

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
2022-YL-082

**ÇÖREK OTU (*Nigella sativa* L.) BİTKİSİNDE EMBRİYO
KÜLTÜRÜ ARACILIĞIYLA ISLAH HATLARININ
GELİŞTİRİLMESİ**

Merve AYDIN MORTAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hüseyin UYSAL

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından ZRF-19028 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2022

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı öğrencisi Merve Aydın MORTAŞ tarafından hazırlanan “ÇÖREKOTU (*Nigella sativa* L.) BİTKİSİNDE EMBRİYO KÜLTÜRÜ ARACILIĞIYLA İSLAH HATLARININ GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/08/2022

Üye (T.D.) : Doç. Dr. Hüseyin UYSAL Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Faik KANTAR Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Doç. Dr. Emre SEVİNDİK Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

.....

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Fen Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan numaralı Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gönül AYDIN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Akademik öğrenimim süresince tez çalışmalarım boyunca ve tamamlanmasında fikirlerini benimle paylaşan çalışmalarımın her aşamasında anlayış ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hüseyin Uysal'a öncelikli teşekkürlerimi sunarım. ZRF-19028 no'lu tez projesinin yürütülmesindeki desteklerinden ötürü Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimine teşekkür ederim. Yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Emre Sevindik'e çok teşekkür ederim. Akdeniz Üniversitesi'nde gerçekleştirdiğim çalışmalarında yardımlarından dolayı sayın Doç. Dr. Esin Arı hocama teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca eğitim ve öğretim hayatımda bu aşamaya gelmemi sağlayan gerek insani olarak gerek akademik olarak örnek aldığım, hayatımda kalıcı izler bırakan kıymetli hocalarım Arş. Gör. Ahmet Say, Dr. Öğr. Üyesi Cevahir Kaynakçı, Prof. Dr. Deniz Ekinci, Doç. Dr. Kahraman Gürcan, Prof. Dr. Mahmut Kaplan, Prof. Dr. Sibel Silici emeğiniz ve katkılarınız için müteşekkirim, saygılarımı sunarım.

Annem ve Babam, bugün olduğum kişi olmam verdiğiniz koşulsuz sevgi ve özveriniz sayesinde. Hayatım boyunca maddi manevi yardım ve desteklerinizin yanında göstermiş olduğunuz sabır ve anlayıştan dolayı müteşekkirim. Güzel kalbiniz, merhametiniz, emeğiniz bu hayattaki pusulam. Sizin çocuğunuz olmanın şansını her daim hissediyorum. Ve kardeşlerim, manevi desteğinizi ve sevginizi her daim hissediyorum, varlığınız bu hayattaki kalkanım. Her şey için teşekkür ederim. Sevgili ablam ve eniştem, bugünlere gelmemde sizlerin emeği ve katkısı büyüktür. Hayatımda olduğunuz, varlığınız, Tuana Azra ve Hüma Gül'ümüzü hayatımıza kattığınız için sevgiyle teşekkürlerimi sunuyorum. İyi ki varsınız.

Yirmi yedi yaşından sonra edindiğim Nurper annem ve Faruk babam, iyi niyetinizi, merhametinizi, sevginizi ve desteğinizi her zaman kalbimde hissettirmekle kalmayıp beni kızınız gibi hissettirmeniz ve yaşatmanız ne büyük şans. Her şey için çok teşekkür ederim.

Hayat arkadaşım Alper, seninle birlikte yürümeye başladığım yollar hep daha ferah. Bu tezi yazarken verdiğin desteğin tarifi yok. Kalbinin güzelliğiyle bu yolda da ferahlattın, yükümü hafiflettin. Sadece bu tez değil, hayatıma geldiğinden beri en zor zamanlarımda, en heyecanlı anlarımda, hüznümde, sevincimde hep sen vardın. Sabrın, anlayışın, inancın için minnettarım. Hep ol. Hayatı benimle deneyimlemeyi seçtiğin için, her şey için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Çörek Otu Hakkında Genel Bilgi.....	2
1.2. Çörek Otunun Sistematığı ve Dağılımı	3
1.3. Botanik Yapısı	4
1.4. Kimyasal Yapısı	5
1.5. Türkiye Çörek Otu Üretimi.....	5
1.6. Çörek Otu Tüketimi	7
1.7. Embriyo Kültürü.....	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	12
2.1. Embriyo Kültürü ile İlgili Çalışmalar.....	12
2.2. Çörek Otunda In Vitro Kültür Çalışmaları	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Bitki Materyali	21
3.1.2. Besi Ortamları	21
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi	22

3.2.2. Çalışmada Kullanılan MS Besi Ortamının Hazırlanması.....	23
3.2.3. Çörek Otu Melezleme İşlemi	24
3.2.4. Çörek Otu Kapsüllerinin Yüze Sterilizasyonu	26
3.2.5. Embriyoların Kültüre Alınması	26
3.2.6. Verilerin Toplanması ve Analizi	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. Araştırmanın İlk Sezonu.....	28
4.1.1. Melezleme Çalışmaları	28
4.1.2. Embrio Kültürü Çalışmaları	28
4.2. Araştırmanın İkinci Sezonu	30
4.2.1. Melezleme Çalışmaları	30
4.2.2. Embriyo Kültürü Çalışmaları (2. Sezon).....	30
4.2.2.1. Kallus Oluşumuna İlişkin Bulgular	31
4.2.2.2. Kalluslardan Elde Edilen Bitkicik Sayılarına İlişkin Bulgular	33
4.2.2.3. Direkt Çimlenmeye İlişkin Bulgular	34
4.3. Besi Ortamına göre Kallus Oluşumu ve Çimlenme	37
4.4. Melezleme Kombinasyonlarına göre Kallus Oluşumu ve Çimlenme.....	38
5. SONUÇ.....	40
KAYNAKLAR	41
BİLİMSEL ETİK BEYANI	52
ÖZ GEÇMİŞ	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu\text{mol/L}$: 1 Litre Başına Mikromol
2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid
BAP	: 6-Benzil Amino Pürin
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: Kalsiyum Klorür monohidrat
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Kalsiyum Klorür hexahidrat
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: Bakır Sülfat pentahidrat
da	: Dekar
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Demir Sülfat Heptahidrat
g	: Gram
g/l	: Gram/Litre
GA	: Gibberellin
GA3	: Gibberellik Asit
H_3BO_3	: Borik Asit
HCl	: Hydrochloric Acid
IAA	: İndol-3-Asetik Asit
kg	: Kilogram
KH_2PO_4	: Mono Potasyum Fosfat
KI	: Potasyum İyodür
KNO_3	: Potasyum Nitrat
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mg. l^{-1}	: Miligram Litre
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Magnezyum Sülfat Heptahidrat
ml	: Mililitre
mm	: Mili Metre
mM	: Milimolar
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Mangan Sülfat Heptahidrat

MS	: Murashige ve Skoog Besin Ortamı (1962)
Na₂ – EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
Na₂MoO₄H₂O	: Sodyum Molibdat Monohidrat
NAA	: Naphthaleneacetic Acid
NH₄NO₃	: Amonyum Nitrat
PDA	: Polydopamine
pH	: Power of Hydrogen
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
Zea	: Zeatin
ZnSO₄. 7H₂O	: Çinko Sülfat Heptahidrat



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye’de yıllara göre çörek otu ekim alanı	6
Şekil 1.2. Türkiye’de yıllara göre çörek otu üretim miktarı.....	6
Şekil 1.3. Türkiye’de yıllara göre çörek otu verimi	7
Şekil 1.4. Ayçiçeğinde olgunlaşmamış embriyoların kültürü ile yaşam çemberinin kısaltılması	11
Şekil 4.1. Besi ortamına göre kallus oluşumu ve çimlenme.....	37
Şekil 4.2. Melezleme kombinasyonlarına göre kallus oluşumu ve çimlenme	38



RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1. Çörek otu tohumu ekimi sonrası saksılar ait sera koşullarında bir görüntü.....	23
Resim 3.2. Çörek otu bitkilerinin saksılardaki gelişme durumlarına ilişkin bir görüntü	23
Resim 3.3. Emesküle için uygun büyüklükteki tomurcuk ve emeskülasyon aşaması	25
Resim 3.4. Emesküle edilmiş tomurcuk ve emeskülasyondan 1 gün sonra tozlama	25
Resim 3.5. Tozlama işlemi sonrası yabancı tozlaşmayı önlemek adına melez kapsüllerin izolasyonu	25
Resim 3.6. Hasat edilmiş melez kapsüller ve sterilizasyon işlemi.....	26
Resim 3.7. Zigotik embriyoları içeren tohum taslaklarının kültürü	27
Resim 4.1. Zigotik tohum taslaklarının kültürlerinde regenerasyonlar.....	30
Resim 4.2. Kültüre alınan tohum taslaklarında kallus oluşumlarına ilişkin resimler	32
Resim 4.3. Araştırmada elde edilen kalluslardan bitkicik oluşumu.....	34
Resim 4.4. Kültüre alınan tohum taslaklarında direk çimlenme	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan MS ortamının kimyasal içeriği	21
Çizelge 3.2 Embriyo kültür çalışmasında kullanılan besi ortamlarının BAP ve IAA kombinasyonları.....	22
Çizelge 4.1 Araştırmaya konu popülasyonlar arasında araştırmanın ilk yılında yapılan melezleme çalışmaları.....	28
Çizelge 4.2 Araştırmanın ilk yılında gerçekleştirilen embriyo kültürü çalışmasına ilişkin olarak besi ortamlarına göre kültüre alınan tohum taslaklarının sayıları ve başarı oranları	29
Çizelge 4.3 Araştırmaya konu popülasyonlar arasında araştırmanın 2. sezonunda yapılan yapılan melezleme çalışmaları	30
Çizelge 4.4 Kültüre alınan embriyolardan elde edilen kallus sayıları ve başarı oranları	31
Çizelge 4.5 Kallus oluşumuna ilişkin varyans analizi tablosu	33
Çizelge 4.6 Kültürde oluşan kalluslardan elde edilen toplam bitkicik sayıları ve kallus başına düşen ortalama bitkicik sayıları	33
Çizelge 4.7 Kültüre alınan embriyolardan elde edilen çimlenme sayıları ve başarı oranları	35
Çizelge 4.8 Çimlenme durumuna ilişkin varyans analizi tablosu	36
Çizelge 4.9 Besi ortamlarına göre çimlenme başarı oranı.....	37

ÖZET

ÇÖREKOTU (*Nigella sativa* L.) BİTKİSİNDE EMBRİYO KÜLTÜRÜ ARACILIĞIYLA ISLAH HATLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Merve A.M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022.

Amaç: Bu araştırmanın amacı; çörek otu popülasyonlarında embriyo kültür tekniği kullanılarak bitki ıslah hatlarının geliştirilmesi olanaklarının araştırılmasıdır. Bu yolla çörek otunda embriyo kültürü çalışmaları için en uygun besi ortamlarının tespiti ve gelecekteki çalışmalar için referans oluşturması hedeflenmiştir.

Materyal ve Yöntem: Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak ülkemizin tek tescilli çeşidi olan Çameli çörek otu çeşidi ile Denizli ve Ankara illerindeki üreticilerden temin edilen 2 farklı çörek otu popülasyonu kullanılmıştır. Popülasyonlar arasında yarım diallel melezleme tekniğine göre melezlemeler yapılmıştır. Melezlerin 12. gününde oluşan zigotik embriyolar MS besi ortamı ve bu ortama BAP ve/veya IAA ilave edilmiş toplam 10 farklı besi ortamında kültüre alınmıştır. İlgili hormon konsantrasyonları şu şekildedir; 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. Araştırma kapsamında her bir popülasyon ve besi ortamı için 5 petri üzerinden ve her petride 20 embriyo olacak şekilde embriyo kültür çalışması yapılmıştır. Toplam her bir besi ortamında 300 adet embriyo kültüre alınmıştır. Her bir popülasyon için ise toplam 1.000 adet embriyo üzerinden kültür çalışması yürütülmüştür.

Bulgular: Kallus oluşumu bakımında en yüksek genel başarı (2,3%) 2,0 mg.l⁻¹ BAP + 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamda sağlanmıştır. Yalın besi ortamında, 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamda ve 2,0 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamlarda kültüre alınan tohumlarda hiç kallus oluşumu gözlenememiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre besi ortamı bakımından kallus oluşumu başarı ortalamaları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Direkt çimlenme durumu bakımından en yüksek başarı oranı (1,7%) yalın besi ortamında sağlanmıştır. Varyans analizi ve Duncan çoklu karşılaştırma sonuçlarına göre yalın besi ortamının çimlenmeye anlamlı ve pozitif bir etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır. Buna karşılık araştırmada 0,5 mg.l⁻¹ BAP, 1,0 mg.l⁻¹ BAP, 2,0 mg.l⁻¹ IAA, 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 1,0 mg.l⁻¹ IAA ve 0,1

mg.l⁻¹ BAP + 2,0 mg.l⁻¹ 1 IAA içeren besi ortamlarında direk çimlenmeye rastlanmamıştır.

Sonuç: Kallus oluşumu başarı oranlarını incelediğimizde; her bir melezleme kombinasyonu için besi ortamı ve genotip etkileşimine göre başarı ortalamaları arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Direkt çimlenme incelendiğinde; her bir çeşit için yalın besi (MS 0) ortamında çimlenmede başarı sağlanırken, genotipin çimlenme üzerine anlamlı bir etkisi tespit edilememiştir. Melezlenen Çörek otu çeşitleri incelendiğinde; kallus oluşumu ve çimlenmeye dair en yüksek genel başarı Denizli x Çameli kombinasyonunda sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Embriyo Kültürü, Çörek otu, Kallus, Çimlenme, *Nigella sativa*.



ABSTRACT

IMPROVEMENT OF BREEDING LINES IN BLACK CUMIN (*Nigella sativa* L.) PLANT BY EMBRYO CULTURE

Merve A.M. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Agricultural Biotechnology Program, Master Thesis, Aydın, 2022.

Objective: The aim of this study is to investigate the possibilities of develop plant breeding lines using embryo culture technique in black cumin populations. In this way, it is aimed to determine the most suitable growth culture for embryo culture studies in black cumin and to create a reference for future studies.

Material and Methods: In this study, Çameli black cumin variety, which is the only proprietary variety of our country, and 2 different black cumin populations obtained from producers in Denizli and Ankara provinces were used as plant materials. Crosses were made between the populations according to the semi diallel hybridization technique. The zygotic embryos were cultured on the 12th day after crossing in 10 different MS medium added BAP and/or IAA. The hormone concentrations are as follows; control, 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. In this research, embryo culture studies were carried out on 5 petri dishes and 20 embryos were placed in each petri dish for each population and medium. A total of 300 embryos were cultured in each medium. The culture studies were carried out on a total of 1.000 embryos for each population.

Results: In terms of callus formation, the highest overall success (2.3%) was achieved in the medium containing 2.0 mg.l⁻¹ BAP + 0.5 mg.l⁻¹ IAA. No callus formation was observed in the cultured seeds in the medium without hormone, containing 0.5 mg.l⁻¹ IAA and containing 2.0 mg.l⁻¹IAA. According to the results of the analysis of variance, there was no significant difference between the success averages of callus formation in terms of the medium. In terms of direct germination, the highest success rate (1.7%) was achieved in the medium without hormone. According to the analysis of variance and Duncan multiple comparison results, it was concluded that the medium without hormone has a significant and positive effect on germination. On the other hand, direct germination was not found in

media containing 0.5 mg.l⁻¹ BAP, 1.0 mg.l⁻¹ BAP, 2.0 mg.l⁻¹ IAA, 1.0 mg.l⁻¹ BAP + 1.0 mg.l⁻¹ IAA ve 0.1 mg.l⁻¹ BAP + 2.0 mg.l⁻¹ 1 IAA.

Conclusion: When we examine the success rates of callus formation; for each crossing combination, no significant difference was found between the average success rates according to the medium and genotype interaction. When direct germination is examined; while success was achieved in germination in the medium without hormone (MS 0) for each variety, no significant effect of genotype on germination was detected. When the hybridized Black Cumin varieties are examined; the highest overall success in callus formation and germination was achieved in Denizli x Çameli combination.

Keywords: Embryo Culture, Black Cumin, Callus, Germination *Nigella sativa*.



1. GİRİŞ

Ülkemizde çörek otu üretimi ve kullanımı giderek artmaktadır. Baharat olarak kullanımının yanında son yıllarda pandemi ve beraberinde getirdiği doğal gıda, doğal tedavi yöntemlerine yönelim talebin artmasına neden olmakla birlikte daha az yan etkiye sahip oldukları için bitkisel ilaçların kullanılmasına büyük önem verilmektedir. Ek olarak, sentetik ilaçlara kıyasla daha ucuz, daha güvenli, toksik olmayan ve sindirilebilir bir formda bulunmaları sebebiyle kısa bir sürede iç piyasada da rağbet görmesiyle çörek otu yağı üretilmeye başlanmıştır (Yiğitbaşı, 2019).

Muazzam biyolojik potansiyeline rağmen, yabancı olarak yetiştirilen çörek otu bitkileri, değişken iklim ve çevre koşullarının olumsuz etkileri nedeniyle fitokimyasal profillerde aşırı değişkenlik sergilemektedir. Ayrıca, yerel ve tek tip tarım uygulamalarının olmaması, fitokimyasal olarak tutarlı çörek otu bitkiciklerinin üretimini kısıtlamıştır. In vitro tohum çimlenmesi, mikro çoğaltma ve kallus organogenezi gibi biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması, değişkenlik sorunlarını önleyebilir. Böylece kontrollü koşullarda ve sınırlı alanda çevresel kısıtlamalardan bağımsız olarak sağlıklı bitki materyali üretimi için umut verici araçlar sağlayabilir. Ayrıca, bu teknik, doğal büyüme mevsiminin kapalı olduğu zamanlarda farklı in vitro kültürlerin oluşturulması için bir başlangıç materyali olarak kullanılabilir. farklı eksplantların sürekli kaynağını sağlar (Khan vd., 2013). In vitro tohum çimlenmesi, fidenin bütünlüğünü korumak kaydıyla rejenerant elde etme yöntemlerini basitleştirerek bitkisel klonların oluşturulması için gereken süreyi kısaltır. Bu yüzden ekonomik açıdan önemli bitki türlerinin yaşam döngüsü için önem arz etmektedir (Nikolic vd., 2006).

Birçok kültür bitkisi gibi çörek otu da geleneksel bitki ıslah teknikleriyle uzun bir periyoda yayılan ıslah sürecine sahiptir. Son yıllarda bu süreci kısaltmak adına biyoteknolojik ıslah teknikleri kullanılmaktadır. ıslah sürecinde karşılaşılan sorunlara daha kolay çözümler sunmak adına da embriyo kültür tekniği entegre edilmektedir.

Bu çalışma kapsamında Ankara ve Denizli illerinde üreticilerden temin edilen yerel çörek otu popülasyonları ve Türkiye'ye ait tek tescilli çeşit olan Çameli çörek otu çeşidi kullanılarak embriyo kültür tekniği geliştirilmesi amaçlanmıştır. BAP ile IAA ilave edilmiş 10 farklı çeşitte MS besi ortamı kullanılarak melezleme işleminden sonraki 12. günde zigotik embriyoları bulunduran tohum taslaklarının çimlenme potansiyelleri belirlenmiştir.

Uzun bir tarihi geçmişe sahip ve tarihin tanık olduğu ileri gelmiş insanların kullandığı gerek yazılı gerek atadan aktarılmış bilgilerle günümüze kadar önemi artarak gelmiş ve geçirdiğimiz pandemi süreciyle de giderek kıymeti artan bir bitki olan çörek otu bitkisine olan ilginin tekrar arttırılması bu çalışmanın bir diğer hedefini oluşturmaktadır.

1.1. Çörek Otu Hakkında Genel Bilgi

Tarımsal faaliyetlerde bitkiler; tarih boyunca, gıda, kozmetik, barınma, yakacak ve hayvanların beslenmesi gibi birçok alanda insanlığa fayda sağlamıştır. İlaveten, insan sağlığını koruyucu olarak tıbbi amaçla da üretimi yapılmakta ve kullanılmaktadır. Dünyanın birçok ülkesinde bitkisel tedavi adı altında tıbbi ve aromatik bitkiler oldukça dikkat çeken ve araştırma konusu olan bitkilerdir (Acıbuca ve Bostan Budak, 2018). FAO (Food and Agriculture Organization) istatistiklerine göre 60.000 bitki türünün tıbbi ve ilgili amaçlarla (kozmetik, aromaterapi, yiyecek ve içecek) kullanıldığı tahmin edilmektedir. 2000-2020 yılları arasında tıbbi ve aromatik bitki türlerinin küresel ticaretteki hacminde %22 artış görülmüştür (FAO, 2022).

Türkiye, üç biocoğrafyanın kesiştiği coğrafi bir konuma sahiptir. Aynı zamanda iki gen merkezini barındıran konumuyla birlikte doğal bitki örtüsünde yer alan 11.707 bitki çeşitliliğiyle büyük bir zenginliğe sahiptir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2020). Ülkemiz, yüzölçümü olarak dünya kara yüzeyinin %0,6'sını temsil etmesine rağmen Dünyadaki tüm bitki türlerinin %2,5'ini bünyesinde bulundurmaktadır (Kan vd., 2004).

Geçirdiğimiz pandemi süreci ve alternatif tıbbın da gelişmesiyle birlikte ülkelerin bünyesinde barınan bitkilerin keşfi ve elde edilen ürünlerin çeşitli amaçlar için kullanılması önem kazanmıştır. Anadolu'da insanların iyileştirici gücüne inanarak hazırladıkları gelenekselleşmiş halk ilaçları halen daha kullanılmakta ve keşfedilmeye devam edilmektedir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2020). Ülkemizde, çörek otu, kekik, adaçayı, anason, dereotu, kişniş gibi tıbbi bitkilerin tarımı üretimin başında gelmesine rağmen son yıllarda gerçekleşen pandemi ve beraberinde getirdiği politik ve ekonomik sebepler üretimin azalmasına neden olsa da birçok alanda ihtiyaç duyulan hammaddelerin büyük bir kısmı Türkiye'den ithal edilmektedir. Türkiye'de tıbbi ve aromatik bitkilerin sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte, ortalama olarak 500 tıbbi bitkinin bulunduğu ön görülmekte; bunların içinde ise 200 civarında tıbbi ve aromatik bitkinin ülke ihracatında yer aldığı bilinmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Dolayısıyla bu durum tıbbi ve aromatik bitkiler sektörünün gelişmesinde önem arz etmektedir. Bu doğrultuda yakın geçmişte yaşanan

gelişmelerden biri de tıbbi bitkiler, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 2014 senesinde yürürlüğe giren Geleneksel Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları (GETAT) kapsamında fitoterapi uygulamalarında kullanılmaya başlanmış, bu durum da ihtiyaç duyulan gıda takviyesi ve bitkisel içerikli ilaç kapsamındaki ürünlere olan talebi artırmıştır. Beraberinde gelen zaman zarfında sentetik kökenli ürünlerden uzaklaşan insanlar doğal ürünlere olan ilginin artmasıyla bitkisel kökenli ürünleri tercih etmeye başlaması neticesinde doğal ürünleri daha popüler kılmıştır (Yiğitbaşı, 2019).

Pandemiyle birlikte çörek otu'nun popülaritesini artıran önemli etkenlerden biri de farmakolojik özelliğidir. Araştırmalar neticesinde çörek otunda bulunan en önemli içeriklerden timokinon maddesi sebebiyle; antitümör, antibakteriyel, antioksidan, antihistaminik, antidiyabetik, anti-hipertansif, inflamatuvar ve antimikrobiyal, antifungal aktiviteleri de dahil olmak üzere geniş bir yelpazeye etki ettiği bilinmekle beraber bağışıklık sistemini güçlendirdiği de bilinen bilgiler arasındadır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2020).

1.2. Çörek Otunun Sistematığı ve Dağılımı

Çörek otu, Doğu Akdeniz ülkeleri, Doğu ve Güney Avrupa ve Batı Asya kökenlidir. Balkanlar, Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Ortadoğu ve Hindistan'da yabani veya kültür olarak yetiştirilmektedir. Zengin bir tarihi ve dini arkaplana sahiptir. Tohumun elde edildiği bitki, Orta Avrupa'ya (Bulgaristan, Kıbrıs, Romanya) ve Yakın Doğu'nun bir kısmına (İran, Irak, Türkiye) özgüdür ve Fas'tan Kuzey Hindistan ve Bangladeş'e, Çin'e, Pasifik'e, Balkan ülkelerine, Doğu Afrika'ya ve Rusya'ya kadar birçok ülkede baharat olarak kullanılmak üzere yaygın olarak yetiştirilmektedir (Burdock, 2022).

Çörek otu (*Nigella sativa* L.), *Ranunculaceae* (Düğünçiçeğigiller) familyasına ait tek yıllık ve otsu bir bitkidir (Kökdil vd., 2006). *Ranunculaceae*, içerisinde zehirli bitkileri de bulunduran zengin bir familyadır. Familya adı, birçok türünün amfibik özelliğine ithafen 'küçük kurbağa' anlamına gelir. İlgili bitkilerin bir kısmı alkaloid içerirken bir kısmı heterozit taşır ve bir kısmında da uçucu laktonlar bulunmaktadır (Tanker vd., 2007). Yer yüzünde her iki yarım küredeki ılıman ve serin bölge isteklerinin yanı sıra özellikle kuzey yarım kürenin ılıman bölgelerinde yayılış gösteren büyük bir bitki ailesidir. Familyanın Türkçe adı ise "düğünçiçeğigiller"dir. Ülkemizde 17 cins ve 234 türü ile yayılış göstermektedir. Bunlardan bazıları; *Adonis* L. (Kan damlası), *Anemone* L. (Dağ lalesi), *Consolida* Riv. ex Ruppis (Mahmuzotu), *Helleborus* L. (Çöpleme), *Thalictrum* L. (Çayır

sedefi), *Ranunculus L.* (Düğünçiçeği), *Delphinium L.* (Hazeran Çiçeği) ve *Nigella L.* (Çörek otu) bitkileridir (Ekmekçigil, 2006).

Nigella sativa L. Bitkisinin sistematikdeki yeri aşağıdaki gibidir:

Âlem: Plantae (Bitkiler)

Bölüm: Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)

Sınıf: Magnoliopsida (İki çenekliler)

Takım: Ranunculales

Familya: Ranunculaceae (Düğün çiçeğigiller)

Cins: *Nigella*

Tür: *N. sativa L.*

Nigella cinsine ait türler genellikle Akdeniz ülkelerinde görülmektedir ve dünyada toplam 20 türü bulunmaktadır (Ceylan, 1983; Seçmen vd., 2000). Türkiye bitki örtüsünde ise 12 tür yayılış göstermektedir. 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], 2022). Ancak ticari bakımdan yaygın olarak yetiştirilen *N. sativa* türüdür. Ülkemizde ise tescil yılı 2014 olan tek tescilli çörek otu "Çameli" çeşididir (Koşar ve Özel, 2018).

1.3. Botanik Yapısı

Nigella sativa türü, yarı kurak bölgelerde yetişen tek yıllık otsu bir tıbbi aromatik bitkidir. Azlı çoklu yoğunluklarda dallanan gövdesi 40-70 cm boylarındadır. Yaprakları ana sap üzerine birbirinden farklı sıralı halde dizilmiştir ve her biri üç bölümden oluşmaktadır. Her ana dal ve yan dalın uç kısmında beyaz ve mavimsiyah, 5 parçalı bir çiçeğe sahiptir. Alt yaprakları saplı yapıda, üst yapraklar ise sapsız açık yeşil renklidir. Bol miktarda nektar barındıran çiçekte dölleme olduktan sonra kapsüller oluşmaktadır ve kapsüllerin içinde fazla miktarda tohum bulunmaktadır. Çörek otu tohumları küçük dikotilenlu (İpor ve Oyen, 1999) genişliği 1,5-2 mm, boyu 2-3 mm ve kalınlığı 1 mm dışı açık siyah içi beyaz renklidir. Tohumların dane ağırlığı 1,9-2,6 gr aralığındadır ve ezilen tohumlar keskin koku vermektedir. Yüksek miktarda yabancı dölleme özelliği gösteren bitkinin diploid

kromozom sayısı $2n=2x=12$ 'dir. Böcekler ve bal arıları tozlaşmada en büyük etmenlerdir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2020).

1.4. Kimyasal Yapısı

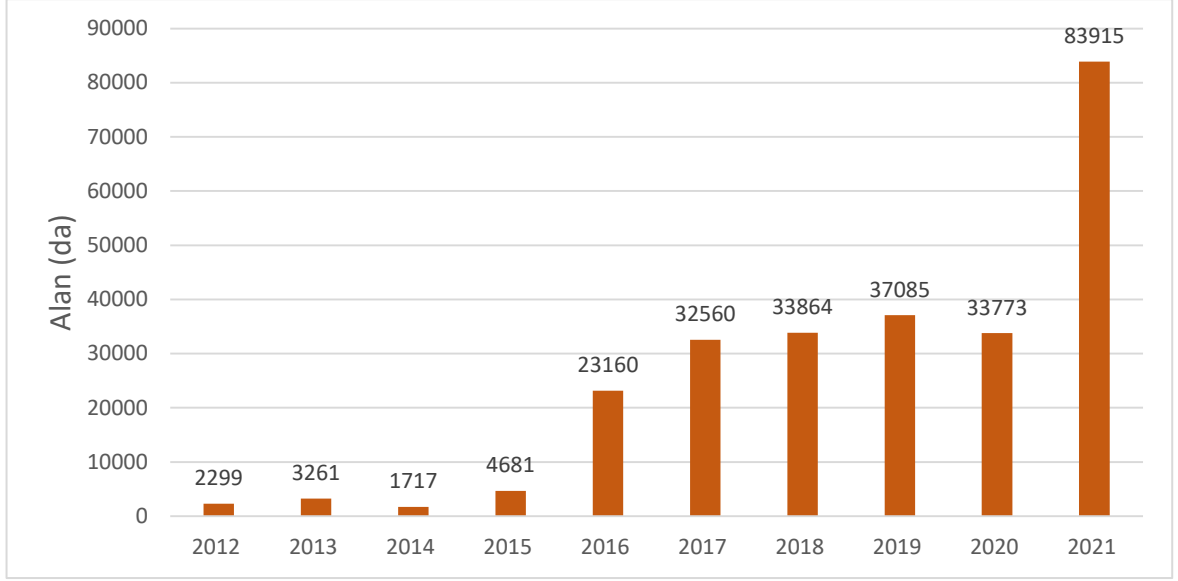
Potansiyel yağ ve protein kaynağı gibi çok yönlü kullanımı bakımından çörek otu adından söz ettirmektedir. Bunlardan biri oleo-kimya endüstrisinde yarı kurutucu bitkisel yağ olarak kullanılmaktadır (Üstün vd.,1998). Tohumun içeriğinde %30–45 oranında sabit yağ, %0,01–0,5 uçucu yağ, %20-30 protein, alkaloid maddeler ve glikozidler yer almaktadır. Çörek otu tohumundan elde edilen yağların bileşiminde ortalama %75'inden fazlasını yağ asitleri oluşturmaktadır. Totalde doymuş yağ asitlerinin %20 sini bünyesinde barındıran çörek otu tohum yağının en fazla bulundurduğu yağ asidi ise Palmitik asittir. Genellikle talep edilen bitkinin tohumlarının kullanımı olduğu için tohumların hasadı tam olgunlaşmaya vardığı zamanda yapılmalıdır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2020).

Çörek otu tohumunda yağ ve protein ihtivasi haricinde, karbonhidrat, selüloz, aminoasitler, mineraller ve vitaminler bulunmaktadır (Al-Gaby, 2008; Ayaşan, 2011).

1.5. Türkiye Çörek Otu Üretimi

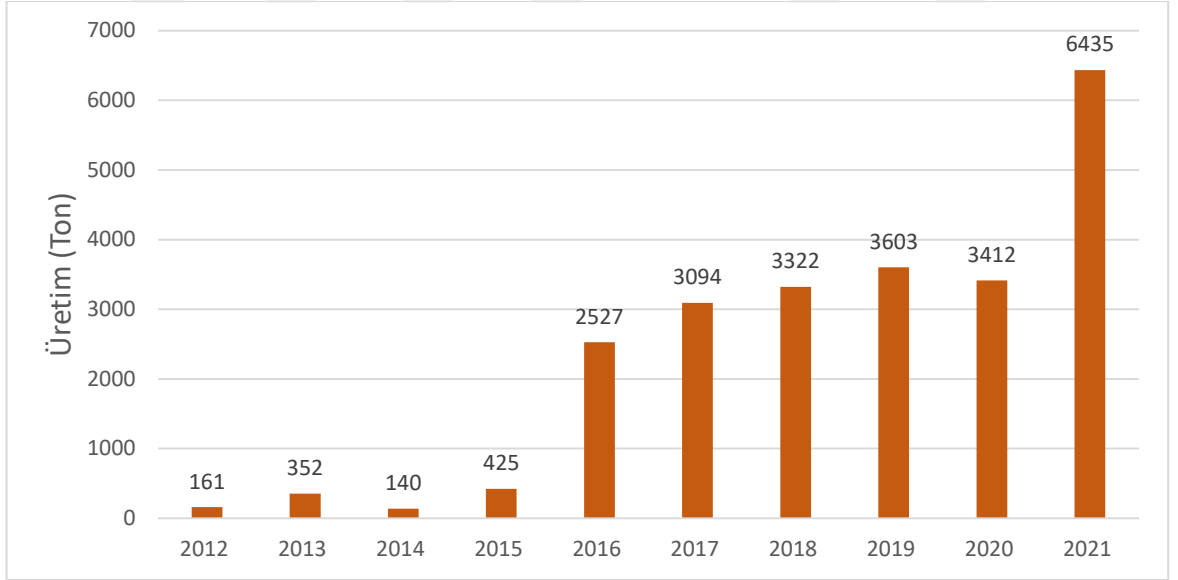
Mezopotamya topraklarını bünyesinde barındıran Türkiye, uygun iklim ve arazi koşullarının değerlendirilmesi sonucunda birçok türün yetiştirtilmesinde olduğu gibi çörek otu üretiminde önemli bir potansiyele sahiptir.

Türkiye'de çörek otuna ait istatistik verileri 2012 yılından itibaren düzenlenmeye başlamıştır. 2012 yılında 2.299 dekar alanda üretilir iken Tarım Bakanlığının iyi tarım uygulamaları, organik tarım uygulamaları gibi destek ödemeleriyle birlikte çiftçi teşvik edilmiştir ve 2021 yılında yaklaşık 36 kat artarak 83.915 dekar alanda üretilmeye başlamıştır. Şekil 1.1'de 2022 TÜİK verilerine göre Türkiye'de yıl bazında çörek otu ekim alanları verilmektedir. 2021 yılında çörek otu ekim alanı ciddi bir artış göstermiştir. Çörek otu ekim alanı yaklaşık %148 oranında artış göstererek 83915 dekara ulaşmıştır. En çok ekim yapılan iller Uşak, Burdur ve Konya'dır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2020).



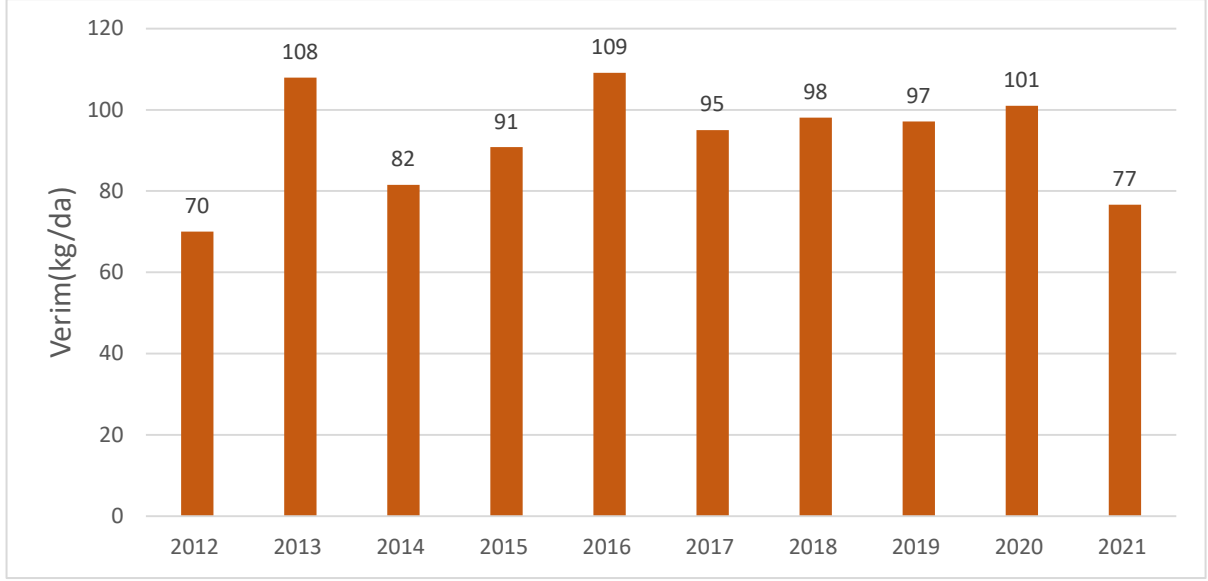
Şekil 1.1 Türkiye’de yıllara göre çörek otu ekim alanı (TÜİK, 2022)

Şekil 1.2’de Türkiye’de yıllara göre çörek otu üretim miktarları verilmektedir. 2021 yılında çörek otu üretim miktarı da ciddi bir artış göstermiştir. Üretim miktarı yaklaşık %89 oranında artış göstererek 83915 tona ulaşmıştır. 2022 yılı için 9500 ton üretim yapılacağı tahmin edilmektedir.



Şekil 1.2 Türkiye’de yıllara göre çörek otu üretim miktarı (TÜİK, 2022)

Şekil 1.3’te Türkiye’de yıllara göre çörek otu verimi gösterilmektedir. 2021 yılında çörek otu üretim alanı ve miktarında gerçekleşen artışa rağmen verim olarak düşüş yaşanmıştır. 2021 yılı çörek otu verimi 77 kg/da dır.



Şekil 1.3 Türkiye’de yıllara göre çörek otu verimi (TÜİK, 2022)

1.6. Çörek Otu Tüketimi

Tarihten günümüze çörek otu tohumları kendilerine özgü yağ ve kokuda olup tedavi edici özelliğiyle halk arasında çok yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Çörek otu tıpta kullanılan bitkiler içerisinde zengin ve uzak bir geçmişe sahiptir. Çörek otu tohumlarına ilk olarak MÖ 1333 - 1323 yılları arasında hüküm süren Mısır’ın 18. hanedan firavunu Tutankamon’a ait mezarda karşılaşılmıştır. Ayrıca güzelliğin sembolü olan Kleopatra tarafından da çörek otundan elde edilen yağın, sağlık ve güzellik için kullanıldığı bildirilmiştir. Yine yiyeceklerin uzun süre muhafazasında ve lezzeti arttırmak amacıyla kullanılmıştır (Ragaa, 2010). İslam ülkeleri ve Müslüman camiasındaki önemine değinmek gerekirse İslam Peygamberi Hz. Muhammed (s.a.v.)’in çörek otuna dair hadisleri nedeniyle çörek otu Müslüman camiasında önemli bir yer edinmiştir (Dinçoğlu, 2014). Hipokrat’tan İbn-i Sina’ya ve İbn-i Sina’dan günümüze ulaşincaya dek birçok hekim çörek otunu şifalı bitki olarak kullanmış ve üzerine araştırma yapmıştır (Yiğitbaşı, 2019).

Çörek otunun tıbbi değerini artıran diğer bir içeriği ise Timokinondur. Timokinon, tümör büyümesini önleyici, parazitlerin sebebiyet verdiği karaciğer hasarını azalttığı (Mahmoud vd., 2002) oksidatif hasara karşı birden çok hücre, doku ve organ üzerinde koruyuculuğu, böbrek ve kalp toksisitesine karşı önemli etkilere sahiptir (Farooqui vd., 2017).

Çörek otu bitkilerinin tohumları halk tıbbında mide hastalıklarında, bağırsaklarda gaz giderme gibi sorunlarda tedavi edici bir yöntem olarak uygulanmaktadır (Baytop, 1984).

Gerçekleşen çalışmalarda çörek otu tohumu ve bileşenlerinin, anti-tümör (Worthen, 1998), anti-bakteriyel (Morsi, 2000), anti-enflamatuar, antioksidan ve bağışıklık sistemini destekleyici (Salem ve Shamim, 2000), etkileri olduğu rapor edilmiştir. Son dönemlerde doğal tedavi yöntemlerinin yanı sıra modern tıpta çörek otunun sabit ve uçucu yağının antibakteriyel, antitümör, sakinleştirici, yatıştırıcı, ağrı kesici, kan şekeri düşürücü ve düz kasları gevşetici etkilerinden takviye ve tedavi edici gıda olarak yararlanıldığı belirlenmiştir (Nickavara vd., 2003).

Türkiye'ye ait tescilli ilk ve tek çörek otu çeşidi Çameli çeşididir ve 2014 yılında Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil ettirilmiştir. Çörek otunun Dünya'da ve Türkiye'de yoğun şekilde tüketilmesinin yanı sıra yetiştirilme kısmında özellikle bölgesel popülasyonlardan üretilip, tescilli çeşit sayısının tek olması kıymetli bir araştırma konusu olarak günümüze gelmektedir. Çörek otu popülasyonları ile en yüksek verim ve en kaliteli ürün almak amacıyla yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır. Verim ve kalite özelliklerinde çevresel faktörlerin etkili olduğu araştırmalarla desteklenmektedir (Özel vd. 2009; Baytöre, 2011). Yukarıda da belirtildiği gibi çörek otu son yıllarda pek çok sektörde artmakta olan bir potansiyele sahiptir.

Çörek otu ekonomik, besleyici ve tıbbi değerleri nedeniyle ve üretiminde ve pazarlanmasında ekonomik kayıp ve gıda zinciri bulaşı riski çok az veya hiç olmadığı için deneysel bir model bitki olarak seçilmiştir.

Giderek artan dünya nüfusunun yeterince ve kaliteli gıdayla beslenmesini sağlamak amacıyla tarımsal üretimi artırmak hedeflenmiştir. İnsanoğlu bu doğrultuda yaygın olarak kullanılmakta olan bitkileri melezleme ve seleksiyon işlemleriyle daha verimli ve kaliteli hâle getirebilmeyi hedeflemişlerdir. Kontrollü olarak bitkilerin üretimini sağlamış ve zaman içerisinde ürünlerin verim ve kalitesini arttırmıştır.

Yeşil Devrim olarak adlandırılan 1950'li yıllarda geleneksel ıslah tekniklerinin geliştirilmesiyle hastalıklara ve zararlılara dayanıklı, yüksek verimli, kaliteli çeşitler geliştirilmiştir. Sentetik gübrelerin ve tarımsal ilaçların kullanımının artmasıyla tarımsal üretim artmıştır. Öte yandan yıllarca uygulanan bu doğal olmayan işlemler ekosistemin ve doğal dengenin hasar almasına yol açmıştır. Ekim alanlarının yetersiz kalması, su kaynaklarının giderek azalması, doğal dengeye zarar vermeden tarımsal faaliyetlerin yapılmak istenmesi, klasik ıslah yöntemlerinin kullanılması ile istenen genotiplere kısa

sürede ulaşılamaması vb. sebeplerden ötürü biyoteknoloji gibi daha ileri teknolojiler araştırılmaya başlanmıştır (Dağüstü, 2018).

Geçmişten günümüze gelen süreçte gelişen teknoloji, genetik çalışmalardaki güncel gelişmeler ve bilim insanlarının bitki hücrelerinin genetik yapılarındaki iyileştirilmeler, oluşturulmak istenen özellikteki genotiplerin kısa zamanda çoğaltılabilmesini, cinsler ve türler arası melezlemelerdeki alışlagelmiş klasik tekniklerle uygulanamayan gen transferlerinin yapılabilmesini, daha kısa zaman diliminde homozigot hatların oluşturulmasını ve bitkideki karakterleri özel olarak ifade eden genlerin izole edilerek bir başka organizmaya aktarılmasına imkan sunmuştur (Kurt, 2004; Hatipoğlu, 2015). Sonuç olarak bitki biyoteknoloji çalışmalarının günümüzde klasik bitki ıslahında geçen süreçten çok daha kısa sürede bitki yetiştirme olanağı sağlayan bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bitkilerde meydana gelen bu hızlı gelişmeler dünya nüfusunun giderek artması göz önünde bulundurulduğunda çok önemli bir yer edinmektedir. Bunun gibi gelişmelerin başarısını etkileyen etkenlerin biri de bitkilerin hücre düzeyinde muamele görmeleri ve bu doğrultuda çalışılmasıdır. Bitki doku ve hücre kültürü teknikleri ve amaçlarının anlaşılması bu nedenle önem arz etmektedir.

Son yıllarda bitki ıslahında biyoteknolojik yöntemler olarak adlandırılan tekniklerden yararlanarak, bitkilerde ıslah sürecinin kısaltılmasına yönelik araştırmalar gittikçe artmaktadır.

Biyoteknolojik yöntemler;

- 1) istenilen özellikteki genotiplerin çoğaltılmasında geçen zamanın kısaltılmasına,
- ii) klasik yöntemlerle elde edilemeyen cinsler ve türler arası melezlerin elde edilmesine imkân sağlayarak, cinsler ve türler arası gen transferine,
- iii) daha kısa sürede homozigot hatların elde edilmesine ve
- iv) karakterleri kontrol eden genlerin izole edilerek diğer bir organizmaya taşınmasına imkân sağlayarak, bitki ıslahında gereken süreçten daha kısa bir sürede ıslah sürecinin gerçekleştirilmesine katkıda bulunmaktadır (Kurt, 2004; Süle, 2005).

Bu çalışma çörek otu popülasyonlarında melezleme sonrası zigotik embriyoları içeren tohum taslaklarının kültürü aracılığıyla embriyo kültürü tekniğini geliştirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

1.7. Embriyo Kültürü

Embriyo kültürü, embriyonun yumurtalık içerisinde gelişmenin belirli bir aşamasında izole edilerek ilgili besi ortamında çimlendirilip geliştirilmesidir. Başarılı olarak ilk 1904 yılında Hanning tarafından çeşitli bitki türlerinin olgun ve olgunlaşmamış embriyolarını, dormansi dönemini tamamlamadan hala çimlenip çimlenemeyeceklerini belirlemek için Turpgilleri kültüre almıştır (Norstog, 1979). Kültüre alınan bitkilerin yabani türleri, kalite, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, stres ve çevre koşullarına dayanıklılık gibi önemli özellikler için genetik varyabilite adına oldukça önemlidir. Kültürü yapılan çeşitlerde istenilen özellikleri bir araya getirmek farklı ebeveynler arası melezlemeleri gerektirmektedir. Fakat bunun gibi melezlemelerde çeşitli melezleme sorunları mevcuttur. Bunlar; Embriyo ve endosperm arası uyumsuzluklar, melez embriyo baskılaması (absorbe) gibi sorunlardır. Bu gibi durumların önlenmesinde embriyo kültürü melezlenmesi zor olan türler ve cinsler arası melez elde edilmesinde başarılı sonuç elde etmek amacıyla tercih edilmektedir (Vasiljevic, 1989).

Ayrıca embriyo kültüründen dormansinin kırılması ve erken çimlenme sorunlarının çözümünde de yararlanılmaktadır. Embriyo kültürü kullanım alanlarından yaygın olanları (Kott ve Kasha, 1985):

- 1- Haploid bitki üretimi,
- 2- Tür ve cinsler arası melezlemelerde yaşamayan embriyoların kullanılması,
- 3- Totipotent hücre kültürü için explant kaynağı,
- 4- Islah sürecinin kısaltılması.

1- Haploid bitki üretimi: Haploid bitki üretimi için, Bulbosum metodu, embriyo kültüründe uzun zamandan beri ve özellikle arpa ıslahında kullanılmaktadır.

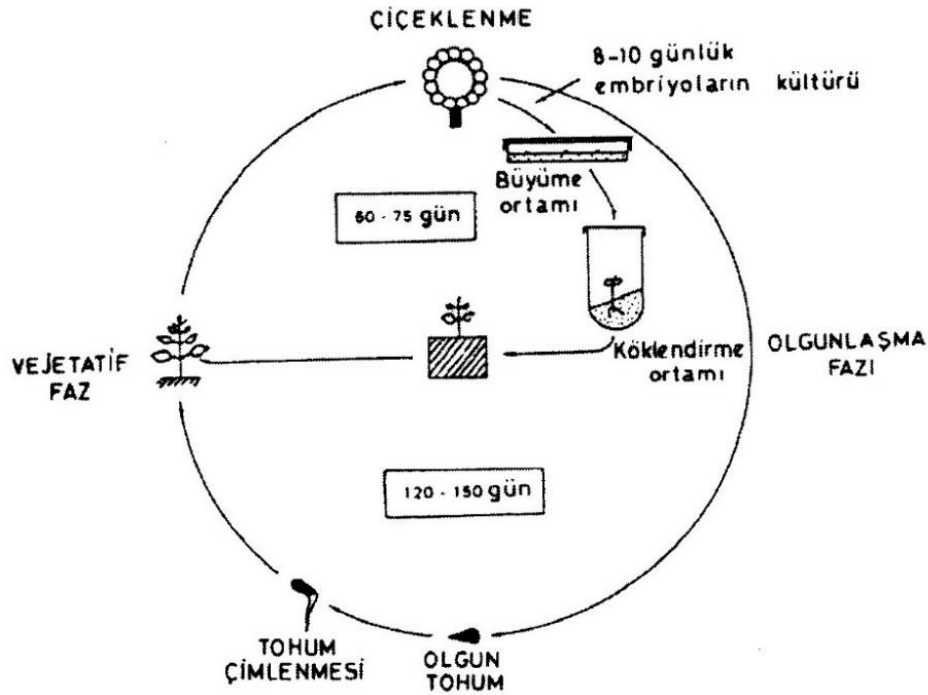
2- Türler ve cinsler arası melezlemeler: Tahıl tohumları içinde yeni ve yararlı tarımsal karakterleri belirlemek için geniş ölçüde hibridizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Burada başarı derecesi bunların birbirleriyle ilişkilerine ya da melezlerine uygunluğuna bağlıdır. Türler arası çaprazlamalar ve diploidler ve tetraploidler arasındaki çaprazlamalar ile endosperm genellikle zayıf gelişir veya hiç gelişmez. Embriyonun bir besin ortamında aseptik olarak kültürlenmesiyle bu problemin üstesinden gelinebilir (Ramming, 1990). Embriyo kültürü geniş hibridizasyon çalışmalarında düzenli olarak kullanılmaktadır.

Arpada, interspesifik hibridleri bulmak için kullanılmıştır ve bu sayede soğuğa ve mildiyöye dayanıklılık gibi özelliklerin kazandırılması amaçlanmıştır (Kott ve Kasha, 1985).

3- Explant kaynağı olarak: Olgunlaşmamış embriyolar tahıllarda ayrıca callus regenerasyonu için kaynak oluşturur. Bu da seleksiyon çalışmalarında özel olarak regenerantların bulunmasında, seleksiyon için varyabilite kaynağı sağlanmasında kullanılmaktadır (Kott ve Kasha, 1985).

4- Islah sürecinin kısaltılması: Bitki ıslahı süreci, toprağın hazırlanmasından bitkilerin büyümesi için optimum koşulların sağlanması ve hastalıktan arı sağlıklı bitkiler yetiştirerek verim ve kaliteyi artırmak, geleneksel üretim sistemlerinin kapasitesini artırarak yeni bir çeşit geliştirmek adına istediğimiz özellikleri kullanarak aynı sonuçları elde edebileceğimiz bitki yetiştirme süresini kısaltarak bitki ıslah çalışmalarını iyileştirmek için kullanılmaktadır (Narayanaswami ve Norstog, 1964; Kurt ve Savsatlı, 2005).

Klasik ıslah tabiatı gereği uzun süreler gerektiren çalışmalardır. Biyoteknolojik yöntemler ise klasik ıslahla başarılması güç olan cinsler ve türlerarası gen aktarımının başarılmasına ve ıslah sürecinin kısaltılmasına önemli katkılar sağlamaktadır. Bir ıslah çalışmasında embriyo kültürü tekniği kullanılarak tohumun olgunlaşmasını bekleyerek zaman kaybetmek yerine, olgunluğa erişmemiş embriyoların kültürüyle ıslah süreci kısaltılabilmektedir (Uysal vd., 2007) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 Ayçiçeğinde olgunlaşmamış embriyoların kültürü ile yaşam çemberinin kısaltılması (Bhojwani ve Razdan, 1996)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Embriyo Kültürü ile İlgili Çalışmalar

En eski deneysel bitki embriyologları arasında, Schopfer'e (1949) göre Charles Bonnet'in 1754 tarihli "Recherches sur l'usage des Feuilles" adlı eserinde (Gris (1864), *Phaseolus multiflorus* (Çalı Fasulyesi) ve *Fagopyrum* (Buğdaygiller) tohumlarının embriyolarından toprağa ekip biraz cüce olan bitkiler elde ettiğini söylemektedir. Yine *Mirabilis alapa*'nın sebze, meyve ve bahçe artığı embriyolarını çimlendirmeyi başarması ve bu deneylerin gerçekleşmesi o dönem için dikkat çekici bir durumdur (Van Tieghem, 1873).

Nemli hazneler kullanarak yalnızca çıkarılmış embriyoları kültürlenmekle kalmamış, aynı zamanda porsiyonlardan kök ve sürgünlerin yenilenmesini de sağlamıştır. Blociszewski (1876), mısır, yulaf, çavdar, yonca, bezelye ve acı baklanın endospermelerinden veya kotiledonlarından tamamen veya kısmen parçalanmış embriyolarının yetiştirilmesinde başarı sağlamıştır. Daha sonra, Brown ve Morris (1890), *Gramineae* (Buğdaygiller) embriyolarını besin solüsyonları ve çeşitli endospermeler üzerinde kültüre almıştır, böylece Arpa embriyoları Buğday endospermeleri üzerinde büyütülmüştür. Ardından Stingl (1907), tahıl embriyolarının karşılıklı implantasyonlarını (yerleşimini) yaparak keşfetmiştir.

Hanning (1904), şekerler, mineral tuzlar, amino asitler ve bitki özleri içeren çeşitli ortamlarda *Raphanus* (turpgiller) ve *Cochlearia* (Cruciferae) embriyolarının büyümesi üzerine kapsamlı araştırmalar yapmıştır.

Knudson (1922) tarafından arpagiller nütrient agar üzerinde çimlendirilmiş ve olgun bitkiler büyütülmüştür. Essenbeck ve Suessenguth (1925), çimlenme ile ilgili enzim sistemlerini incelemek için eksize edilmiş tam süreli *Zea mays* embriyolarını yetiştirmiştir.

Genetik çalışmalarda embriyo kültürü tekniğini kullanma olasılığını ilk kez gösteren Laibach'ın (1925) çalışması; *Linum*'daki belirli türler arası çaprazlamalarda, meyvenin küçüldüğü ve tohumların cansız olduğunu gözlemlemiş ve çözüm olarak bu tür tohumların embriyoları kesilip bir sakaroz ortamına yerleştirilmesi çimlenmeleri sağlamıştır. Hibrit tohumun başarısızlığının, endosperm gelişiminin hareketsizliğinden veya embriyo ile uyumsuzluğundan kaynaklanabileceği ve bunun, embriyonun illa ki olduğu anlamına gelmemesi pratik açıdan ilgi çekicidir.

Dietrich (1924), Tukey (1933), LaRue (1936), LaRue ve Avery (1938), Merry ve Goddard (1941) ve Rijven (1952) gibi bir grup bilim insanının özellikle ilgilendikleri bir

durum vardı, bunun adı “*kunstliche Friihgeburt*” (erkenci filizlenme) idi. Bu durumu şöyle açıklamışlardır; Tam süreli embriyolardan daha azının, eğer in vitro koşullarında büyürlerse, embriyo yerine fidelerin erken filizlendiğini ve küçüldüklerini keşfetmişlerdir.

Dietrich (1924), %5-10 sakaroz ve %1,5 agar içeren Knop solüsyonunda kültüre aldığı Crudferae, Leguminosae, Compositae, Cucurbitaceae ve Gramineae'ye ait bir dizi bitkiden embriyoların büyümesi üzerine kapsamlı bir çalışma yapmıştır. Sonucunda da başlangıçta bekleme süresinin uzun olmadığı in vitro koşullarda daha hızlı bir çimlenmenin meydana geldiğini gözlemlemiştir. İlâveten, kültüre alınan embriyoların ekiminde besi ortamının yüzeyine daha yakın batık olmayanlardan daha etkili sonuç almıştır.

LaRue (1936), birkaç bitki türünün küçük embriyolarının, daha küçük olanlar 0,5 mm kültüre alınamamıştır çünkü nihai boyutlarının üçte birinden daha az olan kültürlenmiş embriyolar, olgunluğa erişebilen bitkilere dönüştüğünü, ideal boydaki embriyoların ise normal embriyolarinkine eşit veya ondan daha büyük bir boyuta farklılaşmadan geliştiğini in vitro büyüme çalışmasında gözlemlemiştir.

LaRue (1936), Oksinlerin embriyo kültürlerinde kullanımına ilişkin ilk raporları sunmuştur. Phaseolus ve Ricinus'un kültürlenmiş embriyoları üzerinde indol asetik asidin (0.5 ppm) embriyoların in vitro büyümesi ve indol asetik asidin tümör ürettiğini Solacolu ve Constantinesco (1936) gözlemlemiştir. Embriyo kültürü ayrıca Gregory ve Purvis (1938) tarafından vernalizasyon çalışmalarında bir araç olarak kullanılmıştır. %2 sakkaroz ortamında embriyolar ve çimlenmenin olmamasının nedeni endosperm veya aleuron tabakasının vernalizasyonuna bağlıdır, ancak embriyonun soğuk muameleye tepkisine, sonraki çiçek oluşumu için embriyoların vernalizasyonu sırasında şekerin gerekliliğini gösterebilmiştir. Vernalizasyon çalışmalarına doku kültürü tekniklerini uygulayan diğer deneyler, Murneek ve Whyte (1948) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Iwanowskaya (1946), Triticum'dan melezler elde ederken, (2n=28) X *Elymus arenarius* (2n=56) ve Brink vd. (1944), *Hordeum jubatum* X *Secale* tahılının bir melezini de embriyo kültürü ile elde etmiştir.

Prezent (1954) ve Camara (1943), yabancı endospermin tahıl embriyolarının sonraki gelişimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bahar buğdayının embriyolarından bir çeşit ve çavdarla yüksek çaprazlanabilirlik sergileyen başka bir buğday çeşidinin endospermi üzerinde yetiştirilmiştir. Yetiştirme işleri bazen embriyoların doğal dormansisi tarafından engellenir, böylece çimlenme ve fide büyümesi birkaç yıla yayılabilir. Randolph (1945),

Randolph ve Cox (1955) ve Lenz (1955), İris fidelerini elde etmek için embriyo kültürlerinden yararlanmışlardır. İris tohumları normalde çimlemek için birkaç yıl gerektirir. Lammerts (1942) yaprak döken ağaçların üreme döngüsü ve çimlenebilirliğinin arttırılması hibrit embriyoların kullanılmasının yöntemin süresini kısaltmada etkili olduğunu gözlemlemiştir.

Von Guttenberg ve Wiedow (1952) kök büyümesinin uyarılmasında kültürlenmiş *Avena Sativa* embriyolarının sayısı gözlemlemiştir. 10-5 ppm'de IAA ile sürgün koleoptilinin uyarılması ve mezokotil büyümesi 1 ppm IAA konsantrasyonunda meydana gelmiştir.

Gorter (1955), farklılaşmamış, çubuk şeklindeki *Cyclamen persicum* embriyolarının %20 Hindistan cevizi sütü, maya özütü veya turba özü içeren bir besiyerinde kültürlendiğini bildirmiştir ve yaklaşık 14 gün içinde olgunlaştığı ve çimlendiği gözlenmiştir.

Ball (1959)'a göre çeşitli organik azotlu bileşiklerin etkilerini inceleyen ve bulan Brown (1906) idi ve glutamin özellikle sürgün büyümesinin desteklenmesinde etkiliydi. Eksize edilmiş arpa embriyoları ve sakkaroz üzerinde yetiştirilen ekotiledonize edilmiş lima fasulyesi embriyolarından fideler elde eden büyüme ortamı Buckner ve Kastle (1917) tarafından gözlemlenmiştir.

Tukey (1933, 1934, 1938, 1944), Werckmeister (1934), Skovsted (1935), Beasley (1940), Skirm (1942), Blakeslee ve Safina (1944), Smith (1944), McLean (1945), Yamasaki (1947), Sanders (1948, 1950), Uttaman (1949), Konzak vd. (1951), Nickell (1951), Keim (1953), Haynes (1954), Honma (1955), Webster (1955), De Capite (1955), Choudhury (1955), Ganesan vd. (1957), Schooler (1960), Bouharmont (1961), Grant vd. (1962), ve Fridriksson ve Bolton (1963) hibrit embriyo kültürü tekniğini geliştirmişlerdir, hatta türler arası melezler elde etmişlerdir.

Embriyoların kültürlenmesinde belirli heksitollerin kullanılmasından bazı başarılar elde edilmiştir. Pollard vd. (1961) tarafından hindistancevizi sütünün "nötr fraksiyonundan" elde edilen her ikisi de inositol ve sorbitol içermektedir. DeMaggio ve Wetmore (1961) tarafından eğreltiotu *Todea barbara*'nın farklılaşmamış proembriyoları ve farklılaşmış embriyolarının kültürlerinde kullanılmıştır. Bu çalışmalarda son derece küçük (35-55 İx) embriyoların in viro koşullarda farklılaşmaya uğramayacağını varsayarak büyümelerini teşvik edeceğini düşünmüştür. Nihayetinde, bu eğrelti otunun daha büyük farklılaşmış embriyoları, %5-10 hindistancevizi sütü içeren ortamlarda hızla büyüdüğünü ancak İnositol

ve s, 50 ppm amino asit karışımını içeren bir ortamda embriyolar, hindistancevizi sütü ortamından daha hızlı bir büyüme oranı gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Carew ve Schwarting (1958), olgun acı bakla embriyolarının büyümesi, NAA ve adenin içeren kültürel koşullar altında araştırmıştır, sülfat ve not edilen parçaların rejeneratif kapasitesi gözlemlendiğinde kallus kültürleri elde etmiştir.

Furuya ve Soma (1957), çeşitli oksinlerin gelişim üzerindeki doğrudan etkilerini bildirmiştir. Buna göre; steril kültürde ekotiledonize edilmiş fasulye embriyosu parçalarının farklılaşmamış fasulye embriyolarının GA ve IAA'nın on günlük bir süre boyunca in vitro koşullarda hücre bölünmesi göstermezken, biraz daha yaşlı embriyolarda bölünmeler gözlemlendiğini bildirmiştir (Dure ve Jensen, 1957).

Zenkeler vd. (1961) Daha önce atıfta bulunulan bir çalışmada inositol, NAA, 2,4-D, adenin ve hindistan cevizi sütü gibi maddelerin kombinasyonlarını içeren besiyerlerinde kotiledon başlangıcının erken evrelerinde ve 0.2-0.3 mm uzunluğunda havuç embriyoları gelişirken daha küçük, farklılaşmamış, 0,1-0,2 mm uzunluğundaki embriyolar büyümediğini gözlemlemiştir.

Kumlehn vd. (1998) döllenmiş buğday (*Triticum aestivum* L.) yumurta hücrelerinden emasküle edilmiş başakların elle tozlaşmasından 3±6 saat sonra, verimli ve tekrarlanabilir embriyo gelişimi elde etmiştir. Hem kış hem de ilkbahar çeşitlerinin eksize edilmiş yumurtalıklarının yaklaşık %75'inden canlı zigotları rutin olarak izole etmek mümkündür. Sporofitik gelişme için uyarılmış olan arpa mikrosporları ile birlikte kültür, ekilen buğday zigotlarının embriyonik gelişimi ile sonuçlanmıştır. 23 saat içinde tozlaşma; zigotlar ilk hücre bölünmelerini geçirmişlerdir. Çoğu daha sonra farklı üst ve alt dokuya sahip farklılaşmaya dönüşen kulüp şeklindeki embriyolara gelişmeye devam etmiştir.

Hadfi vd. (1998) dikotiledon embriyolarında model oluşumu sırasında oksin etkisinin mekanizmasını araştırmak için, doğal oksin indol-3-asetik asit (IAA), oksin taşıma inhibitörü N-(1naftil) talamik asit (NPA) ve antiauxin p-klorofenoksiizobütirik asit (PCIB) 'in etkilerini test etmiştir. İzole edilmiş zigotik *Brassica juncea* embriyolarının bu maddelerle in vitro tedavileri, çok çeşitli morfogenetik değişikliklere yol açmıştır. Yuvarlağımsı embriyolara eksojen oksin (10-40 µM) ile muamele edilmesi ya morfogenezinin tamamen inhibe edilerek top şeklinde embriyolar oluşturmuş ya da herhangi bir apikal yapısı olmayan yalnızca kısaltılmış bir hipokotilden oluşan yumurta ve salatalık şekline benzeyen embriyoların gelişmesine neden olmuştur. Bazen yuvarlağımsı

embriyolarda oksin taşınmasının inhibisyonundan sonra eksen tekrarlanması gözlenmiş ve ikiz embriyoların gelişmesine yol açmıştır.

Fregene vd. (1999) başarılı tohum çimlenmesini artırmak ve popülasyon oluşturma süresini azaltmak için olgunlaşmamış manyok tohumlarını kullanan bir embriyo kültürü protokolü geliştirilmiştir. Embriyonik eksenler, tozlaşmadan 40 gün sonra tohumlardan çıkarılmış ve büyüme faktörleri ile desteklenen 1/3 MS ortamına yerleştirilmiştir. Hem olgun hem de olgunlaşmamış tohumlardan sürgün uzaması (shoot elongation), boğum arası oluşumu ve kültürlerin canlılığında genotipik etkiler gözlenmiştir.

Zhang vd. (1999) Japonica ve Indica pirinç çeşitlerinin ovüllerinden döllenmemiş ve döllenmiş yumurta hücrelerinin rutin izolasyonunu sağlayan basit bir mekanik yöntem geliştirilmiştir. Deneylerde, donör bitkiler güçlü bir durumdayken yumurta hücrelerinin ve zigotların çoğunluğu izolasyon prosedüründen sağ çıkmıştır. Hayatta kalan zigotların yaklaşık %40'ı, orfojenik olmayan bir pirinç besleyici hücre kültürüyle birlikte Millicell eklerinde kültürlendiğinde sürekli gelişim geçirmiştir. Neredeyse tüm zigottan türetilen kallus kültürleri, daha sonra yüksek verimlilikle köklenebilen çoklu sürgünleri yeniden üretmiştir. Zigot türevi bitkicikler toprağa nakledildiğinde verimli bitkiler olarak olgunlaşmıştır.

Sauer ve Friml (2004) çalışmasında zigotik Arabidopsis embriyosunun in vitro kültürü için bir yöntem geliştirmiştir. Tüm yumurtayı kültürleyerek embriyonun eksizyonunu atlayarak, böylece gerekli zaman ve çabayı büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. En erken gelişim aşamalarından olgunluğa kadar embriyo gelişimi ve kültürünün dış manipülasyonunu sağladığını bildirmiştir. Çeşitli kimyasal tedavilerin yanı sıra farklı moleküler belirteçlerin kullanımı, in vitro kültürlenmiş embriyolarda gen ekspresyonunu ve protein lokalizasyonunu görselleştirmek için standart tekniklerle birlikte gösterilmiştir.

He vd. (2007) tütün için güvenilir bir in vitro zigotik embriyogenez sistemi geliştirmiştir. Adikotiledonlu bitkinin tek bir zigotu, döllenmiş ovüllerin besleyici olarak kullanıldığı bir ortak kültür sisteminin yardımıyla doğrudan embriyogenez yoluyla verimli bir bitkiye dönüşebilmiştir. Sonuçlar, bir tütün zigotunun Solanad tipinin temel embriyojenik modelini takip ederek in vitro bölünebileceğini doğrulamıştır.

Hoseini-Nasr vd. (2007) embriyo kültürü yoluyla olgun tohumdan *Taxus baccata*'nın tohum dormansisinin kırılması için iki yöntem açıklamıştır. Bitki rejenerasyonu, zigotik embriyonun MS ortamında kültürlenmesiyle elde edilmiştir. Ayrıca, WP mineral ortamına

embriyo kültürünün ardından bir aylık tohum ön soğutması ile başka bir genç bitki elde edilmiştir. Embriyo kültüründe tanınabilir sürgün ve kök uçlarına sahip iki uçlu yapıların gelişimi gözlenmiştir. Somatik embriyoların yüzde yirmisi genç bitkilerde rejenere edilmiştir.

2.2. Çörek Otunda In Vitro Kültür Çalışmaları

Banerjee ve Gupta (1975) çörek otu bitkisinin kök, gövde ve yaprak kısımlarından eksize edilen naftalenasetik asit (NAA) ve hindistan cevizi sütü ihtiva eden bir konsantrasyonda, kök ve sürgün gelişim gözlemini elde edilen her üç kallustan birinde izlemişlerdir. Bu gözlemler itibariyle hindistan cevizi sütüyle muamele edilen eksplantlar sonrasında bazal ortamda 2,0 ml Indol asetik asid (IAA) uygulaması sonucunda kök ve yaprak kallusları oluştuğunu belirlemişlerdir.

Banerjee ve Gupta (1976) Kazein hidrolizat eklenmiş MS besi ortamına; hindistan cevizi sütünü farklı oranlarda eklenerek yapraktan oluşan kallusdan embriyogenez elde etmişlerdir. Embriyogenez eldesi, MS besi ortamı, 0,5 mg.l⁻¹ IAA ve 100-500 mg.l⁻¹ kazein hidrozat ilave edilmiş ortamında, kültüre alındıktan sonra uzun bir süre geçmesinin ardından oluştuğunu gözlemlemişlerdir. İçeriğinde 1000 mg.l⁻¹ kazein hidrozat içeren bir konsantrasyonda, morfonogenez kapasitesini kaybettiğini ve beşinci altkültürden sonra kültüre devam edilemediğini, 2,4-D ve kinetin ortamlarının farklılaşma üzerinde baskılayıcı etkiler gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çörek otu bitkisinde yaprak kökeni, sürgün tomurcuğu ve köklerin meristematik hücre gruplarının bir parçası olduğunu, embriyoidlerin oluşumunu ise tek bir hücrenin tekrarlanan bölünmesiyle başlatıldığını rapor etmişlerdir.

Chand ve Roy (1982), Kültüre alınan besi ortamında Giberalik asit (GA) içeren konsantrasyonlarda tohumların kallus oluşumu ve çimlenmesinin olmadığını gözlemlemişlerdir; NAA bulunan ortamda ise tohumların çimlenip kallus oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. IAA'nın bulunduğu ortamda ise tohumlardan direkt bitki ve kallus oluştuğunu tespit etmişlerdir. Bütün bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda 2,4-D varlığında, kinetin ve hindistan cevizi sütünü eşit miktarda içeren konsantrasyonlarda tohumların, bitki oluşturmada kallus dokusu meydana geldiğini gözlemlemişlerdir.

Datta vd. (1983) gerçekleştirdiği çalışmada farklı bitki besin düzenleyiciler ile çörek otu da dahil olmak üzere çeşitli bitkiler üzerinde denemeler yapmışlardır. In vitro büyüme ve biyokütle oluşumunun meydana gelmesinde bitki besin ve büyüme düzenleyicilerinin

destekleyici bir etkiye sahip olduğunu, kallus oluşumunda ise 2,4-D ve kinetin etkili olduğunu sunmuşlardır.

Youssef vd. (1998) çalışmasında, tuz oranı fazla olan ortamlarda büyümenin baskılandığı, %0,05 oranda kazein hidrolizat içeren ortamların ise kallus büyümesini teşvik ettiğini açıklamışlardır. İlâveten, kallus kültürlerinde tuz stresinin birincil ürünlerin birikimini arttığını da bildirmişlerdir. Kültüre alınacak besi ortamlarında 2,4-D ortamına çeşitli kinetin oranlarının eklenmesiyle, çörek otu bitkisinden meydana gelen kallusların taze ağırlığının da azaldığını bildirmişlerdir.

Mohammad ve Jumma (2006) deneylerinde, 1010 molar 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) veya pentadienoik asit (PDA) bulunduran Murashige ve Skoog (MS) ortamı kullanılarak çörek otu kallusun başlatılması ve büyümesini incelemiştir. Glutamat dehidrojenaz (GDH), farklılık gösteren amonyum nitrat ve potasyum bulunduran konsantrasyonlara sahip besi ortamında başlatılan kallustan kısmen izole edilmiştir. İlâveten, 2,4-D veya PDA varlığında enzim aktivitesinin kıyaslandığı bir çalışması yapılmıştır. Sonuç olarak, kallus oluşumunun başlaması ve gelişmesi için en etkili besi ortamının 106-M 2,4-D veya PDA ihtiva ettiği durumlarda oluştuğunu rapor etmiştir. 2,4-D veya PDA ihtiva eden MS besi yerinde yetiştirilen kallusun yaş ağırlığı kültüre alındığından 45 gün sonra sırasıyla 5.72 gm ve 2.81 gm idi. Bununla birlikte, kallusun protein içeriği, sırasıyla 2,4 -D veya PDA içeren ortamda büyütülen 1.050 ve 1.116 mg/gm'dır.

Al-Ani (2008) ise çörek otu yaprakları, hipokotilleri ve kökleri çeşitli bitki büyüme düzenleyici içeren konsantrasyonlarda MS ortamında kültürlenmiştir. Neticesinde, MS ortamında 2,4-D (0,0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 mg.l⁻¹) ve kinetin (0, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 5,0 mg.l⁻¹) bulunduran konsantrasyonlarda iyi derecede kallus oluşumu, 2,4-D (mg.l⁻¹) ve kinetin (1,5 mg.l⁻¹) oranını içeren konsantrasyonda ise yaprak eksplantları meydana gelmiştir.

Al-Salih (2012) çalışmasında, çörek otu doku kültürlerinden yararlanarak pestisit deltamethrin'in bitkideki hücre büyümesinde oluşturacağı etkiyi değerlendirmeyi hedefleyerek çeşitli pestisit içeren konsantrasyonları (%0,01-4,0) denemiştir. Sonuç olarak %0,01-0,05 oranında kallus büyümesini baskılamazken %0,1-1,0 oranında pestisit içeren ortam konsantrasyonunun kallus büyümesini teşvik ettiğini rapor etmiştir.

Chand ve Roy (2014) çalışmasında, çörek otu kallus oluşumunun en üst düzeye ulaşması için çeşitli 2,4- D, NAA ve IAA konsantrasyonlarında kültüre alınmıştır. Oluşan kalluslar ilk başta çörek otunun yaprak parçacıklarından meydana gelmişlerdir. Deneyler

süresince kinetin miktarı sabitlenmiştir ve NAA bulunduran besi yerlerinde gelişen kallusların IAA ve 2,4-D bulunduran besi yerlerine göre stabil, yumuşak ve daha açık yeşil renkte olduğu sunmuşlardır. 2,4-D, NAA ve IAA ilave edilen MS besi yerinde çörek otu yaprağından etkileyici oranda kallus üretmi gerçekleştirmişlerdir. 2, 4-D (2 mg.l^{-1}), kinetin ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$) ve %10 hindistan cevizi sütü eklenmiş MS besi yeri kullanmaları neticesinde kallus dokularındaki çoğalma hızının 2,4-D bulunduran besi ortamlarında IAA bulunduranlardan çok daha fazla miktarda olduğunu bildirmişlerdir. Meydana gelen kalluslar daha sonra aynı bazal ortamda kinetin ile kombinlenmiştir ve çeşitli NAA, IAA ve 2, 4-D ve hindistan cevizi sütü içeren besin ortamlarında alt kültüre aktarmışlardır. Bu kültür ortamlarını 25°C 'de ve 16 saat/8 saat ışık-karanlık fotoperiyod içinde muhafaza etmişlerdir. Mevcut iki ortam gözleendiğinde sonuç olarak 28 gün içinde kallus oluştuğunu bildirmişlerdir.

ElNour vd. (2015), çörek otu tohumlarından meydana gelen hipokotiller ve kotiledon eksplantları farklı tipte ve çeşitli büyüme düzenleyicileri konsantrasyonları içeren MS besi ortamlarında kültüre alınmışlardır. Çörek otu eksplantları öncelikle $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ ve $5,0 \text{ mg.l}^{-1}$ Naftalin asedik asit (NAA) bulunduran ortamda kültürlenmiştir ve gözlem sonucunda ikinci haftada kallus oluşumu hızlı bir şekilde gerçekleştiğini bildirmiştir. Bitki materyali kotiledon olduğunda 2,4-D besi ortamına $5,0 \text{ mg.l}^{-1}$ ve $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ miktarlarında yetiştirilen hipokotiller izlendiğinde kallus oluşumunun daha yavaş olduğunu bildirmişlerdir.

Rezaei vd. (2018) bitki doku kültürü çalışmalarında, büyüme ortamı için mineral tuzu ve vitaminler, %3 sukroz ve %0,7 agar oranlarında bulunduran MS besi ortamı kullanmışlardır. Sterilizasyon işlemi gerçekleşmiş tohumlardan kallus gelişimi 7-10 günlük bitkilerin hipokotil ve kotiledon eksplantlarını kallus gelişimi için kullanılmışlardır. Bitki büyüme hormonlarının kallus gelişimindeki etkisini incelemek için TDZ, kinetin ve BAP çeşitli hormon kombinleri NAA (1 mg.l^{-1}) ile hipokotil ve kotiledon eksplantlarıyla çalışmışlardır. Bitki rejenerasyon deneyi ardından meydana gelen kalluslar sürgünlere ve sürgün uzunlukları dikkate alınarak incelenmiş ve sürgünler farklı köklenme ortamlarına ayrı bir şekilde yerleştirilmişlerdir. In vitro koşullarda çörek otu bitki rejenerasyonu, kotiledon gelişimi gözleendiğinde en iyi kallus oluşum oranı $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP ve NAA ile birlikte daha etkili bir sonuç verdiğini rapor etmişlerdir.

Bibi vd. (2018) çörek otunda in vitro koşullarda tohum çimlenmesi ve kallus oluşumu eldesi için çeşitli yöntemler geliştirmiştir. Aynı zamanda, yenilenen dokularda oluşabilecek

antioksidan potansiyelini de incelemişlerdir. Sonuçlar, 1.0 mg.l^{-1} Gibberellic asit (GA3) bulunduran MS besi ortamındaki inkübasyonunda çörek otu tohumlarında en yüksek çimlenme sıklığını göstermiştir. Farklı ön işlem çözümleri arasında H_2O_2 en yüksek çimlenme frekansını tercih etmiş, bunu KNO_3 izlemiştir.

Uysal (2021) Çameli çörek otu çeşidinin gövde ve yaprak kısmının in vitro gelişimi üzerine çalışmıştır. 30 gr şeker içeren beş farklı besin ortamı (1. LS2.5, 2. MS, 3. MS + 0.5 mg.l^{-1} IAA, 4. MS + 0.5 mg.l^{-1} BAP, 5. MS + 0.5 mg.l^{-1} IAA + 0.5 mg.l^{-1} BAP) kullanılmıştır. Araştırma sonucunda yüksek oksin konsantrasyonu içeren ortamlarda kallus oluşumunun teşvik edildiğini bildirmiştir. Yine Eşit miktarda IAA ve BAP eklenmesi çörek otu gövde eksplantlarında kallus oluşumunu desteklemiştir fakat yaprak eksplantlarında doğrudan sürgün rejenerasyonu sağlanamamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, çörek otu bitkileri üzerinde yapılan in vitro çoğaltma çalışmaları için, eğer amaç kallus oluşumu ise, yüksek oksin içeren bir ortamın tercih edilmesi gerektiğindoen doğrudan sürgün rejenerasyonu elde etmek için ise BAP veya diğer sitokinin içeren ortamlar tercih edilmesi gerektiğini bildirmiştir.

Uysal ve Sevindik (2021) yapmış oldukları çalışmada tohumların çok küçük olması ve embriyo izolasyonunun zor olması nedeniyle embriyo kültürü için ovul kültürünü tercih ettiklerini bildirmişlerdir. Embriyo kültürü için Türkiye'de Samsun, Denizli, Isparta, Mersin ve Çameli çörek otu çeşitleri bulunduran üreticilerden temin edilen populasyonlar kullanarak melezlemeler yapmışlardır. Bu araştırma sonucunda toplam 2904 ovul LS2.5 ortamında kültüre alınmıştır. İçlerinde 148 tanesinde kallus oluşumu gözlenmiş ve kallus oluşum oranı %5,10 olarak kaydedilmiştir. İncelenen kombinasyonlarda en yüksek kallus oluşum oranı %7.26 ile Çameli x Denizli kombinasyonundan elde edilmiştir. Bu oluşumlardan bitki rejenerasyonu elde edilememiştir. MS ortamında 3526 adet tohum taslağı kültüre almışlardır. Bu tohum taslaklarından 60 tanesinde çimlenme elde edilmiş ve bitki oluşum oranı %1,70 olarak belirlemişlerdir. Bunlardan 41 bitki olgunlaşmış ve hasat edilmiştir.

Hakimi vd. (2022) çalışmasında çörek otu tohumlarının çimlenme özelliklerini belirlemek için tohumları 20, 25 ve 30 °C'de farklı düzeydeki tuzlu ortamlara maruz bırakmıştır. Her sıcaklıkta tuzluluk stresi oluşturmak için gerekli miktarlarda sodyum klorür tuzu kullanılarak hazırlanan 0, 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl olmak üzere beş tuzluluk potansiyeli seviyesi uygulanmıştır. En yüksek çimlenme yüzdesi (%64) 25 °C'de ve 50 mM NaCl uygulamasında gözlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada Çörek otu (*Nigella sativa* L.) bitkisinde embriyo kültürü tekniği aracılığıyla ıslah hatlarının geliştirilme olanakları araştırılmıştır. Araştırma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında ve Ziraat Fakültesi seralarında ve Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında ve Ziraat Fakültesi seralarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak Türkiye'deki tek tescilli çeşit olan Çameli çörek otu çeşidi ile Denizli ve Ankara'daki üreticilerden temin edilen çörek otu popülasyonları kullanılmıştır.

3.1.2. Besi Ortamları

Bu çalışmada ana besi yeri olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) (Duchefa Biochemie, Katalog No: M0222) besi yeri ve içerisine 9 farklı konsantrasyonda BAP ve/veya IAA eklenmiş toplam 10 farklı besi yeri kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan MS ortamının kimyasal içeriği (Duchefa Biochemie, Katalog No: M0222)

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	CaCl 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	Pyridoxine-HCl	0,5
H ₃ BO ₃	6,2	Thiamin HCl	0,1
MnSO ₄ .7H ₂ O	16,9	Sukroz *	30 000
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	Agar *	6 000
KI	0,83	PH	5,8

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

Çizelge 3.2 Embriyo kültür çalışmasında kullanılan besi ortamlarının BAP ve IAA kombinasyonları

BAP (mg. l ⁻¹)	IAA (mg. l ⁻¹)
-	-
0,5	-
1,0	-
2,0	-
-	0,5
-	1,0
-	2,0
1,0	1,0
0,1	2,0
2,0	0,5

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Bitki metaryalleri sera koşullarında yetiştirilmiştir ve çiçeklenme periyodunu daha uzun zamana yaymak için 3 set olarak ekilmiştir. Tohumlar ½ bahçe toprağı ve ½ oranında yanmış ahır gübresi içeren 3,5 L ebatındaki saksılara ekilmiştir. Her set 5 saksı ve her saksıda 5 bitki olacak şekilde ekim işlemi gerçekleştirilmiştir fakat ekim işleminde istenilen miktarda bitki yetiştirmeyi hedefleyerek 15-20 adet tohum saksılara ekilmiş büyüdüklerinde fazla miktarda yetişen her saksıdaki bitki sayısı 10 adet olacak şekilde seyreltilmiştir.

Araştırma kapsamında ilk denemeler Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi seralarında 2019-2020 kış sezonunda 15 Ekim 2019'dan başlayarak 15'er gün ara ile 3 set halinde kurulmuş belirli bir süre melezleme ve in vitro çalışmalara devam edilmiş ancak Covid-19 pandemisi nedeni ile 2020 Mart ayından itibaren laboratuvar çalışmalarına ara verilmiştir. Yine pandemi sürecinin devam etmesi nedeni ile 2020-2021 yetiştirme sezonunda deneme kurulamamıştır. Denemeler 2021-2022 sezonunda Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi seralarında 1 Aralık 2021 tarihinden başlayarak yine 15'er gün ara ile 3 set halinde kurulmuştur (Resim 3.1 ve 3.2).



Resim 3.1 Çörek otu tohumu ekimi sonrası saksılar ait sera koşullarında bir görüntü



Resim 3.2 Çörek otu bitkilerinin saksılardaki gelişme durumlarına ilişkin bir görüntü

3.2.2. Çalışmada Kullanılan MS Besi Ortamının Hazırlanması

MS besi yeri hazırlama aşamasında ise; 1000 mL'lik besi yeri için 4.4 gr toz MS tartılarak 600 ml civarında saf suda manyetik karıştırıcı ile çözünmesi sağlanmıştır. Çözülme gerçekleştikten sonra üzerine 30 g şeker tartılıp eklenmiş ve şeker de

çözündürülmüştür. Hormon ilavesi yapılacaksa hormonlardan önce stok solüsyonları hazırlanmıştır.

Stok solüsyonlarının hazırlanmasında BAP ve IAA 2-3 ml 1 N NaOH içerisinde çözündürülmüş ardından hacimleri saf su ile normal hacimlerine tamamlanmıştır. Elde edilen hormanlar istenilen miktarlarda bir pipet yardımı ile daha önce hazırladığımız besi ortamına eklenmiştir. Ardından besi ortamının hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır. Besi ortamının PH'ı PH metre ile ölçülmüştür. Ortamın PH'ı düşükse 1 N NaOH yüksekse 1 N HCl kontrollü bir şekilde eklenerek PH 5,8'e sabitlenmiştir. PH ölçümü bittikten sonra şişe içerisine 6 gr (Duchefa Biochemie, Katalog No: P1001) agar eklenmiş ve üzerine hazırladığımız besi ortamı aktarılarak kapağı bir miktar gevşek kalacak şekilde kapatılmıştır. Sterilizasyona hazır besi yeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan besi ortamının kapağı olası kontaminasyon riskine karşı sıkıca kapatılmıştır ve steril petrilere aktarılacak üzere laminar akışlı biyogüvenlik kabinine taşınmıştır. Besi ortamı yaklaşık 50 °C'ye soğuyunca 9 cm çapındaki steril petrilere her bir petride 25 ml olacak şekilde dökülmüştür. Dökülen besi yerleri soğuyup katı hale geldikten sonra 5'erli gruplar halinde streç filmlerle kontaminasyon riskine karşı hava girişi engellenecek şekilde sarılarak kültüre alınma işlemi gerçekleşene kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Çalışmamızda steril edildikten sonra en fazla bir hafta beklemiş taze besi ortamları kullanılmıştır.

3.2.3. Çörek Otu Melezleme İşlemi

Ekimi yapılan Çörek otu bitkilerinde çiçeklenme başladığı andan itibaren melezleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çörek otunda melezleme yapmak için emaskulasyon işlemi tozlamadan 1-2 gün önce yapılması başarı oranını artırmaktadır. Ancak bu aşamada dışı çiçekler de tam olgunluğa erişmemiştir. Yabancı tozlanmayı engellemek amacıyla çiçekler henüz açılmadan önce hava ve nem geçirgenliği olan özel melezleme poşetleri ile izole edilmiş ve tomurcuklar istenilen büyüklükte gelince (Resim 3.3) emaskulasyon işlemi gerçekleştirilmiş çiçekler yeniden izole edilmiştir (Resim 3.4). Hava şartlarına bağlı olarak emaskulasyonun ertesi günü sabah 8.00-9.00 saatlerinde tozlama işlemi yapılmış ve çiçekler tekrardan yabancı tozlanmaya karşı izole edilmiştir. Emaskulasyon işleminden itibaren emasküle edilen çiçeğe, ana bitkinin ismi ve emaskulasyon tarihi yazılarak olası karışmayı önlemek adına etiketleme işlemi yapılmıştır. Tozlama sonrası ise etikete baba bitkinin ismi ve tozlama tarihi de ilave edilmiştir (Resim 3.5).



Resim 3.3 Emesküle için uygun büyüklükteki tomurcuk ve emeskülasyon aşaması



Resim 3.4 Emesküle edilmiş tomurcuk ve emeskülasyondan 1 gün sonra tozlama



Resim 3.5 Tozlama işlemi sonrası yabancı tozlaşmayı önlemek adına melez kapsüllerin izolasyonu

3.2.4. Çörek Otu Kapsüllerinin Yüzey Sterilizasyonu

Embriyo kültürü zigotik tohum taslakları kullanılarak gerçekleştirilmiş olup tozlamadan sonraki 12. günde uygun büyüklükteki embriyoları içeren kapsüller hasat edilerek steril su içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Sterilizasyon işlemine başlamadan önce laminar akışlı kabin 10 dk UV ışığıyla steril edilmiştir ve kapsüller kabin içine sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmek üzere alınmıştır. Sterilizasyon aşamasında toplanan kapsüller öncelikle %70'lik etil alkol ile 10 sn ön sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından %10'luk ticari çamaşır suyu (ACE) çözeltisi ile 5 dk ve son olarak 3-5 kez steril su ile durulama işlemine tabii tutularak kapsül sterilizasyonu tamamlanmıştır (Resim 3.6).



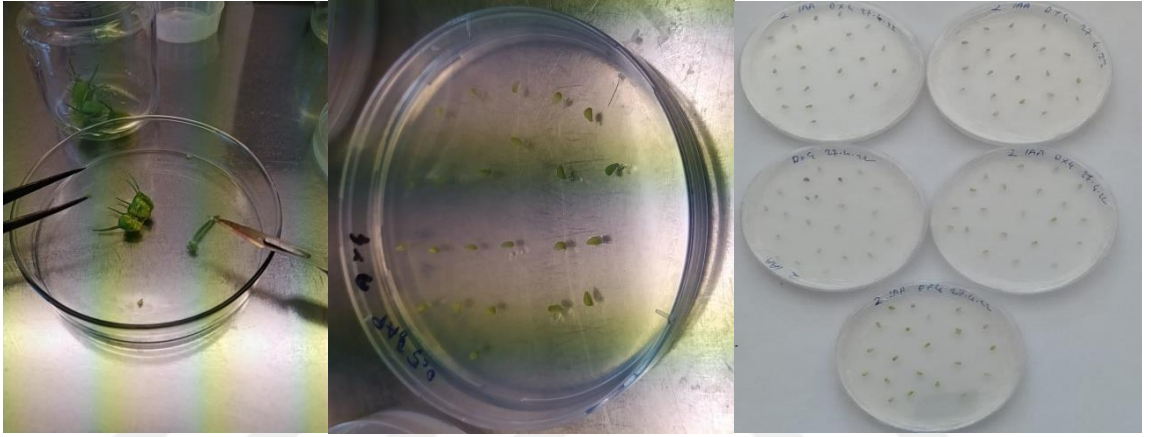
Resim 3.6 Hasat edilmiş melez kapsüller ve sterilizasyon işlemi

3.2.5. Embriyoların Kültüre Alınması

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen kapsüller laminar akışlı biyogüvenlik kabini içerisinde yine otoklavda steril edilmiş pens ve bistüri yardımı ile kesilip açılarak zigotik embriyoları içeren tohum taslakları dikkatli bir şekilde alınıp besi ortamına

yerleştirilmişlerdir. Embriyo kültürü çalışması için zigotik tohum taslakları kullanılarak her bir melezleme kombinasyonu ve besi yeri için 5 adet petri kabı kullanılmış ve her petri kabında 20 adet tohum taslağı ekilmesi kaydıyla embriyolar kültüre alınmıştır (Resim 3.7). Her bir besi ortamında toplam 300 adet embriyo kültüre alınmıştır. Her bir melezleme kombinasyonu için ise toplam 1.000 adet embriyo üzerinden kültür çalışması yürütülmüştür. Araştırmada Çizelge 3.1 ve 3.2’de içerikleri veren besi ortamları kullanılmıştır.

Ekim işleminin ardından $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ sıcaklık ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyoda sahip iklimlendirme odasında muhafaza edilmiştir.



Resim 3.7 Zigotik embriyoları içeren tohum taslaklarının kültürü

3.2.6. Verilerin Toplanması ve Analizi

Kültür tarihinden itibaren 2 ay boyunca petriler gün aşırı kontrol edilmiş oluşan kallus sayıları, direk çimlenen bitki sayıları ve kalluslardan rejenere olan bitkicik sayıları kaydedilerek 2 ayın sonunda denemeye son verilmiştir.

Elde edilen veriler Microsoft Excell paket programı ile değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farkların önem derecesi için SPSS V26 (PASW Inc., Chicago, IL, USA) istatistik paket programı kullanılarak varyans analizi yöntemi uygulanmıştır. En küçük anlamlı fark testinden elde edilen önemlilik dereceleri kullanılarak varyans analizi ile popülasyon ortalamaları arasındaki farkın anlamlılığı test edilmiştir. Duncan çoklu karşılaştırma testi ile de hangi ortalamaların farklı olduğu araştırılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Araştırmanın İlk Sezonu

4.1.1. Melezleme Çalışmaları

Bu tez çalışması kapsamında 2019-2020 yetiştirme sezonu boyunca kurulan denemede gerçekleştirilen melezleme çalışmalarına ilişkin veriler aşağıda Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Araştırmaya konu popülasyonlar arasında araştırmanın ilk yılında yapılan melezleme çalışmaları

Kombinasyonlar	Yapılan Melez Sayısı	Başarılı Melez Sayısı	Başarı Oranı (%)
Çameli x Denizli	18	11	61,1
Çameli x Ankara	23	16	69,6
Denizli x Ankara	17	11	64,7
Toplam	58	38	65,5

Çizelge 4.1’in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi araştırmanın ilk yılında toplam 58 adet melezleme yapılmış olup, bunlardan 38 adet başarılı melez elde edilmiş ve başarı oranı %65,5 olarak gerçekleşmiştir. Yapılan melezlerin kombinasyonlar düzeyinde dağılımını incelediğimizde en fazla melez Çameli x Ankara kombinasyonu arasında gerçekleştirilmiş olup yapılan 23 adet melezin 16 adeti başarıya ulaşmıştır ve başarı oranı %69,9 olarak gerçekleşmiştir. Çameli x Denizli kombinasyonundan ise toplam 18 adet melezleme yapılmış olup bu melezlerin 11 adeti başarıya ulaşmıştır ve başarı oranı %61,1 olarak gerçekleşmiştir. Yine Denizli x Ankara kombinasyonunda 17 adet melezleme yapılmış olup bunlardan 11 adet başarıya ulaşmıştır ve başarı oranı %64,7 olarak gerçekleşmiştir.

4.1.2. Embrio Kültürü Çalışmaları

Elde edilen başarılı melezlerin tohum taslaklarının kültüre alınması şeklinde gerçekleştirilen embriyo kültürü çalışmasına ilişkin olarak besi ortamlarına göre kültüre alınan embriyo miktarları ve başarı oranlarına ilişkin veriler Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Araştırmanın ilk yılında gerçekleştirilen embriyo kültürü çalışmasına ilişkin olarak besi ortamlarına göre kültüre alınan tohum taslaklarının sayıları ve başarı oranları

Besi Ortamları	Genotipler (Elde edilen kallus sayısı (% Başarı oranı))					
	Çameli X Denizli		Çameli X Ankara		Denizli X Ankara	
	Kültüre Alınan Embriyo Sayısı	Rejenere Embriyo Sayısı	Kültüre Alınan Embriyo Sayısı	Rejenere Embriyo Sayısı	Kültüre Alınan Embriyo Sayısı	Rejenere Embriyo Sayısı
MS Yalın	100	0	100	0	100	0
0,5 mg.l ⁻¹ BAP	60	0	100	0	64	0
1,0 mg.l ⁻¹ BAP	0	0	80	0	0	0
2,0 mg.l ⁻¹ BAP	0	0	0	0	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0	0	0
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	0	0	0	0	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
Genel Toplam	160	0	280	0	164	0

Çizelge 4.2'nin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi çalışmanın ilk yılında sadece Yalın MS, 0,5 mg.l⁻¹ BAP ve 1,0 mg.l⁻¹ BAP içeren ortamlarda embriyo kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiş ancak herhangi bir başarı elde edilememiştir.

4.2. Araştırmanın İkinci Sezonu

4.2.1. Melezleme Çalışmaları

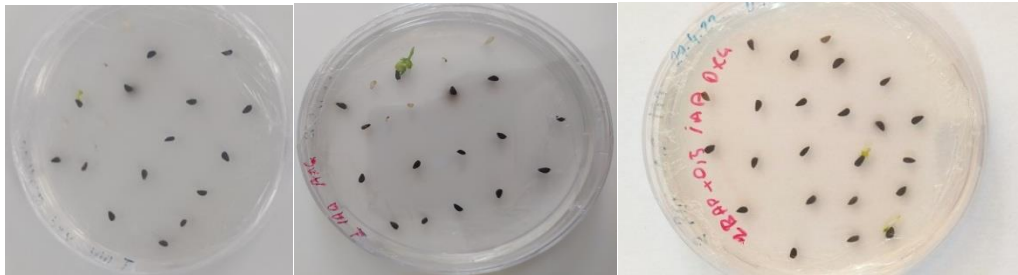
Çizelge 4.3 Araştırmaya konu popülasyonlar arasında araştırmanın 2. sezonunda yapılan yapılan melezleme çalışmaları

Kombinasyonlar	Yapılan Melez Sayısı	Başarılı Melez Sayısı	Başarı Oranı (%)
Çameli x Denizli	32	23	71,9
Çameli x Ankara	36	26	72,2
Denizli x Ankara	40	27	67,5
Toplam	108	76	70,4

Çizelge 4.3'ün incelenmesinden de anlaşılacağı gibi araştırmanın ikinci döneminde toplam 108 adet melezleme yapılmış olup, bunlardan 76 adet başarılı melez elde edilmiş ve başarı oranı %70,4 olarak gerçekleşmiştir. Yapılan melezlerin kombinasyonlar düzeyinde dağılımını incelediğimizde en fazla melez Denizli x Ankara kombinasyonu arasında gerçekleştirilmiş olup yapılan 40 adet melezin 27 adeti başarıya ulaşmıştır ve başarı oranı %67,5 olarak gerçekleşmiştir. Çameli x Ankara kombinasyonundan ise toplam 36 adet melezleme yapılmış olup bu melezlerin 26 adeti başarıya ulaşmıştır ve başarı oranı %72,2 olarak gerçekleşmiştir. Yine Çameli x Denizli kombinasyonunda 32 adet melezleme yapılmış olup bunlardan 23 adet başarıya ulaşmıştır ve başarı oranı %71,9 olarak gerçekleşmiştir.

4.2.2. Embriyo Kültürü Çalışmaları (2. Sezon)

Çalışmanın 2. sezonunda araştırmaya konu her bir besi ortamında her bir kombinasyon için zigotik embriyoları içeren tohum taslaklarından 100 adet kültüre alınmıştır. Tohum taslakları kültüre alındıktan sonra önce kararak olgun tohum halini almış ve kültür tarihinden 26 gün sonra ilk rejenerasyonlar gözlemlenmeye başlanmıştır (Resim 4.1).



Resim 4.1 Zigotik tohum taslaklarının kültürlerinde rejenerasyonlar

4.2.2.1 Kallus Oluşumuna İlişkin Bulgular

Araştırmanın ikinci sezonunda kültüre alınan embriyolarda tespit edilen kallus oluşumu ve oranlarına ilişkin veriler Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Kültüre alınan embriyolardan elde edilen kallus sayıları ve başarı oranları (%)

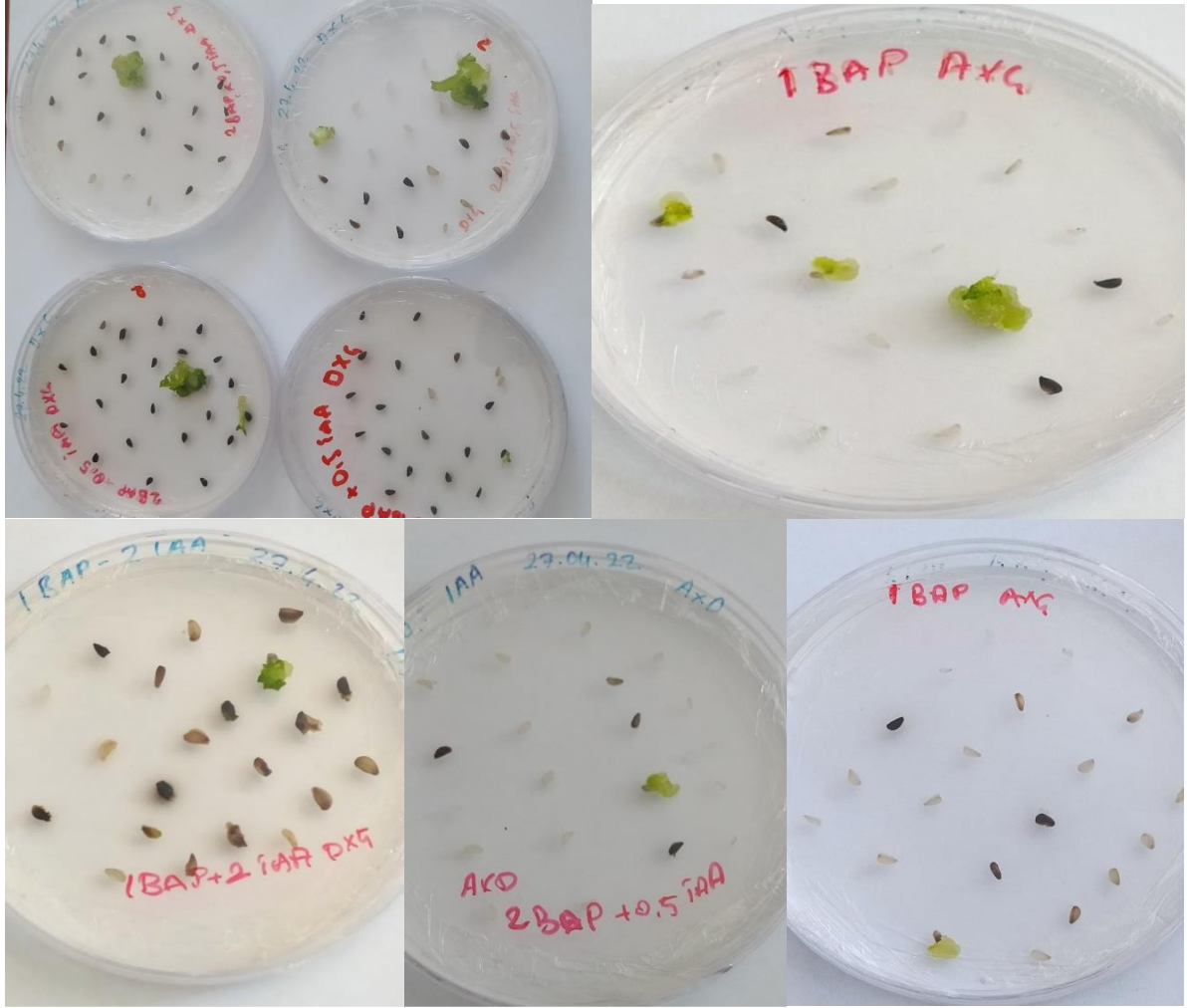
Besi Ortamları	Genotipler			Genel Başarı
	Ankara x Çameli	Ankara x Denizli	Denizli x Çameli	
MS Yalın	0	0	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ BAP	1 (1%)	2 (2%)	1 (1%)	4 (1,3%)
1,0 mg.l ⁻¹ BAP	4 (4%)	2 (2%)	0	6 (2%)
2,0 mg.l ⁻¹ BAP	1 (1%)	0	3 (3%)	4 (1,3%)
0,5 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0
1,0 mg.l ⁻¹ IAA	2 (2,0%)	0	1 (1%)	3 (1%)
2,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0
1,0 mg.l ⁻¹ BAP + 1,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	2 (2%)	1 (1%)	3 (1%)
0,1 mg.l ⁻¹ BAP + 2,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	2 (2%)	2 (0,7%)
2,0 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ IAA	0	3 (3%)	4 (4%)	7 (2,3%)
Genel Başarı	8 (0,8%)	9 (0,9%)	12 (1,2%)	29 (1,0%)

Çizelge 4.4’ün incelenmesinden de anlaşılacağı üzere kallus oluşumu açısından kültüre alınan embriyolarda en yüksek başarı oranı (4%), 2,0 mg.l⁻¹ BAP + 0,5 mg.l⁻¹ IAA bulunduran ortamda kültüre alınan Denizli x Çameli kombinasyonundan ve 1,0 mg.l⁻¹ BAP içeren ortamda kültüre alınan Ankara x Çameli kombinasyonundan elde edilmiştir.

Araştırma sonuçları besi ortamları düzeyinde değerlendirildiğinde kallus oluşumuna dair en yüksek genel başarı (2,3%) 2,0 mg.l⁻¹ BAP + 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamda sağlanmıştır. Yalın besi ortamında, 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamda ve 2,0 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamlarda kültüre alınan tohumlarda hiç kallus oluşumu gözlenememiştir.

Araştırma sonuçları genotipler düzeyinde incelendiğinde ise kallus oluşumuna dair en yüksek genel başarı (1,2%) Denizli x Çameli kombinasyonunda sağlanmıştır. Bunun

yanında Ankara x Çameli (0,8%) ve Ankara x Denizli (0,9%) kombinasyonu da kallus oluşumunda benzer başarı oranlarına sahiptir (Resim 4.2).



Resim 4.2 Kültüre alınan tohum taslaklarında kallus oluşumlarına ilişkin resimler

Kallus oluşumuna yönelik hipotezler aşağıdaki gibi kurabilir;

H_0 : Besi ortamlarının kallus oluşumuna ilişkin başarı ortalamaları birbirine eşittir.

H_0 : Genotiplere göre kallus oluşumuna ilişkin başarı ortalamaları birbirine eşittir.

H_0 : Besi ortamı ve genotip etkileşimlerinin kallus oluşumuna ilişkin başarı ortalamaları birbirine eşittir.

Kallus oluşumu ile alakalı varyans analiz tablosu Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Kallus oluşumuna ilişkin varyans analizi tablosu

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P-değeri
Besi Ortamı	9	3,307	0.367	1.361	0.214
Genotip	2	0,333	0.167	0.617	0.541
Etkileşim	18	7,133	0.396	1.468	0.114
Hata	120	32,400	0.270		
Toplam	149	43,173			

*: $p \leq 0,01$

Çizelge 4.5’de belirtilen varyans analizinde kallus oluşumuna yönelik hipotezler test edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen p-değerleri 0,01’den küçük olmadığı için hiçbir hipotez reddedilememiştir. Besi ortamlarının başarı ortalamaları arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p=0,214$). Genotiplere göre başarı ortalamaları arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p=0,541$). Aynı şekilde besi ortamı ve genotip etkileşimine göre de başarı ortalamaları arasında da anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p=0,114$).

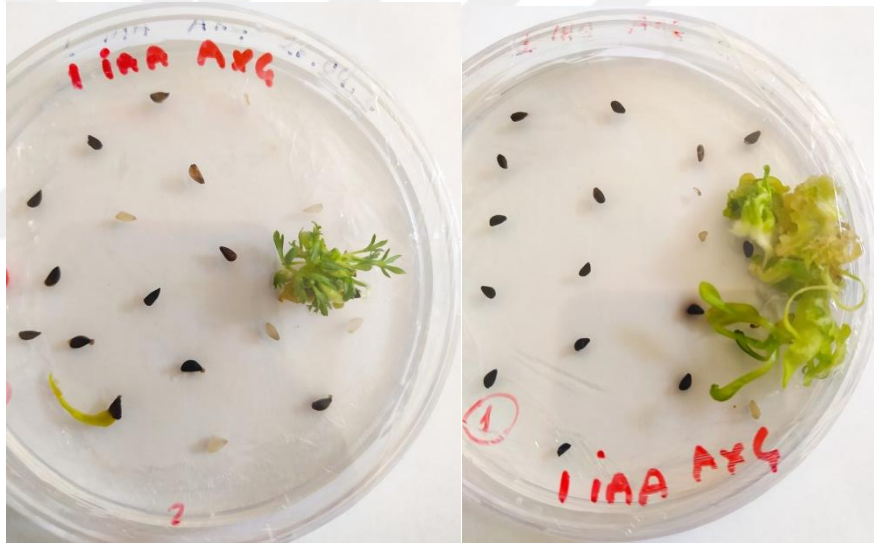
4.2.2.2 Kalluslardan Elde Edilen Bitkicik Sayılarına İlişkin Bulgular

In vitro Kültürde oluşan kalluslardan elde edilen toplam bitkicik sayıları ve kallus başına düşen ortalama bitkicik sayılarına ilişkin veriler Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Kültürde oluşan kalluslardan elde edilen toplam bitkicik sayıları ve kallus başına düşen ortalama bitkicik sayıları

Besi Ortamları	Genotipler			Ortalama Bitkicik Sayısı (Adet)
	Ankara x Çameli	Ankara x Denizli	Denizli x Çameli	
MS Yalın	0	0	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ BAP	0	7 (%3,5)	2 (%2)	9 (%2,2)
1,0 mg.l ⁻¹ BAP	0	0	0	0
2,0 mg.l ⁻¹ BAP	0	0	0	
0,5 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0
1,0 mg.l ⁻¹ IAA	23 (%11,5)	0	0	23 (%7,7)
2,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0
1,0 mg.l ⁻¹ BAP + 1,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0
0,1 mg.l ⁻¹ BAP + 2,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0
2,0 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0
Genel Başarı	23 (%2,9)	7 (%0,8)	2 (%0,2)	32 (%1,1)

Çizelge 4.6'nın incelenmesinden de anlaşılacağı üzere elde edilen kalluslardan en yüksek sayıda bitkicik 23 adet ile 1,0 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamda Ankara x Çameli kombinasyonundan elde edilmiştir. Bu besi ortamı ve kombinasyondan elde edilen 2 adet kallusun her ikisi de bitkicik oluşturmuştur (Resim 4.2). Genel başarı ortalamaları açısından da yine en yüksek başarı oranı 1,0 mg.l⁻¹ IAA ortamından (ortalama 7,67 adet) ve Ankara x Çameli kombinasyonundan elde edilmiştir (ortalama 2,88 adet). Araştırmaya konu besi ortamları içerisinde kallustan bitki oluşumu sağlanan bir diğer besi ortamı 0,5 mg.l⁻¹ BAP içeren ortam olmuştur. Bu ortamda Ankara x Denizli kombinasyonu 7 adet, Denizli x Çameli kombinasyonu ise 2 adet bitkicik oluşmuştur ve bu ortamda kallus başına düşen genel ortalama bitkicik sayısı 2,25 olarak tespit edilmiştir. Bu iki ortam dışında kallus oluşumu tespit edilen diğer ortamlarda ise bitkicik oluşumu sağlanamamıştır. Araştırma süresince elde edilen toplam 29 adet kallusdan ise toplam 32 adet bitkicik elde edilmiş olup kallus başına ortalama bitkicik oluşum oranı 1,10 adet olarak gerçekleşmiştir (Resim 4.3).



Resim 4.3 Araştırmada elde edilen kalluslardan bitkicik oluşumu

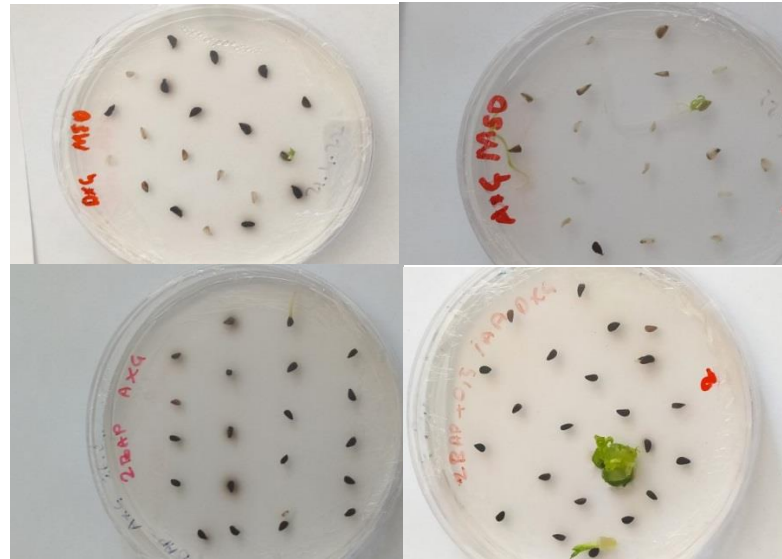
4.2.2.3 Direkt Çimlenmeye İlişkin Bulgular

Araştırmanın ikinci sezonunda kültüre alınan embriyolarda tespit edilen direkt çimlenme ve başarı oranlarına ilişkin veriler Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Kültüre alınan embriyolardan elde edilen çimlenme sayıları ve başarı oranları (%)

Besi Ortamları	Genotipler			Genel Başarı
	Ankara x Çameli	AnkaraxDenizli	Denizli x Çameli	
MS Yalın	2 (2%)	1 (1%)	2 (2%)	5 (1,7%)
0,5 mg.l ⁻¹ BAP	0	0	0	0
1,0 mg.l ⁻¹ BAP	0	0	0	0
2,0 mg.l ⁻¹ BAP	1 (1%)	0	0	1 (0,3%)
0,5 mg.l ⁻¹ IAA	1 (1%)	0	2 (2%)	3 (1%)
1,0 mg.l ⁻¹ IAA	1 (1%)	0	0	1 (0,3%)
2,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0
1,0 mg.l ⁻¹ BAP + 1,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0
0,1 mg.l ⁻¹ BAP + 2,0 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	0	0
2,0 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ IAA	0	0	2 (2%)	2 (0,7%)
Genel Başarı	5 (0,5%)	1 (0,1%)	6 (0,6%)	12 (0,4%)

Çizelge 4.7'nin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi direk çimlenme durumu bakımından kültüre alınan embriyolarda en yüksek başarı oranı yalın ortamda kültüre alınan Ankara x Çameli kombinasyonundan (2%) ve yalın ortamda, 0,5 mg.l⁻¹ IAA içeren ortamda ve 2,0 mg.l⁻¹ BAP + 0,5 mg.l⁻¹ IAA bulunduran ortamda kültüre alınan Denizli x Çameli kombinasyonundan elde edilmiştir (Resim 4.4).



Resim 4.4 Kültüre alınan tohum taslaklarında direk çimlenme

Araştırma sonuçları besi ortamları düzeyinde değerlendirildiğinde çimlenme durumu bakımından en yüksek başarı oranı (1,7%) yalın besi ortamında sağlanmıştır. Buna karşılık araştırmada kullanılan 0,5 mg.l⁻¹ BAP, 1,0 mg.l⁻¹ BAP, 2,0 mg.l⁻¹ IAA, 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 1,0 mg.l⁻¹ IAA ve 0,1 mg.l⁻¹ BAP + 2,0 mg.l⁻¹ 1 IAA içeren besi ortamlarında hiç çimlenme gözlenmemiştir.

Araştırma sonuçları genotipler düzeyinde incelendiğinde ise çimlenme durumuna dair en yüksek genel başarı (0,6%) Denizli x Çameli kombinasyonunda sağlanmıştır. Bunun yanında Ankara x Çameli kombinasyonu da çimlenme bakımından benzer başarı oranına (0,5%) sahiptir.

Çimlenme durumuna yönelik hipotezler aşağıdaki gibi kurabilir;

H_0 : Besi ortamlarının çimlenme durumuna ilişkin başarı ortalamaları birbirine eşittir.

H_0 : Genotiplere göre çimlenme durumuna ilişkin başarı ortalamaları birbirine eşittir.

H_0 : Besi ortamı ve genotip etkileşimlerinin çimlenme durumuna ilişkin başarı ortalamaları birbirine eşittir.

Araştırmaya konu besi ortamlarında direk çimlenme gerçekleştiren tohum taslaklarının varyans analiz tablosu Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Çimlenme durumuna ilişkin varyans analizi tablosu

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P-değeri
Besi Ortamı	9	2,960	0,329	2,902*	0,004
Genotip	2	0,493	0,247	2,176	0,118
Etkileşim	18	1,640	0,091	0,804	0,692
Hata	120	13,600	0,113		
Toplam	149	18,693			

*: $p \leq 0.01$

Çizelge 4.8’de belirtilen varyans analizinde çimlenme durumuna hipotezler test edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen p-değerleri 0.01’den küçük olan hipotezler reddedilmiştir. Buna göre besi ortamlarına göre başarı ortalamaları arasında anlamlı bir fark olduğu sonucuna varılmıştır. Genotipler göre başarı ortalamaları arasında anlamlı bir fark

tespit edilememiştir ($p=0.118$). Aynı şekilde besi ortamı ve genotip etkileşimine göre de başarı ortalamaları arasında da anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p=0,692$).

Çizelge 4.9 Besi ortamlarına göre çimlenme başarı oranı

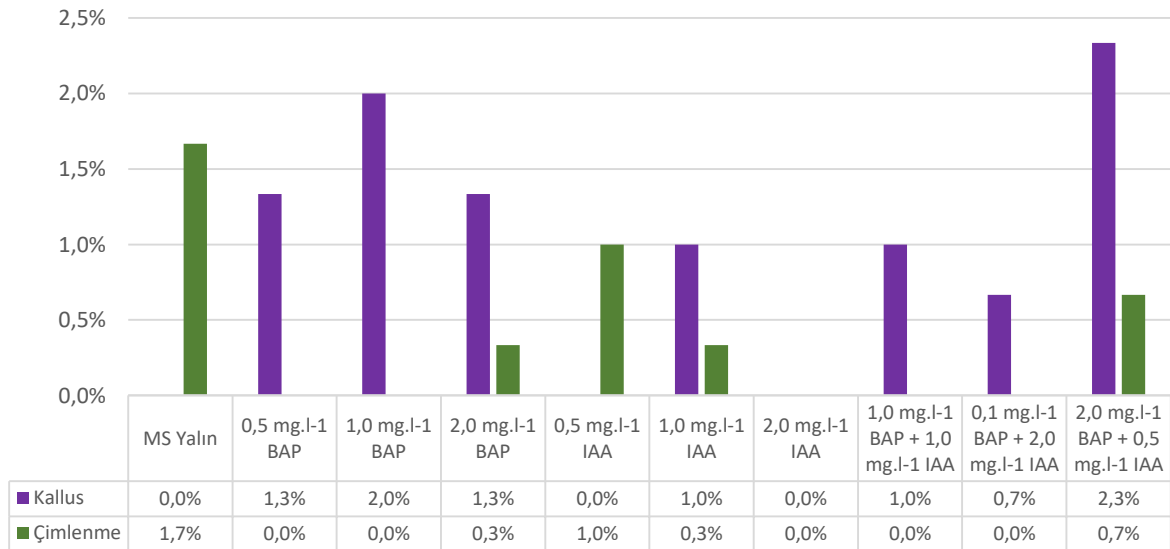
Besi Ortamları	MS Yalın	1,0 mg.l ⁻¹ BAP	2,0 mg.l ⁻¹ BAP	2,0 mg.l ⁻¹ BAP	0,5 mg.l ⁻¹ IAA	1,0 mg.l ⁻¹ IAA	2,0 mg.l ⁻¹ IAA	1,0 mg.l ⁻¹ BAP + 1,0 mg.l ⁻¹ IAA	0,1 mg.l ⁻¹ BAP + 2,0 mg.l ⁻¹ IAA	2,0 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ IAA
Çimlenme	1,7% a	0,0% b	0,0% b	0,3% b	1,0% b	0,3% b	0,0% b	0,0% b	0,0% b	0,7% b

a-b: aynı harfe sahip besi ortamları arasında fark yoktur (Duncan karşılaştırma metodu)

Çizelge 4.9'un incelenmesinden de anlaşılacağı gibi Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiki anlamda yalın besi ortamı direk çimlenme açısından en iyi performansı gösterirken diğer besi ortamları arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunamamıştır.

4.3. Besi Ortamına göre Kallus Oluşumu ve Çimlenme

Araştırmaya konu her bir besi ortamı için kallus oluşumu ve çimlenme oranları grafiksel olarak Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Besi ortamına göre kallus oluşumu ve çimlenme

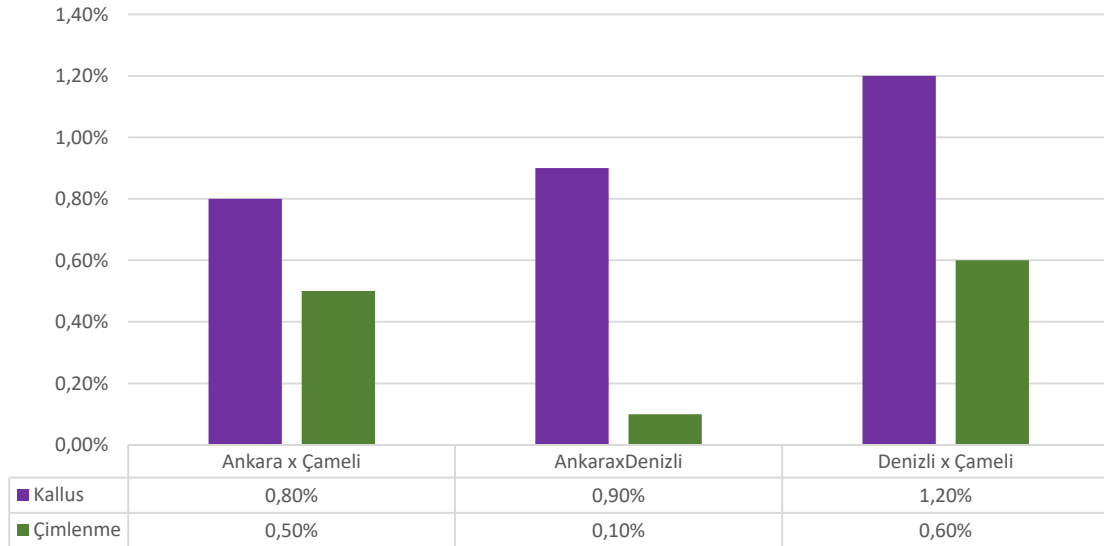
Şekil 4.1'de de görüldüğü gibi kallus oluşumuna dair en yüksek genel başarı (2,3%) 2,0 mg.l⁻¹ BAP + 0,5 mg.l⁻¹ IAA bulunduran ortamda sağlanmıştır. Yalın besi ortamında, 0,5 mg.l⁻¹ IAA bulunduran ortamda ve 2,0 mg.l⁻¹ IAA bulunduran ortamlarda kültüre

alınan tohumlarda hiç kallus oluşumu gözlenememiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre besi ortamı bakımından kallus oluşumu başarı ortalamaları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Çimlenme durumu bakımından en yüksek başarı oranı (1,7%) yalın besi ortamında sağlanmıştır. Varyans analizi ve Duncan çoklu karşılaştırma sonuçlarına göre yalın besi ortamının çimlenmeye anlamlı ve pozitif bir etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır. Buna karşılık deneylerde 0,5 mg.l⁻¹ BAP, 1,0 mg.l⁻¹ BAP, 2,0 mg.l⁻¹ IAA, 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 1,0 mg.l⁻¹ IAA ve 0,1 mg.l⁻¹ BAP + 2,0 mg.l⁻¹ 1 IAA içeren besi ortamlarında hiç çimlenme gözlenmemiştir. Diğer taraftan Rezaei vd. (2018), Uysal (2021) ve Uysal ve Sevindik (2021) çalışmalarında BAP ve/veya IAA içeren ortamlarda daha yüksek başarı oranları elde etmişlerdir.

4.4. Melezleme Kombinasyonlarına göre Kallus Oluşumu ve Çimlenme

Araştırmaya konu besi ortamlarında kültüre alınan tohum taslaklarının melezleme kombinasyonlarına göre kallus oluşum ve çimlenme oranları Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2 Melezleme kombinasyonlarına göre kallus oluşumu ve çimlenme

Şekil 4.2’nin incelenmesinden de anlaşılabileceği gibi kallus oluşumu ve çimlenmeye dair en yüksek genel başarı Denizli x Çameli kombinasyonunda sağlanmıştır. Benzer şekilde Uysal ve Sevindik (2021) çalışmalarında da Denizli x Çameli kombinasyonundan yüksek

bir kallus oluşum oranı elde edilmiştir. Kallus oluşumu bakımından Ankara x ameli (0,8%) ve Ankara x Denizli (0,9%) kombinasyonu benzer başarı oranlarına sahiptir. Ankara x ameli kombinasyonu da çimlenme bakımından %0,5 başarı oranına sahiptir. Ankara x Denizli popülasyonunda ise çok dūřuk bir çimlenme başarı oranı elde edilmiştir (%0,1). Varyans analizi sonuçlarına göre genotip bakımından hem kallus oluşumu ve hem de çimlenme başarı ortalamaları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Embriyo kültüründe başarıyı etkileyen faktörler; genotip, embriyoların yaşı, besi ortamının bileşimi, verici bitkilerin yetişme koşulları, kültürlerin geliştiği ortamdaki ışık, sıcaklık, nem gibi faktörlerdir (Hatipoğlu, 2015). Bu alışma da tüm melezleme kombinasyonları için genotip ve besi ortamının bileşimi dışındaki bütün faktörler eşit olarak uygulanmıştır. Besi ortamlarına ise farklı konsantrasyonlarda BAP (sitokin) ve IAA (oksin) hormonları ilave edilmiştir. İn vitro rejenerasyonda sürgün gelişimi için sitokin hormonları, kök gelişimini teşvik etmek için ise oksin hormonları kullanılmaktadır. Kullanılan oksin ve sitokin konsantrasyonları yüksek olduğunda kallus rejenerasyonu gerçekleşmektedir. Bu iki hormonun besi yerinde eşit miktarda ve dengeli seviyede bulunması da yine in vitro kültürde kallus oluşumunu desteklemektedir (Hatipoğlu, 2015). Yapılan bu çalışmada hormon içermeyen MS besi ortamında en yüksek oranda direk rejenerasyon tespit edilmesi ve hiç kallus oluşumuna rastlanmaması özellikle BAP veya BAP+IAA ihtiva eden besi ortamlarında kallus oluşumunun gerçekleşmiş olması besi ortamına ilave edilen oksin ve sitokin hormonlarının in vitro kültürde kallus oluşumunu teşvik ettiğini göstermektedir.

5. SONUÇ

Son dönemlerde yaşadığımız pandemi süreciyle birlikte yaşamlarımızda meydana gelen değişimlerden biri de doğal yöntemlerle tedavi ve temiz gıdaya yönelik olmuştur. Çörek otu bitkisi de hem uzun bir tarihi geçmişe sahip şifa bitkisi olarak hem de gıda, kozmetik gibi birçok alanda kullanılmasıyla tükettiğimiz popüler bitkiler arasında yer almaktadır.

Bu çalışmada, çörek otu embriyolarını farklı besin ortamı konsantrasyonlarında kültüre alarak, ticari ve tıbbi öneme sahip çörek otu bitkisinin ıslah süresini kısaltmak ve tohum çimlenmesini sağlayıp, ticaret ve sağlık alanına katkı sağlamak, ilgili yetiştirme optimizasyonlarını geliştirmek amaçlanmıştır.

Yaptığımız çalışma sonucunda, farklı besin konsantrasyonlarına kültüre alınan melezleme yaptığımız popülasyonların (Ankara x Çameli, Ankara x Denizli, Denizli x Çameli), çimlenme ve kallus oluşum durumları rapor edilmiştir. İlgili çalışmada embriyo kültür yöntemiyle çörek otu kültüründe kallus oluşumu başarı oranlarını incelediğimizde; her bir melezleme kombinasyonu için besi ortamı ve genotip etkileşimine göre başarı ortalamaları arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Çimlenme incelendiğinde; her bir çeşit için yalın (MS 0) besi ortamında çimlenmede başarı sağlanırken, genotipin çimlenme üzerine anlamlı bir etkisi tespit edilememiştir. Melezlenen Çörek otu çeşitleri incelendiğinde; kallus oluşumu ve çimlenmeye dair en yüksek genel başarı Denizli x Çameli kombinasyonunda sağlanmıştır.

Bu çalışmada melezleme kombinasyonları düzeyinde kallus oluşumu ve çimlenme üzerine anlamlı bir etki tespit edilememiştir ama daha kapsamlı deneyler sayesinde farklı sonuçlara ulaşılabilir.

Gerçekleştirdiğimiz çalışma sürecinde kullandığımız besi ortamı konsantrasyonları, melezlemesi yapılan çeşitlere ait veriler, benzer çalışmaları yapacak kişilere çalışmalarında kullanacakları çeşit ve ortam konsantrasyonları bakımından fikir sahibi olmalarına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Acıbuca, V. ve Bostan Budak, D. (2018). Dünya’da ve Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Yeri ve Önemi. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 33 (1), 37-44. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/cutarim/issue/38663/360703>
- Al-Ani, N. K. (2008). Thymol production from callus culture of *Nigella sativa* L.. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, (18, pp. 181-185).
- Al-Gaby, A. M. (1998). Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* (Black cumin) cake protein. *Nahrung*, 42 (5): 290-294.
- 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.
- Ayaşan, T. (14-16 Eylül 2011). *Çörek otu ve kanatlı hayvan beslemede kullanımı*. [Kongre Sunumu]. 7. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, Adana, 2011
- Ball, E. (1959). Growth of the embryo of *Ginkgo biloba* under experimental conditions. III. Growth rates of root and shoots upon media absorbed through the cotyledons. *Amer. Jour. Bot.* 46: 130-139.
- Banerjee, S. ve Gupta, S. (1975). Morphogenesis in tissue cultures of different organs of *Nigella sativa*. *Physiologia Plantarum*, 33(3), 185-187.
- Banerjee, S. ve 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
- Baytop, T. (1984), Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), *İstanbul Üniversitesi Yayınları*, No:3255, İstanbul.
- Beasley, J. P. (1940). Hybridization of American 26-chromosome and Asiatic 13-chromosome species of *Gossyium*. *Jour. Agr. Res.* 60: 175-181.
- Bhojvani, S.S. ve Razdan, M.K. (1996). Plant Tissue Culture: Theory and Practise, Revised Edition, pp.297-335, *Elsevier Science*, Amsterdam.

- 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).
- Blakeslee, A. F. ve Safiana, S. (1944). New hybrids from incompatible crosses in *Datura* through culture of excised embryos on malt media. *Science* 99: 331-334-.
- Blociszewski, T. (1876). Physiologische Untersuchungen über die keimung und samentheile bedecktsamiger pflanzen.
- Bonnet, C. (1754). Recherches sur l'usage des feuilles dans les plantes: et sur quelques autres sujets relatifs à l'histoire de la vegetation.
- Bouharmont, J. (1961). Embryo culture of rice on sterile medium. *Euphytica* 10: 283-293.
- Brown, H. T. ve Morris, G. H. (1890). Researches on the germination of some of the Gramineae. *Jour. Chem. Soc.* 57: 4-58-528.
- Brown, H. T. (1906). On the culture of the excised embryos of barley on nutrient solutions containing nitrogen in different forms. *Trans. Guinness Res. Lab.* 1: 288-299.-,
- Buckner, J. D. ve Kastle, J. H. (1917). The growth of isolated embryos. *Jour. Biol. Chem.* 29: 209-213.
- Burdock, G. (2022). Assessment of black cumin (*Nigella sativa L.*) as a food ingredient and putative therapeutic agent. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.*; 128:105088
- Camara, A. (1943). TransplantacSo de embriões. *Agron. Lusit.* 5:375-386. [Biol. Abs. 20, 1946, entry 11735].
- Carew, D. P. ve Schwarting, A. E. (1958). Production of rye embryo callus. *Botanical Gazette*, 119(4), 237-239.
- Ceylan, A. (1983). Tıbbi Bitkiler (1. Genel Bölüm). *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları* No:312, Bornova-İzmir.
- Chand, S. ve 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.
- Chand, S. ve Roy, S. C. (2014). Effects of different auxins on chromosome behaviour of leaf callus tissues of *Nigella sativa*. *Cell Chromosome News Letter.* 1: 10.

- Choudhury, B. (1955). Embryo culture technique. I. The growth of immature tomato embryos in vitro. *Indian Jour. Agr.* 12: 143-151.
- Dağüstü, N. (2018). Bitki Doku Kültürü Uygulamalarının Islah Çalışmalarında Kullanılması, *TÜRKTOB Dergisi*, 25, 23-26.
- Datta, A. K., Biswas, A. K., Ghosh, P. D. (1983). Chromosomal variations in callus tissues of two species of *Nigella*. *Nucleus*, 26: 173-177.
- De Capite, L. (1955). La coltura dei frutti in vitro da fiori reesi di *Fragaria chiloensis* Ehrh. *X F. virginica* Duch. var. *marshall* e di *Pisum sativum* L. var. *zekka*. *Ric. Sci. Ital.* 25: 532-538.
- DeMaggio, A. E. and Wetmore, R. H. (1961). Morphogenetic Studies On The Fern *Todea Barbara*. III. Experimental Embryology. *American Journal of Botany*, 48: 551-565. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1961.tb11681.x>
- Dietrich, K. (1924). Ueber die Kultur von Embryonen ausserhalb des Samens. *Flora* 117: 379-417.
- Dinçoğlu, M. (2014). Buhârî İle Ebû Dâvud'un Hocasi Müsedded B. Müserhed Ve Hadis İlimindeki Yeri, *Atatürk Üniversitesi İlahiyat Fakültesi Dergisi*, Sayı: 41, Erzurum, 347-372.
- Dure, L. S. ve Jensen, W. A. (1957). The influence of gibberellic acid and indoleacetic acid on cotton embryos cultured in vitro. *Botanical Gazette*, 118(4), 254-261.
- Ekmekçigil, M. (2006) *Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbariyumu (Ank) Ranunculaceae Familyası revizyonu* Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- 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.
- Essenbeck, C. K. ve Suessencuth, K. (1925). Ober die aseptische Kultur pflanzenlicher Embryonen zugleich ein Beitrag zum Nachweis der Enzymausscheidung. *Arch. Exp. Zellforsch.* 1: 547-590.

- FAO. (2022). Wild check – Assessing risks and opportunities of trade in wild plant ingredients. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb9267en>
- Farooqui, Z., Shahid, F., Khan, A.A., Khan, F. (2017). Oral Administration of *Nigella sativa* Oil and Thymoquinone Attenuates Long Term Cisplatin Treatment Induced Toxicity And Oxidative Damage In Rat Kidney, *Biomed Pharmacother*, 96: 912-923.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M. S. (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi*, 2011, 11 (1): 52 – 67
- Fregene, M., Ospina, J.A., Roca, W. (1999) Recovery of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants from culture of immature zygotic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 55:39–43
- Fridriksson, S. ve Bolton, J. L. (1963). Preliminary report on the culture of alfalfa embryos. *Canad. Jour. Bot.* 41: 439-440.
- Furuya, M., ve Soma, K. (1957). The effects of auxins on the development of bean embryos cultivated in vitro. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo*, 7, 163-198.
- Ganesan, A. T., Shah, S. S., Swaminathan, M. S. (1957). Cause for the failure of seed setting in the cross *Corchorus olitorius* X *C. capsularis*. *Curr. Sci.* 26: 292-293
- Gorter, C. J. (1955). In vitro culture of cyclamen embryos. *Kninbl. Nederl. Akad. van Wetens. Pro. Ser. C*, 58: 377-385.
- Grant, W. F., Bullsi, M. R., Nettancourt, D. D. (1962). The cytogenetics of Lotus. L Embryo-cultured interspecific diploid hybrids closely related to *L. corniculatus* L. *Canad. Jour. Genet. & Cytol.* 4: 105-128.
- Gregory, F. G. ve Purvis, O. (1938). Vernalisation of excised embryos. *Nature* 142:481-482.
- Gris, A. (1864). Recherches anatomiques, et physiologiques sur la germination. *Ann. Sci. Nat. V Bot.* 2: 5-123.
- Hadfi, K., Speth, V., Neuhaus, G. (1998). Auxin induced developmental patterns in Brassica juncea embryos. *Development* 125:879–887.

- Hakimi, Y., Fatahi, R., Shokrpour, M., Naghavi, M. (2022). Investigation of Germination Characteristics of Four Medicinal Plants Seed (Lavender, Hyssop, Black cumin and Scrophularia) Under Interaction Between Salinity Stress and Temperature Levels. *Journal of Genetic Resources*, 8(1), 35-45. doi: 10.22080/jgr.2021.21801.1262
- Hall, O. L. (1956). Further experiments in embryo transplantation. *Hereditas* 42: 261-262.
- Hanning, E. 1904. Zur Physiologic pflanzenlicher Embryonen. I. Ober die Kultur von Cruciferen-Embryonen ausserhalb des Embryosacks. *Bot. Zeit.* 62: 45-80.
- Hatipoğlu, R. (2015). *Bitki Biyoteknolojisi*. Ders Kitabı, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Yayın No:176, Adana.
- Haynes, F. L. (1954). Potato embryo culture. *Amer. Potato Jour.* 31: 282-288.
- He, Y. C., He, Y. Q., Qu, L. H., Sun, M. X., Yang, H. Y. (2007). Tobacco zygotic embryogenesis in vitro: the original cell wall of the zygote is essential for maintenance of cell polarity, the apical-basal axis and typical suspensor formation. *Plant J* 49, 515-27.
- Honma, S. (1955). A technique for artificial culturing of bean embryos. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 65: 405-408.
- Hoseini-Nasr, S. M., Modanloo, S., Jalilvand, H., Mofidabadi, A. J. (2007). Seed dormancy breakage of recalcitrant yew species (*Taxus baccata L.*) using embryo culture. *J Biol Sci* 7:781–785.
- Ipor, I.B., Oyen, L. P. A. (1999). *Nigella sativa L.* In: Guzman, C.C., Siemonsma, J.S. (Eds.), Plant Resources of South-East Asia, No. 13 Spices. *Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands*, pp. 148–151.
- Iwanowskaya, E. V. (1946). Hybrid embryos of cereals grown on artificial nutrient medium. *Comp. Rend. Acad. Sci. (Doklady)*. [U.R.S.S.] 54: 445-448. (Biol. Astr. 22: Entry 2749).
- Kan, Y., Arslan, N., Altun, L., Kartal, M. (2004). Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kültürünün Ekonomik Önemi. XIV. BİHAT Toplantısı (7–9 Ekim Belek/Antalya), Bildiriler Kitabı, 28–32.

- Keim, W. F. (1953). An embryo culture technique for forage legumes. *Agron. Jour.* 45: 509-510.
- Khan, M. A., Abbasi, B. H., Ahmed, N., Ali, H. (2013). Effects of light regimes on in vitro seed germination and silymarin content in *Silybum marianum*. *Ind. Crops Prod.* 46: 105-110.
- Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz.* 73: 1-15.
- Konzak, C. F., Randolph, L. F., Jensen, N. F. (1951). Embryo culture of barley species hybrids. Cytological studies of *Hordeura sativum X H. bulbosura*. *Jour. Here* 42: 125-134.
- Koşar, İ. ve Özel, A. (2018). Çörek otu (*Nigella sativa L.*) çeşit ve popülasyonlarının karakterizasyonu: Tarımsal özellikler. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 22(4): 533-453. DOI: 10.29050/harranziraat.399540
- Kott, L.S ve Kasha, (1985). Embiryo Culture and Haploid Plant Production 2: 46-68.
- Kumlehn J., Lörz, H., Kranz, E. (1998) Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants. *Planta* 205:327–333
- Kurt, O. (2004). Bitki Islahı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ders Kitabı, 2. Baskı. Yayın No: 43.
- Kurt, O. ve Şavşatlı, Y. (2005): A general view to plant biyotechnology. *J. of Fac. of Agric. OMU*, 20 (3):126-133.
- Laibach, F. (1925). Das Taubwerden der Bastardsamen und die kiinstliche Aufzucht fr/ih absterbender Bastard-embryonen. *Zeits. Bot.* 17: 417-4-59.
- Lammerts, W. E. (1942). Embryo culture, an effective technique for shortening the breeding cycle of deciduous trees and increasing germination of hybrid seed. *Amer. Jour. Bot.* 29: 166-171.
- Larue G. S. ve Awery Y. (1938). The development of the embryo of *Zir aquatica* in the seed and in artificial culture. *Bull. Torrey Bot. Club.* 65: 11-21.
- Larue, C. D. (1936). The growth of plant embryos in culture. *Bull. Torrcy But. Club* 9 63: 365-382.

- Mahmoud, M.S., Gilani, A.H., Khwaja, A., Rashid, A., Ashfaq, M.K. (2002). The In Vitro Effect of Aqueous Extract of *Nigella sativa* Seeds on Nitric Oxide Production, *Phytother. Res.*, 17, 92.
- McClean, S. W. (1945). New hybrids with the aberrant species, *Datura ceratocaula*, secured by embryo dissection. [Abs.] *Genetics* 30: 14-15.
- Merry, J., ve Goddard, D. R. (1941). A respiratory study of barley grain and seedlings. *Proc. Rochester Acad. Sci.* 8(28-44), 736.
- Mohammad, A. M. S. ve 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.
- Morsi, N. M. (2000). Antimicrobial Effect Of Crude Extracts of *Nigella sativa* on Multiple Antibiotics-Resistant Bacteria, *Acta microbiologica Polonica*, 49(1): 63-74.
- Murashige, T. ve Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murneek, A. E. ve Whyte, R. O. (1948). Vernalisation and photoperiodism. A symposium. H 22-26. Waltham, Mass. U. S. A.
- Narayanaswami, S. ve Norstog K. (1964). Plant embryo culture. *The Botanical Review*, 30 (4): 587-628.
- Nickavara, B., Mojaba, F., Javidniab, K., Amolia, M.A.R. (2003). Chemical Composition of The Fixed and Volatile Oils of *Nigella sativa* L. from Iran, *Naturforsch.*, 58(9-10): 629-631.
- Nickell, L. G. (1951). Embryo culture of weeping crabapple. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 57: 401-405.
- Nikolić, R., Mitić, N., Miletić, R., Neskovic, M. (2006). Effects of Cytokinins on In Vitro Seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. *J. Pl. Growth Regul.* 25: 187-194.
- Norstog, K. (1979). Embryo culture as a tool in the study of comparative and developmental morphology, p. 179–202. In: W.R. Sharp, P.O. Larsen, E.F. Paddock, and V. Raghavan (eds.). Plant cell and tissue culture. *Ohio State Univ. Press*, Columbus.

- Özel, A., Demirel, U., Güler İ., Erden, K. (2009). Farklı Sıra Aralığı ve Tohumluk Miktarlarının Çörek Otunda (*Nigella sativa* L.) Verim ve Bazı Tarımsal Kaözrakterlere Etkisi, *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*; 13(1), 17-25.
- Pollard, J. K., Shantz, E. M., Steward, F. C. (1961). Hexitols in coconut milk: Their role in nurture of dividing cells. *Plant Physiol.* Jul;36(4):492-501. doi: 10.1104/pp.36.4.492.
- Prezent, I. I. (1954). Use of endosperm in embryo culture. *Izv. Akad. Nank. [SSSR.] Ser. Biol.* 1: 59.
- Ragaa, H. M. (2010). HMS Clinical and Therapeutic Trials of *Nigella Sativa*. *TAF Prev Med Bull.* 9(5): 513-522
- Ramming, D. W. (1990). The use of embryo culture in fruit breeding. *HortScience* 25:393–398.
- Randolph, L. F. (1945). Embryo culture of Iris seed. *Bull. Amer. Iris Soc.* 97: 33-45.
- Randolph, L. F. ve Cox, L. G. (1955). Factors influencing the germination of Iris seed and the relation of inhibiting substances to embryo dormancy. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 48: 284-300.
- 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 cummin (*Nigella sativa* L.) seeds. *Journal of Chemical Metrology*, 12(2), 98.
- Rijven, A. H. G. C. (1952). In vitro studies on the embryo of *Capsella bursapastoris*. *Acta Bot. Need.* 1: 158-200.
- Salem, M. L. ve Shamim, H. M. (2000). Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection, *International Journal of Immunopharmacology*, 22(9): 729-740.
- Sanders, M. E. (1948). Embryo development in four *Datura* species following self and hybrid pollinations. *Amer. Jour. Bot.* 35: 525-532.
- Sanders, M. E. (1950). Development of self and hybrid *Datura* embryos in artificial culture. *Proc. Nat. Acad. Sci. [U.S.A.]* 34: 516-526.

- Sauer, M. ve Friml, J. (2004). In vitro culture of *Arabidopsis* embryos within their ovules. *Plant J.* Dec;40(5):835-43. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02248.x. PMID: 15546365.
- Schooler, A. B. (1960). The effect of gibrel and gibberellie acid (K salt) in embryo culture media for *Hordeum vulgare*. *Agron. Jour.* 52: 411.
- Schopfer, W. H. (1949). Plants and vitamins, pp. 60-64. Waltham, Mass. U.S.A.
- Skirm, G. W. (1942). Embryo culturing as an aid to plant breeding. *Jour. Hered.* 33: 210-215.
- Skovsted, A. (1935). Cytological studies in cotton. III. A hybrid between *Gossy~ium davidsonii Kell.* and *G. sturtii F. Muell.* *Jour. Genet.* 30: 397- 406.
- Smith, P. C. (1944). Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 44: 413-416.
- Solacolu, T. ve Constantinesco, D. (1936). Action de l'acide B-indolyacétique sur la développement des plantules. *Comp. Rend. Acad. Sci.[Paris]*, 203, 437-440.
- Stingl, G. (1907). Experimentelle Studie über die Ernährung von pflanzlichen Embryonen. *Flora oder Allgemeine Botanische Zeitung.* 97(3) :308-331,
- Süle, R. (2005). Farklı Oksin Çeşitlerinin Yonca (*Medicago sativa L.*) Somatik Embriyo Oluşumu Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, M. K. Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya.
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M. (2007). Farmasötik Botanik. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları.* No: 93.
- T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü. (2020). *Çörek Otu Fizibilite Raporu ve Yatırımcı Rehberi.* Ankara. <https://www.tarimorman.gov.tr/SGB/TARYAT/Belgeler/Projeler/%C3%87orek+Otu+Fizibilite+Raporu+ve+Yatirimci+Rehberi.pdf>. [Erişim tarihi: 14/05/2022]
- Tukey, H. B. (1933). Artificial culture of sweet cherry embryos. *Jour. Hered.* 24: 7-12.
- Tukey, H. B. (1934). Artificial culture methods for isolated embryos of deciduous fruits. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 32: 313-322.

- Tukey, H. B. (1938). Growth patterns of plants developed from immature embryos in artificial culture. *Bot. Gaz.* 99: 630-665.
- Tukey, H. B. (1944). The excised-embryo method of testing the germinability of fruit seed with particular reference to Peach seed 9 *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 45: 211-219.
- Türkiye Bitkileri Veri Servisi [TUBİVES], (2022). Türkiye Bitki Verileri Servisi. <https://www.tubives.com> adresinden erişildi (E.T. 27.06.2022).
- TÜİK, (2022). Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr> adresinden erişildi (E.T. 27.06.2022).
- Uttaman, P. (1949). Culturing of proembryos of normal diploid corn (maize) aged 3-7 days. *Curr. Sci.* 18: 215-216.
- Uysal, H. (2021). In vitro propagation of black cumin (*Nigella sativa L.*) plants. *Genetika.* 53(1), 295-303.
- Uysal, H., Seyis, F., Kurt, O. (2007). Tarla Bitkilerinde Melezleme Bariyerlerinin Aşılmasında Alternatif Bir Yöntem: Embriyo Kültürü. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 22 (1), 116-122.
- Uysal, H. ve Sevindik, E. (2021). Development of breeding lines by zigotic ovule culture in *Nigella sativa L.* *Genetika.* 53(2), 583-591.
- Üstün, G., Turkyay S., Karaali A. (1998). *Nigella sativa* seeds: a potential source for oil and oleochemicals, in *Proceedings of the World Conference on Oil Seed and Edible Oil Processing*, Vo1. II, ed. By Koseoglu SS, Rhee KC and Wilson Rf. AOCS Press, Champaign, IL, pp. 155-160.
- Van Tieghem, P. (1873). Recherches Physiologiques sur la Germination. *Ann. Soc. Bot. Lyon* 17: 205-224.
- Vasiljevic, L. (1989). Embryo Culture, Use of Biotechnology in Sunflower Breeding, 1987 and 1988 Progress Report
- Von Guttenberg, H., ve Wiedow, H. L. (1952). Über den Wirkstoffbedarf isolierter Haferembryonen. *Planta*, 41(2. H), 145-166.
- Webster, G. I. (1955). Interspecific hybridization of *Melilotus alba* X *M. officinalis* using embryo culture. *Agron. Jour.* 47: 138-142.

- Werckmeister, P. (1934). Ober die ktinstliche Aufzucht yon Embryonen aus Iris Bastardsamen. *Gartenbauwiss.* 8: 607.
- Worthen, D. R. (1998). The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa L.*, *Anticancer Res.*, 18(3A): 1527-1532.
- Yamasaki, Y. (1947). The growth of embryo transplanted between different species and genera of cereal crops. *Jap. Jour. Genet.* 22: 33-34.
- Yiğitbaşı, H. H. (2019). *Çörekotu (Nigella Spp.) Türlerinde Verim Ve Bazı Kalite Özelliklerinin Araştırılması* Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Konya.
- 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.
- Zenkter, M. (1961). Intraovarian and in vitro pollination. *International Review of Cytology*, 11, 137-156.
- Zhang, J., Dong, W. H., Galli, A., Potrykus, I. (1999). Regeneration of fertile plants from isolated zygotes of rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Rep* 19:128–132.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“ÇÖREK OTU (*Nigella sativa* L.) BİTKİSİNDE EMBRİYO KÜLTÜRÜ ARACILIĞIYLA ISLAH HATLARININ 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.

Merve Aydın MORTAŞ

... / ... / ...

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : AYDIN MORTAŞ Merve

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2022
Lisans	Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji	2017
Lise	Etimesgut Lisesi	2011

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2019-2021	ORSER Kontrol ve Sertifikasyon Şirketi	Kontrolör