 cm, derinliği 10 cm olan saksılara eşit sayıda ekilmiştir. Saksılar laboratuvarımızda bulunan çevresel şartları kontrol edilebilen bitki yetiştirme kabinine yerleştirilmiştir. Kabin, 16 saat ışık, 8 saat karanlık uzun gün koşulları, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 28.080 lüks floresan ışık şiddetine ayarlanmıştır. Bitkiler her gün düzenli olarak saf su ile sulanmıştır. Saksılarda yetiştirilen bu bitkilerden, 12 haftalık bitkiler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.2.1.2. *In vitro* Bitki Yetiştirilmesi

Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen 30 mL Murashige Skoog (1962) bazal ortamı (MSO) içeren 100 mL'lik cam şişelerde kültüre alınmıştır. Kültür şişeleri, 16 saat ışık, 8 saat karanlık uzun gün koşulları, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 28.080 lux floresan ışık şiddetine ayarlanmış bitki yetiştirme kabinine yerleştirilmiştir. Bu kültür şişelerinde çimlenen ve büyüyen bitkiler, besinlerin tükenmesi sonucu gelişimlerinin yavaşlamaması için taze besiyeri içeren daha büyük yetiştirme kavonozlarına aktarılmıştır. 21 haftalık sağlıklı bitkiler eksplant kaynağı olarak araştırmamızda kullanılmıştır.

3.2.2. Sterilizasyon Yöntemleri

Doku kültüründe bitkilerin kültüre alındıkları besin ortamı mikroorganizmaların üremesi için çok elverişlidir. Çalışmalar sırasında mikroorganizmaların meydana getirebilecekleri kontaminasyonlar, çalışmanın her aşamasını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu yüzden doku kültüründe steril çalışmak 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.

3.2.2.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

N.tabacum tohumları çok küçük boyutta olduklarından dolayı yüzey sterilizasyonları eppendorf tüpleri içerisinde yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonu için tohumlar %70'lik etil alkol içeren eppendorf tüplerine konularak kısa sürelerle tüp ters düz edilerek 1,5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda kısa süre santrifüj yapıp tohumların dibe çökmesi sağlanmıştır. Mikropipet yardımıyla alkol tohumların üst kısmından alınmıştır. Daha sonra tohumların üzerine ticari olarak satılan %10'luk

sodyum hipoklorit ilave edilerek 20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda kısa süre santrifüj edilip sodyum hipoklorit mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Tohumların üzerine saf su ilave edilmiştir. Kısa bir süre santrifüj yapılarak saf su uzaklaştırılmıştır. Bu işlem üç defa kez tekrarlanmış ve sodyum hipokloritin tohumların yüzeyinden uzaklaşması sağlanmıştır. Sterilize edilen tohumlar steril kurutma kağıtları üzerine alınarak kurutulmuştur. Bütün bu aşamalar steril kabin içerisinde yapılmıştır.

Kontrollü şartlar altında yetiştirilecek *N. tabacum* tohumları eppendorf tüplerine aktarılarak üzerine ticari olarak satılan %10'lik sodyum hipoklorit içerisinde 20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda kısa süre santrifüj edilerek tohumların dibe çökmesi sağlanmıştır. Mikropipet yardımıyla alkol tohumların üst kısmından alınmıştır. Daha sonra tohumların üzerine saf su ilave edilmiştir. Kısa bir süre santrifüj yapılarak saf su uzaklaştırılmıştır. Bu işlem üç defa kez tekrarlanmıştır. Sterilize edilen tohumlar steril kurutma kağıtları üzerine alınarak kurutulmuştur.

3.2.2.2. Yaprak ve Gövde Parçalarının Sterilizasyonu

Bitki yetiştirme kabininde yetiştirilmiş bitkilerin eksplant olarak kullanılacak yaprakları ve gövde parçaları %20'lik sodyum hipoklorit içerisinde 15 dakika bekletilerek sterilize edilmiştir. Daha sonra steril kabin içerisinde üç defa steril saf sudan geçirilerek sodyum hipokloritin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Sterilize edilen bitki parçacıkları steril kurutma kağıtları üzerine alınarak kurutulmuştur.

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.

3.2.2.3. Besin Ortamlarının ve Cam Malzemelerin Sterilizasyonu

Büyük miktarda hazırlanan besin ortamları büyük şişeler içerisinde 121 °C 'de 1 atmosfer basınçta otoklavda sterilize edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız besi

ortamlarının tümüne otoklavlamadan önce agar eklendiğinden dolayı, ortam henüz sıcak halde iken (60-70 °C) daha önceden steril edilmiş olan kültür kaplarına (petri, kavanoz) boşaltılmıştır. Ortamı kültür kaplarına sıcak bir halde aktarmak kontaminasyon riskini büyük ölçüde engellemektedir. Kullanılan petrilerin etrafları ise streçfilm yada parafilm ile iki üç kat kuşatılarak besin ortamlarının dış ortamdan izole edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan besin ortamları herhangi bir kontaminasyon riskine karşı ekimden önce 1 gün oda koşullarında bekletilmiştir.

Denemelerimizde kullanılan cam malzemelerin tümü öncelikle deterjanlı ve sodyum hipokloritli su ile yıkanarak organik maddelerden arındırılmaya çalışılmıştır. Kurutulan bütün cam malzemeler, pensler, bistüriler ve eksplant kesimi için kullanılan fayanslar alüminyum folyo ile kaplanıp 121° C 'de 1 atmosfer basınçta otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan bu malzemeler üzerlerine pulverizator yardımı ile %96' lık etanol püskürtülerek steril kabine aktarılmışlardır.

3.2.3. Besin Ortamının ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanma Yöntemleri

3.2.3.1. Besin Ortamının Hazırlanması

Çalışmamızda bütün eksplantlar, yüksek tuz içeriğine sahip ve tütün için geliştirilmiş Murashige Skoog (1962) besin ortamında kültüre alınmışlardır. Tablo 3.1 'de bileşenleri verilen hazır (Sigma-S5519) Murashige Skoog bazal besin ortamının yanı sıra, karbon kaynağı olarak sükröz şekeri (Sigma-S-5391) ve ortam yarı-katılaştırıcı olarak agar (Merck-1.01613.0500) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bütün MS besin ortamları 4,43g/L MS, %3 sükröz ve %0,8 agar olarak hazırlanmıştır. Ortamın pH'sı otoklavlamadan önce 1N NaOH ve 1N HCl kullanılarak 5,70- 5,75 olarak ayarlanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri besin ortamına otoklavlamadan önce ilave edilmiştir.

Tablo 3.1: Murashige ve Skoog Besin Ortamının Bileşenleri (1962)

		mg/L
Makro elementler	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	Nikotinic asit
Pridoksin-HCl		0,5
Thiamin-HCl		0,1
<i>myo</i> -inositol		100
Glisin		2,0

3.2.3.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması

Bitki büyüme düzenleyicileri olarak sentetik sitokinin olan 6-Benzilaminopürin (Sigma-B3408) ve sentetik oksinlerden α -naftalenasetik asit (Sigma-N0640) kullanılmıştır. Kullanılacak bitki büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonları 1 mg / mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Naftalenasetikasit (NAA) %70'lik etil alkol içerisinde ısı yardımı ile çözüldükten sonra son hacim saf su ile tamamlanmıştır. Benzilaminopürin (BAP) ise 1 N HCl içerisinde çözüldürülerek saf su ile son hacmi tamamlanmıştır. Hazırlanan bitki büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonları +4°C'de saklanmıştır.

3.2.4. Hazırlanan Kültür Ortamları

Çalışmamızda farklı oranlarda NAA ve BAP içeren kallus teşvik ortamı, alt kültür ortamı, sürgün oluşum ortamı ve kök oluşum ortamı hazırlanmıştır.

Tütün yaprak eksplantlarından organogenesis kallus dokusu oluştuktan sonra gerçekleştirilmiştir. Bu yüzden yaprak eksplantları farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren kallus indüksiyon ortamlarına aktarılmıştır. Gelişen kalluslar çoğalmaları için alt kültür ortamına aktarılmıştır. Çoğaltılan kallus dokusu daha sürgün oluşum ortamına aktarılmış ve sürgün oluşumu meydana gelmiştir. Oluşan sürgünler daha sonra kök oluşum ortamına aktarılmıştır.

Gövdeden alınan eksplantlar ise sürgün oluşum ortamına yerleştirilmiş ve kallus dokusu oluşmadan sürgün oluşumu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sürgünler kök oluşum ortamına aktararak kökledirilmiştir.

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.

3.2.4.1. Kallus Teşvik Ortamları

Çalışmada tütün yaprak eksplantlarından kallus teşviki üzerine farklı oksin sitokinin oranının etkileri araştırılmıştır. Tablo 3.2 'de verilen farklı oranlarda NAA ve BAP içeren MS besin ortamları kallus teşvik ortamı olarak kullanılmıştır. Kabinde yetiştirilen 12 haftalık bitkilerden alınan ve yüzey sterilizasyonu yapılan genç yapraklar ve *in vitro* yetiştirilen 21 haftalık bitkilerden alınan genç yapraklar küçük kareler şeklinde kesilip her bir petriye dört adet gelecek şekilde farklı oranlarda NAA ve BAP ilave edilen 25 ml MS ortamı içeren 9 cm çapındaki petrilere yerleştirilmiştir. Petrilerin etrafı üç kat 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 deneme 100 eksplantlık olarak hazırlanmıştır. Üç farklı kallus teşvik ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarından oluşan kalluslar izlenerek en iyi kallus teşvik ortamı belirlenmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan Kallus Teşvik Ortamları

Ortam	NAA mg/L	BAP mg/L
Büyüme düzenleyicileri içermeyen ortam (MSO)	-	-
Sadece oksin içeren ortam	0,5	-
1:1 oranında oksin :sitokinin içeren ortam	2,5	2,5
10:1 oranında oksin : sitokinin içeren ortam	2	0.2

3.2.4.2. Kallus Alt Kültür Ortamları

Tablo 3.2 'de verilen kallus teşvik ortamlarında oluşturulan kallus dokuları 4 hafta sonra aynı oranda oksin ve sitokinin içeren ortamlara aktararak alt kültüre alınmışlardır. Alt kültürler ile çoğaltılan kallus dokusunun kütle artışı, alt kültür öncesi ve sonrası yaş ağırlıkları hassas terazide tartılarak hesaplanmıştır.

3.2.4.3. Sürgün Rejenerasyon Ortamları

Sürgün rejenerasyonu yaprak eksplantından oluşan kallus dokusundan ve gövde eksplantlarından farklı oranlarda NAA ve BAP ilave edilmiş ortamlarda gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3.1. Kallustan Sürgün Rejenerasyon Ortamları

Alt kültürlenme ile çoğaltılan kallus dokusu sürgün rejenerasyonu için belirlenen 1:4 oranında NAA ve BAP içeren sürgün rejenerasyon ortamına aktarılmışlardır. Bunu yanı sıra kontrol olarak belirlenmiş büyüme düzenleyicileri içermeyen MS ortam ve 1:10 oranında NAA ve BAP içeren ortam kullanılmıştır. Bu ortamlara aktarılan kallustan meydana gelen sürgünler kültür boyunca sayılarak eksplant başına düşen sürgün sayısı hesaplanmıştır. Kallustan sürgün rejenerasyon ortamları Tablo 3.3 'te verilmiştir.

Tablo 3.3: Kallustan Sürgün Rejenerasyon Ortamları

Ortam	NAA mg/L	BAP mg/L
Büyüme düzenleyicileri içermeyen ortam	-	-
1:4 oranında oksin :sitokinin içeren ortam	0,5	2,0
1:10 oranında oksin :sitokinin içeren ortam	0,1	1,0

3.2.4.3.2. Gövde Eksplantından Sürgün Rejenerasyon Ortamı

12 haftalık kabinde yetiştirilen bitkilerden alınan ve yüzey sterilizasyonu yapılan yumuşak gövde parçacıkları ve 21 haftalık *in vitro* yetiştirilen bitkilerden yumuşak gövde parçacıkları yaklaşık 0,5 cm uzunluğunda kesilerek eksplant olarak kullanılmışlardır. Gövde eksplantları 2,0 mg/L NAA ve 0,2 mg/L BAP içeren 25 mL MS ortamı içeren petrilere yerleştirilmiştir. Petrilerin etrafı üç kat 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 denemede 100 eksplant kullanılmıştır.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1. Sonuçlar

4.1.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi İle İlgili Sonuçlar

In vivo ve *in vitro* olarak yetiştirilen *N. tabacum* L. cv. Samsun bitkileri arasında genel bir karşılaştırma yapıldığında, *in vivo* koşullarda yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantlarda kontaminasyon sonucu kayıpların daha fazla meydana geldiği, *in vivo* yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantlarda ise kontaminasyon oranının çok daha düşük olduğu görülmüştür. Bunu yanı sıra *in vivo* yetiştirilen bitkilerin eksplantlarının yüzey sterilizasyonuna maruz kalma zorunluluğu da bir diğer problem olarak karşımıza çıkmıştır. Her iki ortamda yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantların kallus oluşumu ve rejenerasyon yetenekleri arasında bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 4. 1. Bitki yetiştirme kabininde yetiştirilen yedi haftalık *Nicotiana tabacum* bitkileri



Şekil 4.2. MS0 besin ortamında yetiştirilen 6 haftalık *Nicotiana tabacum* fideleri



Şekil 4.3. MS0 besin ortamında yetiştirilen 19 haftalık *Nicotiana tabacum* fideleri

4.1.2. Kültür Ortamları ile İlgili Sonuçlar

4.1.2.1. Kallus İndüksiyon Ortam Sonuçları

Hormon içermeyen besin ortamında (MS0) kültüre alınan yaprak eksplantlarında sadece sınırlı hücre artışına bağlı olarak kabarmalar gözlenmiştir. Kültür boyunca eksplantların hiç birinde kallus oluşumu, sürgün ve kök farklılaşması gözlenmemiştir.

Sadece oksin (0,5 mg/L NAA) içeren besin ortamında kültüre alınan eksplantların kesik bölgelerinde kültüre alınmalarından 2 hafta sonra kallus oluşumu meydana gelmiştir. Kallus oluşumunun yanı sıra eksplantlar üzerinde kültürün 10. gününde ilk kökler gözlenmiştir. Kültür süresi arttıka kök sayısında artış gözlenmiştir. Kallus oluşumu sadece eksplantın kesik bölgelerinde sınırlı kalmıştır. Sürgün oluşumu, bu ortamda kültüre alınan eksplantların hiç birinde gözlenmemiştir.

1:1 oranında oksin ve sitokin (2,5 mg/L NAA, 2,5 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan eksplantlarda ortama konulmalarından 3-4 gün sonra kesik bölgelerde kallus oluşumu ve hücre sayısının artışına bağlı olarak gerçekleşen kabarma ve kıvrılmalar gözlenmiştir. Eksplantın kesik bölgelerinde ve eksplant yüzeyinde az miktarda yeşil ve sert yapıya sahip kallus dokusu oluşmuştur. Kültürde bir ay kalan eksplantlarda kallus şeffaf yapı aldığı grlmştir. Oluşan kallus dokusu eksplantın tamamını kaplamadığı grlmştir.

10:1 oranında oksin sitokin (2,0mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak eksplantlarında kültürün dördüncü gününde hücre sayısının artışına bağlı kabarmalar ve eksplantın kesik bölgelerinde kallus oluşumu gözlemiştir. Kültürün nc haftasında kallus dokusunun eksplantın tamamını kapladığı gözlenmiştir. Bu ortamda yeşil kallustan şeffaf kallusa kadar ve sık yapılı gevşek yapılı kallusa kadar çok değişik yapıya sahip kalluslara kültürde rastlanmıştır.

Ama bu ortamda gelişen kalluslar, 1:1 oranında NAA ve BAP içeren besin ortamında oluşan kallus dokusuna göre daha gevşek yapıya sahip olduğu saptanmıştır. Kültürün 3-4. haftasında bazı eksplantların kallus dokusundan kök oluşumu meydana gelmiştir.

Farklı oranlarda NAA ve BAP içeren kallus teşvik ortamında kültüre alınan eksplantlardan gelişen kalluslar karşılaştırıldığında en iyi kallus teşvik ortamı olarak 10:1 oranında oksin sitokinin (2,0mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortam belirlenmiştir. Bu ortamdaki kallus dokusunun alt kültürlenme ile çoğaltımı ve rejenerasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.4. MSO besin ortamındaki 12 günlük eksplanlar



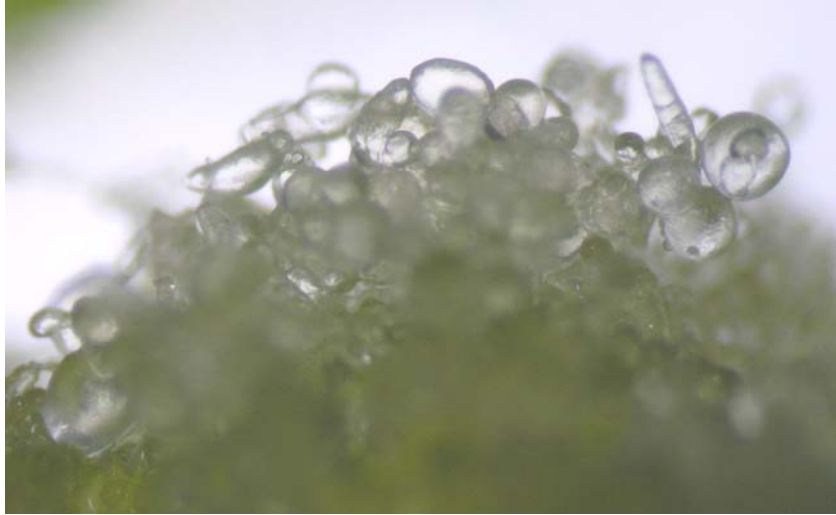
Şekil 4.5. 0,5 mg/L NAA içeren besin ortamında 18 günlük ekplanttan gelişen kallus ve kökler



Şekil 4.6. 1:1 oranında NAA ve BAP içeren ortamda kültüre alınan 18 günlük eksplantlar



Şekil 4.7. 10:1 oranında NAA ve BAP içeren ortamda kültüre alınan 18 günlük eksplantlardan gelişen kallus dokusu





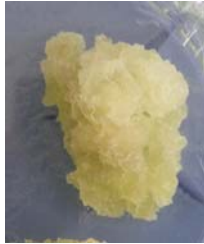
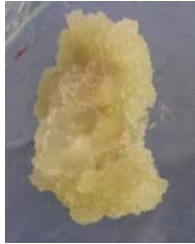
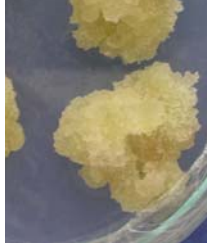
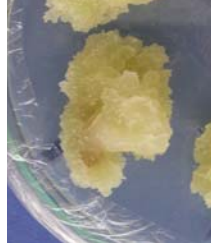


Şekil 4.8. Kallus teşvik ortamlarındaki kallus hücreleri

4.1.2.2. Kallus Dokularının Alt Kültür Sonuçları

Farklı oranda oksin ve sitokinin içeren ortamda oluşturulan kallus dokusundan 10:1 oranında oksin sitokinin (2,0mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda elde edilen kallus dokusu, aynı oranda NAA ve BAP içeren ortamda alt kültürleme yolu ile çoğaltılmıştır. Alt kültürleme süresi dört hafta olarak belirlenmiştir. Bir alt kültür ile çoğaltılan kallus dokusunun rejenerasyon yetenekleri iyi olduğu görülerek ikinci alt kültürleme yapılmamıştır. Alt kültür ile çoğaltılan kallus dokularının bir kısmı rejenerasyon ortamına aktarılırken bir kısmı ise ikinci alt kültür ortamına aktarılmıştır. Alt kültürlemede kallus dokusundaki kütle artışı kültüre konulmadan önceki ve kültür sonrası yaş ağırlıkları CAS Model ME - 410 hassas terazi ile tartılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.1: Alt kültüre alınan kallusların 4 haftalık kültür periyodundaki kütle artışı

Kültür Haftası	Kütle Artışı			
0 hafta				
	1,04 g	0,79g	0,59g	0,55g
4 hafta				
	4,08 g	3,88 g	3,61 g	2,14 g

4.1.2.3. Sürgün Rejenerasyon Ortamları ile İlgili Sonuçlar

4.1.2.3.1. Kallus Dokusundan Sürgün Rejenerasyonu ile İlgili Sonuçlar

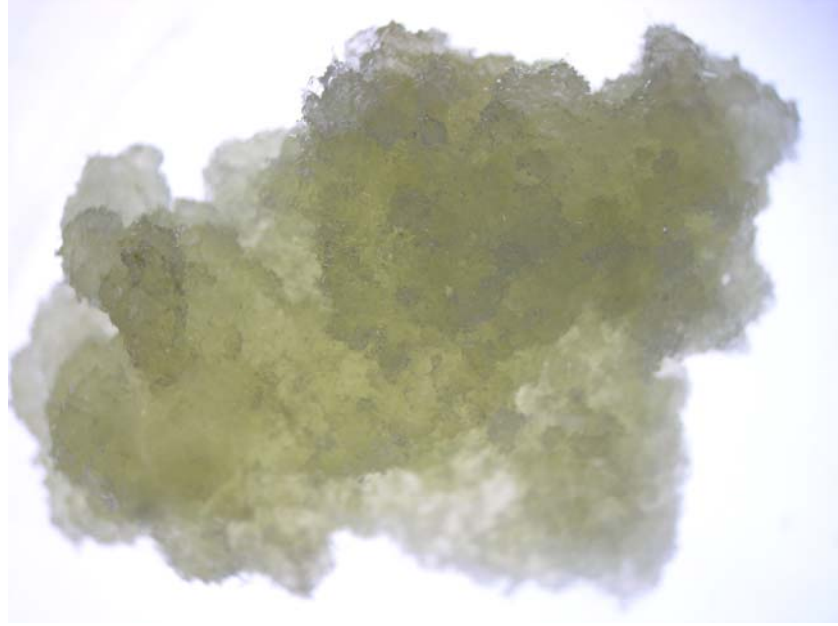
Bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS ortamında (MS0) kültüre alınan yaprak eksplantından oluşan kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu meydana gelmemiştir. Bu ortamda kültüre alınan kalluslar kök ya da sürgüne farklılaşmadan kalmışlardır. Bunu yanı sıra sadece kallus dokusunun kütlesinde artış meydana gelmiştir. Kültür süresinin uzaması kallusların kahverengileşmesine sebep olduğu görülmüştür.

1:10 oranında NAA ve BAP (0,1 mg/L NAA ve 1,0 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Sürgünler kültürün onaltıncı gününde kallus dokusundan yükselmiştir. Bu ortamda oluşan sürgün sayısı kaydedilerek eksplant başına düşen sürgün sayısı 5,2 (21 eksplant- 110 sürgün) olarak hesaplanmıştır.

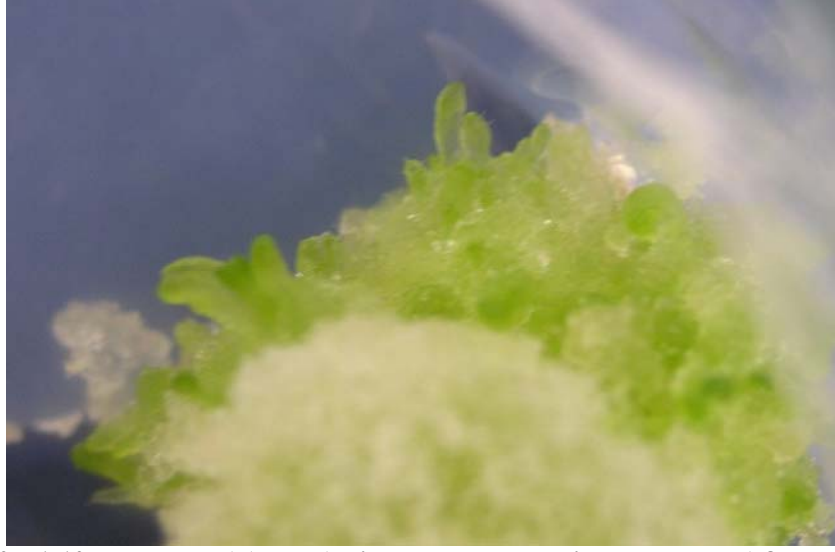
1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) ilave edilmiş MS ortamında kültüre alınan kallus dokusunda sürgün rejenerasyonu meydana gelmiştir. Kültürün 11. gününde meristemoidler gözlenmiştir. Bir aylık kültürde sürgünler oluşmuştur. Eksplant başına düşen sürgün sayısı 2,05 (76 eksplant-156 sürgün) olarak hesaplanmıştır. Meydana gelen sürgünler hormon içermeyen ortama aktarılarak köklenmesi sağlanmıştır. İlk kök kültürün 4. günde görülmüştür. Köklenen bitkilerin saksı toprağına aktarımı alıştırılarak gerçekleştirilmiştir.

Doku kültürü ortamı ile dış ortam arasındaki çevresel koşulların farklı olması sebebiyle bitkiler toprağına alıştırılarak aktarılmıştır. Toprağına alıştırmada, iki farklı yöntem denenmiştir. İlk yöntemde; besin ortamından dikkatlice çıkarılan bitkilerin musluk suyu altında kökleri agardan temizlenmiştir. Daha sonra steril 1:3 oranında perlit: torf içeren saksılara aktarılmıştır. Saksının üzeri üzerine delikler açılmış şeffaf poşetle kaplanmıştır. Bir hafta sonra poşet saksının üzerinden kaldırılmıştır. Diğer yöntemde ise; bitkilerin köklendiğı petrilere etrafındaki streç film katı alınmıştır ve

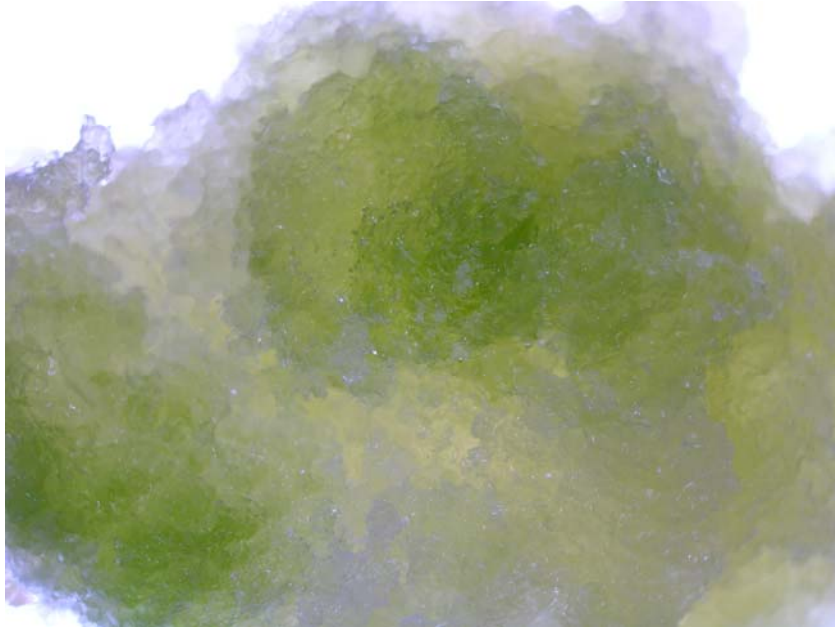
birkaç gün petriyeler bu şekilde bekletilmiştir. Daha sonra bitkilerin musluk suyu altında kökleri agardan temizlenip steril 1:3 oranında perlit: torf içeren saksılara aktarılmıştır. Alıştırmada denenen iki farklı yöntem her ikisinde de başarı sağlanmıştır. Aktarımdan sonra bitkiler izlendiğinde, dış ortama uyum sağladıkları ve sağlıklı bir şekilde büyüdüğü gözlenmiştir.



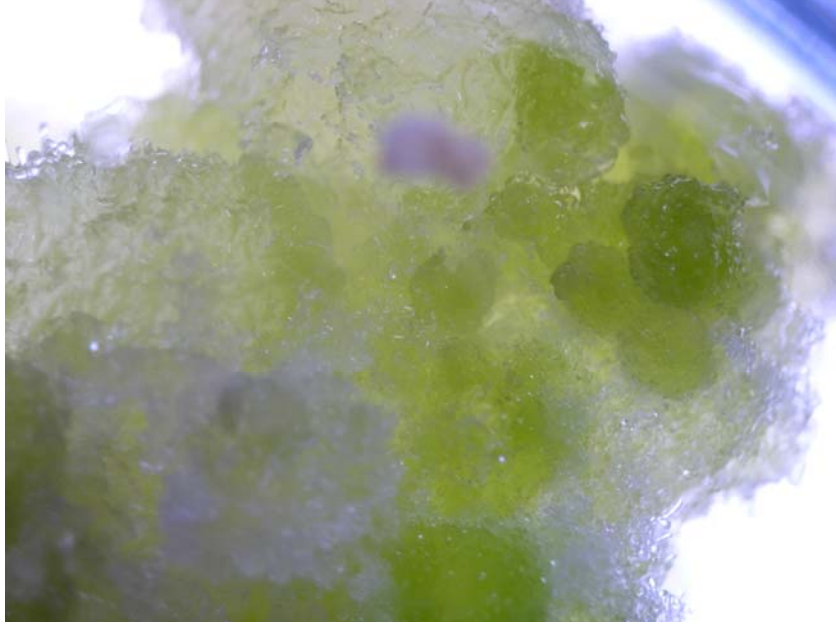
Şekil 4.9. MS0 besin ortamında kültüre alınan kallus dokusu (8x büyütme)



Şekil 4.10. 1:10 oranında NAA ve BAP içeren ortamda gelişen sürgünler (8x büyütme)



Şekil 4.11. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan 11 günlük kallus dokusunda meristemoidler (8x büyütme)



Şekil 4.12. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan kallus dokusundaki meristemoidler (8x büyütme)



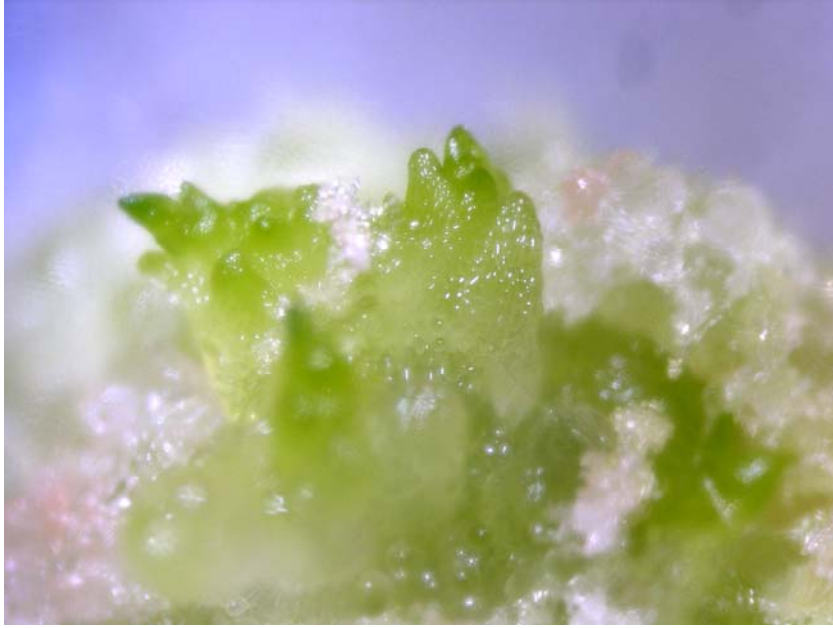
Şekil 4.13. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan 11 günlük kallus dokusunda meristemoidler (40x büyütme)



Şekil 4.14. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusunda meydana gelen meristemoidler (40x büyütmeli)



Şekil 4.15. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusunda meydana gelen sürgün taslakları (40x büyütmeli)



Şekil 4.16. 1:4 oranında NAA ve BAP içeren (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusunda meydana gelen sürgün taslakları (40x büyütme)



Şekil 4.17. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusunda meydana gelen sürgün taslakları (40x büyütme)



Şekil 4.18. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusunda meydana gelen torpido aşamasındaki embrioidler (40x büyütme)



Şekil 4.19. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusunda kültürün 4. haftasında kotiledon oluşumu (40x büyütme)



Şekil 4.20. 1:4 oranında NAA ve BAP içeren (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusundan meydana gelen sürgün



Şekil 4.21. 1:4 oranında NAA ve BAP içeren (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusundan meydana gelen sürgünler



Şekil 4.22. 1:4 oranında NAA ve BAP içeren (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kalluslarda meydana gelen sürgünlerin MS0 besin ortamında köklendirilmesi



Şekil 4.23. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusundan meydana gelen sürgünlerin MS0 besin ortamında köklendirilmesi



Şekil 4.24. 1:4 oranında NAA ve BAP(0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusundan rejenerasyonu sağlanan ve toprağa aktarılan bitki

4.1.2.3.2. Gövde Eksplantından Sürgün Rejenerasyonu İle İlgili Sonuçlar

Gövdeden alınan 0,5 cm boyutunda kesilen eksplantlar sürgün 2mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP içeren ortamda kültüre alınmışlardır. Kültüre alınmalarından bir hafta sonra kesik bölgelerinde kallus oluşumu gözlenmiştir. İki hafta sonra ilk sürgünler eksplantın kesik bölgelerinde bir sırada meydana gelmiştir. Kültür boyunca sürgünler sayısında artış gözlenmiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısı ortamda bulunan hipokotillerde 64 eksplanttan 448 sürgün oluşumu gözlenmiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısı 7 olarak hesaplanmıştır.

Oluşan sürgünler bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS ortamına (MS0) aktarılarak köklenmeleri sağlanmıştır. Alt kültürlemeler sonucunda köklenen ve büyüyen bitkilerin; alıştırılarak saksı toprağına aktarımı yapılmıştır. Alıştırmada kallus dokusundan oluşan sürgünlerin aktarmında denenen alıştırma yöntemleri kullanılmıştır. Toprağı aktarımdan sonra bitkilerin sağlıklı bir şekilde büyüdüğü ve dış ortama uyum sağladıkları görülmüştür.



Şekil 4.25. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarının kültürün 12. günündeki durumu (8x büyütme)



Şekil 4.26. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarının kültürden 14 gün sonraki durumları



Şekil 4.27. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarından gelişen sürgün taslağı (40x büyütme)



Şekil 4.28. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarından gelişen 18 günlük kültürde rastlanan sürgün taslağı (40x büyütme)



Şekil 4.29. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan 18 günlük gövde eksplantlarından oluşan sürgünler (8x büyütme)



Şekil 4.30. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA , 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan 31 günlük gövde eksplantlarından oluşan yapraksı sürgünler (8x büyütme)



Şekil 4.31. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA , 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarından gelişen sürgünlerin MS0 besin ortamında köklendirilmesi



Şekil 4.32. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA , 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarından gelişen ve toprağa aktarımı yapılan bitkiler



Şekil 4.33. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarından gelişen ve toprağa aktarılan bitkiler

4.2. Tartışma

Çalışmamızda *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun bitkisinin *in vitro* rejenerasyon sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda *Nicotiana tabacum* bitkisinde elde edilen eksplantlar farklı oranlarda oksin ve sitokinin içeren ortamda kallus teşviki için kültüre alınmıştır. Bu ortamlarda meydana gelen kallus dokuları karşılaştırılarak kallus teşviki için en uygun bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortam belirlenmiştir.

Belirlenen bu en uygun kallus teşvik ortamında oluşan kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Oluşturulan sürgünler bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen ortamda köklendirilerek tam bitki elde edilmesine gidilmiştir. Rejenere edilen bitkilerin toprağa transplantasyonu yapılmıştır.

Gövdeden alınan eksplantlarından, seçilen sürgün teşvik ortamında sürgün oluşumu sağlanmıştır. Oluşturulan sürgünler köklendirilerek tam bitki elde edilmesine gidilmiştir. Rejenere edilen bitkilerin toprağa transplantasyonu yapılmıştır. Her iki eksplanttan rejenerasyon sonucu elde edilen bütün bitkilerin dış ortama uyum sağladıkları ve sağlıklı bir şekilde büyüdükleri görülmüştür.

Bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen ortamda kültüre alınan eksplantlarda hiçbir organ gelişimi gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, Martin-Tanguy ve diğ., (1988) tarafından yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada; bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmemiş ortamda kültüre alınan eksplant değişmeden kalmış, sınırlı ya da hiç bölünme görünmediği kaydedilmiştir. Tütün yaprak eksplantlarında sürgün ya da kök *de novo* doğrudan oluşumu, ortamdaki fitohormonlara bağlı olduğu bir çok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Attfield ve Evans, 1991a; b; Dhaliwal ve diğ., 2003). Bitki büyüme düzenleyicileri kullanılan bitkisel materyallerden ve buradan elde edilen kalluslardan morfojenetik değişiklikler meydana getirebilme yeteneğine sahiptir (Akı, 1997).

Adventif organlardan ya da somatik embriyolardan rejenerasyon; seçilen bitkinin türüne olduğu kadar endojen ve ekzojen seçilen bitki eksplantı, kültürün çevresel koşulları, besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri gibi birçok faktöre bağlı olduğu ve bu faktörler arasında başlıca role sahip olan bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları ve kombinasyonlarının bitki rejenerasyonunu yönettiği birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Molnár ve Ördög, 2005).

Özellikle oksin/sitokin oranı *in vitro* morfogenez işlemlerde rejenerasyonu sağlayan en önemli faktör olarak görülmektedir (Christianson ve Warnick, 1983). Yüksek oksin/sitokin oranı genellikle kök oluşumunu teşvik ederken, düşük oksin/sitokin oranı ise sürgün oluşumunu teşvik etmektedir. Diğer taraftan eşit oksin/sitokin oranı organize olmamış hücrelerel çoğalmaya ve kallus oluşumuna sebep olmaktadır (Yamaguchi ve diğ., 2003).

0,5 mg/L NAA içeren besin ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında, kesik bölgeleri ile sınırlı kallus oluşumu ve üst yüzeyinde kök oluşumu gözlenmiştir. Bu ortamda kültüre alınan eksplantta, sürgün oluşumu meydana gelmemiştir. Bu sonuçlar kök oluşumu için oksinin tek başına yeterli olduğunu, ancak sürgün oluşumu için ekzojen olarak ilave edilen sitokinin ihtiyacı duyulduğunu göstermektedir. Christianson ve Warnick (1985); köklerin kallusun üst kısmından yükselmesine rağmen sürgünlerin ortamla temas eden hücrelerden yükseldiğini belirtmiştir. Araştırmamızda belirttiği gibi çalışmamızda kökler eksplantın üst kısmından yükselmiştir.

Çalışmamızda ayrıca gövde ve yaprak eksplantları aynı oranda 10:1 oranında NAA ve BAP içeren ortamda kültüre alınmıştır. Yaprak eksplantları 10:1 oranında NAA ve BAP içeren ortamda kültürün başlangıcında kallus oluşumu ve kültürün 3-4. haftasında kök oluşumu görülmüştür. Gövde eksplantlarında ise, kallus dokusunun yanı sıra sürgün oluşumu meydana gelmiştir. Aynı oranda oksin sitokin içeren ortamda kültüre alınan her iki eksplantta aynı organ gelişiminin gözlenmesi gerekirdi. Bunun sebebi; organogenesisin başlaması için ekzojen bitki büyüme düzenleyicilerinin miktarlarının yanı sıra bitkinin endojen hormon

seviyesinin de etkili olması ile açıklanabilir (Thorpe, 1980). Örneğin, Walker 1978 yüksek miktarda 2,4-D 'nin düşük miktarda kinetinin yonca kalluslarında sürgün oluşumunu sağladığı, bunun tersi durumda ise kök oluşumunun gerçekleşmediği gözlenmiştir. (Babaoğlu ve diğ., 2002).

Bunun yanı sıra, kallus indüksiyon ortamı olarak kullanılan 1:1 oranında NAA ve BAP içeren ortamın, 10:1 oranında NAA ve BAP içeren ortama göre en iyi kallus gelişiminin görüldüğü ortam olması beklenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin ortama ilave edilen miktarlarının yüksek olmasının bu ortamda kallus teşvikini etkilediği düşünülmektedir. 1:1 oranında oksin ve sitokinin içeren besin ortamında kallus oluşumunun meydana geldiği birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. Çalışmamız, yapılan bu çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Bunun yanı sıra ortama ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin miktarları da çok önemlidir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarının yüksek olması, bu ortamda oluşan kallus dokusunun sert ve az miktarda olmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

10:1 oranında oksin ve sitokinin içeren besin ortamının kallus oluşum ortamı olarak seçildiği çalışmamıza benzer bir çalışmada, sürgün oluşturan ve sürgün oluşturmeyen ortamda sükröz metabolizmasının değişimini araştırılmıştır. Materyal olarak kullanılan *Nicotiana tabacum* var. Wisconsin 38. yumuşak gövdesi modifiye edilmiş MS tuzları ve 3,0 mg/L NAA ve 0,3 mg/L 2-İP içeren Linsmaier ve Skoog (1965) ortamında kültüre alınmıştır. Bu ortamda kallus oluşumu meydana gelmiş ve bu ortam sürgün oluşturmeyen ortam olarak belirlenmiştir. Kallus üç haftada bir alt kültüre alınarak farklılaşmamış olarak üç yıl çoğaltılmıştır. Sürgün oluşumu için 1,0 mg/L 2İP içeren ve sürgün oluşum ortamı olarak belirlenen ortam kullanılmıştır. Üç haftada santimetre küpte 50 sürgün taslağı rapor edilmiştir (Grady ve Bassham, 1982).

Çalışmamızda kallustan sürgün rejenerasyonu, 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) içeren ortamda meydana gelmiştir. *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun (TCL) eksplant kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada 1:4

oranında oksin ve sitokinin (0,5 mg/L α -naftalen asetik asit (NAA) ve 2 mg/L benziladenin (BA) içeren ortam en uygun sürgün rejenerasyon ortamı olarak belirlenmiştir (Teixeira da Silva, 2005). Çalışmamız bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmamız ile benzerlik gösteren diğer bir çalışmada; *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun ile ilgili olarak yapılan bir diğer çalışmada, TCL yüksek (2-10 μ M) kinetin ve değişen konsantrasyonlarında IBA vejetatif sürgün oluşumunu gözlenmiştir(Mohnen ve diğ., 1990).

2003 yılında yapılan bir çalışmada, sürgün oluşumu gözle görülür biçimde üç morfogjenik safha ile karakterize edilmiştir. Birinci safha; ön meristem oluşumlarının gerçekleştiği 0-10 gün periyodundaki dönemdir. Bu safhada eksplantların çapları genişlemesi ve sitokinin sebebiyle morfogjenik ilk belirti olan eksplantın kesik bölgelerinin çevresinde kallus oluşumu meydana gelmektedir. İkinci safha ise 10-20. gün periyodunda sürgün meristemine başlaması ve meristemoid adı verilen meristem hücrelerinin oluşturduğu ayrı yığınların eksplantın çevresinin etrafında kallus biyokütlesinin içinde görüldüğü safhadır. Son safha ise 20-35 günde ise teşvik edilmiş meristemin yapraksı sürgüne doğru büyüme ve farklılaşması gerçekleştiği safha olarak tanımlanmıştır (Ramage ve Williams, 2003). Çalışmamızda yaprak ve gövde eksplantlarından direkt ve indirekt sürgün organogenesinin gerçekleşme süreci günlük olarak gözlemlendiğinde, bu çalışmada belirtilen morfogjenik olayların aynı zaman ve safhada gerçekleştiği görülmüştür.

0,1 mg/L NAA ve 1,0 mg/L BAP, 30 g/L sakkoroz içeren MS besin ortamı, *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yapılan tütün yaprak disklerinden sürgün rejenerasyonunun gerçekleştirilmesinde ve transgenik tütün bitkilerinin elde edilmesinde yaygın kullanılan bir besin ortamıdır (Horsch ve diğ., 1988). Çalışmamızda bu ortam kontrol grubu olarak kullanılmış ve seçilen sürgün rejenerasyon ortamı ile karşılaştırılmıştır. 0,1 mg/L NAA ve 1,0 mg/L BAP içeren MS besin ortamı ile karşılaştırıldığında; kontrol grubunda eksplant başına düşen sürgün sayısı 5,02 iken, 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L

BAP) içeren ortamda eksplant başına düşen sürgün sayısı 2,05 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar; 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L BAP) içeren besin ortamının, tütün yaprak eksplantları için sürgün rejenerasyon ortamı olarak kullanılabilirliğini göstermektedir.

Bunu yanı sıra direkt organogenesisin meydana geldiği gövde eksplantlarında eksplant başına düşen sürgün sayısı 7 olarak hesaplanmıştır. Indirekt organogenesisin gerçekleştirildiği yaprak eksplantları ile bu sonuç karşılaştırıldığında 2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP içeren ortamın ise, tütün gövde eksplantları için sürgün rejenerasyon ortamı olarak kullanılabilirliğini göstermektedir.

Farklılaşmış ve farklılaşmamış dokulardaki rejenerasyon işlemi, genetik mühendisliği ve bitkilerin klonal çoğaltımı için bir araç olarak uygulanma potansiyeli ile dikkati çekmektedir. Doku kültürlerinin bitkileri iyileştirmede en önemli ve yaygın olarak kullanılan uygulamalarından birisi gen transferidir (Babaoğlu ve diğ., 2002). Farklı gen transfer protokollerinin farklı bitki türlerinde uygulanabilir olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Potrykus, 1995). Gen transferi çalışmalarında transformasyon sıklığını sınırlayan faktörlerden biri, hedef bitki materyali için rejenerasyon protokollerinin güvenilirliğidir. Bu yüzden transformasyon çalışmalarında, bitki rejenerasyonu için kültür koşullarının; çalışılan bitki türüne ve eksplant çeşidine göre optimize edilmesi gerekmektedir (Öktem, 1999).

Bu çalışma ile üretilen tütün kallus dokusunun alt kültürlemeler yolu ile çoğaltımı ile seri kallus üretimi, hücre ve protoplast süspanسیون kültürleri, transformasyon sistemleri, endüstriyel bitkilerin klonal çoğaltımı, tıbbi bitkilerden sekonder metabolitlerin üretilmesi ve biyoreaktör/fermentör sistemlerinin kurulması gibi çalışmaların temelini oluşturulması düşünülmektedir. Bu çalışmaların yanı sıra, optimize edilmiş rejenerasyon sistemi kurulmuş tütün kallus dokularının, ileride yapılacak gen akarım çalışmalarına eksplant kaynağı olarak kullanılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Akçam-Oluk, E. ve Yürekli K. A. 1995. Efficacy of Different Nutrient Media and Explant Sources on Callus Induction of *Cantharanthus roseus* (L.) G. Don Plants. *Tr. J. of Botany*. 19: 569-572.
- Akçam, E. ve Yürekli, K. A. 2001. Regeneration Through Callus Cultures of *Cantharanthus roseus* (L.) G. Don. *Pak. J. Pl. Sci.* 7(1-2): 67-73.
- Akı, C. 1997. *Capsicum annuum*'un Çeşitli Varyeteleri Üzerinde Doku Kültürü Çalışmaları (Doktora Tezi). Ege Üniversitesi , İzmir.
- Akı, C. 2005. Effect of Plant Growth Regulators on Osmotically Stressed Callus Cultures of Some *Capsicum annuum* var. *grossum* L. Cultivars. *Journal of Biological Science*. 5(3):257-259.
- Altamura, M. M. Monacelli, B. ve Pasqua, G. 1989. The Effect of Photoperiod on Flower Formation *in vitro* in a Quantitative Short-Day Cultivar of *Nicotiana tabacum*. *Physiol. Plant.*, 76 : 233-239.
- Arai, M. Saito, T. Kaneko, Y. ve Matsushima, H. 1997. Cellular Origin and Ultrastructural Changes of Regenerating Shoots From Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Internodes Cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 99: 523-528.
- Arda, M. 1995. Biyoteknoloji. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, 3, Ankara.
- Attfield, E. M. ve Evans P.K. 1991. Developmental Pattern of Root and Shoot Organogenesis in Cultured Leaf Explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. *Journal of Experimental Botany*, 42(1): 51-57.
- Attfield, E. M. ve Evans, P. K. 1991. Stages in The Initiation of Root and Shoot Organogenesis in Cultured Leaf Explants of *Nicotiana tabacum*. cv. Xanthi nc. *J. Exp. Bot.*, 42:59-63.
- Babaoğlu, M. Yorgancılar, M. ve Akbulak, A. M. 2002. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Cilt 1.
- Barciszewski, J. Massino, F. ve Clark, B. F.C. 2007. Kinetin—A multiactive molecule. *International Journal of Biological Macromolecules*. 40:182-192.
- Bornman, C.H. 1974. Cytodifferentiation in Tissue Culture. In: H.E. Street (Ed.), *Tissue Culture and Plant Science*. Academic Press, London, 43-70.
- Christianson, M. L. ve Warnick D. A. 1985. Temporal Requirement for Phytohormone Balance in The Control of Organogenesis *in vitro*. *Dev. Biol.*, 112 (2) : 494-497.

- Christianson, M. L. ve Warnick, D. A. 1983. Competence and Determination in The Process of *in vitro* Shoot Organogenesis. *Dev. Biol.*, 95 (2): 288–293.
- Cousson, A. ve Tran Thanh Van, K. 1981. In vitro Control of *de novo* Flower Differentiation From Tobacco Thin Cell Layers Cultured on a Liquid Medium, *Plant Physiol.*, 51: 77-84.
- Creemers- Molenaar, J. Hakkert, J. C. Van Staveren, M. J. ve Gilissen, L. J. W. 1994. Histology of The Morphogenetic Response in Thin Cell Layer Explants From Vegetative Tobacco Plants. *Ann. Bot.*, 73: 547- 555.
- D’Onofrio, C. ve Morini, S. 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: 194-199.
- Dhaliwal, H. S. Ramesar-Fortner, N. S. Yeung, E. C. ve Thorpe, T. A. 2003. Competence, Determination, and Meristemoid Plasticity in Tobacco Organogenesis In Vitro. *Can. J. Bot.*, 81: 611–621.
- Elleuch, H. Belbahri, L. Boetti, H. David, H. Thomasset, B. ve David, A. 2001. Rice salt Promoter is Activated in *Papaver somniferum* and *Nicotiana tabacum* Transgenic Cells in the Absence of Exogenous ABA. *Enzyme Microb. Technol.* 28: 106–113.
- Gaspar, T. Kevers, C. Faivre-Rampant, O. Cre’vecoeur, M. Penel, C. Greppin, H. ve Dommes, J. 2003. Changing Concepts in Plant Hormone Action. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 39: 85–106.
- Gaspar, T. Kevers, C. Penel, C. Greppin, H. Reid, D. M. ve Thorpe, T. A. 1996. Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 32: 272–289.
- Gautheret, R. J. 1966. Factors Affecting Differentiation of Plant Tissues Grown In Vitro. In: W. Beermann (Ed), Cell Differentiation and Morphogenesis. North-Holland, Amsterdam, 55-95.
- George, E. F. Puutock, D. J. M. ve George, H. J. 1987. Tissue Culture Media. *Formulation and Uses*, 1: 12-211.
- Grady, K. L. ve Bassham A. J. 1982. 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Concentrations in Shoot-Forming and Non-Shoot-Forming Tobacco Callus Cultures. *Plant Physiol.*, 70: 919-921.

- Haberlandt, G. 1902. Culturversuche Mit Isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. *Mat. Naturwiss, KI, Kais. Akad. Wiss. Wien*, 111:69-92
- Harbinder, S. Dhaliwal, S. Edward, C. Y. ve Trevor A.T. 2004. TIBA Inhibition of in vitro Organogenesis in Excised Tobacco Leaf Explants, *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant.*, 40: 235–238.
- Horsch, R.B. Fry, J. Hoffmann, N. Neidermeyer, J. Rogers S. G. ve Fraley, R. T. 1988. Leaf Disc Transformation. *Plant Molecular Biology Manual*, A5:1-9.
- Huxter, T.J. Thorpe T.A. ve Reid, D.M. 1981. Soot Initiation in Light and Dark-Grown Tobacco Callus: The Role of Ethylene. *Physiol Plant.*, 53:319-326.
- Iida, A. Seki, M. Kamada, M. Yamada, Y. ve Morikawa, H. 1990. Gene Delivery into Cultured Plant Cells by DNA-coated Gold Particles Accelerated by a Pneumatic Gun. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 813–816.
- Khanam, N. Khoo, C ve Khan, A. G. 2000. Effects of Cytokinin/Auxin Combination on Organogenesis Shoot Regeneration and Tropane Alkaloid Production in *Duboisia myoporoides*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 62: 125–133.
- Lederman, R.G. V. ve Floh, E. I. S. 1993. Cyto Histological Gradients in Callus Tissue of *Nicotiana tabacum*. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 5 (1) : 13-16.
- Linsmaier, E. M. ve Skoog, F. 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 18: 100-127.
- Maeda, E. ve Thorpe, T.A. 1979. Shoot Histogenesis in Tobacco Callus Cultures. *In Vitro*, 15: 415-424.
- Mandel, M. A. Bowman, J. L. Kempin, S. A. Ma, H. Meyerowitz, E. M. ve Yanofsky, M. F. 1992. Manipulation of Flower Structure in Transgenic Tobacco. *Cell*, 71: 133–143.
- Martin-Tanguy, J. Martin, C. Paynot, M. ve Rossin, N. 1988. Effect of Hormone Treatment on Growth Bud Formation and Free Amine and Hydroxycinnamoyl Putrescine Levels in Leaf Eksplant of *Nicotiana tabacum* Cultivated *in vitro*. *Plant Physiol.*, 88: 600-604.
- Mizukami, Y. ve Fischer, R.L. 2000. Plant Organ Size Control: AINTEGUMENTA Regulates Growth and Cell Numbers During Organogenesis. *Plant Biol.*, 97:942-947.

- Mohnen, D. Eberhard, S. Marfa, V. Doubrava, N. Toubart, P. Gollin, D.J. Gruber, A.T. Nui, W. Albersheim, P. ve Darvill, A. 1990. The Control of Root, Vegetative Shoot and Flower Morphogenesis in Tobacco Thin Cell-Layer Explants (TCLs). *Development*, 108: 191-201.
- Molnár, Z. ve Ördög, V. 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.
- Monacelli, B. Pasqua, G. Altamura, M. M. ve Mazzolani, G. 1983. In vitro Neof ormation of Floral and Vegetative Buds in *Nicotiana tabacum* L., *Ann. Bot.*, (Rome), 41: 157-163.
- Monacelli, B. Pasqua, G. Capitani, F. Archilletti, T. Calzecchi-Onesti, B. ve Altamura, M.M. 1992. Histological Analysis of Flower and Vegetative Bud Formation in Tobacco Thin Cell Layers Cultured Under Different Hormonal Treatments. *Cytobios*, 71: 93-103.
- Murashige, T. 1965. Effects of Stem Elongation Retardants and Gibberellin on Callus Growth and Organ Formation in Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant.*, 18: 665–673.
- Murashige, T. ve Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Öktem, H. A. Bülbül, Y. Öktem, E. ve Yücel, M. 1999. Regeneration and Agrobacterium-mediated Transformation Studies in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Tr. J. of Botany*, 23: 345-348.
- Palavan-Ünsal, N. 1993. Bitki Büyüme Maddeleri, Ist., Üniv., Enst., Yayın No:4, 357 s.
- Pasqua, G. Manes, B. Monacelli, L. Natale, S. ve Anselmi, S. 2002. Effects of The Culture Medium pH and Ion Uptake in *in vitro* Vegetative Organogenesis in Thin Cell Layers of Tobacco. *Plant Sci.*, 162: 947-955.
- Potrykus I. ve Spangenberg G. (eds.). 1995. Gene transfer to plants. *Springer Publications, The Netherlands*.
- Ramage, C. M. ve Williams, R. R. 2003. Mineral Uptake in Tobacco Leaf Disc During Different Developmental Stages of Shoot Organogenesis. *Plant Cell Rep.*, 21: 1047–1053.

- Ross, M. K. ve Thorpe, T A. 1973. Physiological Gradients and Shoot Initiation in Tobacco Callus. *Plant Cell Physiol.*, 14: 473-480.
- Ross, M. K. ve Thorpe, T A. ve Costerton, J. W. 1973. Ultrastructural Aspects of Shoot Initiation in Tobacco Callus. *Plant Cell Physiol.*, 14: 10-16.
- Šauliēne, I. ve Raklevičiēne, D. 2002. The Influence of Cytokinin on Morphogenetic Competence in non- or Blooming *Nicotiana* Thin Layer and Leaf Tissue Cultures. *Biologija*, 1 : 87–90.
- Sauliēne, I. ve Rakleviciēne, D. 2004. The Effect of Photoperiod and Growth Regulators on Organogenesis in Thin-Layer Tissues. *Acta Universitatis Latviensis*, 676: 219-222.
- Scaramagli, S. Biondi, S. ve Torrigiani, P. 1999. Methylglyoxal (bis-guanylhydrazone) Inhibition of Organogenesis Is Not Due to S-adenosylmethionine Decarboxylase Inhibition /Polyamine Depletion in Tobacco Thin Cell Layers. *Plant Physiol.*, 1007: 353-360.
- Skoog, F. ve Miller, C. O. 1957. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol.*, 11: 118-131.
- Taiz, L. ve Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology, 3rd edn. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.*
- Takebe, I. Labib, G. ve Melchers, G. 1971. Regeneration of Whole Plants From Isolated Mesophyll Protoplast of Tobacco. *Naturwissen*, 58: 318-329.
- Teixeira da Silva J.A. 2003. Thin Cell Layer Technology in Ornamental Plant Micropropagation and Biotechnology. *African Journal Biotechnology*, 2 (12) : 683-691.
- Teixeira da Silva J.A. 2005. Simple Multiflication and Effective Genetic Transformation of *in vitro*-Grown Tobacco by Stem Thin Cell Layer. *Plant Science*, 169: 1046-1058.
- Thorpe, T. A. 1978. Physiological and Biochemical Aspects of Organogenesis *in vitro*. *In: International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. 4th ed., pp.49-58. International Assciation for Plant Tissue Culture. Univercity of Calgary.*
- Thorpe, T. A. 1980. Organogenesis *in vitro*: Structural, Physiological, and Biochemical Aspects. *In: Vasil, I. K., ed. Perspectives in plant cell and tissue culture. Int. Rev. Cytol., Suppl. 11A, New York: Academic Press; 71–105.*

- Thorpe, T. A. 1982. Physiological and Biochemical Aspects of Organogenesis *in vitro*. In *Proc. 5th Inttl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, pp. 121-124
- Thorpe, T. A. ve Biondi, S. 1981. Regulation of Plant Organogenesis. *Adv. Cell Cult.*, 1: 213-239.
- Thorpe, T.A. ve Murashige, T. 1970. Some Histochemical Changes Underlying Shoot Initiation in Tobacco Callus Cultures. *Can. J. Bot.*, 48: 277- 285.
- Toldi, O. Ahanen, K. Kova' cs, G. Sorvari, S. To' th, S. Dulai, S. ve Scott. P., 2005. Integrated Application of Physiological and Molecular Methods to Forecast Determinative Morphogenetic Events in Tissue Cultured Tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Samsun) Leaf Discs. *Plant Growth Regulation*, 47: 59–64.
- Torrigiani, P. Altamura, M. M. Pasqua, G. Monacelli, B. Serafini-Fracassini, D. ve Bagni, N. 1987. Free and Conjugated Polyamines During *de novo* Floral and Vegetative Bud Formation in Thin Cell Layers of Tobacco. *Physiol. Plant.*, 70: 453-460.
- Torrigiani, P. Scaramagli, S. Castiglione, S. Almaturo, M. M. ve Biondi, S. 2003. Down Regulation of Ethylene Production and Biosynthetic Gene Expression Is Associated to Changes in Putrescine Metabolism in Shoot-Forming Tobacco Thin Cell Layers. *Plant Sci.* 164: 1087-1094.
- Tran Thanh Van K. 1973. Direct Flower Neoformation From Superficial Tissue of Small Explants of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 115 : 87–92.
- Tran Thanh Van, K. 1981. Control of Morphogenesis in *in vitro* Cultures. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 32: 291-311.
- Tran Thanh Van, K. Dien, N.T. ve Chlyah, A. 1974. Regulation of Organogenesis in Small Explants of Superficial Tissue of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 119: 149-159.
- Trigiano R.N. ve Gray, D. J. 1996. Plant Tissue Culture Concept and Laboratory Exercises. CRS Pres. Boca Raton, Florida.
- Van den Ende, G. Croes, A. F. Kemp, A. ve Barendse, G. W. M. 1984. Development of Flower Buds in Thin Layer Cultures of Floral Stalk Tissue from Tobacco: Role of Hormones in Different Stages. *Physiol. Plant*, 61: 114-/118.
- Van Der Beek, J. G. ve Ltifi, A. 1991. Evidence For Salt Tolerance In Pepper Varieties In Tunisia, *Euphytica*, 57(1):51-56.

- Vasıl, I. K. ve Hildebrant A. C. 1966. Variation of Morphogenetic Behaviour in Plant Tissue Cultures. I. *Cichorium endiva*. *Am.J.Bot.*, 53: 86-869.
- Villalobos, V. M. Yeung E. C. ve Thorpe T.A. 1985. Origin of Adventitious Shoots in Excised Radiata Pine Cotyledons Cultured *in vitro*. *Can. J. Bot.*, 63: 2172-2176.
- Walker, K.A. Yu, P.C. Sato, S.J.ve Jawarski, E. G. 1978. The Hormonal Control of Organ Formation in callus of *Medicago sativa* L.Cultured *in vitro*. *Am. J.Bot.*, 65: 654-659.
- Weyers, J. ve Paterson, N.W. 2001. Plant Hormones and The Control of Physiological Processes. *New Phytol.*, 152: 375-389.
- White, P.R. 1939. Controlled Differentiation in a Plant Tissue Culture. *Bull Torrey Bot Clut.*, 66: 507- 513.
- Yamaguchi, M. Kato, H. Yoshida, S. Yamamura, S. Uchimiya, H. ve Umeda, M. 2003. Control of *in vitro* Organogenesis by Cyclin-Dependent Kinase Activities in Plants. *PNAS* 100 (13) :8019–8023.
- Yamakawa, T. Kurahashi, O. Ishida, K. Kato, S. Kodama, T. ve Minoda, Y. 1979. Stability of Indole-3-aceticacid to Autoclaving, Aeration and Light Illumination. *Agric. Biol. Chem.*, 43: 879-880.

TABLÖLAR

Tablo 1.1. Besin Ortamına İlave Edilen Makro Elementler	3
Tablo 1.2. Besin Ortamına İlave Edilen Mikro Elementler.....	3
Tablo 3.1. Murashige Skoog Besin Ortamının Bileşenleri	27
Tablo 3.2. Kullanılan Kallus Teşvik Ortamları	29
Tablo 3.3. Kallustan Sürgün Rejenerasyon Ortamları	30
Tablo 4.1. Alt Kültüre Alınan Kallusların 4 haftalık Kültür Periyodundaki Kütle Artışı.....	37

ŞEKİLLER

Şekil 4.3. Bitki yetiştirme kabininde yetiştirilen yedi haftalık <i>Nicotiana tabacum</i> bitkileri.....	31
Şekil 4.4. MS0 besin ortamında yetiştirilen 6 haftalık <i>Nicotiana tabacum</i> fideleri.....	32
Şekil 4.3. MS besin ortamında yetiştirilen 19 haftalık <i>Nicotiana tabacum</i> fideleri...32	
Şekil 4.4. MSO ortamındaki 12 günlük eksplanlar.....	34
Şekil 4.5. 0,5 mg/L NAA içeren ortamda 18 günlük ekplanttan gelişen kallus ve kökler.....	35
Şekil 4.6. 1:1 oranında NAA ve BAP içeren ortamda kültüre alınan 18 günlük eksplantlar.....	35
Şekil 4.7. 10:1 oranında NAA ve BAP içeren ortamda kültüre alınan 18 günlük eksplantlardan gelişen kallus dokusu.....	36
Şekil 4.8. Kallus teşvik ortamında rastlanan kallus dokusunda yer alan hücreler.....	36
Şekil 4.9. MSO besin ortamında kültüre alınan kallus dokusu	39
Şekil 4.10. 1:10 oranında NAA ve BAP içeren ortamda gelişen sürgünler.....	39
Şekil 4.11. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) içeren ortamda kültüre alınan 11 günlük kallus dokusunda meristemoidler	40
Şekil 4.12. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) içeren ortamda kültüre alınan kallus dokusunda meristemoid hücreler	40
Şekil 4.13. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) içeren ortamda kültüre alınan 11 günlük kallus dokusunda meristemoidler.....	41
Şekil 4.14. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusunda meydana gelen meristemoidler.....	41
Şekil 4.15. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusunda meydana gelen sürgün taslakları	42
Şekil 4.16. 1:4 oranında NAA ve BAP içeren (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusunda meydana gelen	

sürgün taslakları.....	42
Şekil 4.17. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusunda meydana gelen sürgün taslakları.....	43
Şekil 4.18. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusunda meydana gelen torpido aşamasındaki embriyoid.....	43
Şekil 4.19. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) içeren sürgün ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusundan bir aylık kültürde kotiledon oluşumu	44
Şekil 4.20. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusundan meydana gelen sürgünler.....	44
Şekil 4.21. 1:4 oranında NAA ve BAP içeren (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) besin ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kalluslarda meydana gelen sürgünlerin MS0 ortamında köklendirilmesi.....	45
Şekil 4.22. 1:4 oranında NAA ve BAP (0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) içeren MS0 ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusundan meydana gelen sürgünlerin besin ortamında köklendirilmesi.....	45
Şekil 4.23. 1:4 oranında NAA ve BAP(0,5 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP) içeren ortamda kültüre alınan yaprak orjinli kallus dokusundan rejenerasyonu sağlanan ve toprağa aktarılan bitki	46
Şekil 4.24. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarının kültürün 12. günündeki durumu.....	47
Şekil 4.25. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarının kültürden 14 gün sonraki durumları.....	47
Şekil 4.26. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarından 18 gün sonra gelişen sürgün taslağı.....	48
Şekil 4.27. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren	

ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarından gelişen 18 günlük kültürde rastalanan sürgün taslağı.....	48
Şekil 4.28. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan 18 günlük gövde eksplantlarından oluşan sürgünler	49
Şekil 4.29. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA , 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan 31 günlük gövde eksplantlarından oluşan yapraksı sürgünler.....	49
Şekil 4.30. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA , 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarından gelişen sürgünlerin MS0 besin ortamında köklendirilmesi	50
Şekil 4.31. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA , 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarından gelişen ve toprağa aktarımı yapılan bitkiler.....	50
Şekil 4.32. 10:1 oranında NAA ve BAP (2,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP) içeren ortamda kültüre alınan gövde eksplantlarından gelişen ve toprağa aktarılan bitkiler.....	51

YAŞAM ÖYKÜSÜ

1980 yılında İzmir 'de doğdu. İlkokulu İzmir Karşıyaka Şair Eşref İlkokulu'nda, ortaokulu İzmir Karşıyaka Behçet Uz Lisesi'nde tamamlamıştır. Lise eğitimini İzmir Karşıyaka Anadolu Meslek Lisesinde tamamlamıştır. Lisans eğitimine 2000 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Bölümünde başladı. 2004 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. 2004 Eylül 'de aynı bölümde yüksek lisans eğitimine başladı. 2005 yılında biyoloji Bölümünde Araştırma görevlisi olarak göreve başladı. Halen Araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

Nurşen ÇÖRDÜK