



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***İN VİTRO* KOŞULLARDA *Bacopa monnieri*
L.'NİN FARKLI KİMYASAL MUTAJENLERİN
ETKİSİ**

**Kübra MİRZA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Ağustos-2020
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Kübra MİRZA tarafından hazırlanan “*İN VİTRO* KOŞULLARDA *Bacopa monnieri* L'NİN FARKLI KİMYASAL MUTAJENLERİN ETKİSİ” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Muhammad AASIM

.....

Danışman

Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

.....

Üye

Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAĞCI

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../20. gün ve Sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. S. Savaş DURDURAN
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Kübra MİRZA

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***İN VİTRO* KOŞULLARDA *Bacopa monnieri L.*'NİN FARKLI KİMYASAL MUTAJENLERİN ETKİSİ**

Kübra MİRZA

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

Yıl 2020, 50 Sayfa

Jüri

**Prof. Mehmet KARATAŞ
Prof. Dr. Muhammad AASIM
Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI**

Bacopa monnieri L. çoğunlukla Hindistan'da yetişen, özellikle nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan ve soyu tükenmekte olan şifalı bir akuatik bitkidir. Yabancı tipinin korunması ve iyileştirilmesi bitki içerisindeki sekonder metabolit olan Bacoside A'ya bağlıdır. Bu yüzden son yıllarda *B. monnieri*'nin genetik çeşitliliğinin değerlendirilmesi için yapay olarak uyarılmış mutasyon ve *in vitro* doku kültürü uygulaması gibi farklı biyoteknolojik ve moleküler biyolojik teknikler kullanılarak; bitkiyi korumanın ve genetik iyileştirmenin amaçlanmasıyla farklı çalışmalar yapılmaktadır. Araştırmamızda *B. monnieri* bitkisini *in vitro* doku kültürü tekniği ile farklı mutajenlerin (NaN_3 ve EMS) 0,2mg/L, 0,1mg/L, 0,05mg/L ve 0,025mg/L dozlarında; 120, 60 ve 30 dakika boyunca mutajen çözeltilerin içinde maruz bırakılarak ikincil metabolitin artırılması amaçlanmış, bitkinin rejenerasyonuna ve morfolojik özelliklerine olan etkileri de karşılaştırılmıştır. Kullanılan mutajenlerde en verimli sonuçlar genellikle EMS için 0,2mg/L, 0,1mg/L konsantrasyonlarında ve 120 dakikada gözlemlenirken, NaN_3 'de ise genellikle 0,025mg/L, 0,05mg/L konsantrasyonlarında ve 120 dakika olarak belirtilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akuatik bitki, *Bacopa monnieri L.*, Biyoteknoloji, Doku kültürü, EMS, *In vitro*, NaN_3 , Mutajen.

ABSTRACT

MS THESIS

THE EFFECT OF *Bacopa monnieri L.* ON DIFFERENT CHEMICAL MUTAGENES UNDER *IN VITRO* CONDITIONS.

Kübra MİRZA

Advisor: Prof. Mehmet KARATAŞ

Year 2020, 50 Pages

Jury

Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

Prof. Dr. Muhammad AASIM

Assoc. Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

Bacopa monnieri L. is an endangered medicinal aquatic plant that grows mostly in India and is used especially in the treatment of neurodegenerative diseases. Protection and improvement of wild type depend on Bacoside A, the secondary metabolite in the plant. Therefore, by using different biotechnological and molecular biological techniques such as artificially induced mutation and in vitro tissue culture application to evaluate the genetic diversity of *B. monnieri*; Different studies are carried out to protect the plant and genetic improvement. In our study, *B. monnieri* plant was used in vitro tissue culture technique with different mutagens (NaN₃ and EMS) at 0.2mg / L, 0.1mg / L, 0.05mg / L, and 0.025mg / L doses; It was aimed to increase the secondary metabolite by exposure in mutagen solutions for 120, 60 and 30 minutes, and its effects on the regeneration and morphological properties of the plant were also compared. For the mutagens used, the most efficient results were generally observed at 0.2mg / L, 0.1mg / L concentrations and 120 minutes for EMS, while for NaN₃ it was generally stated as 0.025mg / L, 0.05mg / L concentrations and 120 minutes.

Keywords: Aquatic plant, *Bacopa monnieri L.*, Biotechnology, EMS, *In vitro*, NaN₃, Mutagen, Tissue culture.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, akuatik bir bitki türü olan *Bacopa monnieri L.*'nin kullanılan farklı mutajenlerin, farklı konsantrasyonlardaki ve farklı sürelerdeki rejenerasyonuna ve morfolojik özelliklerine bakılarak in vitro doku kültürü tekniği ile bitkide ki önemli metabolit olan Bacoside A içeriğinin geliştirilmesindeki potansiyel incelenmiştir.

Öncelikle tez konusunu seçerken isteklerimi göz önünde bulundurup bana yardımcı olan tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ'a, her daim yanımda olan ve benden desteğini bir an için bile esirgemeyen değerli eğitimci Prof. Dr. Muhammad AASIM'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tezimin yorucu ve uzun süren laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen yüksek lisans arkadaşım Nazmiye Okşan OKAN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan sevgili annem Havva MİRZA, babam Rıfat MİRZA'ya, abim Nadir MİRZA'ya ve tezimin stresli dönemlerinde akademik bilgilerimi benimle paylaşan arkadaşlarım Kader Kübra DEMİRDÖĞEN ve Nazmiye ŞENYİL'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Kübra MİRZA
KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. <i>Bacopa monnieri</i> L. Bitkisinde İn vitro Rejenerasyon Çalışmaları.....	4
2.2. <i>Bacopa monnieri</i> L. Bitkisinde <i>In vitro</i> Mutajenez Çalışmaları	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Deneme Yeri	15
3.2. Bitki Materyali	15
3.3. Büyüme Ortamları ve Doku Kültür Koşulları.....	15
3.4. Kimyasal Mutajenik Ajanlar	16
3.5. İn vitro Kültürü ve Mutajen Uygulamaları	16
3.6. İn vitro Çoğaltılmış Bitkilerin Veri Alımı	16
3.7. İstatistik Analiz.....	16
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	18
4.1. Kullanılan EMS Mutajenin <i>In vitro</i> Rejenerasyonuna Etkileri	18
4.1.1. Farklı EMS Konsantrasyonlarına ve Farklı Sürelere Maruz Kalan <i>Bacopa monnieri</i> L.'nin Tam Yaprak Eksplantında Sürgün Rejenerasyon Çalışması	18
4.1.2. Farklı EMS Konsantrasyonlarına ve Farklı Sürelere Maruz Kalan <i>Bacopa monnieri</i> L.'nin Fenotipe Etkisi.	21
4.2. Kullanılan NaN ₃ Mutajenin <i>In vitro</i> Rejenerasyonuna Etkileri	24
4.2.1. Farklı NaN ₃ Konsantrasyonlarına ve Farklı Sürelere Maruz Kalan <i>Bacopa monnieri</i> L.'nin Tam Yaprak Eksplantında Sürgün Rejenerasyon Çalışması.	24
4.2.2. Farklı NaN ₃ Konsantrasyonlarına ve Farklı Sürelere Maruz Kalan <i>Bacopa monnieri</i> L.'nin Fenotipe Etkisi	27
4.3. TARTIŞMA	30
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	34
5.1. SONUÇLAR	34
5.1.1. EMS Mutajeninden Alınan Sonuçlar	34

5.1.2. NaN ₃ Mutajeninden Alınan Sonuçlar.....	35
5.2. ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	38
EKLER	44
ÖZGEÇMİŞ.....	46



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Cm
Cm²
G, mg, µg
HCl
L, ml, µl
MS
NaN₃
NaOH

Açıklama

Santimetre
Santimetrekare
Gram, miligram, mikrogram
Hidroklorik Asit
Litre, mililitre, mikrolitre
Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
Sodyum Azid
Sodyum Hidroksit

Kısaltmalar

BAP
EMS
KO
SD
VK

Açıklama

6-Benzilaminopürin
Etil Metil Sülfonat
Karelerin Ortalaması (Mean Square)
Serbestlik Derecesi (Degree of Freedom)
Varyansın Kaynağı (Source of Variance)

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları.....	15
Çizelge 4.1. Farklı EMS konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin sürgün rejenerasyon çalışmasına ait varyans analizi.....	19
Çizelge 4.2. Farklı EMS konsantrasyonlarında <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin sürgün rejenerasyonu.....	19
Çizelge 4.3. Farklı sürelerde EMS'ye maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin sürgün rejenerasyonu.....	20
Çizelge 4.4. Farklı EMS konsantrasyonlarında ve farklı sürelerle maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin sürgün rejenerasyonu.....	20
Çizelge 4.5. Farklı EMS konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin sürgün rejenerasyonunun fenotipine ait varyans analizi.....	21
Çizelge 4.6. Farklı EMS konsantrasyonlarında <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin fenotipik analizleri.....	22
Çizelge 4.7. Farklı sürelerde EMS'ye maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin fenotipik analizleri.....	23
Çizelge 4.8. Farklı EMS konsantrasyonlarında ve farklı sürelerle maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin fenotipik analizleri.....	23
Çizelge 4.9. Farklı NaN_3 konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin sürgün rejenerasyon çalışmasına ait varyans analizi.....	25
Çizelge 4.10. Farklı NaN_3 konsantrasyonlarında <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin sürgün rejenerasyonu.....	25
Çizelge 4.11. Farklı sürelerde NaN_3 'e maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin sürgün rejenerasyonu.....	26
Çizelge 4.12. Farklı NaN_3 konsantrasyonlarında ve farklı sürelerle maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin sürgün rejenerasyonu.....	27
Çizelge 4.13. Farklı NaN_3 konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin sürgün rejenerasyonunun fenotipine ait varyans analizi.....	28
Çizelge 4.14. Farklı NaN_3 konsantrasyonlarında <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin fenotipik analizleri.....	28
Çizelge 4.15. Farklı sürelerde NaN_3 'e maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin fenotipik analizleri.....	29

Çizelge 4.16. Farklı NaN_3 konsantrasyonlarında ve farklı sürelerle maruz bırakılan *B. monnieri L.* bitkisinin fenotipik analizleri.....**30**



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Bacopa monnieri L.</i> bitkisinin genel görünümü.....	1
Şekil 6.1. En iyi verim aldığımız parametreler olan 0,2 mg/ml EMS konsantrasyonunda ve 120 dakikalık süreye maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin sırasıyla 2, 5 ve 14 haftalık görünümleri.....	34
Şekil 6.2. EMS mutajenin en iyi süresi olan 120 dakikada 0,0025mg/ml, 0,05mg/ml, 0,1mg/ml ve 0,2mg/ml konsantrasyonlarındaki görünümleri.....	35
Şekil 6.3. EMS mutajenin en iyi konsantrasyonu olan 0,2mg/ml de 30, 60 ve 120 dakikadaki görünümleri.....	35
Şekil 6.4. En iyi verim aldığımız parametreler olan 0,025 mg/ml NaN_3 konsantrasyonunda ve 120 dakikalık süreye maruz bırakılan <i>B. monnieri L.</i> bitkisinin sırasıyla 2, 5 ve 14 haftalık görünümleri.....	35
Şekil 6.5. NaN_3 mutajenin en iyi süresi olan 120 dakikada 0,0025mg/ml, 0,05mg/ml, 0,1mg/ml ve 0,2mg/ml konsantrasyonlarındaki görünümleri.....	36
Şekil 6.6. NaN_3 mutajenin en iyi konsantrasyonu olan 0,2mg/ml de 30, 60 ve 120 dakikadaki görünümleri.....	36

1. GİRİŞ

Plantaginaceae familyasına ait bir bitki olan *Bacopa monnieri* L., Brahmi adıyla da bilinen yarı sucul bir bitkidir. Sulak alanlarda (örneğin bataklık gibi), sıcak ve nemli bölgelerde yetişmektedir (Behera ve ark. 2016). Dünya üzerinde yoğunluk olarak Doğu ülkelerinde görülmekte olup Hindistan'da bu oran daha yüksektir olmasına rağmen Avustralya ve Amerika'nın Florida eyaletinde de yetişmekte olduğu bilinmektedir (Khare, 2003; Daniel, 2005). *B. monnieri* başta Hindistan'da olmak üzere tıbbi amaçlarla kullanılmanın yanı sıra, ticarete daha çok kullanılır ve Hindistan'da ihracat edilen bitkilerin arasında 2.sırada yerini alır.



Şekil 1.1. *Bacopa monnieri* L. bitkisinin genel görünümü.

B. monnieri bitkisinin yaprakları genellikle kısa, geniş ve basit yapılıdır (Şekil:1.1). Sürgün uzunlukları 10 ile 30 cm arasında değişir. Beyaz ve mavi renkli çiçekleri yaz aylarında ortaya çıkar (Bone 1996). Pek çok biyoaktif materyali bünyesinde taşır ve bunlardan en önemlisi de Bacoside A'dır. Aslında *B. monnieri*'nin bugüne kadar korunmasının ve iyileştirme çalışmalarının yapılmasının temelinde bu kimyasal madde içeriği vardır.

B. monnieri, talebin artması sonucu yok olma riskiyle karşı karşıyadır. Bitkiyi korumak ve istenilen Bacoside A içeriğini karşılamak ve çoğaltmak için pek çok stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Uygulanabilecek yöntemler arasında tohumların kullanılması ya da geleneksel vejetatif uygulamalar ve bunlara ek olarak *in vitro* doku kültürü uygulamaları kullanılmaktadır. *B. monnieri* gibi elit bitkilerin üretilmesi ve özelliklerinin zarar görmeden korunabilmesi için uygulanabilecek doku kültürü teknikleri arasında kallus kültürü, somatik organogenez, embriyogenez veya hücre süspansiyoları gibi teknikleri Aasim vd. (2019) tarafından detaylı bir şekilde rapor edilmiştir. Bu yöntemler sayesinde kültür ortamına bitkiyi geliştirebilecek farklı enzimler, kimyasallar, hormonlar ekleyerek ve ortam şartları da örneğin farklı sıcaklık, nem, ışık gibi opsiyonlarla bitkinin en iyi gelişim aralığı tespit edilerek, rahatlıkla bulunabileceği belirtilmektedir.

Bitkilerde ikincil metabolit (Bacoside A) üretimi için *in vitro* koşullarda nutrient oranları, ışıklar, enzimler, büyüme düzenleyiciler, fiziksel veya kimyasal mutajenler ve gen aktarım gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Son yıllarda *B. monnieri*'nin genetik çeşitliliğinin değerlendirilmesi yapay olarak uyarılmış mutasyon, *in vitro* doku kültürü uygulaması gibi farklı biyoteknolojik ve moleküler biyolojik teknikler kullanılarak; koruma ve genetik iyileştirme gibi farklı çalışmalar araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Bitki, Bacoside gibi birkaç ikincil metabolit içerir. Brahmi tabanlı ilaçlar Hindistan'da ve diğer ülkelerde alzheimer hastalığı, anksiyete, astım, mide ülserleri, solunum rahatsızlıkları ve kanser gibi birçok kronik hastalıkların iyileştirilmesinde rol oynar. *B. monnieri* ile ilgili son raporlar tohumların düşük veriminden dolayı yaşayabilirliği açısından dezavantaj barındırdığı için yabancı nesli tükenme riski taşır. Öte yandan, bu önemli tıbbi bitkinin çoğaltılmasına yönelik kapsamlı çalışmaların, ikincil metabolit üretimi için korunması ve ayrıca bitki yayılımı için *in vitro* protokoller geliştirdiği bildirilmiştir. Bu protokoller içerisinde en önemlileri mutajen çalışmalarıdır.

Mutajen, moleküler biyolojide canlı organizmaların DNA veya RNA gibi hücresel bilgi ve yönetim birimlerinin moleküler yapısının değiştirerek organizmanın

doğal olarak beklenen seviyenin çok daha üzerinde mutasyona uğramasına sebep olan fiziksel veya kimyasal etmenlerdir. Yakın zamanda pek çok bitkinin modern ıslahı için kullanılarak klasik ıslah yöntemleri ile aktarılması mümkün olmayan yabancı genlerin kültür çeşitlerine aktarılması ve performanslarının arttırılması sağlanabilmektedir. Doku kültürleri, somatik hibridizasyon, embriyo kurtarma, moleküler markörler, gen haritalama ve son aşama olarak gen transferi ıslah çalışmalarında yeni bir çığır açmıştır. Geçen yirmi sene içerisinde, bitki sekonder metabolitleri faydalı bileşiklerin eldesinde kullanılmaya başlanmış ve biyoteknolojinin yeni bir alanını oluşturmuştur. Günümüzde en fazla çalışılan bitki sekonder metabolitleri alkaloidler, terpenoidler ve fenolik bileşiklerdir.

Araştırmamızda, *B. monnieri L.*'nin canlılık açısından pek çok dezavantajları barındırmasından ve içerdiği Bacoside A maddesi ile pek çok hastalığa tedavi olması amaçlandığı için bitkinin pek çok alanda incelenmesinde etkili oldu. Bu özelliklerden dolayı çalışmamızda *in vitro* koşullarda iki farklı kimyasal mutajen ajanını 0,2mg/L, 0,1mg/L, 0,05mg/L ve 0,025mg/L dozlarında ve 30, 60, 120 dakikalık maruziyet sürelerde maruz bırakılarak bitkinin rejenerasyonuna ve morfolojisine olan etkisi araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Su bitkileri ya da yarı sucul bitkiler, su kütleleri içinde veya bu kütlelere yakın yerlerde yaşamayı seven bitki gruplarıdır. Bu bitkilerden bazıları hem gıda hem de tıbbi ilaç olarak kullanımlarından dolayı ekonomiktir. *Plantaginaceae* familyasına ait sucul bir bitki olan *B. monnieri* L. aynı zamanda brahmi adıyla da bilinir. Bataklık bölgelerinde yetişen ve kolay bulunan ekonomik bir bitki türüdür. Genellikle Dünya'nın tropik ve subtropik bölgelerinde yaygın olarak üretilir. Geleneksel veya modern biyoteknolojik yaklaşımlarının uygulanması, bu bitkinin genetik olarak gelişmesine olanak sağlar. *B. monnieri* esasen şifalı bir bitki olarak pek çok sinirsel hastalıkların tedavisinde kullanılır. Bugüne kadar ki tüm koruma ve iyileştirme çabaları sadece biyoaktif Bacoside A'ya dayanır. Biyoteknolojik teknikler, spesifik karakterlerle kısa sürede istenen özellikleri geliştirmeye izin verir. Bu yöntemler arasında bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak bitkilerin mikro çoğaltımı ve istenilen özellikleri içeren elit çeşitler geliştirilebilmektedir.

2.1. *Bacopa monnieri* L. Bitkisinde İn vitro Rejenerasyon Çalışmaları

B. monnieri'nin in vitro rejenerasyonu üzerine son yıllarda pek çok araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmaların asıl amacı, literatürde de yer alan nesli tükenmekte olan bir bitki olmasından dolayı, kullanılan protokollerin geliştirilmesi veya değiştirilmesiyle bitkiyi doğaya kazandırmaktır. İn vitro morfogenezde bitkinin sürgün vermesi ve büyümesi için farklı bazal ortamlar, farklı eksplantlar ve çeşitli hormonlar veya hormon kombinasyonları kullanılmıştır. Bu yüzden bazal ortam doku kültürü için elzemdir. Çünkü bitkinin ihtiyacı olan pek çok mikro ve makro besin kaynaklarını içerdiğinden bitkinin daha rahat büyümesini sağlar. *B. monnieri* bitkisinin mikro çoğaltım için genellikle MS (Murashige and Skoog) besi ortamı tercih edilmiştir (Gurnani vd. 2012, Asha ve ark. 2013, Jain vd. 2013, Kaur vd. 2013, Prasool vd. 2013, Koul vd. 2014, Mohanta ve Sahoo 2014, Subashri ve Pillai 2014, Rency vd. 2016, Wangdi ve Sarethy 2016, Haque vd. 2017, Srivastava vd. 2017, Zote vd. 2018). Fakat B5 bazal ortamını kullanan araştırmalar da bulunmaktadır (Mohapatra ve Rath 2005, Monica vd. 2013, Koul vd. 2015). Ayrıca bitkinin karbon kaynaklarının da yeterli olması fotosentezin gerektiği gibi yapılmasını sağlamıştır (Sumaryono vd. 2012). Doku kültürü yönteminde en çok kullanılan ve önerilen karbon kaynakları içerisinde sükroz, früktoz veya glikoz

bulunur. Fakat *B. monnieri*'nin doku kültürü çalışmalarında en yaygın kullanılan karbon kaynağı sükrözdür (Sumaryono vd. 2012).

Bitki doku kültürü için diğer önemli etken jelleştirici maddelerdir. Birkaç ticari jelleştirici madde vardır ancak agar, gelrite, fitagel gibi maddeler diğerlerine kıyasla en çok tercih edilen jelleştirici maddelerdir (Babbar vd. 2006). *B. monnieri* rejenerasyonu için, agar veya diğer jelleştirici maddelerle oluşturulan katı ortam tercih edilmektedir, ancak bazı çalışmalar ayrıca deney ihtiyacına bağlı olarak azaltılan veya jelleştirici ajan (sıvı ortam) içermeyen kültür ortamının kullanımını da ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalarda genel olarak %0,65 konsantrasyonuyla in vitro rejenerasyon çalışmaları için kullanılmıştır (Showkat vd. 2010, Karataş vd. 2013, 2016, 2018, Karataş ve Aasim 2014). Diğer çalışmalarda araştırmacılar % 0,7 (Escandon vd. 2006, Kaur vd. 2013, 2014, Ohanta ve Sahoo 2014, Behera vd. 2015, Mishra vd. 2015), % 0,75 (Kaur vd. 2013) veya % 0,8 agar (Tiwari vd. 2001, Mohapatra ve Rath 2005, Joshi vd. 2010, Prabha vd. 2010, Parale vd. 2010, Rout vd. 2011, Gurnani vd. 2012, Pandiyan ve Selvaraj 2012, Rao vd. 2012, Asha vd. 2013, Prasool vd. 2013, Begum ve Mathur 2014, Kumari vd. 2014, Naik vd. 2014, Nagarajan vd. 2015, Narwal 2016, Rency vd. 2016, Wangdi ve Sarethy 2016, Kashyap vd. 2017, Srivastava vd. 2017, Ranjan vd. 2018) gibi oranları tercih etmektedirler. Ayrıca bazı çalışmalar kültür ortamında fitagel (Hegazi 2016, Hegazi vd. 2017) ve gelrite (Nandhini vd. 2015) kullanımını da ortaya koydu. Yusuf ve arkadaşlarının (2011) yaptığı bir çalışmada ise, *B. monnieri*'nin in vitro rejenerasyonu için farklı isabgol konsantrasyonlarının (%1,0, 3.0 ve 5.0) agar (%0,7, 1.0 veya 1.5) ile karşılaştırılması gösterilmiştir.

Sterilizasyon işlemleri deneyin ilerleyebilmesi, alt kültürlerle rahatlıkla alınabilmesi açısından ve bitki parçalarının veya tohumunun yüzey sterilizasyonu, eksojen veya bazı durumlarda endojen mikrobiyal kontaminasyonun çıkarılmasını veya en aza indirilmesini içeren bitki doku kültürü tekniklerine en önemli adımdır (Buckley ve Reed 1994). Su bitkilerinin mikropropagasyonu genellikle sterilizasyon sırasında eksplantlara önemli zararlar vermeden doğrudan yüzey sterilizasyonuna tabi tutularak bitkisel parçaların kullanımını içermektedir (Aasim vd. 2013). *B. monnieri*'nin in vitro rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda, HgCl₂'nin %0,01 gibi farklı konsantrasyonlarda ana sterilizasyon maddesi olarak kullanıldığını ortaya koymaktadır (Showkat vd. 2010, Vijayakumar vd. 2010, Mohan vd. 2011, Kumari vd. 2014, Jain vd. 2013, Subashri ve Pillai 2014,). Diğer çalışmalarda ise bu oran %0.05 (Zote vd. 2018), %0,2 (Koul ve diğerleri 2014) ve %1 (Mohapatra ve Rath 2005) oranlarında ve farklı

sürelerde maruz bırakılmıştır. NaOCl ise en çok kullanılan ikinci sterilizasyon ajanı olarak belirlendi. Aynı zamanda *B. monnieri*'nin sterilizasyonu için başka deterjanlar veya antiseptik kimyasallar da rapor edilmektedir.

Uygun eksplantların seçimi, in vitro koşullar altında aksiller sürgünlerin gelişmesiyle sonuçlandığı için bitki doku kültürü protokolünün önemli ve ön aşamalarından birisidir. Burada dikkat edilecek hususlar eksplantın yaşı ve büyüklüğü gibi faktörlerin belirlenmesiyle kallus indüksiyonu, somatik embriyogenez, organogenez gibi aşamalar amaçlanmıştır (Smith 2012).

In vitro rejenerasyon sonucunda sürgünlerin köklenmesi ve bitkiciklerin dış ortamlara aktarılacak adaptasyonunun sağlanması başarılı bir doku kültürü için gereklidir. Sürgünler IBA hormonu içeren köklenme ortamı sırasında çoklu çekim indüksiyonu Karataş ve arkadaşları (2013) tarafından rapor edilmiştir. Ayrıca sadece oksinlerin bile kısa sürede daha uzun sürgünlere ulaşabileceğini ve doğrudan bitki örtüsü rejenerasyonu için kullanılabileceğini gösterir.

Köklenme sonrasındaki aşama, bitkiciklerin ortama uyum sağlaması yani adaptasyonudur. *B. monnieri*, suda ve aynı zamanda yüksek nemli toprakta hayatta kalabilen yarı sucul bir bitkidir. Bunun yanı sıra su içeren akvaryumlarda in vitro rejenerasyon bitkilerin adaptasyonu Karataş ve arkadaşları (2013) tarafından rapor edilmiştir. Ayrıca, farklı pH seviyelerine (4-10) sahip akvaryumlardaki bitki büyümesini de kontrol ettiler ve pH 8.0'da maksimum bitki büyümesini belirtmişlerdir. Çoğu rejenerasyon olan bitkiciklerin humuslu topraklarda bile adapte olduğu bilinmektedir.

2.2. *Bacopa monnieri* L. Bitkisinde *In vitro* Mutajenez Çalışmaları

B. monnieri içerisinde pek çok tıbbi materyal içerdiğinden dolayı ilaç sanayisinde de çok kullanılan bir bitki türüdür. Araştırmacılar bitkiye üstün tarımsal ve tıbbi özellikler eklemek için çalışmaktadırlar. Yine de tam anlamıyla çözümlenmemiş pek çok noktası bulunmaktadır. Bitkinin kalitesini arttırmak için en çok kullanılan yöntemler arasında mutasyon ıslahı gelir. Bu yöntemin amacı bitkinin gen havuzundaki çeşitliliğini artırarak 2. nesillere aktarımını sağlamaktır. Bunun için fiziksel ve kimyasal mutasyonlar kullanılmıştır. Bu alanla ilgili sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Bunların içerisinde fiziksel mutasyon olarak kullanılan gama ışınları (Varghese ve Sathyanarayana 2007; Naik vd. 2012); kimyasal mutasyon olarak da EMS

(etil metan sülfonat) (Vajpayee vd. 2006; Naik vd. 2012), MMS (metil metan sülfonat) (Vajpayee vd. 2006) ve kolşisin (Escandon vd. 2006; Kharde vd. 2017) kullanılmıştır.

İn vitro hücre süspansiyonu kültürü ve kallus kültürü Bacoside A içeriğinin elde edilmesi için farklı kimyasallar ve farklı ortam koşulları ile pek çok araştırmalar yapılmıştır. Talukdar (2014) kallus hücre süspansiyonu, sekonder metabolitlerin tayini için sıkça kullanılan bir doku kültürü yöntemidir. Bu yöntem farklı organik ve inorganik bileşenlerle veya değişen büyüme koşullarının hücre büyümesi üzerindeki etkinliğini ve bunu takiben ekonomik tıbbi bitkilerin ikincil metabolit üretimini araştırma olanağı sağlar. Yaprak eksplantında kallus indüksiyonu farklı BAP kombinasyonları: KIN (1: 0.05: 0.05 veya 1.5: 0.05: 0.05), 2,4-D, BAP (1: 0.5: 1.5: 0.5) ve IAA (Indole-3-Asetik Asit) kullanılarak araştırıldı (Mendhulkar vd. 2011). Oluşan bir gram kallusu 1:0,5 oranlarında 2,4D BAP içeren sıvı bir ortama aktarılarak hücre süspansiyon kültürüne alındı. 21 günlük hücre süspansiyonunu 3 ve 6 saat boyunca %0,2, %0,6 ve %1,0 DMSO konsantrasyonlarında, 3 saat boyunca da %1 DMSO ile maruz bırakılan süspansiyon kültüründen maksimum Bacoside A içeriğini ($4.6 \pm 0.03 \mu\text{g} / \text{mg}$) elde ettiler. Bacoside A içeriği sadece kallus benzeri hücre süspansiyonun yanı sıra bitkinin farklı eksplantlarından ve farklı kimyasallar kullanarak ayrıca kallus kültürüne de alındı. Bir çalışmada kullanılan yaprak eksplantlarından 0,5mg/L 2,4 D kimyasalları kullanılarak kallus uyarılmıştır. HPLC ve HPLTC teknikleri, in vitro rejenere sürgünlerin Bacoside içeriklerinin ve parmak izi profillerinin bu çalışmada kullanılan ana bitkiler ile pazardan alınan bitkiler arasında benzer bir fitokimyasal profil olduğunu gözlemlenildi. (Showkat vd. 2010).

Chaudhary vd. (2001) belirgin bir mutant olan etil metan sülfonat (EMS) ile muamele edilen 200 tohum, Rmt1'den 4 saat süreyle alınan, M2 jenerasyonundan 400 çemen otu (*Trigonella foenum-graecum L.*) bitkisi elde edilmiştir. Tüm M2 popülasyonlarından rastgele örnekler (mutant hariç) M3 nesline iletirilmiştir. 798 bitki örneğinde bir belirleyici tipin ortaya çıkması, özelliğin monogenik olduğunu göstermiştir. Bu mutant, Rmt 1 ve UM 305 (benzer büyüme alışkanlığı için spontan mutant) ile birlikte büyütülmüştür. Bitki boyu, bitki başına bakla sayısı, bitkide tane verimi ve yaprak biti istilası için genotipler arasında önemli farklılıkların varlığı tespit edilmiştir. Araştırma, mutantın performansının, istenen ekonomik özellikler için seçili olan kontroller ile eşit hale getirilebileceğini göstermiştir.

Escandon vd. (2006) ise *B. monnieri L.*'nin eksplant olarak nodal segmentlerini, kimyasal mutajen olarak da kolşisin mutajenini %0.001 konsantrasyonunda kullanarak

24 ve 48 saat boyunca maruz bırakılmış ve sonuç olarak bitkide çiçek boyutunda artışlar saptanmıştır.

Vajpayee vd. (2006) yaptıkları bir çalışmada *B. monnieri* bitkilerini farklı kimyasal mutajen ajanlarda ve farklı konsantrasyonlarda (0.01–500 μ M MMS ve 0.001–5 mM EMS) 2 saat boyunca muamele etmişlerdir. Sonuçta her iki mutajene maruz kalmış bitkilerde yaprak ve kök hücrelerinde ki DNA hasarı gözlemlenmiştir. EMS ve MMS mutajenlerine maruz kalan *B. monnieri L.*'deki DNA hasarını tespit etmek için Comet deneyi uygulanmıştır. Bitkiler 0,01mM-5mM EMS ve 0,05 μ M-100 μ M MMS konsantrasyonlarında 8°C'de ve 2 saat mutajene maruz bırakılmıştır. Analiz sonucunda doza bağlı ($p < 0,05$) önemli artışlar gözlemlenmiştir. Ayrıca sulak alan bitkisi olan *B. monnieri*'nin yaprakları 0,0001 μ M-200 μ M kadmiyum (Cd) konsantrasyonlarında 2 saat maruz bırakılarak genotoksik etkisine bakılmıştır. Sonuçta yaprak çekirdeğinde 0,01 μ M'lik DNA hasarı tespit edilmiştir. Sonrasında 0,01 μ M-500 μ M Cd ile bitkiler 2,4 ve 18 saat boyunca kadmiyuma maruz bırakıldılar, sonuçta zamana ve konsantrasyona bağlı olarak bitkilerin köklerinden ve yapraklarından alınan hücre çekirdeklerindeki DNA hasarının artışlarıyla sonuçlanmıştır. Köklerdeki hasarın yapraklardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. DNA hasarı, ekojenotoksisitenin değerlendirilmesinde potansiyel bir araç olarak, akuatik bir bitki olan *B. monnieri L.* 'de değerlendirilmiştir. Comet testi, iki model mutajen, etil metan sülfonat (EMS) ve metil metan sülfonat (MMS) 'a maruz kalan *B. monnieri L.* 'deki DNA hasarını tespit etmek için kullanılmıştır. DNA hasarı, izole edilmiş nükleusun (hücresel veya in vitro maruziyet) ve tüm bitkilerin (*in vivo* maruziyet) 0.01-5 mM EMS'ye ve 8°C'de 2 saat boyunca 0.05-100 μ M MMS'ye maruz bırakılmasıyla gerçekleştirilen tedaviler sonrasında doza bağlı artış gözlemlenmiştir. Test daha sonra, bir sulak alan kirleticisi olan kadmiyumun (Cd) genotoksik potansiyelini değerlendirmek için kullanmışlardır.

Diğer çalışmada *B. monnieri L.* bitkisinin yaprak kaynaklı kalli eksplantı (Pragyashakth, Calcutta Local cultivar) ve nodal segmenti olmak üzere iki farklı eksplant kullanılmıştır. Bunlar %0,5'lik konsantrasyonda EMS mutajeni ile farklı sürelerde (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5) maruz bırakılmış sonuçta bitkicik ne kadar çok EMS'ye maruz bırakılmışsa içerisindeki Bacoside A içeriği artmamış hatta azalmıştır (Varghese ve Sathyanarayana (2007)).

Basu vd. (2008) Batı Kanada'da üretimi için geliştirilen bir yem çeşidi olan *Tristar Fenugreek*'ten elde edilen tohumları, 2- 24 saat boyunca 10-300 mM etil metan sülfonat (EMS) ile muamele etmişler ve büyüme alışkanlığı, erken olgunluk ve yüksek

tohum gibi opsiyonların verimini belirlemek için seçilmiştir. Bu mutasyon ıslahı yaklaşımı yüksek tohum verimi, tohum kalitesi ve belirleyici büyüme alışkanlığı ile birleşerek erken tohum olgunluğunu gösteren yeni üreme materyalini tespit etmiştir. Ayrıca bu çalışma, bu mahsulün kantitatif özelliklerinde iyileştirme için mutasyon ıslahının başarılı bir şekilde kullanıldığı gösteren ilk rapor olma özelliğini taşımaktadır.

Naik vd. (2012) doku kültüründe yetiştirilmiş *B. monnieri* L. bitkilerini fiziksel ve kimyasal mutasyonlarla uyarılmışlardır. %0,5'lik etil metan sülfonat (EMS)'ın farklı konsantrasyonlarında ve gama (γ) ışınının farklı dozlarından in vitro üretilmiş olan *B. monnieri* L. 'nin yapraklarına işlenmiştir. Xantha mutantları 10, 20 ve 40 Gy'de γ ışınları ile 80 Gy'de γ ışınları ile tedavi edilen tam yaprak eksplantları nekrotik veya geri dönüşümsüz olduğu tespit edilmiştir. Hem gamada hem de EMS tedavisinde hayatta kalma oranı, adventif sürgün sayısı, taze ağırlık ve kuru ağırlık gibi özelliklerde bir azalma sergilenmiştir. *B. monnieri* L. 'nin yaprak eksplantlarında γ ışınlarının farklı dozları ile yani 10, 20 ve 40 Gy ile uyarılmış mutasyonlarında Bacoside A içeriğinde artış gözlenmiş fakat EMS ile tedavi edilen yaprak eksplantlarında ise önemli bir artış göstermemiştir. 0,10,20,40 ve 80 (Gy) dozlarında gama ışınlarını ve %0,5 konsantrasyonundaki EMS'ye 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 saat aralıklarında maruz bırakılmıştır. Gama ve EMS'de sürgün sayısı, yaş ve kuru ağırlığı gibi kantitatif özelliklerinde önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir. Fakat gama ışınlarıyla yapılan tedavide 10,20,40 dozlarındaki kültürlerde Bacoside A içeriğinde 5 kat artış gözlemlenmesine rağmen EMS'de ise bu içerikte artış gözlemlenmemiştir.

Banerjee ve Shrivastava (2012) *B. monnieri* L. 'nin etkili üretimi için doku kültürü tekniklerinden yararlanarak bir protokol geliştirme çalışması yapmışlardır. Eksplant olarak 2,5 cm'lik internodal parçalar kullanılmıştır. Bitki yüzey sterilizasyonu için 2-3 aylık bitkilerden alınan eksplantlar yaklaşık yarım saat musluk suyunda ardından da 4-3 damla sıvı sabun damlatılmış suda 20 dk boyunca yıkanmış ve musluk suyuyla durulanmıştır. Ardından eksplantlara 2-3 dk %0,1 HgCl₂ ile uygulanmış ve 3-4 kez steril distile su ile yıkanmıştır. Sürgün rejenerasyonu için BAP (0,5-2 mg/l) ve Kin (0,5-2 mg/l) oranlarını hem tek olarak hem de her ikisinin kombinasyonlarını içeren MS veya ½ MS besin ortamları kullanılmıştır. Üç hafta sonra en fazla sürgün rejenerasyonu ve sürgün sayısı 1,0 mg/l BAP- 0,5 mg/l Kin besin ortamında görülmüştür. Büyüyen sürgünler, köklendirme için farklı oranlarda NAA (0,5-2,0 mg/l) içeren katı ve sıvı MS ortamlarına aktarılmıştır. En fazla kök oluşumu 0,15 mg/l NAA içeren sıvı MS

ortamında kaydedilmiştir. Köklendirilen bitkiciklerin adaptasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Karataş vd. (2013), sucul ve tıbbi bitki olan *B. monnieri L*'nin adventif sürgün oluşumu için nodal eksplantlar ve yaprak eksplantlarında BAP-NAA içeren besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Bütün BAP-NAA içeren besin ortamlarında kallus ve sürgün oluşumları gözlenmiştir. Her iki eksplantta en fazla eksplant başına sürgün sayısı 0,25 mg/L BAP+ 0,25 mg/L NAA içeren MS ortamlarında elde edilmiştir. Ortamdaki yüksek NAA oranı BAP'ın tüm oranlarıyla olumsuz etkiler meydana getirmiştir. Yaprak eksplantlarından elde edilen sürgünler diğer eksplantlardan elde edilen sürgünlerle karşılaştırıldığında daha uzun oldukları kaydedilmiştir. Elde edilen sürgünler 4,00-10,00 pH aralığına adaptasyon sağlarken en iyi adaptasyon oranı pH 8,00'de göstermiştir.

Jyoti vd. (2015) *Trigonella foenum-graecum* ve *Trigonella corniculata* tohumlarından Steroidal sapogenin üretimi üzerindeki etkiyi incelemek için farklı konsantrasyonlarda EMS, MMS ve NaN₃ ile tedavi edilmiştir. Her iki steroidal sapogenin gelişmişlik seviyesi, 0.1 M'de EMS'de maksimum artma görülmüş ve bu artış üç kimyasal mutajende de gözlenmiştir.

Seetha Ramasamy vd. (2015) ayurvedik tedavide kullanılan ve bilişsel rahatsızlıklarda tedavi olarak kullanılan *B. monnieri L.* kullanılmıştır. En önemli bileşeni de dammaran tipi triterpenoid saponinlerin bir karışımı olan Bacoside A'dır. Bu çalışmada triterpenoid olarak adlandırılan kimyasal bileşiğin *in vivo* ortamındaki biyolojik aktivitesinin daha iyi olduğu ve ilaç yapında kullanılacak bazı özellikleri verebilen metabolitlere dönüştürüldüğü belirtilmiştir. Bu nedenle çalışmada *in vitro* ve *in silico* tarama yöntemi kullanılmıştır. Bacoside A ve bacopaside X (9.06 mikro M) D1 reseptörüne bağlanma eğiliminin olduğu gözlemlenmiş ve M1 ve 5-HT2A reseptörlerinin bilişsel rol oynayan ebelin laktona olan afinitesinin olmasıyla *B. monnieri L.* 'nin uygun bir bitki seçimi olduğu gösterilmiştir.

Johanna Jonkovicz ve Bradley J. Till (2016) çalışmalarında çeşitli bitki tohumlarını (seçilen genotip kullanılarak kendi kendine üretilmiş veyahut bir tohum stok merkezinden sipariş edilmiştir.) kullanmışlardır. Kullanılan bu tohumlar arpa tohumu, chick pea ve muzdur. EMS nokta mutasyonuna yol açarak bitki de yüzlerce veya binlerce lokali indükleyebilir. Ayrıca nükleotit çeşitliliğini oluşturmak ve hem ucuz hem de basit bir yöntem olduğu için kullanılmıştır. EMS'ye maruz kalmış bitkiler fenotipik karakterizasyon olarak taranabilir. Bu çalışmada EMS tedavisinin tohum ve

vejetatif propagülleri üzerine etkisi incelenmiştir. EMS yoğunluğunun artmasıyla arpadaki çimlenme yüzdesinin de arttığı gözlemlenirken Chick Pea bitkisinde ise çimlenme yüzdesi azalmış ayrıca %60 oranında bitkide toksik etki oluşturmuştur. Sonuç olarak 40 mM EMS'de %65 oranında rejenerasyon gözlemlenmiş ve 0,25mM EMS'deki muz bitkilerinde ise %100 rejenerasyon göstermiştir.

Paulina Koczurkiewicz vd. (2016) araştırmalarında suni sindirim sularından toplanan *B. monnieri* bitkilerinin prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkileri vibrio harveyi mutajenitesi deneyleri ile araştırılmıştır. Sonuçta prostat kanseri hücrelere (DU 145) karşı sitotoksik olduğu tespit edilmiş fakat bununla birlikte sitotoksik etki göstermeyen ekstrelerde kanser hücrelerinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Çalışmadaki tüm ekstralar nitrokinolin-N-oksidi karşı güçlü antimutajenik etki gösterdiği de belirtilmiştir.

Jinin vd. (2016) araştırmalarında hücre su kanalı olan aquaporin-1 (AQP1) hücre zarı içerisinde sıvı akışını kolaylaştıran önemli bir proteindir. Sıvı dengesini korumanın yanında bu kanal AQP1 (IC₅₀ 117µM) şeklinde adlandırılan bir kolon kanseri hücre hattındaki hızlı hücre göçünü kolaylaştırarak cGMP tarafından seçici olmayan bir katyon kanalı olarak işlev görür. Araştırmada *B. monnieri L.*'den izole edilen iki yeni AQP1 kanalının modülatörü olan bacopaside 1 ve bacopaside 2 ile kolon kanseri tedavisine etkisi araştırılmıştır. Sonuçlarda bacopaside 1 in AQP1 su kanalının hem su hem de iyon kanalı aktivitelerini durdurduğunu ancak AQP4 (IC₅₀ 14µM) aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmadığını, bacopaside 2 için ise AQP1'in iyonik iletkenliğini seçici olarak durdurduğunu belirtmişlerdir. *B. monnieri L.*'den izole edilen AQP1 modülatörlerin tespiti ilk bu çalışmayla olmuştur ve bu bacopasidler seçici aquaporilerin ilaç gelişimi için yeni kurşun bileşiklerinin yerine işlev görebilir.

Bir diğer çalışmada ise *B. monnieri L.* bitkisinde %0,1 ve %0,2 konsantrasyonlarında kolşisin kullanılmıştır. Eksplant olarak 1.1µM IBA ve 0.30 µM IBA ile önceden kültürlenmiş yaprak seçilmiş ve 1,2,3,4,5 saat boyunca kolşisine maruz bırakılmıştır. %0,1 oranındaki kolşisinin 2 saat maruz bırakılması sonucunda Bacoside A içeriğinin yaklaşık %0,72 oranında artış göstermiştir (Kharde vd. 2017).

Masoabi vd. (2017) *Saccharum spp.*'nin diğer bir adıyla şeker kamışının rejenerasyon yeteneklerine bakmak için farklı konsantrasyonlarda EMS'ye maruz bırakmışlardır. 20 mM ve daha düşük konsantrasyonlardaki mutajenik bitkilerin daha yararlı olduğu ve genomik mutasyonları indüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada PEG kimyasalı da farklı konsantrasyonlarda ve farklı zaman aralıklarında in vitro

kuraklık stresini tanımlamak amacıyla uygulanmıştır. NCo310 çeşidinden gelmekte olan *Saccharum spp.* kallusu sonrasında 16 mM EMS ile mutasyona maruz bırakılmış ve in vitro ortamda %20(w/v) PEG6000 üzerinden seçilerek 18 bitkinin hayatta kalmasıyla sonuçlanmıştır. Sonuç olarak kullanılan PEG ve EMS ile şeker kamışı bitkilerinin su stresine karşı dayanıklı gelişmiş morfolojik ve fizyolojik özellikler barındırabileceği gösterilmiştir.

Kharde vd. (2017) çalışmalarında *B. monnieri L.* yarı sucul bitkinin kolşisin mutajeniyle somaklonal varyasyonları ve Bacoside içeriğinin artırılmasını sağlamak amacıyla bir araştırma yapmışlardır. Araştırmada %0,1 ve %0,2 konsantrasyonunda 1,2,3,4 ve 5 saat in vitro ortam da bitkinin tam yaprak eksplantları kullanılarak kolşisin ile muamele edilmiştir. Sonuç olarak boğum başına sürgün sayısında (adet), yaprak sayısında (adet) ve Bacoside içeriğinde artışlar gözlemlenmiştir. Boğum başına yaprak sayısında maksimum varyasyon %0,2'lik konsantrasyonda 5 saat maruz bırakılmış kültürde belirlenmiştir. Fakat bu kültürlerin alt kültüre alınmasıyla aynı etki bu alt kültürlerde gözlemlenmemiştir. Kolşisin tedavisine maruz bırakılmamış kontrol gruplarına kıyasla %0,1'lik ve 2 saat maruz bırakılmış kültürlerdeki Bacoside içeriğinin 4 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Jeena vd. (2017) çalışmalarında *B. monnieri L.* 'nin sürgün ve kök dokularındaki transkriptom analizler kıyaslanmıştır. SeQC-V2.2 tekniği kullanılarak kantitatif ve de novo değerlendirme sonucunda sürgünde 18.500 gen ve kökte 26.412 gen saptanmıştır. Birleştirilen sekanslar BLASTX kullanılarak açıklanması sonucu sürgünden 35.130 unigenin ve kökten 37.918 unigenin 133 KEGG yolağına eşlendiği belirtilmiştir. Farklı şekilde ekspres edilen bitki doku parçaları sonucunda sekonder metabolizma ile ilgili totalde 43 transkript seçilmiş ve qRT-PCR tekniği kullanılarak MeJA tedavisiyle 1,3 ve 5 saat süreyle izlenerek belirlenmiştir. Sonuç olarak bu bitkinin ikincil metabolitlerinden biri olan triterpenoit sapogenin aktivasyonunu sağlayan gen bölgeleri tespit edilmiştir.

Doğan ve Emsen (2018) 1,0 mg/L BAP'lı MS besi yerinde kültürlenmiş *Bacopa* bitkisinin sürgün ucu eksplantları kullanılarak yapay ortam da kültürlenmiş insan lenfositlerine aktararak sitotoksikite etkisi araştırılmıştır. Çalışmada genotoksik etkiler kromozom aberasyon (CA) testi ile belirlenmiş olup ayrıca sitotoksik aktiviteleri MTT analizi ile ortaya çıkarılmıştır. İyileştirme çalışmalarında *B. monnieri L.* sulu ekstraktı farklı konsantrasyonlarda (6,25-200mg/L) kullanılmış ve sonuç olarak sitotoksikitenin konsantrasyon ile korelasyonu olduğu belirlenmiştir. Sulu ekstraktın en yüksek

konsantrasyonuna maruz kalan lenfositlerde hücre canlılığı %69,64'e düşmüştür. CA testinde sonuçlar negatif kontrol iyileştirmesinden farklı olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$). Sonuç olarak *B. monnieri L.* 'nin insan lenfosit hücreleri üzerinde herhangi bir toksisite (sitotoksik ve genotoksik) etkisi olmadığını ve *B. monnieri L.* 'nin doğal bir bitkisel ürün olduğu belirtilmiştir.

Srivastava vd. (2018) araştırmasında genel adı Curled Aerides olan *Aerides crisper lindl* tıbbi bitkisinin in vitro koşullarında kolşisin (%0,025-0,03), EMS ve gama radyasyonuna (1-4Gy) maruz bırakılmasından 60 gün sonra 27 farklı kombinasyon şeklinde yaklaşık 40-60 canlılık sıklığı ile çoklu filiz tomurcuğunun oluştuğu gözlemlenmiştir. Kullanılan dozajların artırılması sonucunda 20-30 günden sonra bitkilerin protocom ve sürgün başlarında ölümler gerçekleşmiş 2500 sağlıklı in vitro fidelerin köklerinde ve sürgünlerinde ise pek çok fenotipik özellikler (yaprak şekli, yaprak uzunluğu, yaprak genişliği, büyüme oranı, klorofil çeşitlenmesi ve stoma yoğunluğu) Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA yöntemiyle 15 farklı genetik bant elde edilmiştir.

Ugandhar vd. (2018) *Cicer arietinum* bitkisinin EMS ve UV ışınlarına karşı farklı kantitatif karakterler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Farklı EMS konsantrasyonları ve ICCV-2 farklı zaman aralıklarında maruz bırakılarak mutajenize edilmiştir. M3 neslindeki birçok karaktere bakıldığı zaman bitkinin boyu (cm), baklanın uzunluğu (cm), baklanın genişliği (cm), bitki başına düşen tohum sayısı (adet), yaprak, dal, bakla sayısı gibi pek çok kantitatif karakterlere bakılmıştır. Sonuç olarak M3 rejenerasyonunda UV ışınlarına 5 dakika maruz kalmasındaki ve EMS'nin 1.0% konsantrasyonundaki verim diğer konsantrasyonlara ve sürelerle kıyasla daha verimli olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra EMS'nin konsantrasyonun düşmesiyle bitkinin çiçeklenme dönemindeki azalış ile tutarlı bulunmuştur. Son olarak EMS'nin ve UV'nin Chick Pea olarak da adlandırılan bitkide verimini arttırdığı sonucuna varılmıştır. Tushar Dubey, Subashchandrabase Chinnathambi (2019) çalışmalarında brahmide bulunan Bacoside A, Bacoside B, bacosaponins, betullinic asit ve çeşitli pek çok biyoaktif bileşenleri ve ham brahmi özütünün alzheimer hastalığına olan etkisini çalışmışlardır. *B. monnieri L.* 'de bulunan bu biyoaktifler, nöroprotektif özelliklere sahip olmakla birlikte bilişsel ve öğrenme yetilerinin geliştirilmesinde önemli bir rolü olduğunu başka çalışmalarda da belirtilmiştir. Buradaki çalışmada ise *B. monnieri L.* Tau aracılı oluşan toksisitenin önlenmesi araştırılmıştır. Sonuç olarak bu tür nörolojik hastalıkların ve Alzheimer'ın tedavisinde kurşun formülasyonun etkili olduğu belirlenmiştir.

Di Pauli vd. (2019) bu çalışma INTA tarafından geliştirilen şeker kamışının in vitro mutajenez için genotiplerini tanımlamak amacıyla seçilen 5 genotipin embriyogenez ve somatik embriyogenez yanıtlarını araştırmıştır. Bu bitkinin gen transferinin başarısını, bitkinin rejenerasyonunu, çoğalmasını ve genetik varyasyonunu incelemek için EMS mutajeninden farklı dozlarda kullanılmıştır. Sonuç olarak farklı veriler elde edilmiştir. 3 saatlik 32 mM'dan düşük konsantrasyonlardaki EMS'ye maruz kalmış bitkilerde INTA CP 98-828'de gereken sayıda normal bir bitkinin rejenerasyonu sağlayan optimal bir ortam bulunmuştur. Sonuç olarak INTA şeker kamışının çeşitli genetik yapılarını tanıtmak için bu yaklaşımdan yararlanma olasılığı gösterilmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deneme Yeri

Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.2. Bitki Materyali

Bu çalışmada bitki materyali olarak kullanılan *B. monnieri L.* ise Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

3.3. Büyüme Ortamları ve Doku Kültür Koşulları

Bu çalışmada MS (Murashige & Skoog, 1962) mineral tuz ve vitaminleri kullanılmıştır. Besi ortamı hazırlamak için %0,65 agar ile katılaştırılan temel besi ortamı kullanılmıştır. Ortam hazırlanmasında distile saf su kullanılmıştır. Hazırlanan ortamların pH'sı 1 N NaOH veya 1N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra 1,2 atmosfer basınç altında 121 °C'de tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Kültürler beyaz floresansa veya LED ışığı altında 16 saat ışık fotoperiyotta 24±1 °C de bekletilmiştir.

Ortamda Bulunan Maddeler	Konsantrasyonu (mg/L)	
Makro Elementler	NH ₄ NO ₃	1650,000
	KNO ₃	1900,000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000
	KH ₂ PO ₄	170,000
Mikro Elementler	KI	0,830
	H ₃ BO ₃	6,200
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,850
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,250
Vitaminler	Myo-Inositol	100,000
	Nicotinic Acid	0,500
	Pyrotinic Acid	0,500
	Thiamine-HCl	0,100
	Glycine	2,000

Çizelge 3.1. Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları.

3.4. Kimyasal Mutajenik Ajanlar

Bu çalışmada kimyasal mutajen olarak Sodyum azide (NaN_3) ve EMS kullanılmıştır. *In vitro* mutagenез için bu mutajen kimyasallar için 1,0 mg/ml olarak stok solüsyon hazırlanıp, buz dolabında 4 °C’de saklanmıştır.

3.5. *In vitro* Kültürü ve Mutajen Uygulamaları

Laboratuvarda bulunan *in vitro* çoğaltılmış (steril) bitkilerden tam yaprak eksplantları alınmıştır. Elde edilen yaprak eksplantları farklı konsantrasyonlardaki (0,025, 0,05, 0,10 ve 0,20 mg/L) NaN_3 ve EMS mutajenlerini içeren çözeltilerinde 30, 60 ve 120 dakika boyunca maruz bırakılmıştır. Daha sonra muamele görmüş eksplantlar önceden optimize edilmiş protokollere göre 1,0 mg/L BAP içeren besi ortamında kültüre alınmıştır (Karataş d. 2013, 2016; Karataş ve Aasim 2014). Süresi biten eksplantlar besi ortamına (sitokin ve veya hormonları) alınmıştır.

3.6. *In vitro* Çoğaltılmış Bitkilerin Veri Alımı

Mutajen ile muamele görmüş eksplantlar 14 hafta boyunca besi ortamında kültürüldükten sonra kallus oluşumu (%), sürgün rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu gibi parametreler alınmıştır. Ayrıca, somaklonal varyasyon için fenotip verileri (yaprak sayısı, yaprak alanı, boğum sayısı, boğum arası mesafe, renk, şekil vb.) de kaydedilmiştir. Yaprak sayısı, boğum sayısı, boğumlar arası mesafe gibi opsiyonların verilerini rastgele seçilen 10 sürgünün hesaplanması sonucu elde edilmiştir. Yaprak alanı ise rastgele seçilen 10 sürgün içerisinde yine rastgele seçilen 5 yaprak alınarak İmaje J bilgisayar programı yardımıyla hesaplanmıştır.

3.7. İstatistik Analiz

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup her muamele, 3 tekerrürlü magenta GA7 kutuları veya petriyelerden oluşmaktadır. Elde edilen veriler “SPSS 20 for Windows” programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuş olup, ortamlarını karşılaştırmak amacıyla Duncan (DMRT) testi kullanılmıştır.

Yüzde değerler, istatistik analizinden önce arcsin değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran 1967).



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Araştırmada optimizasyonu önceden belirlenmiş olan (Karataş vd. 2013, 2016; Karataş ve Aasim 2014) *B. monnieri L.* bitkisinden alınan tam yaprak eksplantları 0,025mg/L, 0,05mg/L, 0,1mg/L ve 0,2mg/l konsantrasyonlarında ve 30, 60 ve 120 dakikalık sürelerde, iki farklı mutajen olan EMS ve NaN₃ mutajenlerine maruz bırakılmıştır. Deneme sonucunda elde edilen bitkilerinin fenotipik özellikleri ve rejenerasyonu incelenmiştir.

4.1. Kullanılan EMS Mutajenin *İn vitro* Rejenerasyonuna Etkileri

4.1.1. Farklı EMS Konsantrasyonlarına ve Farklı Sürelere Maruz Kalan *Bacopa monnieri L.*'nin Tam Yaprak Eksplantında Sürgün Rejenerasyon Çalışması

MS ortamında çoğaltılan bitkilerden, tam yaprak bölümü kesilerek 0,025mg/L, 0,05mg/L, 0,1mg/L, 0,2mg/L oranlarındaki EMS çözeltilerinde 30, 60 ve 120 dakika bekletilmesinden sonra MS ve 1,0 mg/L BAP'lı ortamlarda kültüre alınmıştır. Eksplantlar besi ortamında 14 haftaya kadar bekletilmiştir. Eksplantlarda kallus oluşumu gözlemlenirken, 2 hafta içinde eksplantların kenarında ve petiol (yaprak sapı) olan bölgelerde sürgün uçları görülmeye başlamıştır. Daha sonra, 3 ile 4 hafta sonrasında belirgin bir şekilde çoklu sürgün oluşumu gözlemlenmiştir. Eksplantlar besi ortamında 14 hafta boyunca kültüre alındıktan sonra *in vitro* rejenerasyonu ilgili veriler hesaplanarak istatistiksel analize tabi tutulmuştur. İstatistiksel analiz ise çizelge 4.1'da verilmiştir.

Çizelge 4.1. incelendiğinde farklı EMS konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. EMS'e maruz kalma sürelerinde ise sürgün rejenerasyonu istatistiki olarak önemsiz fakat eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. EMS × Süre muamelesi ise sürgün rejenerasyon oranı istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunurken, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Bu verilerin Duncan testi sonuçları ise Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4' te verilmiştir.

Çizelge 4.1.Farklı EMS konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılan *B. monnieri L.* bitkisinin sürgün rejenerasyon çalışmasına ait varyans analizi.

VK	SD	Sürgün rejenerasyon yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
EMS	3	1166,66	2,50 ^{ös}	1150,62	1,45 ^{ös}	6,08	2,91 ^{ös}
Süre	2	1411,11	3,02 ^{ös}	4232,65	5,35*	8,63	4,13*
EMS×Süre	6	1588,88	3,40*	507,70	0,64 ^{ös}	3,08	1,47 ^{ös}
HATA	24	466,66	-	790,34	-	2,08	-
Genel Toplam	35	-	-	-	-	-	-

*p<0,05 düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsizdir.

Çizelge 4.2.Farklı EMS konsantrasyonlarında *B. monnieri L.* bitkisinin sürgün rejenerasyonu.

EMS (mg/L)	Sürgün rejenerasyon yüzdesi (%) **	Eksplant başına sürgün sayısı (adet) ^{ös}	Sürgün uzunluğu (cm)**
0,025	64,44 ^b	36,58	1,97 ^{ab}
0,05	71,11 ^{ab}	15,81	1,03 ^b
0,10	91,11 ^a	41,36	2,97 ^a
0,20	77,77 ^{ab}	26,84	2,41 ^{ab}

**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark p<0,001 düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsizdir.

Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere farklı EMS konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyon yüzdesinde istatistiki olarak farklılık göstermiştir ve p<0,001 düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün uzunluğu istatistiki olarak farklılık göstermiştir ve p<0,001 düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün rejenerasyon yüzdesi %64,44-%91,11 arasında kaydedilirken, en fazla (%91,11) ve en az (%64,44) sırasıyla 0,10 mg/L ve 0,025 mg/L EMS içeren ortamda kaydedilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı istatistiki olarak farklılık göstermemiştir ve önemsiz bulunmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı 15,81-41,36 arasında kaydedilirken, en fazla (41,36) ve en az (15,81) sırasıyla 0,10 mg/L EMS ve 0,05 mg/L EMS ortamda kaydedilmiştir. Sürgün uzunluğu 1,03-2,97 arasında kaydedilirken, en fazla (2,97) ve en az (1,03) sırasıyla 0,10 mg/L EMS ve 0,05 mg/L ortamında kaydedilmiştir.

Çizelge 4.3.Farklı sürelerde EMS'ye maruz bırakılan *B. monnieri* L. bitkisinin sürgün rejenerasyonu.

Süre (dk)	Sürgün Rejenerasyon yüzdesi (%) **	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)**	Sürgün uzunluğu (cm)**
30	65,00 ^b	11,53 ^b	1,29 ^b
60	76,66 ^{ab}	29,82 ^{ab}	2,02 ^{ab}
120	86,66 ^a	49,09 ^a	2,98 ^a

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark $p < 0,001$ düzeyinde önemlidir. ^{ös} önemsizdir.

Çizelgede 4.3. incelendiğinde EMS mutajeni çözeltisinde farklı sürelerle maruz bırakılan tam yapraklardaki sürgün rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu istatistiki olarak birtakım farklılıklar göstermiştir ve $p < 0,001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün rejenerasyonu oranı %65,00-86,66 arasında, eksplant başına sürgün sayısı 11,53-49,09 ve sürgün uzunluğu 1,29-2,98 cm arasında değişiklikler gözlenmiştir. Denemede muamele süresinde artış ile sürgün rejenerasyonu, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna da bağlı olarak artış gözlemlenmiştir. En fazla sürgün rejenerasyonu, en fazla eksplant başına sürgün sayısı ve en fazla sürgün uzunluğu 120 dakikada gözlenmiştir. Buna karşı en az sürgün rejenerasyonu, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu 30 dakikalık muamele ile sonuçlanmıştır.

Çizelge 4.4.Farklı EMS konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılan *B. monnieri* L. bitkisinin sürgün rejenerasyonu.

EMS Konsantrasyon (mg/L)	EMS Süresi (dk)	Sürgün Rejenerasyon yüzdesi (%) **	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)*	Sürgün uzunluğu (cm)**
0,025	30	66,66 ^{abc}	31,16 ^{ab}	2,23 ^{ab}
	60	66,66 ^{abc}	31,41 ^{ab}	0,91 ^b
	120	60,00 ^{abc}	47,16 ^{ab}	2,76 ^{ab}
0,05	30	73,33 ^{abc}	1,83 ^{ab}	0,49 ^b
	60	46,66 ^{bc}	2,27 ^{ab}	0,57 ^b
	120	93,33 ^a	43,33 ^{ab}	2,03 ^{ab}
0,10	30	86,66 ^{ab}	12,08 ^{ab}	2,10 ^{ab}
	60	93,33 ^a	57,00 ^a	3,76 ^a
	120	93,33 ^a	55,00 ^{ab}	3,06 ^{ab}
0,20	30	33,33 ^c	1,05 ^b	0,34 ^b
	60	100,00 ^a	28,60 ^{ab}	2,83 ^{ab}
	120	100,00 ^a	50,86 ^{ab}	4,06 ^a

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark $p < 0,001$ düzeyinde önemlidir.

* $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir; ^{ös} önemsizdir.

Çizelgede 4.4. incelendiğinde EMS*Süre’de sürgün rejenerasyon yüzdesi ve sürgün uzunluğu istatistiki olarak birtakım farklılıklar göstermiştir ve $p<0,001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Eksplant başına sürgün sayısında istatistiki farklılıklar göstermiş ve $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün rejenerasyon yüzdesi %33,33-%100,00 arasında ve sürgün uzunluğu 0,34cm-4,06cm arasında gözlemlenmiştir. Genellikle 120 dakikada her konsantrasyonda artış gözlemlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 1,05-57,00 arasında gözlemlenmiştir. En fazla sürgün rejenerasyonu ve en fazla sürgün uzunluğu 0,2 mg/L EMS konsantrasyonunda 120 dakika ve 60 dakikada gözlenmiştir. En fazla eksplant başına sürgün sayısı ise 0,10mg/L EMS’de 60 dakikada gözlenmiştir. Buna karşın en az sürgün rejenerasyon yüzdesi, en az eksplant başına sürgün sayısı ve en az sürgün uzunluğu 0,2mg/L EMS’de 30 dakikada muamele ile sonuçlanmıştır.

4.1.2. Farklı EMS Konsantrasyonlarına ve Farklı Sürelere Maruz Kalan *Bacopa monnieri L.*'nin Fenotipe Etkisi.

Denemede farklı EMS konsantrasyonu ve süresi kullanıldığında elde edilen sürgünlerin büyümesindeki etkileri gözlemlenmiştir. EMS konsantrasyonları ve süresinin elde edilen sürgünlerin üzerinde fenotip etkilerine ait varyans analizi ise Çizelge 4.5’ te verilmiştir.

Çizelge 4.5.Farklı EMS konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılan *B. monnieri L.* bitkisinin sürgün rejenerasyonunun fenotipe ait varyans analizi.

VK	SD	Boğum sayısı (adet)		Boğumlar arası mesafe(cm)		Yaprak sayısı (adet)		Yaprak alanı (cm ²)	
		KO	F	KO	F	KO	F	KO	F
EMS	3	4,73	1,25 ^{ös}	0,34	0,98 ^{ös}	39,63	1,98 ^{ös}	0,010	2,90 ^{ös}
Süre	2	13,12	3,47*	0,10	0,30 ^{ös}	74,11	3,71*	0,038	11,50*
EMS×Süre	6	4,54	1,20 ^{ös}	0,11	0,31 ^{ös}	25,02	1,25 ^{ös}	0,009	2,60*
HATA	24	3,77	-	0,35	-	19,95	-	0,003	-
Genel Toplam	35	-	-	-	-	-	-	-	-

* $p<0,05$ düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsizdir.

Çizelge 4.5. incelendiğinde farklı EMS konsantrasyonlarının boğum sayısı, boğumlar arası mesafe, yaprak sayısı ve yaprak alanı istatistiki olarak önemsiz bulunmakla birlikte EMS'e maruz kalma sürelerinde boğum sayısı, yaprak sayısı ve

yaprak alanı istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuş, boğumlar arası mesafe ise istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. EMS \times Süre opsiyonunda ise boğum sayısı, boğumlar arası mesafe ve yaprak sayısı istatistiki olarak önemsiz bulunurken yaprak alanı istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu sonuçların Duncan testi ile yapılan analizi çizelge 4.6, 4.7 ve 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.6.Farklı EMS konsantrasyonlarına maruz bırakılan *B. monnieri* L. bitkisinin fenotipik analizleri

EMS (mg/L)	Boğum sayısı (adet) ^{ös}	Boğumlar arası mesafe (cm) ^{ös}	Yaprak sayısı (adet)**	Yaprak alanı (cm ²) **
0,025	2,28	0,78	6,11 ^{ab}	0,07 ^{ab}
0,05	1,33	0,60	3,60 ^b	0,04 ^b
0,10	2,98	1,07	8,60^a	0,10 ^a
0,20	2,71	0,86	7,05 ^{ab}	0,11^a

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark $p < 0,001$ düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsizdir.

Çizelge 4.6. görüldüğü üzere farklı EMS konsantrasyonlarında boğum sayısı ve boğumlar arası mesafede istatistiki olarak benzerlik göstermiştir ve önemsiz bulunmuştur. Yaprak sayısı ve yaprak alanı ise istatistiki olarak benzerlik göstermiş ve $p < 0,001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Boğum sayısı 1,33-2,98 arasında değişirken, en yüksek (2,98) 0,1 mg/L EMS ve en düşük (1,33) 0,05 mg/L EMS olarak kaydedilmiştir. Boğumlar arası mesafe 0,60-1,07 cm arasında bulunurken, en yüksek (1,07) 0,1 mg/L EMS ve en düşük (0,60) 0,05 mg/L EMS ortamında kaydedilmiştir. Yaprak sayısı 3,60-8,60 arasında gözlemlenirken, en yüksek (8,60) 0,1 mg/L EMS, en düşük (3,60) 0,05 mg/L EMS olarak kaydedilmiştir. Yaprak alanında ise bu oran 0,04-0,11 cm² arasında kaydedilirken, en yüksek (0,11) 0,2 mg/L EMS, en düşük (0,04) 0,05 mg/L EMS ortamında kaydedilmiştir.

Çizelge 4.7.Farklı sürelerde EMS'ye maruz bırakılan *B. monnieri L.* bitkisinin fenotipik analizleri

Süre (dk)	Boğum sayısı (adet) **	Boğumlar arası mesafe (cm) ^{ös}	Yaprak sayısı (adet) **	Yaprak alanı(cm ²) **
30	1,42 ^b	0,93	4,05 ^b	0,02 ^c
60	2,10 ^{ab}	0,75	5,99 ^{ab}	0,08 ^b
120	3,47 ^a	0,81	8,99 ^a	0,13 ^a

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark p<0,001 düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsizdir.

Çizelge 4.7. 'de görüldüğü üzere EMS mutajeni çözeltisinde farklı sürelerle maruz bırakılan tam yapraklardan elde edilen bitkilerin boğum sayısı, yaprak sayısı ve yaprak alanı istatistiki olarak benzerlik gösterip p<0,001 düzeyinde önemli bulunmuştur. Boğumlar arası mesafe istatistiki olarak farklılık gösterip önemsiz bulunmuştur. Boğum sayısı 1,42-3,47 arasında değişiklik gösterirken en yüksek (3,47) 120 dakikada, en düşük (1,42) 30 dakikada gözlenmiştir. Yaprak sayısı 4,05-8,99 arasında en yüksek (8,99) 120 dakikada, en düşük (4,05) 30 dakikada kaydedilmiştir. Yaprak alanı ise 0,02-0,13 cm² arasında en yüksek (0,13) 120 dakikada, en düşük (0,02) 30 dakikada gözlenmiştir. Boğumlar arası mesafe 0,75-0,93 cm arasında en yüksek (0,93) 30 dakika, en düşük (0,75) 60 dakika olarak kaydedilmiştir.

Çizelge 4.8.Farklı EMS konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılan *B. monnieri L.* bitkisinin fenotipik analizleri.

EMS Konsantrasyon (mg/L)	EMS Süresi (dk)	Boğum sayısı (adet)*	Boğumlar arası mesafe (cm) ^{ös}	Yaprak sayısı (adet)**	Yaprak alanı (cm ²)**
0,025	30	2,26 ^{ab}	1,05	5,53 ^{ab}	0,06 ^{bcd}
	60	0,91 ^b	0,65	5,00 ^{ab}	0,02 ^{cd}
	120	2,76 ^{ab}	0,64	7,80 ^{ab}	0,13 ^{abc}
0,05	30	0,49 ^b	0,84	1,21 ^b	0
	60	0,57 ^b	0,33	1,25 ^b	0
	120	2,03 ^{ab}	0,64	8,33 ^{ab}	0,12 ^{abc}
0,10	30	2,10 ^{ab}	1,10	7,93 ^{ab}	0,04 ^{cd}
	60	3,76 ^a	0,99	10,26 ^a	0,15 ^{ab}
	120	3,06 ^{ab}	1,13	7,60 ^{ab}	0,13 ^{abc}
0,20	30	0,34 ^b	0,75	1,55 ^b	0
	60	2,83 ^{ab}	1,02	7,46 ^{ab}	0,17 ^a
	120	4,06 ^a	0,82	12,23 ^a	0,16 ^{ab}

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark p<0,001 düzeyinde önemlidir.

*p<0,05 düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsizdir.

Çizelgede 4.8. incelendiğinde EMS*Süre'de boğum sayısı istatistiki olarak farklılık göstermiştir ve $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir. Boğumlar arası mesafe istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Yaprak sayısı ve yaprak alanı ise istatistiki olarak benzerlik göstermekte olup $p < 0,001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Boğum sayısı 0,34-4,06 arasında değişkenlik gösterirken en fazla boğum sayısı 0,20mg/L EMS'de 120 dakikada gözlemlenmiştir. Boğumlar arası mesafe 0,33-1,13cm arasında olup en fazla boğumlar arası mesafe 0,10mg/L EMS'de 120 dakikada tespit edilmiştir. Yaprak sayısı 1,21-12,23 arasında değişirken en fazla yaprak sayısı 0,20mg/L EMS'de 120 dakikada, yaprak alanı ise 0-0,17cm² arasında seyredip en fazla yaprak alanı 0,20mg/L EMS'de 60 dakikada gözlemlenmiştir. Boğum sayısı her konsantrasyonun genellikle 120 dakikasında en iyi sonuçları vermiştir. Boğumlar arası mesafede konsantrasyon ve süreye bağlı bir artış gözlenmemiştir. Yaprak sayısında artan süreye bağlı olarak istisnai durumlar olsa da artış gözlemlenmiştir. Ayrıca konsantrasyon sayısı arttıkça fenotipik olarak yaprakların alanında ve yeşil renginin tonunda artış görülmüştür. Yaprak alanındaki 0 değerleri bitkinin olmadığından değil kullanılan İmage J programının sarı yaprakları görmeyip alanını hesaplayamadığından dolayı bu değerler sıfır olarak girilmiştir.

4.2.Kullanılan NaN₃ Mutajeninin *In vitro* Rejenerasyonuna Etkileri

4.2.1.Farklı NaN₃ Konsantrasyonlarına ve Farklı Sürelere Maruz Kalan *Bacopa monnieri L.*'nin Tam Yaprak Eksplantında Sürgün Rejenerasyon Çalışması.

MS ortamında çoğaltılan bitkilerden, tam yaprak bölümü kesilerek 0,025mg/L, 0,05mg/L, 0,1mg/L ve 0,2mg/L oranlarında NaN₃ çözeltilerinde 30, 60 ve 120 dakikada bekletilerek MS ve 1,0 mg/L BAP'lı ortamlarda kültüre alınmıştır. Eksplantlar besi ortamında 15 haftaya kadar bekletilmiştir. Eksplantlarda kallus oluşumu gözlemlenirken, 2 hafta içinde eksplantların kenarında ve petiol (yaprak sapı) olan bölgelerde sürgün uçları görülmeye başlamıştır. Daha sonra, 4 ile 5 hafta sonrasında belirgin bir şekilde çoklu sürgün oluşumu gözlemlenmiştir. Eksplantlar besi ortamında 15 hafta boyunca kültüre alındıktan sonra veri analizi alınıp, istatistiksel analizine tabi tutulmuştur. İstatistiksel analiz ise çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8.Farklı NaN_3 konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılan *B. monnieri L.* bitkisinin sürgün rejenerasyon çalışmasına ait varyans analizi.

VK	SD	Sürgün rejenerasyon yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
NaN_3	3	5700,00	7,897*	280,87	0,446 ^{ös}	2,94	1,26 ^{ös}
Süre	2	77,77	0,108 ^{ös}	1530,05	2,429 ^{ös}	9,25	3,97*
$\text{NaN}_3 \times \text{Süre}$	6	700,00	0,969 ^{ös}	439,86	0,698 ^{ös}	1,79	0,76 ^{ös}
HATA	24	722,22	-	629,83	-	2,33	-
Genel Toplam	35	-	-	-	-	-	-

* $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsiz.

Çizelge 4.8. incelendiğinde farklı NaN_3 konsantrasyonlarını içeren ortamlarda sürgün rejenerasyonu yüzdesi istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunurken, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. NaN_3 'e maruz kalma sürelerinde ise sürgün uzunluğu istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli olduğu kaydedilirken, sürgün rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı istatistiki olarak önemsiz olarak kaydedilmiştir. Son olarak $\text{NaN}_3 \times \text{Süre}$ opsiyonunda ise sürgün rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu istatistiki olarak önemsiz görülmüştür. Duncan testi sonuçları çizelge 4.9., 4.10. ve 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.9.Farklı NaN_3 konsantrasyonlarına maruz bırakılan *B. monnieri L.* bitkisinin sürgün rejenerasyonu.

NaN_3 (mg/L)	Sürgün rejenerasyon yüzdesi (%) **	Eksplant başına sürgün sayısı (adet) ^{ös}	Sürgün uzunluğu (cm) ^{ös}
0,025	60,00 ^a	23,81	2,30
0,05	71,11 ^a	10,72	1,42
0,1	53,33 ^a	14,90	1,38
0,2	13,33 ^b	14,11	0,93

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark $p < 0,001$ düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsizdir.

Çizelge 4.9. görüldüğü üzere NaN_3 konsantrasyonlarında sürgün rejenerasyonunda birtakım istatistiki farklılıklar gözlemlenmiş ve $p < 0,001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu istatistiki olarak benzerlik göstermiş ve önemsiz bulunmuştur. Sürgün rejenerasyonu %13,33-%71,11 arasında en yüksek (%71,11) 0,05 mg/L NaN_3 , en düşük (%13,33) 0,2 mg/L NaN_3 ortamında kaydedilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısında 10,72-23,81 arasında değişkenlik gösterirken en yüksek (23,81) 0,025 mg/L NaN_3 , en düşük (10,72) 0,05mg/L NaN_3 ortamında gözlenirken sürgün uzunluğu ise 0,93-2,30 arasında en yüksek (2,30) 0,025 mg/L NaN_3 ortamında, en düşük (0,93) 0,2 mg/L NaN_3 ortamında kaydedilmişlerdir. Sürgün uzunluğunda konsantrasyon arttıkça değerler belirgin ölçüde azalmıştır. Fakat sürgün rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısında kayda değer bir azalış görülmemiştir.

Çizelge 4.10. Farklı sürelerde NaN_3 'e maruz bırakılan *B. monnieri* L. bitkisinin sürgün rejenerasyonu.

Süre (dakika)	Sürgün Rejenerasyon yüzdesi (%) ^{ös}	Eksplant başına sürgün sayısı (adet) ^{ös}	Sürgün uzunluğu (cm)**
30	51,66	3,22	0,63 ^b
60	50,00	19,55	1,52 ^{ab}
120	46,66	24,89	2,38 ^a

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark $p < 0,001$ düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsizdir.

Çizelge 4.10. görüldüğü üzere NaN_3 mutajeni çözeltisinde farklı sürelerle maruz bırakılan tam yapraklardaki sürgün rejenerasyonu yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı istatistiki olarak benzerlik göstermiş ve önemsiz bulunmuştur. Sürgün uzunluğunda ise birtakım istatistiki farklılıklar gözlenmiş ve $p < 0,001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün rejenerasyon yüzdesi %46,66-%51,66 arasında en yüksek (51,66) 30 dakika, en düşük (46,66) 120 dakika olarak kaydedilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı en fazla (24,89) 120 dakika, en düşük (3,22) 30 dakikada gözlemlenmiştir. Sürgün uzunluğu ise 0,63-2,38 cm arasında en yüksek (2,38) 120 dakika, en düşük (0,63) 30 dakika olarak tespit edilmiştir. Sürgün rejenerasyon yüzdesinde süre artışına bağlı olarak değerlerde azalma görülürken, eksplant başına sürgün sayısında ve sürgün uzunluğunda tam tersine süre arttıkça değerler artmıştır.

Çizelge 4.11.Farklı NaN_3 konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılan *B. monnieri L.* bitkisinin sürgün rejenerasyonu.

NaN_3 Konsantrasyon (mg/L)	NaN_3 Süresi (dk)	Sürgün Rejenerasyon yüzdesi (%) **	Eksplant başına sürgün sayısı (adet) ^{ös}	Sürgün uzunluğu (cm)*
0,025	30	53,33 ^{abc}	1,06	0,91 ^{ab}
	60	73,33 ^{ab}	18,08	2,76 ^{ab}
	120	53,33 ^{abc}	52,30	3,23^a
0,05	30	93,33^a	2,06	0,40 ^{ab}
	60	60,00 ^{abc}	13,91	0,83 ^{ab}
	120	60,00 ^{abc}	16,20	3,03 ^a
0,10	30	60,00 ^{abc}	9,75	1,20 ^{ab}
	60	53,33 ^{abc}	23,86	1,83 ^{ab}
	120	46,66 ^{abcd}	11,08	1,11 ^{ab}
0,20	30	0	0	0
	60	13,33 ^{cd}	22,33	0,65 ^{ab}
	120	26,66 ^{bcd}	20,00	2,16 ^{ab}

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark $p < 0,001$ düzeyinde önemlidir.

* $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsizdir.

Çizelgede 4.11. incelendiğinde NaN_3 *Süre'de sürgün rejenerasyon yüzdesi istatistiki olarak farklılık göstermiştir ve $p < 0,001$ düzeyinde önemlidir. Eksplant başına sürgün sayısı istatistiki olarak farklı olup önemsiz bulunurken sürgün uzunluğu ise istatistiki olarak farklı olup $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün rejenerasyon yüzdesi 0-93,33 arasında değişkenlik gösterirken en fazla 0,05mg/L NaN_3 'de ve 30 dakikada, en az ise 0,2mg/L NaN_3 'de ve 30 dakikada gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 0-52,30 arasında seyredip en fazla eksplant başına sürgün sayısı 0,025mg/L NaN_3 'de ve 120 dakikada, en az 0,20mg/L NaN_3 'de ve 30 dakikada gözlenmiştir. Sürgün uzunluğu ise 0-3,23cm arasında değerler alırken en fazla sürgün sayısı 0,025mg/L NaN_3 'de ve 120 dakikada, en az ise 0,2mg/L NaN_3 'de ve 120 dakikada gözlenmiştir. 0 değeri olmasının nedeni doku kültürü yaparken ortamdan kaynaklı bakterilerin magentaları kontamine etmesi sonucunda bu değer yazılmıştır. Sürgün rejenerasyonunda konsantrasyon arttıkça değerler düşmüştür. Diğer opsiyonlarda ise konsantrasyona ve süreye bağlı bir artış veya azalış söz konusu değildir.

4.2.2. Farklı NaN_3 Konsantrasyonlarına ve Farklı Sürelere Maruz Kalan *Bacopa monnieri L.*'nin Fenotipe Etkisi

MS ortamında çoğaltılan bitkilerden, tam yaprak bölümü kesilerek 0,025mg/L, 0,05mg/L, 0,1mg/L ve 0,2mg/L oranlarında NaN_3 çözeltilerinde 30, 60 ve 120 dakikada

bekletilerek MS ve 1,0 mg/L BAP'lı ortamlarda kültüre alınmıştır. NaN_3 konsantrasyonları ve süresinin elde edilen sürgünlerin üzerinde fenotip etkilerine ait varyans analizi ise çizelge 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Farklı NaN_3 konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılan *B. monnieri L.* bitkisinin sürgün rejenerasyon çalışmasına ait varyans analizi.

VK	SD	Boğum sayısı (adet)		Boğumlar arası mesafe(cm)		Yaprak sayısı (adet)		Yaprak alanı (cm^2)	
		KO	F	KO	F	KO	F	KO	F
NaN_3	3	16,84	4,64*	0,44	1,92 ^{ös}	53,31	4,08*	0,002	0,631 ^{ös}
Süre	2	19,78	5,45*	0,19	0,85 ^{ös}	131,64	10,09*	0,017	4,80*
$\text{NaN}_3 \times \text{Süre}$	6	4,77	1,31 ^{ös}	0,21	0,94 ^{ös}	10,60	0,81 ^{ös}	0,002	0,55 ^{ös}
HATA	24	3,62	-	0,23	-	13,04	-	0,004	-
Genel Toplam	35	-	-	-	-	-	-	-	-

* $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsizdir.

Çizelge 4.11. incelendiğinde farklı NaN_3 konsantrasyonlarını içeren ortamlarda boğumlar arası mesafe ve yaprak alanı istatistiki olarak önemsiz görülürken, boğum sayısı ve yaprak sayısı istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. NaN_3 'e maruz kalma sürelerinde ise boğumlar arası mesafe istatistiki olarak önemsiz bulunurken, boğum sayısı ,yaprak sayısı ve yaprak alanı ise istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. $\text{NaN}_3 \times \text{Süre}$ opsiyonunda ise boğum sayısı, boğumlar arası mesafe, yaprak sayısı ve yaprak alanı istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Duncan testi sonuçları çizelge 4.12., 4.13. ve 4.14.'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı NaN_3 konsantrasyonlarına maruz bırakılan *B. monnieri L.* bitkisinin fenotipik analizleri.

NaN_3 (mg/L)	Boğum sayısı (adet)**	Boğumlar arası mesafe (cm) ^{ös}	Yaprak sayısı (adet)**	Yaprak alanı (cm^2) ^{ös}
0,025	4,26 ^a	0,57	8,36 ^a	0,070
0,05	2,46 ^{ab}	0,67	5,62 ^{ab}	0,042
0,1	3,22 ^a	0,62	6,71 ^a	0,053
0,2	1,01 ^b	0,19	2,58 ^b	0,045

**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark $p < 0,001$ düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsizdir.

Çizelge 4.12. görüldüğü üzere NaN_3 konsantrasyonlarında boğum sayısı ve yaprak sayısında istatistiki olarak farklılıklar gözlemlenmiş ve $p < 0,001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Boğumlar arası mesafe ve yaprak alanında istatistiki olarak benzerlik göstermiştir ve önemsiz bulunmuştur. Boğum sayısı 1,01-4,26 arasında değişim sergilerken en fazla (4,26) 0,025 mg/L NaN_3 ve en düşük (1,01) 0,2mg/L NaN_3 'de kaydedilmiştir. Yaprak sayısında 2,58-8,36 arasında en fazla (8,36) 0,025 mg/L NaN_3 en az (2,58) 0,2 mg/L NaN_3 ortamında gözlemlenmiştir. Boğumlar arası mesafe 0,19-0,67 arasında seyrederken en fazla (0,67) 0,05mg/L NaN_3 , en az (0,19) 0,2mg/L NaN_3 'de gözlemlenmiştir. Yaprak alanı ise 0,042-0,07 arasında en fazla (0,07) 0,025 mg/L NaN_3 ortamı en az (0,042) 0,1 mg/L NaN_3 ortamı olarak kaydedilmiştir.

En fazla boğum sayısı, en fazla yaprak sayısı ve en fazla yaprak alanı 0,025mg/ml'lik NaN_3 konsantrasyonunda görülürken, en fazla boğumlar arası mesafe ise 0,05mg/ml'lik NaN_3 konsantrasyonunda gözlenmiştir.

Çizelge 4.13. Farklı sürelerde NaN_3 'e maruz bırakılan *B. monnieri L.* bitkisinin fenotipik analizleri.

Süre (dakika)	Boğum sayısı (adet)**	Boğumlar arası mesafe (cm) ^{ös}	Yaprak sayısı (adet)**	Yaprak alanı(cm ²)**
30	1,25 ^b	0,58	2,02 ^b	0,010 ^b
60	3,44 ^a	0,37	7,36 ^a	0,075 ^a
120	3,52 ^a	0,59	8,08 ^a	0,077 ^a

**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark $p < 0,001$ düzeyinde önemlidir.

^{ös} önemsizdir.

Çizelge 4.13. görüldüğü üzere NaN_3 mutajeni çözeltisinde farklı sürelerle maruz bırakılan tam yapraklardaki boğum sayısında, yaprak sayısında ve yaprak alanında birtakım istatistiki farklılıklar gözlenmiştir ve $p < 0,001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Boğumlar arası mesafedeki veriler ise istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Boğum sayısında 1,25-3,52 arasında en fazla (3,52) 120 dakika, en az (1,25) 30 dakika olarak kaydedilmiştir. Yaprak sayısı 2,02-8,08 arasında en fazla (8,08) 120 dakika, en az (2,02) 30 dakika olarak belirtilirken yaprak alanı ise 0,010-0,077 arasında en fazla (0,077) 120 dakika, en az (0,010) 30 dakika olarak gösterilmiştir Boğumlar arası mesafe 0,37-0,59 arasında en fazla (0,59)120 dakika, en az (0,37) 60 dakika olarak kaydedilmiştir. Maruz bırakılma sürelerinin armasıyla doğru orantılı olarak değerlerde artış göstermiştir.

4.14. Farklı NaN_3 konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılan *B. monnieri* L. bitkisinin fenotipik analizleri.

NaN_3 Konsantrasyon (mg/L)	NaN_3 Süresi (dk)	Boğum sayısı (adet)**	Boğumlar arası mesafe (cm)*	Yaprak sayısı (adet)**	Yaprak alanı (cm ²)*
0,025	30	1,38 ^{cd}	0,70 ^{ab}	2,16 ^{cde}	0,02 ^a
	60	5,33 ^{ab}	0,49 ^{ab}	10,80 ^{ab}	0,09 ^a
	120	6,06^a	0,53 ^{ab}	12,13^a	0,11^a
0,05	30	0,26 ^d	0,77 ^{ab}	1,43 ^{de}	0
	60	4,23 ^{abc}	0,19 ^{ab}	8,86 ^{abc}	0,07 ^a
	120	2,90 ^{abcd}	1,04^a	6,56 ^{bcde}	0,05 ^a
0,10	30	3,38 ^{abcd}	0,86 ^{ab}	4,48 ^{bcde}	0,02 ^a
	60	3,10 ^{abcd}	0,59 ^{ab}	7,13 ^{abcd}	0,09 ^a
	120	3,18 ^{abcd}	0,43 ^{ab}	8,53 ^{abc}	0,04 ^a
0,20	30	0	0	0	0
	60	1,10 ^{cd}	0,19 ^{ab}	2,66 ^{cde}	0,03 ^a
	120	1,93 ^{bcd}	0,37 ^{ab}	5,10 ^{bcde}	0,09 ^a

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark $p < 0,001$ düzeyinde önemlidir.

* $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir.

^{0s} önemsizdir.

Çizelge 4.14.'te görüldüğü üzere NaN_3 *Süre opsiyonunda boğum sayısı ve yaprak sayısı istatistiki olarak benzerlik görülmüş ve $p < 0,001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Boğumlar arası mesafe ve yaprak alanı ise istatistiki olarak benzerlik göstermiş olup $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Boğum sayısı 0-6,06 arasında değişkenlik gösterirken en fazla (6,06) 0,025mg/L NaN_3 'de ve 120 dakikada, en az (0) 0,20mg/L NaN_3 'de ve 30 dakikada gözlemlenmiştir. Boğumlar arası mesafe 0-1,04cm arasındayken en fazla (1,04) 0,05mg/L NaN_3 'de ve 120 dakikada, en az (0) 0,20mg/L NaN_3 'de ve 30 dakika olarak kaydedilmiştir. Yaprak sayısı 0-10,80 arasında seyrederken en fazla (10,80) 0,025mg/L NaN_3 'de ve 60 dakikada, en az (0) 0,20mg/L NaN_3 'de 30 dakika olarak yaprak alanı ise 0-0,11 arasında değişkenlik gösterip en fazla (0,11) 0,025mg/L NaN_3 'de 120 dakikada, en az (0) 0,20mg/L NaN_3 'de 30 dakikada kaydedilmiştir. Değerler arasında en az olarak gösterilen sıfır (0) kontamine olmuş magentaların oluşması sonucu veri alınmadığı için yazılmıştır.

4.3.TARTIŞMA

Araştırmada sterilizasyon işlemi filtre sterilizasyon yöntemi kullanılarak yapıldığı için mutajenden kaynaklanan bir kirlilik görülmemiştir. Eksplantta endojenik bir bakteriyel kontaminasyon görülmediği gibi ortaya çıkan bazı kontaminasyonların ortaya çıkma nedeni ise ortam şartlarından kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Araştırmamızda kullandığımız iki farklı mutajenler (EMS, NaN_3) arasında ve maruz bırakılma süreleri (30 dakika, 60 dakika, 120 dakika) arasında önemli farklar belirlenmiştir. EMS mutajenindeki konsantrasyona bağlı sonuçlarda verimi en iyi aldığımız konsantrasyon 0,1 mg/L olup belirlenen opsiyonlardaki ortalama değerleri ise sürgün rejenerasyon yüzdesi %91,11, eksplant başına sürgün sayısı 41,36 adet, sürgün uzunluğu 2,97cm, boğum sayısı 2,98 adet, boğumlar arası mesafe 1,07cm, yaprak sayısı 8,6 adet iken yaprak alanında 0,2mg/L'de 0,11cm² olarak belirlenmiştir.

EMS'de süreye bağlı sonuçlarda verimi en iyi aldığımız maruz bırakılma süresi 120 dakika olup belirlenen opsiyonlardaki ortalama değerleri ise sürgün rejenerasyon yüzdesi %86,66, eksplant başına sürgün sayısı 49,09 adet, sürgün uzunluğu 2,98cm, boğum sayısı 3,47 adet, yaprak sayısı 8,99 adet, yaprak alanı 0,13cm² iken boğumlar arası mesafe 30 dakikada 0,93cm olarak belirlenmiştir.

EMS'de Konsantrasyon ve Süre'ye bağlı parametrelerin sonuçlarında verimi en iyi aldığımız konsantrasyon ve süre 0,2mg/L'de 120 dakika olarak belirlenmiş olup belirlenen opsiyonlardaki ortalama değerler sürgün rejenerasyon yüzdesi %100, sürgün uzunluğu 4,06cm, boğum sayısı 4,06 adet ve yaprak sayısı 12,23 adet olarak bulunmuştur. Diğer değerler ise eksplant başına sürgün sayısı 0,10mg/L'de 60 dakika ve değeri 57,00 adet, boğumlar arası mesafe 0,10mg/L'de 120 dakika ve değeri 1,13cm son olarak yaprak alanı 0,20mg/L'de 60 dakika ve değeri 0,17cm² olarak belirlenmiştir.

NaN_3 mutajenindeki konsantrasyona bağlı sonuçlarda verimi en iyi aldığımız konsantrasyon 0,025mg/L olup belirlenen opsiyonlardaki ortalama değerleri ise eksplant başına sürgün sayısı 23,81 adet, sürgün uzunluğu 2,30 cm, boğum sayısı 4,26 adet, yaprak sayısı 8,36 adet ve yaprak alanı 0,07 cm² olarak belirlenmiş olup diğer opsiyonlar ise sürgün rejenerasyonu 0,05mg/L'de %71,11 ve boğumlar arası mesafe 0,05mg/L'de 0,67cm olarak belirlenmiştir.

NaN_3 'de süreye bağlı sonuçlarda verimi en iyi aldığımız süre 120 dakika olup belirlenen opsiyonlardaki ortalama değerleri ise eksplant başına sürgün sayısı 24,89 adet, sürgün uzunluğu 2,38 cm, boğum sayısı 3,52 adet, boğumlar arası mesafe 0,59 cm, yaprak sayısı 8,08 adet ve yaprak alanı 0,07 cm² olup diğer opsiyondaki değeri ise sürgün rejenerasyon yüzdesi 30 dakikada %51,66 olarak belirlenmiştir.

NaN_3 'de Konsantrasyon ve Süre'ye bağlı parametrelerin sonuçlarında verimi en iyi aldığımız konsantrasyon ve süre 0,025mg/L'de 120 dakikada olarak belirlenmiş olup belirlenen opsiyonlardaki ortalama değerler eksplant başına sürgün sayısı 52,30 adet, sürgün uzunluğu 3,23cm, boğum sayısı 6,06 adet ve yaprak alanı 0,11cm² olarak

bulunmuştur. Diğer değerler ise sürgün rejenerasyon yüzdesi 0,05mg/L'de 30 dakika ve değeri %93,33, boğumlar arası mesafe 0,05mg/L'de 120 dakikada 1,04cm ve yaprak sayısı 0,025mg/L'de 60 dakika ve değeri 10,80 adet olarak bulunmuştur.

İki farklı mutajen arasında en iyi cevap EMS'nin yüksek konsantrasyonlarında gözlenmiştir. NaN_3 'in rejenerasyon hızı daha yavaşken EMS daha kısa sürede kallus oluşumu ve ardından daha hızlı sürgün vermeye başlamıştır. Süre bazında ise 120 dakikalık zamanda EMS ve NaN_3 iyi sonuç vermiştir ancak verim kıyaslandığında EMS'nin verimi daha yüksektir.

Chaudhary vd. (2001) belirgin bir mutant olan etil metan sülfonat (EMS) ile muamele edilen 200 tohum, Rmt1'den 4 saat süreyle alınan, M2 jenerasyonundan 400 çemen otu (*Trigonella foenum-graecum L.*) bitkisi elde edilmiştir. Tüm M2 popülasyonlarından rastgele örnekler (mutant hariç) M3 nesline ilerletilmiştir. 798 bitki örneğinde bir belirleyici tipin ortaya çıkması, özelliğin monogenik olduğunu göstermiştir. Bu mutant, Rmt 1 ve UM 305 (benzer büyüme alışkanlığı için spontan mutant) ile birlikte büyütülmüştür. Bitki boyu, bitki başına bakla sayısı, bitkide tane verimi ve yaprak biti istilası için genotipler arasında önemli farklılıkların varlığı tespit edilmiştir. Araştırmamızda kullandığımız mutajenlerden biri olan EMS bu çalışmada da gözlemlendiği üzere bitkinin boyunda, eksplant başına sürgün sayısında, yaprak alanı, yaprak sayısı ve boğum sayılarında önemli farklılıklar tespit edilmiştir.

Diğer bir araştırmada Escandon vd. (2006) *B. monnieri L.*'nin eksplant olarak nodal segmentlerini, kimyasal mutajen olarak da kolşisin mutajenini %0.001 konsantrasyonunda kullanarak 24 ve 48 saat boyunca maruz bırakmış ve sonuç olarak bitkide çiçek boyutunda artışlar saptanmıştır. Araştırmamızda kolşisine kıyasla 60 ve 120 dakika boyunca 0,2mg/L'lik EMS mutajenine maruz bırakılan tam yaprak eksplantların rejenerasyonu sonucu yaprak alanında artış tespit edilmiştir.

Araştırmamızda kullandığımız model organizmayı kullanan başka bir araştırma olan Naik vd. (2012) doku kültüründe yetiştirilmiş *B. monnieri L.* bitkiciklerini fiziksel ve kimyasal mutasyonlarla uyarmışlardır. %0,5'lik etil metan sülfonat (EMS)'in farklı konsantrasyonlarında ve gama (γ) ışınının farklı dozlarından in vitro üretilmiş olan *B. monnieri L.* 'nin yapraklarına işlenmiştir. Xantha mutantları 10, 20 ve 40 Gy'de γ ışınları ile 80 Gy'de γ ışınları ile tedavi edilen tam yaprak eksplantları nekrotik veya geri dönüşümsüz olduğu tespit edilmiştir. Hem gamada hem de EMS tedavisinde hayatta kalma oranı, adventif sürgün sayısı, taze ağırlık ve kuru ağırlık gibi özelliklerde bir azalma sergilenmiştir. *B. monnieri L.* 'nin yaprak eksplantlarında γ ışınlarının farklı

dozları ile yani 10, 20 ve 40 Gy ile uyarılmış mutasyonlarında Bacoside A içeriğinde artış gözlenmiş fakat EMS ile tedavi edilen yaprak eksplantlarında ise önemli bir artış göstermemiştir. 0,10,20,40 ve 80 (Gy) dozlarında gama ışınlarını ve %0,5 konsantrasyonundaki EMS'ye 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2,5 saat aralıklarında maruz bırakılmıştır. Gama ve EMS'de sürgün sayısı, yaş ve kuru ağırlığı gibi kantitatif özelliklerinde önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir. Araştırmamızda ise kullanılan %0,2'lik EMS ve 60 ile 120 dakikalık sürelerde sürgün rejenerasyonunda, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, boğumlara mesafede azalma görülürken boğum sayısında, yaprak sayısında ve yaprak alanında artışlar tespit edilmiştir.

Üç farklı bitkinin mutajenez maruz kalması sonucu bitkilerin fenotiplerini araştıran bir çalışma olan Jonkowicz ve Till (2016) çeşitli bitki tohumlarını (seçilen genotip kullanılarak kendi kendine üretilmiş veyahut bir tohum stok merkezinden sipariş edilmiştir.) kullanmışlardır. Kullanılan bu tohumlar arpa tohumu, chick pea ve muzdur. EMS nokta mutasyonuna yol açarak bitki de yüzlerce veya binlerce lokali indükleyebilir. Ayrıca nükleotit çeşitliliğini oluşturmak ve hem ucuz hem de basit bir yöntem olduğu için kullanılmıştır. EMS'ye maruz kalmış bitkiler fenotipik karakterizasyon olarak taranabilir. Bu çalışmada EMS tedavisinin tohum ve vejetatif propagülleri üzerine etkisi incelenmiştir. EMS yoğunluğunun artmasıyla arpadaki çimlenme yüzdesinin de arttığı gözlemlenirken Chick Pea bitkisinde ise çimlenme yüzdesi azalmış ayrıca %60 oranında bitkide toksik etki oluşturmuştur. Sonuç olarak 40 mM EMS'de %65 oranında rejenerasyon gözlemlenmiş ve 0,25mM EMS'deki muz bitkilerinde ise %100 rejenerasyon göstermiştir. *B. monnieri L.*'deki durumumuzda 0,2mg/L'lik EMS'de 60 dakikalık ve 120 dakikalık ortamlarda %100 rejenerasyon göstermiştir.

Araştırmamızda elde edilen bulgular oldukça önemlidir. Nesli tükenmekte olan bu akuatik bitkinin neslinin devamlılığını sağlayabilmek ve daha fazla verim alabilmek için eğitimcilerimize yeni araştırma kapıları sunarak yol gösterici olup, bilimsel anlamda da katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. SONUÇLAR

Akuatik bir bitki olan *B. monnieri* L. ekili bir bitki türü olmadığı için tohumların hayatta kalma olasılığı düşüktür. Bundan dolayı verimi arttırmak amaçlanmıştır. Araştırmamızda doku kültürü tekniği ile bitkinin tam yaprak eksplantları alınarak farklı mutajenlerin (EMS, NaN₃), farklı konsantrasyonları (0,025mg/L, 0,05mg/L, 0,1mg/L, 0,2mg/L) ve farklı sürelerde (30 Dk, 60 Dk, 120 Dk) 1.0 BAP'lı besi ortamlarına aktarılarak sonuçlanmıştır.

Eksplantlarda kallus oluşumu gözlemlendikten 2 hafta içinde eksplantların kenarında ve petiol (yaprak sapı) olan bölgelerde sürgün uçları görülmeye başlamıştır. Daha sonra, 3 ile 4 hafta sonrasında belirgin bir şekilde çoklu sürgün oluşumu gözlemlenmiştir.

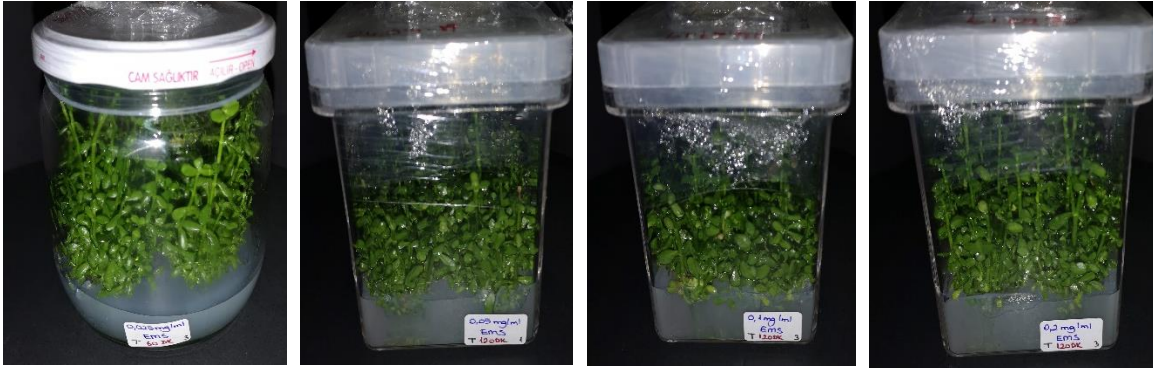
Eksplantlar besi ortamında 15 haftaya kadar bekletilmiştir. Eksplantlarda kallus oluşumu gözlemlendikten, 2 hafta içinde eksplantların kenarında ve petiol (yaprak sapı) olan bölgelerde sürgün uçları görülmeye başlamıştır. Daha sonra, 4 ile 5 hafta sonrasında belirgin bir şekilde çoklu sürgün oluşumu gözlemlenmiştir.

5.1.1. EMS Mutajeninden Alınan Sonuçlar

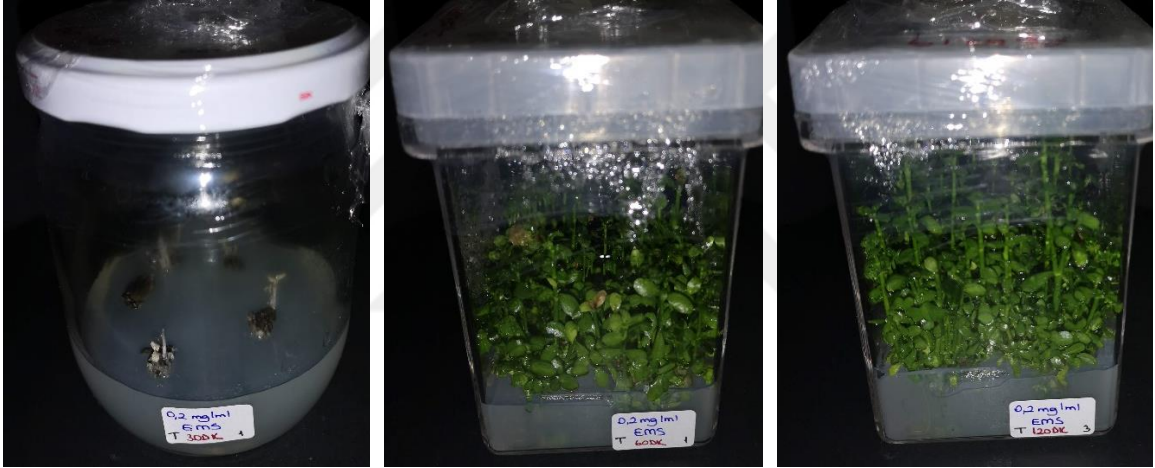
EMS'de Konsantrasyon ve Süre'ye bağlı parametrelerin sonuçlarında verimi en iyi aldığımız konsantrasyon ve süre 0,2mg/L'de 120 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 6.1. En iyi verim aldığımız parametreler olan 0,2 mg/ml EMS konsantrasyonunda ve 120 dakikalık süreye maruz bırakılan *B. monnieri* L. bitkisinin sırasıyla 2, 5 ve 14 haftalık görüntüleri.



Şekil 6.2. EMS mutajeninin en iyi süresi olan 120 dakikada 0,0025mg/ml, 0,05mg/ml, 0,1mg/ml ve 0,2mg/ml konsantrasyonlarındaki görüntüleri.



Şekil 6.3. EMS mutajeninin en iyi konsantrasyonu olan 0,2mg/ml de 30, 60 ve 120 dakikadaki görüntüleri.

5.1.2. NaN_3 Mutajeninden Alınan Sonuçlar

NaN_3 'de Konsantrasyon ve Süre'ye bağlı parametrelerin sonuçlarında verimi en iyi aldığımız konsantrasyon ve süre 0,025mg/L'de 120 dakikada olarak belirlenmiştir.

İki farklı mutajen arasında en iyi cevap EMS'nin yüksek konsantrasyonlarında (0,2mg/L ve 0,1mg/L) gözlenmiştir. NaN_3 'in rejenerasyon hızı daha yavaşken EMS daha kısa sürede kallus oluşumu ve ardından daha hızlı sürgün oluşumu başlamıştır. Süre bazında ise 120 dakikalık zamanda EMS ve NaN_3 iyi sonuç vermiştir ancak verim kıyaslandığında EMS'nin verimi daha yüksektir.



Şekil 6.4. En iyi verim aldığımız parametreler olan 0,025 mg/ml NaN_3 konsantrasyonunda ve 120 dakikalık süreye maruz bırakılan *B. monnieri L.* bitkisinin sırasıyla 2, 5 ve 14 haftalık görünüşleri.



Şekil 6.5. NaN_3 mutajeninin en iyi süresi olan 120 dakikada 0,0025mg/ml, 0,05mg/ml, 0,1mg/ml ve 0,2mg/ml konsantrasyonlarındaki görünüşleri.



Şekil 6.6. NaN_3 mutajeninin en iyi konsantrasyonu olan 0,2mg/ml de 30, 60 ve 120 dakikadaki görünüşleri.

5.2. ÖNERİLER

Tezimizde elde edilen bulgular çok önemlidir. Eğitimcilerimize yeni araştırma kapıları sunarak yol gösterici olup, bilimsel anlamda da katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada *B. monnieri L.*'nin ekili bir bitki türü olmadığı için tohumlarının hayatta kalma olasılığı düşük olan ve yabancı neslinin tükenme riskiyle karşı karşıya kalması sonucu verimin artırılması ve ticari olarak ilaç sektöründe kullanılarak pek çok sinirsel hastalıkların tedavisinde kullanılabilmesi için bu tıbbi bitkinin sağlıklı bir şekilde çoğaltılmasına veya içerisinde en önemli etken olan Bacoside A'nın miktarının bozulmadan artırılmasına ve korunmasına, in vitro rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesine yönelik kapsamlı çalışmalarını yapılmasını öngörmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Aasim M, Karataş, Khawar KM, Dogan, M. (2013). Optimization of sterilization and micropropagation of Water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Journal of Applied Biological Sciences* 7: 71-74.
- Aasim M, Khawar KM, Yalcin G, Bakhsh A (2014) Current trends in fenugreek biotechnology and approaches towards its improvement. *Am J Soc Issues Hum. Fenugreek Special Issue Mar/Apr*, pp 128–136.
- Aravind, A., & Dhanya, S. (2016). In-silico design, synthesis and anti-proliferative evaluation of acetidino-quinazoline derivatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 36(1), 249–255. <https://doi.org/10.1002/em>
- Asha KI, Devi AI, Dwivedi NK, Nair RA (2013) *In vitro* regeneration of brahmi (*Bacopa monnieri* (Linn.) Pennell) - an important medicinal herb through nodal segment culture. *Res Plant Bio*, 3(1): 01-07.
- AV, K., NS, C., MA, C., RH, A., & MB, K. (2017). In Vitro Enhancement of Bacoside in Brahmi (*Bacopa monnieri*) Using Colchicine. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000172>
- Babbar SB, Jain R, Walia N (2005) Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. *In Vitro Cell Dev Biol*, 41:258–261
- Begum T, Mathur M (2014) *In vitro* Regeneration of *Catharanthus roseus* and *Bacopa monnieri* and their survey around Jaipur District. *Int J Pure App Biosci* 2 (4): 210-221
- Behera S, Mallick B, Tiwari TN, Mishra PC (2016) A short review on physico-chemical properties of *Bacopa monnieri* L. *Int J of Med Plants Photon* 110, 735-741
- Behera S, Nayak N, Shasmita Barik DP, Naik SK (2015) An efficient micropropagation protocol of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell through two-stage culture of nodal segments and ex vitro acclimatization. *J Appl Biol Biotechnol* 3(3): 16-21
- Bone K. (1996) *Clinical Applications of ayurvedic and chinese herbs: monographs for the western herbal practitioner*. Warwick, Queensland: Phytotherapy Press
- Buckley PM, Reed BM (1994) Bitki ile ilişkili bakterilerin antibiyotik duyarlılığı. *Horti Sci* 29: 434
- Daniel M, (2005) *Medicinal Plants: Chemistry and Properties*. Science Publishers, Enfield, 225
- Di Pauli, V., Fontana, P. D., Lewi, D. M., & Erazzú, L. E. (2019). Somatic embryogenesis response in Argentinian sugarcane genotypes for in vitro mutagenesis application Somatic embryogenesis response in Argentinian sugarcane genotypes for in vitro mutagenesis application. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*, 30(September), 522–529.

- Dogan, M., & Emsen, B. (2018). Anti-cytotoxic-genotoxic influences of *in vitro* propagated *Bacopa monnieri* L. Pennell in cultured human lymphocytes. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 1(2), 48–53.
- Dubey, T., & Chinnathambi, S. (2019). Brahmi (*Bacopa monnieri*): An ayurvedic herb against the Alzheimer's disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 676, 108153. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108153>
- Escandón AS, Hagiwara JC, Alderete LM (2006) A new variety of *Bacopa monnieri* obtained by *in vitro* polyploidization. *Electron J Biotechnol* 9: 181-186
- Gurnani C, Kumar V, Mukhija S, Dhingra A, Rajpurohit S, Narula P (2012) *In vitro* regeneration of brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) penn.) - a threatened medicinal plant. *kathmandu uni j sci eng and techno* 8: 97- 99
- Haque SM, Chakraborty A, Dey D, Mukherjee S, Nayak S, Ghosh B (2017) Improved micropropagation of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. (Plantaginaceae) and antimicrobial activity of *in vitro* and *ex vitro* raised plants against multidrug-resistant clinical isolates of urinary tract infecting (UTI) and respiratory tract infecting (RTI) bacteria. *Clin PhytoSci* 3:17 DOI 10.1186/s40816-017-0055-6
- Hegazi GAE, Taha HS, Sharaf AMM, Elaish SR (2017a) Enhancing *in vitro* production of Bacoside a from *Bacopa monnieri* using precursor and elicitors feeding. *J Basic Appl Sci Res* 7: 27-35
- Hegazi GAE, Taha HS, Sharaf AMM, Elaish SR (2017b) Micropropagation of *Bacopa monnieri* and enhancing Bacoside a production in shoot cultures. *J Appl Environ Biol Sci* 7 (9) 115-126
- Jain R, Prasad B, Jain M (2013) *In vitro* regeneration of *Bacopa monnieri* (L.): A highly valuable medicinal plant. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2(12): 198-205
- Jankowicz-Cieslak, J., & Till, B. J. (2016). Chemical Mutagenesis of Seed and Vegetatively Propagated Plants Using EMS. *Current Protocols in Plant Biology*, 1(4), 617–635. <https://doi.org/10.1002/cppb.20040>
- Jeena, G. S., Fatima, S., Tripathi, P., Upadhyay, S., & Shukla, R. K. (2017). Comparative transcriptome analysis of shoot and root tissue of *Bacopa monnieri* identifies potential genes related to triterpenoid saponin biosynthesis. *BMC Genomics*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3865-5>
- Joshi AG, Pathak AR, Sharma AM, Singh S (2010) High frequency of shoot regeneration on leaf explants of *Bacopa monnieri*. *Environ Exp Bio* 8: 81-84
- Karatas M, Aasim M, Dogan M, Khawar KM (2013) Adventitious shoot regeneration of the medicinal aquatic plant water hyssop (*Bacopa monnieri* L. PENNELL) using different internodes. *Arch Biol Sci* 65 (1), 297-303

- Karataş M, Aasim M, (2014) Efficient adventitious shoot regeneration of medicinal aquatic plant water hyssop (*Bacopa monnieri* L. Pennell). Pak J Agric Sci 51, 665-670
- Karataş M, Aasim M, Dazkirli M, (2016) Influence of light emitting diodes and benzylaminopurin on adventitious shoot regeneration of water hyssop (*Bacopa monnieri* L. Pennell.) *in vitro*. Arch Biol Sci 68(3), 501-508
- Karataş M, Aasim M, Dazkirli M, (2017) Efficacy of light emitting diodes (leds) lighting system for *in vitro* shoot regeneration of medicinal water hyssop (*Bacopa monnieri* L. PENNEL). Romanian Biotechnol Lett doi.org/10.26327/RBL2017.99
- Kashyap S, Kapoor N, Kale RD (2017) *B. monnieri*'nin bitki doku kültüründe humin besiyeri kullanılarak *mikropropagasyonu* . Ann Plant Sci 6 (5): 1625-1629
- Kaur J, Nautiyal K, Pant M (2013) *In vitro* propagation of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst- A medicinally priced herb. Int J Curr Microbiol Appl Sci 2(8):131-138
- Kharde AV, Chavan NS, Chandre MA, Autade RH, Khetmalas MB (2017) *In Vitro* Enhancement of Bacoside in Brahmi (*Bacopa monnieri*) Using Colchicine. J Plant Biochem Physiol 5: 172. doi:10.4172/2329-9029.1000172
- Khare CP (2003) Indian herbal remedies: rational western therapy, ayurvedic, and other traditional usage, Botany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 89
- Koczurkiewicz, P., Łojewski, M., Piska, K., Michalik, M., Wójcik-Pszczola, K., Szewczyk, A., ... Muszyńska, B. (2017). Chemopreventive and anticancer activities of bacopa monnieri extracted from artificial digestive juices. *Natural Product Communications*, 12(3), 337–342. <https://doi.org/10.1177/1934578x1701200306>
- Koul A, Sharma A, Gupta S, Mallubhotla S (2014). Cost Effective Protocol for Micropropagation of *Bacopa Monnieri* Using Leaf Explants. Int J Sci Res 3: 210-212
- Kumari R, Priyadarshni M, kumari A, Shukla IN (2014) *In vitro* mass multiplication of *Bacopa monnieri* (l.) an endangered and valuable medicinal herb. Indian J Sci Res 7 (1):1248-1253
- Masoabi, M., Lloyd, J., Kossmann, J., & van der Vyver, C. (2018). Ethyl Methanesulfonate Mutagenesis and In Vitro Polyethylene Glycol Selection for Drought Tolerance in Sugarcane (*Saccharum* spp.). *Sugar Tech*, 20(1), 50–59. <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0524-8>
- Mendhulkar VD, Patade PS, Singh SN (2011) DMSO induced product recovery of Bacoside A in cell suspension culture of *Bacopa monnieri* Linn. Int J Pharm Sci Res 2 (11): 3006- 3009

- Mishra SK, Tiwari KN, Shivna PL, Mishra AK (2015) Micropropagation and Comparative Phytochemical, Antioxidant Study of *Bacopa Monnieri* (L.) Pennell. Res J Pharm Biol Chem Sci 6(6): 902-912
- Mohanta YK, Sahoo S (2014) *In vitro* culture of highly valuable medicinal plant *Bacopa monnieri* (L.) penn. for rapid and mass multiplication. Int J Pharm Sci Invention 3:41-45
- Mohapatra HP, Rath SP (2005) *In vitro* studies of *Bacopa monnieri*-An important medicinal plant with reference to its biochemical variations. Indian J Expe Biol 43, 373-376
- Monica J, Rajput, R. Anamika M (2013) Enhancement of secondary metabolite biosynthesis in *Bacopa monnieri*: An *in vitro* study. Res J Recent Scie 2(1): 13-16
- Murashige, Toshio ve Folke Skoog. "Tütün dokusu kültürleri ile hızlı büyüme ve biyolojik analizler için revize edilmiş bir ortam." *Physiologia plantarum* 15.3 (1962): 473-497.
- Nagarajan T, Alagumanian S, Jahirhussain G and Subbaiya S (2015) *In vitro* mass propagation of *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst from nodal explant-a multipurpose medicinal plant. World J Pharm Res 4(12): 1970-1982
- Naik, P. M., Praveen, N., Manohar, S. H., & Murthy, H. N. (2012). Effect of mutagens on the *in vitro* adventitious shoot growth and bacoside a accumulation in *Bacopa monnieri* (L.). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(3), 848–855.
- Nandhini S, Bayyapureddy A, Varghese RJ (2015) *Bacopa monnieri* L. Penn'den saponinlerin ve diğer biyoaktiflerin gelişmiş bir *in vitro* üretimi . Res J Pharm Biol Chem Sci 6 (3): 446–451
- Narwal MD (2016) Exploitation of plant extracts (stem and root) of micropropagated *Bacopa monnieri* : Antimycotic Potential. Int J online of sci 2: 1-8
- Pandiyan P, Selvaraj T (2012) *In vitro* multiplication of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell from shoot tip and nodal explants. J Agric Technol 8(3): 1099-1108
- Parale A, Barmullah R, Nikam T (2010) Influence of organic supplements on production of shoot and callus biomass and accyumulation of of Bacoside in *B. monnieri* L. Pennel. Physiol & Mol Biol Plants 16 (2): 167-175
- Pei, J. V., Kourghi, M., De Ieso, M. L., Campbell, E. M., Dorward, H. S., Hardingham, J. E., & Yool, A. J. (2016). Differential inhibition of water and ion channel activities of mammalian aquaporin-1 by two structurally related bacopaside compounds derived from the medicinal plant *Bacopa monnieri*. *Molecular Pharmacology*, 90(4), 496–507. <https://doi.org/10.1124/mol.116.105882>
- Prabha J, Rani U, Sen A, Verma RN, Batra A (2010) In-vitro conservation of *Bacopa monniera* (L.) Wettst.: A Memory Booster Plant. Our Nature, 8:40-47

- Prasool K, Arun T, Ram, AT, Mohammed SK (2013) *In vitro* regeneration of *Bacopa monnieri* (L.) wettst, under varying hormonal concentrations. Innovative Thoughts Int Res J 1
- Ramasamy, S., Chin, S. P., Sukumaran, S. D., Buckle, M. J. C., Kiew, L. V., & Chung, L. Y. C. (2015). In silico and in vitro analysis of bacoside A aglycones and its derivatives as the constituents responsible for the cognitive effects of *Bacopa monnieri*. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126565>
- Ranjan R, Kumar S, Singh AK (2018) An efficient *in vitro* propagation protocol of local germplasm of *Bacopa monnieri* (L.) found in Bihar: A plant with wide variety of medicinal properties. *J Pharmacogn Phytochem* 7(1): 1803-1807
- Rao S, Rajkumar P, Kaviraj C, Parveen PA (2012) Efficient plant regeneration from leaf explants of *Bacopa monniera* (L.) Wettst. : A threatened medicinal herb. *Annals of Phytomedicine* 1(1): 110-117
- Rency AS, Satish L, Pandian S, Rathinapriya P, Ramesh M (2016) *In vitro* propagation and genetic fidelity analysis of alginate-encapsulated *Bacopa monnieri* shoot tips using *Gracilaria salicornia* extracts. *J Applied Phycol* DOI 10.1007/s10811-016-0918-0
- Showkat P, Zaidi Y, Asghar S, Jamaluddin S (2010) *In vitro* Propagation and Callus Formation of *Bacopa monnieri* (L.) Penn. *Plant Tissue Cult & Biotech* 20(2): 119-125
- Singh HK, Shanker G, Patnaik GK (1996) Neuropharmacological and antistress effects of Bacosides: A memory enhancer. *Indian J Pharmacol* 28:47
- Singh HK, Rastogi RP, Srimal RC, Dhawan BN (1988) Effect of Bacosides A and B on avoidance responses in rats. *Phytother Res* 2:70-5
- Smith RH (2012) *Plant Tissue Culture: techniques and Experiments*. 3rd Edition, Elsevier, DOI: 10.1016/B978-0-12-415920-4.00004-9
- Srivastava P, Tiwari KN, Srivastava G (2017) Effect of different carbon sources on *in vitro* regeneration of Brahmi *Bacopa monnieri* (L.) An important memory vitalizer. *J of Medicinal Plant Stu* 5(3): 202-208
- Srivastava, D., Gayatri, M. C., & Sarangi, S. K. (2018). In vitro mutagenesis and characterization of mutants through morphological and genetic analysis in orchid *Aerides crispa* Lindl. *Indian Journal of Experimental Biology*, *56*(6), 385–394.
- Subashri B, Pillai YJK (2014) *In vitro* regeneration of *Bacopa monnieri* (L.) pennel.-a multipurpose medicinal plant. *Int J Pharm Pharm Sci* 6, 559-563
- Sumaryono, Muslihatin W, Ratnadewi D (2012) Effect of carbohydrate source on growth and performance of *in vitro* sago palm (*Metroxylon sago* Rottb.) Plantlets. *HAYATI J Biosci* 19: 88-92

Şekil 1.1. <https://shop.tranceplants.net/products/bacopa-monniери-brahmi>.

Talukdar A (2014) Biosynthesis of total Bacosides in the callus culture of *Bacopa monniери*. L. Pennel from North-East India. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3(3): 140-145

Tiwari V, Tiwari KN, Singh BD (2001) Comparative studies of cytokinins on *in vitro* propagation of *Bacopa monniери*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 66:9-16

Ugandhar, T. (2018). STUDIES ON EXPERIMENTAL MUTAGENESIS ON CHICK PEA (*CICER ARIETINUM* L.) INDUCED BY ULTRAVIOLET RAYS AND ETHYL METHANE Biomedical European of STUDIES ON EXPERIMENTAL MUTAGENESIS ON CHICK PEA (*CICER ARIETINUM*, (August).

Vajpaye P, Dhawan A, Shanker R (2006) Evaluation of the Alkaline Comet Assay Conducted With the Wetlands Plant *Bacopa monniери* L. as a Model for Ecogenotoxicity Assessment. *Environ Mol Mutagen* 47:483-489

Varghese DB, Sathyanarayana BN (2007) Induction of variation in two cultivars of *Bacopa monniери* by Gamma radiation of *in vitro* cultures. *Medicinal Aromatic Plant Sci and Biotechnol* 1:86-89

Vijayakumar M, Vijayakumar R, Stephen R (2010) *In vitro* propagation of *Bacopa monniери* L. - a multipurpose medicinal plant. *Indian Journal of Science and Technology*, 3:7 781-786.

Wangdi K, Sarethy IP (2016) Evaluation of micropropagation system of *Bacopa monniери* L. in liquid culture and its effect on antioxidant properties. *J Herbs Spices & Medicinal Plants* 22:69–80

Yusuf A, T RK, Nikhilesh S, Rao PS (2011) Effects of antioxidants and gelling agents on regeneration, *in vitro* conservation and genetic stability of *Bacopa monniери* (L.) Pennell. *International Journal Of Ayurvedic And Herbal Medicine* 1: 51:67

Zote RK, Patil YK, Londhe SS, Thakur VV, Choudhari NB (2018) *In vitro* regeneration of *Bacopa monniери* (L.) from leaf and stem explants. *International Journal of Chemical Studies* 6(2): 1577-1580

EKLER

EK-1: *In vitro* koşullarda farklı EMS konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılmış *B. monnieri* L. bitkisi.



0,025 mg/ml EMS
30 dakika



0,05 mg/ml EMS
30 dakika



0,1 mg/ml EMS
30 dakika



0,2 mg/ml EMS
30 dakika



0,025 mg/ml EMS
60 dakika



0,05 mg/ml EMS
60 dakika



0,1 mg/ml EMS
60 dakika



0,2 mg/ml EMS
60 dakika



0,025 mg/ml EMS
120 dakika



0,05 mg/ml EMS
120 dakika



0,1 mg/ml EMS
120 dakika



0,2 mg/ml EMS
120 dakika

EK-2: *In vitro* koşullarında farklı NaN_3 konsantrasyonlarına ve farklı sürelerle maruz bırakılmış *B. monnieri* L. bitkisi.



**0,025 mg/ml NaN_3
30 dakika**



**0,05 mg/ml NaN_3
30 dakika**



**0,1 mg/ml NaN_3
30 dakika**



**0,2 mg/ml NaN_3
30 dakika**



**0,025 mg/ml NaN_3
60 dakika**



**0,05 mg/ml NaN_3
60 dakika**



**0,1 mg/ml NaN_3
60 dakika**



**0,2 mg/ml NaN_3
60 dakika**



**0,025 mg/ml NaN_3
120 dakika**



**0,05 mg/ml NaN_3
120 dakika**



**0,1 mg/ml NaN_3
120 dakika**



**0,2 mg/ml NaN_3
120 dakika**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Kübra MİRZA
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Selçuklu / 30.01.1993
Telefon : 05453577781
Faks : -
e-mail : mirzaybik@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	BitirmeYılı
Lise	: Karatay TOKİ Anadolu Lisesi, Karatay, Konya	2012
Üniversite	: Cumhuriyet Üniversitesi, Merkez, Sivas	2017
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram, Konya	
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2014	Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı	Stajyer

UZMANLIK ALANI: Bitki Doku Kültürü

YABANCI DİLLER: İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER: Ney üfleme, cam vitray yapmak, kitap okumak, roman yazmak.

YAYINLAR