

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Güneş Bayraktar' ın *Gomphrena globosa* L. (Hanım Düğmesi)' nin İn-vitro Şartlarda Embriyo Kültürü İle Üretilmesi başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 11.02.2002.. tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yrd. Doç. Dr. BANU A. ASLANARGUN	
Üye	: Doç. Dr. GÜLER ÇOLAK	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. EMEL SÖZEN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 20.02.2002..... tarih ve 6/2..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Dihan ÖZER
Fen Bilimleri Enstitüsü
01060 r0

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi*****Gomphrena globosa* L. (Hanım Düğmesi)' NİN
İN-VİTRO ŞARTLARDA EMBRİYO KÜLTÜRÜ
İLE ÜRETİLMESİ****GÜNEŞ BAYRAKTAR****Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Yard. Doç. Dr. Banu A. ASLANARGUN
2002, 25 sayfa**

Bu çalışmada *Gomphrena globosa* L. (Hanım Düğmesi) bitkisinin embriyoları üzerine bitki doku kültürü çalışmalarından embriyo kültürü tekniğinin uygulanması ile kısa sürede bol ve kaliteli bitkiler elde edilmiştir. Steril şartlarda tohumlardan çıkarılan embriyolar in-vitro koşullarda iyi sonuçlar vermiştir.

Embriyo kültürü tekniği uygulanan *Gomphrena globosa* L. gerek serada gerekse dış ortamda yetiştirilen bitkilere göre daha kısa sürede gelişmiştir. Aynı zamanda daha sağlıklı ve kontaminasyonsuz oldukları görülmüştür.

Bitkimizin embriyolarının ilk gelişimi için Kinetin (KIN) (1.0 mg/lt) içeren Murashige & Skoog (MS) besin ortamı uygulanmıştır. Vejetatif gelişme için İndol Asetik Asit (IAA) (1.0 mg/lt) içeren MS besin ortamı ile IAA (1.0 mg/lt) + KIN (1.0 mg/lt) içeren MS besin ortamları uygulanmıştır. Her iki MS besin ortamında gelişmenin iyi olduğu fakat IAA (1.0 mg/lt) içeren MS besin ortamındaki bitkilerin kök ve yapraklarının daha iyi bir vejetatif gelişim gösterdikleri görülmüştür. Embriyolardan sekiz gün gibi kısa bir sürede sağlıklı kök ve gövdeleri olan bitkilerin oluştuğu görülmüştür. Bir ay sonrada saksılara aktarılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Gomphrena globosa* L., Doku Kültürü, Embriyo Kültürü

ABSTRACT**Master of Science Thesis****THE PRODUCTION OF *Gomphrena globosa* L.
(Globe Amaranth) WITH EMBRYO CULTURE IN
IN-VITRO CONDITIONS****GÜNEŞ BAYRAKTAR****Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Program****Supervisor: Asst. Prof. Banu A. ASLANARGUN
2002, 25 pages**

In this research, many plants with good quality have been obtained by using the embryo culture technique on *Gomphrena globosa* L. embryos. These embryos have been taken from seed in the sterile conditions and their in-vitro grown has exhibited good results.

Gomphrena globosa L. plant have been propagated using the embryo culture technique, have grow up in a shorter time than the plants grown up either in the greenhouse or outside. Also, it has been observed that they were healthier and uncontaminated than others.

The Murashige & Skoog (MS) medium, which contains Kinetin (KIN) (1.0 mg/l), has been used at the first growth phase of the *Gomphrena globosa* L. embryos. MS medium containing Indol Acetic Acid (IAA) (1.0 mg/l) and MS medium containing IAA (1.0 mg/l)+ KIN (1.0 mg/l), have been used for vegetatif growth. It has been observed that the growth is good on both MS medium but, the plant' s roots and stems have shown better vegetatif growth on the MS medium, which contains IAA (1.0 mg/l). It has been observed that on this medium the healthy roots and stems have grown up from embryos, within eight days. After one month, they have been transferred to pots.

Key words: *Gomphrena globosa* L., Tissue Culture, Embryo Culture

TEŞEKKÜR

Beni öğrenciliğe kabul eden ve konumu verip çalışmalarına yön veren Yrd. Doç. Dr. Banu A. ASLANARGUN' a, çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen TIBAM çalışanlarına ve Arş. Gör. Seval KORKMAZ' a, bölümdeki diğer hocalara ve çalışanlara, hayatım boyunca bana destek veren Anne ve Baba' ma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI.....	3
2.1. Embriyo Kültürü.....	3
2.2. Embriyo Kültürü İçin Gereksinimler.....	4
2.3. Besin Ortamı Bileşeni.....	6
2.4. Kültür Koşulları.....	7
2.5. Embriyo Kültürünün Uygulama Alanları.....	7
2.5.1. Biyolojik Temel Çalışmalarda.....	7
2.5.2. Tohumun Çimlenmemesi Durumunda.....	8
2.5.3. Islah Süresini Kısaltmada.....	8
2.5.4. Yaşamayan Embriyoların Kurtarılması.....	8
2.5.5. Haploid Bitkilerin Üretilmesi.....	9
2.5.6. Tohum Canlılıklarının Hızlı Test Edilmesi.....	9
2.5.7. Ender Bitkilerin Çoğaltılması.....	10
3. MATERYAL VE METOTLAR.....	11
3.1. Materyal.....	11

	<u>Sayfa</u>
3.2. Metotlar.....	12
3.2.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu ve Embriyoların İzolasyonu..	12
3.2.2. Besin Ortamlarının Bileşimi.....	12
3.2.3. Besin Ortamlarının, Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu.....	14
3.2.4. Fotoperiyot Uygulaması.....	14
3.2.5. Genç Bitkilerin Saksılara Alınması.....	14
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	15
4.1. Sonuçlar.....	15
4.2. Tartışma.....	22
5. KAYNAKLAR.....	24

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1. <i>Gomphrena globosa</i> L. bitkisinin genel görünümü.....	11
4.1. MS+KIN (1.0mg/lit) ilave edilmiş besiyerindeki embriyoların görünümü.....	15
4.2. MS+KIN (1.0mg/lit) ortamında gelişen embriyoların 2. gündeki görünümü...	16
4.3. MS+KIN (1.0mg/lit) ortamında gelişen embriyoların 3. gündeki görünümü...	16
4.4. Gelişen embriyoların kavanozlara aktarılmış görünümü.....	17
4.5. Dört gün sonraki bitkilerin görünümü.....	18
4.6. IAA uygulanan bitkilerin görünümü.....	19
4.7. IAA+KIN uygulanan bitkilerin görünümü.....	19
4.8. İklim dolabı içindeki saksı ve kavanozdaki bitkilerin genel görünümü.....	20
4.9. Dört hafta sonunda saksılara aktarılan bitkilerin görünümü.....	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.2.1. MS besiyeri.....	13
3.2.2. Komple Sıvı Besin Çözeltilisi.....	13

1. GİRİŞ

Bitki biyoteknolojisi; çeşitli doku kültürü ve genetik mühendisliği tekniklerini kullanarak bitkilerin moleküler seviyede iyileştirilmesini amaçlamaktadır. Örneğin; bugün kültürü yapılan bir çok bitki türünün ürettiği etken maddeler laboratuvarında üretilmektedir. Yine, tarımsal önemi olan genler değişik organizmalardan izole edilerek kültür bitkilerine kolaylıkla aktarılabilmektedir [1].

Bitki doku kültürlerinin gelişimde etkili olan önemli çalışmalardan bazılarını şöyle sıralayabiliriz; ilk izole edilmiş hücrelerin kültürü Haberlandt tarafından 1902' de, olgun embriyoların kültürü Hanning tarafından 1904' de, ilk embriyo kurtarma tekniği mısır bitkisinde Dieterich tarafından 1924' de kullanılmıştır. İlk sitokininin tanımlanması ve organ oluşumunda sitokin/ oksin oranının önemini ortaya konulması Skoog ve Miller tarafından 1957' de yapılmıştır. İlk somatik embriyogenez havuç bitkisinde Steward *ve ark.* tarafından 1958 yılında çalışılmıştır [2-4].

Laibach 1925 yılında melezlemelerden sonuç alınamadığı durumlarda, embriyo kültüründen yararlanılabileceğini göstermiştir. Overbeek 1941 yılında besi ortamına koko sütü ilave ederek 150 μ m' lik embriyolardan fideler elde etmeyi başarmıştır [5].

1952 yılında *Capsella bursa-pastoris* bitkisini embriyo kültürü tekniği ile in-vitro şartlarda üretilmiştir [6].

1993 yılında muzda triploid erkek çiçeklerde sıvı besiyeri kullanılarak embriyo kültür çalışmaları yapılmıştır [7].

1997 yılında kauçuk ağacında, sıcaklık denemeleri embriyo kültürü ile in-vitro şartlarda yapılmıştır [8].

İlk topraksız üretim şekli olan hidrofonikler, tüm bir bitkinin laboratuvarında tam olarak formüle edilmiş besin ortamlarında yetiştirilebilmesi düşüncesini ve daha sonra da bitki organlarının benzer şekilde kültüre alınabilmesi fikrini doğurmuştur [9]. Bu yolda en önemli adımlardan birisi besin ortamlarının geliştirilmesi ve tamamen aseptik şartlarda doku kültüründe kullanılmasıdır. Ayrıca zaman içinde

organ ve doku gibi daha büyük parçalardan tek hücre kültürüne doğru çalışmaların yöneldiği görülmektedir. Bunun sonucunda, 1983 yılında bitkilere ilk gen transferi gerçekleştirilmiştir. Bu transferin gerçekleştirilmesinde doku kültürünün kullanılması gerekli olmuştur. Günümüzde bitki doku kültürleri bir çok alanda uygulanmaktadır [1].

Bitki doku kültürünün ticari ve ıslah dışı uygulamalarından biride sentetik tohum üretimidir; somatik embriyoların çeşitli metotlarla kaplanması sonucu sentetik (yapay) tohumlar elde edilmektedir. Sentetik tohumların, hibritlerin somatik çoğaltımında, erkısır ve ebeveyn hatların muhafazasında ve odunsu bitkilerin elit genotiplerinin elde tutulmasında kullanımı konusunda oldukça fazla çalışma yapılmaktadır [1].

Doku kültürü tekniği ile kısa sürede bol ve kaliteli ürün elde etmek mümkündür. Ayrıca virüssüz bitki yetiştirmek, uzun süreli muhafaza ve ulaşım kolaylığı, tarla enfeksiyonlarından ve don, dolu gibi benzeri çevre koşullarının olumsuzluğundan etkilenmeyen bitki üretebilmek gibi avantajları vardır [10].

Zigotik embriyo kültürünün en yararlı ve güncel uygulama alanı istenen özellikleri taşıyan nadir bitkilerin yetiştirilebilmesidir. Bahçe ve süs bitkilerinin ıslah sürelerinin kısaltılmasını hedefleyen doku kültürü çalışmalarında embriyo kültürü tekniği de önemli bir yer tutmaktadır.

Gomphrena globosa L. park ve bahçe düzenlemelerinde tercih edilen, ayrıca rengini kaybetmediği için kuru arajmanlarda da kullanılan bir süs bitkisidir. Yapılan literatür araştırmaları, bu bitki üzerinde bugüne dek herhangi bir doku kültürü tekniği ile çalışılmadığını göstermiştir. Bu çalışmamızda embriyo kültürü tekniğini kullanarak *Gomphrena globosa* L. bitkisinin ıslah süresini kısaltmayı, sağlıklı ve çok sayıda bitki üretmeyi amaçladık. Önemi son yıllarda giderek artan doku kültürü ve uygulamalarının alt başlıklarından biri olan embriyo kültürü tekniğini konu aldığımız çalışmamızın bundan sonra yapılacak araştırmalara ışık tutması amaç edinilmiştir.

2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök, v.b.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır [1].

Doku ve hücre kültürü teknikleri (diğer bir değişle in-vitro vejetatif üretim teknikleri), bazı araştırmacılar tarafından mikro üretim veya hızlı klonal üretim adı altında tanımlanmaktadır.

Bu teknikler, geleneksel vejetatif üretim yöntemlerine göre aşağıda belirtilen üstünlüklere sahiptir;

- Daha yüksek çoğalma hızına sahip olma
- Daha az yere gereksinim duyulması
- Tüm yıl boyunca üretim yapma imkanı
- Kimyasal ve fiziksel ortam koşulları üzerinde daha fazla bir oranda kontrol olanağı sağlaması
- Olgun dokulardan yeniden gençleştirme imkanlarının bulunması [11].

2.1. Embriyo Kültürü

Yüksek bitkilerin tohumlarından ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek belli ortamlarda kültüre alınması embriyo kültürü olarak tanımlanmaktadır.

Bitki embriyolarının kültürü ile ilgili ilk çalışma Hanning (1904) tarafından *Raphanus* ve *Cochlearia*'nın tohumlarından olgun embriyoların (2mm) mineral tuz ve şeker içeren basit bir ortamda kültüre alınması ve bitkicik geliştirilmesidir.

Bundan sonra çok değişik bitki türlerinin embriyoları kontrollü koşullarda geliştirilmiştir. Bu çalışmalarla embriyoların besin ihtiyaçları, büyüme ve farklılaşmaları v.b. konular incelenmiş ve embriyo kültürüne ilişkin bazı metotlar ortaya konmuştur [12,13].

İki tip embriyo kültüründen söz edilmektedir;

1. Olgun tohum embriyolarının kültürü; Bu kültür oldukça kolaydır ve basit bir kültür ortamı ile başarılı sonuç alınmaktadır. Böylece embriyonik büyümeyi incelemek ve büyüme dönemlerini ortaya koymak, dormansi ve çimlenmenin metabolik ve biyokimyasal ayrıntılarını analiz etmek mümkün olmaktadır.
2. Olgunlaşmamış erken bölünme fazındaki proembriyoların kültürü; Bu tip kültür erken embriyo dönemlerinden itibaren embriyoların besin ihtiyaçlarının ortaya konulmasını ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Embriyonun izolasyonu oldukça zor bir iştir bu nedenle güç olan bir yöntemdir.

Embriyo izolasyonunun zor olması nedeniyle embriyo kültürüne bir alternatif tozlaşmış yumurtalık (ovary) kültürü ve olgunlaşmamış tohum taslağı (ovül) kültürü de kullanılmaktadır [12].

2.2. Embriyo Kültürü İçin Gereksinimler

Embriyo oluşumu, biyolojinin temel problemlerinden biridir. Hiç kuşkusuz her canlı sistemin en kayda değer özelliği, embriyo denem bu özel şekli inşa etme kapasitesidir. Bu olay bu güne kadar biyolojik olayların mekanik olarak izah edilmesi işlemlerinde en büyük komplikasyonlar doğurmuş bir olaydır. Embriyo kültürü, embriyojenezin ortaya çıkış şeklini modifiye etmek için müdahale etmeye ve yeni bir embriyo yapısının incelenmesinde, embriyoya ait gelişmeye hükmeden bazı prensiplerin saptanmasına yarar [14].

Embriyo kültüründe başarıyı etkileyen bazı faktörler aşağıda belirtilmiştir;

1. Genotip: Diğer doku kültürü çalışmalarında olduğu gibi embriyo kültüründe de genotip etkisi söz konusudur. İn vitro kültürde bazı türlerin embriyolarının gelişmesi çok kolay olurken bazı türlerde oldukça zordur [1].
2. Embriyonun kültüre alındığı dönem: Çok küçük embriyoların in vitro gelişmesi zordur. Embriyo in vivo' da ne kadar gelişmiş ise in vitro' daki gelişimide o ölçüde daha kolay olmaktadır. Örneğin, *Brassica napus*' un erken globular dönem embriyolarının in vitro kültüründe embriyo olgunlaşma oranının embriyo boyutu ile ilişkisi gösterilmiştir. 30µm' den daha küçük embriyolar kültürde gelişmemiş ve 50µm' den daha küçük embriyoların %3.7' si, 50µm' den daha büyük embriyoların ise %28.9' u fide meydana getirmiştir [1].
3. Besin ortamının bileşimi: Olgun embriyolar basit bir ortamda gelişirken erken gelişme dönemindeki embriyolar daha komplike bir ortama gerek duymaktadır. Embriyo kültürü için geliştirilmiş çeşitli ortamlar bulunmaktadır [15].
4. Kültür koşulları: Embriyo kültüründe oksijen önemli bir faktördür. Bazı türlerin embriyo kültürlerinin önce karanlıkta inkübe edilmesi sonra aydınlığa alınması uygun olmaktadır. Kültürde optimum sıcaklık bitki türüne göre değişmektedir. Ayrıca, dormansiyi kırmak için soğuk uygulaması gerekebilir [1].

1. Embriyoların izolasyonu: Embriyoyu zedelemeyen izole etmek özellikle erken gelişme dönemindeki embriyoların süspansiyonunun zarar görmemesi başarı için önemlidir [1].

Embriyo kültürü ile ilgili ilk çalışmalar basit bir ortam üzerinde olgun embriyolardan bitki gelişimi konusunda olmuştur. Sonra olgunlaşmamış embriyoların kültürü ile ilgili çalışmalar da yapılmış ve kültüre alınan embriyonun gelişme dönemine göre kültür ihtiyaçları belirlenerek başarılı sonuçlar alınmıştır [15].

2.3. Besin Ortamı Bileşeni

Embriyoların büyümesi üzerine farklı solüsyonların etkisi araştırılmış ve genellikle en iyi gelişmenin Murashige ve Skoog (MS) ve B₅ ortamlarında olduğu gözlenmiştir. Ancak, MS solüsyonunun küçük boyuttaki embriyolar için toksik etkisi de gözlenmiştir [16].

Embriyo kültüründe mineral tuzlarının birçok farklı formülasyonu kullanılmaktadır. *Capsella*'nın embriyo kültüründe maksimum oranda büyümeyi destekleyen MS ortamında embriyoların canlı kalma frekansları çok düşük olmuş, en az toksik olan Knop ortamında ise embriyo büyümesi zayıf olmuştur [15,16].

Olgun veya olgunlaşmamış embriyoların kültüründe genellikle uygun bir karbon kaynağına gereksinim vardır. Sakkaroz, karbohidratın en iyi formudur ve embriyo kültürü için çok yaygın olarak kullanılmaktadır. *Zea*'nın birkaç türü, *Datura stramonium*, *Pinus nigra*, *Capsella-bursa-pastoris*'in embriyolarında sakkarozun üstünlüğü belirlenmiştir. Sakkaroz kültür ortamına enerji kaynağı olarak eklenmesinin yanı sıra ozmolariteyi de korumaktadır. Bu fonksiyon için sakkarozun optimum konsantrasyonu embriyo gelişme dönemine göre değişmektedir. Olgun embriyolar %2 sakkarozda oldukça iyi büyüme gösterirler fakat daha genç embriyolar daha yüksek karbohidrata ihtiyaç duyarlar [15].

Embriyo kültürü ortamlarında azotun nitrat, nitrit veya amonyum formunda ilavesine rağmen değişik aminoasitlerin ortama ilave edilmesi de kültüre alınan embriyoların büyüme ve gelişmesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [12].

Genellikle glutamin embriyoların büyümesi için en uygun aminoasit olarak belirtilmektedir. Yine bir aminoasit kompleksi olan kazein hidrolizat (CH), embriyo kültürü ortamlarında geniş çapta kullanılmakta ve embriyoların CH konsantrasyonlarına olan duyarlılığı türlere göre değişmektedir [15].

Vitaminler embriyo kültürü ortamlarında da kullanılmaktadır. Ancak bunlar her zaman gerekli değildir. Ototrofik olan tohum embriyoları hücrel biyosentez ile vitamin ihtiyaçlarını karşılayabilmektedir.

Oksin, gibberellin ve sitokinin gibi eksojen büyüme düzenleyicilerinin ayrı ayrı yada kombinasyon halinde uygulanması ile primordiyal kök ve sürgünlerin gelişmesi ve morfogenesisinde görülen modifikasyonlar araştırmacıları embriyo büyümesinde hormonların rolü üzerindeki araştırmalara sevk etmiştir [12].

Embriyo ve embriyo segmentlerinin kallus oluşturması için genellikle bir oksin veya sitokinin, yada her ikisine ihtiyaç duyulabilir. Bununla birlikte bazı bitkilerdeki dormansinin kırılması amacı dışındaki çalışmalarda kültüre alınmış olan olgun veya olgunlaşmamış embriyoların normal gelişimi için eksojen büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duyulduğu konusunda yeterli kanıt bulunmamaktadır [15].

2.4. Kültür Koşulları

Embriyo kültüründe genel olarak ihtiyaç duyulan kültür koşulları aşağıda belirtilmiştir;

1. Büyüme odası sıcaklığı ve aydınlanması seçilen bitki türüne göre değişmektedir. Örneğin, *Capsella bursa-pastoris* için bitkiler 18⁰C bir büyüme odasında devamlı aydınlıkta yetiştirilmiştir. Embriyo kültürü ise 25⁰C kültür odasında Grolux floresan tüpler ile devamlı ışıktaki yapılmıştır. Bazı türlerin önce karanlıkta sonra aydınlıkta inkübe edilmesi daha uygun olmaktadır.
2. Kültür kabı olarak cam kültür kaplarının kullanılması embriyoların gözlenmesine olanak sağlaması bakımından daha uygun olmaktadır. Ayrıca tüm kaplar otoklavda (115⁰C, 20 dakika) sterilize edilir [16].

2.5. Embriyo Kültürünün Uygulama Alanları

2.5.1. Biyolojik temel çalışmalarda;

Embriyo kültürü temel embriyogenezi çalışmak için iyi bir olanaktır. Embriyogenezdeki çeşitli dönemler bu yolla analiz edilebilmektedir.

Embriyo kültürü ile embriyonal büyüme ihtiyaçları belirlenmektedir. Kısaca embriyo kültürü, normal embriyogenez için uygun besin isteklerini belirlemek, beslenmenin ve fitohormonların etkisini ortaya koymak için iyi bir araçtır.

Zigotik embriyoların kültürü tohum taslağında embriyonun büyümesindeki koşulları belirlememizi sağlamaktadır [13,15-17].

2.5.2. Tohumun çimlenmemesi durumunda;

Tohum dormansisi ve tohum sterilitesi embriyo kültürü ile kırılabilir. Bazı türlerdeki tohum dormansisi embriyoyu çevreleyen yapıda var olan kimyasal engelleyiciler veya mekaniksel dayanıklılık nedeniyledir. Böyle durumda embriyoların izole edilip besin ortamında kültüre alınması ile dormansi ortadan kaldırılmaktadır. Tohum sterilitesi embriyoyu çevreleyen yapıların uyumsuzluğu nedeni ile olabilir. Böyle durumlarda da embriyo kültürü ile canlı fideler elde edilmektedir [13,15-17].

2.5.3. Islah süresini kısaltmada;

Bahçe bitkilerinde nadiren de olsa ıslah çalışmaları tohumların dormansi periyotları nedeniyle uzamaktadır. Embriyoların besin ortamında geliştirilmesi ile bu süre kısaltılabilmektedir. Dormansiye sebep olan faktörler tohum kabuğu ve endospermdeki endogen inhibitörler, düşük sıcaklık, özel ışık gereksinimleri gibi faktörler ise embriyonun kültüre alınması ile bunlar giderilmektedir. Sert tohum kabuğu nedeniyle çimlenmenin geciktiği durumlarda da embriyo kültürü ile çimlenme hızlandırılmaktadır [13,15-17].

2.5.4. Yaşamayan embriyoların kurtarılmasında;

a) Embriyoların yetersiz gelişmesi: Meyvenin çok hızlı olarak olgunlaşması ve embriyonun tam olarak gelişmesini sağlayamadığı durumdur. Böyle meyvenin tohumlarından embriyolar çıkarılıp in-vitro kültüre alındığı zaman çimlenir ve normal bitkiler üretilir [13].

b) Hibrit embriyoların yaşayamaması: Uzak akraba olan türler arası melezler çoğunlukla başarısızdır, döllenme olmakla beraber hibrit embriyonun yaşamadığı görülmektedir. Bu duruma embriyo düşmesi veya abortus denilmektedir. Bunun sebeplerinden biri endospermin gelişmemesi veya dejenere olmasıdır. Bu durumda embriyo beslenemediğinden dolayı ölür ve çimlenebilir tohumlar meydana getirmez. Hibrit embriyonun izolasyonu ve kültüre alınması ile yapay besin ortamı endospermin yerine geçebilmekte böylece hibrit embriyolar yaşatılmaktadır .

Böyle başarısız melezlerde embriyonun potansiyel olarak normal büyüme yeteneğinde olduğunu, tam hibrit embriyoların düşme olayının başlamasından önce izole edilerek besin ortamında kültüre alınması ile yaşatılabileceğini ve hibrit bitkilerin elde edilebileceğini göstermesi tarıma önemli katkılarda bulunmuştur [13,15-17].

2.5.5. Haploid bitkilerin üretilmesi;

Embriyo kültürü tekniğinin diğer bir avantajı uzak türler arası veya cinsler arası melezlemelerde döllenmeden sonra melez embriyonun gelişmesi sırasında ebeveynlerden birine ait kromozomların eliminasyonu yolu ile haploidlerin üretimidir. *Hordeum vulgare* x *H. Bulbosum* melezinde döllenme kolayca olur fakat *H. Bulbosum*' un kromozomları embriyogenezin ilk birkaç bölünmesi süresince kaybolur. Bu nedenle gelişen bitkiler haploid *vulgare* bitkileridir. Bunların kromozom sayıları çeşitli uygulamalar ile iki katına çıkarılarak doped-haploid (DH) bitkiler ve bunlardan DH hatlar elde edilmektedir. Aynı teknikle buğday x mısır ve buğday x sorgum melezlerinden haploid yulaf bitkileri elde edilmiştir. 'Bulbosum' tekniği adı altında belirtilen bu yöntem arpa ıslahında kullanılmaktadır [18].

2.5.6. Tohum canlılıklarının hızlı test edilmesi;

Embriyonun çimlenmesi ile gerçekleştirilen bu tohum canlılık testine diğer metotlara göre daha doğru ve güvenilir bir test olarak bakılmaktadır [15].

2.5.7. Ender bitkilerin çoğaltılması;

Ticari muzun yabani bir akrabası olan *Musa balbisiana* tohumları doğada çimlenmemektedir. Bununla birlikte fideler embriyoların kültüre alınması ile kolaylıkla elde edilebilmektedir. Bazı hindistan cevizlerinde sıvı endosperm yerine yumuşak ve yağlı bir doku gelişir, bu tip hindistan cevizleri 'makapuno' olarak adlandırılır ve bunların tohumları normal koşullar altında çimlenmede başarısız olmaktadır. İn-vitro kültür tekniği kullanılarak makapuno embriyolarından bitkicikler yetiştirilmiştir [15].

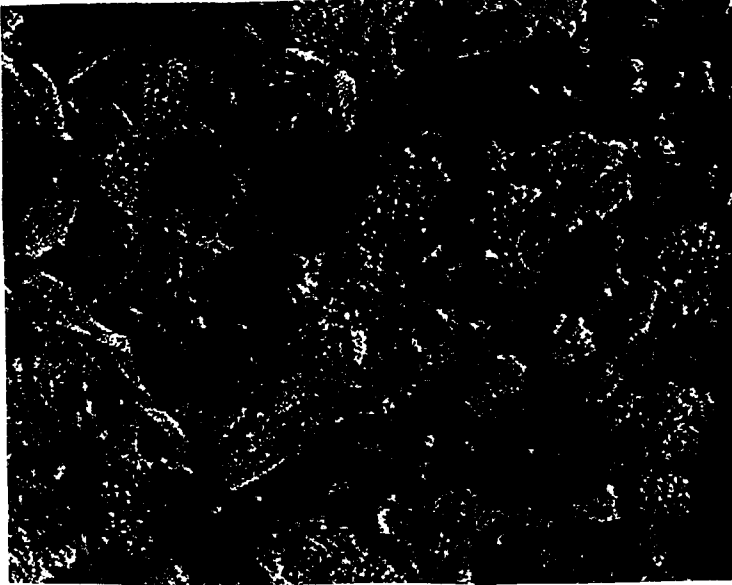
3. MATERYAL VE METOTLAR

3.1. Materyal

Bitkimiz, *Gomphrena globosa* L.' nın tohumları Anadolu Üniversitesi serasından temin edilmiştir.

Gomphrena globosa, Amaranthaceae (tilkikuyruğugiller) familyasından bir süs bitkisidir. Bir veya çok yıllık otsular, nadiren ağaç veya çalılar veya tırmanıcı bitkileridir. Tropik, subtropik ve ılıman bölgelerde yayılış gösterir ve yaklaşık 65 cins ile 900 kadar tür içerir. Ülkemizde tek cinsi (*Amaranthus*) ve 10 türü mevcuttur. Bahçelerimizde süs bitkileri olarak yetiştirilir, bazı türleri az da olsa sebze olarak yenilir.

Gomphrena globosa L.' nın anavatanı Hindistan olup, ülkemizde de park ve bahçelerde çok yetiştirilen tek yıllık bir bitkidir. Çiçekler gövdenin ucunda küre şeklindeki başaklarda ve mor renklidir [19].



Şekil 3.1 *Gomphrena globosa* L. bitkisinin genel görünümü

Çizelge 3.2.1 MS Besiyeri

Makro Elementler	Tam (mg/lt)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1800
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ 7PO ₄	170
Na ₂ Edta	37.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Mikro Elementler	
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8.6
KI	0.86
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .7H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Organik Bileşikler	
Sukroz	30000
Agar	10000
Glisin	2
Inositol	100
Nikotinik asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Thiamin-HCl	0.1

Çizelge 3.2.2 Komple Sıvı Besin Çözeltisi

Makro Elementler	gr/lt saf su
Ca ₃ (PO ₄) ₂	0.5
CaSO ₄	0.5
MgSO ₄	0.5
NaCl	0.5
KNO ₃	0.5
FeCl ₃	0.5
İz Elementler	cc/lt saf su
NH ₄ MoO ₄	1.0
CuCl ₂	1.0
MnCl ₂	1.0
Na ₂ BO ₃	1.0
ZnCl ₂	1.0

3.2.3. Besin ortamlarının, alet ve ekipmanların sterilizasyonu

Besin ortamlarının sterilizasyonu için standart bir işlem olarak otoklavda 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121⁰C' de sterilizasyon yapılmıştır. Besin ortamlarına katılacak hormonlar otoklavlanmadan ötürü özelliklerini yitirecekleri için önce besin ortamlarına katılmamışlardır, diğer elementler otoklavlandıktan ve ısı 40⁰C' ye düştükten sonra 0.45 mm' lik steril filtreler yardımı ile enjekte edilmişlerdir.

Otoklavlanan materyallerin herhangi bir kontaminasyondan korunması için kapların ağzları aliminyum folyo ile veya steril pamuk ile kapatılmıştır.

Cam malzemeler (erlen, beher, petri kutuları, kavanozlar) ile pens, bistürü, saksılar ve 1:1 oranında perlit, kum karışımı kuru havalı fırınlarda 160⁰C-180⁰C' de 3 saat tutularak steril edilmiştir.

3.2.4. Fotoperiyot uygulaması

Embriyoların ekiminden sonra 25⁰C' deki 24 saatlik karanlık fotoperiyotta iklim dolabında tutulan embriyoların gelişmesi ile fotoperiyota başlanmıştır. Sürgünleri gelişen ve köklenen bitkicikler 25⁰C sıcaklıkta 20W' lık beyaz floresans lambalarla aydınlatılmış iklim dolabında fotoperiyota tabi tutulmuşlardır. Bitkilere 2 hafta süre ile 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık fotoperiyot uygulanmıştır.

3.2.5. Genç bitkilerin saksılara alınması

Kavanozlar içinde yeteri kadar gelişen, köklenen ve fotoperiyot ile adaptasyona tabii tutulan bitkilerin herbiri 8-10cm. çapında toprak saksılara aktarılmıştır. Saksılardaki bitkilerin her biri ayrı ayrı olmak üzere hava sızdırmayan birer naylon torba içine alınarak, bitkilerin bulunduğu mikroklimada havanın nisbi rutubetinin belli bir miktarda olması sağlanmıştır. Bitkiler yeni ortama adapte olduktan sonra, geliştikçe naylon torbadan çıkarılmıştır. Bitkiler saksılara aktarıldıktan sonra komple sıvı besin çözeltisi ile sulanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Sonuçlar

Tohumlardan steril şartlarda çıkarılan embriyolar MS+ KIN (1.0mg/lt) ilave edilmiş temel besin ortamının yüzeyine transfer edildikten sonra 24 saat karanlıkta 25⁰C ısı uygulaması altında iklim dolabında inkübe altına alınmışlardır (Şekil 4.1).

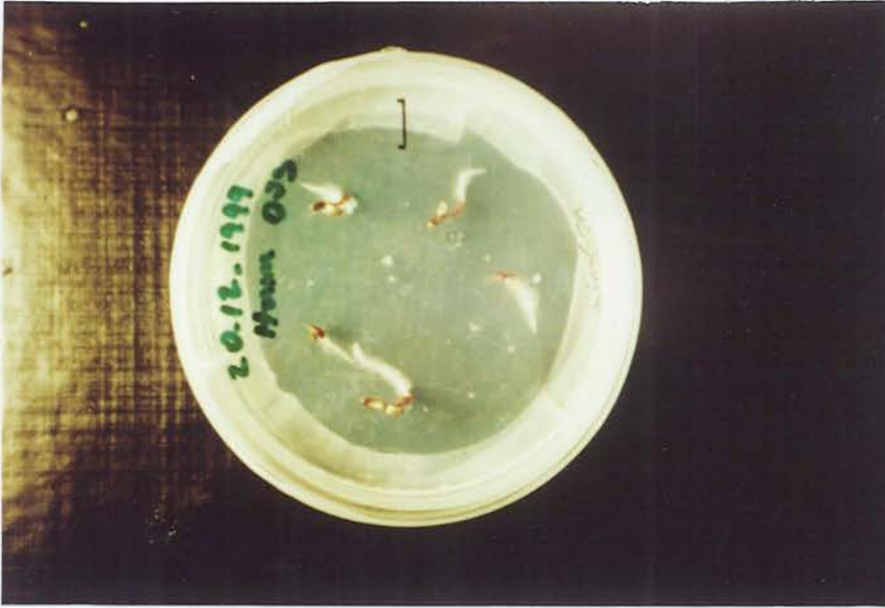


Şekil 4.1 MS+KIN (1.0mg/lt) ilave edilmiş besiyerindeki embriyoların görünümü (Skala: 1cm)

Bu inkübasyonu takip eden 2 gün içinde kök ve kotiledonların oluştuğu görülmüştür. İlk gün ve takip eden günlerde ilk olarak köklerin gelişmeye başladığı kotiledonlarında bunu takiben geliştikleri görülmüştür (Şekil 4.2, 4.3).

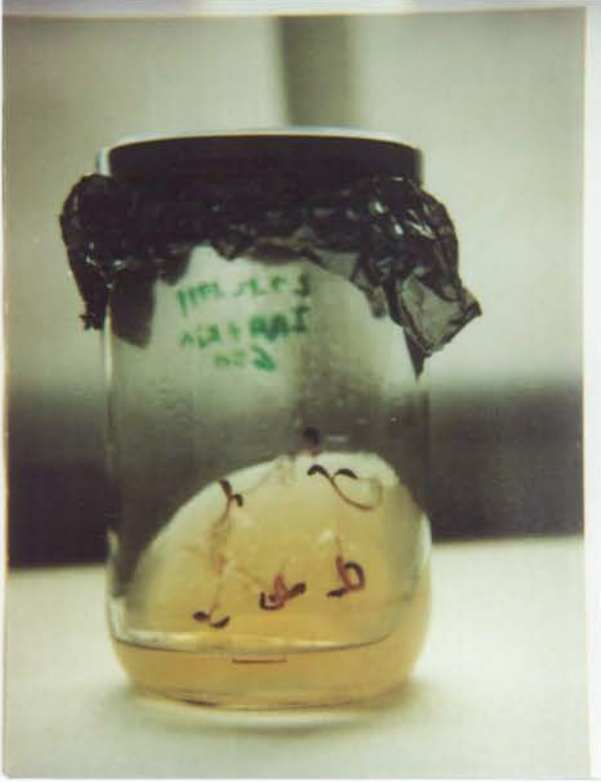


Şekil 4.2 MS+KIN (1.0mg/lt) ortamında gelişen embriyoların 2. gündeki görünümü (Skala: 1cm)



Şekil 4.3 MS+KIN (1.0mg/lt) ortamında gelişen embriyoların 3. gündeki görünümü (Skala: 1cm)

MS besiyerinde kök, gövde ve yaprak gelişimi devam eden embriyolar steril şartlar altında steril kavanozlara aktarılmışlardır. Petrilere yatay hava akışlı kabin içinde steril pensler yardımı ile zarar vermeden alınarak kavanozlardaki yeni besiyeri üzerine dikkatli bir şekilde transfer edilmişlerdir. Transferden sonra 25⁰C ısı uygulaması 12 saat aydınlık 12 saat karanlık nötr fotoperiyot uygulaması olan iklim dolabına yerleştirilmişlerdir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Gelişen embriyoların kavanozlara aktarılmış görünümü (Skala: 1cm)

Kavanozlara aktarılan bitkiler ortama hemen adapte olarak gelişmelerine hızla devam etmişlerdir. Dört gün içinde boyca uzama, köklerde ve yaprak sayısında artma gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Dört gün sonraki bitkilerin görünümü (Skala: 1cm)

Kavanozlara aktarma işleminde IAA uygulanan (Şekil 4.6) ve IAA+KIN uygulanan (Şekil 4.7) kavanozlar karşılaştırıldığında IAA içeren besiyerindeki fidelerde daha hızlı ve çabuk bir gelişim gözlenmiştir, bunun yanında hızlı ve güçlü bir köklenme görülmüştür.



Şekil 4.6 IAA uygulanan bitkilerin görünümü (Skala: 1 cm)



Şekil 4.7 IAA+KIN uygulanan bitkilerin görünümü (Skala: 1 cm)

İklim dolabında gelişmelerine devam eden bitkiler hızlı ve iyi bir vejetatif gelişme göstererek 4 hafta sonunda saksılara aktarılacak duruma gelmişlerdir. Daha önce belirtildiği gibi içinde steril edilmiş 1:1 oranında kum ve perlit karışımı bulunan steril saksılara alınmışlardır. Yatay hava akışlı kabin içinde steril pensler yardımı ile zarar vermeden alınarak saksılara dikkatli bir şekilde transfer edilmişlerdir. Saksılara steril edilmiş komple sıvı besiyeri gün aşırı ilave edilmiştir. Kavanozdaki ve saksılardaki bitkilerin iklim dolabı içindeki genel görünümleri (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 İklim dolabı içindeki saksı ve kavanozdaki bitkilerin genel görünümü

Kavanozlardan saksılara alınan bitkiler önce şeffaf naylon torba içine alınarak mikroklima yaratılmıştır. 25⁰C ısı uygulaması 12 saat aydınlık 12 saat karanlık nötr fotoperiyot uygulaması yapılmıştır. Bundan sonra naylonlar çıkarılmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Dört hafta sonunda saksılara aktarılan bitkilerin görünümü (Skala: 1cm)

4.2. Tartışma

Bu çalışmada araştırma bitkisi *Gomphrena globosa* L.'nin in-vitro koşullarda kısa zamanda iyi ve sağlıklı sonuçlar verdiği görülmüştür.

Bitkimizin tohumlarından steril şartlarda çıkarılan embriyolar ilk gelişimlerinde KIN (1.0mg/lit) +MS içeren petrilere ekilmiştir. İki gün gibi kısa bir sürede kök ve yaprak oluşumu görülmüştür. Bunun kinetinin hücre bölünmesine; ilk olarak mitoz, yani kromozomların duplikasyonu (eşleşmesi); değişik materyaller (soğan kökü, tütün özü, tütün yaprakları, bezelye kotiledonları, v.b.) üzerinde yapılan çok sayıda çalışmada kinetinin önemli oranda DNA oranını arttırması olduğu düşünülmüştür. Son olarak sitokinler protein sentezini kolaylaştırır. Bu olay protein zincirinde aminoasitlerin bağlanmasını sağlayan t-RNA' nın parçası olan bir sitokin kinetininle açıklanabilir [20].

Raphanus sativus (turp) kotiledonlarının gelişmesi kinetininle teşvik edilmiştir [21].

Kültüre alınması daha zor olan Monokotiledonlar, Gymnosperm veya Pteridophyta dokuları hindistan cevizi sütü veya kinetinin varlığında çoğalmaktadır.

Daucus carota ile yapılmış çalışmada 4-6 hafta gibi uzun bir zamanda ilk gelişim görülmüştür. Bu çalışmada Zeatin+ MS besiyeri kullanılmıştır. Dokulardaki sitokinler sitokinoksidadla parçalanırlar. Bu enzimlerin faaliyeti, ki bunlar bakır içeren glikolize proteinlerdir, moleküler oksijenin bulunması ile gerçekleşir. Zeatin sitokinlerinin en yaygınıdır. Bunlar benzaladenin veya kinetin gibi siklik veya doymuş bir yan zincir içererek sitokinler üzerinde çok az etkilidirler. Doğal bir hormon olan zeatinin aktivitesi kinetinden 10 kez daha fazladır [20].

Zea mays ile yapılmış diğer bir çalışma örneğinde de 6 saat gibi daha kısa bir sürede ilk gelişim gözlenmiştir. Besiyerinde hormon kullanılmadan yapılmış bu çalışmada 2 gün sonra radikula, 3-4 gün sonra plumula ve 7-9 günde ilk kök ve yan kökler görülmüştür [22].

Bir süs bitkisi olan bitkimiz 8 gün sonunda kavanoza aktarılacak duruma gelmiştir. Kavanozlara aktarma işleminde IAA (1.0mg/lit)+ KIN (1.0mg/lit)+ MS

besiyeri olan kavanozlardaki bitkiler IAA (1.0mg/lt)+ MS besiyeri olan kavanozlardaki bitkilere göre daha yavaş bir gelişim gözlenmiştir. Bunun nedeni doğal olan IAA ile sentetik bir sitokinin olan KIN arasındaki oransal konsantrasyondur. Bu iki hormon göz ve kök teşekkülünde farklı etkiler yapar [23].

Embriyo kültürü çalışmalarında büyüme odası sıcaklığı ve aydınlanması seçilen bitki türüne göre değişmektedir.

Gomphrena globosa L. bitkisinde ilk embriyoların gelişme ortamı 24 saat karanlıkta 25⁰C ısı uygulaması, kavanozlara aktarıldıktan sonra 25⁰C ısı uygulaması 12 saat aydınlık 12 saat karanlık nötr fotoperiyot uygulaması yapılmıştır. Bitkimizde sağlıklı bir gelişim, köklenme ve farklılaşma olaylarının 8 gün gibi kısa bir sürede ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyot uygulanması sonucunda fideciklerin gelişimi çok iyi sonuçlar vermiştir. Bununla beraber *Capsella bursa-pastoris* ile yapılan embriyo kültürü çalışmaları 25⁰C kültür odasında GroLux floresan tüpler ile devamlı ışıktaki yapılmıştır ve bitkicikler büyüme odasında 18⁰C' de devamlı aydınlıkta yetiştirilmiştir [16].

Embriyo kültürü çalışmalarında embriyoların hayatta kalma şansı da genotipe bağlı olarak türden türe farklılıklar göstermektedir. Örneğin, *Capsella bursa-pastoris* ile yapılmış çalışmada hayatta kalma oranı %90 olarak tespit edilmiştir [8]. *Gomphrena globosa* L. ile yapılan çalışmamızda ise embriyoların hayatta kalma yüzdesi %99' dur. *Gomphrena globosa* L. embriyolarının yaşama şanslarının yüksek olmasına diğer bir sebep olarak da olgun embriyoların kültüre alınmış olması gösterilebilir. Çünkü bu tip embriyoların gelişmeleri ototrof olduklarından dolayı, olgunlaşmamış embriyolara göre daha kolay olmaktadır.

Embriyo kültürü tekniği uygulanan *Gomphrena globosa* L. bitkisi kullanılan klasik yöntemlere göre daha kısa sürede daha sağlıklı ve kontaminizasyonsuz bir gelişme göstermiştir. Bu çalışma bize *Gomphrena globosa* L. bitkisinin in-vitro şartlarda embriyo kültürü tekniği ile başarılı bir şekilde üretilebileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. BABAÖĞLU, M., YORGANCILAR, M. ve AKBUDAK, M.A., *Bitki Biyoteknolojisi-1, Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri*, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye, (2001).
2. PIERİK, RLM., *Micropropagation: Technology and Opportunities*, In:Prakash, J., Pierik, RLM., (eds), *Plant Biotechnology, Commercial Prospects and Problems*, Intercept Ltd., UK., 9, (1993).
3. KUNG, S.D., *Introduction: From Green Revolution to Gene Revolution, Transgenic Plants Vol. 2, Present Status and Social and Economic Impacts*, Academic press, 146-177, (1993).
4. ENDRESS, H.R., *Basic Techniques*. In: *Plant Cell Biotechnologies*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 16-17, (1994).
5. KESKİNER, S., *Crambe orientalis L. Üzerinde Morfolojik, Anatomik, Karyolojik ve Doku Kültürü (Embriyo Kültürü) Çalışmaları* , Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye, (1992).
6. RİSVEN, A.H.G.C., *In-Vitro Studies of The Embryos of Capsella bursa-pastoris*, Acta Bot. Neerl. 1, (1952).
7. ESCALANT, J.V., TEİSSON, C. ve COTE, F.X., *Amplified Somatic Embryogenesis From Male Flowers of Triploid Banana and Plantain Cultivars (Musa Sp.)*, In Vitro Cell. Dev. Biol., 30, 23-36, (1994).
8. ETİENNE, H., BERTAND, B. ve ANTHONY, F., *Improvement of Somatic Embryogenesis in Hevea Brasiliensis (Müll. Arg) Using the Temporary Mersion Technique*, In Vitro Cell. Dev. Biol., 33, 46-60, (1997).
9. CHRİSPEELS, M.J. ve SADAVA, D.E., *Plants, Genes and Agriculture*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 16-17, (1994).
- 10.EKMEKÇİ, B. A., *Petunia X Hybrida (Bahçe Petunyası) Üzerinde Meristem Kültürü Çalışmaları*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye, (1992).

- 11.ERKAN, S., *Moleküler Biyoloji*, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye, (1992).
- 12.Raghavan, V., *Embryo Culture*. In: Vasil IK (ed), *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*, Academic Press, Newyork, 209-236, (1980).
- 13.MONNIER, M., *Zygotic Embryo Culture*, in: Bhojwani SS (ed), *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, The Netherlands, 366-393, (1990).
- 14.BAŞARAN, D., *Bitki Doku Kültürleri*, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, Türkiye, (1990).
- 15.BHOJWANİ, S.S. ve RAZDAN, M.K., *Plant Tissue Culture: Theory and Practice, Revised Edition*, Elsevier Science, Amsterdam, 297-335, (1996).
- 16.MONNIER, M., *Culture of Zygotic Embryos of Higher Plants*. In: Pollard JW, Walker JM (eds), *Plant Cell and Tissue Culture, Methods in Molecular Biology*, Vol. 6, The Human Press, USA, 129-139, (1990).
- 17.HU, C.Y., ve ZANETTİNİ M.H.B., *Embryo Culture and Embryo Rescue for Wide Cross Hybrids*. In: Gamborg OL, Phillips GC (eds), *Plant Cell Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods*, Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 129-140, (1995).
- 18.EMİROĞLU, Ü. ve GÜREL, A., *Bitki Islahında Modern Biyoteknoloji*, The Biotechnology Revulation, Short Course, February 8-12, Bornava, İzmir, (1993).
- 19.SEÇMEN, Ö., ve GEMİCİ, Y., GÖRK, G., BEKAT, L., LEBLEBİCİ, E., *Tohumlu Bitkiler Sistematiği*, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye, (1995).
- 20.YILDIRIM, A. ve DARICI, C., *Bitki Fizyolojisi*, Ankara, Türkiye, (1998).
- 21.LETHAM, D.S., *Regulations of Cell Division in Plant Tissues XII. Acytokinins Bioassay Using Excised Radish Cotyledons*, *Physiol. Plant*, (1971).
- 22.FRANSZ, P.F., *Cytodifferentiation During Callus Initiation and Somatic Embryogenesis in Zea Mays L.*, WAU Dissertation no. 1238, (1988).
- 23.TANRIVERDİ, F., *Çiçek Üretim Tekniği*, (1993).