

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
2021-YL-073

**ÇÖREK OTU (*NIGELLA SATIVA* L.) BİTKİSİNDE ANTER
KÜLTÜR TEKNİĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

SEMRA TİRİNK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin UYSAL

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından ZRF-19029 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2021

TEŞEKKÜR

Akademik eğitim sürecimin bir üst noktası olan yüksek lisans tez konumun belirlenmesinde ve bu araştırmanın her aşamasında bilgi, fikir ve önerileriyle yardımlarını ve desteğini esirgemeyen danışman hocam, Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin UYSAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca katkı ve yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Rukiye KILIÇ ve Dr. Öğr. Üyesi Sara YASEMİN'e teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübe ve bilgilerini bizlere aktaran değerli bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmamın başından sonuna kadar her aşamasında birçok fedakarlıklar göstererek desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT	xiii
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ	8
2.1 Çörek Otunda Kromozom Katlaması ile İlgili Bazı Çalışmalar	10
2.2 Çörek Otunda Kallus Oluşumu ile İlgili Bazı Çalışmalar	11
2.3 Anter Kültür Tekniğinin Geliştirilmesine Yönelik Bazı Çalışmalar	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.1.2. Besi Ortamları	21
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1 Anter Verici Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	22
3.2.2 Mikrosporların Gelişme Aşamalarının Belirlenmesi.....	24
3.2.3 Çalışmada Kullanılan MS Besi Ortamının Hazırlanması.....	26
3.2.4 Çörek Otu Çiçek Tomurcuklarının Yüzey Sterilizasyonu.....	27

3.2.5 Anterlerin Kültüre Alınması.....	28
3.3 Verilerin Analizi.....	29
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	30
4.1 Çörek Otu Popülasyonlarının Kallus Uyartımı ve Gelişimi Üzerine Etkiler	34
4.2 Çörek Otu Genotiplerinde Besin Ortamının Kallus Uyartımı ve Gelişimi Üzerine Etkiler	35
5.SONUÇ	39
KAYNAKLAR	41
BİLİMSEL ETİK BEYANI	49
ÖZ GEÇMİŞ	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

(NH₄)₂SO₄	: Amonyum Sülfat
μmol/L	: 1 Litre Başına Mikromol
2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid
ABA	: Absisik Asit
BA	: Benzyladenine
BAP	: Benzil Amino Pürin
CaCl₂.H₂O	: Kalsiyum Klorür
CoCl₂.6H₂O	: Kobalt Klorür
CuSO₄.5H₂O	: Bakır Sülfat
da	: Dekametre
DH	: Double Haploid
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
FeSO₄.7H₂O	: Demir Sülfat Heptahidrat
g	: Gram
g/l	: Gram/Litre
GA	: Gibberellin
GA₃	: Gibberellik Asit
GDH	: Glucose Dehydrogenase
H₃BO₃	: Borik Asit
HCl	: Hydrochloric Acid

IAA	: İndol-3-Asetik Asit
kg	: Kilogram
KH₂PO₄	: Mono Potasyum Fosfat
KI	: Potasyum İyodür
Kin	: Kinetin
KNO₃	: Potasyum Nitrat
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mg.l⁻¹	: Miligram Litre
MgSO₄.7H₂O	: Magnezyum Sülfat
ml	: Mililitre
mm	: Mili Metre
mM	: Milimolar
MnSO₄.H₂O	: Mangan Sülfat
MS	: Murashige ve Skoog Besin Ortamı (1962)
N6	: N6 Besi Ortamı
Na₂-EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
Na₂MoO₄.H₂O	: Sodyum Molibdat
NAA	: Naphthaleneacetic Acid
NH₄NO₃	: Amonyum Nitrat
PDA	: Polydopamine
pH	: Power of Hydrogen
SK1	: SK1 Besi Ortamı

TDZ	: Tirdiazuron
TFC	: Toplam Fenolik Madde
TPC	: Toplam Flavonoid Madde
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
v/v	: Hacimce Yüzde
w/v	: Hacimde Ağırlıkça Yüzde
Zea	: Zeatin
ZnSO₄.7H₂O	: Çinko Sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Türkiye çörek otu tohumu ekim alanı verileri.....	3
Şekil 1.2 Türkiye çörek otu tohumu üretim miktarı verileri	4
Şekil 1.3 Türkiye çörek otu tohumu verimi	4
Şekil 3.1 Tez çalışmasında kullanılan çörek otu çeşit ve popülasyonları	20
Şekil 3.2 Çörek otu tohumu ekimi sonrası saksılar ait sera koşullarında bir görüntü.....	23
Şekil 3.3 Çörek otu bitkilerinin saksılardaki gelişme durumlarına ilişkin bir görüntü	23
Şekil 3.4 Çörek otu bitkisinden çiçek tomucuklarının alınması.....	24
Şekil 3.5 Çörek otu anterlerine asetokarmin uygulamasına ilişkin bir görüntü	25
Şekil 3.6 Çörek otu bitkisinin mikroskop altında tek çekirdekli mikrospor aşamasının belirlenmesine ilişkin bir görüntü	26
Şekil 3.7 MS besi ortamının petrilere aktarım işlemine ilişkin bir görüntü.....	27
Şekil 3.8 Çörek otu çiçek tomurcuklarından anterlerin ayrılma işlemine ilişkin bir görüntü...	28
Şekil 3.9 İklimlendirme odasında kültüre alınan çörek otu anterlerinden bir görüntü.....	28
Şekil 4.1 Çörek otu bitkisinin Çameli çeşidinde anterlerin gelişiminin görünümü	32
Şekil 4.2 Çörek otunda çeşitlere göre kallus oluşum oranlarının dağılımı (%)	34
Şekil 4.3 Çörek otunda besin ortamına göre kallus oluşum oranlarının dağılımı (%)	35
Şekil 4.4 Ankara genotipinde 0,5 mg.l ⁻¹ BAP içeren besi ortamında kallus oluşumuna ilişkin bir görüntü	37
Şekil 4.5 Ankara genotipinde 1,0 mg.l ⁻¹ IAA ve 1,0 mg.l ⁻¹ BAP içeren besi ortamında kallus oluşumuna ilişkin bir görüntü.....	37

Şekil 4.6 Denizli genotipinde 0,5 mg.l ⁻¹ IAA içeren MS besi ortamında kallus oluşumuna ilişkin bir görüntü.	38
---	----



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan MS besi ortamının kimyasal içeriği.....	21
Çizelge 3.2 Anter kültüründe kullanılan 9 farklı BAP ve IAA kombinasyonları	22
Çizelge 4.1 Çalışma kapsamında kültüre alınan anterlerden elde edilen kallus sayıları ve başarı oranlarına ilişkin veriler (%)	30
Çizelge 4.2 Çörek otu anter kültüründe kallus oluşumuna ilişkin varyans analiz tablosu.....	31
Çizelge 4.3 Çörek otunda çeşitlere göre kallus oluşumu (%)	34
Çizelge 4.4 Çörek otunda besin ortamına göre kallus oluşumu (%)	35

ÖZET

ÇÖREK OTU (*Nigella sativa* L.) BİTKİSİNDE ANTER KÜLTÜR TEKNİĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Semra T. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021.

Amaç: Bu araştırmanın amacı; çörek otu bitkisinde anter kültür tekniği kullanılarak haploid bitki üretim potansiyeli araştırmaktır. Ayrıca gelecekte yapılacak bitki ıslah çalışmalarında çörek otu bitkisinin anter kültür çalışmalarında kullanılacak besi ortamları protokollerinin geliştirilmesine ve %100 homozigot bitkilerin elde edilmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem: Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak ülkemizin tek tescilli çeşidi olan Çameli çörek otu çeşidi ile Denizli, Isparta, Samsun ve Ankara illerindeki üreticilerden temin edilen 4 farklı çörek otu popülasyonu kullanılmıştır. Bitki çiçeklenme döneminde tek çekirdekli mikrosporları içeren tomurcuklar toplanmış ve MS besi ortamı ve bu ortama BAP ve/veya IAA ilave edilmiş toplam 10 farklı besi ortamı (kontrol, 0,5, 1,0 ve 2,0 mg.l⁻¹ BAP, 0,5, 1,0 ve 2,0 mg.l⁻¹ IAA, 1,0/1,0, 0,1/2,0 ve 2,0/0,5 mg.l⁻¹ BAP/IAA) kullanılmıştır. Araştırma kapsamında her bir popülasyon ve besi ortamı için 5 petri üzerinden ve her petride 20 anter olacak şekilde anter kültür çalışması yapılmıştır. Toplam her bir besi ortamında 500 adet anter kültüre alınmıştır. Her bir popülasyon için ise toplam 1.000 adet anter üzerinden kültür çalışması yürütülmüştür.

Bulgular: Genel kallus başarı oranının; 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren besi ortamında %1,6, 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 1,0 mg.l⁻¹ IAA içeren besi ortamında %0,6 ve 0,5 mg.l⁻¹ BAP içeren besi ortamında %0,4 olduğu belirlenmiştir. Popülasyonlar düzeyinde en yüksek başarı oranı %1,0 ile Ankara popülasyonundan elde edilmiş olup, bunu %0,2 ile Denizli popülasyonu ve %0,1 ile Isparta

popölasyonu takip etmiştir. Araştırmaya konu popölasyonların ve besi ortamlarının genel başarı oranının ise %0,26 olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: Elde edilen veriler ışığında genel bir değerlendirme yapıldığında; bitki rejenerasyonu sağlanamamış olmasına karşın, düşük oranlarda da olsa kallus oluşumu başarılmıştır.

Anahtar kelimeler: Anter kültür, Çörek otu, Haploid, Kallus, *Nigella sativa*.



ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ANTHER CULTURE TECHNIQUE IN BLACK CUMIN (*Nigella sativa* L.) PLANT

Semra T. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Agricultural Biotechnology Program, Master Thesis, Aydın, 2021.

Objective: The purpose of this research; The aim of this study is to investigate the haploid plant production potential in black cumin using anther culture technique. In addition, it is aimed to contribute to the development of nutrient media protocols to be used in anther culture studies of black cumin and to obtain 100% homozygous plants in future plant breeding studies.

Material and Methods: In this thesis study, Çameli black seed variety, which is the only registered variety of our country, and 4 different black seed populations obtained from producers in Denizli, Isparta, Samsun and Ankara provinces were used as plant material. During the plant flowering period, buds containing late unicellular microspores were collected and MS nutrient medium and a total of 10 different nutrient mediums (control, 0.5, 1.0 and 2.0 mg.l⁻¹ BAP, 0 0.5, 1.0 and 2.0 mg.l⁻¹ IAA, 1.0/1.0, 0.1/2.0 and 2.0/0.5 mg.l⁻¹ BAP/IAA) were used . Within the scope of the research, anther culture studies were carried out on 5 petri dishes and 20 anthers in each petri dish for each population and medium. A total of 500 anthers were cultured in each medium. For each population, a total of 1000 anther culture studies were carried out.

Results: The overall callus success rate; 1.6% in the medium containing 0.5 mg.l⁻¹ IAA, 0.6% and 0.5 mg.l in the medium containing 1.0 mg.l⁻¹ BAP + 1.0 mg.l⁻¹ IAA It was determined that it was 0.4% in the nutrient medium containing -1 BAP. At the population level, the highest success rate was obtained from the Ankara population with 1.0%, followed by the Denizli population with 0.2% and the Isparta population with 0.1%. It has been determined that the overall success rate of the populations and mediums that are the subject of the research is

0.26%.

Conclusion: When a general evaluation is made in the light of the data obtained; Although plant regeneration could not be achieved, callus formation was achieved, albeit at low rates.

Keywords: Anther culture, Black cumin, Callus, Haploid, *Nigella sativa*.



1. GİRİŞ

Çörek otu (*Nigella sativa* L.), tek yıllık ve otsu bir bitkidir. Güney Avrupa-Ön Asya kökenli olan çörek otu, *Ranunculaceae* (Düğünçiçeğigiller) familyasına aittir (Kökdil vd., 2006). Başlangıçta, *Nigella sativa*; *Bunium persicum* olarak ortak bir isimdi ve daha sonra *Carum bulbocastanum* olarak adlandırıldı, şimdi nesli tükenmek üzere olması ve bu türün Hindistan'ın her yerine ulaşamaması nedeniyle, *Carum carvi* bu isimle adlandırılmış daha sonra *Nigella sativa* Portekizli ve Türk tüccarlar tarafından kullanıla gelmiştir (Zohary, 2000).

Çörek otu bitkisinin bilimsel sınıflandırılması:

Alem: Plantae (Bitkiler Alemi)
Bölüm: Magnoliophyta (Kapalı Tohumlular)
Sınıf: Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım: Ranunculales
Familya: Ranunculaceae (Düğün çiçeğigiller)
Cins: *Nigella*
Tür: *Nigella sativa*

Bitki fizyolojik olarak değerlendirildiğinde ise boyu 20-70 cm arasında değişmekte, gövdesi dik olup dalları seyrek. Bitki üzerindeki yapraklar üç parçalı olarak görünmekle birlikte her bitkide ortalama 4-5 dal bulunmaktadır. Çörek otu bitkisinin çiçekleri beyaz, açık mavi renklerde olup uçlarına doğru sarımsı yeşil rengini almaktadır. Tohumlarının rengi siyahtır ve çiçek içerisinde oluşan meyve çoklu kapsül biçiminde görünmektedir. Köşeli olan bu tohumların uzunlukları 2,5-4 mm, genişlikleri 1,5-2 mm, kalınlığı ise 1 mm civarındadır. Kendine özgü kokusu olup acımsı ve lezzetli tanelere sahiptir (İlisulu, 1992; Ceylan, 1996; Baytop, 1999; Baydar, 2016).

Günümüzde dünya üzerinde yaygın olarak Doğu Akdeniz ülkeleri, Güneydoğu Asya, Afrika, Mısır ve Yunanistan gibi ülkelerde tarımı yapılmaktadır. Hindistan önemli çörek otu üreticilerinin başında gelmektedir (İlisulu, 1992; Baydar, 2016). Türkiye florasında 12 tür bulunmaktadır. Bunlar *Nigella orientalis*, *N. oxyptetala*, *N. lancifolia*, *N. latisecta*, *N. segetalis*, *N. arvensis*, *N. stellaris*, *N. sativa*, *N. damascena*, *N. elata*, *N. nigellastrum* ve *N. unguicularis*'dir (Türkiye Bitkileri Veri Servisi [TUBİVES], 2019). Bu türler içerisinde *N.*

sativa ve *N. damascena* ticari olarak yetştiriciliği yapılan türlerdir. Ülkemizde tek tescilli çeşit Çameli çeşididir.

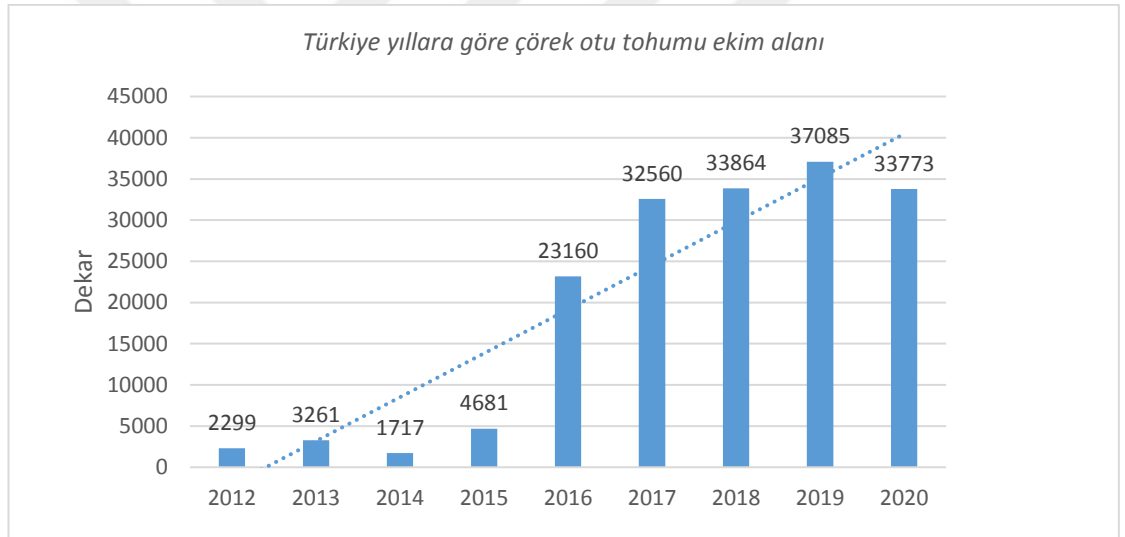
Çörek otunun içeriğinde %31-35,5 oranında sabit yağ, %0,4-0,45 oranında uçucu yağ, %33-34 oranında karbonhidrat, %16-19,9 oranında protein; fosfat, kalsiyum, çinko gibi mineraller; askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin ve folik asit gibi vitaminler bulunmaktadır (El-Tahir ve Bakeet, 2016). Çörek otu uçucu yağını %25-60 oranında meydana getiren timokinon farmakolojik etkisi oldukça güçlü olan bir biyoaktif maddedir. Timokinon maddesi çörek otu uçucu yağının anti-histamin ve antioksidan etkisini artırır ve aynı zamanda ağrı kesici ve iltihap önleyici etkilerini de göstermektedir (Baydar, 2016). Bu madde aynı zamanda bağışıklık sistemine fayda sağladığı gibi bazı ilaçlarda ham madde olarak da kullanılabilir. *N. sativa*, *N. damascena* ve *N. arvensis*'in tohumlarından elde edilen preparatlar insan sağlığını etkileyen; soğuk algınlığı, ateş, astım, bronşit, amenore, iştahsızlık, egzama öksürük, dismenore, sarılık, gaz giderme, idrar söktürücü, çeşitli romatizma ve iltihap hastalıkları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda baharat olarak da gıda amaçlı yaygın olarak kullanılmaktadır (Randhawa ve Alghamdi, 2011). Çörek otu Antik Yunan döneminin meşhur doktoru Dioscorides'in baş ve diş ağrısı tedavilerinden El Biruni'nin yazılı eserlerine, İbn-i Sina'nın üzerine yaptığı çalışmalardan Mısır'ın efsanevî hükümdarı Tutankamun'un kabrine kadar tarihte birçok alanda kullanılmıştır (Barkoudah, 1998). Çörek otu bitkisi yağı ile birlikte, tarihte Afrika'da, Asya'da ve Ortadoğu'da, günümüzde ise Amerika ve Avrupa'da milyonlarca insan tarafından "sağlıklarını desteklemek için" kullanılmaktadır (Riaz vd., 1996).

Çörek otu tohumları uzun yıllardan beri halk hekimliğinde kullanıldığı gibi günümüzde de tedavi edici özelliklerinin yanı sıra yaygın olarak bilinen baharat bitkilerinden biridir (Arslan vd., 2000). Tıbbi açıdan önemi çok olan ve besin değeri yüksek olan bu bitkinin tohumları antioksidan, anti-bakteriyel, anti-inflamatuar ve bağışıklık sistemini kuvvetlendirici gibi birçok farmakolojik etkiye sahiptir. Özellikle son yıllarda kimyasal ilaçların ve antibiyotiklerin sağlık açısından zararlı etkileri anlaşıldıkça alternatif tıba olan ilgi giderek artmaya başlamıştır. Bu kapsamda uzun yıllardır tedavi edici özelliği olduğu bilinen çörek otuna olan ilgi artmış ve artmaya da devam etmektedir.

Bu denli önemli olmasına rağmen çörek otu gerek dünyada gerekse ülkemizde hak ettiği yeri alamamıştır. Bunun en önemli nedenlerinden biri bu bitkinin yeteri kadar bilimsel

araştırmaya konu olmamasıdır. Son yıllarda bu konuya eğilim artsa da ne yazık ki hala arzu edilen seviyeye ulaşamamıştır. Bu yüzden de ülkemizde geliştirilmiş tescilli tek çeşit vardır ve dünyada da çok az sayıdadır. Hem tıbbi anlamda yukarıda bahsedilen faydalarından dolayı hem de pasta ve yemekler de kullanılabilecek baharat özelliğinden dolayı bitki iç ve dış ticaret için önemli bir potansiyele sahiptir. Bu bitki üzerinde yapılacak çalışmalara ivme verilmesi bitkinin tarımsal üretim deseni içerisinde hak ettiği yeri alması bakımından son derece önem arz etmektedir.

Ülkemizde çörek otu ekim alanı 2020 TÜİK verilerine göre 33.773 da'dır (Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK], 2020). 2012-2020 yılları arasında Türkiye çörek otu üretim alanı TÜİK verilerine göre her geçen yıl artış eğilimi göstermiş olup, son yıllarda en çok ekiminin yapıldığı ilk üç ilimiz Uşak (10.750 da), Burdur (9.838 da), Konya (2.334 da)'dır (Şekil 1.1).



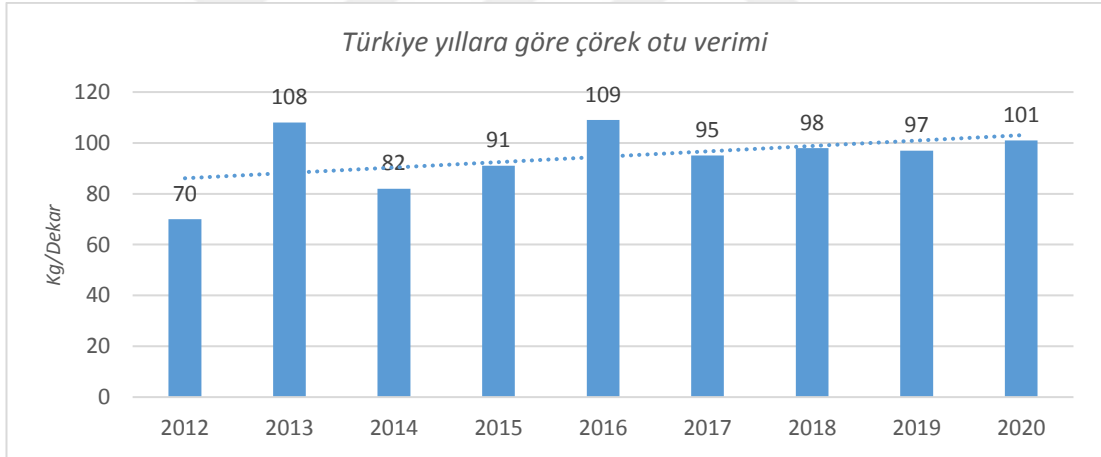
Şekil 1.1 Türkiye çörek otu tohumu ekim alanı (TÜİK, 2020)

Türkiye çörek otu üretimi 2020 yılında toplam 3412 ton olup, 2012-2020 yılları arasında çörek otu üretimi genel olarak artış eğilimi göstermektedir (Şekil 1.2). En fazla üretiminin yapıldığı ilk üç ilimiz Uşak (1.170 ton), Burdur (992 ton) ve Konya (219 ton)'dır (TÜİK, 2020).



Şekil 1.2 Türkiye çörek otu tohumu üretim miktarı verileri (TÜİK, 2020)

Ülkemizde 2012-2020 yılları arasında çörek otu üretiminin verimine bakıldığında ise ortalama 94,55 kg'dır (TÜİK, 2020). Yıllara göre dağılımı ise Şekil 1.3'de verilmiştir.



Şekil 1.3 Türkiye çörek otu tohumu verimi (TÜİK, 2020)

Çörek otunda yapılan araştırmaların her geçen yıl artması sonucu öneminin daha iyi anlaşılmasıyla üretim alanının da arttığı gözlenmektedir. Üretim alanı artarken verimde önemli ölçüde bir artış olmamaktadır. Genel olarak yazlık ekimin yapılması, çörek otu ekiminin yerel ölçeklerde kalması, bitkinin su ihtiyacının karşılanamaması, hasat zamanının gecikmesi, bölgelere göre uygun ekimin yapılmaması ve bitki ıslah yöntemleriyle yeni çeşitlerin

geliştirilmemesi gibi nedenlerle ekim alanlarının artmasına karşılık bitkinin verimi istenilen düzeylere ulaşamamaktadır (Özel vd., 2009; Akgören, 2011; Baytöre, 2011)

Geçmişten günümüze bitkilerde ıslah süresini kısaltma çalışmalarında biyoteknolojik yöntemlerin önemi gittikçe artmaktadır. Biyoteknolojik yöntemlerin bitki ıslahına faydaları: elde edilmek istenen genotiplerin kısa bir sürede çoğaltma işleminin yapılabilmesi, cinsler ve türler arası melezlemelerdeki klasik yöntemlerle yapılamayan gen transferlerinin yapılabilmesi, homozigot hatların daha kısa sürede elde edilebilmesi, bitkideki karakterleri özel olarak ifade eden genlerin izole edilerek bir başka organizmaya aktarılması olarak sayılabilmektedir (Kurt, 2004; Hatipoğlu, 2015).

Klasik ıslah yöntemlerine ek olarak son zamanlarda geliştirilmiş potansiyel kaynak hücre ve doku kültürüdür. Geleneksel ıslah yöntemiyle arzu edilen genetik karakterlerin bir diğer generasyona aktarılması aşamasında, istenilen homozigotluk seviyesine ulaşılması bitkinin genetik yapısına bağlı olarak birkaç generasyon kendilenmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir. Teorik olarak bir bitkinin %95 oranında homozigotluk seviyesine ulaşabilmesi 5-6 yılı bulmakta olup uygulamada ise bu süre çok daha uzun sürebilmektedir. Bitkinin ıslahı için elzem olan bu aşamalar uzun süreler alabilmekte ve hem emek hem de maliyeti artırabilmektedir. Aynı zamanda geleneksel yöntemlerde %100'lük homozigotluk seviyesinin yakalanması mümkün olmamaktadır. Hücre doku kültürü yöntemlerinden olan: anter kültür, polen kültürü, yumurta ve yumurtalık kültürleri teknikleri ile %100'lük homozigotluk seviyesi 1 yıl gibi kısa bir sürede yakalanabilmektedir.

İçerisinde tek hücreli yapıdaki olgunlaşmamış polen tanelerini ihitiva eden anterler in vitro koşullar altında kültüre alınması ve bunlardan direk veya indirek olarak haploid bitkilerin elde edilmesi olayına anter kültür adı verilmektedir (Gambino vd., 2007). Double haploidler, haploid kromozom sayısı gametaofit düzeyden iki katına çıkartılmış bitkilerdir. Homoziot hatların elde edilmesi için ilk olarak haploid bitkiler elde edilerek daha sonra bu bitkilerden kromozom katlama yöntemi ile diploit bitkilerin geliştirilebileceğinin tespiti bitki ıslahının evriminde önemli rol oynamıştır (Niizeki ve Oono, 1968). Yeni nesil ıslah çalışmalarında haploid bitki üretimi gittikçe daha da önemli hale gelmekte ve bu yöntemler biyoteknolojik araç olarak kullanım alanı yaygınlaşmaktadır. Tarımsal açıdan önemli olan bitkilerin ıslah çalışmalarında biyoteknolojik yöntemlerle protokol geliştirilmesi haploid bitki üretiminde önemlidir. Kontrollü bir ortamda haploid ve double haploid bitkiler elde etmek için en yaygın

olarak kullanılan yöntem anter veya izole edilmiş mikrospor kültürüdür (Germanà, 2011). Tabiatla haploid bitkilerin kendiliğinden oluşması çok düşük bir ihtimaldir.

Çörek otu bitkisinin birçok türü ve mutantları (*Chloroxantha* mutant) bahçelerde süs bitkileri olarak yetiştirilmektedir (Subrahmanyam, 2009; El-Mahrouk vd., 2015). Melez üreme programları için homozigot popülasyonların üreme yöntemiyle üretilmesi, tüm bitkiler için zaman alıcı hemde maliyetli olmaktadır. Alternatif olarak elde edilen haploid bitki üretim teknolojisi ile tamamen homozigot hatlar elde edilebilir. Tek kromozom setine sahip bitkilere verilen isim olan haploid, bitki ıslahının süresini kısaltmak için çok iyi bir yöntemdir. Haploidler doğada kendiliğinden veya çeşitli indüksiyon tekniklerinin bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Erkek gametofitler (androgenesis) ve dişi gametofitler (gynogenesis) gibi haploid üretimi için in vitro kültür teknikleri bildirilmiştir. İn vitro androgenesis yoluyla haploid bitkiler üreten 200'den fazla bitki türü vardır (Małuszyński vd., 2003). Döllenenmemiş yumurtalık kültürünün in vitro gynogenesis yoluyla haploid bitkilerin ilk üretimi arpada (*Hordeum vulgare*) bildirilmiştir (San Noeum, 1976). Haploid bitkilerin in vitro eldesi anter kültür tekniğine alternatif olarak bazı bitkilere uygulanmıştır ve anter kültürünün başarılı olmadığı durumlarda kullanılabileceği tespit edilmiştir (Yang ve Zhou, 1982). Haploid bitkiler, haploid veya double haploid bitki üretimine yol açan yumurta hücresinin veya diğer dişi gametofit hücrelerinin partenogenik gelişimi ile elde edilebilir (Forster vd., 2007). Dahası, diploid bitkiler, spontan diploidizasyon ile üretilebilen haploid veya double haploid bitkilerinin yanı sıra somatik hücrelerden de kaynaklanabilir, böylece rejenerantların poliploid seviyesinin tanımlanması çok önemlidir. Buda melezlerdeki double haploid bitkilerinin morfolojik özellikleri gibi çeşitli değerlendirme yöntemleri ile yapılabilir (Murigneux vd., 1993; Rakha vd., 2012).

Bitkilerdeki rejenerasyon yeteneği hem dişi hemde erkek gametlerde olabilirken, birçok sayıda haploid ve double haploid bitki elde edilmesi için erkek gametlerin mikrosporları ya da polenlerinin kullanılması daha kolay ve pratiktir (Morgana vd., 2004). Hücre doku kültürü yöntemlerinden olan anter kültür tekniği ile biyoteknolojik yöntemlerin kullanılarak haploid bitki üretimi günümüzde kullanılan önemli bir tekniktir. Anter kültür tekniği kullanılarak bitkinin normal gelişim sürecini takiben polen iki çekirdekli yapıya dönüşmeden, gametik gelişme aşamasının tek çekirdekli döneminden somatik gelişme aşamasına geçişin sağlanması ve böylece “androgenesis” veya “mikrospor androgenesis” oluşumu gerçekleşmektedir (Duran, 2007).

Geleneksel bitki ıslah yöntemleriyle birçok kültür bitkisinde olduğu gibi çörek otunun ıslahı da, uzun süreç gerektirmekte ve istenilen özelliklerin kazanılması için ihtiyaç duyulan varyabilitenin kazandırılmasında yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda kullanılan biyoteknolojik ıslah yöntemleri bu süreci kısaltarak ıslahta karşılaşılan sorunlara daha pratik çözümler sunmaktadır.

Bu araştırma kapsamında ülkemizin farklı illerinden (Ankara, Samsun, Denizli, Isparta) temin edilen çörek otu popülasyonları ve Çameli çörek otu çeşidi kullanılarak anter kültür tekniği geliştirilmeye çalışılmış ve double-haploid bitkilerin eldesi amaçlanmıştır. BAP ve IAA ile takviye edilmiş 10 farklı MS besi ortamında haploid bitki üretim potansiyelleri araştırılarak, gelecekteki bitki ıslah çalışmalarında çörek otu bitkisinde kullanılacak besi ortamlarının protokolllerinin geliştirilmesine ve %100 homozigot bitkilerin elde edilmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

İlk in vitro haploid bitki üretimi anter kültür tekniği kullanılarak Guha ve Maheswary tarafından 1964 yılında gerçekleştirilmiştir (Guha ve Maheswary, 1964). Anter kültür yöntemi kullanılarak birçok araştırmacıda çeşitli ıslah çalışmaları gerçekleştirmiştir (Kalloo, 1986). Bu çalışmaları kolza, patlıcan, arpa türlerinde (Veilleux, 1994) ve daha sonraları ise double haploid bitki üretimi karpuz ve lahanagillerde çeşitler geliştirilerek devam etmiştir (Cao vd., 1995).

Haploidler, *Datura stramonium*'daki haploid bitkilerin ilk keşfinden bu yana genetikçilerin, bitki embriyologlarının, fizyologların ve yetiştiricilerin büyük ilgisini çekmiştir (Blakeslee vd., 1922). Başlangıçta haploid bitkiler özel bir biyolojik fenomen olarak kabul edildi. Haploidlerin oluşumu, 1960'ların başlarına kadar 39 cins ve 14 aileye ait 71 angiosperm türünde bildirilmiştir (Kimber ve Riley, 1963). Bununla birlikte, haploidlerin araştırılması ve kullanımı daha sonralarda daha az çalışmayla sınırlı kalmıştır. Son kırk yılda, haploid bitki elde edebilmek için çok sayıda in vitro kültür tekniği geliştirilmiştir. Örneğin, anter kültür tekniği ile, 34 ailenin 88 cinsine ait 247 türünde haploidler elde edilmiştir (Maheshwari vd., 1983). Ek olarak, kromozom eliminasyonu (bulbosum tekniği) ve döllenmemiş yumurtalıkların in vitro kültürü de bazı bitki türlerinde haploid bitki üretiminde etkili bir teknik olduğunu kanıtlanmıştır.

Hücre süspansiyon kültürleri artık doğal ürünlerin biyosentezini ve fonksiyonel genomu incelemek için önemli bir model olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, normal olarak yetiştirilen bitki ile kültürlenmiş hücrelerin biyolojik kimliği büyük önem taşısa da, hücre kültürleri (kallus) ve orijinal bitkiler arasındaki metabolik karşılaştırmalar üzerine çok az çalışma bildirilmiştir.

Bitkinin büyümesi ve gelişmesine yardımcı olan bileşikler bitki büyüme düzenleyicilerdir (Zhao vd., 2005). Bitki doku kültüründe bitki büyüme düzenleyiciler eksplantların gelişimi, hücre büyümesi, rejenerasyon, farklılaşma ve metabolitlerin oluşumu üzerine büyük bir etkiye sahiptir (Zhong, 1996; Verma, 2011). Çörek otu bitkisinde ilk çalışmalar bitki büyüme düzenleyiciler üzerinde yapılmış daha sonraları ise haploid bitki eldesi üzerine çeşitli bitki doku kültürü teknikleri denenmiştir. Örneğin El-Mahrouk vd. (2018) in vitro yumurta kültürü tekniğini haploid bitkilerin üretimi yoluyla homozigot hatlar oluşturmak için kullanmıştır.

Araştırmacılar yapmış olduğu bu çalışmada, in vitro rejenerasyon ve yumurta kültürleri yoluyla haploid bitkilerin üretimini ve akış sitometrisi kullanarak rejenere haploidlerin tanımlanması ile ilgili raporlar sunmuşlardır. Ovüller, 6-benziladenin (BA), kinetin (Kin), 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve Naftalin asetik asit (NAA) farklı konsantrasyonlarında 0, 0,5, 1 ve 2 mg.l⁻¹ ile takviye edilmiş Murashige ve Skoog (MS) ortamında kültürlenerek test edilen farklı bitki büyüme düzenleyicileri arasında, 2,4 mg.l⁻¹'te doğrudan gynogenesis üretmişlerdir. En yüksek kalojenez yüzdesini (%100), 1 mg.l⁻¹ 2,4-D ve 2 mg.l⁻¹ NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Rejenere haploidleri tanımlamak için akış sitometrisi analizi kullanılmış ve sırasıyla %21.7 ve %41 yüzdeleri ile 1 ve 2 mg.l⁻¹ 2,4-D'de gynogenetic oluşumu doğrulanmıştır. 2,4-D konsantrasyonlarının, çörek otundaki haploidlerin eldesi için etkili olduğunu kanıtlamışlardır. Rejenere haploidler bitki besin düzenleyiciler olmadan MS ortamında geliştirilmiştir. İn vitro ve haploid bitki üretimi için elde edilen sonuçlar ile çörek otunun ıslah programını büyük ölçüde kolaylaştırabileceği sonucuna varmışlardır.

Abu-Hammour vd. (2010) Akdeniz iklimi koşullarında 2009 yılında yürüttükleri denemede çörek otu çiçeklerini emaskulasyon işlemi için uygun dönemlerde farklı tozlaşma koşullarına tabi tutularak açık ve kapalı, elle, kendi kendine karşı çapraz tozlaşma yöntemlerini deneyerek bitkinin tozlaşma mekanizması üzerine kapsamlı bir araştırma gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar çörek otu çiçeklerinin tozlaşmasında stil hareketlerinin rolünü de değerlendirerek, çörek otunun tamamen kendi kendine uyumlu olduğu sonucuna varmıştır. Sonuçlar ayrıca çörek otunun böcek tozlayıcılarının yokluğunda tam olarak tozlaşmadığını göstermiş ve rüzgarın tozlaşma süreçlerinde çok az rol oynadığı veya hiç rol oynamadığı bildirilmiştir.

Shah ve Samiullah (2006) çörek otunun büyümesi ve verimi hakkında yaptıkları araştırmada ekimden 40 gün sonra 5-10 mol giberellin çözeltisinin, iyonik olmayan su ve püskürtme uygulaması ile kapsül sayısını ve tohum sayısını artırdığını gözlemlemişlerdir.

Paramanik vd. (2007) tarafından yürütülen bir araştırmada giberellin iyonik olmayan su çözeltisi, ekimden sonra 40 gün boyunca püskürtme yöntemi ile uygulanarak çörek otunun büyümesi ve verime etkisi araştırılmış ve 10 ile 5 M GA uygulamasını sırasıyla %43,33, %43,85 ve %53,62 oranında uygulanarak artan kapsül sayısı, tohum verimi ve tohum verimine etkisi araştırılmıştır. 70 gün sonra bitkideki dal sayısı, gövde uzunluğu, kuru ağırlık, yapraklar ve yaprak sayısının arttığını tespit etmişlerdir. Çörek otu yapraklarına iyonize su, GA₃, ABA,

Zea ve Kin (10-7, 10-5 ve 10-4 M) 40 gün boyunca uygulanmış ve bitkisel aşamada büyüme ve 10-5 M konsantrasyonda GA uygulaması ile sürgün uzunluğu, bitki kuru ağırlığı, yaprak sayısı ve yaprak alanı 70 günün sonunda diğer bitki büyüme kök teşvik hormonlarından daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

2.1. Çörek Otunda Kromozom Katlaması ile İlgili Bazı Çalışmalar

Biswas ve Chatterjee (1971) kolhisin uygulamasının, tetraploid bitkilerin üretiminde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bitki ıslah sürecinde bitki boyu, stoma sıklığı, çiçeklenme, polen büyüklüğündeki değişim, meyve büyüklüğü, tohumların çimlenme oranı gibi parametrelerde kolhisin uygulamasının etkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

Biswas ve Datta (1982), çörek otu fidelerine kolhisinin uygulanması ile elde ettikleri autotetraploid bitkilerde mayotik analiz yapmışlar ve değişen sayıda dört değerlikli (0-4), üç değerlikli (0-2) ve tek değerlikli (0-10) kromozom düzensizliklerini üreten tetraploid steril tohumlar elde etmişlerdir.

Bansal ve Sen (1983) çörek otu poliploidinin kök, sürgün ve yaprak dokularından elde edilen kalluslarda yaygın bir özellik olduğunu ve görünümünün dokularda belirgin bir fark göstermediğini bildirmişlerdir.

Kumar ve Roy (1996) çörek otu kallus dokularında yüksek sıklıkta anöpoloid ve poliploid hücrelerin ortaya çıkmasının yanı sıra, binükleat hücre, mikronükleik, diplokromozomlarda çok kutupluluk, yapışkan köprüler ve halka kromozomlarının oluşumunu da gözlemlemişlerdir. Anormalilerin endoduplikasyon ve çeşitli mitotik bozukluklara bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Saha ve Datta (2002) sadece iki tane apikal meristemi olan çörek otu bitkinin uçlarına 3 gün boyunca her gün %0,5 kolhisin çözeltisi ile 5 saatlik bir uygulama yapmışlar ve autotetraploid steril bitkiciklerden 37 tohum elde etmişler ve bu 30 tohumu ekerek 11 bitki elde etmişlerdir. Bu bitkilerden 4'ünün autotetraploid olduğu sitolojik olarak doğrulamışlardır. Morfoloji, sitoloji, polen kalitesi ve autotetraploidlerde tohum seti diploidlerle karşılaştırılarak mayoz bölünme ve polen kalitesi sırasıyla polen ana hücrelerinde ve polen tanelerinde incelenerek %1 propiyono karmin çözeltisi ile boyamışlardır. Tamamen lekelenmiş polen tanelerini verimli olarak kabul etmişlerdir. Chi-square heterojenlik testi uygulanmış ve sonuç olarak, çörek otunda elde edilmiş ototetraploid kromozomların sitolojik incelemesiyle eşleşme düzensizliklerinden kaynaklanan kromozomal bozuklukların polen kalitesindeki azalmanın

sonucu olduğu bildirmişler ve tohum kısırlığının sitolojik temelden ziyade genetik bir temelinin olabileceğini vurgulamışlardır.

2.2. Çörek Otunda Kallus Oluşumu ile İlgili Bazı Çalışmalar

Banerjee ve Gupta (1975) çörek otunun kök, gövde ve yaprak segmentlerinden izole edilen naftalenasetik asit ve hindistan cevizi sütü içeren bir ortamda, her üç kallusdan kök ve sürgün gelişimi gözlemişlerdir. Bu gözlemler sonucunda önce hindistan cevizi sütüne maruz bırakılan eksplanltlar, daha sonra bazal ortamda IAA (2,0 ml) uygulamış ve hindistan cevizi sütünün (%15 v/v) ihmal edilmesinden sonra ise kök ve yaprak kallusları meydana geldiğini belirlemişlerdir. Organ oluşumunun sıklığı ve bu kapasitenin korunması, kallus dokusunun yaşına ve doğasına bağlı olduğu sonucuna varmışlardır.

Banerjee ve Gupta (1976) Kazein hidrolizat ile takviye edilmiş MS ortamına; hindistan cevizi sütünü değişik konsantrasyonlarda uygulayarak yaprak kallusundan embriyogenez elde etmişlerdir. Embriyogenez oluşumu, MS + IAA ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}$) + kazein hidrolizat (100 ve 500 mg.l^{-1}) ortamında, bitki dokusunda uzun bir kültür döneminden sonra meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. 1000 mg.l^{-1} 'lik bir konsantrasyonda kazein hidrolizatın, beşinci altkültürden sonra farklılaşma kapasitesini kaybederek, 2,4-D ve kinetin ortamlarının morfogenez üzerinde inhibitör etkilere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Çörek otunda köklerin, sürgün tomurcuklarının ve yaprakların kökeninin meristematik hücre gruplarından olduğunu, embriyoidlerin ise tek bir hücrenin tekrarlanan bölünmesiyle başlatıldığını ortaya koymuşlardır.

Chand ve Roy (2014) çörek otundaki maksimum kalluslamayı keşfetmek için farklı 2,4-D, NAA ve IAA konsantrasyonları kullanmışlardır. Kallus kültürleri başlangıçta çörek otunun yaprak segmentlerinden elde etmişlerdir. Deneyler boyunca kinetin konsantrasyonu sabit tutarak, NAA içeren ortamlarda yetişen kallusların IAA ve 2,4-D içeren ortamlara göre uyumlu, yumuşak ve yeşil renkte olduğu bildirmişlerdir. 2,4-D, NAA ve IAA eklenen MS besi ortamında çörek otu yaprağından önemli miktarda kallus üretmişlerdir. Bitki besin düzenleyicilerin sadece kültürün başlamasından ve biyokütle oluşumundan sorumlu olmayıp, aynı zamanda metabolitlerin birikimini de arttırdığını bildirmişlerdir. Kallus oluşumu başlangıçta çörek otunun yapraklarından elde etmişlerdir. 2, 4-D (2 mg.l^{-1}), kinetin ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$) ve %10 hindistan cevizi sütü ilave edilmiş MS ortamı kullanmışlardır. Kallus dokularının bölünme hızının 2,4-D içeren ortamlarda IAA içerenlerden daha fazla olduğu sonucuna varmışlardır. Elde edilen kalluslar daha sonra aynı bazal ortamda kinetin ile kombinasyon

halinde farklı NAA, IAA ve 2, 4-D ve hindistan cevizi sütü konsantrasyonlarında alt kültüre almışlardır. Kültürleri 25°C'de ve 16 saat/8 saat ışık-karanlık fotoperiyod içinde inkübe etmişlerdir. Her iki ortamda da 28 günde kallus oluşumu olduğunu gözlemlemişlerdir. Kinetin ve 2,4-D'nin bulunduğu durumlarda kromozomal anormalliklerin maksimum sıklıkta meydana geldiği bulunmuştur.

Chand ve Roy (1982), Giberalik asit varlığında eksplant olarak tohumların çimlendiğini ve kallus oluşumu olmadığını gözlemlemişlerdir; NAA varlığında ise tohumlarda çimlenme gerçekleştiği ve kallus ürettiğini tespit etmişlerdir. IAA'nın varlığında ise tohumların bitkilere dönüştüğünü ve besi ortamında kallus oluşumu meydana geldiği bildirmişlerdir. Her durumda kinetin ve hindistan cevizi sütü miktarı sabit tutularak 2,4-D varlığında, kinetin ve hindistan cevizi sütü tohumlarda, bitki oluşturmada kallus dokusu oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Datta vd. (1983) tarafından yapılan bir araştırmada çörek otunda dahil olmak üzere farklı bitki besin düzenleyicilerle farklı bitkiler üzerinde çalışmışlardır. Her bitki besin düzenleyicilerinin in vitro büyüme ve biyokütle oluşumunu başlatmada etkili olduğunu, 2,4-D ve kinetinin ise hipokotil segmentinden kallus oluşumunda yardımcı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca kromozom sayısındaki sayısal varyasyonları incelemişlerdir. Hipokotil segmentinden oluşmuş kallus dokularının poliploidi, anöploidi ve haploidlerinde yapısal anomaliler tespit etmişlerdir ve farklı hücre hatlarında sık kromozom eliminasyonunu kaydederek; marker kromozomlarının sürekli olarak farklı ploid seviyelerinde olduğunu tespit etmişlerdir. 2,4-D (2 mg.l⁻¹) ve kinetin (1 mg.l⁻¹) ile desteklenmiş MS ortamında hipokotil segmentinden kremi beyaz karışımı renkte kallus oluşumu meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Youssef vd. (1998), kazein hidrolizatın %0,05'inin kallus büyümesini teşvik ettiğini, ancak tuzluluğun artmasıyla büyümenin azaldığını bildirmişlerdir. Buna karşılık, kallus kültürlerinde birincil ürünlerin birikiminin tuz stresi ile arttığını da öne sürmüşlerdir. Kültür ortamında kinetin seviyelerinin 2,4-D'nin besi ortamına eklenmesiyle, çörek otonun kültüre alınmasıyla oluşan kallusların taze ağırlığını azalttığını rapor etmişlerdir.

Elhag vd. (2004), biyosentetik çalışmalar için somatik embriyoları indüklemek ve izole etmek amacıyla, kinetin (0,46 µM) ve 2,4-D (4,5 veya 13,5 µM) veya NAA (5,4 veya 16,2 µM) ile takviye edilmiş MSB5 bazal ortamında aksenik fidelerin yaprak, kök ve kök eksplantlarından kallus kültürleri çalışmışlardır. NAA içeren bir ortamda başlatılan ve alt kültüre alınan eksplantlar, eksplant türüne bakılmaksızın çok sayıda kökten kallus

üretmişlerdir. Bu kültürleri NAA içeren bir ortamda somatik embriyolara ayırmışlardır. Somatik embriyolardan, büyüme düzenleyicilerin olmadığı bazal ortamda da oluşumu gözlemlemişlerdir. Embriyogenik kallusların NAA içeren sıvı ortama aktarıldığında ise çok sayıda embriyo ve embriyo kümelerinin katı ortamın aksine, gelişmenin erken embriyonik aşamalarda kaldığını saptamışlardır.

Mohammad vd. (2006) yaptıkları çalışmada, 106-1.010 molar 2,4-D veya PDA içeren MS ortamını kullanarak çörek otunda köklenme başlatılması ve büyümesini için GDH ve değişken konsantrasyonlarda potasyum ve amonyum nitrat içeren besin ortamında kallus elde etmeye çalışmışlar ve ek olarak, 2,4-D veya PDA varlığında enzim aktivitesinin karşılaştırmalı bir çalışmasını yapmışlardır. Sonuçlar, kallusun başlatılması ve büyümesi için en iyi ortamın 106-M 2,4-D veya PDA varlığında elde edildiğini ortaya koymuştur. 2,4-D ve PDA varlığında MS ortamında yetiştirilen kallusun taze ağırlığı, 45 günlük kültürden sonra sırasıyla 5,72 g ve 2,81 g olarak ölçmüşler ve bununla birlikte 2,4-D ve PDA içeren ortamlarda yetiştirilen kallusun protein içeriğini sırasıyla 1.050 ve 1.116 mg/g taze ağırlığında olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak, PDA'nın çörek otunun bitki doku kültüründe 2,4-D yerine kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Bu nedenle, PDA'nın sentetik bir oksin olarak düşünülebileceği ve çeşitli bitkiler için bitki doku kültüründe kullanılabilir olduğu sonucuna varmışlardır.

Al-Ani (2008) çörek otu yaprakları, hipokotilleri ve kökleri farklı konsantrasyonlarda MS ortamına ekimi yapılarak kültüre almıştır. Bitki kök, hipokotil ve yaprak kültürleri MS ortamında 2,4-D (0,0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 mg / l) ve kinetin (0,0, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 5,0 mg / l) uygulaması yapmış ve en iyi kallus oluşumu, 2,4-D (mg.l^{-1}) ve kinetin ($1,5 \text{ mg.l}^{-1}$) oranı ile yaprak eksplantlarından elde etmiştir.

Al-Salih vd. (2012) bu çalışma, pestisit deltametrinin çörek otu doku kültürlerini kullanarak bitki hücre büyümesi üzerindeki etkisi değerlendirilmek amacıyla farklı pestisit konsantrasyonları (%0,01-4,0) denemişlerdir. Sonuç olarak %0,01-0,05 kallus büyümesini inhibe etmezken %0,1-1,0 oranında pestisit ilavesinin kallus büyümesini arttırdığını bildirmişlerdir.

ElNour vd. (2015) 'de yaptıkları çalışmada, çörek otu tohumları kullanılarak elde edilen hipokotiller ve kotiledon eksplantları, farklı tipte ve farklı büyüme düzenleyicileri konsantrasyonları ile takviye edilmiş bir MS ortamında uygulama yapmışlardır. Çörek otu

eksplantları sırasıyla 1,0 mg.l⁻¹ ve 5,0 mg.l⁻¹ NAA ile takviye edilmiş MS ortamında kültüre alınmış ve iki hafta sonra hızlı bir kallus oluşumu oranı gözlemlenmiştir. Eksplantlar kotiledon olduğunda 2,4-D besisi ortamına 5,0 mg.l⁻¹ ve 0,5 mg.l⁻¹ oranlarında MS ortamında yetiştirilen hipokotiller gözlemlendiğinde yavaş bir kallus oluşum oranı gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Bibi vd. (2018) yapmış oldukları çalışmada çalışmada, in vitro tohum çimlenmesi ve kallus oluşumu için etkili yöntemler geliştirilmişlerdir. Ayrıca rejenere dokularda antioksidan potansiyelini belirlemişlerdir. 4,0 mg.l⁻¹ TDZ ve 4,0 mg.l⁻¹ NAA ile desteklenmiş MS ortamında en yüksek kallus indüksiyon frekansı (%88) olarak tespit etmişler ve kotiledon eksplantlarında kallus biyokütle oluşumu başlattığı gözlemlenmiştir. Kallus kültürlerinde, biyokütle birikimi ile ilgili olarak kültür döneminin antioksidan potansiyeli üzerindeki etkisini belirlemek için büyüme kinetiği incelenerek, büyüme eğrisinin 35. gününde TDZ+NAA'da (her biri 4,0 mg.l⁻¹) olarak kaydetmişlerdir. Ayrıca, daha fazla fenolik (TPC: 1,48 mg) ve flavanoid (TFC: 0,58) içerdiğini ölçülmüşlerdir. 35 günde kallus gelişimi takip edilerek çörek otu kuru biyokütlesi ölçmüşlerdir. En yüksek kuru biyokütlesini 13,2 mg.l⁻¹ olarak ölçmüşlerdir. Çörek otu kotiledonlarından türetilmiş kallus kültürü tarafından gösterilen gelişmiş biyokütle ve antioksidan aktivite metabolik içeriği incelenerek, konsantrasyonların antioksidan aktivitesini artırdığı ve TDZ + NAA içeren besisi ortamının çörek otu kallusunun biyokütlesini ve antioksidan aktivitesini de arttırdığını bildirmişlerdir. Sonuçlar, 1,0 mg.l⁻¹ ile takviye edilmiş MS ortamında inkübe edildiğinde çörek otu tohumlarında en yüksek çimlenme sıklığını gösterdiğini bildirmişlerdir.

Rezaei vd. (2018) doku kültürü deneylerinde, bitki büyüme ortamı için mineral tuzu ve vitaminler, %3 sukroz ve %0,7 agar içeren MS ortamı kullanmışlardır. Kallus gelişimi için sterilize edilmiş tohumlardan 7-10 günlük bitkilerin hipokotil, ve kotiledon ve eksplantlarını kullanılmışlardır. Kallus gelişimi üzerine bitki büyüme hormonları etkisini araştırmak için TDZ, kinetin ve BAP farklı hormon kombinasyonları NAA (1 mg.l⁻¹) ile hipokotil ve kotiledon eksplantları üzerinde kullanmışlardır. Bitki rejenerasyon deneyinden sonra, elde edilen kalluslar sürgünlere ve sürgün uzunluklarına göre değerlendirmişler ve sürgünler farklı köklenme ortamlarına ayrı ayrı yerleştirmişlerdir. Çörek otunun in vitro bitki rejenerasyonu, bu çalışmada incelenen büyüme hormonları ve büyüme hormonu kombinasyonları ile en iyi kallus oranı kotiledon gelişiminde NAA (0,05 mg.l⁻¹ - BAP ile birlikte) büyüme hormonu ile daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir.

2.3. Anter Kültür Tekniğinin Geliştirilmesine Yönelik Bazı Çalışmalar

Corduan (1975) *Hyoscyamus niger* L.'in anterlerini iki farklı yöntemle kültüre almıştır. İlk yöntemde anterleri 5 veya 10 mg.l⁻¹ 2,4-diklorofenoksiasetik asit ile takviye edilmiş bazal bir ortamda mikrospor gelişiminin geç tetrad aşamasında karanlık ortamda bırakmıştır. Gelişen kallus, karanlık döngü sırasında 28 °C ve 20 °C'de floresan tüplerden 16 saat ışık fotoperiyodik koşullar altında çok sayıda bitki üretmiştir. Sitolojik analiz ile, bu bitkilerin yaklaşık %50'sinin haploid olduğunu tespit etmiştir. İkinci yöntemde, çeşitli koşullar altında çok az modifiye edilen bazal ortamında mikrospor gelişiminin erken mononkleat aşamasında anterler kültüre alınarak embrioidler tarafından doğrudan geliştirilen en fazla bitki sayısı, 16 °C'de 28 saat floresan ışığı ve 8 °C'de 20 saat karanlık fotoperiyodik koşullar altında IAA içermeyen besi ortamında geliştiği rapor edilmiştir. Ayrıca sitolojik incelemede, bitkilerin yaklaşık %70'inin diploid olduğunu tespit etmiş, diploid rejeneratların homozigotisinin tespiti için genetik bir belirteç kullanmıştır. Kallus yoluyla ve doğrudan embrioid oluşumu ile gelişen rejeneratların %98'i homozigot olduğunu tespit etmiştir.

Foroughi-Wehr (1976) yapmış olduğu çalışmada 55 farklı arpa (*Hordeum vulgare*) melezinin ve dört çeşidin anterleri in vitro olarak yetiştirmiş ve her melezin mikrosporları, biri hariç tüm melezlerden kalluslar ve daha sonra bu kalluslardan bitkiler elde etmiştir. Kallus oluşumu kültüre alınmış 1000 anterde 3,3 ila 73,2 arasında değişirken, yeşil bitki rejenerasyonunun ise kültüre alınmış 1000 anterde 0 ila 12,7 arasında değiştiğini rapor etmiştir.

Hidaka vd. (1979) yapmış olduğu çalışmada *Ponciru trifoliata* L. anterlerini 2,4-D, IAA, NAA ve kinetin içeren MS ortamında kültü ortamına almışlardır. Ekimden üç hafta sonra, anterlerden kotiledon embrioidler ortaya çıkmış ve embrioidler, anterlerden ve 0,2 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamda daha çok oluştuğu bildirilmiştir. Kallus oluşumu tüm ortamlarda meydana gelmiş ve 2,4-D ilavesi ile kallus oluşumu daha da artırdığı bildirilmişlerdir. Köklenme oluşumu ise embrioidlerin büyüme düzenleyicilerini içeren indüksiyon ortamından büyüme düzenleyicileri olmayan ortama aktarılmasıyla köklenmenin daha kuvvetli olduğu bildirmişlerdir. Mikroskopik gözlemlerde ise bu bitkilerden bazılarının haploid durumu 9 (X) kromozomunu göstermiş ve bazıları 10 (x+1), 11 (x+2) ve 18 (2x) kromozomlara sahip olduğu bildirilmiştir. Bu bitkilere ek olarak, aynı preparatlarda farklı kromozom sayılarına sahip hücrelere sahip olan mixoploidler, örneğin (9, 10), (9, 10, 11) ve (10, 11) elde etmiştir.

Aldemita ve Zabata (1991) anter kültüründe yetiştirilen bitkilere radyasyon uygulayarak incelemelerde bulunmuşlardır. Araştırmada IR8, IR28, IR36, IR42, IR43, IR50, IR54, IR64, Pokkali ve Taipei 309 çeltik çeşitlerini kullanmışlardır. Kallus indüksiyon ortamında farklılık gösteren üç deney yapmışlardır. Fidelerin canlılığının, radyasyon dozajındaki artışla orantılı olduğu ve Taipei 309, IR43 ve Pokkali, sıfır radyasyon tedavisine tepki verdiğini diğer çeşitlerin de duyarlı olduğunu kanıtlamışlardır. Radyasyon uygulanmasının bazı çeşitlerde kallus gelişimini ve bitki rejenerasyonunu iyileştirdiği, ancak duyarlı çeşitlerinde olduğunu bildirmişlerdir. Agaroz ilavesinin tüm genotiplerin kallus gelişimi ve bitki rejenerasyonu için faydalı olduğunu bildirmişlerdir. 17,4 mM prolin ve 25 mM (NH₄)₂SO₄ ilavesinin yeşil bitki rejenerasyonunu başlattığı, ancak kallus gelişimini tam olarak sağlamadığını rapor etmişlerdir. Radyasyon dozunun artmasıyla bitki gelişiminde ve bölünme yüzdesinde bir azalma gözlemlenmiştir. Anter kültüründen elde edilen sonuçların tuz toleransı ve bu alanda daha fazla kullanılması açısından değerlendirileceğini bildirmişlerdir.

Ball vd. (1993) tarafından buğdayda yapılan çalışmada haploid bitki oluşumu üzerine 2,4-D ve IAA konsantrasyonlarının kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu ve yeşil bitki üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. İndüksiyon ortamına eklenen 2,4-D ve IAA ile karşılaştırıldığında tüm anter kültür bileşenleri için önemli ölçüde ($P \leq 0,01$) daha yüksek ortalamalara neden olurken, aynı zamanda 2,4-D eklenmesi önemli ölçüde ($P \leq 0,01$) bitki rejenerasyonunu azalttığı rapor etmiştir. 0,3 mg.l⁻¹ IAA konsantrasyonunda da yeşil bitki yüzdesinin önemli ölçüde artırdığını belirtmişlerdir. Maksimum sayıda haploid bitki üretmek için 2,4-D × IAA kombinasyonunda farklı oranlarda uygulamalar yapmışlar ve indüksiyon ortamındaki daha yüksek 2,4-D seviyelerinin araştırılması gerektiği ve optimum hormon kombinasyonunun bitki rejenerasyonu ve yeşil bitki yüzdesi için farklı olabileceği bildirilmişlerdir.

Alemanno ve Guiderdoni (1994) tarafından 500 mg.l⁻¹ kolhisin içeren yarı-katı indüksiyon bir ortamda çeltikte standart anter kültür prosedürleri iki katına çıkarılarak uygulanmış ve haploid bitki üretiminde anter kültür için karıştırılığında 1,5-2,5 kat daha fazla yeşil bitki elde edildiğini bildirmişlerdir. Kolhisin ilavesi, anter kültürünün farklı etkinlik parametreleri üzerinde zararlı bir etkiye sahip olmadığı, ancak bazı uygulamalarda anterden kallus oluşumunda yeşil kallus bitkisinin rejenerasyon yeteneğinde önemli bir artışa yol açtığını tespit edilmişlerdir. Kolhisin uygulamasının haploid bitki eldesini %31'den %65,5'e çıkardığını bildirmişlerdir.

Pulido vd. (2005) yapmış oldukları çalışmada arpa bitkisinde anter kültür uygulaması yapmışlar ve androjenik sürecin erken evrelerinde sporofitik anter dokularının oynadığı rol hakkında daha fazla bilgi edinmek için, anter kültür ile elde edilen arpa embriyojenik polen tanelerinin sitolojisini ve ultrastruktürünü izole etmişler mikrospor kültürü ile elde edilenlerle karşılaştırmışlardır. Standart sterilizasyon işlemi yapmışlar ve mikrosporları içeren anterleri çanak yapraklar ve taç yapraklar ile 25 °C de 4 gün karanlıkta 0,7 M mannitol ile bekletilmiş ve FeNa₂ EDTA (40 mg.l⁻¹) maltoz ile zenginleştirilmiş MS besisi ortamında kültüre almışlardır. 3, 6 ve 9 gün sonra, kültüre alınan anterler transmisyon elektron mikroskobunda gözlemlene yapmışlardır. 6 gün sonra transmisyon elektron mikroskobunda gözlemlenen anterden elde edilen kalluslara daha yüksek Fe konsantrasyonları 2.5×, 9× Fe, 1× FeNa₂ ve EDTA (40 mg.l⁻¹) uygulamışlardır. Mikrospor ve anter kültürleri arasında tepki süresinde farklılıklar olduğu belirtmişler ancak 17 günlük kültürden sonra gözlemler arpadaki genç kültürlerde net olmadığı ve sonuç olarak 3 ila 9 gün süren anter ve izole mikrospor kültürlerinde embriyojenik yapıların evriminde benzerlik gösterdiği bildirmişlerdir.

Pintos vd. (2007) haploid bitkiler elde etmek için mantar meşesi (*Quercus suber* L.) anter kültüründen elde edilen embriyoların nükleer DNA çoğaltılmasını indüklemek amacıyla yapılan bu çalışmada anter kültür akış sitometrisi ile değerlendirildiğinde, spontan diploidlerin yüzdesinin %7,78 olduğu görülmüş ve bu nedenle, üç antimitotik ajan olan kolhisin, oryzalin ve amiprofos-metil farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde genotipin haploid embriyolarına in vitro olarak uygulayarak antimitotik toksisite embriyoları belirlemişlerdir. Mantarları çekirdeksiz aşamadayken mikrosporlu mantar anterleri seçilerek, 4°C'de maksimum 7 dakika ön işleme tabi tutmuşlar ve daha sonra makro besinleri içeren ortam üzerinde kültüre almışlardır. Mikromineraler, kofaktör olarak MS, %3 (w/v) sakaroz ve %1 (w/v) aktif kömür ve son olarak %0,8 (w/v) agar, pH 5,6 koşullarında oda sıcaklığında kültüre alınmış kültür ortamında gözlemlene yapmışlardır. Anter kültüründen elde edilen embriyoların, doku kültürü uygulamasında karanlıkta 33 °C'de, 5 gün boyunca hafif bir ısı şoku ile birleştirerek elde edildiğini bildirmişlerdir.

Asadi vd. (2018) *Cucumis sativus* L.' da yapılan çalışmada anter kültür için farklı iki *Cucumis* genotipi kullanmışlardır. 4°C'de bekletilen tomurcukları ön sterilizasyona tabi tutmuşlardır. BAP ve 2,4-D kombinasyonlarının ilave edildiği MS ortamında 35°C de kallus morfogenezinin indüksiyonunu içeren DH bitkileri üretmek için bir yöntem geliştirmişlerdir. Ayrıca genotip, anter duvar dokularının çoğalması, kültür ortamındaki anterlerin oryantasyonu

ve başlangıç anter kültür ortamının büyüme düzenleyici bileşimi gibi faktörlerin dikkate değer bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Kromozom iki katına çıkma oranını %81 olarak tespit etmişlerdir.

Hooghvorst vd. (2018) tarafından çeltikte yapılan çalışmada double haploid (DH) bitkileri anter kültür aracılığı ile getirilmeye çalışılmış ve anter kültür protokolünü geliştirmek için, iki *Japonica rice* genotipinin (NRVC980385 ve H28) mikrosporları, indüksiyon ortamında üç büyüme düzenleyici kombinasyonuna ve dört farklı kolhisin uygulamasına tabi tutmuşlardır. 10°C'de 9 gün boyunca mikrosporların soğuk ön muamelesini yapmışlar ve NRCV980385 genotipinde kallus indüksiyonunu 50 kat arttırdığını bildirmişlerdir. Oksinler arasında 2,4-D ve NAA çeltikte anterlerden kallus oluşumu için en çok kullanılan hormon olduğunu ve bu çalışmanın amacının, yeşil double haploid bitkilerin sayısını artırabilecek bazı faktörleri değerlendirerek iki *japonica* çeltik genotipinde anter kültür etkinliğini arttırmak, anter kültür indüksiyon ortamında farklı büyüme düzenleyicilerinin (2,4-D, NAA ve Kinetin) etkisini, farklı kolhisin dozlarının etkisini araştırarak ve anter kültür prosedürü geliştirmeye çalışmışlardır. Kolhisin takviyeli ortamın haploid üretimini arttırdığını ve anter sonrası kültür sürecine (500 mg.l⁻¹) kolhisin uygulamasının haploid bitki üretimini artırdığını rapor etmiştir. Ayrıca her iki genotip içinde, kolhisin içermeyen indüksiyon ortamında 2,4-D (2 mg.l⁻¹) ve kinetin (1 mg.l⁻¹) içeren besi ortamında en iyi kallus oluşumunun görüldüğü bildirmişlerdir.

Tripathy vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada *Oryza sativa* bitkisinde genotiplerin rolü, donör bitkinin fizyolojik durumu, polen gelişim evresi, kültür öncesi ön uygulama, kültür ortamı, fitohormonlar ve başarılı anter kültür için kültür koşulları araştırılmıştır. N6, MS, SK1 besi ortamlarında haploid bitki eldesi için embriyo oluşumu ve anter kültür uyulaması ile kallus oluşumları ve bitki rejenerasyonunu incelemişlerdir. Kallus oluşum oranının N6 ortamında daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. MS ortamında kallus oluşum oranının %11,9 ve yeşil bitki rejenerasyonunun %7,95'de kaldığı gözlemlenerek, N6 ortamında ise kallus oluşumunun %40,64, yeşil bitki rejenerasyonunun %40,93, albino bitki oluşum oranının ise %3,72 olduğunu bildirmişlerdir.

Çakmak vd. (2019) tarafından Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) de yapılan çalışmada anterleri 24 saat boyunca 4°C'de soğuk ön işleme tabi tutmuşlar sonra 2 gün boyunca 35°C'de karanlıkta bekletmişler ve farklı konsantrasyonlarda 6-benzilaminopurin, 2,4-D, NAA ve indol-3-asetik asit kombinasyonları ile takviye edilmiş ortamlarda kültüre almışlardır. Bitki büyüme

düzenleyicilerinden $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ 2,4-D ve 2 mg.l^{-1} NAA genotoksik etki gösterirken, $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ indol-3-asetik asit ve $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ NAA etki göstermediği bildirilmiştir.

Altındal ve Akgün (2019) tarafından yapılan çalışmada çavdarda MS, N6 ve NN besin ortamlarında anter kültüründe kallus oluşumu, anter tepki oranı ve bitki rejenerasyon kabiliyetini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada kallus oluşumunun NN ortamında 8 g/l, MS ortamına 10 g/l agar, $4,4 \text{ } \mu\text{mol/L}$ BAP, $2,4 \text{ } \mu\text{mol/L}$ kinetin, $2,7 \text{ } \mu\text{mol/L}$ NAA ve karbon kaynağı olarak 30,3 g/l süktroz her iki besi ortamına eklemişlerdir. 5 g/l agar, $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ kinetin, 2 mg.l^{-1} 2,4-D, 1 mg.l^{-1} IAA ve 90 g/l süktroz N6 ortamına ilave etmişlerdir. Farklı besi ortamlarının kallus oranı ve büyüklüğünün üzerine etkisinin önemli olduğunu ve anter üzerine etkisinin ise önemsiz olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak MS ortamında soğuk uygulamalı diploit çavdar anterlerinde en fazla kök oluşumu ve bitki rejenerasyonu tespit ettiğini rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma Çörek otu (*Nigella sativa* L.) bitkilerinde anter kültür tekniğinin geliştirilmesi amacıyla Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında ve Ziraat Fakültesi seralarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak ülkemizin tek tescilli çeşidi olan Çameli çörek otu çeşidi ile Denizli, Isparta, Samsun ve Ankara'da ki üreticilerce yerel olarak üretilen 4 farklı çörek otu popülasyonu kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Tez çalışmasında kullanılan çörek otu çeşit ve popülasyonları (1.Ankara, 2. Çameli, 3. Isparta, 4. Denizli, 5. Samsun)

3.1.2. Besi Ortamları

Bu çalışmada ana besi ortamı olarak modifiye MS (Murashige and Skoog; 1962) (Sigma Aldrich, Katalok No: M5519) besi ortamı ve bu ortama 9 farklı konsantrasyonda BAP ve/veya IAA ilave edilmiş toplam 10 farklı besi ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan MS ortamının kimyasal içeriği (Sigma Aldrich, Katalok No: M5519)

Kimyasal Madde	Miktar (mg.l ⁻¹)	Kimyasal Madde	Miktar (mg.l ⁻¹)
KNO ₃	1900	Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0.25
CaCl ₂ .H ₂ O	332.2	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
NH ₄ NO ₃	1650	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
MgSO ₄ .7H ₂ O	180.7	Glycin	2.0
KH ₂ PO ₄	170	Myo-Inositol	100
Na ₂ -EDTA	37.25	Nicotinic asit	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	Pyrodoxine-HCl	0.5
H ₃ BO ₃	6.2	Thiamin HCl	0.1
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	Sukroz *	30 000
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	Agar *	7 000
KI	0.83	PH	5.8

* Hazır olarak temin edilen besi ortamı içerisinde bulunmayıp ayrıca ilave edilen bileşenler

Çizelge 3.2 Anter kültür çalışmasında kullanılan besi oratmlarının BAP ve IAA kombinasyonları

Besi Ortamı No	BAP (mg.l ⁻¹)	IAA (mg.l ⁻¹)
MS-1	-	-
MS -2	0,5	-
MS -3	1,0	-
MS -4	2,0	-
MS -5	-	0,5
MS -6	-	1,0
MS -7	-	2,0
MS -8	1,0	1,0
MS -9	0,1	2,0
MS-10	2,0	0,5

3.2. Yöntem

3.2.1. Anter Verici Bitkilerin Yetiştirilmesi

Anter kültürü yapılacak çörek otu bitkileri sera koşullarında yetiştirilmiştir. Çiçeklenme periyodunu uzatmak ve çalışma için yeterli zaman kazanabilmek için bitkiler 3 set halinde 15'er gün ara ile ekilmiştir. Ekim ½ bahçe toprağı ve ½ oranında yanmış ahır gübresi içeren 3 inç büyüklüğündeki saksılara yapılmış olup, her sette 5 saksı yer almıştır. Saksılarda yeterli bitki sayısını garanti etmek amacıyla her saksıya 10-15 adet tohum ekilmiş ve çıkış sonrası bitkiler birkaç cm boya ulaştıklarında her saksıdaki 5 bitki kalacak şekilde seyreltme yapılmıştır.

Ekim sonrasında, bitkilerin gelişme aşamaları ve ihtiyaç durumları dikkate alınarak bütün gelişme aşamalarında tavsiye edildiğı gibi bakım işlemleri, günlük olarak yapılmıştır (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3).



Şekil 3.2 Çörek otu tohumu ekimi sonrası saksılar ait sera koşullarında bir görüntü



Şekil 3.3 Çörek otu bitkilerinin saksılardaki gelişme durumlarına ilişkin bir görüntü

3.2.2. Mikrosporların Gelişme Aşamalarının Belirlenmesi

In vitro androgenesisin başarıyla uyartılmasında etkili olan en önemli faktörlerden birisi, anterlerin verici bitkiden izole edildiği anda mikrosporların içinde bulundukları gelişme dönemidir. Çoğu bitki türünün mikrospor kültürlerindeki en iyi sonuçlar, tek çekirdekli mikrospor döneminin orta-geç safhasındaki mikrosporları içeren anterlerden alınmıştır (Rudolf vd., 1999; Zheng, 2003).

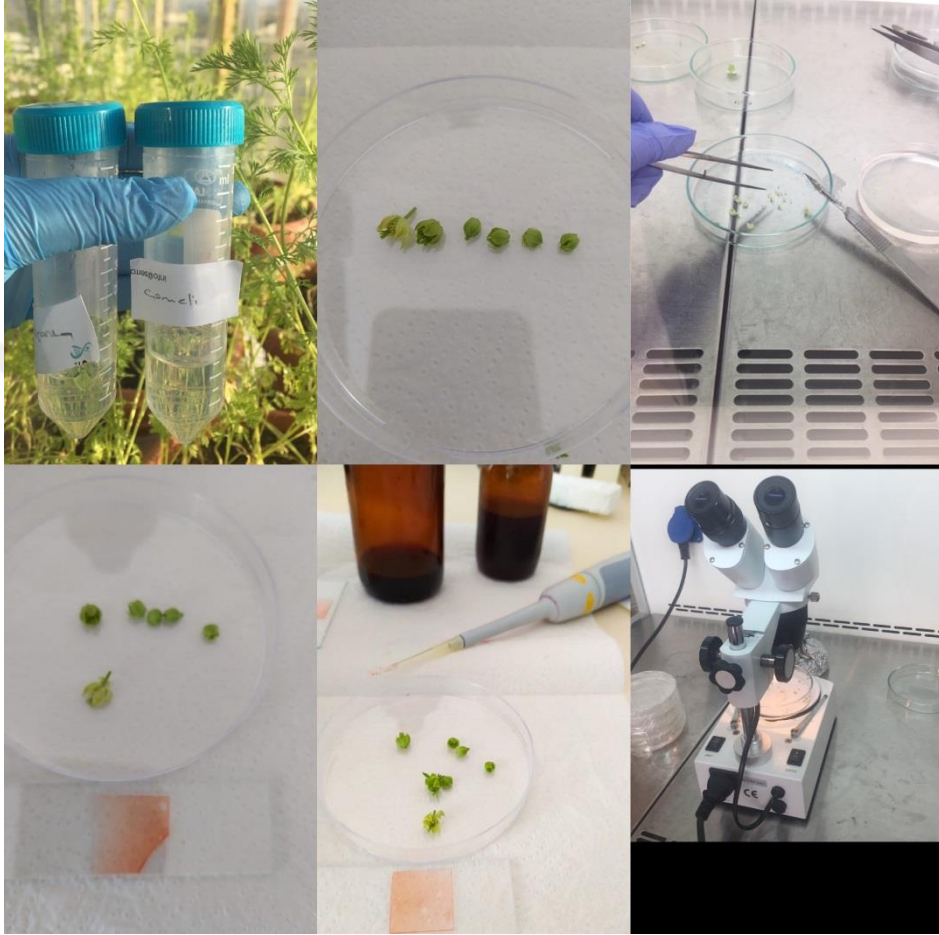
Mikrosporlar içerisinde nişasta depolanmaya başladıktan sonra, gelişmeyi sporofitik yöne kaydırmak ve haploid embriyo elde etmek için yapılacak uyarılar etkili olamamaktadır. Anterlerdeki mikrosporların gelişme dönemini tespit etmek amacıyla sitolojik gözlemler yapmak gerekmektedir (Reynolds, 1993). Doğru aşamadaki mikrosporları bulunduran anterlerin ve tomurcukların morfolojik özellikleri de tanımlandığında, mikrospor kültürü için tomurcuk toplama daha kolay bir işlem haline gelmektedir (Coşkun, 2011).

Anter kültür çalışması için uygun büyüklükteki anterleri tespit etmek amacıyla farklı büyüklükteki anterler her bir popülasyon için ayrı ayrı olacak şekilde bitkiden koparılarak alınmış ve içinde distile su bulunan falkon tüplere alınmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Çörek otu bitkisinden çiçek tomurcuklarının alınması

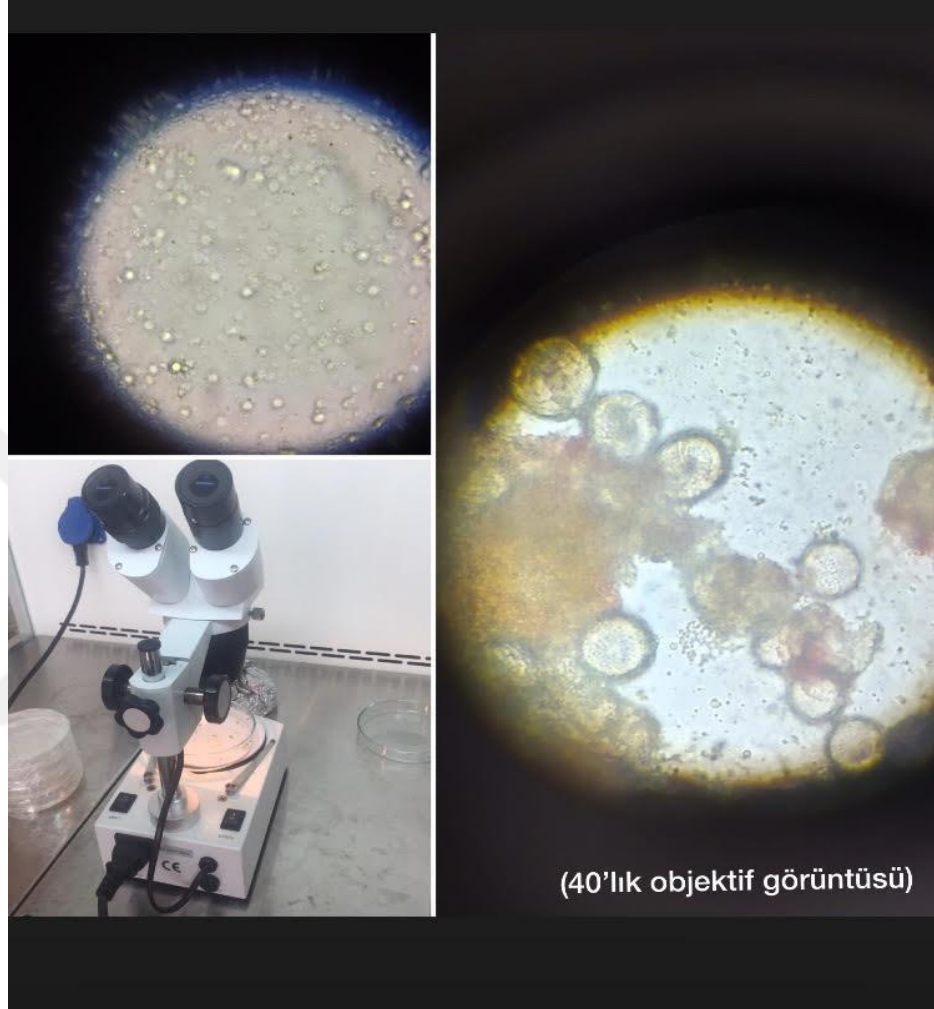
Alınan çiçek tomurcukları Doku Kültürü Laboratuvarına getirilmiş ve mikroskop altında hangi stolojik gelişme evresinde olduğu aşağıda anlatılan yöntemle tespit edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Çörek otu anterlerine asetokarmin uygulamasına ilişkin bir görüntü

Anterlerin incelenmesinde kullanılacak boyama çözeltisi 55 ml saf su içerisine 45 ml glasiyal asetik asit ilave edilip kaynatılmış ve sonra bu karışıma 1 g karmin eklenerek filtre edilerek hazırlanmıştır. Çörek otu bitkisinden alınan farklı büyüklükteki tomurcuklar bistüri yardımıyla kesilmiş ve anterler çıkarılarak lam üzerine yerleştirilmiştir. Anterin üzerine hazırlanan asetokarminden 1 damla damlatıldıktan sonra bisturinin ucu ile ezilmiş ve üstü lamelle kapatılarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Mikroskop altında incelenen anterler her bir çörek otu genotipi için farklı büyüklükteki tomurcuklar incelenerek tek çekirdekli mikrospor aşaması Şekil 3.6'da görüldüğü gibi belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.6 Çörek otu bitkisinin mikroskop altında tek çekirdekli mikrospor aşamasının belirlenmesine ilişkin bir görüntü

3.2.3. Çalışmada Kullanılan MS Besi Ortamının Hazırlanması

MS besi ortamı hazırlanırken 1 litrelik ortam için 4.4 gr toz besi ortamı tartılmış 600 ml dolayında distile su içerisinde bir manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülmüştür. Çözülme tamamlandıktan sonra içerisine 30 g şeker ilavesi yapılmış ve şekerinde çözünmesi sağlanmıştır. Hormon ilavesi yapılacaksa hormonlardan önce stok solüsyonları hazırlanmıştır.

Stok solüsyonları hazırlanırken BAP ve IAA 2-3 ml 1 N NaOH içerisinde çözündürüldükten sonra hacimleri distile su ile normal hacimlerine tamamlanmıştır. Bu hormonlardan gerekli miktarlar bir pipet yardımı ile besi ortamına ilave edilmiştir. Sonrasında besi ortamının hacmi 1000 ml'ye tamamlanmıştır. PH metre aracılığıyla besi ortamının PH'sı belirlenmiş PH düşükse 1 N NaOH yüksekse 1 N HCl ilave edilerek PH 5,8'e ayarlanmıştır. Sonrasında bir vida kapaklı şişe içerisine 7 gr agar ilave edilmiş ve üzerine hazırlanan besi ortamı dökülerek kapağı bir diş açık kalacak şekilde kapatılmıştır. Hazırlanan besi ortamı otoklavda 121 °C'de 15 dakika boyunca sterilizasyona tabi tutulmuştur. Otoklavdan çıkan hazırlanan besi ortamı Şekil '6 da gösterildiği gibi biyogüvenlik kabininde 9 cm çapındaki steril petrilere her bir petride 25 ml olacak şekilde aktarımı aktarılmıştır (Şekil 3.7). Besi ortamlarının soğuyarak katılaşması beklenmiş ve besi ortamları katılaştıktan sonra 5'erli gruplar halinde streç filmlerle sarılarak kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Mümkün olduğunca taze besi ortamları kullanılmış ve hazırlanan besi ortamları en fazla 2 ay bekletilmiştir.



Şekil 3.7 MS besi ortamının petrilere aktarım işlemine ilişkin bir görüntü

3.2.4. Çörek Otu Çiçek Tomurcuklarının Yüzey Sterilizasyonu

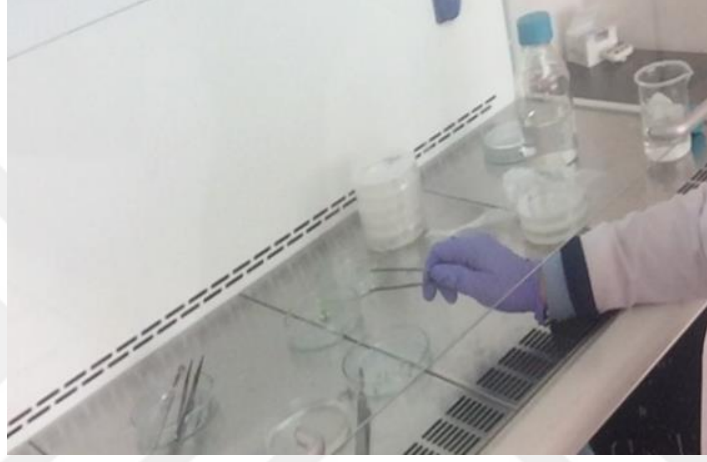
Uygun büyüklükteki anterleri içeren çiçek tomurcukları verici bitkiden hasat edilerek steril su içerisinde laboratuvara getirilmiş ve uygun yöntemle sterilize edilerek farklı besi ortamlarında kültüre alınmıştır.

Bütün sterilizasyon işlemleri biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Laboratuvara getirilen uygun büyüklükteki çörek otu tomurcukları öncelikle %70 etil alkol ile 5 sn daha sonra %6 'lık çamaşır suyu (ACE) çözeltisi ile 10 dakika süre ile sterilizasyona tabi

tutulmuş ve arkasından 3-5 kez steril su ile durulama yapılmıştır. Durulama yapılan tomurcuklar içerisinde steril kurutma kağıdı bulunan steril petri kaplarına biyogüvenlik kabini içerisinde 1-2 dakika kurumaya bırakılmıştır.

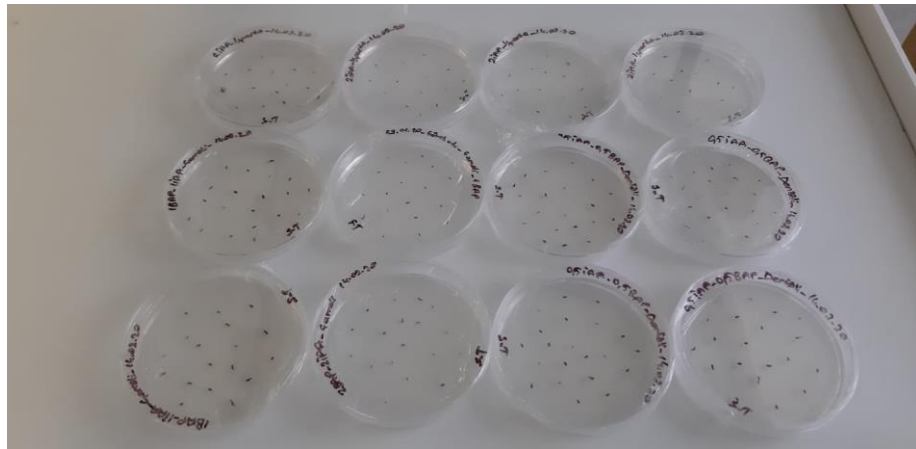
3.2.5. Anterlerin Kültüre Alınması

Çörek otu çiçek tomurcukları biyogüvenlik kabini içerisinde steril petriler üzerinde steril bistüri ve pens yardımıyla açılarak hazırlanan besi ortamında her petride 20 anter olacak şekilde ekilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Çörek otu çiçek tomurcuklarından anterlerin ayrılma işlemine ilişkin bir görüntü

Ekim işleminin ardından, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ sıcaklık ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyoda sahip iklimlendirme odasında kültüre alınmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 İklmlendirme odasında kültüre alınan çörek otu anterlerinden bir görüntü

3.3. Verilerin Analizi

Elde edilen verilerin analizi, SPSS V28 (PASW Inc., Chicago. IL. USA) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılıklar, Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde Microsoft Excell paket programından yararlanılmıştır.



4.BULGULAR VE TARTIŞMA

Araştırmada 10 farklı besi ortamında kültüre alınan 5 farklı çörek otu popülasyonuna ait sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Çalışma kapsamında kültüre alınan anterlerden elde edilen kallus sayıları ve başarı oranlarına (%) ilişkin veriler.

Besi Ortamları	Genotipler (Elde edilen kallus sayısı (% Başarı oranı))					Besi Ortamları Düzeyinde Genel Başarı
	Çameli	Ankara	Samsun	Denizli	Isparta	
MS Yalın	0	0	0	0	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ BAP	0	2 (%2)	0	0	0	2(%0,4)
1,0 mg.l ⁻¹ BAP	0	0	0	0	0	0
2,0 mg.l ⁻¹ BAP	0	0	0	0	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ IAA	0	5(%5)	0	2(%2)	1(%1)	8(%1,6)
1,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0	0	0
2,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0	0	0
1,0 mg.l ⁻¹ BAP + 1,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	3(%2)	0	0	0	3(%0,6)
0,1 mg.l ⁻¹ BAP + 2,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0	0	0
2,0 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0	0	0
Genotipler Düzeyinde Genel Başarı	0	10(%1)	0	2(%0,2)	1(%0,1)	13(%0,26)

Araştırma kapsamında her bir popülasyon ve besi ortamı için 5 petri üzerinden ve her petride 20 anter olacak şekilde anter kültür çalışması yapılmış olup her bir besi ortamında toplam 500 adet anter kültüre alınmıştır. Her bir popülasyon için ise toplam 1.000 adet anter üzerinden kültür çalışması yürütülmüştür. Çizelge 4.1’in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi kallus oluşumu bakımından kültüre alınan anterlerde en yüksek başarı oranı %5 ile 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamda kültüre alınan Ankara popülasyonunda elde edilmiştir. Bu ortamda kültüre

alınan anterlerden 5 adet kallus elde edilmiştir. Bunu %0,3'lük başarı oranı ile yine Ankara popülasyonunda 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 1,0 mg.l⁻¹ IAA içeren besi ortamında kültüre alınan anterler takip etmiştir ve 3 adet kallus elde edilmiştir. Bunların dışında 0,5 mg.l⁻¹ BAP içeren ortamda kültüre alınan Ankara popülasyonunda %2 oranında başarı, 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamda kültüre alınan Denizli popülasyonunda %2, Isparta popülasyonunda ise %1 oranında başarı kaydedilmiştir. Araştırmaya konu besi ortamları genel olarak değerlendirilecek olursa en yüksek başarı oranı %1,6 ile 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamdaki başarı ve toplam 8 adet kallus elde edilmiştir. Bu ortamı %0,6 başarı oranı ile 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 1,0 mg.l⁻¹ IAA içeren besi ortamı takip etmiş ve bu ortamdaki toplam 3 adet kallus elde edilmiştir. Ayrıca 0,5 mg.l⁻¹ BAP içeren ortamdaki %0,4 oranında başarı oranı ile toplam 2 adet kallus elde edilirken araştırmaya konu diğer ortamlarda herhangi bir başarı kaydedilmemiştir.

Araştırma sonuçları popülasyonlar düzeyinde değerlendirildiğinde ise en yüksek başarı oranı %1 ile Ankara popülasyonundan elde edilmiş bu popülasyonda toplam 10 adet kallus elde edilmiştir. Bunun 2 adet kallus ve %0,2'lik başarı oranı ile Denizli popülasyonu 1 kallus ve %0,1'lik başarı oranı ile Isparta popülasyonu takip etmiştir. Diğer popülasyonlarda ise herhangi bir rejenerasyon gözlenmemiştir. Araştırmaya konu popülasyonların ve besi ortamlarının genel başarı oranı ise %0,26 olarak gerçekleşmiştir ve araştırma süresince toplam 13 adet kallus elde edilmiştir.

Materyal yöntem kısmında da belirtildiği gibi bu çalışma kapsamında farklı IAA ve BAP konsantrasyonlarında çörek otu bitkisinin anter kültür tekniği ile haploid bitki elde etme sürecinde kallus oluşumu üzerine gözlemler yapılmıştır. Elde edilen verilerin analizi, SPSS paket programında yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılıklar, Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Çörek otu anter kültüründe kallus oluşumuna ilişkin varyans analiz tablosu

VK	SD	KT	KO	F	ÖNM.
Kombinasyon	49	7.924	0.162	1.758	0.004
Çeşit	4	1.424	0.356	3.870**	0.005
Besin Ortamı	9	2.404	0.267	2.903**	0.003
Çeşit*Besin Ortamı	36	4.096	0.114	1.237	0.182
Hata	200	18.400	0.092		
Genel	249				

**0.01 Düzeyinde önemli (Duncan)

Çizelge 4.2'nin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi çörek otu anter kültüründe ÇeşitxBesin ortamı interaksiyonunun istatistiki anlamda önemsiz olduğu, ayrı ayrı olmak üzere çeşit ve besin ortamları faktörlerinin ise kendi içinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple her bir faktör kendi içinde değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada ilk aşamada çörek otu bitkisinin her bir popülasyonundan farklı büyüklükte ki çiçek tomurcukları izole edilerek bitki tomurcuğu üzerindeki anterlerin tek çekirdekli mikrospor aşaması belirlenmeye çalışılmıştır. Anter kültür çalışmaları incelendiğinde kullanılan hemen hemen her bitki türünde en yüksek embriyo oluşumu tek çekirdekli mikrospor aşamasında gerçekleşmektedir. Anter kültür tekniğinde polen gelişim aşaması başarıyı etkileyen kompleks bir faktör olarak kabul edilir (Touraev vd., 2001; Malik vd., 2007). Anter kültür çalışması için gerekli anter materyalleri en uygun çiçek tomurcuğu büyüklüğüne geldiğinde (Şekil 4.1), tespit edilerek bitkiden hasat edilmiş ve çörek otu anterlerine asetokarmin uygulaması ile mikroskop altında tek çekirdekli mikrospor aşaması belirlenmiştir.



Şekil 4.1 Çörek otu bitkisinin Çameli çeşidinde anterlerin gelişiminin görünümü

Anter kültürünün haploid bitki elde etmek için bitki ıslahı programlarında sağladığı en önemli avantajlardan birisi klasik ıslah yöntemleriyle uzun yıllar sürecektir olan homozigot saf hatların elde edilebilmesi, sadece bir generasyonda elde edilebilme avantajı sağlamaktadır.

Kültür sırasında ki uygulamalardan veya donör bitkiden kaynaklanan birçok faktör anter kültüründe başarı elde etmeyi etkilemektedir. İn vitro ortamda androgenezisin başarıyla uyartılmasındaki en önemli unsurlardan birisi de daha gelişme aşamasında olan mikrospordlardan anterlerin alınma zamanıdır. Anter kültür tekniğinde en önemli nokta doğal sürecinde ilerleyen polenler gematofit gelişme gösterirken bu süreci embriyonik gelişme ile sona erecek olan sporofitik gelişme aşamasına çevirmektir. Bu nedenle kültüre alınan anterlerdeki mikrosporların gelişme dönemlerini saptamak çok önemlidir. Mikrospordlarda nişasta birikmeye başladıktan sonra haploid bitki elde etmek için süreci sporofotik aşamaya geçirmek kimyasallarla dahi pek mümkün olmamaktadır (Sarıkamış vd., 2000; Ellialtıoğlu vd., 2000).

Geneleksen ıslah metodları ile haploid bitkiler elde etmek genellikle zahmetli, oldukça verimsiz ve zaman alıcı olduğu için anter kültür tekniğinde haploid bitki ıslahı ile daha kısa sürede düşük maliyetli yapılabilmektedir. Anter kültüründe polen embriyogenesis uygulamaları yaygın olmasına rağmen birçok bitki türü anter kültüre yanıt vermemektedir. Birçok bitki türünde mikrosporların polen embriyoidlerine dönüşümü biyokimyasal, moleküler mekanizması ve hücresel işleyişi hala tam olarak bilinmemektedir. Araştırma sayıları ve çalışılan türler arttıkça genotipten bağımsız metodlarda da geliştirilmiş olacaktır (Reynolds 1997; Germanà, 2011). Son yıllarda androgenesisin moleküler temeli üstüne yürütülen araştırmalarda transkriptomik, genomik ve proteomik alanlarında gelişmelerden faydalanılmaktadır. Bütün bu gelişmeler androgenesisde mikrospor embriyogenesisin daha iyi anlaşılacak bunun üzerine yapılan genotipten bağımsız çalışmalarla protokoller geliştirilmesinde önemli bir paya sahiptir (Germanà, 2011).

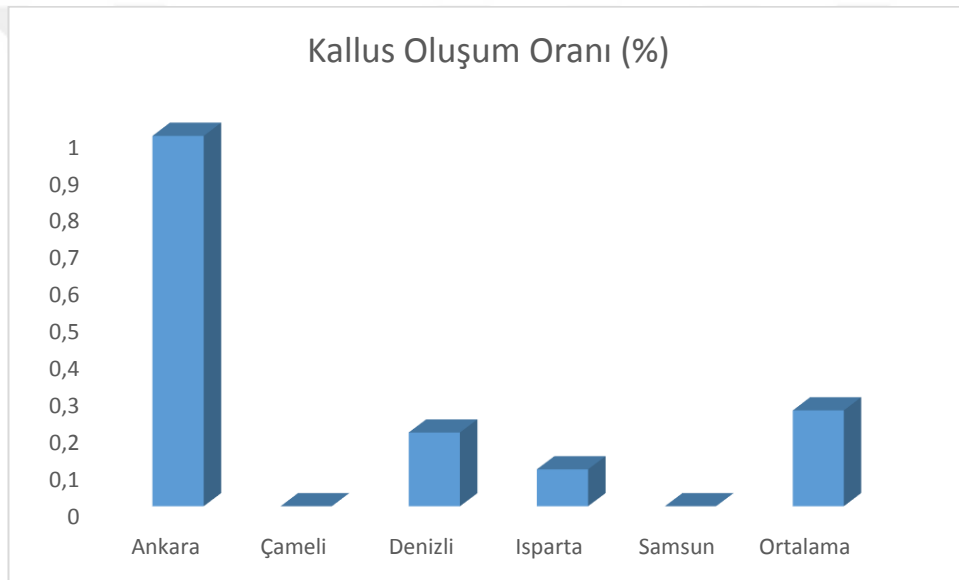
Bu araştırma kapsamında çörek otu genotiplerinin anterleri kullanılarak farklı besi ortamlarındaki haploid bitki üretim potansiyelleri araştırılmıştır. Yapmış olduğumuz literatür taramasına göre şu ana kadar çörek otunda anter kültür aracılığıyla haploid bitki üretimi rapor edilmemiştir. Bu çalışma da her ne kadar yaşama kabiliyetine sahip bitkiler elde edilememiş olsa da anter kültür çalışmaları açısından kallus oluşumu da önem arz etmektedir. Bu bağlamda çörek otu bitkisinde haploid bitkiler elde etmekde gelecekteki çalışmalar için referans oluşturacağı açıktır.

4.1. Çörek Otu Popülasyonlarının Kallus Uyartımı ve Gelişimi Üzerine Etkiler

Araştırmaya konu popülasyonlardan elde edilen kallus oluşum oranlarına göre istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3 Çörek otunda çeşitlere göre kallus oluşumu (%)

Çeşitler	Kallus Oluşumu
Ankara	%1,0 a
Çameli	%0,0 b
Denizli	%0,2 b
Isparta	%0,1 b
Samsun	%0,0 b
Ortalama	%0,26



Şekil 4.2 Çörek otunda çeşitlere göre kallus oluşum oranlarının dağılımı (%)

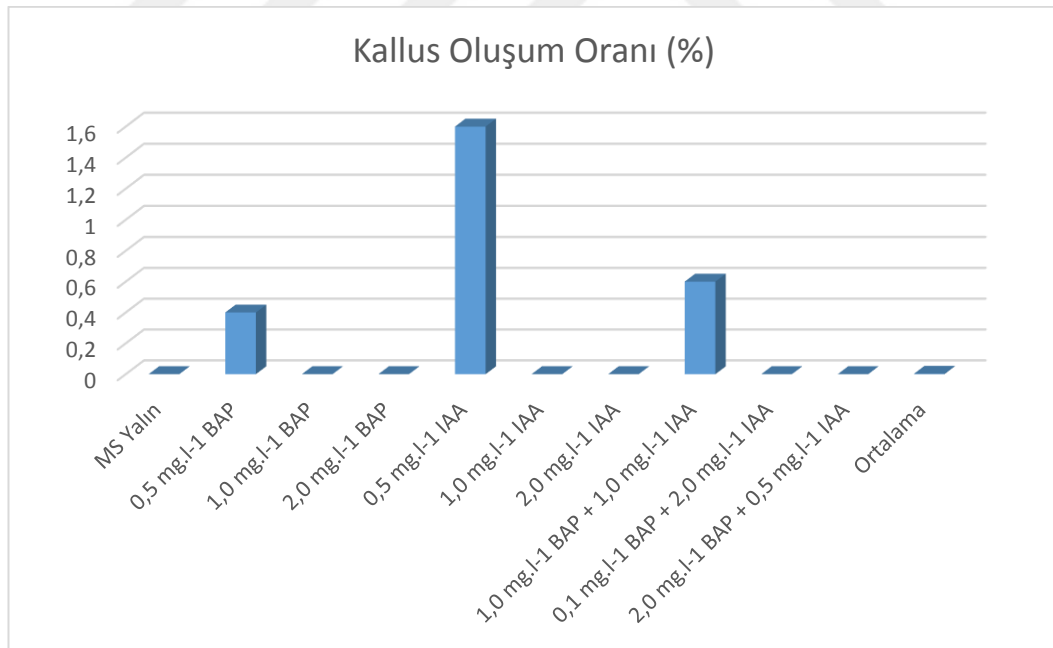
Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2'nin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi araştırmaya konu popülasyonlardan kallus oluşumu bakımından sadece Ankara popülasyonunda önemli düzeyde fark tespit edilmiştir. Diğer popülasyonlar arasında ise istatistiki anlamda bir fark tespit edilmemiştir. Çörek otu bitkisinde 5 farklı popülasyon üzerine yapılan bu çalışmada incelenen popülasyonlar açısından anter kültür tekniğinin geliştirilmesinde en uygun genotipin, toplam 10 kallus oluşumunun gözlemlendiği Ankara genotipi olduğu anlaşılmaktadır.

4.2. Çörek Otu Genotiplerinde Besin Ortamının Kallus Uyartımı ve Gelişimi Üzerine Etkiler

Araştırmaya konu besi ortamlarından elde edilen kallus oluşum oranlarına göre istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 Çörek otunda besin ortamına göre kallus oluşumu (%)

Besin Ortamı	Kallus oluşumu
MS Yalın	%0,0 b
0,5 mg.l ⁻¹ BAP	%0,4 b
1,0 mg.l ⁻¹ BAP	%0,0 b
2,0 mg.l ⁻¹ BAP	%0,0 b
0,5 mg.l ⁻¹ IAA	%1,6 a
1,0 mg.l ⁻¹ IAA	%0,0 b
2,0 mg.l ⁻¹ IAA	%0,0 b
1,0 mg.l ⁻¹ BAP + 1,0 mg.l ⁻¹ IAA	%0,6 b
0,1 mg.l ⁻¹ BAP + 2,0 mg.l ⁻¹ IAA	%0,0 b
2,0 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ IAA	%0,0 b
Ortalama	%0,26



Şekil 4.3 Çörek otunda besin ortamına göre kallus oluşum oranlarının dağılımı (%)

Çizelge 4.4 ve Şekil 4.3'ün incelenmesinden de anlaşılabacağı gibi araştırmaya konu besi ortamları içerisinde en iyi kallus oluşumu 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren besi ortamından elde edilmiştir. Diğer besin ortamları arasında istatistiki anlamda önemli bir fark tespit edilmemiştir.

Araştırmaya konu besi ortamları içerisinde hormon ilavesi yapılmayan besi ortamında, 1,0 mg.l⁻¹ BAP içeren besi ortamında, 2,0 mg.l⁻¹ BAP içeren besi ortamında, 1,0 mg.l⁻¹ IAA içeren besi ortamında, 2,0 mg.l⁻¹ IAA içeren besi ortamında, 0,1 mg.l⁻¹ BAP-2,0 mg.l⁻¹ IAA ve 2,0 mg.l⁻¹ BAP-0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren besi ortamlarında araştırmaya konu 5 popülasyonda da kallus oluşumu veya herhangi bir rejenerasyon gözlenmemiştir. Çörek otu bitkisinde anter kültür tekniğinin geliştirilmesi üzerine yapılan bu çalışmada en iyi sonucun 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamda 5 kallus oluşumu ile Ankara popülasyonundan elde edildiği belirlenmiştir. 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren MS besi ortamında Isparta genotipinde 1 kallus ve aynı zamanda 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren besi ortamında Denizli popülasyonunda 2 kallus oluşumu gözlemlenerek 0,5 mg.l⁻¹ IAA ilaveli besi ortamında çörek otu bitkisinde anter kültür tekniğiyle kallus oluşumunda olumlu sonuçlar elde edildiği görülmektedir.

6-Benzil amino pürin (BAP) sitokinlerin yapay bir formudur. İndol-3-asetik asit (IAA) ise oksinlerin doğal bir formudur. Oksin ve sitokinlerin birlikte kullanıldığı durumlarda kullanım miktarları ve oranlarına göre bitkiler veya bitki dokuları üzerine etkileri yapılan çalışmalarda şu şekilde özetlenmiştir: Besi ortamında kullanılan yüksek oranda BAP + düşük oranda IAA sürgün oluşumunu teşvik etmektedir. Kullanılan bitki büyüme düzenleyicisinin tipine ve genotipe de bağlı olmakla beraber belirli bir eşiğe kadar olan yüksek oranda ki IAA ve düşük miktarlardaki BAP ise kök oluşumunu teşvik etmektedir. Her iki hormonun yüksek oranda ve eşit miktarda besi ortamına ilave edilmesi ve ayrıca tek başına da olsa çok yüksek oranda kullanılan oksin grubu hormonlar kallus oluşumunu teşvik etmektedir (Rost vd., 2006; Kauth vd., 2008). Bu çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek kallus oluşumu 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Bu sonuçlar Rost vd. (2006) ve Kauth vd. (2008) tarafından verilen bu genel bilgilerle tam anlamıyla örtüşmese de genotip başta olmak üzere birçok bileşenin doku kültürü çalışmalarındaki başarı üzerine etkisi göz ardı edilemez.

Araştırma kapsamında kültüre alınan 0,5 mg.l⁻¹ BAP içeren MS ortamında Ankara popülasyonuna ait anterlerden elde edilen kallusa ait görüntü Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4 Ankara genotipinde $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP içeren besi ortamında kallus oluşumuna ilişkin bir görüntü

Araştırma kapsamında kültüre alınan $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ IAA ve $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP içeren MS ortamında Ankara popülasyonuna ait anterlerden elde edilen kallusa ait görüntü Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5 Ankara genotipinde $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ IAA ve $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP içeren besi ortamında kallus oluşumuna ilişkin bir görüntü

Araştırma kapsamında kültüre alınan $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ IAA içeren MS ortamında Denizli popülasyonuna ait anterlerden elde edilen kallusa ait görüntü Şekil 4.6’de verilmiştir.



Şekil 4.6 Denizli genotipinde 0,5 mg.l-1 IAA içeren MS besi ortamında kallus oluşumuna ilişkin bir görüntü

5.SONUÇ

Son yıllarda toplumların doğal ve bitkisel ürünlere olan ilgisi artış eğilimdedir. Çörek otu bitkisi hem sağlık üzerine etkilerinden hem de birçok alanda kullanıma sahip olmasından ötürü ilgiyi üzerinde toplayan bitkiler arasında yer almaktadır.

Ülkemizde de çörek otu üretim alanı son sekiz yılda artış eğilimi göstermektedir. Ancak hem dünya hem de ülkemiz açısından çok önemli bir bitki olmasına rağmen ülkemizde geliştirilmiş tek çeşit (Çameli) bulunurken dünyada da çok az sayıda ticari çeşit bulunmaktadır. Bitki aynı zamanda yeteri kadar bilimsel araştırmaya konu olmamıştır. Bu bitki üzerinde yapılacak çalışmalara ivme verilmesi bitkinin tarımsal üretim deseni içerisinde hak ettiği yeri alması bakımından son derece önem arz etmektedir. Geleneksel bitki ıslah yöntemleriyle birçok kültür bitkisinde olduğu gibi çörek otunun ıslahı da uzun süreç gerektirmekte ve istenilen özelliklerin kazanılması için ihtiyaç duyulan varyabilitenin kazandırılmasında yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda kullanılan biyoteknolojik ıslah yöntemleri bu süreci kısaltarak ıslahta karşılaşılan sorunlara daha pratik çözümler sunmaktadır.

Yeni nesil ıslah çalışmalarında haploid bitki üretimi gittikçe daha da önemli hale gelmekte ve bu yöntemler biyoteknolojik araç olarak kullanım alanı yaygınlaşmaktadır. Tarımsal açıdan önemli olan bitkilerin ıslah çalışmalarında biyoteknolojik yöntemlerle protokol geliştirilmesi haploid bitki üretiminde önemlidir. Kontrollü bir ortamda haploid ve double haploid bitkiler elde etmek için en yaygın olarak kullanılan yöntem anter kültürüdür (Germanà, 2011). Bu araştırma kapsamında ülkemizin farklı illerinden (Ankara, Samsun, Denizli, Isparta) temin edilen çörek otu popülasyonları ve Çameli çörek otu çeşidi kullanılarak anter kültür tekniği geliştirilmeye çalışılmış ve double-haploid bitkilerin eldesi amaçlanmıştır. 10 farklı besi ortamında haploid bitki üretim potansiyelleri araştırılarak, gelecekteki bitki ıslah çalışmalarında çörek otu bitkisinde kullanılacak besi ortamı protokollerinin geliştirilmesine ve %100 homozigot bitkilerin elde edilmesine katkı sağlaması amaçlanmıştır. İstatiksel analiz ve gözlemler sonucu elde edilen verilerin değerlendirilmesi maddeler halinde aşağıda verilmiştir.

a. Bitki büyüme düzenleyicisi ilavesi yapılmayan yalın besi ortamında, 1,0 mg.l⁻¹ BAP içeren besi ortamında, 2,0 mg.l⁻¹ BAP içeren besi ortamında, 1,0 mg.l⁻¹ IAA içeren besi

ortamında, 2,0 mg.l⁻¹ IAA içeren besi ortamında, 0,1 mg.l⁻¹ BAP + 2,0 mg.l⁻¹ IAA ve 2,0 mg.l⁻¹ BAP + 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren besi ortamlarında 5 popülasyonda rejenerasyon gözlenmemiştir.

b. 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren MS besi ortamında Ankara popülasyonunda 5 adet, Denizli genotipinde 2 adet, Isparta genotipinde 1 adet kallus oluşumu gerçekleşmiştir. En iyi sonucun alındığı 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren besi ortamında genel kallus oluşum başarı oranı %1,6 olarak gerçekleşmiştir.

c. 0,5 mg.l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında Ankara popülasyonunda 2 adet kallus oluşumu sağlanmıştır ve genel kallus oluşum başarı oranı %0,4' olarak gerçekleşmiştir.

d. 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 1,0 mg.l⁻¹ IAA içeren MS besi ortamında Ankara popülasyonunda 3 adet kallus oluşumu sağlanmıştır ve genel kallus oluşum başarı oranı %0,6 olarak gerçekleşmiştir.

e. Araştırma sonuçları popülasyonlar düzeyinde değerlendirildiğinde ise en yüksek başarı oranı %1 ile Ankara popülasyonundan elde edilmiş bunu %0,2 ile Denizli popülasyonu %0,1 ile Isparta popülasyonu takip etmiştir. Diğer popülasyonlarda ise herhangi bir rejenerasyon gözlenmemiştir.

f. Araştırmaya konu popülasyonların ve besi ortamlarının genel başarı oranı ise %0,26 olarak gerçekleşmiştir.

Sonuç olarak; araştırma kapsamında elde edilen veriler ışığında bitki rejenerasyonu sağlanamamış ancak düşük oranlarda da olsa çörek otunda anter kültür tekniği uygulanarak kallus oluşumu gerçekleştirilmiştir. Hiç kuşkusuz bu araştırmanın farklı genotiplerle ve farklı bitki büyüme düzenleyicileri/büyüme düzenleyicisi oranları ile tekrar edilmesi sonuçları olumlu veya olumsuz yönde etkileyebilecektir. Elde edilen sonuçlar çörek otunun anter kültür tekniğiyle ıslahına yönelik protokollerin geliştirilmesinde ve haploid bitki elde edilmesi için yapılacak çalışmalara katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abu-Hammour, K.A., Al-Ghzawi, A.A., Zaitoun, S.T. (2010). The effect of bee visitors and style movement on seed set of *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) grown under semiarid conditions. *Advances in Horticultural Science*, (pp. 109-114).
- Akgören, G. (2011) *Bazı çörek otu (Nigella sativa L.) popülasyonlarının tarımsal özellikleri* Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
- Al-Ani, N.K. (2008). Thymol production from callus culture of *Nigella sativa* L.. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, (18(2), pp. 181-185).
- Aldemita, R.R., Zapata, F.J (1991). Anther culture of rice: effects of radiation and media components on callus induction and plant regeneration, *Cereal Research Communications*, (19:9, pp. 32).
- Alemanno, L., Guiderdoni, E. (1994). Increased doubled haploid plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) anthers cultured on colchicine-supplemented media. *Plant Cell Reports*, (13(8), pp. 432-436)
- Al-Salih, H.S. (2012). Evaluation of deltamethrine pesticide effect in the plant cell growth using *Nigella sativa* L. callus cultures. *Rafidain Journal of Science*, 23(4A), 128-136.
- Altındal, N., Akgün, İ. (2019), Çavdarda (*Secale cereale* L.) anter kültür ile kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine genotip, soğuk uygulama ve besi ortamlarının etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (16), 559-566.
- Arslan, N., Gürbüz, B., Özcan S. (2000). Türkiye’de doğal bitkilerin kullanımı ve ticareti. *Ekim Dergisi*, (12),98-104.
- Asadi, A., Zebarjadi, A., Abdollahi, M.R., Seguí-Simarro, J. M. (2018). Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica*, 214(11), 216.
- Ball, S.T., Zhou, H.P., Konzak C.F. (1993). Influence of 2, 4D, IAA and duration of callus induction in anther culture of spring wheat. *Plant Science*, 90:195–20

- Banerjee, S., Gupta, S. (1975). Morphogenesis in tissue cultures of different organs of *Nigella sativa*. *Physiologia Plantarum*, 33(3), 185-187.
- Banerjee, S., Gupta, S. (1976). Embryogenesis and differentiation in *Nigella sativa* leaf callus in vitro. *Physiologia Plantarum*, 38, 115-120. doi: 10.1111/j.1399-3054.1976.tb04869.x
- Bansal, Y.K., Sen, S. (1983). Endoreplication in relation to organ development. *Cell and Chromosome Research*, 6: 19-21.
- Barkoudah, Y. (1998). Black cumin, a neylected food and medicinal plant. *Cwana Nevslatter*, 17:5.
- Baydar, H. (2016). *Tıbbi ve aromatik bitkiler bilimi ve teknolojisi ((51) 339)*. Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Isparta.
- Baytop, T. (1999). *Türkiye’de bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün)*. İstanbul: İstanbul Nobel Tıp Kitapevi.
- Baytöre, F. (2011) *Bazı çörek otu (Nigella sativa L.) popülasyonlarının verim ve verim kriterlerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Bibi, A., Khan, M.A., Adil, M., Mashwani, Z.U.R. (2018). Production of callus biomass and antioxidant secondary metabolites in black cumin. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 28(5).
- Biswas, A.K., Chatterjee, A.K. (1971). Studies on the induction of ploidy in some species. *Bulletin of the Botanical Society of Bengal*, 25: 19-21.
- Biswas, A.K., Datta, A.K. (1982). Studies on induced autotetraploids in *Nigella sativa* L. *Cell Chromosome Research*. 5: 81-83.
- Blakeslee, A.F., Belling, J., Farnham, M.E., Bergner, A.D. (1922). A haploid mutant in the jimson weed. *Datura Stramonium Science*, (55)-1433.
- Cao, M. Q., Li, Y., Liu, F., Jiang, T., Liu, G. S. (1995). Application of anther culture and isolated microspore culture to vegetable crop improvement. *Acta Horticulturae*, 392:27-28.
- Ceylan, A. (1996). *Tıbbi bitkiler-II (Uçucu yağ bitkileri)*. No:481, s.283-286. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını.

- Chand, S., Roy, S.C. (2014). Effects of different auxins on chromosome behaviour of leaf callus tissues of *Nigella sativa*. *Cell Chromosome News Letter*. 1: 10.
- Chand, S., Roy, S.C. (1982). Effects of different hormones on the initiation of callus tissues from seeds of *Nigella sativa* L. *Cell and Chromosome Research*, 5: 74.
- Corduan, G. (1975) Regeneration of anther derived plants from anthers of *Hyoscyamus niger*. *Planta (Berl)*, 127:27–36.
- Coşkun, Y. (2011) *Mikrospor kültürü ile makarnalık buğday bitkisinde (triticum durum desf.) bitki rejenerasyonu*. T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Isparta.
- Çakmak, E., Uncuoğlu, A.A., Aydın, Y. (2019). Evaluation of in vitro genotoxic effects induced by in vitro anther culture conditions in sunflower. *Plant Signaling & Behavior*, 14(9), 1633885.
- Datta, A.K., Biswas, A.K., Ghosh, P.D. (1983). Chromosomal variations in callus tissues of two species of *Nigella*. *Nucleus*, 26: 173-177.
- Duran, R.E. (2007) *Tuzlu koşullar için geliştirilebilecek buğday genotiplerinin anter kültür tekniğine uyumu*. T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Isparta.
- Elhag, H., El-Olemy, M.M., Al-Said, M.S. (2004). Enhancement of somatic embryogenesis and production of developmentally arrested embryos in *Nigella sativa* L. *Horticultural Science*, 39(2), 321-323.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K. (2000). *Haploid bitki üretimi* (137-189). Bitki Biyoteknolojisi, Konya.
- El-Mahrouk, M.E., Maamoun, M.K., El-Banna, A.N., Omran, S.A., Dewir, Y.H., El-Hendawy, S. (2018). In vitro gynogenesis and flow cytometry analysis of the regenerated haploids of black cumin (*Nigella sativa*). *Horticultural Science*, 53(5), 681-686.
- El-Mahrouk, M.E., Maamoun, M.K., Dewir, Y.H., Omran, S.A. & EL-Banna, A.N. (2015). Morphological and molecular characterization of induced mutants in *Nigella sativa* L. using irradiation and chemical mutagens. *Egyptian Journal of Plant Breeding*, 19(3): 257-272.

- ElNour, E.M., Mahmood, Z.A., Futooh, Y., Sanaa, O. (2015). In Vitro Callus Induction and Antimicrobial Activities of Callus and Seeds Extracts of *Nigella sativa* L. *Journal of Biology*, 3(3), 21-28.
- El-Tahir, K.E.D.H., Bakeet, D.M. (2006). The black seed *Nigella sativa* linnaeus-a mine for multi cures: a plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 1(1), 1-19.
- Foroughi-Wehr, B., Mix, G. (1976). In vitro responses of *Hordeumvulgare* L. anthers cultured from plants grown under different environments. *Environmental and Experimental Botany*, 19:303–309
- Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J., Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12(8), 368-375.
- Gambino, G., Ruffa, P., Vallania, R. ve Gribaudo, I., (2007). Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90 (1), 79-83.
- Germana, M. A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 104(3), 283-300.
- Guha, S., Maheswari, S.C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *datura*. *Nature*, 204-497.
- Hatipoğlu, R. (2015). *Bitki Biyoteknolojisi*. Ders Kitabı, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Yayın No:176, Adana.
- Hidaka, T., Yamada, Y., Shichijo, T. (1979). In vitro differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Japanese Journal of Breeding*, 29(3), 248-254.
- Hooghvorst, I., Ramos-Fuentes, E., López-Cristofannini, C., Ortega, M., Vidal, R., Serrat, X., Nogués, S. (2018). Antimitotic and hormone effects on green double haploid plant production through anther culture of Mediterranean japonica rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 134(2), 205-215.
- İlisulu, K. (1992). *İlaç ve baharat bitkileri*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yayın No :1256 Ders Kitabı No:360, Ankara.

- Kalloo, D., (1986). *Vegetable breeding volume III*. (136-140). CRC Press. Inc. Boca raton, Florida.
- Kauth, P.J., Dutra, D., Johnson, T.R., Stewart, S.L., Kane, M.E., Vendrame, W. (2008). Orchid seed germination. *Chapter 38. Techniques and applications of in vitro orchid seed germination*, (pp. 375-391) Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues, Global Science Books.
- Kimber, G., Riley, R. (1963). Haploid angiosperms. *The Botanical Review*, 29: 480–531.
- Köktil, G., İlçim, A., Özbilgin, B., Uygun, C. (2006). Morphology and stem anatomy of some species of genus *Nigella* L. in Turkey. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35 (1): 19-41.
- Kumar, S., Roy, S.C. (1996). Cytological changes leading to loss of differentiation in *Nigella sativa* (Ranunculaceae). *Bangladesh Journal of Botany*, 25: 165- 170.
- Kurt, O. (2004). *Bitki Islahı*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ders Kitabı, 2. Baskı. Yayın No: 43.
- Maheshwari, S.C., Raishid, A., Tyagi, A.K. (1983). Anther pollen culture for production of haploids and their utility. *IAPTC Newsletter* 41: 2–7.
- Malik, M.R., Wang, F., Dirpaul, J.M., Zhou, N., Polowick, P.L., Ferrie, A.M.R., Krochko, J.E. (2007). Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Journal of Plant Physiology*, 144:134–154.
- Małuszyński, M., Kasha, K., Szarejko, I. (2003). *Published doubled haploid protocols in plant species*, (pp. 309–335). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherland.
- Mohammad, A.M.S., Jumma, N.E. (2006). Partial Purification of Glutamate Dehydrogenase from the Callus of Stems of (*Nigella sativa* L.) in the Presence of 2,4- D or PDA. *Rafidain Journal of Science*, 17, 80-93.
- Morgana, C., Di Lorenzo, R., Carimi, F., (2004). Somatic embryogenesis of *Vitis vinifera* L. (cv. Sugraone) from stigma and style culture, *Vitis*, 43 (4), 169-173.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.

- Murigneux, A., Barloy, D., Leroy, P., Beckert, M. (1993). Molecular and morphological evaluation of doubled haploid lines in maize. 1. Homogeneity within DH lines Theor. *Theoretical and Applied Genetics*. 86 837-842.
- Niizeki, H., Oono, K., (1968), Induction of haploid rice plant from anther culture, *Proceedings of the Japan Academy*, 44 (6), 554-557.
- Özel, A., Demirel, U., Güler, İ., Erden, K. (2009) Farklı sıra aralığı ve tohumluk miktarlarının çörek otunda (*Nigella sativa* L.) verim ve bazı tarımsal karakterlere etkisi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*; 13(1), 17-25.
- Paramanik, R.C., Chikkaswamy, B.K., Achinto, P. (2007). Effect of plant hormones on growth, and yield of black cumin (*Nigella sativa* L.). *Journal of Phytological Research*, 20(2), 251-254.
- Pintos, B., Manzanera, J.A., Bueno, M.A. (2007). Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture. *Journal of Plant Physiology*, 164(12), 1595-1604.
- Pulido, A., Bakos, F., Castillo, A., Vallés, M.P., Barnabas, B., & Olmedilla, A. (2005). Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: Fe deposits in isolated-microspore cultures. *Journal of Structural Biology*, 149(2), 170-181.
- Rakha, M.T., Metwally, E.I., Moustafa, S.A., Etman, A.A., & Dewir, Y.H. (2012). Evaluation of regenerated strains from six 'Cucurbita' interspecific hybrids obtained through anther and ovule 'in vitro' cultures. *Australian Journal of Crop Science*, 6(1), 23-30.
- Randhawa, M.A., Alghamdi, M.S. (2011). Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed) a review. *The American Journal of Chinese Medicine*, 39(06), 1075-1091.
- Reynolds, T.L. (1997). Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33:1-10.
- Reynolds, T.L. (1993). A cytological analysis of microspores of *Triticum aestivum* (poaceae) during normal ontogeny and induced embryogenic development. *American Journal of Botany*, 80 (5), 569-576.

- Rezaei, F., Isik, S., Kartal, M., Erdem, S. A. (2018). Effect of priming on thymoquinone content and in vitro plant regeneration with tissue culture of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds. *Journal of Chemical Metrology*, 12(2), 98.
- Riaz, M., Syed, M., Chaudhary, F.M. (1996). Chemistry of the medicinal plants of the genus *Nigella*. *Hamdard Medicus*, 39(2).
- Rost, T.L., Barbour, M.G., Stocking, C.R., Murphy, T.M. (2006). *Plant Biology* 2nd. Edition, Thomson Brooks/Cole, Australia.
- Rudolf, K., Bohanec, B., Hansen, M. (1999). Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. capitata L.: Genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breeding*, 118(3), 237-241.
- Saha, A., Datta, A.K. (2002). Induced autotetraploidy in black cumin (*Nigella sativa* L.). *Indian Journal Genetic*. 62: 275-276.
- San Noeum, L.H. (1976). Haploides d'*Hordeum vulgare*. L. par culture in vitro. *Plantes*, 26 751 754.
- Sarıkamış, G., Ellialtıoğlu, Ş., Yanmaz, R. (2000, Eylül 11-13). *Lahanada çiçek tomurcuğu morfolojisi ile mikrospor gelişme dönemi arasındaki ilişkinin belirlenmesi* [III. Sebze Tarımı Sempozyumu], Isparta, s: 72-75.
- Shah, S.H., Ahmad, I. (2006). Effect of gibberellic acid spray on growth, nutrient uptake and yield attributes during various growth stages of black cumin (*Nigella sativa* L.). *Asian Journal of Plant Sciences*. 5: 881-884.
- Subrahmanyam, N.S. (2009). Modern plant taxonomy. *Publishing House Pvt, Ltd*, New Delhi, India
- Touraev, A., Prosser, M., Heberle-Bers, E. (2001). The microspore: a haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35:53–109.
- Tripathy, S.K., Swain, D., Mohapatra, P.M., Prusti, A.M., Sahoo, B., Panda, S., Behera, S.K. (2019). Exploring factors affecting anther culture in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 7(2), 87-92.

- Türkiye Bitkileri Veri Servisi [TUBİVES], (2019). Türkiye Bitki Verileri Servisi. <https://www.tubives.com> adresinden erişildi (E.T. 29.12.2019).
- Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK], (2020). Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr> adresinden erişildi (E.T. 29.10.2020).
- Veilleux, R.E. (1994). Development of new cultivars via anther culture. *Horticultural Science*, 29 (11):1238-1241.
- Verma, S.K., Yücesan, B.B., Gürel, S. (2011). Indirect somatic embryogenesis and shoot organogenesis from cotyledonary leaf segments of *Digitalis lamarckii* Ivan, an endemic medicinal species. *Turkish Journal of Biology*, 35, 743–750.
- Yang, H.Y., Zhou, C. (1982). In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. *Theoretical and Applied Genetics*, 63(2), 97-104.
- Youssef, A.A., Rady, M.R., Ghanem, S. A. (1998). Growth and some primary products in callus cultures of *Nigella sativa* as influenced by various cultural conditions and salt stress. *Fitoterapia*, LXIX 4: 329-336.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23, 283–333.
- Zheng, M.Y. (2003). Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) – doubled haploid production via induced embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3, 213-230.
- Zhong, J.J., Bai, Y., Wang, S.J. (1996). Effects of plant growth regulators on cell growth and ginsenoside saponin production by suspension cultures of *Panax quinquefolium*. *Journal of Biotechnology*, 45, 227–234.
- Zohary, D., Hopf, M. (2000). *Domestication of plants in the Old World: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley* (3rd ed.), (pp. 206). Oxford University press.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“ÇÖREK OTU (*NİGELLA SATİVA* L.) BİTKİSİNDE ANTER KÜLTÜR TEKNİĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Semra TİRİNK

... / ... / ...