

OĞULOTU (*Melissa officinalis*) BİTKİSİNDE MERİSTEM VE SOMATİK EMBRİYO KÜLTÜRLERİNDEN SENTETİK TOHUM ELDE ETME OLANAKLARI

SYNTHETIC SEED PRODUCTION POSSIBILITIES FROM MERISTEM AND SOMATIC EMBRYO IN LEMON BALM (*Melissa officinalis*)

Anıl Mehmet BALTACI¹, Mehmet ARSLAN^{2*}

¹Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kayseri, Türkiye

²Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kayseri, Türkiye

***sorumlu yazar:** mehmetarslan@erciyes.edu.tr

ÖZ

Oğulotu (*Melissa officinalis*) Lamiaceae familyasından uçucu yağ içeren çok yıllık bir bitki olup tohumla ve çelikle çoğaltılabilmektedir. Sentetik tohum elde etmek amacı ile yürütülen bu çalışmada yan tomurcuklar ve somatik embriyolar sodyum aljinat ile enkapsüle edilerek sentetik tohum elde edilmiştir. Yan tomurcuk ve somatik embriyolardan elde edilen sentetik tohumların çimlenme potansiyelleri belirlenmiştir. Somatik embriyo elde etmek için en yüksek kallus oluşum oranı %62.5 ile 1.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l KN ve 1.5 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l IAA + 0.5 mg/l KN ortamlarından elde edilmiştir. Oluşan kalluslar en iyi 0.5 mg/l KN içeren MS içeren ortamda somatik embriyo oluşturmuştur. Yan tomurcuk ve somatik embriyolar %4 sodyum aljinat kullanılarak enkapsüle edilmiştir. Sentetik tohumlar torf ve MS ortamı içerisinde çimlenme testine tabi tutulmuş, somatik embriyodan elde edilen sentetik tohumlar torf ve MS ortamında çimlenme göstermezken yanal meristemlerden elde edilen sentetik tohumlar MS içeren ortamda %15 oranında çimlenme gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kallus, *Melissa officinalis*, oğulotu, somatik embriyo, sentetik tohum, yanal meristem.

ABSTRACT

Lemon balm (*Melissa officinalis*), an essential oil bearing perennial herb in the Lamiaceae family. This study was conducted to obtain synthetic seeds from axillary buds and somatic embryos of lemon balm. Germination capacity of the synthetic seeds was tested *in vitro* and *in vivo* conditions. Two different methods, direct use of axillary buds and somatic embryos with 4% sodium alginate encapsulation were used. The highest callus formation rate was obtained from 1.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l KN and 1.5 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l IAA + 0.5 mg/l KN applications with 62.51%. To obtain somatic embryos calli were transferred on MS with 0.5 mg/l KN. Synthetic seeds from axillary bud and somatic embryos were obtained by covering 4% sodium alginate and dropping in 100 mM calcium chloride. Germination potential of synthetic seeds was tested in MS medium and peat. No germination was observed in peat, but only 15% germination of the synthetic seeds from axillary buds was observed on MS medium.

Keywords: Axillary bud, Callus, Lemon balm, *Melissa officinalis*, somatic embryo, synthetic seed

GİRİŞ

Oğulotu (*Melissa officinalis*) Güney Avrupa, Akdeniz Bölgesi, Batı Asya ve Kuzey Afrika bölgelerine özgü bir bitkidir ve günümüzde dünya çapında üretimi yapılmaktadır (Tucker ve DeBaggio, 2000). Lamiaceae familyasının bir üyesi olan oğulotu, çok yıllık bir bitkidir ve yaklaşık 1 m kadar boylanır. Yumuşak, tüylü olan yaprakları 2 - 8 cm uzunluğunda ve kalp şeklindedir. Yaprak yüzeyi kalın ve damarlıdır, yaprak kenarları tırtıklı veya dişlidir. Tohumları yaklaşık 1- 1.5 cm uzunluğundadır. Yumurta şeklinde koyu kahverengi veya siyah renktedir. Oğulotunun farklı çevresel şartlara daha iyi adapte olmasını sağlayan lateral köklere bir kök sistemi vardır. Kış aylarında bitkinin üst kısmı ölmekte fakat bahar başlangıcında köklerden yeni sürgünler vermektedir (Turhan, 2006).

Oğulotunun bir diğer ismi de limon otudur ve bu isimle anılmasının nedeni, tadının ve kokusunun limona benzemesidir (Coşge, 2006). Oğulotu ayrıca antimikrobiyal, antioksidan ve antiseptik olarak yararlanılan tıbbi aromatik bir bitkidir (Baytop, 1984) Enerji ve dikkat eksikliği, sinirlilik ve gerginlik, depresyon ve uyku bozukluklarının tedavilerinde kullanılmaktadır (Araujo ve ark., 2003) Yapraklarından hem kuru hem de taze haliyle salata, sandviç, çorba, dondurma, şarap gibi çeşitli yiyecek ve içeceklerde tatlandırıcı, aroma verici ve baharat olarak

yararlanılmaktadır. Ayrıca süs bitkisi olarak da kullanılabilen oğulotu, bahçelerde kenar bitkisi olarak kullanımı söz konusudur (Simon, 1984).

Bitki doku kültürü, bitki hücre, doku ve organlarının sentetik besi ortamında, aseptik koşullarda, nem, ışık ve sıcaklığın kontrollü olduğu ortam içerisinde yeniden organların ve bitkiciklerin elde edilmesi tekniğidir (Dağla, 2012). Somatik embriyogenesis, bitki doku kültürü tekniklerinin en önemli araçlarından birisidir. Somatik embriyogenesis, döllenme sonucu oluşan zigotik embriyolara benzerdir, fakat somatik hücrelerden geliştirilerek embriyo elde etme esasına dayanır (Merkle ve ark., 1995).

Somatik embriyolar, alınan eksplantın somatik hücrelerinden gelişmesi sebebiyle, eksplant ile aynı genetik yapıya sahip olmaktadır. Bu da ana bitkinin klonu anlamına gelmektedir. Bu sayede döllenme sonucu meydana gelen zigotik embriyoda istenmeyen özellikleri de kazanması riski, somatik embriyolarda bulunmamaktadır (Parrott ve ark., 1991). Somatik embriyolar da zigotik embriyolar gibi globular, kalp, torpedo ve kotiledon safhalarına sahiptirler (de Jong ve ark., 1993). Bu nedenle elde edilen somatik embriyolar bitki oluşturma kapasitesi vardır ve bu somatik embriyolar hidrojel bir madde ile enkapsüle edilerek sentetik tohum olarak saklanabilirler (Redenbaugh ve ark., 1986). Sentetik tohum

terimi ilk kez 1970'lerde kullanılmaya başlanmıştır ve özellikle canlı tohum üretme yeteneğini kaybetmiş bitkilerde kullanılması hedeflenmiştir (Çölgeçen ve Toker, 2006). İlk sentetik tohum üretiminde somatik embriyolar basitçe kaplanmıştır ve zaman içerisinde farklı koruyucu kaplama materyallerinin geliştirilmesiyle yeni enkapsülasyon teknikleri oluşmuştur (de Jong ve ark., 1993). İlk enkapsülasyon tekniklerinde nem oranının yüksek olmasından kaynaklı olarak depolama süresi birkaç hafta iken, gelişen enkapsülasyon teknikleriyle nem oranı düşürülerek uzun bir süre depolanabilir hale gelmiştir (McKersie ve ark., 1989). Sentetik tohum oluşturma süreci, kallus, pre-embriyoların oluşumu, somatik embriyo formu, olgunlaşma ve bitki rejenerasyonu şeklinde ilerlemektedir (Arnold ve Eriksson, 1981). Sentetik tohum teknolojinin temel amacı, somatik embriyoları korumak, saklamada ve taşımada kolaylık oluşturmaktır (Guerra ve ark., 2001). Ayrıca sentetik tohum teknolojisi, *in vitro*'da üretimi yapılan bitkilerin araziye veya seraya aktarımında kolaylık sağlamaktadır (Soneji ve ark., 2002).

Oğulotu gibi tohumu çok küçük olan bitkilerde ekim zorluğunun oluşmasına karşın sentetik tohum teknolojisi, makinalı ekime imkan sağlamasıyla da büyük bir avantaj sağlamaktadır (Mamiya ve Sakamoto, 2001). Yapılan bu çalışmada,

Oğulotu bitkisinde tohum depolama, taşıma ve bitki çoğaltımı sırasında oluşan sorunların giderilmesi ve tohumlarının çok küçük yapıda olması nedeniyle tarlada düzenli bir ekime imkan vermemesi sorununa karşın sentetik tohum teknolojisi kullanılarak alternatif yöntemler geliştirilmek ve meristematik dokunun ve somatik embriyonun enkapsüle edilerek elde edilen sentetik tohumların rejenerasyonunda eksplant kaynakları arasındaki farklılığın belirlenmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan materyal, ERÜTAM (Erciyes Üniversitesi Tarımsal Araştırma Merkezi)'da Ziraat Fakültesine ait deneme arazisinde bulunan tıbbi ve aromatik bitkiler parselinden temin edilmiştir.

Çalışmada yanal meristemler ve somatik embriyolar olmak üzere iki farklı eksplant kaynağı enkapsüle edilmiştir. Oğulotu bitkileri torf içeren 2 L lik saksılara alınmış ve Genom ve Kök Hücre Merkezi Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarında bulunun 12000 lüks ışık şiddetinde, 16 saat gündüz, 8 saat gece fotoperiyodda, 25 °C sıcaklıkta olan bitki büyütme odasına yerleştirilmiştir. Bitkilerden genç sürgünler alınarak yapraklar ayrıldıktan sonra, somatik embriyo elde etmek ve boğum tomurcuklarını enkapsüle etmek için eksplant olarak kullanılmıştır.

Somatik embriyogenesis ile embriyo elde etmek için %3 sükröz, %0.8 agar ve 4,4 g/l

MS ile birlikte temel ortam olarak kullanılmıştır ve oluşturulan ortamların içerisine farklı oranlarda Kinetin, BA, 2,4-D, NAA ve IAA eklenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge1. Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyiciler ve konsantrasyonları

No	Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicileri		
	2,4-D	NAA	KN
1	1.0 mg/l	1 mg/l	0.5 mg/l
2	1.5 mg/l	1 mg/l	0.5 mg/l
3	2.0 mg/l	1 mg/l	0.5 mg/l
	2,4-D	IAA	KN
4	1.0 mg/l	1 mg/l	0.5 mg/l
5	1.5 mg/l	1 mg/l	0.5 mg/l
6	2.0 mg/l	1 mg/l	0.5 mg/l
	2,4-D	BA	KN
7	1.0 mg/l	0.5 mg/l	0.0 mg/l
8	1.5 mg/l	0.5 mg/l	0.0 mg/l
9	2.0 mg/l	0.5 mg/l	0.0 mg/l

Doku kültüründe kullanılan bisturi, pens, pipet ucu, cam kavanoz, petri, saf su, hazırlanan ortamlar, magentalar, sodyum aljinat solüsyonu, kalsiyum klorid solüsyonu, filtre kağıdı 121 °C de 20 dakika ve 1.2 atmosfer basınç altında otoklavlanarak steril edilmiştir. Kesim işlemi sırasında kullanılan, otoklavlanmış bisturi ve pens, %70 alkol ve alev yardımıyla uçları yakılarak her kullanımdan sonra yeniden steril edilmiştir.

Oğulotu sürgünleri toprak yüzeyinden 5 cm yükseklikten kesilerek budanmıştır ve yaprakları ayıklandıktan sonra çeşme suyu altında yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra steril kavanoz içerisine aktararak steril kabin içerisinde %20 ticari çamaşır suyuna

10 dakika çalkalanmıştır. Ardından 4 defa saf su ile durulanmıştır. Bu işlem ardından steril hale gelmiş olan, yanal meristematik dokuları içeren sürgünler binoküler mikroskop altında kesilerek ekime hazır hale getirilmiştir.

Oluşturulan sentetik tohumların mikroorganizmalar tarafından zarar görmesini engellemek amacıyla ticari olarak satılan torf, 121 °C' de 20 dakika otoklavlanmıştır. Çamaşır suyu ile yıkanan viyoller steril saf su ile iyice durulandıktan sonra steril edilen torf doldurulmuştur.

Somatik embriyo elde etmek için, steril edilen bitki sürgün parçaları, yanal meristemleri içeren küçük parçalara binoküler mikroskop altında steril bistürü kullanılarak ayırıldıktan sonra 2,4-D, BA, IAA, KN ve NAA hormon kombinasyonu içeren ortamlar içerisine steril pens ile aktarılmıştır. Yanal meristem eksplantının bulunduğu yarı-katı MS ortamları karanlık ortama alınmıştır.

Yanal meristemlerin kültüre alınmasından sonra karanlık ortamda elde edilen kalluslar, aynı özelliklerdeki ortamlar içerisinde 10 günde bir alt kültüre alınmıştır ve 4 hafta sonra embriyonik kallusların olduğu gözlemlenmiştir. Karanlık ortam içerisinde embriyonik kallusların oluşumunun ardından (0.5, 1, 1.5, 2) mg/l KN içeren %3 süzkroz, %0.8 agar içeriği olan yarı-katı MS ortamları içerisine aktararak 12000 lüks ışık

şiddetinde, 16 saat gündüz, 8 saat gece foto periyodda, 25 °C sıcaklıkta olan iklim odasına konulmuştur. İklim odasına alındıktan 10-15 gün içinde oluşan somatik embriyoların globular safhaya geldikleri gözlemlenmiştir. Globular safhadan sonra kalp (heart) safhasına aynı ortamlar içerisinde 10 gün de bir alt kültüre alınarak somatik embriyolar elde edilmiştir.

Sterilizasyon aşamasından sonra binoküler mikroskop altında bisturi ile kesilen yanal meristemler, %4 sodyum aljinat içerisinde karıştırıldıktan sonra pipetle çekilerek 100 mM kalsiyum klorid içerisinde damlatılmıştır. Yarım saat kalsiyum klorid içerisinde bekletildikten sonra yanal meristemi içeren aljinat katılarak boncuk şeklinde sentetik tohum elde edilmiştir. Kalsiyum klorid içerisinde çıkarıldıktan sonra steril filtre kağıdı üzerinde 45 dakika kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra elde edilen sentetik tohumların bir kısmı torf içeren viyoller içerisinde, bir kısmı da 0.1 mg/l BA, %0.8 agar ve %3 sükröz içeren yarı katı MS ortamı içerisinde ekimi yapılmıştır. Sentetik endosperm oluşturmak için %4 sodyum aljinat solüsyonuna 4.4 g/l MS, %3 sükröz, 1mg/l BA ve 0.2 mg/l NAA eklenerek oluşturulmuştur.

Elde edilen kalp (heart) şeklindeki somatik embriyolar ayıklandıktan sonra 4.4 g/l MS, %3 sükröz, 1mg/l BA ve 0.2 mg/l NAA içeren sentetik endospermli %4 sodyum

aljinat solüsyonu içerisinde karıştırılmıştır. Pipet yardımıyla somatik embriyo ve sodyum aljinat birlikte çekilerek 100 mM kalsiyum klorid içerisinde damlatılmıştır. Kalsiyum klorid içerisinde yarım saat bekletildikten sonra katılarak boncuk şeklini alan somatik embriyolu sodyum aljinat, kalsiyum klorid solüsyonundan süzülerek steril filtre kağıdı üzerinde 45 dakika kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminin ardından elde edilen sentetik tohumların bir kısmı torf içeren viyole, bir kısmı da 0.1 mg/l BA, %0.8 agar ve %3 sukroz içeren yarı katı MS ortamına ekimi yapılmıştır. Araştırmada eksplantların kallus oluşturma oranı (%), embriyonik kallusların somatik embriyoya dönüşmeleri (%), elde edilen sentetik tohumların çimlenme oranı (%) tespit edilmiştir.

BULGULAR

Yapılan çalışmada yanal meristem eksplantları yarı katı MS ortamı içerisinde alındıktan 30-40 gün sonra elde edilen kalluslar mikroskop altında incelenerek oluşan embriyonik kalluslar saptanmıştır. Embriyonik kalluslar mikroskop altında bakıldığında parlak ve yuvarlak, mat beyaz renkli yapılarıyla diğer kalluslardan ayırt edilmiştir.

Çizelge 2’de görüldüğü gibi bu çalışma 5 farklı büyüme düzenleyicisinin (2,4-D, NAA, IAA, KN, BA) 3 farklı kombinasyonun ile (2,4-D + NAA + KN, 2,4-D + IAA + KN,

2,4-D + BA) 3 farklı dozda, 9 farklı uygulama şeklinde yürütülmüştür.

Çizelge 2. Oğulotunda yanal meristem eksplantından kallus oluşum oranları (%)

Bitki Büyüme Düzenleyisi				
No	2,4-D	NAA	KN	Kallus Oluşum Oranı (%)
1	1.0 mg/l	1 mg/l	0.5 mg/l	62.50 A
2	1.5 mg/l	1 mg/l	0.5 mg/l	45.83 A
3	2.0 mg/l	1 mg/l	0.5 mg/l	54.17 A
2,4-D IAA KN				
4	1.0 mg/l	1 mg/l	0.5 mg/l	45.83 A
5	1.5 mg/l	1 mg/l	0.5 mg/l	62.50 A
6	2.0 mg/l	1 mg/l	0.5 mg/l	41.67 AB
2,4-D BA KN				
7	1.0 mg/l	0.5 mg/l	0.0 mg/l	20.83 BC
8	1.5 mg/l	0.5 mg/l	0.0 mg/l	4.17 C
9	2.0 mg/l	0.5 mg/l	0.0 mg/l	4.17 C
LSD =0.05				23.62

Araştırmada 9 uygulamanın hepsinde de kallus oluşumu gözlenmiştir. Uygulamalar arasında kallus oluşum oranı bakımından bir birinden önemli 3 farklı grup oluşmuştur. Kallus oluşum oranı %4,2 ile 62.5 arasında değişim göstermiştir. En yüksek kallus oluşum oranı %62.5 ile 1 nolu (1.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l KN) ve 5 nolu (1.5 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l IAA + 0.5 mg/l KN) uygulamalardan elde edilmiştir. Bu uygulamaları takiben sırasıyla 3 nolu (2.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l KN), 2 nolu (1.5 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l KN), 4 nolu uygulama (1.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l IAA + 0.5 mg/l KN) ve 6 nolu (2 mg/l 2,4 D + 1mg/l IAA + 0.5 mg/l KN) uygulamalar izlemiştir. Araştırmada en düşük kallus oluşumu % 4.17 ile 8. (1.5 mg/l 2,4 D + 0.5 mg/l BA) ve 9. (2 mg/l 2,4 D + 0.5 mg/l BA) uygulamalardan elde edilmiştir.

Elde edilen embriyonik kalluslar 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg/l KN içeren MS ortamı içerisine alınmış ve 15-20 gün içerisinde globular, ardında kalp (heart) şekline ulaşmıştır. En iyi somatik embriyo dönüşümü %35 ile 0.5 mg/l KN içeren yarı-katı MS ortamından elde edilmiştir. Çok az miktarda olgunlaşan somatik embriyolar kalp (heart) aşamasında enkapsüle edilmek için kallus üzerinden ayrıştırılmıştır.

Yanal meristem eksplantı %3 sükröz, 4.4 mg/l MS ve 1 mg/l BA ve 0.2 mg/l NAA içeren %4 sodyum aljinat solüsyonu içerisine karıştırılmış ve 100 mM kalsiyum klorid içerisine damlatılmış ve yarım saat içerisinde beklettikten sonra kurutma işlemi yapılarak sentetik tohum elde edilmiştir. Elde edilen sentetik tohumlar 1 hafta 4 °C 'de bekletildiğinde enkapsülasyonda kullanılan temel kimyasal olan aljinatın suyunu kaybederek küçüldüğü ve içerisindeki yanal

meristemin yeşil aksamını koruyarak yaşamını kaybetmediği gözlemlenmiştir. Bir hafta sonra 4 °C'den çıkartılan sentetik tohumlar hem steril torf içerisine hem de 1 mg/l BA içeren yarı-katı MS çimlendirme ortamına alınmıştır. Torf içerisine ekildikten sonra 12000 lüks ışık şiddetinde, 16 saat gündüz, 8 saat gece fotoperiyotta, 25 °C' sıcaklıkta iki hafta bekletilen ve düzenli sulanan sentetik tohumların hiçbirinde çimlenme olmadığı gözlemlenmiştir. Torf içerisinden çıkartılıp bakıldığında sentetik tohum içerisindeki yanal meristemin karardığı ve eksplantın ölümünün gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca enkapsülasyon malzemesi aljinatın su alarak şiştiği ve şeklinde bozulmalar olduğu gözlemlenmiştir.

Bir mg/l BA içeren yarı-katı MS çimlendirme ortamı içerisine 100 adet ekimi yapılan sentetik tohumlar, 12000 lüks ışık şiddetinde, 16 saat gündüz, 8 saat gece foto periyotta, 25 °C' sıcaklıkta olan iklim odasına yerleştirilmiştir ve meristematik dokulardan 15 tanesi iki hafta sonra sürgün vererek %15 oranında çimlenme olduğu gözlemlenmiştir. Geri kalan sentetik tohumlarda iki hafta sonra çimlenme olmamış ve ekimden 4 hafta sonra aljinat içerisindeki eksplantın kararak ölümünün gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Araştırmanın bir diğer aşaması olan somatik embriyoların enkapsüle edilmesi

çalışmasında, elde edilen somatik embriyolar 4.4 g/l MS, %3 sükröz, 1mg/l BA ve 0.2 mg/l NAA içeren %4 sodyum aljinat solüsyonu içerisine karıştırılarak 100 mM kalsiyum klorid içerisine damlatılmıştır. Boncuk şeklinde elde edilen sentetik tohumlar torf içeren viyol içerisine ve 1 mg BA içeren yarı-katı MS ortamı içerisine steril şartlarda ekimi yapılmıştır. Torf ve yarı-katı MS içerisinden ekimi yapılan sentetik tohumlar 12000 lüks ışık şiddetinde, 16 saat gündüz, 8 saat gece foto periyotta, 25 °C' sıcaklıkta olan bitki büyütme odasında bekletilmiştir. Bu işlem sonucunda sentetik tohumların hiçbirinde çimlenmenin olmadığı, aljinat içerisinden ekimi yapılan eksplantın kararak ölümünün gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

TARTIŞMA

Kallus oluşumunda en iyi sonuçların %62.5 oranla ile .0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l KN ve 1.5 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l IAA + 0.5 mg/l KN uygulamalardan elde edildiği tespit edilmiştir. Kumar ve Thomas *Clitoria ternatea* bitkisinde en iyi kallus oluşumunun 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında (Kumar ve Thomas, 2012), *Artemisia vulgaris* bitkisinde ise en iyi oluşum ortamının 0.5 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BA ve 50 mg/ askorbik asit içeren MS ortamı olduğunu belirtmişlerdir (Sudarshana ve ark. 2013). Kallus oluşumundan sonra somatik embriyo geliştirmek için en iyi sonucun %35

oranla 0.5 mg/l KN içeren yarı-katı MS ortamında olduğu görülmüştür. Sadece sodyum aljinat ile kaplama yapıldığında sodyum aljinat tek başına kaplanan eksplantı besleyemeyeceği için sentetik bir endospermin gerekli olduğu düşünülerek sodyum aljinat solüsyonu içerisine 4.4 mg/l MS, %3 sukroz, 1 mg/l BA ve 0.2 mg/l NAA eklenerek ekplantlar enkapsüle edilmiştir. Enkapsülasyon işleminden sonra elde edilen sentetik tohumlar torf ve yarı katı MS içerisinde çimlenme testine tabi tutulmuştur. Yanal meristemler torf içerisinde bir çimlenme göstermemiş, sadece MS ortamı içerisinde %15 oranında çimlenme göstermişlerdir. Somatik embriyoların enkapsülasyonu ile elde edilen sentetik tohumlar hem torf, hem de MS ortamında çimleneme göstermemiştir.

Daha önceki çalışmalarda torf içerisinde direk çimlendirme denemesi yapılmamış, torf ve toprak içerisine de ekiminin denenebileceğine dair öngörülerde bulunmuş ve genellikle MS ortamı içerisinde çimlenme testine tabi tutulduktan sonra çimlenen bitkileri torf içerisine aktararak sera koşullarına almışlardır. Yanal meristemlerden alınan eksplantlar 1 hafta 4 °C'de depoladıktan sonra 1 mg/l BA içeren MS ortamında çimlendirildiğinde %15 oranında rejenerasyon elde edildiği tespit edilmiştir, Rathore ve Kheni *Withania coagulans* bitkisinde yan al meristemlerden

elde ettikleri sentetik tohumları 60 gün 4 °C'de depoladıktan sonra 0.57 µM IAA ve 1.11 µM BA içeren MS ortamına %72 oranında rejenerasyon olduğunu belirtmişlerdir (Rathore ve Kheni, 2017).

Malanadi ve Staden *Pinus patula* bitkisinde somatik embriyolardan elde ettikleri sentetik tohumları sıvı DCR temel ortam içerisinde çimlendirmeye almışlardır ve %9 oranında çimlendiğini belirtmişlerdir (Malabadi ve Van Staden, 2005). Huda ve Bari Patlıcan (*Solanum melongena*) bitkisinde somatik embriyolar enkapsüle etmişler ve 1.0 mg/l BA ve 0.1 mg/l giberillik asit (GA₃) içeren MS ortamının en iyi çimlendirme ortamı olduğunu belirtmişlerdir (Huda ve Bari, 2007). Yürütülen bu çalışmada Oğulotu (*Melissa officinalis*) bitkisinde yan al meristemlerin ve somatik embriyoların enkapsüle edilerek sentetik tohum oluşturulabileceğine ve ana bitkiyle aynı genetik yapıda bitkiler elde edilebileceğine dair sonuçlar içermektedir. Sentetik tohum teknolojisi bizlere, hızlı çoğaltım, depolama ve tohum teknolojisinin geliştirme açısından avantaj sağlama potansiyeline sahiptir.

Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı dozları, farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonları ve farklı besin ortamları ile çalışma devam ettirilerek somatik embriyo oluşumu ve elde edilen sentetik tohumların çimlenme oranlarının artırılabilmesi ön görülmektedir.

Somatik embriyoların sayısını ve olgunlaştırılmasını, daha iyi hale getirebilmek için farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanılması faydalı bir sonuç ortaya çıkartabilir. Bitki büyüme düzenleyicilerin etkisiyle beraber bitkilerin genetiği ve eksplant kaynağı doku kültürü çalışmalarında kallus ve somatik embriyo oluşumunda büyük önem taşımaktadır. Çalışmada somatik embriyo elde etmek için yanal meristem eksplantı kullanılmıştır. Ancak bitkilerin kotiledon, gövde, kök, yaprak gibi diğer vejetatif organlarının da denenerek somatik embriyo oluşumunun artırılması söz konusu olabilir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından desteklenen FYL-2018-7815 no'lu projenin bir bölümüdür. Desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Araujo, C., Sousa, M. J., Ferreira, M. F., Leao, C., 2003. Activity of essential oils from Mediterranean Lamiaceae species against food spoilage yeasts. *Journal of Food Protection*, 66(4): 625-632.

Arnold, S. V., Eriksson, T., 1981. In vitro studies of adventitious shoot

formation in *Pinus contorta*. *Canadian Journal of Botany*, 59(5): 870-874.

Baytop, T. (1984). Treatment with plants in Turkey. Istanbul University Publication. No: 3255. *Istanbul University, Istanbul*.

Coşge, B., 2006. The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis L.*), its components and using fields. *J. of Fac. of Agric., OMU*, 21(1): 116-121.

Çölgeçen, H., Toker, M. C. 2006. Sentetik Tohum. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi. Anadolu University Journal of Science and Technology Cilt/Vol.:7-sayı/No: 2* : 323-336.

Dagla, H. R. 2012. Plant tissue culture. *Resonance* 17 (89): 759-767.

de Jong, A. J., Schmidt, E. D., de Vries, S. C., 1993. Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 22(2): 367-377.

Guerra, M. P., Dal Vesco, L. L., Ducroquet, J. P. H., Nodari, R. O., Reis, M. S., 2001. Somatic embryogenesis in *Goiabeira serrana*: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(2): 117-128.

Huda, A. K. M. N., Bari, M. A., 2007. Production of synthetic seed by encapsulating asexual embryo in eggplant (*Solanum melongena L.*). *Int. J. Agric. Res*, 2: 832-837.

Kumar, G. K., Thomas, T. D., 2012. High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Clitoria*

- ternatea Linn. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 110(1): 141-151.
- Malabadi, R. B., Van Staden, J., 2005. Storability and germination of sodium alginate encapsulated somatic embryos derived from the vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. *Plant cell, tissue and organ culture*, 82(3): 259-265.
- Mamiya, K., Sakamoto, Y., 2001. A method to produce encapsulatable units for synthetic seeds in *Asparagus officinalis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(1): 27-32.
- Merkle, S. A., Parrott, W. A., Flinn, B. S., 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In *In vitro embryogenesis in plants* (pp. 155-203). Springer Netherlands.
- McKersie, B. D., Senaratna, T., Bowley, S. R., Brown, D. C. W., Krochko, J. E., Bewley, J. D., 1989. Application of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *In vitro cellular & developmental biology*, 25(12): 1183-1188.
- Parrott, W. A., Merkle, S. A., Williams, E. G., 1991. Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer systems. *Advanced methods in plant breeding and biotechnology*, 4: 158-200.
- Rathore, M. S., Kheni, J., 2017. Alginate encapsulation and in vitro plantlet regeneration in critically endangered medicinal plant, *Withania coagulans* (Stocks) Dunal. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87(1): 129-134.
- Redenbaugh, K., Paasch, B. D., Nichol, J. W., Kossler, M. E., Viss, P. R., Walker, K. A., 1986. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Nature Biotechnology*, 4(9): 797-801.
- Simon, J. E. C., 1984. *Herbs an indexed bibliography 1971-1980: the scientific literature on selected herbs and aromatic and medicinal plants of the temperature zone* (No. 581.634063 S55).
- Sudarshana, M. S., Rajashekar, N., Niranjan, M. H., Borzabad, R. K., 2013. In vitro regeneration of multiple shoots from encapsulated somatic embryos of *Artemisia vulgaris*, L. *IOSR J Pharma Biol Sci*, 6: 11-15.
- Tucker, A. O., DeBaggio, T. 2000. *Big book of herbs*. Interweave Press.
- Turhan, M. 2006. Hand book of herbal plants, chapter 4. *Melissa officinalis*, 3: 184-245.