

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI ÇEMEN (*Trigonella foenum-graecum* L.) GENOTİPLERİNDE
SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİNE UYGUN KALLUS ÜRETİMİ VE
REJENERASYON ÇALIŞMALARI

Melike İNCETEKİN

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI ÇEMEN (*Trigonella foenum-graecum* L.) GENOTİPLERİNDE SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİNE UYGUN KALLUS ÜRETİMİ VE REJENERASYON ÇALIŞMALARI

Melike İNCETEKİN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Serkan URANBEY

Çemen bitkisi geleneksel tıpta kullanılan bir tıbbi bitkidir. Çemen tohumları yaygın olarak lezzet verici olarak kullanılır ve farklı alkaloid, saponin ve sabit yağ içeriğine sahiptir. Trigonellin ve diosgenin bileşenleri anti-kanser, kolesterolü ve kan şekerini düşürücü etkisiyle bilinir. *In vitro* koşullar altında sekonder metabolit üretimini artırmanın ilk adımı kallus üretimi sağlamaktır. Bu amaca ulaşmak için kök, petiol ve kotiledon gibi farklı eksplant tipleri kullanılmıştır. Bu çalışmada, Gürarlan ve Çiftçi çemen çeşitleri bitkisel materyal olarak kullanılmış olup, sekonder metabolit üretimine uygun kallus üretiminin elde edilebilmesi için 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarını (0 μ M, 1.13 μ M, 2.26 μ M, 4.52 μ M, 9.05 μ M, 18.10 μ M) içeren besin ortamları kullanılmıştır. Eksplant tipleri ve besin ortamlarının kallus oluşumuna etkileri incelenmiştir. İncelenen parametrelerden yüzde kallus oluşumu, 30. Gün, 60. Gün ve 90. Gün kallus ağırlıkları parametrelerinin varyans kaynakları üzerine etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Birim ağırlık yönünden ortalama en yüksek kallus ağırlığı Gürarlan çeşidinde 90. gün, petiol eksplant tipinin kullanıldığı 1.13 μ M 2,4-D içeren besin ortamından elde edilirken; Çiftçi çeşidinde 90. gün, kotiledon eksplant tipinin kullanıldığı 2.26 μ M 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiştir.

Temmuz 2024, 66 sayfa

Anahtar Kelimeler: Çemen otu, 2,4-D, sekonder metabolit, kallus, *in vitro*

ABSTRACT

Master Thesis

CALLUS INDUCTION FOR SECONDARY METABOLITE PRODUCTION AND ADVENTITIOUS SHOOT REGENERATION STUDIES IN DIFFERENT FENUGREEK (*Trigonella foenum-graecum* L.)

Melike İNCETEKİN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Serkan URANBEY

Fenugreek is a medicinal plant used in traditional medicine. Fenugreek seeds are widely used as flavoring and have different alkaloid, saponin and fixed oil contents. Trigonellin and diosgenin components are known for their anti-cancer, cholesterol and blood sugar lowering effects. The first step to increase secondary metabolite production under *in vitro* conditions is callus production. Different explant types such as roots, petioles and cotyledons were used to achieve this goal. In this study, Güraslan and Çiftçi fenugreek varieties were used as plant material and nutrient media containing different concentrations of 2,4-D (0 μ M, 1.13 μ M, 2.26 μ M, 4.52 μ M, 9.05 μ M, 18.10 μ M) were used to obtain callus production suitable for secondary metabolite production. The effects of explant types and nutrient media on callus formation were analyzed. Among the parameters examined, the effect of percent callus formation, 30th day, 60th day and 90th day callus weights on variance sources were found statistically significant. The highest average callus weight in terms of unit weight was obtained from the nutrient medium containing 1.13 μ M 2,4-D in Gürarslan variety on the 90th day, in which petiol explant type was used; while the highest average callus weight was obtained from the nutrient medium containing 2.26 μ M 2,4-D in Çiftçi variety on the 90th day, in which cotyledon explant type was used.

July 2024, 66 pages

Key Words: Fenugreek, 2,4-D, secondary metabolite, callus, *in vitro*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında desteklerini benden esirgemeyen, bilgi ve deneyimiyle her zaman yanımda olan, yürüdüğüm zorlu yollarda verdiği tavsiyelerle yolluma ışık tutan değerli danışman hocam Prof. Dr. Serkan URANBEY' e teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca ne zaman başım sıkışsa kapısını çaldığım, düştüğüm zaman bir baba şevkatiyle elini uzatan, her zaman varlığını hissettiğim, maddi ve manevi anlamda desteklerini benden esirgemeyen biricik hocam Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a, güzel dokunuşlarıyla bu çalışmayı renklendiren, güzel ve iyi insanların hala var olduğuna inancımı güçlendiren, güler yüzüyle günüme çiçek açtıran değerli hocam Prof. Dr. Cengiz SANCAK'a, yürüdüğüm bu yolun başından beri üzüldüğümde benimle üzülen, sevindiğimde benimle sevinen, bana inanan ve güvenen, yürüdüğüm yoldan keyif almamı sağlayan güzel insan Dr. Öğr. Üyesi Güray AKDOĞAN'a, varlığıyla çalışma alanımı renklendiren, keyifli sohbetlerin baş kahramanı, bir abi gibi varlığını hissettiren ve desteklerini asla esirgemeyen Doç. Dr. Berk BENLİOĞLU'na, sadece sohbeti yeter dediğim kapısını çalıp derdimi döktüğüm dert ortağım, bu yolu yürürken motive olmamı sağlayan kıymetli hocam Dr. Yasin ÖZGEN'e, yoluma yoldaş olan, yolda kol kola yürüdüğüm güzel arkadaşım Yüksek Ziraat Mühendisi Cansu DEMİR'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu yolda en büyük teşekkür her zaman ve her koşulda arkamda duran, omzuna başımı koyup ağladığımda huzur bulduğum, bu yolu tamamlamamda en büyük payı olan hatta yolun bittiği yerde yol açan, biricik sığınağım ANNEME...

Melike İNCETEKİN
Ankara, Temmuz 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1 Materyal	18
3.1.1 Bitki materyali.....	18
3.2 Yöntem	18
3.2.1 Çalışmada kullanılan ekipmanın sterilizasyonu	19
3.2.2 Bitki besin ortamı, büyüme düzenleyicileri ve hazırlığı	19
3.2.3 Çemen tohumlarında yüzey sterilizasyonu ve in vitro çimlendirme.....	21
3.2.4 Eksplant hazırlığı	22
3.2.5 Elde edilen kallusların sürgün rejenerasyon ortamına aktarılması.....	23
3.3 İstatistiki Analizler	24
4. BULGULAR	25
4.1 Tohumların Yüzey Sterilizasyonu	25
4.2 Farklı Besin Ortamlarının Kallus Tipi ve Rengi Üzerine Etkileri	26
4.3 Farklı Çemen Genotiplerinde Ekplant Tipleri ve Besin Ortamlarının Kallus Oluşumu Üzerine Etkileri	31
4.3.1 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde farklı ekplant tiplerinde kallus oluşumu üzerine etkileri.....	32
4.3.2 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Gürarlan çeşidinde farklı eksplant tiplerinde kallus oluşumu üzerine etkileri	37
4.4 Kallus Ağırlığı	41
4.4.1 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde farklı ekplant tiplerinde 30. günde kallus ağırlığı üzerine etkileri.....	41
4.4.2 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde farklı ekplant tiplerinde 60.günde kallus ağırlığı üzerine etkileri.....	44
4.4.3 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde farklı ekplant tiplerinde 90. günde kallus ağırlığı üzerine etkileri.....	46
4.4.4 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Gürarlan çeşidinde farklı ekplant tiplerinde 30. Günde kallus ağırlığı üzerine etkileri.....	48

4.4.5 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Gürarlan çeşidinde farklı ekplant tiplerinde 60. Günde kallus ağırlığı üzerine etkileri.....	50
4.4.6 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Gürarlan çeşidinde farklı eksplant tiplerinde 90. Günde kallus ağırlığı üzerine etkileri.....	52
4.5 Sürgün Rejenerasyonu	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	55
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ.....	66



SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat
Rpm	Dakikada Devir
HCl	Hidroklorik Asit
NaOH	Sodyumhidroksit
μM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
g	Gram
L	Litre
dk	Dakika

Kısaltmalar

BA	Benzil Adenin
BAP	Benzilaminopürin
IAA	Indol-3-Asetik Asit
IBA	Indol-3-Bütirik Asit
NAA	α-Naftalen Asetik Asit
TDZ	Thidiazuron
KIN	Kinetin
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
MS	Murashige and Skoog
B5	Gamborg B5 Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
EtOH	Etil Alkol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Çemen bitkisi tohumları.....	2
Şekil 1.2 Çemen otu	3
Şekil 1.3 Sekonder metabolitlerin genel sınıflandırılması	4
Şekil 1.4 Trigonella foenum-graecum L. biyoaktif bileşiklerin organik yapısı.....	6
Şekil 3.1 In vitro’da çimlendikten 4-5 hafta sonra kök, petiol ve kotiledon eksplantlarının izole edildiği bitkicik.....	20
Şekil 3.2 Çemen tohumlarının sterilizasyonu	21
Şekil 3.3 Steril çemen tohumlarının besin ortamlarına aktarılmadan önce kurutulması.....	22
Şekil 3.4 Kallus teşviki için hazırlanan steril besin ortamları.....	22
Şekil 3.5 Steril fideciklerden elde edilen farklı eksplant tiplerinin kallus teşvik ortamlarına aktarılması	23
Şekil 3.6 Kallus teşvik ortamından elde edilen kallusların sürgün rejenerasyon ortamına aktarılması	24
Şekil 4.1 Farklı besin ortamlarının Çiftçi çeşidi çemen bitkisinin petiol eksplantında kallus tipi ve rengi üzerine etkileri.....	27
Şekil 4.2 Farklı besin ortamlarının Çiftçi çeşidi çemen bitkisinin kotiledon eksplantında kallus tipi ve rengi üzerine etkileri	29
Şekil 4.3 Farklı besin ortamlarının Çiftçi çeşidi çemen bitkisinin kök eksplantında kallus tipi ve rengi üzerine etkileri.....	30
Şekil 4.4 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinin farklı eksplant tiplerinin 1.13 µM 2,4-D içeren besin ortamındaki kallus oluşumu	34
Şekil 4.5 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinin farklı eksplant tiplerinin 2.26 µM 2,4-D içeren besin ortamındaki kallus oluşumu	35
Şekil 4.6 Gürarlsan çeşidi çemen bitkisinin farklı eksplant tiplerinin 1.13 µM 2,4-D içeren besin ortamındaki kallus oluşumu	38
Şekil 4.7 Gürarlsan çeşidi çemen bitkisinin farklı eksplant tiplerinin 2.26 µM 2,4-D içeren besin ortamındaki kallus oluşumu	40
Şekil 4.8 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde kallus ağırlığının ölçülmesi	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Türkiye’ de yıllara göre çemen verim, üretim ve ekim alanı.....	3
Çizelge 1.2 Çemen tohumlarının kimyasal kompozisyonu	5
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüler ve saklanma koşulları.....	20
Çizelge 4.1 Farklı miktarlarda ticari çamaşır suyu ile yüzey sterilizasyonunun Çiftçi ve Gürarslan çeşidi çemen tohumlarının çimlenmesi üzerine etkileri	25
Çizelge 4.2 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde kök, kotiledon ve petiol kallus tipi ve rengi üzerine etkileri.....	28
Çizelge 4.3 Farklı besin ortamlarının Gürarslan çeşidi çemen bitksinin kök, kotiledon ve petiol eksplantında kallus tipi ve rengi üzerine etkileri.....	31
Çizelge 4.4 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde kök, kotiledon ve petiol eksplant tiplerinde kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçları	33
Çizelge 4.5 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde kök, kotiledon ve petiolde kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkilerine ilişkin Tukey Testi.....	37
Çizelge 4.6 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde kök, kotiledon ve petiol eksplant tiplerinde kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçları	38
Çizelge 4.7 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Gürarslan çeşidinde kök, kotiledon ve petiolde kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkilerine ilişkin Tukey Testi.....	41
Çizelge 4.8 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde 30. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu	42
Çizelge 4.9 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde 30. gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi	44
Çizelge 4.10 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde 60. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu	44
Çizelge 4.11 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde 60. gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi.....	46
Çizelge 4.12 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde 90. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu	46
Çizelge 4.13 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde 90. gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi.....	48
Çizelge 4.14 Gürarslan çeşidi çemen bitkisinde 30. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu	48

Çizelge 4.15 Gürarlan çeşidi çemen bitkisinde 30. gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi.....	50
Çizelge 4.16 Gürarlan çeşidi çemen bitkisinde 60. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu	50
Çizelge 4.17 Gürarlan çeşidi çemen bitkisinde 60. gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi.....	51
Çizelge 4.18 Gürarlan çeşidi çemen bitkisinde 90. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu	52
Çizelge 4.19 Gürarlan çeşidi çemen bitkisinde 90. gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi.....	53



1. GİRİŞ

Dünyada geniş yayılma alanına sahip tek yıllık baklagil bitkisi olan çemen, Akdeniz bölgesinde yayılış göstermektedir. Çemen cinsinin 106 türü bulunmaktadır (POWO 2024). Yaygın olarak görülen 50 türün 45 tanesi ülkemizde doğal olarak yetişmektedir. Ülkemizde kültüre alınan çemen türü ise *Trigonella foenum-graecum* L.'dir (Beyzi 2011).

Fabacea (Baklagil) familyasına ait olan çemen bitkisi, ömürleri yönünden tek yıllık, saplarının içi boş ve köşeli olmayan yuvarlak bir yapıya sahiptir. Bitki boyu, ülkemizde 30-60 cm yüksekliğe sahiptir. Vejetatif gelişme döneminde tüysüz koyu yeşil renkli yaprakları üçlü yapıdadır. Bitki yaprak sapları 5.3 mm uzunluğunda olup, üst bölgede yer alan yaprakların yüzeyleri tüylüdür. Yan dallara sahip olan çemen bitkisinde yaprakçıklar 10-40 mm uzunluğunda ve 8-15 mm genişliğinde oval formdadır (Gökçe 2016). Çiçekler tıpkı yan dallar gibi yaprak koltuklarından sapsız şekilde çıkar. Taç yapraklar bir adet bayrak yaprak, iki adet kanatçık ve kayıkçıktan oluşmuştur. Taç yapraklar sarımsı beyaz veya açık pembe renktedir. Çiçekler meydana geldikten 10 gün sonra meyve oluşumu gözlemlenmiştir. Meyveleri bakla olarak isimlendirilen çemen bitkisinde baklalar 5-11 cm uzunlukta olup, bir bakla içerisinde yaklaşık olarak 10-20 adet tohum bulunmaktadır (Beyzi 2010).

Çemen tohumu 3-5 mm büyüklükte dikdörtgenimsi, sert yapılı, açık kahverengi ve koyu sarı renktedir. Çemen tohumlarının kendine has ve yoğun bir kokusu vardır. Bu koku 3-Hydroxy-4,5-Dimethyl-2(5H)-Furanon bileşiği sonucu ortaya çıkmaktadır (Gökçe 2016).



Şekil 1.1 Çemen bitkisi tohumları (Anonim)

Çemenin hem tohumları hem de yaprakları insan beslenmesinde kullanılmaktadır. Çemen bitkisinden tıp, gıda, eczacılık, kozmetik ve halk hekimliği gibi birçok alanda yararlanılmaktadır (Çamlıca 2022).

Çemen baharat ve baklagil olarak oldukça önemli bir yere sahiptir. Çemen tohumları, genellikle Hint ve Orta Doğu mutfağı gibi geleneksel mutfaklarda baharat olarak kullanılmaktadır. Tohumların kendine özgü tat profili, yemeklere zengin bir aroma katar. Ayrıca, çemen tohumları, özellikle köri karışımları, ekmek ve hamur işleri, turşular ve et yemekleri gibi çeşitli yemeklerde kullanılmaktadır. Baharat olarak kullanımı, gıda endüstrisinde ve evde yemek yapımında yaygın olarak görülmektedir. Çemen, aynı zamanda baklagil olarak değerlendirilir ve beslenme açısından zengin bir kaynak olarak kabul edilir. Tohumlar lif, protein, demir, magnezyum, çinko ve çeşitli B vitaminleri bakımından zengindir. Ekim nöbeti sistemlerinde toprak yapısının iyileştirilmesinde önemli yere sahip olan çemen bitkisi aynı zamanda yeşil gübreleme olarak da değerlendirilmektedir.



Şekil 1.2 Çemen Otu

Çemenin ülkemizdeki üretim alanı 2013 yılında 1678 dekar iken 2023 yılında yaklaşık 6.5 katlık bir artış göstererek 10746 dekar alana yükselmiştir. Üretim miktarı değerlendirmeye alındığında ise 2013 yılında 195 ton çemen üretimi gerçekleştirilirken yaklaşık 6.7 kat artarak 1313 tona ulaşmıştır (TÜİK, 2023).

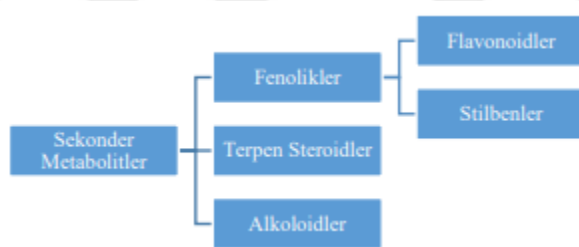
Çemen bitkisinde verim yıl içerisindeki yağış miktarıyla orantılı bir şekilde değişim gösterirken üretim miktarı talebe bağlı olarak değişmektedir.

Çizelge 1.1 Türkiye’ de yıllara göre çemen verim, üretim ve ekim alanı (TÜİK, 2023)

YILLAR	EKİM ALANI (da)	ÜRETİM (ton)	VERİM (kg/da)
2013	1678	195	116
2014	1979	218	110
2015	4825	491	114
2016	8234	914	111
2017	14499	1521	105
2018	7188	745	104
2019	6040	645	107
2020	6521	713	109
2021	7326	816	112
2022	8903	1044	117
2023	10746	1313	122

Bitkiler primer metabolit olarak isimlendirilen ve yaşamsal faaliyetlerini sürdürmek için elzem olan karbonhidrat, lipid ve amino asitleri üretirler. Aynı zamanda bitkiler primer metabolitlerle birlikte bitkilerin yaşamsal faaliyetleri için primer metabolitler kadar önemi olmayan ancak savunma, çevreye uyum sağlama gibi amaçlarla sekonder metabolit üretimi gerçekleştirirler. Bitkilerin ürettiği sekonder metabolitler modern tıp ve biyoteknolojide hiperlipidemi, hipoglisemi tedavisinde, anti-oksidan, anti-enflamatuvar, anti-proliferatif ve anti-kanser ajan olarak kullanılmaktadır (Turgut Kara 2007; İlgar 2019).

İlk olarak Kossel (1891) tarafından kullanılmış olan sekonder metabolit kavramı primer metabolitlerin zıttı olarak tanımlanmıştır. Theis ve Lerdau (2003), ise sekonder metabolitleri fotosentez sonucunda üretilmeyen, bitkilerin bazı fizyolojik fonksiyonları sonucunda oluşan ve fotosentez, solunum gibi yaşamsal faaliyetlerde rolü olmayan maddeler olarak tanımlamıştır. Sekonder metabolitler genel olarak üç başlık altında sınıflandırılır (Erkoyuncu 2015).



Şekil 1.3 Sekonder metabolitlerin genel sınıflandırılması (Alvarez 2014)

Fenolikler; her bitkide bulunan, çoğunlukla pigmentlerle temsil edilen oldukça geniş bir gruptur. Çoğunlukla renk hücreleri ile temsil edilen ve tüm bitkilerde bulunan bir grup olarak tanımlanır. Hücre çeperini güçlendiren lignin bu grupta yer alırken aynı zamanda yapısal fonksiyonları olan maddelerde bu grupta yer alır. Bazıları bitki savunmasında, tohum gelişmesinde ve tozlamada görev almaktadırlar. Kimyasal yapısına baktığımızda bir ya da daha fazla asidik hidroksil grubu içeren aromatik bileşiklerdir. Fenoliklerin alt grubu olan flavonoidler; birçok çiçeğin ve meyvenin renginin oluşması, polinatör

çekimi gibi olaylarda rol alırken, stilbenler; daha çok bitki savunmasında görev alırlar (Topcu ve Çölgeçen 2015).

Terpenler; 22.000'in üzerinde bileşiğin tanımlandığı bu grup en geniş doğal ürün sınıfı olarak ifade edilmektedir. Terpenler sınıfında yer alan bu bileşikler fotosentetik renk hücreleri, bitkilerde hormonlar ve membranların yapısal bileşenleri gibi işlevlerde rol almaktadır (Tiring vd. 2020).

Alkoloitler; aktif, azot içeren bazik bileşiklerdir. Alkoloitler sınıfında yer alan bazı bileşikler böcekler savunma mekanizmalarında kullanılmaktadır. Birçok hastalığın tedavisinde insanlar şifalı bitki özlerini kullanmışlardır (Tiring vd. 2020).

Sekonder metabolitler bitkilerin yaşadıkları çevrede canlılığını sürdürebilmeleri için gereklidir. Sekonder metabolitlerin sahip oldukları bazı özellikleri bitkileri potansiyel düşmanlara karşı korur ve savunma mekanizmalarının gelişmesini sağlar. Sekonder metabolitler bitkilerin ortak yaşam alanlarında polinatörleri ve simbiyontları kendilerine çekmek için cezbedici madde olarak görev almaktadırlar. Bitkilerin adaptasyon yeteneklerinde önemli rol almalarının yanında sekonder metabolitler tat ve koku verici olarak, boyar madde olarak kullanılmıştır (Turgut Kara 2007).

Çemen tohumlarının bileşiminde %27 protein, %7-10 sabit yağ (%52 oleik asit, %40 linoleik asit), azotlu bileşikler, flavonoid, müsilaj ve kolin gibi maddeler bulunmaktadır (İpek 2008).

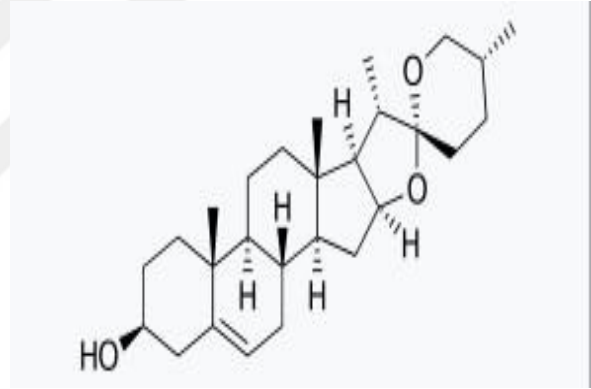
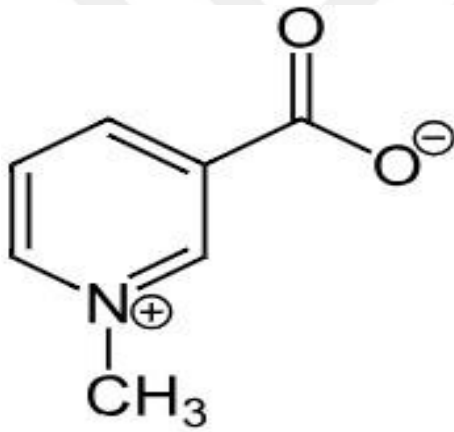
Çizelge 1.2 Çemen tohumlarının kimyasal kompozisyonu (A.A.M Nour 1986)

Kimyasal Kompozisyonu (%)

Nem	4.3
Ham protein	27.3
Ham yağ	6.7
Ham lif	6.7
Nitrojen	51.2
Kül	3.8

Çemen tohum droğunun sekonder metabolit içeriğinde yaklaşık %35 oranında alkoloitler (betain, gentianin, karpain, kolin, nörin, trigonellin, trimetilamin), %10 oranında flavonoitler (kemferol, kersetin, luteolin, izokersitrin, izoviteksin, orientin, rutin, viteksin) ve %4.8 oranında saponinler (diosgenin, fenogrekin, fenugrin B, gitogenin, neotigogenin, sarsasapogenin, silagenin, tigogenin, trigofoenozitler A-G, yamogenin, yukagenin) bulunmaktadır (Keser ve Gürbüz 2020).

Çemen tohumlarında terapötik özelliğe sahip pek çok sekonder metabolit bulunmaktadır. Çemen tohumlarının en önemli sekonder metabolit grubu saponinlerdir. *Trigonella foenum-graecum* L. saponinler grubuna örnek olarak diosgenin, yamogenin, tigogenin, neotigogenin ve gitogenin sayılabilir (İlgar 2019).



Şekil 1.4 *Trigonella foenum-graecum* L. biyoaktif bileşiklerin organik yapısı (a; Trigonellin, b; Diosgenin)

Sekonder metabolitler günümüzde yoğun olarak ilaç sanayinde kullanım alanı bulmaktadır. Sekonder metabolitler anti-inflamatuar, antioksidan, kardioprotektif, antikarsinojenik, hipoglisemik ve hipolipidemik etkiye sahiptir. Tıbbi bitkiler ham drog ve özüt olarak kullanılmaktadır. Birçok sekonder metabolit saflaştırılmış şekilde kullanılır. Örneğin; sedef hastalığında berberin, romatizmal ağrılarda kapsaisin, öksürük giderici olarak kodein, uyarıcı olarak kafein, ağrı kesici olarak morfin, mide bulantısı için skopolamin kullanılmaktadır (Çalışkan vd. 2019).

İnflamatuar etkinlik; vücudumuzda meydana gelen yaralanma veya vücudumuzun herhangi bir tehlikeyle karşı karşıya kaldığında verdiği tepkidir. İnflamatuar süreç vücudumuzda enfeksiyon, antijen-antikor etkileşimi veya fiziksel bir hasar meydana gelmesi durumunda ortaya çıkan olaylar bütünü olarak değerlendirilir. Sekonder metabolitlerin anti-inflamatuar etkinlikleri sıklıkla çalışılan konular arasında yer almaktadır. Anti-inflamatuar etki gösteren sekonder metabolitler antioksidan ve serbest radikal temizleyici özelliğiyle, inflamasyona neden olan hücresel sistemleri düzenleyerek etkisini göstermektedir. Çemen otu tohumlarının metanolik ekstraktlarının anti-inflamatuar etkinliğinde alkaloid ve flavonoid içeriğinin etkisinin olabileceği belirtilmiştir (Ülger vd. 2020).

Antikarsinogenik etki; kanserle mücadelede bitkisel sekonder metabolitlerin hayati öneme sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Doğal bileşik temel kaynaklı kanser ilaçlarının payı %60'dan fazla olmasına rağmen kanserle mücadelede kullanılan bitki ekstaktlarının kanserli hücre üzerindeki olumlu etkilerini bitki sekonder metabolitlerden sağlanıp sağlanmadığını net ifade etmek mümkün değildir (Ülger vd. 2020).

Yapılan etnobotanik çalışmalarda 800 tıbbi bitki türünün antidiyabetik etkisinin olduğu bildirilirken bunlardan 400' ü üzerinde çalışmada hipoglisemik özellik gösterdiği gözlemlenmiştir. Tıbbi bitkilerin ihtiva ettiği tanen, flavonoid, E ve C vitamini vs. gibi antioksidan etkili bileşiklerle β hücrelerini ve fonksiyonlarını reaktif oksijen ürünlerine karşı korudukları düşünülmektedir (Sarıkaya vd. 2010).

Tıbbi ve aromatik bitkilerde büyük öneme sahip olan ve sekonder metabolizmanın bir ürünü olarak meydana gelen sekonder metabolitler, bitkilerde savunma amaçlı kullanılmaktadır. Tıbbi bitkiler insanlar tarafından yıllardır hastalıkların tedavisinde ve gıda maddesi olarak tüketilmektedir. Bitkilerde üretilen sekonder metabolit miktarının az olması insanlık için her zaman olumsuz bir etki yaratmıştır (Önlü 2019).

Sekonder metabolitlerin üretimi kesintiye uğramadan zamana ve çevre koşullarına bağlı olmaksızın güvenli, steril ve üretim aşamaları kontrollü olacak şekilde *in vitro* koşullar

altında gerçekleştirilebilir. Kallus olarak ifade edilen ve morfolojik olarak farklılaşma eğilimi gösteren hücre ya da hücre grupları potansiyel olarak sekonder metabolit üretimine daha yatkındır. Bu sebeple sekonder metabolit üretiminde yüksek saflıkta ve verimlilikte kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinden faydalanılmaktadır (Baydar 2013).

Doku kültürü çalışmalarında bitkilerin eşeysel çoğalabilmelerinin yanında bitkilerin vejetatif aksamalarının herhangi bir parçası kullanılarak (gövde, kök, yaprak) eşeysiz olarak çoğalma kabiliyetleri sonucunda *in vitro* şartlarda steril yeni bitkilerin elde edilmesi mümkün hale gelmektedir. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen çalışmalarda hastalık ve zararlılardan arındırılmış, mevsime bağlı kalmaksızın tek bir bitkiden istenildiği kadar bitki üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Doku kültürü çalışmaları bitkileri genetik olarak amaca uygun şekilde yönlendirme konusunda çalışmalar yürüten insanlara yardımcı olmaktadır (Acar 1997).

Sekonder metabolitler, primer metabolitlerden biyosentetik yolla üretilmiş olup bitkiler alemindeki dağılışı özel olan bir taksonomik grup (tür, cins, familya) ile sınırlanmıştır. Bitkilerin farklı gelişim dönemlerinde ve özelleşmiş hücre tiplerinde sentezlenen sekonder metabolitlerin saflaştırılmaları oldukça zordur.

Sekonder metabolitler;

- Aynı ekosistemde bulunduğu bitkilerle rekabet gücünü artırırken, bitkiye karşı meydana gelebilecek bakteriyel ve fungal patojenlerin saldırılarına karşı bitkiyi korur,
- Tozlanmada cezbedici olarak görev yapar,
- Simbiyotik ilişkilerde görev alır,
- Bitkilerde simbiyotik ilişkiyi düzenler,
- Bitkide çevreden kaynaklı meydana gelebilecek sıcaklık değişimleri, su, ışık ve mineral madde gibi stres faktörlerine karşı korur,

- Hücre düzeyinde bitki büyüme düzenleyicisi olarak, basit yapılı genlerin fonksiyonel protein yapılarına dönüşmesini düzenlemekte ve transdüksiyon mekanizmalarında görevlidirler.

Biyoteknolojik yöntemlerle, bileşikler iklim ve toprak koşullarından etkilenmeden, kontaminasyondan uzak, pestisit ve herbisit kullanılmadan, daha sabit kaliteye ve verime sahip sürekli olarak elde edilebilmektedir. Bu yöntemler içinde olan bitki hücre ve doku kültürleri, steril koşullar altında, yapay bir besi ortamında, tam bitkiden veya bitkinin çeşitli kısımlarından elde edilen kültürlerdir. Sekonder metabolit üretimi, mikroçoğaltım, bitki hücrelerinden biyokimya, fizyoloji, genetik ve patoloji alanlarında yürütülen çalışmalar bitki hücre ve doku kültürü uygulamalarının temel alanlarıdır.

Sekonder metabolitlerin *in vivo* şartlar altında yetiştirilen bitkiden elde edilmesinin yerine *in vitro* koşullar altında elde edilmesinin bazı avantajları vardır. Tarlada yetiştiricilik esnasında kaliteyi olumsuz etkileyen bazı faktörler *in vitro* koşullar altında engellenebilir. *In vitro* koşullarda sekonder metabolit üretimi *in vivo* bitkiden sekonder metabolit üretimine göre daha fazla olabilir. *In vitro* koşullar altında elde edilen bileşikler bitkide üretilen bileşiklerle benzerlik gösterebilir.

Genele ve yapılan çalışmalara bakılacak olursa, günümüz koşulları, üretim maliyetleri, artan talepler, çeşitlerin korunması gibi konular nedeniyle yapılacak olan sekonder metabolit üretimlerinin *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmesi zaman, maliyet ve sürdürülebilirlik açısından önemli hale gelmiştir.

Tıbbi ve aromatik bitkiler özellikle son yıllarda dünyadaki tüm toplumlarda daha fazla önem kazanmaya ve kullanılmaya başlamıştır. Çemen bitkisinde doku kültüründe geliştirilmiş *in vitro* çoğaltım protokolleri mevcuttur. Bu protokoller üzerinden yola çıkarak sekonder metabolit üretimine en uygun kallus üretimi eldesi sağlanmak istenmiştir ve çalışmanın amacı olan *in vitro* sekonder metabolit üretimine uygun kallus üretimi ve somatik embriyogenezis yoluyla bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Patel vd. (2023), yaptıkları çalışmada çemen bitkisinde kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonunu incelemişlerdir. 2,4-D (2.26, 4.52, 6.79, 9.05 ve 11.31 μM) ve NAA (2.69, 5.37, 8.06, 10.74 ve 13.43 μM) bitki büyüme düzenleyicilerinden farklı oranlarda kombinasyonlar oluşturmuşlar ve eksplant olarak bitkinin hipokotil ve kotiledon kısımları üzerindeki etkilerini gözlemlemişlerdir. Maksimum kallus gelişimini 9.05 μM 2,4-D içeren ortamda ve hipokotil eksplantından sağlamışlardır. Sürgün rejenerasyonu için hazırlanan bütün ortamlarda 2.71 μM Adenin sülfat sabit tutulmuş ve farklı oranlarda BAP (2.22, 4.44, 6.66, 8.88 ve 11.10 μM) kullanmışlardır. Maksimum sürgün rejenerasyonunu ise 2.71 μM Adenin sülfat +8.88 μM BAP içeren ortamda ve hipokotil eksplantından elde etmişlerdir.

Cambaz (2022), *Veurbascum scamandri* Murb. bitkisinde yaprak eksplant tipini kullanarak farklı besin ortamı kombinasyonlarının kallus oluşumu üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışma sonucunda farklı bitki büyüme düzenleyicileri kullanarak oluşturduğu besin ortamlarının sekonder metabolit üretimi üzerinde önemli etkileri olduğunu rapor etmiştir.

Burdak vd. (2020), çemen bitkisinde farklı genotipler ve farklı temel besin ortamlarının (MS medium, White's medium, Nitsch's medium) in vitro kallus oluşumuna etkilerini incelemişlerdir. Yürüttükleri çalışmada sürgün ucu eksplantını kullanmışlar ve çeşitli temel besin ortamlarına çeşitli konsantrasyonlarda BAP ve 2,4-D kullanmışlardır. En yüksek kallus oluşum oranını MS medium besin ortamının 3.33 μM BAP+3.39 μM 2,4-D ile desteklenmiş kombinasyonundan elde etmişlerdir. Ayrıca 5 farklı genotip kullanmışlar ve kullanılan genotiplerden birinin daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Latifian vd. (2018) *Tagetes minuta* bitkisinin mikro çoğaltımı üzerine farklı BAP ve IAA konsantrasyonlarının etkilerini incelemişlerdir. Eksplant olarak in vitro koşullar altında yetiştirilen bitkiden alınan hipokotil kısmını kullanmışlardır. Farklı şekilde oluşturulan kombinasyonlardaki ortamlardan en iyi sonuç veren ortamı belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmalarının sonucunda farklı bitki büyüme düzenleyicisi

konsantrasyonlarının ve farklı eksplant tiplerinin bitki rejenarasyonu üzerine etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir.

Valizadeh (2018), yaptığı sekonder metabolit üretimine uygun kallus kültürü ve sürgün rejenerasyonuna yönelik çalışmada *Trigonella foenum-graecum* L. bitkisinin yaprak, hipokotil ve embriyo eksenli eksplant olarak kullanmıştır. Bu eksplantlar farklı konsantrasyonlarda NAA (0.0, 2.26, 6.79 ve 9.05 μ M) ve BA (0.0, 2.22, 6.66, 8.88 μ M) içeren MS besin ortamına aktarılmıştır. Kullanılan NAA ve BA kombinasyonuna bağlı olarak, embriyo eksenli eksplantında 2.69 μ M NAA içeren ve BA içermeyen ortamda kallus ve sürgün elde edilmiştir. Ancak yaprak ve hipokotil eksplantları için en yüksek kallus oluşumu 10.74 μ M NAA içeren ortamda meydana gelmiştir.

Açıkgöz (2017), *Achillea gypsicola* bitkisinde iki farklı temel besiyer (MS , B5) ve farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin (BAP, IAA, IBA, KIN, NAA, 2,4-D) kallus oluşumu ve sekonder metabolit üretimine etkilerini incelemiştir. Aynı zamanda sekonder üretimindeki etkiyi gözlemek için farklı elisitör uygulamaları gerçekleştirmiştir. Eksplant kaynağı olarak yaprak ve gövde kullanmış ve yaprak eksplant tipinde en yüksek kallus oluşumu KIN ve 2,4-D içeren besin ortamında meydana gelirken, gövde eksplant tipinde en yüksek kallus oluşumunun KIN ve IBA içeren besin ortamında meydana geldiğini bildirmiştir.

Tuncer ve Günsan (2017), *Rheum ribes* L. bitkisinin tohumlarından in vitro koşullarda elde edilmiş olan fidelerin hipokotil ve kotiledon eksplant tiplerini kullanmışlardır. Farklı oranlarda IBA ve BAP içeren besin ortamı kombinasyonlarına aldıkları eksplant tiplerini aktarmışlardır. Yürüttükleri çalışma sonucunda kallus ve sürgün oluşumu yönünden hipokotil eksplant tiplerinin, kotiledon eksplant tiplerine göre daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir. En yüksek kallus oluşumunun 4.44 μ M BAP ve 4.92 μ M IBA içeren besin ortamından meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

ElNour vd. (2015), *Trigonella foenum-graecum* L. bitkisinin kallus oluşumu üzerine farklı oksin konsantrasyonlarının ve kinetin ile kombinasyonlarının etkilerini incelemişlerdir. Steril koşullarda elde edilen bitkiciklerin hipokotil ve kotiledon

yapraklarını eksplant olarak kullanmışlardır. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak 2,4-D (0.45, 2.26, 4.52, 9.05, 13.57, 18.10, 22.62 μM) ve NAA (0.0, 0.54, 2.69, 5.37, 10.74, 16.11, 21.48 ve 26.85 μM) ve Kin (2.32 μM) kullanmışlardır. Bitki büyüme düzenleyicisinin kullanılmadığı ortamda kallus gelişimi meydana gelmediğini raporlamışlardır.

Özdemir vd. (2015) *Mentha spicata* subsp. *spicata* bitkisinde in vitro koşullar altında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonunu incelemişlerdir. Hipokotil eksplantlarını kallus elde edebilmek amacıyla BAP ve NAA bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarında inkübe etmişlerdir. BAP ve NAA kombinasyonlarının kallus oluşum kapasitesinde ve rejenere olan bitki sayısında farklılıklara sebebiyet verdiğini gözlemlemişlerdir. Maksimum kallus oluşum yüzdesini 1.11 μM BAP ve 2.69 μM NAA içeren MS besin ortamından, maksimum rejenere sürgün yüzdesini ise 8.88 μM BAP ve 0.25 μM NAA içeren MS besin ortamından elde etmişlerdir

Bondarian vd. (2015), yaptıkları çalışmada *Papaver somniferum* L., bitkisinde kallus eldesi ve rejenerasyonu üzerine çalışmalar yürütmüşlerdir. Çalışmada eksplant tipi olarak yaprak, kök ve hipokotil kullanmışlardır. En yüksek kallus eldesini 9.05 μM 2,4-D ve 1.34 μM BAP içeren besin ortamından, en yüksek rejenerasyon oranını 4.44 μM BAP ve 0.45 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Vahedi vd. (2014), safranın hızlı çoğaltımı için 2,4-D büyüme düzenleyicisi (4.52, 9.05 ve 18.10 μM) ve kinetin (2.32, 4.65, 18.59 ve 37.18 μM) içeren MS ortamında safran kormlarının apikal ve lateral meristemlerinden kallus indüksiyonu üzerine çalışmışlardır. Sonuç olarak lateral meristemlerin eksplantlarında kallus indüksiyonunun ilk belirtilerinin 60 gün sonra ortaya çıktığını ve 45 gün sonra 9.05 μM 2,4-D ve 2.32 μM kinetin içeren eksplantların kallus oluşumunu teşvik ettiğini bulmuşlardır.

Sen vd. (2014), *Achyranthes aspera* L. bitkisinde kallus gelişimi ve sürgün rejenerasyonu elde etmeye çalışmışlardır. 2,4-D, NAA, BAP, IAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicilerini kullanarak farklı kombinasyonlarda besin ortamları belirlemişlerdir.

Çalışmada eksplant tipi olarak yaprak kullanılmış ve en yüksek kallus gelişim oranını 9.05 μM 2,4-D ve 2.69 μM NAA içeren besin ortamından elde etmişlerdir. En yüksek sürgün sayısının 17.75 μM BAP ve 2.32 μM KIN içeren besin ortamından meydana geldiğini gözlemlemişlerdir.

Özdemir ve Kurşat (2014), *Acinos rotundifolius* Pers. bitkisinin in vitro bitki üretiminde BAP ve IBA bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerini incelemişlerdir. Eksplant tipi olarak kotiledon boğumu kullanmışlar ve BAP ile IBA kullanarak farklı besin ortamı kombinasyonları meydana getirmişlerdir. Araştırma sonucunda elde ettikleri verileri incelediklerinde BAP ve IBA içeren besin ortamlarının kallus oluşumu ve rejenerasyon üzerinde etkili olduğunu rapor etmişlerdir. En yüksek kallus oluşum oranını 1.11 μM BAP ve 9.84 μM IBA içeren besin ortamından elde etmişlerdir. Sürgün rejenerasyonu meydana gelen kallusları 2.69 μM NAA içeren besin ortamında köklendirmişlerdir.

Jamshidi vd. (2014), *Trigonella foenum-graecum* L. bitkisinde yaprak eksplantlarını kullanarak kallus gelişimi ve diosgenin seviyesini saptamaya çalışmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda NAA, Kin, ve 2,4-D hormonlarıyla oluşturulan besin ortamlarının kallus gelişimi ve diosgenin seviyelerine etkileri incelendiğinde, en iyi sonucu 6.79 μM 2,4-D ve 2.32 μM Kin kombinasyonundan elde etmişlerdir. Diosgenin seviyeleri farklı zaman aralıklarında (20.,40.,60. ve 80.günlerde) değerlendirmeye alınmış ve 60. gün en yüksek diosgenin seviyesine ulaşılmıştır. Ayrıca 2,4-D hormonunun, NAA hormonuna göre diosgenin seviyesini önemli oranda artırdığını belirtmişlerdir.

Abd Elaleem vd. (2014), in vitro koşullarda B5 ve MS temel besiyerleriyle beraber farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve NAA hormonlarının kallus oluşumuna etkilerini incelemişlerdir. Kallus oluşumu için *Trigonella foenum-graecum* bitkisinin hipokotil ve kotiledon yapraklarını eksplant olarak kullanmışlardır. Maksimum kallus oluşumunun B5 temel besiyerine ek olarak 9.05 μM 2,4-D içeren ortamda, kotiledon yapraklarda gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Ekmekci (2013), *Ocimum basilicum* L. bitkisinin hipokotil, yaprak epikotil, sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarını in vitro koşullar altında yetişen fideciklerden elde

ettiğini ve farklı kombinasyonlarda sitokinin (BAP, TDZ) ve oksin (IBA, NAA) içeren ortamlarda sürgün rejenerasyonu için kültüre aldığını raporlamıştır. Fesleğen bitkisinin üç farklı çeşidi kullandığını, her üç çeşitte sürgün oluşumunun sadece hipokotil eksplantında meydana geldiğini, bazı sürgünlerden adventif kök oluşumu olduğunu ve kontrollü bir şekilde toprağa aktırıldığını bildirmiştir.

Yaacob vd. (2013), *Justicia betonica* Linn. bitkisinde petiol ve internod eksplant tiplerini kullanarak kallus eldesi ve sürgün rejenerasyonu meydana getirmeye çalışmışlardır. Kallus oluşumu için NAA, BAP, KIN ve Zeatin bitki büyüme düzenleyicilerini kullanmışlar, kullandıkları eksplant tipleri içerisinde petiol eksplant tipinin kolay bir şekilde kallus oluşturduğunu rapor etmişlerdir. En uygun rejenerasyon ortamını internod eksplant tipi için 8.06 μ M NAA ve 2.22 μ M BAP içeren, petiol eksplant tipi için ise 5.37 μ M NAA ve 4.44 μ M BAP içeren besin ortamı olarak belirlemişlerdir

Afshari vd. (2011), *Trigonella foenum-graecum* bitkisinin kallus gelişimi ve bitki rejenerasyonunu incelemek amacıyla yapılan çalışmada kök, embriyo ve hipokotil gibi eksplantlar kullanmışlardır. İki farklı temel besiyeriyle (B5 ve MS) beraber farklı bitki büyüme düzenleyicileri (2,4-D, Kin, NAA, BAP ve IBA) kullanarak çeşitli ortamlar belirlemişlerdir. 2.32 μ M Kin ve 9.05 μ M 2,4-D kombinasyonunda her iki temel besiyerinde en iyi kallus gelişimini elde etmişlerdir.

Don Palmer ve Keller (2011) yürüttükleri çalışmada *Hypericum perforatum* L. bitkisinin taç yapraklarını kullanarak kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu meydana getirmeye çalışmışlardır. Çalışma sonucunda bitki rejenerasyonunda oksinin önemli bir faktör olduğu kanısına varmışlardır. Sitokinin miktarının ise oksin kadar elzem olmadığını rapor etmişlerdir.

Rezaeian (2011), bu çalışmada *Trigonella foenum-graecum* bitkisinin yaprak, apikal meristem ve köklerini eksplant olarak kullanmıştır. Ortamda 2,4-D hormonunun konsantrasyonundaki artışla beraber kallus gelişiminde de artış gerçekleştiğini

belirtmiştir. En yüksek kallus oluşumunu 4.52 μ M 2,4-D içeren ortamda ve apikal meristem eksplantında gözlemlemiştir.

Yamaner (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışma endemik ve tıbbi öneme sahip olan *Hypericum adenotrichum* Spach bitkisinin *in vitro* koşullar altında çoğaltılması ve belirli elisitör uygulamalarının bitkideki sekonder metabolit üretimini artırma potansiyelini araştırmıştır. Bitkinin doğadan toplanan yapraklarını eksplant olarak kullanmıştır. En yüksek kallus eldesini 17.75 μ M BA ve 1.08 μ M NAA içeren MS besin ortamından sağlamıştır. Elde edilen kallusları 2.32 μ M Kin içeren MS besiyeri ortamına transfer edildiğinde sürgün oluşumunu gözlemlediğini bildirmiştir.

Irvani vd. (2010), *Dorema ammoniacum* D. bitkisinde kallus kültürü ve bitki rejenerasyonu üzerine çalışmalar yapmışlardır. Çalışmada kök, kotiledon ve hipokotil eksplant tipini kullanmışlardır. 2,4-D, NAA, BAP ve KIN bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak farklı kombinasyonlarda kallus oluşumu için besin ortamları hazırlamışlardır. Ekplant tipleri içerisinde en yüksek sonucu hipokotil eksplant tipinden elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Hipokotil eksplant tipinden elde ettikleri kallusları 8.88 μ M BA ve 0.98 μ M IBA içeren besin ortamına aktarmışlar ve en yüksek sürgün rejenerasyonunu elde etmişlerdir. Kök rejenerasyonu için en uygun besin ortamının ise 12.30 μ M IBA içediğini bildirmişlerdir.

Aasim vd. (2009), yaptıkları çalışmada *in vitro* koşullar altında farklı TDZ ve IBA konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Eksplant olarak apikal meristem ve kotiledon yaprakları kullanmışlardır. Apikal meristemlerin sürgün rejenerasyonundaki potansiyelinin kotiledon yapraklara göre daha fazla olduğunu saptamışlardır. Bitki büyüme düzenleyicilerin konsantrasyonlarına bakılmaksızın belirlenen bütün ortamlarda sürgün rejenerasyonu gözlemlenirken, en iyi sonucun sadece TDZ içeren ortamda elde edildiğini belirtmişlerdir.

Raja Naika ve Krishna (2008), bu çalışmada nadir bulunan bir tıbbi bitki olan *Clematis gouriana* Roxb 'un gövde kallus kültürü ve *in vitro* bitki rejenerasyonu üzerine çalışmışlardır. Kallus elde edebilmek için BAP ve NAA bitki büyüme düzenleyicileri

ile farklı kombinasyonlar oluşturmışlardır. En iyi kallus eldesini 4.44 μ M BAP ve 2.69 μ M NAA kombinasyonundan elde etmişlerdir. Bir sonraki adımda elde edilen kalluslar BAP ve 2.46 μ M IBA içeren MS besiyerine aktarmışlardır. 2-6 hafta aynı besiyerinde inkübe edilen kalluslardan filizlenen tomurcuklar gözlemlemişlerdir.

Bhatti vd. (2008) *Rauwolfia serpentina* L. bitkisinde kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu çalışmışlardır. Besin ortamlarında BAP, IBA ve 2,4-D 'nin farklı oranlarını kullanarak çeşitli kombinasyonlar oluşturmışlardır. Kallus oluşumu için yaprak ve kök eksplant tipini; sürgün rejenerasyonu için ise apikal uç eksplant tipini seçmişlerdir. Hem kallus oluşumunda hemde sürgün rejenerasyonunda en yüksek sonucu IBA+BAP kombinasyonundan elde etmişlerdir.

Ali Ahmed vd. (2005), *Phyla nodiflora* L. bitkisinde sürgün rejenerasyonu meydana getirmek için farklı oranlarda oksin ve sitokinin kombinasyonlarını kullanarak besin ortamları denemişlerdir. En yüksek sürgün rejenerasyon oranını 11.10 μ M BA ve 2.32 μ M KIN içeren besin ortamından sağlamışlardır. Elde ettikleri sürgünleri köklendirme ortamına almışlar ve en yüksek kök rejenerasyonunun 4.92 μ M IBA içeren besin ortamından meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Oncina vd. (2000), *Trigonella foenum-graecum* bitkisinin yaprak, gövde ve kök eksplantlarından elde edilen kalluslarda sekonder metabolit olarak bulunan diosgenin miktarlarında önemli farklılıklar saptamışlardır. Diosgenin seviyelerinin yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslarda, gövde ve kök eksplantlarından elde edilen kalluslara göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. 45 gün boyunca yapılan karşılaştırmalarda diosgenin seviyelerini yaprak, gövde ve kök kalluslarında sırasıyla %22, %10 ve %27 olarak saptamışlardır.

Ahmed vd. (2000), *Trigonella foenum-graecum* bitkisinin yaprak, gövde ve kök kısımlarını eksplant olarak kullanmışlardır. Eksplant üzerindeki kallus oluşumunu ve oluşan kalluslarda trigonellin içeriğini gözlemleyebilmek için 2,4-D ve Kin hormonları kullanılarak farklı kombinasyonlarda ortamlar belirlemişlerdir. Kallus gelişimindeki en iyi sonucu 9.05 μ M 2,4-D ve 2.32 μ M Kin kombinasyonundan elde etmişlerdir. Kök

eksplantının diğ er eksplantlarla karşılaştırıldığında en iyi kallus gelişim oranını verdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca en yüksek kallus gelişim oranı kültüre alındıktan 4 hafta sonra kök eksplantında meydana gelmiştir.

Pretto ve Santarem (2000), *Hypericum perforatum* L. bitkisinin yaprak eksplantlarını kullanarak BA, KIN ve 2,4-D bitki büyüme düzenleyicilerini farklı oranlarda içeren besin ortamları belirlemişler ve kallus oluşumunu incelemişlerdir. Aynı zamanda kallus oluşumuna ıřđın etkisinde gözlemlemek için eksplantları karanlık ve aydınlık ortamlarda bırakmışlardır. En yüksek kallus oluşum oranını karanlık ve 2,4-D + BA içeren besin ortamından elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Murch vd. (2000), antidepresan etkisiyle bilinen sarı kantaron bitkisinde TDZ'nin farklı oranlarının kullanıldığı besin ortamlarının bitki rejenerasyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Eksplant kaynağı olarak hipokotili kullanmışlar ve besin ortamlarında bulunan düşük dozlardaki TDZ'nin bitki rejenerasyonu üzerinde önemli etkileri olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılan çemen tohumları, Bolu Abant İzzet Baysal Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Gülsüm Yıldız ve Dr. Mahmut Çamlıca tarafından temin edilmiştir. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü tarafından tescil ettirilen Gürarlan ve Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil ettirilen Çiftçi çemen çeşitleri kullanılmıştır.

Çiftçi çeşidi çemen bitkisi 2017 yılında Eskişehir Geçit kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından seleksiyon ıslah yöntemiyle tescil ettirilmiştir. Mart ayında çiçeklemeye başlayan Çiftçi çeşidinin taç yaprakları beyaz renge sahiptir. Dik bir büyüme gösteren bitki, baklaları uzun ve ortalama bakladaki tane sayısı 10 adettir. Tohumların şekilleri dikdörtgenimsi bir yapıya sahipken, rengi sarımsıdır.

Gürarlan çeşidi çemen bitkisi 2014 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi tarafından tescil ettirilmiştir. Çeşidin bitki boyu 50-60 cm, tohum verimi 140-160 kg/da, bin tohum ağırlığı 16-21 g, tohumları koyu sarı renkli, bakla uzunluğu 8-10 cm, çiçekleri soluk sarı, yaprak rengi koyu yeşil, bitkide bakla sayısı 15-20 adet, baklada tane sayısı 8-12 adettir.

3.2 Yöntem

Çemen bitkisinin *in vitro* kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu kapasitesini incelemek amacıyla yürütülen bu çalışmada yöntem; çalışmada kullanılan ekipman sterilizasyonu , temel besin ortamı, büyüme düzenleyicileri ve hazırlığı, Çemen tohumlarında yüzey

sterilizasyonu ve *in vitro* çimlendirme, elde edilen kallusların sürgün rejenerasyon ortamına aktarılması ve istatistiki analizler şeklinde ele alınmıştır.

3.2.1 Çalışmada kullanılan ekipmanların sterilizasyonu

In vitro çalışmalarda, laboratuvar ortamının ve kullanılan ekipmanın steril olması, bakteriyel kontaminasyondan kaçınılarak güvenilir sonuçların elde edilmesi için hayati öneme sahiptir. Bu nedenle, her çalışma öncesi ekipmanların sterilizasyonu sağlanmıştır. Tohumların yüzey sterilizasyonunda kullanılan petri kapları gruplar halinde yüksek sıcaklığa dayanıklı yanmaz kağıtlara sarılarak 180 °C'de 2 saat etüvde bekletilmiştir. Petri kapları, kâğıt koruyucular steril kabin içerisinde açıldıktan sonra kullanılmıştır. Çalışmalar sırasında kullanılan pens, bistüri, spatül vb. malzemeler alüminyum folyo ile kaplanarak petri kapları ile etüvde bekletilmiştir. Ayrıca kullanılmadan önce %70'lik etil alkol (EtOH) ile steril edilmiştir. Kullanım sırasında da sterilizasyonun sağlanması için steril kabin içerisinde 270°C sıcaklığa ulaşabilen cam boncuklu sterilizatör kullanılmıştır.

3.2.2 Temel besin ortamı, büyüme düzenleyicileri ve hazırlığı

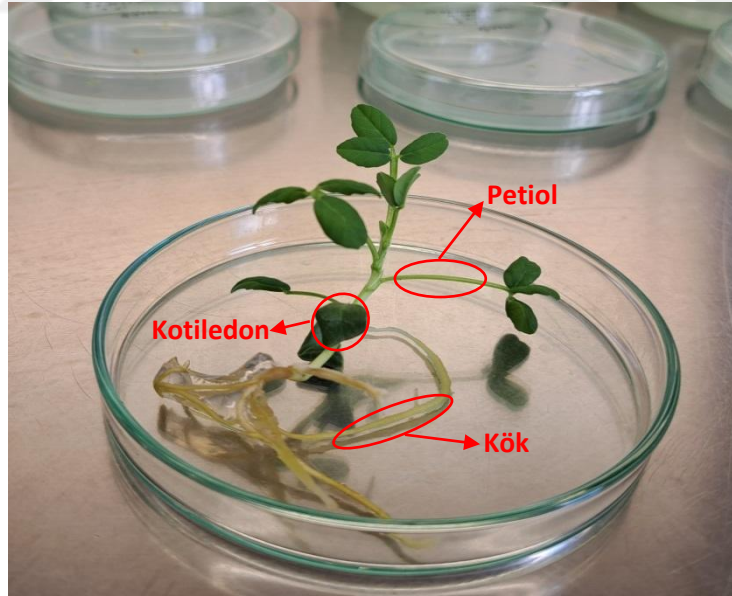
Çimlendirme ile kallus ve rejenerasyon çalışmalarında değişik konsantrasyonlarda sukroz içeren ve 7 g/L agar ile katılaştırılan ticari Murahige ve Skoog (1962) (MS) besin ortamı kullanılmıştır. Ayrıca kallus organogenesiz çalışmalarında oksin kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda (0, 1.13, 2.26, 4.52, 9.05, 18.10 µM) 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) kullanılmış olup, oksin 1 N sodyumhidroksit (NaOH) içerisinde çözülene kadar bekletilmiştir. Daha sonra eriyik steril su ile tamamlanarak 0.5 mg/ml olacak şekilde stok çözelti hazırlanmış ve +4 °C'de depolanmıştır. Sürgün rejenerasyonu çalışmalarında ise sitokinin kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda (2.27, 4.54, 6.81 µM) Thidiazuron (TDZ) kullanılmıştır. Sitokinin dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülene kadar bekletilmiş ve eriyik steril su ile tamamlanarak 0.25 mg/ml olacak şekilde stok çözelti hazırlanmış ve +4 °C'de depolanmıştır. Hazırlanan besin ortamları 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılarak besin ortamının pH değeri 5.6-5.8 olarak ayarlanmış ve otoklavda 121 °C' de, 1.2 atmosfer basınç altında 20 dk süre ile

steril edilmiştir. Çalışmada kullanılan çimlendirme, kallus teşvik ve sürgün oluşturma ortamları her 4 haftalık periyotta yenilenmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüler ve saklanma koşulları

Büyüme Düzenleyicisi	Çözücü	Stok Konsantrasyonu	Saklanma Koşulları (°C)
2,4-D	NaOH	0.5 mg/ml	+4
TDZ	DMSO	0.25 mg/ml	+4

Otoklavdan çıkarılan besin ortamları steril kabin içerisinde daha önceden steril edilmiş olan magenta kaplarına dökülerek, katılaşması beklenmiş ve steril edilmiş tohumlar bir magenta içerisinde beş tohum olacak şekilde çimlenmenin gerçekleşmesi için bırakılmıştır. Tohumlarda ilk çimlenme 4.günde gözlemlenmiştir. Eksplant alınacak şekilde bitkicik oluşması için dört hafta beklenmiştir.



Şekil 3.1 *In vitro* 'da çimlendikten 4-5 hafta sonra kök, petiol ve kotiledon eksplantlarının izole edildiği bitkicik

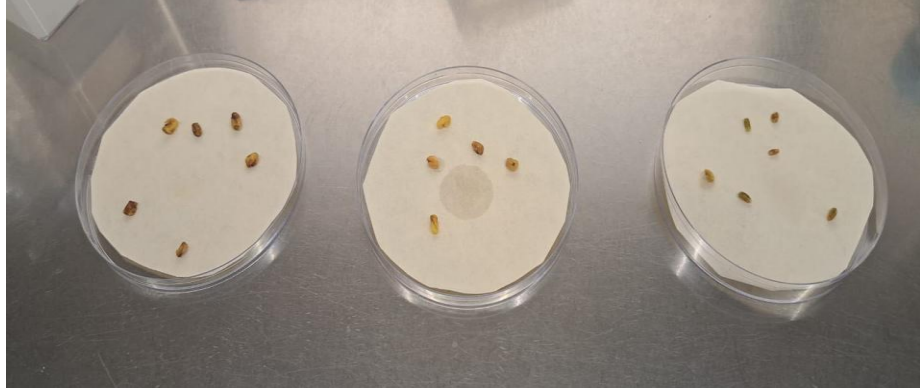
3.2.3 Çemen tohumlarında yüzey sterilizasyonu ve *in vitro* çimlendirme

Gürarslan ve Çiftçi çeşidine ait iri taneli ve daha canlı renklere sahip olan tohumlar *in vitro* çalışmalarda kullanılmıştır. Çemen çeşitlerine ait tohumlar, 2 ml'lik tamamen steril ependorf tüpler içerisinde 3 dk süre ile %70'lik etil alkol (EtOH) içerisinde çalkalanarak bekletilmiş, 3 kez steril saf suyla durulanmıştır (Şekil 3.2). Daha sonra %5 sodyum hipoklorit (NaOCl) içeren %25'lik ticari çamaşır suyunda 30 dk boyunca elle ters yüz edilmiş, 3 kez 5 dk süre ile steril saf su kullanılarak durulanmıştır.



Şekil 3.2 Çemen tohumlarının sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonu işlemi tamamlandıktan sonra, tohumlar steril kurutma kağıtları (Whatman) üzerinde kuruyana kadar bekletilmiş ve çimlenme için belirlenen 20 g/L sukroz, 7 g/L agar içeren Murahige ve Skoog (1962) (MS) besin ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.3). Uygulanan yüzey sterilizasyonu sonucu Gürarslan çeşidi tohumlarında herhangi bir bakteriyel ve fungal bulaşıklığa rastlanmamıştır.



Şekil 3.3 Steril çemen tohumlarının besin ortamlarına aktarılmadan önce kurutulması

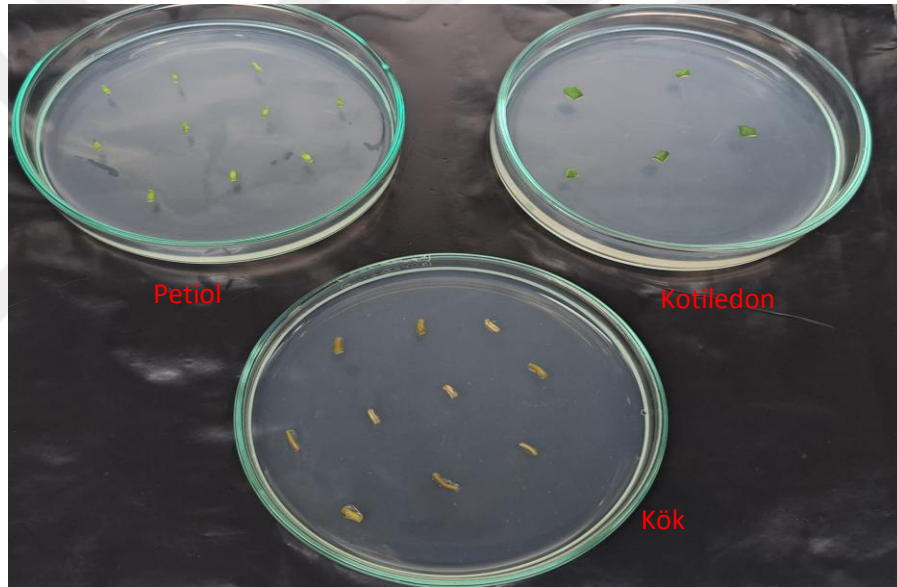
Ancak Çiftçi çeşidi çemen tohumlarında bakteri kaynaklı bulaşıklık olabildiği bunda tohum kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Bu çeşitte yüzey sterilizasyonunda kullanılan ticari çamaşır suyu %30'luk konsantrasyonda kullanılarak bulaşıklık sorunu çözülmüştür. Yüzey sterilizasyonu optimize edildikten sonra her iki çeşide ait tohumlar 20 g/L sukroz, 7 g/L agar içeren Murahige ve Skoog (1962) (MS) besin ortamında 24 °C 8/16 16000 lüks ışık/karanlık ortamında iklimlendirme kabininde çimlendirilmiştir.

3.2.4 Eksplant hazırlığı



Şekil 3.4 Kallus teşviki için hazırlanan steril besin ortamları

In vitro da yüzey sterilizasyonundan sonra çimlendirme ortamına yerleştirilen Gürarslan ve Çiftçi çeşidine ait tohumlarda 4-7 gün sonra çimlenme başlamış, çalışmada kullanılacak doku ve organel tiplerinin (kök, petiol ve kotiledon) oluşması için kültüre aldıktan yaklaşık 4-5 hafta sonra gelişen bitkiciklerden farklı eksplant tipleri izole edilmiştir. Kök eksplantı olarak 4-5 haftalık bitkiciğin kök ucundan itibaren 10 mm boyutunda izole edilmiştir. Benzer olarak aynı yaştaki bitkicikten 10 mm uzunluğunda petiol (yaprak sapı) kesilerek besin ortamına yerleştirilmiştir. Son olarak bitkiciğin kotiledon yaprakları boğum kısmından izole edilmiş, meristematik dokular uzaklaştırılmış, kotiledon yaprağın proksimal kısmı atılarak, distal kısmı 10.0×5.0 mm boyutunda olacak şekilde kesilmiş ve besin ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.5 Steril fideciklerden elde edilen farklı eksplant tiplerinin kallus teşvik ortamlarına aktarılması

3.2.5 Elde edilen kallusların sürgün rejenerasyon ortamına aktarılması

Farklı eksplantlardan gelişen farklı yapı, renk, boyut ve ağırlıktaki kalluslar, sürgün rejenerasyonu teşviki için belirlenen besin ortamlarına aktarılmıştır. Sürgün rejenerasyon teşvik ortamı olarak farklı konsantrasyonlarda TDZ (2.27, 4.54, 6.81 μ M), 30 g/L sukroz, 7 g/L agar ve MS temel besin ortamı kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren kallus teşvik ortamından elde edilen tüm eksplant

tipleri farklı konsantrasyonlarda (2.27, 4.54, 6.81 μ M) TDZ içeren besin ortamlarına her bir kallus eksplantı ayrı ayrı olacak şekilde sürgün rejenerasyon ortamlarına aktarılmıştır.



Şekil 3.6 Kallus teşvik ortamından elde edilen kallusların sürgün rejenerasyon ortamına aktarılması

3.3 İstatistiki Analizler

In vitro gerçekleştirilen çalışmada kullanılan genotipler arasındaki korelasyonların değerlendirilebilmesi için istatistiki analizler gerçekleştirilmiştir. Yürütülen çalışma sonucunda kallus tipi ve rengi, kallus elde edilen eksplant oranı, elde edilen kallusların ağırlığı ve rejenerasyon gerçekleşen kallus oranı incelenmiştir. Doku kültürü çalışmaları 90 mm çapındaki petri kaplarına her muamelede 10 adet eksplant olacak şekilde 4 tekerrürlü olarak yerleştirilmiş ve deneme tesadüf parselleri deneme desenine uygun olarak kurulmuştur. Elde edilen kalluslar ise sürgün rejenerasyonu için hazırlanan besin ortamlarına her magentada 5 adet eksplant olacak şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen veriler ışığında varyans analizi ve Tukey testi uygulanmıştır. Yüzde değerler istatistiki analiz yapılmadan önce açılı değerlerine dönüştürülmüş (Snedecor ve Cochran 1967) ve istatistik analizler, JMP istatistik paket programı ile bilgisayar ortamında gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

Çalışmada kullanılacak eksplantlar için uygun sterilizasyon yönteminin belirlenmesi kontaminasyon kaynaklı besi ortamı, eksplant ve zaman kaybının önüne geçebilmek için oldukça önemli bir aşamadır. Sterilizasyonda kullanılacak olan kimyasalların konsantrasyonu ve eksplantların kimyasallara maruz bırakılma süresi arttıkça eksplantların veya bitkinin rejeneratif gelişiminin zarar görmesine neden olabilir. Eksplantların ve bitki rejeneratif gelişiminin olumsuz yönde etkilenmeyeceği ve en sağlıklı şekilde sonuç verebileceği sterilizasyon yöntemi daha önce yapılan çalışmalarda yer alan sterilizasyon protokolleri göz önüne alınarak değerlendirilmiş ve karar verilmiştir. Rezaeian (2011) yaptığı çalışmada, tohumları ilk olarak 25 saniye etil alkol daha sonra %2 sodyum hipoklorit ile steril hale getirmiştir. Besin ortamına aktarmadan önce 3 defa steril distile su ile durulama işlemini gerçekleştirmiştir. Oncina vd. (2000) yaptıkları çalışmalarında sterilizasyon yöntemi olarak %100 'lük etil alkolle 1 dakika, %20'lik sodyum hipoklorit ile 15 dakika tohumların yüzey sterilizasyonunu sağlamışlar ve tohumları besin ortamlarına aktarmadan önce steril distile su ile durulamışlardır.

Çizelge 4.1 Farklı miktarlarda ticari çamaşır suyu ile yüzey sterilizasyonunun Çiftçi ve Gürarlan çeşidi çemen tohumlarının çimlenmesi üzerine etkileri

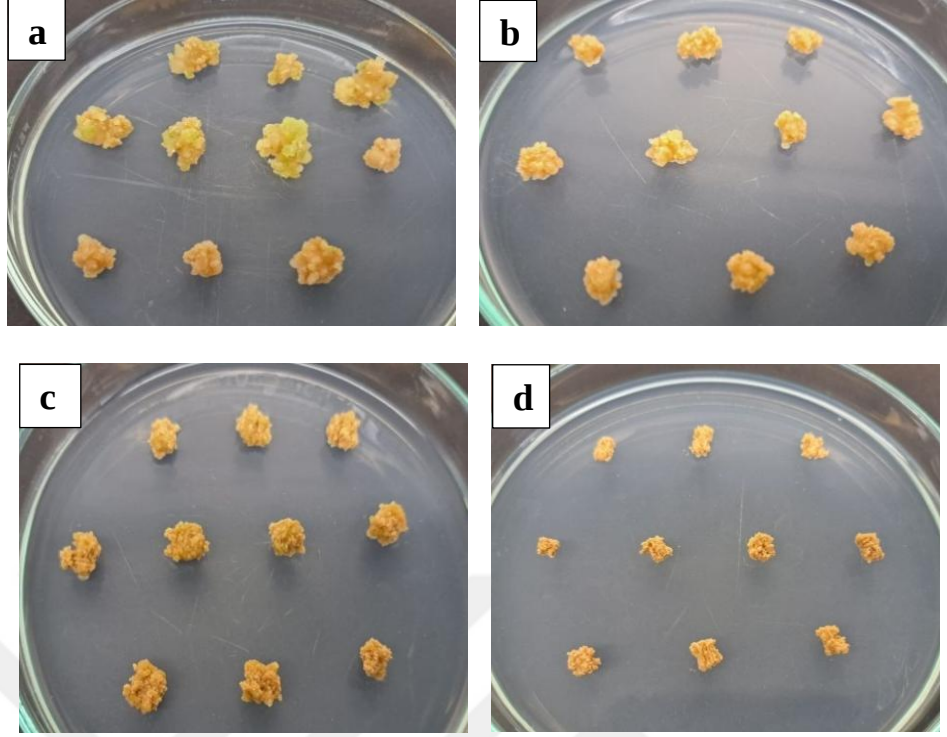
Çamaşır Suyu Oranları (%)	Çimlenme Oranı (%)		Sağlıklı Bitkicik Oluşumu (%)		Bulaşık Bitkicik Oranı (%)	
	Çiftçi	Gürarlan	Çiftçi	Gürarlan	Çiftçi	Gürarlan
25	100.0	100.0	0.0	100.0	100.0	0.0
30	100.0	100.0	90.0	100.0	0.0	0.0

Gürarlan ve Çiftçi çeşidi çemen tohumlarına uygulanan farklı oranlardaki çamaşır suyunun çimlenme oranı, sağlıklı bitkicik oluşumu ve kontamine bitki sayısı değerleri Çizelge 4.1'de belirtilmiştir. Gürarlan ve Çiftçi çeşidi çemen tohumlarının kullanıldığı

bu çalışmada ilk olarak 3 dakika %70'lik etil alkol (EtOH) içerisinde çalkalanarak bekletilmiştir. Daha sonra tohumların etil alkolden arındırılması için 3 defa steril distile su ile durulanmıştır. Ardından %25'lik ticari çamaşır suyunda (NaOCl) 30 dakika boyunca bekletilmiş ve 3 kez 5'er dakikalık aralıklarla durulanmıştır. Kullanılan bu yöntem Gürarslan çeşidi çemen tohumları için %100 oranında çimlenme ve sağlıklı bitkicik oluşumu sağlamıştır. Çiftçi çeşidi çemenler için ise %100 oranında bir çimlenme görülmesine rağmen sağlıklı bitkicik gözlemlenememiş ve tüm bitkilerde bakteri kaynaklı kontaminasyon meydana gelmiştir. Bu nedenle Çiftçi çeşidi çemen tohumlarında %30'luk ticari çamaşır suyu kullanılmış ve diğer aşamalar sabit tutulmuştur. Bu deneme sonucunda Çiftçi çeşidi çemen tohumlarında %100 oranında çimlenme gözlemlenirken, sağlıklı bitkicik oluşum oranı %90 olarak kaydedilmiştir.

4.2 Farklı Besin Ortamlarının Kallus Tipi ve Rengi Üzerine Etkileri

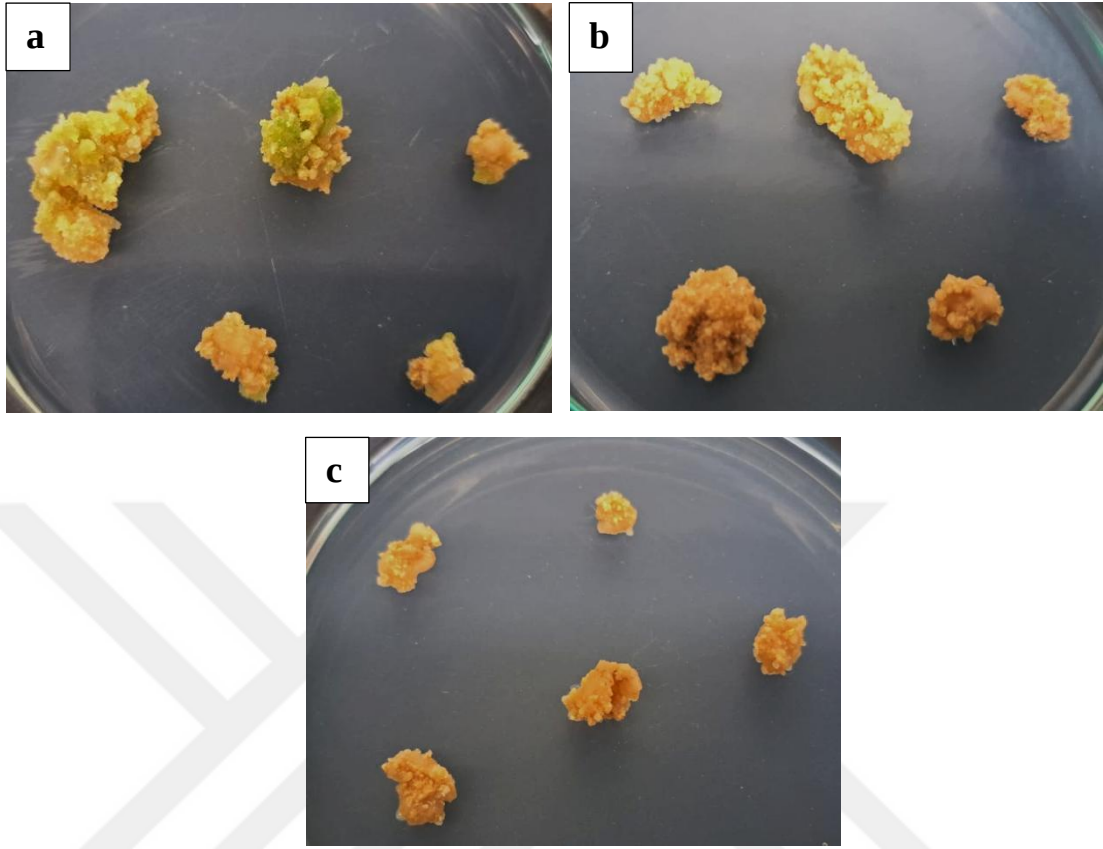
Hormonların bulunması doku kültüründe yürütülen çalışmalarda birçok gelişmenin meydana gelmesine yol açmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılması bitkilerin rejenerasyon kabiliyetlerinde değişiklikler oluşturmuştur. Bu değişiklikler insanlarda merak duygusu uyandırmış ve insanların bu alanda çalışmalara yönelmesine yol açmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda bitki büyüme düzenleyicilerinin doku kültürü çalışmalarında kullanılması, eksplant ve bitki büyüme düzenleyicilerinin birbiri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda besin ortamlarında kullanılan büyüme düzenleyicilerin miktarlarının önemli olduğu kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında olumlu veya olumsuz etkileri değerlendirilmiştir (Sönmez, 2019).



Şekil 4.1 Farklı besin ortamlarının Çiftçi çeşidi çemen bitkisinin petiol eksplantında kallus tipi ve rengi üzerine etkileri (a: 1.13 μ M 2,4-D içeren besin ortamı, b: 2.26 μ M 2,4-D içeren besin ortamı, c: 4.52 μ M 2,4 içeren besin ortamı d: 9.05 μ M 2,4-D içeren besin ortamı)

Çizelge 4.2 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde kök, kotiledon ve petiol kallus tipi ve rengi üzerine etkileri

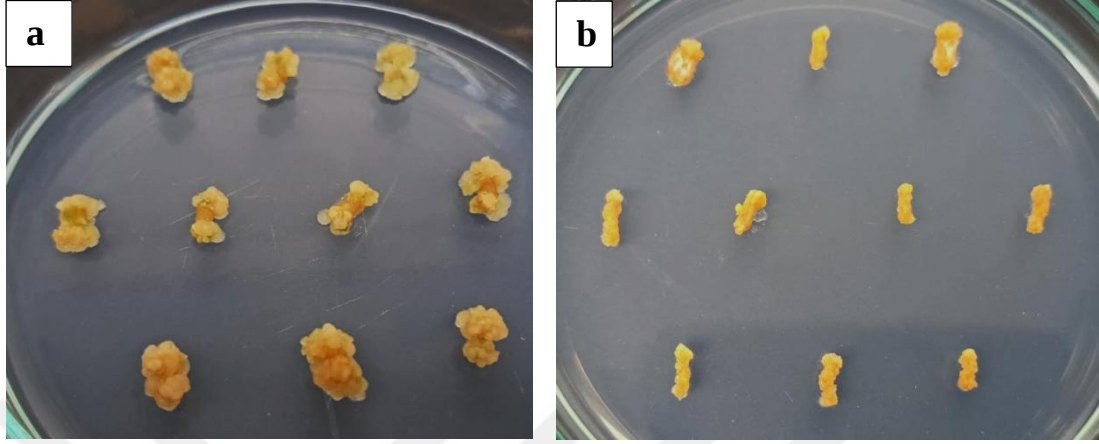
Büyüme düzenleyicileri (μM)	Eksplant tipleri		
2,4-D	Kök	Kotiledon	Petiol
Kontrol (0.0)	Kallus yok	Kallus yok	Kallus yok
1.13	Sarı-yeşil, Gevşek, Sulu	Sarı-yeşil, Gevşek, Sulu	Sarı-yeşil, Gevşek, Sulu
2.26	Sarı, Az gelişmiş, Yumuşak	Sarı-yeşil, Kompakt	Sarı, Gevşek
4.52	Kallus yok	Sarı, Yumuşak, Sulu	Sarı-kahve, Kompakt, Sert
9.05	Kallus yok	Kahverengi, Sert	Az gelişmiş, Sert, Kahverengi
18.10	Kallus yok	Kallus yok	Kallus yok



Şekil 4.2 Farklı besin ortamlarının Çiftçi çeşidi çemen bitkisinin kotiledon eksplantında kallus tipi ve rengi üzerine etkileri (a: 1.13 μ M 2,4-D içeren besin ortamı, b: 2.26 μ M 2,4-D içeren besin ortamı, c: 4.52 μ M 2,4-D içeren besin ortamı)

Kallus tipi ve rengi, materyalin canlılığı ve gelişimi hakkında bilgi verebilir. Kallus rengi klorofil endojen ve ekzojen hormonları, eksplant kaynakları ve sıcaklık ile ışık maruziyeti gibi çevresel kültür koşulları arasındaki farklılıklar nedeniyle değişiklikler gösterebilir (Mongole vd. 2009). Bu çalışmada, Çiftçi çeşidi çemen tohumlarından elde edilen 4-6 haftalık steril bitkiciklerden alınan kotiledon, kök ve petiol eksplantları kullanılmıştır. Eksplant tipleri farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren besin ortamlarına aktarılmış ve oluşan kallusların rengi ve tipi Çizelge 4.2’de özetlenmiştir. Kontrol ve 18.10 μ M 2,4-D içeren besin ortamlarındaki eksplantların hiçbirinde kallus gelişimi gözlemlenmemiştir. Ayrıca 4.52 μ M 2,4-D ve 9.05 μ M 2,4-D içeren besin ortamlarına alınan kök eksplant tipinde kallus gelişimi gözlemlenmezken, bu ortamlardaki kotiledon ve petiol ekplantların da kallus gelişimi meydana gelmiştir. 1.13 μ M 2,4-D ve 2.26 μ M 2,4-D içeren besin ortamlarında bütün eksplant tiplerinde kallus gelişimi meydana

gelmiş ve 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamındaki bütün eksplant tiplerinin sarı-yeşil renkte, sulu ve gevşek dokulu kallus oluşturduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3 Farklı besin ortamlarının Çiftçi çeşidi çemen bitkisinin kök eksplantında kallus tipi ve rengi üzerine etkileri (a: 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamı, b: 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamı)

Gürarlsan çeşidi çemen tohumundan elde edilen bitkiciklerden alınan eksplant tiplerinin oluşturduğu kallus tipi ve rengi Çizelge 4.3’ de belirtilmiştir. Çiftçi çeşidi ile aynı şekilde kontrol ve 18.10 μM 2,4-D içeren besin ortamlarında kallus oluşumu gözlemlenmemiştir. Kök eksplant tipi 4.52 μM 2,4-D ve 9.05 μM 2,4-D içeren besin ortamlarında kallus oluşumu göstermemiştir. 9.05 μM 2,4-D içeren besin ortamında kotiledon ve petiol eksplant tiplerinden elde edilen kalluslar kahverengi, az gelişmiş ve sert yapılı olarak gözlemlenmiş ve 1.13 μM 2,4-D ve 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamlarındaki eksplant tipleri ise sarı-yeşil, sulu ve gevşek bir yapıya sahiptir.

Eksplant tiplerinden elde edilen kalluslardan gerçekleştirilen gözlemlerden yola çıkıldığında iki çeşit içinde 2,4-D miktarındaki artış kallus rengi ve tipinde olumsuz yönde bir etkiye sahiptir. Ancak 1.13 μM 2,4-D ve 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamlarından elde edilen kallusların canlı, parlak, sarımsı ve gevşek yapılı olduğu gözlemlenmiştir. Rejenerasyon ve süspansiyon kültüründe kullanılmaya elverişli olan kalluslar sarımsı, sulu ve gevşek yapılı olmalıdır (Hu vd. 2019). Bu nedenle 2,4-D’nin belirli konsantrasyonlarının kallus renginde ve tipinde olumlu bir etkiye sahip olduğu,

aynı zamanda süspansiyon kültürüne uygun kallusların özelliklerini taşıdığı söylenebilir.

Çizelge 4.3 Farklı besin ortamlarının Gürarlan çeşidi çemen bitksinin kök, kotiledon ve petiol eksplantında kallus tipi ve rengi üzerine etkileri

Büyüme düzenleci leri (μ M)	Eksplant tipleri		
	Kök	Kotiledon	Petiol
2,4-D			
Kontrol	Kallus yok	Kallus yok	Kallus yok
1.13	Sarı-yeşil, Gevşek, Sulu	Sarı-yeşil, Gevşek, Sulu	Sarı-yeşil, Gevşek, Sulu
2.26	Sarı, Az gelişmiş, Yumuşak	Sarı-yeşil, Gevşek	Sarı, Gevşek, Sulu
4.52	Kallus yok	Sarı-kahve, Sert, Kompakt	Sarı, Kompakt
9.05	Kallus yok	Kahverengi, Sert, Az gelişmiş	Az gelişmiş, Sert, Kahverengi
18.10	Kallus yok	Kallus yok	Kallus yok

4.3 Farklı Çemen Genotiplerinde Ekplant Tipleri ve Besin Ortamlarının Kallus Oluşumu Üzerine Etkileri

Çiftçi çeşidinden alınan kök, kotiledon ve petiol eksplantları besin ortamlarına alındıktan bir hafta sonra eksplant üzerinde çıplak gözle ve mikroskop altında ilk gözlemler gerçekleştirilmiştir. Bir hafta sonraki ilk gözlemlerde hiçbir eksplant tipinde kallus başlangıcı gözlemlenmemiştir. İkinci gözlem eksplantların besin ortamlarına aktarılmasından 12 gün sonra gerçekleştirilmiştir. Kotiledon ve petiol eksplantlarında ilk kallus oluşumu aynı anda görülmüştür. Kök ekplantındaki kallus başlangıcı eksplantlar besin ortamına aktarıldıktan 20 gün sonra gözlemlenmeye başlamıştır. Kök eksplantı fazla genişleme göstermeden gelişimini sürdürmüştür. Kallus oluşumunun başlamasıyla birlikte kotiledon ve petiol eksplantları genişleyerek yaklaşık 2-3 katı kadar hacimsel bir gelişme göstermiştir. Kök eksplantı kotiledon ve petiol eksplantına göre daha yavaş bir büyüme ve kallus gelişimi göstermiştir.

Gürarlan çeşidinde ise kök, kotiledon ve petiol eksplant tipleri kallus teşvik besin ortamlarına aktarıldıktan bir hafta sonra ilk kallus oluşumları gözlemlenmiştir. Gerçekleştirilen ilk gözlemde 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamında tüm eksplant tiplerinde kallus başlangıcı olduğu görülmüştür. 2.26 μM 2,4-D ve 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamlarında kök eksplant tipinde kallus başlangıcı gözlemlenmezken kotiledon ve petiol eksplant tiplerinde kallus başlangıcı meydana gelmiştir. Ortamlardan 9.05 μM 2,4-D ve 18.10 μM 2,4-D içeren besin ortamlarında ise kallus başlangıcı gözlemlenmemiştir. İkinci gözlem eksplant tipleri besin ortamlarına alındıktan 14 gün sonra gerçekleştirilmiştir. İlk gözlemde 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamında kallus oluşturmayan kök eksplant tipi ikinci gözlemde kallus oluşturmıştır. Besin ortamlarından 4.52 μM 2,4-D ve 9.05 μM 2,4-D içeren besin ortamlarında ikinci gözlemde de kök eksplant tipinde kallus başlangıcı meydana gelmemiştir. Kontrol grubu ve 18.10 μM 2,4-D içeren besin ortamında ise hiçbir eksplant tipinde kallus başlangıcı gözlemlenmemiştir.

İki farklı genotip göz önüne alındığında Gürarlan çeşidi, Çiftçi çeşidine göre yaklaşık 5 gün daha önce kallus başlangıcı göstermiştir. Her iki genotip içinde kontrol ve 18.10 μM 2,4-D içeren besin ortamlarındaki tüm eksplant tiplerinde kallus oluşumu meydana gelmemiştir.

4.3.1 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde farklı eksplant tiplerinde kallus oluşumu üzerine etkileri

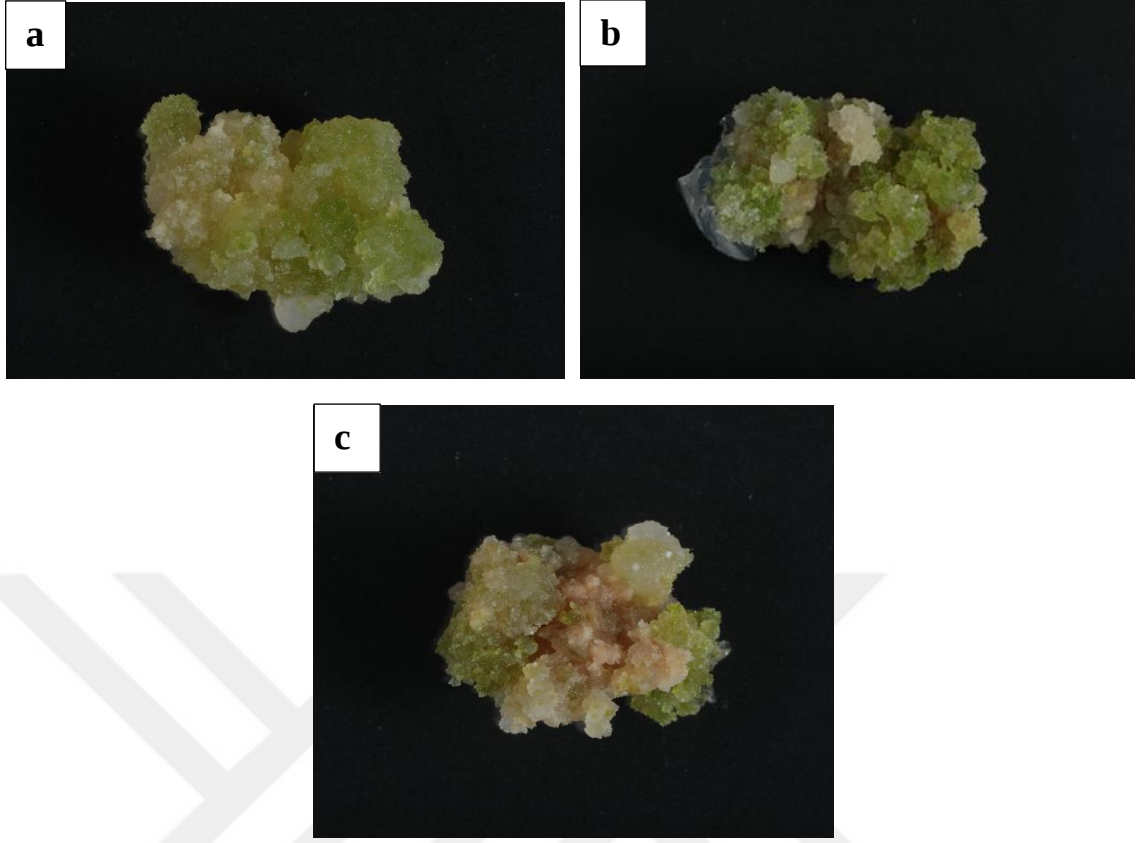
Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren MS besi ortamlarında Çiftçi çeşidinde farklı eksplant (kotiledon, kök, petiol) tiplerinden elde edilen kallus oluşturma oranına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.4'de özetlenmiştir. Elde edilen varyans analiz sonuçlarına göre varyasyon kaynaklarından eksplant, besin ortamı ve eksplant*besin ortamı interaksiyonlarının kallus oluşturma oranı üzerine etkisi istatistiki olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Çiftçi çeşidinde farklı eksplant tipleri ve besin ortamlarına ait yüzde kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkilerine ait ortalama değerleri ve Tukey Testi ise Çizelge 4.5' de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde kök, kotiledon ve petiol eksplant tiplerinde kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Kaynaklar	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Eksplant (A)	2	14702.78	7351.39	48.7086**
Besin Ortamı (B)	5	109494.4	21898.89	145.0969**
A * B	10	31313.89	3131.389	20.7479**
Hata	54	8150	150.93	
Genel	71			
Değişim Katsayısı (%)		23.90		

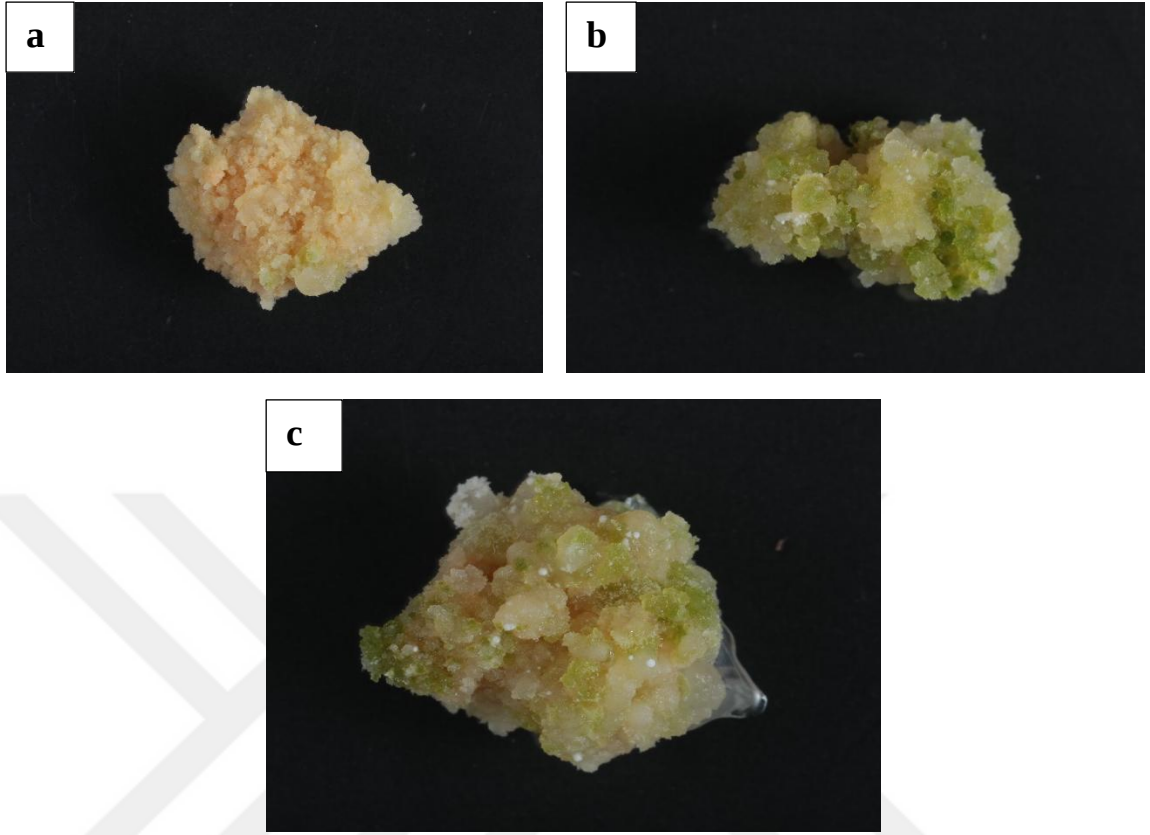
**0.01 düzeyinde önemli

Kallus oluşum etkinliği eksplant kaynağı, besin ortamı bileşeni, sıcaklık ve büyüme koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Chaudhry vd. 2014). Eksplant tipi somatik embriyogenesiz ile kallus indüklenmesinde büyük bir etkiye sahiptir (Li Yang vd. 2010).



Şekil 4.4 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinin farklı eksplant tiplerinin 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamındaki kallus oluşumu (a;Kotiledon b;Kök, c; Petiol)

Farklı 2,4-D konsantrasyonları ve eksplant tipleri dikkate alındığında, kallus oluşturan eksplant oranı %0.0-100.0 arasında değişmiştir. En yüksek kallus oluşturma oranı kotiledon için 1.13 μM ve 2.26 μM 2,4-D; kök için 1.13 μM 2,4-D, petiol için ise 4.52 μM ve 9.05 μM içeren besin ortamında saptanmıştır. Ancak 2,4-D konsantrasyonu 18.10 μM ye çıkarıldığında eksplantların hepsinde kallus gelişiminin tamamen negatif etkilendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca kök eksplantında da benzer olarak 2,4-D düzeyi 4.52 μM ve üzerine çıkıldığında kallus oluşumunun engellendiği görülmüştür. Tariq vd. (2020) *Citrillus colocynthis* L. bitkisinin *in vitro* koşullar altında mikroçoğaltımı üzerine çalışmışlardır. Eksplant tipi olarak yaprak ve bitki nodlarını kullanmışlar ve kallus teşvik ortamlarında farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve KIN kullanmışlardır. Kallus oluşumu açısından en iyi sonuç 4.52 μM 2,4-D+4.65 μM KIN içeren besin ortamından elde ettiklerini ve 2,4-D konsantrasyonundaki artışın kallus oluşumunda keskin bir azalma gösterdiğini rapor etmişlerdir.



Şekil 4.5 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinin farklı eksplant tiplerinin 2.26 μ M 2,4-D içeren besin ortamındaki kallus oluşumu (a;Kotiledon b;Kök, c; Petiol)

Eksplant tipleri kendi aralarında incelendiğinde tüm besin ortamlarında eksplant tipleri ortalamaları arasında fark istatistiki olarak önemli bulunmuş olup, ortalama kallus oluşturma oranı %31.25-62.92 arasında değişmiştir. En yüksek kallus oluşturma oranı petiol eksplant tipinden (%62.92), en düşük ise (% 31.25) kök eksplant tipinden elde edilmiştir. Kotiledon ve petiol eksplant tiplerinin kallus oluşturma oranı bakımından tüm besin ortamları dikkate alındığında istatistiki olarak aynı grupta yer aldığı görülmektedir. Kök eksplant tipinin kallus oluşturma yeteneği morfogenetik olarak, kotiledon ve petiol eksplant tiplerinden daha düşük olduğu, ayrıca önemli sekonder metabolitlerin birikimi bakımından kök organının geride kaldığı bilinmektedir. Singh vd. (2015) *Centella asiatica* L. bitkisi üzerine yaptıkları çalışmada yaprak ve kök eksplant tiplerini kullanmışlar ve her iki eksplant tipinde de sekonder metabolit üretimi gerçekleşmesine rağmen yaprak eksplant tipinden elde edilen sekonder metabolit

oranının kök eksplant tipinden elde edilen sekonder metabolit oranına göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren besin ortamları tüm eksplant tipleri için kalus oluşturan eksplant oranı bakımından incelendiğinde, kalus oluşturan eksplant % 0.0-96.7 arasında değiştiği görülmüştür. En yüksek kalus oluşumu (%96.7), 0.25 μ M 2,4-D içeren besin ortamında, en düşük ise (% 0.0) kontrol ve 18.10 μ M 2,4-D içeren besin ortamında görülmüştür. Das vd. (2018) *Brucea mollis* Wall. bitkisinde yürüttükleri çalışmada 3 farklı eksplant tipi (yaprak, nod, internod) kullanmışlar ve farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicisi (2,4-D, BAP, NAA) kullanarak çeşitli besin ortamı kombinasyonları belirlemişlerdir. Kontrol ortamındaki hiçbir eksplant tipinde kalus oluşumu gözlemlenemediklerini bildirmişlerdir.

Tüm eksplant tiplerinde besin ortamına en düşük doz olan 1.13 μ M 2,4-D eklendiğinde çok çarpıcı biçimde kalus oluşumunun başladığı, eksplantların büyümeye başladığı saptanmış ve 2,4-D'nin tüm eksplant tiplerinin kalus rejenerasyonu bakımından uyardığı düşünülmektedir. Dennis Thomas ve Maseena (2006) *Cadiospermum hilicacabum* bitkisinde 2,4-D 'nin farklı konsantrasyonlarını (2.26-40.68 μ M) kullanarak belirledikleri besin ortamlarının kalus oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. En yüksek kalus oluşumunun 22.62 μ M 2,4-D içeren besin ortamından elde ettiklerini bildirmişlerdir. Valizadeh ve Tabar (2009) *Bunium persicum* bitkisinde farklı konsantrasyonlarda kullandığı büyüme düzenleyicilerle (2,4-D, NAA, KIN) belirlediği besin ortamlarının hipokotil eksplant tipi üzerine etkilerini incelemişlerdir. En yüksek kalus oluşum oranını 4.52 μ M 2,4-D içeren besin ortamından elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

4.52 μ M 2,4-D ve daha yüksek konsantrasyonlarda tüm eksplant tipleri ortalamalarında kalus oluşumunun olumsuz etkilendiği 18.10 μ M 2,4-D konsantrasyonuna çıkıldığında tüm eksplant tiplerinde kalus oluşumunun durduğu gözlemlenmiştir. Belli bir dozdan sonra 2,4-D'nin toksik etki ettiği ya da hücre yapısında bozulmalara ya da oksin biyosentez dengesini bozduğu sebebiyle kalus oluşumunun negatif etkilendiği düşünülmektedir. Elde edilen bulgular literatürle karşılaştırıldığında kaydedilen

sonuçlara benzer olarak; Fletcher vd. (2011) yürüttükleri çalışmada *Manihot esculenta* Crantz. bitkisine farklı 2,4-D (36.2 μ M, 54.24 μ M, 67.8 μ M) konsantrasyonları ve farklı eksplant tiplerinin (yaprak, petiol, koltuk altı meristemi) kallus teşvikine etkilerini incelemişlerdir. En yüksek kallus oluşum oranını, en düşük konsantrasyonda 2,4-D içeren besin ortamından elde ettiklerini bildirmişlerdir. 36.2 μ M 2,4-D içeren besin ortamında tüm eksplant tiplerini kallus oluşturduğunu, 67.8 μ M 2,4-D içeren besin ortamında ise sadece yaprak eksplant tipinin kallus oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4.5 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde kök, kotiledon ve petiolde kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkilerine ilişkin Tukey Testi

Besin Ortamları (μ M)	Eksplant Tipleri			
	Kotiledon	Kök	Petiol	Ort.
Kontrol	0.0b	0.0b	0.0b	0.0
1.13	100.0a	100.0a	90.0a	96.7
2.26	100.0a	87.5a	87.5a	91.7
4.52	90.0a	0.0b	100.0a	63.3
9.05	70.0a	0.0b	100.0a	56.7
18.10	0.0b	0.0b	0.0b	0.0
Ortalama	60.00	31.25	62.92	

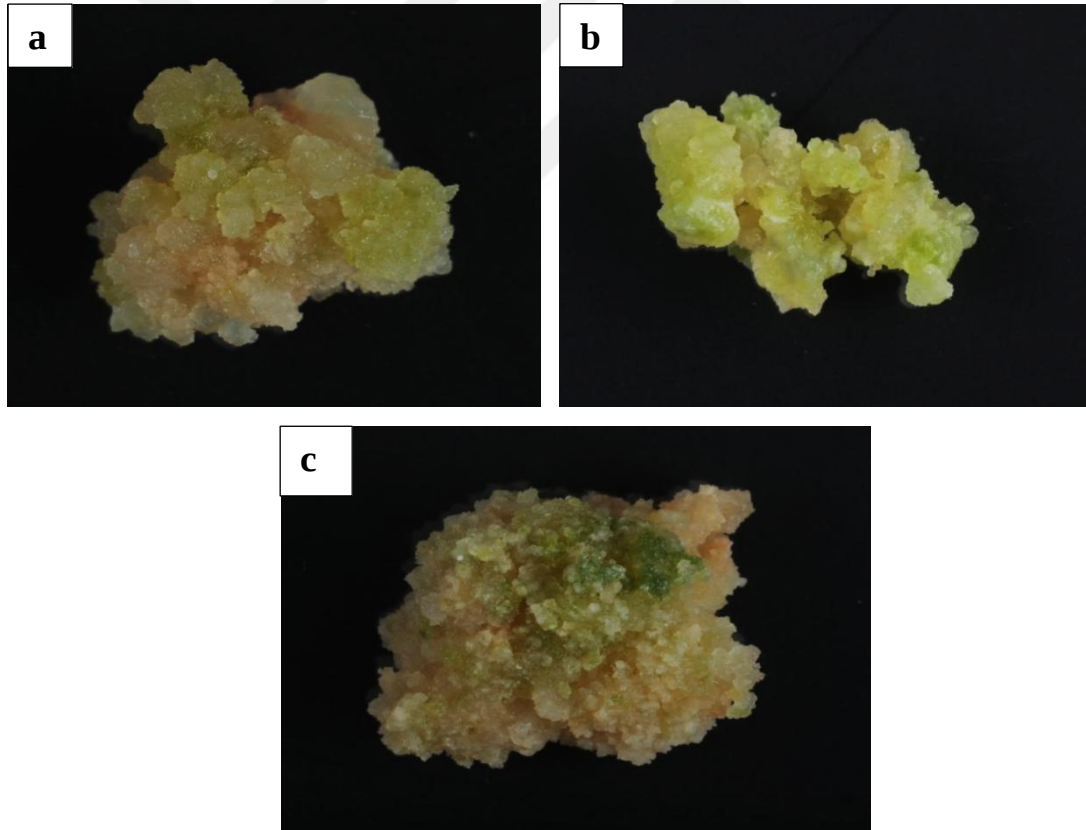
4.3.2 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Gürarşan çeşidinde farklı eksplant tiplerinde kallus oluşumu üzerine etkileri

Farklı 2,4-D konsantrasyonları kullanılarak oluşturulan besin ortamlarında kotiledon, kök ve petiol eksplant tiplerinde elde edilen kallus oluşturma oranına ilişkin varyans analiz tablosu Çizelge 4.6'da verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre varyasyon kaynaklarından eksplant, besin ortamı ve eksplant*besin ortamı interaksyonu 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.6 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Gürarslan çeşidinde kök, kotiledon ve petiol eksplant tiplerinde kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Kaynaklar	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Eksplant (A)	2	12036.11	6018.055	35.0377**
Besin Ortamı (B)	5	112173.6	22434.72	130.6173**
A * B	10	23180.56	2318.056	13.496**
Hata	54	9275	171.76	
Genel	71			
Değişim Katsayısı (%)		27.19		

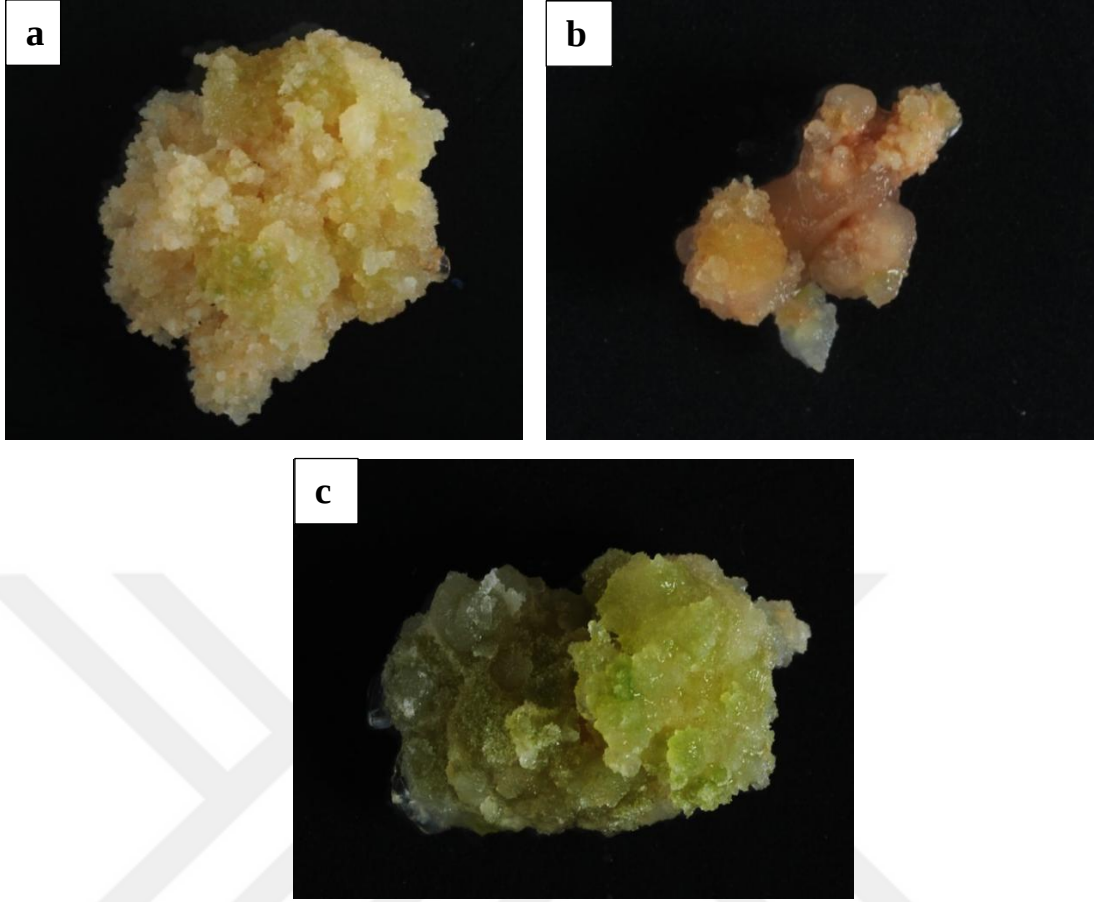
**0.01 düzeyinde önemli



Şekil 4.6 Gürarslan çeşidi çemen bitkisinin farklı eksplant tiplerinin 1.13 μ M 2,4-D içeren besin ortamındaki kallus oluşumu (a;Kök b;Kotiledon, c; Petiol)

Çizelge 4.7'ye göre eksplant*besin ortamı interaksyonu incelendiğinde kotiledon eksplant tipinde kallus oluşturan eksplant oranı %0.0-95 arasında değişirken, kök ve petiol eksplant tiplerinde %0.0-100 arasında değişmiştir. En yüksek yüzde kallus oluşturma oranı kotiledon eksplant tipi için; %95 değeri ile 1.13 μ M 2,4-D içeren besin ortamından, kök eksplant tipi için; %100 değeri ile 2.26 μ M 2,4-D içeren besin ortamından, petiol eksplant tipi için ise %100 değeri ile 1.13, 2.26 ve 9.05 μ M 2,4-D içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Kök eksplant tipinde sadece 1.13 μ M ve 2.26 μ M 2,4-D içeren besin ortamlarında kallus oluşumu meydana gelmiştir. Bütün eksplant tipleri için ise kontrol ve 18.10 μ M 2,4-D içeren besin ortamlarında kallus oluşumu gözlemlenmemiştir.

Eksplant tipleri ortalama değerleri incelendiğinde tüm besin ortamlarında eksplant tipleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. En yüksek sonuç %64.17 ile petiol eksplant tipinden gözlemlenirken, bu oranı %47.92 ile kotiledon, %32.5 ile kök eksplant tipi takip etmiştir.



Şekil 4.7 Gümrüslan çeşidi çemen bitkisinin farklı eksplant tiplerinin 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamındaki kallus oluşumu (a;Kotidon b;Kök, c; Petiol)

Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren besin ortamlarının genel ortalamaları kendi aralarında irdelendiğinde ise en yüksek kallus oluşturma oranı %96.67 ile 1.13 μM ve 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Bu oranları %49.17 ile 9.05 μM 2,4-D içeren besin ortamı ile %46.67 ile 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamı takip etmiş ve istatistiki olarak aynı grup içerisinde yer almışlardır. Benzer olarak gerçekleştirilen bir çalışmada Phua vd. (2016) *Clinacanthus nutans* bitkisinde farklı konsantrasyonlarda 2,4-D (0-45.2 μM) içeren besin ortamlarının genç ve yaşlı yaprak eksplant tipleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Genç yapraklar eksplant tipi olarak kullanıldığında en iyi kallus oluşumunu 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde ederlerken, yaşlı yapraklar eksplant tipi olarak kullanıldığında 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde etmişlerdir. 2,4-D konsantrasyonu 9.05 μM üzerine çıkmaya başladığında kallus oluşumunda yavaşlamanın başladığını ve 18.10 μM üzerine

çıkıldığında ise kallus oluşumunun meydana gelmediğini ve kontrol grubunda da kallus oluşmadığını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.7 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Gürarlan çeşidinde kök, kotiledon ve petiolde kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkilerine ilişkin Tukey Testi

Besin Ortamları (μM)	Eksplant Tipleri			
	Kotiledon	Kök	Petiol	Ort.
Kontrol	0.0d	0.0d	0.0d	0.0
1.13	95.0a	95.0a	100.0a	96.67
2.26	90.0a	100.0a	100.0a	96.67
4.52	55.0bc	0.0d	85.0ab	46.67
9.05	47.5c	0.0d	100.0a	49.17
18.10	0.0d	0.0d	0.0d	0.0
Ortalama	47.92	32.5	64.17	

4.4 Kallus Ağırlığı

4.4.1. Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde farklı ekplant tiplerinde 30. günde kallus ağırlığı üzerine etkileri

Eksplant tipi, besin ortamları, bitki büyüme düzenleyicilerindeki farklılıklar, elde edilen kallusların ağırlığında oldukça önemli bir etkiye sahiptir (Burdak vd. 2020). Yapılan varyans analizi sonucunda Çiftçi çeşidi için 30.gün kallus ağırlığına ilişkin elde edilen değerler Çizelge 4.8’ de verilmiştir. Sonuçlara göre varyasyon kaynaklarından eksplant, besin ortamı ve eksplant*besin ortamı interaksyonu $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur.

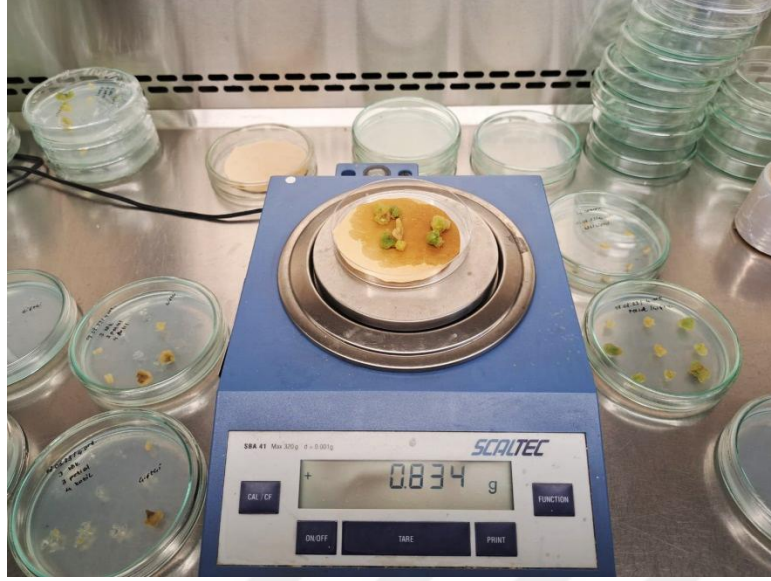
Çizelge 4.8 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde 30. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu

Kaynaklar	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Eksplant (A)	2	38.0992	19.0496	514.7643**
Besin Ortamı (B)	5	46.77909	9.355818	252.8158**
A * B	10	22.88497	2.288497	61.8405**
Hata	54	1.99835	0.03701	
Genel	71			
Değişim Katsayısı (%)		18.81		

**0.01 düzeyinde önemli

Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde kallus eldesi gerçekleştikten 30 gün sonra kallus ağırlık ölçümü gerçekleştirilmiş ve 30. gün kallus ağırlığına ilişkin ortalama değerler ve Tukey testi Çizelge 4.9’ da verilmiştir. Eksplant*besin ortamı interaksyonu değerlendirildiğinde elde edilen kallusların ağırlıkları 0.0-3.536 g arasında değişmektedir. Eksplant tipi olarak kotiledon kullanıldığında 2.26 µM 2,4-D içeren besin ortamında en yüksek kallus ağırlığı elde edilmiştir. Bu değeri kotiledon eksplant tipi 3.235 g ile 1.13 µM 2,4-D içeren besin ortamı takip etmiştir. Kök eksplant tipi kullanıldığında ise 1.13 ve 2.26 µM 2,4-D içeren besin ortamlarında benzer değerler elde edilmiştir. Bütün eksplant tiplerinde kontrol ve 18.10 µM 2,4-D içeren besin ortamlarında kallus oluşmadığı için ağırlık ölçümü yapılmazken, kök eksplant tipinde 4.52 µM ve 9.05 µM 2,4-D içeren besin ortamlarında da kallus oluşmadığı için ağırlık ölçümü yapılmamıştır. Petiol eksplant tipi kullanıldığında en yüksek sonuç 2.076 g değeri ile 4.52 µM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiştir. Ayrıca petiol eksplant tipi, 1.13 µM, 2.26 µM ve 4.52 µM 2,4-D içeren besin ortamları istatistiki olarak aynı grup içerisinde yer almaktadır.

Eksplant tipleri için kallusların 30.gün ağırlık ortalama değerleri kendi içinde değerlendirmeye alındığında aralarındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. En yüksek 30.gün kallus ağırlığı ortalama değeri 1.893 g ile kotiledon eksplant tipinden elde edilirken, petiol eksplant tipi 1.062 g değeri ile kotiledon eksplant tipini takip etmiştir. En düşük 30.gün kallus ağırlık ortalama değeri ise 0.112 g değeri ile kök eksplant tipinden elde edilmiştir.



Şekil 4.8 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde kallus ağırlığının ölçülmesi

Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren besin ortamları kendi aralarında incelendiğinde en yüksek sonuç 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilirken 1.13 μM , 2.26 μM ve 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamları istatistiki olarak aynı grup içerisinde yer almaktadır. En yüksek sonuç elde edilen 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamından ölçülen 30.gün kallus ağırlığı ortalama değeri 1.885 g olarak kaydedilmiştir. Bu değeri 1.797 g ile 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamı ve 1.663 g ile 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamı takip etmiştir.

Çizelge 4.9 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde 30. gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi

Besin Ortamları (µM)	Eksplant Tipleri			
	Kotiledon	Kök	Petiol	Ort.
Kontrol	0.0e	0.0e	0.0e	0.0
1.13	3.235ab	0.320de	1.837c	1.797
2.26	3.536a	0.353de	1.765c	1.885
4.52	2.912b	0.0e	2.076c	1.663
9.05	1.674c	0.0e	0.696d	0.790
18.10	0.0e	0.0e	0.0e	0.0
Ortalama	1.893	0.112	1.062	

4.4.2 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde farklı eksplant tiplerinde 60. günde kallus ağırlığı üzerine etkileri

Çizelge 4.10' da Çiftçi çeşidinde 60. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu verilmiştir. Yapılan istatistik analizi sonucunda eksplant, besin ortamı ve eksplant*besin ortamı interaksiyonu $p < 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.10 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde 60. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu

Kaynaklar	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Eksplant (A)	2	43.1135	215.567	410.863**
Besin Ortamı (B)	5	54.55189	10.91038	207.9474**
A * B	10	25.74638	2.574638	49.0716**
Hata	54	2.8332	0.05247	
Genel	71			
Değişim Katsayısı (%)		20.70		

**0.01 düzeyinde önemli

Çiftçi çeşidine ait 60. gün kallus ağırlığı ortalama değerleri (Çizelge 4.11) incelendiğinde besin ortamları ve eksplant tipleri arasında genel olarak farklılıklar gözlenmektedir. Eksplant*besin ortamı interaksyonu değerlendirildiğinde en yüksek sonuç 3.661 g değeri ile kotiledon eksplant tipinin kullanıldığı 2.26 μ M 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiş ve bu değeri sırasıyla 3.462 g ile 1.13 μ M 2,4-D içeren besin ortamı ve 3.135 g değeri ile 4.52 μ M 2,4-D içeren besin ortamı takip etmiştir. Ayrıca bu değerler istatistiki olarak aynı grup içerisinde yer almaktadır. Kök eksplant tipi kullanıldığında 1.13 μ M 2,4-D ve 2.26 μ M 2,4-D besin ortamları sırasıyla 0.358 g ve 0.386 g değerleri ile aynı istatistiki grup içerisinde yer alırken kontrol, 4.52 μ M 2,4-D, 9.05 μ M 2,4-D ve 18.10 μ M 2,4-D içeren besin ortamlarından kallus ağırlığı değerleri elde edilememiştir. Petiol eksplant tipi kullanıldığında en yüksek sonuç 4.52 μ M 2,4-D içeren besin ortamından elde edilirken 1.13 μ M 2,4-D, 2.26 μ M 2,4-D ve 4.52 μ M 2,4-D içeren besin ortamları aynı istatiki grup içerisinde yer almaktadır.

Kullanılan farklı eksplant tiplerinden elde edilen 60.gün kallus ağırlık ortalama değerleri aralarındaki fark önemli bulunmuştur. Eksplant tipi ortalama değerleri göz önüne alındığında en yüksek sonuç 2.015 g ile kotiledon eksplant tipinden elde edilmiştir. Bu değeri ise 1.18 g ile petiol eksplant tipi takip etmiş ve en düşük kallus ağırlığı ortalama değeri ise 0.123 g ile kök eksplant tipinden elde edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda kullanılan 2,4-D içeren besin ortamlarından elde edilen 60.gün kallus ağırlığı değerleri irdelendiğinde en yüksek sonucun 1.983 g ile 2.26 μ M 2,4-D içeren besin ortamından elde edildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca 1.978 g değeri ile 1.13 μ M 2,4-D içeren besin ortamı ve 1.820 g değeri ile 4.52 μ M 2,4-D içeren besin ortamı en yüksek değeri takip ederken, bu değerler aynı istatistiki grup içerisinde yer almaktadır.

Çizelge 4.11 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde 60. gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi

Besin Ortamları (µM)	Eksplant Tipleri			
	Kotiledon	Kök	Petiol	Ort.
Kontrol	0.0d	0.0d	0.0d	0.0
1.13	3.462a	0.358cd	2.113b	1.978
2.26	3.661a	0.386cd	1.902b	1.983
4.52	3.135a	0.0d	2.325b	1.820
9.05	1.833b	0.0d	0.741c	0.858
18.10	0.0d	0.0d	0.0d	0.0
Ortalama	2.015	0.123	1.18	

4.4.3 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Çiftçi çeşidinde farklı eksplant tiplerinde 90. Günde kallus ağırlığı üzerine etkileri

Çiftçi çeşidinde 90. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu Çizelge 4.12’ de verilmiştir. Varyasyon kaynaklarından eksplant, besin ortamı ve eksplant*besin ortamı interaksyonu istatistiki olarak $p < 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.12 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde 90. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu

Kaynaklar	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Eksplant (A)	2	49.35992	24.67996	430.5033**
Besin Ortamı (B)	5	63.44325	12.68865	221.3337**
A * B	10	29.34313	2.934313	51.1845**
Hata	54	3.0957	0.05733	
Genel	71			
Değişim Katsayısı (%)		20.09		

**0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.13' deki eksplant*besin ortamı interaksiyonu değerlendirildiğinde kotiledon eksplant tipi kullanıldığında en yüksek sonuç 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamından 3.851 g değeri ile elde edilirken, bu değeri 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamı 3.753 g değeri ve 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamı 3.348 g değeri takip etmiştir. Ayrıca kotiledon eksplant tipinin kullanıldığı bu 3 farklı ortam aynı istatistiki grup içerisinde yer almaktadır. Kök eksplant tipi kullanıldığından en yüksek sonuç 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiştir. Petiol eksplant tipi kullanıldığında en yüksek ağırlık ölçümü 2.512 g ile 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamından meydana gelmiştir. Aynı zamanda 1.13 μM 2,4-D ve 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamı ile aynı istatistiki grup içerisinde yer alırken kotiledon eksplant tipinin kullanıldığı ve 9.05 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilen 90.gün kallus ağırlığı değeride bu istatistiki grup içerisinde yer almıştır.

Eksplant tipleri kendi aralarında değerlendirmeye alındığında tüm besin ortamlarında eksplant tipleri 90.gün kallus ağırlık ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. En yüksek 90.gün kallus ağırlığı kotiledon eksplant tipinden 2.155 g olarak kaydedilmiştir. Bu değeri 1.285 g değeri ile petiol ve 0.134 g değeri ile kök eksplant tipi takip etmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren besin ortamlarının 90.gün kallus ağırlık değerleri incelendiğinde 2.151 g ile 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamından en yüksek değer elde edilirken 2.26 μM ve 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamları bu değeri takip etmiş ve istatistiki olarak aynı grupta yer almıştır.

Çizelge 4.13 Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde 90. gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi

Besin Ortamları (µM)	Eksplant Tipleri			
	Kotiledon	Kök	Petiol	Ort.
Kontrol	0d	0d	0d	0
1.13	3.753a	0.378cd	2.322b	2.151
2.26	3.851a	0.423cd	2.101b	2.125
4.52	3.348a	0d	2.512b	1.954
9.05	1.979b	0d	0.775c	0.918
18.10	0d	0d	0d	0
Ortalama	2.155	0.134	1.285	

4.4.4 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Gürarlan çeşidinde farklı eksplant tiplerinde 30. günde kallus ağırlığı üzerine etkileri

Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren MS besi ortamlarında Gürarlan çeşidinde farklı eksplant (kotiledon, kök, petiol) tiplerinden elde edilen 30.gün kallus ağırlığına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.14’de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre eksplant, besin ortamı ve eksplant*besin ortamı interaksionu $p<0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Gürarlan çeşidinde farklı eksplant tipleri ve besin ortamlarına ait 30.gün kallus ağırlığı üzerine etkilerine ait ortalama değerleri ve Tukey Testi ise Çizelge 4.15’ de verilmiştir.

Çizelge 4.14 Gürarlan çeşidi çemen bitkisinde 30. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu

Kaynaklar	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Eksplant (A)	2	27.42496	13.71248	123.8452**
Besin Ortamı (B)	5	26.37804	5.275608	47.647**
A * B	10	18.91587	1.891587	17.084**
Hata	54	5.9790	0.1107	
Genel	71			
Değişim Katsayısı (%)		42.73		

**0.01 düzeyinde önemli

Gürarslan çeşidinde 30.gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler incelendiğinde eksplant*besin ortamı interaksyonu; kotiledon eksplant tipi için en yüksek sonuç 1.366 g değeri ile 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiştir. En yüksek sonucu sırasıyla 4.52 μM 2,4-D, 1.13 μM 2,4-D ve 9.05 μM 2,4-D içeren besin ortamları takip ederken, 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamı ve 9.05 μM 2,4-D içeren besin ortamı aynı istatistiki grup içerisinde yer almıştır. Kök eksplant tipi kullanıldığında 1.13 μM 2,4-D ve 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamları sırasıyla 0.381 g ve 0.353 g değeri ile aynı istatistiki grup içerisinde yer almıştır. Eksplant tipi olarak petiol kullanıldığında ise en yüksek sonuç 3.187 g değeri ile 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiştir. Bu değeri 2.835 g değeri 4.52 μM 2,4-D, 2.266 g değeri ile 2.26 μM 2,4-D ve 1.342 g değeri ile 9.05 μM 2,4-D içeren besin ortamları takip etmiştir. Bütün eksplant tipleri için kontrol ve 18.10 μM 2,4-D içeren besin ortamlarında kallus oluşumu meydana gelmediği için en düşük istatistiki grupta yer alırken, kök eksplant tipi 4.52 μM 2,4-D ve 9.05 μM 2,4-D içeren besin ortamlarında da kallus oluşumu meydana gelmediği için en düşük istatistiki grup içerisinde yer almıştır.

Eksplant tipleri kendi aralarında incelendiğinde tüm besin ortamlarında eksplant tipleri 30.gün kallus ağırlığı ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Petiol eksplant tipi 1.605 g değeri ile en yüksek sonucu verirken, kotiledon eksplant tipi 0.609 g değeri ile ikinci sırada yer almıştır. En düşük sonuç ise 0.122 g değeri ile kök eksplant tipinden elde edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren besin ortamları için 30.gün kallus ağırlık ortalama değerleri irdelendiğinde 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamı 1.427 g değeriyle en yüksek sonucu verirken 2.26 μM 2,4-D ve 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamlarıyla aynı istatistiki grup içerisinde yer almaktadır.

Çizelge 4.15 Gürarşlan çeşidi çemen bitkisinde 30. gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi

Besin Ortamları (µM)	Eksplant Tipleri			
	Kotiledon	Kök	Petiol	Ort.
Kontrol	0e	0e	0e	0
1.13	0.712cde	0.381de	3.187a	1.427
2.26	1.366c	0.353de	2.266b	1.328
4.52	0.948cd	0e	2.835ab	1.27
9.05	0.588cde	0e	1.342c	0.643
18.10	0e	0e	0e	0
Ortalama	0.609	0.122	1.605	

4.4.5 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Gürarşlan çeşidinde farklı eksplant tiplerinde 60. günde kallus ağırlığı üzerine etkileri

Gürarşlan çeşidine ait 60.gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu Çizelge 4.16’ da verilmiştir. Varyasyon kaynaklarından eksplant, besin ortamı ve eksplant*besin ortamı interaksyonu $p<0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.16 Gürarşlan çeşidi çemen bitkisinde 60. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu

Kaynaklar	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Eksplant (A)	2	34.77424	17.38712	148.0049**
Besin Ortamı (B)	5	34.94216	6.988433	59.4878**
A * B	10	23.27479	2.327479	19.8123**
Hata	54	6.343739	0.11748	
Genel	71			
Değişim Katsayısı (%)		38.63		

**0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.17’de Gürarşlan çeşidine ilişkin 60.gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi mevcuttur. Eksplant*besin ortamı interaksyonu incelendiğinde kotiledon eksplant tipi kullanıldığında en yüksek sonuç 1.472 g değeri ile 2.26 µM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiştir. Bu değeri 1.072 g değeri 4.52 µM 2,4-D, 0.986 değeri

ile 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamı takip etmiştir. Ayrıca 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamı ile 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamı aynı istatistiki grup içerisinde yer almaktadır. Kök eksplant tipi kullanıldığında en yüksek değer 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiştir. Petiol eksplant tipi kullanıldığında ise en yüksek sonuç 3.692 g değeri ile 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilirken bu değeri 3.164 g değeri ile 4.52 μM 2,4-D, 2.502 g değeri ile 2.26 μM 2,4-D ve 1.56 g değeri ile 9.05 μM 2,4-D içeren besin ortamları takip etmiştir.

Eksplant tipleri kendi aralarında incelendiğinde tüm besin ortamlarında eksplant tipleri 60.gün kallus ağırlığı ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuş olup değerler 0.152 g ile 1.819 g arasında değişmiştir. En yüksek sonuç petiol eksplant tipinde elde edilirken en düşük sonuç kök eksplant tipinden elde edilmiştir.

Farklı besin ortamlarının 60.gün kallus ağırlığına ait genel ortalama değerler göz önüne alındığında en yüksek sonuç 1.727 g değeri ile 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiştir. Bu değeri 2.26 μM 2,4-D ve 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamları takip etmiştir. Ayrıca üç besin ortamında aynı istatistiki grup içerisinde yer almaktadır.

Çizelge 4.17 Gürarlan çeşidi çemen bitkisinde 60. gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi

Besin Ortamları (μM)	Eksplant Tipleri			
	Kotiledon	Kök	Petiol	Ort.
Kontrol	0f	0f	0f	0
1.13	0.986cde	0.503ef	3.692a	1.727
2.26	1.472cd	0.410ef	2.502b	1.461
4.52	1.072cde	0f	3.164ab	1.412
9.05	0.608def	0f	1.56c	0.723
18.10	0f	0f	0f	0
Ortalama	0.689	0.152	1.819	

4.4.6 Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının Gürarслан çeşidinde farklı eksplant tiplerinde 90. günde kallus ağırlığı üzerine etkileri

Yapılan varyans analizi sonucunda Gürarслан çeşidi için 90.gün kallus ağırlığına ilişkin elde edilen değerler Çizelge 4.18’ de verilmiştir. Sonuçlara göre varyasyon kaynaklarından eksplant, besin ortamı ve eksplant*besin ortamı interaksyonu $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.18 Gürarслан çeşidi çemen bitkisinde 90. gün kallus ağırlığına ait varyans analiz tablosu

Kaynaklar	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Eksplant (A)	2	46.25149	23.12574	182.1419**
Besin Ortamı (B)	5	45.19912	9.039823	71.199**
A * B	10	32.74082	3.274082	25.7872**
Hata	54	6.85614	0.12697	
Genel	71			
Değişim Katsayısı (%)		35.96		

**0.01 düzeyinde önemli

Gürarслан çeşidi 90.gün kallus ağırlığına ait ortalama değerleri ve Tukey testi Çizelge 4.19’ da verilmiştir. Eksplant*besin ortamı interaksyonu ele alındığında kotiledon eksplant tipi kullanıldığında 1.641 g değeri ile en yüksek sonuç 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiş ve petiol eksplant tipi kullanıldığında 9.05 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilen sonuç ile aynı istatistiki grup içerisinde yer almıştır. Kotiledon eksplant tipi 1.13 μM 2,4-D ve 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamlarından sırasıyla 1.047 g ve 1.101 g değerleri elde edilmiş ve bu değerlerde aynı istatistiki grup içerisinde yer almıştır. Eksplant tipi olarak kök kullanıldığında en yüksek sonuç 0.560 g değeri ile 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilirken 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamı 0.418 g değeri ile onu takip etmiştir. Ayrıca kök eksplant tipinin 1.13 μM 2,4-D ve 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamı ile kotiledon eksplant tipinin 9.05 μM 2,4-D içeren besin ortamı aynı istatistiki grup içerisine dahil olmuştur. En yüksek sonuç 4.499 g değeri ile 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamında petiol eksplant tipinden meydana gelmiştir. Bu değeri 4.52 μM 2,4-D ve 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamları takip etmiş ve bu besin ortamları aynı istatistiki grup içerisinde yer almıştır.

Eksplant tipleri kendi aralarında incelendiğinde tüm besin ortamlarında eksplant tipleri 90.gün kallus ağırlığı ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Petiol eksplant tipi 2.075 g değeri ile en yüksek sonucu meydana getirirken bu değeri 0.734 g değeri ile kotiledon eksplant tipi takip etmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren besin ortamları 90.gün ortalama ağırlık değerleri irdelendiğinde en yüksek sonuç 2.035 g değeri ile 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiştir. Bu değeri 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamı ile 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamı takip etmiştir.

Çizelge 4.19 Gürarlan çeşidi çemen bitkisinde 90. gün kallus ağırlığına ait ortalama değerler ve Tukey testi

Besin Ortamları (μM)	Eksplant Tipleri			
	Kotiledon	Kök	Petiol	Ort.
Kontrol	0.0e	0.0e	0.0e	0.0
1.13	1.047cd	0.560de	4.499a	2.035
2.26	1.641c	0.418de	2.788b	1.616
4.52	1.101cd	0.0e	3.447b	1.516
9.05	0.616de	0.0e	1.717c	0.778
18.10	0.0e	0.0e	0.0e	0.0
Ortalama	0.734	0.163	2.075	

4.5 Sürgün Rejenerasyonu

Aasim vd. (2009), yaptıkları çalışmada *in vitro* koşullar altında farklı TDZ ve IBA konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Eksplant olarak apikal meristem ve kotiledon yapraklarını kullanmışlardır. Apikal meristemlerin sürgün rejenerasyonundaki potansiyelinin kotiledon yapraklara göre daha fazla olduğunu saptamışlardır. Bitki büyüme düzenleyicilerin konsantrasyonlarına bakılmaksızın belirlenen bütün ortamlarda sürgün rejenerasyonu gözlemlenirken, en iyi sonucun sadece TDZ içeren ortamda elde edildiğini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışma referans alınmış ve farklı eksplant tiplerinden elde edilen kallusların rejenerasyon elde edilmesi için TDZ' nin farklı oranları kullanılarak rejenerasyon için üç farklı (2.27,

4.54, 6.81 μM) besin ortamı belirlenmiştir. Besin ortamlarına aktarılan kalluslar seçilirken en sağlıklı görünen, sulu ve gevşek formda olanlar tercih edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen kalluslar ortamlara aktarıldıktan sonra her hafta gözlemlenmiş ve ilk dört hafta sonunda bütün eksplant tipleri (kök, kotiledon, petiol) koyu yeşil bir renk almıştır. Kalluslarda enine büyüme meydana gelmiştir. Ancak hiçbir eksplant tipinde herhangi bir rejenerasyon meydana gelmediği gözlemlenmiştir.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çemen bitkisi içerdiği sekonder metabolitler nedeniyle ilaç sanayinde oldukça büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca baharat bitkisi olarak kullanılmasının yanı sıra *Fabacea* familyasına ait olan bir bitki olduğu için hem ekim nöbetinde hem de yeşil gübre bitkisi olarak önemli bir yere sahiptir. Biyoteknolojik yöntemlerle, bileşikler iklim ve toprak koşullarından etkilenmeden, kontaminasyondan uzak, pestisit ve herbisit kullanılmadan, sabit kaliteye ve verime sahip devamlı olarak elde edilebilmektedir. Bu yöntemler içinde olan bitki hücre ve doku kültürleri, steril koşullar altında, yapay bir besi ortamında, tam bitkiden veya bitkinin çeşitli kısımlarından elde edilen kültürlerdir. Sekonder metabolitlerin in vitro koşullar altında elde edilmesinin bazı avantajları vardır. *In vivo* koşullarda yetiştirilen bitkiler çevreden kaynaklanan, kalite özelliklerini olumsuz etkileyecek bazı faktörlerle karşı karşıya gelebilir. Çeşitli çalışmalar *in vitro* koşullar altında yetiştirilen bitkilerde sekonder metabolit içeriğinin arazi koşullarında yetiştirilen bitkilere göre daha fazla olabileceğini göstermiştir (Babich vd. 2020). Yürütülen bu çalışmada da farklı 2,4-D konsantrasyonları kullanılarak sekonder metabolit üretimine uygun kallus üretimi oluşumu amaçlanmıştır.

Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde kallus oluşumu göz önüne alındığında en yüksek sonuç %62.92 ile petiol eksplant tipinden elde edilmiştir. Besin ortamlarında ise en yüksek sonuç %96.7 değeri ile 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre 2,4-D'nin farklı dozlarının kallus oluşumu üzerine önemli ölçüde etkili olduğu söylenebilir. Gürarlan çeşidi çemen bitkisinde kallus oluşumuna bakıldığında yine en yüksek kallus oluşumu %64.17 ile petiol eksplant tipinden elde edilmiştir. İki çeşit içinde kallus oluşum oranı petiol eksplant tipinde en yüksek sonucu vermiştir. Besin ortamları için ise 1.13 μM ve 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamları kallus oluşum oranını teşvik etmiştir. Baklouti vd. (2022) *Phoenix dactlifera* L. bitkisinde farklı konsantrasyonlarda (0, 4.52, 22.6, 45.2, 90.4, 180.8 μM) 2,4-D' nin kallus oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamının en yüksek sonuç verdiğini bildirmişlerdir. 0 μM , 45.2 μM , 90.4 μM ve 180.8 μM 2,4-D içeren besin ortamlarında kallus oluşumu gözlemlenemediklerini rapor etmişlerdir. Rahayu vd. (2016), *Centella asiatica* bitkisinde farklı oksin

konsantrasyonlarının kallus indüklenmesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Büyüme düzenleyicisi olarak Dicamba, Pikloram ve 2,4-D (9.05 μ M, 18.10 μ M ve 27.12 μ M) kullanmışlardır. Petiol ve yaprak eksplant tiplerini besin ortamlarına aktarmışlar ve en yüksek kallus oluşumunun 2,4-D (18.10 μ M) ve Dicamba (18.10 μ M) içeren besin ortamlarından elde ettiklerini bildirmişlerdir. Rezaeian (2011), farklı 2,4-D konsantrasyonlarının çemen bitkisinin ürettiği sekonder metabolit olan diosgenin üretimine etkilerini incelemiştir. Çalışmada eksplant tipi olarak yaprak, sürgün apikal meristemi ve kök apikal meristemi kullanmıştır. En yüksek kallus gelişiminin 4.52 μ M 2,4-D içeren besin ortamından sürgün apikal meristeminden meydana geldiğini gözlemlemiştir. Diosgenin miktarının ise yaprak eksplant tipinde kallus gelişiminin 45.gününde en yüksek sonuç verdiğini bildirmiştir. Elaleem vd. (2014) çemen bitkisinde çeşitli konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicilerinin hipokotil ve kotiledon eksplant tiplerinde kallus indüklenmesine etkilerini incelemişlerdir. En yüksek kallus oluşum oranının 9.05 μ M 2,4-D içeren besin ortamından ve kotiledon eksplant tipinden elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yıldız (2012) *Citrus grandis* L., Osbeck (pummelo) bitkisinde kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu için eksplant olarak yaprak eksplant tipini kullanmıştır. Bitkinin tohumlarından elde edilen bitkinin yaprak eksplantından kallus eldesinin gerçekleştirilebilmesi için farklı konsantrasyonlarda oksin hormonu (NAA, 2,4-D, BA, IAA, IBA, KIN) kullanılarak besin ortamları belirlenmiştir. Kallus oluşumu açısından en iyi sonucun 2,4-D içeren besin ortamından elde edildiğini bildirmiştir. Keshvari vd. (2018) *Stevia rebaudiana* (Bert.) bitkisi üzerine yürüttükleri çalışmada iki farklı temel besiyer (MS ve B5) ve iki farklı eksplant tipinin (yaprak ve internod) kallus indüklenmesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Ayrıca temel besiyerlerini çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerle (2,4-D, BAP, NAA) zenginleştirmişlerdir. En iyi kallus indüklenmesi MS+1.13 μ M 2,4-D+4.44 μ M BAP içeren besin ortamında yaprak eksplant tipinde gözlemlemiştir. Jamshidi vd. (2014) yaptıkları çalışmada çemen bitkisinin yaprak eksplantlarını NAA, 2,4-D ve KIN içeren besin ortamlarına almışlar ve diosgenin seviyesindeki artışı gözlemlemiştir. En yüksek kallus oluşumunu 2,4-D içeren besin ortamından sağlamışlardır. Nordine vd. (2014) yürüttükleri çalışmada kekik bitkisinin yaprak ve nod (toprak üstü aksam başladıktan sonraki 3. boğum) eksplant tiplerini kullanmışlardır. Kallus teşvik ortamı olarak farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve KIN içeren besin ortamlarına eksplant tiplerini aktarmışlar ve en yüksek sonucu 4.52

μM 2,4-D+ 2.32 μM KIN içeren besin ortamından ve nod eksplant tipinden elde ettiklerini bildirmişlerdir. Gerçekleştirilmiş olan bu çalışmada literatürdeki çalışmalarla benzerlikler göstermektedir. Ancak Ahmed vd. (2000) çemen bitkisinde farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin kallus oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. En iyi kallus oluşumu gözlenen ortam 9.05 μM 2,4-D+2.32 μM KIN içeren besin ortamından ve kök eksplant tipinden elde ettiklerini bildirmişlerdir. Kök eksplant tipinden en iyi sonucu elde etmelerinin sebebi 2,4-D' ye ek olarak KIN büyüme düzenleyicisi kullanmış olmaları olabilir.

Kallus tipi ve rengi incelendiğinde iki çeşit içinde 1.13 μM 2,4-D içeren besin ortamı daha sağlıklı, canlı, sulu ve gevşek yapılı kallus oluşumu sağlamıştır. Besin ortamlarındaki 2,4-D miktarındaki artış kallus tipinde ve rengine olumsuz bir etki oluşturduğu, meydana gelen kallusların kuru, kahverengi ve sert dokulu bir hal aldığı gözlemlenmiştir. Benzer bir çalışmada; Mungole vd. (2009) *Ipomoea obuscra* L. bitkisinde farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyiciler (2,4-D, BAP, NAA) içeren besin ortamlarından elde edilen kallusların morfolojik yapısı üzerine etkilerini incelemişlerdir. 2,4-D (3.6 μM) ve KIN (3.68 μM) kombinasyonunun olduğu besin ortamından beyaz ve gevşek kalluslar elde ederlerken BAP (0.88 μM) ve NAA (1.08 μM) kombinasyonunun olduğu besin ortamından yeşil, sert ve kompakt yapıda kalluslar elde etmişlerdir. Nurokhman vd. (2019) *Gynura procumbens* bitkisinde çeşitli kombinasyonlarda büyüme düzenleyicileri (2,4-D, BAP, IAA, NAA) ve eksplant tiplerinin (petiol, yaprak) kallus morfolojisi üzerine etkilerini incelemişlerdir. 2,4-D ve BAP içeren besin ortamlarından yaprak eksplant tipinde beyaz, gevşek ve yeşil, kompakt kalluslar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren besin ortamlarından elde edilen kallusların sarımsı beyaz, kompakt yapılı olduklarını rapor etmişlerdir. Abd Elaleem vd. (2014) yürüttükleri çalışmada elde edilen kallusların renk ve tiplerini gözlemlemişler ve farklı konsantrasyonlardaki besin ortamları (2,4-D, NAA) ve kullanılan eksplant tiplerinin oluşan kallusların tipleri ve renkleri üzerindeki etkilerinin önemli olduğunu bildirmişlerdir. Kotiledon ve hipokotil eksplant tiplerini kullanmışlar ve kotiledon eksplant tipinden elde ettikleri kalluslar kompakt yapılı iken hipokotil eksplant tipinden elde ettikleri kallusların yumuşak olduğunu gözlemlemişlerdir.

Kallus ağırlığı, belirlenmiş olan besin ortamlarına ve farklı eksplant tiplerine göre farklılıklar göstermiştir. Çiftçi çeşidi çemen bitkisinde en yüksek sonuç eksplant tiplerinden kotildon eksplant tipinden elde edilmiştir. Besin ortamlarının genel ortalamalarına bakıldığında 1.13 μM , 2.26 μM ve 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamlarından en yüksek kallus ağırlıkları elde edilmiştir. Kallusların ağırlık ölçümleri 30., 60. ve 90.günlerde aynı kalluslar kullanılarak yapılmış ve ağırlıklarda devamlı bir artış söz konusu olmuştur. Gürarlan çeşidi çemen bitkisinde ise petiol eksplant tipi en yüksek sonucu verirken, besin ortamlarında ise 1.13 μM , 2.26 μM ve 4.52 μM 2,4-D içeren besin ortamlarından en yüksek kallus ağırlıkları elde edilmiştir. 2,4-D'nin hiç kullanılmadığı kontrol grubu ve 18.10 μM kullanıldığı ortamlarda kallus oluşumu meydana gelmemiştir. Ancak 1.13 μM , 2.26 μM ve 4.52 μM kullanıldığı ortamlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallus ağırlığı açısından en iyi ortamlar 1.13 μM ve 2.26 μM 2,4-D içeren besin ortamları olarak belirlenirken iki farklı çeşit içinde kök eksplant tipinde benzer oranda kallus oluşumu ve kallus ağırlığı meydana gelmiştir. İki çeşit içinde kök eksplant tipinin iyi sonuç vermediği söylenebilir. Ayrıca elde edilen kalluslardan sürgün veya kök rejenerasyonu meydana gelmemiştir. Yorgancılar ve Erkoyuncu (2011) yürüttükleri çalışmada *Astragalus schizopterus* bitkisinde rejenerasyon gerçekleştirebilmek için farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile çeşitli besin ortamı kombinasyonları belirlemişlerdir. Ayrıca yaprak ve petiol olmak üzere iki farklı eksplant tipi kullanmışlardır. Kallus ağırlıklarından en yüksek sonucu ortam olarak farklı miktarlarda 2,4-D içeren besin ortamlarından elde ederlerken, eksplant tipi olarak ise yaprak eksplant tipinde petiol eksplant tipine göre daha yüksek elde ettiklerini bildirmişlerdir. Shoja vd. (2010) *Tanacetum balsamita* L. bitkisinde farklı eksplant tipleri ve farklı besin ortamlarının kallus oluşum kapasitesi, kallus yaş ve kuru ağırlığı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Petiol, yaprak ve bitki nodu eksplant tiplerini kullanmışlardır. BAP (0.88, 2.22 ve 4.44 μM) ve 2,4-D (4.52 ve 9.05 μM) kullanarak farklı kombinasyonlarda besin ortamları belirlemişler ve en yüksek kallus oluşumunu 4.52 μM 2,4-D+4.44 μM BAP içeren besin ortamından elde etmişlerdir. Eksplant tipleri değerlendirmeye alındığında ise en yüksek kallus ağırlığını petiol eksplant tipinden elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Burdak vd. (2020) yürüttükleri çalışmada çemende sürgün ucu eksplant tipini kullanarak elde ettikleri kallusların yaş ağırlık ölçümlerini gerçekleştirmişlerdir. Farklı temel besin ortamlarının kallus ağırlıkları üzerindeki

etkileri arasında önemli farklılıklar olduğunu rapor etmişlerdir. En yüksek kallus ağırlığı eldesini 2189,95 mg ile MS medium+3.33 μ M BAP+3.39 μ M 2,4-D içeren besin ortamından elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca kullandıkları çemen genotipleri arasında da kallus ağırlıkları açısından farklılıklar gözlemlemişlerdir. Rezaeian (2011), çemen bitkisi üzerine yürüttüğü çalışmada farklı 2,4-D konsantrasyonları ve farklı eksplant tiplerinin 15, 30, 45 ve 60.günlerde elde edilen kallusların yaş ve kuru ağırlıklarını almıştır. En yüksek ağırlık değerini 2.26 μ M ve 1 μ M 4.52 2,4-D içeren besin ortamından sürgün apikal meristem eksplant tipinden elde ettiğini bildirmiştir. 6.79 μ M 2,4-D içeren besin ortamından elde edilen kallus ağırlığının ise 2.26 μ M ve 4.52 μ M 2,4-D içeren besin ortamlarından elde edilen besin ortamlarına göre daha az olduğunu rapor etmiştir. Amini vd. (2023), safran bitkisinde yaptıkları çalışmada eksplant tipi olarak korm kullanmışlar ve en yüksek kallus ağırlığını 4.52 μ M 2,4-D+0.92 μ M KIN içeren besin ortamından elde etmişlerdir.

Sonuç olarak farklı eksplant tiplerinin ve farklı besin ortamlarının, kallus oluşumuna, kallus tipine, kallus rengine ve kallus ağırlığına etkileri olmuştur. Yürütülen bu çalışmada elde edilen parametreler çemen bitkisinde ileride yürütülecek çalışmalara referans olarak farklı protokollerin oluşturulmasında kaynak niteliğinde olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aasim, M., Khawar, H.M., Sancak, C., ve Özcan, S. 2009. In vitro shoot regeneration of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 3(2); 135-138.
- Abd Elaleem, G., Ahmed, M.M. and Saeed, A.E. 2014. Study of the in vitro callus induction *Trigonella foenum-graecum* L. from cotyledons and hypocotyls explants supplemented with various plant hormones. International Journal of Current Microbiology and Applied Science, Vol. 3, 486-493.
- Acar, H. 1997. Arpada doku kültürü ve bitki ıslahında yararlanma olanakları (Seminer). Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Açıkgöz, M.A., 2017. *Achillea gypsicola* Türünde Kallus Kültürü ile Sekonder Metabolit Üretim Potansiyelinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ordu Üniversitesi . Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 198, Ordu.
- Afshari, E., Ranjbar, G.A., Kazemitaber, S.K., Riasat, M. and Kazemi Poshtmasari, H. 2011. Callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27 (51); 160-147.
- Ahmed, F.A., Ghanem, S.A., Reda, A.A. and Solaiman, M. 2000. Effects of some growth regulators and subcultures on callus proliferation and trigonelline content of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)
- Ali Ahmed, A.B., Gouthaman, T., Rao, A.S., Rao, M.V. 2005. Micropropagation of *Phyla nodiflora* (L.) Greene: An important medicinal plant. Iranian Journal of Biotechnology, 3(3); 186-190.
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Inanova S., Asyakina L., ve Prosekov A. 2020. Modern Trend in the In vitro Production and Use of Callus, Suspension Cells and Root Cultures of Medicinal Plants. Molecules, 25, 5805-5823.
- Baydar, H. 2013. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, 466, Bursa.
- Beyzi, E., İlbaş, A.İ., Gürbüz, B. 2010. Çemen (*Trigonella foenum-graecum* L.) ve Genel Özellikleri. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26(4); 316-322.
- Beyzi, E. 2011. Çemen (*Trigonella foenum-graecum* L.)'de Farklı Fosfor Dozlarının Verim ve Bazı Morfolojik Özellikler Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 43, Ankara.

- Bhatti, R., Arif, M., Gaur, A.K., Rao, P.B. 2008. *Rauwolfia serpentina*: Protocol optimization for in vitro propagation. *African Journal of Biotechnology*, 7(23); 4265-4268.
- Bondarian, F., Gholibaygian, m., Torabi, S., Bahreinii M., Omid, M. 2015. Study of Callus İnduction and Regeneration of *Papaver somniferum* L. *International Journal of Current Research*, 7(10); 20955-20957.
- Burdak, A., Tripathi, A.ve Choudhary J.R. 2020. Effect of diffferent media and genotypes on in vitro callus induction in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Indian Research Journal Genetic and Biotechnology*, 12(2); 74-79.
- Cambaz, E. 2022. *Verbascum scamandri* Murb. Türünün Kallus Kültürü ile Sekonder Metabolit Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi. Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 99, Çanakkale.
- Çalışkan, T., Hatipoğlu, R., Kırıcı, S. 2019. Production of plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures under In vitro Conditions. *Turkish jorunal of Agriculture-Food Science and Technology*, 971-980.
- Çamlıca, M. 2022. Sulu ve kuru koşullarda çemen (*Trigonella foenum-graecum* L.) genotiplerinin verim ve bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi. Doktora Tezi. Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 209, Bolu.
- Das, P., Tanti, B., Borthakur S.K. 2018In vitro callus induction and indirect organogenesis of *Brucea mollis* Wall. ex Kurz – A potential medicinal plant of Northeast India. *South African Journal of Botany*, 119, 203-211.
- Dennis Thomas, T., Maseena, E.A. 2006. Callus induction and plant regeneration in *Cardiospermum halicacabum* Linn. an important mdicinal plant. *Scientia horticulture*, 108, 332-336.
- Don Palmer, C., Keller, W.A. 2011. Plant regeneration from petal explants of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 105, 129-134.
- Ekmekci, H. 2013. Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinde in vitro doku kültürü çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 53, Karaman.
- Elnour, E.M., Ali, M.A. and Saeed, A.T. 2015. Effect of different concentrations of auxins and combination with kinetin on callus initiation of *Trigonella foenum-graecum* L. *International Journal of Technical Research and Applications*, Vol. 3, 117-122.
- Fletcher, K.A., Amoaka, N.E., Twumasi, P. 2011. Effect of 2,4-D, explants type and cultivar on the callogenesis expression of cassav (*Manihot esculenta* Crantz.) in Ghana. *African Journal of Biotechnology*, 10(46); 9396-9401.

- Gökçe, Z., Efe, L. 2016. Çemen (*Trigonella foenum-graecum* L.) Bitkisinin Kullanım Alanları ve Tıbbi Önemi. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, TARGİD Özel Sayı, 355-363.
- Irvani, N., Solouki, M., Omid, M., Zare, A. R., Shahnazi, S. 2010. Callus induction and plant regeneration in *Dorema ammoniacum* D., an endangered medicinal plant. Plant Cell and Tissue Organ Culture. 100, 293-299.
- İlgar, B.A. 2019. Çemen Otu (*Trigonella foenum-graecum* L.) Dokularında Cyp450 Gen Anlatımı ve Diosgenin Üretimi Arasındaki İlişkinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 45, İstanbul.
- İpek, A., Kaya, M.D. ve Gürbüz, B. 2008. Çemen (*Trigonella foenum-graecum* L.) ve Kimyon (*Cuminum cyminum* L.) Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Tohum Yaşı ve GA3 Uygulamalarının Etkileri. Tarım Bilimleri Dergisi, 14 (1); 57-61.
- Jamshidi, S., Lahouti, M. and Ganjeali, A. 2014. Assessment of callus growth and bio-production of diosgenin in callus culture of *Trigonella foenum-graecum* L. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Science, Vol. 3, 191-198.
- Keser, M., Gürbüz, İ. 2020. Piyasadan Temin Edilen Bazı Çemen Tohumu Örneklerinin Avrupa Farmakopesi Ölçütleri Açısından Değerlendirilmesi. Lokman Hekim Dergisi, 10(3); 327-335.
- Oncina, R., Botia, J.M., Del Rio, J.A. and Ortuno, A. 2000. Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. Food Chemistry, 70, 489-492.
- Keshvari, T., Najafy, A., Kahrizi, D., Zebarjadi, A. 2018. Callus Induction and Somatic Embryogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni as a Medicinal Plant. Cellular and Molecular Biology, 64(2); 46-49.
- Latifian, E., Arvas. Y.E. ve Kaya, Y. 2018. *Tagetes minuta* bitkisinin mikro üretimi üzerine farklı BAP ve IAA konsantrasyonlarının etkileri. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 1(2); 96-104.
- Li Yang, J., Zhao, B., Seong, E.S., Jo Kim, M., Hee Kang, W., Young Kim, n., Yeon Yu, C., Hao Li, C. 2010. Callus induction and high-efficiency plant regeneration via somatic embryogenesis in *Papaver nudicaule* L., an ornamental medicinal plant. Plant Biotechnology Reports, 4, 261-267.
- Mungole, A., Awati R., Dey, S., Chaturvedi, A., Zanwar, P. 2009. In vitro callus Induction and shoot regeneration in *Ipomea obscura* L.: Potent Indian Medicinal Plant. Indian Journal of Science and Technology, 2(8); 24-26.
- Murch S.J., Choffe, K.L., Victor, J.M.R., Slimmon, T.Y., KrishnaRaj, S., Saxena, P.K. 2000. Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of *St. John's wort*. Plant Cell Reports, 19, 576-581.

- Nordine A., Themcani, C.R., ve El Meskaoui A. 2014. Regeneration of plants through somatic embryogenesis in *Thymus hyemalis* Lange, a potential medicinal and aromatic plant. *In vitro Cellular and Developmental Biology*. 50; 19-25.
- Nour, A.A.M, Magboul, B.I. 1986. Chemical and amino acid composition of fenugreek seeds grown in Sudan. *Food Chemistry*, 22(1); 1-5.
- Nurokhman, A., Faizah, H., Wida Utami, E.S., Manuhara, Y.S. 2019. Effect of Plant Growth Regulator and Explant types on *In vitro* Callus Induction of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. *Research Journal of Biotechnology*. 14(9); 102-107.
- Önlü, Ş. 2019. *Hypericum* türlerinde *in vitro* bitki rejenerasyonu ve sekonder metabolit üretimi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 128, Ankara.
- Özdemir, F.A., Yıldırım, M.U. ve Kahriz, M.P. 2015. *Mentha spicata* subsp. *spicata* hipokotilinden *in vitro* çoklu sürgün rejenerasyonu. *Anadolu Journal of Agricultural Science*, 30, 126-129.
- Özdemir, F.A., Kurşat, M. 2014. BAP ve IBA etkisiyle *Acinos rotundifolius* Pers.'den *In vitro* Bitki Üretimi. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 7(1); 15-18.
- Patel, S.R., Abhishek, D., Patel H.N., Patil, S.S., Patel, S.G. 2023. Development of somaclones through callus culture in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) variety Gujarat Methi-2. *Regume Research-An International Journal*, Vol. 46, 1697-1705.
- Phua, Q.Y., Chin, C.K., Asri, Z.R.M., Lam, D.Y., Subramaniam, S., Chew, B.L. 2016. The Callusgenic Effects of 2,4-D on leaf Explants of Sabah Snake Grass (*Clinacanthus nutans*). *Pakistan Journal of Botany*, 48(2); 561-566.
- Pretto, F.R., Santarem, E.R. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*. 62, 107-113.
- Rahayu, S., Roostika, I., Bermawie, N. 2016. The effect of types and concentrations of auxins on callus induction of *Centella asiatica*. *Nusatara Bioscience*, 8(2); 283-287.
- Raja Naika, H., Krishna, V. 2008. Plant regeneration from callus culture of *Clematis gauriana* Roxb. –A rare medicinal plant. *Turkish of Journal Biology*, Vol. 32, 99-103.
- Rezaeian, S. 2011. Assessment of diosgenin production by *Trigonella foenum-graecum* L. *in vitro* condition. *American Journal of Plant Physiology*, 6(5); 261-268.
- Sağlam Yılmaz, S., Akyıldız, E. 2018. Acı Kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) Bitkisinde Kallus Kültürü Araştırmaları. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 11(2); 15-19.

- Sarıkaya, S., Öner, H. ve Harput, Ü.Ş. 2010. Türkiye Florasında Diyabet Tedavisinde Kullanılan Tıbbi Bitkiler. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 39(4); 317-342.
- Sen, K.M., Nasrin, S., Rahman, S., Jamal, A.H.M. 2014. In vitro callus induction and plantlet regeneration of *Achyranthes aspera* L., a high value medicinal plant. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 4(1); 40-46.
- Shoja A.M., Hassanpouraghdam, M.B., Khosrowshahli M., Movafeghi, A. 2010. Callogenesis Capability and Calli Somaclonal Variation of Costmary (*Tanacetum balsamita* L.). Romanian Biotechnological Letters, 15(2); 5121-5124.
- Singh, J., Sabir, F., Sanghwan, R.S., Narnoliya L.K., Saxena, S., Sanghwan. N.S. 2015. Enhanced secondary metabolite production and pathway gene expression by leaf explants-induced direct root morphotypes are regulated by combination of growth regulators and culture conditions in *Centella asiatica* L. urban. Plant Growth Regulator Factory, 75, 55-66.
- Sönmez, E. 2019. In vitro Koşullarda *Valeriana officinalis* L. Bitkisinin Farklı Eksplantlarına Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 37, Kütahya.
- Tanur Erkoyuncu, M. ve Yorgancılar, M. 2015. Bitki Doku Kültürü ile Sekonder Metabolitlerini Üretimi. Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi, 2(1); 66-76.
- Tariq, A., Afrasiab, H., Farhat, F. 2020. In vitro Micropropagation of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad: an endangered medicinal plant. Advancements in Life Sciences, 8(1); 52-56.
- Tiring, G., Satar, S. ve Özkaya, O. 2020. Sekonder Metabolitler. Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 203-215.
- Topcu, Ş., Çölgeçen, H. 2015. Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 8(2); 09-29.
- Tuncer, B., Günsan, B. 2017. Yabani Ravent (*Rheum ribes* L.)'in Doku Kültürü ile Çoğaltım Olanakları Üzerine Araştırma. Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi, 4(3); 296-301.
- Turgut Kara, N. 2007. *Astragalus chrysochlorus*'da fenilpropanoid metabolik yoluna ilişkin genomik analizler. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 99, İstanbul.
- Ülger, T.G., Yabancı Ayhan, N. 2020. Bitki Sekonder Metabolitlerinin Sağlık Üzerine Fonksiyonel Etkileri. Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 11(3); 384-390.
- Vahedi, M., Kalantari, S., Salami, S.A. 2014. Factors affecting callus induction and organogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Plant Tissue Cult. & Biotech, 24, 1-9.

- Valizadeh, M., Kazemi Tabar S.K. 2009. Investigation of Plant Growth Regulators Effect on Callus Induction and Shoot Regeneration of Bunium persicum (Boiss.) B. Fedtsch. Journal of Agricultural Science and Technology, 11, 481-486.
- Valizadeh, M. 2018. *In vitro* regeneration in medicinal plant fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Journal of Plant Physiology and Breeding, 8(2); 43-51.
- Yaacob, J.S., Taha, R.M., Jaafar, N., Hasni, Z., Elias, H. 2013. Callus induction, plant regeneration and somaclonal variation in *in vitro* and *in vivo* grown White shrimp plant (*Justicia betonica* Linn.). Australian Journal of Crop Science, 7(2); 281-288.
- Yamaner, Ö. 2011. *Hypericum adenotrichum* Spach'un doku kültürü teknikleri ile çoğaltılması ve *in vitro* koşullarda sekonder metabolit değişiminin araştırılması. Doktora Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 137, Aydın.
- Yıldız, B. 2012. Limonotu (*Lippia citriodora* Kunth) Bitkisinde Doku Kültürü Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 51, Çanakkale.