

Zeatin ve Farklı Oksin Kombinasyonlarının Önemli Tıbbi Bitki *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr.'nin *In Vitro* Mikroçoğaltımı Üzerine Etkisi

Muhammet DOĞAN

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Karaman, Türkiye

<https://orcid.org/0000-0003-3138-5903>

✉: mtdogan1@gmail.com

ÖZET

Bu çalışma, tıbbi bitki *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr.'nin doku kültürü teknikleriyle hızlı ve verimli bir şekilde üretilmesi üzerine Zeatin (ZEA) ve oksin kombinasyonlarının etkilerini sunmaktadır. *L. aromatica*'nın yaprak eksplantları 0.10-1.60 mg L⁻¹ ZEA ve 0.10 mg L⁻¹ indol-3-asetik asit (IAA), indol-3-butirik asit (IBA) ve naftalen asetik asit (NAA) eklenmiş Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında altı hafta boyunca kültüre alınmıştır. Hormon uygulamaları kıyaslandığında eksplant başına maksimum sürgün sayısı 0.10 mg L⁻¹ ZEA + 0.10 mg L⁻¹ IBA içeren MS besin ortamında elde edilmiştir (25.29 adet), ardından 0.10 mg L⁻¹ ZEA + 0.10 mg L⁻¹ IBA içeren MS besin ortamında tespit edilmiştir (23.72 adet). Sürgün uzunlukları ZEA+IAA uygulamalarında 1.24-1.41 cm, ZEA+IBA uygulamalarında 1.28-1.47 cm ve ZEA+NAA uygulamalarında 1.16-1.34 cm olarak elde edilmiştir. En uzun sürgünler ZEA+IBA'nın kullanıldığı kültür ortamlarında kaydedilmiştir. Rejenere sürgünler, 0.25 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamında köklendirilmiş ve köklenmiş bitkiler akvaryuma başarıyla alıştırılmıştır. Sonuç olarak *in vitro* üretim için en uygun hormon kombinasyonu 0.10 mg L⁻¹ ZEA + 0.10 mg L⁻¹ IBA olarak tespit edilmiştir. Bu üretim protokolü, ticari olarak büyük ölçekte üretim için faydalı olabilir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 19.04.2019

Kabul Tarihi : 17.07.2019

Anahtar Kelimeler

Doku kültürü

L. aromatica

Mikroçoğaltım

Oksin

Yaprak eksplant

Zeatin

The Effect of Zeatin and Different Auxin Combinations on *In Vitro* Micropropagation of *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr., an Important Medicinal Plant

ABSTRACT

This study presents the effects of Zeatin (ZEA) and auxin combinations on the fast and efficient production of medicinal plant *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. by tissue culture techniques. The leaf explants of *L. aromatica* were cultured on Murashige and Skoog (MS) nutrient medium supplemented with 0.10-1.60 mg L⁻¹ ZEA and 0.10 mg L⁻¹ indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA) and naphthaleneacetic acid (NAA) for six weeks. The maximum number of shoots per explant compared to hormone applications were obtained in MS nutrient medium containing 0.10 mg L⁻¹ ZEA + 0.10 mg L⁻¹ IBA (25.29), followed by in the MS nutrient medium containing 0.10 mg L⁻¹ ZEA + 0.10 mg L⁻¹ IBA (23.72). The shoot lengths were obtained as 1.24-1.41 cm in ZEA + IAA applications, 1.28-1.47 cm in ZEA + IBA applications and 1.16-1.34 cm in ZEA + NAA applications. The longest shoots were recorded in culture media using ZEA + IBA. The regenerated shoots were rooted on MS medium containing 0.25 mg L⁻¹ IBA and then the rooted plantlets were successfully acclimatized in an aquarium. As a result, the most suitable hormone combination for *in vitro* production was determined as 0.10 mg L⁻¹ ZEA + 0.10 mg L⁻¹ IBA. This production protocol may be useful for commercially large scale production.

Research Article

Article History

Received : 19.04.2019

Accepted : 17.07.2019

Keywords

Tissue culture

L. aromatic

Micropropagation

Ouxin

Leaf explant

Zeatin

GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artması ve buna bağlı olarak artan antropojenik aktiviteler, doğal ekosistemi hızla aşındırmakta ve çok sayıda bitki türünün doğal yaşam alanı tahrip etmektedir. Ayrıca birçok bitkinin habitatlarından aşırı toplanması, bitkilerin neslini tehlikeye sokmaktadır. Bitkilerin geleneksel yöntemler ile üretilmesi birçok kısıtlamayı beraberinde getirir. Tohum yoluyla yetiştirilen bitkinin çoğu yüksek heterozigottur ve büyüme-gelişme ve verim açısından büyük farklılıklar gösterebilir. Ayrıca, bitkilerin birçoğu kesme ve aşılama yoluyla vejetatif çoğalmaya elverişli olmadığından istenen çeşitlerin üretilmesi sınırlıdır. Bu endişe verici durumla başa çıkmak için en önemli yöntemlerin başında biyoteknolojik bir uygulama olan bitki doku kültürü gelmektedir (Sharma ve ark., 2010).

Bitki doku kültürü ışık, nem ve sıcaklık kontrollü ve aseptik koşullar altında suni bir besin ortamında bitki hücre ve dokularından yeni bitki ve bitkisel ürünlerin elde edilmesi olarak tanımlanabilir (El-Sherif, 2018). Bu kontrollü üretim sistemi, aynı genetik özelliklere sahip yüksek verimli bitkilerin üretilmesine imkan verir ve üretimde homojenlik ve standardizasyonun sağlanır (Chaturvedi ve ark., 2007). Bu teknik ile çeşitli alanlarda kullanılabilen biyoaktif bileşiklerin üretimi ve özellikle de biyolojik çeşitliliğin sürdürülebilir bir şekilde korunması sağlanabilir (Karuppusamy, 2009). 1994 yılında Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), bitki hücresi ve doku kültürü tekniklerini gıda amaçlı doğal bileşikler üretme süreci olarak desteklemiştir (Anand, 2010; Roberto ve Francesca, 2011; Diasa ve ark., 2016).

Mikroçoğaltım, bitkilerin dokularından veya tohumlarından bitkisel büyütme ve çoğaltma sürecidir (Zhou ve Wu, 2006). Mikroçoğaltım, bitki hücrelerinin ve dokularının yepyeni bir bitkiye dönüşme yeteneği olan totipotensi kavramına dayanır. Geleneksel üretimde, birçok bitki filizlenmez, çiçek açmaz, belirli iklim koşullarında tohum üretmez veya uzun büyüme ve çoğalma sürelerine sahiptir. Mikroçoğaltım, minimum alan ve zaman kullanarak düzenli bir şekilde bitki tedariki sağlayabilir. Bitkinin *in vitro* mikroçoğaltımının avantajları aşağıda listelenmiştir (Sidhu, 2010)

- Yüksek çoğaltım oranı
- Bitkinin özel ihtiyaçlarını karşılayarak, kontrollü ortamda üretim.
- Tüm yıl boyunca, bölgesel veya mevsimsel değişikliklerden bağımsız üretim
- İstenilen özelliklere sahip klonların üretimi
- Sekonder metabolitlerin üretimi
- Genetik olarak geliştirilmiş bitkiler üretilir
- Tehdit altındaki bitki türlerinin korunması
- Kriyoprezervasyonla genetik materyalin korunması

Mikroçoğaltım çalışmalarında kitlesel üretim için bitki büyüme düzenleyicileri / bitki hormonları etkin rol oynamaktadır. Bitki hormonları, düşük konsantrasyonlarda fizyolojik süreçleri etkileyen organik bir gruptur. Etkilenen süreçler genel olarak büyüme, farklılaşma ve gelişmedir. Ancak stoma hareketi gibi diğer süreçler de etkilenebilir. Bitki organları arasındaki morfolojik farklılıkların, hormon kompozisyonlarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Davies, 2010). Aynı zamanda bitki hormonları olarak da bilinen bitki büyüme düzenleyicilerinin keşfedilmesi, bitkilerin çimlenmesinden büyüme-gelişmesine kadar tüm fizyolojik sürecin kontrol edilmesine izin verilerek, organ ve doku gibi özelleşmiş hücrelerden *in vitro* bitki kültürünün gelişmesinde önemli katkı yapmıştır (Diasa ve ark., 2016). Son yıllarda bitki büyüme düzenleyicilerin farklı konsantrasyonlarda etkilerinin araştırıldığı güncel birçok çalışma yayınlanmıştır (Sun ve ark., 2018; Emsen ve Dogan, 2018; Dogan, 2018, 2019, Imtiaz ve ark., 2019).

Limnophila aromatica (Lamk.) Merr. tıbbi ve baharat amaçlı kullanılan bir bitkidir. *L. aromatica*, tamamlayıcı tıp uygulamalarında diyare, bazı bakteriyel enfeksiyonlar, sindirim sorunu, ülser, iltihap, nefes darlığı ve kan damarı hastalıklarının iyileştirilmesinde yararlanılmaktadır (Kukongviriyapan ve ark., 2007). Bu çalışmada, Zeatin (ZEA) ve farklı oksin kombinasyonunun *L. aromatica*'nın yaprak eksplantlarından *in vitro* mikroçoğaltımı üzerine etkileri araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada kullanılan *L. aromatica* bitkileri, Türkiye'nin Konya ilinde akvaryum bitkileri satan bir mağazadan temin edilmiştir. Ön sterilizasyon işlemi olarak 3-5 boğum bölgesini içeren üst gövde parçaları kesildi ve 15 dakika boyunca musluk suyu altında bekletilmiştir. Bitkinin yüzey sterilizasyonu için bu üst gövde parçaları 10 dakika boyunca % 20 çamaşır suyu (NaOCl) ile muamele edilmiştir. Ardından her biri 3 defa 5 dakika boyunca sürekli karıştırılarak sterilize distile su ile durulanmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra, boğum eksplantları steril koşullar altında izole edilmiş ve % 3 sukroz (Duchefa) ile takviye edilmiş ve % 0.65 agar (Duchefa) ile katılaştırılmış Murashige ve Skoog (MS) (1962) ortamında dört hafta boyunca kültüre alınmıştır. Stok bitki oluşturulması için kültür ortamlarına herhangi bir büyüme düzenleyicisi ilave edilmemiştir.

Çoğaltım çalışmalarında buralardan elde edilen steril sürgünlerin yaprak eksplantları kullanılmıştır. Yaprak eksplantları % 3 sukroz, % 0.65 agar ve farklı konsantrasyonlarda Zeatin (ZEA) ile 0.10 mg L⁻¹ indol-3-asetik asit (IAA), indol-3-butirik asit (IBA) ve naftalen asetik asit (NAA) içeren MS besin ortamında

altı hafta süre ile kültüre alınmıştır. Eksplantlar ayrıca kontrol grubu olarak büyüme varyantları olmayan MS ortamında kültüre alınmıştır (Çizelge 1).

Bitki büyüme düzenleyicileri, uygun çözücülerle çözüldükten sonra 1 mg mL⁻¹ oranında stok solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlar -20 °C'de saklanmıştır. Hazırlanan kültür ortamlarına aktarılacak ZEA, IBA ve IAA filtre ile steril edildikten sonra MS besin ortamlarına aktarılmıştır. NAA ise MS besin ortamları ile birlikte otoklavda steril edilmiştir.

Tüm ortamların pH'ı otoklavlanmadan önce 1N NaOH ve 1N HCl ile 5.8 ± 0.1'e ayarlanmıştır. Ardından ortamlar 120 °C'de 20 dakika boyunca 118 kPa atmosferik basınçta otoklavlanmıştır. Bütün

kültürler, beyaz floresan lambalar altında 16 saat ışık fotoperiyodunda (5000 lüks), 24±1 °C'de inkübe edilmiştir. Altı haftalık kültürden sonra, deney sonlandırılmış ve sürgün rejenerasyon verileri alınmış ve analiz edilmiştir.

Aseptik koşullar altında rejenere sürgünler yaklaşık 3 cm uzunluğunda kesilmiş ve *in vitro* köklendirme için 0.25 mg L⁻¹ IBA'lı MS ortamını içeren Macenta GA⁷ kaplarında kültüre alınmıştır. Dört haftalık kültürden sonra, köklenen sürgünler üzerindeki agar akan musluk suyu altında dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bitkiler, iklimlendirme için musluk suyu ve kum içeren akvaryuma transfer edilmiştir ve üç hafta beklenmiştir (16 saat ışık; 23 °C).

Çizelge 1. Çoğaltım çalışmalarında kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri

Zeatin (ZEA - mg L ⁻¹)	İndol-3-asetik asit (IAA - mg L ⁻¹)	İndol-3-butirik asit (IBA - mg L ⁻¹)	Naftalen asetik asit (NAA - mg L ⁻¹)
0	0	0	0
0.10	0.10	-	-
0.20	0.10	-	-
0.40	0.10	-	-
0.80	0.10	-	-
1.60	0.10	-	-
0.10	-	0.10	-
0.20	-	0.10	-
0.40	-	0.10	-
0.80	-	0.10	-
1.60	-	0.10	-
0.10	-	-	0.10
0.20	-	-	0.10
0.40	-	-	0.10
0.80	-	-	0.10
1.60	-	-	0.10

Her deneysel uygulama, altı tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler SPSS 21 for Windows programı istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Post Hoc testleri için de Duncan testleri uygulanmıştır. Veriler arasındaki korelasyon analizi için Pearson tek yönlü analiz kullanılmıştır. Yüzdelerde verilen veriler istatistiksel analizden önce arkine dönüşüme tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran, 1997).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, *L. aromatica*'nın yaprak eksplantları *in vitro* mikroçoğaltım amacıyla farklı konsantrasyonlarda ZEA ve 0.10 mg L⁻¹ IAA, IBA ve NAA içeren kültür ortamında altı hafta boyunca inkübe edilmiş ve bitkilerin etkin üretimi başarıyla sağlanmıştır. Doku kültürü teknikleri ile bitkilerin üretiminde yaprak eksplantları önemli bir doku parçasıdır. Bu nedenle yaprak eksplantları kullanılarak *in vitro* bitki üretimi konusunda son yıllarda güncel raporlar yayınlanmaktadır. Üretimi gerçekleştirilen bitkilere *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. (Faria ve ark., 2018), *Prunus*

pseudocerasus Lindl (Sun ve ark., 2018) ve *Echinops kebericho* (Enyew ve Feyissa, 2019) verilebilir.

Mevcut çalışmada, yaprak eksplantlarından ilk sürgünlerin çıkışı, IBA'lı MS besin ortamında 14. günde, NAA'lı MS besin ortamında 16. günde ve IAA'lı MS besin ortamında 18. günde gözlenmiştir. Üç hafta sonunda kültür ortamındaki yaprak eksplantlarından çoklu sürgünler belirgin şekilde gözlenmeye başlanmıştır. Altı hafta sonunda deneme sonlandırılmış ve rejenerasyon verileri alınarak varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 2).

Çizelge 2'de görüldüğü gibi, ZEA + IAA uygulamalarında sürgün rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı $p < 0.01$ seviyesinde anlamlı bulunurken, sürgün uzunluğu $p < 0.05$ seviyesinde anlamlı bulunmuştur. ZEA + IBA ve ZEA + NAA uygulamalarında sürgün rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri $p < 0.01$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır (Çizelge 3).

Çizelge 2. ZEA+IAA, ZEA+IBA ve ZEA+NAA kombinasyonlarının *L. aromatica*'nın yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		Kareler Ortalaması ₁	F değeri	Kareler Ortalaması	F değeri	Kareler Ortalaması	F değeri
ZEA + IAA							
Ortam	5	1407.656	13.03**	64.12	21.39**	0.03	3.43*
Hata	12	108.03	-	3.00	-	0.01	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-
** $p < 0.01$ düzeyinde önemli; * $p < 0.05$ düzeyinde önemli							
ZEA + IBA							
Ortam	5	666.82	7.20**	186.85	24.43**	0.04	4.32**
Hata	12	92.61	-	7.65	-	0.01	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-
** $p < 0.01$ düzeyinde önemli							
ZEA + NAA							
Ortam	5	805.76	5.80**	97.10	15.53**	0.02	3.33**
Hata	12	138.91	-	6.25	-	0.01	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-
** $p < 0.01$ düzeyinde önemli							

Çizelge 3. ZEA+IAA, ZEA+IBA ve ZEA+NAA kombinasyonlarının *L. aromatica*'nın yaprak eksplantlarında sürgün rejenerasyonuna etkisi

Büyüme Düzenleyicileri (mg L ⁻¹)		Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)
ZEA	IAA			
0	0	44.44 ^c	3.11 ^d	1.15 ^b
0.10	0.10	88.89 ^{ab}	9.20 ^c	1.37 ^a
0.20	0.10	94.44 ^a	11.53 ^c	1.41 ^a
0.40	0.10	100.00 ^a	15.27 ^{ab}	1.35 ^a
0.80	0.10	100.00 ^a	15.61 ^a	1.29 ^{ab}
1.60	0.10	72.22 ^b	12.32 ^{bc}	1.24 ^{ab}
ZEA	IBA			
0	0	61.11 ^b	3.16 ^c	1.18 ^c
0.10	0.10	83.33 ^a	25.29 ^a	1.45 ^{ab}
0.20	0.10	100.00 ^a	23.72 ^a	1.47 ^a
0.40	0.10	100.00 ^a	18.33 ^b	1.42 ^{ab}
0.80	0.10	94.44 ^a	18.30 ^b	1.35 ^{abc}
1.60	0.10	94.44 ^a	15.16 ^b	1.28 ^{bc}
ZEA	NAA			
0	0	55.55 ^b	3.44 ^c	1.12 ^c
0.10	0.10	100.00 ^a	15.40 ^{ab}	1.28 ^{ab}
0.20	0.10	100.00 ^a	19.50 ^a	1.34 ^a
0.40	0.10	88.89 ^a	17.58 ^{ab}	1.27 ^{ab}
0.80	0.10	83.33 ^a	16.34 ^{ab}	1.23 ^{abc}
1.60	0.10	88.89 ^a	13.42 ^b	1.16 ^{bc}

ZEA+IAA ZEA+IBA ve ZEA+NAA uygulamaları için aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

Sürgün rejenerasyon yüzdeleri ZEA+IAA içeren MS besin ortamında % 72.22-100.00, ZEA+IBA ve ZEA+NAA içeren MS besin ortamlarında % 83.33-100.00 arasında değişmiştir. Maksimum sürgün rejenerasyon oranları (% 100) ZEA+IAA

uygulamalarında 0.40 ve 0.80 mg L⁻¹ ZEA + 0.10 mg L⁻¹ IAA içeren kültür ortamında, ZEA+IBA uygulamalarında 0.20 ve 0.40 mg L⁻¹ ZEA + 0.10 mg L⁻¹ IBA içeren kültür ortamında ve ZEA+NAA uygulamalarında 0.10 ve 0.20 mg L⁻¹ ZEA + 0.10 mg

L^{-1} NAA içeren kültür ortamında tespit edilmiştir. Genel olarak yüksek sürgün rejenerasyon değerleri kaydedilmiştir. En düşük sürgün rejenerasyon frekansları ise tüm denemelerde bitki büyüme düzenleyici içermeyen (kontrol grubu) MS besin ortamlarında belirlenmiştir. Mevcut çalışmayla uyumlu olarak, yüksek oranda stokin ve düşük oranda oksin içeren kültür ortamlarının *in vitro* çoğaltım için etkin kullanımı daha önce Ayyav ve ark. (2012), Maheshwari ve Kumar (2006) ve Sivanesan ve Jeong (2007) tarafından raporlanmıştır. Tafvizi ve ark. (2009) *Gossypium hirsutum* L.'in *in vitro* sürgün rejenerasyonu üzerine ZEA'nın etkisini araştırmış ve çoklu sürgün indüksiyonu için en iyi uygulamanın ZEA'nın düşük oranda (0.1 mg L^{-1}) kullanıldığı MS besin ortamında tespit etmiştir. Buna karşın, Enyew ve Feyissa (2019) *E. kebericho*'in yaprak eksplantlarını $1.0-2.5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + 0.5 mg L^{-1} NAA içeren MS besin ortamına aktarmış ve düşük oranda sürgün rejenerasyon frekansları kaydetmiştir (% 6.67-33.33). Bu sonuçlar, sürgün rejenerasyonu üzerine hormonların etki mekanizmalarının bitki türlerine göre farklılık gösterebileceğini ortaya koymuştur.

Eksplantlarının ZEA ve farklı oksin hormonları ile kombinasyonlarına verdikleri tepkiler farklılık göstermiştir. Örneğin, ZEA+IBA uygulamasında ZEA'nın orta seviyelerde kullanılması ve ZEA+NAA uygulamasında ise genel olarak ZEA'nın düşük seviyelerde kullanılması hücrelerin rejenerasyon kabiliyetini pozitif yönde teşvik etmiştir. Diğer yandan ZEA+IAA denemelerinde ZEA'nın yüksek seviyelerde kullanılması hücrelerin rejenerasyon kabiliyetini olumlu teşvik etmiştir. Bu farklı etkiler, hormonların yapısal farklılığından veya hormonların eksplant

üzerindeki etki mekanizmasındaki farklılıklarından kaynaklanabilir. Bu bulguları destekleyen sonuçları Haddadi ve ark. (2013) *Fragaria x ananassa* cv. Camarosa'da bildirmiştir. $0-16 \mu\text{M}$ ZEA, kinetin ve $6-\alpha,\alpha$ -dimethylallylamino pürine içeren kültür ortamında en yüksek *in vitro* sürgün çoğaltımını $4-\mu\text{M}$ ZEA içeren MS kültür ortamında elde etmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı istatistiksel olarak $p < 0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. ZEA + IAA eklenmiş kültür ortamında 9.20-15.61 adet, ZEA + IBA eklenmiş kültür ortamında 15.16-25.29 adet, ZEA + NAA eklenmiş kültür ortamında 13.42-19.50 adet olarak sayılmıştır (Çizelge 3). ZEA + IAA uygulamalarında en yüksek sayıda sürgünler 15.61 adet ile 0.80 mg L^{-1} ZEA + 0.10 mg L^{-1} IAA içeren kültür ortamında (Şekil 1a), ardından ise 15.27 adet ile 0.40 mg L^{-1} ZEA + 0.10 mg L^{-1} IAA içeren kültür ortamında elde edilmiştir. ZEA + IBA uygulamalarında eksplant başına maksimum sürgün sayısı 25.29 adet ile 0.10 mg L^{-1} ZEA + 0.10 mg L^{-1} IBA içeren MS besin ortamında (Şekil 1b), ardından 23.72 adet ile 0.20 mg L^{-1} ZEA + 0.10 mg L^{-1} IBA içeren MS besin ortamında tespit edilmiştir. ZEA + NAA denemelerinde en fazla sürgün sayısı 19.50 adet ile 0.20 mg L^{-1} ZEA + 0.10 mg L^{-1} NAA içeren MS besin ortamında (Şekil 1c), ardından 17.58 adet ile 0.40 mg L^{-1} ZEA + 0.10 mg L^{-1} NAA içeren MS besin ortamında kaydedilmiştir. Masekesa ve ark. (2019) tatlı patates bitkilerinin doku kültürü ile üretimi için farklı konsantrasyonlarda sitokinleri içeren (ZEA, Kinetin ve Tidiazuron) kültür ortamında deneme kurmuşlardır. En yüksek sürgün sayısı ve rejenerasyonunu 0.2 mg L^{-1} ZEA içeren MS besin ortamında elde etmişlerdir.



Şekil 1. Sekiz hafta sonunda ZEA+IAA, ZEA+IBA ve ZEA+NAA içeren MS besin ortamında *L. aromatica*'nın yaprak eksplantlarından *in vitro* sürgün rejenerasyonları. (a) 0.80 mg L^{-1} ZEA + 0.10 mg L^{-1} IAA içeren kültür ortamındaki *in vitro* sürgünler (b) 0.10 mg L^{-1} ZEA + 0.10 mg L^{-1} IBA içeren kültür ortamındaki *in vitro* sürgünler (c) 0.20 mg L^{-1} ZEA + 0.10 mg L^{-1} NAA içeren kültür ortamındaki *in vitro* sürgünler

Eksplant başına sürgün sayısı bakımından her üç farklı hormon uygulamaları karşılaştırıldığında en yüksek sonuçlar ZEA+IBA'da, en düşük sonuçlar ZEA+IAA'da tespit edilmiştir. Ayrıca, IBA ve NAA uygulamalarında ZEA'nın düşük seviyede kullanılması yaprak eksplantlarından sürgün çıkışı

olumlu yönde etkilerken, IAA uygulamalarında ZEA'nın yüksek seviyelerde kullanımı daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde sürgün sayısı üzerinde oksin hormonlarının farklı etkiler gösterdiği anlaşılabilir.

Yaprak eksplantlarından çıkan rejenere sürgünlerin

uzunlukları istatistiksel olarak $p < 0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur. Sürgün uzunlukları ZEA+IAA uygulamalarında 1.24-1.41 cm, ZEA+IBA uygulamalarında 1.28-1.47 cm ve ZEA+NAA uygulamalarında 1.16-1.34 cm olarak kaydedilmiştir (Çizelge 3). IBA içeren kültür ortamındaki sürgünlerin boyları, IAA ve NAA içeren kültür ortamındaki sürgünlerden daha uzun olarak ölçülmüştür. Ayrıca 0.20 mg L⁻¹ ZEA içeren kültür ortamları sürgün uzunluğu bakımından daha iyi sonuçlar vermiştir. Buna karşın, en kısa sürgünler ise 1.60 mg L⁻¹ ZEA içeren kültür ortamında belirlenmiştir. Bu sonuçlar, *L. aromatica* için sitokin ve oksinlerin yüksek oranda kombinasyonunun sürgün uzunluğunu azaltıcı etki yapabileceğini göstermiştir. Benzer şekilde yüksek sitokin ve oksin uygulamasının sürgün uzunluğunu azaltıcı etkisi daha önce *Ruta graveolens* L. (Ahmad ve ark., 2010), *Jatropha curcas* (Kumar ve Reddy, 2010) ve *Toddalia asiatica* (L.) Lam (Anand ve ark., 2015) bitkilerinde de bildirilmiştir.

Çizelge 4'de verilen korelasyon matrislerine göre, eksplant başına sürgün sayısı ile sürgün rejenerasyon

değerleri arasında pozitif yönlü ilişki olduğu tespit edilmiştir (ZEA+IAA için $r = 0.747$, $p < 0.01$; ZEA+IBA için $r = 0.477$, $p < 0.05$; ZEA+IBA için $r = 0.712$, $p < 0.01$). Eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu arasında ZEA+IBA ($r = 0.752$, $p < 0.01$) ve ZEA+NAA ($r = 0.634$, $p < 0.01$) için pozitif yönlü bir ilişki belirlenirken, ZEA+IAA uygulamasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir ($r = 0.390$, $p > 0.05$). Bu sonuçlar bize sürgün rejenerasyon, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verilerinin birbiriyle ilişkili parametreler olduğunu göstermiştir.

Rejenere sürgünlerin *in vitro* köklendirilmesi için yaklaşık 3 cm uzunluklarında kesilen üst gövde parçaları 0.25 mg L⁻¹ IBA içeren kültür ortamına transfer edilmiştir. Köklendirme işlemi dört hafta sonunda başarıyla sağlanmıştır. Köklü bitkiler ardından *ex vitro* koşullara alıştırılması için su içeren akvaryumlara aktarılmıştır. İlk bir haftada bitkilerin yapraklarında ve boylarında uzamalar gözlenmiştir. Üçüncü haftada doku kültürü şartlarında çoğaltılan bitkiler akvaryum ortamına başarıyla alıştırılmıştır sağlamıştır.

Çizelge 4. Farklı ZEA+IAA, ZEA+IBA ve ZEA+NAA uygulamaları için *L. aromatica*'da Pearson korelasyon katsayıları

ZEA+IAA uygulamaları	Sürgün Rejenerasyonu	Eksplant Başına Sürgün Sayısı	Sürgün Uzunluğu
Sürgün Rejenerasyonu	1	0.747**	0.666**
Eksplant Başına Sürgün Sayısı	0.747**	1	0.390
Sürgün Uzunluğu	0.666**	0.390	1
ZEA+IBA uygulamaları	Sürgün Rejenerasyonu	Eksplant Başına Sürgün Sayısı	Sürgün Uzunluğu
Sürgün Rejenerasyonu	1	0.477*	0.550**
Eksplant Başına Sürgün Sayısı	0.477*	1	0.752**
Sürgün Uzunluğu	0.550**	0.752**	1
ZEA+NAA uygulamaları	Sürgün Rejenerasyonu	Eksplant Başına Sürgün Sayısı	Sürgün Uzunluğu
Sürgün Rejenerasyonu	1	0.712**	0.652**
Eksplant Başına Sürgün Sayısı	0.712**	1	0.634**
Sürgün Uzunluğu	0.652**	0.634**	1

*Korelasyon 0.05 seviyesinde önemli (Tek yönlü)

**Korelasyon 0.01 seviyesinde önemli (Tek yönlü)

SONUÇ

In vitro mikroçoğaltım çalışmaları, tıbbi ve ticari açıdan önemli bitkilerin üretilmesi için önemli bir yöntemdir. Ayrıca bu yöntem eczacılık alanında ve ilaç sanayinde kullanılan bitkilerin büyük ölçekli üretimine imkan sağlayabilmektedir. Mevcut bu çalışma, ZEA'nin farklı oksin hormonları ile kombinasyonu durumunda *L. aromatica*'nın yaprak eksplantlarından *in vitro* hızlı ve çoklu üretimini sunmaktadır. Yaptığımız literatür araştırmalarına göre ZEA ve farklı oksinleri içeren kültür ortamında *L. aromatica*'nın yaprak eksplantı ile bir doku kültürü çalışması tespit edilmemiştir. ZEA ve oksin etkileşimini içeren bu çalışma *L. aromatica* için ilk rapordur. ZEA+IAA, ZEA+IBA ve ZEA+NAA karşılaştırıldığında maksimum sayıda sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu ZEA+IBA kombinasyonunda tespit edilmiştir. Sürgün sayısı bakımından en iyi hormon kombinasyonları ise 0.80 mg L⁻¹ ZEA + 0.10 mg L⁻¹ IAA, 0.10 mg L⁻¹ ZEA + 0.10 mg L⁻¹ IBA ve 0.20

mg L⁻¹ ZEA + 0.10 mg L⁻¹ NAA olarak bulunmuştur. *L. aromatica* önemli bir tıbbi ve aromatik bitkidir. Bu üretim protokolü, ticari olarak büyük ölçekte üretim için faydalı olabilir. Ayrıca, *L. aromatica*'nın doğal ortamlarından toplanmasının önüne geçerek neslinin korunmasına yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

- Ahmad N, Faisal M, Anisa M, Aref IM 2010. *In vitro* Callus Induction and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Ruta graveolens* L. South African Journal of Botany, 76(3): 597-600.
- Anand S 2010. Various Approaches for Secondary Metabolite Production Through Plant Tissue Culture. Pharmacia 1: 1-7.
- Anand SP, Velmurugan G, Doss A 2015. *In-vitro* Direct Regeneration from Nodal Explants of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. Asian Journal of Plant Science and Research, 5(1): 49-53.
- Ayyavu M, Devarajan T, Gabriel M. 2012. Rapid *In*

- Vitro* Plant Regeneration From Leaf Explants of *Launaea sarmentosa* (Willd.) Sch. Bip. ex Kuntze. *Biological Research*, 45: 131-136.
- Chaturvedi HC, Jain M, Kidwai NR 2007. Cloning of Medicinal Plants Through Tissue Culture-A Review. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45: 937-948.
- Davies PJ 2010. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. (In: Davies P.J. (eds) *Plant Hormones*. Springer, Dordrecht) 1-15.
- Diasa MI, Sousa MJ, Alves RC, Ferreira ICFR 2016. Exploring Plant Tissue Culture to Improve the Production of Phenolic Compounds: A Review. *Industrial Crops and Products*, 82: 9-22.
- Dogan M 2018. *In Vitro* Micropropagation from Nodal Explants of the Medicinal Plant *Lysimachia nummularia* L.. *KSU Journal of Agriculture and Nature*, 21(6): 875-881.
- Dogan M 2019. Multiple Shoot Regeneration Via Indirect Organogenesis from Shoot Tip and Nodal Meristem Explants of *Ceratophyllum demersum* L. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 29(2): 568-577.
- El-Sherif NA 2018. Impact of Plant Tissue Culture on Agricultural Sustainability. (In: Negm A., Abubashim M. (eds) *Sustainability of Agricultural Environment in Egypt: Part II. The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer, Cham.) 93-107.
- Emsen B, Dogan M 2018. Evaluation of Antioxidant Activity of *In Vitro* Propagated Medicinal *Ceratophyllum demersum* L. Extracts. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 17(1): 23-33.
- Enyew M, Feyissa T, 2019. *In Vitro* Shoot Regeneration From Leaf Explants of *Echinops kebericho*: An Endangered Endemic Medicinal Plant. *Plant Biosystems*, 153(2): 199-204.
- Faria DV, Simao MJ, Cipriano R, Werner ET, Soares TCB, Aoyama EM, Lima-Gontijo ABP 2018. *In vitro* Morphogenesis and Micropropagation of *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. f. (Bromeliaceae) from Leaf Explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54(5): 530-536.
- Haddadi F, Abd Aziz M, Kamaladini H, Rayanfar SA 2013. Thidiazuron- and Zeatin-Induced High-Frequency Shoot Regeneration from Leaf and Shoot-Tip Explants of Strawberry. *Horttechnology*, 23(3): 276-281.
- Imtiaz M, Khattak AM, Khan MA, Jalal F, Hussain S, Said F, Bo H, 2019. Rapid *In-Vitro* Propagation of *Chrysanthemum morifolium* Through Shoot Bud Explants. *Pakistan Journal of Botany*, 51(3): 1093-1098.
- Karuppusamy S 2009. A Review On Trends In Production Of Secondary Metabolites from Higher Plants by *In Vitro* Tissue, Organ And Cell Cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3: 1222-1239.
- Kukongviriyapan U, Luangaram S, Leekhaosong S, Kukongviriyapan V, Preeprame S, 2007. Antioxidant and Vascular Protective Activities of *Cratoxylum formosum*, *Syzygium gratum* and *Limnophila aromatica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(4): 661-666.
- Kumar N, Reddy MP 2010. Plant Regeneration Through the Direct Induction of Shoot Buds from Petiole Explants of *Jatropha curcas*: a Biofuel Plant, *Annals of Applied Biology*, 156(3): 367-375.
- Maheshwari P, Kumar A 2006. Organogenesis, Shoot Regeneration, And Flowering Response of *Vernonia cinerea* to Different Auxin And Cytokinin Combinations. *In Vitro Cell Dev Biol.* 42: 589-595.
- Masekesa TR, Gasura E, Ngadze E, Icishahayo D, Kujeke GT, Chidzondo F, Robertson I 2016. Efficacy of Zeatin, Kinetin and Thidiazuron in induction of adventitious root and shoot from petiole explants of sweetpotato cv. Brondal. *South African Journal of Botany*, 104: 1-5.
- Murashige T, Skoog F 1962. A Revised Medium For Rapid Growth And Bioassays With Tobacco Tissue Cultures. *Physiological Plantarum*, 15: 473-497.
- Roberto T, Francesca M 2011. Sustainable Sourcing Of Natural Food Ingredients by Plant Cell Cultures. *Agro Food Industry Hi Tech*, 22: 26-28.
- Sharma S, Rathi N, Kamal B, Pundir D, Kaur B, Arya S 2010. Conservation of Biodiversity of Highly Important Medicinal Plants of India Through Tissue Culture Technology- A Review. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(5): 827-833.
- Sidhu Y 2010. *In Vitro* Micropropagation Of Medicinal Plants By Tissue Culture. *The Plymouth Student Scientist*, 4(1): 432-449.
- Sivanesan I, Jeong BR 2007. Direct Shoot Regeneration From Nodal Explants of *Sida cordifolia* Linn. *In Vitro Cell Dev Biol.* 43: 436-441.
- Snedecor GW, Cochran WG 1997. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Sun QR, Sun HY, Bell RL, Guan QZ 2018. Plant Regeneration From *In Vitro* Leaf Explants of *Prunus pseudocerasus* Lindl. *Propagation of Ornamental Plants*, 18(1): 3-11.
- Tafvizi F, Farahanei F, Sheidai M, Nejadstattari T 2009. Effects of Zeatin And Activated Charcoal in Proliferation of Shoots And Direct Regeneration In Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 8(22): 6220-6227.
- Zhou LG, Wu JY 2006. Development and Application of Medicinal Plant Tissue Cultures for Production of Drugs and Herbal Medicinals in China. *Natural Product Reports*, 23: 789-810