

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ENDEMİK *RICOTIA CARNOSULA* BOISS. & HELDR. (BRASSICACEAE)’DA
IN VITRO REJENERASYON VE SENTETİK TOHUM ÜRETİMİ**

Melike DEMİR
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2020
ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ENDEMİK *RICOTIA CARNOSULA* BOISS. & HELDR. (BRASSICACEAE)'DA
IN VITRO REJENERASYON VE SENTETİK TOHUM ÜRETİMİ**

Melike DEMİR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2020

ANTALYA

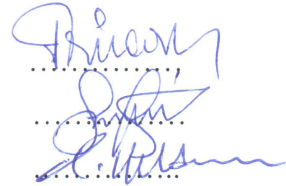
T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK *RICOTIA CARNOSULA* BOISS. & HELDR. (BRASSICACEAE)'DA
IN VITRO REJENERASYON VE SENTETİK TOHUM ÜRETİMİ

Melike DEMİR
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 17/02/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Esin ARI
Prof. Dr. Serpil GÖK TANGOLAR
Dr. Öğr. Üyesi Tolga YILDIRIM



ÖZET

ENDEMİK *RICOTIA CARNOSULA* BOISS. & HELDR. (BRASSICACEAE)'DA IN VITRO REJENERASYON VE SENTETİK TOHUM ÜRETİMİ

Melike DEMİR

Yüksek Lisans, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Esin ARI

Şubat 2020; 95 sayfa

Ricotia carnosula Boiss. & Heldr. (Brassicaceae) zengin antioksidan içeriğine sahip, farmasötik potansiyeli taşıyan önemli bir endemik bitkidir. Ayrıca çeşitli kültür veya ıslah çalışmaları ile desteklenmesi halinde, mevsimlik süs bitkisi olarak da kullanılabilir özelliğine sahiptir. Ancak, *R. carnosula*, IUCN (Nesli Tükenme Tehlikesi Altında Olan Türlerin Kırmızı Bitkiler Listesi) kategorisine göre, LR-lc grubunda, nesli tehdit altında bulunan türler arasında yer almaktadır. Bu tez çalışmasında, sürdürülebilir üretim ve genetik kaynak muhafazası yönünden literatürde henüz yer bulamamış bir tür olan *R. carnosula* endemiğinin somatik embriyogenesis veya organogenesis yoluyla rejenerasyonunun sağlanması ve böylece etkili *in vitro* klonal üretim protokollerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Ayrıca elde edilen somatik embriyoları enkapsülasyon uygulamalarıyla sentetik tohumlara dönüştürerek, *R. carnosula*'nın *in vitro* muhafazasına temel oluşturmak hedeflenmiştir. Eksplant olarak tohumlardan elde edilen *in vitro* bitkiciklerin kotiledon ve hipokotilleri kullanılmıştır. Rejenerasyon çalışmaları için eksplantların her biri; oksin olarak IAA, 2,4-D ve NAA, sitokinin olarak TDZ, BA ve Zeatinin çeşitli konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren 73 farklı rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır. Çalışmada iki eksplant tipi ve 73 farklı rejenerasyon ortamının tek başlarına ve birbirleri ile olan interaksiyonlarının; eksplant tepkisi, toplam kallus, embriyojenik kallus, organojenik kallus, antosiyanin oluşumları, direkt ve indirekt yolla somatik embriyogenesis ile sürgün-kökü kapsayan organogenesis oluşumları üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışma sonunda, *R. carnosula* türünün kallus oluşumu, somatik embriyogenesis ve organogenesis oluşum potansiyelinin çok yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle hiçbir bitki gelişim düzenleyicisi (BGD) içermeyen kontrol ortamlarında somatik embriyo, sürgün ve yoğun olarak kök yapılarının gözlenmesi, *R. carnosula*'nın kotiledon ve hipokotil dokularında bulunan farklı endojen hormon seviyelerinin ne denli yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Embriyojenik kallus oluşumu yönünden 73 rejenerasyon ortamının ortalaması olarak kotiledon eksplantları (%30.1) hipokotil eksplantlarından (%12.8), organojenik kallus oluşumu yönünden ise hipokotil eksplantları (%11.9), kotiledon eksplantlarından (%4.9) daha başarılı bulunmuştur. En yüksek direkt somatik embriyo oluşumu (%37.5) 71. ortamda (1 mg/L Zeatin) kültüre alınan kotiledonlarda oluşurken, en yüksek indirekt somatik embriyo oluşumu (%75) 11. ortamdaki (0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L IAA) kotiledonlarda meydana gelmiştir. En yüksek direkt organogenesis oluşumu (%100) BGD içermeyen kontrol ortamındaki hipokotillerden elde edilirken, en yüksek indirekt organogenesis oluşumu (%62.5) 2.

ortamda (1 mg/L IAA) kültüre alınan hipokotil eksplantlarında gerçekleşmiştir. Son olarak, en yüksek somatik embriyo verimi (97 embriyo/petri) 58. ortamdaki (1 mg/L TDZ + 1 mg/L NAA) kotiledonlarda oluşurken, en yüksek sürgün oluşumu (78.5 sürgün/petri) 71. ortamda (1 mg/L Zeatin) kültüre alınan hipokotillerden meydana gelmiştir. Oluşan somatik embriyolarda yapılan farklı enkapsülasyon uygulamaları arasında ise %4'lük sodyum aljinat ile beraber kullanılan 100 mM CaCl₂ kombinasyonu, sentetik tohumların oluşturulması için en uygun kaplama ortamı olarak belirlenmiş ve daha sonra bu ortamlardan elde edilen sentetik tohumlar %94'e varan oranda çimlendirilmiştir.

Yapılan bu tez çalışması ile geliştirilen *in vitro* rejenerasyon ve sentetik tohum protokollerinin, henüz klonal bir üretim protokolü bulunmayan ve yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olan *R. carnosula* endemiğinin, etkili şekilde klonal üretim ve genetik kaynak olarak uzun süreli *in vitro* muhafaza çalışmalarına katkı sağlaması beklenmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Embriyojenik kallus, Organogenesis, *Ricotia carnosula*, Sentetik tohum, Somatik embriyogenesis

JÜRİ: Doç. Dr. Esin ARI

Prof. Dr. Serpil GÖK TANGOLAR

Dr. Öğr. Üyesi Tolga YILDIRIM

ABSTRACT

IN VITRO REGENERATION AND SYNTHETIC SEED PRODUCTION IN ENDEMIC *RICOTIA CARNOSULA* BOISS. & HELDR. (BRASSICACEAE)

Melike DEMİR

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Esin ARI

February 2020; 95 page

Ricotia carnosula Boiss. & Heldr. (Brassicaceae) is an important endemic plant with a rich antioxidant content and pharmaceutical potential. It also has the feature of being used as a seasonal ornamental plant if it is supported by various cultivation or breeding studies. However, *R. carnosula* is among the endangered species in the LR-lc group, according to the IUCN (Red Plants List of Endangered Species) category. In this thesis, it is aimed to improve an efficient *in vitro* regeneration protocol of *R. carnosula* endemic, of which sustainable production and genetic resource conservation protocols are absent in the literature, through somatic embryogenesis or organogenesis. In addition, by transforming the obtained somatic embryos into synthetic seeds with encapsulation applications, it is aimed to form a basis for *R. carnosula*'s *in vitro* cryopreservation. The cotyledon and hypocotyls of *in vitro* seedlings developed from seeds were used as explants. In regeneration studies each of the explants was cultured in each of 73 different regeneration media consisting of IAA, 2,4-D, NAA as auxins and TDZ, BA, Zeatin as cytokinins in various concentrations and combinations. The effects of the explants and regeneration media and their interactions on the response, the formations of total callus, embryogenic callus, organogenic callus, anthocyanin, somatic embryogenesis and organogenesis were investigated.

At the end of the study, it was concluded that *R. carnosula* has a very high regeneration potential in terms of callus formation, somatic embryogenesis and organogenesis. Especially in control medium without any plant growth regulator (BGD), the observation of intense callus, somatic embryo, shoot and root structure formations revealed how high the endogenous hormone levels in the cotyledon and hypocotyl tissues of *R. carnosula*. In terms of embryogenic callus formation, as the average of 73 media, cotyledon explant (30.1%) was found to be more successful than hypocotyl explant (12.8%) while hypocotyl explant (11.9%) is better than cotyledon explant (4.9%) regarding organogenic callus formation. The highest direct somatic embryo formation (37.5%) occurred in cotyledons cultured in the 71st medium (1 mg / L Zeatin), while the highest indirect somatic embryo formation (75%) in the 11th medium (0.5 mg / L BA + 0.5 mg / L IAA) formed in cotyledons. The highest formation of direct organogenesis (100%) was obtained from hypocotyls in control environment without BGD, whereas the highest indirect organogenesis formation (62.5%) occurred in hypocotyl explants cultured in the 2nd medium (1 mg / L IAA). Finally, the highest somatic embryo yield (97 embryo / petri) occurred in cotyledons in the 58th medium (1 mg / L TDZ + 1 mg / L NAA), while the highest shoot yield (78.5 shoot / petri) formed in hypocotyls in 71th medium (1 mg / L Zeatin). Among the different encapsulation applications applied to the somatic embryos

formed, the combination of 100 mM CaCl₂ and 4% sodium alginate has been determined as the most suitable coating medium for the formation of synthetic seeds. Synthetic seeds obtained from this applications germinated up to 94%.

It is hoped that the *in vitro* regeneration and synthetic seed protocols developed with this thesis will contribute to the studies on effective clonal production of the *R. carnosula* endemic, which does not yet have a clonal production protocol and faces the danger of extinction, and long-term *in vitro* cryopreservation as a genetic resource.

KEYWORDS: Embryogenic callus, Organogenesis, *Ricotia carnosula*, Synthetic seed, Somatic embryogenesis

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Esin ARI

Prof. Dr. Serpil GÖK TANGOLAR

Assist. Prof. Dr. Tolga YILDIRIM

ÖNSÖZ

Ülkemiz endemik bitkilerinden *Ricotia carnosula*, yetiştiği doğal bölgelerde gerçekleştirilen yoğun yol çalışmaları başta olmak üzere çeşitli etmenler ve risklerden ötürü populasyon sayısını giderek kaybetmektedir. Bu nedenle *R. carnosula*, Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabında türü giderek azalan ve tehdit altında bulunan endemik bitki türleri listesi arasında yer almaktadır. Öte yandan *R. carnosula* morfolojik özellikleri ile süs bitkisi ve zengin antioksidan içeriği ile farmasötik değeri yüksek önemli bir tıbbi bitki kullanım potansiyeline sahiptir. Bu çalışmada *R. carnosula*'nın, bitki doku kültürü yöntemlerinden olan somatik embriyogenesis veya organogenesis tekniği ile rejenerasyonunun sağlanması, klon niteliğinde bitki elde edilmesi, böylece hızlı ve klonal üretim için uygun ve tekrarlanabilir bir rejenerasyon protokolünün oluşturulması amaçlanmıştır. Tez sonunda, önemli kullanım potansiyelleri taşıyan *R. carnosula* endemik türünün *in vitro* koşullarda hızlı ve sürdürülebilir üretim protokolü ile nesli tükenmekte olan bu türün genetik kaynak muhafazası için sentetik tohum protokolleri geliştirilmiştir.

Bu tezin şekillenmesinde ve tamamlanmasında beni destekleyen, laboratuvar çalışmalarında bütün imkanları sunarak, bilgi ve tecrübeleriyle yönlendiren ve doğru kaynaklara ulaşmamı sağlayan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Esin ARI'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez savunma jürimde yer alarak değerli tavsiye ve yorumlarıyla tezime son şeklini verilmesini sağlayan, kıymetli hocalarım Prof. Dr. Serpil GÖK TANGOLAR'a ve Dr. Öğr. Üyesi Tolga YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım.

Histolojik çalışmalarımın gerçekleştirilmesi ve yorumlanmasında özellikle laboratuvarlarında sağladıkları yardımlar için sayın Prof. Dr. Filiz VARDAR'a, yorum ve katkılarıyla destek olan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ş. Fatih TOPCUOĞLU'na, Prof. Dr. Mehmet Ziya FIRAT'a, Prof. Dr. Yıldız AYHAN'a, Prof. Dr. Arzu TÜRKER'e ve Dr. Sandeep Kumar VERMA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını ve bilgilerini bir an olsun esirgemeyen sevgili ablam Selcen DOĞAN'a, laboratuvar arkadaşlarıma ve tez sürecimdeki manevi desteklerinden dolayı değerli arkadaşlarım Büşra YİRMİBEŞ, Anıl Can TARAKÇI, Hanife BULUT ve Öykü ŞEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatımın her döneminde gerek maddi gerek manevi desteklerini her zaman hissettiğim çok kıymetli ailem, babam Mustafa DEMİR, annem Kadriye DEMİR, ablam Melek GENÇGİL ve çok değerli arkadaşım Yiğit ÖZKAN'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	6
2.1. Brassicaceae Familyasında Yapılan Somatik Embriyogenesis Çalışmaları.....	6
2.2. Brassicaceae Familyasında Yapılan Organogenesis Çalışmaları	14
2.3. Farklı Türlerdeki Sentetik Tohum Çalışmaları	20
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1. Bitkisel Materyal	24
3.2. Metot	24
3.2.1. <i>In vitro</i> stok bitki yetiştirme çalışmaları.....	24
3.2.2. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemeleri	26
3.2.3. Somatik embriyoları bitkiye dönüştürme ve aklimatizasyon çalışmaları....	28
3.2.4. Histolojik analizler.....	32
3.2.5. Sentetik tohum çalışmaları	34
3.2.6. İncelenen özellikler ve deneme deseni	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1. Kallus Bulguları	39
4.2. Antosiyanin Bulguları	49
4.3. Somatik Embriyogenesis Bulguları.....	55

4.4. Organogenesis Bulguları	64
4.5. Köklenme Bulguları	72
4.6. Sentetik Tohum Bulguları	79
4.7. Aklimatizasyon Bulguları.....	81
6. SONUÇLAR	83
7. KAYNAKLAR	87

ÖZGEÇMİŞ



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Endemik *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr. (Brassicaceae)’da *In Vitro* Rejenerasyon ve Sentetik Tohum Üretimi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

10/01/2020

Melike DEMİR



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
g/L	: gram/litre
mg/L	: Miligram/litre
°C	: Santigrad derece

Kısaltmalar

MS	: Murashige ve Skoog (1962) besin ortamı
NN	: Nitsch ve Nitsch (1969) besin ortamı
BGD	: Bitki gelişim düzenleyicisi
MES	: 2-Morpholino ethane sulfonic asit
KOH	: Potasyum hidroksit
HCL	: Hidroklorik asit
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksi asetik asit
NAA	: Naftalen asetik asit
IAA	: Indol-3-asetik asit
TDZ	: Thidiazuron
BA	: Benzil adenin
KIN	: Kinetin
FAA	: Formalin asetik alkol
GA	: Glutaraldehit
AgNO ₃	: Gümüş nitrat
SE	: Somatik embriyo

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. <i>Ricotia carnosula</i> 'nın doğadaki görüntüleri.....	24
Şekil 3.2. Sterilizasyon basamakları	25
Şekil 3.3. Kültüre alınan eksplantlardan oluşan kök yoğunluklarına ait görüntüler.....	38
Şekil 4.1. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarında oluşan embriyojenik kallus görüntüleri	47
Şekil 4.2. Rejenerasyon ortamlarında gelişen organojenik kalluslara ait görüntüler	48
Şekil 4.3. Kallus ve rejenerantlardaki antosiyanin oluşumlarına ait görüntüler	49
Şekil 4.4. 47 nolu rejenerasyon ortamında kültüre alınan hipokotil eksplantında oluşan indirekt somatik embriyogenesis görüntüleri	59
Şekil 4.5. 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ içeren 47. kültür ortamında gelişen sürgün ve somatik embriyo görüntüleri	60
Şekil 4.6. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarından elde edilen somatik embriyo (SE) aşamalarına ait görüntüler.....	62
Şekil 4.7. Somatik embriyo aşamalarına ait histolojik kesit görüntüleri	63
Şekil 4.8. Sekonder embriyogenesis'e ait görüntüler.....	64
Şekil 4.9. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarında direkt organogenesis ile oluşan <i>Ricotia carnosula</i> sürgünleri ve bunlara ait histolojik görüntüleri	73
Şekil 4.10. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarının kontrol ortamındaki gelişimlerine ait görüntüler	78
Şekil 4.11. Somatik embriyolardan oluşturulan sentetik tohumlara ait görüntüler	79
Şekil 4.12. <i>Ricotia carnosula</i> sentetik tohumlardan elde edilen <i>in vitro</i> bitkicikler.....	80
Şekil 4.13. Aklimatizasyonu yapılan rejenere bitkilere ait görüntüler	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tohum çimlendirme ortamlarının içerikleri	24
Çizelge 3.2. Çalışmanın tohum çimlendirme ve rejenerasyon aşamalarında kullanılan besin ortamlarının içerikleri ve konsantrasyonları	27
Çizelge 3.3. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarının rejenerasyon denemeleri için oluşturulan besin ortamları ve BGD içeriklerinin farklı bir gösterimi.....	29
Çizelge 3.4. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarının rejenerasyon denemeleri için oluşturulan besin ortamları ve BGD içeriklerinin toplu gösterimi	31
Çizelge 3.5. Parafine alma metodunda uygulanan aşamalar.....	32
Çizelge 3.6. Kesitlerin parafinden kurtarılması	33
Çizelge 3.7. Hematoksilen analiz yöntemi	34
Çizelge 3.8. Sentetik tohum elde edilmesinde kullanılan farklı sodyum aljinat ile kalsiyum klorür konsantrasyonları ve kombinasyonlarından oluşturulan kaplama ortamları	35
Çizelge 4.1. <i>Ricotia carnosula</i> rejenerasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotillerde oluşan tepki ve kallus özelliklerine ait varyans analiz sonuçları.....	39
Çizelge 4.2. <i>Ricotia carnosula</i> rejenerasyon denemelerinde oluşan tepki ve kallus özellikleri üzerine eksplantxortam interaksiyonunun etkileri	42
Çizelge 4.3. <i>Ricotia carnosula</i> rejenerasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotillerde meydana gelen rejenerasyon ve kallus oranları ile bunlara bağlı antosiyanin oluşum özelliklerine ait varyans analiz sonuçları	50
Çizelge 4.4. <i>Ricotia carnosula</i> rejenerasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotil eksplantlarından oluşan rejenerasyon ve kallus oranları ile bunlarda oluşan antosiyanin oranı üzerine eksplantxortam interaksiyonunun etkisine ait varyans analiz sonuçları	52
Çizelge 4.5. <i>Ricotia carnosula</i> rejenerasyon ortamlarında direkt ve indirekt olarak gelişen somatik embriyogenesis oran ve verimine ait varyans analiz sonuçları.....	56
Çizelge 4.6. <i>Ricotia carnosula</i> rejenerasyon ortamlarında direkt ve indirekt olarak gelişen organogenesis oran ve sayılarına ait varyans analiz sonuçları	65
Çizelge 4.7. <i>Ricotia carnosula</i> rejenerasyon ortamlarında gelişen somatik embriyogenesis, organogenesis ve rejenerant verimleri üzerine eksplantxortam interaksiyonunun etkisine ait varyans analiz sonuçları.....	69
Çizelge 4.8. <i>Ricotia carnosula</i> rejenerasyon ortamlarında gelişen kök oluşumlarına ait varyans analiz sonuçları	74

Çizelge 4.9. *Ricotia carnosula* rejenerasyon ortamlarından gelişen kök oluşumları üzerine eksplantxortam interaksiyonlarının etkisine ait varyans analiz sonuçları 76

Çizelge 4.10. Farklı sodyum aljinat ve kalsiyum klorür konsantrasyonları ile kapsüllenmiş *Ricotia carnosula* sentetik tohumlarının çimlenme oranları..... 80



1. GİRİŞ

Türkiye, farklı iklim tiplerine sahip olması bakımından üç floristik bölgenin kesişme noktasında bulunmaktadır. Bu nedenle biyolojik çeşitlilik konusunda dünyanın en zengin ülkelerinden birisidir (Uçar ve Turgut 2009). Son verilere göre Türkiye florasında 9996 tür, alt türleriyle birlikte 3649'u endemik olmak üzere 11707 doğal bitki taksonu bulunmaktadır (Arslan vd. 2015). Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de farklı kullanım amaçları nedeniyle doğal bitkilere olan talep giderek artmaktadır. Bununla birlikte, bitkilerin bir kısmı doğal üretimi yapılmaksızın sadece doğal florasından toplanarak yok olmaya mahkum bırakılmıştır. Özellikle tıbbi bitkilere olan talep artışı, bazı endemik bitki türlerinin neslinin giderek azalmasına neden olmaktadır. Bu durum doğal ve tıbbi öneme sahip olan bitki türlerinin hızlı bir şekilde kültüre alınmasının önemini gündeme getirmektedir.

Dünyadaki 25 biyoçeşitlilik noktasından birisi olan Akdeniz havzasına ait flora, 24000 bitki türünü barındırmakta olup, bunlardan %60'ını endemik bitkiler oluşturmaktadır (Greuter 1991; Myers vd. 2000). Bu durum Akdeniz bölgesinin bitkisel gen kaynakları bakımından diğer bölgelere göre, hatta dünya geneline bakıldığında çok önemli bir konumda olduğunu göstermektedir.

Akdeniz bölgesinin doğal bitki türlerinden olan *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr., Türkiye florasında yetişen ve Brassicaceae familyasının bir üyesi olan endemik türler arasında yer almaktadır. *R. carnosula* Akdeniz bölgesinde Antalya, Muğla ve Osmaniye illerinde doğal yayılış gösteren, tek yıllık ve otsu özellikte bir bitkidir (Davis 1965).

R. carnosula yetişme koşulları yönünden, nikelce zengin, eğimli ve kayalık bölgelerde, Mart-Nisan aylarında çiçek açma özelliği göstermekte ve bitkinin boyu yaklaşık 20-30 cm'ye kadar uzanmaktadır (Arı 2010a). Özellikle serpantin anakayalarda ve *Pinus brutia* Ten. (kızılçam) altı kayalıklarda yayılış gösterdiği bildirilmiştir (Özüdoğru 2015). Serpantin kayalar, endemizm bakımından ilişkilendirildiğinde, tüm dünyada endemik türlerin yayılış gösterdiği zengin habitatlar olarak bilinmektedir (Brooks 1987; Kruckeberg 2002). Örneğin; %1.5'i serpantin kayalarla kaplı olan Kaliforniya'da, 1410 bitkinin 176'sı serpantinlere endemiktir (Brady vd. 2005). Bunun yanında Küba'nın sadece %7'si serpantin olmasına rağmen ülkenin 6375 bitki türünden 920'si serpantin kayalara endemiktir (Reeves vd. 1999). Türkiye'de yayılış gösteren serpantin topraklarına bakıldığında ise Antalya, Muğla, Adana, Doğu Toroslar'da Mersin ve Kuzeydoğusu, Niğde, Kütahya, Balıkesir, Ankara ve Çanakkale gibi Ülkemizin çeşitli bölgelerinde rastlanırken, bu bölgelerin endemizm açısından önemli olduğu bildirilmiştir (Hoşgören 2000).

Ricotia cinsinin Türkiye florasında yayılış gösteren dokuz farklı türü bulunmaktadır. *R. carnosula*'yı diğer türlerden ayıran özelliklerden birisi kotiledon yapraklarının etli olmasıdır. Latince tür epiteti olan "carnosula" "etli" anlamına gelmektedir (Özüdoğru 2015). *R. carnosula*'nın çiçek yapısı incelendiğinde konik, lineer-oblong yapıda, hafif kokulu, beyaz pembe ve lila renklerde, 4 petalli, küçük (11-12 mm) çiçeklere sahip olduğu kaydedilmiştir (Arı 2010a). Kök yapısı genel olarak zayıf, gövdesi silindirik ve erken dönemde tabandan itibaren dallanan morfolojik özelliklere sahiptir (Özüdoğru 2015). *R. carnosula* doğal türünün farklı kültür ve ıslah çalışmaları ile bitki

çapının genişletilmesi ve çiçeklenme süresinin uzatılması halinde alternatif bir mevsimlik süs bitkisi olma potansiyeli barındırdığı bildirilmiştir (Arı 2010a; Arı vd. 2010b).

Ülkemiz coğrafi konumu, zengin genetik çeşitlilik ve endemik türleri barındırması nedeniyle, bitkisel metabolitler açısından önemli ve zengin bir rezerve sahiptir. *R. carnosula*'nın yapılan sekonder metabolit analizleri, bu bitkide reductorose, saponin, nitrojen bileşikler, flavonoid, tannin, lipid ve siyanojenetik glikozitlerin varlığını ortaya koymuştur (Arı 2010a). Bunun yanında, aralarında *R. carnosula*'nın da bulunduğu farklı tıbbi ve doğal bitkilerin nörobiyolojik aktivitelerinin ölçüldüğü bir çalışmada, (Orhan vd. 2015; Orhan vd. 2016) *R. carnosula*'nın zengin antioksidan içeriğine sahip olduğu ortaya koyulmuştur. Dünya Sağlık Örgütü tarafından temel ilaçlar kapsamında ilan edilen 252 ilacın %11'inin bitkisel sekonder metabolitlerden üretildiği göz önünde bulundurulduğunda, metabolit açısından zengin bitkilerin ıslahı ve genetik kaynaklarının muhafazası büyük önem taşımaktadır (Rates 2001).

Endemik bitki türleri küresel ısınmaya bağlı olarak iklim değişikliği ya da çok dar bir alanda yayılış göstermeleri sebebiyle yok olma tehlikesi altında bulunmaktadır. Bunun yanı sıra ilaç, gıda veya süs bitkisi kullanımı, tarla açma, aşırı otlatma, sanayileşme, kenstsel yapılaşma gibi doğal ve insan kaynaklı etmenler sonucu da türü tehdit altına giren endemik bitkiler bulunmaktadır (Ekim 2010; Karagöz vd. 2015). Akdeniz bölgesinde yayılış gösteren *R. carnosula* IUCN (Nesli Tükenme Tehlikesi Altında Olan Türlerin Kırmızı Bitkiler Listesi) kategorisine göre, LR-lc grubunda, türü tehdit altında bulunan bitkiler arasında yer almaktadır (Ekim vd. 2000). Hatta, Antalya Kemer bölgesinde bulunan küçük *R. carnosula* popülasyonlarının, yol çalışmalarından ötürü önemli ölçüde zarar gördüğü ve popülasyonun zaman içerisinde giderek azaldığı bildirilmiştir (Arı vd. 2010b). Bu noktada belirtmek gerekirse; bitki doku kültürü yöntemleri kullanılarak *in vitro* koşullarda gerçekleştirilecek bitki rejenerasyonu ve klonal çoğaltım protokollerinin geliştirilmesinin, *R. carnosula* üzerindeki yok olma baskısını azaltarak, potansiyel kullanımının önünü açacağı düşünülmektedir.

Son yirmi yılda bitki genetik kaynaklarının giderek azalması ile Paunescu (2009), türü tehdit altında olan birçok endemik bitki popülasyonunun artması, yeni *ex situ* koruma yaklaşımlarının geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Bu kapsamda Dünya Bitki Koruma Stratejisinin nihai uzun vadeli hedefi, dünyadaki bitki çeşitliliğinin devam eden kaybını durdurmaktır (<http://www.bgci.org/worldwide/gspc/>). Biyoteknolojideki gelişmeler, bitki genetik kaynaklarının korunması ve yönetimi için, özellikle *in vitro* doku kültürü teknikleri kullanılarak, değerli bir *ex situ* koruma alternatifini bize sunmaktadır. Doku kültürü uygulamaları, nesli tükenme tehlikesi altında olan bitkilerin korunması ve çoğaltılması hususunda büyük önem kazanmış ve bir çok bilim insanı tarafından bu bitkilerin *in vitro* olarak üretimi ve genetik kaynak muhafazasının sağlanmasında etkin bir yeri olduğunu vurgulamışlardır (Acemi vd. 2012a, b). Son zamanlarda kapsamlı germplazm koleksiyonlarının kurulmasıyla, bitki genetik kaynak koruma alanında *in vitro* teknikler giderek daha da fazla kullanılmaktadır (Sarasan vd. 2006).

Doku kültürü; bitki doku, organ veya hücrelerinin bitki yada bitkisel ürünlerin oluşturulması amacıyla steril koşullar altında, yapay besin ortamlarında kültüre alınmasını ele alan biyoteknolojik bir yaklaşımdır. Somatik embriyogenesis, organogenesis, mikroçoğaltım, germplazm muhafazası, hastalıklardan ari bitkilerin üretimi, haploid bitki üretimi, sekonder metabolit üretimi, protoplast füzyonu, somatik

melezleme, embriyo kültürü, somoklonal varyasyon gibi birçok *in vitro* yöntem bitki doku kültürü çalışma alanı kapsamındadır. Özellikle genetik iyileştirme, yeni çeşit geliştirme, kaybolan türlerin muhafazası ve üretimi, doku kültürünün temel amaçları arasında yer almaktadır. Bu noktada yapılması gerekli olan en temel sistem, başarılı bir bitki rejenerasyonunun sağlanmasıdır (Babaoğlu vd. 2001). Bitkilerin *in vitro* kültür ile çoğaltılması genellikle organogenesis ve somatik embriyogenesis yoluyla gerçekleştirilmektedir (Fehér vd. 2003).

Organogenesis genel olarak bitkilerin çoğaltılmasında kullanılan *in vitro* rejenerasyon yöntemleri arasında yer almaktadır. *In vitro* organogenesis, aseptik koşullarda kültüre alınmış ana dokudaki bir çıkıntı şeklinde kendini gösteren ve yeni bir organ oluşumu süreci olarak tanımlanmaktadır (Roostika ve Mariska 2003). Bitkilerde doku kültürü ile organogenesis, doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki farklı süreçte gerçekleşebilmektedir. Bu süreç ya meristem hücrelerinden doğrudan ya da kallus kümelerinden dolaylı olarak farklılaşmaların meydana gelmesi ile yaprak, sürgün ve kök gibi organ oluşumlarını kapsamaktadır.

Etkili bir rejenerasyon sistemi için, kültür ortamının içerdiği bitki gelişim düzenleyici (BGD) miktarları önemlidir. Özellikle farklı konsantrasyonlarda bulunan BGD'ler meristem hücrelerinin gelişmesine bağlı olarak farklı organ oluşumları ile sonuçlanmaktadır (Onay vd. 2019). Sürgün oluşum sürecine bakıldığında ise ya doğrudan bir eksplant üzerinde veya dolaylı olarak eksplantta üretilen kallus hücrelerinden başlatılır. Doğru eksplant ve BGD miktarı seçimi, sürgün oluşumunun başarısını önemli düzeyde etkilemektedir (Hartmann, Davis ve Geneve 2007). Organogenesis, bitkileri çoğaltmak için popüler bir yöntem haline gelmiştir ve diğer rejenerasyon prosedürlerine kıyasla Brassicaceae türlerinin rejenerasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır (Cardoza ve Stewart 2004).

Bitki rejenerasyonu için yaygın olarak kullanılan diğer bir yöntem ise somatik embriyogenesis tekniğidir. Bu yöntem, *in vitro* kültür şartları altında bitki somatik hücrelerinin farklılaşarak somatik embriyo yapılarına dönüşmesi temeline dayanmaktadır. Böylece elde edilen somatik embriyolardan, genetik alt yapıları aynı, klon niteliğinde bitkiler elde edilmektedir (Babaoğlu vd. 2001; Shahzad vd. 2016). Somatik embriyo oluşum süreci ilk olarak indüksiyon, ekspresyon ve proembriyojenik kümelerin meydana gelmesi ile başlayıp, ardından somatik embriyoların oluşumu, olgunlaşması, çimlenmesi ve bitki oluşumu gibi adımları kapsayan bir rejenerasyon işlemidir (Högberget vd. 2001; Bozhkov vd. 2002; Zavattieri vd. 2010). Bu aşamalar farklı fizyolojik, morfolojik ve moleküler olaylar ile karakterize edilmektedir (Zavattieri vd. 2010).

Somatik embriyo oluşumunda, doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki farklı gelişimsel süreç izlenebilmektedir. Direkt olarak meydana gelen somatik embriyolar, kallus oluşum aşaması olmaksızın, eksplant üzerindeki tek bir hücre ya da hücre gruplarındaki farklılaşmalardan meydana gelmektedir. İndirekt olarak meydana gelen embriyo oluşumu ise öncelikle eksplantların ilk aşamada organize olmamış hücre topluluğu olarak tanımlanan kallusa dönüşmesi ile başlamaktadır. Bu sürecin ardından, kallusların yüksek konsantrasyonda oksin içeren bir kültür ortamına transfer edilmesiyle embriyojenik kalluslar oluşum gösterir. Embriyojenik kallusların BGD içermeyen kültür ortamlarına transfer edilmesiyle de somatik embriyolar oluşur ve bu da indirekt somatik

embriyogenesis süreci olarak tanımlanır (Williams ve Maheswaran 1986; Horstman vd. 2017).

İndirekt somatik embriyogenesis uyartımı ve dolaylı somatik embriyoların sayısını arttırmak için BGD'lerden genellikle 2,4 diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) gibi oksinlere ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir (Lloyd vd. 1980; Pasternak 2002; Raghavan 2004; Vondrakova vd. 2011). Ancak somatik embriyoların oluşum ve olgunlaşma gösterdiği aşamalarda BGD içermeyen kültür ortamlarına transferi gereklidir. Çünkü kültür ortamında bulunan BGD'nin etkisi embriyo gelişimini ve daha sonra bitkiye dönüşme potansiyelini olumsuz şekilde etkilemektedir (Pasternak 2002; Zavattieri vd. 2010). Yapılan somatik embriyo çalışmalarında, BGD'lerin dışında ağır metal uygulamaları, ozmotik şoklar, kültür ortamına ilave edilen besin maddelerinin açlık stresi gibi farklı stres koşulları da somatik embriyogenezin başlatılması ve embriyo sayısının artırılmasında etkilidir. Bunun yanı sıra eksplant tipi, eksplant yaşı, genotip ve kullanılan besin ortamları da somatik embriyo oluşumunda etkili olan çeşitli faktörler arasında yer almaktadır (Onay vd. 2019).

Kültüre alınan somatik dokulardan oluşan embriyolar tam bir bitki oluşturma potansiyeline sahiptirler. Somatik embriyolar *in vitro* koşullarda elde edilebildiği gibi doğada da kendiliğinden oluşum gösterebilmektedir (Onay vd. 2012). Somatik embriyogenesis, meydana gelen embriyoların morfolojik olarak zigotik embriyolara benzerlik gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuş ve zigotik embriyolarda olduğu gibi globular, kalp, torpido ve kotiledon gibi gelişim safhalarını izlediği bildirilmiştir (Winkelmann vd. 2006). Somatik embriyogenesis, klonal çoğaltıma yönelik en iyi yaklaşımlardan biri olarak görülmektedir ve embriyolojik çalışmalarda model bir sistem olarak kullanılmaktadır. Somatik embriyogenesis yöntemi kısa bir sürede bitkilerin çoğaltılması ve ticari seviyelerde büyük ölçekli üretimin gerçekleştirilmesinde önemli bir araç olarak görülmektedir (Von Arlond vd. 2002).

Somatik embriyogenesis yöntemi ilk defa Steward vd. (1958) tarafından kullanılarak, havuç bitkisinde (*Daucus carota*) başarılı bir rejenerasyon çalışması yapılmıştır. Yine pek çok süs ve bahçe bitkisinin mikroçoğaltımında özellikle de orman ağaçlarının çoğaltılmasında somatik embriyogenesis tekniği kullanılarak başarılı *in vitro* rejenerasyon protokolleri geliştirilmiştir (Germina ve Lambardi 2016).

Somatik embriyogenesis yöntemi kullanılarak elde edilecek çok sayıdaki embriyodan, kısa sürede ve çok sayıda klonal bitki elde etmek mümkündür. Elde edilen somatik embriyolar sodyum aljinat, potasyum aljinat, karragen, jelatin, sodyum pektat, karboksimetil selüloz gibi kimyasal ajanlarla kaplanarak, gerçek tohumun analoğu olan sentetik tohumlar meydana getirilebilmektedir (Rai vd. 2009). Sentetik tohum teknolojisi, başarılı bir çimlenme ve sağlıklı bir bitkiye dönüşme için uygun eksplantın seçilmesiyle birlikte uygun bir matraste kapsüllenmesi sürecini içermektedir. Bu yöntem ile, tohum çimlenmesi ile oluşan doğal bitki gelişimi taklit edilmektedir (Saxena vd. 2019). Bu metod çeşitli orman, tıbbi ve sebze bitki türlerinin çoğaltılması ve depolanması için başarıyla kullanılmıştır. Yapay tohum oluşturulması, germplazm korunmasında kullanılabilecek materyal olarak somatik embriyoların bir başka önemli kullanım alanını oluşturmaktadır (Shahzad vd. 2016). Sentetik olarak kapsüllenmiş somatik embriyolar, *in vitro* veya *in vivo* koşullar altında ekilebilmekte ve klon bitkiler üretebilmektedir (Khor ve Loh 2005). Ekonomik ve tıbbi açıdan önemli olması ya da

türünün tehlike altında bulunması gibi sebepler nedeniyle *in vitro* koşullarda elde edilmiş somatik embriyoları sentetik tohumla dönüştürülmüş pek çok bitki türü bulunmaktadır (İpekci ve Gözükırmızı 2003; Manjkhola 2005; Pintos vd. 2008; Baskaran vd. 2015).

Bu tez çalışmasında, türü tehdit altında olan *R. carnosula* endemiğinin, klonal ve hızlı üretimi için, bitki doku kültürü yöntemlerinden olan somatik embriyogenesis ve organogenesis gibi çeşitli *in vitro* yöntemler kullanılarak, etkin bir rejenerasyonunun sağlanması ve bununla birlikte, genetik kaynak muhafazası için sentetik tohum üretimi gibi *in vitro* korunmasına yönelik tekrarlanabilir rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda *R. carnosula* türünün, *in vitro* kültür koşullarında çimlenme ve somatik embriyo oluşturma tepkisi ilk kez belirlenmiştir. Türü yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan bu endemik bitki türünün, sentetik tohumları ilk kez geliştirilerek bunların çimlenme performansları tespit edilmiştir. *R. carnosula* bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu ile ilgili literatürde herhangi bir bilgiye rastlanılmamıştır. Sonuç olarak bu özgün çalışma sayesinde; *R. carnosula* endemik bitki materyalinin *in vitro* koşullarda ilk kez kültüre alınması ve biyoteknolojik yöntemler yardımıyla, *in vitro* rejenerasyon ve sentetik tohum protokollerinin ilk kez geliştirilmiş olmasının, bu değerli endemik bitkinin genetik kaynak muhafazası için önemli bir bilimsel altyapı oluşturulmuştur.

2. KAYNAK TARAMASI

Literatür incelendiğinde, *R. carnosula* ile yapılmış sınırlı sayıda çalışma ile karşılaşmıştır. Bu çalışmaların; taksonomik, morfolojik, *in vivo* koşullarda gerçekleştirilen az sayıdaki kültüre alma çalışmaları ve bazı metabolitlerinin belirlenmesine yönelik ön araştırmalar olduğu görülmektedir (Arı 2010; Özudoğru 2015; Orhan vd. 2016). *R. carnosula*'nın bağlı olduğu familya olan Brassicaceae'daki diğer türlerde yapılan çalışmalar incelendiğinde ise perisikl hücreleri, stigma, hipokotil, kotiledon, yaprak gibi eksplantların kullanılarak başarılı sonuçların elde edildiği somatik embriyogenesis çalışmaları bulunmaktadır (Choi vd. 1996; Koh ve Loh 2000; Kumari vd. 2000; Leroy vd. 2000; Zenkteler vd. 2006; Qin vd. 2006; Yang vd. 2010; Siong vd. 2011). *R. carnosula* endemiğinin *in vitro* rejenerasyonu ile ilgili henüz literatürde yapılmış bir çalışmaya rastlanılmadığı için öncelikli olarak bu bölümde Brassicaceae familyasındaki diğer türlerde yapılmış olan somatik embriyogenesis çalışmalarına yer verilmiştir.

2.1. Brassicaceae Familyasında Yapılan Somatik Embriyogenesis Çalışmaları

Kirti (1988), iki farklı kolza çeşidi olan Geres ve Duplo'da agaroz kaplama sistemi kullanarak protoplast kaynaklı kalluslardan somatik embriyo indüksiyonunu sağlamıştır. Brassicaceae familyasında somatik embriyo elde etmek üzere hipokotil eksplantından izole edilen protoplastların kültüre alınması ile daha iyi sonuçlar ortaya koyduğu Glimelius (1984), tarafında bildirilmiştir. Bu nedenle protoplastlar hipokotillerden izole edilip 2,4-D (1.0 mg/L), NAA (0.1 mg/L), BAP (0.4 mg/L) ve mannitol (7%) içeren protoplast kültür ortamına transfer edilmiştir. Dört hafta sonra elde edilen hücre kolonileri somatik embriyogenesisi indüklemek için iki aşamadan oluşan "Embriyoid indüksiyon ortamı I" ve "Embriyoid indüksiyon ortamı II"den oluşan kültür ortamlarına aktarılmıştır. İlk aşamada hindistan cevizi suyu (%10), 2,4D (3.0 mg/L) içeren MS ortamı kullanılmış, ikinci aşamada ise 2 mm çapına ulaşmış olan kalluslar, 2,4-D içermeyen, sadece hindistan cevizi suyu (%10), BAP (3.0 mg/L) ve GA₃ (0.1 mg/L)'içeren MS ortamına transfer edilmiştir. Yeşil ve iyi gelişmiş embriyoidler BGD içermeyen MS ortamına aktarılmıştır. Çalışma sonucunda kalluslardan Geres çeşidinde 38 adet, Duplo çeşidinde ise 143 adet somatik embriyo rejenerasyonu sağlanmış olup, zaman içerisinde sekonder embriyo oluşumları da gözlemlenmiştir. Aynı zamanda sekonder embriyolardan 20'den fazla sürgün oluşumu meydana gelmiştir.

Parihar vd. (1995), *Brassica napus*'da somatik embriyogenesis yoluyla yüksek frekanslı protoplast rejenerasyonu için basit bir protokol geliştirmişlerdir. ISN706 (AACC) genotipinin 8-12 günlük fidelerinden hipokotil dokuları kullanılarak protoplastları izole edilmiştir. Bu protoplastlar KM (A) ortamında kültürlenmiş ve %30-35 arasında değişen bir frekansta yüksek bölünme oranı göstermiştir. Gelişen koloniler yaklaşık 2 ile 4 mm'ye ulaşana kadar sıvı kültür ortamında tutulmuştur. Bu aşamada oluşan mikrokalluslar 5.0 mg/L 2iP, 0.1 mg/L NAA, 0.001 mg/L GA₃, 0.5 g/L PVP, 0.5 g/L MES ve 5.0 mg/L AgNO₃ içeren bir rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Bu çalışma ile kültüre alınan mikrokallusların küçük bir yüzdesinde farklılaşma olmadığı ve büyük kallusların oluşum gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmada %10-15 oranında organogenesis oluşumu sağlanırken, %70-80 oranında embriyogenesis oluşumu tespit edilmiştir. Meydana gelen somatik embriyolar bitkiciklere dönüşürken aynı zamanda bir sekonder embriyo oluşumu da sergilemiştir.

Choi vd. (1996) Çin lahanasının üç farklı çeşidi üzerinde somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonunu sağlamaya çalışmışlardır. Eksplant tipi olarak 5-8 ve 10 günlük fidelerden oluşan kotiledon ve hipokotilleri kullanılarak 2,4-D oksin hormonunun çeşitli konsantrasyonlarını içeren MS bazal ortamında kültüre almışlardır. Kotiledon eksplantlarından meydana gelen kalluslar her dört haftada bir 4.52 μ M 2,4-D içeren alt kültür ortamlarına transfer edilmiştir. Embriyojenik kallus oluşumu için 2,4-D'nin optimum konsantrasyonu 4.52 μ M ile 9.04 μ M arasında olduğu bildirilmiştir. Kültüre alınan kalluslardan kotiledon aşamasına kadar farklı evrede embriyolar elde edilmiş ve aynı zamanda sekonder embriyo oluşumları da gözlenmiştir. Kullanılan üç çeşidin hipokotil eksplantlarından, fidelerin yaşı veya 2,4-D konsantrasyonu ne olursa olsun somatik embriyo üretiminin başarısız olduğu ortaya konulmuştur. "Top Salad" çeşidinde ise somatik embriyo oluşumu gözlenmiş ve kotiledon aşamasına kadar ulaşan bu embriyolar MS kültür ortamına transfer edildikten sonra bitkiciklere dönüştürülerek saksılara aktarımı yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, üç çeşit arasında sadece "Top Salad" çeşidinden kotiledon eksplantlarından embriyo elde edilmesi ile, somatik embriyogenesis yöntemi kullanılarak bitki rejenerasyonunun sağlanmasında genotip faktörünün etkisi ortaya konulmuştur.

Craig vd. (1997), türünde sap kısmındaki internod eksplantlarını kullanarak verimli ve tekrarlanabilir bir somatik embriyo rejenerasyonu sağlamışlardır. Internodlar 9 mM 2,4-D içeren MS bazlı ortamda kültüre alındığında, eksplantların üçte birinde somatik embriyoların indüklendiği tespit edilmiştir. İlk olarak 28-30 günlük bir süreden sonra %66.9 oranında dağılgan kalluslar elde edilmiştir. 56-60 günlük kültür sürecinden sonra, nodüler yapıda kalluslardan somatik embriyo oluşumları gözlemlenmiştir. Oluşan somatik embriyolar hormon içermeyen kültür ortamlarına ya da 0.5 mM 2,4-D, 2.9 mM GA₃ içeren ½ MS ortamına transfer edilmiştir. Öte yandan somatik embriyoların BGD içermeyen ortamda çimlendirilmesiyle, %90'dan daha fazla oranda bitki rejenerasyonu gözlenmiştir. 4-5 cm yüksekliğe ulaşan çimlendirilmiş embriyolar, saksılara aktarılacak bireysel bitkilerin oluşumu sağlanmıştır. Rejenere edilen bitkilerde, yapılan çeşitli analizlerle bunların diploid yapıda verimli oldukları ve morfolojik olarak *M. arvensis*'in tohumlarından elde edilmiş bitkilerle benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmayla birlikte, *M. Arvensis*'in rejenerasyonu sağlanmış ve C3-C4 metabolizmasında yer alan genlerin izolasyonu, transferi ve gen tanımlama gibi çeşitli çalışmalarda kolaylık sağlanabileceği bildirilmiştir.

Leroy vd. (2000), *Brassica oleracea* var. *botrytis* L.'de somatik embriyogenesis elde etmek için hipokotil eksplantlarını 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L kinetin içeren MS ortamında kültüre almış ve kallogenesis oluşumunu indüklemişlerdir. Hipokotillerden oluşan mikrokalluslar her üç haftada bir 0,1 mg/L ya da 1 mg/L 2,4-D ve kinetin içeren ortamlarda alt kültüre alınmıştır. Oluşan kallusların olgunlaşma ortamına aktarılmasıyla, somatik embriyolar meydana gelmiş ve aynı zamanda globular, kalp ve torpido aşamaları da gözlemlenmiştir. İki aylık kültürden sonra embriyolardan 35 bitki rejenerasyonu sağlanıp başarılı bir şekilde aklimatizasyonu yapılmıştır. Kallusların rejenerasyonu ise 8 aydan fazla bir süre boyunca devam ettirilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen bitkiler, genomik varyasyonları karakterize etme yetenekleri açısından test edilmiştir. ISSR markırları kullanılarak aynı çeşitten farklı rejenerantlar arasında polimorfizmin olmadığı ve rejenerasyon protokolünün uygulanabilirliği ortaya konulmuştur.

Koh ve Loh (2000), *Brassica napus*'da direkt somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonunu indüklemek için basit bir yöntem geliştirmişlerdir. *In vitro* koşullarda stok bitkiler yetiştirilirken, aynı zamanda tohum yaşı ve pH'nın etkisini de test etmişlerdir. Eksplant olarak hem olgun hem de olgunlaşmamış tohumlar (tozlaşma sonrası 15-24 günlük) kullanılmış, besiyerinin pH'sı 3.5, 4, 5, 6 ve 7 olacak şekilde ayarlanmıştır. MS bazal ortamında oluşan fidelerin, hipokotil ve kotiledon eksplantları üzerinde somatik embriyolar meydana gelmiştir. Düşük pH (3.5-5) değerine sahip ortamlar, yüksek pH'a (6-7) göre somatik embriyogenez açısından daha elverişli bulunmuştur. Tohumların embriyojenik potansiyeli, tohum yaşı ile ters bir korelasyon göstermiştir. Tozlaşma sonrası 14-24 günlük olgunlaşmamış tohumların yaklaşık %41-68'i somatik embriyoları meydana getirmiştir. Oluşan embriyoların yaklaşık %54'ü aynı ortamda alt kültüre alındıktan sonra sekonder embriyo üretimi gözlenmiştir. Sekonder embriyoların %75'i MS ortamında çimlendirilmiş ve bitkicikler geliştirilmiştir. 10^{-6} μ M Zeatin ile zenginleştirilmiş indüksiyon ortamına aktarılan bitkicikler %40 oranında çiçek üretmiştir.

Gaj (2002), *Arabidopsis thaliana* (L.)'nın olgunlaşmamış zigotik embriyolarını kullanarak, ışık koşulları, indüksiyon ortamının fiziksel durumu ve mutajenik uygulamalar ile çeşitli gelişim evrelerinde bulunan eksplantların embriyojenik yeteneği üzerindeki etkisini araştırmıştır. Doğrudan somatik embriyogenezin (DSE) etkinliği, erken (ES) ve geç (LS) gelişimsel evrede olan olgunlaşmamış zigotik embriyoların kültüre alınmasıyla analiz edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, indüksiyon ortamının (katı veya sıvı) fiziksel durumunun, eksplantların embriyojenik yeteneğini etkilemediği ve her iki durumda da LS olgunlaşmamış zigotik embriyoların yüksek oranda DSE verimi gösterdiği ortaya konulmuştur. Hem katı hem de sıvı indüksiyon ortamında, ES eksplantları, LS eksplantlarından %25.8–37.3 yani 2.5–3 kat daha düşük bir frekansta somatik embriyolar üretmiştir. Ayrıca eksplantlar iki farklı kimyasal mutajen olan N-nitroso n-metil üre (MNH) ve etil metan sülfonat (EMS) ile muamale edilmiş ve sonuç olarak, ES eksplantlarının kültüründe somatik embriyo oluşum verimliliği araştırılmıştır. En etkili DSE indüksiyonu, sırasıyla 0.125-1.0 mM x 3 saat ve % 0.05-0.2 x 18 saat dozlarında MNH ve EMS uygulandığında gözlenmiştir. Öte yandan DSE'lerin karanlıkta indüklenmesiyle ES eksplantlarının (%69.8'e kadar) embriyojenik yapılar oluşturduğu tespit edilmiş ve aynı zamanda 16 saatlik ışıklı kültürlere kıyasla, DSE oluşumu üzerinde yaklaşık 2 kat daha fazla etkisi olduğu belirlenmiştir. Işık koşullarından bağımsız olarak, LS zigotik embriyoların % 80'inden fazlası somatik embriyo üretmiştir.

Dal Corso vd. (2005), ağır metal toleranslı ve hiperakümülatör bitki olan *Arabidopsis halleri*'nin *in vitro* bitki rejenerasyonunu geliştirmeye çalışmışlardır. Bitkiler, kök eksplantlarından kallus indüksiyonu, somatik embriyoların indüksiyonu ve sürgün gelişimi olarak üç aşamalı bir prosedürle elde edilmiştir. İlk olarak kök, yaprak ve yaprak sapı eksplantları kallus indüksiyonu için 0.5 mg/L 2,4-D ve 0.05 mg/L KIN içeren MS ortamında kültüre alınmış ve 2 hafta sonra kallus oluşumu gözlenmiştir. Sadece kök segmentlerinde oluşan kalluslar, 2.0 mg/L 6- α - α - (dimetilallilamino)-purin (2ip) ve 0.05 mg/L NAA içeren kültür ortamına transfer edilmiş ve burada %40 oranında embriyojenik yapılar meydana gelmiştir. Aynı ortamda gelişmeye devam eden embriyojenik kalluslar da %38 oranında sürgün rejenerasyonu ile sonuçlanmıştır. Elde edilen sürgünlerin hormonsuz MS ortamına aktarılmasıyla %50 oranında kök rejenerasyonu oluşturulmuştur. Kök sistemine sahip sürgünler gelişimini tamamlaması

için 3 hafta boyunca aynı ortamda muhafaza edilmiş ve sera koşullarındaki saksılara aktarılarak büyümeleri sağlanmıştır. Yapılan gözlemler sonucunda rejenere bitkiler, donör bitkilere kıyasla morfolojik ve büyüme özellikleri bakımından saptanabilir bir varyasyon oluşturmamıştır.

Zhang vd. (2005), *Eruca sativa* bitkisinde kotiledon ve hipokotil eksplantları kullanarak somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu için yeni bir protokol geliştirmişlerdir. Eksplantlar çeşitli konsantrasyonlarda 2,4-D, IBA, IAA, NAA ve BA ile desteklenmiş MS besiyerinde kültüre alınmıştır. 4.52 μ M 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınan eksplantlar, dört haftalık kültür sürecinin ardından embriyojenik kalluslar oluşturmaya başlamıştır. İlk indüksiyon ortamından sonra elde edilen embriyojenik kalluslar farklı konsantrasyonları bulunan (0.56, 1.13, 2.26, 4.52, 9.04 ve 18.08 μ M) 2,4-D'li MS ortamlarına transfer edilmiş ve üç haftada bir ortam yenilemesi yapılmıştır. Embriyojenik kalluslar olgunlaşma için çeşitli konsantrasyonlarda absisik asit (ABA), polietilen glikol (PEG)-4000, sukroz ve aktif kömür (AC) ile desteklenmiş MS ortamına aktarılmıştır. En fazla embriyojenik kallus, 4.52 μ M 2,4-D içeren MS ortamında sağlanırken, kotiledon eksplantında %83.9, hipokotil eksplantında ise %64.8 oranında oluşum göstermiştir. Somatik embriyolar 45 g/L PEG bulunan MS ortamına aktarıldığında olgun embriyo halini almış ve uygulanan kurutma işleminden sonra 0.24 μ M IBA içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamında kültüre alınarak yeni bitkiciklerin oluşması sağlanmıştır. Öte yandan 0.56 μ M 2,4-D içeren kültür ortamında sekonder embriyogenesis için etkili olmuş ve primer embriyojenik kallusların %82'si ikincil embriyoları meydana getirmiştir. Çimlenen somatik embriyolardan oluşan bitkicikler, aklimatize edilmiş ve %75'inin hayatta kaldığı bildirilmiştir.

Brassicaceae familyasına ait çok yıllık bir bitki olan *Chorispora bungeana*'da, normal koşullar altında çimlenme problemi ile karşılaşıldığı için Wang vd. (2006) tarafından somatik embriyogenez yoluyla yeni bir *in vitro* rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. İlk olarak yaprak eksplantları 4.0 mg/L GA₃, 0.2 mg/L NAA ve 0.2 mg/L 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınmış ve oluşan primer kalluslardan hücre süspansiyon kültürü yapılmıştır. Süspansiyon kültürü, 1.0 mg/L KIN ve 0.2 mg/L NAA ile desteklenmiş sıvı MS ortamında kallus partiküllerinin inkübasyonu ile başlatılmıştır. Gelişim gösteren kalluslar küçük parçalara ayrılarak 1.0 mg/L KIN ve 0.2 mg/L NAA içeren 50 ml'lik sıvı MS ortamlarına transfer edilmiştir. Dört haftalık kültür sürecinin ardından, somatik embriyolar oluşum göstermeye başlamış ve erken kotiledon aşamasına gelen embriyolarda sukroz konsantrasyonunun bitki gelişimi üzerindeki etkisi test edilmiştir. Yüksek sukroz (60 ve 90 g/L) içeren ortamlarda embriyoların tümü bitkilere dönüşürken, daha düşük sukroz konsantrasyonları (0 ve 30 g/L) ana kök gelişimini inhibe etmiştir. Köklenen bitkiler vermikulite aktarıldıktan sonra, 1 hafta sera koşullarında iklimlendirilip açık alana transferi yapılmıştır.

Zenkter vd. (2006), brokoli bitkisindeki pistil elementlerinin rejenerasyon kapasitesini incelemek için stigma ve stil eksplantlarını kullanarak basit kültür koşulları altında MS ortamında kültüre almışlardır. Kallus proliferasyonu ve proembriyo oluşumunu indüklemek için ve aynı zamanda proembriyoları kotiledoner embriyolara dönüştürmek için MS ortamının üç optimum çeşidi kullanılmıştır. İlk olarak 4 mg/L BAP, 1.6 mg/L 2,4-D, 250 mg/L kazein hidrolizat ve 30 g/L sukroz ile desteklenmiş MS bazal ortamında kallus oluşumları meydana gelmiştir. İki kez alt kültüre alma işleminden sonra kalluslardan proembriyo indüksiyonu gözlenmiştir. Globular embriyolar ve kalluslar,

somatik embriyo gelişimi, olgunlaşması ve çimlenmesi için 2 mg/L BAP, 1 mg/L IAA ve 40 g/L sakkaroz içeren MS ortamına transfer edilmiştir. Somatik embriyo popülasyonu sadece 1 mg/L BAP ve 2 mg/L NAA içeren besiyerinde oluşmuştur. NAA'nın BAP içeren MS ortamına eklenmesi, kök oluşumunu önemli ölçüde arttırmıştır. İklimlendirme işlemlerinden sonra, bütün bitkiler sağlıklı bir gelişim göstermiş ve fenotipik olarak normal çiçekler ürettiği bildirilmiştir.

Alyssum borzaeanum Avrupa florasında yer alan ve nesli tükenme tehlikesi olan endemik türler arasında yer almaktadır. Paunescu (2008), bu bitkide ilk kez, ikincil somatik embriyogenez ile bitki yetiştirme verimliliğini artırmak için *in vitro* rejenerasyon çalışmaları yapmıştır. Embriyojenik kallus gelişimini indüklemek için, kotiledon ekpslatlar 2,4-D (1.0 mg/L), ve KIN (0.1 mg/L) ile desteklenmiş besin ortamlarında kültüre alınmıştır. 25 °C'de 12 saatlik fotoperiyod altında 3 haftalık kültür sürecinden sonra, embriyojenik kalluslar, globular, kalp ve kotiledon evrelerinde embriyojenik yapılar meydana gelmiştir. Erken kotiledon aşamasındaki embriyolar kalluslardan ayrılarak NAA, IBA, 1-naftiloksi asetik asit (NOA), IAA, 2,4-D, 2,4,5-triklorofenoksi asetik asit (2,4,5 T) ve BAP'ın çeşitli konsantrasyonları ve kombinasyonlarını içeren MS ortamlarına aktarımı yapılmıştır. Yapılan histolojik analiz sonuçlarına göre, somatik embriyoların farklılaşması kotiledon dokularında 25 gün içerisinde meydana gelmiştir. Aynı zamanda embriyolar üzerinde doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki farklı sekonder embriyojenik yapılar oluşmuştur. 1-2.5 mg/L oksinler (IBA, NOA, IAA, 2,4 D, 2,4,5 T) içeren ortamlarda yüksek verimlilikle, eksplant başına 10-40 embriyo oluşurken, oksin içeriği az olan ortamlarda ise başarı oranı düşük olup, eksplant başına 1-3 sekonder embriyo, indirekt olarak oluşum göstermiştir. Sonuç olarak, sekonder embriyogenesis yoluyla, tek bir somatik embriyodan, 40'tan fazla bitki rejenerasyonunun sağlanabileceği bildirilmiştir. Böylece nesli tükenme tehlikesi olan bu endemik türün korunması için etkili ve tekrarlanabilir bir rejenrasyon protokolu de tanımlanmıştır.

Paunescu (2009), kotiledon ve hipokotil eksplantlarını kullanarak *Alyssum borzaeanum*' da, bitki rejenerasyon sürecinin hormonal regülasyonunu histolojik olarak izlemiş ve bu bitki germplazmasının ilk kez *in vitro* koleksiyonunun oluşturulması için yeni bir protokol geliştirilmesini amaçlamıştır. Çeşitli oksin ve sitokinin hormon gruplarını kullanarak, 30 günlük kültür sürecinden sonra bazı ortamlarda herhangi bir morfolojik oluşuma rastlanılmamıştır. 45 günlük kültür sonucunda ise, mitotik olarak aktif yapıya sahip kalluslar meydana gelmiş ve pro embriyojenik yapılar, indirekt somatik embriyoların oluşumuyla sonuçlanmıştır. Sitokinin konsantrasyonları 5 µM'den az olsa da, düşük konsantrasyonlarda oksin (<0.5 µM) ile birlikte embriyojenik kallus gelişimini ve sürgün rejenerasyonunu teşvik etmiştir. 2,4 -D ve 2,4,5-T gibi bazı oksinlerin düşük konsantrasyonları, embriyo gelişimini inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar, daha önce diğer Brassica türlerinde bildirilen somatik embriyo gelişimi üzerine 2,4 D'nin inhibitör rolünün olduğunu (Zhang vd. 2005) doğrulamaktadır. 4.52 µM 2,4-D ve 0.92 µM Kin içeren ortamlarda doğrudan somatik embriyogenesis sağlanırken, sürgün rejenerasyonu için en etkili hormonal kombinasyon 4.43 µM BAP ile 0.57 µM IAA içeren besin ortamlarının olduğu tespit edilmiştir.

Taskın vd. (2009) somatik embriyogenesis yoluyla etkili bir rejenerasyon sistemi kurmak için çeşitli *Boechera holboellii* dokularının morfojenik potansiyelini araştırmışlardır. Yedi günlük *in vitro* yetiştirilen bitkilerden kotiledon, hipokotil, kök ve yaprak eksplantları, 4-6 aylık olan bitkilerin ise ovullerinden izole edilen olgunlaşmamış

kotiledonlar kullanılarak, çeşitli hormon kombinasyonları (BA; NAA; TDZ; 2,4-D) içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Somatik embriyogenesis rejenerasyonu için en etkili eksplant tipi olgunlaşmamış kotiledonların kullanılmasıyla sağlanmıştır. İki haftalık kültür sürecinden sonra, yüksek oranda embriyojenik kalluslar oluşum göstermiştir. Bu çalışma ile, 3 hafta içerisinde 1.34 μ M NAA + 8.87 μ M BA ve 2.68 μ M NAA + 17.74 μ M BA içeren MS ortamında %10 oranında somatik embriyo elde edilirken, %38'lik bir frekansla en fazla somatik embriyo oranı 1.34 μ M NAA ve 4.44 μ M BA içeren MS ortamında tespit edilmiştir.

Yang vd. (2010) yedi günlük brokoli fidelerinin kotiledon, hipokotil ve kök eksplantlarını kullanarak 1.0 mg/L 2,4-D içeren agarlı ya da sıvı MS ortamlarda kültüre almışlardır. Kök eksplantları sıvı ortamda kültürlendiğinde %100 oranında doğrudan somatik embriyo oluşumu göstermiştir. Yapılan histolojik analizde, somatik embriyoların sıvı kültürden bir gün sonra, kök eksplantlarının perisikıl hücre katmanlarından direkt olarak oluşum gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda brokoli kök eksplantlarının somatik embriyo oluşumu üzerinde kotiledon veya hipokotil eksplantlarından daha fazla rejenerasyon sağladığı da ortaya konulmuştur. Öte yandan kullanılan 7 farklı genotipin, somatik embriyo oluşum sıklığını veya eksplant başına somatik embriyo sayısını etkilemediği ortaya konulmuştur. İncelenen tüm brokoli genotipleri %100 somatik embriyo indüksiyon verimliliğine sahiptir ve 0.8 mm kök segmenti başına somatik embriyo sayısı 'Luhui' çeşidinde 23'den 'Haizi'de 26.'ya kadar değişmektedir. Besin ortamındaki 2,4-D konsantrasyonunun artırılmasıyla birlikte, kültürlerde normal olarak gelişen somatik embriyoların sayısı da doğru orantılı olarak bir artış göstermiştir. Çimlenmiş bitkiler, 1 mg/L BA içeren $\frac{1}{2}$ MS agar ortamına aktarıldığında, %73.3 oranında en yüksek bitki rejenerasyon frekansını göstermiştir. Elde edilen rejenere bitkiler, seraya transfer edilmiş ve yaklaşık %75'i canlılığını korumaya devam etmiştir. Aynı zamanda tohumlardan elde edilen bitkilerin, rejenere bitkiler ile kontrol edildiğinde, morfolojik olarak herhangi bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.

Crambe tataria nesli tükenmekte olan endemik türler arasında yer almaktadır. Piovan vd. (2011), *Crambe tataria* (Brassicaceae) için doğrudan organogenesis ile *in vitro* mikroçoğaltımını, kallus yoluyla da somatik embriyogenesis geliştirmişlerdir. Bitki rejenerasyonu için üç haftalık fidelerinden yaprak ve kök eksplantları, çeşitli hormon konsantrasyonlarını içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. 2 mg/L Kin ve 1 mg/L 2,4-D içeren kültür ortamında, yaprak eksplantları kök eksplantından daha fazla miktarda kallus oluşturmuştur. Somatik embriyogenesisi indüklemek için iki farklı metod denenmiştir. Bunun için oluşan kalliler ya her 3 haftada bir altkültüre alınmış ya da kallilerin 8 haftada bir taze ortama aktarımı yapılmıştır. Somatik embriyogenesis oluşumu, NAA ve BAP içeren besin ortamında 8 haftada bir alt kültüre alınan kalluslardan meydana gelmiştir. Daha sonra oluşan embriyolar 30 g/L sukroz ve 1/2 MS olgunlaştırma ortamına aktarılmış ve akabinde çimlenme ortamına transferi yapılmıştır. NAA ve BAP ile kültürlenmiş kök eksplantları aynı zamanda rozet şeklinde sürgünler oluşturmuştur. *In vitro* rejenere bitkilerin dış koşullara aklimatizasyonu yapıldıktan sonra sadece %50'sinin adaptasyon sağlayarak canlılığını sürdürebildiği tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, bitki genetik materyalinin uzun süreli muhafazasına yönelik olarak direkt olarak organogenesis yoluyla ve kallustan indirekt olarak somatik embriyogenez yolu ile iki farklı *in vitro* rejenerasyon protokolünün oluşturulduğu rapor edilmiştir.

Chen vd. (2011), *Eruca Sativa* Mill' de somatik embriyogenesis yolu ile kotiledon, kotiledon petiolleri ve hipokotil eksplantlarını kullanarak etkili bir rejenerasyon protokolü ortaya koymuşlardır. MS ortamı üzerinde, tek başına 2,4-D, BA, KIN ve kombinasyonları halinde, kültür ortamları oluşturularak farklı boyutlarda embriyojenik kallus (EK) ve somatik embriyolar (SE) elde edilmiştir. Hormonsuz MS ortamına aktarılan EK ve SE'ler farklı eksplant ve ortamlardan, %6-48 oranında sürgünler geliştirmiş ve sonrasında %2-29 frekansta kökler oluşturmuştur. Sürgün farklılaşması açısından eksplantlar değerlendirildiğinde, kotiledon eksplantları hipokotillerle benzer sonuçlar ortaya koymuş, ancak kotiledon petiolleri diğer eksplant tiplerine göre etkili bir sonuç oluşturmamıştır. Kallus indüksiyonu ve sürgün farklılaşması için 2,4-D'nin KIN ile kombinasyonu tek başına 2,4-D ve 2,4-D + BA'dan daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Kotiledon, kotiledon petiolleri ve hipokotil eksplantlarının bitki rejenerasyonu için optimal hormon kombinasyonları sırasıyla 1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L KIN, 0.8 mg/L 2,4-D + 0.3 mg/L BA ve 1 mg/L 2,4-D + 0.3 mg/L KIN olarak belirlenmiştir. SE olgunlaşması ve çimlendirilmesinde etkili birçok faktör bulunmaktadır. Bu çalışma ile 1 mg/L 2,4-D içeren MS ortamından elde edilen kalluslar farklı temel besin ortamları ve sukroz konsantrasyonları içeren ortamlara aktarılmış ve en etkili olgunlaştıma ortamı olarak 60-80 g/L sukroz içeren MS kültür ortamları olmuştur. Öte yandan oluşan somatik embriyolar, çimlenme performanslarının test edilmesi için farklı konsantrasyonlarda sukroz ve NaCl içeren ortamlara transfer edilmiş ve tek başına MS, MS + 60 g/L sukroz, ½MS + 0.1 mg/L IBA, ½MS + 0.5 mg/L IBA ve MS + 0.5% NaCl en etkili çimlendirme ortamları olarak tespit edilmiştir.

Dünya çapında çok önemli bir sebze ürünü olan *Brassica oleracea* var'da (karnabahar) Siong vd. (2011), somatik embriyogeneiz yoluyla doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki farklı *in vitro* rejenerasyon protokolü oluşturmuşlardır. İki haftalık fidelerden elde edilen hipokotil eksplantı ve genç yapraklar kültüre alınmıştır. 2,4-D ve KIN'nin farklı konsantrasyonları, hem tek hem de kombine olacak şekilde dolaylı ve doğrudan somatik embriyogeneiz üzerindeki etkileri açısından değerlendirilmiştir. Oldukça nadir görülen direkt somatik embriyogeneiz, hipokotil eksplantlarının 1.0 mg/L 2,4-D ve 0.5, 1.0, 1.5 mg/L KIN içeren besin ortamlarında kültüre alınmasıyla meydana gelmiştir. İlk embriyojenik kallus indüksiyonu ise çok düşük konsantrasyonlarda 2,4-D ile (0.05 mg/L ve 0.1 mg/L) desteklenmiş MS kültür ortamında görülmüştür. Kültüre alınan genç yapraklar 0.05 veya 0.1 mg/L 2,4-D içeren ortamlarda 6 haftalık kültür sürecinden sonra dolaylı yoldan embriyo oluşumu göstermiştir. Oluşan embriyolarda, 7. haftada globular, kalp, torpido ve kotiledon gibi embriyo oluşum evreleri görülmüştür. Somatik embriyo gelişimini sürdürmek için 2,4-D içermeyen ½ MS ortamına transferi yapılmış ve hormonsuz ortama aktarılan embriyolardan sağlıklı bitkicikler meydana gelmiştir. Eksplant başına en fazla embriyo sayısı 23-25 olarak dolaylı yoldan elde edilirken, doğrudan oluşan embriyo sayısı 14-19 olarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma ile 2,4-D'nin tek başına ve KIN ile kombinasyon halinde uygulanmasının karnabaharda somatik embriyogeneizi indükleyebildiği ve sentetik tohum üretimi için potansiyel bir rejenerasyon metodu olduğu ortaya konulmuştur.

Don Palmer ve Keller (2011), önemli bir endüstriyel yağlı tohum türü olan *Crambe abyssinica*'nın somatik embriyogenesis yöntemi ile *in vitro* bitki rejenerasyonunu sağlamaya çalışmışlardır. Oluşturulan sekiz günlük *in vitro* stok bitkilerde kotiledon, hipokotil ve kök eksplantlarını kullanarak, NAA ve 2,4-D'nin çeşitli konsantrasyonları ile

embriyojenik kallus indüksiyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarında, 2,4-D'nin 4.5'den 3.9 μM 'ye kadar olan ve NAA'nın 13.0 ile 39.0 μM 'ye kadar olan seviyelerinde %100 oranında kallus oluşum sıklığı gözlenmiştir. Hem NAA hem de 2,4-D'nin her konsantrasyonunda, kök eksplantlarının kallus oluşum sıklığı hipokotil ve kotiledon eksplantlarınınkinden daha düşük bulunmuştur. Her iki oksin için hipokotil eksplantı, en yüksek embriyojenik kallus uyartım frekansına sahipken, kökünki en düşük seviyede belirlenmiştir. 22.6 μM 2,4-D ve 26.0 μM NAA içeren kültürlerde elde edilen kallusların, diğer oksin seviyelerine kıyasla kallus başına ortalama embriyo sayısı açısından daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. Her üç eksplant tipinde embriyojenik kallus indüksiyonu için 22.6 μM 2,4-D ve 26.0 μM NAA optimal oranlardır. Embriyo indüksiyonu için hipokotil kaynaklı kallusların kotiledon ve kök kaynaklı kalluslardan daha üstün olduğu tespit edilmiş ve en yüksek ortalama embriyo sayısı (36) hipokotil eksplantında 22.6 μM 2,4-D içeren kalluslardan elde edilmiştir. Aynı zamanda *C. Abyssinica*'da oluşan kallusların, embriyojenik kallus oluşuma sıklığı üzerinde farklı sukroz seviyelerinin etkisi araştırılmış ve en iyi embriyo oluşumu %5-6 oranında sukroz içeren kültür ortamlarında tespit edilmiştir. Öte yandan somatik embriyoların çimlenmesi ve aklimatizasyonu sonrasında canlılığını sürdürebilmesi için farklı ortam kompozisyonları denenmiştir. Somatik embriyolar, $\frac{1}{2}$ B5 veya $\frac{1}{2}$ MS ortamında %3 sukroz içeren kültür ortamlarında en iyi şekilde çimlenme göstermiş ve oluşan bitkiciklerin sera koşullarına başarılı bir şekilde aktarımı yapılmıştır.

Cosic vd. (2013), doğrudan somatik embriyogenesis ile *Brassica oleracea* var. *Gongylodes*'de (yer lahanası) *in vitro* bitki rejenerasyonu için etkili ve tekrarlanabilir bir protokol geliştirmişlerdir. Somatik embriyolar, MS ortamında 0, 0.5, 1.0 veya 1.5 mg/L 2,4-D ile desteklenmiş farklı gelişim evrelerinde (torpido, erken kotiledon, kotiledon, geç kotiledon) olgunlaşmamış zigotik embriyolardan indüklenmiştir. 28 gün sonunda, eksplant yüzeylerinde farklı gelişim evrelerinde somatik embriyolar meydana gelmiştir. Dört eksplant tipinin tümü, BGD içermeyen ortamda, erken kotiledon evresinde %80.7, normal kotiledon evresinde ise %74.6 ile en yüksek somatik embriyo uyartım yüzdesini oluşturmuştur. 2,4-D içeren besin ortamları somatik embriyogenesis üzerinde inhibitör bir etki uygulamış ve somatik embriyo uyartım frekansını %19.3'e düşürmüştür. Erken kotiledon (8.2) ve geç kotiledon (7.5) aşamalarına sahip eksplantlar, hormon içermeyen ortamlarda dört hafta sonunda eksplant başına en yüksek primer somatik embriyo sayısı olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda en fazla sekonder embriyogenesis oluşumu, erken kotiledon evresindeki zigotik embriyolarda görülmüş ve ikincil embriyoların oluşumu üzerine farklı sitokininlerin etkisi de araştırılmıştır. Globular aşamadaki embriyoların kültüre alınmasıyla Cis-Zeatin sitokini içeren ortamlarda %90.7 ve %73.8'lik en yüksek frekanslarla embriyojenik yanıt görülürken, kotiledon evredeki embriyolarda BA ve TDZ %80.7, hormonsuz ortamda ise %100 oranında sekonder embriyo oluşumu tespit edilmiştir. Yapılan histolojik çalışmalar sonucunda maternal doku ile gelişmekte olan embriyolar arasında vasküler bir bağlantı olmadığı ve sekonder somatik embriyoların doğrudan oluşum gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen embriyolar başarılı bir aklimatizasyon süreci geçirdikten sonra, flow stometri analizi yapılmış ve bitkilerin %97'sinde ploidy varyasyonu gözlenmemiştir.

Pavlovic vd. (2013), iki önemli *Brassica oleracea* çeşitleri olan lahana ve karnabaharda basit, hızlı ve tekrarlayan bir somatik embriyogenez protokolü oluşturarak bitki rejenerasyonunu sağlamaya çalışmışlardır. Somatik embriyoların doğrudan

rejenerasyonu için, olgunlaşmamış zigotik embriyolar BGD içermeyen B5 indüksiyon ortamı (B5-0) ve 1 mg/L 2,4-D ile desteklenmiş B5 ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Lahana ve karnabaharın kotiledoner aşamasındaki zigotik embriyoları sırasıyla, %11.84 ve %11.95 oranında en yüksek embriyo oluşturma kapasitelerini göstermiştir. İkincil somatik embriyolar, lahana ve karnabaharın birincil embriyolarında yüksek frekansta (sırasıyla %83.3 ve %87.5) olarak belirlenmiş ve bu süreç BGD içermeyen (MS-0) ortamında tekrarlayan bir şekilde devam etmiştir. Rejenerasyon ortamında 1 mg/L BA veya KİN eklenmesi, lahanada %56, karnabaharda ise %79'a kadar somatik embriyo dönüşümünü önemli ölçüde geliştirmiştir. Somatik embriyolardan gelişen rejenere bitkiler *ex vitro* koşullara başarılı bir şekilde adaptasyon sağlamış ve tohum kaynaklı bitkilere benzer morfolojik özellikler sergilemiştir. Bu çalışma ile etkili ve tekrarlayan somatik embriyogenesis yöntemi kullanılarak, lahana ve karnabaharın klonal üretimi ve genetik modifikasyonları için uygun ve pratik çalışmalar yapılabileceği vurgulanmıştır.

Brassica oleracea var. *Acephala* (kara lahana) yüksek besleyici ve düşük kalorili bir bitki türü olması ile yaygın olarak tüketilen önemli bir yapraklı sebzedir. Bitkinin iki yılda bir ürün vermesi ve kendine uyumsuzluğu nedeniyle biyoteknolojik yaklaşımlar, bu türün üretimi konusunda alternatif bir yol olarak görülmektedir. Banjac vd. (2019), doku kültürü yöntemlerinden yararlanarak, farklı ve etkili bir rejenerasyon protokolü sağlamayı, oluşan rejenere bitkilerde toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktivitelerini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Bu kapsamda kotiledon, hipokotil, ve kök eksplantları, sitokinin olarak TDZ, BA ve KIN (0, 5, 7.5, 10, 20 30 μ M) oksin olarak da NAA'nın (0, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 μ M) çeşitli konsantrasyonlarını içeren ortamlarda kültüre alınmış ve bu hormon tiplerinin rejenerasyon kapasitesine olan etkileri test edilmiştir. Kotiledon ve kök eksplantlarında herhangi bir rejenerasyon tepkisi görülmediği için hipokotil eksplantı ile rejenerasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Öncelikle BA ve TDZ içeren ortamlarda, iki haftalık kültür sürecinden sonra, hem sürgün hem de yumuşak ve yarı saydam kalluslardan somatik embriyoların oluşması ile iki farklı rejenerasyon tipinin görüldüğü belirtilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda TDZ'nin morfogenez yapısı rejenerasyonu açısından en etkili sitokinin olduğu bildirilmiş ve kullanılan sitokinlerin tipi ve konsantrasyonu, rejenerasyonu önemli ölçüde etkilemiştir. Test edilen optimal BGD kombinasyonları arasında 20 μ M TDZ + 2 μ M NAA içeren ortamlarda hem somatik embriyogenez hem de sürgün organogenesisinde yüksek rejenerasyon sağlamıştır. Elde edilen primer embriyolar 5 μ M TDZ, BA, ve KIN içeren MS ortamına aktarılmış ve TDZ içeren besin ortamında anormal olmayan, en yüksek (7.79) sekonder embriyo oluşumu gözlenmiştir. Embriyolardan elde edilen rejenere bitkiler ise %90 oranında başarılı bir şekilde aklimatize edilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarına göre TDZ uygulaması ile, antioksidan özelliklerle birlikte, toplam fenolik içeriğindeki artışa neden olduğu da ortaya konulmuştur.

2.2. Brassicaceae Familyasında Yapılan Organogenesis Çalışmaları

R. carnosula endemiğinin organogenesis yoluyla *in vitro* rejenerasyonu hakkında henüz literatürde yapılmış bir çalışmaya rastlanılmadığı için bu bölümde Brassicaceae familyasında yapılmış olan organogenesis çalışmalarına yer verilmiştir. Brassicaceae familyası incelediğinde, hipokotil ve kotiledon dokuları gibi rejenerasyon başarısı yüksek olan eksplant çeşitlerinin kullanıldığı organogenesis çalışmaları bulunmaktadır (Guo vd. 2005; Cogbill vd. 2010; Ravanfar vd. 2011; Sharma vd. 2014; Cosic vd. 2015; Gambhir vd. 2017; Banjac vd. 2019).

Ono vd. (1994), kolza bitkisinin kotiledoner eksplantlarını kültüre alarak (*B. napus*) sürgün rejenerasyon yeteneğini 100 farklı genotip üzerinde araştırmışlardır. Optimum rejenerasyon ortamı olarak; dört günlük fidelerden elde edilen kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 4 mg/L BAP içeren besin ortamının olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda sürgün rejenerasyonu için gaz geçirgen filtreli bantların kullanılması, parafilmle göre daha etkili bulunmuştur. Farklı kolza çeşitlerinden olan 'Arabella', 'Norin 26', 'Norin 18' ve 'Norin 30' %97 oranında sürgün rejenerasyonu göstermiş ve rejenerasyon kapasitesi üzerinde genotip farklılığının önemi ortaya konulmuştur. Yapılan histolojik çalışmalar, sürgün meristemlerinin 8 gün içinde vasküler dokulardan gelişen kallustan kökenlendiğini ortaya koymuştur. Elde edilen rejenerant bitkicikler köklenmesi için 2 mg/L indol-3-butirik asit (IBA) içeren besiyerinde kültüre alınmıştır. Köklenme oluşumu meydana gelen bitkiciklerin toprağa transferi yapılarak adaptasyon süreci tamamlanmış ve çiçek açan bitkilerden tohumlar elde edilmiştir.

Akasaka-Kennedy vd. (2005), kolza fidelerinin yaprak eksplantlarını kültüre alarak (*Brassica napus* L.) güvenilir bir sürgün rejenerasyonu sağlamak için çeşitli faktörlerin etkilerini araştırmışlardır. Başlangıç olarak üç farklı genotip (Westar, Norin 31 ve Norin 10) kullanılmış ve indüksiyon ortamına $AgNO_3$ eklenerek sürgün oluşumu üzerindeki etkisini incelenmiştir. Kültüre alınan eksplantlar, $AgNO_3$ içeren kallus indüksiyon ortamında genişlemiş ve sürgün indüksiyon ortamına aktarıldıktan sonra, her üç genotipte eksplant yüzeylerinde kalluslar ve adventif tomurcuklar gözlenmiştir. Sürgün oluşum frekansları yönünden Westar %51, Norin 31 %77, Norin 10 ise %91 oranında rejenerasyon sağlamıştır. Ancak, $AgNO_3$ içermeyen ortamlarda kültürlenmiş eksplantlar sürgün oluşturma açısından başarısız bulunmuştur (%0-30). Sonraki çalışmalarda ise 48 kolza genotibi aynı koşullarda sürgün rejenerasyon yeteneği için incelenmiş ve 47'sinin sürgün oluşturma kapasitesi olduğu belirlenmiştir. Tomurcuk oluşumu sıklığı ve eksplant başına tomurcuk sayısı arasında anlamlı bir korelasyon ($r = 0.84$) gözlenmiş ve genotip farklılığının önemli etkisi ortaya konulmuştur. Yapılan histolojik gözlemlerde, kallus indüksiyon ortamında 7 günlük kültürden sonra vasküler demet dokularında üretilen kalluslardan, organize bir yapının geliştiğini ve sürgün indüksiyon ortamına aktarıldıktan bir hafta sonra da sürgün apikal meristemlerinin geliştiği gözlenmiştir. Rejenere bitkiler, kültürün başlamasından 2 ay sonra elde edilmiş ve normal olarak çiçeklenerek tohum bağlamıştır. Rejenere bitkilerde ve bunların S1 nesillerinde morfolojik veya DNA içeriğinde herhangi bir varyasyon saptanmamıştır.

Guo vd. (2005), kök hardalının (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) kotiledon ve yaprak segmentlerini kullanarak, çeşitli sitokinin konsantrasyonları BA, N-(2-kloro-4-piridil)-n-fenilure (CPPU), KIN, TDZ ve farklı seviyelerde NAA ile kombinasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Kotiledon ve yaprak segmentinin sürgün rejenerasyon frekansı, ortamda kullanılan farklı sitokinin türü ve konsantrasyonlarına göre sonuç vermiş, çoğu durumda kotiledon eksplantı yaprak segmentine kıyasla daha yüksek rejenerasyon göstermiştir. Sitokininler arasından TDZ'nin BA, KIN ve CPPU'ya kıyasla hem kotiledon hem de yaprak segmentlerinden sürgün rejenerasyonunu sağlayan en iyi sitokinin olduğu belirlenmiştir. TDZ'nin (2.27 veya 4.54 μM) NAA (5.37 μM) ile kombinasyonunu içeren ortamlarda en yüksek sürgün rejenerasyon sıklığı sırasıyla, kotiledonda %61.3–67.9, yaprak segmentinde ise %40.7–52.4 olarak tespit edilmiştir. Sürgün rejenerasyonunun teşvik edilmesi açısından TDZ ve CPPU'nun kombine edilerek kullanılması uygun bulunmuştur. Ayrıca KIN ile BA'nın kotiledon ve yaprak

segmentinden oluşan sürgün rejenerasyonunu da etkilediği ortaya konulmuştur. Sonuç olarak NAA'nın sitokininler ile birlikte kullanılmasıyla sürgün oluşumunu büyük ölçüde arttırdığı tespit edilmiş, hem kotiledon hem de yaprak segmentlerinde verimli ve güvenilir bir sürgün rejenerasyon sistemi geliştirilmiştir.

Yıldızhan (2007) yapmış olduğu çalışmada, Cu, Zn ve Cd akümülatörü olan *Brassica nigra*'nın olgunlaşmış dokularından *in vitro* rejenerasyon protokolü oluşturmayı amaçlamıştır. İlk olarak stok bitki yetiştirilmesi için sterilizasyonu yapılan *Brassica nigra* tohumları hormon içermeyen MS ortamında çimlendirmeye bırakılmıştır. 30 gün içerisinde gelişen bitkiciklerden gövde, sürgün ucu ve hipokotil olmak üzere 3 farklı eksplant kullanılmış, kallus oluşumu ve rejenerasyon yeteneğinin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda, üç eksplant tipinde kallus oluşumu gözlenmiştir. Sürgün ucu eksplantında direkt ve indirekt sürgün rejenerasyonu görülürken, indirekt sürgün oluşumu, 1 mg/L NAA + 0.2 mg/L BAP, 0.5 mg/L NAA + 2 mg/L BAP ve 0.2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren kültür ortamlarında tespit edilmiştir. Doğrudan sürgün oluşumu gösteren ortamlar ise BAP ve NAA'nın tüm kombinasyonlarını içermiştir. Rejenere sürgünler beş farklı MS besiyerinde kültüre alınarak kök rejenerasyonu için test edilmiştir. 7-20 gün içerisinde 1 mg/L IBA içeren ve BGD içermeyen MS ortamlarında kök rejenerasyonu sağlanmıştır. Yapılan bu çalışma ile hiperakümülatör bitki olan *Brassica nigra*'nın çoklu sürgün üretimi sağlanmış ve kontamine olan toprakların remediasyonunda kullanılması için etkili bir metot oluşturulmuştur.

Ghnaya vd. (2008), *Brassica napus* L'nin dört farklı çeşidinden izole edilen enine ince hücre katmanlarını (TTCLs) kullanarak, kolay ve hızlı şekilde kallus oluşumuna izin veren bir prosedür açıklamışlardır. Çalışmada genotip, eksplant kaynağı ve kültür ortamının sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri de incelenmiştir. İki haftalık stok bitkilerden Jumbo, Drakkar, Cossair ve Pactol çeşitlerinin hipokotil ve yaprak sap TTCL eksplantları oluşturularak NAA (0.1–0.4 mg/L), BAP (1-4 mg/L) ve sukroz (20-40 g/L) içeren katı MS ortamında kültüre alınmıştır. Dört çeşit arasında önemli bir genotipik etki gözlenmiş, Jumbo ve Drakkar çeşitlerinin sürgün rejenerasyon kapasitesi açısından, diğerlerine kıyasla daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Farklı eksplantlar dikkate alındığında ise hipokotillerin 3 mg/L BAP, 0.3 mg/L NAA ve 30 g/L sukroz içeren MS ortamında kültüre alındığında yüksek oranda sürgün organogenesi sergilediği belirlenmiştir. Adventif sürgün tomurcukları, TTCL eksplantlarının %46'sından ortalama 7.5 tomurcuk olarak gelişmiş ve ayrıca 7 günlük kültür sonrası sürgün oluşumu gözlenmiştir. Sürgünlerden meydana gelen rejenere bitkiler normal olarak gelişim göstermiş ve ebeveyn bitkilerle aynı morfolojik özelliklere sahip olduğu da belirtilmiştir.

Cogbill vd. (2010), *Brassica rapa*'da, ilk defa adventif sürgün rejenerasyon protokolü oluşturmuş ve çeşitli faktörlerin sürgün oluşturma üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. İlk olarak, stok bitkilerden elde edilen beş günlük kotiledon eksplantları, değişen konsantrasyonlarda TDZ ve NAA içeren 15 farklı MS ortamında kültüre alınmıştır. 1.5 mg/L TDZ ve 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamında %8.8 oranında sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Öte yandan, aynı hormon ve miktarlarını içeren MS ortamında dört farklı konsantrasyonda AgNO₃'ün etkisi test edilmiştir. 5 mg/L AgNO₃ içeren ortamlarda gelişen sürgün oranı % 14.8'e yükselmiştir. Beş günlük kotiledon eksplantları proksimal (petiole en yakın) veya kotiledonun distal ucundan kesilerek (1.5 mg/L TDZ, 0.5 mg/L NAA ve 5 mg/L AgNO₃) besiyerinde abaksial veya adaksial

yönde kültüre alınmıştır. Eksplant oryantasyonu ve pozisyonunun sürgün oluşturma kapasitesinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Adaksiyal-proksimal olarak yerleştirilen kültürlerde eksplant başına en yüksek ortalama sürgün sayısı elde edilmiş ve sürgün rejenerasyon oranı %32.5'e yükselmiştir. Ayrıca sürgün rejenerasyonunda eksplant yaşının etkisine de bakılmış ve 4 günlük kotiledon eksplantları kullanıldığında, sürgün geliştirme oranı %44.5'e yükselirken, 9 günlük yaprak eksplantlarında ise %23'lük sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Ayrıca sürgünleın uzamaları için 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamına aktarılırken ve kök rejenerasyonları içinse hormonsuz ortama aktarılmıştır. Gelişen bitkicikler sonra sera koşullarında iklimlendirme işlemine tabi tutulmuştur. Bu çalışmada *Brassica rapa* için en etkili sürgün rejenerasyon ortamınının 1.5 mg/L TDZ, 0.5 mg/L NAA ve 5. mg/L AgNO₃ içeren MS ortamı olduğu belirlenmiştir.

Brassica oleracea subsp. *italica* (brokoli) cv.'nin *in vitro* sürgün rejenerasyonu için Ravanfar vd. (2011), 7 günlük *in vitro* fidelerin gelişen kotiledon eksplantlarını kullanarak BAP (0, 1, 3, 5 ve 7 mg/L) ve NAA'nın (0, 0.5 ve 1 mg/L) farklı konsantrasyonları ve kombinasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde kültüre almışlardır. 3 mg/L BAP ve 1 mg/L NAA içeren kültür ortamı, sürgün oluşumunu uyartmak için belirlenen en uygun besiyeri olarak bildirilmiştir. Aynı kültür ortamında 8 haftalık kültür sürecinden sonra eksplantların %53.33'ünde sürgün indüksiyonu sağlanmış ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı 0.43 olarak tespit edilmiştir. Tek başına BAP veya NAA içeren ortamlarda herhangi bir sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir. Optimum kültür koşullarından elde edilen sürgünler ise 0.2 mg/L IBA içeren MS ortamına köklendirilmek üzere transfer edilmiştir. Aklimatizasyon sırasında farklı yetiştiricilik ortamlarının etkisi değerlendirilmiş ve sağlıklı bitki oluşumu en fazla (% 83.33) kum ve toprak içeren ortamlarda (1:1) sağlanmıştır. Turba yosunu, perlit ve vermikülit (3:1:1) karışımından oluşan ortamlarda ise azami kök uzunluğu (4.37 cm) ve bitki boyu (7.87 cm) olarak belirlenmiştir.

Sharma vd. (2014), lahana'da (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) bitki rejenerasyonu için kotiledon ve hipokotil eksplantları farklı sitokinin ve oksinlerin (KIN-IAA, KIN-NAA, BAP-IAA, BAP-NAA) farklı konsantrasyonları ve kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Kullanılan 36 BGD kombinasyonundan sırasıyla 1.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA 2 mg/l BAP + 0.25 mg/L IAA içeren MS ortamında kotiledon eksplantından yüksek frekansta sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Her iki eksplattan geliştirilen sürgünler, kök indüksiyonu için çeşitli oksin (IAA, NAA, IBA ve 2,4-D) konsantrasyonlarını içeren MS ortamına aktarılmış ve 4 haftalık kültürden sonra 0.1 mg/L IBA içeren MS ortamında %90 oranında kök rejenerasyonu sağlanmıştır. Rejenere edilen bitkiler, kum ve toprak karışımı içeren ortamlara aktarılmış ve iklimlendirilmiştir.

Gambhir ve Srivastava (2015), lahanada yaprak ve yaprak sapı eksplantlarını kullanarak TDZ'nin sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. 20-25 günlük lahana fidelerinden elde edilen yaprak ve yaprak sapı eksplantları, TDZ, TDZ+Adenine, TDZ+NAA ve TDZ+IAA kombinasyonları içeren 40 farklı MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Yaprak eksplantında 0.220 mg/L TDZ + 0.02 mg/L NAA içeren ortamda % 91.11 oranında sürgün rejenerasyonu sağlanırken, yaprak sapında ise 0.22 mg/L TDZ+ 0.02 mg/L NAA içeren MS ortamında % 88.88 oranında sürgün rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Geliştirilen sürgünler 0.1 mg/L NAA içeren MS ortamına transfer edilmiş ve %100 oranında kök oluşmuştur. Son aşama olarak rejenere edilen

bitkilerin tümü, sterilize edilmiş hindistan cevizi torfu içeren saksılara transfer edilmiş ve aklimatizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) çeşitlerinden olan Vienna Purple (VP) ve Vienna White (VW) bitkilerinde Cosic vd. (2015), *in vitro* organogenesis rejenerasyon protokolü oluşturmayı amaçlamışlardır. İlk olarak intakt fide, kotiledon, hipokotil ve kök eksplantları farklı sitokininleri içeren (BA, TDZ ve Trans- veya Cis-Zeatin) MS ortamında kültüre alınmıştır. Test edilen tüm sitokininler, intakt fide ve hipokotil eksplantlarında sürgün rejenerasyonunu uyartmıştır. Bunlardan intakt fideler, her iki çeşitte de rejenerasyon oranı ve rejenere sürgünlerin canlılığı açısından daha başarılı bulunmuştur. VP çeşidi BA (% 60) veya TDZ (% 50) içeren MS ortamında en yüksek sürgün rejenerasyon frekansını gösterirken, VW çeşidi ise BA (% 50), TDZ (%47.5) veya transZeatin (%37.5) içeren ortamlarda sürgün gelişimi oluşturmuştur. Hem hipokotil eksplantlarında hem de rejenere edilmiş sürgünlere sahip fidelerde (HRSs ve SRSs) endojen sitokinin ve IAA içeriğinin ölçümleri, bu iki tip eksplantlar arasındaki organojenik yanıtta gözlenen farklılıkların, içsel sitokinin ve IAA içeriği ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. HRS'ler genellikle yüksek miktarlarda toplam sitokinin sergilerken, SRS'ler daha yüksek bir IAA/biyoaktif sitokinin oranı sergilemiştir. Sürgün rejenerasyonu, sitokininlerden Cis-Zeatin, Trans-Zeatin, TDZ veya BA içeren besin ortamlarında elde edilmiştir. Fidelerden rejenere edilen sürgünler, BA (0.5 mg/L) ile takviye edilmiş ortamda daha başarılı şekilde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan sürgünlerin köklenme potansiyelini belirlemek için 2 veya 4 mg/L IBA içeren ortamlara transfer edilmiş ve sonuç olarak, yüksek konsantrasyonda IBA içeren ortamda daha verimli köklenme gözlenmiştir. Köklenen bitkiler, toprağa başarılı şekilde aktarılmış ve adaptasyonları sağlanmıştır. Gelişen rejenere bitkilerde sitometrik analizler yapılmış ve ploidi seviyelerinde bir varyasyon olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak fidelerden, *de novo* sürgün organogenesisi yoluyla iki Kohlrabi çeşidinde hızlı ve başarılı bir bitki rejenerasyon protokolü bildirilmiştir.

Gerszberg vd. (2015), lahananın sekiz farklı çeşidinde hipokotil ve kotiledon eksplantlarını kullanarak *in vitro* koşullar altında rejenerasyon potansiyeli açısından test etmişlerdir. 10 günlük fidelerden alınan hipokotil ve kotiledon eksplantları, %1 sukroz ve farklı konsantrasyonlarda BGD kombinasyonları ile desteklenmiş MS bazal ortamında kültüre alınmış ve ardından farklı kallus indüksiyon ortamlarında alt kültürleme yapılmıştır. Hipokotil eksplantlarının, test edilen tüm çeşitlerde kotiledon eksplantlarına kıyasla kallus indüksiyonu ve organogenesis için daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Rejenerasyon açısından, 'Amager' test edilen diğer çeşitlere göre önemli ölçüde daha duyarlı bulunmuş ve eksplant başına en fazla sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Ayrıca, kullanılan beş ortam türü arasında, MS + 8.88 μ M BAP + 0.53 μ M NAA, sürgün rejenerasyonu için en etkili besiyeri olarak belirlenmiştir. Elde edilen rejenere sürgünler, köklenme ortamlarına aktarılmış ve 10-15 gün içerisinde kök oluşumu meydana gelmiştir. Ancak 5.37 μ M NAA içeren MS ortamının maksimum sayıda güçlü ve sağlıklı kök rejenerasyonu ile daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra bitkiler seraya aktarılıp aklimatizasyon işlemi yapılmış (%95 oranında) ve rejenere edilen bitkiler arasında fenotipik değişiklikler gözlenmemiştir.

Genetik manipülasyonlar brokoli ıslahı için önemli hale gelmiştir. Kumar ve Srivastava (2015a), hipokotil ve kotiledon eksplantları kullanarak TDZ'nin organogenesis üzerindeki etkisini belirlemeyi amaçlamışlardır. 10 ila 12 günlük *in vitro*

yetiştirilen brokoli fidelerinden hipokotil ve kotiledon eksplantları, sürgün rejenerasyonu için tek başına TDZ, Adenin+TDZ, NAA+TDZ ve IAA+TDZ kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Test edilen 36 besin ortamı değerlendirildiğinde, 2 µM TDZ ve 0.5 µM IAA içeren MS ortamında hipokotil eksplantlarında (%95.92) maksimum sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Aynı zamanda 2 µM TDZ ve 0.59 mM adenin içeren MS ortamında ise kotiledon eksplantlarından %88.88 oranında çoklu sürgün rejenerasyonu gelişmiştir. 1.08 µM NAA içeren MS ortamında *in vitro* rejenere edilmiş sürgünler yüksek frekansta (% 93.99) kök rejenerasyonu oluşturmuştur. İyi gelişmiş sürgünler ve kök sistemine sahip rejenere bitkiler, kum ve toprak karışımı içeren saksılarda dış koşullara aktarılmıştır.

Kumar ve Srivastava (2015b)'nın brokolide yapmış oldukları diğer çalışmada, hipokotil, kotiledon, yaprak ve yaprak sapı eksplantlarını farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA kombinasyonları içeren sürgün geliştirme ortamlarında kültüre almıştır. Hipokotil eksplantı (%83.33) 3.5 mg/L BAP+0.019 mg/L NAA içeren ortamda, kotiledon eksplantı (%90) 2.5 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA içeren ortamda, yaprak eksplantı (%62.96) 4 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA içeren ortamda ve yaprak sapı ise (%91) 4.5 mg/L BAP+0.019 mg/L NAA içeren ortamlarda yüksek oranda sürgün rejenerasyonu oluşturmuştur. Sonuç olarak yaprak sapı eksplantları, diğer eksplantlara kıyasla maksimum oranda sürgün rejenerasyon meydana getirmiştir. Öte yandan *in vitro* elde edilen tüm sürgünler 0.1 mg/L NAA içeren MS ortamına aktarılmış ve %100 oranında başarılı kök rejenerasyonu ile oluşmuştur. Rejenere edilen bitkiler, daha sonra hindistan cevizi torfu içeren saksılara transfer edilerek başarılı şekilde dış koşullara alıştırılmıştır.

Gambhir vd. (2017), *Brassica oleracea* cv. Pride of India'da organogenesis için 7-9 günlük kotiledon ve hipokotil eksplantlarını 40 farklı ortamda (TDZ, Adenin+TDZ, NAA+TDZ, IAA+TDZ'den oluşan) kültüre almıştır. Sırasıyla 0.33 mg/L TDZ + 79.7 mg/L adenin ve 0.22 mg/L TDZ + 0.088 mg/L IAA içeren MS ortamında kotiledon eksplantlarından %91.11 ve hipokotil eksplantlarından ise %94.40 oranında maksimum sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Oluşan sürgünler çeşitli köklenme ortamlarına aktarılmış ve 2-3 hafta içerisinde köklenme rejenerasyonu sağlanmıştır. Maksimum köklenme (%100) 0.1 mg/L NAA içeren MS ortamında oluşmuştur. Köklendirilen rejenere sürgünler sterilize edilmiş hindistan cevizi torfu içeren saksılara aktarılmış ve başarıyla iklimlendirilmiştir. Rejenere bitkiler morfolojik olarak incelendiğinde herhangi bir fenotipik varyasyona rastlanılmamıştır.

Srivastava vd. (2017), *Brassica oleracea* L. var *botrytis*'in fidelerinden elde edilen yaprak dokularını kültüre alarak, çeşitli BGD ve kombinasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Eksplantlar Gamborg ortamında inkübe edilmiş ve kallus oluşumları 2 haftalık yaprak eksplantlarında oluşmaya başlamıştır. Maksimum kallus frekansı, %85.56 oranında 9.1 µM TDZ ve 0.5 µM NAA ile desteklenen MSB5 ortamında kaydedilmiştir. Ayrıca 4.5 µM TDZ ve 0.5 µM NAA içeren MSB5 ortamında da %54.44 oranında kallus oluşmuştur. Ekplant başına maksimum sürgün sayısı (5.33), 4.5 µM TDZ ve 0.5 µM NAA içeren MSB5 ortamında kaydedilirken, maksimum sürgün uzunluğu (4.86 cm) 4.5 µM TDZ ve 5.7 µM GA₃ içeren MSB5 ortamındaki sürgünlerde kaydedilmiştir. Bununla birlikte, 4.9 µM IBA içeren ½ MS bazal ortamında kültüre alınan sürgünler %71.11 oranında kök oluşturmuşlardır. Ayrıca rejenere olmuş bitkilerde, süperoksit dismutaz, askorbat

peroksidaz ve peroksidaz antioksidan enzim aktivitelerine bakılmış ve kallus indüksiyonu ile rejenerasyonunda bu önemli antioksidan enzimlerin rolleri ortaya konulmuştur.

Liu vd. (2018), Çin lahanasının (*Brassica rapa* L.) *in vivo* yaprak eksplantlarından yüksek verimli bir rejenerasyon sistemi oluşturmuş ve genetik transformasyon uygulamalarını da araştırmışlardır. 17.76 μM BA ve 5.37 μM NAA içeren ortamlarda 'Beijing New No.3' (88.46 ± 1.65) ve 'Chengyangqing' (73.77 ± 1.73) çeşitlerinin maksimum rejenerasyon sağladığı tespit edilmiştir. Etilen inhibitörü olan, AgNO_3 Brassica türlerinin rejenerasyonunu teşvik etmede önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle çeşitli konsantrasyonlarda AgNO_3 (0, 11.77, 23.55, 35.32 veya 47.09 μM), BA ve NAA içeren ortamlar ilave edilerek yaprak rejenerasyonu için en uygun kombinasyon tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışmada 11.77 μM AgNO_3 konsantrasyonunun yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonu için gerekli olduğu tespit edilmiştir. Sekiz Çin lahanası çeşidi arasında, 17.76 μM BA, 5.37 μM NAA ve 11.77 μM AgNO_3 içeren MS ortamında, eksplant başına sürgün sayısına (1.31 ± 0.02 ile 2.02 ± 0.05 arasında) ek olarak, sürgün rejenerasyon frekanslarındaki genotipik farklılıklar da (47.24 ± 3.65 ile 88.46 ± 1.65 arasında) gözlenmiştir. Düşük sıcaklık (4°C) 'Beijing New No. 3' ve 'Chengyangqing' çeşitlerinin sürgün indüksiyon frekansında önemli bir fark oluşturmamıştır. Öte yandan oluşan adventif sürgünler, daha fazla büyümeleri ve rejenere sürgünlerin uzaması için MS bazal ortama aktarılmıştır. Sürgünler 2-3 cm uzunluğa ulaştığında, izole edilmiş ve 2.69 μM NAA içeren köklendirme ortamına transferi yapılmıştır. Köklenen rejenere sürgünler saksılara aktararak dış koşullarda aklimatizasyonu yapılmış ve adaptasyonu sağlanmıştır.

Banjac vd. (2019), kara lahanada etkili ve tekrarlanabilir bir rejenerasyon protokolü elde etmeyi amaçlamış ve rejenerantlardaki antioksidan aktivitesi ile toplam fenolik içeriğini de araştırmışlardır. Bu amaçla kotiledon, hipokotil ve kök eksplantları 3 farklı sitokinin (TDZ, BA, KIN) ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarıyla kombine edilmiş besiyerlerinde kültüre alınmıştır. BA ve TDZ içeren ortamlarda eksplant yüzeyinde somatik embriyolar gözlenirken, aynı zamanda sürgün oluşumu da meydana gelmiştir. Hem sürgün hem de embriyo oluşumu açısından TDZ' nin en etkili sitokinin tipi olduğu belirlenmiş ve optimal BGD kombinasyonu 20 μM TDZ + 2 μM NAA olarak tespit edilmiştir. Ayrıca TDZ uygulaması ile rejenere bitkilerdeki antioksidan ve toplam fenolik içeriğinde artış olduğu tespit edilmiştir.

2.3. Farklı Türlerdeki Sentetik Tohum Çalışmaları

R. carnosula endemiğinde henüz literatürde yapılmış bir sentetik tohum çalışmasına rastlanılmadığı için, bu bölümde farklı türlerde yapılmış olan sentetik tohum üretimi çalışmaları hakkındaki literatürlerden bahsedilmiştir.

Sentetik tohum teknolojisi kullanılarak birçok tahıl, meyve, süs, tıbbi bitki, sebzeler, ağaçlar ve orkide gibi çeşitli bitki türlerinde sentetik tohum üretiminin yapıldığı bildirilmiştir (Rai vd. 2009; Gantait vd. 2015). Literatüre göre ilk sentetik tohum çalışması; havuç somatik embriyolarında kurutulmuş sentetik tohumların suda çözünabilir reçine kaplama ve polioksietilen glikolün uygulanmasıyla Kitto ve Janick (1982) tarafından rapor edilmiştir. Daha sonra, Redenbaugh vd. (1984) aljinat hidrojel kapsüllemesi ile yonca bitkisinde başarılı bir sentetik tohum üretimi sağlamışlardır. Sentetik tohum üretiminde kullanılan eksplant kaynağı, bitki rejenerasyonu için etkili

faktörler arasında yer almaktadır (Gantait vd. 2015). Bu nedenle somatik embriyo dışında, sürgün ucu, nodal segmentler, aksiller tomurcuk, mikro sürgünler ve kalliler gibi farklı tiplerde eksplant kaynakları da yapay tohum oluşumunda kullanılmaktadır (Pattnaik ve Chand 2000; Zych vd. 2005; Lata vd. 2009; Saha vd. 2014).

Kamada vd. (1989), havuç bitkisinin (*Daucus carota* L. cv. US-Harumakigosun) apikal meristem bölgelerini çeşitli MS ortamlarında kültüre almışlar ve somatik embriyolar elde etmişlerdir. Dört farklı uygulamadan oluşan somatik embriyolar 0.25-0.50, 0.5-1.0, 1.0-2.0 mm olacak şekilde 3 ayrı boyuta göre ayrılmıştır. Embriyolar %3'lük (w/v) sodyum aljinat çözeltisinde bekletildikten sonra 100 mM CaCl₂ çözeltisine damlacıklar halinde ilave edilmiş ve kapsüller meydana gelmiştir. Oluşturulan her yapay tohum içerisinde tek bir somatik embriyo bulunmaktadır. Sentetik tohumlar petrilere aktararak çimlendirme testleri yapılmış ve kültürün başlamasından 1-2 hafta sonra embriyolarda çimlenme gözlenmiştir. Hem radikula hem de yeşil tomurcuk geliştiren tohumların frekansı; sukroz, kadmiyum veya sodyum hipoklorit ile muamele edilen büyük boy embriyolarda yaklaşık %30-50 iken, 2,4-D ile uyartılan embriyolarda yaklaşık %15 olarak tespit edilmiştir.

İpekçi ve Gözükırmızı (2003), *Paulownia elongata*'da yaprak ve internodal eksplantlarından doğrudan somatik embriyogenez yoluyla tekrarlanabilir ve etkili bir rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Çeşitli hormonlar (BAP, NAA, IAA KIN, TDZ) tek başına veya kombinasyonları halinde somatik embriyogenesi indüklemeye kapasiteleri açısından test edilmiştir. En yüksek somatik embriyo indüksiyon frekansları, %3 sukroz, %0.6 phytagel, 500 mg/L kazein hidrolizat ve 10 mg/l TDZ içeren MS ortamında gözlenmiştir. Somatik embriyolar 7 günlük kültür sürecinden sonra aynı içerikli MS ortamında yaprak (%69.8) ve internod (%58.5) eksplantlarından indüklenmiştir. Olgun embriyoların alt kültüre alınması, yaprak eksplantlarında %50.1, internod eksplantlarında ise %29.8 oranında çimlenme frekansı ile sonuçlanmıştır. Doğrudan yaprak eksplantlarından elde edilen embriyolar, 50 mM CaCl₂ içerisinde 30 dk maruz bırakılarak ve üç farklı sodyum aljinat konsantrasyonu (%1, %2.5, %3) içeren sıvı MS ortamında kapsüllenmiştir. %3'lük sodyum aljinat ile kaplanan embriyolar, en uygun konsantrasyon olarak belirlenmiş ve sırasıyla %73.7 hayatta kalma ve %53.3 çimlenme frekansları oluşturmuştur. Sentetik tohumların 30 gün veya 60 gün boyunca 4°C'de depolanması, hem kapsüllenmiş hem de kapsüllenmemiş embriyoların, depolanmayan embriyolara kıyasla, hayatta kalma ve tam çimlenme frekanslarını önemli ölçüde azaltmıştır. Bununla birlikte, 4°C'de 30 gün veya 60 gün depolama sonrasında, kapsüllenmiş embriyoların canlılık oranları sırasıyla %67.8 ve %53.5, çimlenme frekansları ise %43.2 ve %32.4 olarak belirlenmiştir.

Manjkhola vd. (2005), Himalaya'nın tehlike altında olan tıbbi bitkilerinden *Arnebia euchroma*'da eşzamanlı olarak organogenesis ve somatik embriyogenesis protokolü geliştirmişlerdir. Çalışmada yaprak kaynaklı kalluslardan hem sürgün hem de somatik embriyo rejenerasyonu gözlenmiştir. En yüksek sürgün oluşumu 2.5 µM BA ve 1 µM IBA içeren ortamlarda kültür başına 12.2 sürgün olarak tespit edilmiştir. En yüksek ptimal somatik embriyo oluşumu ise 2.5 µM BA ve 2.5 µM IBA içeren ortamlarda kültür başına 16.3 embriyo olarak belirlenmiştir. % 3 sodyum aljinat ve kalsiyum nitrat (25 dakika boyunca 100 mM) ile kapsüllenmiş erken kotiledon evredeki embriyolar, MS ortamında kültüre alınmış ve %60.6 oranında çimlenme göstermiştir. Sentetik tohum üretiminde sodyum aljinatın düşük konsantrasyonları (% 1-2) çok yumuşak, yüksek

konsantrasyonu (% 4) ise çok sert yapı için köklerin ve sürgünlerin ortaya çıkması engellenmiştir.

Tangolar ve Büyükalaca (2008) asma bitkisinde, B Amerikan anaçlarından elde edilen (*V. vinifera* L. cvs. 'Chasselas' x *V. berlandieri*), 41 olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarını kullanarak 2,4-D (0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/L) ile desteklenen B5 ortamı üzerinde aydınlık ve karanlık koşullar altında kültüre almışlardır. En yüksek somatik embriyo oluşumu karanlık koşullarda 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L 2,4-D içeren ortamlarda sırasıyla %27.5, %22.0 ve %20 oranlarında bulunmuştur. Torpido aşamasındaki somatik embriyo sayısı, en fazla 1.0 mg/L 2,4-D (565 embriyo) ile desteklenmiş B5 ortamında karanlık koşullarda elde edilmiştir. Yapay tohum üretimi için torpido aşamasındaki somatik embriyolar izole edilmiş ve çeşitli konsantrasyonlarda sodyum aljinat (% 3 ve 4) ile kalsiyum klorür (75, 100 ve 125 mM) çözeltilerinde muamele edilerek, boncuk sertliği ve somatik embriyoların dönüşüm frekansı üzerindeki etkileri test edilmiştir. Kapsülasyon için en uygun kombinasyon %3 sodyum aljinat ile 125 mM kalsiyum klorür karışımı olarak belirlenmiştir. Oluşturulan sentetik tohumlar, çimlenme performansı için BGD içermeyen MS ortamlarına transfer edilmiş ve %54-74 arasında çimlenme oranı görülmüştür.

Pintos vd. (2008), Mantar meşesi (*Quercus suber*) ağacında sentetik tohum üretilmesi amacıyla olgun somatik embriyoları (1.5 ± 0.5 cm büyüklüğünde), aljinat ile kaplamış ve yapay tohumların ticarileştirilmeye yönelik depolanabilme koşullarını test etmişlerdir. İlk olarak, mineral bileşenler ile kapsüllemenin sentetik tohuma dönüşümü üzerindeki etkisi, daha sonra kapsüle sukroz ve mineral besin maddelerinin eklenmesinin etkisi ve sukrozun kapsüle eklenmesi ile sentetik tohumların soğuk depolanmasının dönüşüm oranına etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda sentetik tohumların dönüşüm oranı, mineral besinlerle takviye edilmiş ortamda, besin içermeyen ortamdan daha yüksek bulunmuştur. Öte yandan kapsüle sukroz ilave edilmesinin sentetik tohum dönüşüm oranı üzerinde önemli bir etkisi bulunmamıştır. Kapsülasyon için %5'lik sodyum aljinat ile 50 ve 100 mM CaCl_2 kullanılmış ancak iki konsantrasyon arasında önemli bir istatistiksel fark kaydedilmemiştir. Sentetik tohumlar, dönüşüm kapasitesinde önemli bir kayıp olmadan 4°C'de iki ay boyunca soğuk koşullar altında muhafaza edilmiştir.

Kumar ve Thomas (2012), önemli bir tıbbi bitki türü olan *Clitoria ternatea* Linn'nin kotiledon eksplantlarından türetilen embriyojenik kalluslardan etkili bir bitki rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Optimum embriyojenik kallus, % 75 oranında 2 mg/L 2,4-D ile desteklenmiş MS ortamında oluşmuştur. Kalluslar 2 mg/L BA ve 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamlarında alt kültüre alınmış ve 45 günlük kültür sürecinden sonra kallusların % 61'i farklı gelişim aşamalarında olan gram kallus başına ortalama 22 somatik embriyo oluşturmuştur. Öte yandan kültür ortamına daha yüksek konsantrasyonlarda sukroz ve ABA eklenmesi, embriyojenik yanıtı önemli ölçüde arttırmıştır. 2 mg/L BA, 0.2 mg/L NAA ve % 4 sukroz ile desteklenmiş MS ortamında, kültürlerin % 76'sı gram kallus başına ortalama 28 embriyo oluşumu ile sonuçlanmıştır. En yüksek embriyojenik tepki, % 83 oranında 2 mg/L BA, 0.2 mg/L NAA ve 3 mg/L ABA ilave edilmiş MS ortamında gram kallus başına ortalama 37 embriyo olarak belirlenmiştir. Sentetik tohumlar, %3 sukroz, 1.0 mg/L BA, 0.2 mg/L NAA ve MS ortamı içeren kalsiyum aljinat ile kapsüllenmiştir. En yüksek sentetik tohum çimlenmesi (%92) 2 mg/L BA ve 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamında gözlenmiş ve %4'lük sodyum aljinat optimum bulunmuştur. Sentetik tohumlar 4°C'de ve $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de 5 aya kadar muhafaza

edilmiş ve 5 aylık depolama sürecinden sonra %86 oranında canlılık saptanmıştır. Çimlenen sentetik tohumlar başarıyla toprağa transfer edilmiştir.

Cheruvathur vd. (2013), *Rhinacanthus nasutus* (L.) kurz'un kotiledon ve yaprak eksplantlarını 1.0–5.0 mg/L 2,4-D ile tek başına veya 0.3–1.5 mg/L IBA ile kombinasyonunu içeren MS ortamlarında kültüre almışlardır. Maksimum kallus indüksiyonu (%100), 4 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L IBA içeren MS ortamında kültüre alınan kotiledon eksplantlarında gerçekleşmiştir. Kalluslar IBA (3.0–5.0 mg/L) içeren ½ MS ortamında alt kültüre alındığında kolay dağılabilen embriyojenik kalluslar oluşturmuş ve 45 günlük kültür sürecinden sonra çeşitli gelişim aşamalarında olan (globular, kalp, torpido) somatik embriyolar meydana getirmiştir. En yüksek kallus embriyogenesis, 4 mg/L IBA içeren MS ortamında oluşmuştur. Ayrıca, kallusların %47'si gram kallus başına ortalama 16.3 somatik embriyo üretmiştir. Çimlenme için, torpido evresindeki somatik embriyolar izole edilmiş, 0.5 mg/L BAP ve IAA içeren ½ MS ortamında kültüre alınmıştır. Torpido evresindeki somatik embriyolar, sodyum aljinat (3, 4 ve 5 %) içeren MS ortamı içerisinde bekletildikten sonra sentetik tohum üretimi için CaCl₂ (100 ve 125 mM) çözeltisine damlatılarak, 60-80 rpm çalkalayıcıda 30 dk boyunca çalkalanmıştır. %3 sodyum aljinat ile kapsüllenene ve 100 mM CaCl₂ ile sertleştirilmiş olan sentetik tohumlar yüksek oranda (%92) çimlenme frekansı göstermiş ve 0.2 mg/L içeren MS ortamında optimum büyüme sağlamışlardır.

Baskaran vd. (2015) tarafından nesli tükenmekte olan tıbbi bir bitki olarak *Mondia whitei* türünde somatik embriyogenesis ve sentetik tohum üretimi yoluyla etkili bir bitki rejenerasyon sistemi geliştirilmiştir. En yüksek somatik embriyogenesis frekansı (% 100) 40 g/L sukroz, 8 g/L agar, 20 µM, 2,4-D ve 1 µM TDZ içeren kültür ortamında tespit edilmiştir. Kalp, torpido ve kotiledon evrelerindeki somatik embriyolar, 20 g/L sukroz, 8 g/L agar, 0.5 µM meta-topolin riboside (mTR) ve 0.25 µM IAA içeren MS ortamından izole edilmiştir. Embriyolar, sıvı MS ortamı ve farklı konsantrasyonlarda sodyum alginat ve kalsiyum klorür çözeltilerinde 10 dk maruz bırakılarak kapsüllenmiştir. %3 sodyum alginat ve 100 mM CaCl₂·2H₂O kombinasyonu, sentetik tohumların hayatta kalma oranı (%95.7) ve çimlenme (%73) frekanslarını optimum olarak sağlamıştır. 4°C'de depolanan sentetik tohumların çimlenme oranı 50 günlük depolamadan sonra %51,6 olarak belirlenmiştir. Somatik embriyogenesis ve sentetik tohum uygulamaları sonucu geliştirilen bitkiler sera koşullarında iklimlendirilmiş ve %90 oranında adaptasyon sağlanmıştır. Bu protokol ile germplazm ve doğal popülasyonların korunması için nispeten basit ve hızlı bir sistemin oluşturulduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma 2018-2019 yıllarında Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1. Bitkisel Materyal

Çalışmada bitkisel materyal olarak, daha önce 116G020 TUBİTAK 1007 alt projesi kapsamında Antalya-Kemer bölgesinden toplanan doğal *Ricotia carnosula* tohumlarının (Şekil 3.1.) serada üretilmiş tohumları kullanılmıştır.



Şekil 3.1. *Ricotia carnosula*'nın doğadaki görüntüleri

3.2. Metot

3.2.1. *In vitro* stok bitki yetiştirme çalışmaları

Çalışmada kullanılacak olan iki farklı eksplant tipinin (kotiledon ve hipokotil) elde edilmesi için steril koşullarda Çizelge 3.1'deki çimlendirme ortamlarına tohum ekimi yapılarak *in vitro* stok bitki üretimi yapılmıştır. Bu amaçla, en iyi çimlenme oranını belirlemek için ön deneme amaçlı 5 farklı çimlenme ortamı test edilmiştir.

Çizelge 3.1. Tohum çimlendirme ortamlarının içerikleri

Ort. No	Temel Ortam*	Vitamin**	Sukroz	Plant Agar	IAA***	pH
1	Tam MS	NN	30 g/L	7 g/L	-	5.8
2	Tam MS	NN	30 g/L	7 g/L	1 mg/L	5.8
3	Modifiye Tam MS (Mod 3B)	NN	30 g/L	7 g/L	-	5.8
4	Modifiye Tam MS (Mod 3B)	NN	30 g/L	7 g/L	1 mg/L	5.8
5	MES tampon'lu MS tuzları	NN	30 g/L	7 g/L	-	5.8

*MS (Murashige Skoog 1962) (Duchefa), **NN (Nitsch ve Nitsch 1969) (Duchefa), ***IAA (Indol-3-asetik asit) (Duchefa)

Daha sonraki stok bitki geliştirme çalışmalarında, daha başarılı bulunduğu için 5 nolu MES 'lı MS ortamı (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı tuzları ile NN ortamı (Nitsch ve Nitsch, 1969) vitaminleri çimlendirme ortamı olarak kullanılmış ve hazırlanan bu ortam 180 ml'lik steril cam kavanozlara 30 ml dökülerek, sterilizasyonu için 121 °C'de 20 dk otoklavlanmıştır.

R. carnosula tohumlarının ekimi öncesinde Şekil 3.2'de özetlenen sterilizasyon basamakları uygulanmıştır. Sterilizasyon için dezenfektan olarak etanol ve sodyum hipoklorit kullanılmıştır. Tohumlar ilk aşamada, %70'lik etanolde 2 dk bekletildikten sonra steril kavanozlarda saf su ile 1 defa (5dk) durulanmıştır. Durulanan tohumlar ikinci aşamada, 1-2 damla Tween 20 içeren %15 lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dk boyunca bekletilmiş, en son her biri 2 dk'lık 3 durulama işleminden geçirilmiştir. Sterilizasyon işlemlerinin tümü laminar flow kabin içerisinde yapılmıştır.



(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 3.2. Sterilizasyon basamakları; **a)** *Ricotia carnosula* tohumlarının kapsüllerinden çıkarılması; **b)** %70'lik etanol ve %15'lik sodyum hipoklorit uygulaması; **c); d)** Tohumların çimlendirme ortamında kültüre alınması

Sterilizasyon sonrasında tohumların ekimi, her bir kavanoza 7 tohum olacak şekilde yapılmıştır. Kültüre alınan tohum kavanozlarının ağızları streçlenip iki gün boyunca 25 °C’de karanlık koşullarda inkübasyona bırakılmış ve ardından 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyoda sahip (25°C) bitki büyütme odasına transferi yapılmıştır. Bir haftalık *in vitro* fidelerden steril koşullar altında kotiledon ve hipokotil eksplantları alınarak, hazırlanan rejenerasyon ortamlarında kültüre alınmıştır.

3.2.2. *In vitro* rejenerasyon denemeleri

Çalışmada, kotiledon ve hipokotilden oluşan iki farklı eksplant tipinin rejenerasyonu için Çizelge 3.2.’de içerik ve konsantrasyonları belirtilen çeşitli oksin ve sitokininlerin farklı kombinasyonlarını içeren, kontrol dahil 73 farklı kültür ortamı hazırlanmıştır. Bu ortamlarda temel besin ortamı olarak MES ’lı MS ortamı makro-mikro tuzları ile NN ortamı vitaminleri kullanılmıştır. Karbonhidrat kaynağı olarak %3 sukroz, katılaştırıcı ajan olarak ise % 0.3 gelrite ilave edilmiştir.

Ortamların pH değeri 1 N KOH ve 0.1 N HCl kullanılarak 5.8’e ayarlanmış ve ardından 121 °C’de 20 dk otoklavlanarak sterilizasyonu yapılmıştır.

Otoklavlanan besin ortamlarının oksin ve sitokinin stokları DMSO (dimethyl sulfoxide) ve saf su ile çözündürülerek soğuk filtrasyon ile sterilize edilmiş ve otoklavlanan ortamlara steril laminar flow kabin içerisinde uygun miktarda ilave edilmiştir. Çalışmada oksin olarak 2,4-D (2,4-diklorofenoksi asetik asit), NAA (naftalen asetik asit) ve IAA (Indol-3-asetik asit), sitokinin olarak ise TDZ (Thidiazuron), BA (Benzil adenin) ve Zeatin’in 0, 0.5, 1 ve 2 mg/L lik konsantrasyonları, MES ’lı MS ortamına Çizelge 3.3.’de belirtildiği gibi farklı kombinasyonlarda ve konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. Hazırlanan ortamlar 6 cm’lik steril petri kaplarına 10 ml hacimde dökülmüş ve kültür yapılıncaya kadar streçlenerek 25°C karanlık koşullarda muhafazası sağlanmıştır.

Her bir eksplant tipi için her bir ortam uygulamasında dört petri ve her bir petride dört eksplant kültüre alınmıştır. Rejenerasyonun teşvik edilmesi için kotiledon (5x5 mm) ve hipokotil (5 mm uzunlukta) eksplantlarının kenarları steril bisturi yardımıyla kesilerek yara dokularının oluşması teşvik edilmeye çalışılmıştır. Eksplantlar petriler içerisinde kültüre alındıktan sonra petrilerin ağızları sıkıca streçlenip, 25°C’de karanlık koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Kültürler iki hafta sonra 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyoda sahip (25°C) bitki büyütme odalarına transfer edilmiştir. Kültüre alınan eksplantların her birisinin somatik embriyo veya sürgün oluşturma yetenekleri haftalık olarak stereo mikroskop altında gözlemlenmiş ve 8 hafta sonra deneme sonuçları kaydedilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmanın tohum çimlendirme ve rejenerasyon aşamalarında kullanılan besin ortamlarının içerikleri ve konsantrasyonları

İçerik	MS* (mg/L)	MS Mod 3B* (mg/L)	MS MES* (mg/L)	NN* (mg/L)
Makro Elementler				
CaCl ₂	332	332	332	-
KH ₂ PO ₄	170	170	170	-
KNO ₃	1900	950	1900	-
MgSO ₄	180	180	180	-
NH ₄ NO ₃	1650	825	1650	-
Mikro Elementler				
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	-
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	-
FeNa ₂ EDTA	36.70	36.70	36.70	-
H ₃ BO ₃	6.20	6.20	6.20	-
KI	0.83	0.83	0.83	-
MnSO ₄ . 4H ₂ O	16.90	16.90	16.90	-
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	-
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.60	8.60	8.60	-
Vitaminler				
Glycine	2.00	2.00	2.00	2.00
Myo-İnositol	100	100	100	100
Nicotinic Acid	0.50	0.50	0.50	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50	0.50	0.50	0.50
Thiamine-HCl	0.10	0.10	0.10	0.10
Biotin	-	-	-	0.05
Folic Acid	-	-	-	0.50

*Duchefa hazır ortamları kullanılmıştır.

3.2.3. Somatik embriyoları bitkiye dönüştürme ve aklimatizasyon çalışmaları

Kültüre alınan hipokotil ve kotiledon eksplantlarından gelişim gösteren kotiledon evresindeki somatik embriyolar steril koşullar altında izole edilmiş ve bu embriyolar çimlendirilmek üzere BGD içermeyen besin ortamına transfer edilmiştir. Bu ortamın hazırlanması için 30 g/L sukroz, NN vitamin, 7g/L plant agar içeren MES 'lı MS ortamı kullanılmış (pH 5.9) ve 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak sterilize edilmiştir. İyi bir embriyo gelişimi için kültür kabı olarak steril cam tüpler kullanılmış ve her bir tüpe 12.5 ml hacimde ortam dökülmüştür. İzole edilen kotiledon aşamasındaki embriyolar, her tüpte bir embriyo olacak şekilde transfer edilmiş ve 25 °C'de 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyoda sahip bitki büyütme odalarına aktarılmıştır. Yaklaşık bir ay sonra sürgün ve kök oluşumu tamamlanan *in vitro* bitkiciklere aklimatizasyon işlemi uygulanarak dış koşullara alıştırılmıştır.

Çizelge 3.3'de görüldüğü üzere, Zeatin hormonu diğer sitokinler olan BA ve TDZ de olduğu gibi oksinler ile kombine edilmeden kullanılmıştır. Bunun nedeni oldukça kapsamlı bu denemede eksplant yönünden yaşanan sıkıntı olup, bu nedenle sadece sitokin olarak tek başına etkisi araştırılmıştır. Öte yandan, Çizelge 3.3'den de görüldüğü gibi ortam olarak her bir eksplant tipi için kontrol ortamı dahil toplam 73 adet besin ortamı kullanılmıştır. İki sayfadan oluşan bu besin ortamlarının içeriklerini daha kısa özetlemek için Çizelge 3.4. oluşturulmuştur.

Çizelge 3.3. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarının rejenerasyon denemeleri için oluşturulan besin ortamları ve BGD içeriklerinin farklı bir gösterimi

Besin Ortamı No	SİTOKİNİN			OKSİN		
	BA (mg/L)	TDZ (mg/L)	Zeatin (mg/L)	IAA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)
Kontrol	-	-	-	-	-	-
1				0.5		
2				1		
3				2		
4					0.5	
5					1	
6					2	
7						0.5
8						1
9						2
10	0.5					
11	0.5			0.5		
12	0.5			1		
13	0.5			2		
14	0.5				0.5	
15	0.5				1	
16	0.5				2	
17	0.5					0.5
18	0.5					1
19	0.5					2
20	1					
21	1			0.5		
22	1			1		
23	1			2		
24	1				0.5	
25	1				1	
26	1				2	
27	1					0.5
28	1					1
29	1					2
30	2					
31	2			0.5		
32	2			1		
33	2			2		
34	2				0.5	
35	2				1	
36	2				2	
37	2					0.5

Çizelge 3.3'ün devamı.

38	2					1
39	2					2
40		0.5				
41		0.5		0.5		
42		0.5		1		
43		0.5		2		
44		0.5			0.5	
45		0.5			1	
46		0.5			2	
47		0.5				0.5
48		0.5				1
49		0.5				2
50		1				
51		1		0.5		
52		1		1		
53		1		2		
54		1			0.5	
55		1			1	
57		1				0.5
58		1				1
59		1				2
60		2				
61		2		0.5		
62		2		1		
63		2		2		
64		2			0.5	
65		2			1	
66		2			2	
67		2				0.5
68		2				1
69		2				2
70			0.5			
71			1			
72			2			

Çizelge 3.4. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarının rejenerasyon denemeleri için oluşturulan besin ortamları ve BGD içeriklerinin toplu gösterimi

Ortamların BGD içeriği		0	IAA			2,4 D			NAA		
			0.5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	0.5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	0.5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L
	0	0 (Kont)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BA	0.5 mg/L	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
	1 mg/L	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
	2 mg/L	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
TDZ	0.5 mg/L	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
	1 mg/L	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59
	2 mg/L	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
Zeatin	0.5 mg/L	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 mg/L	71	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2 mg/L	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Aklimatizasyon için öncelikle 1:1:1 oranında torf, perlit ve vermikulit karışımı hazırlanmış ve 121 °C’de 30 dk boyunca otokolavlanarak sterilizasyonu yapılmıştır. Hazırlanan bu karışım, küçük viyollere eşit miktarlarda dağıtılıp suya doymun hale getirilmiştir. Tüplerden pens yardımı ile çıkartılan bitkicikler, köklerine zarar verilmeden agar bulaşığından çeşme altında su ile arındırılmış ve her viyol yuvasına bir adet bitkicik olacak şekilde dikim işlemi yapılmıştır. Dış koşullarda ortam neminin düşük olması sebebiyle, viyollere transfer edilen ancak stomaları henüz aktif olmayan bitkicikler nem koşullarına uyum sağlayamamakta ve bu aşamada önemli kayıplar yaşanmaktadır. Bu nedenle transfer edilen bitkiciklerde nem oranının yüksek tutulması için dikim yapılan viyollerin üzeri, içlerine su spreyleneş plastik pet bardaklarla (2 adet) kapatılmıştır. Daha sonra aktarılan bitkiciklerin 25°C’de 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyoda sahip bitki büyütme odalarında muhafazası yapılmış ve hergün belirli aralıklarla su ile spreyleneş kademeli nemlendirme işlemi yapılmıştır. Büyümeye başlayan bitkiler bir süre sonra daha iyi gelişim gösterebilmesi için viyollerden küçük saksılara aktarılmış ve 2 hafta boyunca delikli plastik bardaklar altında tutulmuştur. Gelişmeye devam eden bitkilerde ortam neminin düşürülmesi için, iki haftanın sonunda pet bardaklar kademeli olarak tamamen kaldırılmıştır. 4. hafta ise bitkilerin dış ortama adaptasyonunu sağlamak için pet bardaklar tamamen kaldırılmış ve alıştırma seralarına transferi yapılmıştır.

3.2.4. Histolojik analizler

Kotiledon ve hipokotil eksplantlarından elde edilen rejenerantların gelişimlerine ilişkin histolojik analizler, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümü, Hücre Biyolojisi Laboratuvarında yapılmıştır. Bu amaçla *R. carnosula*’nın farklı evrelerde bulunan kalp, torpido ve kotiledon aşamasındaki embriyoları, sürgünleri ve kalluslar kullanılmıştır. Histolojik gözlemlerin yapılması için embriyo ve sürgünler fikse edildikten sonra parafin ve epon kesitleri alınmıştır. Histolojik analizlere ait ayrıntılar aşağıda belirtilmiştir;

Prafine Alma: Sürgünler ve farklı gelişim safhasında bulunan embriyolar Çizelge 3.5’de belirtilen metoda göre fikse edildikten sonra %70’lik etil alkol içerisinde muhafaza edilmiştir. Daha sonra parafine gömme işlemi uygulanarak, 4-8 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Bu kesitler uygun boyalar ile boyandıktan sonra floresan mikroskop altında gözlemleri yapılmıştır.

Kesit alma işlemi için Formalin-Asetik-Alkol (FAA); 50 ml etil alkol, 5 ml glasiyel asetik asit, 10 ml formaldehit (%37-40) ve 35 ml saf su kullanılarak hazırlanmıştır.

0.025 M fosfat tamponu (pH 7); 22.6 ml 0.1 M NaH₂PO₄.2H₂O (sodyum dihidrojen fosfat di hidrat) + 77.4 ml 0.1 M Na₂HPO₄ 7H₂O (sodyum hidrojen fosfat hepta hidrat) konulduktan sonra hacim 200 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Glutaraldehit (GA); 0.025 M fosfat tamponunda (pH 7) %2.5 glutaraldehit hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. Parafine alma metodunda uygulanan aşamalar

Çözelti	Fiksasyon	Sıcaklık ve Süre
Asetik asit : %100 alkol (1:3)	Fazla fiksatifin alınması	1 gün
%96 Etil alkol		2 dakika 2 kez
%70 Etil alkol	Saklama	2 dakika 2 kez
%70 Etil alkol	Dehidratasyon	Buzdolabı (+4 °C)
%80 Etil alkol		30 dakika
%96 Etil alkol		30 dakika
%100 Etil alkol	Şeffaflaştırma	30 dakika 2 kez
%100 Etil alkol:ksilol (2:1)		30 dakika
%100 Etil alkol:ksilol (1:1)		30 dakika
%100 Etil alkol:ksilol (1:2)		30 dakika
Ksilol	Parafin infiltrasyonu	30 dakika 3 kez
Ksilol: parafin (1:1)	Fiksasyon	1gün 56°C etüv
Parafin	Fazla fiksatifin alınması	1gün 56°C etüv
Parafin		1gün 56°C etüv

Fiksasyon Yapılan Materyallerin Saklanması: Fikse edilen materyallerin tümü, havası alındıktan sonra (24 saat) sırasıyla (%100-%96-%80) etil alkol içerisinde bir kez çalkalanmıştır. Daha sonra %70'lik etil alkol içerisinde iki defa çalkalanarak, yine %70'lik etil alkol içerisinde buzdolabında (+4°C) muhafaza edilmiştir.

Parafinlerden kesitlerin alınması: Parafin kalıplara hazırlanan somatik embriyolardan ve sürgünlerden el mikrotomu (Leica RM 2125 RT) ile kesitler alınmış ve albumin mayer bulunan lama koyularak 24 saat boyunca 40°C'lik ısıtma tablasında bekletilmiştir. Kesitlerin parafinden kurtarılması için Çizelge 3.6'da belirlenen basamaklar uygulanmıştır.

Çizelge 3.6. Kesitlerin parafinden kurtarılması

Çözelti	Uygulama	Süre
Ksilol	Deparafinizasyon	10 dakika
Ksilol: %100 Etil alkol (2:1)		10 dakika
Ksilol: %100 Etil alkol (1:1)		10 dakika
Ksilol: %100 Etil alkol (1:2)		10 dakika
%100 Etil alkol		10 dakika
%96 Etil alkol		10 dakika
%70 Etil alkol		10 dakika
%50 Etil alkol		10 dakika
%35 Etil alkol		10 dakika
Saf su		10 dakika

Albumin Mayer hazırlanışı ve Mordanlama işlemi: İlk olarak yumurta akı filtre kağıdı üzerinde süzdürülmüştür. Filtreden geçirilen yumurta akına aynı ölçüde gliserin eklenmiş ve son olarak küçük bir damla timol ilave edilmiştir.

Saf su içerisinde bekletilen kesitler, 5 gr amonyum demir sülfat üzerine 100 ml saf su eklenerek hazırlanan mordan çözeltisinden geçirilerek, 120 dakika bekletilmiştir. Musluk suyu altında 60 dakika tutulan kesitler son olarak saf su ile çalkalanmıştır.

Hematoksilin analizi ve boyama işlemi: Hematoksilin çözeltisi %96'lık etil alkol içerisinde hazırlanmıştır. Ancak bu stok çözeltinin boyama işlemi yapılmadan en az bir ay önce hazırlanması gerekmektedir. 10 ml Hematoksilin çözeltisi üzerine 10 ml gliserin eklenerek, 80 ml saf su ile çözeltinin hacmi 100'e tamamlanmıştır.

Mordanlama işlemi yapılan kesitler boya içerisine konulduktan sonra karanlık koşullar altında bir gün boyunca bekletilmiştir. Ardından boyanan kesitler musluk suyu altında 2 dakika durulandıktan sonra diferansiyon işlemi yapılmıştır. %1'lik mordan solüsyonuna konulan kesitler mikroskop altında incelenerek uygun şekilde boyama işlemine tabi tutulmuştur. Diferansiyon işlemi sonrasında kesitler saf su ile çalkalanarak Çizelge 3.7'de belirtilen dehidratasyon işlemi uygulanmıştır.

Çizelge 3.7. Hematoksilen analiz yöntemi

Çözelti	Uygulama	Süre (dk)
Hematoksilen		30 dakika
Suda çalkalama		Boya fazlası gidinceye kadar
%35 Etil alkol	Dehidratasyon	3 dakika
%50		3 dakika
%70		3 dakika
%96		3 dakika
%100		5 dakika - 2 kez
Ksilol: %100 etil alkol (1:2)		5 dakika
Ksilol: %100 Etil alkol (1:1)		5 dakika
Ksilol: %100 Etil alkol (1:2)		5 dakika
Ksilol		5 dakika - 2 kez

Kesitlerin kalıcı preparat haline getirilmesi için, dehidratasyon işlemi sonlandıktan sonra kesitlerin üzerine birer damla entellan konulmuş ve lamel ile kapatılarak kurumaya bırakılmıştır. Daimi preparatlar elde edildikten sonra floresan mikroskop altında sürgün ve somatik embriyo kesitlerinin histolojik incelemeleri yapılmış ve fotoğraflanmıştır.

3.2.5. Sentetik tohum çalışmaları

Rejenerasyon ortamlarında, kotiledon ve hipokotil eksplantlarından gelişen somatik embriyolar kullanılarak sentetik tohum çalışmaları yapılmıştır. Farklı gelişim evrelerinde bulunan embriyolar mikroskop altında belirlenerek, kotiledon aşamasına ulaşmış olan embriyolar enkapsülasyon işleminde kullanılmıştır. Sentetik tohum oluşumu

için, Çizelge 3.8’de belirtilen farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlardaki sodyum aljinat ile kalsiyum klorür çözeltilerinden oluşturulan kaplama ortamları hazırlanmıştır.

Çizelge 3.8. Sentetik tohum elde edilmesinde kullanılan farklı sodyum aljinat ile kalsiyum klorür konsantrasyonları ve kombinasyonlarından oluşturulan kaplama ortamları

Ortam No	Sodyum Aljinat İçeriği	CaCl ₂ İçeriği
1.	Kontrol	
2.	%3	100 mM
3.	%3	125 mM
4.	%3	150 mM
5.	%4	100 mM
6.	%4	125 mM
7.	%4	150 mM

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan sodyum aljinat ve CaCl₂ çözeltileri otoklavlanarak sterilize edilmiş ve sentetik tohum çalışmaları için kullanılmıştır. İki farklı sodyum aljinat çözeltisi 30 g/L sukroz içeren sıvı MS besin ortamına ilave edilerek otoklavlanmıştır. Kotiledon aşamasındaki embriyolar, ilk olarak steril kabin içerisinde sodyum aljinatlı bu karışımla 30 dk boyunca muamele edilmiştir. Ardından steril pastör pipet uç çapları 2 mm olacak şekilde kesilerek ağızları genişletilmiştir. Bu pipet yardımıyla sodyum aljinat içerisindeki embriyolar, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan CaCl₂ çözeltilerinin içerisine el kontrolü ile damlatılmıştır. Daha sonra somatik embriyo kapsüllerinin istenilen form ve kaliteye ulaşabilmesi için 20 dk boyunca manyetik karıştırıcıda çalkalanmıştır. Bu süreçte Ca⁺² ve Na⁺ arasında iyon değişimi sağlanarak oluşturulan sentetik tohumlara sertlik ve dayanıklılık kazandırılmaktadır. Bu işlem sonunda kaplanan embriyolar CaCl₂’den arındırılmak üzere 3 defa saf su ile durulandıktan sonra filtre kağıtlarında hafifçe kurutulmuştur. Oluşturulan sentetik tohumlar, BGD içermeyen MES ’lı MS ortamına transfer edilerek, çimlenme yetenekleri belirlenmiştir.

3.2.6. İncelenen özellikler ve deneme deseni

Farklı rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan kotiledon ve hipokotil eksplantlarının tümü stereo mikroskop altında incelenerek, her bir petri için gözlem alınmıştır. Gözlemler genel olarak dört ana grupta yapılmıştır.

3.2.6.1. Kallus gözlemleri

Bu amaçla yapılan gözlemlerde kallus oluşturma oranı (%), embriyojenik kallus oluşturma oranı (%), organojenik kallus oluşturma oranı (%) ve kallus miktarı gözlemleri yapılmıştır.

Kallus oluşturma oranı (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan kallus oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır.

Embriyojenik kallus oluşturma oranı (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan embriyojenik kallus oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır. Embriyojenik kallus tanımlaması yapılırken; Şekil 4.1’de görüldüğü üzere, renk olarak sarı ve açık yeşil renkli küçük öbekli kalluslar ve farklı bir yapıya sahip kolay dağılabilen “friable” kallus oluşumları “embriyojenik kallus” olarak ele alınmıştır.

Organojenik kallus oluşturma oranı (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan organojenik kallus oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır. Organojenik kalluslar yapısal olarak çok daha sert, kompakt ve koyu yeşil renkte oldukları tespit edilmiş ve bu yapıya sahip olan kalluslar genel olarak sürgün oluşturduğu için organojenik kallus olarak değerlendirilmiştir.

Kallus derecesi: Her bir petride kültüre alınan 5 mm lik eksplantlardan oluşan kallus derecesi için eksplant merkezde olacak şekilde eksplantın çevresinde oluşan kallusun çapı (cm cinsinden) 0 ile 3 arasında rakamsal bir göreceli değerlendirme sistemi uygulanmıştır:

- 0 Kallus oluşumu yok: Kallus yok
- 1 Kallus oluşumu az: 0.5-1 cm çaplı kalluslar
- 2 Kallus oluşumu orta: 1-2 cm çaplı kalluslar
- 3 Kallus oluşumu yoğun : $2\text{cm} \leq$ çaplı kalluslar

3.2.6.2. Somatik embriyogenesis gözlemleri

Bu amaçla yapılan gözlemlerde direkt somatik embriyogenesis oranı (%), indirekt somatik embriyogenesis oranı (%) ve somatik embriyo sayısına ait gözlemler alınmıştır.

Direkt somatik embriyogenesis oranı: Her bir petride kültüre alınan eksplantlarda kallus oluşumu olmaksızın direkt olarak gelişen somatik embriyoların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır.

İndirekt somatik embriyogenesis oranı: Her bir petride kültüre alınan eksplantlarda oluşan kalluslardan indirekt olarak gelişen somatik embriyoların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır.

Somatik embriyo verimi: Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan oluşan somatik embriyo verimi kaydedilmiştir.

3.2.6.3. Organogenesis gözlemleri

Bu amaçla yapılan gözlemlerde direkt sürgün oluşturma oranı (%), indirekt sürgün oluşturma oranı (%), sürgün sayısı, kök oluşturma oranı (%), kök yoğunluğu, kalın kök oluşturma oranı (%) ve ince kök oluşturma oranı (%) gözlemleri alınmıştır.

Direkt sürgün oluşturma oranı (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlarda kallus oluşumu olmaksızın direkt olarak gelişen sürgünlerin, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır.

İndirekt sürgün oluşturma oranı (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlarda kalluslardan sürgünlerin, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır.

Sürgün verimi: Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan oluşan sürgün verimi olarak kaydedilmiştir.

Kök oluşturma (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan oluşan köklerin, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır.

Kalın kök oluşturma (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlarda oluşan kalın köklerin, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır.

İnce kök oluşturma (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlarda oluşan ince köklerin, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır.

Kök yoğunluğu: Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan oluşan kökler yoğunlukları açısından 0 ile 3 arasında rakamsal bir göreceli değerlendirme sistemine göre değerlendirilmiştir (Şekil 3.3).

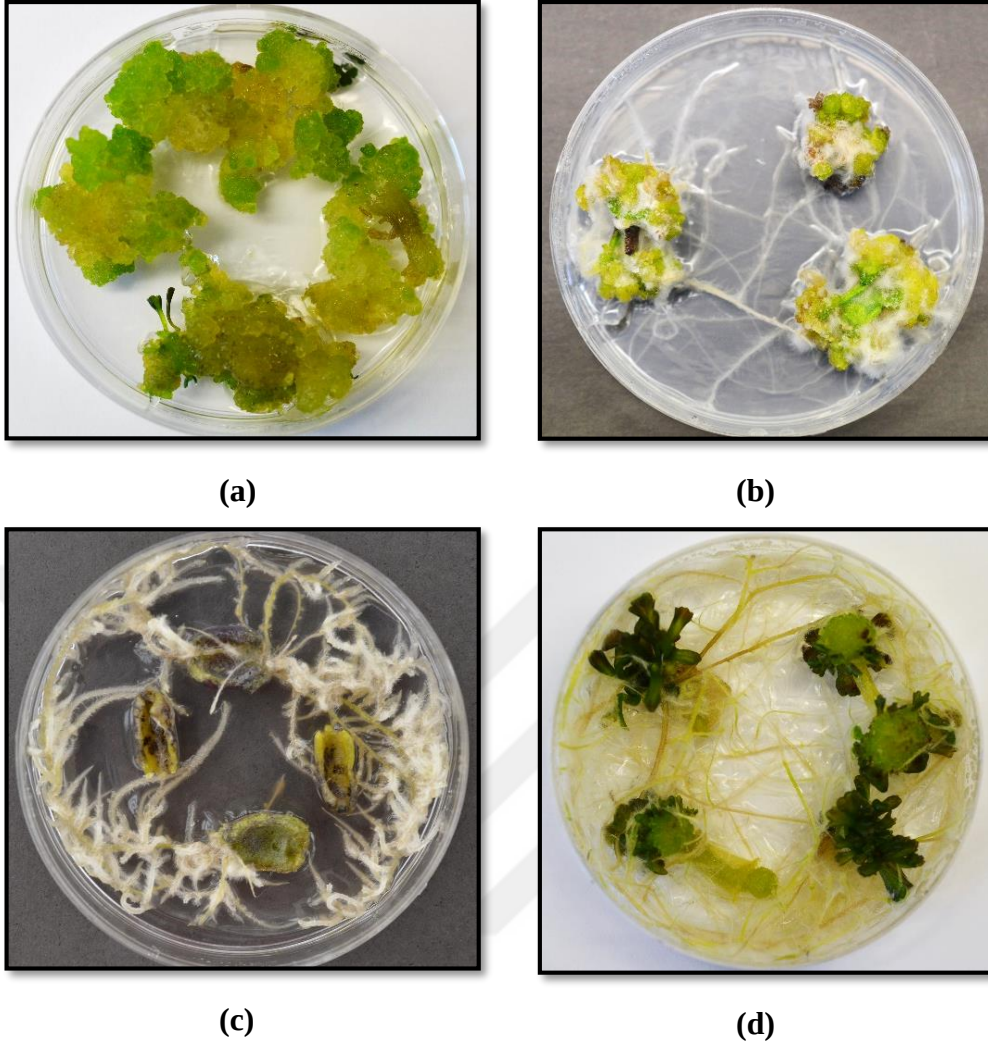
- 0 Kök oluşumu yok
- 1 Kök oluşumuz az
- 2 Kök oluşumu orta
- 3 Kök oluşumu yoğun

3.2.6.4. Antosiyanin gözlemleri

Bu amaçla yapılan gözlemlerde kalluslardaki antosiyanin oranı (%) ve rejenerantlardaki antosiyanin oranı (%) gözlemleri yapılmıştır.

Antosiyaninli kallus oranı (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan meydana gelen kalluslardaki antosiyanin oluşumunun, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır.

Antosiyaninli rejenerant oranı (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan meydana gelen somatik embriyo ve sürgünlerdeki antosiyanin oluşumunun, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır.



Şekil 3.3. Kültüre alınan eksplantlardan oluşan kök yoğunluklarına ait görüntüler; **a)** kök oluşumu yok; **b)** kök oluşumu az; **c)** kök oluşumu orta; **d)** kök oluşumu yoğun

Tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulan denemede her bir eksplant tipi için her bir uygulama her tekerrürde dört eksplant olacak şekilde dört tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri JMP (v8.00, SAS Institute Inc., USA) programı ile yapılmıştır. Eksplant ve rejenerasyon ortamları arasındaki farklılıkların tespiti için LSD testi ve %5 önem seviyesi kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Rejenerasyon denemelerinde kullanılacak eksplantları elde etmek için *in vitro* stok bitkiler yetiştirilmiştir. Bu amaçla *R. carnosula* tohumları ön uygulama olarak beş farklı çimlendirme ortamında test edilmiştir. Fide kalitesi ve çimlenme oranı bakımından 30 g/L sukroz ve NN vitamin içeren 5 nolu MES li MS ortamı diğer çimlendirme ortamlarına kıyasla daha başarılı bulunmuş ve %64 oranında çimlenme sağlamıştır. Bu nedenle daha sonraki stok bitki yetiştirme çalışmalarında 5 nolu tohum çimlendirme ortamı kullanılmıştır. Çimlenen stok bitkilerden elde edilen kotiledon ve hipokotil eksplantları, farklı BGD konsantrasyonları ve kombinasyonlarını içeren kontrol dahil toplamda 73 farklı rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır.

4.1. Kallus Bulguları

Rejenerasyon denemelerinde başlangıçta iki hafta karanlık fotoperiyot koşullarda (25°C) inkübe edilen kotiledon ve hipokotil eksplantlarında morfolojik olarak üç farklı kallus türü gözlenmiştir. Bunlar farklılaşmamış embriyojenik ve organojenik kallus olarak ele alınmıştır. Kültüre alınan eksplantlar morfolojik tepki, kallus oluşturma, embriyojenik kallus oluşumu, organojenik kallus oluşumu ve kallus derecesi açısından değerlendirilmiş ve bunlara ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1’de belirtilmiştir. Ayrıca bağımsız değişkenlerin eksplantxortam interaksiyonlarına ait sonuçları da Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Ricotia carnosula* rejenerasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotillerde oluşan tepki ve kallus özelliklerine ait varyans analiz sonuçları

Uygulama	Tepki (%)	Kallus Oluşumu (%)	Embriyojenik Kallus (%)	Organojenik Kallus (%)	Kallus Derecesi (0/1/2/3) (Yok/ Az/ Orta/ Çok)
Eksplant					
Kotiledon	98.12	86.04 a	30.09 a	4.88 b	1.83
Hipokotil	98.37	82.36 b	12.84 b	11.90 a	1.80
LSD %5	Ö.D	2.996	3.347	2.314	Ö.D
P	0.7338	0.0130 *	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	0.6655
Ortam					
0	100.00 a	31.25 i-j	9.38 m-q	0.00 h	0.75 lmn
1	100.00 a	84.38 a-d	28.13 g-n	3.13 gh	1.88 d-h
2	100.00 a	100.0 a	28.13 h-o	31.25 bcd	2.13 b-g
3	87.50 cd	84.38 a-d	3.13 pq	28.13 bcd	1.88 d-h
4	100.00 a	81.25 a-e	75.00 ab	0.00 h	2.38 a-e
5	100.00 a	87.50 a-d	62.50 bcd	0.00 h	1.75 e-i
6	100.00 a	87.50 a-d	12.50 l-q	0.00 h	1.63 f-j
7	100.00 a	93.75 abc	28.13 f-m	28.13 bcd	2.25 a-f
8	100.00 a	93.75 abc	6.25 n-q	3.13 gh	1.25 h-l
9	100.00 a	100.0 a	12.50 c-g	0.00 h	1.75 e-i
10	100.00 a	53.13 gh	6.25 j-q	12.50 e-h	0.88 klm
11	100.00 a	100.0 a	46.88 c-g	0.00 h	2.88 a
12	100.00 a	93.75 abc	13.75 j-q	0.00 h	2.88 a
13	18.75 e	12.50 j	0.00 q	0.00 h	0.13 n
14	100.00 a	100.0 a	50.00 c-g	0.00 h	2.75 ab
15	100.00 a	96.88 ab	56.25 b-e	0.00 h	2.25 a-f
16	100.00 a	100.0 a	96.88 a	0.00 h	1.75 e-i

Çizelge 4.1'in devamı.

17	100.00	a	96.88	ab	37.50	e-k	0.00	h	2.88	a
18	100.00	a	100.0	a	56.25	b-e	9.38	fgh	2.25	a-f
19	100.00	a	93.75	abc	18.75	i-q	21.88	c-f	2.75	ab
20	100.00	a	71.88	d-g	34.38	f-l	28.13	bcd	1.63	f-j
21	100.00	a	84.38	a-d	15.63	j-q	9.38	fgh	2.00	c-g
22	100.00	a	90.63	a-d	0.00	q	0.00	h	2.38	a-e
23	100.00	a	75.00	c-f	0.00	q	18.75	d-g	1.25	h-l
24	100.00	a	93.75	abc	50.00	c-g	0.00	h	2.25	a-f
25	100.00	a	96.88	ab	3.13	pq	0.00	h	2.50	a-d
26	90.63	bc	75.00	c-f	21.88	i-q	0.00	h	1.50	g-k
27	100.00	a	100.0	a	50.00	c-f	15.63	d-h	2.25	a-f
28	100.00	a	100.0	a	18.75	i-q	9.38	e-h	2.38	a-e
29	100.00	a	100.0	a	68.75	bc	0.00	h	2.63	abc
30	100.00	a	62.50	efg	6.25	opq	37.50	abc	1.50	g-k
31	100.00	a	93.75	abc	43.75	d-h	0.00	h	1.25	h-l
32	100.00	a	93.75	abc	0.00	q	15.63	d-h	1.63	f-j
33	100.00	a	100.0	a	0.00	q	12.50	e-h	1.75	e-i
34	81.25	d	78.13	b-e	12.50	l-q	0.00	h	1.00	jkl
35	100.00	a	90.63	a-d	6.25	opq	0.00	h	2.00	c-g
36	100.00	a	81.25	a-e	0.00	q	0.00	h	1.25	h-l
37	100.00	a	84.38	a-d	25.00	h-p	0.00	h	1.75	e-i
38	96.88	ab	87.50	a-d	0.00	q	46.88	a	2.63	abc
39	100.00	a	93.75	abc	9.38	n-q	0.00	h	2.38	a-e
40	100.00	a	28.13	ij	3.13	pq	0.00	h	0.63	lmn
41	100.00	a	87.50	a-d	25.00	h-p	0.00	h	1.50	g-k
42	100.00	a	100.0	a	3.13	pq	21.88	c-f	1.63	f-j
43	100.00	a	100.0	a	0.00	q	9.38	fgh	1.88	d-h
44	100.00	a	56.25	fgh	0.00	q	0.00	h	1.13	i-l
45	100.00	a	100.0	a	6.25	opq	0.00	h	1.88	d-h
46	100.00	a	78.13	b-e	12.50	l-q	0.00	h	1.50	g-k
47	100.00	a	96.88	ab	62.50	bcd	18.75	def	2.75	ab
48	96.88	ab	87.50	a-d	68.75	bc	12.50	e-h	2.13	b-g
49	100.00	a	87.50	a-d	18.75	i-q	15.63	d-h	1.75	e-i
50	100.00	a	18.75	i-j	3.13	pq	3.13	gh	0.88	klm
51	100.00	a	96.88	ab	0.00	q	12.50	e-h	1.63	f-j
52	100.00	a	100.0	a	3.13	pq	25.00	b-e	1.75	e-i
53	100.00	a	81.25	a-e	9.38	n-q	9.38	fgh	1.63	f-j
54	100.00	a	81.25	b-e	0.00	q	0.00	h	1.25	h-l
55	100.00	a	100.0	a	31.25	f-m	0.00	h	1.88	d-h
56	100.00	a	87.50	a-d	37.50	e-j	0.00	h	2.00	c-g
57	100.00	a	100.0	a	21.88	h-p	37.50	ab	2.88	a
58	100.00	a	93.75	abc	62.50	bcd	15.63	d-g	2.38	a-e
59	100.00	a	100.0	a	12.50	l-q	9.38	fgh	2.50	a-d
60	100.00	a	37.50	hi	0.00	q	12.50	e-h	0.75	lmn
61	100.00	a	87.50	a-d	0.00	q	18.75	def	1.25	h-l
62	100.00	a	90.63	abc	6.25	n-q	3.13	gh	1.50	g-k
63	100.00	a	100.0	a	0.00	q	3.13	gh	1.75	e-i
64	100.00	a	71.88	a-g	0.00	q	0.00	h	1.25	h-l
65	100.00	a	87.50	a-d	6.25	n-q	3.13	gh	1.25	h-l
66	100.00	a	93.75	abc	37.50	e-i	0.00	h	2.00	c-g
67	100.00	a	90.63	a-d	0.00	q	18.75	d-g	2.13	b-g
68	100.00	a	100.0	a	6.25	n-q	15.63	d-h	2.63	abc
69	100.00	a	100.00	a	50.00	c-g	0.00	h	2.50	a-d
70	100.00	a	40.63	hi	28.13	g-n	0.00	h	0.25	mn
71	100.00	a	31.25	ij	25.00	h-o	0.00	h	0.88	klm
72	100.00	a	90.63	a-d	12.50	k-q	15.63	d-h	2.13	b-g
LSD %5	2.573		18.10		20.22		13.98		0.65	
P	<0.0001		<0.0001		<0.0001		<0.0001		<0.0001	
	***		***		***		***		***	

Çizelge 4.1'e göre rejenerasyon ortamlarının etkisine bakılmaksızın kotiledon ve hipokotil eksplantları arasında tepki yönünden önemli bir fark olmadığı ve her iki eksplantın da yüksek oranda morfolojik tepki gösterdiği belirlenmiştir. Ancak eksplantların etkisine bakılmaksızın tepki üzerine sadece test edilen rejenerasyon ortamların etkisi ise önemli bir farklılık ($p<0.001$) oluşturmuştur. Morfolojik tepki açısından değerlendirilen rejenerasyon ortamlarında, 2 mg/L IAA + 0.5 mg/L BA içeren 13 nolu ortam (%18.75) hariç, diğer ortamlar genel olarak %100 oranında tepki göstermiştir. Eksplant ve ortam interaksyonu da morfolojik tepki açısından değerlendirilmiş fakat istatistiksel düzeyde önemli bir farklılık oluşturmamıştır.

Yapılan analiz sonuçlarına göre kullanılan eksplant tiplerinde, ortam bileşimine bakılmaksızın kallus oluşumu (%) üzerinde, istatistiksel düzeyde ($p<0.05$) farklılıklar görülmektedir. Kotiledon eksplantı (%86.04) hipokotil eksplantına göre (%82.36) kallus oluşumu yönünden daha başarılı sonuçlar ortaya koymuştur. Rejenerasyon ortamları değerlendirildiğinde ise $p<0.001$ seviyesinde önemli farklılıklar meydana gelmiş ve toplamda 73 rejenerasyon ortamı arasında 20 farklı kültür ortamı %100 oranında kallus oluşumu göstermiştir. Genel olarak, kallus oluşumu açısından başarılı bulunan rejenerasyon ortamları tek başına IAA, NAA ve 2,4-D hormonlarını, aynı zamanda BA + NAA, BA + IAA, TDZ + IAA, 2,4-D + TDZ ve TDZ + NAA gibi çeşitli BGD kombinasyonlarını da içermektedir. Deepika ve Kanwar (2010), farklı bir tür olan *Punica granatum*'da, yaptıkları çalışma sonucu en yüksek kallus frekansının 13.5 μ M NAA ve 13.2 μ M BA kombinasyonunu içeren kültür ortamlarında kotiledon eksplantlarından elde ettiklerini bildirmişlerdir. Dolayısıyla bu tezde elde edilen sonuca göre, kotiledon eksplantının kallus oluşturma açısından daha etkili olduğu ve bu çalışma ile uyumlu olduğu söylenebilir. Çizelge 4.2'ye göre ise eksplantxortam interaksyonlarının kallus oluşumu üzerine etkisi $p<0.001$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Her iki eksplant türü incelendiğinde 2, 9, 11, 14, 16, 18, 23, 27, 28, 29, 33, 42, 43, 45, 52, 55, 57, 59, 63, 68 ve 69 nolu rejenerasyon ortamlarında %100 oranında kallus oluşumu gözlenirken, yine her iki ekplant türünde %12.5 oranla 13 nolu rejenerasyon ortamı kallus oluşumu yönünden daha düşük sonuçlar oluşturmuştur.

Endojen hormonların, *in vitro* koşullarda somatik embriyogenesinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı ve embriyojenik yetkinliğin elde edilmesinde, eksplant farklılaşmasını sağlayan gen ekspresyonunun yeniden programlanması için sinyal molekülleri olarak işlev gördüğü bilinmektedir (Jimenez, 2001; Grzyb vd. 2017). Bu doğrultuda, çeşitli konsantrasyonlarda BGD içeren MS ortamlarında kültürlenmiş eksplantlarda, BGD'lerin türüne ve miktarlarına bağlı olarak embriyojenik kallus uyartımı yönünden farklı yanıtlar oluşturması olağandır. Sadece eksplantların embriyojenik kallus oluşturma etkisine bakıldığında $p<0.001$ seviyesinde istatistiksel olarak çok önemli farklılıklar bulunmuş ve kotiledon eksplantının (%30.09), hipokotil eksplantından (%12.84) 2.4 kat daha fazla embriyojenik kallus oluşturduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu durumda kotiledon eksplantının, embriyojenik kallus oluşturma yönünden daha uygun bir eksplant tipi olduğu belirlenmiştir. Zhang vd. (2005), Brassicaceae familyasına bağlı *Eruca sativa* türünde somatik embriyogenesisi yöntemi ile bitki rejenerasyonunu sağlamaya çalışmışlardır. Bizim çalışmamızla paralel sonuçlar ortaya koyarak, en fazla embriyojenik kallus oranını 2,4-D içeren MS ortamında kotiledon eksplantlarından (%83.9) elde ederlerken, hipokotil eksplantında ise %64.8 oranında daha düşük oranlarda embriyojenik kallus oluşumları gözlemlemişlerdir.

Çizelge 4.2. *Ricotia carnosula* rejenerasyon denemelerinde oluşan tepki ve kallus özellikleri üzerine eksplantxortam interaksiyonunun etkileri

Ort. No	Tepki (%)		Kallus Oluşum (%)		Kallus Tipi (%)				Kallus Derecesi (0/1/2/3) (Yok/ Az/ Orta/ Çok)	
					Embriyojenik		Organojenik			
	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil
K	100.0	100.0	62.5 c-g	0.0 l	18.8 j-n	0.0 n	0.0 i	0.0 i	1.5 d-g	0.0 j
1	100.0	100.0	87.5 abc	81.3 a-d	0.0 n	56.3 c-h	6.3 hi	0.0 i	1.3 e-h	2.5 abc
2	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	56.3 d-i	0.0 n	0.0 i	62.5 b	2.0 b-e	2.3 a-d
3	75.0	100.0	75.0 a-e	93.8 ab	0.0 n	6.3 mn	0.0 i	56.3 b	1.5 d-g	2.3 a-d
4	100.0	100.0	62.5 c-g	100.0 a	50.0 d-j	100.0 a	0.0 i	0.0 i	2.8 ab	2.0 b-e
5	100.0	100.0	75.0 a-e	100.0 a	75.0 a-d	50.0 d-j	0.0 i	0.0 i	1.3 e-h	2.3 a-d
6	100.0	100.0	75.0 a-e	100.0 a	25.0 i-n	0.0 n	0.0 i	0.0 i	1.3 e-h	2.0 b-e
7	100.0	100.0	87.5 abc	100.0 a	37.5 f-m	18.8 i-n	0.0 i	56.3 b	1.8 c-f	2.8 ab
8	100.0	100.0	87.5 abc	100.0 a	6.3 m-n	6.3 mn	0.0 i	6.3	1.0 f-i	1.5 d-g
9	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	25.0 i-n	0.0 n	0.0 i	0.0 i	1.8 c-f	1.8 c-f
10	100.0	100.0	62.5 c-g	43.8 f-i	6.3 mn	6.3 mn	0.0 i	25.0 d-h	1.0 f-i	0.8 g-j
11	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	75.0 a-d	18.8 i-n	0.0 i	0.0 i	2.8 ab	3.0 a
12	100.0	100.0	93.8 ab	93.8 ab	27.5 h-n	0.0 n	0.0 i	0.0 i	2.8 ab	3.0 a
13	25.0	12.5	12.5 jkl	12.5 jkl	0.0 n	0.0 n	0.0 i	0.0 i	0.0 j	0.3 i-j
14	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	100.0 a	0.0 n	0.0 i	0.0 i	3.0 a	2.5 abc
15	100.0	100.0	100.0 a	93.8 ab	100.0 a	12.5 lmn	0.0 i	0.0 i	2.5 abc	2.0 b-e
16	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	93.8 ab	100.0 a	0.0 i	0.0 i	2.0 b-e	1.5 d-g

Çizelge 4.2'nin devamı

17	100.0	100.0	93.8 ab	100.0 a	75.0 a-e	0.0 n	0.0 i	0.0 i	3.0 a	2.8 ab
18	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	100.0 a	12.5 lmn	0.0 i	18.8 e-i	2.5 abc	2.0 b-e
19	100.0	100.0	100.0 a	87.5 a-d	37.5 f-m	0.0 n	0.0 i	43.8 b-d	3.0 a	2.5 abc
20	100.0	100.0	75.0 a-e	68.8 b-f	68.8 b-f	0.0 n	0.0 i	56.3 b	1.8 c-f	1.5 d-g
21	100.0	100.0	75.0 a-e	93.8 b	25.0 i-n	6.3 mn	0.0 i	18.8 e-i	1.8 c-f	2.3 a-d
22	100.0	100.0	81.3 a-d	100.0 a	0.0 n	0.0 n	0.0 i	0.0 i	2.8 ab	2.0 b-e
23	100.0	100.0	100.0 a	50.0 e-h	0.0 n	0.0 n	0.0 i	37.5 b-f	1.0 f-i	1.5 d-g
24	100.0	100.0	87.5 abc	100.0 a	87.5 abc	12.5 lmn	0.0 i	0.0 i	2.0 b-e	2.5 abc
25	100.0	100.0	100.0 a	93.8 ab	0.0 n	6.3 mn	0.0 i	0.0 i	2.0 b-e	3.0 a
26	100.0	81.3	75.0 a-e	75.0 a-e	43.8 e-l	0.0 n	0.0 i	0.0 i	1.5 d-g	1.5 d-g
27	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	75.0 a-d	25.0 h-n	12.5 ghi	18.8 d-h	2.8 ab	1.8 c-f
28	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	37.5 f-m	0.0 n	0.0 i	18.8 d-h	2.8 ab	2.0 b-e
29	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	100.0 a	37.5 f-m	0.0 i	0.0 i	2.8 ab	2.5 abc
30	100.0	100.0	100.0 a	25.0 h-l	12.5 lmn	0.0 n	50.0 bc	25.0 d-h	2.0 b-e	1.0 f-i
31	100.0	100.0	100.0 a	87.5 abc	0.0 n	87.5 abc	0.0 i	0.0 i	1.0 f-i	1.5 d-g
32	100.0	100.0	87.5 abc	100.0 a	0.0 n	0.0 n	0.0 i	31.3 c-g	1.0 f-i	2.3 a-d
33	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	0.0 n	0.0 n	0.0 i	25.0 d-h	1.0 f-i	2.5 abc
34	62.5	100.0	56.3 d-g	100.0 a	25.0 i-n	0.0 n	0.0 i	0.0 i	0.8 g-j	1.3 e-h
35	100.0	100.0	81.3 a-d	100.0 a	12.5 lmn	0.0 n	0.0 i	0.0 i	2.3 a-d	1.8 c-f
36	100.0	100.0	62.5 c-g	100.0 a	0.0 n	0.0 n	0.0 i	0.0 i	1.3 e-h	1.3 e-h
37	100.0	100.0	100.0 a	68.8 b-e	50.0 d-j	0.0 n	0.0 i	0.0 i	2.0 b-e	1.5 d-g
38	100.0	93.8	100.0 a	75.0 a-e	0.0 n	0.0 n	87.5 a	6.3 h-i	2.8 ab	2.5 abc
39	100.0	100.0	100.0 a	87.5 abc	0.0 n	18.8 k-n	0.0 i	0.0 i	2.3 a-d	2.5 abc
40	100.0	100.0	12.5 i-l	43.8 f-i	6.3 mn	0.0 n	0.0 i	0.0 i	0.5 hij	0.8 g-j

Çizelge 4.2'nin devamı

41	100.0	100.0	100.0 a	75.0 a-e	50.0 d-j	0.0 n	0.0 i	0.0 i	1.8 c-f	1.3 e-h
42	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	6.3 mn	0.0 n	0.0 i	43.8 b-d	1.0 f-i	2.3 a-d
43	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	0.0 n	0.0 n	12.5 ghi	6.3 h-i	2.5 abc	1.3 e-h
44	100.0	100.0	62.5 c-g	50.0 e-h	0.0 n	0.0 n	0.0 i	0.0 i	1.3 e-h	1.0 f-i
45	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	0.0 n	12.5 lmn	0.0 i	0.0 i	2.3 a-d	1.5 d-g
46	100.0	100.0	87.5 abc	68.8 b-f	25.0 i-n	0.0 n	0.0 i	0.0 i	1.8 c-f	1.3 e-h
47	100.0	100.0	100.0 a	93.8 ab	75.0 a-d	50.0 d-i	25.0 d-h	12.5 f-i	3.0 a	2.5 abc
48	100.0	93.8	100.0 a	75.0 a-e	62.5 b-g	75.0 a-d	25.0 d-h	0.0 i	3.0 a	1.3 e-h
49	100.0	100.0	100.0 a	75.0 b-e	37.5 f-m	0.0 n	0.0 i	31.3 c-h	2.3 a-d	1.3 e-h
50	100.0	100.0	25.0 h-k	12.5 i-l	0.0 n	6.3 mn	6.3 hi	0.0 i	1.3 e-h	0.5 hij
51	100.0	100.0	100.0 a	93.8 ab	0.0 n	0.0 n	0.0 i	25.0 d-h	1.0 f-i	2.3 a-d
52	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	0.0 n	6.3 mn	12.5 g-i	37.5 b-e	1.8 c-f	1.8 c-f
53	100.0	100.0	100.0 a	62.5 c-g	0.0 n	18.8 k-n	0.0 i	18.8 e-i	1.0 f-i	2.3 a-d
54	100.0	100.0	75.0 a-e	87.5 a-d	0.0 n	0.0 n	0.0 i	0.0 i	1.5 d-g	1.0 f-i
55	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	12.5 lmn	50.0 d-j	0.0 i	0.0 i	2.0 b-e	1.8 c-f
56	100.0	100.0	75.0 a-e	100.0 a	62.5 b-g	12.5 lmn	0.0 i	0.0 i	2.3 a-d	1.8 c-f
57	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	18.8 j-n	25.0 i-n	25.0 c-h	50.0 b-c	3.0 a	2.8 ab
58	100.0	100.0	100.0 a	87.5 abc	87.5 abc	37.5 f-m	12.5 g-i	18.8 e-i	2.8 ab	2.0 b-e
59	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	25.0 i-n	0.0 n	0.0 i	18.8 f-i	2.8 ab	2.3 a-d
60	100.0	100.0	62.5 c-g	12.5 jkl	0.0 n	0.0 n	25.0 d-h	0.0 i	1.3 e-h	0.3 ij

Çizelge 4.2'nin devamı

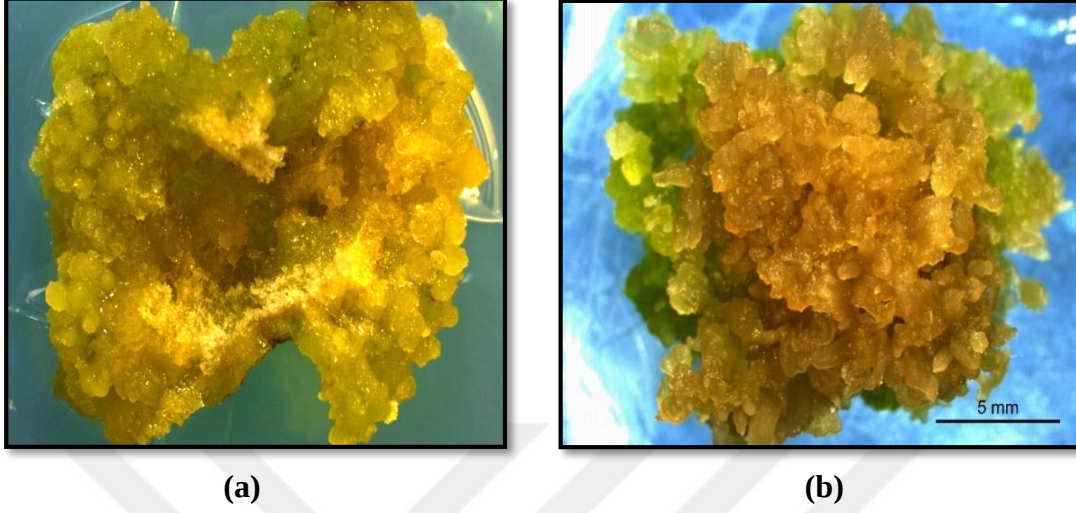
61	100.0	100.0	100.0 a	75.0 b-e	0.0 n	0.0 n	0.0 i	37.5 b-e	1.0 f-i	1.5 d-g
62	100.0	100.0	100.0 a	81.3 a-d	6.3 mn	6.3 mn	0.0 i	6.3 h-i	1.0 f-i	2.0 b-e
64	100.0	100.0	62.5 c-g	81.3 a-d	0.0 n	0.0 n	0.0 i	0.0 i	1.0 f-i	1.5 d-g
65	100.0	100.0	75.0 a-e	100.0 a	12.5 k-n	0.0 n	0.0 i	6.3 h-i	1.5 d-g	1.0 f-i
63	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	0.0 n	0.0 n	0.0 i	6.3 h-i	1.0 f-i	2.5 abc
66	100.0	100.0	87.5 abc	100.0 a	43.8 d-k	31.3 g-m	0.0 i	0.0 i	2.0 b-e	2.0 b-e
67	100.0	100.0	87.5 abc	93.8 ab	0.0 n	0.0 n	25.0 d-h	12.5 g-i	2.0 b-e	2.3 a-d
68	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	12.5 k-n	0.0 n	12.5 g-i	18.8 d-h	2.5 abc	2.8 ab
69	100.0	100.0	100.0 a	100.0 a	100.0 a	0.0 n	0.0 i	0.0 i	2.5 abc	2.5 abc
70	100.0	100.0	75.0 a-e	6.3 kl	56.3 c-h	0.0 n	0.0 i	0.0 i	0.3 i-j	0.3 ij
71	100.0	100.0	37.5 g-j	25.0 h-l	31.3 g-m	18.8 j-n	0.0 i	0.0 i	1.3 e-h	0.5 hij
72	100.0	100.0	100.0 a	81.3 a-d	18.8 j-n	6.3 mn	18.8 e-i	12.5 g-i	2.0 b-e	2.3 a-d
Ort.	98.1	98.4	86.0	82.4	30.1	12.8	4.9	11.9	1.8	1.8
İnteraksiyon										
LSD %5	Ö.D		25.60		28.59		19.77		0.93	
P	0.2743		< 0.0001 ***		< 0.0001 ***		< 0.0001 ***		< 0.0001 ***	

Çizelge 4.1'deki besin ortamları içeriğinin embriyojenik kallus oluşumuna etkisi incelendiğinde ise eksplantlardan bağımsız olarak embriyojenik kallus oluşumu yönünden $p < 0.001$ düzeyinde rejenerasyon ortamları arasında önemli ölçüde farklılıklar tespit edilmiştir. En başarılı rejenerasyon ortamı, 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA kombinasyonunu içeren 16 nolu (%96.88) rejenerasyon ortamı olarak belirlenmiştir. Denchev ve Conger (1995), *Panicum virgatum* L. türünde 2,4-D ve pikloramin BA ile kombinasyon halinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, uygulama başına ortalama embriyojenik kallus oluşumu 45 μ M BA ile 45 μ M 2,4-D kombinasyonundan elde edilmiş ve kullanılan hormon kombinasyonu yönünden bizim çalışmamıza ait embriyojenik kallus bulgularını destekler nitelikte sonuçlar ortaya konulmuştur.

Eksplantxortam interaksiyonunun etkisi incelendiğinde Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi embriyojenik kallus oluşumu üzerinde $p < 0.001$ seviyesinde önemli farklılık bulunmuştur. Kotiledon eksplantında 14 (0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA), 15 (1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA), 18 (1 mg/L NAA + 1 mg/L BA), 29 (2 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA) ve 69 (2mg/L NAA + 2 mg/L TDZ) nolu ortamlar %100 oranında embriyojenik kallus oluştururken, hipokotil eksplantında ise 2 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA içeren 16 nolu rejenerasyon ortamı ile 0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA içeren 4 nolu kültür ortamında %100 oranında başarı sağlanmıştır. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, embriyojenik kallus yönünden BA'nın diğer sitokin hormonlarına kıyasla daha başarılı olduğu görülmektedir. Shibli vd. (2000) nesli tükenmekte olan *Arum palaestinum* türünde somatik embriyogenesis yoluyla başarılı bir üretim protokolü oluşturmayı amaçlamışlardır. Yaptıkları çalışmada yumru eksplantında en yüksek kallus ağırlığı ve arzu edilen kallus fenotipini 8.8 μ M BAP ve 5.4 μ M NAA kombinasyonunu içeren ortamlarda elde etmişler ve alt kültüre alınması durumunda embriyojenik yapılar sahip friable kallus oluşumları meydana gelmiştir. Ayrıca çalışma sonucunda embriyojenik kallus oluşumu yönünden en başarılı sitokin BA olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızdaki bulgular doğrultusunda, embriyojenik kallus oluşumu yönünden başarılı olan ortamlar genel olarak Shibli vd. (2000)'nin yaptıkları çalışmaya ait bulgular ile örtüşmektedir.

Kültüre alınan eksplantlardan gelişen embriyojenik kalluslar ve embriyojenik olmayan kalluslar birbirinden renk ve yapı itibarıyla ayrılmıştır. Embriyojenik kallus tanımlaması yapılırken; Şekil 4.1'de görüldüğü üzere, renk olarak sarı ve açık yeşil renkli küçük öbekli kalluslar ve farklı bir yapıya sahip kolay dağılabilen “friable” kallus oluşumları “embriyojenik kallus” olarak ele alınmıştır. Embriyojenik olmayan kallusların ise yapısal olarak çok daha sert, kompakt ve koyu yeşil renkte oldukları tespit edilmiştir. Bu yapıya sahip olan kalluslar ise genel olarak sürgün oluşturduğu için organojenik kallus olarak değerlendirilmiştir. Farklı türlerde yapılan çalışmalar incelendiğinde, Shibli vd. (2000) embriyojenik yapılar sahip kolay ayrışabilen friable kallusları embriyojenik kallus olarak sınıflandırmışlardır. Başka bir çalışmada ise Yang vd. (2008), 8.8 μ M BA ve 2.7 μ M NAA içeren ortamlarda alt kültür işleminden sonra *Leonurus heterophyllus*'da friable yapıda ve sarımsı renkte kallus elde etmişlerdir. Öte yandan Fiuk ve Rybczynski (2008), *Gentiana* spp.'de yaprak eksplantlarını kullanarak somatik embriyo elde etmeye çalışmışlar ve oluşan kallusları yapı ve renk bakımından; ince-embriyojenik, nodüler-

embriyojenik, filiform-embriyojenik olmayan, sulu-embriyojenik olmayan, yeşil-embriyojenik olmayan ve beyaz-embriyojenik olmayan kallus olarak 6 farklı kategoride incelemiştir.

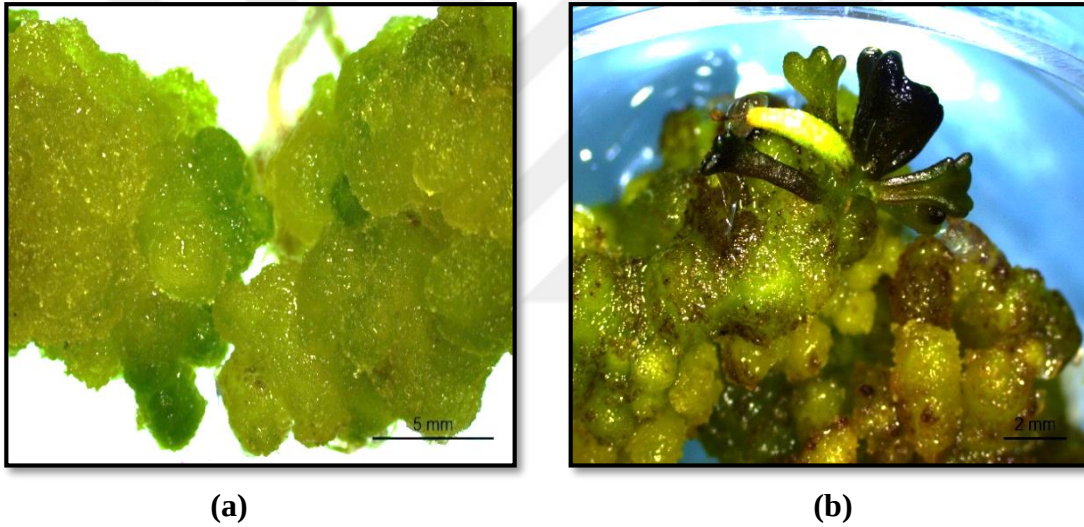


Şekil 4.1. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarında oluşan embriyojenik kallus görüntüleri; **a)** 15 nolu rejenerasyon ortamında kotiledon eksplantından gelişen embriyojenik kallus görüntüsü; **b)** 16 nolu rejenerasyon ortamında hipokotil eksplantında kolay dağılabilen “Friable” kallus görüntüsü

Görüldüğü üzere farklı araştırmacılar tarafından elde edilen bulgulara göre embriyojenik kallus tanımlaması bakımından çok farklı sonuçlar ortaya konulmuştur. Oluşan bu farklılıkların tür içinde bile var olan genotipik farklılıklardan, kullanılan eksplant türünden, alt kültürleme işlemlerinden ya da kültüre alınan dokudaki içsel hormon düzeyinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda incelenen gözlem parametrelerinin, Fiuk ve Rybczyński (2008)’nin yapmış olduğu çalışma bulguları ile birebir paralellik gösterdiği gözlenmiştir. Ancak yüksek oranda embriyojenik kallus oluşturmalarına rağmen 14, 15, 29 ve 69 nolu ortamlarda somatik embriyo yapıları oluşmamıştır. Bu durumun, embriyo oluşturma kapasitesine sahip olan kalluslarda alt kültürleme işleminin yapılmamasından kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir.

Rejenerasyon ortamlarından bağımsız olarak, organojenik kallus (%) oluşumu açısından değerlendirilen eksplantlarda, Çizelge 4.1’de belirtilen varyans analiz sonuçlarına göre $p < 0.001$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmuştur. Embriyojenik kallus oluşumunda görülenin tam tersi olarak hipokotil eksplantının (%11.90) kotiledon eksplantına (%4.88) kıyasla 2.4 kat daha fazla organojenik kallus oluşturduğu tespit edilmiştir. Eksplantın etkisinden bağımsız olarak, sadece rejenerasyon ortamlarının organojenik kallus oluşturma etkisi incelendiğinde ise $p < 0.001$ seviyesinde farklılık meydana geldiği belirlenmiştir. En yüksek organojenik kallus oluşumunun 1 mg/L NAA + 2 mg/L BA kombinasyonunu içeren 38 nolu (%48.88) rejenerasyon ortamı olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan eksplantxortam interaksyonunun etkisine

bakıldığında Çizelge 4.2’de belirtildiği gibi $p<0.001$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılık oluşmuştur. Organojenik kallus oluşumu açısından en iyi eksplant ve rejenerasyon ortamı incelendiğinde, kotiledon eksplantında %87.5 oranla 38 nolu kültür ortamında başarılı sonuçlar ortaya konulmuştur. Hipokotil eksplantında ise %62.5 oranla 2 nolu (1 mg/L IAA) rejenerasyon ortamı organojenik kallus oluşumu yönünden başarılı bulunmuştur. Rajore ve Batra (2007), *Jatropha curcas* L.’de türünde farklı BGD ler kullanarak organojenik kallus indüksiyonunu sağlamayı ve rejenere sürgünler elde etmeyi hedeflemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda yeşil, kompakt ve hızlı büyüyen kallus üretimi için 1 mg/L NAA’nın optimum konsantrasyon olduğu belirlenmiştir. Ayrıca daha iyi kallus oluşumları elde etmek için NAA, çeşitli konsantrasyonlarda BAP/KIN (1.0-8.0 mg/L) ile kombine edilmiş ve 1 mg/L NAA + 5 mg/L BAP içeren kültür ortamlarında organojenik kallus indüksiyonu başarıyla sağlanmıştır. Bu kültür ortamlarında ise yeşil ve kompakt görünüme sahip kalluslar oluşum göstermiştir. Söz konusu çalışma kendi çalışmamız ile kıyaslandığında aynı hormon kombinasyonlarını içeren 38 nolu rejenerasyon ortamında, yeşil sert ve kompakt görünüme sahip maksimum oranda (%100) organojenik kallus oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Rejenerasyon ortamlarında gelişen organojenik kalluslara ait görüntüler; **a)** 38 nolu rejenerasyon ortamında kotiledondan gelişen organojenik kalluslar; **b)** 7 nolu rejenerasyon ortamında hipokotilden gelişen organojenik kalluslar

Kültüre alınan her iki ekplant tipine bakıldığında, Çizelge 4.1’de belirtildiği gibi kallus derecesi açısından kotiledon ve hipokotil eksplantları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemektedir. Eksplantların etkisine bakılmaksızın sadece ortamların kallus derecesi üzerinde olan etkisi değerlendirildiğinde ise $p<0.001$ seviyesinde önemli bir fark bulunmuştur. En yüksek kallus derecesini (2.8) oluşturan rejenerasyon ortamları; 11 (0.5 mg/L IAA + 0.5 mg/L BA), 12 (1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BA), 17 (0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA) ve 57 (0.5 mg/L NAA + 1 mg/L TDZ) nolu kültür ortamları olarak belirlenmiştir. Bu durumda *R. carnosula*’da IAA ve NAA oksinlerinin 2,4-D’ye kıyasla kallus derecesi yönünden daha yüksek sonuçlar ortaya koyduğu görülmektedir. Eksplantxortam interaksiyonları incelendiğinde ise (Çizelge 4.2). kallus derecesi

yönünden $p<0.001$ düzeyinde önemli farklılık ortaya çıkmıştır. En fazla kallus derecesi (3) kotiledon eksplantında 14, 17, 19, 47, 48 ve 57 nolu ortamlarda görülürken, hipokotil eksplantında ise 11, 12 ve 25 nolu rejenerasyon ortamlarında oluşmuştur.

4.2. Antosiyanin Bulguları

Farklı rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda hem sürgün hem de somatik embriyo oluşumları meydana gelmiştir. Ancak bu oluşumlar sırasında ilginç şekilde hem rejenerantlarda, hem de kalluslarda bazen çok yoğun antosiyanin oluşumlarına rastlanmıştır. Şekil 4.3’de kültür ortamlarında oluşan kalluslarda ve rejenerantlardaki (sürgün ve somatik embriyo) antosiyanin oluşumları görülmektedir. *R. carnosula*’nın doğal formlarında da bazen gözlemlenebilen, ancak tüm *in vivo* ve *in vitro* tohum çimlendirme çalışmalarında istisnasız rastladığımız kotiledonların alt yüzeyinin tamamen koyu renkli antosiyaninlerden meydana gelmesinin, aslında *R. carnosula*’nın özellikle somatik embriyogenesis ayrımı için önemli bir morfolojik markır olabileceği düşünülmektedir. Hem kotiledon hem de hipokotil eksplantlarında oluşan antosiyanin miktarları; bu eksplantlarda meydana gelen rejenerasyon ve kallus oranları ile ilişkilendirilerek, antosiyanin oluşum özelliklerine ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.3’de verilmiş, aynı özelliklere ait eksplantxortam interaksiyon sonuçları ise Çizelge 4.4’de belirtilmiştir.



Şekil 4.3. Kallus ve rejenerantlardaki antosiyanin oluşumlarına ait görüntüler; **a)** 69. ortamda kallusdan antosiyanin oluşumu; **b)** 53. ortamda rejenerantlardan antosiyanin oluşumu

Çizelge 4.3’e göre kültüre alınan eksplantların genel rejenerasyon oluşumu üzerine olan etkisi değerlendirildiğinde $p<0.001$ seviyesinde önemli farklılıklar görülmektedir. Hipokotil eksplantı %27.14 ortalama oluştururken kotiledon eksplantı ise %16.69 oranında rejenerasyon sağlamıştır. Eksplantlardan bağımsız olarak ortamların etkisine bakıldığında, yine $p<0.001$ düzeyinde önemli farklılıklar meydana gelmiştir.

Rejenerasyon oluşumu açısından diğer ortamlara kıyasla 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ içeren 47 nolu kültür ortamı çok daha başarılı sonuçlar ortaya koymuştur. Öte yandan eksplantxortam interaksyonu Çizelge 4.4’de görüldüğü gibi rejenerasyon kapasitesi üzerinde $p < 0.001$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. En iyi rejenerasyon yüzdesi hipokotil eksplantında (%93.75) 1 mg/L TDZ içeren 50 nolu kültür ortamında, kotiledon eksplantında ise %81.25 oranla 47 nolu kültür ortamında belirlenmiştir. Çizelge 4.3’ bulunan kallusa (%) ait bulgular daha önce “Kallus Bulguları” bölümünde yorumlanarak açıklanmıştır.

Çizelge 4.3. *Ricotia carnosula* rejenerasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotillerde meydana gelen rejenerasyon ve kallus oranları ile bunlara bağlı antosiyanin oluşum özelliklerine ait varyans analiz sonuçları

Uygulama	Rejenerasyon Oluşumu (%)	Kallus Oluşumu (%)	Antosiyanin Oluşumu (%)	
			Rejenerantlarda	Kalluslarda
Eksplant				
Kotiledon	16.69 b	86.04 a	3.42 b	22.09 a
Hipokotil	27.14 a	82.36 b	10.53 a	18.07 b
LSD %5	3.416	2.996	1.822	3.221
P	< 0.0001 ***	0.0130 *	< 0.0001 ***	0.0226 *
0	43,75 c-g	31.25 i-j	12.50 gh	0.00 n
1	37,50 d-h	84.38 a-d	0.00 i	0.00 n
2	59,38 a-e	100.00 a	9.38 gh	43.75 d-h
3	28,13 f-j	84.38 a-d	28.13 ef	18.75 i-n
4	59,38 a-e	81.25 a-e	0.00 i	0.00 n
5	6,25 jkl	87.50 a-d	0.00 i	0.00 n
6	0,00 l	87.50 a-d	0.00 i	0.00 n
7	53,13 a-f	93.75 abc	12.50 gh	50.00 c-g
8	9,38 jkl	93.75 abc	0.00 i	6.25 mn
9	12,50 jkl	100.00 a	12.50 gh	0.00 n
10	21,88 g-k	53.13 gh	0.00 i	21.88 h-m
11	46,88 b-f	100.00 a	0.00 i	25.00 h-m
12	12,50 jkl	93.75 abc	0.00 i	90.63 ab
13	0,00 l	12.50 j	0.00 i	0.00 n
14	0,00 l	100.00 a	0.00 i	9.38 lmn
15	0,00 l	96.88 ab	0.00 i	0.00 n
16	6,25 jkl	100.00 a	0.00 i	0.00 n
17	40,63 c-h	96.88 ab	0.00 i	50.00 c-g
18	12,50 i-l	100.00 a	0.00 i	31.25 f-k
19	40,63 c-h	93.75 abc	12.50 gh	65.63 bc
20	59,38 a-e	71.88 d-g	0.00 i	3.13 mn
21	25,00 g-k	84.38 a-d	0.00 i	18.75 i-n
22	0,00 l	90.63 a-d	0.00 i	37.50 e-j
23	18,75 h-l	75.00 c-f	0.00 i	12.50 k-n
24	6,25 jkl	93.75 abc	0.00 i	0.00 n
25	0,00 l	96.88 ab	0.00 i	0.00 n
26	0,00 l	75.00 c-f	0.00 i	0.00 n
27	53,13 a-f	100.00 a	21.88 efg	62.50 c-d
28	15,63 h-l	100.00 a	9.38 gh	40.63 d-h
29	0,00 l	100.00 a	0.00 i	50.00 c-g
30	75,00 ab	62.50 efg	46.88 ab	31.25 g-l

Çizelge 4.3'ün devamı

31	25,00	g-k	93.75	abc	43.75	abc	0.00	n
32	18,75	h-l	93.75	abc	0.00	i	6.25	mn
33	12,50	jkl	100.00	a	12.50	gh	25.00	h-m
34	0,00	l	78.13	b-e	0.00	i	0.00	n
35	0,00	l	90.63	a-d	0.00	i	0.00	n
36	0,00	l	81.25	a-e	0.00	i	0.00	n
37	6,25	jkl	84.38	a-d	0.00	i	25.00	h-m
38	6,25	jkl	87.50	a-d	0.00	i	46.88	c-g
39	0,00	l	93.75	abc	0.00	i	28.13	g-l
40	37,50	d-h	28.13	ij	0.00	i	3.13	mn
41	9,38	jkl	87.50	a-d	0.00	i	12.50	k-n
42	21,88	g-l	100.00	a	0.00	i	21.88	i-n
43	9,38	jkl	100.00	a	0.00	i	50.00	c-g
44	0,00	l	56.25	fgh	0.00	i	0.00	n
45	0,00	l	100.00	a	0.00	i	0.00	n
46	9,38	jkl	78.13	b-e	0.00	i	0.00	n
47	75,00	a	96.88	ab	43.75	abc	56.25	cde
48	62,50	a-d	87.50	a-d	25.00	ef	31.25	g-l
49	18,75	h-l	87.50	a-d	0.00	i	9.38	lmn
50	50,00	b-f	18.75	i-j	0.00	i	12.50	j-n
51	12,50	jkl	96.88	ab	0.00	i	18.75	i-n
52	28,13	f-j	100.00	a	6.25	hi	21.88	i-n
53	37,50	e-i	81.25	a-e	31.25	de	0.00	n
54	0,00	l	81.25	b-e	0.00	i	0.00	n
55	0,00	l	100.00	a	0.00	i	6.25	mn
56	6,25	jkl	87.50	a-d	0.00	i	6.25	mn
57	59,38	a-e	100.00	a	31.25	cde	43.75	d-h
58	53,13	a-e	93.75	abc	0.00	i	43.75	d-h
59	21,88	g-l	100.00	a	0.00	i	68.75	bc
60	50,00	b-f	37.50	hi	18.75	fg	12.50	k-n
61	28,13	f-j	87.50	a-d	25.00	ef	0.00	n
62	6,25	jkl	90.63	abc	0.00	i	0.00	n
63	3,13	kl	100.00	a	0.00	i	37.50	e-i
64	3,13	kl	71.88	a-g	3.13	hi	0.00	n
65	3,13	kl	87.50	a-d	0.00	i	0.00	n
66	0,00	l	93.75	abc	0.00	i	0.00	n
67	18,75	h-l	90.63	a-d	0.00	i	31.25	g-l
68	21,88	g-k	100.00	a	0.00	i	53.13	c-f
69	0,00	l	100.00	a	0.00	i	100.00	a
70	53,13	a-e	40.63	hi	43.75	bcd	0.00	n
71	62,50	abc	31.25	ij	53.13	a	25.00	h-m
72	25,00	g-k	90.63	a-d	6.25	hi	0.00	n
LSD %5	20.63		18.10		11.00		19.46	
P	< 0.0001 ***		< 0.0001 ***		< 0.0001 ***		< 0.0001 ***	

Çizelge 4.4. *Ricotia carnosula* rejenerasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotil eksplantlarından oluşan rejenerasyon ve kallus oranları ile bunlarda oluşan antosiyanin oranı üzerine eksplantxortam interaksiyonun etkisine ait varyans analiz sonuçları

Ort. No	Rejenerasyon(%)		Kallus Oluşum (%)		Antosiyanin Oluşumu (%)			
					Kotiledonda		Hipokotilde	
	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil	Kallusda	Rejenerant-larda	Kallusda	Rejenerant-larda
K	18,75 i-m	68,75 a-f	62,5 c-g	0,0 l	0,0 k	25,0 fgh	0,0 k	0,0 i
1	6,25 lm	68,75 a-f	87,5 abc	81,3 a-d	0,0 k	0,0 i	0,0 k	0,0 i
2	56,25 c-h	62,50 a-g	100,0 a	100,0 a	87,5 abc	0,0 i	0,0 k	18,8 fgh
3	0,00 m	56,25 b-g	75,0 a-e	93,8 ab	0,0 k	0,0 i	37,5 f-j	56,3 cd
4	62,50 a-g	56,25 b-g	62,5 c-g	100,0 a	0,0 k	0,0 i	0,0 k	0,0 i
5	12,50 j-m	0,00 m	75,0 a-e	100,0 a	0,0 k	0,0 i	0,0 k	0,0 i
6	0,00 m	0,00 m	75,0 a-e	100,0 a	0,0 k	0,0 i	0,0 k	0,0 i
7	31,25 g-l	75,00 a-e	87,5 abc	100,0 a	75,0 a-d	12,5 ghi	25,0 h-k	12,5 ghi
8	6,25 lm	12,50 j-m	87,5 abc	100,0 a	12,5 ijk	0,0 i	0,0 k	0,0 i
9	25,00 h-m	0,00 m	100,0 a	100,0 a	0,0 k	25,0 fgh	0,0 k	0,0 i
10	12,50 j-m	31,25 g-l	62,5 c-g	43,8 f-i	31,3 f-j	0,0 i	12,5 ijk	0,0 i
11	75,00 a-d	18,75 h-m	100,0 a	100,0 a	25,0 h-k	0,0 i	25,0 h-k	0,0 i
12	25,00 h-m	0,00 m	93,8 ab	93,8 ab	87,5 abc	0,0 i	93,8 ab	0,0 i
13	0,00 m	0,00 m	12,5 jkl	12,5 jkl	0,0 k	0,0 i	0,0 k	0,0 i
14	0,00 m	0,00 m	100,0 a	100,0 a	18,8 h-k	0,0 i	0,0 k	0,0 i
15	0,00 m	0,00 m	100,0 a	93,8 ab	0,0 k	0,0 i	0,0 k	0,0 i
16	6,25 lm	6,25 lm	100,0 a	100,0 a	0,0 k	0,0 i	0,0 k	0,0 i
17	50,00 d-i	31,25 g-l	93,8 ab	100,0 a	0,0 k	0,0 i	100, a	0,0 i
18	6,25 lm	18,75 i-m	100,0 a	100,0 a	37,5 f-j	0,0 i	25,0 g-k	0,0 i
19	37,50 f-l	43,75 d-j	100,0 a	87,5 a-d	31,3 f-j	25,0 fgh	100, a	0,0 i
20	56,25 c-h	62,50 a-g	75,0 a-e	68,8 b-f	6,3 j-k	0,0 i	0,0 k	0,0 i
21	25,00 h-m	25,00 h-m	75,0 a-e	93,8 b	37,5 f-j	0,0 i	0,0 k	0,0 i
22	0,00 m	0,00 m	81,3 a-d	100,0 a	75,0 a-e	0,0 i	0,0 k	0,0 i
23	0,00 m	37,50 f-l	100,0 a	50,0 e-h	0,0 k	0,0 i	25,0 h-k	0,0 i
24	0,00 m	12,50 klm	87,5 abc	100,0 a	0,0 k	0,0 i	0,0 k	0,0 i
25	0,00 m	0,00 m	100,0 a	93,8 ab	0,0 k	0,0 i	0,0 k	0,0 i
26	0,00 m	0,00 m	75,0 a-e	75,0 a-e	0,0 k	0,0 i	0,0 k	0,0 i
27	62,50 a-g	43,75 e-k	100,0 a	100,0 a	75,0 a-d	31,3 ef	50,0 d-h	12,5 ghi
28	12,50 klm	18,75 h-m	100,0 a	100,0 a	68,8 a-e	0,0 i	12,5 ijk	18,8 fgh
29	0,00 m	0,00 m	100,0 a	100,0 a	37,5 f-j	0,0 i	62,5 b-f	0,0 i
30	62,50 a-g	87,50 abc	100,0 a	25,0 h-l	62,5 b-f	12,5 ghi	0,0 k	81,3 ab
31	0,00 m	50,00 d-i	100,0 a	87,5 abc	0,0 k	0,0 i	0,0 k	87,5 a

Çizelge 4.4'ün devamı

32	0,00	m	37,50	f-l	87,5	abc	100,0	a	12,5	ijk	0,0	i	0,0	k	0,0	İ
33	0,00	m	25,00	h-m	100,0	a	100,0	a	0,0	k	0,0	i	50,0	d-h	25,0	fgh
34	0,00	m	0,00	m	56,3	d-g	100,0	a	0,0	k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
35	0,00	m	0,00	m	81,3	a-d	100,0	a	0,0	k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
36	0,00	m	0,00	m	62,5	c-g	100,0	a	0,0	k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
37	0,00	m	12,50	klm	100,0	a	68,8	b-e	50,0	d-h	0,0	i	0,0	k	0,0	i
38	6,25	lm	6,25	lm	100,0	a	75,0	a-e	75,0	a-d	0,0	i	18,8	h-k	0,0	İ
39	0,00	m	0,00	m	100,0	a	87,5	abc	50,0	d-h	0,0	i	6,3	j-k	0,0	i
40	18,75	i-m	56,25	b-g	12,5	i-l	43,8	f-i	6,3	j-k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
41	6,25	lm	12,50	klm	100,0	a	75,0	a-e	25,0	h-k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
42	0,00	m	43,75	d-j	100,0	a	100,0	a	0,0	k	0,0	i	43,8	e-i	0,0	i
43	12,50	klm	6,25	lm	100,0	a	100,0	a	75,0	a-d	0,0	i	25,0	h-k	0,0	i
44	0,00	m	0,00	m	62,5	c-g	50,0	e-h	0,0	k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
45	0,00	m	0,00	m	100,0	a	100,0	a	0,0	k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
46	18,75	j-m	0,00	m	87,5	abc	68,8	b-f	0,0	k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
47	81,25	abc	68,75	a-f	100,0	a	93,8	ab	50,0	d-h	50,0	cde	62,5	b-f	37,5	def
48	62,50	a-g	62,50	a-g	100,0	a	75,0	a-e	25,0	h-k	12,5	ghi	37,5	f-j	37,5	def
49	12,50	klm	25,00	h-m	100,0	a	75,0	b-e	18,8	h-k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
50	6,25	lm	93,75	a	25,0	h-k	12,5	i-l	25,0	g-k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
51	0,00	m	25,00	h-m	100,0	a	93,8	ab	0,0	k	0,0	i	37,5	f-j	0,0	i
52	12,50	klm	43,75	d-j	100,0	a	100,0	a	0,0	k	0,0	i	43,8	e-i	12,5	ghi
53	0,00	m	75,00	a-d	100,0	a	62,5	c-g	0,0	k	0,0	i	0,0	k	62,5	bc
54	0,00	m	0,00	m	75,0	a-e	87,5	a-d	0,0	k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
55	0,00	m	0,00	m	100,0	a	100,0	a	0,0	k	0,0	i	12,5	ijk	0,0	i
56	12,50	j-m	0,00	m	75,0	a-e	100,0	a	0,0	k	0,0	i	12,5	ijk	0,0	i
57	56,25	c-h	62,50	a-g	100,0	a	100,0	a	50,0	d-h	25,0	fg	37,5	f-j	37,5	def
58	75,00	a-d	31,25	g-l	100,0	a	87,5	abc	50,0	d-h	0,0	i	37,5	f-j	0,0	i
59	25,00	h-m	18,75	j-m	100,0	a	100,0	a	100, a		0,0	i	37,5	f-j	0,0	i
60	12,50	klm	87,50	ab	62,5	c-g	12,5	jkl	25,0	h-k	0,0	i	0,0	k	37,5	def
61	0,00	m	56,25	b-g	100,0	a	75,0	b-e	0,0	k	0,0	i	0,0	k	50,0	cde
62	0,00	m	12,50	j-m	100,0	a	81,3	a-d	0,0	k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
63	0,00	m	6,25	lm	100,0	a	100,0	a	0,0	k	0,0	i	75,0	a-d	0,0	i
64	0,00	m	6,25	lm	62,5	c-g	81,3	a-d	0,0	k	0,0	i	0,0	k	6,3	hi
65	0,00	m	6,25	lm	75,0	a-e	100,0	a	0,0	k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
66	0,00	m	0,00	m	87,5	abc	100,0	a	0,0	k	0,0	i	0,0	k	0,0	i
67	25,00	h-m	12,50	klm	87,5	abc	93,8	ab	0,0	k	0,0	i	62,5	b-f	0,0	i
68	25,00	h-m	18,75	h-m	100,0	a	100,0	a	56,3	c-g	0,0	i	50,0	d-h	0,0	i
69	0,00	m	0,00	m	100,0	a	100,0	a	100, a		0,0	i	100, a		0,0	i

Çizelge 4.4'ün devamı

70	18,75 h-m	87,50 abc	75,0 a-e	6,3 kl	0,0 k	0,0 i	0,0 k	87,5 a
71	50,00 c-h	75,00 a-d	37,5 g-j	25,0 h-l	50,0 d-h	31,3 ef	0,0 k	75,0 ab
72	31,25 g-l	18,75 j-m	100,0 a	81,3 a-d	0,0 k	0,0 i	0,0 k	12,5 ghi
Ort.	16,70	27,14	86,0	82,4	22,1	3,4	18,1	10,5
İnteraksiyon								
LSD %5	29.18		25.60		15.56		27.52	
P	< 0.0001 ***		< 0.0001 ***		< 0.0001 ***		< 0.0001 ***	

Kültüre alınan eksplantlardan gelişen kalluslarda ve rejenerantlarda meydana gelen antosiyanin oluşumları incelenmiş ve ortamların etkisinden bağımsız şekilde rejenerantlarda oluşan antosiyanin oranları ($p<0.001$) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Hipokotil eksplantları (%10.53) kotiledon eksplantlarına kıyasla (%3.42) rejenerantlarda 3 kat daha fazla antosiyanin oluşturmuştur. Eksplantların etkisinden bağımsız olarak ortamların etkisine bakıldığında ise rejenerantlarda antosiyanin oluşumu yönünden $p<0.001$ düzeyinde önemli farklılık bulunmuştur. Rejenerantlarda en fazla antosiyanin oluşturan rejenerasyon ortamı 1 mg/L Zeatin içeren 71 nolu kültür ortamı olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi eksplantxortam interaksiyonunun antosiyanin oluşumu üzerindeki etkisi $p<0.001$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. En fazla antosiyanin yüzdesi (%87.5) hipokotil eksplantında 31 nolu (2 mg/L BA + 0.5 mg/L IAA) rejenerasyon ortamında gerçekleşmiştir. Termignoni vd. (1996) *Eucalyptus dunnii* türünde somatik embriyo uyartımı üzerinde yaptıkları çalışmada üç günlük fidelerden alınan eksplantlarda NAA ve 2,4-D kombinasyonlarını kullanarak kahverengimsi ve kompakt kalluslardan çeşitli evrelerde somatik embriyo yapılarını elde etmişlerdir. Oluşan embriyoların bazıları beyazımsı renkteyken, globüler ve erken kalp evrelerinde gelişen embriyoidlerin çoğunda antosiyanin oluşumu tespit etmişlerdir. Antosiyaninin baskın olarak koyu kırmızı renk oluşturmalarının *Eucalyptus*'daki somatik embriyogenesise ait bir özellik olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamıza ait bulgular değerlendirildiğinde ise *R. carnosula*'da genel olarak kotiledon yaprak alt yüzeyi ile uyumlu mor renkli antosiyanin oluşmuş ve Termignoni vd. (1996)'nin yapmış oldukları çalışma ile uyumlu olarak, yüksek oranda antosiyanin içeren somatik embriyo yapıları da elde edilmiştir. Şekil 4.3'de olduğu gibi somatik embriyo yapılarının genel olarak her aşamasında yoğun antosiyanin oluşumları görülmüştür. Ayrıca, rejenerasyon ortamlarında gelişen sürgünlerde de yine yüksek oranda antosiyanin oluşumları tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra Banjac vd. (2019)'nin *Brassica oleracea* L. var. *acephala*'da yaptıkları başka bir çalışmada somatik embriyo ve sürgünlerde antosiyanin oluşumlarına rastlanırken, Arı vd. (2016)'nin süs biberinde yapmış oldukları shed-mikrospor kültürü çalışmalarında da yine antosiyanin pigmentasyonu gösteren embriyolar elde edilmiştir.

Çizelge 4.3'de belirtildiği gibi, kalluslarda meydana gelen antosiyanin oluşumu yönünden eksplantlar arasında $p<0.05$ düzeyinde farklılıklar oluşmuştur. Genel olarak, kotiledon eksplantlarının (%22.09), hipokotil eksplantlarına kıyasla (%18.07) kalluslarda antosiyanin oluşumu yönünden daha etkili olduğu görülmektedir. Eksplantlardan

bağımsız olarak rejenerasyon ortamlarının etkisine bakıldığında ise $p<0.001$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur. Kalluslarda görülen maksimum (%100) antosiyanin oluşumu, 2 mg/L NAA + 2 mg/L TDZ içeren 69 nolu rejenerasyon ortamında meydana gelmiştir.

Eksplant ortam interaksiyonunun kalluslarda antosiyanin oluşumu üzerine olan etkisi değerlendirildiğinde $p<0.001$ seviyesinde önemli bulunmuştur. Kotiledon eksplantında 59 ve 69 nolu rejenerasyon ortamları %100 oranında antosiyanin oluştururken, hipokotil eksplantlarında 17 (0.5 mg/L BA+ 0.5 mg/L NAA), 19 (0.5 mg/L BA + 2 mg/L NAA) ve 69 nolu (2 mg/L NAA + 2 mg/L TDZ) rejenerasyon ortamları yine maksimum oranda (%100) antosiyanin pigmenti oluşturmuştur. Meyer ve Van Staden (1995), *Oxalis linearis*'de yaptıkları çalışma sonucunda, antosiyanin oluşumlarının BGD varlığında meydana geldiğini ve en yüksek antosiyanin üretiminin 8 μ M BA ve 2 μ M NAA kombinasyonunda oluşan kalluslardan elde edildiğini bildirmişlerdir. Söz konusu çalışmada BA'nın antosiyanin üretimini teşvik ettiği ortaya konulmuş ve diğer sitokininlerin pigment üretimi ile kallus büyümesi üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Bununla birlikte antosiyanin pigment üretimi, BA, TDZ ve Zeatin içeren kültürlerde önemli ölçüde artış gösterirken, kinetin ve 2-İP'nin pigment üretimi üzerinde çok az etkisi olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da, BA ve NAA kombinasyonlarını içeren kültür ortamlarında kalluslardaki antosiyanin üretiminin daha yüksek oranlarda olduğu göze çarpmaktadır.

4.3. Somatik Embriyogenesis Bulguları

Kültüre alınan eksplantlardan çeşitli rejenerasyon ortamlarında direkt ve indirekt olmak üzere iki farklı oluşum süreci ile somatik embriyolar meydana gelmiştir. Kallus aşaması olmaksızın doğrudan oluşum gösteren embriyolar direkt somatik embriyo, kallus hücrelerinden dolayı bir şekilde gelişim gösteren embriyolar ise indirekt somatik embriyo olarak tanımlanmıştır.

Direkt somatik embriyogenesis oluşumunda, rejenerasyon ortamlarının bileşimine bakılmaksızın, Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi kotiledon ve hipokotil eksplantları arasında $p<0.01$ düzeyinde istatistiksel olarak önem bulunmaktadır. Kotiledon eksplantı (%0.77) hipokotil eksplantına (%0.17) kıyasla 4.5 kat daha fazla oranda direkt somatik embriyo oluşturmuştur. Bu durumda nadir olarak görülen direkt embriyo oluşumunun kotiledon eksplantında daha başarılı sonuçlar oluşturduğu söylenebilir. Eksplantların dışında sadece rejenerasyon ortamlarının etkisine bakıldığında ise $p<0.001$ seviyesinde önemli bir farklılık görülmektedir. Direkt somatik embriyo oluşumu sadece 10 (% 3.13) 40 (% 6.25), 57 (% 6.25), ve 71 (% 18.75) nolu ortamlarda görülürken, en başarılı rejenerasyon ortamı olarak 1 mg/L Zeatin içeren 71 nolu kültür ortamı belirlenmiştir. Genel olarak bakıldığında, test edilen diğer rejenerasyon ortamları direkt somatik embriyo oluşumu üzerinde başarısız sonuçlar göstermiştir.

Çizelge 4.5. *Ricotia carnosula* rejenerasyon ortamlarında direkt ve indirekt olarak gelişen somatik embriyogenesis oran ve verimine ait varyans analiz sonuçları

Uygulama	Somatik Embriyogenesis		
	Direkt (%)	İndirekt (%)	Somatik Embriyo Verimi (embriyo/petri)
Eksplant			
Kotiledon	0.77 a	11.99 a	8.38 a
Hipokotil	0.17 b	6.76 b	4.14 b
LSD %5	0.44	2.58	0.26
P	0.0035 **	0.0009 ***	0.0030 **
Ortam			
0	0.00 d	9.38 efg	2.50 hi
1	0.00 d	25.00 cde	8.50 e-g
2	0.00 d	28.13 cde	7.75 e-h
3	0.00 d	3.13 fg	0.50 j
4	0.00 d	53.13 a	8.88 e-g
5	0.00 d	6.25 fg	1.38 hij
6	0.00 d	0.00 g	0.00 j
7	0.00 d	37.50 bc	15.00 de
8	0.00 d	6.25 fg	1.75 hi
9	0.00 d	12.50 efg	2.50 hi
10	3.13 c	3.13 fg	0.88 ij
11	0.00 d	46.88 ab	39.25 bc
12	0.00 d	12.50 efg	2.25 hi
13	0.00 d	0.00 g	0.00 j
14	0.00 d	0.00 g	0.00 j
15	0.00 d	0.00 g	0.00 j
16	0.00 d	6.25 fg	1.13 hij
17	0.00 d	34.38 bcd	12.50 def
18	0.00 d	3.13 fg	0.88 ij
19	0.00 d	18.75 def	5.88 f-i
20	0.00 d	28.13 cde	14.88 de
21	0.00 d	15.63 efg	3.75 g-j
22	0.00 d	0.00 g	0.00 j
23	0.00 d	0.00 g	0.00 j
24	0.00 d	6.25 fg	0.38 ij
25	0.00 d	0.00 g	0.00 j
26	0.00 d	0.00 g	0.00 j

Çizelge 4.5'in devamı

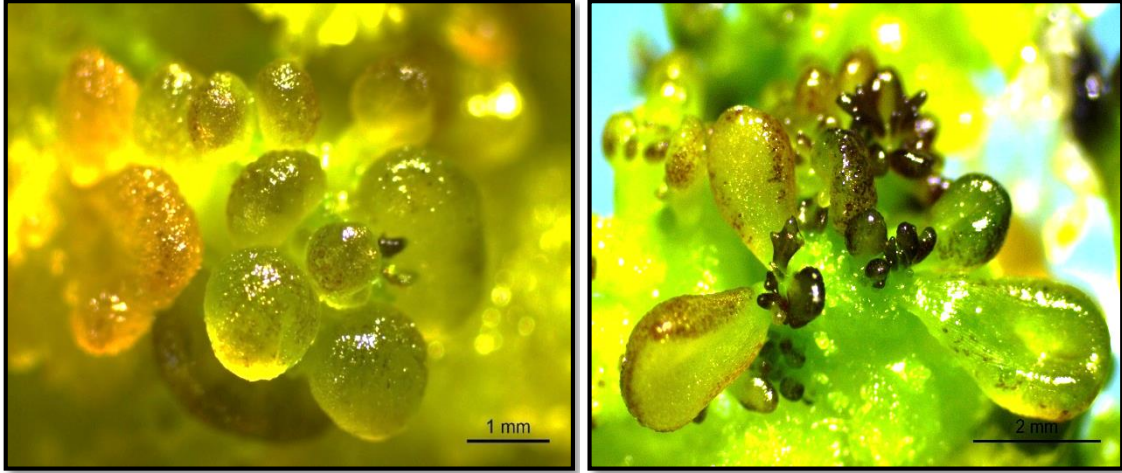
27	0.00 d	43.75 ab	25.75 cd
28	0.00 d	6.25 fg	1.88 hi
29	0.00 d	0.00 g	0.00 j
30	0.00 d	6.25 fg	5.25 f-i
31	0.00 d	3.13 fg	15.50 de
32	0.00 d	0.00 g	0.00 j
33	0.00 d	0.00 g	0.00 j
34	0.00 d	0.00 g	0.00 j
35	0.00 d	0.00 g	0.00 j
36	0.00 d	0.00 g	0.00 j
37	0.00 d	0.00 g	0.00 j
38	0.00 d	0.00 g	0.00 j
39	0.00 d	0.00 g	0.00 j
40	6.25 b	3.13 fg	2.00 hi
41	0.00 d	3.13 fg	0.13 ij
42	0.00 d	0.00 g	0.00 j
43	0.00 d	0.00 g	0.00 j
44	0.00 d	0.00 g	0.00 j
45	0.00 d	0.00 g	0.00 j
46	0.00 d	9.38 efg	2.13 hi
47	0.00 d	53.13 a	62.25 a
48	0.00 d	50.00 ab	39.38 bc
49	0.00 d	6.25 fg	1.13 hij
50	0.00 d	3.13 fg	1.50 hij
51	0.00 d	0.00 g	0.00 j
52	0.00 d	3.13 fg	1.25 hij
53	0.00 d	9.38 efg	9.50 e-g
54	0.00 d	0.00 g	0.00 j
55	0.00 d	0.00 g	0.00 j
56	0.00 d	6.25 fg	0.75 ij
57	6.25 b	34.38 bcd	43.63 b
58	0.00 d	37.50 bc	70.38 a
59	0.00 d	12.50 efg	3.13 g-j
60	0.00 d	0.00 g	0.00 j
61	0.00 d	0.00 g	0.00 j
62	0.00 d	3.13 fg	0.38 ij
63	0.00 d	0.00 g	0.00 j

Çizelge 4.5'in devamı.

64	0.00 d	0.00 g	0.00 j
65	0.00 d	0.00 g	0.00 j
66	0.00 d	0.00 g	0.00 j
67	0.00 d	0.00 g	0.00 j
68	0.00 d	6.25 fg	2.38 hi
69	0.00 d	0.00 g	0.00 j
70	0.00 d	9.38 efg	1.50 hij
71	18.75 a	9.38 efg	42.50 b
72	0.00 d	9.38 efg	4.38 f-j
LSD %5	2.702	15.63	1.591
P	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***

Çizelge 4.7'deki (Bölüm 4.4'deki organogenesis bulgularından sonra ortak bir Çizelge halinde verilmiştir) eksplantxortam interaksyonları incelendiğinde direkt somatik embriyo oluşumu üzerinde $p < 0.001$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılık tespit edilmiştir. Sonuç olarak en yüksek direkt somatik embriyo oluşumu kotiledon eksplantında (%37.5) 71 nolu (1 mg/L TDZ) rejenerasyon ortamında gerçekleşirken, hipokotil eksplantında (%12.5) ise 57 nolu (1 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA) ortamda oluşmuştur. Literatür incelendiğinde, Brassicaceae familyasına bağlı farklı türlerde kotiledon, hipokotil ve kök eksplantlarının kültüre alınmasıyla başarılı direkt somatik embriyo çalışmaları bulunmaktadır (Koh ve Loh 2000; Yang vd. 2010; Siong vd. 2011). Verma vd. (2012), endemik türler arasında yer alan *Digitalis trojana Ivan*'da hipokotil dokularını kültüre alarak direkt somatik embriyo oluşumunu sağlamışlardır. Sitokinin hormonlarının etkisinin değerlendirildiği çalışmada, tek başına Zeatin KIN ve TDZ hormonlarının direkt somatik embriyo oluşumları üzerinde etkili sonuçlar ortaya koyduğu bildirilmiş ve doğrudan somatik embriyogenesis için kültüre alınan hipokotil dokularında 0.5 mg/L veya 1 mg/L TDZ içeren kültür ortamlarının çok daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Mevcut çalışmada ise en etkili direkt somatik embriyogenesis hipokotil eksplantında 1 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA içeren 57 nolu (%12.5) ortamda gerçekleşmiştir.

İndirekt somatik embriyo oluşumu açısından değerlendirilen kotiledon ve hipokotil eksplantları $p < 0.05$ seviyesinde önemli farklılıklar oluşturmuştur. Sadece eksplantların etkisi incelendiğinde, kotiledon eksplantı (%11.99) hipokotil eksplantına (%6.76) göre indirekt somatik embriyo oluşturma yönünden hemen hemen 2 kat daha başarılıdır. Eksplantların etkisine bakılmaksızın değerlendirilen rejenerasyon ortamlarında ise $p < 0.001$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli bir fark mevcuttur. İndirekt somatik embriyo oluşumu yönünden 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ içeren 47 nolu kültür ortamı (%53.13) en etkili rejenerasyon ortamı olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).

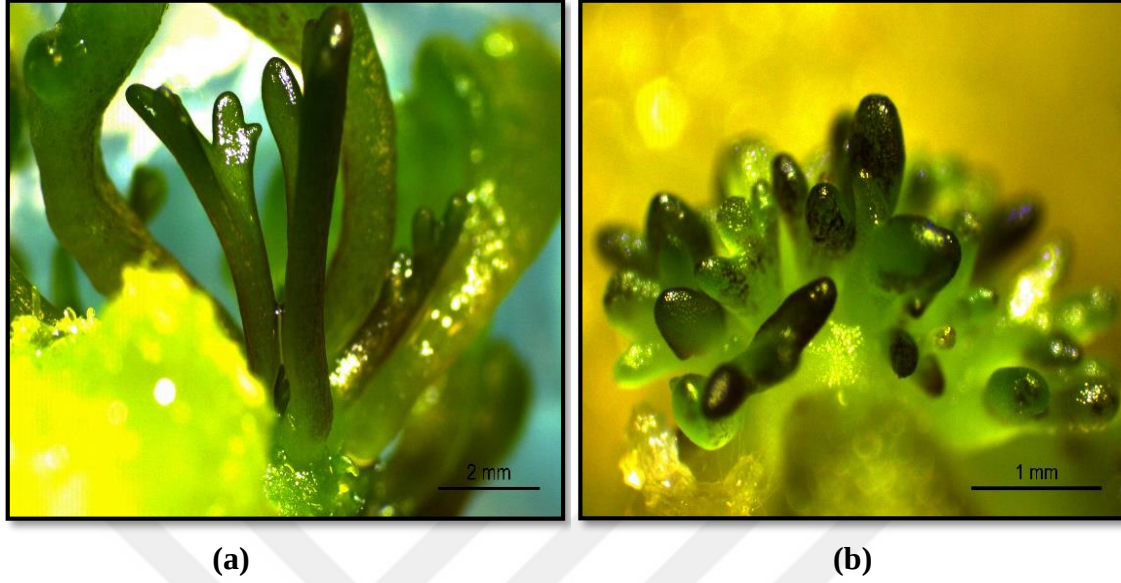


Şekil 4.4. 47 nolu rejenerasyon ortamında kültüre alınan hipokotil eksplantından oluşan indirekt somatik embriyogenesis görüntüleri

İndirekt somatik embriyo oluşumu üzerine eksplantxortam interaksyonunun etkisi incelendiğinde ise ($p<0.001$) istatistikel düzeyde önemli farklılıklar meydana gelmiştir (Çizelge 4.7). Kotiledon eksplantında 0.5 mg/L IAA + 0.5 mg/L BA içeren 11 nolu (%75) kültür ortamında başarılı olarak bulunmuştur. Hipokotil eksplantında ise 0.5 mg/L IAA içeren 1 nolu rejenerasyon ortamında (%50) ve 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ içeren 48 nolu rejenerasyon ortamında (%62.5) en yüksek oranda indirekt somatik embriyo yapıları meydana gelmiştir. Verma vd. (2012), yapmış oldukları çalışmada düşük oranlarda IAA'nın TDZ ile kombinasyonunun somatik embriyo oluşumu açısından etkili sonuçlar ortaya koyduğunu bildirmişlerdir. Bu durumda kendi çalışmamızda elde edilen bulgular ile uyum sağladığı söylenebilmektedir. Ancak kendi çalışmamızdaki bulgular doğrultusunda en yüksek indirekt somatik embriyo oranları (%53.13) TDZ + NAA kombinasyonunu içeren rejenerasyon ortamlarında da görülmektedir.

Kültüre alınan kotiledon ve hipokotil eksplantlarında iki farklı rejenerasyon yoluyla somatik embriyo oluşmuştur. Ancak takibi yapılan 73 farklı rejenerasyon ortamında, yaklaşık olarak 31 ortamın Şekil 4.5'de görüldüğü gibi aynı kültürler üzerinde hem somatik embriyo hem de sürgün yapılarını oluşturduğu tespit edilmiştir. Banjac vd. (2019) *Brassica oleracea* var. *acephala*'da yaptıkları çalışmada bizim çalışmamıza ait bulgular ile paralel sonuçlar elde ederek BA ve TDZ içeren kültür ortamlarında hem sürgün hem de somatik embriyo oluşumlarını bildirmişlerdir. Öte yandan Manjkhola vd. (2005) tehlike altında olan tıbbi bitkilerden *Arnebia euchroma*'da yaptıkları rejenerasyon denemelerinde, yaprak kaynaklı kalluslardan hem sürgün hem de somatik embriyo yapılarını gözlemlediklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada da Choffe vd. (2000) tıbbi bir bitki olan *Echinacea purpurea* L.'da yaprak sapı eksplantını BAP, TDZ ve IAA ile kombine edilmiş ortamlarda kültüre almışlar ve yapılan histolojik

ve morfolojik gözlemler sonucu iki farklı rejenerasyon formunun (somatik embriyo ve sürgün) oluşum gösterdiğini bildirmişlerdir.



Şekil 4.5. 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ içeren 47. kültür ortamında gelişen sürgün ve somatik embriyo görüntüleri; **a)** sürgünler; **b)** somatik embriyolar

Eksplantların somatik embriyo verimi üzerine olan etkisi incelendiğinde (Çizelge 4.5). ortam bileşimine bakılmaksızın $p < 0.01$ düzeyinde eksplantlar arasında önemli ölçüde farklılıklar oluşmuştur. Kotiledon eksplantının (ortalama 8.38 embriyo/petri) hipokotil eksplantına göre (ortalama 4.14 embriyo/petri) somatik embriyo verimi yönünden iki kat daha etkili olduğu belirlenmiştir. Sadece rejenerasyon ortamlarının etkisine bakıldığında verim üzerinde $p < 0.001$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar meydana gelmiştir. Çizelge 4.5'te görüldüğü gibi 1 mg/L TDZ + 1 mg/L NAA içeren 58 nolu rejenerasyon ortamı ve 0.5 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA içeren 47 nolu rejenerasyon ortamı somatik embriyo oluşumu üzerinde başarılı sonuçlar ortaya koymuştur. 58 nolu rejenerasyon ortamında ortalama 70.38 embriyo/petri oluşurken, 47 nolu rejenerasyon ortamında ise ortalama 62.25 embriyo/petri somatik embriyo meydana gelmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar doğrultusunda, somatik embriyo oluşturma yönünden TDZ hormonunun en etkili sitokininler arasında yer aldığı rapor edilmiştir (Verma vd. 2012; Banjac vd. 2019). Bu doğrultuda kendi çalışmamıza ait bulgular değerlendirildiğinde, rejenerasyon ortamlarındaki en başarılı sonuçlar TDZ hormonunu içeren kültür ortamlarında ve özellikle TDZ + NAA kombinasyonlarından elde edilmiştir.

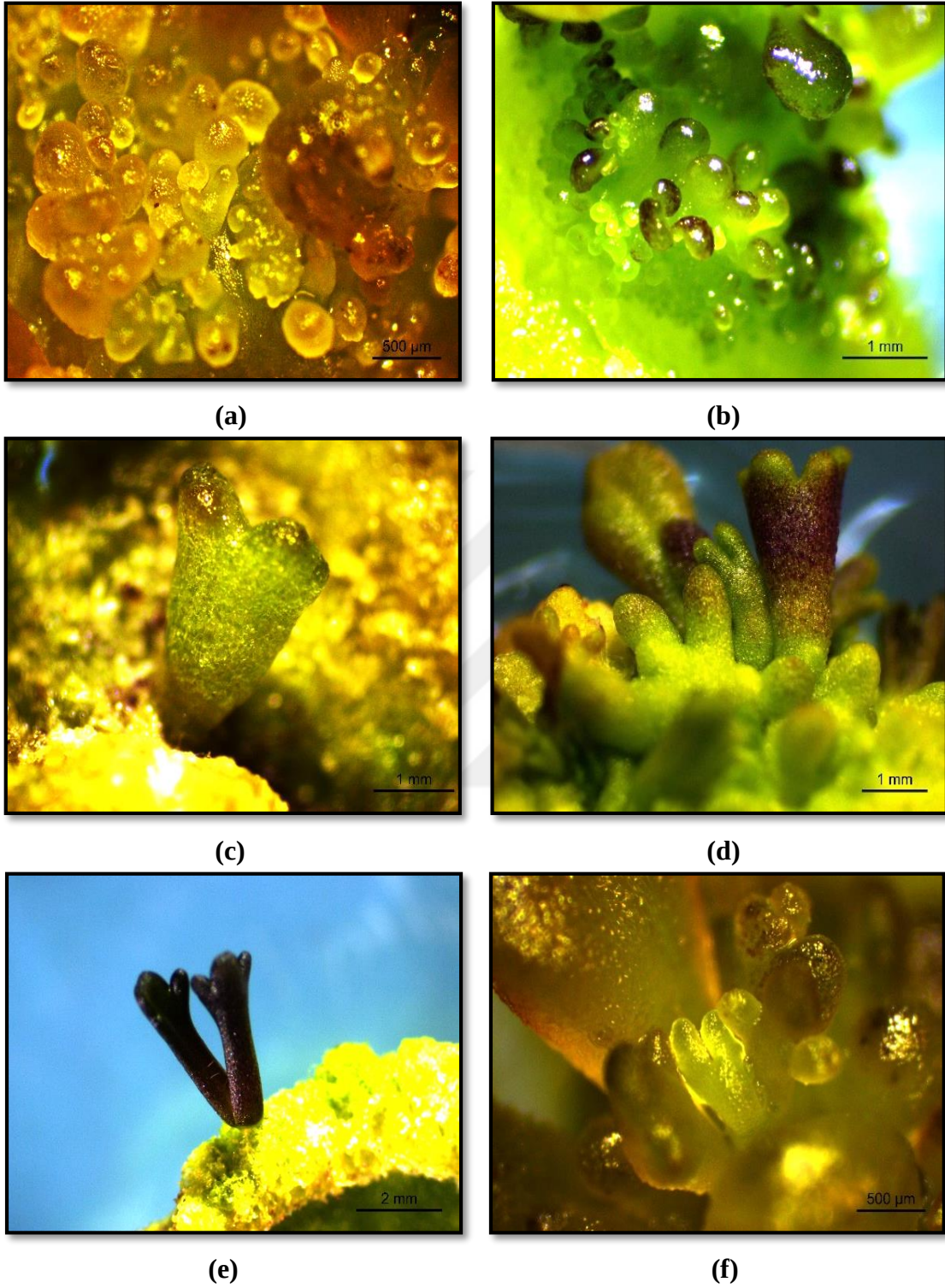
Öte yandan eksplantxortam interaksiyonun somatik embriyo verimi üzerine etkisi incelendiğinde (Çizelge 4.7). yine istatistiksel olarak ($p < 0.01$) önemli farklılıklar bulunmuş, kotiledon ve hipokotil eksplantlarında sırasıyla 58 nolu kültür ortamında ortalama 97 embriyo/petri, 47 nolu kültür ortamında ise ortalama 81.50 embriyo/petri verim elde edilmiştir. Dolayısıyla 73 farklı rejenerasyon ortamı arasında 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ içerikli 47 ve 1 mg/L NAA + 1 mg/L TDZ içerikli 58 nolu BGD

kombinasyonlarının somatik embriyo verimi yönünden en başarılı kültür ortamları olduğu tespit edilmiştir.

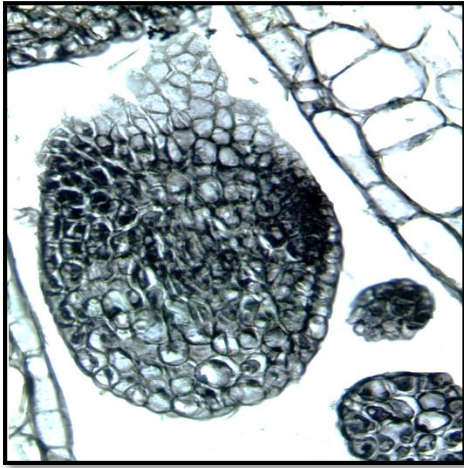
Yapılan mikroskopik ve histolojik incelemeler sonucunda, *R. carnosula*'nın kültüre alınan her iki eksplantında da somatik embriyo yapıları gözlenmiş ve bunların gelişim sürecinde oluşan globular, kalp, torpido ve kotiledon evreleri belirlenerek her aşaması morfolojik olarak Şekil 4.6'da, histolojik olarak ise Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

İki haftalık kültür sürecinden sonra hem kotiledon hem de hipokotil eksplantlarındaki somatik hücrelerde farklılıklar meydana gelerek embriyojenik gelişim başlamış ve öncelikle 4.6 ve 4.7'de görüldüğü gibi globular aşamadaki somatik embriyo yapıları gözlenmiştir. Rejenerasyon çalışmalarında gerçekleşen organogenesis ve somatik embriyogenesisin oluşum aşamaları yapılan histolojik analizlerle ve mikroskopik incelemelerle tespit edilmiştir. Histolojik kesitlerde, embriyojenik hücrelerin nispeten küçük olduğu ve diğer somatik hücrelere kıyasla büyük belirgin bir çekirdeğe ve yoğun sitoplazmaya sahip olduğu belirlenmiştir.

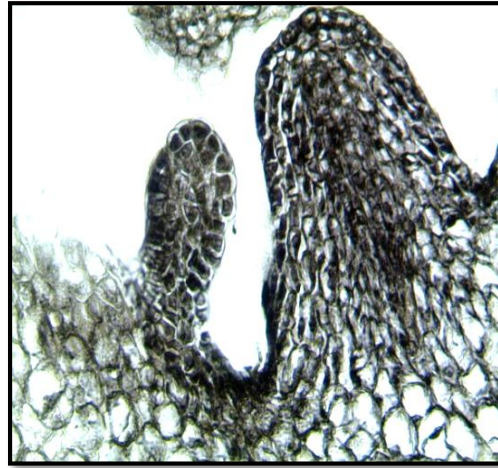
Öte yandan oluşan somatik embriyo yapılarının ana doku ile vasküler bir bağlantısının olmadığı ve bağımsız bir şekilde oluşum gösterdiği de tespit edilmiştir. *In vitro* somatik embriyo oluşum sürecinin başlangıcı literatürde, yüksek seviyelerde polisakkaritler ile karakterize edilmiş ve özellikle gerekli tohum rezerv bileşiklerinin tüketimi, somatik embriyogenesis ve organogenesis ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum, nişastanın oluşan embriyojenik hücrelerde yoğun metabolik ve mitotik aktivite için enerji sağladığı ve hızla metabolize olduğunu göstermektedir (Branca vd.1994; Martin vd. 2000; Pinto vd. 2010). Çalışmamızda yapılan histolojik incelemeler sonucunda globular ve kalp aşamasında olan somatik embriyolarda Şekil 4.7.f'de görüldüğü gibi nişasta tanecikleri saptanmıştır. Benzer şekilde Arias vd. (2019)'nin *Swietenia macrophylla*'da, Silva vd. (2015)'nin ise *Passiflora edulis Sims*'de (Passifloraceae) yaptıkları çalışmada da, elde ettikleri somatik embriyo yapılarında nişasta taneciklerinin varlığı bildirilmiştir.



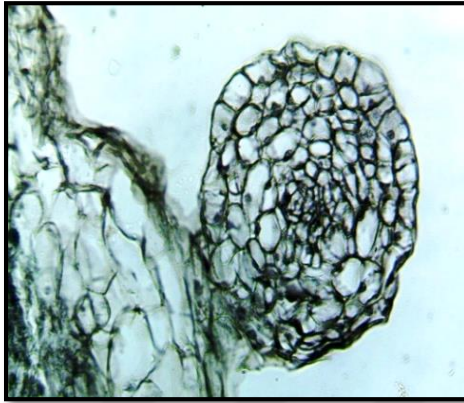
Şekil 4.6. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarından elde edilen somatik embriyo (SE) aşamalarına ait görüntüler; **a),b)** globular aşamadaki SE; **c)** kalp aşamasındaki SE; **d)** torpedo ve kotiledon aşamasındaki SE; **e)** direkt oluşum gösteren kotiledon aşamasındaki SE; **f)** indirekt oluşum gösteren kotiledon aşamasındaki SE



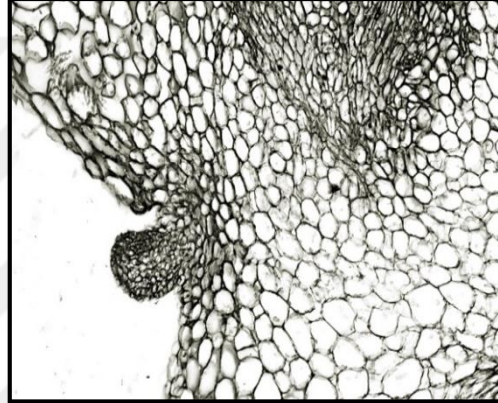
(a)



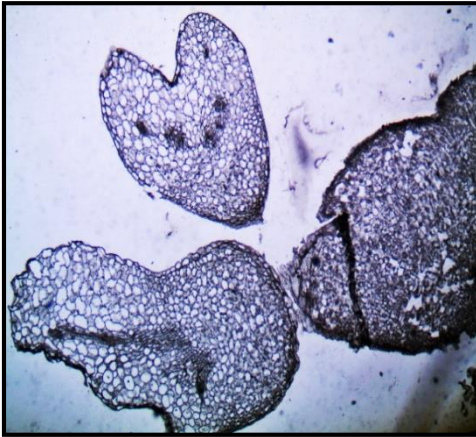
(b)



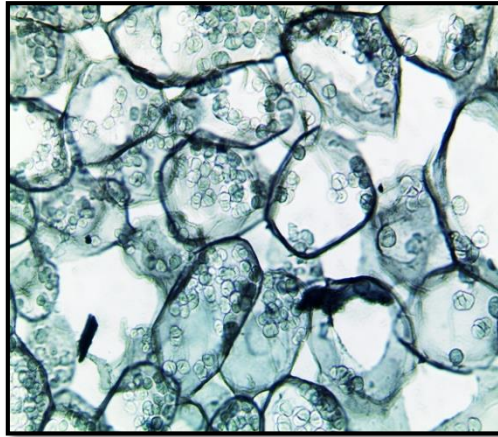
(c)



(d)



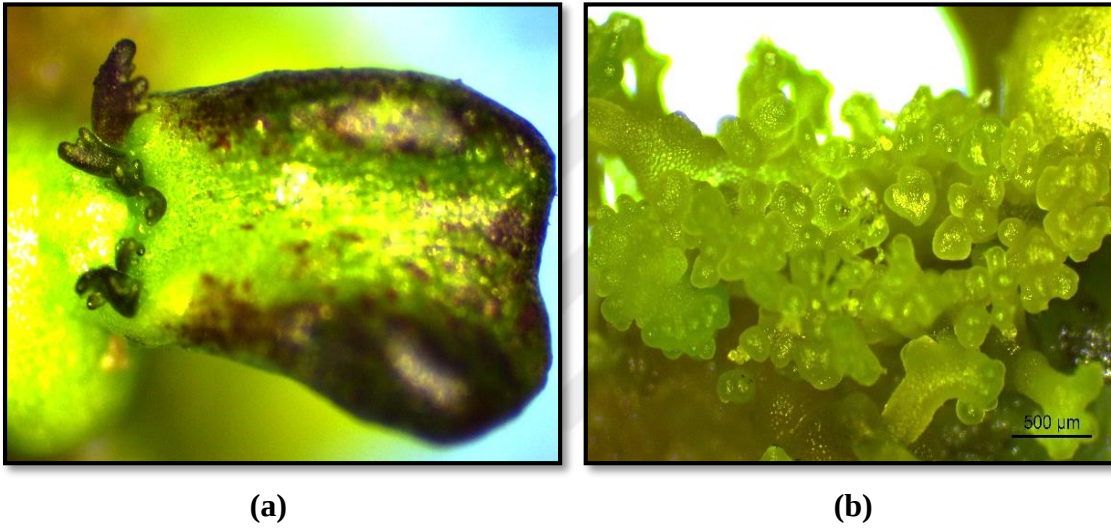
(e)



(f)

Şekil 4.7. Somatik embriyo aşamalarına ait histolojik kesit görüntüleri; **a), b), c), d)** globular aşamadaki SE; **e)** kalp aşamadaki SE; **f)** embriyojenik hücrelerde bulunan nişasta tanecikleri

Yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda dikkat çeken diğer önemli bir nokta; oluşan somatik embriyolar üzerinde zaman içerisinde sekonder embriyo yapılarının da meydana gelmiş olmasıdır. “Sekonder embriyogenesis” daha önceden oluşmuş somatik embriyolardan, tekrar ikincil bir somatik embriyo rejenerasyonunun oluşması olarak tanımlanmaktadır. Şekil 4.8’ de görüldüğü gibi bu çalışmada yoğun şekilde sekonder embriyogenesis gerçekleşmiştir. Benzer şekilde pek çok araştırmacı tarafından Brassica’da yapılan somatik embriyogenesis çalışmalarında, ikincil somatik embriyoların gelişim gösterdiği rapor edilmiştir (Kirti 1988; Parihar 1995; Choi vd. 1996; Koh ve Loh 2000; Zhang vd. 2005; Paunescu 2008; Cosic vd. 2013; Banjac vd. 2019). Sekonder embriyo oluşumları 0.5 mg/L NAA + 1 mg/L BA içeren 27 nolu rejenerasyon ortamının yanısıra hiçbir BGD içeriği olmayan kontrol grubunda da gerçekleşmiştir. Özellikle kontrol grubunda hem primer hem de sekonder embriyogenesisin meydana gelmesi, *R. carnosula* türünün rejenerasyon potansiyelinin aslında ne kadar yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8. Sekonder embriyogenesisine ait görüntüler; **a)** kontrol ortamında bir kotiledondan elde edilen somatik embriyo üzerinde gelişen sekonder embriyolar; **b)** 27 nolu rejenerasyon ortamında bir hipokotilden elde edilen somatik embriyo üzerinde oluşan sekonder embriyolar

4.4. Organogenesis Bulguları

Organogenesis oluşumu açısından değerlendirilen rejenerasyon ortamlarında her iki eksplant tipinde de direkt ve indirekt oluşumu gözlenmiştir. Ortamın etkisinden bağımsız olarak, eksplantların direkt organogenesis üzerine etkisi incelendiğinde $p < 0.001$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6). Organogenesis yönünden hipokotil eksplantları (%9.08) kotiledonlara (%0.17) göre çok daha etkili bulunmuştur. Direkt sürgün oluşumu üzerine sadece ortamların etkisi de önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). 73 farklı rejenerasyon ortamı arasında en etkili direkt sürgün oluşumları dikkat çekici bir şekilde BGD içermeyen kontrol ortamında oluşmuştur, ki bu *R. carnosula*’nın hipokotil dokularındaki içsel sitokinin seviyesinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.6. *Ricotia carnosula* rejenerasyon ortamlarında direkt ve indirekt olarak gelişen organogenesis oran ve sayılarına ait varyans analiz sonuçları

Uygulama	Organogenesis		
	Direkt (%)	İndirekt (%)	Sürgün verimi (sürgün/petri)
Eksplant			
Kotiledon	0.17 b	3.60 b	2.18 b
Hipokotil	9.08 a	12.16 a	8.34 a
LSD %5	1.34	2.25	0.21
P	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***
Ortam			
0	50.00 a	0.00 h	13.50 c-h
1	9.38 de	3.13 gh	2.00 h-k
2	0.00 f	31.25 abc	11.00 d-j
3	0.00 f	25.00 a-d	9.75 e-j
4	0.00 f	0.00 h	0.00 j
5	0.00 f	0.00 h	0.00 j
6	0.00 f	0.00 h	0.00 j
7	0.00 f	15.63 c-g	1.88 h-k
8	0.00 f	3.13 gh	0.75 ijk
9	0.00 f	0.00 h	0.00 j
10	0.00 f	15.63 c-g	8.75 e-k
11	0.00 f	0.00 h	0.00 j
12	0.00 f	0.00 h	0.00 j
13	0.00 f	0.00 h	0.00 j
14	0.00 f	0.00 h	0.00 j
15	0.00 f	0.00 h	0.00 j
16	0.00 f	0.00 h	0.00 j
17	0.00 f	9.38 e-h	1.88 h-k
18	0.00 f	9.38 e-h	8.13 e-k
19	0.00 f	21.88 b-e	12.00 c-i
20	3.13 ef	28.13 abc	19.25 cde
21	0.00 f	9.38 e-h	5.50 f-k
22	0.00 f	0.00 h	0.00 j
23	0.00 f	18.75 c-f	3.25 f-k

Çizelge 4.6'nın devamı

24	0.00 f	0.00 h	0.00 j
25	0.00 f	0.00 h	0.00 j
26	0.00 f	0.00 h	0.00 j
27	0.00 f	9.38 e-h	3.63 f-k
28	0.00 f	9.38 e-h	3.13 f-k
29	0.00 f	0.00 h	0.00 k
30	31.25 c	35.53 ab	24.25 bc
31	0.00 f	21.88 b-e	4.25 f-k
32	3.13 ef	15.63 c-g	3.88 f-k
33	0.00 f	12.50 d-h	3.13 f-k
34	0.00 f	0.00 h	0.00 j
35	0.00 f	0.00 h	0.00 j
36	0.00 f	0.00 h	0.00 j
37	6.25 ef	0.00 h	0.25 ijk
38	0.00 f	6.25 fgh	0.88 ijk
39	0.00 f	0.00 h	0.00 j
40	28.13 c	0.00 h	7.25 e-k
41	6.25 ef	0.00 h	1.88 h-k
42	0.00 f	21.88 b-e	4.00 f-k
43	0.00 f	9.38 e-h	1.25 h-k
44	0.00 f	0.00 h	0.00 j
45	0.00 f	0.00 h	0.00 j
46	0.00 f	0.00 h	0.00 j
47	3.13 ef	18.75 c-f	8.63 e-k
48	0.00 f	12.50 d-h	2.88 g-k
49	0.00 f	12.50 d-h	1.63 h-k
50	43.75 b	3.13 gh	16.13 c-f
51	0.00 f	6.25 fgh	1.88 h-k
52	0.00 f	25.00 a-d	16.50 c-f
53	18.75 d	9.38 e-h	6.88 e-k
54	0.00 f	0.00 h	0.00 j
55	0.00 f	0.00 h	0.00 j
56	0.00 f	0.00 h	0.00 j
57	0.00 f	37.50 a	34.75 b
58	0.00 f	21.88 b-e	13.63 c-h
59	0.00 f	9.38 e-h	3.50 f-k
60	43.75 b	6.25 fgh	23.63 bcd

Çizelge 4.6'nın devamı

61	9.38 de	18.75 c-f	4.88 f-k
62	0.00 f	3.13 gh	0.25 ijk
63	0.00 f	3.13 gh	0.50 ijk
64	3.13 ef	0.00 h	0.38 ijk
65	0.00 f	3.13 gh	0.63 ijk
66	0.00 f	0.00 h	0.00 j
67	0.00 f	18.75 c-f	4.75 f-k
68	0.00 f	15.63 c-g	2.88 g-k
69	0.00 f	0.00 h	0.00 j
70	43.75 b	0.00 h	12.75 c-i
71	34.38 bc	0.00 h	57.63 a
72	0.00 f	15.63 c-g	14.25 c-g
LSD %5	8.104	13.64	1.302
P	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	<0.0001 ***

Çizelge 4.7'ye göre eksplantxortam interaksyonunun direkt sürgün oluşumu üzerindeki etkisi $p < 0.001$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Maksimum direkt sürgün oluşumları kontrol grubunda kültüre alınan hipokotil eksplantında (%100) gerçekleşirken, kotiledon eksplantında ise sadece 71 nolu rejenerasyon ortamında (%12.5) meydana gelmiştir. Bu durum yine *R. carnosula*'nın farklı dokularında bulunan endojen hormonların organogenesis yönünü belirlemedeki rolünü ortaya koymaktadır. Verma vd. (2011) *Digitalis lamarckii* endemik türünde yapmış oldukları çalışmada direkt sürgün organogenesisi yolu ile etkili bir *in vitro* rejenerasyon protokolu oluşturmayı hedeflemişlerdir. İlk olarak yaprak eksplantlarını kültüre alarak BAP, KIN, TDZ ve Zeatinin farklı konsantrasyonlarının direkt organogenesis üzerindeki etkisini test etmişlerdir. Çalışma sonucunda tek başına BAP'ın diğer sitokinlere kıyasla daha etkili olduğu bulunmuş, Zeatin ve KIN içeren kültürlerde ise sürgün oluşumuna rastlanılmamıştır. Kendi çalışmamıza ait bulgularda ise Verma vd. (2011)'nin aksine sitokinler arasında tek başına Zeatin ve TDZ içeren kültür ortamları daha başarılı sonuçlar oluşturmuş, 0.5 mg/L Zeatin, 1 mg/L TDZ ve 2 mg/L TDZ içeren rejenerasyon ortamında uygulama başına %43.75 oranında direkt sürgün oluşumu gerçekleşmiştir.

İndirekt sürgün oluşumu yönünden ortamın etkisine bakılmaksızın iki farklı eksplant türü arasında istatistiksel olarak ($p < 0.001$) önemli fark görülmektedir (Çizelge 4.6). Hipokotil eksplantı (%12.16) kotiledon eksplantına (%3.60) kıyasla daha başarılı bulunmuş ve 3.3 kat daha fazla sürgün oluşumu meydana getirmiştir. Rejenerasyon ortamlarının tek başına etkisine bakıldığında ise ($p < 0.001$) önemli düzeyde farklılıklar meydana gelmiş ve 57 nolu (0.5 mg/L NAA + 1 mg/L TDZ) rejenerasyon ortamı ile 30 nolu rejenerasyon ortamı (2 mg/L BA) (%37.50) indirekt organogenesis açısından diğer ortamlara kıyasla daha etkili bulunmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda özellikle Brassica türlerinde TDZ + NAA ve BAP + NAA kombinasyonlarının organogenesis

oluşumunda etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Guo vd. 2005; Yıldızhan 2007; Cogbill vd. 2010; Gambhir ve Srivastava 2015). Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, indirekt sürgün oluşumlarının TDZ + NAA kombinasyonunda ve sadece BA içeren rejenerasyon ortamında etkili olduğu belirlenmiş ve bu durum *R. carnosula* dokularındaki endojen oksin varlığını ortaya koymaktadır.

Öte yandan, eksplant ortam interaksyonlarının etkisi incelendiğinde Çizelge 4.7’de belirtildiği gibi indirekt sürgün oluşumu yönünden $p < 0.001$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Hem rejenerasyon ortamı hem de eksplant bazında en başarılı sürgün oranları hipokotil eksplantında 2 (1 mg/L IAA) nolu kültür ortamlarında gerçekleşmiştir. Özellikle 1 mg/L IAA oksin hormonu içeren 2 nolu rejenerasyon ortamında %62.5 oranında sürgün oluşumunun gözlenmesi, daha önce belirtildiği gibi hipokotil dokularında bulunan içsel sitokinin seviyesinin yüksek olduğunu doğrulamaktadır.



Çizelge 4.7. *Ricotia carnosula* rejenerasyon ortamlarında gelişen somatik embriyogenesis, organogenesis ve rejenerant verimleri üzerine eksplant ortam interaksyonunun etkisine ait varyans analiz sonuçları

Ort. No	Rejenerasyon Tipi (%)								Oluşan Rejenerant Verimi			
	Somatik Embriyogenesis				Organogenesis							
	Direkt		İndirekt		Direkt		İndirekt		Embriyo		Sürgün	
	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil
K	0.0 d	0.0 d	18.8 g-i	0.0 j	0.0 h	100.0 a	0.0 h	0.0 h	5.00 j-n	0.00 n	0.00 n	27.00 c-h
1	0.0 d	0.0 d	0.0 j	50.0 b-d	0.0 h	18.8 e	6.3 f-j	0.0 h	0.00 n	17.00 f-j	0.25 mn	3.75 k-n
2	0.0 d	0.0 d	56.3 abc	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	62.5 a	15.50 g-k	0.00 n	0.00 n	22.00 d-k
3	0.0 d	0.0 d	0.0 j	6.3 ij	0.0 h	0.0 h	0.0 h	50.0 abc	0.00 n	1.00 mn	0.00 n	19.50 e-l
4	0.0 d	0.0 d	50.0 b-d	56.3 abc	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	11.25 g-l	6.50 h-m	0.00 n	0.00 n
5	0.0 d	0.0 d	12.5 h-j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	2.75 lm	0.00 n	0.00 n	0.00 n
6	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
7	0.0 d	0.0 d	31.3 e-h	43.8 c-f	0.0 h	0.0 h	0.0 h	31.3 b-f	10.50 g-l	19.50 e-i	0.00 n	3.75 k-n
8	0.0 d	0.0 d	6.3 i-j	6.3 ij	0.0 h	0.0 h	0.0 h	6.3 f-j	1.75 lmn	1.75 ln	0.00 n	1.50 lmn
9	0.0 d	0.0 d	25.0 f-h	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	5.00 j-n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
10	6.3 c	0.0 d	6.3 ij	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	31.3 b-f	1.75 lmn	0.00 n	0.00 n	17.50 f-n
11	0.0 d	0.0 d	75.0 a	18.8 g-i	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	63.75 abc	14.75 g-k	0.00 n	0.00 n
12	0.0 d	0.0 d	25.0 f-h	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	4.50 j-n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
13	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
14	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 i	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
15	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
16	0.0 d	0.0 d	6.3 ij	6.3 ij	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	1.50 ln	0.75 mn	0.00 n	0.00 n
17	0.0 d	0.0 d	50.0 b-d	18.8 g-i	0.0 h	0.0 h	0.0 h	18.8 d-h	20.75 e-i	4.25 j-n	0.00 n	3.75 k-n
18	0.0 d	0.0 d	6.3 ij	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	18.8 d-h	1.75 lmn	0.00 n	0.00 n	16.25 f-n
19	0.0 d	0.0 d	37.5 d-g	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	43.8 a-d	11.75 g-l	0.00 n	0.00 n	24.00 c-j
20	0.0 d	0.0 d	56.3 abc	0.0 j	0.0 h	6.3 gh	0.0 h	56.3 ab	29.75 d-h	0.00 n	0.00 n	38.50 bcd

Çizelge 4.7'nin devamı

21	0.0 d	0.0 d	25.0 f-h	6.3 ij	0.0 h	0.0 h	0.0 h	18.8 d-h	5.25 j-n	2.25 lm	0.00 n	11.00 g-n
22	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
23	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	37.5 a-e	0.00 n	0.00 n	0.00 n	6.50 j-n
24	0.0 d	0.0 d	0.0 j	12.5 h-j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.75 mn	0.00 n	0.00 n
25	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
26	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
27	0.0 d	0.0 d	62.5 ab	25.0 f-h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	18.8 d-h	44.50 b-e	7.00 h-l	2.50 lmn	4.75 k-n
28	0.0 d	0.0 d	12.5 h-j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	18.8 d-h	3.75 lm	0.00 n	0.00 n	6.25 j-n
29	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
30	0.0 d	0.0 d	12.5 h-j	0.0 j	0.0 h	62.5 c	50.0 abc	25.0 c-g	10.50 g-l	0.00 n	29.75 c-f	18.75 e-n
31	0.0 d	0.0 d	0.0 j	6.3 ij	0.0 h	0.0 h	0.0 h	43.8 a-d	0.00 n	31.00 d-h	0.00 n	8.50 h-n
32	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	6.3 gh	0.0 h	31.3 b-f	0.00 n	0.00 n	0.00 n	7.75 i-n
33	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	25.0 c-g	0.00 n	0.00 n	0.00 n	6.25 j-n
34	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
35	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
36	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
37	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	12.5 ef	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.50 mn
38	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	6.3 f-j	6.3 f-j	0.00 n	0.00 n	0.75 mn	1.00 lmn
39	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
40	12.5 b	0.0 d	6.3 ij	0.0 j	0.0 h	56.3 c	0.0 h	0.0 h	4.00 j-n	0.00 n	0.00 n	14.50 f-n
41	0.0 d	0.0 d	6.3 ij	0.0 j	0.0 h	12.5 ef	0.0 h	0.0 h	0.25 n	0.00 n	0.00 n	3.75 k-n
42	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	43.8 a-d	0.00 n	0.00 n	0.00 n	8.00 i-n
43	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	12.5 e-i	6.3 f-j	0.00 n	0.00 n	0.50 mn	2.00 lmn
44	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
45	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
46	0.0 d	0.0 d	18.8 g-i	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	4.25 j-n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
47	0.0 d	0.0 d	56.3 abc	50.0 b-d	0.0 h	6.3 gh	25.0 c-g	12.5 e-i	43.00 c-g	81.50 ab	8.25 i-n	9.00 h-n
48	0.0 d	0.0 d	37.5 d-g	62.5 ab	0.0 h	0.0 h	25.0 c-g	0.0 h	31.00 d-h	47.75 b-d	5.75 j-n	0.00 n

Çizelge 4.7'nin devamı

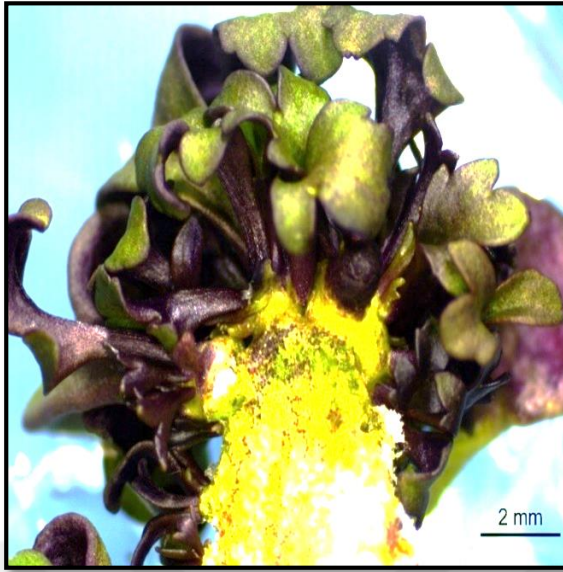
49	0.0 d	0.0 d	12.5 h-j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	25.0 c-g	2.25 lm	0.00 n	0.00 n	3.25 lmn
50	0.0 d	0.0 d	0.0 j	6.3 ij	0.0 h	87.5 b	6.3 f-j	0.0 h	0.00 n	3.00 lm	3.75 k-n	28.50 c-g
51	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	12.5 e-i	0.00 n	0.00 n	0.00 n	3.75 k-n
52	0.0 d	0.0 d	0.0 j	6.3 ij	0.0 h	0.0 h	12.5 e-i	37.5 a-e	0.00 n	2.50 lm	8.75 h-n	24.25 c-j
53	0.0 d	0.0 d	0.0 j	18.8 g-i	0.0 h	37.5 d	0.0 h	18.8 d-h	0.00 n	19.00 e-i	0.00 n	13.75 f-n
54	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
55	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
56	0.0 d	0.0 d	12.5 h-j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	1.50 ln	0.00 n	0.00 n	0.00 n
57	0.0 d	12.5 b	31.3 e-h	37.5 d-g	0.0 h	0.0 h	25.0 c-g	50.0 abc	78.75 ab	8.50 h-l	16.75 f-n	52.75 b
58	0.0 d	0.0 d	50.0 b-d	25.0 f-h	0.0 h	0.0 h	25.0 c-g	18.8 d-h	97.00 a	43.75 b-f	18.00 f-n	9.25 h-n
59	0.0 d	0.0 d	25.0 f-h	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	18.8 d-h	6.25 h-m	0.00 n	0.00 n	7.00 i-n
60	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	87.5 b	12.5 e-i	0.0 h	0.00 n	0.00 n	6.00 j-n	41.25 bc
61	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	18.8 e	0.0 h	37.5 a-e	0.00 n	0.00 n	0.00 n	9.75 hn
62	0.0 d	0.0 d	0.0 j	6.3 ij	0.0 h	0.0 h	0.0 h	6.3 f-j	0.00 n	0.75 mn	0.00 n	0.50 mn
63	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	6.3 f-j	0.00 n	0.00 n	0.00 n	1.00 lmn
64	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	6.3 gh	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.75 mn
65	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	6.3 f-j	0.00 n	0.00 n	0.00 n	1.25 lmn
66	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
67	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	25.0 c-g	12.5 e-i	0.00 n	0.00 n	6.50 j-n	3.00 lmn
68	0.0 d	0.0 d	12.5 h-j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	12.5 e-i	18.8 d-h	4.75 j-n	0.00 n	1.50 lmn	4.25 k-n
69	0.0 d	0.0 d	0.0 j	0.0 j	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.0 h	0.00 n	0.00 n	0.00 n	0.00 n
70	0.0 d	0.0 d	18.8 g-i	0.0 j	0.0 h	87.5 b	0.0 h	0.0 h	1.75 j-n	0.00 n	0.00 n	25.50 c-i
71	37.5 a	0.0 d	0.0 j	18.8 g-i	12.5 ef	56.3 c	0.0 h	0.0 h	79.25 ab	5.75 j-n	36.75 b-e	78.50 a
72	0.0 d	0.0 d	12.5 h-j	6.3 ij	0.0 h	0.0 h	18.8 d-h	12.5 e-i	5.50 j-n	3.25 lm	13.75 f-n	14.75 f-n
Ort	0.8	0.2	12.0	6.8	0.2	9.1	3.6	12.2	8.37	4.41	2.18	8.34
İnteraksiyon												
LSD %5	11.46		19.29		3.821		22.11		2.251		1.842	
P	< 0.0001 ***		< 0.0001 ***		< 0.0001 ***		< 0.0001 ***		0.0048 **		0.0456 *	

Sürgün verimi üzerine, ortamın etkisinden bağımsız olarak, eksplantların etkisi incelendiğinde Çizelge 4.6’da görüldüğü gibi $p<0.001$ seviyesinde önemli bulunmuştur. Hipokotil eksplantları (ortalama 8.34), kotiledon eksplantlarına (ortalama 2.18) kıyasla sürgün oluşumu üzerinde daha etkili bulunmuş ve 3.8 kat daha fazla sürgün meydana getirmiştir. Eksplantlardan bağımsız olarak rejenerasyon ortamlarının etkisi incelendiğinde ise istatistiksel olarak yine önemli fark bulunmuştur ($p<0.001$). 73 farklı kültür ortamı arasında uygulama başına oluşan en fazla sürgün verimi Çizelge 4.6 ve Şekil 4.9’da görüldüğü gibi 1 mg/L Zeatin içeren 71 nolu kültür ortamında 57.63 sürgün/petri oluşturmuştur.

Eksplantxortam interaksiyonunun sürgün verimine olan etkisi incelendiğinde $p<0.05$ düzeyinde farklılık oluşmuş ve en yüksek sürgün verimi hipokotil eksplantında ortalama 78.50 sürgün/petri ile yine 71 nolu rejenerasyon ortamında belirlenmiştir. Kotiledon eksplantı yönünden ise ortalama 36.75 sürgün/petri verim ile 71 nolu rejenerasyon ortamı diğer kültür ortamlarına kıyasla daha başarılı bulunmuştur. Brassicaceae familyasına ait türlerdeki organogenesis çalışmaları incelendiğinde, daha önce belirtildiği gibi BAP ve TDZ’nin NAA ile kombine edilmesiyle organogenesis oluşumunu önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Guo vd. 2005; Yıldızhan 2007; Cogbill vd. 2010; Gambhir ve Srivastava 2015). Ancak bizim çalışmamızdaki bulgular, kullanılan bu kombinasyonlar dışında farklı sitokinin uygulamalarının da (1mg/L Zeatin) Brassicaceae’ya bağlı *R. carnosula* türünde sürgün verimi yönünden çok daha başarılı ve etkili sonuçlar ortaya koyduğunu göstermiştir. Dolayısıyla türler arasında organogenesis oluşum tepkilerinin ortamlara göre değişiklik gösterebildiği ve BA ile TDZ içeren kültür ortamlarından farklı olarak tek başına Zeatin uygulamalarının da (sürgün/petri 57.63) organogenesis yönünden etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

4.5. Köklenme Bulguları

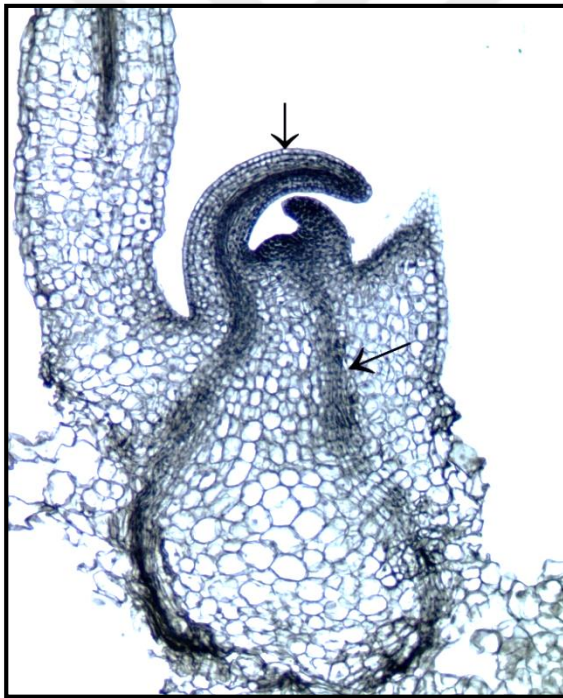
Kültüre alınan eksplantlarda ortamların etkisine bakılmaksızın Çizelge 4.8’de belirtildiği gibi kök oluşum oranı üzerinde $p<0.05$ düzeyinde farklılık oluşmuştur. Kök oluşturma kapasitesi yönünden kotiledon eksplantı (%17.70) hipokotil eksplantına kıyasla (%14.55) daha başarılı bulunmuştur. Eksplantların dışında sadece rejenerasyon ortamlarının köklenme üzerine etkileri incelendiğinde $p<0.001$ düzeyinde farklılık tespit edilmiştir. 73 farklı rejenerasyon ortamı içerisinde en etkili kök oluşumları 2, 8 ve 9 nolu rejenerasyon ortamlarında maksimum oranda (%100) gerçekleşmiştir. Bu ortamların içerikleri; 1 mg/L IAA (2), 1 mg/L NAA (8) ve 2 mg/L NAA (9)’dan oluşmaktadır. Ekspantxortam interaksiyonu ise köklenme üzerinde $p<0.001$ düzeyinde farklılık meydana getirmiştir. Kök oluşturma yönünden en etkili ortamlar kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 2, 8 ve 9 nolu rejenerasyon ortamları olarak bulunmuştur. Bu ortamlarda %100 oranında kök oluşumları meydana getirmiştir (Çizelge 4.9). Hipokotil eksplantı incelendiğinde ise, 2, 7, 8, ve 9 nolu rejenerasyon ortamlarında %100 oranında kök oluşumu gerçekleşmiştir. Brassica türlerinde yapılan araştırmalarda, genellikle NAA hormonunun kök rejenerasyonunu yüksek oranda teşvik ettiği ve başarılı şekilde kök oluşumunu sağladığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamıza ait sonuçlarda ise NAA dışında, IAA hormonunun da kök rejenerasyonu açısından başarılı bir oksin tipi olduğu söylenebilir.



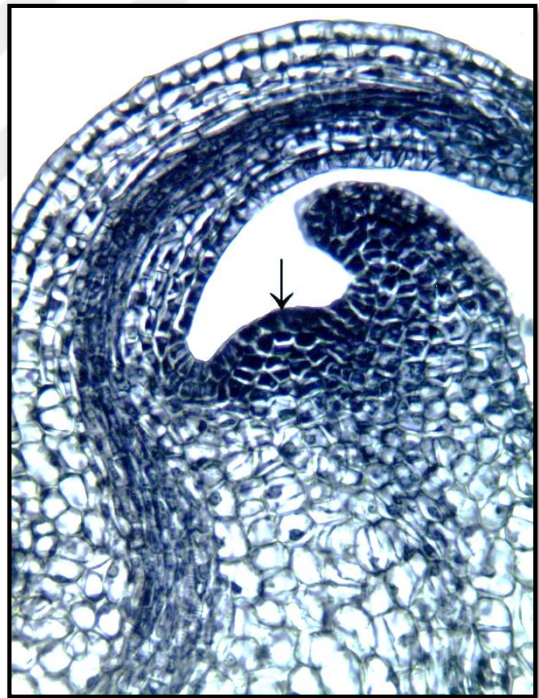
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.9. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarında direkt organogenesis ile oluşan *Ricotia carnosula* sürgünleri ve bunlara ait histolojik görüntüleri; **a)** 1 mg/L Zeatin içeren rejenerasyon ortamında kotiledon eksplantından oluşan direkt sürgün görüntüsü; **b)** 1 mg/L Zeatin içeren rejenerasyon ortamında hipokotil eksplantından gelişen direkt sürgün görüntüsü; **c)** primordium yapraklar ve vasküler bantların gelişimi; **d)** sürgün apikal meristem bölgesi

Çizelge 4.8. *Ricotia carnosula* rejenerasyon ortamlarında gelişen kök oluşumlarına ait varyans analiz sonuçları

Uygulama	Kök Oluşumu (%)	Kök Yoğunluğu (0/1/2/3) (Yok/ Az/ Orta/ Çok)	Kök Kalınlık Oranı (%)	
			Kalın	İnce
Eksplant				
Kotiledon	17.70 a	0.41	5.67 a	12.37
Hipokotil	14.55 b	0.34	3.08 b	11.47
LSD %5	2.49	Ö.D	1.87	Ö.D
P	0.0265 *	0.0546	0.0159 *	0.5058
Ortam				
K	40.63 efg	1.25 d	12.50 c-f	28.13 d-g
1	78.13 bc	1.88 c	59.38 a	18.75 f-i
2	100.00 a	2.25 bc	53.13 ab	46.88 bcd
3	65.63 cd	1.25 d	43.75 b	21.88 e-h
4	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
5	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
6	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
7	93.75 ab	1.88 c	0.00 f	93.75 a
8	100.00 a	2.88 a	0.00 f	100.00 a
9	100.00 a	2.38 b	6.25 ef	93.75 a
10	18.75 hi	0.38 fgh	18.75 cde	0.00 j
11	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
12	21.43 hi	0.71 ef	21.43 c-d	0.14 j
13	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
14	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
15	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
16	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
17	46.88 efg	1.00 de	6.25 def	40.63 cde
18	31.25 gh	0.50 fg	0.00 f	31.25 def
19	87.50 ab	1.13 d	25.00 c	62.50 b
20	9.38 ij	0.25 fgh	6.25 def	3.13 ij
21	21.88 hi	0.63 ef	12.50 c-f	9.38 hij
22	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
23	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
24	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
25	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 J
26	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
27	59.38 de	1.38 d	3.13 f	56.25 bc
28	65.63 cd	1.25 d	12.50 c-f	53.13 bc
29	50.00 def	1.00 de	0.00 f	62.50 b
30	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
31	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
32	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
33	3.13 ij	0.13 gh	0.00 f	3.13 ij
34	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
35	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
36	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
37	15.63 hij	0.25 fgh	0.00 f	15.63 g-j
38	15.63 hij	0.38 fgh	3.13 f	12.50 g-j
39	9.38 ij	0.13 gh	0.00 f	9.38 hij

Çizelge 4.8'in devamı

40	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
41	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
42	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
43	6.25 ij	0.13 gh	0.00 f	6.25 ij
44	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
45	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
46	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
47	50.00 def	1.88 c	6.25 def	43.75 bcd
48	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
49	18.75 hi	0.38 fgh	0.00 f	18.75 f-i
50	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
51	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
52	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
53	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
54	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
55	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
56	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
57	9.38 ij	0.25 fgh	6.25 def	3.13 ij
58	12.50 ij	0.25 fgh	0.00 f	12.50 g-j
59	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
60	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
61	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
62	6.25 ij	0.13 gh	6.25 ef	0.00 j
63	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
64	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
65	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
66	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
67	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
68	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
69	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
70	0.00 j	0.00 h	0.00 f	0.00 j
71	3.13 ij	0.13 gh	3.13 f	0.00 j
72	37.50 fg	1.25 d	15.63 cde	21.88 e-h
LSD %5	15.07	0.44	11.33	15.49
P	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***

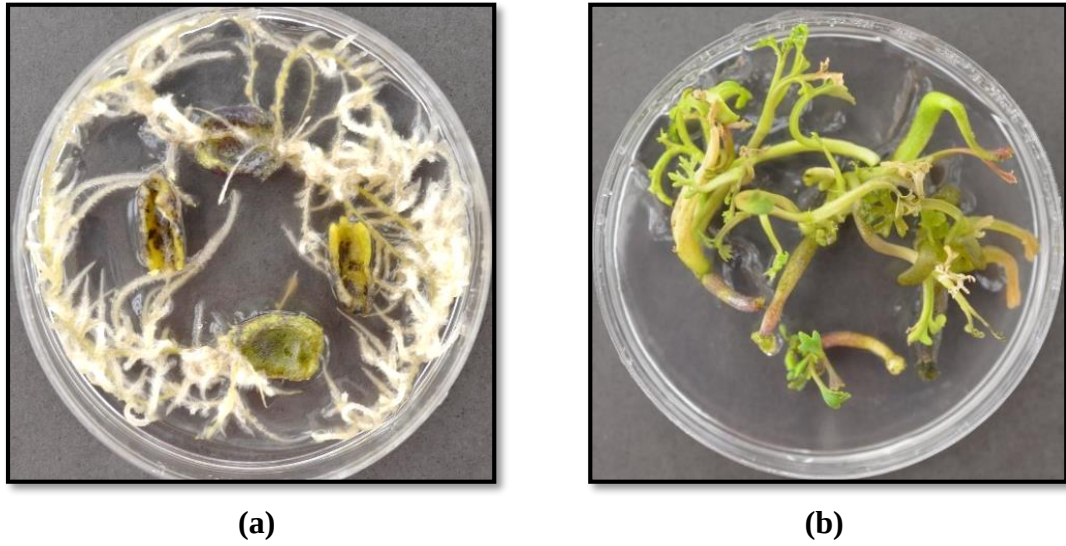
Çizelge 4.9. *Ricotia carnosula* rejenerasyon ortamlarından gelişen kök oluşumları üzerine eksplantxortam interaksiyonlarının etkisine ait varyans analiz sonuçları

Ort. No	Kök Oluşum (%)		Kök Yoğunluğu (0/1/2/3) (Yok/ Az/ Orta/ Çok)		Kök Kalınlık Yüzdesi (%)			
					Kalın		İnce	
	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil
K	75.00 bc	6.25 kl	2.25 bcd	0.25 jk	25.00 cde	0.00 f	50.00	6.25
1	87.50 ab	68.75 bcd	2.00 cde	1.75 def	87.50 a	31.25 cd	0.00	37.5
2	100.0 a	100.0 a	2.00 cde	2.50 bc	75.00 ab	31.25 cd	25.00	68.75
3	56.25 c-g	75.00 bc	1.50 efg	1.00 ghi	56.25 bc	31.25 cd	0.00	43.75
4	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
5	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
6	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
7	87.50 ab	100.0 a	1.50 efg	2.25 bcd	0.00 f	0.00 f	87.50	100.00
8	100.0 a	100.0 a	2.75 ab	3.00 a	0.00 f	0.00 f	100.00	100.00
9	100.0 a	100.0 a	2.25 bcd	2.50 bc	0.00 f	12.50 def	100.00	87.50
10	37.50 e-i	0.00 l	0.75 hij	0.00 k	37.50 bcd	0.00 f	0.00	0.00
11	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
12	6.25 kl	31.25 f-j	0.25 jk	1.00 ghi	6.25 ef	31.25 cd	0.00	0.00
13	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
14	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
15	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
16	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
17	50.00 d-h	43.75 d-h	1.25 fgh	0.75 hij	6.25 ef	6.25 ef	43.75	37.50
18	50.00 d-h	12.50 j-m	0.50 ijk	0.50 ijk	0.00 f	0.00 f	50.00	12.50
19	100.0 a	75.00 b-c	1.50 efg	0.75 hij	25.00 cde	25.00 cde	75.00	50.00
20	18.75 i-l	0.00 n	0.50 ijk	0.00 k	12.50 def	0.00 f	6.25	0.00
21	25.00 h-k	18.75 i-l	1.00 ghi	0.25 jk	6.25 ef	18.75 def	18.75	0.00
22	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
23	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
24	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
25	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
26	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
27	62.50 c-f	56.25 c-g	1.50 efg	1.25 fgh	0.00 f	6.25 ef	62.50	50.00
28	87.50 ab	43.75 d-h	1.75 def	0.75 hij	25.00 cde	0.00 f	62.50	43.75
29	25.00 h-k	75.00 bc	1.00 ghi	1.00 ghi	0.00 f	0.00 f	50.00	75.00
30	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
31	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
32	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
33	0.00 l	6.25 kl	0.00 k	0.25 jk	0.00 f	0.00 f	0.00	6.25
34	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
35	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
36	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
37	31.25 f-j	0.00 l	0.50 ijk	0.00 k	0.00 f	0.00 f	31.25	0.00
38	25.00 h-k	6.25 kl	0.50 ijk	0.25 jk	6.25 ef	0.00 f	18.75	6.25
39	0.00 l	18.75 i-l	0.00 k	0.25 jk	0.00 f	0.00 f	0.00	18.75
40	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
41	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
42	0.00 l	12.50 j-m	0.00 k	0.25 jk	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
43	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	12.50
44	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00

Çizelge 4.9'un devamı

45	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
46	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
47	68.75 bcd	31.25 f-j	2.00 cde	1.75 def	6.25 ef	6.25 ef	62.50	25.00
48	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
49	25.00 h-k	12.50 j-m	0.50 ijk	0.25 jk	0.00 f	0.00 f	25.00	12.50
50	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
51	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
52	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
53	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
54	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
55	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
56	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
57	18.75 i-l	0.00 l	0.50 ijk	0.00 k	12.50 def	0.00 f	6.25	0.00
58	12.50 j-m	12.50 j-m	0.25 jk	0.25 jk	0.00 f	0.00 f	12.50	12.50
59	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
60	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
61	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
62	0.00 l	12.50 j-m	0.00 k	0.25 jk	0.00 f	12.50 def	0.00	0.00
63	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
64	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
65	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
66	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
67	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
68	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
69	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
70	0.00 l	0.00 l	0.00 k	0.00 k	0.00 f	0.00 f	0.00	0.00
71	6.25 kl	0.00 l	0.25 jk	0.00 k	6.25 ef	0.00 f	0.00	0.00
72	31.25 f-j	43.75 d-h	1.00 ghi	1.50 efg	18.75 def	12.50 def	12.50	31.25
Ort.	17.64	14.55	0.41	0.34	5.65	3.08	12.37	11.47
İnteraksiyon								
LSD %5	21.31		0.62		16.03		Ö.D	
P	0.0008 ***		0.0359 *		0.0127 *		0.0806	

Köklenme ile ilgili olarak, kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı ve herhangi bir BGD içeriği bulunmayan kontrol ortamında dikkat çekici bir şekilde %75 oranında kök oluşumu gerçekleşmiştir (Şekil 4.10 ve Çizelge 4.9). Bunun yanı sıra aynı koşullar altında kültüre alınan hipokotil eksplantlarında ise, daha önce belirtildiği gibi %100 oranında sürgün oluşumu meydana gelmiştir (Çizelge 4.7). Bu sonuçlar doğrultusunda kültüre alınan eksplantlar kendi içinde değerlendirildiğinde, *R. carnosula*'nın kotiledon eksplantında endojen oksin seviyesinin ve hipokotil eksplantında ise endojen sitokinin seviyesinin yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bu durumda *R. carnosula*'nın iki farklı eksplantında bulunan içsel oksin/sitokinin seviyesinin, hem somatik embryogenesis hem de organogenesis yönünü belirlemede önemli role sahip olduğu söylenebilir. Ayrıca, kültüre alınan her iki eksplant türünden de ekzojen hormon ilavesine gerek kalmadan çift yönlü rejenerasyon sağlanması, *R. carnosula* türünün rejeneratif kapasitesinin ne denli yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.



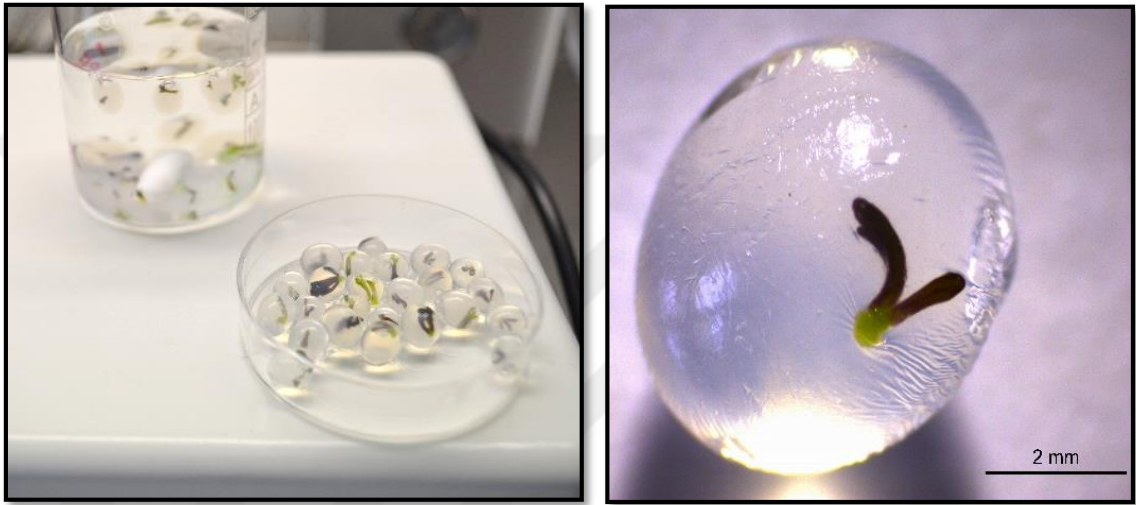
Şekil 4.10. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarının kontrol ortamındaki gelişimlerine ait görüntüler; **a)** kotiledon eksplantındaki kök oluşumları; **b)** hipokotil eksplantındaki sürgün oluşumları

Kök yoğunluğu üzerine yapılan varyans analiz sonuçlarına göre Çizelge 4.8’de belirtildiği gibi ortamların etkisinden bağımsız olarak kotiledon ve hipokotil eksplantları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir. Rejenerasyon ortamlarının etkisi incelendiğinde 1 mg/L NAA içeren 8 nolu kültür ortamı kök yoğunluğu açısından $p < 0.001$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Eksplantxortam interaksiyonunun kök yoğunluğuna olan etkisi test edildiğinde ise $p < 0.05$ seviyesinde farklılık meydana getirmiş, eksplant ve ortam bazında en iyi kök yoğunluğunu oluşturan rejenerasyon ortamı yine 8 nolu kültür ortamında hipokotil eksplantından elde edilmiştir (Çizelge 4.9).

Kalın kök (%) ve ince kök (%) oluşumları üzerine her iki eksplant türünün etkisi incelenmiş ve sonuç olarak, kalın kök oluşumu yönünden eksplantların önemli etkisinin olduğu ($p < 0.05$), ince kök oluşumu açısından ise kotiledon ve hipokotil dokuları arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Eksplantların etkisinden bağımsız olarak, rejenerasyon ortamlarının etkisi incelendiğinde 1 nolu rejenerasyon ortamı (%59.38) diğer kültür ortamlarına kıyasla kalın kök oluşturma yönünden önemli ($p < 0.001$) bulunmuştur. İnce kök oluşumunda ise aynı şekilde $p < 0.001$ düzeyinde farklılık tespit edilmiş ve en yüksek ince kök oluşumu 8 (%100) nolu rejenerasyon ortamında oluşmuştur. Öte yandan, aynı özellikler için eksplantxortam interaksiyonu incelendiğinde, kalın kök oluşumu $p < 0.05$ seviyesinde önemli iken, ince kök oluşumunda ise eksplantxortam interaksiyonunun önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. En yüksek kalın kök oluşumu kotiledon eksplantında 1 (%87.50) nolu rejenerasyon ortamında gerçekleşmiştir. Çalışmada elde edilen bu ayrıntılı köklenme bilgilerinin *R. carnosula*’da yapılabilecek hem mikroçoğaltım hem de *in vitro* sekonder metabolit üretim çalışmaları için önemli olduğu düşünülmektedir.

4.6. Sentetik Tohum Bulguları

Yapılan rejenerasyon çalışmaları sonucunda, çeşitli rejenerasyon ortamlarında gelişim gösteren somatik embriyolar, uygun sentetik tohum üretim protokolünün geliştirilmesinde kullanılmıştır. Farklı gelişim evrelerinde bulunan somatik embriyolar arasından sadece kotiledon aşamasına ulaşmış olan embriyolar belirlenip, bunlar çeşitli konsantrasyondaki sodyum aljinat (%3, %4) ve CaCl_2 (100 mM, 125 mM, 150mM) solüsyonları ile enkapsüle edilmiş ve sentetik tohumlar haline dönüştürülmüştür. Bu ortamlarda oluşturulan sentetik tohumların çimlenme performanslarının test edilmesi için BGD içermeyen MES'li MS ortamlarına ekimleri yapılarak, 25°C'de 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyoda sahip bitki büyüme odasında kültüre alınmıştır.



Şekil 4.11. Somatik embriyolardan oluşturulan sentetik tohumlara ait görüntüler

Yapılan sentetik tohum denemeleri sonucunda *R. carnosula*'da hem %3, hem de %4'lük sodyum aljinat konsantrasyonlarının özellikle 100 mM CaCl_2 ile kombinasyonu halinde embriyoların çimlenmesi için uygun elastik yapıyı oluşturduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi %4'lük sodyum aljinat + 100 mM CaCl_2 ile kaplanan sentetik tohumlarda %93.75 en yüksek çimlenme oranı gerçekleşmiştir. Bu oranı %3'lük sodyum aljinat + 100 mM CaCl_2 ile kaplanan yapay tohumlarda %90.62 oranında izlemiştir. Sonuç olarak *R. carnosula* sentetik tohum üretimi için en uygun enkapsülasyon ortamının %4'lük sodyum aljinat + 100 mM CaCl_2 kombinasyonu olduğu tespit edilmiştir.

Literatür incelendiğinde sentetik tohum üretimi için en uygun aljinat konsantrasyonlarının türe göre farklılık gösterdiği belirtilmektedir. Kumar ve Thomas (2012)'nin *Clitoria ternatea* Linn'de yapmış oldukları çalışmada % 4'lük sodyum aljinat konsantrasyonunun sentetik tohumların çimlenmesi için optimum olduğu, %4'ün üzerindeki konsantrasyonun ise kapsüllenen embriyoların çimlenmesi için çok sert bir matris oluşturduğunu bildirmişlerdir. Öte yandan Cangahuala-inocente vd. (2007) *Acca sellowiana*'da %1'lik sodyum aljinat konsantrasyonunun sentetik tohum oluşturmak için yeterli olduğunu bildirirken, başka bir çalışmada Mathur vd. (1989), % 6'lık sodyum

aljinat ve 75 mM CaCl₂ kombinasyonunun optimum sonuç verdiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise %3 ve %4'lük sodyum aljinat konsantrasyonun 100 mM CaCl₂ ile birlikte kullanılmasının sentetik tohum eldesi için uygun olduğu, ancak en başarılı kombinasyonun %4 sodyum aljinat +100 mM CaCl₂ olduğu belirlenmiştir. Benzer sonuçlar, yine Pattnaik ve Chand (2000)'in dut bitkisinde yapmış oldukları çalışmada görülmüş ve %4'lük sodyum aljinat konsantrasyonunun optimum olduğu, bu sayede berrak ve üniform bir kapsül oluşturduğu rapor edilmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı sodyum aljinat ve kalsiyum klorür konsantrasyonları ile kapsüllenmiş *Ricotia carnosula* sentetik tohumlarının çimlenme oranları

Ortam No	Sodyum Aljinat (%)	Kalsiyum Klorür (mM)	Çimlenme Oranı (%)
Kontrol	-	-	84.37
1	3	100	90.62
2		125	68.75
3		150	62.50
4	4	100	93.75
5		125	43.75
6		150	34.75
LSD %5			Ö.D
P			0.1642

Sentetik tohumların BGD içermeyen kültür ortamlarında çimlendirilmeleri sonucu, yaklaşık bir ay gibi bir süre sonunda, sentetik tohumlarda hipokotil-radisil eksen gelişimi gözlenmiş ve büyümelerine devam ederek sağlıklı *in vitro* bitkicikler meydana gelmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *Ricotia carnosula* sentetik tohumlardan elde edilen *in vitro* bitkicikler

4.7. Aklimatizasyon Bulguları

Rejenerasyon ortamlarında kotiledon ve hipokotil eksplantlarından gelişim gösteren somatik embriyolar, kotiledon aşamasına ulaştıklarında, *in vitro* koşullarda izole edilerek 30 g/L sukroz eklenmiş hormonsuz MS (MES tamponlu) çimlendirme ortamı içeren tüplere transferleri yapılmıştır. Her tüpte bir somatik embriyo olacak şekilde toplamda 225 somatik embriyo çimlendirme ortamlarına aktarılmış ve 25 °C’de 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyoda sahip bitki büyütme odalarında muhafaza edilmiştir. Yaklaşık bir aylık kültür süresinden sonra embriyoların hepsi %100 oranında çimlenmiştir. Sağlıklı sürgün ve kök oluşumu gözlenen *in vitro* bitkicikler belirlenerek aklimatizasyon işlemleri yapılmıştır (Şekil 4.13).

Toplamda 100 rejenere bitkicik küçük viyollere aktarılmış ve gelişim gösteren bitkiciklerin daha büyük saksılara transferi yapılarak dış koşullara adaptasyonu sağlanmıştır. Son aşama olarak sera koşullarına aktarılan *ex vitro* bitkilerin %70’i yaşamını sürdürerek sağlıklı gelişim göstermiştir. Yapılan morfolojik gözlemler sonucu oluşan rejenere bitkiler ile doğadaki formları arasında herhangi bir farklılığa rastlanılmamıştır.



şekil 4.13. Aklimatizasyonu yapılan rejenere bitkilere ait görüntüler

6. SONUÇLAR

Ricotia carnosula Boiss. & Heldr. (Brassicaceae) zengin antioksidan içeriğine sahip, tıbbi bitki potansiyeli taşıyan bir endemik bitkidir. Ancak, IUCN (Nesli Tükenme Tehlikesi Altında Olan Türlerin Kırmızı Bitkiler Listesi) kategorisine göre, LR-lc grubunda, türü tehdit altında bulunan türler arasında yer almaktadır. *In vitro* yöntemler ile gerçekleştirilen hızlı klonal üretim ve germplazm muhafaza işlemleri, türü tehdit ya da yok olma tehlikesi altında bulunan bitkilerin korunmasında gen ve tohum bankalarının *in situ* muhafazasına önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Bu yönüyle literatürde henüz ele alınmamış bir tür olan *R. carnosula* endemiğinin, bu tez çalışmasında *in vitro* koşullarda somatik embriyogenesis veya organogenesis yoluyla rejenerasyonunun sağlanması ve elde edilecek somatik embriyoların çeşitli kaplama uygulamalarıyla sentetik tohuma dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Yapılan denemelerde kotiledon ve hipokotil eksplantlarının kültüre alındığı 73 farklı rejenerasyon ortamının tek başlarına ve birbirleri ile olan interaksiyonlarının; eksplant tepkisi, toplam kallus, embriyojenik kallus, organojenik kallus, antosiyanin oluşumları, direkt ve indirekt yolla somatik embriyogenesis ve sürgün-kökü kapsayan organogenesis oluşumları üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen somatik embriyolar enkapsüle edilerek sentetik tohum haline dönüştürülmüştür. Tez çalışmasında gerçekleştirilen tüm uygulamalara ait genel sonuçlar özellikle eksplantxbesin ortamının interaksiyon etkisi yönünden aşağıda özetlenmiştir.

- Çalışmada elde edilen morfolojik yapılar yönünden somatik embriyo ve organ oluşumu şeklinde iki farklı rejenerasyon tipi görülmüştür. Kurulan denemelerde elde edilen sonuçlar; özellikle embriyojenik kallus oluşumu, organojenik kallus oluşumu, somatik embriyo oluşumu ve sürgün oluşumu üzerinde eksplant kaynağı ve kullanılan ortam içeriklerinin önemli etkisinin olduğunu ortaya koymuştur. 73 farklı besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda en yüksek embriyojenik kallus oluşumu kotiledon eksplantında 14 (0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA), 15 (1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA), 18 (1 mg/L NAA + 1 mg/L BA), 29 (2 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA) ve 69 (2mg/L NAA + 2 mg/L TDZ) nolu ortamlarda %100 oranında gerçekleşirken, hipokotil eksplantında ise 2 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA içeren 16 nolu rejenerasyon ortamında ve 0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA içeren 4 nolu kültür ortamında yine %100 oranında meydana gelmiştir. Embriyojenik kallus oluşumu yönünden BA'nın diğer sitokinin hormonlarına kıyasla daha başarılı olduğu ifade edilebilir. Çalışmamızda embriyojenik kalluslar renk ve yapı bakımından farklılıklar oluşturmuştur. Özellikle sarı ve açık yeşil renge sahip, yapı olarak nodüler ve dağılabilir kallus (friable) oluşumları embriyojenik kallus olarak nitelendirilmiştir. Koyu yeşil, sert ve kompakt görünüme sahip kalluslar ise genel olarak sürgün oluşturduğu için organojenik kallus olarak tanımlanmıştır. Oluşan bu farklılıkların kullanılan eksplant türünden ve bunların içsel hormon düzeylerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yüksek oranda embriyojenik kallus oluşturmalarına rağmen 14, 15, 29 ve 69 nolu ortamlarda somatik embriyo yapıları oluşmamış ve bu durumun alt kültürleme işleminin yapılmamasından kaynaklandığı tahmin edilmektedir.
- Organojenik kallus oluşumu yönünden, kotiledon eksplantında %87.5 oranla 38 nolu (1 mg/L NAA + 2 mg/L BA) rejenerasyon ortamı daha başarılı sonuçlar oluştururken, hipokotil eksplantında ise %62.5 oranla 2 nolu (1 mg/L IAA) rejenerasyon ortamı organojenik kallus açısından başarılı bulunmuştur.

- En yüksek kallus derecesi (3) kotiledon eksplantında 14, 17, 19, 47, 48 ve 57 nolu rejenerasyon ortamlarında oluşurken, hipokotil eksplantında ise 11, 12 ve 25 nolu rejenerasyon ortamlarında belirlenmiştir.
- Kültüre alınan eksplantlardan gelişen kalluslarda ve rejenerantlarda farklı oranlarda antosiyanin oluşumu meydana gelmiştir. Rejenerantlarda en fazla antosiyanin oranı (%87.5) hipokotil eksplantında 31 nolu (2 mg/L BA + 0.5 mg/L IAA) ve 70 nolu (0.5 mg/L Zeatin) rejenerasyon ortamlarında meydana gelmiştir. Öte yandan somatik embriyo yapılarının genel olarak her aşamasında yoğun olarak ve sürgünlerde ise kısmen antosiyanin oluşumları meydana gelmiştir. Antosiyanin oluşumunun *R. carnosula*'nın özellikle somatik embriyogenesis başlangıcını tespit etmek için morfolojik bir markır olabileceği düşünülmektedir.
- Kalluslarda meydana gelen antosiyanin oluşumu yönünden ise kotiledon eksplantında 59 (2 mg/L NAA + 1 mg/L TDZ) ve 69 nolu (2 mg/L NAA + 2 mg/L TDZ) rejenerasyon ortamları %100 oranında antosiyanin oluştururken, hipokotil eksplantında 17. (0.5 mg/L BA+ 0.5 mg/L NAA), 19. (0.5 mg/L BA + 2 mg/L NAA) ve 69. rejenerasyon ortamları da %100 oranında antosiyanin meydana getirmiştir. Bu durumda, BA + NAA ve TDZ + NAA kombinasyonlarının kalluslardaki antosiyonun üretimini yüksek oranda teşvik ettiği ifade edilebilir.
- Somatik embriyolar direkt ve indirekt olmak üzere iki farklı şekilde oluşmuştur. Direkt somatik embriyo oluşumu yönünden en etkili sonuçlar 1 mg/L Zeatin içeren 71 nolu rejenerasyon ortamında kültüre alınan kotiledonlarda tespit edilmiştir. Hipokotil eksplantı yönünden ise 57 nolu (0.5 mg/L NAA + 1 mg/L TDZ) rejenerasyon ortamı %12.5 oranla direkt somatik embriyo oluşumları göstermiştir. Mikroskopik ve histolojik incelemeler sonucu direkt yolla oluşan somatik embriyolarda genel olarak ana doku ile belirgin bir vasküler bağlantının olmadığı tespit edilmiştir. İndirekt somatik embriyo oluşumu ilk olarak kallus oluşumlarının ardından somatik embriyo yapılarının meydana gelmesiyle başlamıştır. En yüksek indirekt somatik embriyo oluşumu kotiledon eksplantında 0.5 mg/L IAA + 0.5 mg/L BA içeren 11 nolu (%75) kültür ortamında meydana gelirken, hipokotil eksplantında ise 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ içeren 48 nolu rejenerasyon ortamında (%62.5) meydana gelmiştir.
- Kültüre alınan kotiledon ve hipokotil eksplantlarının somatik embriyo verimi üzerine eksplantxortam interaksiyonlarının etkisi, istatistiksel olarak $p<0.05$ düzeyinde önemli farklılıklara neden olmuştur. En yüksek somatik embriyo verimi kotiledon eksplantında 58. ortamda (ortalama 97embriyo/petri), hipokotil eksplantında ise 47. ortamda (ortalama 81.50 embriyo/petri) meydana gelmiştir. Dolayısıyla 73 farklı rejenerasyon ortamı arasında 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ (47 nolu ortam) ve 1 mg/L NAA + 1 mg/L TDZ (58 nolu ortam) içeren BGD kombinasyonlarının somatik embriyogenesi en yüksek düzeyde teşvik ettiği belirlenmiştir. Somatik embriyo oluşumundaki tüm aşamalar (globular kalp torpedo ve kotiledon) mikroskopik ve histolojik incelemeler sonucu tespit edilmiştir. Ayrıca histolojik analizlerle globular ve kalp aşamasında olan somatik

embriyolarda, embriyojenik hücrelerin enerji kaynağı olarak kullandığı nişasta taneciklerine de rastlanmıştır.

- Yapılan incelemeler sonucunda somatik embriyolar üzerinde çok sayıda sekonder embriyo yapılarının meydana geldiği belirlenmiştir. Bu yapılar hiçbir BGD içeriği olmayan kontrol grubunda ve 0.5 mg/L NAA + 1 mg/L BA içeren 27 nolu rejenerasyon ortamlarında oluşmuştur. Sekonder embriyoların özellikle kontrol grubunda meydana gelmiş olması *R.carnosula* türünün rejenerasyon yeteneğinin ne denli yüksek olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir.
- Organogenesis oluşumu açısından her iki eksplant tipinde de, direkt ve indirekt olmak üzere iki farklı oluşum süreci gözlenmiştir. En etkili direkt sürgün oluşumları hipokotil eksplantında (%100) kontrol grubunda oluşurken, kotiledon eksplantında ise 71 nolu rejenerasyon ortamında (%12.5) meydana gelmiştir. En yüksek indirekt sürgün oluşum oranı ise (%62.5) hipokotil eksplantında 1 mg/L IAA içeren 2 nolu kültür ortamında gerçekleşmiştir. Ortam içeriği incelendiğinde, sadece oksin hormonu içeren rejenerasyon ortamında sürgün oluşumlarının gözlenmesi özellikle *R. carnosula* hipokotil dokularındaki içsel sitokinin seviyesinin yüksek olduğunu göstermektedir.
- Sürgün verimi (sürgün/petri) yönünden değerlendirilen eksplantlarda, en yüksek sürgün verimi hipokotil eksplantında ortalama 78.50 sürgün/petri ile 71 nolu rejenerasyon ortamında gerçekleşirken, kotiledon eksplantında ise ortalama 36.75 sürgün/petri verimi ile yine 71 nolu rejenerasyon ortamında meydana gelmiştir.
- Kültüre alınan eksplantların kök oluşturma kapasitesi değerlendirildiğinde; 1 mg/L IAA (2 nolu), 1 mg/L NAA (8 nolu) ve 2 mg/L NAA (9 nolu) içeren kültür ortamlarında %100 oranında etkili kök oluşum oranları gözlenmiştir. Öte yandan kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı ve herhangi bir BGD içeriği bulunmayan kontrol ortamında %75 oranında kök oluşumları meydana gelirken, hipokotil eksplantında ise %100 oranında sürgün oluşumları meydana gelmiştir. Bu durum, kotiledon eksplantında bulunan içsel oksin seviyesinin, hipokotil eksplantında ise içsel sitokinin seviyesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca *R. carnosula*'daki içsel oksin/sitokinin seviyesinin hem somatik embriyogenesis hem de organogenesis yönünü belirlemede önemli bir kriter olduğu da ifade edilebilir. Kalın ve ince kök oluşumlarında eksplantxortam interaksiyonunun etkisi incelendiğinde ise, en yüksek kalın kök oluşum oranı (%87.5) kotiledon eksplantında 1 nolu (0.5 mg/L IAA) rejenerasyon ortamında gözlenirken, ince kök oluşumunda istatistiksel olarak önemli bir farklılık oluşturmadığı tespit edilmiştir.
- Çalışmada elde edilen somatik embriyolarda sentetik tohum oluşturulması amacı ile çeşitli enkapsülasyon uygulamaları yapılmış ve bunların arasından %4'lük sodyum aljinat +100 mM CaCl₂ kombinasyonunun embriyoların çimlenmesi için uygun elastik yapıyı oluşturduğu belirlenmiştir. Bu şekilde kaplanan sentetik tohumlarda en yüksek çimlenme oranı %93.75 olarak belirlenmiştir.

- Yapılan denemeler sonucunda 225 adet somatik embriyo çimlendirme ortamlarına aktarılmış ve %100 oranında *in vitro* rejenerasyon sağlanmıştır. Sağlıklı sürgün ve kök oluşumu gösteren 100 bitkicik belirlenerek dış koşullara adaptasyonunun sağlanması için küçük viyollere aktarılmış ve gelişen bitkicikler daha büyük saksılara transfer edilmiştir. Sera koşullarına aktarılan rejenere bitkilerin aklimatizasyon başarısı ise %70 olarak gerçekleşmiştir.
- Sonuç olarak bu tez çalışmasında, türü tehdit altında olan *R. carnosula* endemiğinin, klonal ve hızlı üretimi için, somatik embriyogenesis ve organogenesis yoluyla etkin rejenerasyon protokolleri geliştirilmiş ve bununla birlikte, uzun dönem *in vitro* genetik kaynak muhafazası için sentetik tohum protokolü oluşturularak, bu değerli endemik bitkinin sürdürülebilir genetik kaynak muhafazası için biyoteknoloji yardımıyla önemli bir bilimsel altyapı oluşturulmuştur.

7. KAYNAKLAR

- Acemi, A., Kıran, R., Özen, F., Mavi, Yıldız., 2012. (*Amsonia orientalis*)'in *in vitro* Çoğaltımında Farklı IAA ve IBA Konsantrasyonlarının Kök Gelişimi Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül Ege Üniversitesi Prof. Dr. Yusuf VARDAR-MÖTBE, İzmir.
- Acemi, A., Özen, F. and Kıran, R., 2012. Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *Amsoniaorientalis* (*Apocynaceae*)'in *in vitro* Çoğaltımında Sürgün Gelişimi Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül, Ege Üniversitesi Prof. Dr. Yusuf VARDAR-MÖTBE, İzmir.
- Akasaka-Kennedy, Y., Yoshida, H. and Takahata, Y. 2005. Efficient plant regeneration from leaves of rapeseed (*Brassica napus* L.) the influence of AgNO₃ and genotype. *Plant Cell Rep*, 24: 649–654.
- Anonim1 : <http://www.bgci.org/worldwide/gspc/> [Son erişim tarihi : 30.09.2019].
- Arı, E. 2010a. Cultivation and Phytochemical Studies on *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr. 6th Conference On Medicinal and Aromatic Plants Of Southern European Countries (6th CMAPSEEC), vol.6, no.22 (Supplemented), ss.104, 18-22 Nisan, Antalya, Türkiye.
- Arı, E., Karagüzel, O. and Gürbüz, E. 2010b. Antalya florasından selekte edilen ve kültüre alınan bazı doğal bitkilerin peyzajda kullanım önerileri. IV. Ulusal Süs Bitkileri kongresi, ss. 189-199, 20-22 Ekim, Alata, Mersin.
- Arı, E., Bedir, H., Yildirim, S., & Yildirim, T. 2016. Androgenic responses of 64 ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to shed-microspore culture in the autumn season. *Turkish Journal of Biology*, 40(3), 706-717.
- Arslan, N., Baydar, H., Kızıl, S., Karık, Ü., Şekeroğlu, N. and Gümüşçü, A. 2015. Tıbbi Aromatik Bitkiler Üretiminde Değişimler ve Yeni Arayışlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği 8. Teknik Kongresi, ss. 483-507, 12-16 Ocak, TMMOB ZiraatMühendisleri Odası, Ankara.
- Babaoğlu, M., Özcan, S. and Sancak, C. 2001. Somatik Embriyogenesis. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., Bitki Biyoteknolojisi, 1.Basım, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 71-88 s.
- Banjag, N., Vinterhalter, B., Krstic-Milosevic, D., Milojevic, J., Tubic, L., Ghalavenji and Zdravkovic-Korac, S. 2019. Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from the hypocotyl slices and free radical scavenging activity of regenerants of collard greens (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 137:613–626.
- Baskaran, P., Kumari, A. and van Staden, J. 2015. Embryogenesis and synthetic seed production in *Mondia whitei*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 121: 205–214.
- Bozhkov, P.V., Filonova L.H. and von Arnold, S. 2002. A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by with drawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. *Biotechnol. Bioeng*, 77: 658–667.

- Brady, K.U., Kruckeberg, A.R., and Bradshaw H.D Jr, 2005. Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36:243–266.
- Branca, C., Torelli, A., Fermi, P., Altamura, M. M., & Bassi, M. 1994. Early phases in *in vitro* culture of tomato cotyledons: starch accumulation and protein pattern in relation to the hormonal treatment. *Protoplasma*, 182, 59-64.
- Brooks, R.R. 1987. *Serpentine and its Vegetation: A Multidisciplinary Approach*. Dioscorides Press, Portland, OR.
- Cangahuala-Inocente, G. C., Dal Vesco, L. L., Steinmacher, D., Torres, A. C., & Guerra, M. P. 2007. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): induction, conversion and synthetic seeds. *Scientia Horticulturae*, 111(3), 228-234.
- Cardoza, V., Stewart, C.N.Jr. 2003. Increased *Agrobacterium* mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl explants. *Plant Cell Rep*, 21:599–604.
- Chen, K., Zhang, X.B., Jiang, J.L. and Wang, X.Y. 2011. Plantlet regeneration from cotyledon, cotyledon petiole, and hypocotyls explants via somatic embryogenesis pathway in roquette (*Eruca sativa* Mill). *Plant Biosyst*, 145(1): 68–76.
- Cheruvathur, M.K., Kumar, G.K. and Thomas, T.D. 2013. Somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113(1): 63-71.
- Choffe, K. L., Victor, J. M., Murch, S. J., & Saxena, P. K. 2000. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* L.: direct somatic embryogenesis and indirect shoot organogenesis in petiole culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(1), 30-36.
- Choi, P. S., Woong, Y. S. and Jang, R. L. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotyledonary explant cultures of Chinese cabbage. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 44: 253-256.
- Craig, W., Wiegand, A., O'Neill, C.M., Mathias, R.J., Power, J.B. and Davey, M.R. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration from stem explants of *Moricandia arvensis*. *Plant Cell Rep*, 17: 27–31.
- Cogbill, S., Faulcon, T., Jones, G., McDaniel, M., Harmon, G., Blackmon, R. and Young, M. 2010. Adventitious shoot regeneration from cotyledonary explants of rapid-cycling fast plants of *Brassica rapa* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 101:127–133.
- Cosic, T., Motyka, V., Raspor, M., Savic, J., Cingel, A., Vinterhalter, B., Vinterhalter, D., Travnickova, A., Dobrev, P.I., Bohanec, B. and Ninkovic, S. 2015. *In vitro* shoot organogenesis and comparative analysis of endogenous phytohormones in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) effects of genotype, explant type and applied cytokinins. *Plant Cell Tissue and Organ Cult*, 121:741–760.
- Cosic, T., Vinterhalter, B., Vinterhalter, D., Mitić, N., Cingel, A., Savić, J., Bohanec, B. and Ninković, S. 2013. *In vitro* plant regeneration from immature zygotic

- embryos and repetitive somatic embryogenesis in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *G. ongylodes*). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 49:294–303.
- Dal Corso, G., Borgato, L. and Furini, A. 2005. *In vitro* plant regeneration of the heavy metal tolerant and hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 82: 267–270.
- Davis, P.H. (ed), 1965-1985. Flora of Turkey and the East Aegan Islands. Edinburgh University Press. Vol 1-9.
- Don Palmer, C., Keller, W.A. 2011. Somatic embryogenesis in *Crambe abyssinica* Hochst. ex R.E. Fries using seedling explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 104:91–100.
- Denchev, P. D., & Conger, B. V. 1995. *In vitro* culture of switchgrass: influence of 2,4-D and picloram in combination with benzyladenine on callus initiation and regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 40(1), 43-48.
- Deepika R, Kanwar K. 2010. *In vitro* regeneration of *Punica granatum* L. Plants from different juvenile explants. *J Fruit Ornam Plant Res*, 18:5–22.
- Ekim, T., 2010. National Geographic Türkiye Dergisi 2010.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytac, Z. and Adigüzel N. 2000. Red Data Book of Turkish Plants (Pteridophyta and Spermatophyta). Foundation for Turkish Nature Conservation (TTKD) and Van Centennial University (VCU), Ankara, Turkey.
- Fehér, A., Pasternak, T. and Dudits, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 74:201–228.
- Gaj, M.D. 2002. Stimulation of somatic embryo formation by mutagens and darkness in culture of immature zygotic embryos of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul*, 37: 93–98.
- Gambhir, G., Kumar, P. and Srivastava, D.K. 2017. High frequency regeneration of plants from cotyledon and hypocotyl cultures in *Brassica oleracea* cv. Pride of India. *Biotechnol Rep*, 15(2017):107–113.
- Gambhir, G. and Srivastava, D.K. 2015. Thidiazuron induces high frequency shoot regeneration in leaf and petiole explants of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *Capitata*). *J Biotechnol Biomater*, 5:172.
- Gantait, S., Vijayan, J. and Majee, A. 2017. Artificial seed production of *Tylophora indica* for interim storing and swapping of germplasm. *Horticultural Plant journal*, 3(1): 41-46.
- Gantait, S., Kundu, S., Ali, N. and Sahu, N.C. 2015. Synthetic seed production of medicinal plants: a review on influence of explants, encapsulation agent and matrix. *Acta physiologiae plantarum*, 37(5): 98.
- Germena, M.A. and Lambardi, M. 2016. Protocols in somatic embryogenesis in selected important horticultural plants. In: Germena M. A. and Lambardi, M. (Eds.), *Somatic Embryogenesis in Higher Plants*, Springer Science and Business Media, New York, pp. 263-395.

- Gerszberg, A., Konka, K.H. and Kowalczyk, T. 2015. *In vitro* regeneration of eight cultivars of *B. oleracea* var. *capitata*. *In vitro Cellular Developmental Biology*, 51: 80-87.
- Ghnaya, A.B., Charles, G. and Branchard, M. 2008. Rapid shoot regeneration from thin cell layer explants excised from petioles and hypocotyls in four cultivars of *Brassica napus* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 92:25–30.
- Glimelius, K. 1984. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some Brassicaceae. *Physiol Plant*, 61: 38-44.
- Greuter, W. 1991. Botanical diversity endemism rarity and extinction in the Mediterranean area, an analysis based on the published volumes of MedChecklist. *Botanika Chronika*, 10: 63-79.
- Grzyb, M., Kalandyk, A., Waligórski, P., & Mikuła, A. 2017. The content of endogenous hormones and sugars in the process of early somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 129, 387-397.
- Guo, D.P., Zhu, Z.J., Hu, X.X. and Zheng, S.J. 2005. Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*). *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 83:123–127.
- Hartmann, H.T., Davis, F.T. and Geneve, F.L. 2007. Plant propagation. Principles and practices. London: Prentice Hall.
- Horstman, A., Berner, M. and Boutilier, K. 2017. A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*, 4: 201–216.
- Hoşgören, M.Y. 2000. Jeomorfolojinin Ana Çizgileri I. Rebel yayıncılık, İstanbul.
- Högberg, K.A., Bozhkov, P.V., Grönroos, R. and von Arnold, S. 2001. Critical factors affecting *ex vitro* performance of somatic embryo plants of *Picea abies*, *Scand. J J.F or. Res.* 16: 295–304.
- İpekçi, Z. and Gözükrımı, N. 2003. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Rep.*, 22: 16–24.
- Jiménez, V. M. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, 196-223.
- Kamada, H., Kobayashi, K., Kiyosue, T. and Harada, H. 1989. Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In vitro cellular & developmental biology*, 25(12): 1163-1166.
- Karagöz, A., Doğan, O., Erpul, G., Dengiz, O., Sönmez, B., Tekeli, İ., Deviren Saygın, S. and Madenoğlu, S. 2015. Çölleşme Kuraklık ve Erozyonunun Olası Etkilerinin Türkiye Ölçeğinde Değerlendirilmesi. Türkiye Ziraat Mühendisliği 8. Teknik Kongresi, ss. 118-141, 12-16 Ocak, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara.
- Khor, E. and Loh, C.S. 2005. Artificial seeds. In: Nedovic, V. and Willaert, R. (Eds.), *Applications of Cell Immobilization Biotechnology*, Springer, The Netherlands, pp. 527-537.

- Kirti, P.B. 1988. Somatic embryogenesis in hypocotyl protoplast culture of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Breed*, 100:222–224.
- Kitto, S. L., and Janick, J. 1982. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. In *HortScience* (Vol. 17, No. 3, pp. 488-488). 701 north saint a saph street, alexandria, va 22314-1998: amer soc *horticultural science*.
- Koh, L. W. and Loh, C. S. 2000. Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and *in vitro* flowering in rapid-cycling *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*, 19: 1177-1183.
- Kruckeberg, A.R. 1985. California Serpentine: Flora, Vegetation, Geology, Soils, and Management Problems. Berkeley: Univ. Calif. Press. 180 pp.
- Kumar, G.K. and Thomas, T.D. 2012. High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Clitoria ternatea* Linn. *Plant Cell Tissue and Org Cult*, 110(1): 141-151.
- Kumar, P. and Srivastava, D.K. 2015a. Effect of potent cytokinin thidiazuron (TDZ) on *in vitro* morphogenic potential of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), an important vegetable crop. *Indian J Plant Physiol*, 20:317–323.
- Kumar, P. and Srivastava, D.K. 2015b. High frequency organogenesis in hypocotyl, cotyledon, leaf and petiole explants of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), an important vegetable crop. *Physiol Mol Biol Plants*, 21:279–285.
- Kumari, A., Cheemaa G. S. and Munshi, S.K. 2000. A hypocotyl-derived somatic embryogenic system in *Brassica juncea* Czern & Coss and its manipulation for enhanced storage lipid accumulation. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 63:109–120.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I.A. and Elsohly, M.A. 2009. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. an important medicinal plant. *Physiol Mol Biol Plants*, 15:79–86.
- Leroy, X. J., Leon, K., Charles, G. and Branchard, M. 2000. Cauliflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs. *Plant Cell Reports*, 19: 1102- 1107.
- Liu, W., Yang, Y. and Liu, Q. 2018. Establishment of an efficient regeneration system using heading leaves of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) and its application in genetic transformation. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 59:583–596.
- Lloyd, C.W., Lowe, S.B. and Peace, G.W. 1980. The mode of action of 2,4-D in counter-acting the elongation of carrot cells grown in culture. *J Cell Sci*, 45:257–268.
- Manjkhola, S., Dhar, U. and Joshi, M. 2005. Organogenesis, embryogenesis, and synthetic seed production in *Arnebia euchroma* a critically endangered medicinal plant of the Himalaya. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(3): 244-248.
- Mathur J, Ahuja PS, Lal N, Mathur A.K 1989. Propagation of *Valeriana wallichii* DC using encapsulated apical and axial shoot buds. *Plant Science* 60:111–116.

- Martin, A.B., Cuadrado, Y., Guerra, H., Gallego, P., Hita, O., Martin, L., Villalobos, N. 2000. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Science*, 154, 143-151.
- Meyer, H. J., & Van Staden, J. 1995. The in vitro production of an anthocyanin from callus cultures of *Oxalis linearis*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 40(1), 55-58.
- Murashige, T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. and Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities, *Nature*, 403: 853-858.
- Nitsch, J.P. and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85–87.
- Onay, A., Kılınç, F.M. and Yıldırım, H. 2019. Bitki Biyoteknolojisindeki Güncel Yaklaşımlar. Bitki Doku Kültürü, Y. Özden Çiftçi, A. Altınkut Uncuoğlu, Palme Yayınevi, Ankara, ss.73-94.
- Onay, A., Yıldırım, H., Pirinç, V., Tilkat, E., Çiftçi, Y. Ö., Akdemir, H. and Kılınç, F.M. 2012. Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 1(2):11-28.
- Ono, Y., Takahata, Y. and Kaizuma, N. 1994. Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Cell Rep.* 14:13–17.
- Orhan, İ.E., Şenol, F.S., Haznedaroğlu M.Z., Koyu, H., Aslan Erdem, S., Yılmaz, G., Çiçek, M., Yaprak, A.E., Arı, E., Küçükboyacı, N. and Toker, G. 2015. *In vitro* neurobiological evaluation of randomly selected fourteen medicinal and edible plants using high throughput screening assays. The Second Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, pp:508, 22-25 April, Antalya, Turkey.
- Orhan İ, E., Şenol, F.S., Haznedaroğlu, M.Z., Koyu, H., Aslan Erdem, S., Yılmaz, G., Çiçek, M., Yaprak, A., Arı, E., Küçükboyacı, N. and Toker, G. 2016. Neurobiological evaluation of thirty-one medicinal plant extracts using microtiter enzyme assays. *Clinical Phytoscience*, 2: 1-12.
- Özüdoğru, B. 2015. *Ricotia* L. (Brassicaceae) cinsinin filogeni ve filocoğrafyası. D Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 224 s.
- Qin, Y., Li, H.L. and Guo, Y.D. 2006. High frequency embryogenesis, regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and analysis of genetic stability by RAPD. *Sci Hortic*, 111: 203–208.
- Parihar, D.S., Maheshwari, S.C. and Khurana, P. 1995. High frequency somatic embryogenesis and plantlet regeneration from hypocotyls protoplast cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 42: 113—115.
- Pasternak, T.P., Prinsen, E., Ayaydin, F., Miskolczi, P., Potters, G., Asard, H., Van Onckelen, H.A., Dudits, D. and Feher, A. 2002. The role of auxin, pH, and stress

- in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol.* 129: 1807–1819.
- Pattnaik, S.K. and Chand, P.K. 2000. Morphogenic response of the alginate encapsulated axillary buds from in vitro shoot cultures of six mulberries. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 60:177–185.
- Paunescu, A. 2008. Histological investigation of the secondary somatic embryogenesis of *Alyssum borzaeanum* (Brassicaceae). *Phytologia Balcanica*, 14(1):111–117.
- Paunescu, A. 2009. Hormonal regulation of somatic embryogenesis and organogenesis in *Alyssum borzaeanum* Nyár. in vitro Culture System. *Electronic Journal of Biology*, 5 (3): 45–48.
- Pavlović, S., Vinterhalter, B., Zdravković-Korać, S., Vinterhalter, D., Zdravković, J., Cvikić, D. and Mitić, N. 2013. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of cabbage (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 113:397–406.
- Pinto, G., Silva, S., Neves, L., Araújo, C., Santos, C. 2010 Histocytological changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Trees Struct Funct*, 24:763–769.
- Piovan, A., Cassina, G. and Filippini, R. 2011. *Crambe tataria*: Actions for *ex situ* conservation. *Biodivers. Conserv*, 20: 359–371.
- Pintos, B., Bueno, M.A., Cuenca, B., Manzanera, J.A. 2008. Synthetic seed production from encapsulated somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.) and automated growth monitoring. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 95: 217–25.
- Prakash, A.V., Nair, D.S., Alex, S., Soni, K.B., Viji, M.M. and Reghunath, B.R. 2018. Calcium alginate encapsulated synthetic seed production in *Plumbago rosea* L. for germplasm exchange and distribution. *Physiology and molecular biology of plants*, 24(5): 963-971.
- Rai, M.K, Asthana, P., Singh, S.K., Jaiswal, V.S. and Jaiswal, U. 2009. The encapsulation technology in fruit plants a review. *Biotechnol Adv*, 27:671–679.
- Raghavan, V. 2004. Role of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2, 4-D. *Am J Bot*, 91:1743–1756.
- Rajore, S., & Batra, A. 2007. An alternative source for regenerable organogenic callus induction in *Jatropha curcas* L. *Indian Journal of Biotechnology*, 545-548.
- Rates, S.M.K. 2001. Plants as sources of drugs. *Toxicon*, 39: 603–613.
- Ravanfar, S.A., M.A, Aziz, M.A., Kadir, A.A., Rashid and F. Haddadi. 2011. In vitro adventitious shoot regeneration and acclimatisation of *Brassica oleracea* subsp. *italica* cv. Green Marvel. *African J. of Biotech*, 10(29): 5614-5619.
- Redenbaugh, K., Nichol, J., Kossler, M. E. and Paasch, B. 1984. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. *In vitro-Journal of the Tissue*

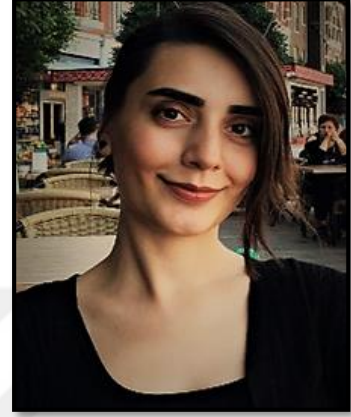
- Culture Association*, (Vol. 20, No. 3, pp. 256-257). 8815 Centre Park Dr, STE 210, Colombia, MD 21045: Soc in Vitro Biology.
- Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Borhidi, A. and Berazain, R. 1999. Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. *Annals of Botany*, 83(1): 29-38.
- Roostika, T.I. and Mariska, I. 2003. *In vitro* culture of pineapple by organogenesis and somatic embryogenesis: Its utilization and prospect. *Buletin AgroBio*, 6: 34-40.
- Saha, S., Sengupta, C. and Ghosh, P. 2014a. Molecular and phytochemical analyses to assess genetic stability in alginate-encapsulated microshoots of *Ocimum gratissimum* L. following *in vitro* storage. *Nucleus*, 57:33-43.
- Sarasan, V.A., Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G. and Rowntree, J.K. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants progress in the past decade. *In Vitro Cell. Develoamental Biol., Plant*, 42: 206-214.
- Saxena, A., Shukla, M. and Saxena, P. 2019. Synthetic Seeds: Relevance to Endangered Germplasm Conservation *In Vitro*. In *Synthetic Seeds*, pp. 21-60.
- Shahzad, A., Sharma, S. and Siddiqui, S.A. 2016. Somatic embryogenesis: a valuable strategy for phyto-climbing diversity conservation. In: Shahzad A, Sharma S, Siddiqui SA (eds) *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers*. Springer, Cham, pp. 195-216.
- Sharma, S., Gambhir, G. and Srivastava, D.K. 2014. High frequency organogenesis in cotyledon and hypocotyls explants of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *Capitata*). *Nat Acad Sci Lett*, 37:5-12.
- Shibli, R. A., Duwayri, M. A., Sawwan, J. S., Shatnawi, M. A., & Al-Qudah, T. S. 2012. Regeneration via somatic embryogenesis of the endangered wild arum (*Arum palaestinum*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(3), 335-340.
- Siong, P.K., Taha, R.M. and Rahiman, F.A. 2011. Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl and leaf explants of *Brassica oleracea* Var. *botrytis* (Cauliflower). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, Vol. 53(1):26-31.
- Srivastava, S., Krishna, R., Sinha, R.P. and Singh, M. 2017. TDZ-induced plant regeneration in *Brassica oleracea* L. var. *botrytis*: effect of antioxidative enzyme activity and genetic stability in regenerated plantlets. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 53(6): 598-605.
- Steward, F.C, Mapes, M.O. and Hears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Growth and division of freely suspended cells. *Am. J. Bot.*, 45: 705-708.
- Tangolar, S.G. and Buyukalaca, S. 2008. Production of Artificial Seeds from Somatic Embryos Obtained from Immature Zygotic Embryos of Vines. *European*
- Taskin, K. M., Turgut, K. and Scott, R.J. 2009. Somatic embryogenesis in apomict *Boechera holboellii*. *Acta Biologica Hungarica*, 60: 301- 307.
- Termignoni, R. R., Wang, P. J., & Hu, C. Y. 1996. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45(2), 129-132.

- Uçar, E., and Turgut, K. 2009. Bazı Dağ Çayı (*Sideritis*) Türlerinin In Vitro Çoğaltımı. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22 (1): 51-57.
- Verma, S. K., Yücesan, B. B., Cingöz, G., Gürel, S., & Gürel, E. 2011. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Digitalis lamarckii*, an endemic medicinal species. *Turkish journal of botany*, 35(6), 689-695.
- Verma, S. K., Sahin, G., Yücesan, B., Eker, I., Sahbaz, N., Gürel, S., & Gürel, E. 2012. Direct somatic embryogenesis from hypocotyl segments of *Digitalis trojana* Ivan and subsequent plant regeneration. *Industrial Crops and Products*, 40, 76-80.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Kyachok, J. and Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 69: 233–249.
- Vondrakova, Z., Eliasova, K., Fischerova, L. and Vagner, M. 2011. The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Cent Eur J Biol*, 6:587–596.
- Wang, J., An, L., Wang, R., Yang, D., Si, J., Fu, X., Chang, J. and Xu, S. 2006. Plant regeneration of *Chorispora bungeana* via somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 42:148–151.
- Williams, E.G. and Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, 57: 443–462.
- Winkelmann, T., Heintz, D., Van Dorsselaer, A., Serek, M. and Braun, H. P. 2006. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. Reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta*, 224(3): 508-519.
- Yang, J.L., Seong, E.S., Kim, M.J., Ghimire, B.K., Kang, W.H., Yu, C.Y. and Li, C.H. 2010. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) root explants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 100:49–58.
- Yıldızhan, Y. 2007. *Brassica nigra* bitkisinin in vitro şartlarda doku kültürü ile çoğaltılması. Yüksek lisans tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 77 s.
- Zavattieri, M.A., Frederico, A.M. and Lima, M. 2010. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electron Biotechnol*, 13:1–9.
- Zenkter., M, Zenkter., E. and Dostatnia., I. 2006. Somatic embryogenesis from broccoli stigmas in tissue culture. *Acta Biol Crac Ser Bot*, 48:121–125.
- Zhang, T., Cao, Z.Y. and Wang., X.Y. 2005. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon and hypocotyls explants of *Eruca sativa* Mill. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 41: 655–657.
- Zych, M., Furmanowa, M., Krajewska-Patan, A., Łowicka, A., Dreger, M. and Mendlewska, S. 2005. Micropropagation of *Rhodiola kirilowii* plants using encapsulated axillary buds and callus. *Acta Biol Crac Ser Bot*, 47:83–87.

ÖZGEÇMİŞ

Melike DEMİR

mlkdmr.03@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2017-2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü , Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2013-2017	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Eskişehir

ESERLER

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1) Ç. AYDOĞAN, E. TURHAN, M. DEMİR, Ö. GÖZ, Role Of Ascorbic Acid In Alleviating Cadmium Stress In Broad Bean., Özet Bildiri, 2nd International Mediterranean Science And Engineering Congress (ımsec 2017), 25 Ekim 2017, 27 Ekim 2017, 707 - 707.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1) S. DOĞAN, M. DEMİR, E. ARI, Biyoremediasyon Uygulamalarında Yeni Yaklaşımlar., Özet Bildiri, 8. Ulusal Bitki Besleme ve Gübre Kongresi, 12-15 Mart 2019, 130.