

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**LİMONOTU (*Lippia citriodora* Kunth) BİTKİSİNDE**  
**DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI**

**Bilal YILDIZ**

**Tarla Bitkileri Anabilim Dalı**

Tezin sunulduğu tarih: **06/02/2012**

**Tez Danışmanı:**

**Prof. Dr. Hakan TURHAN**

**ÇANAKKALE**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

**BİLAL YILDIZ** tarafından **PROF. DR. HAKAN TURHAN** yönetiminde hazırlanan “**LİMONOTU (*Lippia citriodora* Kunth) BİTKİSİNDE DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan TURHAN

---

Danışman

Prof. Dr. Harun BAYTEKİN

---

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Orhan YÜKSEL

---

Jüri Üyesi

Sıra No: .....

Tez Savunma Tarihi: 06/02/2012

Prof. Dr. İsmet KAYA

---

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans Tezi BAP tarafından 2011/55 no'lu projeden desteklenmiştir.

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Bilal YILDIZ

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Hakan TURHAN'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca her türlü konuda beni destekleyen, yardımlarını bir an esirgemeyen tüm Tarla Bitkileri Bölümü hocalarım ve araştırma görevlilerine içtenlikle teşekkür ederim.

Tezimin başladığı günden bu güne kadar desteklerini esirgemeyen başta Çanakkale Ziraat Odası Başkanı İlhan ULUS olmak üzere tüm oda personeline ve çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarıma teőekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bilal YILDIZ

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|              |                                |
|--------------|--------------------------------|
| NAA          | 1-Naphthaleneacetic Acid       |
| 2,4-D        | 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid |
| BA           | 6-Benzylaminopurine            |
| IAA          | Indole Acetic Acid             |
| IBA          | Indole Butyric Acid            |
| KIN          | Kinetin                        |
| M            | Molar                          |
| MS           | Murashige ve Skoog             |
| SD           | Serbestlik Derecesi            |
| $\mu$ M      | Mikromolar                     |
| L            | Litre                          |
| da           | Dekar                          |
| mg           | Miligram                       |
| cm           | Santimetre                     |
| $^{\circ}$ C | Santigrad Derece               |

## ÖZET

### LİMONOTU (*Lippia citriodora* Kunth) BİTKİSİNDE DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Bilal YILDIZ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Hakan TURHAN

06/02/2012, 39

Bu araştırmada, limonotu (*Lippia citriodora* Kunth) bitkisinin *in vitro* koşullarda kallus oluşumu ve somatik embriyogenesis için uygun besi ortamlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırma iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada limonotu bitkisinin doku kültürüne aktarımı, kallus oluşumu ve çoğaltımı, ikinci aşamada ise embriyogenik kallus gelişimi amaçlanmıştır. Deneme Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Doku Kültürü ve Biyoteknoloji Laboratuvarlarında 2010-2011 yıllarında yürütülmüştür. Denemelerde Murashige ve Skoog (MS) temel besi ortamına ilave edilen bazı sitokin ve oksin büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarının kallus gelişimine etkileri incelenmiştir. İncelenen parametreler bakımından limon otunda en iyi kallus gelişimi 2,0 mg/L NAA + 0,5mg/L BA büyüme düzenleyici ilaveli MS besi ortamının olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, limonotu bitkisi (*Lippia citriodora* Kunth) başarı ile doku kültür ortamına aktarılmış ve kallus oluşturmuştur. Ayrıca somatik embriyogenesis veya organogenesis temelinin oluşturan embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Çok az da olsa bu kalluslardan kök gelişimi sağlanmıştır. Limonotunda kallus kültürü ile yapılan ilk çalışma olması açısından önemli sonuçlar elde edilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Limonotu, kallus kültürü, büyüme düzenleyici, *in vitro*

## ABSTRACT

### TISSUE CULTURE STUDIES IN LEMONGRASS (*Lippia citriodora* Kunth)

Bilal YILDIZ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Chair for Crop Science Thesis of Master of Science

Advisor: Prof. Dr. Hakan TURHAN

06/02/2012, 39

In this study, the aim was to determine suitable media for callus induction and somatic embryogenesis in lemongrass (*Lippia citriodora* Kunth) under *in vitro* conditions. The study comprised two stages. At the first stage, transferring lemongrass to tissue culture, callus induction and proliferation, and, then, at the second stage embryonic callus growth were aimed. The study was carried out at Tissue Culture and Biotechnology Laboratories, Agricultural Faculty, Çanakkale Onsekiz Mart University in years of 2010-2011. In the experiments, Murashige and Skoog (MS) was used as basal medium and supplemented with some cytokines and auxins, and their different concentrations. The effects of these media on callus growth were examined. According to the results of investigated characters, the best callus growth was obtained from MS supplemented with 2,0 mg/L NAA + 0,5mg/L BA. As a result, lemongrass plant was transferred to tissue culture and calli were induced with this study. In addition, somatic embryogenesis or embryonic calli for the bases of organogenesis were obtained. Even very few, root development were observed from some calli. Some important results were achieved as the first callus report in lemongrass.

**Keywords:** Lemongrass, callus culture, growth regulator, *in vitro*

# İÇERİK

|  | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....  | ii           |
| İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....  | iii          |
| TEŞEKKÜR.....  | iv           |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....   | v            |
| ÖZET.....  | vi           |
| ABSTRACT.....  | vii          |
| <b>BÖLÜM 1 – GİRİŞ.....</b>  | <b>1</b>     |
| <b>BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>  | <b>4</b>     |
| <b>BÖLÜM 3 – MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>   | <b>9</b>     |
| 3.1. Bitkilerin Steril Koşullara Aktarılması.....                                | 9            |
| 3.2. Denemenin Kurulması.....  | 9            |
| 3.2.1. Kallus Oluşumu.....   | 11           |
| 3.2.2. Alt Kültüre Alma ve Embriyogenik Kallus Oluşumu.....                      | 11           |
| 3.2.3. Embriyogenik Kallus Oluşumu.....  | 12           |
| 3.3. Ölçümler.....   | 12           |
| 3.4. Yetiştirme Koşulları.....   | 14           |
| 3.5. Deneme Deseni ve İstatistikî Analiz.....                                    | 14           |
| <b>BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>                            | <b>16</b>    |
| 4.1. Kallus Oluşumu.....   | 16           |
| 4.1.1. Kallus Oluşturma Yüzdesi.....   | 16           |
| 4.1.2. Kallus Büyüklüğü.....   | 17           |
| 4.1.3. Kallus Skoru.....   | 19           |
| 4.1.4. Kallus Rengi.....   | 21           |
| 4.1.5. Kallus Ağırlığı.....  | 23           |
| 4.1.6. Kallus Oluşumuyla İlgili Karakterler Arasındaki Korelasyonlar.....        | 25           |
| 4.1.7. Kallus Oluşumu Denemesine İlişkin Sonuç.....                              | 25           |
| 4.2. Somatik Embriyogenesis.....   | 27           |
| 4.2.1. Kallus Büyüklüğü.....   | 28           |
| 4.2.2. Kallus Rengi.....   | 30           |
| 4.2.3. Somatik Embriyogenesisle İlgili Karakterler Arasındaki Korelasyonlar..... | 32           |
| 4.2.4. Somatik Embriyogenesis Denemesine İlişkin Sonuç.....                      | 32           |



|   |            |
|---|------------|
| <b>BÖLÜM 5 – SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b> | <b>33</b>  |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                   | <b>35</b>  |
| <b>Çizelgeler.....</b>                  | <b>I</b>   |
| <b>Şekiller.....</b>                    | <b>II</b>  |
| <b>Özgeçmiş.....</b>                    | <b>III</b> |

**BÖLÜM - 1****GİRİŞ**

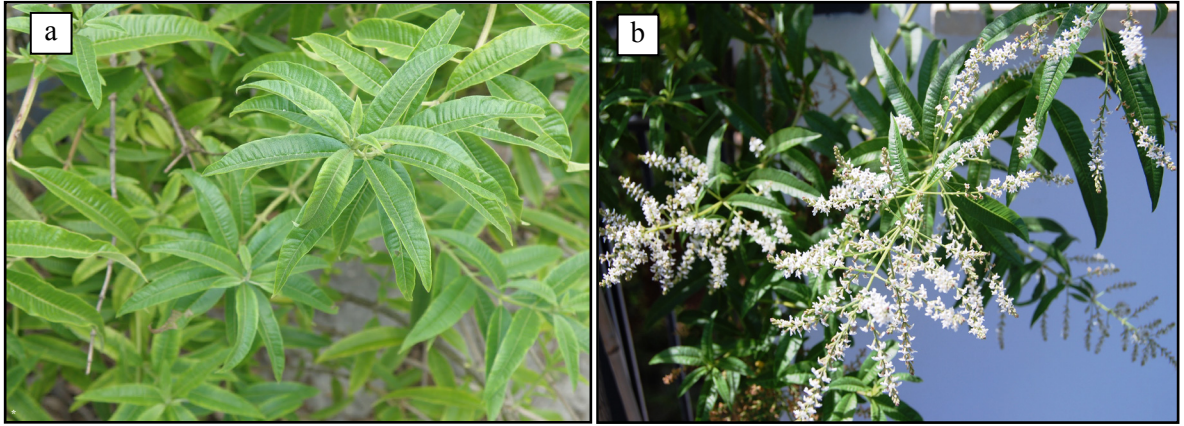
Bitkiler insan yaşamında sadece besin kaynağı olarak değil aynı zamanda ilaç ve aromatik bileşiklerin kaynağı olarak da önemli bir yere sahiptir. Tıbbi ve aromatik bitkilerin tarihi neredeyse insanlık tarihi kadar eskidir. Bu bitkilerin kullanımı ile ilgili bilgiler nesilden nesile aktararak günümüze kadar ulaşmıştır (Brown, 1995). Birçok tıbbi ve aromatik bitki, aynı zamanda gıda, yağ, şeker ve lif gibi amaçlar için de kullanılmaktadır (Andi ve ark., 1997). Kullanılan modern ilaçlardaki etken maddeler önce bitkilerde tespit edilir ve daha sonra seri üretim amacıyla sentetik olarak üretilirler. Özellikle tekrar doğal ürünlere dönüş eğilimi nedeniyle son yıllarda bitkisel (herbal) ilaçlar daha da yaygın hale gelmiştir. Bunun sonucu olarak Avrupa’da bitkisel ilaç pazarı her geçen yıl hızla artmaktadır. Buna paralel olarak ülkemizde de tıbbi bitkilere ve bu bitkilerden elde edilen özütlerle olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Türkiye’de yetiştirilen ilaç ve baharat bitkileri genel olarak alternatif tıp ve modern tıp, yemekler, baharat, boya sanayi ve bitkisel çay yapımı gibi alanlarda kullanılmaktadır (Başer, 1998). Bununla ilgili güncel basında ve bilimsel çevrelerde birçok yayın mevcuttur. Özellikle tıp fakültelerinin farmakoloji bölümleri bu konuya yoğun bir ilgi göstermekte, bir anlamda alternatif tıp ile modern tıbbi birleştirmektedir (Anonim, 1999).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, günümüzde dünya nüfusunun % 80’i bitkisel ilaçlarla tedavi olmaktadır. Bitkisel ürünlerin kullanımı, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere daha yaygındır. Dünyada 20.000 tıbbi bitki türü hakkında çalışma yapıldığı belirlenmiştir (Deans ve Svoboda, 1990). Dünyada 100’ü aşkın tıbbi ve aromatik bitki türünün kültürü yapılmakta ancak ülkemizde yalnızca 15 tür küçük alanlarda yetiştirilmektedir. Türkiye florasında yaklaşık 9.000 bitki türünün bulunduğu ve bunlardan 3.000 kadarının da endemik olduğu (Gümüüşçü, 2001), yaklaşık 1.000 kadarının ise tıbbi bitki olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Arslan ve ark., 2002). Halk hekimliğinde kullanılan bu aromatik bitkilerden 350 kadarının ticareti yapılmakta olup, yaklaşık 100 tür farklı ülkelere ihraç edilmektedir (Özhatay ve ark., 1997).

Çalışmaya konu olan limonotu (*Lippia citriodora* Kunth), *Lippia* cinsi *Verbenaceae* familyasına aittir (Şekil 1.1). Bu cinse ait otsu, çalimsı ve küçük ağaçları kapsayan yaklaşık 200 adet türü bulunmaktadır. Limonotu (*Lippia citriodora* Kunth) Kuzey Karolina, Kaliforniya, Orta ve Güney Amerika, İspanya, Çin ve Hindistan’da yabani formlarıyla yayılış göstermektedir (Karik, 2009; Terblanche ve Kornelius, 1996).

Limonotu bitkisel çay ve endüstriyel anlamda kullanılan limon kokulu aromatik yapraklara sahiptir. Bu nedenle limon meyvesinin koku ve aroması bakımından alternatifi olarak kullanılmaktadır. Limonotunun ılıman iklime sahip olan bölgelerde kültürü yapılmaktadır. Limonotu Avrupa'ya 1784 yılında getirilmiştir. İspanya, Fransa ve diğer Avrupa ülkelerinde limonotu çayı oldukça popüler bir içecektir (Chevallier, 1996), ülkemizde ise hazır demleme çaylar olan adaçayı, zencefil gibi karışımlarına eklenen limonotu, diğer aroma bitkileri kadar tanınmamaktadır.

Limonotu farmokognozük bakımdan ağrı kesici, iltihap giderici, ateş düşürücü, endişe giderici, idrar artırıcı, hazmı kolaylaştırıcı ve spazm giderici olarak kullanılmaktadır (Nakamura ve ark., 1997).



**Şekil 1.1.** Limonotunun bitkisel özellikleri (a. Genç yapraklar, b. Çiçeklenme dönemi ve çiçekler).

Tohumlu bitkileri vejetatif ve generatif çoğaltmak mümkündür. Doku kültürü yöntemi vejetatif şekilde yapılan üretim modellerinden modern ve en hızlı yaygınlaşan *in vitro* üretim şeklidir. Doku kültürü, üretimi zor olan bitkilerin çoğaltılması yanında biyoteknolojik ve ıslah çalışmalarının başarısını ve etkinliğinin artırılmasında önemli bir yöntemdir. Özellikle tıbbi ve aromatik bitkilerin özütlerinin üretilmesi ve süspansiyon kültürü ile sekonder metabolit üretimi gibi diğer doku kültürü teknikleri ile etken maddelerinin üretilmesi de son yıllarda araştırmacıların dikkat çektiği konulardır.

Doku kültürüne 20. yüzyılın başlarında Haberlandt (1902) ile başlanmış ve birçok bitki türünde çalışmalar yapılmıştır. Tarihsel geçmişi eski olmasına rağmen, biyoteknolojik çalışmaların temeli olması sebebiyle güncelliği ve önemini korumaktadır. Gen transferi, protoplast füzyonu, haploid teknoloji, hücre kültürü gibi biyoteknolojik yöntemlerin uygulanabilmesi için bitkilerin doku kültüründe üretilmesi ve çoğaltılması gerekmektedir. Doku kültürü; canlıların eksplant adı verilen hücre, doku ya da

organlarından yararlanarak, steril koşullarda yapılan üretilimdir. Gönülşen (1987) ise bitki doku kültürünü bitkilerin çeşitli kısımlarından alınan hücre, doku ve organların sterilize edilip çeşitli besin maddeleri içeren steril ortamlarda ve uygun çevre koşullarında kültüre alınması ve büyütülmesi olarak tanımlamıştır.

Günümüzde bitki doku kültürleri çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik farklılığı oluşturmak bitki doku kültürünün farklı amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri ıslah çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü uygulamaları rutin olarak uygulanmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2001). Yine tıbbi aromatik bitkilerde etken maddelerin (sekonder metabolitlerin) üretiminde doku kültürünün bir alanı olan biyoreaktörler de ticari olarak kullanılmaktadır (Kasper ve ark., 2009). Biyoreaktörlerde kullanılan doku kültürü yöntemi hücre kültürüdür. Kısaca biyoreaktörlerin çalışma prensibi kullanılan bitki hücrelerinin otomasyon şeklinde çoğaltılmasıdır (Sambamurthy ve Kar, 2006). Daha sonra bu hücrelerden sekonder metabolitlerin çıkarılmasıdır.

Doku kültüründe bitki türü ve kültür amacına (hücre, kallus, organ vb.) göre çok sayıda besi ortamı geliştirilmiştir (Franklin ve Dixon, 1994; Gamborg ve Phillips, 1995). Bitki gelişimi için en yaygın olarak kullanılan besi ortamı Murashige ve Skoog (MS) tarafından 1962 yılında geliştirilmiştir (Murashige ve Skoog, 1962). MS içeriğinde bitkilerin yaşamları için gerekli olan inorganik tuzlar, bitki büyüme düzenleyicileri, vitaminler, aminoasitler, aminler, karbon ve enerji kaynağı ile su yer almaktadır.

Doku kültürü ile mevsim değişikliklerine bağlı kalınmaksızın, yıl içinde sürekli, sağlıklı bitkiler üretilebilir. Aynı genetik yapıya sahip, sağlıklı bitkilerin kısa sürede üretilmesinin yanında kontrol altındaki farklı ortam şartlarına fizyolojik tepkilerin izlenilebilmesine olanak sağlaması nedeniyle deneysel çalışmalarda en doğru sonuçların alınabileceği üretim yöntemidir. Yapılan bu çalışmanın dünya literatüründe limonotunda kallus oluşumu açısından ilk olacak olması ve doku kültürü çalışmalarını kapsamaması bakımından da önemlidir. Doku kültürü ile limonotu bitkisinin çoğaltımı hem ekonomik olacak hem de uçucu yağ kompozisyonundaki istenilen bileşenlerin artışını mümkün kılacak çalışmalara temel teşkil edecektir. Ayrıca gelecekte limonotunda yapılacak biyoteknolojik çalışmalara da olanak sağlayacaktır.

Bu çalışmada tıbbi ve aromatik bitkilerden limonotunun (*Lippia citriodora* Kunth) ilk kez kallus kültürüne aktarılması ve doku kültüründe yetiştirilmesi amaçlanmıştır.

## **BÖLÜM 2**

### **ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Bitkiler, insanların hem temel besin kaynakları hem de ilk ilaçlarıdır. İnsanlar ilk çağlardan beridir deneme yanılma yöntemiyle hangi bitkilerin tüketilebileceğini ve hangilerinin zehirli veya faydalı (tıbbi) olduğunu öğrenmişlerdir. Floradan toplama veya kültür yoluyla ürettikleri tıbbi aromatik bitkilerden, farklı yöntemler kullanarak etken maddeleri elde etmeyi başarmışlardır. Bugün dünyada tanımı yapılmış yaklaşık 500.000 adet bitki bulunmakta ancak bu bitkilerin 20.000 kadarının tıbbi amaçlar doğrultusunda kullanılabilirdiği, bunlardan 500 türe yakınının ekonomik amaçlı olarak ticaretinin yapıldığı bilinmektedir (Baydar, 2005). Dünya üzerinde bu türlerden 100 kadarının tarımı yapılmakta olup ülkemizde ise 15 türün küçük alanlarda da olsa ticari olarak tarımı yapılmaktadır (Arslan, 1997).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bildirimlerine göre, günümüzde insanoğlunun %80'i bitkisel ilaçlarla şifa bulmaktadır (Başer, 1998). Halk hekimliği adı altında bitkisel tedavi genellikle az gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerde daha da yaygındır. Bitkilerden elde edilen özütleri her geçen gün ilgi artmakta ve çalışmalar fazlaşmaktadır. İlaç ve baharat bitkileri; çay, aroma, boya sanayinde, tıpta ve endüstriyel alanlarda drog, uçucu yağ ve özütleri kullanılmaktadır (Anonim, 1999).

Ülkemizde ve dünya genelinde tıbbi ve aromatik bitkilerin tarımı çok fazla gelişmemiş olup doğal floradan toplanıp ticareti yapılmaktadır (Arslan, 1990). Çalışmaya konu olan limonotu (*Lippia citriodora* Kunth) bitkisinin de ülkemizde tarımı tam olarak gelişmemiştir. Ancak yapılan adaptasyon çalışması ve pazarın yavaş yavaş oluşması sonucu kültürü her geçen gün artmaktadır.

Literatürde limonotu bitkisinin birkaç sinonimi bulunmaktadır. Bunlar; *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton, *Aloysia citrodora* Paláu, *Aloysia citrodora* Paláu, orth. var., *Lippia citriodora* Kunth, orth. var., *Lippia triphylla* (L'Hér.) Kuntze'dir (Anonim, 2011). Çalışmada *Lippia citriodora* Kunth olarak anılacaktır.

Limonotunun da yer aldığı *Verbeneceae* familyası yaklaşık 175 cins ve 2.300 türü içermekte olup güney yarımkürenin tropik ve subtropik özellikle 17 ılıman bölgede dağılışı gösterdiği bildirilmektedir (Figueiredo ve ark., 2004). *Lippia citriodora* L. bitkisinin çok yıllık ve çalimsı formda bir bitki olduğu, orijininin Güney Amerika olduğu ve bitkinin uçucu yağının eczacılıkta, kozmetik ve parfüm endüstrisinde kullanıldığı

belirtilmiştir. Çalışmada, bu familyadaki türlerin yüksek miktarda monoterpen ve düşük miktarda seskiterpen içerdiği vurgulanmıştır.

Limonotu bitkisinin farklı dikim aralıklarının herba ve uçucu yağ verimi ve uçucu yağ kalitesi üzerine Yalova ekolojik koşullarında yapılan bir çalışmada, bu bölgede çok yıllık bir bitki olarak yetiştirilebileceği bildirilmiştir (Karik, 2009). Bir yetiştirme sezonunda iki hasat yapılabileceği bulunmuştur. Değişik dikim aralıklarının denendiği çalışmada en yüksek drog yaprak ve uçucu yağ verimi her iki yılda da 40 x 40 cm dikim sıklığından elde edilmiştir.

Limonotu bitkisinin yaş ve kuru dallarından, yapraklarından ve uçucu yağından faydalandığı (Bown, 1995), dokuları büzücü ve sedatif özelliği olan bitkinin özellikle sindirim sistemindeki spazmları çözücü, iştah açıcı, yatıştırıcı ve şeker hastalığına karşı günde 2-3 bardak içildiği bildirilmiştir (Baytop, 1999). Ayrıca uçucu yağının insektisit ve bakteriyosit etkiye sahip olduğu, kuru yapraklarının bitkisel çay karışımlarında limon aromalı olması nedeniyle yer aldığı ve uçucu yağının aromaterapide, sinirsel rahatsızlıklarda ve haricen sivilce ve aknelere karşı kullanıldığı belirtilmiştir (Pascual ve ark. 2001).

Mısır ekolojik koşullarında 75 x 60 cm dikim sıklığında yetiştirilen ve 3 kez biçim alınan limonotunda, taze herbadan sırası ile taze yaprak oranı %40, kuru yaprak verimi %10 olarak bulunmuştur (El-Hamidi ve ark., 1983). Uçucu yağ oranları ise taze herbada %0,37, kuru herbada %0,83, taze yaprakta %0,55 ve kuru yaprakta %1,57 olarak belirlenmiştir. 3 biçim sonunda toplam uçucu yağ verimi 4.07 L/da olarak saptanmıştır. GLC analizleri sonucunda limonotundaki ana bileşen olan citralin 3. biçimde yükseldiği (%23 - 32.9), limonen ve cineol oranlarının 3. biçimde düştüğü, (limonen %19,02 - 15,10 ve cineol %6,4 - 3,9), linalol ve geraniol oranlarının ise değişiklik göstermediği gözlenmiştir.

Limonotu ile Slovenya'da yapılan ve 4 farklı dikim sıklığı denenen bir çalışmada en yüksek drog yaprak (118kg/da) ve uçucu yağ verimi (1,193 L/da) 40 x 40 cm dikim sıklığında bulunmuştur. Yapılan GC analizleri sonucunda ise citral, limonen ve citronellol uçucu yağın ana bileşenleri olarak tespit edilmiştir (Rode, 1998).

İzmir Cumaovası'nda kültürü yapılan limonotu bitkisinde kuru yapraklardan ve yapraklı dallardan Clevenger aparatı ve su distilasyon yöntemi ile 3 saat kaynatılarak elde edilen uçucu yağlar GC/MS cihazı ile analiz edilmiştir. Uçucu yağın oranı, yapraklarda %1,2 ve yapraklı dallarda ise %1,11 olarak saptanmıştır. Uçucu yağda ise 69 tane bileşen

tanımlanmıştır (Özek ve ark., 1996). Bu uçucu yağ oranı benzer aromaya sahip oğulotu (*Melissa officinalis* L.) bitkisine göre çok daha yüksektir.

*Lippia citriodora* L. bitkisinde en iyi hasat zamanı ve uçucu yağ içeren bitki kısmını belirlemek amacıyla Çin, Şengay’da yapılan çalışmada, yapraklardan ve dallardan değişik büyüme zamanlarında çıkartılan uçucu yağın bileşimindeki değişimler araştırılmıştır. En iyi hasat zamanı Temmuz ayının ortasında öğlen saatleri olarak bulunmuştur. Yaprakların dallara göre daha fazla uçucu yağ içerdiği ve bitkinin üst bölgesindeki taze yapraklardan en yüksek miktarda uçucu yağ elde edildiği tespit edilmiştir (Shen ve ark., 2004).

Limonotu ile yapılan diğer bir çalışmada ise; Atina koşullarında, büyümenin en hızlı olduğu Mayıs ve tam çiçeklenme dönemi olan Eylül aylarında taze yapraklardan ekstrakte edilen uçucu yağlar GC-FID ve GC/MS ile analiz edilmiştir. Mayıs ayında uçucu yağın %66,3’ü ile Eylül ayında %69’unu geranial, neral ve limonen ana bileşenlerden oluştuğu tespit edilmiştir. Mayıs ve Eylül aylarında bileşenler tek tek incelendiğinde ise geranial %38,7’den %26,8’e, neral %24,5’den %21,8’e düşerken, limonen %5,8’den %17,57’e yükselmiştir. Diğer bütün bileşenler kalitatif ve kantitatif olarak çok az değişim göstermiştir (Argyropoulou ve ark., 2007).

Eşeyli ve eşeysiz olarak çoğalmakta olan bitkiler için çeşitli üretim metotları bulunmaktadır. Günümüzde klonal çoğaltım için kullanılan tekniklerin başında doku kültürü gelmektedir. Doku kültürü literatürde, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, yaprak, sap, polen tanesi, sürgün, kallus vb.) yapay besi ortamlarında ve aseptik şartlar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Bitkilerin uygun besin maddeleri ihtiyaçları, büyüme düzenleyicisi ve kültür istekleri biliniyorsa doku kültürü diğer adıyla mikroçoğaltım teknikleri kullanılarak tüm bitki türlerinin çoğaltılması teknik olarak mümkündür (Hartman ve Kester, 1975).

Mikro çoğaltım, bitki yetiştiriciliği ve genetik yönden birçok avantaj sağlamaktadır. Bunlar; hastalık ve zararlılardan arı bitki üretimi, kitlesel üretimle üretilen bitkilerde fenotip ve genotip olarak homojenite olması, alışlagelmiş yöntemlerden daha kısa süre içerisinde kültürün tamamlanması, zor üretilen türlerin daha kolay üretimi, nesli tükenen/tükenmekte olan genotiplerin nesillerinin devamlılığının sağlanması ve somaklonal varyasyon ile yeni çeşitlerin elde edilmesi olarak sıralanabilir (Özkum, 2006).

Bir tıbbi ve aromatik bitki olan *Aloysia citriodora* Palau ile yapılan *in vitro* köklendirme çalışmasında, eksplant olarak sürgün kullanılmış ve bitkinin doku kültürüne olan yanıtları incelenmiştir. Temel besi ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962)'in yarım ve dörtte birlik dozları kullanılmıştır ( $\frac{1}{2}$  MS ve  $\frac{1}{4}$  MS). Büyüme düzenleyici olarak ise BA ve NAA in farklı dozları denenmiştir. Deneme sonunda en iyi köklenmenin tam MS ve  $\frac{1}{2}$ MS'te 0,1 mg/L BA ile 0,1 mg/L NAA içeren ortamlarda olduğu bulunmuştur (Severin ve ark., 2006).

Limonotu bitkisinde daha önce kallus kültürü çalışmasına rastlanmamış, ancak limonotuna yakın bir tür olan ve mine çiçeği olarak bilinen *Verbena officinalis* L.'de yapılan çalışmada en yüksek sürgün gelişimi 13,32  $\mu$ M BA ile 5,71  $\mu$ M IAA büyüme düzenleyicilerinden elde edilmiştir. Gelişen kök sayısı bakımından 4,92  $\mu$ M IBA en etkili olurken, kök oluşturan sürgünlerin yüzdesi bakımından 5,71  $\mu$ M IAA %100 köklenme oranı ile daha başarılı olmuştur (Uçar-Türker ve ark., 2010).

Oğulotu (*Melissa officinalis* L.) bitkisinde MS besi ortamı kullanılarak bitki büyüme düzenleyicilerinin oğulotu bitkisi gelişimi üzerinde etkisinin incelendiği bir çalışmada, 11,42  $\mu$ M IAA'nın en etkili sürgün gelişimini teşvik ettiği sonucuna ulaşılmıştır (Silva ve ark., 2005).

Oreganum türlerinin *in vitro* kallus üretimi üzerine yapılan bir çalışmada 2,4-D, NAA ve BA'ın farklı yoğunlukları denenmiş en yüksek kallus verimine *Oreganum vulgare* türünde ulaşılmış, moleküler ve etken madde incelemelerinde ise türler arasında önemli farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (El-Gengaihi ve ark., 2006).

Karam ve ark. (2003), yabani adaçayı (*Salvia fruticosa*) bitkisinde kallus yoluyla hücre süspansiyon kültürüyle rosmarinik asit üretimi üzerine yapılan bir çalışmada en yüksek kök gelişimi oranı ve rosmarinik asit verimine (2,62 mg/100 mg kuru ağırlık) B5 ortamında 2,7  $\mu$ M NAA ve % 4 sukroz ilavesiyle ulaşılmıştır. En büyük kallus oranına (0,79 g/eksplant) ise MS ortamında 6,9  $\mu$ M TDZ ve 3,0  $\mu$ M IAA ilavesiyle ulaşılmıştır.

*Verbenacea* familyasından limonotunun yakın akrabası olan *Lippia alba* bitkisinin doku kültürü ile çoğaltılması ile ilgili yapılan çalışmada eksplant kaynağı olarak boğum arası içermeyen sürgünler kullanılmış ve en fazla sürgüne MS besi ortamına 5 mg/L BA ilave edilerek ulaşılmıştır. Yine aynı çalışmada sürgünlerin köklenmesi ile yapılan denemede ise, en iyi sonucu %100 köklenme ile büyüme düzenleyici içermeyen MS besi ortamı, %90 köklenme ile  $\frac{1}{2}$  MS besi ortamı vermiştir (Gupta ve ark., 2001).



*Lippia* türlerinden *Phyla nodiflora* bitkisinde sürgün oluşumu için yapılan çalışmada, eksplant olarak sürgünler kullanılmıştır. Temel besi ortamı olarak MS, büyüme düzenleyici olarak ise BA, NAA, IBA, IAA ve KIN'in farklı oranlardaki yoğunlukları denenmiştir. En iyi sonuca MS besi ortamına 2,5 mg/L BA ve 0,5 mg/L IBA ilave edilerek ulaşılmıştır (Ali-Ahmed ve ark., 2005).

Bitkiler ürettikleri doğal bileşikler sayesinde hammadde kaynağı olarak yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu doğal bileşikler bitki kimyasallarıdır ve primer ve sekonder metabolit olarak adlandırılırlar. Tıbbi ve aromatik bitkilerin özütleri sekonder metabolitler içerisindedir. Sekonder metabolitlerin üretiminde biyoreaktörler önemli rol oynamaktadır. Bitki biyoreaktörleri, sıvı ortamlar kullanılarak çok sayıda bitkinin hastalıktan arı olarak gelişmesini sağlayacak şekilde dizayn edilmiş kültür sistemleri olarak tanımlanmaktadır (Özkaynak ve Samancı, 2004). Yılmaz (2009) ise biyoreaktörleri; bitki, hayvan ve insan hücrelerini ya da başlı başına enzimleri kullanarak hammaddeleri biyolojik olarak dönüştürmek için kullanılan reaktörler olarak tanımlamıştır. Özellikle hücre kültürü yolu ile sekonder metabolitlerin yüksek miktarlarda üretilebileceği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Tripathi ve Tripathi, 2003).

Limonotunda bazı doku kültürü çalışmaları yapılmasına rağmen bu çalışmalar sürgün veya meristem kullanımı ile doğrudan bitki elde edilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Limonotunda henüz kallus kültürü çalışmalarının yapılmaması bu çalışmaya ayrı bir önem kazandırmakta ve elde edilecek sonuçlar gelecekte yapılacak olan biyorekatörler dahil biyoteknolojik ve bitki ıslahı çalışmalarına kaynak teşkil edecek niteliktedir.

### **BÖLÜM 3 MATERYAL VE YÖNTEM**

Bu araştırma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Doku Kültürü ve Biyoteknoloji Laboratuvarlarında 2010-2011 yıllarında yürütülmüştür. Bitki materyali olarak Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsünden temin edilen fideler kullanılmıştır. Bu fideler tarlaya şaşırtılıp tekrar çelik alma ve köklendirme işleminden sonra saksılara alınmış ve taze filizlerden sap ve yaprak parçaları doku kültüründe eksplant olarak kullanılmıştır.

Bu bölüm, bitkilerin steril koşullara aktarılması, denemenin kurulması, ölçümler ve verilerin analizi şeklinde dört alt bölüm başlığında değerlendirilmiştir.

#### **3.1. Bitkilerin Steril Koşullara Aktarılması**

Bitkiden alınan sap ve yaprak parçaları, sıvı sabun kullanılarak yıkanmış ve akan su altında durulanmıştır. Bu işlem sonrasında eksplantlar 30 saniye boyunca % 70'lik etanol içinde hafifçe çalkalanarak bekletilmiştir. Etanol eksplantlardan süzülerek uzaklaştırıldıktan sonra, eksplantlar doğrudan 1-2 damla Tween 20 içeren % 1'lik sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) çözeltisine aktarılmıştır. Sodyum hipoklorit (NaOHCl) olarak % 5 yoğunluktaki sade ticari çamaşır suyu kullanılmıştır. Sterilizasyon iki aşamalı olarak yapılmıştır. Birinci aşamada eksplantlar 15 dakika süre ile hipoklorit çözeltisinde çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Bu süre içerisinde bir yandan da içinde kültür işlemlerinin gerçekleştirileceği steril kabin etanol ve UV ışığı ile dezenfekte edilerek kullanıma hazırlanmıştır. Eksplantların yüzey sterilizasyonunun birinci aşama süresi biter bitmez sodyum hipokloritin uzaklaştırılması için eksplantlar 3-4 kez steril saf suyla steril kabin altında durulanmıştır. Eksplantlar istenilen ve eşit boyutlara kesilerek getirildikten sonra sterilizasyonun ikinci aşamasında steril kabin içerisinde 2-3 dakika süresince %1'lik sodyum hipoklorit içerisinde bekletilmiş, yeniden steril saf su ile durulanarak ekime hazır hale getirilmiştir. Bu şekilde yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır.

#### **3.2. Denemenin Kurulması**

Denemenin kurulması için eksplant olarak genç sürgünlerden alınan, boğum arası içermeyen sap ve yaprak parçaları kullanılmıştır. Her bir sap eksplantı yaklaşık 1 cm büyüklüğünde kesilerek kültüre alınmıştır. Yaprak eksplantları ise kesilerek 1,0 x 0,5 cm boyutlarına getirilmiştir.

Bitki doku kültürlerinde kullanılan besi ortamı ve içerikleri genotip, bitki türü, kültür tipi gibi değişik faktöre bağlı olarak farklılık gösterdiği bilinmektedir. Doku kültürü çalışmalarında sıkça kullanılan bitki besi ortamları MS, B5, LS, White, SH ve NN olarak sıralanabilir (Franklin ve Dixon, 1994; Gamborg ve Phillips, 1995). Bu araştırmada da temel besi ortamı olarak bitki doku kültürlerinde çok sık kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamı kullanılmıştır. MS içeriğinde bitkilerin yaşamları için gerekli olan su, makro ve mikro besin elementleri ve vitaminler bulunmaktadır (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** MS için kullanılan kimyasallar ve miktarları (Murashige ve Skoog, 1962)

| <b>Kimyasallar</b>                                  | <b>Yoğunluk (mg/l)</b> |
|---|------------------------|
| (NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>                   | 1650,000               |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 1900,000               |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 440,000                |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 370,000                |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 170,000                |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 27,800                 |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                | 33,600                 |
| MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O                | 22,300                 |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 8,600                  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 6,200                  |
| KI  | 0,830                  |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0,250                  |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                | 0,025                  |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 0,025                  |
| Myo-inositol  | 100,000                |
| Nicotinic acid                                      | 0,500                  |
| Pyridoxin-HCl                                       | 0,500                  |
| Thamin-HCl  | 0,100                  |
| Glisin  | 2,000                  |
| Sakkaroz  | 30000,000              |
| pH  | 5,7                    |

Büyüme düzenleyicilerin seçiminde daha önce yakın bazı tıbbi ve aromatik bitki türlerinde yapılmış doku kültürü çalışmaları dikkate alınmıştır (Uçar-Türker ve ark., 2010; Silva ve ark., 2005; El-Gengaihi ve ark., 2006; Karam ve ark., 2003; Gupta ve ark., 2001; Ali-Ahmed ve ark., 2005). Bu önceki çalışmalarda, kullanılan büyüme düzenleyicilerden NAA, 2,4-D, BA, IAA, IBA ve KIN' in farklı yoğunlukları kullanılmıştır. Bu tezde de söz konusu büyüme düzenleyicileri kullanılmıştır.

Deneme, kallus oluşumu, alt kültüre alma ve embriyogenik kallus oluşumu safhalarından oluşmuştur.

**3.2.1. Kallus Oluşumu**

Temel besi ortamı olan MS besi ortamına naftalin asetik asit (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), benzil adenin (BA) olmak üzere toplam 3 farklı büyüme düzenleyicinin farklı konsantrasyonları ilave edilmiştir (Çizelge 3.2). Besi ortamının pH değeri 5,7 olarak ayarlanmış ve katılaştırılması için 8 g/L katılaştırıcı jel (Agar-Agar) ilave edilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Kallus oluşumu için kullanılan besi ortamları

| Besi Ortamı<br>No | Büyümü Düzenleyiciler (mg/L) |       |     |
|-------------------|------------------------------|-------|-----|
|                   | NAA                          | 2,4-D | BA  |
| 1                 | -                            | -     | -   |
| 2                 | 1,0                          | -     | -   |
| 3                 | 2,0                          | -     | -   |
| 4                 | -                            | 1,0   | -   |
| 5                 | -                            | 2,0   | -   |
| 6                 | 1,0                          | -     | 0,5 |
| 7                 | 1,0                          | -     | 1,0 |
| 8                 | 2,0                          | -     | 0,5 |
| 9                 | 2,0                          | -     | 1,0 |
| 10                | -                            | 1,0   | 0,5 |
| 11                | -                            | 1,0   | 1,0 |
| 12                | -                            | 2,0   | 0,5 |
| 13                | -                            | 2,0   | 1,0 |

**3.2.2. Alt Kültüre Alma ve Embriyogenik Kallus Oluşumu**

Kallus oluşumu için denenen ortamlar arasında en iyi sonuçları; yaprak eksplantları için MS + 2,0 mg/L NAA+0,5 mg/L BA, sap eksplantları için MS + 1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA vermiştir. Sonuçları en iyi olan bu ortamlar kallus alt kültürü ve embriyogenik kallus oluşumu için kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Alt kültüre alırken kalluslar yaklaşık 0,5 x 0,5 cm boyutlarına bölünerek hazırlanmış sterilize edilmiş besi ortamına hafifçe bastırarak yerleştirilerek ve gelişimi sağlanmıştır.

**Çizelge 3.3.** Alt kültür ve embriyogenik kallus oluşumu için kullanılan besi ortamları

| Besi Ortamı<br>No | Eksplant<br>Tipi | Büyüme Düzenleyiciler (mg/L) |     |
|-------------------|------------------|------------------------------|-----|
|                   |                  | NAA                          | BA  |
| 1                 | Yaprak           | 2,0                          | 0,5 |
| 2                 | Sap              | 1,0                          | 0,5 |

Ön deneme sonucu yapılan gözlemlere göre yaprak eksplantlarının gelişimi ve elde edilen kallus miktarının fazla olması nedeniyle alt kültürde daha iyi olduğu için bundan sonraki denemelerde kallus kaynağı olarak yaprak kallusları kullanılmıştır.

### 3.2.3. Embriyogenik Kallus Oluşumu

Meristem içermeyen somatik hücrelerden embriyo oluşumuna somatik embriyogenesis denir. Bu tezde somatik embriyo gelişimi gösteren kalluslar embriyogenik kallus olarak ifade edilecektir. Alt kültüre aldığımız kalluslar sitokin oranı artırılmış besi ortamına aktarılmış ve sürgün oluşumu için teşvik edilmiştir. Mine çiçeği (*Verbena officinalis* L.)'nin gövde eksplantlarından adventif sürgün oluşumu denemesinde (Uçar-Türker, 2010) kullanılan BA ve IAA ile *Lippia alba*'da yapılan doku kültürü çalışmasında (Gupta ve ark., 2001) kullanılan BA ve KIN büyüme düzenleyicileri denenmiştir (Çizelge 3.4). Bu çalışmaların temel alınmasının nedeni kullanılan türlerin limonotuna en yakın türler olmasıdır. Denemenin kurulması için kullanılan kalluslar, bir önceki denemede belirlenen MS + 2,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA besi ortamında üretilen kalluslardır. Deneme her bir kaptaki 4 kallus eksplantı olacak şekilde kurulmuştur. Kullanılan kallusların boyutları 0,5 x 0,5 cm'dir.

### 3.3. Ölçümler

Kültürler iklim odasında tutulmak koşulu ile gelişimleri ve varsa kontamine olmuş kapların düzenli takibi yapılmıştır. Kontamine olmuş kaplar başka bir odada açılarak imha edilmiştir. Yetiştirme odası 25±2°C sabit sıcaklıkta, 16 saat fotoperiyot uygulamalı ve ısı vermeyen beyaz florasan (90 mmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> Photosynthetic photon flux density) ile aydınlatılmıştır.

Şekil 3.1'de limonotunda doku kültürü çalışmalarından genel görünümüne ait fotoğraflar görülmektedir. *In vitro* ölçüm ve gözlemler 30 günlük yetiştirme süresinin sonunda yapılmıştır. Bunlar:

**Çizelge 3.4.** Embriyogenik kallus oluşumu için kullanılan besi ortamları

| Besi Ortamı<br>No* | Büyüme Düzenleyiciler (mg/L) |     |     |     |
|--------------------|------------------------------|-----|-----|-----|
|                    | BA                           | IAA | KIN | IBA |
| 1                  | -                            | -   | -   | -   |
| 2                  | 0,5                          | -   | -   | -   |
| 3                  | 1,0                          | -   | -   | -   |
| 4                  | -                            | 2,0 | -   | -   |
| 5                  | 0,5                          | 1,0 | -   | -   |
| 6                  | 0,5                          | 2,0 | -   | -   |
| 7                  | 1,0                          | 1,0 | -   | -   |
| 8                  | 1,0                          | 2,0 | -   | -   |
| 9                  | 1,5                          | 1,0 | -   | -   |
| 10                 | 1,5                          | 2,0 | -   | -   |
| 11                 | -                            | -   | 0,5 | -   |
| 12                 | -                            | -   | 1,0 | -   |
| 13                 | -                            | -   | 0,5 | 0,5 |
| 14                 | -                            | -   | 1,0 | 0,5 |
| 15                 | -                            | -   | 0,5 | 1,0 |
| 16                 | -                            | -   | 1,0 | 1,0 |
| 17                 | -                            | -   | 0,5 | 2,0 |
| 18                 | -                            | -   | 1,0 | 2,0 |
| 19                 | 2,5                          | -   | -   | -   |
| 20                 | 5,0                          | -   | -   | -   |
| 21                 | -                            | -   | 5,0 | -   |
| 22                 | 2,5                          | -   | -   | 0,5 |
| 23                 | 5,0                          | -   | -   | 0,5 |
| 24                 | -                            | -   | 5,0 | 0,5 |
| 25                 | -                            | 0,5 | 0,5 | -   |
| 26                 | 2,5                          | -   | 2,5 | -   |
| 27                 | 2,5                          | -   | 2,5 | 0,5 |

\* Çizelgede olmayıp denenen ve kontaminasyon sonucu veri elde edilemeyen iki ortam olan MS + 1,5 mg/L BA ile MS + 1,5mg/L IAA denemeden çıkartılmıştır.

**Kallus ağırlığı:** Besi ortamından ayrılan ve üzerlerindeki ortam kalıntıları temizlenen kallusların bekletilmeden hassas terazide tartılmıştır.

**Kallus oluşturma (gelişim) yüzdesi:** Bir yetiştirme kabında bulunan tüm eksplantlardan kallus geliştirenlerin yüzde olarak belirlenmesidir.

**Kallus boyutu:** Her bir kallusun eni ve boyu ölçülüp ortalaması alınarak cm olarak ifade edilmiştir.

**Kallus skoru:** 0'dan 9'a kadar tek sayılarla değerlendirilmiş küçükten büyüğe doğru değerler verilmiştir. Buna göre; 0=ölü, 1=çok küçük, 3=küçük, 5=Orta, 7=büyük, 9=çok büyük.

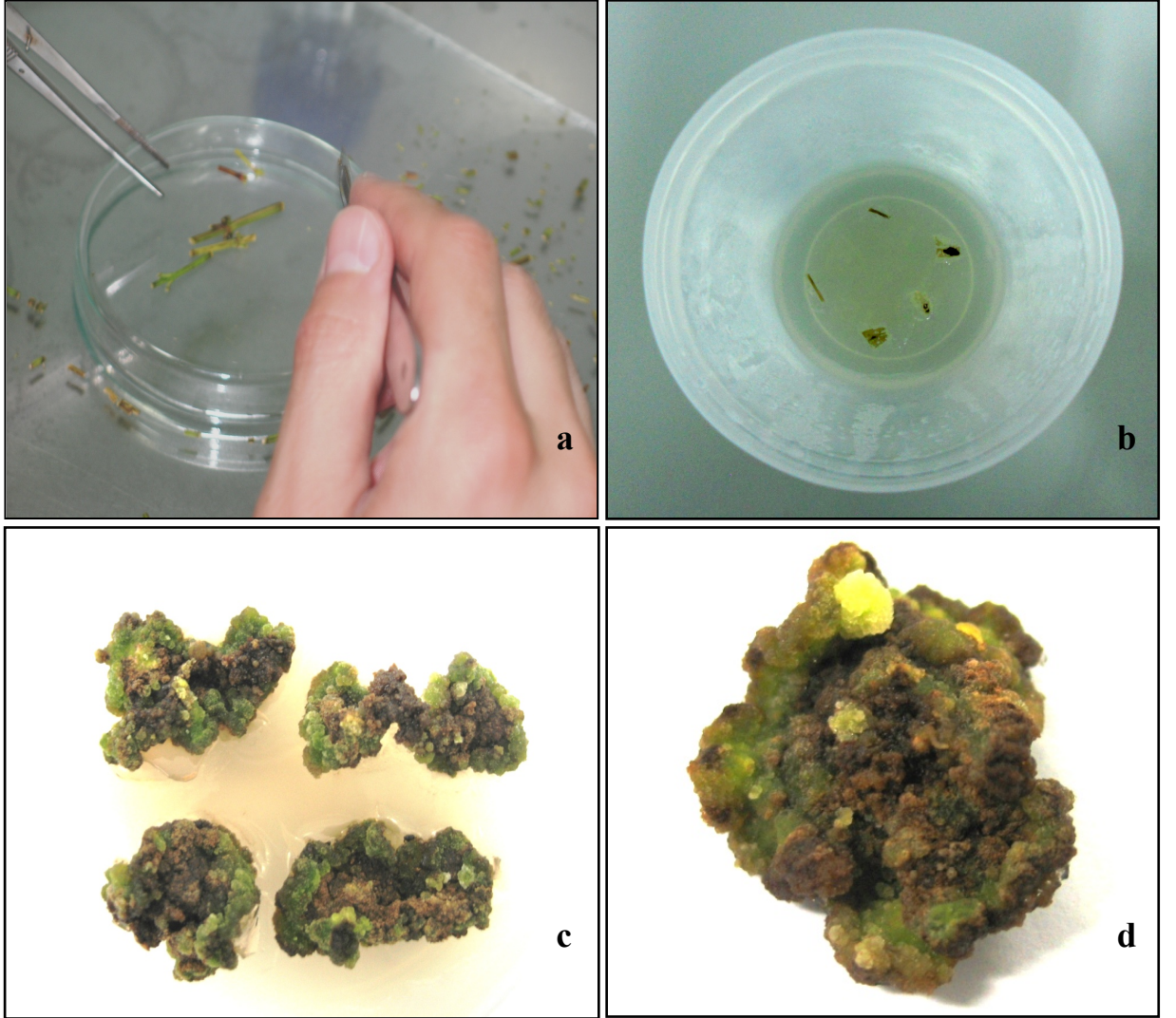
**Kallus rengi skoru:** 1'den 9'a kadar tek sayılarla değerlendirilerek açıktan koyu renge doğru değerler verilmiştir (Turhan, 1997). Buna göre; (1) koyu yeşil, (3) yeşil, (5) açık kahve, (7) kahve, (9) koyu kahverengidir.

### **3.4. Yetiştirme Koşulları**

Yetiştirme kabı olarak şeffaf, otoklavlanabilir, vida kapaklı 0,33 ml hacminde plastik kaplar kullanılmıştır. Her bir kaba 40 ml besi ortamı konulmuş ve kapakları yarı açık şekilde 121°C sıcaklıkta ve 1,06 bar basınçlı bir otoklavda (Nüve-Steam Sterilizer-OT 032, TS 5626) 20 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Yetiştirme koşulları, 25±2°C sabit sıcaklıkta, 16 saat fotoperiyot uygulamalı ve ısı vermeyen beyaz florasan ile aydınlatılan kontrollü odadır.

### **3.5. Deneme Deseni ve İstatistikî Analiz**

Denemeler 5 tekerrürde ve her bir tekerrür; kallus oluşumu için 3 yaprak 3 sap eksplantı, alt kültür ve somatik embriyogenesis için 4 kallus içerecek şekilde kurulmuştur. Deneme deseni olarak tesadüf blokları deneme deseni kullanılmıştır. Elde edilen verilerin istatistikî analizi SAS programında PROC GLM'e göre analiz edilmiştir (SAS Institute, 1998). Ortalamalar arasındaki farklar ise, %5 düzeyinde LSD testine göre belirlenmiştir.



**Şekil 3.1.** Limonotunda doku kültürü çalışmalarından genel görünüm (**a.** Eksplant hazırlığı, **b.** Ekim sonrası yetiştirme kabı içerisindeki eksplantlar, **c.** Yetiştirme kabı içerisindeki gelişen kalluslar, **d.** Embriyogenik kallus).



**BÖLÜM 4****ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA**

Araştırmada, limonotunun doku kültüründe farklı büyüme düzenleyici içeren besi ortamlarında kallus ve embriyogenik kallus oluşumu üzerine etkileri belirlenmiştir. Kallus oluşumu için NAA, 2,4- D ve BA, somatik embriyogenesis için ise BA, IAA, IBA ve KIN büyüme düzenleyicilerinin farklı dozları MS besi ortamına ilave edilerek denenmiştir. Her bir denemedeki uygulamalar için 30. günün sonunda çeşitli ölçüm ve gözlemler alınmıştır. Alınan bu ölçümlerden elde edilen verilerin istatistikî analiz sonuçları ve değerlendirmeleri başlıklar halinde aşağıda verilmiştir.

**4.1. Kallus Oluşumu**

Aşamalar halinde kurulan denemelerin ilk kısmında Yalova Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsünden temin edilen limonotu bitkilerinin genç sürgünlerden sap ve yaprakları alınarak sterilizasyon yapılmıştır. Elde edilen steril bitki eksplantları besi ortamlarına yerleştirilerek farklı büyüme düzenleyici ve miktarları içeren 13 farklı besi ortamı kallus oluşumu için denenmiştir. Araştırmanın bu aşamasındaki bulgular, her bir karakter ayrı ayrı olacak şekilde sunulmuş ve tartışılmıştır.

**4.1.1. Kallus Oluşturma Yüzdesi**

Varyans analizi sonuçlarına göre kallus oluşturma yüzdesi açısından kullanılan yaprak ve gövde eksplantları arasındaki fark önemli bulunmuştur. Farklı dozlarda NAA ve BA içeren besi ortamlarının, yüzde kallus oluşturma üzerine etkisi de önemli bulunmuştur (Çizelge 4.1). Yine eksplant x besi ortamı interaksyonu önemli bulunmuş, bu da kallus oluşumu için yaprak ya da gövde eksplantlarından farklı besi ortamlarında farklı yanıtlar alındığı göstermiştir. Bu nedenle kallus oluşturma yüzdesi için Çizelge 4.1’de tüm eksplant ve besi ortamları birlikte değerlendirilerek karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.1.** Limonotunda kallus oluşturma yüzdesine ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı      | Serbestlik derecesi | Olasılık (%) |
|------------------------|---------------------|--------------|
| Eksplant               | 1                   | 0,0062       |
| Besi ortamı            | 12                  | <0,0001      |
| Eksplant x Besi ortamı | 12                  | <0,0001      |

Kallus oluşturma yüzdesine ait LSD testine göre ortalamalar arasında önemli farklar bulunmuştur. Çizelge 4.2'ye bakıldığında, yaprak eksplantlarında en fazla kallus oluşumu sap eksplantlarında %100,00 ile MS + 1,0 mg/L NAA ve yaprak eksplantlarında %86,67 oran ile MS + 2,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA ortamlarından elde edilmiştir. 0-1-2-3 NAA ve 0-0,5-1 BAP kombinasyonlarıyla *Cananga odorata* çiçek petal eksplantlarının kallus oluşumunu inceledikleri çalışmalarında en yüksek biyomas akümülyasyonunu ve kallus oluşum yüzdesini 3,0 mg/L NAA ve 0,5 mg/L BAP içeren B5 ve MS ortamlarından elde etmişlerdir (Nurazah ve ark, 2009).

**Çizelge 4.2.** Limonotunda eksplant ve besi ortamına bağlı olarak yüzde kallus oluşturma (LSD<sub>0,05</sub>: 30,156)

| Besi ortamı (mg/L)      | Kallus oluşturma (%)   |                 |
|-------------------------|------------------------|-----------------|
|                         | Yaprak                 | Sap             |
| MS                      | 23,09 e-g <sup>1</sup> | 39,75 d-f       |
| MS + 1,0 NAA            | 60,00 b-d              | <b>100,00 a</b> |
| MS + 2,0 NAA            | 66,67 b-d              | 88,50 ab        |
| MS + 1,0 2,4-D          | 67,50 b-d              | 45,24 c-e       |
| MS + 2,0 2,4-D          | 11,97 fg               | 0,86 g          |
| MS + 1,0 NAA + 0,5 BA   | 73,33 a-c              | 86,67 ab        |
| MS + 1,0 NAA + 1,0 BA   | 83,33 ab               | 75,00 a-c       |
| MS + 2,0 NAA + 0,5 BA   | <b>86,67 ab</b>        | 26,67 e-g       |
| MS + 2,0 NAA + 1,0 BA   | 80,00 ab               | 16,67 e-g       |
| MS + 1,0 2,4-D + 0,5 BA | 60,00 b-d              | 0,00 g          |
| MS + 1,0 2,4-D + 1,0 BA | 20,00 e-g              | 0,00 g          |
| MS + 2,0 2,4-D + 0,5 BA | 0,00 g                 | 0,00 g          |
| MS + 2,0 2,4-D + 1,0 BA | 0,00 g                 | 0,00 g          |

<sup>1</sup>: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.

#### 4.1.2. Kallus Büyüklüğü

Kallus büyüklüğü, kallus gelişiminin belirlenmesinde önemli bir karakterdir. Her ne kadar kallus oluşum yüzdesi önemliyse de oluşan kallusların boyut bakımından büyük olması kallusların alt kültüre alınmasında parçalanarak kullanılması bakımından daha avantajlıdır. Bu karaktere ait verilerin varyans analizine göre, kullanılan eksplantın, besi

ortamının ve eksplant x besi ortamı interaksyonunun kallus büyüklüğüne etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** Limonotunda kallus büyüklüğüne ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon kaynağı      | Serbestlik derecesi | Olasılık (%) |
|------------------------|---------------------|--------------|
| Eksplant               | 1                   | 0,0070       |
| Besi ortamı            | 12                  | <0,0001      |
| Eksplant x Besi ortamı | 12                  | <0,0001      |

Eksplant x besi ortamı interaksyonu önemli çıktığı için eksplant ve besi ortamlarına ait kallus büyüklüğü ortalamalarının karşılaştırılması burada sunulmamasına rağmen tüm besi ortamlarında yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların büyüklükleri daha fazla olmuştur. Hem eksplant hem de besi ortamının değerlendirildiği LSD testi sonuçları Çizelge 4.4’te verilmiştir. En büyük kalluslar 16,35 mm ortalama ile MS + 2,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA ve 15,50 mm ortalama ile MS + 1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA ortamlarında yaprak eksplantı kullanımı ile elde edilmiştir.

*Thymus sipyleus* Boiss. ve *Sideritis sipylea* Boiss. bitki türlerinin kallus oluşumu için MS + 0,4 mg/L NAA besi ortamının uygun olduğu bulunmuştur (Yürekli ve Baba, 1995). Diğer bir araştırmada tıbbi bir tür olan *Saussurea laniceps* Hand.-Mazz. bitkisinin kallus kültüründe temel besi ortamı olarak MS kullanılmış, büyüme düzenleyici olarak da BA ve NAA’nın farklı dozları kullanılmıştır (Chen ve Li, 2005). Kullanılan büyüme düzenleyicilerin cinsi ve yoğunluğuna göre kallus gelişiminde farklılıkların olduğu bildirilmiştir.

Limonotunda yapılan bu çalışmada benzer çalışmalarda olduğu gibi temel besi ortamı olarak MS’in uygun olduğu en iyi kallus gelişiminin NAA ve BA içeren besi ortamlarından elde edildiği gözlenmiştir. Özetle, besi ortamı ve kullanılan büyüme düzenleyicisine bağlı olarak kallus büyüklüğünün farklılıklar gösterdiği söylenebilir.

**Çizelge 4.4.** Limonotunda eksplant ve besi ortamına bağlı kallus büyüklüğü (LSD<sub>0,05</sub>: 4,304)

| Besi ortamı (mg/L)      | Kallus büyüklüğü (mm) |           |
|-------------------------|-----------------------|-----------|
|                         | Yaprak                | Sap       |
| MS                      | 1,71 g-1 <sup>1</sup> | 3,01 f-1  |
| MS + 1,0 NAA            | 5,23 e-h              | 14,08 ab  |
| MS + 2,0 NAA            | 6,67 d-f              | 10,57 b-d |
| MS + 1,0 2,4-D          | 5,63 e-g              | 3,96 f-1  |
| MS + 2,0 2,4-D          | 1,15 h1               | 0,15 1    |
| MS + 1,0 NAA + 0,5 BA   | 10,17 b-d             | 12,87 a-c |
| MS + 1,0 NAA + 1,0 BA   | 12,96 a-c             | 8,88 c-e  |
| MS + 2,0 NAA + 0,5 BA   | <b>16,35 a</b>        | 4,10 f-1  |
| MS + 2,0 NAA + 1,0 BA   | <b>15,50 a</b>        | 2,38 f-1  |
| MS + 1,0 2,4-D + 0,5 BA | 4,10 f-1              | 0,00 1    |
| MS + 1,0 2,4-D + 1,0 BA | 1,90 g-1              | 0,00 1    |
| MS + 2,0 2,4-D + 0,5 BA | 0,00 1                | 0,00 1    |
| MS + 2,0 2,4-D + 1,0 BA | 0,00 1                | 0,00 1    |

<sup>1</sup>: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.

#### 4.1.3. Kallus Skoru

Kallus skoru *in vitro* denemelerde kallusun gözlemsel olarak tespit edilen gelişimidir. Bazen kallusun eni boyu ölçülerek alınan ölçümler kallusun dikey gelişimini göz ardı edebilmektedir. Bu görsel kallus gelişimi bir skala kullanımı ile sayısal forma dönüştürülebilmektedir. Kallus gelişimi hacimsel veya ağırlık olarak belirlenebilse de eğer bu steril kalluslar kullanılacaksa bu mümkün olmamaktadır. Bu nedenle kallus skoru hacimsel gelişim hakkında bilgi verirken, kallus hücre topluluklarının birbirleri arasındaki farklılıkları kalitatif bakımdan ortaya koyar. Kallus skorları için, 0=ölü, 1=çok küçük, 3=küçük, 5=Orta, 7=büyük, 9=çok büyük skalası kullanılmıştır. Kallus skoru ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları incelendiğinde eksplantın, besi ortamının ve interakasyonlarının kallus skoru üzerine etkileri yüksek düzeyde önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** Limonotunda kallus skoruna ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon kaynağı      | Serbestlik derecesi | Olasılık (%) |
|------------------------|---------------------|--------------|
| Eksplant               | 1                   | 0,0063       |
| Besi ortamı            | 12                  | <0,0001      |
| Eksplant x Besi ortamı | 12                  | <0,0001      |

Çizelge 4.6’da kallus skoru bakımından farklılıklar gözlemlendiği görülmektedir. Farklı oranlardaki oksin ve sitokin oranlarının interaksiyonları eksplant tipleri üzerine farklı yanıtlar vermiştir. LSD testine göre, en yüksek kallus skoru 7,40 ile MS + 2,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA içeren besi ortamındaki yaprak eksplantından elde edilmiştir. Kallus oluşturan besi ortamlarında en düşük kallus skoru ise 1,00 ile MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA içeren besi ortamındaki yaprak eksplantlarından elde edilmiştir.

**Çizelge 4.6.** Limonotunda eksplant ve besi ortamına bağlı kallus skoru (LSD<sub>0,05</sub>: 1,670)

| Besi ortamı (mg/L)      | Kallus skoru        |          |
|-------------------------|---------------------|----------|
|                         | Yaprak              | Sap      |
| MS                      | 0,29 e <sup>1</sup> | 0,45 e   |
| MS + 1,0 NAA            | 0,53 e              | 4,67 b   |
| MS + 2,0 NAA            | 1,50 de             | 3,07 b-d |
| MS + 1,0 2,4-D          | 0,89 e              | 0,44 e   |
| MS + 2,0 2,4-D          | 0,17 e              | 0,06 e   |
| MS + 1,0 NAA + 0,5 BA   | 3,40 bc             | 4,47 b   |
| MS + 1,0 NAA + 1,0 BA   | 4,67 b              | 2,80 cd  |
| MS + 2,0 NAA + 0,5 BA   | <b>7,40 a</b>       | 1,47 de  |
| MS + 2,0 NAA + 1,0 BA   | <b>6,40 a</b>       | 0,83 e   |
| MS + 1,0 2,4-D + 0,5 BA | 1,00 e              | 0,00 e   |
| MS + 1,0 2,4-D + 1,0 BA | 0,47 e              | 0,00 e   |
| MS + 2,0 2,4-D + 0,5 BA | 0,00 e              | 0,00 e   |
| MS + 2,0 2,4-D + 1,0 BA | 0,00 e              | 0,00 e   |

1: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.

Kallus skor skalası: 0=ölü, 1=çok küçük, 3=küçük, 5=Orta, 7=büyük, 9=çok büyük.

Türkiye endemiği *Astragalus chrysocholorus*'un *in vitro* doku kültürüne optimizasyonu, çoğaltımı ve sekonder metabolitlerinin araştırıldığı çalışmada sürgün eksplantları kullanılmıştır. Kallus oluşumu, temel besi ortamı MS olan 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli besi ortamında gerçekleşmiştir (Arı ve ark., 2002). Lotus bitkisi *Nelumbo nucifera* Geartn.'de yapılan çalışmada MS temel besi ortamına 2,4-D, Kinetin ve BA'nin farklı dozları eklenerek kallus gelişimi ve somatik embriyo oluşumu gözlenmiştir (Arunyanarat ve Chaitrayagun, 2005). 12 haftalık yetiştirme süresi sonunda 6,0 µM 2,4-D ve 0,5 µM BA içeren besi ortamında gelişen kalluslarda en iyi kallus skoru tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, kallus skoru eksplant türü ve besi ortamına bağlı olarak büyük farklılıklar göstermekte olup, bu parametrelerin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

#### **4.1.4. Kallus Rengi**

Kallus rengi *in vitro* denemelerde kallusun canlılığı, gelişimi ve tipi hakkında bilgiler vermektedir. Kallus rengi ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları incelendiğinde denenen besi ortamlarının ve eksplant x besi ortamı interaksyonunun kallus rengine etkisinin önemli düzeyde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Diğer önceki karakterlerin aksine eksplantlar arasında kallus rengi bakımından önemli bir farkın olmadığı görülmektedir.

**Çizelge 4.7.** Limonotunda kallus rengine ait varyans analiz sonuçları

| <b>Varyasyon kaynağı</b> | <b>Serbestlik derecesi</b> | <b>Olasılık (%)</b> |
|--------------------------|----------------------------|---------------------|
| Eksplant                 | 1                          | 0,9308              |
| Besi ortamı              | 12                         | <0,0001             |
| Eksplant x Besi ortamı   | 12                         | <0,0001             |

Kallus rengi de 1'den 9'a kadar değişen bir skala yardımıyla belirlenmiştir. Buna göre 1=koyu yeşil, 3=yeşil, 5=açık yeşil, 7=sarımsı yeşil, 9=kahverengidir (Turhan, 1997). Kallus rengine ilişkin ortalamalar Çizelge 4.8'de verilmiştir. Kallus renginin genel olarak ortam ve eksplant türüne göre değişiklik gösterdiği görülmektedir. LSD testine göre 7,11 ortalama değer ile en yüksek renk skoru MS + 2,0 mg/L NAA içeren besi ortamından elde edilmiştir. Kallus oluşan besi ortamlarında en düşük kallus rengi skoru 1,03 ise MS + 2,0

mg/L 2,4-D içeren besi ortamından elde edilmiştir. Renk skalasına göre 1,03 değeri koyu yeşil, 7,11 değeri ise sarımsı yeşil anlamına gelmektedir.

*Cananga odorata* bitkisi petal yapraklarından kallus rejenerasyonu çalışmasında MS ve B5 ortamına 3,0 mg/L NAA ve 0,50 mg/L BAP ilavesinde kolay dağılabilen soluk ve beyaz kalluslar elde edilmiştir (Nurazah ve ark., 1999). BA ilaveli ortamlarda NAA'ın azalmasıyla kırmızımsı beyaz renk her iki büyüme düzenleyicinin yüksek konantrasyonunda da kahverengi ve daha kompakt yapıda kalluslar görülmüştür.

*Citrus grandis* L., Osbeck (pummelo) genotipinin yaprak eksplantlarından kallus oluşumu ve sürgün gelişimi çalışmasında, pummelo tohumlarından elde edilen bitkinin yapraklarından kallus oluşumunu sağlamak amacıyla yedi farklı oksin konsantrasyonları içeren besi ortamı kullanılmıştır. 2,4-D içeren besi ortamı kallus oluşumu için en etkili bulunmuştur. 0,9 ve 0,4  $\mu$ M 2,4-D içeren besi ortamları yeşil renkli sıkı yapılı kalluslar meydana getirmişlerdir (Tao ve ark., 2002). Kallus renginin kallus yapısı hakkında bilgi vermesi bakımından önemlidir. Genellikle açık renkli yani fazla klorofil içermeyen kallusların daha yumuşak ve dağılabilir formda olması ile ilişkilidir. Bu gibi kalluslar da hücre süspansiyon kültürüne geçişte kolaylık sağlamaktadır. Yaptığımız çalışmada ise kallus renginde çok farklılıklar olduğu gözlemlenmiş, eksplant tipi ve besi ortamına bağlı olarak kallus renginin değişiklik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

**Çizelge 4.8.** Limonotunda eksplant ve besi ortamına bağlı kallus rengi (LSD<sub>0,05</sub>: 2,401)

| Besi ortamı (mg/L)      | Kallus rengi          |               |
|-------------------------|-----------------------|---------------|
|                         | Yaprak                | Sap           |
| MS                      | 1,81 g-j <sup>1</sup> | 3,53 d-h      |
| MS + 1,0 NAA            | 4,53 b-f              | 6,84 ab       |
| MS + 2,0 NAA            | 5,33 a-e              | <b>7,11 a</b> |
| MS + 1,0 2,4-D          | 5,83 a-d              | 4,06 c-g      |
| MS + 2,0 2,4-D          | 1,03 ij               | 0,03 j        |
| MS + 1,0 NAA + 0,5 BA   | 2,20 f-j              | 6,33 a-c      |
| MS + 1,0 NAA + 1,0 BA   | 1,50 h-j              | 3,58 d-h      |
| MS + 2,0 NAA + 0,5 BA   | 3,00 e-ı              | 2,00 g-j      |
| MS + 2,0 NAA + 1,0 BA   | 1,47 h-j              | 0,67 j        |
| MS + 1,0 2,4-D + 0,5 BA | 5,40 a-e              | 0,00 j        |
| MS + 1,0 2,4-D + 1,0 BA | 1,67 g-j              | 0,00 j        |
| MS + 2,0 2,4-D + 0,5 BA | 0,00 j                | 0,00 j        |
| MS + 2,0 2,4-D + 1,0 BA | 0,00 j                | 0,00 j        |

<sup>1</sup>: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.

Kallus renk skalası: 1=koyu yeşil, 3=yeşil, 5=açık yeşil, 7=sarımsı yeşil, 9=kahve.

#### 4.1.5. Kallus Ağırlığı

Kallus ağırlığı ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları incelendiğinde besi ortamı ve eksplant x besi ortamı interaksiyonun önemli olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.9).

**Çizelge 4.9.** Limonotunda kallus ağırlığına ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon kaynağı      | Serbestlik derecesi | Olasılık (%) |
|------------------------|---------------------|--------------|
| Eksplant               | 1                   | 0,2275       |
| Besi ortamı            | 12                  | <0,0001      |
| Eksplant x Besi ortamı | 12                  | <0,0001      |

Deneme sonunda üzerlerindeki agar parçaları temizlenen kalluslar bekletilmeden tartılmış, nem kaybı yoluyla oluşabilecek hata payı azaltılmıştır. Kallus ağırlığına ilişkin Çizelge 4.10'da genel olarak farklılıklar gözlenmektedir. LSD testine göre 1,58g ortalama



değer ile en ağır kallus MS + 2,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA ve MS + 2,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA içeren besi ortamındaki yaprak eksplantlarından elde edilmiştir (Çizelge, 4.10).

*Medicago sativa* L. bitkisi ile yapılan bir çalışmada, farklı oksinler kullanılarak somatik embriyo üretimi amaçlanmıştır (Süle, 2005). Elçi yonca çeşidine ait tohumlar *in vitro* ortamda çimlendirilmiş ve 6 günlük fidelerden hipokotil ve kotiledon segmentleri, 1 mg/L 2,4-D, NAA, pikloram veya dicamba + 0,2 mg/L KIN içeren SH ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma sonunda kullanılan oksin çeşidine bağlı olarak kallus indüksiyon oranı % 23,6 ile % 50,8 arasında değişmiş ve en yüksek değer 2,4-D oksin grubu büyüme düzenleyici içeren ortamlardan elde edilmiştir. Oluşan kallusların ağırlığı ortam kombinasyonlarına bağlı olarak 0,660 mg ile 1,472 mg arasında değişim gösterirken, picloramın ilave edildiği besi ortamlarından en yüksek sonuçlar alınmıştır. Çalışmamızda ise temel besi ortamı olan MS besi ortamına NAA ve BA'in iki dozunda kallus ağırlığı olarak benzer sonuçlar alınmıştır.

**Çizelge 4.10.** Limonotunda eksplant ve besi ortamına bağlı kallus ağırlığı (LSD<sub>0,05</sub>: 0,429)

| Besi ortamı (mg/L)      | Kallus ağırlığı (gr)  |          |
|-------------------------|-----------------------|----------|
|                         | Yaprak                | Sap      |
| MS                      | 0.05 g-1 <sup>2</sup> | 0.07 g-1 |
| MS + 1,0 NAA            | 0.19 f-1              | 0.99 bc  |
| MS + 2,0 NAA            | 0.21 e-1              | 0.67 cd  |
| MS + 1,0 2,4-D          | 0.22 e-1              | 0.15 g-1 |
| MS + 2,0 2,4-D          | 0.07 g-1              | 0.03 h1  |
| MS + 1,0 NAA + 0,5 BA   | 0.59 c-f              | 1.18 ab  |
| MS + 1,0 NAA + 1,0 BA   | 0.92 bc               | 0.47 d-g |
| MS + 2,0 NAA + 0,5 BA   | <b>1.58 a</b>         | 0.62 c-e |
| MS + 2,0 NAA + 1,0 BA   | <b>1.58 a</b>         | 0.44 d-h |
| MS + 1,0 2,4-D + 0,5 BA | 0.07 g-1              | 0.00 1   |
| MS + 1,0 2,4-D + 1,0 BA | 0.09 g-1              | 0.00 1   |
| MS + 2,0 2,4-D + 0,5 BA | 0.00 1                | 0.00 1   |
| MS + 2,0 2,4-D + 1,0 BA | 0.00 1                | 0.00 1   |

<sup>1</sup>: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.

#### **4.1.6. Kallus Oluşumu Denemesinden Ölçülen Karakterler Arasındaki Korelasyonlar**

Çizelge 4.11’de kallus oluşumu denemesinde ölçülen karakterler arasındaki korelasyon katsayıları belirtilmiştir. Korelasyon katsayısının yüksek olması ölçülen karakterler arasındaki ilişkinin yakınlığını göstermektedir. Diğer taraftan bu ilişkinin olması, bu karakterlerin birbirine bağlı olduğunu da göstermektedir.

Buna göre Çizelge 4.11’e bakıldığında tüm karakterler arasındaki korelasyonlar önemli bulunmuştur. Kallus rengi ile kallus skoru arasındaki korelasyon katsayısı (0,380) hariç diğer karakterler arasındaki katsayılar ise daha yüksek bulunmuştur. Aralarında çok yüksek ve önemli ilişki bulunan bu karakterler, gelecekteki çalışmalarda ölçülen karakterlerin azaltılmasında fayda sağlayabilir.

**Çizelge 4.11.** Limonotunda kallus oluşumu denemesinde ölçülen karakterler arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri

| Karakterler     | Kallus oluşturma yüzdesi | Kallus büyüklüğü | Kallus skoru |
|-----------------|--------------------------|------------------|--------------|
| Kallus skoru    | 0,778*                   | 0,956*           |              |
| Kallus rengi    | 0,796*                   | 0,550*           | 0,380*       |
| Kallus ağırlığı | 0,693*                   | 0,898*           | 0,936*       |

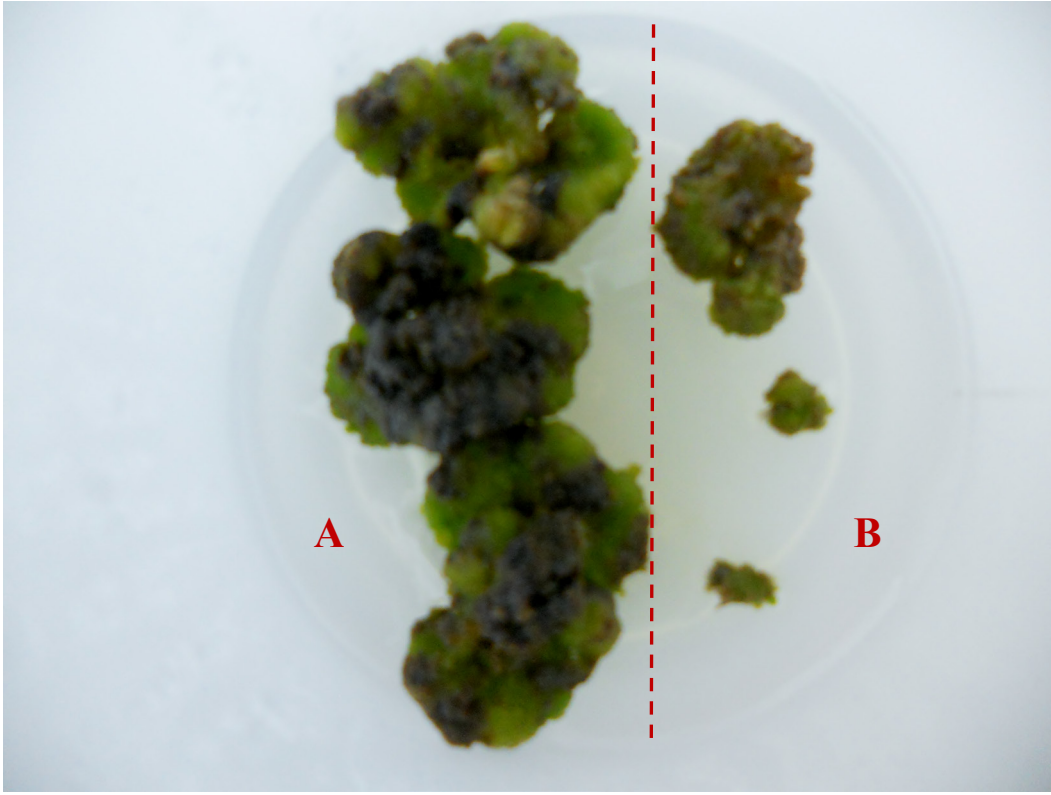
\* Önemlilik düzeyleri <0,0001’dir.

#### **4.1.7. Kallus Oluşumu Denemesine İlişkin Sonuç**

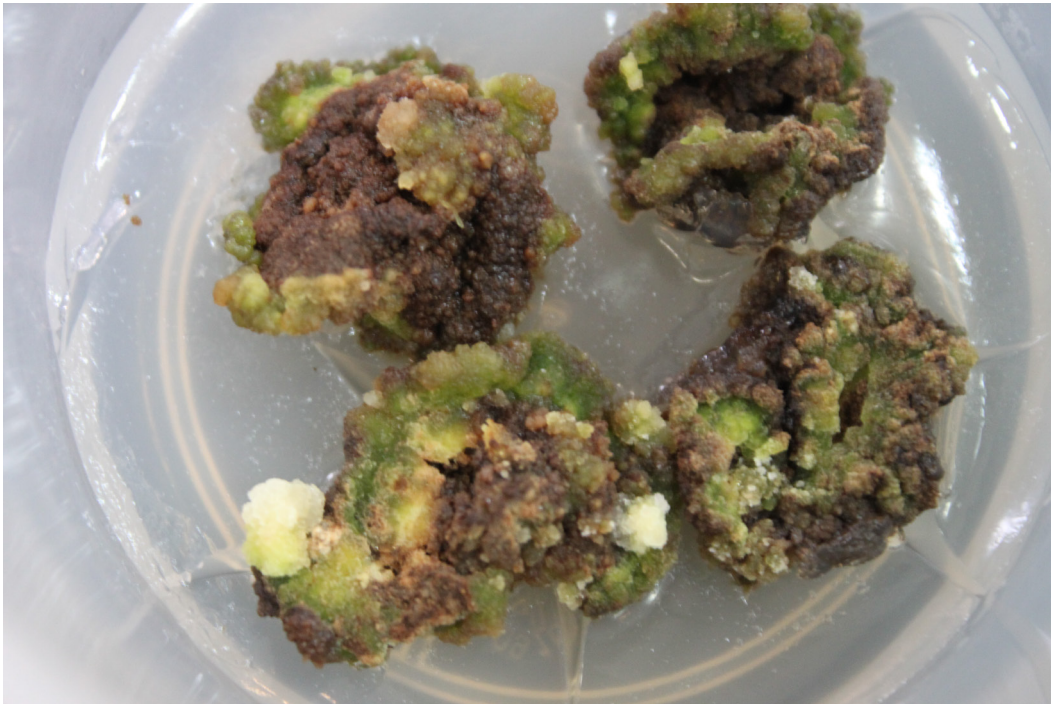
Yaptığımız bu tez çalışmasında sap eksplantlarında kallus gelişim yüzdesi yapraklara göre biraz daha yüksek olmasına rağmen kallus büyüklüğü ve kallus skoru için yaprak eksplantları daha üstün özellikler göstermiştir. Ayrıca yapılan bir ön denemede yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslar kültüre alma ve denemenin sürdürülebilirliği bakımından daha iyi sonuç vermiştir. Sap eksplantlarından gelişen kallusların alt kültüre alınması sırasında kallusların çok sert ve kırılabilir olmaları nedeniyle kallusların eşit büyüklükte bölünmesinde sorun oluşturmuştur.

Sonuç olarak, limonotu *in vitro* kallus oluşumu üzerine 13 farklı besi ortamı denenmiştir ve incelenen parametreler ışığında en uygun besi ortamının yaprak eksplantlarının geliştirildiği MS + 2,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA’lı ortamlar olduğu belirlenmiştir. Denemenin devamında embriyogenik kallus oluşumu için yaprak

eksplantları ve MS + 2,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA ortamında geliştirilen kalluslar kullanılmıştır.



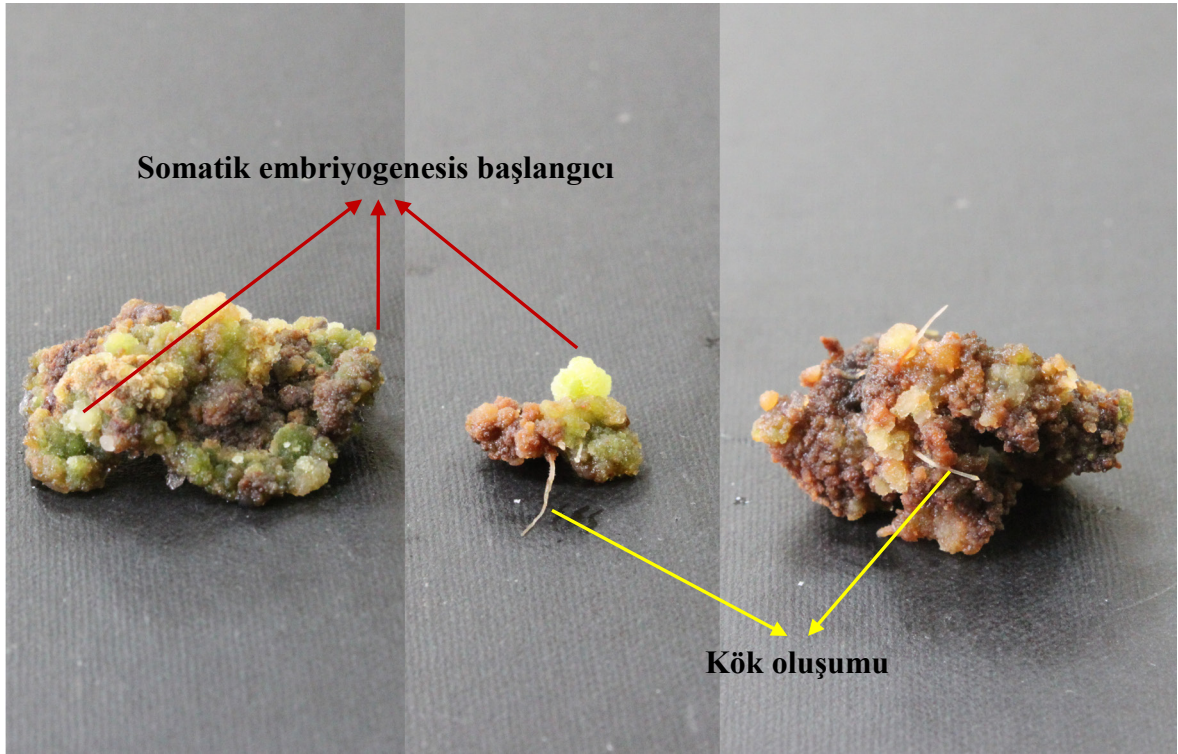
**Şekil 4.1.** Eksplantlardan kallus gelişimi (A: Yaprak kallusu, B: Sap (Gövde) kallusu).



**Şekil 4.2.** Embriyogenik kallus denemesi için yaprak eksplantlarından kallus üretimi.

#### 4.2. Embriyogenik Kallus

Bitkilerde totipotansi olarak isimlendirilen bir hücreden bir bitki elde edilebilmesi mümkündür. Kallus farklılaşmamış diğer bir tanımlama ile sürgün ve kök gibi organ oluşturmamış kümeler halinde çoğalan hücre topluluğudur. Bu potansiyelden yararlanılarak doku kültüründe kallusta bulunan hücrelerde somatik embriyo oluşturulabilir. Bu somatik hücreler kallus üzerinde farklı yapılar ve baloncuklar şeklinde (ya da kalp şeklinde) görülür (Şekil 4.3). Embriyogenik kallus veya somatik embriyogenesis gelişimi aşamasında BA, KIN, IAA, IBA ve kombinasyonlarını içeren 27 MS besi ortamının kallus gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Dört hafta süren denemede kallus oluşumu denemesinin ortam şartlarının aynısı uygulanmış olup deneme sonunda kök ya da sürgün rejenerasyonu görülmezken kallus boyutu, kallus rengi ve ağırlığına ait bulgular elde edilmiştir. Yalnız bazı eksplantlarda kök gelişimi olmasına rağmen bu sayı az olduğu için istatistiki olarak değerlendirilmemiştir (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Embriyogenik kalluslarda kök oluşumu ve somatik embriyogenesis başlangıcı.

**4.2.1. Kallus Büyüklüğü**

Kallus büyüklüğü, her bir kallusun eni ve boyu ölçülerek ortalaması alınarak hesaplanmış ve istatistik analizi yapılmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre, farklı besi ortamlarının kallus boyutu üzerine etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 4.12).

**Çizelge 4.12.** Limonotunda somatik embriyogenesis oluşumunda kallus büyüklüğüne ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı | Serbestlik derecesi | Olasılık (%) |
|-------------------|---------------------|--------------|
| Besi ortamı       | 26                  | <0,0001      |
| Tekerrür          | 4                   | 0,8481       |

Farklı besi ortamlarındaki kallus büyüklüğüne ilişkin LSD testindeki bulgulara göre, Çizelge 4.13’de 25,53 mm ile MS + 1,0 mg/L KIN + 1,0 mg/L IBA içeren besi ortamındaki kallusların en büyük boyuta sahip olduğu görülmüştür. En küçük kallus ortalaması ise 13,23 mm ile MS + 1,0 mg/L KIN + 0,5 mg/L IBA içeren besi ortamından elde edilmiştir. Eksplant olarak kullanılan 5,0 mm boyutlarındaki kallusların boyutlarında tüm besi ortamlarında Çizelge 4.13’te görüldüğü gibi önemli artışları olmuştur.

Can ve arkadaşlarının (2000) rejenerasyona hazır hale getirdikleri adi yalancıları bitkilerini 8 hafta sonunda rejenerasyon ortamlarına aktarılmıştır. Denenen ekotiplerde en yüksek kallus oluşum oranı (%74) ve en yüksek kallus ağırlığı (369,3 mg/L) MS + 6 mg/L 2,4 D’li ortamda elde edilmiştir. 2,4-D oranı 6 mg/L’den arttıkça ortalama kallus oluşum oranında azalma görülmüştür. Çalışmamızda ise farklı ortamların kallusların gelişimini çeşitli şekillerde etkilediği ve besi ortamına bağlı olarak kallus boyutunun değişiklik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

**Çizelge 4.13.** Limonotunda besi ortamına bağlı kallus büyüklüğü (LSD<sub>0,05</sub>: 3,188)

| <b>Besi ortamı</b>             | <b>Kallus büyüklüğü (mm)</b> |
|--------------------------------|------------------------------|
| MS                             | 15,29 g-1 <sup>1</sup>       |
| MS + 0,5 BA                    | 15,19 g-1                    |
| MS + 1,0 BA                    | 15,82 f-1                    |
| MS + 2,0 IAA                   | 22,08 ab                     |
| MS + 0,5 BA + 1,0IAA           | 19,43 a-e                    |
| MS + 0,5 BA + 2,0 IAA          | 20,82 a-d                    |
| MS + 1,0 BA + 1,0 IAA          | 20,76 a-d                    |
| MS + 1,0 BA + 2,0 IAA          | 21,75 a-c                    |
| MS + 1,5 BA + 1,0 IAA          | 19,82 a-e                    |
| MS + 1,5 BA + 2,0 IAA          | 20,68 a-d                    |
| MS + 0,5 KIN                   | 13,69 ı                      |
| MS + 1,0 KIN                   | 21,29 a-d                    |
| MS + 0,5 KIN + 0,5 IBA         | 19,58 a-e                    |
| MS + 1,0 KIN + 0,5 IBA         | 13,23 ı                      |
| MS + 0,5 KIN + 1,0 IBA         | 17,35 e-h                    |
| MS + 1,0 KIN + 1,0 IBA         | <b>22,53 a</b>               |
| MS + 0,5 KIN + 2,0 IBA         | 20,09 a-e                    |
| MS + 1,0 KIN + 2,0 IBA         | 19,24 b-e                    |
| MS + 2,5 BA                    | 18,25 d-g                    |
| MS + 5,0 BA                    | 20,34 a-e                    |
| MS + 5,0 KIN                   | 18,23 d-h                    |
| MS + 2,5 BA + 0,5 KIN          | 18,66 c-f                    |
| MS + 5,0 BA + 0,5 KIN          | 19,43 a-e                    |
| MS + 5,0 KIN + 0,5 IBA         | 15,05 hı                     |
| MS + 0,5 IAA + 0,5 KIN         | 19,88 a-e                    |
| MS + 2,5 BA + 2,5 KIN          | 19,10 b-e                    |
| MS + 2,5 BA + 2,5KIN + 0,5 IBA | 20,40 a-e                    |

<sup>1</sup>: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.

#### 4.2.2. Kallus Rengi

Kallus rengi için kallus oluşumunda kullanılan 1-9 skalası kullanılmıştır; 1=koyu yeşil, 3=yeşil, 5=açık yeşil, 7=sarımsı yeşil, 9=kahverengi (Turhan, 1997). Farklı besi ortamlarına ilişkin kallus renginin varyans analiz tablosu aşağıdaki verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre farklı besi ortamlarının kallus rengi üzerine etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 4.14).

**Çizelge 4.14.** Limonotunda somatik embriyogenesis oluşumunda kallus rengine ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı | Serbestlik derecesi | Olasılık (%) |
|-------------------|---------------------|--------------|
| Besi ortamı       | 26                  | <0,0001      |
| Tekerrür          | 4                   | 0,3158       |

Farklı besi ortamlarında somatik embriyogenesisi incelemek amacıyla ekilen kallus rengine ilişkin LSD testine göre, Çizelge 4.15’de de görülen ortalamalar ile genel olarak denemede görülen renk durumu açık yeşil ile kahverengi arasındadır. Çalışmada kahverengine en yakın uygulama 9,40 ile MS + 2,0 mg/L IAA, 9,23 ile MS + 0,5 KIN ortamlarında görülürken, yeşil-koyu yeşil arasındaki en iyi sonuç MS + 1,0 mg/L BA + 2,0 mg/L IAA ortamında gözlenmiştir.

*Taxaceae* familyasına ait insanlardaki tümörlere karşı etkili taxan maddesini içeren *Taxus wallichiana* (Zucc.) bitkisinin organogenes ve bitki rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmada temel besi ortamı olarak Lloyd, MCCown ve WPMSH ortamları kullanılmıştır Zigotik embriyolar 0,5 mg/L BA, 1,0-2,0 mg/L 2,4-D veya NAA kombinasyonu ilave edilmiş olup ½ kuvvetteki Lloyd ve MCCown ortamlarında kültüre alınmış ve kültür başlangıcından 4 hafta sonra yeşil ve sarı olmak üzere morfolojik olarak iki farklı kallus oluşturmuştur (Datta ve ark., 2006).

Çalışmamızda kalluslar ikinci alt kültürden sonra kahverengileşerek ölmeye başlamıştır. Çizelge 4.15’de de gördüğümüz üzere 4 hafta sonunda alınan ölçümler sonucu çoğu kallus kahverengine yakın renk almıştır. Bu da kallusların ölme belirtisidir.

**Çizelge 4.15.** Limonotunda besi ortamına bağlı kallus rengi (LSD<sub>0,05</sub>: 1,681)

| <b>Besi ortamı</b>             | <b>Kallus rengi</b>   |
|--------------------------------|-----------------------|
| MS                             | 7,38 b-g <sup>1</sup> |
| MS + 0,5 BA                    | 7,55 b-f              |
| MS + 1,0 BA                    | 8,13 a-d              |
| MS + 2,0 IAA                   | <b>9,00 a</b>         |
| MS + 0,5 BA + 1,0IAA           | 4,79 ı-k              |
| MS + 0,5 BA + 2,0 IAA          | 5,82 g-j              |
| MS + 1,0 BA + 1,0 IAA          | 3,84 kl               |
| MS + 1,0 BA + 2,0 IAA          | 2,39 l                |
| MS + 1,5 BA + 1,0 IAA          | 2,57 l                |
| MS + 1,5 BA + 2,0 IAA          | 8,10 a-d              |
| MS + 0,5 KIN                   | <b>9,00 a</b>         |
| MS + 1,0 KIN                   | 8,13 a-d              |
| MS + 0,5 KIN + 0,5 IBA         | 6,50 d-h              |
| MS + 1,0 KIN + 0,5 IBA         | 8,50 ab               |
| MS + 0,5 KIN + 1,0 IBA         | 8,07 a-e              |
| MS + 1,0 KIN + 1,0 IBA         | 8,38 a-c              |
| MS + 0,5 KIN + 2,0 IBA         | 8,97 ab               |
| MS + 1,0 KIN + 2,0 IBA         | 8,25 a-c              |
| MS + 2,5 BA                    | 6,40 e-ı              |
| MS + 5,0 BA                    | 5,15 h-k              |
| MS + 5,0 KIN                   | 6,70 c-h              |
| MS + 2,5 BA + 0,5 KIN          | 7,38 b-g              |
| MS + 5,0 BA + 0,5 KIN          | 6,30 f-ı              |
| MS + 5,0 KIN + 0,5 IBA         | 8,20 a-c              |
| MS + 0,5 IAA + 0,5 KIN         | 6,20 f-ı              |
| MS + 2,5 BA + 2,5 KIN          | 5,40 h-k              |
| MS + 2,5 BA + 2,5KIN + 0,5 IBA | 4,50 jk               |

<sup>1</sup>: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.

Kallus renk skalası: 1=koyu yeşil, 3=yeşil, 5=açık yeşil, 7=sarımsı yeşil, 9=kahve.



### **4.2.3. Somatik Embriyogenesis Denemesinden Ölçülen Karakterler Arasındaki Korelasyonlar**

Çizelge 4.16’de somatik embriyogenesis denemesinde ölçülen karakterler arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri aşağıda gösterilmiştir. Kallus rengi ile kallus büyüklüğü arasında önemli fakat negatif korelasyonun (-0,4360) olduğu bulunmuştur. Bu durum, renk skalasında küçük değerler yeşile doğru gittiğini bu da kallusun sağlıklı ve büyümeye devam ettiğini göstermesi ile açıklanabilir.

**Çizelge 4.16.** Somatik embriyogenesis denemesinde ölçülen karakterler arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyi

| <b>Karakterler</b>  | <b>Kallus Büyüklüğü</b> |
|---------------------|-------------------------|
| <b>Kallus Rengi</b> | <b>-0,4360*</b>         |

\* Önemlilik düzeyi <0,0001’dir.

### **4.2.4. Somatik Embriyogenesis Denemesine İlişkin Sonuç**

Limonotunda somatik embriyogenesis gelişimi ile ilgili 27 farklı besi ortamı denenmiştir. Denemede kallus boyutu ve kallus rengi parametreleri değerlendirilmiştir. Bu ortamlar arasında en büyük kallus boyutunun 22,53 mm ile, MS + 1,0 mg/L KIN + 1,0 mg/L IBA içeren besi ortamından elde edileceği, BA ve IAA’in kallus rengi parametresinde yeşil renk eldesi için pozitif rol oynadığı sonucuna varılabilir.

**BÖLÜM - 5**  
**SONUÇ ve ÖNERİLER**

- Kallus oluşumu ve çoğaltımı üzerine yapılan deneme sonucunda 2,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA ilaveli MS besi ortamının yaprak eksplantlarından en uygun kallus oluşumunu teşvik ettiği belirlenmiştir. Aynı besi ortamı kullanılarak çok sayıda alt kültür ile limonotunda kallus oluşumu üzerine etkisi ispatlanmıştır.
- Embriyogenik kallus veya organogenesis ile ilgili denemede kallus boyutunda MS + 1,0 mg/L IBA + 1,0 mg/L KIN içeren besi ortamında yetişen kallusların denemede kullanılan diğer ortamlardaki gelişen kalluslara göre boyutunun daha büyük olduğu gözlemlenmiştir.
- Kallus skorunda da MS + 2,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA ortamı ve yaprak eksplantlarında elde edilen kallusların diğer ortamlarda gelişen kalluslara göre hacim olarak daha büyük olduğu gözlemlenmiştir.
- Kallus rengine ilişkin parametrede somatik embriyo oluşturabilecek kallusların rengi, denemedeki MS + 2,0 mg/L 2,4-D besi ortamında bulunan yaprak eksplantlarında koyu yeşil olarak bulunmuştur.
- Kallus ağırlığı ve kallus oluşumu ile ilgili bir değerlendirme yapılacak olursa, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve eksplant tipinin bu hususta önemli bir faktör olduğunu ve NAA'nın bu bağlamda pozitif rol aldığı belirlenmiştir.
- Kallus oluşumu genel olarak incelendiğinde, eksplant tipinin besi ortamına verdiği yanıtlar çok farklı olarak bulunmuştur. İnteraksiyondan dolayı besi ortamı seçiminde hangi eksplant tipinin hangi ortamda daha iyi geliştiği, bundan sonra bu bitki ile yapılacak çalışmalara kaynak teşkil edecektir.

Sonuç olarak limonotunda kallus gelişimi başarı ile gerçekleştirilmiş ve çalışmanın amaçlarından biri olan somatik embriyogenesis veya organogenesis ile ilişkin başlangıç kallusları olan embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Bulguları sınırlı olan hatta kallus kültürü olarak çalışma bulunmayan limonotunda elde edilen veriler yapılacak doku kültürü çalışmalarına bilimsel anlamda katkı sağlayacağı gibi gelecekte limonotu üzerine yapılacak diğer gen transferi, uçucu yağ oranının artırılması gibi biyoteknolojik çalışmalara da temel oluşturması beklenmektedir. Bunun dışında limonotunda doku kültürü veya hücre kültürü yolu ile biyoreaktörde sekonder metabolitlerin üretilmesine de katkı sağlayacak sonuçlar

elde edilmiştir. Bu çalışmanın devamı veya gelecek bir çalışma olarak, başarı ile elde edilen bu kalluslarda sürgün gelişimi ve hücre kültürü için daha detaylı çalışmalar yapılmasında yarar vardır. Bu amaçla daha farklı büyüme düzenleyicileri, yoğunlukları ve yetiştirme koşulları denenebilir.

## KAYNAKLAR

- Ali-Ahmed A. B., Gouthaman T., Suryanarayana R. ve Rao M. V., 2005. Micropropagation of *Phyla nodiflora* (L.) Greene: An important medicinal plant. *Iranian Journal of Biotechnology*, 3 (3): 186-190.
- Andi C., Katherine R., Sallie M. ve Lesley M., 1997. *The Encyclopedia of Herbs and Spices* (Vol. 2). Hermes House, London. 11-34.
- Anonim, 1999. 20.10.2011. <http://www.fao.org/docrep/x5402e/x5402e00.htm>.
- Anonim, 2011. 10.10.2011. <http://plants.usda.gov>.
- Argyropoulou C., Daferea D., Tarantilis A. T., Fasseas C. ve Polissiou M., 2007. Chemical Composition of the Essential Oil From Leaves of *Lippia citirodora* H. B. K. (Verbenaceae) at two Developmental Stages. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 831-837.
- Arı Ş., Şahin-Hasancebi S., Arda N., Turgut N. ve Aytaç Z., 2002. Optimization of Tissue Culture Conditions of Turkish Endemic *Astragalus chrysocholorus*, Second Balkan Botanical Congress, İstanbul, 204 p.
- Arslan N., 1990. Tıbbi Bitkilerin Kültürü ve Önemi. *Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Dergisi*, Ankara, 53: 7-8.
- Arslan N., 1997. Ekonomik Önemi Olan Doğal Tıbbi Bitkilerimizin Kültüre Alınması. Türkiye II. Tarla Bitkileri Kongresi Bildiri Kitabı (Çağrılı Bildiri), Samsun, 46-49.
- Arslan N., Gürbüz B. ve Gümüşçü A., 2002. *Tıbbi Bitkiler İsim Kılavuzu*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No. 1530, 180 p.
- Arıyanart S. ve Chaitrayagun M., 2005. Induction of Somatic Embryogenesis In Lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). *Scientia Horticulturae*, 105: 411-420.
- Babaoğlu M., Gürel E. ve Özcan S., 2001. *Bitki Biyoteknolojisi* (1. Cilt). Selçuk Üniversitesi Vakfı, Konya. 2-17.
- Başer K. H. C., 1998. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Endüstriyel Kullanımı. *Anadolu Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi Bülteni (TAB) 13-14*, Eskişehir, 19-43.
- Baydar H., 2005. *Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi*, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, Isparta. 51: 221 p.
- Baytop T., 1999. *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 287 p.

- Bown D., 1995. *Encyclopedia of Herbs and Their Uses*. Dorling Kindersley Limited, 9 Henrietta Street, London. 174p.
- Brown D., 1995. *The Royal Horticultural Society, Encyclopedia of Herbs and Their Uses*. Dorling Kindersley Limited, 9 Henrietta Street, London. 235p.
- Can E., Çeliktaş N. ve Hatipoğlu R., 2000. Adi Yalancıdarı (*Paspalum dilatatum* Poir.) Bitkisinin Genç Salkımlarından Kallus Oluşumu ve Bitki Rejenerasyonuna Genotip ve 2,4-D Konsantrasyonun Etkileri Üzerine Bir Araştırma. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 24: 113-119.
- Chen Y. ve Li F., 2005. Micropropagation and callus culture of *Saussurea laniceps*, an alpine medicinal plant, *Forestry Studies in China*, 7 (1): 16-19.
- Chevallier A., 1996. *The Encyclopedia of Medicinal Plants*. Dorling Kindersley Limited, London. 227 p.
- Datta M. M., Majumder A. ve Jha S., 2006. Organogenesis and plant regeneration in *Taxus wallichiana* (Zucc.), *Plant Cell Rep.*, 25: 11-18.
- Deans S. G. ve Svoboda K. P., 1990. The Antimicrobial Properties of Marjoram (*Origanum majorana* L.) Volatile Oil, *Flavour Fragrance Journal*, 5: 187-190.
- El-Gengaihi S., Taha H. S. ve Kamel A.M., 2006. In vivo and in vitro Comparative Studies of *Oreganum* Species. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 4:(3,4) : 127-134.
- El-Hamidi A., Ahmed S. S. ve Shaarawy F., 1983. *Lippia citriodora* L. Grown in Egypt. A New Crop Under Development. III International Symposium on Spice and Medicinal Plants, 31-35.
- Figueiredo R. O., Stefanini M. B., Ming L. C., Marques M. O. M. ve Facanali R., 2004. Essential Oil Composition of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton Leaves Cultivated in Botucatu, São Paulo, Brazil, *Acta Horticulturae*, 629:131-134.
- Franklin C. I. ve Dixon R. A., 1994. *Initiation and Maintenance of Callus and Cell Suspension Culture*. Oxford University, 1-25.
- Gamborg O. L. ve Phillips G. C., 1995. Sterile Techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3: 35-42.
- Gönülşen N., 1987. *Bitki Doku Kültürleri ve Uygulama Alanları*. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir. 78: 137.
- Gupta S. K., Khanuja S. P. S. ve Kumar S., 2001. In vitro micropropagation of *Lippia alba*. *Current Science*, 81 (2): 206-210.

- Gümüşçü U. G., 2001. Yünlük Yüksükotu (*Digitalis lanata* Ehrh.)'nun In Vitro Koşullarda Hızlı Çoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Ankara.
- Haberlandt G., 1902. Cultuversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitz-Ber Math-Nat Kl Kais Akad Wiss Wien.*, 111: 69-92.
- Hartman H. T., ve Kester D. E., 1975. *Plant Propagation - Principels and Practices*. Prentice-Hall. Inc., New Jersey. 53-66.
- Karam N. S., Jawad F. M., Arikat N. A. ve Shibli R. A., 2003. Growth and rosmarinic acidaccumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 117–121.
- Karik Ü., 2009. Farklı Dikim Aralıklarının Limonotu (*Lippia citriodora* L.) Bitkisinde Herba ve Uçucu Yağ Verimi İle Uçucu Yağın Kalite Özelliklerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Bursa.
- Kasper C., Griensven M. V. ve Pörtner R., 2009. *Advances In Biochemical Engineering/Biotechnology, Bioreactor Systems for Tissue Engineering*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1-3.
- Mansuroğlu S. ve Gürel E., 2001. *Mikroçoğaltım, Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoğlu M., Gürel E. ve Özcan S. (edt.)*. Süleyman Demirel Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 262-281.
- Murashige T. ve Skoog T. F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiolgia Plantarum*, 15: 473-479.
- Nakamura T., Okuyama E., Tsukada A., Yamazaki M., Satake M., Nishibe S., T Deyama., Moriya A., Maruno M. ve Nishimura H., 1997. Acteoside as the Analgesic Principle of Cedron (*Lippia triphylla*), a Peruvian Medicinal Plant. *Chem. Pharm. Bull.*, 45: 499-504.
- Nurazah Z., Radzali M., Syahida A. ve Maziah M., 1999. Effects of Plant Growth Regulators on Callus Induction From *Cananga odorata* Flower Petal Explant. *African Journal of Biotechnology* 8 (12): 2740-2743.
- Özek T., Kirimer N., Tümen G. ve Başer K. H. C., 1996. Composition of the Essential Oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton Grown in Turkey. *J.Essent. Oil Res.*8: 581-583.

- Özhatay N., Koyuncu M., Atay S. ve Byfield A., 1997. *Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma*. Doğal Hayatı Koruma Derneği Yayınları. 9-11.
- Özkaynak E. ve Samancı T., 2004. Mikroçoaltımda Çevre Kontrolünde Son Gelişmeler. *Anadolu – Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 14 (2): 114-138.
- Özkum D., 2006. Kekik (*Origanum multiflorum*) ve Adaçayı (*Sideritis srticta*)'nın Doku Kültürü Yoluyla Çoğaltımı Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara.
- Pascual M. E., Slowing K., Carretta E, Sanchez M. D. ve Villar A., 2001. Lippia: Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology: a Review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 201-214.
- Rode J., 1998. Possibilities of *Lippia citriodora* Kunth. Cultivation in Slovenia. ISHS Acta Horticulturae 523: XXV International Horticultural Congress, Part 13: New and Specialized Crops and Products, Botanic Gardens and Human-Horticulture Relationship, Brussels, Belgium. 61-64.
- Sambamurthy K. ve Kar A., 2006. *Pharmaceutical Biotechnology*. New Age International (p) Ltd., Publishers. 186-189.
- SAS Institute 1998. Statistical Analysis System User's Guide: Statistics. SAS Inst., Cary, NC.
- Shen X. J., Yao L. ve Huang J., 2004. Study On the Content and Composition o Essential Oil in Different Period of Growth in *Lippia citriodora* L. *Journal of Shangha Jiaotong University - Agricultural Science*, 22 (1): 22-25, 42.
- Severin C., Bruzzese D., Sapio O. D., Gattuso M. ve Gattuso S., 2006. Evaluation of the in vitro Behavior of *Aloysia citriodora* Palau: Histological and Chemical Study. *IDECEFYN*, 11: 19-20.
- Silva S. S., Alice. L., Celso S. L., Rosane A. S. ve Gilc S.. 2005. Essential Oil Composition of *Melissa officinalis* L. in vitro Produced under the Influence of Growth Regulators. *Journal of Brazil Chemical Society*, 16 (6B): 1387-1390.
- Süle R., 2005. Farklı Oksin Çeşitlerinin Yonca (*Medicago sativa* L.)'da Somatik Embriyo Oluşumuna Etkisi Üzerinde Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Antakya.
- Tao H., Shaoin P., Gaofeng D., Lanying Z. ve Gengguang L., 2002. Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 69:141-146

- Terblanche F. C. ve Kornelius G., 1996. Essential Oil Constituents of the Genus *Lippia* (Verbenaceae)-A Literature Review. *Journal Essential Oil Research*, 8: 471-485.
- Tripathi L. ve Tripathi J. N., 2003. Role of Biotechnology in Medicinal Plants, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2 (2): 247-248.
- Turhan, H., 1997. Salinity studies in potato (*Solanum tuberosum* L.). Ph.D. Dissertation (Doktora Tezi). The University of Reading, UK. 252p.
- Uçar-Türker A., Yücesan B. ve Gürel E., 2010. Tıbbi bir bitki olan *Verbena officinalis* L.'in Gövde İnternodal Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu. *Turk. J. Biol.*, 34: 297-304.
- Yılmaz Z., 2009. Bir Biyoreaktörde Glikoz Derişimi Kontrolü. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı, Ankara.
- Yürekli A. K. ve Baba B., 1995. Ekonomik Öneme Sahip Endemiklerin Doku Kültürü Teknikleri ile Çoğaltılması, *TBAG-1190*, 61 p.



## ÇİZELGELER

### Sayfa No

|  |    |
|--|----|
| Çizelge 3.1. MS için kullanılan kimyasallar ve miktarları.....   | 10 |
| Çizelge 3.2. Kallus oluşumu için kullanılan besi ortamları.....  | 11 |
| Çizelge 3.3. Alt kültür ve embriyogenik kallus oluşumu için kullanılan besi ortamları.....   | 12 |
| Çizelge 3.4. Embriyogenik kallus oluşumu için kullanılan besi ortamları.....   | 13 |
| Çizelge 4.1. Limonotunda kallus oluşturma yüzdesine ait varyans analiz sonuçları.....  | 16 |
| Çizelge 4.2. Limonotunda eksplant ve besi ortamına bağlı olarak yüzde kallus oluşturma.....  | 17 |
| Çizelge 4.3. Limonotunda kallus büyüklüğüne ait varyans analiz sonuçları.....  | 18 |
| Çizelge 4.4. Limonotunda eksplant ve besi ortamına bağlı kallus büyüklüğü .....  | 19 |
| Çizelge 4.5. Limonotunda kallus skoruna ait varyans analiz sonuçları .....   | 20 |
| Çizelge 4.6. Limonotunda eksplant ve besi ortamına bağlı kallus skoru.....   | 20 |
| Çizelge 4.7. Limonotunda kallus rengine ait varyans analiz sonuçları .....   | 21 |
| Çizelge 4.8. Limonotunda eksplant ve besi ortamına bağlı kallus rengi.....   | 23 |
| Çizelge 4.9. Limonotunda kallus ağırlığına ait varyans analiz sonuçları.....   | 23 |
| Çizelge 4.10. Limonotunda eksplant ve besi ortamına bağlı kallus ağırlığı .....  | 24 |
| Çizelge 4.11. Limonotunda kallus oluşumu denemesinde ölçülen karakterler arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri..... | 25 |
| Çizelge 4.12. Limonotunda somatik embriyogenesis oluşumunda kallus büyüklüğüne ait varyans analiz sonuçları .....                      | 28 |
| Çizelge 4.13. Limonotunda besi ortamına bağlı kallus büyüklüğü.....  | 29 |
| Çizelge 4.14. Limonotunda somatik embriyogenesis oluşumunda kallus rengine ait varyans analiz sonuçları.....                           | 30 |
| Çizelge 4.15. Limonotunda besi ortamına bağlı kallus rengi.....  | 31 |
| Çizelge 4.16. Somatik embriyogenesis denemesinde ölçülen karakterler arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyi.....        | 32 |

## ŞEKİLLER

|  | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|--|------------------------|
| Şekil 1.1. Limonotunun bitkisel özellikleri.....   | 2                      |
| Şekil 3.1. Limonotunda doku kültürü çalışmalarından genel görünüm.....                     | 15                     |
| Şekil 4.1. Eksplantlardan kallus gelişimi.....   | 26                     |
| Şekil 4.2. Embriyogenik kallus denemesi için yaprak eksplantlarından kallus üretimi.....   | 26                     |
| Şekil 4.3. Embriyogenik kalluslarda kök oluşumu ve somatik embriyogenesis başlangıcı ..... | 27                     |

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Bilal YILDIZ

Doğum Yeri: Yalova

Doğum Tarihi: 06.08.1986

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi - Ziraat Fakültesi – Tarla Bitkileri Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi – Fen Bilimleri Enstitüsü – Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer: - Kışlık Tahıllarda Farklı Otlatma Sistemlerinin Etkileri (Lisans Tezi)

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal: -

c) Katıldığı Projeler: - Limonotu (*Lippia citriodora* Kunth.) Bitkisinde Doku Kültürü Çalışmaları (2011/055)

### İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Çanakkale Ziraat Odası Başkanlığı, 05-2010, Devam Ediyor.

### İLETİŞİM

E-posta Adresi: byildiz77@hotmail.com