

**TIBBİ BİTKİLERDEN *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague**

**Ex Turrill' in *In Vitro* KOŞULLARDA ÇOĞALTIMI**

**Asuman KOCA**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Genel Biyoloji Programı**

**Yrd. Doç. Dr. Muhammad AASIM**

**Mayıs-2013**

**T.C.  
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ BİTKİLERDEN *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague Ex Turrill' in  
*In Vitro* KOŞULLARDA ÇOĞALTIMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Asuman KOCA**

**Anabilim Dalı : Biyoloji**

**Programı : Genel Biyoloji**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Muhammad AASIM**

**KARAMAN - 2013**

## TEZ ONAYI

Asuman KOCA tarafından hazırlanan “**Tıbbi Bitkilerden *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague Ex Turrill’ in *In Vitro* Koşullarda Çoğaltımı**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç.Dr. Muhammad AASİM

Jüri Üyeleri

İmza:

*Prof.Dr. Mehmet KARATAŞ*

*Prof. Dr. Khalid Mahmood Khawar*

*Yrd. Doç.Dr. Muhammad Aasim*

Tez Savunma Tarihi: .../.../...

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL**  
**Enstitü Müdürü**

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**Asuman KOCA**

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

## TIBBİ BİTKİLERDEN *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague Ex Turrill' in *In Vitro* KOŞULLARDA ÇOĞALTIMI

Asuman KOCA

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Muhammad AASIM

Mayıs, 2013, 57 sayfa

*Trachyspermum ammi* *Apiaceae* familyasına ait tek yıllık tıbbi, aromatik ve baharatlı bitkidir. Tohumları ilaç olarak, koruyucu olarak, gıdalar için aroma olarak ve parfümeri uçucu yağın üretimi için kullanılmaktadır. Bu çalışmada *T. ammi* tohumları NaOCl ile steril edildikten sonra *in vitro* koşullarda MSO ortamında çimlendirilmiştir. Bir-üç haftalık fideciklerden elde edilen kotiledon yaprak, lamina, hipokotil, epikotil ve kotiledon boğum eksplantları ile steril edilmiş zigotik embriyo eksplantları *in vitro* koşullarda farklı sitokin (0,25-2,50 mg/L BAP, 0,10-1,60 mg/L TDZ ve Kinetin) ile 0,10-0,25 mg/L IBA içeren MS ortamlarında sürgün rejenerasyonu amacıyla kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlarda kallus oluşumu gözlenirken, kotiledon boğum, zigotik embriyo eksplantı ve hipokotil eksplantlarında sürgün oluşumu başarıyla sağlanmıştır. En fazla eksplant başına 19,40 adet sürgün ve zigotik embriyo eksplantında en fazla sürgün 12,96 adet sürgün 0,20 mg/L TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. En uzun sürgünler ise kotiledon boğum eksplantında 2,91 cm ile 0,50 mg/L BAP içeren ortamda kaydedilirken, zigotik embriyo eksplantında 5,23 cm ile 0,20 mg/L Kinetin içerikli ortamda elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler 0,20-1,00 mg/L IBA içeren ortamlarda köklendirilmiştir. Köklendirme ortamda çoklu sürgün oluşumunda kaydedilmiştir. Köklenmiş bitkilerin adaptasyonu sağlamak için iklim odasında ve iklim dolabında bırakılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Apiaceae*, *T.ammi*, *In vitro*, Doku Kültürü, Oksin, Sitokinin,

## ABSTRACT

Ms Thesis

### ***In vitro* PROPAGATION OF MEDICINAL PLANT *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill**

Asuman KOCA

**Karamanoğlu Mehmetbey University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Muhammad AASIM**

**May, 2013, 57 pages**

*Trachyspermum ammi* is an annual medicinal, aromatic and spice plant belongs to Apiaceae family. Seeds has been used for medication and production of essential oil used for food flavoring and perfumery. Seeds of *T. ammi* were surface sterilised with NaOCl followed by *in vitro* germination on MSO. Cotyledonary leaves, lamina, hypocotyls, epicotyls and cotyledon node explants obtained from 1-3 weeks old germinated seedlings and sterilised zygotic embryos were cultured on MS medium supplemented with different cytokinins (0.25-2.50 mg/L BAP, 0.10-1.60 mg/L TDZ ve Kinetin) and 0.10-0.25 mg/L IBA. Kallus formation was observed on all explants alongwith successful shoot regeneration from hypocotyls, cotyledonary nodes and zygotic embryos explants. Maximum number of 19.40 shoots from cotyledonary nodes and 12.96 shoots from zygotic embryos explants were obtained from medium containing 0.20 mg/L TDZ. Whereas, maximum longer shoots of 2.91 cm from cotyledonary nodes were recorded on MS medium supplemented with 0.50 mg/L BAP and 5.23 cm from zygotic embryos were obtained from MS medium supplemented with 0.20 mg/L kinetin. Regenerated shoots were rooted on MS medium supplemented with 0.20-1,00 mg/L IBA. Multiple shoot induction was also recorded in the rooting medium. Rooted plantlets were transferred to growthroom and growth chamber for adaptation.

**Key Words:** *Apiaceae*, *T.ammi*, *In vitro*, Tissue Culture, Auxins, Cytokinin,

## ÖN SÖZ

Yüksek lisansa başladığım andan tez bitim aşaması ve sonrasında her koşulda benden yardımlarını, sabrını, bilgilerini esirgemeyen ve çalışmalarımı bilinçli bir şekilde devam ettirmem için yönlendiren, bilimsel çalışmaların nasıl yürütüldüğünü öğrenmem için elinden gelenin fazlasını vermeye çalışan danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Muhammad AASIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu süre zarfında benden manevi desteklerini eksik etmeyen her an yanımda olan anneme, babama teşekkürü bir borç bilirim.

Labratuvar ortamımın, çalışmalarımızın zevkli hale gelmesinde, çalışmalarımın hızlanması için yardımına koşan arkadaşlarım Ayşeğül ÇINAR, Hilal KESKİN, Gözde YALÇIN'a ve ismi geçmeyen diğer arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

**Asuman KOCA**

**Mayıs, 2013**

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>ÖN SÖZ</b> .....	iii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	ix
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
<b>2.KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	3
<b>3.MATERYAL ve METOT</b> .....	11
3.1. Materyal .....	11
3.1.1. Bitki Materyali .....	11
3.1.2. Rejenerasyon İçin Kullanılan Eksplantlar .....	11
3.1.3. Büyüme Düzenleyicilerinin Çözücüler ve Saklama Koşulları .....	11
3.2. Yöntem .....	12
3.2.1. Besin Ortamları ve Kültür Koşulları .....	12
3.2.2. T. ammi Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu .....	12
3.2.3. <i>In vitro</i> Koşullarda T. ammi Tohumların Çimlendirilmesi .....	12
3.2.4. Eksplant İzolasyonu ve Kültüre Alınması .....	13
3.2.5. Süspansiyon Kültüre Alınması .....	13
3.2.6. Sürgünlerin Köklendirilmesi ve Dış Şartlara Alıştırılması .....	13
3.2.7. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi .....	13
<b>4. BULGULAR</b> .....	14
4.1. Sterilizasyon Çalışmaları .....	14
4.1.1. Ticari Çamaşır Suyu (%5) ile Yüzey Sterilizasyonu.....	14
4.2. <i>In vitro</i> Çimlenme .....	15
4.3. <i>T. ammi</i> Bitkisinin Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları .....	15



4.3.1. <i>T. ammi</i> Bitkisinin Lamina Eksplantlarında Sürgün Rejenerasyonu .....	15
4.3.2. <i>T. ammi</i> Bitkisinin Kotiledon Yaprak Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu .....	16
4.3.3. Farklı TDZ-IBA Dozlarında <i>T. ammi</i> Bitkisinin Epikotil Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu .....	18
4.3.4. <i>T. ammi</i> Bitkisinin Hipokotil Eksplantlarında Sürgün Rejenerasyonu ....	18
4.3.5. <i>T. ammi</i> Bitkisinin Kotiledon Boğum Eksplantlarında Sürgün Rejenerasyonu .....	19
4.3.6. <i>T. ammi</i> Bitkisinin Zigotik Embriyo Eksplantlarında Sürgün Rejenerasyonu .....	26
4.4. <i>In vitro</i> Köklendirme.....	37
4.5. Bitkilerin Dış Koşullara Adaptasyonu.....	38
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	40
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b> .....	47
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	49
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	58

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 3.1:</b>	Kullanılan büyüme düzenleyici, antioksidant ve antibiyotik çözücüler, stok konsantrasyonu ve saklama koşulları .....	11
<b>Çizelge 4.1:</b>	<i>T. ammi</i> bitkisinde çamaşır suyu ile yapılan yüzey sterilizasyonun bulaşık oranı, çimlenme oranı ve ölüm oranlarına ait varyans analizi .....	14
<b>Çizelge 4.2:</b>	Çamaşır suyu (NaOCl) ile yapılan yüzey sterilizasyon sonuçları	15
<b>Çizelge 4.3:</b>	Farklı TDZ-IBA dozlarının <i>T. ammi</i> bitkisinin kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyona ait varyans analizi .....	20
<b>Çizelge 4.4:</b>	Kotiledon boğum eksplantında, farklı TDZ-IBA dozlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi .....	21
<b>Çizelge 4.5:</b>	<i>T. ammi</i> bitkisinde bir haftalık kotiledon boğum eksplantının farklı BAP dozlarında sürgün rejenerasyonu ait varyans analizi	23
<b>Çizelge 4.6:</b>	Bir haftalık kotiledon boğum eksplantında farklı BAP dozlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi .....	23
<b>Çizelge 4.7:</b>	<i>T. ammi</i> bitkisinin üç haftalık kotiledon boğum eksplantında farklı BAP dozlarının sürgün rejenerasyona ait varyans analizi .	25
<b>Çizelge 4.8:</b>	Üç haftalık kotiledon boğum eksplantında farklı BAP dozlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi .....	25
<b>Çizelge 4.9:</b>	<i>T. ammi</i> bitkisinin zigotik embriyo eksplantının farklı TDZ dozlarının varyans analizi .....	27
<b>Çizelge 4.10:</b>	Farklı TDZ dozlarının <i>T. ammi</i> bitkisinin tohumlarında sürgün rejenerasyona etkisi .....	27
<b>Çizelge 4.11:</b>	<i>T. ammi</i> bitkisinin zigotik embriyo eksplantının farklı Kinetin-IBA dozlarında varyans analizi .....	29
<b>Çizelge 4.12:</b>	Farklı Kinetin-IBA dozlarının <i>T. ammi</i> bitkisinin tohumlarında sürgün rejenerasyona etkisi .....	30
<b>Çizelge 4.13:</b>	Farklı TDZ-IBA dozlarında <i>T. ammi</i> bitkisinin zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi .....	32
<b>Çizelge 4.14:</b>	Farklı TDZ-IBA dozlarının <i>T. ammi</i> bitkisinin zigotik embriyo eksplantında sürgün rejenerasyonu .....	33
<b>Çizelge 4.15:</b>	Farklı BAP-IBA dozlarının <i>T. ammi</i> bitkisinin zigotik embriyo eksplantında varyans analizi .....	35
<b>Çizelge 4.16:</b>	Farklı BAP-IBA dozlarının <i>T. ammi</i> bitkisinin zigotik embriyo eksplantında sürgün rejenerasyonu .....	36

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekiller</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1:	<i>Trachyspermum ammi</i> bitki, tohum görünümü .....	1
Şekil 4.1:	<i>T. ammi</i> bitkisinin lamina eksplantında kallus oluşumu, sürgün uçları .....	16
Şekil 4.2:	<i>T. ammi</i> bitkisinde kotiledon yaprak eksplantında petiyol kısmı beyazlıklar, yapraklarda sararmalar .....	17
Şekil 4.3:	<i>T. ammi</i> bitkisinde kotiledon yaprak eksplantında kallus oluşumu .....	17
Şekil 4.4:	<i>T. ammi</i> bitkisinin epikotil eksplantında yoğun kallus oluşumu, süspansiyon kültür sonrası ve küçük sürgün uçları .....	18
Şekil 4.5:	<i>T. ammi</i> bitkisinin hipokotil eksplantında sürgün rejenerasyonu, süspansiyon kültüründen sonra sürgün uçları ve kararma, GA3 içeren ortamda sürgün oluşumu .....	19
Şekil 4.6:	<i>T. ammi</i> bitkisinde kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyonu, iki hafta, dört hafta sonrası sürgün ve kallus oluşumu, MSO ortamına aktarıldıktan sonra yeni sürgün oluşumu .....	20
Şekil 4.7:	<i>T. ammi</i> bitkisinin kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyonu, bir hafta ve üç hafta sonra sürgün oluşumu, kallus oluşumu ve 10 hafta sonra sürgün oluşumu .....	22
Şekil 4.8:	<i>T. ammi</i> bitkisinin kotiledon boğum eksplantında sürgün oluşumu, çoklu ve normal sürgün oluşumu, hyperhidrik sürgün oluşumu .....	24
Şekil 4.9:	<i>T. ammi</i> bitkisinin zigotik embriyo eksplantında TDZ ortamlarında sürgün rejenerasyonu, iki hafta sonra sürgün ve kallus oluşumu, MSO ortamında sürgün gelişimi, yaprakta sürgün oluşumu .....	26
Şekil 4.10:	<i>T. ammi</i> bitkisinde Kinetin-IBA ortamlarda zigotik embriyo eksplantında sürgün rejenerasyonu, bir hafta sonra uzamış sürgünler, dört hafta sonra çoklu sürgün oluşumu .....	29
Şekil 4.11:	<i>T. ammi</i> bitkisinde TDZ-IBA ortamlarda zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu, dört hafta sonra çoklu sürgün oluşumu, kallus oluşumu, yaprak ucunda sürgünler .....	31
Şekil 4.12:	<i>T. ammi</i> bitkisinin BAP-IBA ortamlarda zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu, üç hafta sonra çoklu sürgün rejenerasyonu, kallus oluşumu, yaprak uçlarında sürgün rejenerasyonu .....	34
Şekil 4.13 :	<i>T. ammi</i> bitkisinin IBA ortamlarında çoklu sürgün ve kallus oluşumu, ince kökler .....	37

<b>Şekil 4.14:</b>	<i>T.ammi</i> bitkisinin sükroz ortamında sert yapılı yoğun köklü görünümü .....	38
<b>Şekil 4.15:</b>	<i>In vitro</i> koşullarda çoğaltılmış <i>T.ammi</i> bitkisinin dış koşullarda adaptasyonu .....	39
<b>Şekil 4.16</b>	<i>In vitro</i> koşullarda çoğaltılmış <i>T. ammi</i> bitkisi üzerinde çiçek oluşumu .....	39

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

°C	Santrigrat Derece
2,4 D	Diklorofenoksi Asetik Asit
BAP/ BA	6Benzil Amino Pürin/6 benziladenine
GA <sub>3</sub>	Giberellik Asit
HCL	Hidroklorik Asit
IAA	İndol-3-Asetik Asit
IBA	İndol 3 Bütirik Asit
KIN/Kn	Kinetin
MS	Murashige ve Skoog Besi Ortamı
NAA	Naftalen Asetik Asit
NaOH	Sodyum Hipoklorit
NaOCl	SodyumHidroksit
PVP	Polyvinypyrrolidine
TDZ	Thidiazuron

### Açıklama

### Kısaltmalar

µM	Mikromol
cm	Santimetre
dk	Dakika
dSu	Distile Su
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ppm	Parts per million(Milyonda Bir)
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Dakikadaki Devir)

## 1.GİRİŞ

Mısır anasonu (*Trachyspermum ammi*) *Apiaceae* (maydanoz familyası) familyasına ait tıbbi ve aromatik bir bitkidir. Bishop's weed Ajowan veya carom olarak bilinen (Jeet ve ark., 2012) Asya, Avrupa ve Afrikada yayılış gösteren bir çok türü yetişmektedir. Bitkinin en fazla yetiştirildiği ülkeler ise Mısır, Irak, İran, Afganistan, Pakistan ve Hindistan'dır. *T. ammi* Türkiye'de Şanlıurfa ve Gaziantep illerinde yayılış göstermektedir (Tübives, 2012).

Bitki yaygın olarak kurak ve yarı kurak bölgelerde (Joshi, 2000), yüksek düzeyde tuz içeren topraklarda yetişir (Ashraf, 2002; Munns, 2002). Mısır anasonu 60-90 cm'lik dallı yapıya sahip, Temmuz ve Eylül ayları arasında çiçek açan (Şekil 1.1a) tek yıllık bir bitkidir (Şekil 1.1a). Meyveler ufak, esmer, kırmızı renkli (Şekil 1.1b) ve Karaman kimyona benzerlik gösterir. Tadı acı, keskin bir kokusu olan ve meyveleri kurulduktan sonra suyla kaynatılıp içilebilen bir bitkidir. Bazen, Ortadoğu'da meyve sapları kürdan olarak da tüketilmektedir (Anonim, 2013a).



Şekil 1.1. *Trachyspermum ammi* (a) bitki, (b) tohum görünümü

*T. ammi* tohum içeriği incelendiğinde %11,9 lif, %38,6 karbonhidrat, %8,9 nem, %15,4 protein, %18,1 yağ ve %7,1 mineral madde (kalsiyum, fosfor, demir ve nikotinik asit), tanenler, glikozitler saponinler ve flavon içermektedir (Pruthi, 1992). Meyvelerde ana bileşen olarak %35 ile %60 timol ve %2 ile %4 oranda kahverengimsi uçucu yağ bulunmaktadır (Bairwa ve ark., 2012). Meyveye bakıldığında sarı, kristalin flavon ve steroid benzeri bir madde izole edilmiş ve ayrıca 6-O- $\beta$  glukopiranozil timol de içerebilir (Garg, 1998).

Mısır anasonunun kullanımı sadece Orta Asya ve Kuzey Hindistan, özellikle kuzey batısı (Punjab, Gujarat) ile sınırlıdır. Mısır anasonu ayrıca Arap dünyasında sevilen ve Habeşistan'ın bir baharat karışımı olan bereberenin içerisinde de bulunur. Kavrulması ve kızartılması güçlü aromasını arttırken patates ve balık yanında iyi gider (Anonim, 2013b). Ayrıca, tohumları ilaç olarak, koruyucu olarak, çok sayıda gıdalar için aroma olarak ve parfümeride (Joshi, 2000) uçucu yağın üretimi için küçük miktarlarda kullanılmaktadır. *T. ammi* geleneksel bir tıbbi bitki olup yaygın olarak insanlarda ve hayvanlarda çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Karakteristik aromatik kokusu ve keskin bir tadı ile tohumlar köri baharat olarak da kullanılır. *T. ammi* vücudun direncini arttırmak için bir ham madde olarak, dizanteri ve nefes spreyi olarak da kullanılır (Bairwa ve ark., 2012).

Uçucu yağ (%2,5-5 kurutulmuş meyvelerde) baskın olan timol (%35-60), bununla beraber  $\alpha$ -pinen, p-simen, limonen ve  $\alpha$ -terpinen bulunur. Cezayirde yetişen mısır anasonunun açık havadaki kısımlarından (çiçekler, yapraklar) destile edilen uçucu yağda baskın bileşen isotimol (%50) ayrıca p-simen, timol, limonen ve  $\alpha$ -terpinen bulunur (Kambouche ve El-Abed, 2003).

Güney Hindistan'da mısır anasonu meyvelerinden, neredeyse saf timol (%98) elde edilir. Yapraklarında monoterpenoidler ve sesquiterpenoidler birlikte bulunur. Bitkinin yağ içeriğinde kadinen %43, longifolen %11, timol %5, kamphor %3 ve diğerleri de (Minija ve Thoppil, 2002) bulunmaktadır.

*T. ammi* geleneksel terapötik kullanımları şunlardır: galaktagog, mide, gaz giderici (Chialva ve ark., 1993), balgam söktürücü, antiseptik (Choudhury ve ark., 1998). Tohumları yağda kızartılır ve çorba yapılarak galaktagog için kullanılır (Howard ve ark., 1985). Bronşit, kolik ağrı (Singh ve ark., 2003), antipiretik, ateş düşürücü ilaç (Vadevathy ve ark., 1995), antilithiasis ve diüretik aktivite (Ramaswamy ve ark., 2010), antiplatelet-aggregatory (Srivastava, 1988), antitussive etkileri (Boskabady ve ark., 2005), antifilarial aktivitesi (Mathew ve ark., 2008), aflatoksin, detoksifikasyon (Velazhahan ve ark., 2010), nematocidal etkinlik (Kwon Park ve ark., 2007), sindirim uyarıcı (Platel ve ark., 2001) gibi kullanım alanları vardır. Bitki de terpenler, glikozitler ve steroller varlığı ve aktif anti-inflamatuvar etkiler gösterdiği bulunmuştur (Chawla ve ark., 1987).

## 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bitki doku kültürü ile bitkilerin hücre, doku, organlarından kozmetik, farmasötik veya tarımsal açıdan önemli sekonder metabolitler üretilebilmektedir. Bu amaçla üretimin daha verimli, daha ucuz ve ürünün daha çok miktarda olması için gün geçtikçe yeni yöntemler keşfedilmektedir. Moleküler biyolojik araştırmalarla ürün verimini artırma, bir materyalden birden çok ürün alma veya genetiği değiştirilmiş bitkilerden yeni ürünlerin kazanılması gibi metotlar geliştirilir. Bu metotlara göre güncellenen doku kültürü teknikleriyle üretilen doğal hammaddeler kullanılarak da yan etkisi olmayan “güvenli” ilaçlar elde edilebilir (Yağcı ve ark., 2008).

Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolit üretimi daha güvenilir, basit ve tahmin edilebilirdir. Normalde ana bitkide bulunmayan bileşiklerin de üretilebilmesine olanak sağlar. Politik, coğrafik ve mevsimsel engellerden bağımsız üretim yapılabilir. Karmaşık bitki ekstraksiyonlarıyla karşılaştırıldığında fitokimyasalların izolasyonu daha çabuk ve etkili yapılabilir. Hücre kültürleriyle bitkinin kendisinden elde edilen fitokimyasalların miktarı karşılaştırıldığında hücre kültürlerinden çok daha fazla miktarda ürün elde edilebilir hatta üretim endüstriyel boyuta taşınabilir. Hücre kültüründe genetik uygulamalara yönelik işaretlemeler ve değişimler yapılabilir. Temel araştırmalara (örneğin metabolik ve biyokimyasal yolların anlaşılmasında) yol gösterici tayinler yapılabilir. Biyotransformasyon ile enzim sistemleri kullanılarak ucuz öncü moleküllerden yeni bileşikler elde edilebilir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Razdan, 2003; Lila, 2005). Doku kültür teknikleri kullanılarak tıbbi bitkilerin bu avantajlarından faydalanmak için önce uygun bir protokol geliştirmesi gerekir. Bazı tıbbi bitkilerinde yapılan doku kültürü çalışmaları aşağıda verilmiştir.

Pevalek-Kozlina (1998), tehdit altındaki endemik bir bitki olan *Centaurea ragusina* için klonal çoğaltım metodu geliştirmek amacıyla yürüttükleri araştırmalarında tohumları çimlendirerek elde ettikleri 20 günlük fidelerin sürgünlerini kullanarak koltuk altı meristemlerden mikro çoğaltım yapmıştır. En iyi sürgün oluşumunun 1,0 µM BA ve 2,9 µM GA<sub>3</sub> içeren MS ortamında olduğunu bildirmiştir. Elde edilen sürgünler 2,5 µM IBA içeren MS ortamında köklendirildikten sonra saksılara aktarılmış olup, dış koşullarına adaptasyon sağlanmıştır.

Cuenca ve ark., (1999) *Centaurea pui*'nin mikroçoğaltımı amacıyla yürüttükleri çalışmalarında eksplant olarak infloresans gövdeleri kullanmışlar ve en fazla sürgün



oluşumunun 0,5 mg/L BA ya da 2 mg/L KIN içeren MS ortamında olduğunu, en uygun köklenmenin 2 mg/L IAA ve 2 mg/L IBA destekli MS ortamında olduğunu kaydetmişlerdir. Köklenen sürgünlerin %40'ını başarılı bir şekilde saksılara aktarmışlardır.

Cuenca ve Marco (2000), tehdit altındaki endemik bitki *Centaurea spacchii*'nin çiçekli meristemleri kullanılarak hızlı çoğaltım yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada %15 kontaminasyon olduğunu gözlemişlerdir. 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamında yüksek oranda sürgün oluşumu gözlenmiştir. Fakat oluşan sürgünlerin boyunun uzamadığı bildirilmiştir. Tek çeşit oksin kullanımı ile 6 hafta sonunda köklenme oranının düşük olduğu gözlenmiştir. İki çeşit oksin kullanımında ise en iyi sonuçların 2 mg/L IAA ve 2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında %60 köklenme olduğu gözlenmiştir. Sürgünlerin %50'si 3 hafta içinde köklenmeye başlamıştır. Seraya aktarılan bitkilerin ise %80'inin canlılığını koruduğunu rapor edilmiştir.

Çölgeçen (2005), poliploidi nedeniyle tohum tutma ve sert tohum sorunlarını aşmak amacıyla *T. pratense* bitkisinde mikroçoğaltım yolu ile üretimi amaçlamıştır. Farklı oranda BAP ve NAA içeren PC-L2 ve MS ortamları kullanılmıştır. *T. pratense* bitkisinde doğal tetraploid PC-L2 ortamında daha iyi sonuç alınmıştır. En iyi kallus ve sürgün oluşturan eksplantın apikal meristem eksplantı ve 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA içeren PC-L2 ortamında olduğu gözlenmiştir. 1 mg/L NAA içeren PC-L2 ortamında sürgünlü kalluslarda %94,4 oranında köklenme görülmüş ve *in vitro* olarak doğal tetraploid *T. pratense*'de organogenez gerçekleştirilmiştir. Bitkilerin tarlaya aktarımı yapılmıştır.

Daneshvar Royandazag (2005), adventif sürgün rejenerasyonu amacıyla *Papaver bracteatum*'ın 7 ve 18 nolu hatlarından alınan, hipokotil-kotiledon eksplantlarda sırasıyla 7. hatta en iyi sonuç 1 mg/L Kinetin, 0,5 mg/L NAA ve 0,1 mg/L GA<sub>3</sub> içeren MS ortamda ve 18. hatta 1 mg/L Kinetin, 2,00 mg/L NAA ve 0,1 mg/L GA<sub>3</sub>, 2,00 mg/L Kinetin, 2,00 mg/L NAA ve 0,1 mg/L içeren ortamlardan elde etmiştir. *P. pseudo-orientale* de ise en iyi rejenerasyon hipokotil-kotiledon eksplantında 15 mg/L BA ve 2,4-D ile ön muameleden sonra 0,24 mg/L 2,4-D ve 0,19 mg/L NAA içeren 2 mg/L glisine, 0,5 mg/L nikotinik asit, 0,5 mg/L piridoxine, 2,00 mg/L miyoinositol, 0,5 mg/L thiamine ile modifiye edilmiş MS ortamından elde edilmiştir. Köklenme sağlamak için, rejenere olan sürgünler 0,25, 0,50 ve 1,00 mg/L BA içeren MS besin ortamına alınmış olup, en iyi sonuç 0,5 mg/L BA içeren ortamlardan elde edilmiştir.

Gopi ve Ponmurugan (2006), *Ocimum basilicum* bitkisinde somatik embriyo üzerinden tam bitki rejenerasyonu için etkili bir protokol geliştirmişlerdir. Juvenil bitkinin yaprak eksplantından 1,0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic asid (2,4-D), %3 sükröz ve %0,9 agar ile desteklenmiş MS ortamında kallus oluşumu başlatılmıştır. Kalluslar 0,5 mg/L 2,4-D ve 1,0 mg/L BAP içeren MS ortamına aktarıldığında küresel yapılı embriyo farklılaşması olduğunu gözlenmiştir. Maksimum küresel yapılı embriyolar 1,0 mg/L BAP + 1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L KN ile daha fazla takviye edilen MS ortamında büyütülerek ve somatik embriyo üretilmiştir. Devam eden küresel embriyo şekilleri ve embriyo çimlenmeleri bu ortamda oluşmuştur. Bütün fidanlar özel yapılmış plastik bardak içeren soilrite üzerine transfer edilmesinin ardından bahçe toprağına transfer edilmiştir. *Ex vitro* koşullarda bitkilerin yaşama oranı %80 olduğunu belirlenmiştir.

Purohit ve Kothari (2007), *Trachyspermum ammi*' nin kotiledon ve kotiledon boğum eksplantlardan direkt somatik embriyogenez geliştirmişlerdir. Üç aşamalı direkt embriyogenez prosedürü 0,2 mg/L 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) içeren sıvı Murashige ve Skoog (MS) ortamda gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada 4 hafta içinde kallus oluşmadan globuler somatik embriyolar geliştirilmiştir. İkinci aşamada kalp ve torpedo şeklindeki embriyolar sıvı ortamında düşürülmüş 2,4-D oranı ile gerçekleştirilmiştir. Üçüncü aşamada eksplantları hormonsuz sıvı ortamında kazein hidrolizat ilave edilerek kültüre alınmıştır. Daha sonra eksplantlardan bitkiler elde etmek için 1 mg/L GA<sub>3</sub> içeren ortamında kültüre alınarak gerçekleştirilmiştir.

Sayılır ve ark., (2007) doğa da derin kök yapısı nedeniyle elverişsiz koşullarda yetişen kapari bitkisinin doku kültürü yapılarak tuz içeriği daha fazla olan MS ve ½ MS ortamında iyi geliştiğini belirlemişlerdir. Gamborg-White ortamlarında yeterli gelişme ve çoğalma olmamıştır. 3,0 mg/L BAP + 0,1 mg/L GA<sub>3</sub> + 0,05 mg/L IAA içeren ortamda, 750 sürgün/100 eksplant sağlanmıştır. BAP konsantrasyonunun artmasıyla küçük sürgün sayısında artma meydana gelmiştir. GA<sub>3</sub> ün (0,1-0,3 mg/L) sürgün uzunluğu üzerine bir etkisi bulunmamıştır. Tek başına 1,5 mg/L BAP'ın kullanılmasının daha etkin bulunmuş, 800 adet sürgün/100 eksplant (8 adet sürgün/eksplant) değerine ulaşılmıştır. Köklendirme aşamasında ise 3,0 mg/L IBA içeren ½ MS ortamında %75'lik bir köklenme sağlanmış olup, NAA hormonunun IBA ya göre daha etkisiz olduğu belirtilmiştir.

Siddique ve Anis (2007), *Ocimum basilicum*'un hızlı çoğaltımı için olgun bitkiden elde edilen sürgün ucu eksplantı farklı süre (4, 8, 12 ve 16 g) ve 5-100µM Thidiazuron

(TZD) içeren sıvı MS ortamda geliştirmişlerdir. Sürgün oluşumu için optimum koşulların 50 µM TDZ'ın 8 günlük indüksiyon sonrası TDZ olmayan MS ortamına alt kültüre alınması olduğu belirtilmiştir. En fazla sürgün rejenerasyonu %78, eksplant başına sürgün sayısı 11,6 adet ve sürgün uzunluğu 4,8 cm olduğunu kaydedilmiştir. 8 günden fazla indüksiyona bırakıldığında birleşmiş ve biçimsiz sürgün oluşturulmuştur. Elde edilen sürgünler 1,0 µM içeren IBA içeren ortamda köklendirildikten sonra, başarıyla toprağa aktarılmıştır.

Aasim ve ark., (2008) Kırmızı adasoğanı (*Urginea maritima* L.) bitkisinin tek ve ikili pul yapraklardan *in vitro* koşullarda soğan çoğaltımı yapmışlardır. Eksplantlar farklı oranda TDZ içeren MS ortamda 8 hafta karanlıkta veya 16 saat ışık fotoperiyot altında tutulmuştur. Çalışma sonuçlarına göre, karanlık ortam eksplantta rejenerasyona olumsuz etki bırakırken 16 saat ışık fotoperiyot altında tutulmuş eksplantlar üzerinde hızlı şekilde soğan rejenerasyonu gözlenmiştir. İkili pul yapraklar, tekli pul yapraklara göre soğan rejenerasyon için daha uygun görülmüştür. İkili pul yapraklar üzerinde hem adventif hemde yan soğan oluşumu görülmüştür. TDZ'nın tüm konsantrasyonlarda, adventif soğan oluşumuna göre yan soğan oluşumu daha fazla olmuştur. Elde edilen soğanları 1 mg/L IBA içeren ortamda köklendirilmiştir. Tüm soğanlar alıştırıldıktan sonra tarlaya aktarılmıştır.

Kalyoncu ve ark., (2008) bu çalışmada, selekte edilmiş bir iğde (*Eleagnus angustifolia* L.) tipinden erken haziranda alınan yeşil uç çeliklerinin, "Sisleme Sisteminde" iki farklı hava nisbi nem ortamında (%85-90 ve %95-100), Indol-3-Butirik Asit'in (IBA) uygulanan 5 farklı konsantrasyonunun (0, 500, 1500, 2500 ppm ve 3500 ppm) ve perlit köklendirme ortamının köklenmeleri üzerine etkilerini incelenmiştir. Araştırmada, dikilen çeliklerin tümünün canlı kaldığı ve yüzde yüze varan oranda köklendiğini belirlenmiştir. Çeliklerde kallus oluşumu, en yüksek %95-100 nem seviyesindeki 500 ppm doz uygulamasından (%12,50) elde edilmiştir. Köklenme oranı kontrol grubu dahil tüm uygulamalarda %75,00'in üzerinde gerçekleşmiş olup, en yüksek köklenme %85-90 nem seviyesindeki ortamda, 500 ppm ve 1500 ppm doz uygulamalarından (%100) elde edilmiştir. IBA dozu ve nem artışlarının köklenmeyi arttırmadığı gözlenmiştir. Çeliklerde köklenme yüzey uzunluğu, en fazla %85-90 nem seviyesinde 500 ppm doz uygulamasında (2,563 cm) belirlenmiştir. Kök sayısı bakımından, en yüksek değer %85-90 nem seviyesinde, 500 ppm doz uygulamasından (18,75 adet/çelik) elde edilmiştir. Çeliklerde en uzun kök %85-90 nem seviyesindeki kontrol grubundan (6,083

cm), en kısa kök ise, %95-100 nem seviyesindeki kontrol grubundan (0,323 cm) elde edilmiştir. Kök dallanması en yüksek %85-90 nem seviyesindeki 500 ppm doz uygulamasında (8,083 adet/çelik) bulunmuştur. İncelenen köklenme özellikleri dikkate alındığında, iğde yeşil uç çeliklerinin kolay köklendiği belirlenmiş olup, %85-90 nisbi nem seviyesindeki, kontrol grubu (%100), 500 ppm (%100) ve 1500 ppm IBA doz uygulamalarından en iyi köklenme özelliklerini elde edilmiştir.

Najaf (2008), kebere tohumlarının çimlenmesinde etkili, benzer zamanda mikro çoğaltımda kullanılabilecek olan bir yöntem geliştirmeye çalışmıştır. Tohumlar farklı oranlarda BAP, NAA ve GA<sub>3</sub> içeren MS ortamında başarılı bir şekilde (%100) çimlendirmiştir. Daha sonra *in vitro* ortamda gelişen bitkiciklerden alınan gövde, yaprak ve koltuk altı meristem eksplantları değişik oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarda rejenerasyona alınmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu 0,4 mg/L BAP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Elde edilen sürgünleri 50 mg/L IBA ile 5 dk. muamele edilip, MS ortamında köklendirilmiştir.

Siddique ve Anis (2008), *Ocimum basilicum*'un *in vitro* kültürü yoluyla olgunlaşmış bitkinin aksil tomurcuklar içeren nodal segmentleri 6-benziladenin (BA), thidiazuron (TGB), Kinetin (Kin) ve 2-izopentenil adenin (2-iP) kullanarak MS ortamında sürgünler üretmişlerdir. Tomurcuğun uyarması için 5,0 µM BA'nın optimum olduğu bulunmuştur. En fazla sürgünleri 2,5 µM BA ve 0,5 µM IAA içeren yarı MS ortamında elde edilmiştir. Bitkiler TDZ içermeyen ortamda kültüre alındığında sürgün oluşumu ve uzunluğunda artış görülmüştür. Elde edilen bitkilerin 1,0 µM IBA ortamının, köklenme için IAA ve NAA'a göre daha iyi olduğunu kanıtlanmıştır. *In vitro* ile üretilen bitkiler toprağa aktarılarak %90'ında adaptasyon sağlanmıştır.

Aasim ve ark., (2009) Çemen (*Trigonella fonemgraecum* L.) bitkisinde doku kültürü çalışmasıyla *in vitro* rejenerasyon protokolu geliştirmişlerdir. Bu çalışmada çemen bitkisinin sürgün ucu ve kotiledon yaprak eksplantları farklı oranda TDZ veya TDZ-IBA içeren ve agarla katılaştırılmış MS ortamında kültüre alınmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu 0,40 mg/L TDZ içeren MS ortamdan elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler köklendirelememişlerdir.

Uçar ve Turgut (2009), bu çalışmalarında doku kültürü tekniğinden yararlanarak *Sideritis perfoliata*, *Sideritis stricta* ve *Sideritis erythrantha* türlerinin *in vitro* rejenerasyon yeteneğini araştırmışlardır. Rejenerasyon çalışmalarında tohum, yaprak, yaprak sapı, boğum, boğum arası ve sürgün ucu gibi değişik eksplantlar denenmiştir. Üç

farklı türün tohumları chloramine-T ve sodyum hipoklorit ile sterilizasyon yapıldıktan sonra farklı dozlarda GA<sub>3</sub> içeren çimlendirme ortamlarına ekilmişlerdir. *Sideritis stricta* türünün tohumlarında hiç çimlenme görülmezken, diğer türlerin tohumlarında ise çimlenme oranının çok düşük kalmıştır. Yaprak, yaprak sapı, boğum ve boğum arası eksplantları ise farklı BAP ve NAA konsantrasyon ve kombinasyonları içeren %0,7 agar, %3 sükröz ve aktif kömür ilave edilmiş MS ortamında kültüre alınmışlardır. Kültür sırasında eksplantlardan kaynaklanan kontaminasyonlar görülürken, kontaminasyon oluşmayan eksplantlarda ise kararma gözlenmiştir. İlkbaharda yeni oluşan *Sideritis stricta* türüne ait bitkilerden alınan sürgün uçları farklı oranlarda TDZ içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Bu eksplantlardan sürgün oluşumu başarılıdır.

Aasim ve ark., (2010) *Trigonella* bitkisinin *in vitro* koşullarda çimlenen 8-10 günlük fidelerden elde edilen kotiledon boğum eksplantları 0,05-0,80 mg/L Kinetin, 0,25-1,0 mg/L BA ile 0 veya 0,20 mg/L NAA ve 0,05-0,80 mg/L TDZ ile 0 veya 0,10 mg/L IBA içeren ve gelrit ile katılaştırılan ortamlarda kültüre almışlardır. En fazla sürgün rejenerasyonunu TDZ-IBA içeren ortamlarda elde edilmiştir. Eksplant başına en fazla 22,21 adet sürgün 0,40 mg/L TDZ içeren ortamda kaydedilmiştir. Ortamlarda oksin varlığını sürgün uzunluğunu arttırmıştır. Elde edilen sürgünler 0,1-1,0 mg/L IBA veya NAA içeren ortamlara köklendirmek için kültüre alınmıştır.

Verma ve ark., (2011) *Digitalis lamarckii* (bodur yüksükotu) için direkt sürgün organogenezisi yolu ile etkili bir *in vitro* rejenerasyon protokolünü ilk defa bu çalışma ile rapor etmişlerdir. İki farklı deney seti kurularak; ilk sette *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş fidelerden alınan yaprak eksplantları kullanılarak, 6-benzilaminopurin (BAP), kinetin, thidiazuron (TDZ) ve zeatinin farklı konsantrasyonları karşılaştırılmış, ikinci sette ise sürgün çoğaltımı amacıyla, birinci sette kültüre alınan ve çok sayıda sürgün meydana getirmiş olan eksplantlar kullanılarak, indol-3-butirik asidin (IBA), BAP, kinetin, TDZ ve zeatin ile kombinasyonları test edilmiştir. Sürgün rejenerasyonu (birinci deney seti) sonuçlarına bakıldığında, TDZ'nin, BAP'dan istatistiki olarak çok daha etkili olduğu bulunmuş, 1,0 mg L<sup>-1</sup> dozunda kullanıldığında ise eksplant başına ortalama 10,3 sürgün üreterek, en başarılı sonucu vermiştir. Sürgün çoğaltımı (ikinci deney seti) sonuçlarına bakıldığında ise 0,2 mg L<sup>-1</sup> IBA'nın 0,2 mg L<sup>-1</sup> TDZ ile kombinasyonu, eksplant başına ortalama 16,5 sürgün üreterek, BAP (11,0 sürgün), zeatin (5,5 sürgün) veya kinetin (4,0 sürgün) ile kombinasyonuna göre istatistiki olarak

çok daha başarılı sonuçlar vermiştir. Rejenere olan sürgünler, 0,5 mg L<sup>-1</sup> indol-3-asetik asit (IAA) içeren ortamda kolaylıkla köklendirilmiştir. Köklendirilmiş rejenerantlar, daha sonra saksılara aktarılmış ve normal bir gelişme seyri göstererek olgunlaşma sürecini tamamlamışlardır. Bu çalışmada tanımlanan protokol ile, bitki rejenerasyonunun direkt sürgün organogenezisi yoluyla başarıldığı ortaya konulmuş ve tıbbi önemi olan bu endemik türde büyük ölçekli kardenolit üretimi, germplasm korunması ve genetik transformasyon çalışmalarına katkı sağlaması beklenmektedir.

Yücesan (2011), *Digitalis L.* türleri içeriğindeki kalp glikozitlerinin kalp kası kasılma ve kalp ritmini düzenlemesinden ötürü tıbbi ve ekonomik değeri yüksek olan bitkileri bu çalışmada yapılan birçok doku kültürü uygulaması, çoklu sürgün üretme maksadıyla farklı besi ortamları, büyüme düzenleyicileri ve *in vitro* koşullarda çimlendirilen fiderlerden izole edilen çeşitli eksplantlar ile yapmıştır. Sürgün rejenerasyonu, farklı besi ortamları arasından 0,5 mg/L thidiazuron (TDZ) ve 0,25 mg/L indol-3-asetik asit (IAA) içeren Linsmaier and Skoog (1965) besi ortamı, *Digitalis davisina* Heywood, *D. cariensis* Jaub. Et Spach em. Werner ve *D. trojana* Ivan türlerinde başarıyla optimize edilmiştir. *D. lamarckii* Ivan.'da ise büyüme düzenleyicilerinden benzil-amino-pürin (BA) ve naftalen-asetik-asit (NAA)'nın daha başarılı olduğu gözlenmiştir.

Kara ve ark., (2011) bu çalışma, biberiye (*Rosemary officinalis*), çördükotu (*Hyssopus officinalis*) ve adaçayı (*Salvia officinalis*) bitkilerinin çelikle çoğaltımı üzerine, farklı çelik alma dönemleri (mart, haziran, eylül) ve IBA dozlarının (kontrol-0, 1000, 2000, 3000 ve 4000 ppm) etkisini belirlemek amacıyla yürütmüşlerdir. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tıbbi ve Aromatik Bitkiler deneme alanından 2010 yılında alınan çelikler, Tarla Bitkileri Araştırma ve Uygulama Serasında farklı IBA dozları ile muamele edilerek, içinde perlit-torf (1:1) karışımından oluşan köklendirme ortamına dikilmişlerdir. Ortalama 60 gün boyunca köklendirilmeye bırakılan çeliklerin köklenme oranları, kök sayıları ve kök uzunlukları belirlenmiştir. Araştırmada çelik alma dönemleri ve IBA dozlarının çördük otu, biberiye ve adaçayının köklenmesi üzerine etkisi istatistiksel olarak  $P \leq 0,05$  düzeyinde önemli olmuştur. Biberiye, çördükotu ve adaçayında en yüksek köklenme oranı (sırasıyla %85,0, 82,3 ve 81,0), kök sayısı (sırasıyla 28,8, 21,6 ve 10,6 adet bitki) ve kök uzunluğu (7,1, 6,1 ve 5,1 cm) mart döneminde 4000 ppm IBA dozunda olduğu tespit edilmiştir.

Ekmekci ve ark., (2012) fesleğenin (*Ocimum basilicum L.*) Antalya geniş yapraklı türünün kotiledon boğum, hipokotil ve epikotil eksplantları 0,05-1,60 mg/L TDZ ile 0

veya 0,10 mg/L IBA içeren MS ortamında kültüre almışlardır. 4 hafta sonra eksplantları 3 g/L aktif kömür içeren ortamına alt kültüre alınmıştır. Kotiledon boğum eksplantı tüm ortamlarda çoklu sürgün oluşumu verirken diğer eksplantlar seçici TDZ-IBA içeren ortamlarda sürgün oluşmuştur. Elde edilen sürgünler IBA içeren ortamda köklendirilmiştir. Toprağa aktarılan bitkiler iklim odasında başarıyla adaptasyon sağlanmıştır.

Ekmekci ve ark., (2013) fesleğen (*Ocimum basilicum* L) bitkisinin 7-12 günlük fideciklerden epikotil, hipokotil ve sürgün ucu eksplantları izole edilerek 0,80-2,40 mg/L TDZ, 0-0,10 mg/L IBA içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Tüm ortamlarda ve tüm eksplantlarda %100 kallus oluşumu kaydedilmiştir. Eksplantlar kıyaslandığında sürgün ucu eksplantta diğer eksplantlara göre daha fazla sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. Epikotil, hipokotil ve sürgün ucu eksplant için eksplant başına sürgün sayısı sırasıyla 1,83-3,22, 1,00-3,39 ve 1,55-3,58 kaydedilmiştir. Epikotil, hipokotil ve sürgün ucu eksplant için sürgün uzunluğu sırasıyla 0,27-0,85 cm 0,22-0,79 cm ve 0,39-0,94 cm arasında değişmiştir ve maksimum uzunluğu 0,80 mg/L TDZ ortamında elde edilmiştir. Rejenere olan sürgünler köklendirme için 0,25-1,00 mg/L IBA ortamına aktarılmıştır. Köklendirilmiş bitkiler organik madde içeren saksılara aktarılarak iklimlenme koşulları için iklimlendirme odasında bekletilerek bitkilerin %70 hayatta ve büyümeyi sürdürdüğü kaydedilmiştir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan bitki materyali Mısır Anasonu (*T.ammi*) Pakistan'dan temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Rejenerasyon İçin Kullanılan Eksplantlar

Tez kapsamında kullanılan, zigotik embriyo direk olarak, kotiledon boğum, kotiledon yaprak, hipokotil, epikotil ve lamina eksplantları ise *in vitro* koşullarda MSO ortamında çimlenen bir ile üç haftalık fidelerden elde edilmiştir.

##### 3.1.3. Büyüme Düzenleyicilerinin Çözücüleri ve Saklama Koşulları

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Duchefa, Merck ve Sigma Aldrich Chemical Co. tarafından temin edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonları uygun çözücülerle çözüldükten (Çizelge 3.1) sonra standart şekilde istenilen miktarda ve oranda hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.1.** Kullanılan büyüme düzenleyici, antioksidant ve antibiyotik çözücüleri, stok konsantrasyonu ve saklama koşulları

Bitki büyüme düzenleyicileri	Çözücü	Stok konsantrasyonu (mg/ml)	Saklama koşulları(°C)
<b>Oksinler</b>			
IBA	1N NaOH	1/1	- 20
<b>Sitokinler</b>			
TDZ	Etanol	1/1	4
BAP	1N NaOH	1/1	4
Kinetin	1N NaOH	1/1	-20
<b>Anti Oksidantlar</b>			
PVP	dSu	1/1	4



Büyüme düzenleyici dozları, ortamlar otoklavda steril edilmeden önce veya gerekirse sonra ilave edilmiştir. Hazırlanan stok solüsyonlar uygun sıcaklıkta 6-12 ay saklanmıştır (Çizelge 3.1).

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Besin Ortamları ve Kültür Koşulları**

Denemelerde %3 sükröz içeren ve %0,65'lik agar ile katılaştırılmış (Duchefa Biochemie B.V. The Netherlands) MS ortamı (Murashige ve Skoog, 1962) kullanılmıştır. Ortam hazırlanırken distile saf su kullanılmıştır. Besin ortamına farklı konstrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Tüm denemelerde farklı oranda bitki hormonunu besin ortamına ilave ettikten sonra pH'sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5,8'e ayarlanmıştır. Ortamlar 104 KPa basınç altında ve 120 °C'de 20 dk tutularak otoklavlanmıştır. Tüm kültürler gün ışığı floresan (6000 lüks) altında 16 saat ışık fotoperiyodunda 24±1 °C sıcaklıkta tutulmuşlardır.

#### **3.2.2. *T. ammi* Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu**

Tohumların yüzey sterilizasyonu için farklı oranlarda (%50, 60 ve 70) ticari çamaşır suyu (ACE-%5,0 Çamaşır suyu) ve farklı sürelerde uygulanmıştır. Sterilizasyondan sonra tohumlar steril saf su ile 3 kez durulama işlemi yapılmıştır.

#### **3.2.3. *In vitro* Koşullarda *T. ammi* Tohumların Çimlendirilmesi**

Yüzey sterilizasyonu sağlanmış tohumları steril petri kapları veya GA<sup>7</sup> Magenta kapları içerisinde %3 sükröz içeren ve %0,65 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında 24±1°C'de 16 saat ışık fotoperiyodunda çimlendirilmiştir.

### **3.2.4. Eksplant İzolasyonu ve Kültüre Alınması**

Denemede kullanılan hipokotil eksplantı bir haftalık fideciklerden elde edilirken epikotil ve lamina eksplantları iki haftalık fideciklerden elde edilmiştir. Kotiledon boğum eksplantları sırayla bir hafta, iki hafta ve üç haftalık fideciklerden elde edilmiştir. Kotiledon yaprak ise bir haftalık fideciklerden alınmıştır. Olgunlaşmış zigotik embriyo (tohumlar) ise yüzey sterilizasyonundan sonra direk kültüre alınmıştır. Daha sonra, eksplantlar bulgularda gösterdiği şekilde farklı oran ve kombinasyonlarda BAP, TDZ, Kinetin, IBA ve GA<sub>3</sub> içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır.

### **3.2.5. Süspansiyon Kültüre Alınması**

Deneme kapsamında farklı eksplantlardan oluşan kallustan sürgün rejenerasyon elde edilmesi için süspansiyon kültürü kullanılmıştır. Süspansiyon kültürü için hormonlar ile beraber 1,0 g/L myo-inositol ve 1 mg/L PVP de kullanılmıştır. Daha sonra, eksplantlar 25 °C ve 150 rpm hızında bir hafta süreyle çalkalanmıştır.

### **3.2.6. Sürgünlerin Köklendirilmesi ve Dış Şartlara Ağıştırılması**

Denemelerin sonucunda elde edilen bitkilerin adventif sürgün oluşumu için 0,20-1,00 mg/L IBA içeren MS ortamı kullanılmıştır. IBA ortamda 3-4 hafta beklettikten sonra kök oluşum oranı kaydedilmiştir. Bir başka denemede ise 1,0 mg/L IBA ile beraber MS ortamında farklı oranda sukroz (45, 60, 75 ve 90 g/L) kullanılmıştır.

### **3.2.7. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi**

Rejenerasyon denemeleri 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler bilgisayarda "SPSS 16 for Windows" programı kullanılarak one way ANOVA ile analiz edilmiştir. Yüzde değerleri istatistik analizi yapılmadan önce "arcsin transformasyon"una tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran, 1967). Post hoc testlerinden LSD veya Duncan testleri uygulanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Sterilizasyon Çalışmaları

#### 4.1.1. Ticari Çamaşır Suyu (%5) ile Yüzey Sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyon için bitki tohumları ticari çamaşır suyunun (%5 NaOCl Çamaşır suyu) (ACE) %50, 60 ve 70'lik oranlar ve farklı sürelerle tabi tutulmuştur. İki hafta sonra bulaşık oranı (%), çimlenme oranı (%) ve bitki ölümü oranı (%) verileri alınıp istatistik analizi yapılmıştır (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** *T. ammi* bitkisinde çamaşır suyu ile yapılan yüzey sterilizasyonun bulaşık oranı, çimlenme oranı ve ölüm oranlarına ait varyans analizi

VK	SD	Bulaşık oranı (%)		Çimlenme oranı (%)		Ölüm oranı (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Çamaşır suyu	4	202,23	2,39*	73,33	0,54 <sup>ös</sup>	73,33	0,54 <sup>ös</sup>
Hata	10	84,40	-	135,00	-	135,00	-
Genel Toplam	14	-		-		-	

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli, \*  $p < 0,05$  düzeyinde önemli, <sup>ös</sup> önemsiz

Çizelge 4.1'de çamaşır suyunun farklı oranları tohum sterilizasyonda bulaşık oranlarına  $p < 0,05$  düzeyinde etkilediği görülmüştür. Diğer yandan çimlenme oranı ve fideliklerin ölüm oranlarına bakıldığında çamaşır suyu çamaşır suyu oranlarının önemsiz olduğu kaydedilmiştir. Bu farklılığın önem düzeyine belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Çamaşır suyu (NaOCl) ile yapılan yüzey sterilizasyon sonuçları

Çamaşır suyu oranı (%)	Süre (dk)	Bulaşık oranı* (%)	Çimlenme oranı <sup>ös</sup> (%)	Ölüm oranı <sup>ös</sup> (%)
50	5	20,00 <sup>a</sup>	70,00 <sup>ös</sup>	30,00 <sup>ös</sup>
50	10	18,33 <sup>a</sup>	63,33	36,66
50	15	0,00 <sup>b</sup>	60,00	40,00
60	5	13,66 <sup>ab</sup>	71,66	28,33
70	5	18,33 <sup>a</sup>	63,33	36,66

\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p<0,05$  düzeyinde önemlidir.

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.2’de bulaşık oranının % 0-20,00 arasında olduğu gözlenmiştir. En yoğun bulaşığın %20,00 ile %50 çamaşır suyu 5 dk steril edilen tohumlarda olduğu tespit edilmiştir. %50 çamaşır suyu 15 dk steril edilen tohumlara bakıldığında hiç bulaşığın olmadığı kaydedilmiştir. Diğer yandan çimlenme oranının %60,00-71,66 arasında kaydedilirken, fidecinin ölüm oranının ise %28,33-40,00 arasında değiştiği kaydedilmiştir. Çimlenme oranı ve ölüm oranları istatistik olarak önemsiz olduğu gözlenmiştir.

#### **4.2. *In vitro* Çimlenme**

Yüzey sterilizasyondan sonra, tohumlar %0,65 agar ile katılaştırılmış MSO içeren ortamında kültüre alınmıştır. 4-5 gün içinde çimlenme başlamış olup, 8-20 gün içinde %100 çimlenme kaydedilmiştir.

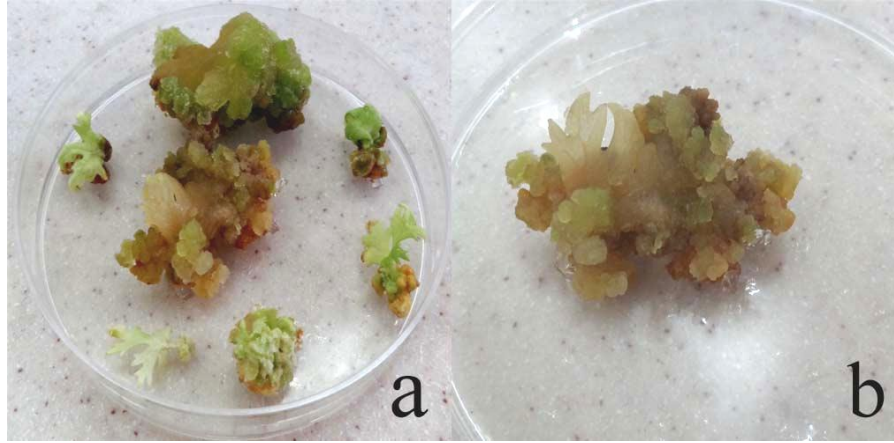
#### **4.3. *T. ammi* Bitkisinin Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları**

##### **4.3.1. *T. ammi* Bitkisinin Lamina Eksplantlarında Sürgün Rejenerasyonu**

Birinci denemede *T. ammi* bitkisinin *in vitro* koşullarda çimlenme sağlayan üç haftalık fideciklerden lamina eksplantları alınarak farklı dozlarda BAP (0,25, 0,50, 0,75, 1,00 ve 1,25 mg/L) içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Yapraklarda şişmenin olduğu ve daha

fazla gelişmeden yaprakların sarardığı kaydedilmiştir. Deneme sonucunda her hangi gelişme gözlenmemiştir.

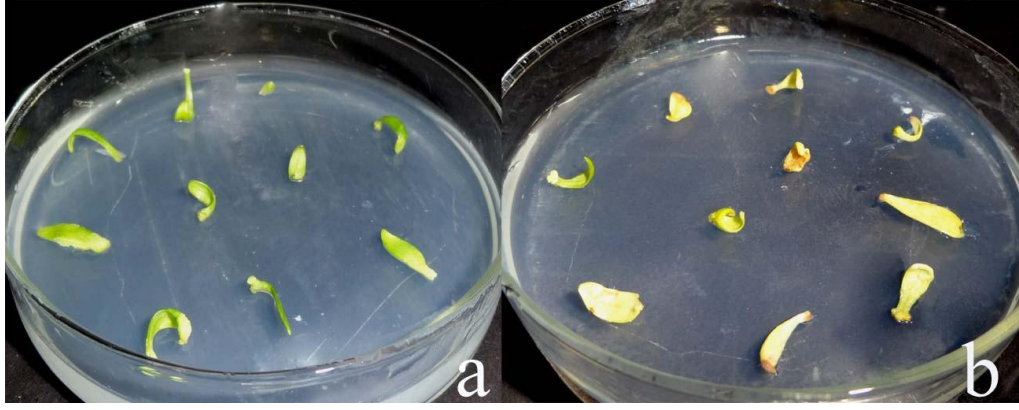
İkinci denemede *T. ammi* bitkisinin *in vitro* koşullarda çimlenme sağlayan iki haftalık fideciklerden lamina eksplantları farklı oranda TDZ (0,10, 0,20, 0,40, 0,80 ve 1,60 mg/L) ve IBA (0,10 mg/L) içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. 0,40 mg/L TDZ ve 0,80 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren ortamda dört hafta sonra eksplantların şiştiği ve kallus oluştuğu (Şekil 4.1a) tespit edilmiştir. Diğer tüm ortamlarda, eksplantlar sararıp ölmüştür. Kalluslardan sürgün elde etmek amacıyla sekiz hafta sonra esplantlar (kalluslu) 0,50 mg/L GA<sub>3</sub> içeren ortama alınmıştır. On iki hafta sonra eksplantta sürgün uçları (Şekil 4.1b) gözlenmiştir. Ancak kallus sürgün vermemiştir ve daha sonra beyazlaşıp ölmüştür.



Şekil 4.1. *T. ammi* bitkisinin lamina yaprak eksplantında (a) kallus oluşumu, (b) sürgün uçları

#### 4.3.2. *T. ammi* Bitkisinin Kotiledon Yaprak Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

Yapılan birinci çalışmada *T.ammi* bitkisinin *in vitro* koşullarda çimlenme sağlayan bir haftalık fideciklerden kotiledon yaprak eksplantları farklı BAP oranları (0,25, 0,50, 0,75, 1,00 ve 1,25 mg/L) içeren petrilere kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlarda üç hafta içerisinde yaprak petiyol kısımlarında beyaz oluşumlar (Şekil 4.2a) gözlenmiştir. Ancak yapraklarda daha fazla gelişimin olmadığı ve yaprakların sarardığı (Şekil 4.2b) kaydedilmiştir.



**Şekil 4.2.** *T. ammi* bitkisinde kotiledon yaprak eksplantında (a) petiyol kısmı beyazlıklar (b) yapraklarda sararmalar

Diğer bir çalışmada *T. ammi* bitkisinin *in vitro* koşullarda çimlenme sağlayan iki haftalık fideciklerden kotiledon yaprak eksplantları alınarak farklı dozlarda TDZ (0,10 0,20, 0,40, 0,80 ve 1,60 mg/L) ve IBA (0,10 mg/L) bulunan ortamlarda kültüre alınmıştır. Üç hafta sonra tüm ortamlarda eksplantların petiyol kısımlarında beyaz oluşumlar gözlenmiştir. Fakat 0,20 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren ortamda kallus oluştuğu (Şekil 4.3) kaydedilirken, diğer ortamlarda kallus oluşumu gözlenmemiştir. Sekiz hafta sonrasında kallus oluşumunun yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Kallustan sürgün elde etmek amacıyla eksplantlar 0,50 mg/L GA<sub>3</sub> ortamına aktarılmıştır. Deneme başlangıcından on iki hafta sonra yapraklarda hiç sürgün oluşumu gözlenmediği için deneme sonlandırılmıştır.



**Şekil 4.3.** *T. ammi* bitkisinde kotiledon yaprak eksplantında (a) kallus oluşumu

### 4.3.3. Farklı TDZ-IBA Dozlarında *T. ammi* Bitkisinin Epikotil Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

*T. ammi* bitkisinin *in vitro* koşullarda çimlenen iki haftalık fideciklerden epikotil eksplantları izole edilerek 0,10, 0,20, 0,40, 0,80 ve 1,60 mg/L TDZ, 0+0,10 mg/L IBA içerdiği ortamlarda kültüre alınmıştır. Dört hafta sonrasında TDZ-IBA olan ortamlarda kallus oluşumu kaydedilmiştir. Bunun yanında yalnızca TDZ olan ortamlardan sadece 0,40 mg/L TDZ içeren ortamda az miktarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Yedi hafta sonra eksplantlar MS ortamına alınmıştır. MS ortamına aktarıldıktan iki hafta sonra 1,60 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren ortamda yoğun kallus oluşumu (Şekil 4.4a) gözlenmiştir. Kalluslardan sürgün elde etmek amacıyla eksplantlar benzer oranda TDZ-IBA içerdiği ve 1,0 mg/L myo-inositol ve 1 mg/L PVP ilave edilen sıvı MS ortamına süspansiyon kültür için kültüre alınmıştır. Ortamlar, 25 °C sıcaklık ve 150 rpm'de bir hafta süreyle çalkalanmıştır. Bir hafta sonra (Şekil 4.4b), eksplantlar süspansiyon kültüründen 0,50 mg/L GA<sub>3</sub> içeren ortama aktarılmıştır. Üç hafta sonra, 0,10 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren ortamda sürgün uçlarının (Şekil 4.4c) olduğu gözlenmiştir. Fakat sürgün uçları büyümemiş ve ölmüştür.



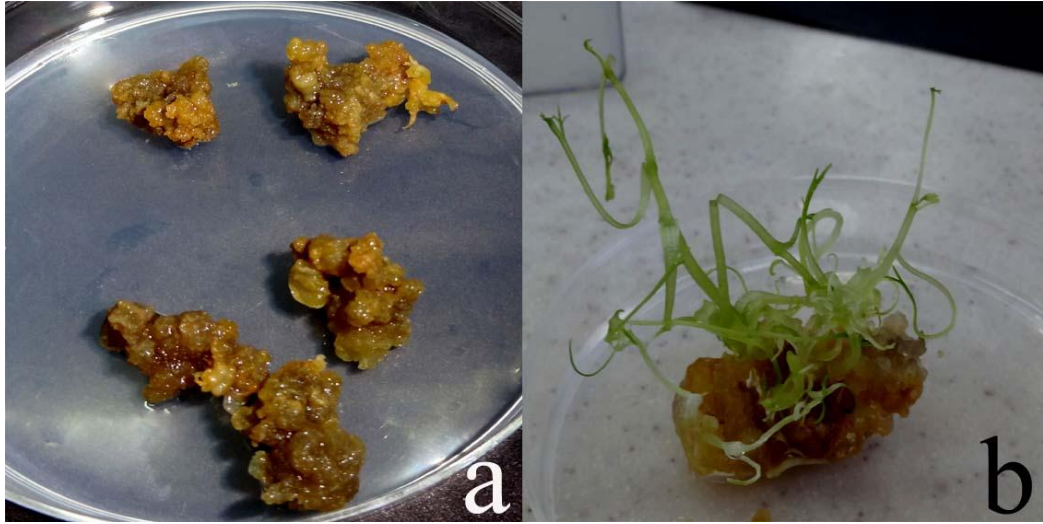
Şekil 4.4. *T. ammi* bitkisinin epikotil eksplantında (a) yoğun kallus oluşumu, (b) süspansiyon kültür sonrası, (c) küçük sürgün uçları

### 4.3.4. *T. ammi* Bitkisinin Hipokotil Eksplantlarında Sürgün Rejenerasyonu

Yapılan bu çalışmada *T. ammi* bitkisinin *in vitro* koşullarda çimlenme sağlayan bir haftalık fideciklerden hipokotil eksplantları farklı BAP oranları (0,25, 0,50, 0,75, 1,00 ve 1,25 mg/L) içeren petrilere kültüre alınmıştır. Denemede hipokotil eksplantına bakıldığında yalnızca 1,50 mg/L BAP ortamında altı hafta sonra bazı eskplantlarda kallus oluşumu tespit edilmiştir. Oniki hafta sonunda kallusların büyüdüğü gözlenmiş



ve bu eksplantlar iki gruba ayrılmıştır. Birinci gruptaki eksplantlar 1,50 mg/L BAP, 1 g/L myo-inositol ve 1 mg/L PVP içeren sıvı ortamında süspansiyon kültür için alınmıştır. Eksplantlar 25 °C ve 150 rpm’de bir hafta süreyle çalkalayıcıya bırakılmıştır. Süspansiyon kültüre alınan eksplantta kararmalar olduğu (Şekil 4.5a) gözlenmiştir. Daha sonra eksplantlar MSO ortamına aktarılmıştır. MSO ortamda dört hafta sonra kallusun iç kısımda sürgün uçları görülmüştür. Fakat bu uçların büyümediği gözlenmiştir. İkinci gruptaki eksplantlar ise 0,50 ve 1,00 mg/L GA<sub>3</sub> içeren ortamına aktarılmıştır. İki hafta sonra eksplantlarda çoklu sürgünlerin (Şekil 4.5b) çıktığı kaydedilmiştir.



**Şekil 4.5.** *T. ammi* bitkisinin hipokotil eksplantında sürgün rejenerasyonu (a) süspansiyon kültüründen sonra sürgün uçları ve kararma, (b) GA<sub>3</sub> içeren ortamda sürgün oluşumu

#### **4.3.5. *T.ammi* Bitkisinin Kotiledon Boğum Eksplantlarında Sürgün Rejenerasyonu**

##### Farklı TDZ-IBA Dozlarının *T. ammi* Bitkisinin Kotiledon Boğum Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

Bu çalışmada *in vitro* koşullarda çimlenen iki haftalık bitkilerden elde edilen kotiledon boğum eksplantları alınarak 0,10-1,60 mg/L TDZ ile 0+0,10 mg/L IBA içeren ortamda kültüre alınmıştır. Tüm ortamlarda iki hafta içerisinde eksplantlarda sürgün ve kallus oluşumu (Şekil 4.6a) gözlenmiştir. Dört hafta sonra, hemen hemen her ortamda yoğun kallus oluşumları (Şekil 4.6b) ile çoklu sürgün oluşumu da gözlenmiştir. Yedi hafta sonra, kalluslardan sürgün elde etmek amacıyla eksplantlar MS ortamına alınmıştır.



0,10 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren ortamdan MS'e alınan kalluslardan bir hafta sonra küçük sürgün uçlarının oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.6c). Benzer şekilde, üç hafta sonra kallus olmayan kotiledon boğumlarda da sürgün oluşumu kaydedilmiştir. MS ortamında bitkiler beş hafta bekletildikten sonra kallus oluşumu oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.3). Sürgün rejenerasyon oranı %100 olduğu için varyans analizi yapılmamıştır.



**Şekil 4.6.** *T. ammi* bitkisinde kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyonu (a) iki hafta, (b) dört hafta sonrası sürgün ve kallus, (c) MSO ortamına aktarıldıktan sonra yeni sürgün oluşumu

**Çizelge 4.3.** Farklı TDZ-IBA dozlarının *T. ammi* bitkisinin kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyona ait varyans analizi

VK	SD	Kallus Oluşum Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
TDZ-IBA	9	1104,29	5,24**	64,76	210,87*	0,77	33,79**
Hata	20	210,84	-	0,31	-	0,02	-
Genel Toplam	29	-		-		-	

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli, \*  $p < 0,05$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.3'de görüldüğü üzere TDZ-IBA ortamlarda kallus oluşumu ve sürgün uzunluğu bakımından  $p < 0,01$  düzeyinde farklılık derecesine sahipken eksplant başına sürgün sayısının farklılığı  $p < 0,05$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Kotiledon boğum eksplantında, farklı TDZ-IBA dozlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi

<b>TDZ (mg/L)</b>	<b>IBA (mg/L)</b>	<b>**Kallus oluşum oranı (%)</b>	<b>*Eksplant başına sürgün sayısı (adet)</b>	<b>**Sürgün uzunluğu (cm)</b>
0,10	-	85,71 <sup>ab</sup>	4,30 <sup>d</sup>	2,08 <sup>c</sup>
0,20	-	71,42 <sup>bc</sup>	19,40 <sup>a</sup>	1,49 <sup>d</sup>
0,40	-	100,00 <sup>a</sup>	7,29 <sup>bc</sup>	1,52 <sup>d</sup>
0,80	-	42,85 <sup>d</sup>	7,43 <sup>bc</sup>	1,50 <sup>d</sup>
1,60	-	57,14 <sup>cd</sup>	3,43 <sup>d</sup>	2,39 <sup>b</sup>
0,10	0,10	71,42 <sup>bc</sup>	4,00 <sup>d</sup>	1,57 <sup>d</sup>
0,20	0,10	71,42 <sup>bc</sup>	6,45 <sup>c</sup>	2,74 <sup>a</sup>
0,40	0,10	42,85 <sup>d</sup>	8,25 <sup>b</sup>	1,51 <sup>d</sup>
0,80	0,10	85,71 <sup>ab</sup>	8,00 <sup>b</sup>	1,58 <sup>d</sup>
1,60	0,10	52,38 <sup>cd</sup>	4,00 <sup>d</sup>	1,04 <sup>e</sup>

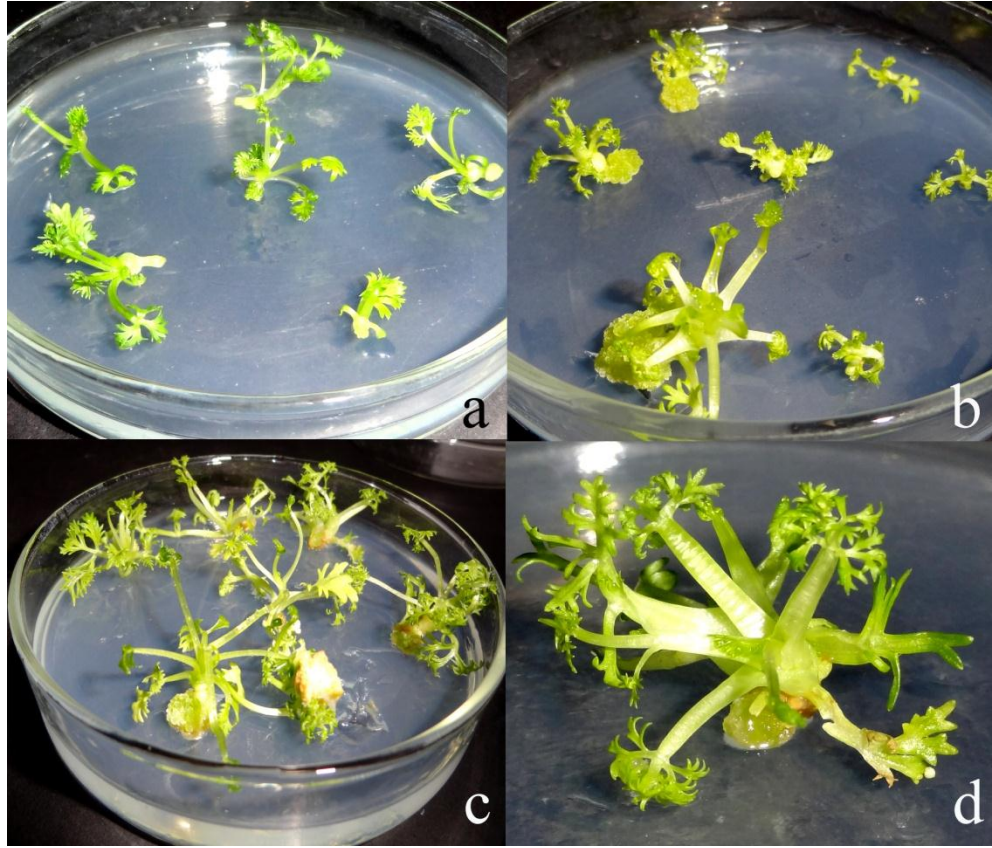
\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p < 0,05$  düzeyinde önemlidir.

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p < 0,01$  düzeyinde önemlidir.

Kotiledon boğum eksplantlarında sürgün rejenerasyonu oranı %100 olarak kaydedilmiştir. Çizelge 4.4’de Kallus oluşumu %42,85-100,00 arasında bulunurken, en fazla %100,00 kallus oluşumu 0,40 mg/L TDZ içeren ortamda kaydedilmiştir (Çizelge 4.4). En düşük kallus oluşumu ise 0,80 mg/L TDZ ve 0,40 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren ortamda gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından 0,10-1,60 mg/L TDZ içeren ortamında 3,43-19,40 adet arasında kaydedilirken, 0,10-1,60 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren ortamında 4,00-8,25 adet arasında bulunmuştur (Çizelge 4.4). En fazla eksplant başına sürgün sayısı (19,40 adet) 0,20 mg/L TDZ içeren ortamından elde edilmiştir. 0,20 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren ortam dışında diğer ortamlarda 0,10 mg/L IBA eklendiğinde her hangi değişiklik kaydedilmemiştir. Sürgün uzunluğu 1,04-2,74 cm arasında olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.4). En uzun (2,74 cm) sürgün ise 0,20 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren ortamından elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler IBA içeren ortamlarda köklendirilip adaptasyon için toprağa aktarılmıştır.

### Farklı BAP Dozlarının *T. ammi* Bitkisinin Bir Haftalık Kotiledon Boğum Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

Bu çalışmada *in vitro* koşullarda çimlenen 7-8 günlük bitkilerden alınan kotiledon boğum eksplantları 0,25-1,25 mg/L BAP içeren ortamlara kültüre alınmıştır. Bütün ortamlarda bir hafta içinde eksplantta sürgün çıktığı (Şekil 4.7a) gözlenirken, üç hafta içinde çoklu sürgün oluşumu (Şekil 4.7b) ile kallus oluşumu (Şekil 4.7c) kaydedilmiştir. 4 hafta sonra 0,75 mg/L BAP bulunan ortamda yoğun hyperhidrik sürgünler olduğu gözlenmiştir. 10 hafta sonunda (Şekil 4.7d) kallus oluşumu, sürgün rejenerasyonu, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.5).



**Şekil 4.7.** *T. ammi* bitkisinin kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyonu (a) bir hafta ve (b) üç hafta sonra sürgün oluşumu, (c) kallus oluşumu, (d) 10 hafta sonra sürgün oluşumu

**Çizelge 4.5.** *T. ammi* bitkisinin bir haftalık kotiledon boğum eksplantının farklı BAP dozlarında sürgün rejenerasyonu ait varyans analizi

VK	SD	Kallus Oluşum Oranı (%)		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)	
		KO	F	KO	F
BAP	4	2404,23	20,93**	224,43	0,69 <sup>ös</sup>
Hata	10	114,82	-	326,51	-
Genel toplam	14	-		-	
VK	SD	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
BAP	4	4,00	0,88 <sup>ös</sup>	1,26	4,75**
Hata	10	4,56	-	0,26	-
Genel toplam	14	-		-	

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli, <sup>ös</sup> önemsiz

Çizelge 4.5’de sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından BAP ortamlarında önemli bir fark kaydedilmemiştir (Çizelge 4.5). Diğer yandan, kallus oluşum oranı ve sürgün uzunluğu  $p < 0,01$  düzeyinde farklılık derecesine sahip olduğu bulunmuştur. Bu farklılığın önem derecesini belirlemek için Duncan testi yapılmıştır (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6.** Bir haftalık kotiledon boğum eksplantında farklı BAP dozlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi

BAP (mg/L)	**Kallus oluşum oranı (%)	<sup>ös</sup> Sürgün rejenerasyon oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	**Sürgün uzunluğu (cm)
0,25	0,00 <sup>c</sup>	71,43 <sup>ös</sup>	4,70 <sup>ös</sup>	1,90 <sup>a</sup>
0,50	52,37 <sup>b</sup>	80,95	6,98	2,17 <sup>a</sup>
0,75	57,14 <sup>ab</sup>	80,95	7,83	2,60 <sup>a</sup>
1,00	76,18 <sup>a</sup>	85,71	6,75	1,69 <sup>ab</sup>
1,25	42,18 <sup>b</sup>	95,24	6,33	0,85 <sup>b</sup>

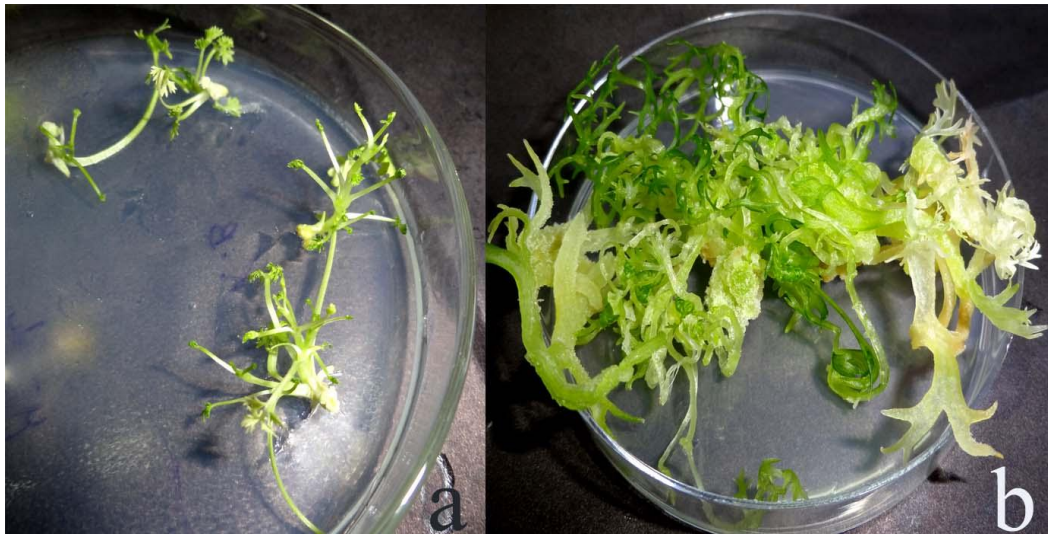
\*\* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p < 0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.6’da görüldüğü gibi sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı istatistik olarak önemli bulunmamıştır. Sürgün rejenerasyonu oranı %71,43-95,24

arasında kaydedilmiş olup, en fazla oran %95,24 ile 1,25 mg/L BAP ortamında gözlenmiştir (Çizelge 4.6). Eksplant başına sürgün sayısı ise 4,70-7,83 adet olarak belirlenmiştir. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı (7,83 adet) 0,75 mg/L BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir (Çizelge 4.6). Kallus oluşumu %0-76,18 arasında bulunurken, en fazla kallus oluşumu %76,18 ile 1,00 mg/L BAP ortamında kaydedilmiştir. Buna karşı, 0,25 mg/L BAP ortamında hiç kallus oluşumuna rastlanmamıştır (Çizelge 4.6). Sürgün uzunluğu ise 0,85-2,60 cm olarak bulunmuştur. En uzun sürgün 0,75 mg/L BAP içeren MS ortamında 2,60 cm iken, en kısa sürgün 1,25 mg/L BAP içeren ortamında 0,85 cm olduğu kaydedilmiştir (Çizelge 4.6). Elde edilen sürgünler IBA içeren ortamında köklendirilip adaptasyon için toprağa aktarılmıştır.

#### Farklı BAP Dozlarının *T. ammi* Bitkisinin Üç Haftalık Kotiledon Boğum Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

Üç haftalık çimlenen fideciklerden kotiledon boğum eksplant alınarak 0,25-1,25 mg/L BAP içeren ortamlarına aktarılmıştır. Beş gün sonra eksplantlardan tekli sürgünler çıktığı gözlemlenmiştir. Üç hafta sonra hemen hemen her ortamda çoklu sürgünler tespit edilmiştir (Şekil 4.8a). Dört hafta sonra tüm ortamlarda hyperhidrik (Şekil 4.8b) sürgünlerin çıktığı kaydedilmiştir. Dokuz hafta sonra kallus oluşumu oranı, sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.7).



**Şekil 4.8.** *T. ammi* bitkisinin kotiledon boğum eksplantında sürgün oluşumu (a) çoklu ve normal sürgün oluşumu, (b) hyperhidrik sürgün oluşumu

**Çizelge 4.7.** *T. ammi* bitkisinin üç haftalık kotiledon boğum eksplantında farklı BAP dozlarının sürgün rejenerasyona ait varyans analizi

VK	SD	Kallus Oluşum Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
BAP	4	2041,66	1,96*	16,06	1,64*	1,29	3,34**
Hata	10	1041,66	-	9,80	-	0,38	-
Genel toplam	14	-		-		-	

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli, \*  $p < 0,05$  düzeyinde önemli

Sürgün rejenerasyonunda 0,25-1,25 mg/L BAP ortamları arasında fark gözlemlenmemiş, rejenerasyon oranı bütün ortamlarda %100 olarak kaydedilmiştir. Çizelge 4.7 incelendiğinde kallus oluşum oranı ve sürgün uzunluğu  $p < 0,01$  düzeyinde farklı olduğu tespit edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise  $p < 0,05$  düzeyinde farklı olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi Çizelge 4.8 verilmiştir.

**Çizelge 4.8.** Üç haftalık kotiledon boğum eksplantında farklı BAP dozlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi

BAP (mg/L)	*Kallus oluşum oranı (%)	*Eksplant başına sürgün sayısı	**Sürgün uzunluğu (cm)
0,25	0,00 <sup>b</sup>	9,21 <sup>ab</sup>	1,50 <sup>b</sup>
0,50	41,66 <sup>ab</sup>	12,91 <sup>a</sup>	2,91 <sup>a</sup>
0,75	66,66 <sup>a</sup>	8,85 <sup>ab</sup>	2,60 <sup>ab</sup>
1,00	16,66 <sup>ab</sup>	8,66 <sup>ab</sup>	2,00 <sup>ab</sup>
1,25	16,66 <sup>ab</sup>	6,50 <sup>a</sup>	1,44 <sup>b</sup>

\* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p < 0,05$  düzeyinde önemlidir.

\*\* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p < 0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelgede 4.8'de görüldüğü gibi kallus oluşum oranı %0,00-66,66 arasında gözlemlenmiştir. En yoğun kallus oluşumu 0,75 mg/L BAP içeren ortam ile 66,66 olduğu bulunmuştur. 0,25 mg/L BAP içeren ortamda ise kallus oluşumunun olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Eksplant başına sürgün sayısı 6,50-12,91 adet belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Eksplant başına sürgün sayısı en fazla 12,91 adet ile 0,50 mg/L BAP içeren ortamda tespit edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısının en az (6,5



adet) 1,25 mg/L BAP içeren ortamda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Sürgün uzunluğu incelendiğinde ise 1,44-2,91 cm arasında değişim gösterdiği gözlemlenmiştir. En uzun sürgün 0,50 mg/L BAP içeren ortamda 2,91 cm tespit edilirken, en kısa sürgün 1,25 mg/L BAP içeren ortamda 1,44 cm olduğu kaydedilmiştir (Çizelge 4.8).

#### 4.3.6. *T. ammi* Bitkisinin Zigotik Embriyo Eksplantlarında Sürgün Rejenerasyonu

##### Farklı TDZ Dozlarının *T.ammi* Bitkisinin Zigotik Embriyo Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

Bu çalışmada zigotik embriyo (tohum) eksplantından sürgün rejenerasyon elde etmek amacıyla %50 çamaşır suyu ile 15 dk steril edilen tohumlar 0,20-0,80 mg/L TDZ içeren petrilere ekim yapılmıştır. İki hafta sonra bütün petrilere çoklu sürgünler (Şekil 4.9a) ile beraber radikula kısımlarının çok fazla geliştiği ve kallus oluşturduğu (Şekil 4.9a) da fark edilmiştir. Beş hafta sonra çoklu sürgünlerden daha fazla sürgün elde etmek amacıyla radikula kısmı çıkarılarak MSO ortamı bulunan magentalara aktarılmıştır. Bir hafta sonra eksplantlardan yeni sürgünler (Şekil 4.9b) çıktığı gözlenmiştir. MSO'a aldıktan iki hafta sonra yaprak üzerindende (Şekil 4.9c) çoklu sürgünlerin oluştuğu gözlenmiştir. Denemenin başlangıcından 11 hafta sonrasında kallus oluşumu oranı, sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.9).



**Şekil 4.9.** *T. ammi* bitkisinin zigotik embriyo eksplantında TDZ ortamlarında sürgün rejenerasyonu (a) iki hafta sonra sürgün ve kallus oluşumu, (b) MSO ortamında sürgün gelişimi, (c) yaprakta sürgün oluşumu

**Çizelge 4.9.** *T. ammi* bitkisinin zigotik embriyo eksplantının farklı TDZ dozlarının varyans analizi

VK	SD	Kallus Oluşum Oranı (%)		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)	
		KO	F	KO	F
TDZ	3	6333,33	108,57**	300,00	12,00**
Hata	8	58,33	-	25,00	-
Genel toplam	11	-		-	
VK	SD	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
TDZ	3	10,94	4,56*	0,92	6,38*
Hata	8	2,40	-	0,14	-
Genel toplam	11	-		-	

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli, \*  $p < 0,05$  düzeyinde önemli

Çizelgede 4.9’da kallus oluşum oranı ve sürgün rejenerasyon oranının  $p < 0,01$  düzeyinde farklılık derecesine sahip olduğu saptanmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna bakıldığında  $p < 0,05$  farklılık derecesine sahip olduğu kaydedilmiştir. Bu farklılıkların önem derecesini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır (Çizelge 4.10).

**Çizelge 4.10.** Farklı TDZ dozlarının *T. ammi* bitkisinin tohumlarında sürgün rejenerasyona etkisi

TDZ (mg/L)	**Kallus oluşum oranı (%)	**Sürgün rejenerasyonu oranı (%)	*Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	*Sürgün uzunluğu (cm)
0,20	6,66 <sup>c</sup>	100,00 <sup>a</sup>	12,96 <sup>a</sup>	1,44 <sup>b</sup>
0,40	10,00 <sup>c</sup>	100,00 <sup>a</sup>	8,90 <sup>b</sup>	1,25 <sup>b</sup>
0,60	70,00 <sup>b</sup>	80,00 <sup>b</sup>	10,40 <sup>ab</sup>	2,48 <sup>a</sup>
0,80	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	8,93 <sup>b</sup>	1,48 <sup>b</sup>

\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p < 0,05$  düzeyinde önemlidir.

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p < 0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelgede 4.10’da kallus oluşumu %6,66-100,00 arasında değiştiği belirlenmiştir. En yoğun kallus oluşumu 0,80 mg/L TDZ içeren ortamda %100 oranında olduğu



kaydedilmiştir. Buna karşı, en az kallus oluşumu ise 0,20 mg/L TDZ ortamında %6,66 olduğu saptanmıştır. Denemede TDZ oranı arttıkça kallus oluşumunda artış olduğu kaydedilmiştir. Sürgün rejenerasyonuna bakıldığında %80-100 arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10). En az sürgün rejenerasyonu 0,60 mg/L TDZ içeren ortamda %80,00 olarak belirlenmiş ve diğer ortamların hepsinde %100 sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 9,80-12,96 adet arasında değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 4.10). En çok sürgün 0,20 mg/L TDZ içeren ortamda 12,96 adet olduğu saptanmıştır. Sürgün uzunluğunun 1,25-2,48 cm arasında değişim gösterdiği kaydedilmiştir. En uzun sürgün 2,48 cm ile 0,60 mg/L TDZ içeren ortamda tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

#### Farklı Kinetin-IBA Dozlarının *T. ammi* Bitkisinin Zigotik Embriyo Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

Bu denemede zigotik embriyo (tohum) eksplantından sürgün rejenerasyon elde etmek amacıyla %50 çamaşır suyu ile 15 dk steril edilen tohumlar 0,10, 0,20, 0,40, 0,80 ve 1,60 mg/L Kinetin ile 0+0,10 mg/L IBA içeren ortamlara ekim yapılmıştır. Bir hafta sonra bütün ortamlarda çimlenme gözlenmiştir. 0,10 mg/L Kinetin ve 0,10 mg/L Kinetin + 0,10 mg/L IBA ortamında sürgün uzunluğunun çok fazla olduğu (Şekil 4.10a) tespit edilmiştir. Dört hafta sonra çok küçük çoklu sürgünler (Şekil 4.10b) kaydedilmiştir. Denemenin başlangıcından 8 hafta sonrasında kallus oluşumu oranı, sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.11).



**Şekil 4.10.** *T. ammi* bitkisinde Kinetin-IBA ortamlarında zigotik embriyo eksplantında sürgün rejenerasyonu (a) bir hafta sonra uzamış sürgünler , (b) dört hafta sonra çoklu sürgün oluşumu

**Çizelge 4.11.** *T. ammi* bitkisinin zigotik embriyo eksplantının farklı Kinetin-IBA dozlarında varyans analizi

VK	SD	Kallus Oluşum Oranı (%)		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Kin-IBA	9	1486,08	19,75**	320,43	4,57**
Hata	30	75,23	-	70,02	-
Genel toplam	39	-		-	
VK	SD	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
Kin-IBA	9	0,25	1,59*	5,80	9,76**
Hata	30	0,15	-	0,59	-
Genel toplam	39	-		-	

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli, \*  $p < 0,05$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.11’de Kinetin-IBA ortamlarında kallus oluşum oranı, sürgün rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu  $p < 0,01$  düzeyinde farklılık derecesine sahipken, eksplant başına sürgün sayısının  $p < 0,05$  düzeyinde farklılığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.12’de verilmiştir.

**Çizelge 4.12.** Farklı Kinetin-IBA dozlarının *T. ammi* bitkisinin tohumlarında sürgün rejenerasyona etkisi

Kinetin (mg/L)	IBA (mg/L)	**Kallus oluşum oranı (%)	**Sürgün rejenerasyon oranı(%)	*Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	**Sürgün uzunluğu (cm)
0,10	-	0 <sup>c</sup>	95,83 <sup>ab</sup>	1,88 <sup>ab</sup>	5,23 <sup>a</sup>
0,20	-	0 <sup>c</sup>	97,91 <sup>a</sup>	1,93 <sup>ab</sup>	3,54 <sup>ab</sup>
0,40	-	0 <sup>c</sup>	95,83 <sup>ab</sup>	1,73 <sup>b</sup>	2,31 <sup>de</sup>
0,80	-	0 <sup>c</sup>	85,41 <sup>abcd</sup>	1,81 <sup>b</sup>	1,74 <sup>e</sup>
1,60	-	0 <sup>c</sup>	95,83 <sup>ab</sup>	2,14 <sup>ab</sup>	1,62 <sup>e</sup>
0,10	0,10	8,30 <sup>c</sup>	83,33 <sup>bcd</sup>	2,13 <sup>ab</sup>	4,24 <sup>ab</sup>
0,20	0,10	29,16 <sup>b</sup>	87,49 <sup>abc</sup>	1,85 <sup>b</sup>	3,04 <sup>bcd</sup>
0,40	0,10	39,58 <sup>ab</sup>	72,91 <sup>d</sup>	2,00 <sup>ab</sup>	2,82 <sup>cde</sup>
0,80	0,10	49,99 <sup>a</sup>	91,66 <sup>ab</sup>	1,63 <sup>b</sup>	3,93 <sup>bc</sup>
1,60	0,10	27,08 <sup>b</sup>	74,99 <sup>cd</sup>	2,51 <sup>a</sup>	1,82 <sup>e</sup>

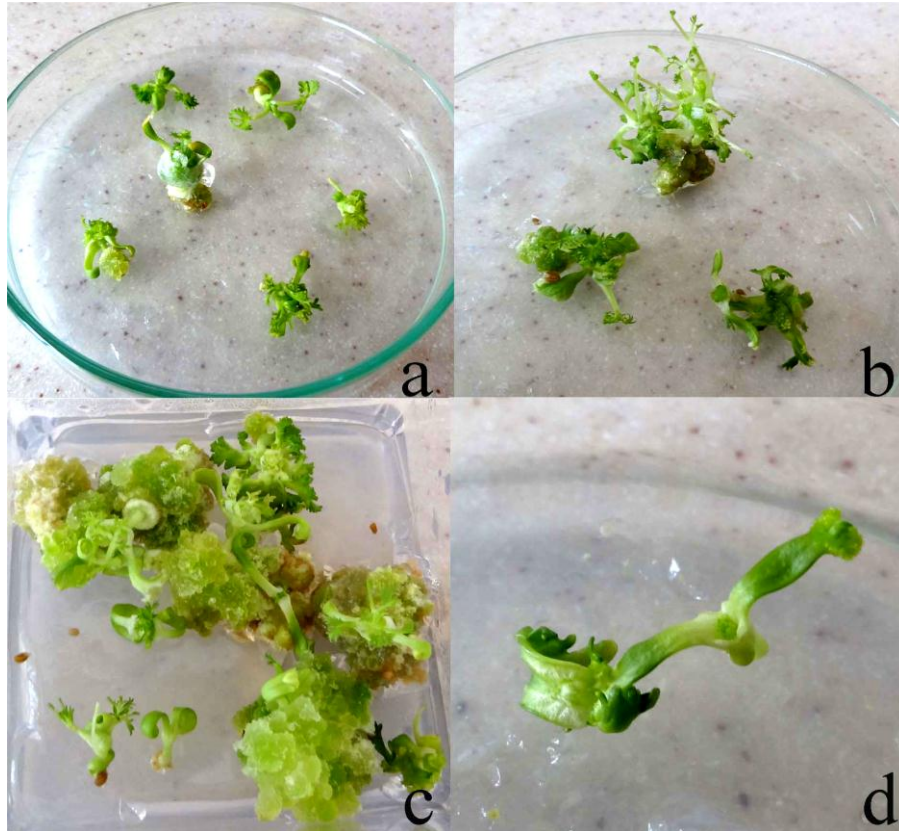
\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p<0,05$  düzeyinde önemlidir.

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.12 inceleniğinde kallus oluşumunun 0,10-1,60 mg/L Kinetin içeren ortamlarda hiç gözlenmezken, 0,10-1,60 mg/L Kinetin + 0,10 mg/L IBA ortamlarda %8,30-49,99 arasında değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 4.12). En yoğun kallus oluşumu 0,80 mg/L Kinetin + 0,10 mg/L IBA içeren ortamda %49,99 olduğu tespit edilmiştir. Sürgün rejenerasyon oranı %72,91-%97,91 arasında kaydedilmiştir. En az sürgün rejenerasyon oranı %40 mg/L Kinetin + 0,10 mg/L IBA içeren ortam ile %72,91 olduğu gözlenirken en yüksek oran ise %97,91 ile 0,20 mg/L Kinetin ortamında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12). Eksplant başına sürgün sayısı 1,63-2,51 adet arasında değiştiği tespit edilmiştir. En fazla eksplant başına sürgün sayısı 2,51 adet ile 1,60 mg/L Kinetin + 0,10 mg/L IBA içeren ortamda olduğu gözlenmiştir. En az eksplant başına sürgün sayısına bakıldığında 1,63 adet ile 0,80 mg/L Kinetin + 0,10 mg/L IBA içeren ortamda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12). Sürgün uzunluğu incelendiğinde 1,62-5,23 cm arasında olduğu gözlenmiştir. En uzun sürgün 0,10 mg/L Kinetin ortamında 5,23 cm olarak tespit edilirken, en kısa sürgün (1,62 cm) 1,60 mg/L Kinetin içeren ortamda kaydedilmiştir (Çizelge 4.12).

### Farklı TDZ-IBA Dozlarının *T. ammi* Bitkisinin Zigotik Embriyo Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

Zigotik embriyo (tohum) eksplantından sürgün rejenerasyonu elde etmek için %50 çamaşır suyu ile 15 dk steril edilen tohumlar 0,10-1,60 mg/L TDZ ve 0-0,10 mg/L TDZ-IBA içeren ortamlara ekim yapılmıştır. Bir hafta içinde tüm ortamlarda sürgün oluşumu kaydedilmiştir. İki hafta içinde çoklu sürgün oluşumunun başladığı ve dört hafta sonrasında hemen hemen her ortamda çoklu sürgünlerin (Şekil 4.11a,b) varlığı gözlenmiştir. Bazı ortamlarda yoğun kallus (Şekil 4.11c) oluşumu da kaydedilmiştir. Denemede bazı ortamlarda yaprak uçlarında kallus oluşumu ve sürgün uçları gözlenmiştir. Sekiz hafta sonrasında 0,40 mg/L TDZ içeren ortamda yaprakdan sürgünlerin çıktığı kaydedilmiştir (Şekil 4.11d). Sekiz haftanın sonunda kallus oluşumu oranı, sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.13).



**Şekil 4.11.** *T. ammi* bitkisinde TDZ-IBA ortamlarda zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu (a,b) dört hafta sonra çoklu sürgün oluşumu, (c) kallus oluşumu, (d) yaprak ucunda sürgünler

**Çizelge 4.13.** Farklı TDZ-IBA dozlarında *T. ammi* bitkisinin zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Kallus Oluşum Oranı (%)		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)	
		KO	F	KO	F
TDZ-IBA	9	1626,89	9,63**	96,73	0,72 <sup>ös</sup>
Hata	20	168,94	-	134,26	-
Genel toplam	29	-		-	
VK	SD	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
TDZ-IBA	9	8,44	2,62**	0,17	4,65**
Hata	20	3,21	-	0,03	-
Genel toplam	29	-		-	

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli, \*  $p < 0,05$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.13’de görüldüğü gibi kallus oluşum oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından  $p < 0,01$  düzeyinde farklılık derecesine sahip olduğu saptanmıştır. Sürgün rejenerasyonun ise önemsiz olduğu belirlenmiştir. Bu farklılıkların önem derecesini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır (Çizelge 4.14).

**Çizelge 4.14.** Farklı TDZ-IBA dozlarının *T. ammi* bitkisinin zigotik embriyo eksplantında sürgün rejenerasyonu

<b>TDZ (mg/L)</b>	<b>IBA (mg/L)</b>	<b>**Kallus oluşum oranı (%)</b>	<b><sup>ös</sup>Sürgün rejenerasyon oranı (%)</b>	<b>**Eksplant başına sürgün sayısı (adet)</b>	<b>**Sürgün uzunluğu (cm)</b>
0,10	-	58,33 <sup>ab</sup>	94,44 <sup>ös</sup>	9,73 <sup>a</sup>	1,03 <sup>ab</sup>
0,20	-	36,10 <sup>bcd</sup>	88,88	7,17 <sup>ab</sup>	0,74 <sup>bc</sup>
0,40	-	24,99 <sup>cd</sup>	77,77	7,46 <sup>ab</sup>	0,77 <sup>bc</sup>
0,80	-	16,66 <sup>d</sup>	88,88	6,81 <sup>ab</sup>	0,51 <sup>c</sup>
1,60	-	13,88 <sup>d</sup>	86,10	7,25 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>c</sup>
0,10	0,10	44,44 <sup>bc</sup>	86,11	5,72 <sup>b</sup>	1,28 <sup>a</sup>
0,20	0,10	69,44 <sup>a</sup>	83,33	5,81 <sup>b</sup>	0,84 <sup>bc</sup>
0,40	0,10	69,44 <sup>a</sup>	91,66	4,44 <sup>b</sup>	0,72 <sup>bc</sup>
0,80	0,10	80,55 <sup>a</sup>	91,66	5,20 <sup>a</sup>	1,01 <sup>ab</sup>
1,60	0,10	44,44 <sup>bc</sup>	77,77	4,05 <sup>a</sup>	0,90 <sup>b</sup>

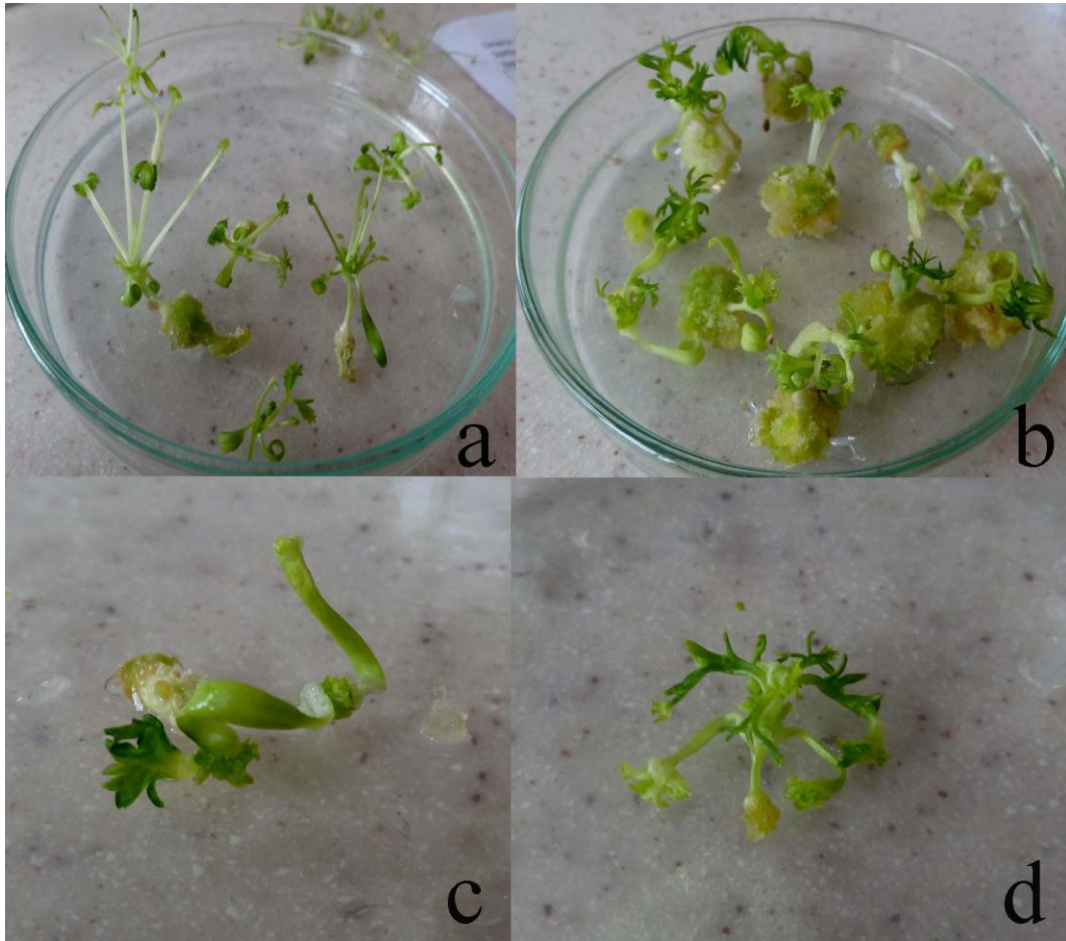
\* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p < 0,05$  düzeyinde önemlidir.

\*\* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p < 0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.14 incelendiğinde kallus oluşum oranının %13,88-80,55 arasında olduğu kaydedilmiştir. En yoğun kallus oluşumu 0,80 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA ortamında kaydedilirken, en düşük oranın ise 1,60 mg/L TDZ ortamında olduğu kaydedilmiştir (Çizelge 4.14). Sürgün rejenerasyonuna bakıldığında %77,77-94,44 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Eksplant başına sürgün sayısı bakımından 4,05-9,73 adet olduğu ve en yüksek 0,10 mg/L TDZ içeren ortamda 9,73 adet olarak tespit edilmiştir. En düşük eksplant başına sürgün sayısı ise 4,05 adet ile 1,60 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içerikli ortamda bulunmuştur (Çizelge 4.14). Sürgün uzunluğu incelendiğinde 0,47-1,28 cm olarak belirlenmiştir. En uzun sürgün 0,10 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren ortamda 1,28 cm, en kısa sürgün ise 1,60 mg/L TDZ ortamında 0,47 cm olarak gözlemlenmiştir. Genel olarak ortamlarda 0,10 mg/L IBA ilave edildiğinde kallus oluşum oranı ve sürgün uzunluğunda artış gözlenmiştir. Buna karşı, eksplant başına sürgün sayısında azalma kaydedilmiştir (Çizelge 4.14).

## Farklı BAP-IBA Dozlarının *T. ammi* Bitkisinin Zigotik Embriyo Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

Bu çalışmada zigotik embriyo (tohum) eksplantından sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla %50 çamaşır suyu ile 15 dk steril edilen tohumlar 0,50, 1,00, 2,00 ve 2,50 mg/L BAP ile 0+0,10 mg/L IBA içeren ortamlara kültüre alınmıştır. Bir hafta içinde ortamlarda çimlenmenin başladığı ve iki hafta sonra bütün ortamlarda sürgün oluşumunun gerçekleştiği gözlenmiştir. Üç hafta sonunda çoklu sürgün oluşumları (Şekil 4.12a) tespit edilmiştir. Altı hafta sonra eksplantlarda yoğun kallus oluşumu da gözlenmiştir (Şekil 4.12b). Yedi hafta sonra bazı ortamlarda yaprak uçlarında sürgün oluşumu kaydedilmiştir (Şekil 4.12c,d). Sekiz hafta sonunda kallus oluşum oranı, sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.15).



**Şekil 4.12.** *T. ammi* bitkisinin BAP-IBA ortamlarda zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu (a) üç hafta sonra çoklu sürgün rejenerasyonu , (b) kallus oluşumu, (c),(d), yaprak uçlarında sürgün rejenerasyonu

**Çizelge 4.15.** Farklı BAP-IBA dozlarının *T. ammi* bitkisinin zigotik embriyo eksplantında varyans analizi

VK	SD	Kallus Oluşum Oranı (%)		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)	
		KO	F	KO	F
BAP-IBA	8	723,96	1,78*	86,82	1,60*
Hata	18	406,49	-	54,03	-
Genel toplam	26	-		-	
VK	SD	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
BAP-IBA	8	9,75	7,03**	0,03	3,96**
Hata	18	1,38	-	0,01	-
Genel toplam	26	-		-	

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli, \*  $p < 0,05$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.15’de görüldüğü üzere farklı BAP-IBA ortamlarında kallus oluşum oranı ve sürgün rejenerasyon oranı  $p < 0,05$  düzeyinde farklılık derecesine sahipken, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu  $p < 0,01$  düzeyinde farklılığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.16’de verilmiştir.



**Çizelge 4.16.** Farklı BAP-IBA dozlarının *T. ammi* bitkisinin zigotik embriyo eksplantında sürgün rejenerasyonu

BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	*Kallus oluşum oranı (%)	*Sürgün rejenerasyon oranı(%)	**Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	**Sürgün uzunluğu (cm)
0,50	-	36,10 <sup>ab</sup>	94,44 <sup>ab</sup>	9,99 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>
1,00	-	66,66 <sup>ab</sup>	97,22 <sup>ab</sup>	9,50 <sup>a</sup>	0,78 <sup>b</sup>
2,00	-	58,33 <sup>ab</sup>	83,33 <sup>b</sup>	6,20 <sup>bc</sup>	0,79 <sup>b</sup>
2,50	-	33,33 <sup>b</sup>	91,66 <sup>ab</sup>	6,40 <sup>bc</sup>	0,93 <sup>ab</sup>
0,50	0,25	75,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	10,05 <sup>a</sup>	0,92 <sup>ab</sup>
1,00	0,25	72,22 <sup>ab</sup>	88,88 <sup>ab</sup>	8,03 <sup>ab</sup>	0,99 <sup>a</sup>
1,50	0,25	59,91 <sup>ab</sup>	94,44 <sup>ab</sup>	6,74 <sup>bc</sup>	1,07 <sup>a</sup>
2,00	0,25	47,21 <sup>ab</sup>	88,88 <sup>ab</sup>	5,90 <sup>bc</sup>	1,06 <sup>a</sup>
2,50	0,25	41,66 <sup>ab</sup>	86,11 <sup>ab</sup>	5,74 <sup>c</sup>	1,02 <sup>a</sup>

\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p<0,05$  düzeyinde önemlidir.

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.16’da kallus oluşum oranının %33,33-75,00 arasında değiştiği kaydedilmiştir. En yoğun kallus oluşumunun 0,50 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA içerikli ortamda ve en az kallusun ise 2,50 mg/L BAP ortamında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.16). Genel olarak IBA içerikli ortamlarda kallus oluşumun yoğun olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.12b). Sürgün rejenerasyonunun %83,33-100 arasında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.16). En çok sürgün rejenerasyonu %100 ile 0,50 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA içerikli ortamda belirlenmiştir. Sürgün rejenerasyonunun en az (%83,33) olduğu ortam ise 2,00 mg/L BAP ortamı olarak kaydedilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 5,74-10,05 adet arasında elde edilmiştir. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı (10,05 adet) 0,50 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA ortamındayken, en az eksplant başına sürgün sayısı ise (5,74 adet) 2,50 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA ortamında olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.16). Sürgün uzunluğunun 0,78-1,07 cm arasında değiştiği gözlenmiştir. En uzun sürgün 1,07 cm ile 1,50 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA içerikli ortamda gözlenmiştir. En kısa sürgün 1,00 mg/L BAP içeren ortamda 0,78 cm olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.16)

#### 4.4. In Vitro Köklendirme

Tez kapsamında çoğaltım amacıyla yapılan çalışmalarda IBA içerikli ortamlarda küçük kök oluşumu kaydedilmiş olup, toprağa adaptasyon için aktarılmıştır. *In vitro* koşullarda elde edilen köklenmemiş sürgünler ise köklenme amacıyla 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 ve 1,60 mg/L IBA içeren ortamlarda kültüre alınmış ve üç hafta sonrasında bütün ortamlarda köklenmenin olduğu gözlenmiştir. IBA içeren ortamda çoklu sürgün oluşumu ile birlikte küçük kallus oluşumları (Şekil 4.13a) ve daha ince kökler de kaydedilmiştir (Şekil 4.3b).



**Şekil 4.13.** *T. ammi* bitkisinin IBA ortamlarında (a) çoklu sürgün ve kallus oluşumu, (b) ince kökler

Bitkilerde daha sert gövde ve daha güçlü kök elde etmek amacıyla fidecikler 45, 60, 75 ve 90 g/L sükröz içerikli ortamlara alınmıştır. 75 g/L sükröz içeren ortamda 4 hafta sonunda fideciklerin sert, güçlü yapıda olduğu ve kök yoğunluğunun da çok fazla olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** *T. ammi* bitkisinin sükröz ortamında sert yapılı yoğun köklü görünümü

#### **4.5 Bitkilerin Dış Koşullara Adaptasyonu**

Köklendirilmiş bitkilerin köklerine zarar vermeden agardan arındırmak için çeşme suyu kullanılmıştır. Daha sonra, Aasim ve ark., (2008, 2009, 2010, 2011, 2012) çalıştığı yöntemine göre bitkiler ilk olarak çeşme suyu içinde 10-15 dk bekletilmiştir. Bitkiler toprağa aktarılmadan önce, saksılara bol miktarda su verilmiştir. Toprağa aktarıldıktan sonra bitkilerin nem dengesini koruyabilmek için saksılar üzerinde şeffaf poşetler geçirilerek ve iklim odasında  $23\pm 1$  °C’te bırakılmıştır. Bir hafta sonra poşetlerde delik açılarak adaptasyon sağlanmaya çalışılmış ancak adaptasyon sağlanamamış ve bitkiler ölmüştür.

Bir başka çalışma da torf, torf+perlit (3:1, 2:1, 1:1,) ve tek perlit kullanılmıştır. Bitkilerden bazıları iki üç dk çeşme suyunda bekletilerek bazıları bekletilmeden agardan arındırıldıktan sonra saksılara aktarılmıştır. Saksılara bol miktarda su verildikten sonra bitkilerin nem dengesini korumak için şeffaf poşetler geçirilmiştir. Daha sonra saksılar

23±1 °C sıcaklık, %90 nem ve 5000 lux ışık içeren iklimlendirme dolabında bırakılmıştır. Bir hafta bekletildikten sonra poşetlere delikler açılmış ve 15 gün sonra poşetler tamamen çıkarılmıştır. Bitkilerin her hangi olumsuz etkisi göstermeden sağlıklı şekilde adaptasyonu sağlanmıştır (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15** *In vitro* koşullarda çoğaltılmış *T. ammi* bitkisinin dış koşullarda adaptasyonu



**Şekil 4.16** *In vitro* koşullarda çoğaltılmış *T. ammi* bitkisi üzerinde çiçek oluşumu

## 5. TARTIŞMA

Mısır anasonu önemli tıbbi ve aromatik bir bitkidir. Dünyada Asya, Avrupa ve Afrika kıtalarında tek yıllık bir bitki olarak yayılış gösterip, çeşitli amaçla kullanılmaktadır. Türkiye’de yalnız Şanlıurfa ve Gaziantep illerinde yayılış gösteren ekonomik bir bitkidir (Tübives, 2012). Bu tez çalışmasında mısır anasonunun çeşitli eksplantları çoklu sürgün eldesi için çeşitli hormonlara tabi tutularak sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir.

### *Ticari Çamaşır Suyu (%5) ile Yüzey Sterilizasyon*

Sterilizasyon çalışmamızda %50, %60 ve %70 oranlarında çamaşır suyu çeşitli sürelerde (5, 10, 15 dk) uygulanmıştır. %50 çamaşır suyu ve 15 dk muamele sonucunda %100 sterilizasyon sağlanmıştır. Çamaşır suyu farklı kültür bitkilerin yüzey sterilizasyonu için farklı oranda kullanılmıştır (Aasim ve ark., 2008). *Trigonella* (Aasim ve ark., 2009, 2010), tıgllu fiğ (Aasim ve ark., 2011), mercimek (Aasim, 2012) ve nohut (Aasim ve ark., 2013) bitkilerinde tohum sterilizasyonu için %100 çamaşır suyu kullanılmıştır.

Çimlenme oranlarına bakıldığında en fazla çimlenmenin %60 çamaşır suyu ile 5 dk muamele sonucu olduğu gözlenmiştir. Ancak bulaşık oranı ve gelişen bitkilerin ölüm oranının yüksek olması sebebiyle %50 çamaşır suyu 15 dk muamele tercih edilmiştir. Buna karşı, *Trigonella* (Aasim ve ark., 2009, 2010) ve fesleğen (Ekmekci, 2013) bitkilerinde %100 çamaşır suyu ile muamele sonucunda MSO ortamında %100 çimlenme kaydedilmiştir. *T. ammi* bitkisinde düşük çimlenme oranının sebebi ise tohumların kabuğunun daha ince olması sonucu yüzey sterilizasyon işlemlerinde çamaşır suyunun embriyolarına zarar verdiğinden kaynaklandığını düşünülmektedir.

### *T. ammi Bitkisinin Lamina Eksplantlarında Sürgün Rejenerasyonu*

*T. ammi* bitkisinin *in vitro* koşullarda çimlenmeyi sağladıktan sonra lamina eksplantları BAP ve TDZ-IBA içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. BAP içeren tüm ortamlarda bulunan laminalarda sadece şişmeler görülmüştür. Buna karşı, 0,40 mg/L TDZ ve 0,80 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren MS ortamda dört hafta sonra eksplantların şiştiği ve kallus oluştuğu gözlenmiştir. Fakat daha sonra gelişmenin olmadığı ve eksplantlarda klorosis ve daha sonra nekroz ve daha sonra ölüm tespit edilmiştir. TDZ potansiyel bir

herbistidir. Bunun sebebi kullanılmış dozlarının *T. ammi* bitkisine toksik olup, eksplant gelişmelerine engel olduğunu düşünülmektedir.

#### *T. ammi* Bitkisinin Kotiledon Yaprak Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

*T. ammi* bitkisinin *in vitro* koşullarda çimlenen fideciklerden kotiledon yaprak eksplantları farklı BAP oranları ve farklı TDZ-IBA içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. BAP ortamlarında petiyol (yaprak sapı) kısımlarının beyaz oluşumlar dışında daha fazla gelişmenin olmadığı kaydedilmiştir. TDZ ortamında ise petiyol kısımlarında beyaz oluşumların yanısıra yalnızca 0,20 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren ortamda kallus oluştuğu ve daha sonra gelişmelerin ilerlemediği gözlenmiştir. Benzer şekilde Aasim ve ark., (2009, 2010) *Trigonella* bitkisinin kotiledon yaprak eksplantından kallus oluşumu gözlenirken her hangi sürgün oluşumu kaydetmemişlerdir. Benzer şekilde, Mahesh ve ark., (2012) *Launaea sarmentosa* bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonu için 0,5 mg/L BA + 0,2 mg/L NAA içeren ortamın uygun olduğu kaydetmişlerdir. Bu tez kapsamında çalışılmış *T. ammii* bitkisi ve Mahesh ve ark., (2012)'nin çalıştığı bitkilerin ve çalıştığı dokuların iç yapı farklı olup hormonlara karşı farklı tepki verdiği düşünülmektedir.

#### *T. ammi* Bitkisinin Hipokotil Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

Denemede *T. ammi* bitkisinin *in vitro* koşullarda çimlenme sağlayan bir haftalık fideciklerden hipokotil eksplantları farklı BAP oranları içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. BAP içerikli ortamlardan yalnızca 1,50 mg/L BAP ortamında kallus oluştuğu diğer ortamlarda herhangi bir değişikliğin olmadığı kaydedilmiştir. Kallustan sürgün elde etmek amacıyla eksplantlar bir hafta süreyle süspansiyon kültüre ve daha sonrasında GA<sub>3</sub> ortamına alarak sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Benzer şekilde Ekmekçi (2013), Fesleğen bitkisinde hipokotil eksplantında BAP-NAA ortamlarında kallus oluşumu ile sürgün rejenerasyonu elde etmiştir. Buna karşı Aasim ve ark., (2010) *Trigonella* bitkisinde hipokotil eksplantında kallus oluşumu ile somatik embriyogenez gözlenirken, sürgün oluşumu gözlememişlerdir.

### *T. ammi* Bitkisinin Epikotil Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

Bitkide iki haftalık fideciklerden epikotil eksplantları izole edilerek TDZ-IBA içeren MS ortamlara kültüre alınmıştır. Benzer şekilde, Udayakumar ve ark., (2012)'da epikotil eksplantından sürgün rejenerasyonu çalışmışlardır. Genel olarak TDZ ve IBA'nın birlikte bulunduğu ortamlarda kallus oluşumu gözlenirken yalnız TDZ nin bulunduğu ortamlarda kallus oluşumunun olmadığı gözlenmiştir. 0,10 mg/L TDZ + 0,10 mg/L IBA içeren ortamda küçük sürgün uçları gözlenmiş ancak sürgün elde edilmemiştir. Bunun sebebi TDZ'nin tek bulunduğu ortamlarda toksik etkisi gösterdiğini ve IBA ile beraber ise TDZ'nin az da olsa olumsuz etkilerini yok ettiğini düşünülmektedir. Aasim ve ark., (2008) börülce bitkisinde BAP ile NAA karışımının sürgün rejenerasyonunda olumsuz etki yaptığını bildirmiştir. Buna karşı, Dejam ve ark., (2006) bakrai bitkisinde 1,0-4,0 mg/L BAP ile 0,5-1,0 mg/L NAA içeren ortamında ve Siddique ve ark., (2012) *Cassia angustifolia* bitkisinde 0,5-10,0 µM BA içeren ortamında epikotil eksplantından başarıyla sürgün oluşumu elde etmiştir. Denemelerdeki farklılıkların, farklı eksplantların ve farklı bitkilerin farklı hormonların kullanılmasından dolayı olduğu düşünülmektedir.

### *T. ammi* Bitkisinde Kotiledon Boğum Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu

Kotiledon boğum eksplantı bir çok bitkilerde *in vitro* rejenerasyonu için *Vigna radiata* (Gulati ve Jaiwal, 1994), börülce (Obembe ve ark., 2000; Van Lee ve ark., 2002; Diallo ve ark., 2008; Aasim ve ark., 2012), *Vicia narbonensis* (Kendir ve ark., 2008; Kendir ve ark., 2009), Macar fiğ (Şahin-Demirbag ve ark., 2008a) ve *Trifolium pannonicum* (Şahin-Demirbag ve ark., 2008b) başarıyla kullanmışlardır. Ayrıca, kotiledon boğumu, mercimek (Khawar ve ark., 2004; Doğan ve ark., 2005), yabani mercimek (Sevimay ve ark., 2005), börülce (Popelka ve ark., 2006; Chaudhary ve ark., 2007), nohut (Sanyal ve ark., 2003) ve *Pisum sativum* (Svabova ve ark., 2005) gibi bitkileri de gen aktarım çalışmalarında da rapor edilmiştir.

*T. ammi* bitkisinde *in vitro* koşullarda çimlenen bir haftalık fideciklerden kotiledon boğum eksplantları alınarak TDZ-IBA ortamına kültüre alınmıştır. Diğer çalışmalarda ise 1 ve 3 haftalık fideciklerden kotiledon boğum eksplantları BAP ortamlara kültüre alınmıştır. Bütün ortamlarda bir veya iki hafta içinde eksplantlar da sürgün oluşumu



gözlenirken, üç hafta sonrasında çoklu sürgün oluşumu tespit edilmiştir. Kallus oluşumuna bakıldığı zaman TDZ içerikli ortamlarda hemen hemen her eksplantta kallus olduğu belirlenirken BAP içerikli ortamlarda çok nadir kallus gözlenmiştir. TDZ içeren tüm ortamlarında kallus oluşumu görülmüştür. Benzer şekilde Aasim ve ark., (2010) *Trigonella* bitkisinde kullanılan TDZ-IBA, Kinetin ve BAP-NAA içeren ortamlarda %100 kallus oluşumu rapor etmiştir.

Sürgün rejenerasyonuna bakıldığında ise TDZ-IBA içeren ortamlarda ve üç haftalık kotiledon boğum eksplantları BAP içeren ortamlarda %100 olarak kaydedilirken, bir haftalık eksplantta %80,95-95,24 arasında bulunmuştur. TDZ içeren ortamda yüksek oranda sürgün rejenerasyon Malik ve Saxena, (1992a), Khawar ve Özcan, (2002), Khawar ve ark., (2004) ve Sevimay ve ark., (2005) tarafından mercimekte rapor edilmiştir. Soya fasulyesinin (*Glycine max*) hızlı çoğaltım çalışmasında kotiledon nodu ve hipokotil eksplantları 2 mg/L thidiazuron (TDZ) ya da 1,15 mg/L benzyladenine (BA) içeren besi ortamlarına alınmış ve TDZ'nin BA'ya göre daha fazla adventif sürgün rejenerasyonu oluşturduğu belirtilmiştir (Kaneda ve ark., 1997). Huetteman ve Preece (1993), tarafından etkili yan sürgün çoğaltımına ve adventif sürgün oluşumuna TDZ'nin diğer kimyasallara göre etkisinin daha fazla olduğunu rapor edilmiştir. Yapılan diğer bazı çalışmalar ise, TDZ'nin değişik konsantrasyonları ile (0,025-136,23 mM) yan ve adventif rejenerasyon meydana geldiği gösterilmiştir (Malik ve Saxena, 1992b; Beattie ve Garrett, 1995). Ortamlarda IBA eklendiğinde sürgün rejenerasyonunda her hangi olumsuz etkisi görülmemiştir. Buna karşı, Aasim ve ark., (2009, 2010), *Trigonella* bitkilerde IBA'nin sürgün rejenerasyonunu olumsuz etkilediğini rapor etmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı ise TDZ ortamlarda, hem TDZ-IBA hemde BAP içeren ortamlardan daha fazla olduğu tespit edilirken, en yüksek eksplant başına sürgün sayısı 0,20 mg/L TDZ ortamında elde edilmiştir. Benzer şekilde, yaygın mürdümük bitkisinde kotiledon nodlarından elde edilen sürgün oluşturma oranı ve sürgün sayısı bakımından en fazla etkili olan dozun 0,2 mg/L TDZ olduğu görülmüştür. Buna karşı, Barik ve ark., (2004) yaygın mürdümükte kotiledon nodu ile farklı sitokininleri (BA, Kn, TDZ) test ettikleri çalışmalarında en etkili sitokininin BA olduğunu ve eksplant başına maksimum sürgün sayısının 2 mg/L (8,87 mM) ile BA'da gözlemişlerdir. Khawar ve ark., (2004) farklı iki mercimek genotipinde yaptıkları çalışmada, her 2 mercimek çeşidinde de eksplant başına en yüksek sürgün sayısını 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamından elde



etmişlerdir. Sonuçlar TDZ'nin düşük dozlarının boğum eksplanttan yüksek sürgün rejenerasyonu için önemini vurgulamaktadır. Benzer şekilde Malik ve Saxena (1992b), mercimek tohum kültüründe boğum ve ana sürgünlerin alt kısımlarından nisbeten düşük oranda TDZ kullanarak en fazla sürgün rejenerasyon elde etmişlerdir.

Sonuçlara bakıldığında sürgün uzunluğu, sitokinin tipi ve oranlar arasında ilişki bulunmuştur. Genel olarak BAP içeren ortamlarda TDZ-IBA ortamlara göre daha uzun sürgün elde edilmiştir. Benzer çalışmada, Aasim ve ark., (2009, 2010) *Trigonella* bitkisinde en uzun sürgünler BAP-NAA içeren ortamdan elde etmişlerdir.

Eksplantların yaşı kıyaslandığında üç haftalık kotiledon boğum eksplantı bir haftalık eksplantından daha fazla sürgün rejenerasyonu, eksplant başına daha fazla sürgün sayısı ve daha uzun sürgünler elde edilmiştir. Buna karşı, Kendir ve ark., (2008) narbon fiğ bitkisinde 4-5 günlük ve 14-15 günlük fideciklerinden elde edilen kotiledon boğum eksplantı kullandığında 4-5 günlük kotiledon boğum eksplantından daha fazla eksplant başına sürgün sayısı elde edildiğini rapor etmişlerdir. Sears ve Deckard (1982), ve Mathias ve Simpson (1986), tarafından kotiledon boğum eksplantın yaşı ve hormonları arasında ilişkinin önemli olduğu rapor edilmiştir.

BAP içeren ortamlarda hiperhidrik oluşumu gözlenirken, TDZ-IBA ortamlarda gözlenmemiştir. Buna karşı, Aasim ve ark., (2009, 2010) *Trigonella* bitkisinde TDZ'den dolayı hiperhidrik oluşumu gözlemlerken, kinetin ve BAP-NAA içeren ortamda olmadığını rapor etmişlerdir. Hiperhidrik bitkilerin oluşumu sitokinin oranları ve eksplant tipine bağlıdır. Yüksek oranda sitokinin hiperhidrik bitki oluşumunu sebep olmaktadır. Bazı çalışmalarda bu feneomen sık sık, etilen birikimi, jelleştirici konsantrasyon ve tipi, ortamdaki besin bileşimi ve sitokinin dozuyla ilişkidir (Ziv, 1991). Barbara üzüm bitkisinde TDZ konsantrasyonu artırılınca vitrifikasyon insidansının arttığı gösterilmiştir (Gribaudo ve Fronda, 1991).

#### *T. ammi Bitkisinde Zigotik Embriyo Eksplantında Sürgün Rejenerasyonu*

Tohum (zigotik embriyo) *in vitro* koşullarda eksplant olarak adventif/aksil sürgün oluşumu için birçok bitkilerde kullanılmıştır. Nohut (Polisetty ve ark., 1997), maş fasulyesi (Harisaranraj ve ark., 2008), yerfistik (Li ve ark., 1994; Cucco ve Juame, 2000; Gagliardi ve ark., 2000; Palanivel ve Jayabalan, 2002; Pacheco ve ark., 2007), narbon fiğ (Kendir ve ark., 2009), tüglü fiğ (Aasim ve ark., 2011) gibi bir çok

baklagillerde, çeltik (Masaaki ve ark., 2004; Bano ve ark., 2005) ve buğday (Malik ve ark., 2004) gibi tahıllarda, *Epimedium alpinum* L. (Mihaljević ve Vršek, 2008), soğan (Khar ve ark., 2005) ve ıspanak gibi (Al-Khayri ve ark., 1992) bitkilerde çoklu sürgün oluşumu için rapor edilmiştir.

Denemede steril edilen tohumlar farklı dozlarda TDZ, Kinetin-IBA, TDZ-IBA, BAP-IBA içeren ortamlara kültüre alınmıştır. Kallus oluşum oranı bakımından en yoğun kallusların TDZ içerikli ortamlarda gözlenirken kallus oluşumunun az olduğu ortamlar Kinetin içerikli ortamlar olarak kaydedilmiştir. TDZ içeren ortamlarda kallus oluşumun genellikle radikula kısımlarda olduğu kaydedilmiştir. Aasim ve ark., (2011) tüylü fiğ bitkisinde, kallus oluşumunu sadece radikula kısmında rapor etmiştir. Harisaranraj ve ark., (2008) maş fasulye bitkisinin yarı tohum eksplantında sitokinin ve oksin içeren ortamlarda kallus oluşumu rapor etmiştir. Benzer şekilde kallus oluşumu buğday (Malik ve ark., 2004), soğan (Khar ve ark., 2005) ve çeltik (Bano ve ark., 2005) bitkisinde de rapor edilmiştir. Kendir ve ark., (2009), narbon fiğ bitkisinde BAP içeren ortamlarda kallus oluşumu gözlememiştir.

Tüm zigotik embriyo denemelerde sürgün oluşumu embriyonik eksen kısmında tek sürgün halinde başlamış olup, bir kaç hafta içinde çoklu sürgün oluşumu kaydedilmiştir. Polisetty ve ark., (1997) nohut bitkisinin tohum eksplantından sürgün/sürgün uçların farklılaşması 45-90 gün içinde rapor etmişlerdir. Buna karşı, Gagliardi ve ark., (2000) yarfistiğin tohumlarından MSO veya 10 M TDZ içeren ortamlarda her hangi sürgün oluşumu elde edilmediğini rapor atmışlardır. Bazı oranlarda bir kaç hafta sonra kotiledon yapraklarında sürgün oluşumu kaydedilmiştir. Narbon fiğinde (Kendir ve ark., 2009) ve tüglü fiğinde (Aasim ve ark., 2011) kotiledondan her hangi gelişme olmadığı rapor edilmiştir.

Zigotik embriyo eksplantında, eksplant başına sürgün sayısı incelendiğinde en az sürgün sayısının Kinetin içeren ortamlarda 1,63-2,51 adet olduğu belirlenmiştir. Genel olarak diğer hormonların eksplant başına sürgün sayısına etkisi hemen hemen benzer olmakla birlikte en iyi sonucun TDZ içeren ortamda 12,96 adet olduğu belirlenmiştir. Benzer çalışmalarda Kendir ve ark., (2009) narbon fiğ bitkisinde BAP içeren ve Aasim ve ark., (2011) tüylü fiğ bitkisinde TDZ-IBA içeren ortamlarda çoklu sürgün oluşumu elde edilmiştir.

Zigotik embriyo eksplantında sürgün uzunluğuna bakıldığında TDZ, TDZ-IBA ve BAP-IBA içerikli ortamlarda ortalama olarak birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Ancak

Kinetin ortamı incelendiğinde bu hormonun sürgün uzunluğunu oldukça arttırdığı gözlenmiştir. Kinetin içerikli ortamda sürgün uzunluğunu 1,62-5,23 cm olduğu tespit edilmiştir. Buna karşı Kendir ve ark., (2009) narbon fiğ bitkisinde BAP oranı artmasıyla sürgün uzunluğunda azalma kaydetmiştir.

#### *T. ammi Bitkisinin In vitro Koşullarda Köklendirilmesi ve Adaptasyonu*

Tez kapsamında yapılan çoğaltım denemelerinde IBA içeren ortamlarda farklı oranlarda küçük köklü bitkicikler de kaydedilmiştir. Ancak, köklenmemiş sürgünler köklendirme amacıyla farklı oranlarda 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 ve 1,00 mg/L IBA içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Bir hafta içerisinde kök oluşumu gözlenmeye başlamıştır. *In vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerde köklendirme için IBA, çoğu birçok bitkide başarıyla kullanılmıştır. Söyler ve ark., (2007) keperi bitkisinde 3,0 mg/L IBA içeren ½ MS ortamında %75' lik bir köklenme oranı elde etmiştir. Kara ve ark., (2011) çördük otu ve adaçayında en yüksek köklenme oranı sırasıyla; %85,0, 82,3 ve 81,0, kök sayısı sırasıyla; 28,8, 21,6 ve 10,6 adet bitki ve kök uzunluğu 7,1, 6,1 ve 5,1 cm olarak mart döneminde 4000 ppm IBA dozunda tespit etmiştir. Buna karşı, Aasim ve ark., (2009a, 2010) *Trigonella* bitkisinde IBA kullanılarak kök oluşumu elde edilmediğini rapor etmişlerdir.

Köklendirilmiş bitkilerin köklerindeki agar ilk olarak köklere zarar vermeden çeşme suyu ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, börülce bitkisinde kullanılan protokol, Aasim ve ark., (2008, 2009, 2010) tarafından kullanılarak bitkiler ilk olarak çeşme suyu içinde 10-15 dk bekletilmiştir. Bitkiler toprağa aktarılmadan önce, saksılara bol miktarda su verilmiştir. Bitkiler toprağa aktarıldıktan sonra bitkilerin nem dengesini koruyabilmek için saksılar üzerinde şeffaf poşetler geçirmişlerdir. 1 hafta sonra, poşetlerde delikler açılmıştır ve 15 gün sonra poşetler tamamen çıkarılıp, saksılar iklim odasında büyümeye bırakılmıştır. Fakat bitkinin adaptasyonu sağlanamamıştır.

Diğer çalışmada bitkiler adaptasyon için iklimlendirme dolabında (%90 nem) bırakılmıştır. Üç hafta sonrasında bitkinin adaptasyonu başarıya sağlanmış ve tohumlar elde edilmiştir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Denemede kullanılan *T. ammi* bitkisinin yüzey sterilizasyonu için %50 çamaşır suyu (NaOCl) ile 15 dk sterilizasyon sonucunda bulaşık oranı yokken çimlenme oranının %60 olduğu görülmüştür.
2. Yüzey sterilizasyon sonrası tohumlar MS ortamlara kültüre alındığında 3-4 gün içinde çimlenme başladığı gözlenmiştir.
3. Denemede kullanılan zigotik embriyo eksplantları direk olarak, hipokotil, epikotil, kotiledon boğum, lamina, kotiledon yaprak ve 1-3 haftalık fideciklerden alınmıştır.
4. Lamina ve kotiledon yaprak eksplantlarında sürgün oluşumunun olmadığı, petiyol kısımlarında beyaz oluşumlar ile kallus oluşumu kaydedilmiş ancak daha sonra gelişmenin olmadığı tespit edilmiştir.
5. Hipokotil eksplantında sadece 1,50 mg/L BAP içeren MS ortamda sürgün rejenerasyonun olduğu gözlenmiştir.
6. Epikotil eksplantında hiç bir ortamda sürgün rejenerasyonu gözlenmezken bazı ortamlarda kallus oluşumunun ve sürgün uçlarının olduğu belirlenmiştir.
7. Kotiledon boğum eksplantlarında bütün ortamlarda sürgün rejenerasyonunun olduğu belirlenmiştir. En yüksek oranın %100 ile 0,40 mg/L TDZ ve üç haftalık fideciklerden alınan eksplantları BAP içeren ortamlarında kaydedilmiştir. Bir haftalık fideciklerden alınan eksplantlarda ise en yüksek oranın %95,26 ile 1,25 mg/L BAP içerikli MS ortamında olduğu gözlenmiştir.
8. Denemede farklı sürelerde çimlenen fideciklerden kotiledon boğum eksplantı alınarak alt kültür yapıldığında uzun süre çimlenmiş olan eksplantta kallus oluşumunun daha az, eksplant başına sürgün sayısının daha fazla ve sürgün uzunluğunun daha fazla olduğu kaydedilmiştir.
9. Denemede zigotik embriyo eksplantlarında kallus oluşumunun TDZ ortamlarında daha yoğun tespit edilmiştir.
10. Zigotik embriyo eksplantında TDZ ve BAP içeren bazı ortamlarda sürgün oluşumunun %100 olduğu kaydedilmiştir.
11. Zigotik embriyo eksplantında en fazla eksplant başına sürgün sayısı 12,96 adet ile TDZ ortamında elde edilirken, en fazla sürgün uzunluğunun 0,10 mg/L Kinetin içeren MS ortamında 5,23 cm olarak tespit edilmiştir.

12. Zigotik embriyo eksplantında çoklu sürgünlerin TDZ ve BAP içerikli ortamlarda daha yoğun olduğu gözlenirken Kinetin ortamında az sayıda olduğu belirlenmiştir.
13. Bazı BAP ve TDZ içerikli MS ortamında zigotik embriyoda yaprak uçlarında da sürgün oluşumunun ve sürgün uçlarının olduğu gözlenmiştir.
14. Denemelerde IBA'nın bulunduğu ortamlarda kök oluşumunun olduğu kaydedilmiştir.
15. Köklendirme için kullanılan IBA içeren MS ortamlarının hepsinde köklenme sağlanırken, çoklu sürgün oluşumu da gözlenmiştir.

Tez kapsamında çalışılan hemen hemen bütün eksplantlarda yoğun kallus oluşumunun olduğu ve bu sebepten sürgün oluşumunun oldukça yavaş olduğu gözlenmiştir. Kallus oluşumunun azalmasına yönelik çalışmaların yapılmasını önerilmektedir. Bunun yanında epikotil, kotiledon yaprak, lamina yaprak eksplantlarında kallus üzerinde sürgün uçları gözlenmesine rağmen sürgün elde edilememiştir. Bu eksplantlardaki sürgün uçların gelişmemesine sebep olan faktörlerin araştırılmasında önerilmektedir. Daha uzun süreli ve farklı yoğunlukta farklı hormonlar kullanılarak kalluslardan sürgün elde edilebileceği düşünülmektedir. Epikotil, kotiledon yaprak ve lamina eksplantları tek başına ortamlara kültüre alındığında sürgün elde edilmezken tohum eksplantı ile beraber incelendiğinde bu kısımlardan sürgünlerin çıktığı gözlenmiştir. Bunun sebebi tek başına eksplant gelişmezken tohum ile beraber birkaç eksplantların aynı anda “geri besleme” mekanizmasıyla farklı eksplantlara olumlu tepki vererek birbirini olumlu yönde etkilediği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aasim, M., Khawar, K.M. ve Ozcan, S., 2008. *In vitro* Regeneration of Red Squill *Urginea maritima* (L.) Baker. using Thidiazuron. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22(4), 925-928.
- Aasim, M., Khawar, K.M. ve Özcan, S., 2008. *In Vitro* Micro Propagation From Shoot Meristems Of Turkish Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Cultivar Akkiz. *Bangladesh Journal of Botany*, 37(2), 149-154.
- Aasim, M., Khawar, K.M. ve Ozcan, S., 2009. *In vitro* shoot regeneration of Fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.). *American Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 3(2), 135-138.
- Aasim, M., Hussain, N., Umer, E.M., Zubair, M., Hussain, S.B., Saeed, S., Rafique, T.S. ve Sancak, C., 2010. *In vitro* shoot regeneration of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) using different cytokinins. *African Journal Biotechnology*, 9, 7174-7179.
- Aasim, M., Şahin-Demirbag, N., Khawar, K.M., Kendir, H.ve Özcan, S., 2011. Direct Axillary Shoot Rejuvenation From The Mature Seed Explant of The Hairy Vetch (*Vicia villosa* rooth). *Archives of Biological Sciences*, 63(3), 757-762.
- Aasim, M., 2012. Micropropagation of lentil (*Lens culinaris* Medik.) using pulse treatment of immature plumular apices. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 49(2), 149-154.
- Aasim, M., Özcan, S.F., Khawar, K.M. ve Özcan, S., 2012. Comparative studies on the competence of axillary shoot regeneration on unsliced and longitudinally sliced cotyledon nodes of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Turkish Journal of Botany*, 36, 281-287.
- Aasim, M., Day, S., Rezaei, F. ve Hajyzadeh, M., 2013. Multiple shoot regeneration of plumular apices of chickpea. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 33-39.
- Al-Khayri, J.M., Huang, F.H., Morelock, T.E. ve Busharar, T.A., 1992. *In vitro* plant regeneration of Spinach from mature seed-derived callus. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 28, 64-66.
- Anonim, 2013a, Mısır Anasonu, [http://www.sifamarket.com/sifali\\_bitkiler\\_78\\_misir-anasonu\\_2049.html#.UTJBhTCeP2s-](http://www.sifamarket.com/sifali_bitkiler_78_misir-anasonu_2049.html#.UTJBhTCeP2s-) (Erişim Tarihi: 2.03.2013).
- Anonim 2013b, Mısır Anasonu (*Tracyspermum ammi*), <http://www.food-info.net/tr/products/spices/ajwain.htm-> (Erişim Tarihi: 2.03.2013).
- Ashraf, M., 2002. Salt tolerance of cotton some new advances. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2(1), 1-30.

- Bano, S., Jabeen, M., Rahim, F. ve Ilahi, S., 2005. Callus induction and regeneration in seed explants of rice (*Oryza sativa* cv. Swat II). *Pakistan Journal of Botany*, 37, 829-836.
- Barik, D.P., Naik S.K., Mohapatra, U. ve Chand P.K., 2004. High frequency plant regeneration by in vitro shoot proliferation in cotyledonary node explants of grasspea (*Lathyrus sativus* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 40, 467-470.
- Bariwa, R., Sodha, R.S. ve Rajawat, B.S., 2012. *Trachyspermum ammi*. *Pharmacognosy Review*, 6, 56-60.
- Beattie, L.D. ve Garrett, R.G., 1995. Adventitious shoot production from immature embryos of white clover. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42, 67-72.
- Boskabady, M.H., Jandaghi, P., Kiani, S. ve Hasanzadeh, L., 2005. Antitussive Effect of *Carum copticum* guinea pigs. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 79-82.
- Chaudhary. D., Madanpotra, S., Jaiwal, R., Saini, A., Kumar, P. ve Pawan, J.K., 2007. *Agro bacterium tumefaciens*-mediated high frequency genetic transformation of an Indian Cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp) cultivar and transmission of transgene into progeny. *Plant Science*, 172, 692-700.
- Chawla, A.S., Handa, S.S., Sharma, A.K. ve Kaith, B.S., 1987. Plant antiinflammatory agents. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 46, 214-223.
- Chialva, F., Monguzzi, F., Manitto, P. ve Akgül. A., 1993. Essential oil constituents of *Trachyspermum copticum* (L.) Link fruits. *Journal of Essential Oil Research*, 5(1), 105-106.
- Choudhury, S., Riyazuddin, A., Kanjilal, P.B. ve Leclercq, P.A., 1998. Composition of the seed oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Northeast India. *Journal of Essential Oil Research*, 10(5), 588-590.
- Cucco, M.F. ve Jaume, A.D.R., 2000. Protocol for regeneration *in vitro* of *Arachis hypogaea* L. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3, 154-160.
- Cuenca, S., Amo-Marco, J.B. ve Para, R., 1999. Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk. (Compositae). *Plant Cell Reports*, 18(7-8), 674-678.
- Cuenca, S., ve Amo-Marco, J.B., 2000. *In vitro* propagation of *Centaurea spachii* from inflorescence stems. *Plant Growth Regulation*, 30(2), 99-103.
- Çölgeçen, H., 2005. Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L.' de *In vitro* Organogenez. *Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

- Daneshvar Royandazag, S., 2005. *Papaver Bracteatum* Lindl ve *Papaver Pseudo-Orientalis* (Fedde) Medw.'de Adventif Sürgün Rejenerasyonu. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Dejam, M., Khosh-Khui, M. ve Shekafandeh, A., 2006. Adventitious Bud Induction and Plant Regeneration in Epicotyl Segments of Bakrai (*Citrus reticulata* Blancox *C. limetta* Swing.). *International Journal of Agricultural Research*, 1, 14-19.
- Diallo, M.S., Ndiaye, A., Sagna, M. ve Gassama-Dia, Y.K., 2008. Plantsregeneration from African cowpea variety (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *African Journal of Biotechnology*, 7, 2828-2833.
- Doğan, D., Khawar, K.M. ve Özcan, S., 2005. *Agrobacterium* Mediated tumor and hairy root formation from different explants of lentils derived from young seedlings. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7, 1019-1025.
- Ekmekci, H., Koca, A., Çınar, A. ve Aasim, M., 2012. *In vitro* koşullarda Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) Bitkisinin Mikroçoğaltım Çalışmaları. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, 15-18 Kasım, 2012, Antalya, Türkiye.
- Ekmekci, H., Koca, A., Çınar, A., Aasim, M. ve Khawar, K.M., 2013a. *In vitro* shoot regeneration potential of different explants of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). 1st Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. *April 17-20, 2013, Gazimagosa (Famagusta), The Northern Cyprus*.
- Ekmekçi, H., 2013b. Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) Bitkisinde *In vitro* Doku Kültürü Çalışmaları. *Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi, Karaman*.
- Gagliardi, R.F., Pacheco, G.P., Coculilo, S.P., Valls, J.F.M. ve Mansur, E., 2000. *In vitro* plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (Genus *Arachis*, Section *Extranervosae*). *Biodiversity and Conservation*, 9, 943-951.
- Garg, S., 1998. A new glucoside from *Trachyspermum ammi*, *Fitoterapia*, 6, 511-512.
- Gribaudo, I. ve Fronda, A., 1991. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. *Hort Science*, 26(8), 1083.
- Gopi, C. ve Ponmurugan, P., 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *O. basilicum* L. *Journal of Biotechnology*, 126(2), 260-264.
- Gulati, A. ve Jaiwal, P.K., 1994. Plant regeneration from cotyledonary node explants of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Plant Cell Reports*, 13, 523-527.
- Harisaranraj, R., Babu, S.S. ve Suresh, K., 2008. Callus inductionand plant regeneration of *Vigna mungo* (L.) Hepper via half seed explant. *Ethnobotanical Leaflets*, 12, 577-85.



- Howard, M.P., Reynolds, R.D., Moser, P.B., Andon, M.B., Mc Connell, W. ve Acharya, S., 1985. Special Foods of High Nutritive Value Consumed by Nepalese Lactating Women. *Federation Proceedings*, 44(5), 1505.
- Huetteman, A.C. ve Preece, E.J., 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33(2), 105-119.
- Jeet, K., Devi, N., Narender, T., Sunil, T., Lalit, S. ve Raneev, T., 2012. *Trachyspermum ammi* (Ajwain): Comprehensive Review. *International Research Journal Of Pharmacy*, 3, 133-138.
- Joshi, S.G., 2000. Medicinal Plants, 1st ed. Delhi (INDIA): *Oxford and IBH Publisher*.
- Kalyoncu, İ.H., Ersoy, N. ve Yılmaz M., 2008. Seleksiyon İslahıyla Belirlenen Bir İğde (*Elaeagnus angustifolia L.*) Tipinin Yeşil Uç Çeliklerinin Köklenmesi Üzerine Farklı Hormon ve Nem Seviyeleri Etkisinin Araştırılması. *SDÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3, (1).
- Kambouche, N. ve El-Abed, D., 2003. Composition of the Volatile Oil from the Aerial Parts of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Oran (Algeria). *Journal of Essential Oil Research*, 15, 39-40.
- Kaneda Y., Tabei, Y., Nishimura, S., Harada, K., Akihama T. ve Kitamura. K., 1997. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Reports*, 17(1), 8-12.
- Kara, N., Baydar H. ve Erbaş, S., 2011. Farklı Çelik Alma Dönemleri ve İBA Dozlarının Bazı Tıbbi Bitkilerinin Köklenmesi Üzerine Etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü. *Isparta Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 28(2), 71-81.
- Kendir, H., Şahin-Demirbag, N., Khawar, K.M. ve Aasim, M., 2008. *In vitro* plant regeneration from Narbon Vetch (*Vicia narbonensis L.*) using cotyledonary node explants. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 2030-2033.
- Kendir, H., Şahin-Demirbag, N., Aasim, M. ve Khawar, K.M., 2009. *In vitro* plant regeneration from Turkish Narbon Bean (*Vicia narbonensis L.*). *African Journal of Biotechnology*, 8, 614-618.
- Khar, A., Bhutani, R.D., Yadav, N. ve Chowdhury, V.K., 2005. Effect of explant and genotype on callus culture and regeneration in onion (*Allium cepa L.*). *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18, 397-404.
- Khawar, K.M. ve Özcan, S., 2002. High frequency shoot regeneration from cotyledonary node explants of different lentil (*Lens culinaris Medik*) genotypes and *in vitro* micrografting. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 16, 12-17.

- Khawar, K.M., Sancak, C., Uranbey, S. ve Özcan, S., 2004. Effect of Thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris Medik*) via organogenesis. *Turkish Journal of Botany*, 28, 421-426.
- Kwon Park, I., Junheon, K. ve Sang-Gil, L., 2007. Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components From Ajwain (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimentadioica*) and Litsea (*Litsea cubeba*) Essential Oils Against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus Xylophilus*). *Journal of Nematology*, 39(3), 275-279.
- Li, Z., Jarret, R.L., Pittman, R.N., James, A. ve Demski, W., 1994. Shoot organogenesis from cultured seed explants of Peanut (*Arachis hypogea* L.) using Thidiazuron. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 30, 187-191.
- Lila, M. A., 2005. Valuable secondary products from *in vitro* culture. In: *Plant Development and Biotechnology* (Eds. Trigiano RN and Gray D). CRC Press, 285-289, London, New York, Washington.
- Mahesh, A., Thangadurai, D. ve Melchia G., 2012. Rapid *in vitro* plant regeneration from leaf explants of *Launaea sarmentosa* (Willd.) Sch. Bip. ex Kuntze. *Biological Research*, 45, 131-136.
- Malik, K.A. ve Saxena. P.K., 1992a. Regeneration in *Phaseolus vulgare* L. high frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta*, 186, 384-389.
- Malik, K.A. ve Saxena, P.K., 1992b. *In vitro* regeneration of plants: a novel approach. *Naturwissenschaften*, 79, 136-137.
- Malik, S.I., Rashid, H., Yasin, T. ve Minhas N.M., 2004. Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus of mature seed explants of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal Botany*, 36, 629-634.
- Masaaki, D., Noriaki, H. ve Mari, M., 2004. Callus formation from seed explant, growth in suspension culture and plant regeneration of the Japonica rice cultivar Koshiibuki. *Journal of the Niigata Agricultural Research Institute*, 6, 1-5.
- Mathew, N., Bhattacharya, S.M., Perumal, V. ve Muthuswamy, K., 2008. Antifilarial Lead Molecules Isolated from *Trachyspermum ammi*. *Molecules*, 13, 2156-2168.
- Mathias, R.J. ve Simpson, E.S., 1986. The interaction of genotypes and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* Linn) callus. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 7, 31-37.
- Mihaljević, S. ve Vršek, I., 2008. *In vitro* shoot regeneration from immature seeds of *Epimedium alpinum* induced by thidiazuron and CPPU. *Scientia Horticulturae*, 120, 406-410.

- Minija, J. ve Thoppil, J.E., 2002. Essential Oil Composition Of *Trachyspermum Ammi* (L.) Sprague From South India. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64, 250-251.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment*, 25, 239-250.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Najaf, S., 2008. Kebere (*capparis spp.*)'nin *in vitro* çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Obembe, O.O., Kadiri, M. ve Machuka, J., 2000. Induction of multiple shoots and regeneration from cotyledonary nodes and epicotyls. (Abstracts) *African Journal of Plant Science*, 108, 20.
- Pacheco, G., Gagliardi, R., Carneiro, L., Callado, C., Valls, J. ve Mansur, E., 2007. The role of BAP in somatic embryogenesis induction from seed explants of *Arachis species* from Sections Erectoides and Procumbentes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 88, 121-126.
- Palanivel, S. ve Jayabalan, N., 2002. Direct Multiple shoot induction from different mature seed explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Philippine Journal of Science*, 131, 127-131.
- Pevalek- Kozlina, B., 1998. *In vitro* propagation of *Centaurea ragusina* L. a Croatian endemic species. *Acta Biologica Cracoviensia*, 40, 21-24.
- Platel, K. ve Srinivasan, K., 2001. Studies on the influence of dietary spices on food transit time in experimental rats. *Nutrition Research*, 21(9), 1309-1314.
- Polisetty, R., Paul, V., Deveshwar, J.J., Khetarpal, S., Suresh, K. ve Chandra, R., 1997. Multiple shoot induction by benzyladenine and complete plant regeneration from seed explants of chick pea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Reports*, 16, 565-571.
- Popelka, J. C., Gollasch, S., Moore, A., Molvig, L. ve Huggins, T.J.V., 2006. Genetic transformation of cowpea and stable transmission of the transgenes to progeny. *Plant Cell Reports*, 25, 304-312.
- Pruthi, J. S., 1992. Spices and Condiments, 4th ed. Delhi (INDIA): *National Book Trust Publisher.*
- Purohit, S. ve Kothari, S.L., 2007. Direct somatic embryogenesis from cotyledon and cotyledonary node explants in bishop's weed *Trachyspermum ammi* (L.) sprague. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 154-158.
- Ramachandra Rao, S. ve Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.

- Ramaswamy, S., Sengottuvelu, S., Haja, S.S., Jaikumar, S., Saravanan, R., Prasadkumar, C. ve Sivakumar, T., 2010. Gastroprotective Activity of Ethanolic Extract of *Trachyspermum ammi* Fruit. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* , 1(1), 1-15.
- Razdan, M. K., 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. *Science Publishers*, India.
- Sanyal, I., Singh, A.K. ve Amla, D.V., 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) using mature embryogenic axis and cotyledonary nodes. *Indian Journal of Biotechnology*, 2, 524-532.
- Sayılır, A., Özzambak, E., Özen, Ş. ve Eşi Yok, D., 2007. Kapari Türlerinin (*Capparis* L.) Tohumla ve Doku Kültürü ile Çoğaltılması Üzerine Araştırmalar. *C.B.U. Fen Bilimleri Dergisi*, 3(1), 71-80.
- Sears, R.G. ve Deckard, E.L., 1982. Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration. *Crop Science*, 22, 546-550.
- Sevimay, C.S., Khawar, K.M. ve Yüzbaşıoğlu, E., 2005. Adventitious shoot regeneration from different explants of wild lentil (*Lens culinaris* subsp. *orientalis*). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19, 46-49.
- Siddique, I. ve Anis, M., 2007. Rapid micropropagation of *Ocimum basilicum* using shoot tip explants pre-cultured in thidiazuron supplemented liquid medium. *Biologia Plantarum*, 51, 787-790.
- Siddique, I. ve Anis M., 2008. An improved plant regeneration system and *ex vitro* acclimatization of *Ocimum basilicum*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 493-499.
- Siddique, I., Bin Javed, S., Al-Othman, M.R. ve Anis, M., 2012. Stimulation of *in vitro* organogenesis from epicotyl explants and successive micropropagation round in *Cassia angustifolia* Vahl.: an important source of sennosides. *Agroforest System*, DOI 10.1007/s10457-012-9
- Singh, V.K., Singh, S. ve Singh, D.K., 2003. *Phytochemistry and Pharmacology*, Stadium Press, 321-353, Houston Texas, USA.
- Snedecor, G.W. ve Cochran, W.G., 1967. Statistical Methods. *The Iowa State University Press*, USA .
- Srivasta, K.C., 1988. Extract of a spice-omum (*Tracyspermum ammi*)-shows antiaggregatory effects and alters arachidonic and metabolism in human platelets. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 33(1), 1-6.
- Svabova, L., Smykal, P., Griga, M. ve Ondrej, V., 2005. *Agrobacterium* mediated transformation of *Pisum sativum* *in vitro* and *in vivo*. *Biologia Plantarum*, 49, 361-370.

- Şahin-Demirbag, N., Kendir, H., Khawar, K.M. ve Aasim, M., 2008a. *In vitro* plant regeneration from Hungarian vetch (*Vicia pannonica* Crantz) using cotyledonary node explants. *Biotechnology & Biotechnological Equipments*, 22(4), 929-932.
- Şahin-Demirbag, N., Kendir, H., Khawar, K.M. ve Aasim, M., 2008b. *In vitro* regeneration of Turkish endemic *Trifolium pannonicum* JACQ. Subsp. *elongatum* (WILLD). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22(4), 921-924.
- Tubives, 2012, [http://turkherb.ibu.edu.tr/index.php?sayfa=1&tax\\_id=4195](http://turkherb.ibu.edu.tr/index.php?sayfa=1&tax_id=4195)- (Erişim Tarihi: 3.09.2012).
- Uçar, E. ve Turgut, K., 2009. Bazı Dağ Çayı (*Sideritis*) Türlerinin *In Vitro* Çoğaltımı. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(1), 51-57.
- Udayakumar, R., Choi, C.W., Kim, K.T., Kim, S.C., Kasthuriengan, S., Mariashibu, T. S., Sahaya Rayan, J. J. ve Ganapathi, A., 2012. *In vitro* plant regeneration from epicotyl explant of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7, 43-52.
- Van Lee, B.U.I., De Carvalho, M.H.C., Zuily-Fodil, Y., Thi, A.T.P. ve Van, K.T., 2002. Direct whole plant regeneration of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) from cotyledonary node thin cell layer explants. *Journal of Plant Physiology*, 159, 1255-1258.
- Vedavathy, S. ve Rao, D.N., 1995. Herbal folk medicine of Tirumala and Tirupati region of Chittoordistrict, Andhra Pradesh. *Fitoterapia*, 66(2), 167-171.
- Velazhahan, R., Vijayanandraj, S., Vijayasamundeeswari, A., Paranidharan, V., Samiyappan, R. ve Iwamoto, T., 2010. Detoxification of aflatoxins by seed extracts of the medicinal plant, *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turill Structural analysis and biological toxicity of degradation product of aflatoxin G1. *Food Control*, 21, 719-725.
- Verma, S.K., Yücesan, B.B., Gürel, S. ve Gürel, E., 2011. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Digitalis lamarckii* an endemic medicinal species. *Turkish Journal of Botany*, 35, 689-695.
- Yağcı, C., Toker, M.C. ve Toker, G., 2008. Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoitler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 1(1), 47-58.
- Yücesan, B. B., 2011. Anadolu Endemik *Digitalis* L. Türlerinin *In Vitro* Çoğaltımı ve Kardiyak Glikozitlerinin Üretilmesi. *Doktora Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bolu.
- Ziv, M., 1991. Quality of micropropagated plants vitrification. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 27, 64-69.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

**Adı Soyadı** : Asuman KOCA  
**Doğum Tarihi ve Yer** : 22.03.1988/ İstanbul  
**Medeni Hali** : Bekar  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**Telefon** : 0(545) 6898001  
**e-mail** : asumankoca70@gmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Yıl
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Karaman	2013
Lisans	Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü, KONYA	2010
Lise	Özel Başarı Fen Lisesi, Karaman	2006

### **Bilimsel Faaliyetleri**

#### ***Ulusal Kongre/Sempozyum***

1. Ekmekci, H., **Koca, A.**, Çınar, A., Aasim, M., 2012. *In vitro* koşullarda Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) Bitkisinin mikroçoğaltım çalışmaları. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 15-18 Kasım, 2012, Antalya, Türkiye.

#### ***Uluslararası Kongre/Sempozyum***

1. **Asuman Koca**, Ayşegül Çınar, Muhammad Aasim, Khalid Mehmood Khawar: In vitro shoot regeneration from mature zygotic embryo of *Trachyspermum ammi*. 1st Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. April 17-20, 2013, Gazimagosa (Famagusta), Turkish Republic of Northern Cyprus.
2. Ekmekci, H., **Koca, A.**, Çınar, A., Aasim, M., Khawar K.M., 2013. *In vitro* shoot regeneration potential of different explants of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). 1st Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. April 17-20, 2013, Gazimagusa (Famagusta), Turkish Republic of Northern Cyprus.