

Limnophila aromatica (Lamk.) Merr.'nin Boğum ve Boğum Arası Eksplantlarından *In Vitro* Sürgün Rejenerasyonu

Muhammet DOĞAN¹

ÖZET: *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. geneneysel tıpta yaygın şekilde kullanılan önemli tıbbi ve aromatik bir bitkidir. Bu çalışmada, *L. aromatica*'nın çoklu ve hızlı üretimi için boğum ve boğum arası eksplantları 0.10 mg L⁻¹ Gibberellik asit (GA₃) ve 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 ve 1.60 mg L⁻¹ Tidiazuron (TDZ) kombinasyonlarını içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında sekiz hafta boyunca kültüre alınmıştır. Genel olarak her iki tip eksplant için de yüksek sürgün rejenerasyon yüzdeleri elde edilmiştir. Boğum eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısı (21.44 adet) ve en uzun sürgünler (1.68 cm) sırasıyla 0.10 mg L⁻¹ GA₃ + 0.40 mg L⁻¹ TDZ ve 0.10 mg L⁻¹ GA₃ + 0.10 mg L⁻¹ TDZ içeren MS ortamında tespit edilmiştir. Boğum arası eksplantlarında, maksimum eksplant başına sürgün sayısı (17.46 adet) ve en uzun sürgünler (1.60 cm) sırasıyla 0.10 mg L⁻¹ GA₃ + 0.20 mg L⁻¹ TDZ ve 0.10 mg L⁻¹ GA₃ + 0.05 mg L⁻¹ TDZ eklenmiş MS ortamında elde edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi ile boğum eksplantı, boğumarası eksplantından daha fazla rejenerasyon sürgün vermiştir. Rejenerasyon sürgünleri 0.25 mg L⁻¹ indol butirik asit (IBA) içeren MS ortamında başarılı bir şekilde köklendirilmiştir. Köklenen sürgünlerin akvaryum ortamına alıştırılması başarıyla sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Boğum eksplant, çoğaltım, *in vitro*, *Limnophila aromatica*, TDZ.

In Vitro Shoot Regeneration of *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. from Nodal and Internodal Explants

ABSTRACT: *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. is an important medicinal and aromatic plant widely used in the traditional medicine. In this study, nodal and internodal explants of *L. aromatica* (Lamk.) Merr. were cultured for multiple and rapid production on Murashige and Skoog (MS) medium containing combinations of 0.10 mg L⁻¹ Gibberellic acid (GA₃) and 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 and 1.60 mg L⁻¹ Thidiazuron (TDZ) for eight weeks. In general, high shoot regeneration percentages were obtained for both types of explants. In nodal explants, the maximum number of shoots per explant (21.44) and the highest shoot length (1.68 cm) were determined in MS medium containing 0.10 mg L⁻¹ GA₃ + 0.40 mg L⁻¹ TDZ and 0.10 mg L⁻¹ GA₃ + 0.10 mg L⁻¹ TDZ, respectively. In internodal explants, the maximum number of shoots per explant (17.46) and the highest shoot length (1.60 cm) were obtained in MS medium supplemented with 0.10 mg L⁻¹ GA₃ + 0.20 mg L⁻¹ TDZ and 0.10 mg L⁻¹ GA₃ + 0.05 mg L⁻¹ TDZ, respectively. With the effect of plant growth regulators, the nodal explants gave more regenerated shoots than the internodal explants. Regenerated shoots were successfully rooted on MS medium containing 0.25 mg L⁻¹ indole butyric acid (IBA). Successful adaptation of the rooted shoots to the aquarium environment has been achieved.

Keywords: Nodal explant, propagation, *in vitro*, *Limnophila aromatica*, TDZ.

¹ Muhammet DOĞAN (0000-0003-3138-5903), Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji, Karaman, Türkiye

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Muhammet DOĞAN, mtdogan1@gmail.com

GİRİŞ

Limnophila aromatica (Lamk.) Merr. (familya: Scrophulariaceae) Güneydoğu Asya'dan tropikal ve subtropikal Afrika'ya, ve Avustralya ve Pasifik Adaları'na kadar yayılış gösterebilen çok yıllık bir bitkidir. Özellikle Hindistan genelinde yaygın olarak bulunur. Akvatik bir bitki olan *L. aromatica*, genellikle su altında yaşamaktadır. Fakat bazen su üstüne çıkan gövdeleri de mevcuttur. Su üstüne çıkan gövdeleri, genellikle su yüzeyinin 2-15 cm üzerindedir. Su altı gövdeleri pürüzsüzdür. Dişli kenarlı yapraklara sahip olan yaprakları yaklaşık 30 mm uzunluğundadır. Boyları yaklaşık 3.60 metre uzunluğuna çıkabilir. Çiçekleri beyaz, pembe, mor veya mavi renkte olabilir. Çiçekler sapsız ve yaprak ekseninde taşınır. Her biri 4-5 mm uzunluğunda beş, yeşil, tüylü loblara sahip sepalleri vardır. Meyveleri 150 yakın tohum içeren kapsüllerdir (Brahmachari, 2014).

L. aromatica Güneydoğu Asya'da tıbbi ve baharat amaçlı kullanılan önemli bir bitkidir. *L. aromatica*'nın etanol ekstraktının yüksek 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme aktivitesine ve antioksidan kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiş, *L. aromatica*'nın serbest radikal ile ilişkili oksidatif hasara karşı bir ilaç görevi görebileceğini vurgulanmıştır (Do et al., 2014). *L. aromatica*, geleneksel tıpta, hazımsızlık, peptik ülser, diyare, bakteriyel enfeksiyon, iltihap, astım, kan bozuklukları ve kardiyovasküler hastalıkların tedavileri için bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır (Kukongviriyapan et al., 2007). Ayrıca, *L. aromatica* nevadensin, nevadensin-7-O-β-glikopiranozid, gardenin B ve diğer flavonlar gibi antioksidan etkinliğe sahip olan polifenolik bileşikler olan birçok flavonoidleri içermektedir (Bui et al., 2004).

Bitki doku kültürü, aseptik şartlarda ve yapay bir besin ortamında bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından (eksplant) yararlanılarak yeni doku, tam bir bitki ya da bitkisel ürünlerin elde edilmesi işlemleridir (Babaoğlu ve ark., 2001). Özellikle son yıllarda doku kültürü çalışmaları ile tarım ve ilaç sanayinde önemli adımlar atılmıştır. *In vitro* rejenerasyon sayesinde değerli bitki temelli ilaçların elde edilmesi, biyolojik araştırmaların popüler bir alanını oluşturmaktadır. Ayrıca doku kültürü, bahçecilik ve ormancılık alanlarında büyük ölçekli bitki üretimine imkan sağlayarak başta insan refahı ve çevre sağlığı açısından önemli yararlar sunmaktadır (Anis and Ahmad, 2016).

Doku kültürünün diğer bazı avantajları;

Bitkilerin yıl boyunca, dış şartlara ve hava durumlarına bağlı olmadan üretilmesi

Özellikle virüs enfeksiyonları gibi patojenlerden arındırılmış hastaliksız bitkilerin üretilmesi

Genetik olarak zor bitkilerin muhafazası ve üretilmesi

Ticari öneme sahip bitkilerin kısa sürede ve çoklu üretilmesi

Bir bitkinin farklı dokularının üretim materyali olarak kullanılabilmesi ve çoğaltım materyalinin tasarruf edilebilmesi

Küçük alanlarda binlerce bitki üretilerek üretim alanından tasarruf sağlanması

olarak sıralanabilir (Öztürk, 2008; Neumann et al., 2009; Wawrosch, 2010).

Bu çalışmada, önemli tıbbi ve aromatik sucul bitki olan *L. aromatica*'nın boğum ve boğum arası eksplantlarından doku kültürü teknikleri ile hızlı ve çoklu üretimi amaçlanmıştır. Daha önce agarla katılaştırılmış BAP+NAA içeren kültür ortamında *L. aromatica*'nın doku kültürü ile üretimi için bir çalışma yürütülmüştür (Karatas and Aasim, 2015). Fakat, yaptığımız araştırmalara göre *in vitro* sürgün rejenerasyonu amacıyla 0.10 mg L⁻¹ Gibberellik asit (GA₃) ve 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 ve 1.60 mg L⁻¹ Tiazuron (TDZ) kombinasyonlarının *L. aromatica*'nın boğum ve boğum arası eksplantları üzerine etkilerini içeren bir çalışma tespit edilememiştir. Ayrıca bu bitkinin sıvı kültür ortamında *in vitro* üretimine yönelik çalışma da bulunamamıştır. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar, daha sonraki araştırmalarda bu bitkinin doku kültürü ortamlarında etkili bir şekilde çoğaltımına ve yüksek oranda biyoaktif etken maddelerin elde edilmesine imkân sağlayabilecektir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada bitki materyali olarak *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. kullanılmıştır. *L. aromatica* Konya'da bulunan akvaryumculardan temin edilmiştir. Bitkilere yüzey sterilizasyonu işlemi uygulanmadan önce, 15 dakika akan çeşme suyunun altında tutulmuştur. Bitkilerin yüzey sterilizasyonu ticari çamaşır suyu (%20

NaOCl) ile 10 dk muamele ile edilmiştir. 5 dk süreyle 3 kez durulama işlemi uygulandıktan sonra sürgün ucu eksplantları izole edilerek, hormonsuz Murashige ve Skoog (1962) (MS) besin ortamına aktarılmıştır (Çizelge 1). Buradan elde edilen steril ve sağlam eksplantlar çoğaltım çalışmaları için kullanılmıştır.

Kültür ortamlarının hazırlanmasında MS besin tuzları ve %3 sükröz (Duchefa) kullanılmıştır. Köklendirme ortamı için ayrıca kültür ortamına %0.65'lik agar (Duchefa) eklenmiştir. Denemelerde MS besin ortamında 0.10 mg L⁻¹ Gibberellik asit (GA₃) ve 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 ve 1.60 mg L⁻¹ Tidiazuron (TDZ) kombinasyonları kullanılmıştır. 1N NaOH ve 1N HCl ile kültür ortamının pH'sı 5.7±0.1'e yapılmış ve otoklavda steril edilmiştir (1.2 atm basınç - 120 °C'de 20 dk). Denemelerde eksplantlar, beyaz ışık yayan diyotlar (LED) 24±1 °C'de ve 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.

Rejenere sürgünlerden yaklaşık 2.5 cm uzunluklarında kesilen sürgünler, *in vitro* köklendirme çalışması için, içinde 0.25 mg L⁻¹ indol butirik asit (IBA) içeren MS besin ortamlarındaki steril Magenta GA^{7®} kaplarında 4 hafta boyunca kültüre alınmıştır.

Rejenere sürgünlerin üzerindeki besin ortamı şebeke suyu ile arındırıldıktan sonra bitkiler, dış koşullara alıştırmak için akvaryum ortamına aktarılmıştır. Akvaryum tabanına 4-5 cm yüksekliğinde dere kumu yerleştirilmiş olup, 24°C sıcaklık ayarlı termostat ve 16 saat fotoperiyodunda aydınlatma kullanılmıştır. Ayrıca akvaryum suyuna sıvı gübre ilave edilmiştir. Tüm denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Elde edilen veriler SPSS 16 for Windows (Statistical Package for the Social Sciences version 16.0, IBM Corporation, Armonk, NY, USA) programı ile analiz edilmiş ve Post Hoc testleri için de Duncan testleri uygulanmıştır.

Çizelge 1. Murashige ve Skoog (1962) temel besin ortamı bileşenleri

Bileşenler		Konsantrasyonu (mg L ⁻¹)
Makro Elementler	NH ₄ NO ₃	1 650
	KNO ₃	1 900
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	KI	0.83
	H ₃ BO ₃	6.2
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.25
Vitaminler	Myo-Inositol	100
	Nicotinic Acid	0.5
	Pyrotinic Acid	0.5
	Thiamine-HCl	0.1
	Glycine	2

BULGULAR VE TARTIŞMA

L. aromatica'nın boğum ve boğum arası eksplantları 0.05-1.60 mg L⁻¹ TDZ ve 0.10 mg L⁻¹ GA₃ kombinasyonlarının eklendiği sıvı kültür ortamına aktarılmıştır. Boğum eksplantlarında 11. günde sürgünler oluşmaya başlarken, boğum arası eksplantlarda ise 14. günde sürgün oluşmaya başlamıştır. Dört hafta sonunda eksplantlar üzerinde çoklu sürgünler belirgin şekilde

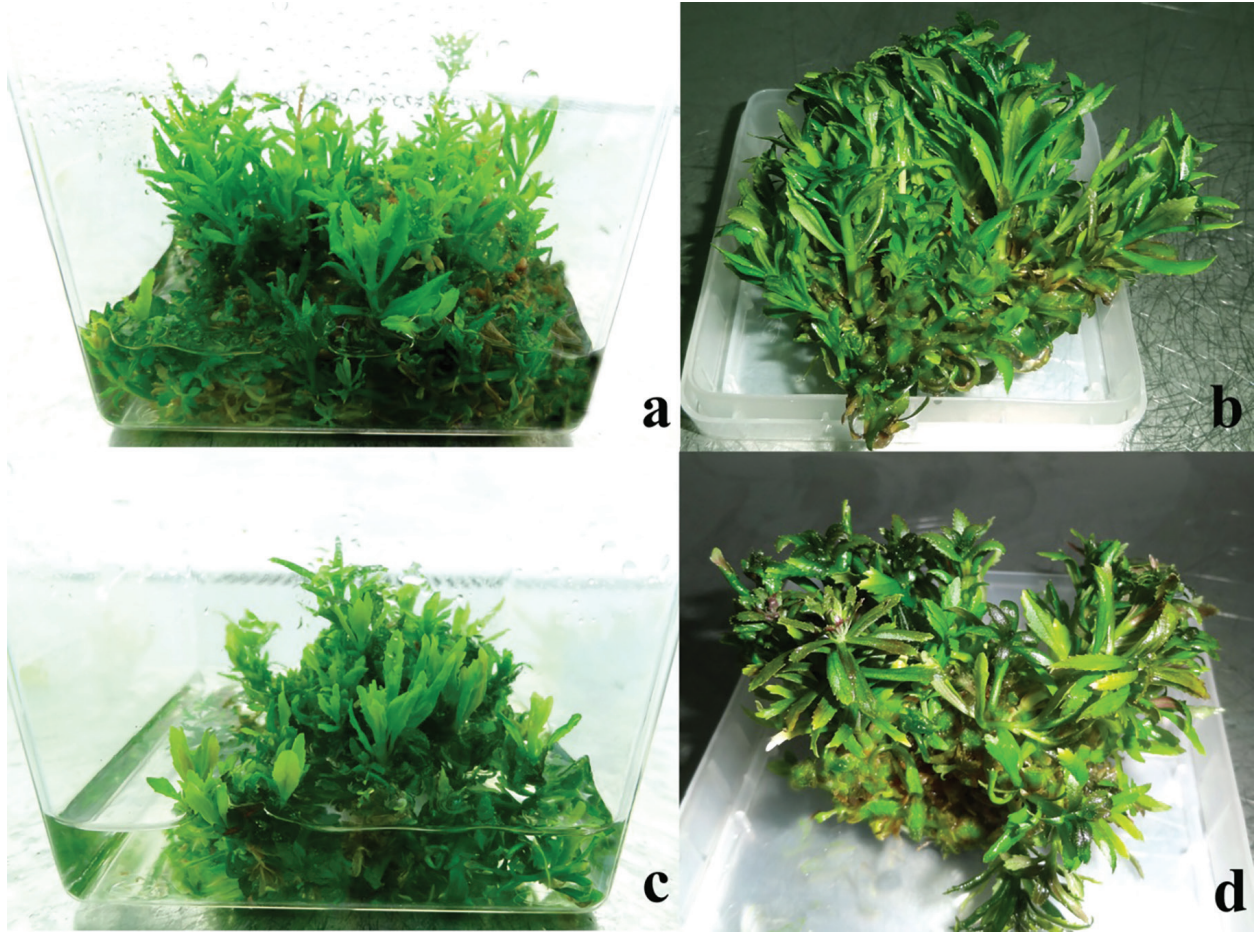
gözlenmiştir. Benzer şekilde, sıvı kültür ortamında *Mangifera indica* (Raghuvanshi and Srivastava, 1995), *Curcuma longa* (Prathantharug et al., 2005), *Ocimum basilicum* (Siddique and Anis, 2007), *Ceratophyllum demersum* L. (Dogan ve ark., 2015) bitkileri üzerinde de çoklu sürgün oluşumları tespit edilmiştir. Sekizinci haftada (Şekil 1) deneme sonlandırılmış olup veriler alınarak varyans analizi uygulanmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. 0.10 mg L⁻¹ GA₃ ve farklı TDZ dozlarının *L. aromatica*'nın boğum ve boğum arası eksplantlarına ait varyans analizi

Boğum							
V.K.	S.D.	Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	163.65	2.65 ^{öd}	53.34	66.07**	0.34	17.84**
Hata	12	61.75	-	0.81	-	0.02	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-
** p<0.01 düzeyinde önemli, ^{öd} Önemli değil							
Boğum arası							
V.K.	S.D.	Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	608.06	1.97 ^{öd}	27.14	11.50**	0.32	25.04**
Hata	12	308.63	-	2.36	-	0.01	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-
** p<0.01 düzeyinde önemli, ^{öd} Önemli değil							
V.K.: Varyasyon kaynakları, S.D: Serbestlik derecesi, K.O: Kareler ortalaması							

Çizelge 2'den de anlaşılacağı gibi boğum ve boğum arası eksplantlarında sürgün rejenerasyon yüzdesi bakımından ortamlar arasında anlamlı bir farklılık

tespit edilmezken, sürgün uzunluğu ve sayısı açısından önemli farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0.01$). Ardından bu veriler için Duncan testi uygulanmıştır (Çizelge 3).



Şekil 1. 0.10 mg L⁻¹ GA₃ ve farklı TDZ dozlarını eklenmiş sıvı kültürde *L. aromatica*'nın boğum ve boğum arası eksplantlarından sürgün rejenerasyonu; Sekiz hafta sonra (a,b) 0.40 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ eklenmiş sıvı kültürde boğum eksplantından çıkan çoklu sürgün oluşumu; (c,d) 0.20 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ eklenmiş sıvı kültürde boğum arası eksplantından çoklu sürgün oluşumu

Çizelge 3. 0.10 mg L⁻¹ GA₃ ve farklı TDZ dozlarının *L. aromatica*'nın boğum ve boğum arası eksplantlarında sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları.

Büyüme Düzenleyicileri (mg L ⁻¹)		Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
TDZ	GA ₃	Boğum	Boğum arası	Boğum	Boğum arası	Boğum	Boğum arası
0.05	0.10	83.33	72.22	9.29 ^c	9.24 ^c	1.51 ^{ab}	1.60 ^a
0.10	0.10	100	94.44	14.94 ^{cd}	15.62 ^a	1.68 ^a	1.33 ^{ab}
0.20	0.10	100	94.44	18.33 ^b	17.46 ^a	1.43 ^{ab}	1.28 ^b
0.40	0.10	100	72.22	21.44 ^a	14.50 ^{ab}	1.18 ^{bc}	1.19 ^b
0.80	0.10	100	66.66	15.72 ^c	13.51 ^{ab}	1.01 ^{cd}	0.81 ^c
1.60	0.10	88.89	61.11	12.92 ^d	11.06 ^{bc}	0.78 ^d	0.76 ^c
Ortalama		95.37	76.85	15.44	13.57	1.27	1.16

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.01$ düzeyinde önemlidir

Sürgün rejenerasyon yüzdesi boğum eksplantında %83.33-100 arasında tespit edilmiştir. 0.05 ve 1.60 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ içeren MS ortamlar hariç diğer kültür ortamlarında %100 sürgün oluşumu elde edilmiştir (Çizelge 3). Boğum arası eksplantında sürgün rejenerasyon oranı %61.11-94.44 arasında değişmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyon oranı (%94.44) 0.10 ve 0.20 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ ilave edilmiş kültürde kaydedilirken, en düşük rejenerasyon yüzdesi (%61.11) 1.60 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ ilave edilmiş kültürde kaydedilmiştir. Genel olarak boğum eksplantlarındaki sürgün rejenerasyon yüzdeleri, boğum arası eksplantlarına kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, boğum arası eksplantlarda kültür ortamlarında kullanılan TDZ oranı arttıkça sürgün rejenerasyon oranı da düşüş göstermiştir. Dogan ve ark. (2015) *Ceratophyllum demersum*'u 0.05-0.80 mg L⁻¹ TDZ eklenmiş sıvı besin ortamında kültüre almış ve sürgün rejenerasyon yüzdesini sürgün ucu, 1. boğum arası ve 2. boğum arası eksplantları için %85 -100 arasında tespit etmişlerdir. Buna karşın Siddique and Anis, (2007) *O. basilicum*'un sürgün ucu eksplantlarını 5-100 µM TDZ içeren kültür ortamında sekiz hafta kültüre almış ve sürgün rejenerasyon yüzdelerinin %41-78 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Karatas and Aasim (2015) BAP+NAA içeren MS besin ortamında *L. romatica*'nın sürgün ucu eksplantları ile yürüttükleri çalışmada, tüm kültür ortamlarında %100 sürgün rejenerasyonunu bildirmişlerdir.

Kültür ortamlarda eksplant başına sürgün sayısı boğum eksplantlarında 9.29-21.44 adet, boğum arası eksplantında 9.24-17.46 adet arasında değişmiştir (Çizelge 3). En fazla eksplant başına sürgün sayısı boğum eksplantında 21.44 adet ile 0.40 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ eklenmiş sıvı kültürde tespit edilirken (Şekil 1 a,b), en düşük eksplant başına sürgün sayısı ise 9.29 adet ile 0.05 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ eklenmiş kültür ortamında belirlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 0.40 mg L⁻¹ TDZ'ye kadar bir artış gösterirken, bu orandan daha yüksek TDZ kullanımı ile sürgün sayıları düşüş göstermiştir. Karatas and Aasim (2015) 0.25-2.00 mg L⁻¹ BAP ve 0.25 mg L⁻¹ NAA içeren kültür ortamında *L. aromatica*'nın sürgün ucu ile yürüttükleri çalışmada eksplant başına en yüksek sürgünleri 1.00 mg L⁻¹ BAP'ı tek içeren MS besin ortamında kaydetmiştir. Kher et al. (2014) *Pluchea lanceolata* bitkisinin *in vitro* üretimi için boğum eksplantlarını 0.5-2.5 mg dm⁻³ TDZ içeren MS

ortamında kültüre almış ve sürgün sayılarını 6.0±1.5-9.7±3.5 adet arasında elde etmiştir. En yüksek sürgün sayısını ise en az oranda kullanılan TDZ (0.5 mg dm⁻³) konsantrasyonunda tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Boğum arası eksplantlarda ise en fazla sürgün sayısı 17.46 adet ile 0.20 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ eklenmiş sıvı kültürlerde (Şekil 1 c,d), ardından ise 15.62 adet ile 0.10 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ eklenmiş sıvı kültürlerde tespit edilmiştir. En düşük sürgün sayısı 9.24 adet ile büyüme düzenleyici oranının en düşük oranda kullanıldığı (0.05 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃) kültür ortamında saptanmıştır. Eksplant tipleri kendi içinde kıyaslandığında, 0.10 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ ortamı hariç diğer tüm kültür ortamlarında eksplant başına sürgün sayısı boğum eksplantlarında daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Cheruvathur et al. (2010) *Malaxis acuminata* ile yürüttükleri çalışmada, bitkinin internodal eksplantlarını 1-4 mg L⁻¹ TDZ + 0.5 mg L⁻¹ NAA eklenmiş kültür ortamında, eksplant başına maksimum sürgünleri de 3.0 mg L⁻¹ TDZ + 0.5 mg L⁻¹ NAA eklenmiş kültür ortamında tespit etmişlerdir.

Sürgün uzunlukları boğum eksplantında 0.78-1.68 cm, boğum arası eksplantında ise 0.76-1.60 cm arasında değişmiştir (Çizelge 3). En uzun sürgünler boğum eksplantlarında 1.68 cm ile 0.10 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ eklenmiş kültürde, boğum arası eksplantlarında ise 1.60 cm ile 0.05 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ eklenmiş kültürde belirlenmiştir. En kısa sürgünler her iki eksplant tipi içinde 1.60 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ eklenmiş kültürde tespit edilmiştir. Kültür ortamlarında TDZ oranının artması sürgün uzamalarını olumsuz etkilemiştir. Benzer şekilde TDZ'nin sürgün uzunluğu üzerindeki engelleyici etkisi *Vaccinium visit-idaea* L. (Depnath, 2005), *Solanum tuberosum* L. cvs. (Sajid and Aftab, 2009), *Zingiber officinale* Rosc. (Lincy and Sasikumar, 2010) ve *Stevia rebaudiana* (Lata et al., 2013) gibi bitkilerde de daha önce bildirilmiştir. Buna karşın 5-100 µM TDZ içeren MS ortamında *O. basilicum*'da sürgün ucu ile yürütülen çalışmada en kısa sürgünler, TDZ'nin en düşük oranda kullanıldığı 5 µM'de tespit edilmiştir. Bu durum, TDZ sürgün uzunluğu üzerine etkisinin bitki çeşidine göre değişebileceğini göstermektedir (Siddique and Anis, 2007).

Köklendirme çalışmaları için *in vitro* koşullarda üretilen rejenere bitkiler 2.5 cm uzunluklarında kesilerek, 0.25 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamına

aktarılmıştır. Dört hafta sonunda bitkiler başarıyla köklendirilmiştir. Ardından dış koşullara alıştırmak için akvaryum ortamına yerleştirilmiştir. İlk haftada bitkilerin boylarında ve yapraklarında uzamalar gözlenmiş olup, dördüncü haftada *in vitro* koşullara üretilen bitkiler akvaryum koşullarına başarıyla uyum sağlamıştır.

SONUÇLAR

Bitki doku kültürü ekonomik olarak değerli bitkilerin kitlesel çoğaltımı için başvurulacak en önemli yöntemlerden birisidir. Özellikle farmasötik alanda doku kültürü uygulamaları ve sekonder metabolit eldesi ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Yürütülen bu çalışmada, tıbbi açıdan değerli bileşikler içeren *L. aromatica*'nın doku kültürü teknikleri ile çoklu üretimi gerçekleştirilmiştir. Daha önce bu bitki ile bazı doku kültürü çalışmaları yürütülmüş olsa da sıvı kültür ortamında üretilmesine yönelik çalışmalar tespit

KAYNAKLAR

- Anis M, Ahmad N, 2016. Plant Tissue Culture: A Journey from Research to Commercialization. In: Anis M., Ahmad N. (eds) Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement. Springer, Singapore.
- Babaoğlu M, Yorgancılar M, Akbudak MA, 2001. Doku Kültürleri: Tarihçe ve Temel Teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları, Editörler: Babaoğlu, M., E. Gürel, ve S. Özcan, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya. 1-35 p.
- Brahmachari G, 2014. *Limnophila* (Scrophulariaceae): Chemical and Pharmaceutical Aspects - An Update. The Open Natural Products Journal, 7: 1-14.
- Bui ML, Grayer RJ, Veitch NC, Hung Tran GC, Knguyen Q, 2004. Uncommon 8-oxygenated flavonoids from *Limnophila aromatica* (Scrophulariaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 32: 943-947.
- Cheruvathur MK, Abraham J, Mani B, Thomas TD, 2010. Adventitious shoot induction from cultured internodal explants of *Malaxis acuminata* D. Don, a valuable terrestrial medicinal orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 101: 163-170.
- Depnath SC, 2005. Micropropagation of lingonberry: influence of genotype, explant orientation, and overcoming TDZ induced inhibition of shoot elongation using zeatin. HortScience, 40: 185-188.
- Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huyn LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Yi-Hsu J, 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. Journal of Food and Drug Analysis, 22: 296-302.

edilememiştir. Çalışmamızda eksplant başına sürgün sayısı bakımından boğum eksplantları, boğum arası eksplantlarından daha iyi sonuçlar vermiştir. Boğum eksplantı için en iyi hormon kombinasyonu 0.40 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ olarak, boğum arası için en iyi hormon kombinasyonu 0.20 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ olarak tespit edilmiştir. Her iki eksplant tipi için de en uzun sürgün uzunlukları 0.05 mg L⁻¹ TDZ + 0.10 mg L⁻¹ GA₃ kombinasyonunu içeren MS besin ortamında görülmüştür.

Her iki eksplant tipi için de sürgün uzunlukları bakımından düşük oranda (0.05 ve 0.10 mg L⁻¹) TDZ kullanılan TDZ daha yüksek sonuçlar göstermiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 2130190 numaralı proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

- Dogan M, Karatas M, Aasim M, 2015. An efficient *in vitro* plantlet regeneration of *Ceratophyllum demersum* L., an important medicinal aquatic plant. Fresenius Environmental Bulletin, 24(10b): 3499-3504.
- Karataş M, Aasim M, 2015. *In vitro* whole plant regeneration of the medicinal aquatic plant-*Limnophila aromatica*. Fresenius Environmental Bulletin, 24: 1-4.
- Kher MM, Joshi D, Nekkala S, Nataraj M, Raykundaliya DP, 2014. Micropropagation of *Pluchea lanceolata* (Oliver & Hiern.) using nodal explant. Journal of Horticultural Research, 22(1): 35-39.
- Kukongviriyapan U, Luangaram S, Leekhaosong S, Kukongviriyapan V, Preeprame S, 2007. Antioxidant and vascular protective activities of *Cratogeomys formosum*, *Syzygium gratum* and *Limnophila aromatica*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 30(4): 661-666.
- Lata H, Chandra S, Wang YH, Raman V, Khan IA, 2013. TDZ-induced high frequency plant regeneration through direct shoot organogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni: an important medicinal plant and a natural sweetener. American Journal of Plant Sciences, 4: 117-128.
- Lincy A, Sasikumar B, 2010. Enhanced adventitious shoot regeneration from aerial stem explants of ginger using TDZ and its histological studies. Turkish Journal of Botany, 34: 21-29.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiological Plantarum, 15: 473-497.

- Neumann KH, Kumar A, Imani J, 2009. Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology, Principles and Practice, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 1 p.
- Öztürk M, 2008. AKVARYUM bitkileri *Hygrophila difformis* ve *Microsorium pteropus*'un *in vitro* koşullarda çoğaltımı. Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Prathanturarug S, Soonthornchareonnon N, Chuakul W, Phaidee Y, Saralamp P, 2005. Rapid micropropagation of *Curcuma longa* using bud explants pre-cultured in thidiazuron-supplemented liquid medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 347-351.
- Raghuvanshi SS, Srivastava A, 1995. Plant regeneration of *Mangifera indica* using liquid shaker culture to reduce phenolic exudation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 41(1): 83-85.
- Sajid ZA, Aftab F, 2009. Effect of thidiazuron (TDZ) on *in vitro* micropropagation of *Solanum tuberosum* L. Cvs. desiree and cardinal. Pakistan Journal of Botany, 41: 1811-1815.
- Siddique I, Anis M, 2007. Rapid micropropagation of *Ocimum basilicum* using shoot tip explants pre-cultured in thidiazuron supplemented liquid medium. Biologia Plantarum, 51(4): 787-790.
- Wawrosch C, 2010. *In Vitro* Propagation of Medicinal Plants for Conservation and Quality Assurance, Medicinal Plant Biotechnology, Editörler: Arora, R., CAB International, Oxfordshire, UK. 94 p.