T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENGEREK OTU (*Echium italicum L.*) BİTKİSİNİN GEÇİCİ DALDIRMA BİYOREAKTÖR SİSTEMLERİ KULLANILARAK KİTLE ÇOĞALTIMI

BÜŞRA KÖKSAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2017

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENGEREK OTU (*Echium italicum L.)* BİTKİSİNİN GEÇİCİ DALDIRMA BİYOREAKTÖR SİSTEMLERİ KULLANILARAK KİTLE ÇOĞALTIMI

BÜŞRA KÖKSAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF.DR.YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE
2017

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MASS PROPAGATION OF *ECHIUM ITALICUM* L. PLANT USING TEMPORARY IMMERSION SYSTEM

BÜŞRA KÖKSAL

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

SUPERVISOR

PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE

2017

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29/06/2017 tarih ve 2017/35 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 19/10/2017 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Büşra KÖKSAL'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Yelda İnden Çiftci

ÜYE : Prof. Dr. Sedef Tunca Gedik

ÜYE : Doç. Dr. Yıldız Aydın

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

.....
Gebze Teknik Üniversitesi
..... Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Bitki kimyasal bileşikleri sentezlendikleri metabolik yol ve fonksiyonlarına göre primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılırlar. Sekonder metabolitler primer metabolitlere nazaran daha kompleks yapıda olma eğilimindedirler. Bu maddeler, çoğu durumda bitkilerde çok az miktarda bulunan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Fakat biyoteknolojik olarak sekonder metabolit miktarının bitki hücre ve organlarında arttırılmaya çalışılmasında biyoreaktör kullanımı en güncel yaklaşımlardandır. Bu kapsamda tezin amacı, ilaç endüstrisinin de ilgilendiği şikonin ve rozmarinik asit gibi çeşitli sekonder metabolitlerin üretildiği engerek otu (*Echium italicum* L.) gibi ekonomik değere sahip yerel bitki kaynaklarının mikroçoğaltımı için uygun besiyeri ve bitki büyüme düzenleyicisi içeriğinin yarı-katı kültür sisteminde belirlenmesi ve optimize edilen besiyeri içeriğinin güncel çoğaltım teknikleri olan sıvı ve geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde denenmesi böylece biyoteknolojik yöntemlerle sürdürülebilirliklerinin sağlanmasıdır. Tez kapsamında öncelikle farklı besi ortamı içerikleri [MS (Murashige ve Skoog besiyeri,1962) ve B5 (Gamborg besiyeri)], sitokinin tipleri [BA (6-benziladenin), TDZ (Tidiazuron), KIN(Kinetin), 2-iP (2-izopentiladenin)] ve miktarları (1, 2, 4 mg 1^{-1}) yarı-katı besiortamında denenmiştir. Engerek otu bitkisine ait gövde uçlarından en yüksek proliferasyon (%100), 1 mg 1^{-1} BA ile desteklenen yarı katı B5 besiortamında elde edilmiştir. Gövde ucu eksplantlarının geçici daldırma biyoreaktör sisteminde sıvı besiortamı ile 24 saatte bir kez 24 dakikalığına temas etmesi (24s/24') ile %100 proliferasyonun elde edilmesinin yanı sıra çoklu gövde oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı artış sağlanmıştır. Geçici daldırma biyoreaktör uygulamaları sonucu vitrifikasyon oluşmamıştır. Oluşan gövdeler de en yüksek köklenme (%100), 2 mg 1^{-1} indol-3-butrik asit (IBA) ile desteklenen yarı-katı besi ortamında sağlanmıştır. Köklenen gövdeler, daha sonra *in vivo* koşullara iklimlendirilmiştir. Geliştirilen mikroçoğaltım tekniklerinin, engerek otunun yer aldığı *Boraginaceae* ailesinde bulunan diğer türlerin de *in vitro* koşullarda çoğaltımı için model oluşturma potansiyeli bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Sekonder metabolit, *in vitro* çoğaltım, mikroçoğaltım, geçici daldırma biyoreaktör sistemleri, *Echium italicum*

SUMMARY

Plant chemical compounds is divided to primer and secondary metabolites according tothe their synthezied metabolic pathway and functions. Secondary metabolites tend to be more complex in regard to primer ones. These metabolites are low molecular weighted compounds that usually exist in relatively lower amounts. In this context, the aim of the thesis concerns the determination of the optimum media and plant growth regulator type and amount in semi-solid media which is followed by assessment of this optimized medium content in temporary immersion bioreactor for the micropropagation of local plant sources like *Echium italicum* L. that produced shikonin and rosemarinic acid secondary metabolites. In the scope of the thesis, initially, different nutrient media contents [MS (Murashige and Skoog nutrient, 1962) and B5 (Gamborg nutrient)], cytokinin types [BA (6-benzyladenine), TDZ (Tidiazuron), KIN (Kinetin),2-iP (2-izopentyladenine)] and amounts (1, 2, 4 mg 1^{-1}) were tested in a semi-solid media. The highest proliferation (%100) was obtained in semi-solid B5 medium supplemented with 1 mg 1^{-1} BA. Body end explants temporary immersion bioreactor system in the liquid feeding environment once every 24 hours up to 24 minutes of contact (24h / 24 ') with %100 proliferation is achieved. As a result of temporary immersion bioreactor applications, no vitrification occurred. Proliferated microshoots showed the highest rooting percentage (%100) in 2 mg 1^{-1} indole-3-butryric acid (IBA) supplemented semi-solid medium. The rooted microshoots were then acclimatized to in vivo conditions. Improved micropropagation techniques, have potential to be used a model for the *in vitro* mass propagation of other other species of the *Boraginaceae* family.

Keywords: Secondary metabolite, *in vitro* proliferation, micropropagation, temporary immersion system, *Echium italicum*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında her zaman her türlü bilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen, teşvik ve özveride bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim sırasında ders aldığım Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı hocalarıma çok teşekkür ederim.

Deney süresi boyunca bana yardımını esirgemeyen Doktora Öğrencisi Hamit Ekin'e, Araştırma Görevlisi Doğa Gümüşel'e, Öğretim Görevlisi Veysel Süzerer'e teşekkür ederim.

Sınırsız destekleri, anlayışları ve sabırları nedeniyle çok sevgili annem, babam ve kardeşime, bu süreçte beni yalnız bırakmayan her daim destek olan sevgili Mustafa Yıldırım'a, ve desteğini hiç esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Müberra Fatma Cesur ve Merve Kutay'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLOLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı ve Literatüre Katkısı	1
1.2. Bitkisel gen kaynaklarının korunma ve kullanımında biyoteknolojik yaklaşımlar	2
1.3. Bitki doku kültürü	3
2. *IN VİTRO* ÇOĞALTIM	5
3. *IN VİTRO* ÇOĞALTIM TEKNİKLERİNDE SIVI KÜLTÜR KULLANIMI	7
4. FARKLI SIVI KÜLTÜR TEKNİKLERİNİN KULLANIMI	9
5. GEÇİCİ DALDIRMA BİYOREAKTÖR SİSTEMLERİ	10
6. ENGEREK OTU (*ECHİUM İTALİCUM* L.)	14
7. LİTERATÜRDE ENGEREK OTU BİTKİSİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
8. GEREÇ VE YÖNTEM	21
8.1. Gereçler	21
8.1.1. Bitki materyali	21
8.1.2. Kullanılan malzemeler	21
8.1.3. Kullanılan cihazlar	23
8.2. Yöntemler	23
8.2.1. Sterlizasyon	23
8.2.2. Tohum çimlenmesi	25
8.2.3. Proliferasyon besiyerinin belirlenmesi	25

8.2.4. Sitokininlerin *in vitro* proliferasyona olan etkilerinin belirlenmesi 27
8.2.5. Proliferasyonun geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde denenmesi 27
8.2.6. Gövdelerin *de novo* köklendirilmesi ve *in vivo* koşullara iklimlendirilmesi 28
8.2.7. Gövde yarı-katı ve biyoreaktör kültürlerin rosmarinik asit üretiminin TLC ile belirlenmesi 39
8.2.8. Sonuçların toplanması ve verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi 30
9. BULGULAR 31
9.1. Proliferasyon besiyerinin belirlenmesi 31
9.2. Sitokininlerin *in vitro* proliferasyona olan etkilerinin belirlenmesi 32
9.3. Proliferasyonun geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde denenmesi 34
9.4. *In vitro* köklenme ve *in vivo* koşullarda iklimlendirme 36
9.5. Rosmarinik asit üretiminin TLC ile belirlenmesi 41
10. TARTIŞMA 43
10.1. Proliferasyon besiortamının belirlenmesi 43
10.2. Optimum sitokinin tür ve miktarının belirlenmesi 44
10.3. Sıvı kültür ortamlarında *in vitro* proliferasyon 44
10.4. *In vitro* köklenme 45
10.5. Rosmarinik asit üretimin TLC ile belirlenmesi 46
11. SONUÇ 47

KAYNAKLAR 48
ÖZGEÇMİŞ 55

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		**Açıklamalar**
ABA	:	Absisik asit
ALA	:	Alfa-linolenik asit
B5	:	Gamborg besiyeri
BA	:	6-benziladenin
dH_2O	:	Distile su
DHA	:	Dokosahekzaenoik asit
DKW	:	Driver ve Kuniyuki tarafından geliştirilen besiyeri
EPA	:	Eikosapentaemoik asit
GLA	:	Gama-linolenik asit
G.O.K.	:	Gövde oluşumu kapasitesi
HIV	:	İnsan immün yetersizlik virüsü
IAA	:	İndol asetik asit
IBA	:	İndol-3-bütirik asit
2-IP	:	2-izopentiladenin
KIN	:	Kinetin
LA	:	Linoleik asit
MS	:	Murashige ve Skoog besiortamı
NAA	:	Naftalen asetik asit
PB	:	Paklobutrazol
PGPR	:	Bitki büyümesini teşvik edici rizobakteriler
PUFA	:	Çoklu doymamış yağ asidi
RAPD	:	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	:	Restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi
SA	:	Salisilik asit
SDA	:	Stearidonik asit
TDZ	:	Tidiazuron
TIS	:	Geçici daldırma biyoreaktör sistemi
TLC	:	İnce tabaka kromatografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
5.1:	Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinden birisi olan RITA biyoreaktör sisteminin genel çalışma prensibi.	10
6.1:	a) Engerek otu bitkisinin sıkı huni şeklindeki taç yaprakları, b) Engerek otu bitkisinin genel görüntüsü.	12
6.2:	*Echium* L. türlerince üretilen şikonin ve alkanin.	14
6.3:	*Echium* L. türlerince üretilen bazı metabolitlerin kimyasal formları.	15
6.4:	SDA‘ nın biyosentezini gösteren yolak.	16
8.1:	a) Engerek otu bitkisine ait kabuklu tohumlar, b) Engerek otu bitkisinin kabuklarından ayrılan tohumlar.	23
8.2:	a) %20’lik domestos içerisinde 20 dakika steril edilen tohumlar, b) Domestostan sonra dH_2O ile durulanan tohumlar, c) Laminar kabin içerisinde filtre kağıt üzerinde kurutmaya bırakılan steril tohumlar.	23
8.3:	TIS kapları ve geçici daldırma biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım.	27
9.1:	Farklı besiortamlarında elde edilen proliferasyon sonuçları, a) B5 + 1 mg 1^{-1} BA, b) MS + 1 mg 1^{-1} BA.	31
9.2:	a) B5 + 1 mg 1^{-1} BA, b) B5 + 1 mg 1^{-1} KIN, c) B5 + 1 mg 1^{-1} TDZ, B5 + 1 mg 1^{-1} 2-iP içeren yarı-katı besiortamlarında gövde uçlarından elde edilen proliferasyon.	34
9.3:	Geçici daldırma biyoreaktör sisteminde elde edilen proliferasyon, a) Sırasıyla $24^s/8$’ süreli, $24^s/16$’ süreli ve $24^s/24$’ süreli daldırma, b) $24^s/8$’ süreli daldırma, c) $24^s/16$’ süreli daldırma, d) $24^s/24$’ süreli daldırma, e) Sırasıyla $24^s/8$’, $24^s/16$’ ve $24^s/8$’ süreli daldırmalara ait gövde uçları.	36
9.4:	Farklı IBA içeriklerinde elde edilen köklenme sonuçları, a) B5 0 ortamı, b) B5 + 1 mg 1^{-1} IBA, c) B5 + 2 mg 1^{-1} IBA, d) B5 + 4 mg 1 mg 1^{-1} IBA,	39
9.5:	Farklı IAA içeriklerinde elde edilen köklenme sonuçları, a) B5 0	40

besiortamı, b) B5 + 1 mg 1^{-1} IAA, c) B5 + 2 mg 1^{-1} IAA, d) B5 + 4 mg 1^{-1} IAA.

9.6: *In vivo* koşullara iklimlendirme aşamaları, a) Köklendirme besi yerindeki köklenmiş bitkiciklerin besiyerinden çıkarılması, su ile köklenmiş bitkiciklerin köklerinin yıkanması ve sularının süzülmesi, b)Bitkiciklerin steril torf içeren viyollere dikilmesi ve sulanması. 41

9.7: Kartlara yüklenmek üzere hazırlanan a) yarı-katı gövde özütü, b) Kök özütü, c) biyoreaktör özütü. 42

9.8: Özütlerin ve rosmarinik asitin TLC görüntüsü. 43

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
5.1:	Geçici daldırma biyoreaktör sistemleri kullanılarak farklı bitki türlerinin proliferasyon çalışmaları	11
6.1:	Ülkemizde yetişen *Echium* L. türlerinin biyolojik özellikleri TÜBİVES	13
7.1:	*Echium L.* bitkisi ile ilgili yapılan çalışmalar	18
8.1:	Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler.	20
8.2:	Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan cihazlar	21
8.3:	Tez çalışmasında kullanılan besiortamları ve içerikleri.	25
9.1:	*In vitro* çoğaltılan engerek otuna aitmikrogövdelerden alınan gövde uçlarının 1 mg $^{-1}$ benzil adenin (BA) içeren farklı besiortamlarında gösterdikleri proliferasyon sonuçları	31
9.2:	*In vitro* çoğaltılan engerek otu bitkisine ait mikrogövdelerden alınan göcde uçlarının farklı miktarlada sitokinin içeren B5 besiortamında gösterdikleri proliferasyon sonuçları	33
9.3:	*In vitro* çoğaltılan engerek otu bitkisine ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının farklı daldırma zamanlarında B5 + 1 mg 1^{-1} BA içeren sıvı besiortamında gösterdikleri proliferasyon sonuçları	54
9.4:	*In vitro* çoğaltılan engerek otu bitkisine ait mikrogövdelerdein farklı miktarlarda oksin içeren B5 besiortamında 4 hafta kültürleme sonucunda elde edilen köklenmeler	38

1. GİRİŞ

1.1. Tezin Amacı ve Literatüre Katkısı

Mikroçoğaltım tekniğinin ekonomik öneme sahip olan *Echium*.L. bitkisinde geliştirilmesi, türün hızlı ve klonal çoğaltımınını sağlamaktadır. Buna ek olarak, *in vitro* proliferasyon tekniklerinin yarı-katı ve sıvı biyoreaktör sistemlerinde denenmesi türün ticari olarak üretilmesinde ve farklı kültür sistemlerinin karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca bitkisel yüksek değerlikli sekonder metabolit üretimi sağlanarak ilaç sanayisine de katkı sağlamaktadır.

Her ne kadar, sekonder metabolitlerin bitkideki görevleri farklılık gösterse de mikrobiyal patojenlere karşı sitotoksik etkili olanlar tıpta "antimikrobiyal madde" olarak kullanılmaktadır [Benli ve Yiğit, 2005]. Herbivorlara karşı etkileri merkezi sinir sistemi üzerine nörotoksik şekilde olup, bunlardan "anti-depresan", sakinleştirici, kas gevşetici olarak ya da anestetik ilaçların eldesinde yararlanılmakta, ayrıca bazılarının yapıca ligandlara, hormonlara, signal transdüksiyon molekülleri veya nörotransmitlere benzerlik göstermesinden dolayı, merkezi sinir sistemi ile endokrin sisteme karşı etkili ilaçların elde edilmesinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda antikanser özelliğinden de ilaç sektöründe faydalanılmaktadır.

Bitki yerine bitki hücrelerinin uygun koşullarda biyoreaktörlerde üretilmesi bitkisel unsurların doğanın sunduğu parametrelerden bağımsız üretimini sağlamaktadır. Dolayısıyla, ikincil metabolitlerin tam bitkiden bağımsız üretimi piyasaya arzda süreklilik sağlar, üretim verimini arttırır ve ikincil metabolitler belirli spesifikasyonlara sahip endüstriyel ürünler niteliğine kavuşmaktadır. Böylelikle *in vitro* bitki kültürleri kavramı ortaya çıkmaktadır. Biyolojik etkileri olan bu kimyasal maddeler, çoğu durumda bitkilerde çok az miktarda bulunan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Fakat biyoteknolojik olarak sekonder metabolit miktarının bitki hücre ve organlarında arttırılmaya çalışılmasında biyoreaktör kullanımı en güncel ve yenilikçi yaklaşımlardandır. Bu kapsamda bu tezin amacı, ilaç endüstrisinin de ilgilendiği sekonder metabolitlerin üretildiği *Echium* L. gibi ekonomik değere sahip yerel bitki kaynaklarının mikroçoğaltımı için uygun besiyeri ve bitki büyüme düzenleyicisi içeriğinin yarı-katı kültür sisteminde belirlenmesi ve optimize edilen besiyeri içeriğinin güncel çoğaltım teknikleri olan sıvı ve geçici daldırma biyoreaktör

sistemlerinde denenmesi böylece biyoteknolojik yöntemlerle sürdürülebilirliklerinin sağlanmasıdır.

1.2. Bitkisel Gen Kaynaklarının Korunma ve Kullanımında Biyoteknolojik Yaklaşımlar

Dünya hiç olmadığı kadar büyük bir hızla değişmektedir. Doğal varlıklar tükenmekte artan nüfus ve kontrol edilemeyen tüketim arzusunun yarattığı baskı gen kaynaklarının geleceğini tehlikeye atarak doğal dengenin bozulmasını da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle insanların başta gıda olmak üzere temel ihtiyaçlarını karşılamasında bitkilerin korunmasının önemi artık daha fazla bilinmekte ve önemsenmektedir.

Biyoteknoloji de süregelen hızlı ve yeni gelişmeler genetik kaynakların insanlığın yararına daha etkili olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Bu farkındalık insan yaşamı açısından oldukça büyük bir öneme sahiptir. Bitkiler, doğadaki diğer canlıların yaşamına sürdürebilmesi için birincil üreticilerdir [Benli ve Yiğit, 2005].

Canlılığın sürdürülebilmesi için oldukça hayati öneme sahip bitkiler ilaç, gıda gibi birçok hammaddenin kaynağı olmakla birlikte, ekolojik dengenin sağlanmasında da önemlidirler. Yapılarında bulundurdukları sekonder metabolitler sayesinde şifa kaynağı olarak gösterilmektedirler. Sahip oldukları bu moleküller sayesinde hem insan sağlığı açısından hem de biyoçeşitlilik açısından oldukça önemlidirler [Balandrin ve Klocke, 1988]. 91 ülke üzerinde dünya sağlık organizasyonu tarafından yapılan bir araştırmaya göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitki miktarı 20.000 kadardır. Bunların 500 civarının üretim için kullanılarak nesilleri kaydedilmektedir [Kırbağ, 1999].

Bitkisel gen kaynakları başta nüfus artışı olmak üzere, sanayileşme, kentleşme, bilinçsiz tüketim ve orman yangınları gibi birçok etkenden ötürü yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır. Bu nedenle bitki türlerindeki artış miktarı dünya nüfus artışıyla doğru orantılı bir şekilde büyüme göstermelidir. Fakat bu artış dünyanın maruz kaldığı biyotik ve abiyotik streslerden ötürü kısıtlanmaktadır. Bu nedenle biyoçeşitliliğin kaynaklarından birisi olan bitki materyallerinin koruma altına alınması çalışmaları her geçen gün önemini arttırarak devam etmektedir [Holt et al., 1993].

Bitki tohumlarının uzun süreli olarak depolanabilmesi, aynı anda çok sayıda örneğin depolanabilmesi, depolama esnasında canlılık kayıplarının az olması gen

kaynaklarının korunmasındaki temel prensipler arasındadır. Fakat bu prensiplere uymayan bitki türlerinin varlığı da söz konusudur. Örneğin; tohumları kurutmaya ve soğukta depolamaya uygun olmayan bitki türleri için uzun süreli depolama söz konusu değildir. Bu nedenle *in vitro* tekniklerin geliştirilmesi bir zorunluluk haline gelmiştir. Yapılan çalışmalar ile yalnızca depolama da değil aynı zamanda bitki ıslah çalışmaları da geliştirilmektedir [Withers, 1994].

Bitki biyoteknolojisi alanının gelişimi ile birlikte, bitki genetik materyallerinin korunmasından bitki doku kültürü teknikleri ile yeni geliştirilen çeşitlerin tarımda kullanılmasına kadar birçok alanda çalışmalar amaçlanmaktadır.

Geliştirilen çalışmalar ile 'RFLP', 'RAPD' gibi moleküler teknikler kullanılarak değişen çevre koşullarına uygun genetik çeşitliliğin belirlenmesi, gen aktarımı teknolojisi ile istenilen özelliklerin bitkilere aktarılmasının sağlanması, bitki ıslah sürelerinin kısaltılması, mikroçoğaltım çalışmalarının kontaminasyon riskini azaltması sebebiyle elde edilen ürünlerin sağlıklı bireyler olması, bitkilerin kısa, orta veya uzun süreli olarak depolanabilmesi, bitki hastalıklarının tanı ve tedavisi gibi amaçlardan faydalanılmaktadır [Simmonds, 1983; Benson, 1999].

1.3. Bitki Doku Kültürü

İn vitro, hücre, aksenik ya da steril kültür olarak da adlandırılan bitki doku kültürü temel ve pratik uygulamaların yapı taşını oluşturan önemli bir alandır. Karmaşık birçok metodu içinde barındıran bitki hücre kültürü teknolojisi, uygun fiziksel ve kimyasal koşullar altında bitki hücre, doku ve organlarının büyütülüp yeni bitki elde edilmesini amaçlamaktadır. Bugüne kadar pek çok bitki türünün, *in vitro* kültür şartlarına aktarımı gerçekleştirilmiştir.

Doku kültürü uygulamaları (1) hücre davranışı, (2) bitki modifikasyon ve gelişimi, (3) patojenden arındırılmış bitkilerin üretimi ve gen kaynaklarının korunması, (4) klonal çoğaltım ve (5) ürün oluşumu başlıkları altında incelenebilir [Thorpe, 1990].

Hücre davranışı başlığı altında hücre bilimi, beslenme, birincil ve ikincil metabolizma ile birlikte morfogenez ve kültür dokularının patolojisi hakkında araştırmalar yapılmaktadır [Thorpe, 1990].

Bitki modifikasyonu ve gelişimi periyodu süresince, geleneksel ıslah çalışmalarına ek olarak, *in vitro* metotlar geliştirilmiştir. Bu teknikler haploid bitkilerin indüklenmesi, cinsel uyuşmazlık sorunun ortadan kaldırılması, intergenik ve interspesifik hibritlerin üretimi için stigma, ovul ya da plasenta üzerinde *in vitro* tozlaşma da kontrollü bir şekilde kullanılmıştır [Yeung et al., 1981].

Patojenlerden bağımsız bitkiler gen kaynakları deposu açısından oldukça büyük bir öneme sahiptir (Thorpe, 1990). Bitkilerin meristem uç kültürü teknikleri ile virüslerden, bakterilerden ve mantarlardan arındırılma çalışmaları 1960'tan beri özellikle virüs enfekte bitkiler için kullanılmaktadır. Çünkü bakteri ve mantar bitkiden başarılı bir şekilde uzaklaştırılabilir [Bhojwani and Razdan, 1983].

Klonal çoğaltım bitkilerin vejetatif çoğaltımı için oldukça yaygın olarak kullanılan uygulamalardan bir tanesidir. Uygulama bütün bitki türleri için kullanılabilmektedir. Fakat hiperhidrisiti gibi çözülmesi gereken problemleri içermektedir [Murashige, 1978; Conger, 1981]. Mikroçoğaltımın sağlanabileceği üç yol bulunmaktadır. Bunlar yan tomurcukların apikal dormansisinin kırılmasını, kallustan doğrudan ya da dolaylı olarak tomurcuk üretimini ve eksplantlar üzerinde doğrudan ya da dolaylı olarak somatik embriyogenezisin uyarılmasıdır [Murashige, 1974; Murashige, 1978].

Bitkilerin ürün oluşturma kapasitelerine bakıldığında, yüksek yapılı bitkilerin endüstri ve farmasötik biyoteknolojinin oldukça ilgi gösterdiği kimyasalları ürettiği görülmektedir. Sekonder metabolit olarak bilinen bu kimyasalların üretimi çeşitli uygulamalarla verimli bir şekilde arttırılabilmektedir [Zenk, 1978].

Doku kültürü uygulamalarına bakıldığında yaygın olarak kullanılan uygulamalardan bir tanesinin de gen transfer tekniği olduğu görülmektedir. 1970'li yılların başlangıcında restriksiyon enzimleri alanındaki çalışmaların gelişmesiyle, doku kültürü de yeni bir araştırma alanına doğru yönelim göstermiştir. Spesifik yabancı genlerin bitki hücrelerine aktarılmasıyla genetik olarak modifiye edilmiş ürünler ortaya çıkmıştır. Aktarılma yöntemlerine bakıldığında *Agrobacterium tumefaciens* bitki genetik mühendisliği alanındaki önemli yöntemlerden bir tanesidir. Aynı zaman da kimyasal yöntemler ve elektroporasyon yöntemi ya da mikroenjeksiyon yöntemi ile de transformasyon gerçekleştirilmektedir [Hiei et al., 1994]. *İn vitro* teknoloji uygulamaları bitki biyolojisi çalışmalarında önemli katkıda bulunmakta ve her geçen gün de gelişimini devam ettirmektedir [Brown and Thorpe, 1995].

2. *IN VİTRO* ÇOĞALTIM

İn vitro çoğaltım; bitki hücrelerinin, dokularının ya da organlarının yapay besi ortamında ve aseptik koşullar altında yeniden bir bitki oluşturma kapasitesi olarak tanımlanabilir. Doğada yaygın olarak bulunmayan ya da kimyasal olarak sentezi zor olan maddelerin sentezlenmesine öncülük etmektedirler. Elde edilmek istenilen bitki örneği çevre kirliliğinden, mikroplardan ve toksinlerden bağımsız olarak ve istenilen zaman da üretilebilmektedir. *İn vitro* çoğaltım tekniğinin bu yönleri daha 1994 yılında besin maddelerinin biyoteknolojik olarak üretimi için FAO (United Nation's Food & Agriculture Organization) tarafından ortaya çıkarılmıştır. *İn vitro* çoğaltım teknolojisine bakıldığında bitkisel kaynaklı bileşiklerin kozmetik ve ilaç endüstrisinde kullanıldığı görülmektedir. Cezayir menekşesinden elde edilen arbutin ağartma ajanı olarak kullanılmakta, porsuk ağacından elde edilen pigment ise antitümör ajanı olarak kullanılmaktadır [Sch and Blum, 2008; Dodds et al., 1985].

Biyolojik olarak bakıldığında bütün bitkiler, potansiyel olarak totipotent yani hücrelerden yine aynı bitkiyi elde edebilecek farklılaşmamış hücrelere sahiptirler. Bitki üzerindeki herhangi bir mekanik hasar kallus oluşumunu indükler. Kallus kültürleri farklılaşmamış hücre gruplarını içermektedir. Kültürler için uygun besiyeri sağlandığında aynı zaman da bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak, hücreler uyarıldığında yetişkin bir bitkinin yeniden üretilmesi sağlanmaktadır. Bu teknik mikroçoğaltım tekniği olarak adlandırılmaktadır [Toso and Melandri, 2009; Toso and Melandri, 2010].

Yeni bitki hücre hattının üretilmesindeki ilk adım, uygun bitki materyalinin seçilmesidir. Yeni hücre hattının oluşturulması için gerekli ve çok önemli olan ikinci adım bitki materyalinin sterilizasyonudur. Sterilizasyonun sağlanmadığı durumlarda bakteri ve küf kontaminasyonu kültür gelişimini durdurmakta ya da yavaşlatmaktadır. Bu durum meristem hücrelerinde kalıcı hasarlara sebep olmaktadır. Steril edilen bitki materyalleri mikroskobik fragmentlere indirgenir ve katı besi yeri içeren petri üzerine yerleştirilir.

Üretimi gerçekleştirilen kallus, düzenli olarak hücre metabolizması için gerekli olan bütün maddeleri içeren besiyerine transfer edilir. Besiyeri karanlık ortamda tutulur böylece kültür fotosentez yeteneğini kaybeder ve heterotrofik organizma davranışını alır. Bu aşama da bitki için gerekli olan organik karbon ve enerji kaynağı

olarak sakkaroz, oksin, sitokin gibi bitki hormonları, vitamin ile makro ve mikro elementler besiyerine eklenerek bitki ile muameleleri sağlanır. Bu şekilde gerçekleştirilen transferler, hücre hattı tek tip hücre şeklini alana kadar devam ettirilir.

Dikkate değer noktalardan bir tanesi elde edilen hücre hattının genetik özelliklerinin değişmemesidir. Kültür koşulları üretilen biyokütlenin hacmi, hücre görüntülenmesi, pH seviyesi, şeker içerikleri gibi rutin ölçümlerin yapılmasıyla kontrol edilmektedir [Dal Toso and Melandri, 2009; Dal Toso and Melandri, 2010]. Uygun koşullar altında gelişimini sürdüren eksplantların *in vitro* çoğaltım aşamasında geldiği son basamaklardan bir tanesi köklendirmedir. Çoğaltımı sağlanan bitki gövdeleri köklenmeyi uyaran bitki büyüme düzenleyicileri içeren farklı bir besi ortamına alınırlar. Burada belirli bir süre köklenme sağlandıktan sonra son olarak iklimlendirme aşamasına geçilir. İklimlendirme basamağı aşamalı olarak gerçekleştirilmelidir. Steril koşullar altında, ihtiyaç duyulan bütün besin içeriklerinin bulunduğu aynı zamanda uygun nem ve ışık düzeyinin sağlandığı bir ortamda yetişen bitkilerin, daha düşük nem, daha yüksek ışık düzeyi ve steril olmayan koşullara sahip ortama aktarılması bitkilerin aktarıldığı ortama uyum sağlayabilmeleri için aşamalı bir süreci gerektirmektedir [Preece and Sutter, 1993].

3. *IN VİTRO* ÇOĞALTIM TEKNİKLERİNDE SIVI KÜLTÜRLERİN KULLANIMI

Mikroçoğaltım patojenden bağımsız bitki türlerinin üretimi için oldukça yaygın olarak kullanılan biyoteknolojik bir yöntemdir. Mikroçoğaltım yöntemlerinin çoğunda katı besiyeri kullanılmaktadır. Bu durum eksplantlar için bazı dezavantajlara sebep olmaktadır. Katılaştırmanın jel ile sağlandığı kültür ortamına yerleştirilen eksplantlar jelden dolayı zamanla kararma göstermektedir. Aynı zamanda besi ortamı, her eksplantın besiyeri ile etkileşim halinde olmamasından dolayı materyaller için heterojen bir ortam sunmaktadır. Katılaştırıcı olarak kullanılan agar, fitojel veya fitoagar gibi maddeler pahalı olup, üretim maliyetini de arttırmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı katılaştırıcı ajanların kullanılmadığı sıvı kültür ortamları tercih edilmektedir. Doku kültürü otomasyonundaki proliferasyonun hızlanması, kesim işlemlerinin ve ayrım işlemlerinin mekanikleştirilmesi gibi gelişmeler biyoreaktörlerdeki sıvı kültürlerin kullanımına bağlıdır [Alper ve ark., 1993]. Etkili ve verimli bir şekilde çoğaltımın sağlanması, proliferasyonun hızlı ve kapsamlı olmasının yanında çoğalma fazı için büyük ölçekli kültürlerin kullanımı gerekmektedir [Ziv, 1991a; Ziv, 1991b; Ziv, 1995b]. Aynı zamanda mikroçoğaltım sürecinin otomasyonu geleneksel yöntemlerin getirmiş olduğu sınırlandırmaları azaltmaktadır [Alper ve ark., 1993; Aitken-Christie et al., 1995; Vasil, 1994]. Sıvı kültür kullanımı ilk olarak Haris ve Mason (1983) tarafından geliştirilmiştir. Ve ilk başarılı bitki rejenerasyonu sonuçları *Solanum tubaresum* ve *Coffee arabicana'*nın somatik embriyolarından elde edilmiştir [Etienne and Berthouly, 2002].

Kitle çoğaltımların verimli bir şekilde gerçekleştirilmesinde sıvı kültürlerin tercih edilmesinin avantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Bedensel iş gücünü azaltır.
- Bitkilerin transfer edilmesinden ziyade kültür ortamının değişmesine olanak sağlar.
- Oldukça maliyetli olan jel kullanımına gereksinim duymaz. Böylece maliyeti düşürür.
- Ticari olarak kitlesel üretime olanak sağladığı için zaman ve mekan yönğnden avantaj sağlar [Ziv et al., 1998].

Biyoreaktörler de bitki büyümesinin ve morfogenezin kontrol edilebilmesi amacı ile atmosfer gazları, oksijen seviyesi, CO_2 değişimi, pH, mineraller, karbonhidratlar, büyüme düzenleyicileri ve sıcaklık gibi kültür koşullarının ayarlanmış olması gerekmektedir.

Biyoreaktörlerdeki atmosfer gazları, bitkilerin spesifik gelişim fazları için oldukça büyük öneme sahiptirler [Akita and Takayama, 1994]. Oksijen seviyesi bitki metabolik aktiviteleri üzerinde etkilidir. Bu seviye bir türden başka bir türe göre farklılık göstermektedir [Cazzulino et al, 1991]. Kültür ortamındaki karbondioksit gereksinimi fotosentez ile ilişkili olmasa da amino asit gibi metabolik yolaklar için gereklidir [Preil, 1991]. Bitki hücrelerinin gelişimi açısından oldukça büyük öneme sahip olan pH, birçok hücre kültürünün başlangıç aşamasında 5.5 – 5.9 gibi bir değer göstermektedir [Jay et al., 1994]. Kültür için kullanılan mineral içeriklerine bakıldığında ise, organik ve inorganik içerikleri düzenlenmiş MS besiyerinin birçok bitki türü için sıvı ya da katı kültürler de kullanıldığı görülmektedir. Mineral içerikleri kültürün fiziksel özelliklerine, bitki biyokütlesinin tür ve büyüklüğüne göre değişiklik gösterebilmektedir. Sıcaklık, pH, ışık, minerallerin konsantrasyonu, besiyeri hacmi gibi faktörler besin içeriklerinin emilim hızını etkilemektedir. Bitki hücrelerinin sıvı kültürler de besiyeri içeriklerini daha iyi absorbe ettiği gözlemlenmiştir [Williams, 1992; Debergh et al., 1994]. Bitki kültürleri enerji kaynağı olarak karbonhidratlara hitiyaç duymaktadırlar. Karbonhidrat kaynağı olarak ise genellikle sukroz, glikoz, fruktoz ya da sorbitol kullanmaktadırlar [Smart and Fowler, 1984]. Yapılan çalışmalar sıvı kültürler de bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımının, bitki hücrelerindeki proliferasyon ve rejenerasyon açısından elde edilen verimin katı besiyerilerine göre daha etkili olduğunu göstermektedir [Ammirato and Styer, 1985]. Son olarak sıcaklık faktörüne bakıldığında, biyoreaktör içindeki sıvı kültürlerin sıcaklık kontrolünün sağlanması bitki gelişimi açısından oldukça büyük öneme sahiptir. Bu kontrolün sağlanması, biyoreaktör içindeki ısıtıcı bir eleman ya da biyoreaktör ile bağlantılı bir şekilde su dolaşımının sağlanması ile gerçekleşmektedir [Akita and Takayama, 1994].

4. FARKLI SIVI KÜLTÜR TEKNİKLERİNİN KULLANIMI

Genel olarak, bitki hücre ve dokuları sıvı besi ortamında kültür edilebilirler. Sıvı besi ortamlarının hücre büyümesinde olumlu etkileri olmasının yanında dezavantajları da bulunmaktadır. Bitki hücrelerinin sıvı besiyerleri ile doğrudan temas halinde olması bitkilerin vitrifiye olmasına (cam haline gelmesine) ve bazı bitkilerin proliferasyonundan çok köklenmesine sebep olmaktadır. Ayrıca mikrobiyal kontaminasyonun kontrolü ve kültürlerin büyütülmesi daha zordur [Ziv et al., 1998].

Sıvı kültür ortamlarının kullanıldığı biyoreaktör sistemlerinin meydana getirdiği bu problemlere çözüm olarak yeni teknikler geliştirilmektedir. Bu tekniklerden bir tanesi, bitki dokularının gelişimini destekleyecek ekonomik bir matriks materyalinin kullanılması olabilir. Başka bir çözüm noktası ise geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin (TIS) kullanımı olabilir [Alvard et al., 1993; Teisson and Alvard, 1995; Adelberg, 2006; Afreen, 2006; Eibl and Eibl, 2006]. Geçici daldırma tekniklerinin kullanımı bitki dokularının düzenli aralıklarla sıvı ile muamelesine, rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesine ve bazı kültür aşamalarının otomatikleştirilmesine imkan sağlamaktadır. Bu biyoreaktör sistemlerinin kullanımı ilk önce ananas bitkisi için geliştirilmiştir [Escalona et al., 1999]. Daha sonra diğer bitki türleri için de rejenerasyon hızını ve bitki örtüsü gelişimini iyileştirdiğini gösteren çalışmalar rapor edilmiştir [Etienne et al, 2002].

5. GEÇİCİ DALDIRMA BİYOREAKTÖR SİSTEMLERİ

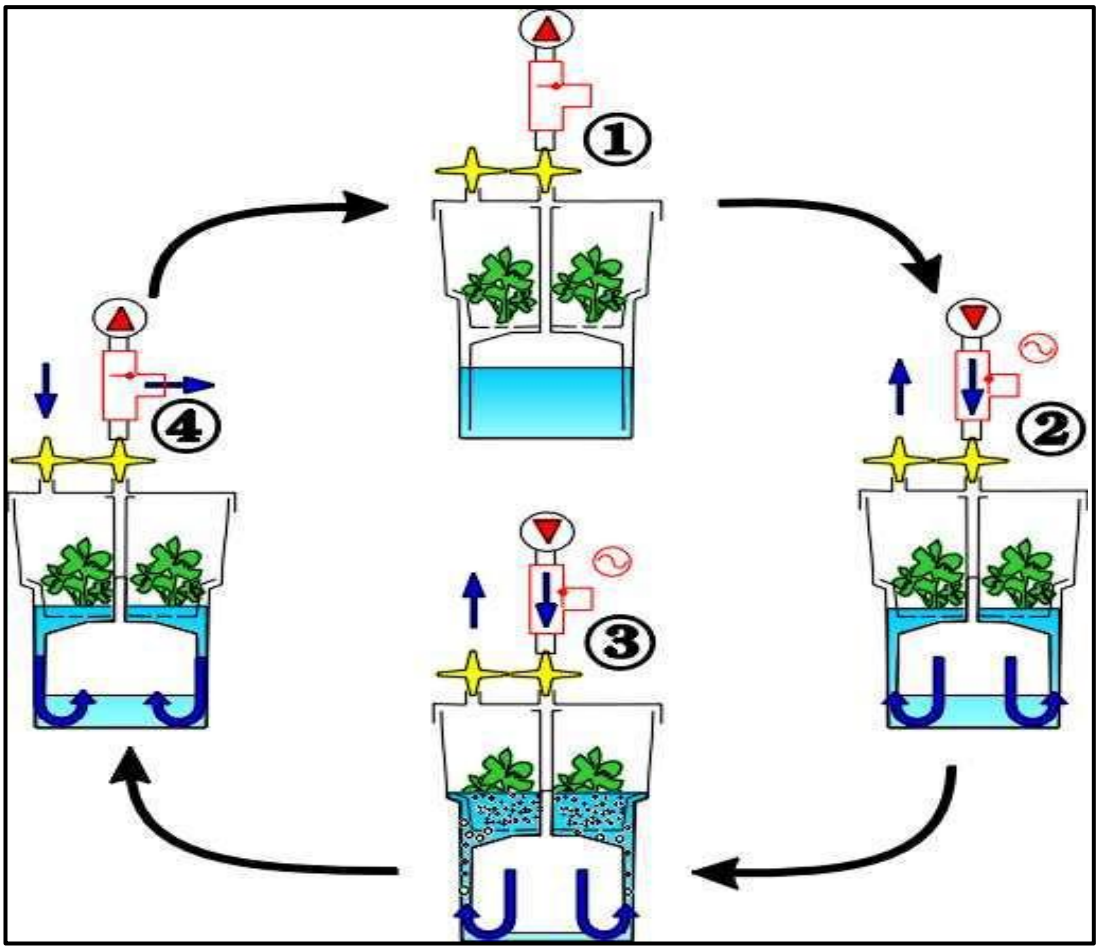
Sıvı kültür ortamlarının kullanıldığı biyoreaktörler de en sık karşılaşılan problemlerden birisi bitkilerin vitrifiye olmasıdır. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek adına geliştirilen biyoreaktör türü, 1980' lerin sonuna doğru geliştirilmiştir. Geliştirilen biyoraktör ekipmanları bitki materyallerinin sürekli kültür ile muamele edilmesinden ziyade belirli aralıklar ile muamele edilmesine imkan sağlamaktadır. Geçici daldırma biyoreaktör sistemleri olarak adlandırılan bu biyoreaktörler ile sağlanan kitlesel bitki üretimleri diğer yöntemlere göre daha ekonomiktir.

Yarı katı ve sıvı kültürün avantajlarını bir araya getiren bir yöntem olan geçici daldırma biyoreaktör sistemleri, Teisson ve arkadaşları tarafından (1995) tasarlanmıştır. Bu sistem ile yapılan ilk çalışma ise 1983 yılında Haris ve Mason tarafından geliştirilmiştir. Kullanılan bitki materyalleri sırasıyla *Solanum tuberosum* ve *Coffee arabicana'*dır [Etienne and Berthouly, 2002]. Bu sistem bitki materyali ile sıvı besiyeri arasında çeşitli zaman aralıklarında etkileşimi sağlayabilen bir imkan sunmaktadır. Etkileşimi sağlayan sistem hava akımıdır. Hava akımı sayesinde ortamdaki sıvı besiyeri eksplantlar ile bir araya gelerek bitki materyallerinin gerekli besini alması sağlanmaktadır. Bu işlem süresince bitki materyalleri herhangi bir zarara uğramadan gerekli besin maddelerini alabilmektedir [Teisson and Alvard, 1995; Etienne- Barry, 1999; Escalona et al., 1999; Espinosa et al., 2002].

Çeşitli türlerin üretimi için elde edilen sonuçlar, bu sisteme dayalı iki biyoreaktör kullanılarak rapor edilmiştir. Bu biyoreaktörlerden birisi olan RITA®; ağırlıklı olarak somatik embriyoların kültürlenmesi için kullanılmakta olup, farklı bitki türlerinde olumlu sonuçlar verdiği rapor edilmektedir. Bu sistem, sıvı ortamı alttaki bir kaptan bitki dokularının içinde bulunduğu üst kısma doğru iten bir hava kompresörü ile çalışmaktadır. RITA® biyoreaktör sisteminin çalışma prensibi, Şekil 5.1' de gösterilmiştir [Teisson and Alvard, 1995]. İkinci biyoreaktör ise 10 litre hacmindeki iki ayrı büyük cam kaptan oluşan ikiz kap sistemidir. Bu kaplardan birisi bitki dokuları diğeri ise sıvı besiyeri için kullanılmaktadır. Sıvı kültür basınçlı hava ile bir kaptan diğerine taşınır [Escalona et al., 1999].

Geçici daldırma kültürü çalışmaları birçok avantajı beraberinde getirmiştir. Eksplantlar oksijen açısından zayıf olan sıvı kültür içerisinde sürekli tutulmayarak

dokulara yeterli oksijen transferi sağlanmaktadır. Ayrıca, mekanik çalkalama ya da sürekli olarak havalandırma olmaması bitki dokularının strese girmesini engellemektedir. Bitkilerin sıvı kültüre dalma süreleri ve sıklıkları değiştirilerek kontrol edilebildiğinden hiperhidrisite sınırlıdır [Etienne and Berthouly, 2002]. Yapılan bazı çalışmalar da ayrıca biyoreaktör sistemlerinin bitki gelişimini arttırdığını ve bitkinin iklimledirilmesi aşamasında daha sağlıklı geliştiğini göstermektedir [Aitken-Christie et al., 1995]. Farklı bitki türlerinin mikroçoğaltımın da kullanılan bu sistem ile çalışılan bitkiler Tablo 5.1' de gösterilmektedir. Bununla birlikte, bu biyoreaktör sisteminin *Echium italicum L.* bitkisinde kullanıldığına dair bir çalışma henüz literatürde bulunmamaktadır.



Şekil 5.1: Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinden birisi olan RITA® biyoreaktör sisteminin genel çalışma prensibi. Bitkiler sıvı besiyeri ile temas etmeyecek şekilde poliüretan köpük disk üzerine yerleştirilir (1). Pnömatik pompa sayesinde yüksek basınca sahip steril hava, sıvı besiyerinin alt kısımdan üst kısma doğru hareketini sağlayarak eksplantların sıvı kültür ortamı ile istenilen süre temasını sağlar (2). Steril hava akışı sürekli olarak çalkalanır böylelikle sıvı kültür ortamındaki havanında yenilenmesi sağlanır (3). Pompanın durması ile engellenen hava basıncı, sıvı kültürün kabın alt kısmına geçmesini sağlar, böylece eksplantlar ile sıvı besiortamının sürekli teması engellenir (4).

Tablo 5.1: Geçici daldırma biyoreaktör sistemleri kullanılarak farklı bitki türlerinin proliferasyon çalışmaları.

Tür adı	Eksplant tipi	Besiortamı	Yöntem	Kaynakça
Ananas comosus	Sürgün	MS+NAA+PB*+BA	Mikroçoğaltım (3 sa 2')	Escalona ve ark., 1999
Crescentia cujete	Nodal segment	MS+KIN	Mikroçoğaltım (3 sa 3')	Murc ve ark., 2004
Eucalyptus	Nodal segment	MS+BA+NAA	Mikroçoğaltım (10 sa 30 sn)	McAlister ve ark., 2005
Fragaria ananassa	Yaprak	MS+TDZ+IBA	Mikroçoğaltım (4 sa 5')	Hanhineva ve ark., 2005
Alocasia amazonica	Gövde	MS+TDZ	Mikroçoğaltım (Günde 4 kez 30')	Jo ve ark., 2008
Ilex dumosa	Nodal segment	MS+BA	Mikroçoğaltım (4 sa 1')	Luna ve ark., 2008
Saccharum spp.	Gövde	MS+BA+PB	Mikroçoğaltım (3 sa 3')	Bernal ve ark., 2008
Theobroma cacao	Embriyojenik kallus	DKW Besiyeri*	Somatik embriyogenez	Niemenak ve ark., 2008
Musa spp.	Sürgün	MS	Mikroçoğaltım (3 sa 4')	Aragon ve ark., 2009
Bactris gasipaes	Zigotik embriyo	MS+ 2IP*	Somatik embriyogenez	Steinmacher ve ark., 2011
Pistacia vera L.	Nodal segment	MS+BA+GA_3	Mikroçoğaltım	Akdemir ve ark, 2014

*PB, paklobutrazol; DKW, Driver ve Kuniyuki (1984) tarafından geliştirilen besiortamı; 2 IP: :2- izopentiladenin

6. ENGEREK OTU (*ECHİUM İTALİCUM L.*)

Yaklaşık olarak 100 cinsi ve 2500 türü ile geniş bir alana yayılan *Echium italicum* L. *Boraginaceae* ailesine ait bir bitki türüdür [Hartman, 1995]. Yaygın bir şekilde engerek otu olarak bilinen *Echium italicum* L. türleri dikenli ve böcekler tarafından döllenen zigomorfik çiçeklere sahip tek yıllık ya da çok yıllık bitkilerdir. Bitkinin yaprakları soluk mavi-eflatun-pembemsi-beyazımsı renklere sahiptir ve yaklaşık olarak 7.5 ya da 9.5 mm uzunlukta huni şeklinde taç yapraklara sahiptir [Edmondson , 1978] (Şekil 6.1 a ve b) Dünya üzerinde yayılım gösterdiği bölgeler Avustralya, Avrupa, Akdeniz Bölgesi ve kuzey batı İran'dır. Türkiye' de sadece *E. orientale* endemik olmak üzere belirlenmiş toplam 8 türü bulunmaktadır (*E. russicum* L., *E. glomeratum* L., *E. italicum* L., *E. vulgare* L., *E. plantagineum* L., *E. angustifolium* L. ve *E. parviflorum* L.) TÜBİVES (2015). Ülkemizde doğal olarak yetişen *Echium* L. türlerinin biyolojik özellikleri Tablo 6.1 ' de gösterilmiştir.

Şekil 6.1: a) Engerek Otu bitkisinin genel görüntüsü, b) Engerek Otu bitkisinin sıkı huni şeklindeki taç yaprakları.

Tablo 6.1: Ülkemiz' de yetişen *Echium* L. türlerinin biyolojik özellikleri TÜBİVES.

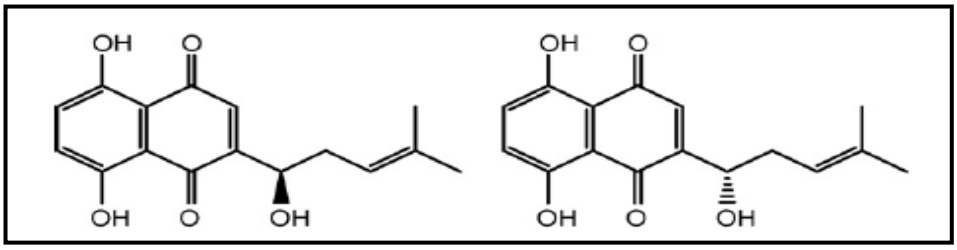
	Ömür	Yapı	Çiçeklenme	Habitat	Yükseklik	Endemik	Element	Türkiye dağılımı	Genel dağılımı
Echium orientale	İki yıllık	ot	6 ya da 7	Fagus ve Abies ormanı açıklıkları ya da çalılık	850-1550	Endemik	Karadeniz	K. Ve komşu karasal Anadolu	Türkiye
Echium russicum	İki yıllık	ot	6 ya da 7	Dağlardaki bozkırlar, tabakalı kayalar	1550-2200	Endemik değil	Avrupa-Sibirya	KB. Ve KD. Anadolu	O. Avrupa,Balkanlar, O. Ve G. Rusya
Echium glomeratum	İki yıllık	ot	5 ya da 7	Tarlalar, yol kenarları, çorak yerler	0-600	Endemik değil	D.Akdeniz	G. Ve komşu Anadolu	B. Suriye
Echium italicum	İki yıllık veya monokarpik	ot	5 ya da 8	Kireçtaşı yamaçlar, tarlalar	0-1950	Endemik değil	Akdeniz	Türkiye	O. Ve G. Avrupa , GB. Asya
Echium vulgare	İki yıllık	ot	5 ya da 9	Piceae ve Abies ormanı, yol kenarları	0-2440	Endemik değil	Avrupa-Sibirya	K. Türkiye	Avrupa, GB. Ve O. Asya
Echium plantagineum	Tek veya iki yıllık	ot	3 ya da 9	Tarlalar, kıyılar, çorak yerler, çimenlik	0-2400	Endemik değil	Akdeniz	Trakya ve Dış Anadolu	B. Avrupa ve Akdeniz Havzası, O. Avrupa, G. Rusya
Echium angustifolium	Çok yıllık	ot	3 ya da 8	Kıyı kumulları, kumlu yamaçlar, makiler	0-870	Endemik değil	D.Akdeniz	Trakya ve Dış Anadolu	K. Afrika, Yunanistan, Ege, Kıbrıs, Filistin
Echium parviflorum	Tek veya iki yıllık	ot	3 ya da 4	Kayalık kireçtaşı, yamaçlar, çimenlik	0-50	Endemik değil	Akdeniz	G.Anadolu	K. Afrika kıyıları ve G. Avrupa, Portekiz, Yunanistan

Ülkemizde "Engerek otu" olarak bilinen *Echium* cinsi bitki, Türkiye' de doğal olarak yetişmektedir. Yaşadığı alanlar ayçiçeği, tek yıllık yem bitkileri, nohut ve buğday tarlalarıdır. Habitatları bu şekilde yayılım gösterdiğinden istilacı bitkiler olarakta adlandırılırlar [Yıldırım ve Ekin, 2003]. Yapılan araştırmalar sonucunda Orta Anadolu Bölgesinde bu bitkinin çeşitli türlerine rastlanmıştır. Çevre ve Orman Bakanlığı verilerine göre bitkinin yaygın olduğu iller sırasıyla Kırklareli, İstanbul, Bursa, Edirne, Samsun, Bolu, Kastamonu, Sinop, Giresun, Erzurum, Çorum ve Ankara olarak belirtilmiştir [Yıldırım ve Ekin, 2003].

Bitkinin kimyasal özelliklerine bakıldığında ise, sahip olduğu kırmızı pigmentli köklerinin özellikle yanık ve yaraların iyileştirilmesinde geleneksel olarak kullanıldığı görülmektedir. Daha önce gerçekleştirilen fitokimyasal çalışmalar, *Boraginaceae* ailesinin yaklaşık 150 türünün köklerinin alkanin ve şikonin gibi naftakinon pigmentlerini içerdiğini göstermiştir. *Echium* L. türlerince üretilen şikonin ve alkanin metabolitlerin kimyasal formları Şekil 6.2' de gösterilmiştir. [Papageorgiou et

al.,1999, 2002, 2006a,b] *Boraginaceae* ailesine ait naftakinon pigmentleri üreten bazı cinsler sırasıyla şunlardır; Lithospermum [Tabata et al., 1974], Onosma [Ozgen ve ark., 2004; Sagratini et al., 2008], Arnebia [Yuan et al., 2006], Alkanna [Assimopoulou ve ark., 2006; Mita et al., 1994] and Echium [Fukui et al, 1983].

Tıbbi bir bitki ailesi olan Boraginaceae ' nın kök epidermisinde yaygın olarak bulunan şikonin ve alkaninler sekonder metabolit olarak bilinmektedirler. Oldukça geniş bir spektrum aktivitesine sahip olan bu farmasötik maddeler; yara iyileşmesi [Papageorgiou et al. 1999, 2006b, 2008], antibakteriyel [Shen et al., 2002], anti-HIV [Chen et al., 2003], anti-tumor [Yoon et al., 1999; Singh et al., 2003] ve antioksidant [Assimopoulou et al., 2004] gibi özelliklere sahiptir.

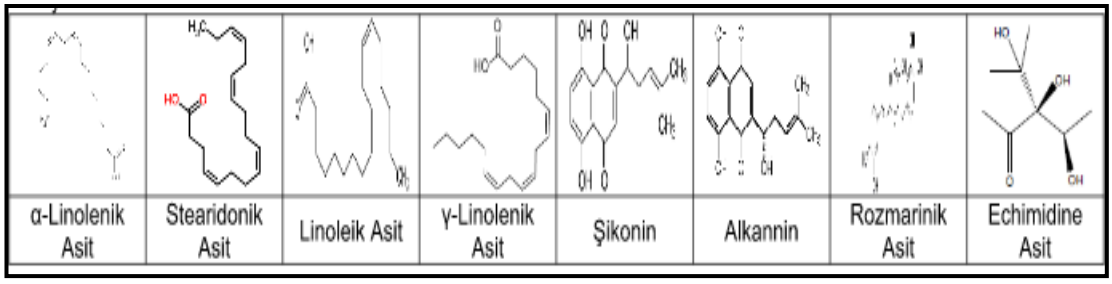


Şikonin Alkanin

Şekil 6.2: *Echium* L. türlerince üretilen şikonin ve alkanin.

Echium L. cinsine ait türlerin bir çoğu, ticari öneme sahip fitoaleksinlerin (rozmarinik asit, şikonin ve alkanin) yanında, önemli çoklu doymamış yağ asitlerinin çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) , alfa-linolenik asit (ALA), stearidonik asit (SDA), linoleik asit (LA), gamma linolenik asit (GLA) üretimini de gerçekleştirmektedir. *Echium* L. türlerince üretilen bazı metabolitlerin kimyasal formları Şekil 6.3' te gösterilmektedir. Sahip olduğu omega-3 ve omega-6 yağ asitleri ile diğer bitki türlerine göre daha büyük öneme sahiptir. Ürettiği metabolitler ile bir çok sektör için değerli olan bitki türü, bal arılarının da tercihleri arasındadır. Yapılan çalışmalarda engerek otundan elde edilen yağın cilt kırışıklıklarını azalttığı, cildi güneş ışınlarının zararlı etkilerinden koruduğu, bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanıldığı, kalp rahatsızlıklarının tedavisinde olumlu sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Şekil 6.4'e bakıldığında alfa-linolenik asitin (ALA), eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosahekzaenoik asit (DHA) sentezindeki ilk metabolitinin SDA olduğu görülmektedir. Bu nedenle engerek tohumunun stearidonik asitçe zengin olması EPA ve DHA sentezi için önemlidir [Guil-Guerrero, 2007] EPA ve DHA' nın ancak balık

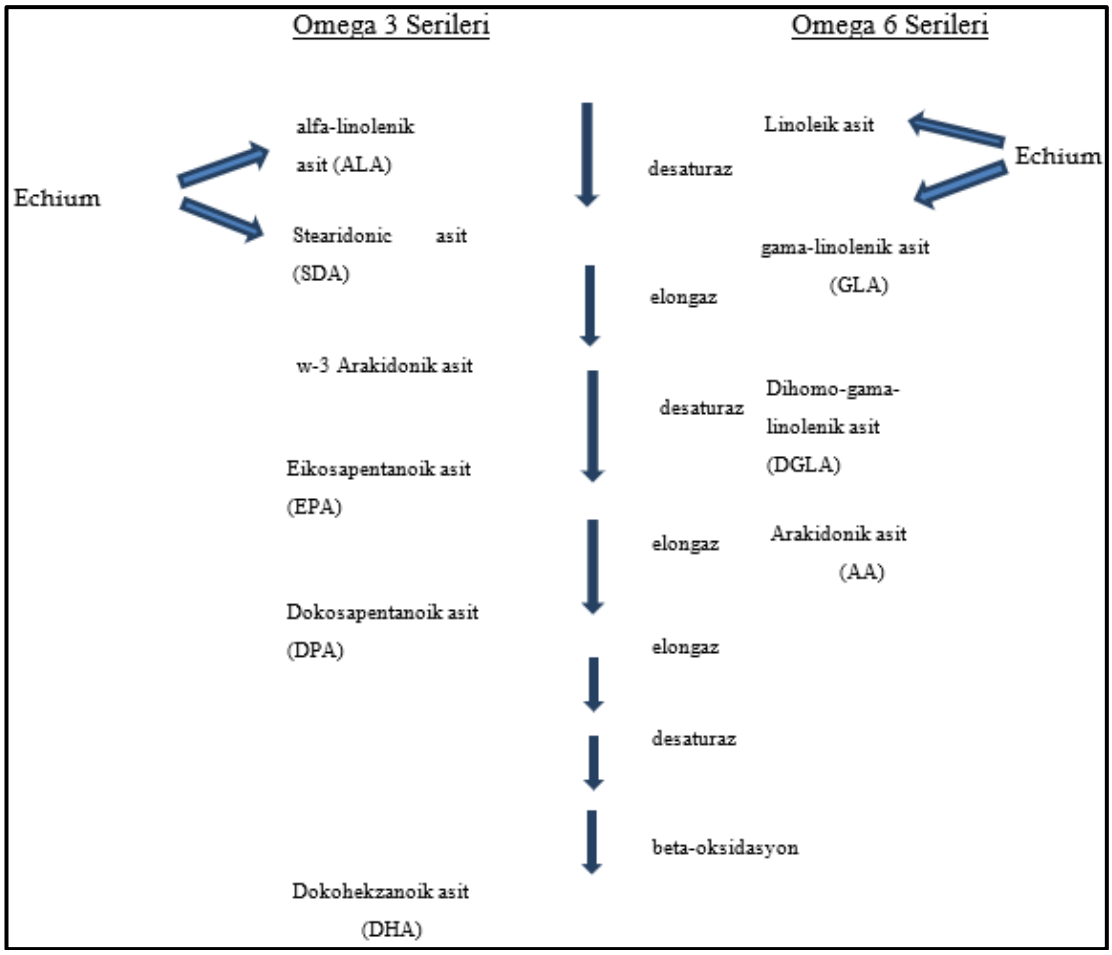
yağlarından direk alımı mümkündür. Bu açıdan bakıldığında SDA, deniz ürünlerinden sağlanan yağ asitlerine alternatif olarak bitkilerden elde edilebilme olanağı göstermektedir [Berti, 2007].



Şekil 6.3: *Echium* L. türlerince üretilen bazı metabolitlerin kimyasal formları.

Echium bitkisinden elde edilen yağ, çoklu doymamış yağ asitlerince zengin olup hayvansal kaynaklara alternatif bitkisel bir kaynak olarak gösterilmektedir. GLA ve SDA yağ asitlerince zengin olması bakımından omega-3 ve omega-6 yağ asitleri için önemli bir kaynaktır. *Echium* bitkisinden elde edilen SDA alımı, göğüs ve kolon kanseri, cilt rahatsızlıkları, kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi birçok hastalığın tedavisinde önemli rol oynamaktadır.

Echium bitkisi ile yapılan çalışmalarda SDA içeriğinin % 3,03 (*E.auberianum*) % 12,9 (*E.plantagineum*) arasında değiştiği ve ortalama % 6,69 gibi bir değere sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca bu çalışmalar GLA yüzdesinin de % 9,15 (*Echium plantagenium*) ile % 26,31 (*Echium callithyrsum*) arasında değiştiğini göstermektedir. GLA ortalama içeriği ise % 20,79' dur [Guil- Guerrero, 2000] *Echium* L.' de SDA oluşumu Şekil 6.4' te gösterilmiştir.



Şekil 6.4**:** SDA‘ nın biyosentezini gösteren yolak.

7. LİTERATÜRDE ENGEREK OTU BİTKİSİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Yağ asitlerinin karasal kaynaklarını oluşturan ve dünya üzerinde geniş bir yayılım göstermekte olan *Boraginaceae* familyasının özellikle *Echium* türlerinden elde edilen SDA üzerindeki çalışmalar , ilk kez 1960'lı yıllarda ortaya çıkmış önemini günümüzde de hala korumaktadır. İnsan sağlığı açısından oldukça büyük öneme sahip olan bu yağ asitleri kalp rahatsızlıkları, cilt hastalıkları, kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır [Clough, 2001].

Hem Avrupa kıtası hem de Akdeniz Bölgesinde çeşitlilik gösteren Boraginaceae ailesinin var olan fakat henüz analiz edilmeyen türleri bulunmaktadır. İkincil metabolitler bakımından zengin olan bu bitki analizleri ile yeni tohum yağlarının araştırılmasına kaynak oluşturulmaktadır.

Bitkisel kaynaklı olan ikincil metabolitlerin üretiminde kullanılacak olan bitkiler çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Bu nedenle *in vitro* kültürlerin kullanılması sağlıklı sonuçları elde edilebilmesi için gereklidir. İkincil metabolitlerin kullanımında bitki materyallerinin tercih edilmesi, bakteri ve memeli hücre sistemlerine göre ekonomik olarak daha uygun ve daha güvenilir olduğundan tercih edilmektedir. Sürgün, kök, kallus ve hücre süspansiyon kültürleri gibi *in vitro* kültürler, SDA gibi önemli yağ asitlerinin üretiminde kullanılmaktadır [Czaplicki, 2009]. İkincil metabolitlerin üretimi esnasında kullanılan bitkiler abiyotik ya da biyotik strese maruz kalabilmektedir. Fakat *in vitro* çalışmalar sayesinde strese maruz kalan bitkilerin savunma mekanizmalarını harekete geçirmek için elisitörlerin, absisik asit (ABA) ve salisilik asit (SA)' in ya da geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin kullanılması ikincil metabolit üretimini arttırmaktadır [Ramachandra, 2002 ; Kumar, 2014; Wilken, 2005; Perez and Alonso, 2008].

Sağlık, gıda, kozmetik gibi birçok endüstriyel alanda kullanılan bu ikincil metabolitlerin üretilmesinde Boraginaceae familyasıda kullanılmaktadır. Engerek otu bitkisine ait tohum, gövde, yaprak gibi kaynaklar kullanılarak yapılan çalışmalar oldukça fazladır. SDA miktarının belirlenmesi, saflaştırılması, saçak kök kültürünün oluşturulması, abiyotik stres uygulanması gibi amaçlarla yapılan çalışmalar Tablo 7.1' de gösterilmektedir.

Tablo 7.1: SDA miktarının belirlenmesi, saflaştırılması, saçak kök kültürünün oluşturulması, abiyotik stres uygulanması gibi amaçlarla yapılan çalışmalar.

Tür	Kaynak	Yapılan çalışma	Sonuç	Referans
*Echium L.*türü (Makaronezy)	Tohum	SDA miktarının belirlenmesi	*E.plantagineum L.* (%36.65 SDA)	Guil-Guerrero vd. 2000
Echium L.türü (Makaronezy)	Yaprak	SDA miktarının belirlenmesi	*E.boissieri L.*(%54.45 SDA)	Guil-Guerrero vd. 2000
Endemik *Echium L.* (Makaronezy)	Tohum	SDA miktarının belirlenmesi	*E.pininana L.*(%8.81 SDA)	Guil-Guerrero vd. 2001
Tür Boraginaceae (Türkiye)	Tohum	SDA miktarının belirlenmesi	*E.italicum L.*(%11.9 SDA)	Erdemoğlu vd. 2004
Tür Boraginaceae (Fas)	Tohum	SDA miktarının belirlenmesi	*Echium humile ssp.Pycnanthum L.*(%16.2 SDA)	Gui-Guerrero vd. 2006
E.vulgare L.(Polonya)	Çiçeklenme sonrası tohum	SDA miktarının belirlenmesi	%10.5 SDA	Stolyhwo ve Mol 2007
Tür Boraginaceae (Türkiye)	Tohum	SDA miktarının belirlenmesi	*E.italicum L.*(%14.59 SDA)	Özcan 2008
E.fastuosum L. E.sabulicola L.(İspanya)	Tohum	SDA miktarının belirlenmesi ve saflaştırma	*E.fastuosumL.* (%11.5 SDA) *E.sabulicola L.*(%6.5 SDA)	Gui-Guerrero vd. 2008
E.vulgare L.(Polonya)	Tohum	SDA miktarının belirlenmesi	*E.vulgare L.* (%12.6 SDA)	Czaplicki vd. 2009
E. acanthocarpum L. (İspanya)	Tohum	Saçak kök kültürü	Yüksek Δ6-desaturaz aktivasyonu	Cequier-Sánchezvd. 2011
3 Tür Boraginaceae (Rusya)	Tohum	SDA miktarının belirlenmesi	*E. vulgare* L. (%5.3 SDA)	Yunusova vd 2012
Tür *Boraginaceae* (Fas ve Tunus)	Tohum	SDA miktarının belirlenmesi	*E.parviflorum* (%17.3 SDA)	Guil-Guerrero vd. 2013
E. acanthocarpum L. (İspanya)	Tohum	Saçak kök kültürü ve abiyotik stres uygulanması	% 60' a kadar SDA miktarında artış	Zarate vd., 2013
E. italicum L. (Türkiye Populasyon	Tohum	SDA miktarının belirlenmesi	%15.48 SDA (Sarıyer örneği)	Özcan,2013

8. GEREÇ ve YÖNTEM

8.1. Gereçler

8.1.1. Bitki Materyali

Tez çalışmasında kullanılan *Echium italicum L.* bitki tohumları Bingöl Üniversitesi Arş.Gör. Veysel Süzerer'den (1.lokasyon: 38º52'59'' Kuzey, 40º52'27'' Doğu, 1200 metre-yükseklik, Bingöl Üniversitesi-Bingöl, Tohumu var ; 2.lokasyon: 38º57'27'' Kuzey, 40º13'46'' Doğu, 1800 metre-yükseklik, Kuruca Geçidi-Bingöl, Tohumu var) temin edildi. Tohumlar kullanılıncaya kadar 4°C' da ve karanlık koşullarda saklandı. Tez kapsamında yapılacak olan tüm çalışmalarda, *in vitro* koşullarda tohumlardan geliştirilen kültürlerden elde edilen gövde uçları ile gerçekleştirildi.

8.1.2. Kullanılan Malzemeler

Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler Tablo 8.1' de sunulmuştur.

Tablo 8.1: Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Adı	Üretici Firma
$(NH_4)_2SO_4$	SIGMA A-3920
$NaH_2PO_4.H_2O$	SIGMA S5515
KH_2PO_4	DUCHEFA 7778-77-0
NH_4NO_3	SIGMA A-3795
KNO_3	SIGMA P-8291
KH_2PO_4	SIGMA P-8416
$Ca(NO_3)_2$	SIGMA C- 2786
$MgSO_4.7H_2O$	SIGMA M-7774
$CaCl_2.2H_2O$	SIGMA C-2536

Tablo 8.1: Devam.

K_2SO_4	SIGMA P- 8541
$MnSO_4.H_20$	SIGMA M-7899
$ZnSO_4.7H_2O$	SIGMA Z-1001
$Na_2MO_4.2H_2O$	SIGMA M-1651
KI	Ridel-de Haen 03124
H_3BO_4.	SIGMA B-9645
$CoCl_2.6H_2O$	SIGMA C 2911
$CuSO_4.5H_2O$	SIGMA C-8027
$FeSo_{4.}7H_2O$	SIGMA F-8263
Na_2EDTA	SIGMA E-6635
L-Glisin	Merck K 27061401
Nicotinic Acid	SIGMA N-0765
Thiamin HCl	SIGMA T-3902
Pyridoxine HCl	SIGMA P-8666
Sukroz	Merck K 31845651
Myo-İnositol	SIGMA I-3011
Agar	SIGMA A-1296
NaOH	Merck I 06462
HC	J.T. Baker 6081
6-Benzil adenin (BA)	SIGMA B-3408
Gibberelik asit (GA_3)	SIGMA G-7645
Kinetin (KIN)	SIGMA K-3378
Indol-3-bütrik asit (IBA)	SIGMA I-5386
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Merck K 31954097
Indol-3-asetik asit (IAA)	SIGMA I-2886
Tidiazuron (TDZ)	SIGMA P6186-25MG
2-izopentiladenin (2-iP)]	DUCHEFA 2365-40-0
Etanol	PROLAB KİMYA

8.1.3 Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan cihaz listesi Tablo 8.2' de sunulmuştur.

Tablo 8.2: Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Cihazın Markası
Hassas terazi	Sartorius BL 2105
Analitik terazi	Sartorius BL 3100
Otoklav	Hirayama HVE-50 Hirayama HVE-51
Bitki büyütme odası	Botes Klima-Taahüt San. ve Tic. Ltd.Şti.
pH metre	WTW pH526
Manyetik karıştırıcı	Schoot Heidolph MR3001
Sterilizatör	SIGMA S-3273
Laminar akımlı kabin	Tekno A.Ş.
İklimlendirme dolabı	WTC Binder
-20 Buzdolabı	Indesit
+ 4 Buzdolabı	Indesit

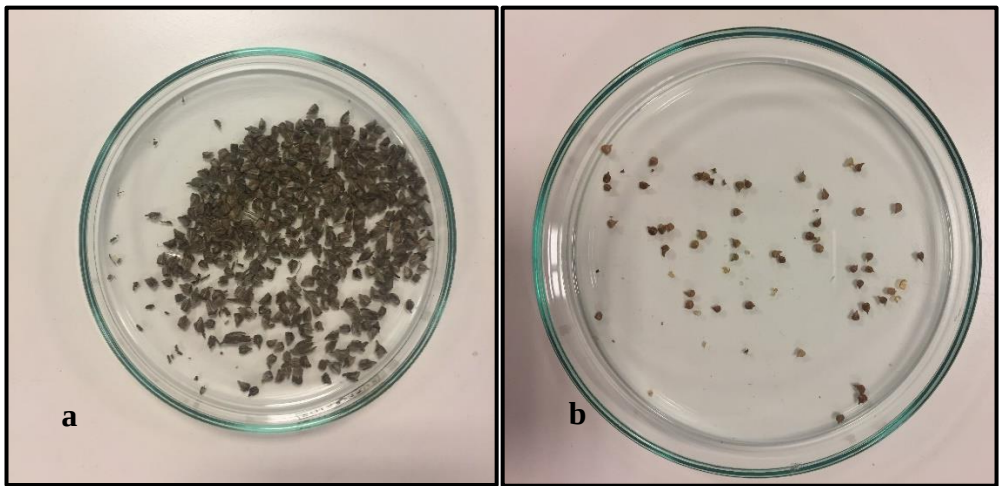
8.2. Yöntemler

8.2.1. Sterilizasyon

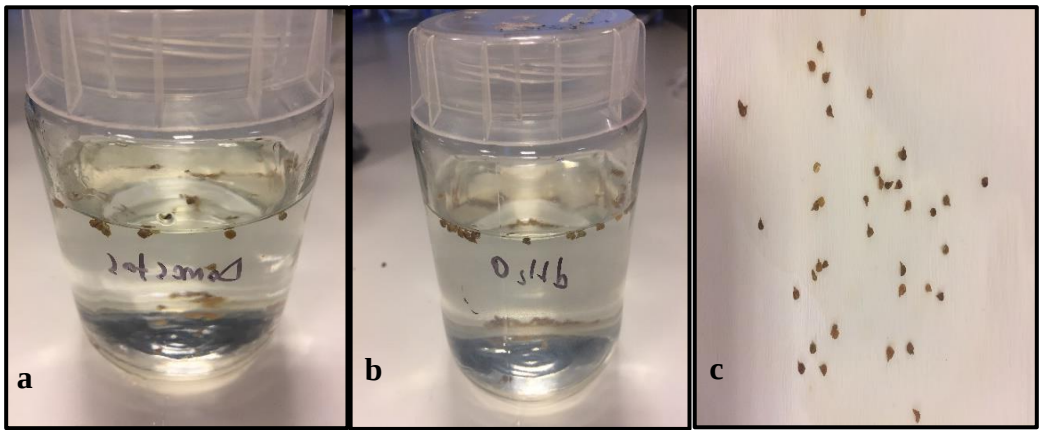
Engerek otu bitkisine ait tohumlar *in vitro* koşullara aktarılmadan önce sterilizasyon işlemlerinden geçirildi. Sterilizasyon işlemlerinde kullanılan kimyasal maddeler ve konsatrasyonları bitkiden bitkiye göre değişiklik göstermekle birlikte, bazı kimyasallar ve derişimleri tohumlara zarar verebildiği için bitki türüne uygun olan kimyasal ve derişimleri çeşitli denemeler yapılarak, tohumun verimliliğini düşürmeden ve tohumda bulunan mikroorganizmaları en etkili şekilde yok eden kimyasal maddeler seçilmeye dikkat edildi. Tez kapsamında tohumların sterlizasyonunu en iyi şekilde sağlayabilmek için tohumlar steril edilmeden önce kabuklarından ayrıldı (Şekil 8.1) ve tohumlar:

- % 20’ lik Çamaşır suyu (Domestos; < %5 NaOCl) ile 20 dakika çalkalandı. (Çalkalama işlemi 100 rpm de gerçekleştirildi.) (Şekil 8.2 a)
- Çamaşır suyu ile muamele edilen tohumlar 4’er kez 5 dakika arayla dH_2O ile durulandı.(Şekil 8.2 b)
- Son yıkamadan sonra tohumlar kurutulmak amacıyla steril kurutma kağıtları üzerinde laminar akımlı kabin içerisinde bekletildi. (30-40 dakika). (Şekil 8.2 c)

Steril filtre kağıtları üzerinde kuruyan tohumlar *in vitro* çimlenme işlemi için petri içersine alınarak, hazırlanan bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besiyerine aktarıldı.



Şekil 8.1: a) Engerek otu bitkisine ait kabuklu tohumlar, b) Engerek otu bitkisine kabuklarından ayrılan tohumlar.



Şekil 8.2: a) %20'lik domestos içerisinde 20 dakika steril edilen tohumlar, b) Domestostan sonra dH2O ile durulanan tohumları, c) Laminar kabin içerisinde filtre kağıt üzerinde kurutmaya bırakılan steril tohumlar.

8.2.2. Tohum Çimlenmesi

Steril edilen *Echium italicum L.* tohumları herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı-katı MS besiortamına aktarılarak çimlenmeleri sağlandı.

8.2.3. Proliferasyon Besiyerinin Belirlenmesi

Sterlizasyon aşamasından sonra çimlenmeye bırakılan tohumlar iki hafta süre ile gözlemlendi. Çimlenme belirtisi olan kök ve gövde oluşumu gözlenen eksplantlar, öncelikle farklı bitki türlerinin çoğaltılması için de kullanılan Murashige ve Skoog adlı bilim adamları tarafından makro ve mikroelementler ve vitamin miktarları formüle edilen yarı-katı MS besiyerine aktarıldı. Buna ek olarak Gamborg besin ortamı olarak bilinen B5 besiyeri de engerek otu bitkisinin *in vitro* proliferasyonu için denendi. Tez kapsamında kullanılan bu besiortamlarının içerikleri Tablo 8.3'de gösterilmiştir.Bu iki besiortamı içerisinden en iyi gövde ucu proliferasyonunu sağlayan besiortamı, daha sonraki aşamaların yürütülmesinde kullanıldı.

Yürütülen çalışmada kullanılan proliferasyon besiyerleri karbon kaynağı olarak 30 gr/l sukroz ve katılaştırıcı olarak 7 gr/l agar içermektedir. Aynı zamanda her iki besiyerine de eşit miktarlar da fitohormon olan BA (6-benziladenin) eklenerek MS+1mg l^{-1} BA ve B5+1 mg l^{-1} BA şeklinde 1'er litre besiyeri hazırlandı. Her iki besiyerinin de pH ölçümü agar eklenmeden önce, B5 besiyeri için 5.5 ve MS besiyeri için 5.8 olacak şekilde ayarlandı. BA yüksek sıcaklıktan etkilenmediği için otoklav

öncesi besiyerlerine eklenerek pH ölçümleri yapıldı. Besiyerleri 121°C' da 20 dakika otoklav ile steril edilmesi sonrası yatay akımlı laminar kabinde steril koşullarda kültür kaplarına döküldü.

Laminar kabin içerisinde steril şartlarda kültür ortamından alınan bitki gövde uçları her vitroventte 4 gövde ucu olup 20'şer adet gövde ucu olacak şekilde aktarım gerçekleştirildi. Her iki besiyeri için de 5 adet vitrovent kullanıldı.

İn vitro proliferasyonun gerçekleşmesi için herbir vitrovent 4 hafta süre ile 22°C ve 3000 lüks ışık şiddetinde 16s aat aydınlık, 8 saat karanlık koşullarında bitki büyüme odasında kültürlendi. 4 haftalık sürenin sonunda ise yine aseptik şartlarda laminar kabin içerisinde eksplantlardan oluşan gövde uçlarının ölçümleri alındı.

Tablo 8.3: Tez çalışmasında kullanılan besiortamları ve içerikleri.

Kimyasallar	MS	B5
$(NH_4)_2SO_4$	0	134 mg
$NaH_2PO_4.H2O$	0	150 mg
NH_4NO_3	1650 mg	0
KNO_3	1900 mg	2500 mg
KH_2PO_4	170 mg	0
$MgSO_4.7H_2O$	370 mg	250 mg
$CaCl_2.2H_2O$	440 mg	150 mg
$MnSO_4.H_20$	16,9 mg	10 mg
Ş$ZnSO_4.7H_2O$	8,6 mg	2 mg
$Na_2MO_4.2H_2O$	0,25 mg	0,25 mg
KI	0,83 mg	0.75 mg
H_3BO_4.	6,20 mg	3 mg
$CoCl_2.6H_2O$	0,025 mg	0,025 mg
$CuSO_4.5H_2O$	0,025 mg	0,025 mg
Demir		
$FeSo_4.7H_2O$	28 mg	28 mg
Na_2EDTA	37 mg	37 mg
Vitamin		
Glisin	2 mg	0
Nikotinik Asit	0,5 mg	1 mg

Tablo 8.3: Devam.

Tiamin HCl	0,1 mg	10 mg
Pridoksin HCl	0,5 mg	1 mg
Sukroz	30 gr	20 gr
Myo-inositol	100 mg	100 mg
Agar	7 gr	7 gr
pH	5,8	5,5

8.2.4. Sitokininlerin *İn Vitro* Proliferasyona Olan Etkilerinin Belirlenmesi

En iyi büyümeyi gösteren gövde ucu eksplantlarının bulunduğu besiortamına, optimum sitokinin tipinin ve derişiminin belirlenebilmesi amacıyla farklı miktarlarda (1, 2, 4 mg l^{-1}) 6-benziladenin (BA), kinetin (KIN), tidiazuron (TDZ) ve 2-izopentiladenin (2-iP) eklenerek, bu sitokininlerin engerek otu bitkisine ait gövde uçlarının proliferasyonuna olan etkileri gözlemlenmiştir. 4 haftalık süreç sonunda elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak engerek otu bitkisinin gövde ucunda en yüksek proliferasyonu sağlayan sitokinin türü ve derişimi belirlenmiştir.

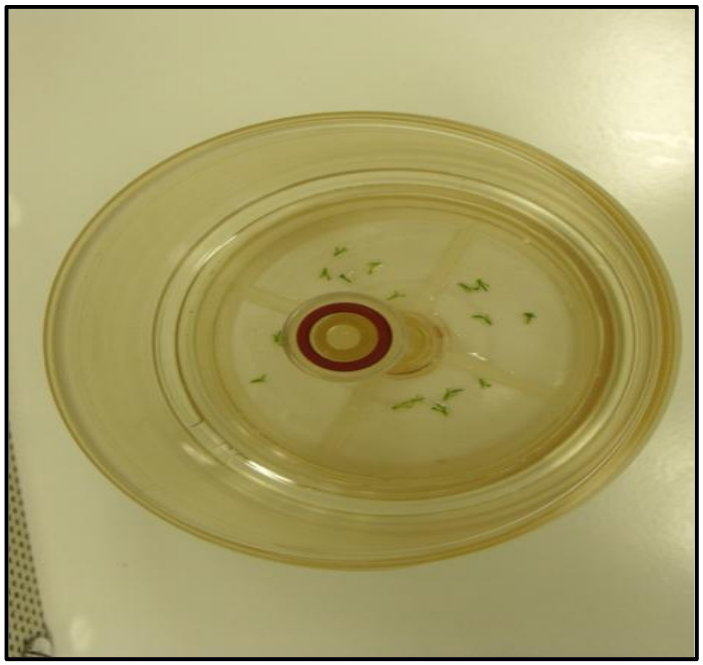
Yapılan araştırma sonucu proliferasyonu en iyi şekilde sağlayan B5 besiyeri içerik olarak değiştirilmeden hazırlanmıştır. Besiyerine aktarılacak olan sitokininlerden TDZ ve 2-iP hormonlarının yapısı yüksek sıcaklıkta bozulduğu için bu hormonlar besiyerlerine otoklavdan önce aktarılmıştır. Bu hormonların sterilizasyonu ise filtre ile gerçekleştirilmiştir. Diğer iki sitokinin olan BA ve KIN ise otoklavdan önce besiyerine aktarılarak, sterilizasyonları sağlanmıştır. Farklı sitokininlere sahip besiortamına aktarılan gövde uçları, aktarım gerçekleştirildikten sonra proliferasyon için 4 hafta süre ile bitki büyütme odasına yerleştirilmiştir.

8.2.5. Proliferasyonun Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemlerinde Denenmesi

Farklı bitki türlerinin mikroçoğaltımında kullanılan geçici daldırma biyoreaktör sistemi, engerek otu bitkisinin *in vitro* proliferasyon çalışmalarında da kullanılmıştır. Bu nedenle optimize edilen besiyeri içeriği agar eklenmeden sıvı olarak hazırlanmıştır. Daha sonra bitki gövde ucu eksplantları aseptik koşullarda biyoreaktöre aktarılmış,

eksplantların besiyeri ile çeşitli temas aralıkları (24 saatte bir kez) ve süre (8, 16, 24 dakika) denenmiştir.

Araştırmanın bu aşamasında kullanılan materyallerin sterilizasyonuna özen gösterilmiştir. TIS kapları otoklavda steril edilmiş, aynı şekilde kullanılan besiortamının da sterilizasyonu sağlanmıştır. Kabin içerisinde gövde uçlarının aktarımı kaplara aktarıldıktan sonra kaplar kapatılmış ve bitki büyütme odasına yerleştirilmiştir. (Şekil 8.3)



Şekil 8.3 : TIS kapları ve geçici daldırma biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım.

8.2.6. Gövdelerin *De Novo* Köklendirilmesi ve *İn Vivo* Koşullara İklimlendirilmesi

İn vitro ortamda çoğaltılan bitki gövde uçları uygun besiyerinde düzenli aralıklarla (her 4 haftada bir) altkültürlendikten sonra *in vitro* köklendirilmeleri için farklı oksin çeşitleri [indol-3-bütrik asit (IBA) ve indol asetik asit (IAA)] ve bu oksin çeşitlerinin farklı miktarları (0, 1, 2, 4 mg l^{-1}) ile muamele edilmiştir. Hazırlanan besiyerleri vitroventlere dökülerek her kap içerisine 10 adet gövde ucu aktarımı gerçekleştirilmiştir. Bitki gövde uçları aktarılan kaplar köklenmenin gerçekleşmesi için 4 hafta süre ile bitki büyütme odasına konulmuştur.

4 haftalık süreç sonunda köklenmenin gerçekleştiği bitkiler, fotosentez yapabilme yeteneklerinin yeniden kazandırılması, ototrof canlı özelliğini kazanabilmeleri amacı ile sera koşullarında iklimlendirilmişlerdir. İklimlendirilmenin gerçekleşebilmesi amacı ile ilk olarak bitkiler *in vitro* koşullardaki besiyerinden arındırılmışlardır. Besiyerinden arındırma işlemi suyla yıkama işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Köklerde şeker bulunması iklimlendirme aşamasında bakterilerin üremesine sebep olacağından yıkama işlemi uygulanmıştır. Yıkama işleminden sonra suları süzülen bitkiler otoklavda steril edilen topraklı saksılara aktarılarak gelişmeleri izlenmiştir. Daha sonra hergün düzenli olarak sulama işlemi gerçekleştirilerek *in vivo* koşullara alışmaları amaçlanmıştır.

8.2.7. Gövde Yarı-Katı ve Biyoreaktör Kültürlerin Rosmarinik Asit Üretiminin TLC ile Belirlenmesi

Yarı-katı besiyeri ve Biyoreaktör sistemleri kullanılarak elde edilen gövde uçları rasmorinik asit varlığının belirlenebilmesi amacıyla TLC yöntemi için hazırlanmıştır. Bu aşamada ilk olarak bitkiler etüvde kurutulmuştur. Daha sonraki aşamalar ise sarasıyla şu şekildedir:

- Yarı Katı Besi Yeri Gövde Özütünün Hazırlanması

Yarı katı besi yerinden alınan gövdeler kurutulduktan sonra toz haline getirilmiştir. 1 gr toz haline getirilen gövde erlen içerisine alınarak üzerine 150 ml metil alkol ilave edilerek 30°C de 90 dakika ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi tamamlandıktan sonra 15.000 rpm de 20 dakika santrifüjlendikten sonra supernatant kısmı alınmıştır. Bu kısmın çözüşü döner buharlaştırıcı ile vakumda 40°C de uzaklaştırılmıştır. Geriye koyu yeşil renkli özüt kalmıştır.

- Biyoreaktör Gövde Özütünün Hazırlanması

Biyoreaktörden alınan gövdeler kurutulduktan sonra toz haline getirilmiştir. 1 gr toz haline getirilen gövde erlen içerisine alınarak üzerine 150 ml metil alkol ilave edilerek 30°C de 90 dakika ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi tamamlandıktan sonra 15.000 rpm de 20 dakika santrifüjlendikten sonra supernatant kısmı alınmıştır. Bu kısmın çözüşü döner buharlaştırıcı ile vakumda 40°C de uzaklaştırılmıştır. Geriye koyu yeşil renkli özüt kalmıştır.

Elde edilen özütlerin içinde rosmarinik asit varlığını tespit etmek için TLC (İnce Tabaka Kromatografi) tekniği kullanılarak silica gel dolgu maddesi içeren TLC kartlarına numuneler ve rosmarinik asit referansı damlatılarak Toluen/etilasetat/formik asit (5/4/1) yürütücü sisteminde yürütülmüştür.

8.2.8. Sonuçların Toplanması ve Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

25°C ± 2°C sıcaklık ve 16 saat aydınlık (3000 lüks) ve 8 saat karanlık koşullar altında 4 hafta kültürleme sonrası her eksplanttan oluşan gövde proliferasyonu (%), eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı ve ortalama gövde boyu (mm) verileri kaydedilmiştir.

Çoğaltımı sağlanan gövde uçlarının köklenmelerini sağlamak için eksplantlar köklenme besiyerine aktarılmıştır. Aktarımdan en az 4 hafta sonra köklenme yüzdesi, gövde başına oluşan kök sayısı ve kök uzunluğu verileri kaydedilmiştir. Her bir deneme en az 10 eksplant ile yapılmıştır.

Veriler değerlendirilirken gövde oluşumu kapasitesi (G.O.K.) indeksi Lambardi ve arkadaşlarının 1993 yılında rapor ettikleri formüle göre;

$$\text{GOK indeksi} = \frac{\text{Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı X Rejenerasyon yüzdesi}}{100} \quad (8.1)$$

hesaplandı.

Elde edilen verilerin değerlendirmesi yapılırken, oransal veriler arasındaki farklılıklar X2 testi ile, üç veya daha fazla yüzdeler arasındaki farklılıklar ise Post hoc çoklu karşılaştırma testine (Marascuilo ve McSweeney, 1977) göre yapıldı. Farklı verilerin karşılaştırılması için, varyans analizleri (ANOVA) takiben ortalamaları karşılaştırmak için $P \leq 0.05$ olacak şekilde anlamlı en az farklılık (LSD) testi kullanıldı.

9. BULGULAR

9.1. Proliferasyon Besiyerinin Belirlenmesi

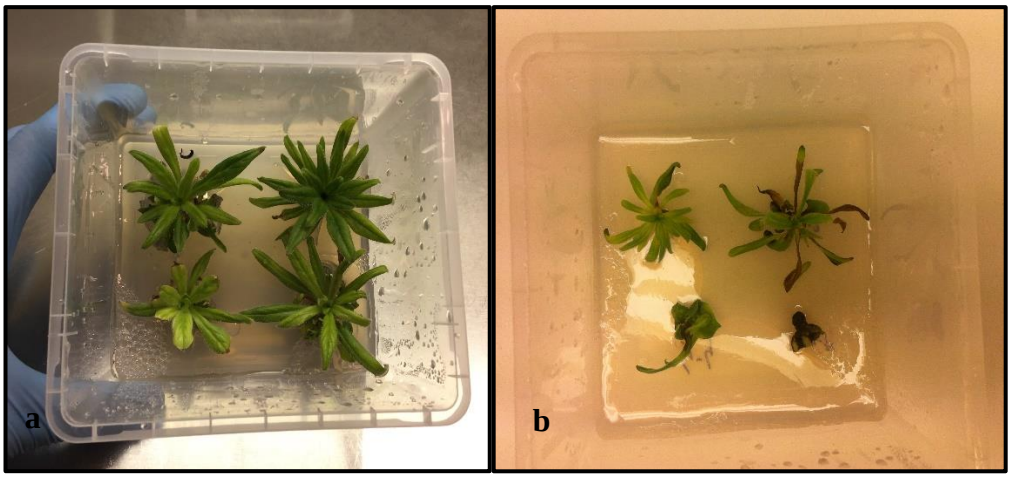
Tez kapsamında engerek otu bitkisinin B5 besiortamında çoğaltılan mikrogövdelerinden alınan gövde uçlarından optimum proliferasyon besiyerinin belirlenebilmesi için farklı makro ve mikro elementleri içeren ve/veya aynı makro ve mikro elementleri farklı miktarlarda içeren (Bkz. Tablo 8.3) MS, B5 olmak üzere 2 çeşit besiortamı denenmiştir. Denenen 2 besiortamında da proliferasyon yüzdesi (Tablo 9.1) ve çoklu gövde oluşumu (gövde/eksplant>1, Şekil 9.1) elde edilirken, eksplant başına en fazla gövde B5 besiortamında sağlanmıştır. İstatistiksel olarak da bu besiortamında elde edilen çoklu gövde oluşumu, denenen MS besiortamında görülen sonuçlardan anlamlı olarak farklılık göstermektedir.

Gövde oluşumu kapasitesi bakımından sonuçlar incelendiğinde en fazla çoklu gövde oluşumunu sağlayan B5 besiortamlarının yine engerek otu bitkisinin proliferasyonu için en uygun makro ve mikro element bileşenlerini içerdiği görülmektedir.

Tablo 9.1: *In vitro* çoğaltılan engerek otuna ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının 1 mg l^{-1} benzil adenin (BA) içeren farklı besiortamlarında gösterdikleri proliferasyon sonuçları[a].

Besiortamı	Proliferasyon[b] (%)	Gövde/Eksplant[b] (Ort±S.H.)[c]	G.O.K. İndeksi[d]	Gövde boyu[b] (Ort±S.H.)[c] (mm)
B5[e]	100 a	1.20±0.09 a	1.20	3.79±0.21a
MS[e]	100 a	1.00±0.00 a	1.00	3.55±0.23a

[a] Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 20 eksplant kullanılarak yapılmıştır.
[b] Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.
[c] SH: Standart hata
[d] G.O.K= Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı x Rejenere olan eksplant yüzdesi / 100 formülü (Lambardi ve ark., 1993) kullanılarak, hesaplanmıştır.
[e] MS: Murashige ve Skoog besiortamı, B5: Gamborg besiyeri



Şekil 9.1: Farklı besiortamlarında elde edilen proliferasyon sonuçları.
a) B5 + 1 mg 1^{-1} BA, b) MS + 1 mg 1^{-1} BA

9.2. Sitokininlerin *İn Vitro* Proliferasyona Olan Etkilerinin Belirlenmesi

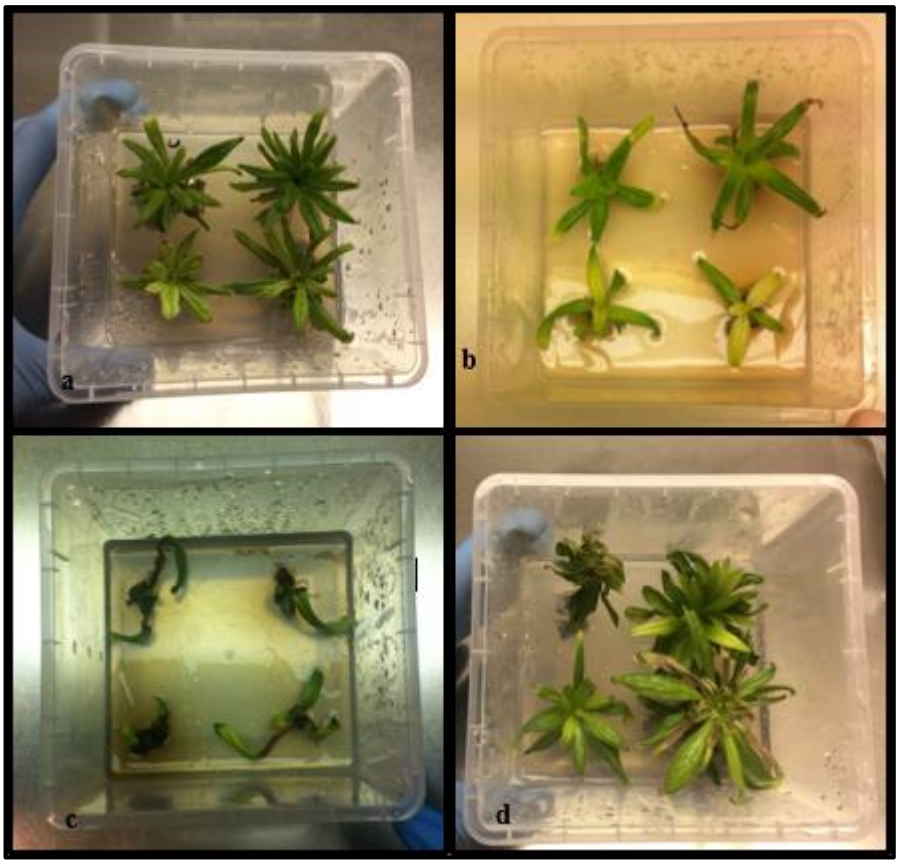
Engerek otu bitkisine ait gövde uçlarının mikroçoğaltımı için B5 besiortamına 4 farklı sitokinin türü (BA, KIN, TDZ ve 2-İp) 3 farklı miktarda (1, 2, 4 mg 1^{-1}) eklenmiştir. 1 mg 1^{-1} TDZ, 2 mg 1^{-1} BA, 4 mg 1^{-1} BA, 2 mg 1^{-1} KIN ve 2 mg 1^{-1} TDZ hariç denenen 4 farklı sitokinin türünde de %100 proliferasyon elde edilmiştir. (Tablo 9.2). Besiortamına eklenen sitokinin türü ve miktarının eksplant başına oluşan gövde sayısında önemli derecede etkileri olduğu görülmüştür. Eksplant başına en fazla gövde oluşumu ve çoklu gövde oluşumu sadece 1 mg 1^{-1} BA besiortamında elde edilmiştir. BA miktarının arttırılması ise proliferasyon sağlanamamıştır. BA haricinde denenen diğer sitokininlerde çoklu gövde oluşumu gerçekleşememiş ve tekli gövdeler oluşmuştur.

Besiortamına BA' nın eklenmesinin çoklu gövde oluşumuna olan olumlu etkisi nedeniyle en fazla gövde oluşturma kapasitesi (1.2) gövde/eksplant oranının en yüksek olduğu 1 mg 1^{-1} BA içeren besiortamında elde edilmiştir (Şekil 9.2). En uzun gövdeler (>6.0 mm) 4 mg l^{-1} KIN içeren besiortamından elde edilmiştir. En kısa gövde ise (3.45 mm) 2 mg 1^{-1} iP içeren besiortamında gözlemlenmiştir. Dolayısıyla oluşan gövdelerin boyları bakımından denenen sitokinin tipleri ve miktarıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır.

Tablo 9.2: *In vitro* çoğaltılan engerek otu bitkisine ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının farklı miktarlada sitokinin içeren B5 besiortamında gösterdikleri proliferasyon sonuçları[a].

Sitokinin	Proliferasyon [b] (%)	Gövde/Eksplant [b] (Ort±S.H.) [d]	G.O.K. [c] İndeksi	Gövde boyu [b] (Ort±S.H.) [d] (mm)
BA[e] (mg 1^{-1})				
1	100 a	1.20 ± 0.09 a	1.20	3.79 ± 0.21 c
2	0.0 c	0.0 ± 0.0 c	0	0.0 ± 0.0 d
4	0.0 c	0.0 ± 0.0 c	0	0.0 ± 0.0 d
KIN [e](mg 1^{-1})				
1	100 a	1.0 ± 0.0 b	1.0	5.85 ± 0.24 a
2	95 b	0.95 ± 0.5 b	0.9	4.85 ± 0.41
4	100 a	1.0 ± 0.0 b	1.0	6.20 ± 0.32 a
TDZ[e](mg 1^{-1})				
2	0.0 c	0.0 ± 0.0 c	0	0.0 ± 0.0 d
2	95 b	0.95 ± 0.5 b	0.9	4.0 ± 0.27 c
4	100 a	1.0 ± 0.0 b	1.0	4.2 ± 0.28 bc
2-İp[e] (mg 1^{-1})				
1	100 a	1.0 ± 0.0 b	1.0	4.85 ± 0.31 b
2	100 a	1.0 ± 0.0 b	1.0	3.45 ± 0.31 c
4	100 a	1.0 ± 0.0 b	1.0	4.70 ± 0.24 b

[a] Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 25 eksplant kullanılarak yapılmıştır.
[b] Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.
[c] G.O.K= Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı x Rejenere olan eksplant yüzdesi / 100 formülü (Lambardi ve ark., 1993) kullanılarak, hesaplanmıştır.
[d] SH: Standart hata.
[e] BA: 6-benziladenin, KIN: kinetin, TDZ: tidiazuron, 2-iP:2-izopentil adenin.



Şekil 9.2: a) B5 + 1 mg 1^{-1} BA, b) B5 + 1 mg 1^{-1} KIN, c) B5 + 1 mg 1^{-1} TDZ, d) B5 + 1 mg 1^{-1} 2-iP, içeren yarı-katı besiortamlarında gövde uçlarından elde edilen proliferasyon sonuçları.

9.3. Proliferasyonun Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemlerinde Denenmesi

Tez kapsamında geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile bitkiler 24 saat boyunca sırasıyla 8, 16 ve 24 dakika olmak üzere 3 farklı sürede besiyeri ile muamele edilmiştir. Sıvı besiortamı ile muamele edilen engerek otu bitkisi gövde uçlarından elde edilen proliferasyon sonuçları, Tablo 9.3' de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, 24 saat boyunca 8 dakika sıvı besiortamı ile temas, %100 proliferasyon sağlarken eksplant başına düşen gövde sayısı 2'dir.

24 saat boyunca 16 dakika sıvı besiortamı ile temas eden gövde uçlarında ise yine %100 proliferasyon elde edilmiş, eksplant başına düşen gövde sayısı ise 2.6'dır.

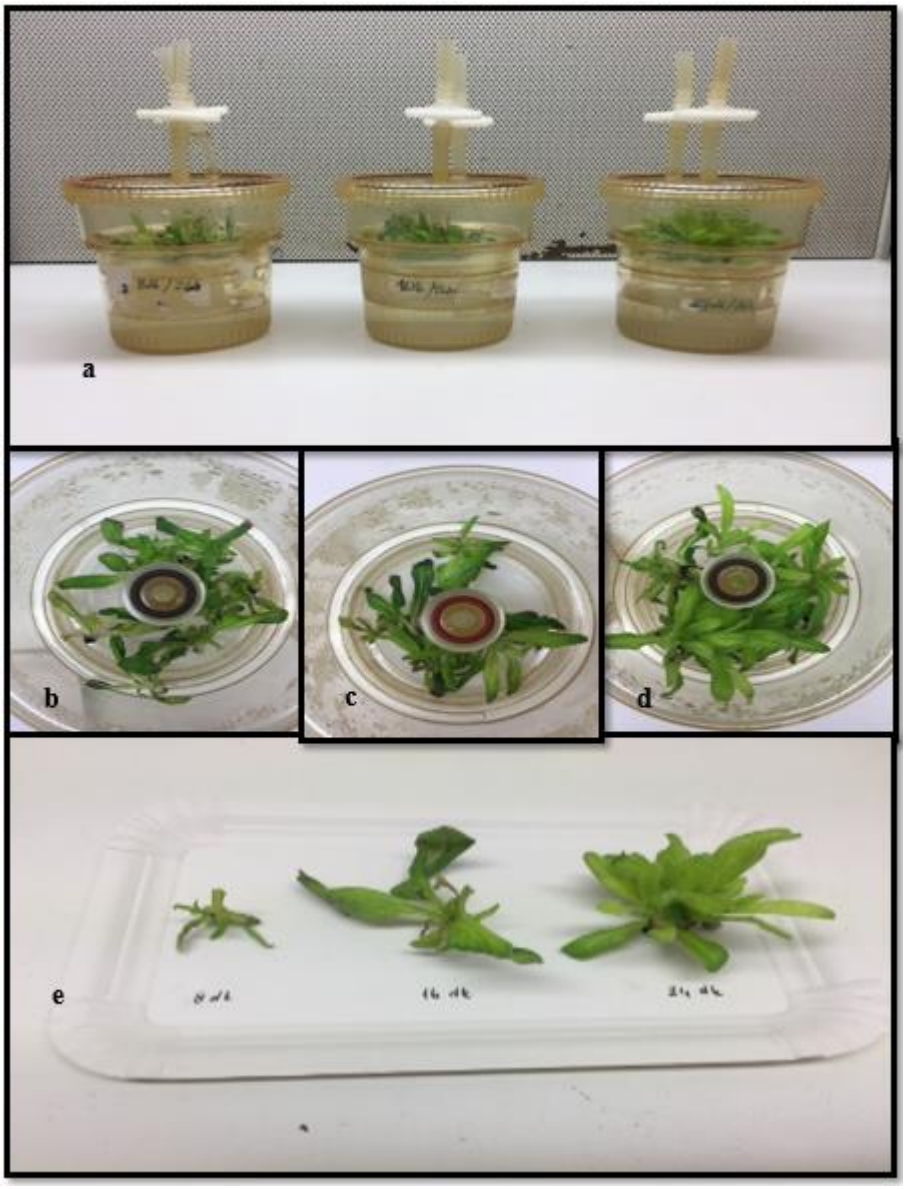
Eksplantların sıvı besiortamı ile temas aralığının 24 dakikaya çıkartılması ile yine %100 proliferasyon sağlanmış fakat eksplant başına düşen gövde sayısı 3.87 ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir.

Sıvı besiortamı ile muamele de 3 farklı süre gövde oluşturma kapasiteleri bakımından karşılaştırıldığında ise gün içerisinde daha uzun aralıklarla sıvı besiortamıyla muamelenin proliferasyon için daha uygun olduğu görülmektedir. Denenen farklı sürelerde elde edilen gövdelerin boyları arasında bir fark bulunmamaktadır. Sıvı besiortamı ile 3.50 mm'den uzun gövdeler elde edilmiştir. En yüksek indeks olan 3.87, en fazla proliferasyon ve eksplant başına gövde oluşumunun görüldüğü 24 dakika sıvı besiortamı ile muamele de elde edilmiştir.

Tablo 9.3: *In vitro* çoğaltılan engerek otu bitkisine ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının farklı daldırma zamanlarında B5 + 1 mg 1^{-1} BA içeren sıvı besiortamında gösterdikleri proliferasyon sonuçları [a].

Daldırma Zamanı	Proliferasyon (%)[b]	Vitrikasyon (%)[b]	Gövde/Eksplant (Ort±SH)[bc]	Gövde Uzunluğu (Ort±SH)[bc] (mm)	G.O.K.[d]
24[s]/8'[e]	100 a	0 a	2.00 ± 0.37 b	3.25 ± 0.29 a	2.0
24[s]/16'[e]	100 a	0 a	2.62 ± 0.49 b	3.33 ± 0.27 a	2.62
24[s]/24'[e]	100 a	0 a	3.87 ± 0.51 a	3.77 ± 0.17 a	3.87

[a] Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme 8 eksplant kullanılarak yapılmıştır.
[b] Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.
[c] SH: Standart hata.
[d] G.O.K= Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı x Rejenere olan eksplant yüzdesi / 100 formülü (Lambardi ve ark., 1993) kullanılarak, hesaplanmıştır.
[e] s, saat; ', dakika.



Şekil 9.3 : Geçici daldırma biyoreaktör sisteminde elde edilen gövde ucu proliferasyonlar,a) Sırasıyla $24^s/8'$ süreli, $24^s/16'$ süreli ve $24^s/24'$ süreli daldırma proliferasyonu, b) $24^s/8'$ süreli daldırma proliferasyonu, c) $24^s/16'$ süreli daldırma proliferasyonu, d) $24^s/24'$ süreli daldırma proliferasyonu, e) Sırasıyla $24^s/8'$, $24^s/16'$ ve $24^s/8'$ süreli daldırmalara ait proliferasyon.

9.4. *İn Vitro* Köklenme ve *İn Vivo* Koşullarda İklimlendirme

Engerek otu bitkisine ait köklenme sonuçlarına bakıldığında kullanılan tüm miktarlar örnekler üzerinde köklenme yüzdeleri farklı da olsa etki göstermiştir. Herhangi bir oksin düzenleyicisi olmayan örneklerde de köklenme görülmüş olsa da (Tablo 9.4), besiyerine IBA veya IAA eklenmesi gövdelerde köklenme yüzdesini arttırmıştır. Denenen IBA (2 mg 1^{-1}) miktarı (%100) en yüksek köklenmeyi

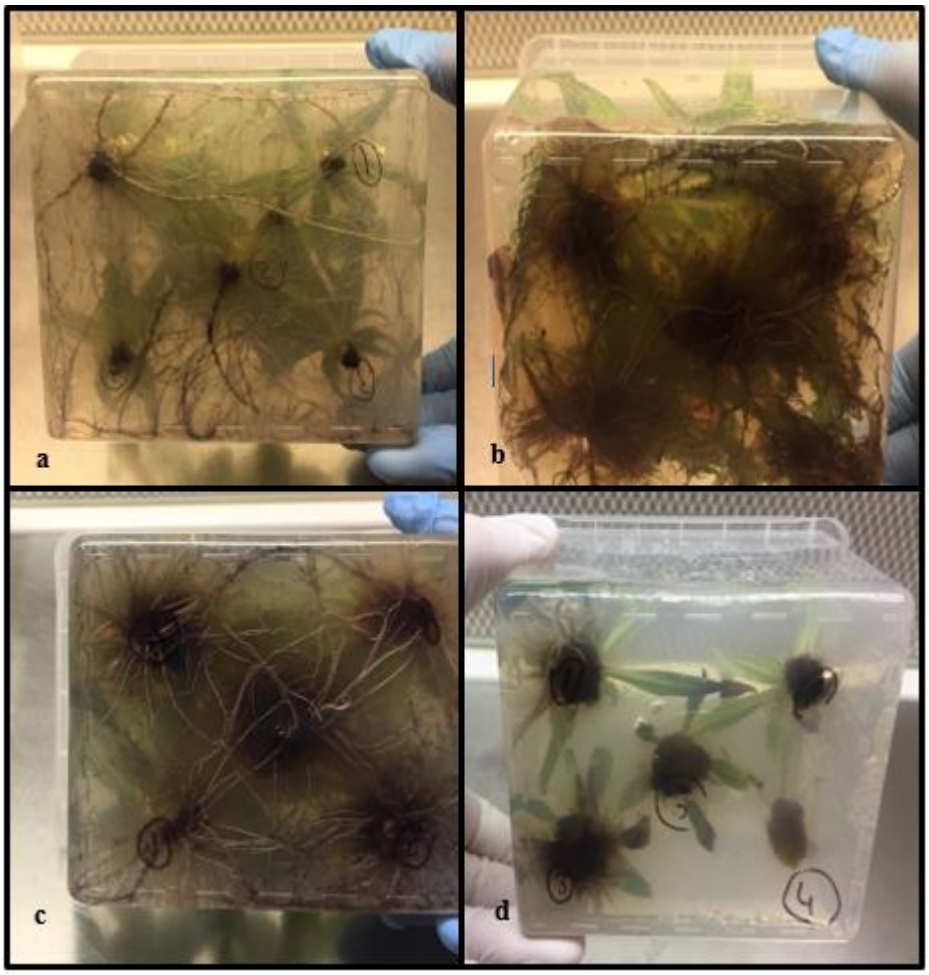
sağlamıştır. Miktarın arttırılması köklenme yüzdesini %80'e düşürmüştür. IBA'dan farklı olarak, düşük miktarda eklenen (1 mg 1^{-1}) IAA ile %100 köklenme sağlanırken, IAA miktarının arttırılması köklenmeyi düşürmüştür.

Gövde başına oluşan kök sayısı bakımından denemeler incelendiğinde kök/gövde oranı en fazla (16.1) besiortamına 2 mg 1^{-1} IBA eklenmesiyle elde edilmiştir. 1 mg 1^{-1} IAA eklenmesi de 15.4 gibi bir sonuçla IBA'ya benzerlik göstermektedir. Fakat IBA varlığında oluşan köklerin daha sağlıklı oldukları gözlemlenmiştir. Köklerin boyları incelendiğinde ise genel olarak 1 ve 2 mg 1^{-1} IAA ile desteklenen besiortamlarında daha uzun kökler (sırasıyla 4.8 ve 5.4 mm) elde edilmiştir. IBA ve IAA ile besiortamının desteklenmesi sonucunda *in vitro* çoğaltılan engerek otuna ait gövdelerde görülen köklenmeler sırasıyla Şekil 9.4 ve 9.5'te gösterilmiştir. Köklenen gövdeler daha sonra in vivo koşullara başarıyla iklimlendirilmişlerdir (Şekil 9.6).

Tablo 9.4: *In vitro* çoğaltılan engerek otu bitkisine ait mikrogövdelerdein farklı miktarlarda oksin içeren B5 besiortamında 4 hafta kültürleme sonucunda elde edilen köklenmeler[a].

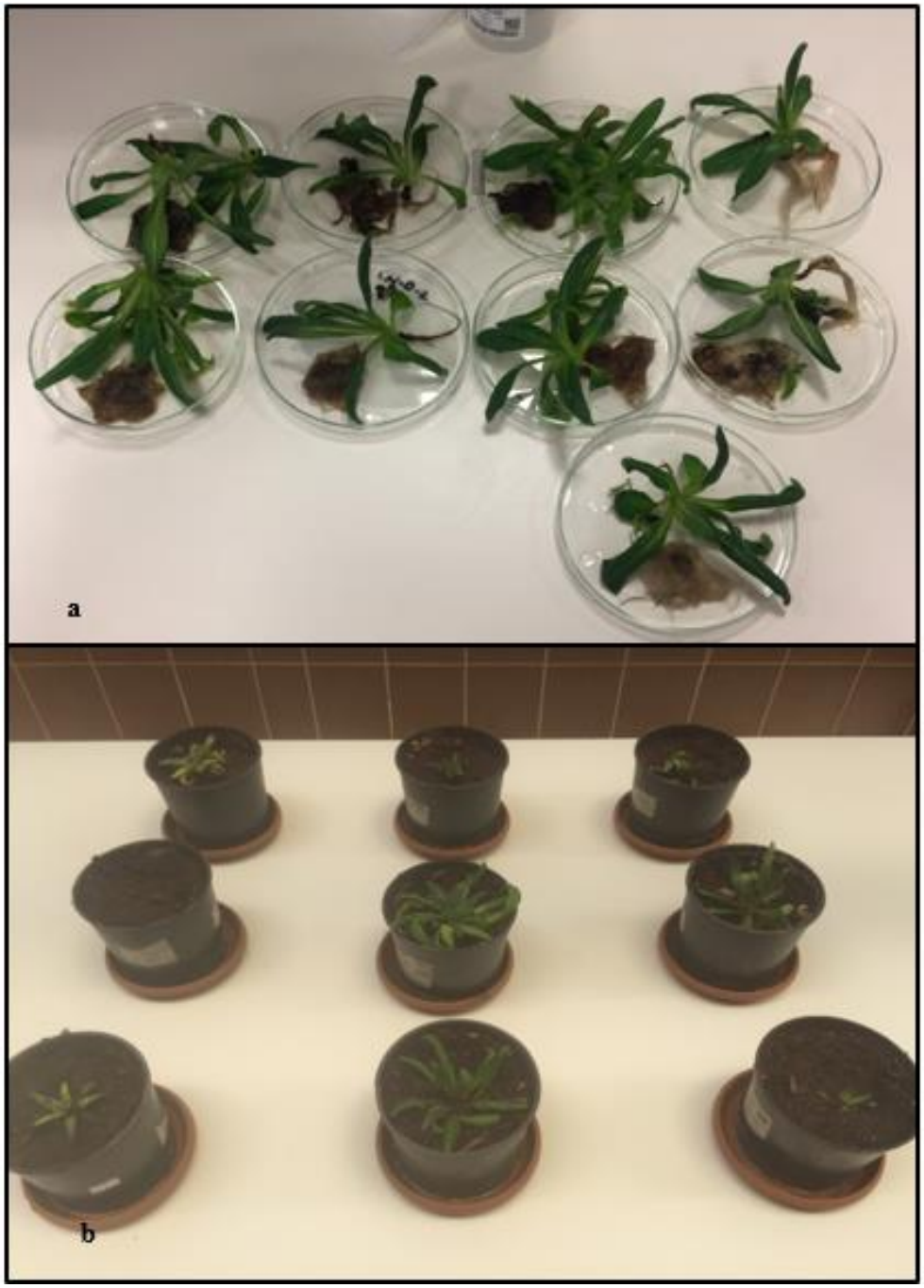
Oksin türü ($mg1^{-1}$)	Köklenme[b] (%)	Kök/Gövde[b] (Ort±S.H.)[c]	Kök boyu[b] (Ort±S.H.)[c] (cm)
IBA			
0	40c	8.60 ± 3.01 d	5.41 ± 0.51 a
1	100a	14.7 ± 1.21 b	3.27 ± 0.15 c
2	100 a	16.1 ± 0.9 a	3.75 ± 0.13 c
4	80b	11.4 ± 3.25 cd	2.76 ± 0.12 d
IAA			
0	40c	4.5 ± 1.96 e	3.70 ± 0.51 c
1	100a	15.4 ± 2.10 a	4.80 ± 0.29 b
2	100a	13.7 ± 1.03 b	5.40 ± 0.19 a
4	80b	7.6 ± 2.21 d	4.70 ± 0.30 b

[a] Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 10 eksplant kullanılarak yapılmıştır.
[b] Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.
[c] SH: Standart hata.



Şekil 9.4: Farklı IBA içeriklerinde elde edilen köklenme sonuçları, a) B5 0 besiortamı, b) B5 + 1 mg 1^{-1} IBA besiortamı, c) B5 + 2 mg 1^{-1} IBA besiortamı, d) B5 + 4 mg 1^{-1} IBA besiortamı.

Şekil 9.5: Farklı IAA içeriklerinde elde edilen köklenme sonuçları, a) B5 0 besiortamı, b) B5 + 1 mg 1^{-1} IAA besiortamı, c) B5 + 2 mg 1^{-1} IAA besiortamı, d) B5 + 4 mg 1^{-1} IAA besiortamı.

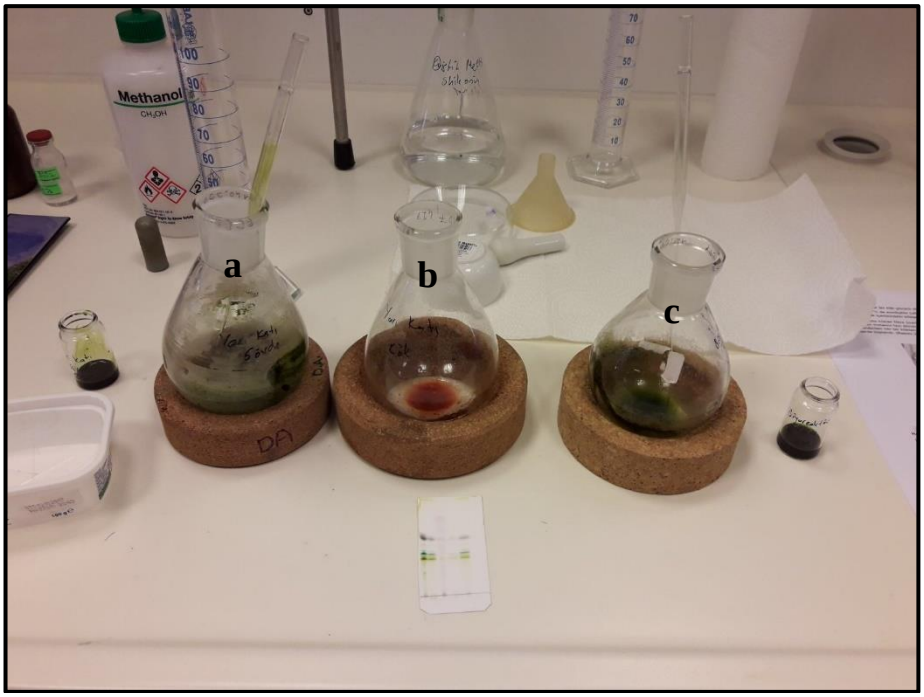


Şekil 9.6: *In vivo* koşullara iklimlendirme aşamaları, a) Köklendirme besiyerindeki köklenmiş bitkiciklerin besiyerinden çıkarılması, su ile köklenmiş bitkiciklerin köklerinin yıkanması ve sularının süzülmesi, b)Bitkiciklerin steril torf içeren viyollere dikilmesi ve sulanması.

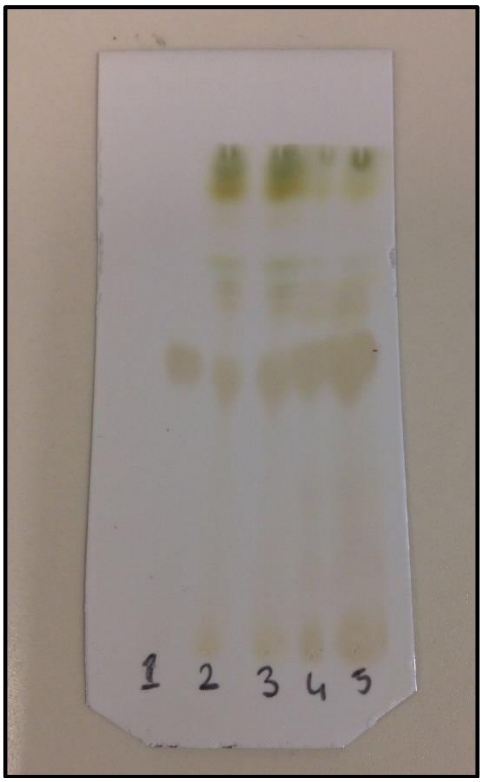
,

9.5. Rosmarinik Asit Üretiminin TLC ile Belirlenmesi

Elde edilen özütlerin içinde rosmarinik asit varlığını tespit etmek için TLC (İnce Tabaka Kromatografi) tekniği kullanılarak silika jel dolgu maddesi içeren TLC kartlarına numuneler ve rosmarinik asit referansı damlatılarak Toluen/etilasetat/formik asit (5/4/1) yürütücü sisteminde yürütülmüştür. Kartlara yüklenmek üzere hazırlanan özütler Şekil 9.7' de gösterilmiştir. Elde edilen TLC kartının aşağıda resmi verilmiştir (Şekil 9.8). TLC görüntüsü incelendiğinde elde edilen özütlerin rosmarinic asit içerdiği görülmektedir. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında bu özütler içerisindeki rosmarinic asit izole edilerek saflaştırılacak ve saflığı çeşitli kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle tespit edilecektir.



Şekil 9.7: Kartlara yüklenmek üzere hazırlanan, a) yarı-katı gövde özütü, b) Kök özütü, c) biyoreaktör özütü.



Şekil 9.8: Özütlerin ve rosmarinic asitin TLC görüntüsü, (1) rosmarinik asit referansı (R), (2) yarı katı özüt, (3) R +yarı katı özüt, (4) biyoreaktör özüt, (5) R+biyoreaktör özüt.

10. TARTIŞMA

10.1. Proliferasyon Besiortamının Belirlenmesi

Eksplantların *in vitro* koşullarda büyüyebilmesi için kullanılan besiortamına bitki için gerekli olan makro ve mikroelementlerin ve vitaminlerin uygun bileşen ve miktarlarının eklenmesi gerekmektedir. Bitkiler çoğu zaman tütün bitkisi için kullanılan MS besiortamında proliferasyon sağlasa da, her bitki türünün kendisine uygun besiortamı belirlenmelidir. Bu nedenle tez kapsamında engerek otu bitkisi için azot içerikleri farklı olan MS ve B5 besiortamı kullanılmıştır.

Şimdiye kadar yapılan *in vitro* çalışmalarda engerek otu bitkisi için B5 besi ortamı kullanılmıştır [Özcan, 2000]. Tez kapsamında engerek otu bitkisine ait çalışmalarda en iyi proliferasyonu sağlayan besiortamının B5 olduğu görülmüştür.

Bitki örneğinin aynı besiortamında uzun süreli olarak çoğaltılmasI proliferasyonunu olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle, *in vitro* ortamda yapılan çalışmalarda oluşturulan mikrogövdelerin proliferasyonunda azalma görüldüğünde besiortamının içeriğinin ve bitki büyüme düzenleyicilerinin miktarlarının değiştirilmesi gerekmektedir. Tez kapsamında eksplantlara bakıldığında örneklerin B5 besiortamında daha yüksek proliferasyon göstermektedir. Besiortamlarının içeriklerine bakıldığında ise B5 besiortamının daha düşük sukroz ve azot içeriği olduğu görülmektedir. MS besiortamında KNO_3'e ek olarak, NH_4NO_3' te azot kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca B5 besiortamının vitamin içerikleri MS besiortamına göre daha fazladır dolasıyla örneklerin vitamine daha çok ihtiyaç duydukları görülmektedir.

10.2. Optimum Sitokinin Tür ve Miktarının Belirlenmesi

İn vitro ortamda çoğaltılan birçok bitki oksin ve sitokinin içerikli besiortamlarında yetiştirilmektedir. Oksin ve sitokinin türevlerinin bitki gelişimine olan etkileri birçok çalışmada rapor edilmiştir [Rout ve Jain, 2004]. Oksin ve türevlerinin eksplant üzerinde gövde oluşumunu etkilediği birçok çalışmada gösterilmiştir [Rout et al., 2006]. Çalışmalar incelendiğinde tez kapsamında 4 farklı sitokinin engerek otu bitkisinin mikroçoğaltımına etkisine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre proliferasyonu en iyi sağlayan bitki büyüme düzenleyicisi bir adenin türevi olan 1 mg 1^{-1} BA'dır. Bu bitki düzenleyicisinin birçok süs bitkisi ve odunsu bitki üzerinde kullanıldığı rapor edilmiştir.

Besiortamına 2-iP eklenmesinin gövde uzamasına olan olumlu etkisi engerek otu bitkisinin gövdelerinde olduğu gibi *Elliottia racemosa* [Woo ve Wetzstein, 2008] bitkisinde de gözlenmiştir. Besiortamına 1 mg 1^{-1} TDZ, 2 mg 1^{-1} BA ve 4 mg 1^{-1} BA' nın eklenmesi en düşük gövde/eksplant oranını verdiğinden bu bitki büyüme düzenleyicilerinin engerek otu bitkisine ait gövde uçlarında gövde oluşturma kapasiteleri de düşüktür (0,0,0).

10.3. Sıvı Kültür Ortamlarında *İn Vitro* Proliferasyon

In vitro çoğaltım teknikleri ile yapılan son çalışmalara bakıldığında sıvı kültürlerinin kullanımının oldukça arttığı görülmektedir. Uygun besiortamı içeriği, gerekli olan sukroz miktarlarının belirlenmesi, gerekli miktarlarda uygun bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımı bitki proliferasyonun sağlanması için yarı-katı besiyerilerinde kullanıldığı gibi sıvı kültürlerde de kullanılmaktadır [Ziv, 1989; Ilan et al., 1995; Park et al., 2000].

Yapılan *in vitro* çalışmalarda gövde uçlarının daha hızlı büyümesinin ve çoğalmasının sağlanması için kullanılan koşullar bitki yapısını fizyolojik olarak etkilemekte ve anormal bitkilerin oluşmasına sebep olmaktadır. Özellikle sıvı besiortamında kullanılan bitkilerin yarı-katı besiyeri ile kültüre alınan bitkilere göre fizyolojik, morfolojik ve anatomik olarak anormalliklere daha yatkındırlar. Bu anormalliklerin tamamı hiperhidrisite olarak adlandırılmaktadır ve rejenere olan bitkilerde değişik oranlarda camsılaşmaya sebep olmaktadır [Ziv et al., 1987].

Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde eksplantların sıvı ile teması sürekli değildir. Süreklilik yerine belirli zaman aralıklarında sıvı besiyeri ile temas edilen bitkilerin proliferasyonu daha sağlıklıdır. Ayrıca geçici daldırma biyoreaktör sistemleri bitki büyümesi sırasında yüksek havalandırma imkanı sağlayarak mikroçoğaltımın daha verimli olmasını sağlamaktadır. Eksplantların sıvı besiortamı ile temas sıklığı ve daldırma süresi proliferasyonu etkilemektedir. Bu farklılık bitkiden bitkiye göre farklılık göstermektedir. Uzun süreli ve sık daldırma bitkide vitrifikasyona sebep olmaktadır [Etienne and Berthouly,2002; Etienne et al., 1997]. Engerek otu bitkisi ile yapılan çalışmada ise sıvı kültür ortamında hiperhidrisite sorunu tespit edilmemiştir.

Yapılan tez çalışmasında engerek otu bitkisine ait gövde uçlarının farklı daldırma periyotlarında sıvı besiortamı ile temas ettirilerek, geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin bitki gövde uçlarının proliferasyonuna olan etkisi incelenmiştir. Tez kapsamında geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile bitkiler 24 saat boyunca sırasıyla 8, 16 ve 24 dakika olmak üzere 3 farklı sürede besiyeri ile muamele edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda vitrifikasyon gözlenmemiştir. Elde edilen sonuçlara göre en iyiproliferasyon denenen en uzun süreli daldırma süresi ile gerçekleştirilmiştir. 24 saatte 24 dakika sıvı besiortamı ile muamele edilen bitkilerden %100 proliferasyon sağlanmış olup, eksplant başına düşen gövde sayısı 3.87 ile oldukça yüksektir. Bitki gövde uçlarının sıvı besiortamı ile uzun süreli etkileşimi proliferasyonu olumlu yönde etkilemiştir.

10.4. *İn Vitro* Köklenme

Bitki büyüme düzenleyicileri eksplantlarda hücreden hücreye iletişimi sağlayan temel yapıtaşlarıdır. Bitkiler büyüme ve gelişimlerinin sağlanabilmesi için ihtiyaçları olan bu temel maddeleri kendileri üretmektedirler. Genel anlamda doğal olarak bitkilerde sentezlenen, büyüme ve buna bağlı diğer fizyolojik olayları kontrol eden, meydana geldiği yerden bitkilerin diğer kısımlarına taşınarak taşındığı bölgelerde de etkin olabilen, çok az konsantrasyonlarda bile etkisini gösterebilen organik moleküllere hormon (fitohormon-bitki büyüme düzenleyicileri) adı verilmektedir [Öktüren ve Sönmez, 2005]. Bitki büyüme düzenleyicilerinden bir tanesi de oksinlerdir. Bitkide organize olan oksinler apikal dominansinin sağlanmasının yanısıra

kök oluşumunu da etkilemektedir [Tamas, 1995]. Tez kapsamında iki farklı oksinin (IBA ve IAA) *in vitro* çoğaltım çalışmalarına etkisi incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre denenen IBA (2 mg 1^{-1}) miktarı (%100) en yüksek köklenmeyi sağlamıştır. Miktarın arttırılması köklenme yüzdesini %80'e düşürmüştür. IBA'dan farklı olarak, düşük miktarda eklenen (1 mg 1^{-1}) IAA ile %100 proliferasyon sağlanırken, IAA miktarının arttırılması köklenmeyi düşürmüştür. Yapılan çalışmanın sonucuna göre IBA'nın IAA'ya göre daha fazla gövde başına kök oluşturmuştur.

10.5. Rosmarinik Asit Üretiminin TLC ile Belirlenmesi

TLC'nin açılımı aslında "thin layer chromatography" olup, Türkçe'ye ince tabaka kromatografisi olarak geçmiştir. Bildigimiz gibi kromatografi maddelerin ayrılması icin kullanılan metottur. TLC; maddelerin ayrılması, herhangi bir karışımın kaç bileşenden oluştuğunun bulunması ve maddelerin kalitatif analizleri icin sıkça kullanılan bir metotdur. Çünkü çok kolay, hızlı ve maliyeti çok azdır. Elde edilen özütlerin içinde rosmarinik asit varlığını tespit etmek için TLC (İnce Tabaka Kromatografi) tekniği kullanılarak silika jel dolgu maddesi içeren TLC kartlarına numuneler ve rosmarinik asit referansı damlatılarak Toluen/etilasetat/formik asit (5/4/1) yürütücü sisteminde yürütülmüştür. TLC görüntüsü incelendiğinde elde edilen özütlerin rosmarinic asit içerdiği görülmektedir.

,

11. SONUÇ

Engerek otu bitkisine ait gövde uçlarının *in vitro* proliferasyonu için yarı-katı ve sıvı besiortamlarının denendiği tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- Engerek otu bitkisine ait gövde uçları daha az azot ihtiyaç duyduğu görülmektedir. B5 besiortamının içeriğine bakıldığında azot kaynağı bakımından MS besiortamına göre daha az içeriklidir. Yine B5 besiortamı sukroz bakımından yine MS'e göre daha düşük miktarda sukroz içermektedir. Engerek otu bitkisin daha düşük miktarda azot ve sukroz ile daha iyi proliferiye olmaktadır. B5 besiortamı engerek otu bitkisinin yüksek proliferasyonu için uygundur.
- Denenen 4 farklı sitokinin içinde engerek otu bitkisinin *in vitro* proliferasyonunu en iyi sağlayan bitki büyüme düzenleyicisi bir adenin türevi olan BA'dır. 1 mg 1^{-1} BA ile muamele edilen besiortamında %100 proliferasyon sağlanırken, eksplant başına yaklaşık 1.2 gövde elde edilmiştir.
- Geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak sıvı besiortamının engerek otu bitkisi üzerindeki proliferasyon etkisine bakılmak üzere 3 farklı periyotlarla bitkilerin sıvı kültür ile muamelesi incelenmiştir. Gövdelerin hiçbirisinde vitrifikasyon gözlemlenmemiştir.
- Elde edilen sonuçlara göre en vermli proliferasyon denenen en uzun süreli daldırma ile gerçekleştirilmiştir. 24 saatte 24 dakika sıvı besiortamı ile muamele edilen bitkilerden %100 proliferasyon sağlanmış olup, eksplant başına düşen gövde sayısı 3.87 ile oldukça yüksektir.
- Elde edilen sonuçlara göre denenen IBA (2 mg 1^{-1}) miktarı *in vitro* çoğaltılan gövdelerde en yüksek köklenmeyi sağlamıştır.
- Elde edilen TLC görüntüsü incelendiğinde elde edilen özütlerin rosmarinik asit içerdiği görülmektedir.

KAYNAKLAR

Adelberg J. W., (2006), ‘’Agitated thin-films of liquid media for efficient micropropagation’’, Plant Tissue Culture Engineering, 103-117.

Afreen F., (2006), ’’Temporary immersion bioreactor engineering considerations and applications in plant micropropagation’’, Plant Tissue Culture Engineering, 189-202.

Aitken-Christie J., Jones C., (1987), ’’Towards automation: radiata pine shoot hedges in vitro’’, Plant Cell Tissue Organ Culture, 8, 185-196.

Aitken-Christie J., Kozai T., Takayama S., (1995), ‘’Automation in plant tissue culture. General introduction and overview’’, Plant Cell Tissue Organ Culture, 165-177.

Akita, M., Takayama S., (1994), ‘’Induction and development of potato tubers in a jar fermentor’’, Plant Cell Tissue Organ Culture, 36, 177-182.

Alper Y., Young R. E., Adelberg J. W., Rohdes B. B., (1993), ‘’Mass handling of watermelon microcutting’’, African Journal of Biotechnology, 16, 3782-3788.

Alvard D., Cote F., Teisson C., (1993), ‘’Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation: Effects of temporary immersion of explants’’, Plant Cell Tissue Organ Culture, 32, 55-60.

Ammirato P. V., Styer D. J., (1985), ‘’Strategies for large scale manipulation of somatic embryos in suspension culture’’, Biotechnology in plant science, 161-178.

Aragon C. E., Escalona M., Rodriguez R., Cañal M. J., Capote I., Pina D., González-Olmedo J., (2009), ‘’Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors’’, In Vitro Cellular Developmental Biology, 342-345.

Assimopoulou A. N., Boskou D., Papageorgiou V. P., (2004), ‘’Antioxidant activities of alkannin, shikonin and Alkanna tinctoria root extracts in oil substrates’’, Food Chemistry, 87,433–438.

Assimopoulou A. N., Karapanagiotis I., Vasiliou A., Kokkini S., Papageorgiou V. P., (2006), ‘’Analysis of alkannin derivatives from Alkanna species by high-performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry’’, Biomedical Chromatography, 20, 1359–1374.

Balandrin M. J., Klocke J. A., (1988), ‘’Medicinal, aromatic and industrial materialsfrom plants’’, Biotechnology in Agriculture and Forestry.Medicinal and Aromatic Plant, 3-36.

Benli M., Yiğit N., (2005),’’ Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (Thymus vulgaris) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi’’, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 3, 1-8

Benson E. E., Wilkinson M., Todd A., Ekuere U., Lyon J. (1999), “Development competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips”, CryoLetters, 17, 119-128.

Bernal A., Machado P., Cortegaza L., Carmona E. R., Rivero O., Zayas C. M., Odalis N., Perez A., Santana I., Arencibia A. D., (2008),’’ Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by Temporary Immersion Bioreactors (TIBS)’’, Sugar Technology, 10, 42-47.

Berti M., Johnson B. L., Dash S., Fischer S. Wilckens R., Hevia F., (2007), ‘’Echium: a source of stearidonic acid adapted to the northern great plains in the US in Issues in New Crops and New Uses’’, Sugar Technology, 120-125.

Bhojwani S. S., Razdan M. K., (1983), ‘’Plant tissue culture: Theory and practice developments in crop science’’, Elsevier, 121-126.

Brown D.C.W., Thorp T. A., (1995), ‘’Crop improvement through tissue culture’’, World J. Microbiology Biotechnology, 11, 409-415.

Cazzulino D., Pederson H., Chin C. K., (1991), ‘’Bioreactors and image analysis for scale-up and plant propagation’’, Cell culture and somatic cell genetics of plants, 147-177.

Chen X., Yang L., Zhang N., Turpin J. A., Buckheit R. W., Osterling C., (2003), ‘’Shikonin, a component of Chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1’’, Antimicrob Agents Chemother, 47, 2810–2816.

Clough P. M., (2001), ‘’Specialty vegetable oils containing gamma-linolenic acid and steridionic acid’’, Structured and Modified Lipids, 75-117.

Conger B. V., (1981), ‘’Cloning agricultural plants via in vitro techniques’’, 1st Edition, Boca Raton.

Czaplicki S., Zadernowski N., Ogrodowska D., (2009), ‘’Triacylglycerols from viper bugloss (Echium vulgare L.) seed bio-oil’’, European Journal of Lipid Science and Technology, 111, 1266-1269.

Debergh P. C., De Riek J., Matthys M., (1994), ‘’Nutrient supply and growth of plants in culture’’, 1 st Edition, Plant Physiology.

Dodds J. H., Roberts L. W. (1985), “Experiments in plant tissue culture. 2 nd edition”, Cambridge University Press, 172-179.

Dougall, D. K., (1987),’’ Primary metabolism and its regulation’’, Plant tissue and cell culture, 124-125.

Edmondson J. R., (1978), ‘’Echium Flora of Turkey’’, Plant Cel Culture, 6, 318-324.

Eibl R., Eibl D., (2006), ‘’Design and use of the wave bioreactor for plant cell culture’’, Plant Tissue Culture Engineering, 205-226.

Escalona M., Lorenzo J. C., González B., (1999), ‘’Pineapple (Ananas comosus L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems’’, Plant Cell Reports, 18, 743–748.

Espinosa, P., Lorenzo, J. C., Iglesias, A., (2002), ‘’Production of pineapple transgenic plants assisted by temporary immersion bioreactors’’, Plant Cell Reports, 21, 136–140.

Etienne H., Lartaud M., Michaux-Ferriére N., Carron M. P., Berthouly M., Teisson C., (1997),’’ Improvement of somatic embryogenesis in Hevea brasiliensis (Mull Arg.) using the temporary immersion technique’’, In vitro Cellular Developmental Biology, 33, 81-87.

Etienne Barry D., Bertrand B., Vásquez N., Etienne, H., (1999), ’’Direct sowing of Coffea arabica somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plant’’, Plant Cell Reports, 19, 111–117.

Etienne H., Berthouly M., ‘’Temporary immersion systemsin plant micropropagation’’, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69, 215-231

Fukui H., Tsukada M., Mizukami H., Tabata, M., (1983), ‘’Formation of stereoisomeric mixtures of naphthoquinone derivatives in Echium lycopsis callus cultures’’, Phytochemistry, 22, 453–456.

Ge F., Yuan X., Wang X., Zhao B., Wang Y., (2006), ‘’Cell growth and shikonin production of Arnebia euchroma in a periodically submerged airlift bioreactor’’, Biotechnology Letters, 28, 525–529.

Guil-Guerrero J. L., (2007), ‘’Stearidonic acid (18:4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources’’, Eur. J. Lipid Sci. Technology, 1226-1236.

Guil-Guerrero, J. L., Gomez- Mercado, F., Garcia-Maroto, F., Campra-Madrid, P., (2000), ‘’Occurance and characterization of oils rich in γ-linolenic acid Part I: Echium seeds from Macaronesia’’, Phytochemistry, 451-456.

Guil-Guerrero J. L., Lopez-Martinez J. C., Campra-Madrid P., (2008), ‘’Gammalinolenic extraction from seed by SCF and several solvent systems’’, International Journal of Food Science and Technology, 1176 – 1180.

Guil-Guerrero J. L., Lopez-Martínez J. C., Gomez-Mercado F., Campra-Madrid P., (2006), ‘’Gamma-linolenic and stearidonic acids from Moroccan Boraginaceae’’, Eur. J. Lipid Sci. Technology, 108, 43-47.

Guil-Guerrero J. L., Maroto F. F., Gimenez A., (2001), ’’ Fatty Acid Profiles from Forty-nine Plant Species That Are Potential New Sources of Linolenic Acid’’, Journal of American Oil Chemists Society, 677-684.

Guil-Guerrero J. L., Rincon-Cervera M. A., Gomez-Mercado F., Ramos-Bueno R.P., Venegas-Venegas E., (2013), ‘’New seed oils of Boraginaceae rich in stearidonic and gamma-linolenic acids from the Maghreb region’’, Food Composition and Analysis, 31, 20-23.

Hanhineva K., Kokko H., Renlampi S., (2005), ‘’Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (Fragaria ananassa) cultivars in temporary immersion bioreactor system’’, In Vitro Cellular Developmental Biology, 41, 826–831.

Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumasho T., (1994), ‘’Efficient transformation of rice(Oryza sativa L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundries of the T-DNA’’, Plant Journal, 6, 271-282.

Holt J. S., Powles S. B. and Holtum J. A. M., (1993), ‘’Mechanismis ano agronomic aspects of herbicide resistance’’,. Plant Physiology., 44, 203-229.

Ilan A., Ziv M., Halevy A. H., (1995), ‘’Propagation and corm development of Brodiaea in liquid cultures’’, Scientia Horticulturae, 63, 101–112.

Jay V., Genestier S., Courduroux J. C., (1994), ‘’Bioreactor studies on the effect of medium pH on carrot (Daucus carota 1.) somatic embryogenesis’’, Plant Cell Tissue Organ Culture, 36, 205-209.

Jo E. A., Murthy H. N., Hahn E. J., Paek K. Y., (2008), ’’Micropropagation of Alocasia amazonica using semisolid and liquid cultures’’, In Vitro Cellular & Developmental Biology , 44, 26-32.

Kırbağ S., (1999), ‘’Hypericum perforatum L. ’un Değişik Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkileri’’, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi , 2, 102-108.

Kumar D., (2014), ‘’Salicylic acid signaling in disease resistance’’, Plant Science, 228, 127–124.

Lambardi M., Sharma K. K., Thorpe T. A. (1993), “Optimization of in vitro bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (Pinus halepensis Mill.)”, In Vitro Cell Development Biology, 29, 189–199.

Luna C., Collavino M., Mroginski L., Sansberro P., (2008), ’’Identification and control of bacterial contaminants from Ilex dumosa nodal segments culture in a temporal immersion bioreactor system using 16S rDNA analysis’’, Plant Cell Tissue Organ Culture, 95, 13–19.

McAllister B., Finnie J., Watt MP., Blakeway F., (2005), ‘’Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial Eucalytus clones in Mondi Forests (SA)’’, Plant Cell Tissue Organ Culture, 81, 347-358.

Mita G., Gerardi C., Miceli A., Bollini R., De Leo P., (1994), ‘’Pigment production from in vitro cultures of Alkanna tinctoria Tausch’’, Plant Cell Reports, 13, 406–410.

Murashige T., (1974), ‘’Plant propagation through tissue culture’’, Annual Review of Plant Physiology, 25, 135–166.

Murashige T., (1978), ‘’The impact of plant tissue culture on agriculture’’, Plant science, 123-128.

Murch S. J., Liu C., Romero R. M., Saxena P. K., (2004), ‘’In vitro culture and temporary immersion bioreactor production of Crescentia cujete’’, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 78, 63–68.

Niemenak N., Saare-Surminski K., Rohsius C., Omokolo N. D., Lieberei R., (2008), ‘’Regeneration of somatic embryogenesis in Theobroma cacao L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues’’, Plant Cell Reports, 27, 667–676.

Öktüren F., Sönmez S., (2005), ‘’Bitki Besin Maddeleri ve Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicileri (Hormonlar) Arasındaki İlişkiler’’, Derim. Batı Akdeniz tarımsal Araştırma Enstitüsü, 22, 20-32.

Ozgen, U., Coskun, M., Kazaz, C. S. H. (2004), ’’Naphthoquinones from the roots of Onosma argentatum Hub.-Mor. (Boraginaceae)’’, Turkish Journal of Chemistry, 28, 451–454.

Özcan T., (2008), ‘’Analysis of the total oil and fatty acid composition of seeds of some Boraginaceae taxa from Turkey’’, Plant Systematics and Evolution, 274, 143-153.

Park S. Y., Murthy H. N., Paek K. Y., (2000), ‘’Mass multiplication of protocorm-like bodies (PLBs) using bioreactor system and subsequent plant regeneration in Phalaenopsis’’, Plant Cell Tissue Organ Culture, 63, 67–72.

Papageorgiou V. P., Assimopoulou A. N., Ballis A. C., (2008), ‘’Alkannins and shikonins: a new class of wound healing agents’’, Current Medicine Chemistry, 15, 3248–3267.

Papageorgiou V. P., Assimopoulou A. N., Couladouros E. A., Hepworth D., Nicolaou K. C., (1999), ‘’The chemistry and biology of alkannin, shikonin and related naphthazarin natural products’’, Plant tissue culture, 270–301.

Papageorgiou V. P., Assimopoulou A. N., Kyriacou G., (2002), ‘’Determination of naturally occurring hydroxynaphthoquinone polymers by size-exclusion chromatography’’, Chromatographia, 55, 423–430.

Papageorgiou V. P., Assimopoulou A.N., Samanidou V.F., Papadoyannis I.N., (2006a), ‘’Analytical methods for the determination of alkannins and shikonins’’, Current Organic Chemistry, 10, 583–622.

Papageorgiou V. P, Assimopoulou A. N, Samanidou V. F, Papadoyannis I. N., (2006b), ’’Recent advances in chemistry, biology and biotechnology of alkannins and shikonins’’, Current Organic Chemistry, 10, 2123– 2142.

Preil W., (1991), ‘’Application of bioreactors in plant propagation’’, Biotechnology Advances, 425-455.

Ramachandra S. R, Ravishankarb G. A., (2002), ‘’Plant cell cultures:Chemical factories of secondary metabolites’’, Biotechnology Advances, 20, 101–153.

Rout G.R., Jain S.M., (2004), ‘’Micropropagation of ornomental plants-cut flowers’’, Propagation Ornamental Plants, 4, 3-28.

Rout G. R., Mohapatra A., Jain S. M., (2006), ‘’Tissue culture of ornomental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects’’, Science Direct Biotechnology Advances, 24, 531-560.

Shen C. C., Syu W. J., Li S. Y., Lin C. H., Lee G. H., Sun C. M., (2002), ‘’Antimicrobial activities of naphthazarins from Arnebia euchroma’’, Journal of Natural Product, 65, 1857–1862.

Simmonds N. W., (1983), ‘’Plant breeding: The state of the art. In Genetic Engineering of Plants’’, 1 st edition, Plenum press.

Singh F., Gao D., Lebwohl M. G., Wei H., (2003), ‘’Shikonin modulates cell proliferation by inhibiting epidermal growth factor receptor’’, Plant Cell Tiss Organ, 200, 115–121.

Smart N. J., Fowler M. W., (1984) ‘’An airlift column bioreactor suitable for large-scale cultivation of plant cell suspensions’’, Journal of Experimantal Botany, 35, 531-537.

Steinmacher D. A., Guerra M. P., Saare-surminski K., Lieberei R., (2011), ‘’A temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis’’, Journal of Natural Product, 324-328.

Stolyhwo A., Mol J., (2007), ‘’Changes in the content of γ-linolenic C18 : 3 (n-6)and stearidonic C18 : 4 (n-3) acids in developing seeds of viper’s bugloss Echium vulgare L.’’, Acta Biochimica Polonica, 54, 741- 746.

Tamas I. A., (1995), ‘’Hormonal regulation of apical dominance’’, In: Davies P. J., Editor, ‘’Plant Hormones Book’’, 1 st edition, Dordrecht Kluwer Academic Publishers.

Tabata M., Mizukami H., Hiraoka N., Konoshima M., (1974), ‘’Pigment formation in callus cultures of Lithospermum erythrorhizon’’, Phytochemistry, 13, 927–932.

Teisson C., Alvard D., (1995), ‘’A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: Temporary immersion’’, Plant tissue culture, 124-129.

Thorpe T. A., (1990), ‘’The current status of plant tissue culture’’, Plant tissue culture, 178-186.

Vasil I. K., (1994), ‘’Automation of plant propagation’’, Plant Cell Tissue Organ Culture, 39, 105-108.

Withers L. A., (1994), ‘’New technologies for the conservation of plant genetic resources’’, Plant tissue culture, 429-435.

Woo S. M., Wetzstein H. Y., (2008), ‘’An efficient tissue culture regeneration system for Georgia Plume, Elliottia racemosa, a threatened Georgia endemic’’, Horticultural Science, 43, 447-453.

Yeung, E. C., Thorpe, T. A., Jensen, C .J., (1981), ‘’In vitro fertilization and embryo culture’’, Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture, 253–271.

Yıldırım A., Ekin T., (2003), ‘’Orta Anadolu Bölgesi Yabancı Ot Florası’’, Bitki Koruma Bülteni, 43, 1-98.

Yoon Y., Kim Y. O., Lim N. Y., Jeon W. K., Sung H. J., (1999), ‘’Shikonin an ingredient of Lithospermum erythrorhizon induced apoptosis in HL60 human premyelocytic leukemia cell line’’, Planta Medica, 65, 532–535.

Ziv M., Schwartz A., Fleminger D., (1987), ‘’Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation plants propagated in vitro: implication for hardening’’, Plant Science, 52, 127–134.

Ziv M., (1989), ‘’Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants’’, Plant Cell Tissue Organ Culture, 17, 101–110.

Ziv M., (1991a), ‘’Vitrification: Morphological and physiological disorders of in vitro plants’’, Plant tissue culture, 45-69.

Ziv M., (1991b), ‘’Morphogenic pattern of plants in liquid medium in shaken flasks or large scale bioreactor cultures’’, Israel Journal of Botany, 40, 145-153.

Ziv M., (1995b), ‘’The control ofbioreactor environment for plant propagation in liquid culture’’, Acta Horticulturae, 319, 25-38.

Ziv M., Ronen K., Raviv M., (1998), ‘’Proliferation of meristamatic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors fort he large scale micropropagation of plants’’, In Vitro Cell Development Biology, 34, 152-158.

ÖZGEÇMİŞ

Büşra KÖKSAL 17.04.1991' de Bursa' da doğdu. İlk ve orta öğrenimin Bursa'da tamamladı. 2010 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2014 yılında eğitimini tamamladı.

2015 yılında Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Prof. Dr. Yelda Özden ÇİFTÇİ danışmanlığında ''Engerek otu (*Echium italicum L.)* bitkisinin geçici daldırma biyoreaktör sistemleri kullanılarak kitle çoğaltımı'' konulu tez çalışmasını gerçekleştirdi. 2016 yılında aldığı pedagojik formasyon eğitimi sonucu sertifika almaya hak kazanmış olup öğrencilere fen bilimleri üzerine ders verdi. Ocak 2017 - Ağustos 2017 tarihleri arasında İstanbul Teknopark'ta sentetik tohum üzerine araştırma yapan TRD Biotek firmasında çalıştı.