

ANKARA ÜNİVERSİTESİ BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GEÇİCİ DALDIRMA SİSTEM BİYOREAKTÖRLERLE SU MERCİMEĞİ
(*Lemna minor* L.) BİTKİSİNİN *IN VITRO* ÇOĞALTIMI**

ZEHRA YENİCE

ANKARA

2010

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. H. Hüseyin ATAR danışmanlığında , Zehra YENİCE tarafından tarfindan hazırlanan bu çalışma 20.07.2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Sabahattin ÖZCAN İmza:

Üye: Prof. Dr. H.Hüseyin ATAR İmza:

Üye: Prof. Dr. Serap PULATSÜ İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof.Dr.Mustafa AKÇELİK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Zehra YENİCE

GEÇİCİ DALDIRMA SİSTEM BİYOREAKTÖRLERLE SU MERCİMEĞİ (*Lemna minor* L.) BİTKİSİNİN *IN VITRO* ÇOĞALTIMI

Ankara Üniversitesi

Biyoteknoloji Enstitüsü

Temel Biyoteknoloji

Danışman: Prof. Dr. H. Hüseyin ATAR

Protein yönünden oldukça zengin olan *Lemna minor* L. bitkisi Türkiye’de bol miktarda bulunmakta, ekolojik olarak su kirliliğinin ortadan kaldırılmasında ve akvakültürde ortam dengesinin korunmasında çok önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada bu bitkinin Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktör ile *in vitro* çoğaltımının yapılması ve kullanılmış bitki büyüme düzenleyicilerin bitkinin protein miktarına etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Bitki farklı oranlarda BAP, kinetin ve TDZ içeren şekerli ve şekersiz sıvı MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Mikroçoğaltım için yapılan denemeler 8 saat karanlıkta ve 16 saat beyaz floresan ışığı ($150 \mu \text{ mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fotoperiyot altında ve $24\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. En fazla bitki çoğaltımı 0,2 mg/l BAP içeren şekersiz sıvı MS ortamında pH 7.23 te görülmüştür. Bu ortamda eksplant başına 50.44 adet bitki kaydedilmiştir. Ayrıca 0,05 mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamında eksplant başına düşen bitki sayısı en fazla 57,823 adet ve 0.6 mg/l TDZ içeren sıvı MS ortamında eksplant başına düşen bitki sayısı en fazla 50,74 adet hesaplanmıştır. Kjeldahl Yöntemi ile yapılan azot tayini çalışmaları sonucunda bitkinin protein değeri %25,5 olarak tespit edilmiştir. Hormon uygulaması sonucunda ise 0,5 mg/l BAP ile bitkideki protein oranının %29,18’ e çıktığı görülmüştür. Bu tezdeki çalışma amacına ulaşmış ve bitki büyüme düzenleyicilerin geçici daldırma sistem biyoreaktörleriyle çoğaltımın bitki protein miktarına olumlu yönde etkileri belirlenmiştir.

2010, 47 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *In vitro*, geçici daldırma sistem biyoreaktör, *Lemna minor* L., mikroçoğaltım.

ABSTRACT

Master Thesis

Zehra YENİCE

MICROPROPAGATION OF COMMON DUCKWEED (*Lemna Minor* L.) PLANTS USING TEMPORARY IMMERSION SYSTEM BIOREACTORS.

Ankara University
Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. H.Hüseyin
ATAR

Lemna minor L. rich in protein, found in large quantities in Turkey that help in reducing water pollution and play an important role in maintaining balance in aquaculture. This study reports role of Temporary immersion Bioreactors in micropropagation of this plant and effects of plant growth regulators on protein concentration in the plants. With this objective different variant of media with and without sucrose, varying pH and concentrations of BAP, kinetin, TDZ in medium were analyzed. These studies were carried out at 8 h dark and 16 h light photoperiod ($150 \mu \text{ mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Maximum plant regeneration was obtained using 0.2 mg/l BAP in liquid MS medium without sucrose at pH 7.23. This medium regenerated 50.44 plants per explant. At the same time liquid MS medium containing 0.05 mg/l kinetin and 0.6 mg/l TDZ regenerated 57,823 and 50,74 plants per explant respectively. Protein measurement using Kjeldahl method showed 25.5% protein in the plant that increased to 29.18% using 0.5 mg/l BAP using hormone applications. It was concluded that the aim of the study in this thesis were fulfilled and positive effects of temporary immersion system bioreactors on plant multiplication were found.

2010, 47 pages

Key words: *In vitro*, Temporary immersion system bioreactors, *Lemna minor* L, micropropagation

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, öneri ve yorumları ile çalışmamı yönlendiren ve yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. H. Hüseyin ATAR'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başladığımdan beri yanımda ve bana her konuda destek olan, yardımını esirgemeyen hayat görüşü ile beni her zaman aydınlatan ve yaşamımda doğru kararlar almamda etkili olan sayın hocam Doç. Dr. Khalid Mahmood Khawar BHATTI' ye;

Çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen Yard.Doç. Dr. Sevil SAĞLAM ' a;
Maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan, her şeyimi borçlu olduğum sevgili aileme ve hayatımın her aşamasında beni asla yalnız bırakmayan tüm dostlarıma teşekkür ederim.

ZEHRA YENİCE

ANKARA, 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1.GİRİŞ	1
1.1.Su bitkilerinin sucul ortamdaki önemleri.....	1
1.2. Tatlı Su bitkilerinin sınıflandırılması.....	2
1.3. Su bitkilerinin morfolojik ve fiziksel özellikleri.....	3
1.4. Su bitkilerinde üreme.....	3
1.4.1. Sporla üreme.....	3
1.4.2. Tomurcuklanma ile üreme.....	4
1.4.3. Generatif üreme.....	4
1.5. Akvaryum bitkileri yetiştirme teknikleri.....	5
1.6. Akvaryum bitkilerinde çoğaltım yöntemleri	6
1.7. <i>İn-vitro</i> Yöntemler.....	7
1.7.1. Doku kültür teknikleri.....	7
1.7.2.Organogenesis.....	7
1.7.3.Mikroçoğaltım.....	8
1.7.4. Embiryogenesis.....	8
1.7.5 Protoplast kültürü ve somatik melezleme.....	8
1.7.6 Haploid bitki üretimi	8
1.7.7. Meristem kültürü ve Virüssüz bitki eldesi.....	9
1.7.8. Germplazm muhafazası.....	9

1.8. Geçici Sistem Biyoreaktör Kullanımı ile Doku Kültürü.....	9
1.9. Su bitkilerinin kullanım alanları.....	11
1.9.1 Su Kirliliğinin Giderilmesinde Filtrasyon Amacıyla Kullanımı.....	11
1.9.2 Gübre ve hayvan yemi olarak kullanımı.....	11
1.9.3. Akvaryum süs bitkisi ve peyzaj amaçlı kullanımı.....	11
1.9.4. İnsan gıdası olarak kullanımı.....	12
1.9.5. Genetik mühendisliği ve biyoteknoloji alanında kullanımı.....	12
1.10. <i>Lemna minor</i> L. 'nin su bitkileri içerisindeki yeri ve önemi.....	12
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1. <i>L.minor</i> bitkisinde yürütülen çalışmalar	22
3.1.1. Bitki materyali.....	22
3.1.2.In vitro çalışmalardaki büyüme ortamları ve kültür koşulları.....	22
3.1.3.Bitki büyüme düzenleyicileri.....	22
3.1.4. Eksplant yüzey sterilizasyonu.....	22
3.1.5. Bitki için uygun pH aralığının belirlenmesi.....	23
3.1.6.Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktör ile materyalin hızlı çoğaltımı.....	23
3.1.7 Bitki materyalinden azot ve protein tayini.....	23
3.2 Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi.....	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	25
4.1. Eksplantın yüzey sterilizasyonu.....	25
4.2. Farklı pH değerlerinin çalkalamasız ortamda Erlen Meyerler içerisinde su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkisi.....	26

4.3. Farklı pH değerlerinin çalkalamalı ortamda Erlen Meyerler içerisinde su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkisi.....	28
4.4. GDS biyoreaktörlerde çoğaltım için uygun sıvı MS miktarının ayarlanması...	29
Geçici daldırma sistem biyoreaktörlerde sıvı MS ortam optimizasyonu.....	30
4.6. Farklı konsantrasyonlarda TDZ hormon uygulaması.....	31
4.7.Farklı konsantrasyonlarda BAP uygulaması.....	33
4.8. Farklı konsantrasyonlarda kinetin uygulaması.....	35
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	38
5.1. <i>L.minor</i> Bitkisinde Yürütülen Çalışmalar.....	38
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	<i>Lemna</i> türleri için en iyi gelişim şartları ve tolerans sınırları.....	13
Çizelge 1.2.	Bazı bitkilerde bulunan protein miktarı.....	14
Çizelge 4.1	Farklı süre ve konsantrasyonlardaki çamaşır suyu ve H ₂ O ₂ ile yapılan yüzey sterilizasyona ait varyans analizi.....	25
Çizelge 4.2	Farklı süre ve konsantrasyonlardaki çamaşır suyu ve H ₂ O ₂ ile yapılan yüzey sterilizasyona ait Duncan testi sonuçları.....	25
Çizelge 4.3.	Farklı pH değerlerinin distile su kullanılarak çalkalamasız ortamda Erlenmeyerler içerisinde su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkisine ait varyans analizi.....	27
Çizelge 4.4.	Farklı pH değerlerinin çalkalamalı ortamda Erlenmeyerler içerisinde su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkisine ait Duncan testi sonuçları.....	27
Çizelge 4.5.	Farklı pH değerlerinin çalkalamalı ortamda Erlenmeyerler içerisinde su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkisine ait varyans analizi.....	28
Çizelge 4.6.	Farklı pH değerlerinin çalkalamalı ortamda Erlenmeyerler içerisinde su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkisine ait Duncan testi sonuçları.....	28
Çizelge 4.7.	Farklı MS sıvı kültür ortamlarının su mercimeğinin bitki oluşumu etkilerine ait varyans analizi.....	30
Çizelge 4.8.	Farklı MS sıvı kültür ortamlarının su mercimeğinin bitki oluşumu etkilerine ait Duncan testi sonuçları ..	30
Çizelge 4.9.	Farklı konsantrasyonlardaki TDZ hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkilerine ait varyans analizi	31
Çizelge 4.10.	Sıvı kültür MS ortamına farklı konsantrasyonlardaki TDZ hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkilerine ait Duncan testi sonuçları.....	32
Çizelge 4.11.	Farklı konsantrasyonlardaki BAP hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkilerine ait varyans analizi	33
Çizelge 4.12.	Sıvı Kültür MS ortamına farklı konsantrasyonlardaki BAP hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkilerine ait Duncan testi sonuçları.....	34
Çizelge 4.13.	Farklı konsantrasyonlardaki kinetin hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkilerine ait varyans analizi.....	36

Çizelge 4.14.	Sıvı kültür MS ortamına farklı konsantrasyonlardaki kinetin hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkilerine ait Duncan testi sonuçları.....	36
---------------	---	----

SİMGELER DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simge ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
µg	Mikrogram
ABA	Absisik asit
BA	Benzil adenin
BAP	6 Benzilaminopurin
cm, mm	Santimetre, Milimetre
ÇS	Çamaşır suyu
dk	Dakika
G	Gram
GA ₃	Giberellik asit
GDS	Geçici daldırma sistem
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorikasit
IAA	İndol asetik asit
IBA	İndol 3 butirik asit
KIN	Kinetin
l, µl	Litre, mikro litre
Mg	Miligram
ml	mili litre
MS	Murashige and Skoog bazal ortamı
N	Normal
NAA	Naftalin asetik asit
NaOCl	Sodyum hipoklorit
NaOCl	Sodyum hipoklorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NH ₃	Amonyak
NH ₄	Amonyum
ppm	Plant preservation mixture (Bitki koruma karışımı)
rpm	Dakikada devrim
SD	Serbestlik derecesi
sn	Saniye
TDZ	Thidiazuron (1 Phenyl 3-(1,2,3-thidiazol 5yL) urea)
VK	Varyasyon kaynakları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Akuatik bitkilerde üremenin şematik gösterimi.....	3
Şekil 1.2.	Geçici Daldırma Sistem Biyorektörün şematik görünümü	10
Şekil 1.3	Bazı <i>Lemna</i> türleri: (A) <i>L. minor</i> , (B) <i>L. gibba</i> , (C) <i>L. trisulca</i> , (D) <i>Spirodella polyrhiza</i>	10 13
Şekil 1.4	<i>L. minor</i> 'ün Türkiye'deki yayılış alanları (Saygıdeğer 1996, değiştirilerek).....	14
Şekil 4.1	<i>L.minor</i> bitkisinin yüzey sterilizasyonu. (a) %20 çamaşır suyu ve uygulanan tüm dk sürelerde bitkilerin klorofil parçalanması sonucunda meydana gelen beyazlaşma. (b) %20 H ₂ O ₂ 9 dk muamelesi ile elde edilen kısmen yeşil steril bitkiler. (c) %10 H ₂ O ₂ ve uygulanan tüm dk sürelerde bitkilerde meydana gelen bulaşıklık. (d) %20 H ₂ O ₂ 8 dk muamelesi ile elde edilen steril bitkiler.....	27
Şekil 4.2	Sıvı kültür MS ortamına farklı konsantrasyonlardak TDZ hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkileri (a) 0.1 mg/l TDZ (b) 0.2 mg/l TDZ (c) 0.3 mg/l TDZ (d) 0.4 mg/l TDZ (e) 0.5 mg/l TDZ içeren ve (f) 0.6 mg/l TDZ içeren sıvı MS ortamda bitki çoğaltımı.....	34
Şekil 4.3	Sıvı kültür MS ortamına farklı konsantrasyonlardaki BAP hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkileri (a) 0.1 mg/l BAP (b) 0.2 mg/l BAP (c) 0.3 mg/l BAP (d) 0.4 mg/l BAP (e) 0.5 mg/l BAP içeren ve (f) 0.6 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamda bitki çoğaltımı.....	36
Şekil 4.4	Sıvı kültür MS ortamına farklı konsantrasyonlardaki kinetin hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkileri (a) 0.05 mg/l kinetin (b) 0.15 mg/l (c) 0.1 mg/l kinetin (d) 0.2 mg/l kinetin çaltımı (e) 0.5 mg/l kinetin (f) 0.6 mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamda bitki çoğaltımı.....	38

1.GİRİŞ:

Akvatik ortamın asıl üreticileri olan su bitkileri bir hücreliden çok hücreliye kadar çeşitli şekilleri olan ve klorofil içeren canlılardır. Birincil üreticiler olan bu bitkiler suda bulunan karbondioksiti ve ışık enerjisini kullanarak fotosentez yapmaktadır ve sucul ortamın besin zincirinin ilk halkası olarak bitkisel kaynakları oluşturmaktadırlar (Cirik vd 2000, Ozturk 2008).

1.1 Su Bitkilerinin Sucul Ortamdaki Önemleri

Sucul bitkiler taşıdıkları klorofil sayesinde fotosentez olayı ile organik madde üretmektedirler. Fotosentez aktivitesi ile suyun oksijenazyonunu da sağlamaktadır. Su kirliliğinin biyolojik yöntemlerle saptanmasında belirleyicilerdir.

Sucul ekosistemde organik parçalanma biyolojik döngü açısından önem taşımaktadırlar. Organik parçalanma olayından aerob bakteri ve mantarlar için gerekli olan oksijen temini su bitkileri tarafından sağlanmakta ve dolaylı olarak da bitkiler, organik atıkların parçalanması açısından akvatik ortamda önem taşımaktadırlar (Dalay vd 2001).

Su bitkileri aynı zamanda patojen bakterilerin ortamdan uzaklaştırılmalarında rol oynamaktadırlar. Patojen bakteriler bilindiği gibi asidik ortamı tercih etmekte ve bitkisel organizmalar ise ortamı bazikleştirdiği için bakterilerin uzaklaşmasını sağlamaktadır.

Sanayi atık sularında geniş bir büyüme potansiyeline sahip olup ve indikatör bitkiler olmasından ötürü fitoremediasyon ve biyoakümülyasyon amaçlı kullanılmaktadır (Wang ve Freemark 1995, Jain vd 1990, Hammouda vd 1995). Su bitkileri ortamın kimyasal yapısını da etkilemektedir. Örneğin su bitkilerinin suyun sertliğinin azalmasına neden olması gibi elodea ve benzeri bazı su bitkileri sudaki kireci alarak suyu yumuşatmaktadırlar. Bu sayede sert sulara toleransı olmayan su canlıları için uygun ortam oluşturmaktadır. Bu bitkiler suda eriyik halde olan karbonatın çökmesine neden olarak suyun sertliğini azaltmaktadırlar.

Sucul ortamdaki bitkisel organizmalar güneş ışığının ulaşabildiği kıyılarda ve derinliğin az olduğu kısımlarda daha yoğun bulunmaktadır. Makrofitler özellikle kıyı zonunda dağılım göstermektedir. Bu yöreler balık ve diğer canlıların üreme alanlarını oluşturmaktadır. Sazan gibi çoğu balık yumurtalarını bitkilerin üzerine bırakmayı tercih eder ve yumurtadan çıkan lavralar için bitkiler korunma ve beslenme alanıdır. Bitkiler herbivor balıkların gidasını oluşturmaktadır.

Su bitkileri akvatik tabanı da etkilemektedirler ve büyüyen kök ve gövdelerin yardımıyla dalgaların su tabanına olan etkisini yok ederek taban materyalinin sürüklenmesini önlemekte ve birçok bentik canlının yapışma alanını da oluşturmaktadırlar.

1.2 Tatlı Su Bitkilerinin Sınıflandırılması

Tatlı su bitkileri yaşam alanlarına göre 3 gruba ayrılmaktadır.

Hidrofit topluluklar: Tamamen sucul ortamlara adapte olmuş bitkilerdir. Bitkinin kök gövde ve yaprakları tamamıyla su içersinde gömülü halde bulunmaktadır. Genelde akarsularda ve durgun sularda yaşayan bitki topluluklarıdır. Akarsularda yaşayanlara örnek olarak *Ranunculus* ve *Fontinalis* türlerini verebiliriz. *Potamogeton*, *Sagittaria*, *Elodea*, *Nymphaea* vb türleri ise durgun sularda yaşayan hidrofitlerdir.

Amfibi topluluk: Tamamı su içersinde olmayan bitki topluluklarıdır. Özellikle kurak periyotlarda bitkinin bir kısmı su dışında kalır. Göller ve sulak alanlarda kıyı zonunda, menderes oluşumu görülen akarsuların kenarlarında rastlanmaktadır. *Alisma*, *Equisetum*, *Juncus* vb. türleri kıyı ve bataklıklarda yaşayan amfibiklerdir. *Polygonum* vb.türleri ise alüvyonlu toprakları tercih eden bitki topluluklarıdır.

Helofit topluluk: Islak ve nemli ortamlarda yaşamaya adapte olmuş bitki toplulukları olup geniş alanları kaplamaktadırlar ve bataklıklarda baskın olarak bulunmaktadır. *Phragmites*, *Scirpus*, *Typha* vb. türleri bu topluluğun bitkilerine örnek olarak verilebilmektedir.

1.3 Su Bitkilerinin Morfolojik ve Fiziksel Özellikleri

Sucul bitkiler karada yaşayanlar ile karşılaştırıldığında çeşitli sitolojik, morfolojik ve anatomik farklılıklar göstermektedir. Ayrıca bu bitkilerin üreme şekilleri ve tiplerinin de değiştiği görülmekte ve aynı türde farklılaşmalara rastlanmaktadır. Örneğin bitkinin su seviyesine göre içinde veya dışında kalan kısımlarında farklı tipte yaprak ve çiçek görülmekte ve su seviyesinin değişimleri bitkide morfolojik değişimlere neden olmaktadır. Bu nedenle bitkiyi tanımak zorlaşmaktadır (Cirik vd 2001).

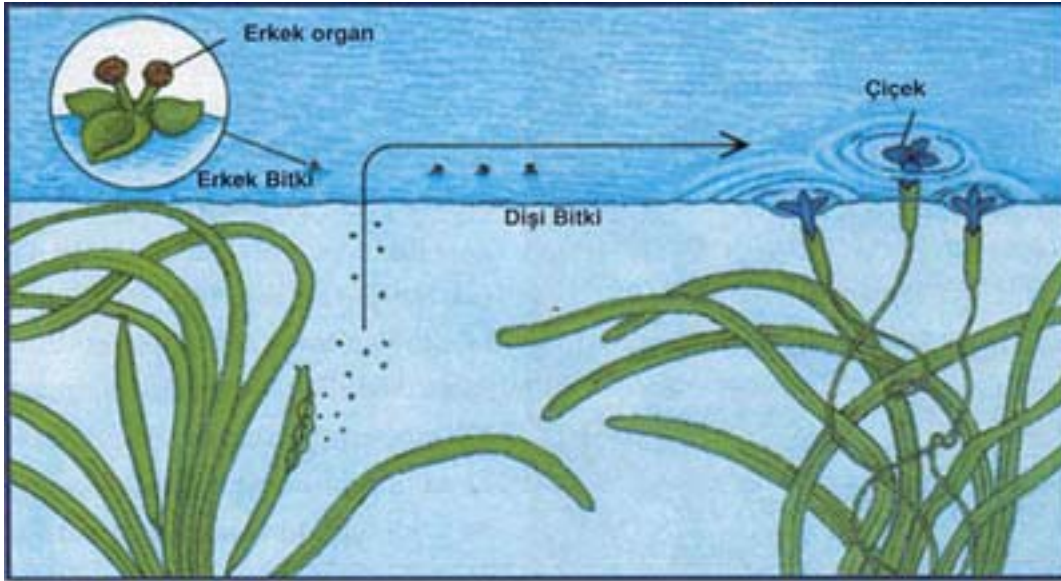
Çeşitli su bitki türleri ile yaşadıkları sucul ortam arasında doğrudan ilişki bulunmaktadır. Örneğin *Myriophyllaceae* familyası üyeleri suya tamamen gömülmüş halde yaşadıkları halde su mercimekleri (*Lemna* türleri) suyun üzerinde kalmaktadırlar. Nilüferler (*Nymphaea* türleri) ise bir yandan rizom gövde ve kökleri ile çamura tutunmakta, geniş yaprakları ise su yüzeyinde yüzmektedir. Su bitkileri yaşadıkları ortama uyabilmek için bazı morfolojik değişiklikler geçirmektedirler. Kök, gövde veya yapraklar bazen ince lam veya iplik şekline

dönüşebilmekte ve çiçekler çok küçük olup yalnızca bir tek üreme organı içermektedir. İletim kanalları karadaki çiçekli bitkilere oranla azalmış olup daha az farklılaşma göstermektedir.

1.4. Su Bitkilerinde Üreme

Sucul bitkiler çiçeklenme ve döllenme yönünden gerçekten farklılaşmalar göstermektedir. Döllenme suda olmakta ve polenler bu ortamdaki yayılmaya adapte olmaktadır. Polen su içinde serbest hale geçerek, dişi çiçeğin stigmatını bulana kadar su içinde gezinmektedir. Döllenmeden sonra meyve oluşumu su içinde oluşmaktadır. Çiçekleri havada olan su bitkilerinde dahi genellikle meyve su içinde gelişmektedir. Meyveyi taşıyan dalcıklar eğilerek genç meyveyi su içine yönleltmektedir. Sucul meyveler etlidir, tohumları jelleşme oluşumu ile açılmaktadır. Tohumlar su içinde veya üstünde yüzmektedirler.

Generatif üreme her ne kadar bitkisel türlerin çeşitliliğinde önemli ise de eşeysiz (Vejetatif) üreme su bitkilerinde önemli rol oynamaktadır. Bazı türlerin vejetatif olarak üremesi ile aşırı çoğalması genellikle insan aktivitesi sonucu ortamda değişimler olduğunu simgelemektedir. Su bitkilerinde üreme spor, tomurcuklanma ve generatif olmak üzere üç şekilde gerçekleşmektedir (Şekil 1.1- Cirik vd 2001).



Şekil 1.1: Akuatik bitkilerde üremenin şematik gösterimi (Cirik vd, 2001)

1.4.1 Sporla Üreme

Bu üremede bitkiden gelişerek yeni bitkileri verme yeteneğinde olan eşeysiz hücreler görev almaktadır ve bu hücreler spor olarak adlandırılmaktadırlar.

Ekzosporeler ile üreme: Alg ve mantarlarda görülen üreme şeklidir.

Endosporeler ile üreme: Ana bitkide ve bir vücut hücresinin protoplastının parçalara ayrılıp ana çeperden kaçmasıyla ya da özelleşmiş ve sporangium adını alan hücrelerin içinde oluşan sporelerdir.

1.4.2 Tomurcuklanma ile Üreme

Bu üreme tipinde özel üreme hücreleri yoktur. Basit hücre bölümleri veya ana hücreden ayrılan bağımsız bireyler halinde gelişebilen vejetatif yapılarla görülen üreme tipidir ve üç farklı şekilde gerçekleşmektedir.

İkiye bölünme yolu ile üreme: Diatome türleri

Çok hücreye bölünme şeklindeki vejetatif üreme: Thallophyta'nın çeşitli guruplarında rastlanmaktadır.

Tomurcuklanma yoluyla üreme: Ana hücreden boğumlar oluşarak yeni bireylerin meydana geldiği üreme tipi olarak tanımlanmaktadır.

Üretken (Gemma) kısımların oluşumu yoluyla üreme: Ciğer otları ve karayosunlarında görülen üreme tipi olarak tanımlanmaktadır.

Soğancık(Bulbül) denilen kısımları ile üreme: Tohumlu bitkilerde görülmektedir.

Rizom oluşumu ile üreme: Rizom bir gövde metamorfozudur. Bu yolla bitki çoğalır. Çiçekli bitki guruplarında rastlanmaktadır.

Soğan ile üreme: Soğan bir gövde ve yaprak metamorfozudur. Daha çok çenekliler olmak üzere soğanlı bitki guruplarında görülmektedir.

1.4.3 Generatif Üreme

Aynı veya iki farklı bireyden oluşan, eşey bakımından farklı iki üreme hücresi veya çekirdeğinin birleşip gelişmesi ile olan üreme çeşididir. Eşeyli üremede birleşen üreme hücrelerine gamet, birleşmeye döllenme, oluşan hücre ya da çekirdeğe de zigot, gametleri meydana getiren fertlere ise gametofit denmektedir. Eşeyli üreme farklı bitki guruplarında çeşitlilik göstermektedir (Cirik vd 2001).

Autogami: Bir ana hücrenin protoplastından oluşan gametler hücre içinde gelişmektedir ve bu üreme türüne diyatomelerde rastlanmaktadır.

İzogami: Birleşen gametler şekil ve büyüklük bakımından benzer fakat fizyolojik olarak birbirinden ayrılmaktadırlar.

1.5 Akvaryum Bitkileri Yetiştirme Teknikleri

Akvaryum bitkilerinin yetiştirme tekniklerinin başında eşeysel üretim gelmektedir. Vejetatif yolla ürememiş bir bitkinin çiçeğindeki polenler, bir fırça ile diğer bitkinin çiçeğine taşınabilmektedir. Tohumların çimlendirilmesi yoluyla da üretim yapılabilmektedir. Bu yöntem daha çok vejetatif üretimlerinde sorun bulunan bitkilerde uygulanmaktadır. Diğer bir üretim şekli ise eşeysiz üretim şeklinde gerçekleştirilmektedir. Bunun için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bitkide oluşan küçük filizler kesilerek tepe kısmı yukarıya gelecek şekilde toprağa dikilir ve yeni bitkiler elde edilmektedir. Bazı bitkilerde rizom yeni bir yavru bitki oluşturmaktadır. Yavru zamanla sürgün verir ve yeni bir bitki meydana getirmektedir. Bu bitkiler birbirinden ayrılarak yeni bitki elde edilebilmektedir.

Bazı türlerde de bitkinin çiçek sapında köklü yavru bir bitki oluşturmaktadır. Diğer bir yöntemde, büyüme rizomu bulunan bitkilerin rizomlarının küçük parçalar şeklinde kesilip su bulunan bir kaba yerleştirilmesi ve yeni bitkilerin elde edilmesidir. Bazı bitkilerde de yeni bitki elde etmek için yapraklar kullanılmaktadır. Kullanılan yöntemlerden biri de, ana bitkinin kesilerek üretimidir. Boğum bölgesi bulunan bitkilerde boğum bölgesinden kesim yapılarak toprağa dikilir ve yeni bireyler elde edilmektedir (Cirik vd 2001). Uygulanan tekniklerin yanı sıra akvaryum havalandırmasının ve ışık seviyesinin yeterli olması ve ısının sabitlenmesi en önemli etkenler arasında bulunmaktadır. Bitkilerin çürüyüp kopmaları, akvaryumda büyük bir kirliliğe yol açtığı için vakum ve benzeri aletler ile tabanın temizlenmesi de gerekmektedir.

Akvaryuma ilk getirdiğinde sağlıklı olan bitkiler bir süre sonra solmaya başlayabilir bu yüzden akvaryum dengesi bitkiler için uygun hale getirildikten sonra bitkiler dikilmelidir. Diğer bitkilerin havasız kalmasını engellemek için ölü yaprakları kesilir ve fazla uzayanlar da budanmaktadır.

Karadaki benzerleri gibi su bitkilerinin de azot, fosfor ve potasyum gibi gereksinimleri vardır. Bunların çoğunu sudan almakta ve bazı bitkiler ise sadece kökleri sayesinde beslenmektedirler.

Bitkiler fotosenteze yardımcı olan klorofili üretmek için demire ihtiyaç duymaktadırlar. Bakır ve çinko gibi diğer elementler ise pek çok önemli metabolik süreçte vazgeçilmez bir rol oynamaktadırlar.

Karbondiyoksit, bitkilerin büyümesini sağlamaktadır. Karbondiyoksit dozaj sisteminin amacı, karbondiyoksiti 5–12 miligram/litre seviyesinde tutmaktadırlar. Işık, her 4,55 litre'ye 3–5 watt

hızlı bir büyüme sağlar 12–16 saatlik bir ışıklandırma büyüme hızlandırır da bazı bitkiler düşük seviyede ışıklandırma istemektedir.

Isı, bitkiler için önemli taşımaktadır. Tropikal bölgelerde yetişen su bitkileri için ortalama sıcaklık seviyesi 24°C civarındadır. Bazı bitki türleri az ışıkla yetinebilirken, hatta bazen az ışığı tercih ederlerken, bazıları çok ışık gerekmektedir. Bunlar genellikle hızlı büyüyen bitkilerdir. Büyüme hızıyla orantılı olarak daha çok karbondioksit ve diğer bitki besinlerine ihtiyaç duymaktadırlar. Buna karşılık daha çok da oksijen üretmektedirler.

1.6 Akvaryum Bitkilerinde Çoğaltım Yöntemleri

Akvaryum bitkilerini çoğaltım yöntemleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

Geleneksel yöntemlerle çoğaltım

Vejetatif çoğaltım: Bitkinin herhangi bir vejetatif organından alınan örnek kalem, yaprak vb. den çoğaltım yapılmaktadır. Su bitkisi çoğaltımında bu yöntem çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Vejetatif çoğaltım kolay, ucuz ve özel eğitim gerektirmeyen yöntemlerden biridir.

Generatif çoğaltım: Bitki üzerinde gelişen tohum ya da spor kullanılmaktadır. Bu yöntem geleneksel olarak kullanılmaktadır. Örneğin Nilüfer, *Samolus* ve *Cyperus* bitkilerinde tercih edilen geleneksel bir yöntemdir.

Biyoteknolojik yöntemlerle çoğaltım

Mikroçoğaltım ve Doku Kültürü Yöntemleriyle Çoğaltım: *In-vitro* olarak laboratuvar koşullarında bitkilerin üretilmesidir. Kullanılan eksplantlar koltukaltı meristemi, yaprak, petiol, hipokotildir.

Türkiye’de son yirmi beş yıldan beri su ürünleri eğitimi ile birlikte su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli gelişmeler kaydedilmiş ve üretim artmış, ancak su bitkileri konusunda yeterince gelişme sağlanmamış olup su bitkilerinin yoğun üretimine yönelik çalışmalar bulunmamaktadır. Üretim daha çok amatörce ve düşük miktarlarda yapılmaktaydı bu nedenle yapılan çalışmalar dâhilinde kısa zamanda daha verimli ve kontrollü üretimin yapıldığı farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en önemlisi *in-vitro* üretimdir. Doku kültürü tekniklerini kullanarak yapılan çoğaltım (mikro üretim) günümüzde, dünyada özellikle süs bitkilerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.7 In vitro Yöntemler

1.7.1. Doku kültür teknikleri

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyans oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetik iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır(Babaoğlu vd 2001). Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonu yani bitkinin hücre, doku ve organlarından klonlanmasıdır.

Bitki doku kültürleri tekniğinin esasları başlıca üç ana kısımdan oluşmaktadır:

1. Kültürün gelişmesi için gerekli organik ve inorganik maddeleri içeren steril bir gıda ortamının hazırlanması,
2. Bakteri, mantar veya her ikisini taşıyan ve kültüre alınacak bitki parçasının (eksplant) orijini oluşturulan ana materyalin dezenfekte edilmesi,
3. Orijin bitkiden istenen eksplantın (meristem, anter, embriyo, yaprak ucu vb.) alınarak steril gıda ortamına, steril şartlarda konulması ve gelişmesi için uygun çevre şartlarına yerleştirilmesidir (Gönülşen 1987) .

Bitki doku kültürü çalışmalarının kullanım amaçlarına göre birbirinden ayrılan değişik uygulamaları vardır. Bunlar aşağıdaki gibi sıralanmaktadır.

1.7.2 Organogenesis:

Organogenesis, hücre ve dokulara baskı uygulayıp bazı değişikliklere sebep olunarak sürgün veya kök primordiyumu (taslağı) diye isimlendirilen tek kutuplu ve vasküler sistemi kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının meydana gelmesine yol açan bir işlem olarak tanımlanmaktadır(Gürel ve Türker 2001). Bu uygulamalar sonunda doğrudan adventif sürgün ve kök oluşumu gerçekleşiyorsa direkt, kallus meydana geldikten sonra meristematik bir merkez ve ardından sürgün ya da kök geliyorsa indirekt organogenesis olarak adlandırılmaktadır.

1.7.3 Mikroçoğaltım

Organize meristemlerden, henüz olgunlaşmamış veya olgunlaşmasını tamamlamış somatik hücrelerden direkt (organogenesis veya somatik embriyogenesis) veya indirekt (kallus, protoplast vb.) yollarla bitkilerin çoğaltılması ve köklendirilmesi işlemine genel olarak mikroçoğaltım denilmektedir (Brown ve Thorpe, 1995). Mikroçoğaltım bitkilerin ihtiyacı olan uygun besin maddeleri, hormon ve kültür istekleri doğrultusunda gerçekleştirilirse, doku kültür teknikleri içerisinde çoğaltım amacıyla yapılan uygulamalarda en avantajlı yöntemler arasında olarak kabul edilmektedir. Bu teknik sayesinde hastalısız bitki elde etmek mümkündür. Somaklonal varyasyondan dolayı çeşitlilik artmaktadır ayrıca üretim diğer tekniklere göre daha kısa sürede ve daha az anaç bitki kullanılarak gerçekleştirilmektedir (babaoğlu 2002).

1.7.4 Embriyogenesis

In-vitro kültür şartlarını ve özellikle de bitki büyüme düzenleyicilerini ayarlayarak bir bitkinin herhangi bir somatik hücre, doku veya organından embriyo elde edilmesi yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Somatik ve zigotik embriyogenesis olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilmekte ve somatik embriyolardan elde edilen bitkiler genetik olarak klon oluşturmaktadırlar(Bournman 1994).

1.7.5 Protoplast Kültürü ve Somatik Melezleme

Protoplast hibridizasyonu veya somatik melezleme, pre-zigotik eşeysel uyumsuzluklar nedeniyle, klasik melezleme ile elde edilemeyen hibritlerin elde edilmesinde kimyasal ve fiziksel metotlar kullanılarak uygulanan bir tekniktir.

1.7.6 Haploid Bitki Üretimi

Mayoz bölünme geçirmiş haploid sayıda kromozoma sahip hücrelerde (polen/mikrospor veya megaspor) veya bu hücreleri ihtiva eden bitki kısımlarının (anter veya yumurtalık) doku kültürü yoluyla elde edilen hücrelerinde veya rejenerantlarında yapılan kromozom katlanması sonucu %100 homozigot bitkiler elde edilebilmektedir. Bu tekniğe *in -vitro* haploidi tekniği denmektedir(Maheswari vd, 1995). Anter kültürü, mikrospor kültürü ve ovaryum kültürü olmak üzere üç şekilde tekniğin uygulanması gerçekleştirilmektedir.

Anter kültürü

Mikrospor bulunduran anterlerin tomurcuklarından ayrılıp *in-vitro* olarak haploid embriyoların elde edilmesi işlemidir.

Mikrospor kültürü

Anterden izole edilen mikrosporların *in-vitro* koşullarda hazırlanmış özel besin ortamlarında geliştirilip, haploid embriyoların elde edilmesi işlemidir.

Ovül ve ovaryum kültürü

Döllenmiş yumurta hücrelerinin kültüre alınması ile haploid embriyoların oluşturulması uygulamasıdır.

1.7. 7. Meristem Kültürü ve Virüssüz Bitki Eldesi

Tüm apikal meristem veya buradan alınan küçük embriyonik parçalar kültüre alınarak uygulanan tekniğe meristem kültürü denmektedir. Bu metotla üretilen bitkiler genotipik ve fenotipik olarak birbirine benzemektedir.

Apikal ve kök meristemlerinin *in-vitro* koşullarda kültüre alınması ile gerçekleştirilen yöntemdir. Bu yöntem, virüsten tamamen arındırılmış bitkiler elde edilmesini mümkün kılmaktadır. *İn-vitro* klonal çoğaltım ile en yüksek genetik kararlılığı elde etmek mümkündür. Ayrıca karantina uygulamalarına göre uluslararası taşımada çoğunlukla kabul edilen kültürlerden olması bu tekniğin tercih edilmesinde önemli bir avantaj sağlamaktadır (Babaoğlu 2002).

1.7.8 Germplazm Muhafazası

Genetik materyalin sıvı azot içerisinde çok düşük sıcaklıklara kadar kademeli olarak ısının düşürülmesi ile uzun süreli muhafaza edilebilmesine olanak sağlayan tekniktir (Brown ve Thorpe, 1995).

1.8. Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktör Kullanımı ile Doku Kültürü

Uygulanan doku kültürü tekniklerinde genellikle katı besin ortamları kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda katı besin ortamına yerleştirilen eksplantlar, besin ortamının katılaşmasını sağlayan jelleştirici ajanların varlığından ötürü kararmaya başlar ve bu nedenle periyodik olarak 4–6 haftadan sonra yeni ortamlara aktarılmaktadır (Kito,1997). Bu aktarımlar sırasında materyalde kontaminasyon görülme olasılığı çok yüksektir. Jelleştirici ajanların kullanıldığı katı besin ortamlarında mikroçoğaltım çalışmaları, sıvı besin ortamında yapılan doku kültür çalışmaları ile kıyaslandığında kontaminasyon riski daha yüksek ve daha maliyetli uygulamalardır (Etienne ve Berthouly 2005). Bu nedenle özellikle ticari amaçlı mikroçoğaltım için katılaştırıcı ajanların kullanılmadığı sıvı kültür ortamları tercih edilmektedir. Sıvı kültür ortamlarında bitki eksplantlarının tüm yüzeyi ortamlarla temas

ettiğinden besin ortamındaki bileşenleri daha iyi absorbe etmektedirler. Sıvı kültür ortamlarında kullanılan biyoreaktörlerin mikroçaoğaltım çalışmalarında kullanımı da bu nedenle artmaktadır (Aitken ve Davies,1988). Sıvı kültür ortamlarının kullanıldığı biyoreaktör sistemlerinde en çok karşılaşılan problem ise bitki materyalinin sürekli besin ortamında kalmasından kaynaklanan hiperhidrisiti olayının gözlemlenmesidir. Bu nedenle son zamanlarda geliştirilen ve bitkinin belirli aralıklarla sıvı yüzeyden uzaklaşmasını mümkün kılan geçici daldırma sistem biyoreaktörler (Şekil1.2) kullanılmaktadır.



Şekil 1.2 Geçici daldırma sistem biyoreaktörün şematik görünümü

Geçici daldırma sistem biyoreaktörler ilk olarak Haris ve Mason (1983) tarafından geliştirilmiş olup ilk başarılı bitki rejanrasyonu sonuçları *Solonum tuberosum* ve *Coffee arabicanı* ‘nın somatik embriyolarından elde edilmiştir (Etienne and Berthouly, 2002).

Geçici daldırma sistem biyoreaktörlerin doku kültür tekniklerinin uygulama alanlarındaki avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir.

a)Üretim harcamalarında masraflarda azalmaya neden olur, ekonomiktir.

b)Ticari kitlesel üretime olanak sağladığı için zaman ve mekan yönünden avantaj sağlar.

c)Bu yöntemde katılaştırıcı madde olarak agar vd kullanılmamaktadır, bu nedenle katılaştırıcı maddelerle ilgili oluşabilecek sorunlara rastlanmamaktadır.

Geçici daldırma sistem biyoreaktörlerde diğer biyoreaktör sistemlerinden farklı olarak eksplantla sıvı besin ortamının arasında zaman zaman geçici temas sağlayabilen bir yüzey geliştirilmiştir. Hava akımı ile ortam belirli zaman aralıklarında yukarı doğru çıkarak bitkinin gerekli besin maddeleri almasını sağlamaktadır. Daldırma işlemi süresince hava akımı ve besin ortamı bitkiye nüfuz ederek materyale zarar vermeden dokulara geçmektedir. Geçici daldırma sistem biyoreaktörler bu amaçla somatik embriyogenesisiz ve organogenesisiz için uygun sistemler olarak kullanılmaktadır.

1.9 Su Bitkilerinin Kullanım Alanları

1.9.1 Su kirliliğinin giderilmesinde filtrasyon amacıyla kullanımı

Doğal sularda çeşitli etmenlerle kirlenmenin giderilmesinde bitkilerin kullanılması çalışması son yıllarda giderek artmaktadır (Wang ve Freemark 1995). Endüstriyel atıklarla kirlenen sularda ağır metallerin uzaklaştırılmasında su bitkilerinden faydalanılmaktadır. Petrol ve türevlerinin doğal sular için tehdit oluşturduğu bilinmektedir. Petrol hidrokarbon kaynaklı kirliliğin ortadan kaldırılmasında su bitkilerinin filtrasyon amacıyla kullanılmasının daha ekonomik ve daha etkili sonuçları olduğu tespit edilmektedir. Özellikle *Lemnaceae* türleri biyolojik filtrasyon amaçlı kullanılan bitkilerin başında gelmektedir.

1.9.2 Gübre ve hayvan yemi olarak kullanımı

Kümes hayvanları, küçük ve büyük baş hayvanlar için yem ve gübre kaynağı olarak akuatik bitkiler kullanılmaktadır. Kimyasal yapılarından ötürü gübre olarak kullanımları uygundur. Bu bitkiler özellikle *Lemna* türünde; protein miktarının çok yüksek olmasından ötürü iyi bir gübre ve yem kaynağı olmaktadır. Akvaryum balıklarında büyüme ve gelişme üzerine olumlu etkileri yapılan çalışmalarla saptanmıştır. İçerdiği protein miktarından ötürü akuakültürde balık yemleri ile birlikte kullanıldığında balık gelişiminde ve büyümesinde önemli etkilere sahip olmaktadır. Ayrıca içerdiği azot nedeniyle gübre olarak değerlendirilebilen yenilenebilir bir kaynaktır. Kümes hayvanlarında, domuzlarda ve büyük baş hayvanlarda besin kaynağı olarak kullanımı da önemli bir yere sahip olmaktadır (Haustein vd 1990, Lenge 1990, Hang 1997).

1.9.3. Akvaryum süs bitkisi ve peyzaj amaçlı kullanımı

Yaygın olarak kullanım alanı akvaryumlardır. Akvaryumlarda süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Son yıllarda bu alandaki çalışmalar ve ilgi oldukça artmıştır. Ayrıca park bahçe düzenlenmelerinde nilüfer gibi su bitkilerinin yeri vazgeçilmezdir.

Akvaryum bitkileri güzel görünümünün yanı sıra akvaryum ekosistemi için oldukça önem taşımaktadır. Akvaryumda oluşan azotlu atıkların filtrasyon ile uzaklaştırılmasında ve akvaryum için fotosentez ile oksijen oluşturulmasında su bitkilerinin önemi çok büyüktür. Diğer yandan, akvaryum bitkileri küçük balık ve yavruların saklanabileceği bir ortam oluşturmaktadır (Alpbaz 1984).

1.9.4 İnsan gıdası olarak kullanımı

Güney Asya'da su kestanenin yetiştiriciliği yapılmaktadır. Çin'de su kestanesine benzer emergent bir tür olan *Eleocharis dulcis* sulak alanlarda, genelde pirinçle dönüşümlü olarak yetiştirilmektedir. Diğer su kestaneleri de (*Trapa natans*) Akdeniz bölgesinde yetiştirilmektedir. *T. natans*'ın tuhaf ve dikenimsi meyvelerinin içinde büyük, etli tohumları bulunmaktadır. Bunlar da yenilmekte, bu sebeple yetiştiriciliği ve ticari olarak dağıtımı yapılmaktadır. Dünyanın farklı bölgelerinde çeşitli sucul bitkilerin taze yaprakları tüketilmektedir. ABD'de düzenli olarak tüketilen ve salatalarda kullanılan sucul bitkilerin birisi de su teresidir. Su teresinin hem yetiştiriciliği yapılmakta, hem de doğadan fazla miktarlarda toplanmaktadır.

1.9.5 Genetik mühendisliği ve biyoteknoloji alanında kullanımı

Günümüzde su bitkilerinin proteomik ve genomik araştırmalarda kullanımı giderek artmaktadır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda birçok türün gen haritası çıkarılarak tüm genomu saptanmaktadır. Kara bitkileri ile olan filogenetik akrabalık dereceleri ise araştırmacılar için önemli sonuçlar çıkmaktadır. Özellikle basit yapılı *Lemna* türlerinin genom haritasının 2009 yılında tamamlanması ile ileride yapılacak olan çalışmalar için aydınlatıcı nitelikte bildirilmiştir (Mardonov vd, 2008).

1.9.10 *Lemna minor* L. 'nin Su Bitkileri İçerisindeki Yeri ve Önemi

L. minor *Arales* takımının *Lemnaceae* familyasında yer alan, serbest yüzen veya su içine batık durumda bulunan çok küçük basit yapılı akuatik bitkidir (Güner 1985). *Lemna* türleri dünyanın her yerinde yerleşim göstermesine karşın yurdumuzda yer alan tür çoğunlukla *L. minor* ve *L. gibba*'dır (Davis 1984). Şekil 1.3'de *Lemna* türlerinin bazıları gösterilmektedir.



Şekil 1.3: Bazı *Lemna* türleri: (A) *L. minor*, (B) *L. gibba*, (C) *L. trisulca*, (D) *Spirodella polyrhiza* (Davis,1984).

Monoik bitkiler olup nadiren dioik olarak bulunmaktadırlar. Farklılaşmamış frond (tallus) bulunduran bitki, basit yapılı kök sistemi içermektedirler. Kök sisteminin esas görevi bitkinin üst kısmını yukarı doğru tutmaktır. Çiçek durulman bir dişi ve iki erkek çiçekten ibaret olup, çıplak ya da bir kın ile çevrilmiştir (Haslam vd 1975). Vejetatif üremeleri yaprakçıkların köke "bağlandığı yere yakın olan en dar kısmının iki yanında bulunan iki cepten tomurcuklanması ile gerçekleşmektedir. Her yaprakçık çok sayıda dişi tomurcuk üretebilmekte ve bir cepte bulunan dişi tomurcuk diğerinden daha çabuk gelişmektedir. Dişi tomurcuklar annelerine bağlı yeni birey oluşturmaktadırlar. Tomurcuğun daha geç geliştiği keseye minus denmekte ve çiçeklenme olduğunda çiçek bu cepten açığa çıkmaktadır (Martin vd 1978).

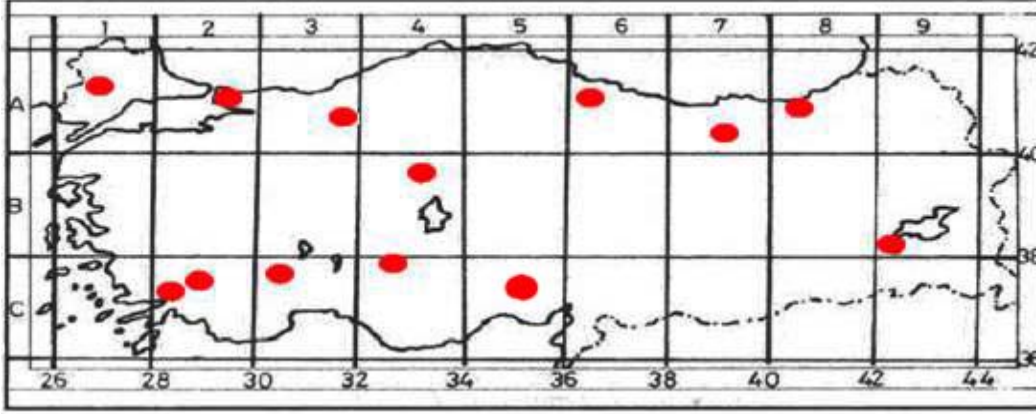
Vejetatif sürgün gelişimine sahiplerdir ve eşeyli üreme için uygunlardır. Genel olarak 3–6 gün arasında çok hızlı bir şekilde büyümektedirler (Vatta vd 1995).

Az ışıklı ortamlarda iyi gelişmekte, yüksek ışık şiddeti fotosentetik inaktivasyona sebep olmaktadır (Örencik vd 1983). *Lemna* türleri için en iyi gelişme şartları ve tolerans sınırları Çizelge 1.1' de verilmektedir (Saygıdeğer 1996).

Çizelge1.1: *Lemna* türleri için en iyi gelişim şartları ve tolerans sınırları (saygıdeğer)

Çevre şartları	En İyi Gelişim	Tolerans Sınırları
pH	4,5–7,5	3,5–8,5
Sıcaklık	20 – 30°C	1- 32°C
Işık Şiddeti	Sınırlayıcı değil	Geniş tolerans sınırı

Ülkemizde oldukça bol bulunan bir türdür. Türkiye florası kayıtlarına göre *L. minor* Adana ilinde ilk kez görülmüş ve Adana ili C5 karesi için yeni kayıt olup daha sonra *L.minor* şekil 1.4 de görüldüğü üzere yayılış alanları belirlenmiştir.



Şekil 1.4: *L. minor* 'ün Türkiye'deki yayılış alanları (Saygıdeğer 1996, değiştirilerek)

Yenilebilen bir enerji kaynağıdır, son yıllarda üzerinde yapılan çalışmalar hız kazanmaktadır ve önemi giderek artmaktadır. Protein yönünden oldukça zengin bir bitkidir. Diğer bazı bitkilerle protein yönünden karşılaştırılırsa, *Lemna* protein miktarı bakımından Soya'dan sonra gelmektedir ve %24–45 oranında protein ihtiva etmektedirler (Çizelge 1.2-Russof vd 1980, ve Orron 1990).

Çizelge 1.2: Bazı bitkilerde bulunan protein miktarı

BİTKİ ADI	PROTEİN ORANI (%)
Soya	37
<i>L. minor</i>	24.4
Yonca	20
Buğday	14.5
Arpa	12
Mısır	8.8

İçerdiği protein miktarından ötürü akuakültürde balık yemleri ile birlikte kullanıldığında balık gelişiminde ve büyümesinde önemli etkiler göstermektedir. Ayrıca içerdiği azot nedeniyle gübre olarak değerlendirilebilen yenilenebilir bir kaynaktır. Kümes hayvanlarında, domuzlarda ve büyük baş hayvanlarda besin kaynağı olarak kullanımı da bitkiye önemli bir özellik kazandırmaktadır (Haustein vd 1990, Lenge 1990, Hang 1997).

Biyoteknolojik çalışmalar kapsamında *L. minor* bitkisi ile moleküler düzeyde birçok araştırma yapılmıştır.

Bunların yanı sıra ekolojik olarak büyük öneme sahiptir. Doğal sularda çeşitli etmenlerle kirlenmenin giderilmesinde bitkilerin kullanılması çalışması son yıllarda giderek artmaktadır. Sanayi atık sularında geniş bir büyüme potansiyeline sahip olup ve indikatör bir bitki olmasından ötürü fitoremediasyon amaçlı kullanılan bitkilerin başında gelmektedir (Wang ve Freemark 1995).

Petrol ve türevleri doğal su alanları için tehdit oluşturmaktadır. Bu durum insan ve hayvan sağlığı için de büyük risk oluşturmaktadır. Petrol kirliliğinin insan ve hayvan sağlığı açısından en önemli etkisi ise kimyasal kaynaklı akciğer iltihabıdır. Daha seyrek görülen etkileri arasında kalp- damar hastalıkları, akciğer böbrek ve dalak damarlarında ortaya çıkan sorunlar sayılabilmektedir. Yapılan araştırmalar doğrultusunda petrol hidrokarbon kaynaklı kirliliğin ortadan kaldırılmasında *L. minor*'un etkili olduğu saptanmıştır. *L. minor* türleri SO₂ ve H₂S gibi zehirli gazlardan kükürtü absorblayarak sistein ve diğer kükürt içeren aminoasitleri sentezlemektedirler (Memon 2008). Ayrıca; çok yüksek oranda minerale ve metiyonin, lizin gibi esansiyel aminoasitlere sahiptirler.

L. minor proteomik ve geneomik araştırmalarda da kullanılan bir bitkidir. Yapılan çalışmalar ile yüksek protein ihtiva etmesinden ötürü rekombinant teröpatik proteinlerin üretimi için geliştirilmektedir. Lemna Expression System (LEX); transgenik bitkilerin hızlı bir şekilde klonal büyümesine, rekombinant proteinlerin salınımına, yüksek protein eldesine olanak sağlamaktadır (Cox ve Sterling 2006).

Hızlı çoğaltımı ve uygulanan doku kültür teknikleri sayesinde kullanım alanları giderek artmakta ve üzerinde yapılan çalışmalar hız kazanmaktadır. *Lemna minor* *L.* bitkisi Türkiye'de akvaryum ticaretinde kullanılan önemli bitkiler arasındadır. Ülkemizde oldukça bol miktarda bulunmaktadır. Yenilebilen bir enerji kaynağı olup, son yıllarda üzerinde yapılan çalışmalar hız kazanmakta ve önemi giderek artmaktadır. Ekolojik olarak çok büyük öneme sahip olan bitki aynı zamanda protein yönünden oldukça zengindir. Bu çalışmada bitkinin geçici daldırma sistem biyoreaktör ile *in vitro* çoğaltımının gerçekleştirilmesi ve biyoreaktör kullanımı ile de ortam koşullarının optimum düzeyde tutularak bitkinin doğal şartlarından daha hızlı sürede ve daha sağlıklı bir şekilde çoğaltılması amaçlanmıştır. Ayrıca; bitkinin mikroçoğaltımı amacıyla kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin, çoğalma hızına ve bitki protein kalitesine etkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Artan vd (2007), *L. minor* bitkisinin ağır metal giderim kapasitesini araştırmışlardır. Bu amaçla, *L. minor* bitkisi, evsel atıksularının deşarj edildiği sızdırmalı fosseptikten alınan sularla önce doğal arazi şartlarında ardından laboratuvar şartlarında büyütölmeye çalışılmıştır. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarlarında yapılan bu çalışmada doğal arazi şartlarında üretilen su mercimeklerinin laboratuvar ortamında ağır metal giderim verimlilikleri araştırılmıştır. Deneysel çalışmalar iki farklı hacimdeki sistemlerde yürütölmüştür. 100 mL' lik ve 500 mL' lik her iki sistemde de kesikli olarak çalışılmıştır. Üç farklı ağır metal giderimi için elde edilen deneysel sonuçlar řu şekildedir: Kadmiyum 5,0 ve 10,0 mg/L konsantrasyonlarında: 100 mL' lik kesikli reaktörlerde deney süresi sonunda yaklaşık % 96 giderim verimi elde edilmiştir, 500 mL' lik kesikli reaktörlerde ise yaklaşık %90 oranında giderim verimi elde edilmiştir. Bakır 10,0 ve 20,0 mg/L konsantrasyonlarında: 100 mL' lik kesikli reaktörlerde deney süresi sonunda yaklaşık % 89 giderim verimi elde edilmiştir 500 mL' lik kesikli reaktörlerde ise yaklaşık %89 oranında giderim verimi elde edilmiştir. Kurşun 10,0 ve 20,0 mg/L konsantrasyonlarında: 100 mL' lik kesikli reaktörlerde deney süresi sonunda yaklaşık % 98–100 giderim verimi elde edilmiştir. 500 mL' lik kesikli reaktörlerde ise yaklaşık % 98–100 oranında giderim verimi elde edilmiştir.

Stewart vd (1952) havuç (*Daucus carota* L.) ile yapılan *in vitro* çalışmada biyoreaktör içerisinde gelişen bitkilerde oksijen eksikliğinden dolayı kök uzamalarında olumsuz etki saptamışlardır. Bu sorunu gidermek ve ortamdaki O₂ dengesini sağlamak amacıyla 'Auxophyton' içeren biyoreaktörlerde eksplantlar költüre alınarak sürekli hava girişi sağlanmış olup kök uzamasında olumlu etkiler gözlenmiştir. Bitkide yapılan yaş ağrlık ölçümlerinde 20 gün sonunda, bitkinin ağrılığının 2,6 kat arttığı kaydedilmiştir.

Escalant vd (1994) muz bitkisinin geçici daldırma sistem biyoreaktörler ile mikroçoğaltımını gerçekteştirmiş ve buradan elde edilen sonuçları, muz bitkisinin agar kullanılan katı besin ortamında yapılan mikroçoğaltım deneme sonuçları ile karşılaştırmışlardır. GDS biyoreaktör içerisinde költüre alınan eksplantlarda 2 ay sonra oluşan somatik embriyoların sayısı 1375 adet kaydedilirken agar içeren katı ortamdaki embriyo sayısının 450 olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak biyoreaktör uygulaması ile yapılan mikroçoğaltımda bitki oluşum yüzdesi, agarlı ortamda gerçekteştirilen mikroçaltımdaki bitki oluşum yüzdesinden 3,05 kat daha fazla olduğu kaydedilmiştir. Denemede 6 ay sonunda yarı katı besin ortamında yapılan mikroçoğaltımla elde edilen sonuçlara kıyasla GDS biyoreaktörlerle yapılan mikroçoğaltımda % 60 -70 oranında daha fazla somatik embriyo üretimi sağlanmıştır.

Kane vd (1988), Amerikan nilüferi *Nelumbo lutea*' nin embriyosunu *in vitro* koşullarda izole etmişler ve BAP, Zeatin, GA₃ ya da ABA içeren yarım kuvvette sıvı MS ortamda kültüre almışlardır. Rizom gelişiminde, BAP ve Zeatinin etkisi olmamış ve 290 µM GA₃ içeren ortam en iyi sonucu vermiştir. 0.38 µM ABA içeren ortam rizom gelişimini engellemiştir. Tohumlar % 50' lik etanolde 1 dakika bekletilmiş ve % 2.6 sodyum hipoklorit ile 12 dakika muamele edilip 3 defa saf su ile durulama işlemi uygulanmıştır.

Cook vd (1989), su bitkisi *Kosteletzkya virginica*' nin olgunlaşmış embriyo ve gövde eksplantlarını kültüre alarak 30 g/l glukoz, 2 mg/l IAA ve 1 mg/l kinetin içeren MS ortamında kallus yoluyla rejenerasyon sağlamışlardır. Gövde ve kök kullanılarak kallus yoluyla bitki rejenere edilip, değişik sitokinin ve oksin içeren karbonhidratlı ortama aktarılmıştır. Histolojik olarak meristematik bölgeler, gövde ve kök ucu incelenmiş ve somatik embriyo oluşmadığı anlaşılmıştır. *Kosteletzkya virginica* tohumlarının yüzey sterilizasyonunda sülfirik asit ve etanol kullanmışlardır. Bir saat H₂SO₄ ile muamele edilen tohumlar, çeşme suyunda durulanmış ve % 95'lik etanolde 10 dakika bekletilmiştir. Tohumlar gece boyunca steril saf suda bekletildikten sonra yine % 95'lik etanolde 5 saniye bekletilmiş ve kurutulmuştur.

Straub vd (1989), su bitkisi *Distichlis sipicata*' nin olgun tohumlarını kullanarak doku kültürü çalışmaları yapmışlardır. Katı, beyaz ve rejenere kabiliyeti olan kalluslar oluşmuş ve üzerinde turuncu-yeşil çizgiler gözlenmiştir. Rejenerasyon ortamına oksin yerine 1 mg/l BAP ilave edince rejenere kabiliyeti yükselmiştir. Yapılan histolojik çalışmalar hücrelerin embriyonik olduğunu göstermiş fakat rejenerasyon sürgün organogenesi ile elde edilmiştir. Rejenere olan bitkiler doğal koşullarda tohum ve çiçek oluşturmuştur. Tohumların yüzey sterilizasyonunda çamaşır suyu veya etanol kullanılmıştır. Tohumlar 15 dakika çamaşır suyunda bekletildikten sonra 3 defa steril saf su ile durulanmıştır. Diğer bir yöntemde ise, % 95' lik etanolde 15 dakika bekletme ve durulamadan sonra kurutma uygulanmıştır.

Kane vd (1990), akvaryum bitkisi *Cryptocoryne lucens*' in sürgün oluşumunu ve *ex vitro* koşullara adaptasyonunu incelemişlerdir. 2 µM BAP, 0,5 µM NAA ve % 0,8 agar içeren LS besin ortamında sürgün rejenerasyonunu optimize etmişlerdir. 35 günde sürgün rejenerasyonu görülmüştür. En fazla sürgün rejenerasyonu tek koltukaltı eksplantı kullanılarak, (7,7 adet/eksplant başına) 20 µM BAP ve 0,5 µM NAA içeren MS ortamda elde edilmiştir. 18 hafta sonunda en iyi adaptasyon topraksız bitki ortamı ya da poliüretan köpük tablalarda gerçekleştirilmiştir.

Bird ve Smith (1994), deniz yosunu *Halophila engelmannii*'nin koltukaltı meristemini kullanarak doku kültürü çalışmaları yapmışlardır. Aynı kültür kabında iki ortam kullanmışlardır. Alt kısma % 0,8 agar içeren katı ortam, bunun üst kısmında sıvı besi ortamı konmuştur. Katı ortamda inorganik besin maddeleri, bitki büyüme düzenleyicileri, % 1 sukroz ve aktif karbon içeren suni deniz suyu kullanılmıştır. Sıvı ortam ise suni deniz suyu ve inorganik besin maddeleri içermiştir. Ortamda azot kaynağı olarak nitrit kullanıldığında, koltukaltı meristemden gelişen bitkilerde ölüm görülmüştür. En iyi gelişme, azot kaynağı olarak 3.4 mM GA3 kullanıldığında elde edilmiştir. En fazla sürgün oluşumu 0.25 mg/l NAA ve 10 mg/l BAP içeren ortamda gözlenmiştir.

Agrawal ve Ram (1995), su kestanesi (*Trapa sp.*)'nin *in vitro* çimlenmesi ve mikroçoğaltımı konusunda çalışmışlardır. Yüzey sterilizasyonundan sonra embriyolar NBS (Nitsch'in temel yarı katı ortamı) ortamına yerleştirilerek bitkiler elde edilmiştir. Bu filizlerden sürgün ucu ve nodal kısımlar alınarak NBL (Nitsch'in temel sıvı ortamı) ortamında kültüre alınmıştır. Rejenere olan sürgülerden alınan eksplantlar çeşitli bitki büyüme düzenleyici bulunan NBL ortamına yerleştirilmiş ve sürgün uzunluğu, dallanma, nod sayısı ve kök gelişimi gibi özellikler incelenmiştir. Oksin axillary tomurcuk üretimini engellemiş ancak yeşil kök oluşumunu artırmıştır. Absisik asit genç yaprak gelişimini engellemiştir. 10–6 M BAP axillary dal üretimini artırmada çok etkili olmuştur. Bu dallar NBL'ye transfer edildiğinde gövde uzaması ve köklenme görülmüştür.

Purohit ve Singhvi (1998), *Achras sapota* bitkisinin mikroçoğaltımını yapmışlardır. Kotiledon boğum kullanılmıştır. 2 mg/l BAP içeren SH (Schenk and Hildebrandt's medium) ortamda, 42 günde eksplant başına ortalama 2.17 cm uzunluğunda 3 adet sürgün elde edilmiştir. Bundan sonra eksplantlar 21 günlük ara ile 3 kere kültüre alınmıştır. Her alt kültürde eksplantlardan 3 kat daha fazla sürgün elde edilmiştir. Ortama 1mg/l Giberellik asit ilave edildiğinde hem sürgün çoğaltımında hem de sürgün gelişiminde olumlu etkisinin olduğu görülmüştür. Elde edilen sürgünler 200 mg/l IBA ile muamele edildikten sonra ½ SH ortama yerleştirilmiş ve % 66 oranında köklenme sağlanmıştır. Deneme sonunda 500 bitki elde edilmiş ve 440 tanesi başarılı bir şekilde adapte edilmiş ve toprağa aktarılmıştır.

Das vd (1999), *Litchi chinensis* türünde iki yöntem kullanarak sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Birinci yöntemde; tohumlar 20 mg/l BAP içeren MS ortamda kâğıt köprüler üzerinde çimlendirilmiştir. İkinci yöntemde; bitkinin koltukaltı meristemleri her iki günde bir 100 µg BAP ile muamele edilmiştir. Birinci yöntem ile kotiledon noddan 4 hafta içerisinde 27,5 sürgün elde edilmiştir. İkinci yöntemde ise her koltukaltı meristeminden 8 hafta

içerisinde 8 sürgün elde edilmiştir. İkinci yöntemde yani inplanta muamelesinde; ilk önce steril filtre kağıtları steril su ile ıslatıldıktan sonra koltukaltı meristemlerin üzerine sarılmıştır. Sonra üzerine değişik oranlarda BAP uygulanmıştır. Her iki yöntem bitkinin 5 genotipinde denenmiş ve iyi sonuç alınmıştır. Elde edilen sürgünler 25 mg/ml IBA ile 15 dk muamele edilmiştir. Bütün genotiplerde köklenme elde edilmiştir. Bu bitkinin doku kültüründe “Bavistin” fungusiti ve organik nutrient maddeler içermeyen ortam kullanılarak fungus bulaşıklığı kontrol altına alınmıştır.

Guillermo vd (1999), *Nothofagus leoni* Espinosa çeşidinde mikroçoğaltım çalışması yapmışlardır. Eksplantlara ilk önce 0.55 µM BAP uygulanmıştır. Sonraki iki alt kültürde BAP içermeyen ortamlarda çoğaltım yapılmıştır. Eksplantlar üzerinde kallus oluştuktan sonra sürgünler gelişmiştir. Sürgünler 1.23 µM IBA muamelesi ile % 91,4 oranında başarı ile köklendirilmiştir. Bitkilerde ilk köklenme 11. günde gözlenmiştir.

Kane vd (1999), *Cryptocoryne wendtii*' nin *in vitro* çoğaltımını yapmışlardır. Bitki, yüzey sterilizasyonu için 15 dk çeşme suyunda tutulduktan sonra 12 dk % 1.05'lik NaOCl+Tween 20 (1d/100ml) ile muamele edilmiştir. Daha sonra 1dk % 50'lik etanol ile 5 dk muamele edildikten sonra 3 kere durulama yapılmıştır. Denemede katı ortam üzerine sıvı ortam ilave edilerek ikili ortam kullanılmıştır. I. ortam; MS, 0.56 mM myo-inositol, 1,2 µM thiamin-HCL ve 87,6 mM sukroz, 2.2 µM BA, 0.57 µM IAA; 87.6 mM sukroz ve % 0.8 agar II. ortam; MS, BA (0–25µM), IAA (0–10 µM). Sürgün ucu, katı ortama yerleştirilmiştir. 150x25 mm kültür tüpleri kullanılmış ve 25°C'de 16 saat fotoperiyot uygulanmıştır. En fazla sürgün oluşumu 20 µM BA bulunan ortamdan elde edilmiştir. Topraksız besi ortamında (MetroMix 500) % 100 köklenme sağlanmış ve bitkilerin tamamı seraya adapte olmuştur. Bitkinin aktarılmasından 8 hafta sonra yüksek kaliteli satışa hazır bitkiler elde edilmiştir.

Chen vd (2001), *Oncidium* cinsinde çiçeklerin canlılık süresini artırmaya çalışmışlardır. Çiçek sapları, çiçeklerin uzun süre canlı kalabilmesi için 50 mg/l kinetin ve 40 gr/l sukroz içeren ortamda bekletilmiştir. Yalnız Kin veya Sukroz içeren sıvı ortamda bekletilen çiçek dallarındaki sonuçlar Kin ve sukrozun birlikte kullanılmasına göre daha düşük olmuştur. Çiçek saplarının ilk önce Kin ve sonra sukroz içeren ortama konulması daha iyi sonuç vermiştir. Gibberalik asitin bir etkisi gözlenmemiştir.

Öztürk (2002), *Ludwigia sp*'nin *in vitro* hızlı çoğaltımı çalışmasını yapmıştır. Yüzey sterilizasyonu için bitki 15 dk çeşme suyunda tutulmuş ve 9 dk % 20'lik ticari çamaşır suyuyla muamele edildikten sonra 3 dk 3 kere durulama işlemi yapılmıştır. Uç meristemi,

birinci, ikinci ve üçüncü-dördüncü koltukaltı meristem eksplantları 4 hafta MS, % 3 sukroz, % 0,8 agar, BAP (0,1, 0,2 ve 0.3 mg/l), TDZ (0.05, 0.1, 0.15 mg/l), NAA (0.1 mg/l) içeren ortamlarda tutulduktan sonra ½ MS ortama alınmış ve 4 hafta bu ortamda tutulmuştur. Petri ve Magenta GA-7 kültür kapları kullanılmış ve 24 + 1°C'de 16 saat fotoperyot uygulanmıştır. En fazla sürgün (12.31 adet/eksplant) uç meristemi ile 0.05 mg/l TDZ ve 0.1mg/l NAA içeren MS besisi ortamından elde edilmiştir. Rejenere olan sürgünler 10-20 mm uzunluğa geldiklerinde kesilerek steril Magenta GA7 veya cam kavanozlar (baby jar) içinde ½ MS ortamda köklendirmeye alınmıştır. Burada köklenen sürgünler daha sonra akvaryum ortamına adapte edilmiştir. Akvaryum suyunun pH'sı 7 ve sıcaklığı 24oC + 2°C'de tutularak 12 saat ışık ve 12 saat karanlık fotoperiyodunda gelişmeye bırakılmıştır. Akvaryum dibine 1-2 cm yüksekliğinde ince kum yerleştirilmiş ve akvaryum suyuna haftada bir sıvı gübre (FloraPride, Tetra Plant) ilave edilmiştir.

Anthony vd (2004), *Leucopocon verticillatus* türünün rejenerasyonu için somatik embriyogenesis ile bir protokol geliştirmişlerdir. En iyi sonuçlar 10 µM TDZ ve 5 µM IAA içeren, % 4 Maltoz ve % 0,7 agar içeren Gamborg B5 (pH: 6) ortamından elde edilmiştir. Somatik embriyolar ana eksplanttan alındıktan sonra ½ Gamborg B5 ortamında kültüre alınmıştır. Embriyoların 100 µM IBA ile 2-5 günlük muamelesi köklenmeye yardımcı olmuştur. Agar içeren ortamda gelişen kökler ince ve kırılğan yapıya sahip olmuşlardır. Bu nedenle köklendirmek için kum ve arpa ortamı kullanılmıştır. Bu ortamda % 60 oranında kırılmayan kökler ve bitkiler elde edilmiş ve toprağa aktarılmıştır.

Andersone ve Levinsh (2004), olgun bitki dokularında düşük oranda morfogenezin sebeplerinden birinin sitokinin muamelesine tepki gösterilememesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada sitokininin etkisini artırmak için ilk önce *Pinus sylvestris* bitkisinin tomurcuk eksplantları soğukta bekletilmiştir. Yalnız 22 °C'de bekletilen tomurcuklarda sitokininin etkisi görülmemiştir. Fakat soğuk muamelesi yapılan eksplantlarda yüksek oranda BAP muamelesinin etkili olduğu ve tomurcuklardaki dormansiyi kırmak için hem fiziksel hemde biyokimyasal yöntemler kullanılarak fazla sayıda sürgün elde edilebileceğini belirtmişlerdir.

Panigrahi vd (2006), *Hygrophila auriculata* bitkisinin yaprak eksplantlarından BAP ve NAA içeren MS ortamda sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Yaprak eksplantından kallus yoluyla en iyi sürgün rejenerasyonu 2 mg/l BAP ve 0,2 mg/l NAA içeren ortamda görülmüştür. 3 cm'den fazla gelişen sürgünler 0,1 mg/l NAA içeren MS ortamda

köklendirilmiştir. Elde edilen bitkilerin % 80'i başarıyla toprağa aktarılmış ve adaptasyon sağlanmıştır.

Husain vd (2007), *Pterocarpus marsupium* (kino zamkı) türünde çalışmışlardır. Bitkinin 18 günlük fidelerinden elde edilen kotiledon boğum eksplantları 0,1–10 μM TDZ içeren MS ortamda kültüre alınmıştır. En fazla sürgün yüzdesi (% 90) ve eksplant başına en fazla sürgün sayısı (15,2 Adet), 0,4 μM TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. Eksplantların uzun süre TDZ içeren ortamda bulunması sürgün uzunluğunda olumsuz etki yapmıştır. İlk aşamada; TDZ'nin etkisi ile sürgün oluşturan eksplantlar sürgün gelişimi ve uzaması için 5 μM BA içeren ortama aktarılmıştır. En fazla sürgün uzaması (% 90) 5.4 cm ortalama ile 5 μM BA içeren ortamdan elde edilmiştir. Fazla sayıda sürgün elde etmek amacıyla, sürgünler alındıktan sonra ana eksplant dokusu tekrar tekrar rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır. Böylece eksplant başına 44 adet sürgün elde edilmiştir. Sürgünlerin % 65'ninde en fazla sürgün başına 4,4 adet kök görülmüştür. Bu sürgünler 4 gün 200 μM IBA içeren ortamda bekletildikten sonra 0,2 μM IBA ve 3.96 μM floro glukinol içeren ortamda köklendirilmiştir. Elde edilen bitkiler ilk önce iklim odasında tutulmuş daha sonra seralara % 70 başarı ile aktarılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *L.minor* Bitkisinde Yürütülen Çalışmalar

3.1.1. Bitki materyali

Çalışmada su mercimeği (*L. minor* L.) bitkisi kullanılmıştır. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümünden temin edilmiştir.

3.1.2. *In vitro* çalışmalardaki büyüme ortamları ve kültür koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri ile % 3 sukroz içeren ve % 0,8'lik agar (Type A, Sigma-Aldrich Corporation St Lo. Mo) veya % 0.6–0.65'lik agar (Duchefa Hollanda) ile katılaştırılan temel besin ortamı (MSO) kullanılmıştır. Sıvı kültür denemelerinde agar ilave edilmemiştir. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmış olup, gereken durumlarda besin ortamına farklı konstrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1N NaOH veya 1N HCl kullanılarak 5,6-5,8'e ayarlandıktan sonra 118 KPa basınç altında ve 120°C'de 20 dk otoklavlanarak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler 16 saat beyaz floresan ışığı (150 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fotoperiyot altında ve 24±1°C sıcaklıkta tutulmuşlardır.

3.1.3. Bitki büyüme düzenleyicileri

Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyiciler (BAP, TDZ ve kinetin) Sigma Aldrich ve Duchefa'den temin edilmiştir. Büyüme düzenleyicilerin stok solüsyonları firmanın önerdiği şekilde uygun çözücülerle çözüldükten sonra istenilen miktar ve oranda hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlar 4°C' de iki ay saklanmıştır. Kinetin ortamlara otoklavlandıktan sonra ilave edilmiştir.

3.1.4. Eksplant yüzey sterilizasyonu

Su mercimeğinde yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarının sağlanacağı en düşük dezenfektan miktarını belirlemek amacı ile farklı dozlarda ticari çamaşır suyu ve H₂O₂ kullanılmıştır. Ticari çamaşır suyu ile yapılan denemede çamaşır suyunun %20 ve 10'luk konsantrasyonlarında 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 dk bekletme uygulamaları ile yüzey steril edilmiştir. H₂O₂ ile yapılan denemede ise %20 ve 10'luk H₂O₂ konsantrasyonlarında 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 dk muamelesiyle yüzey steril edilmiştir. Yüzey steril edilmiş bitki steril Petri kapları içerisinde % 3 sukroz içeren ve % 0.6 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında 24±1°C'de kültüre alınmıştır. Yüzey steril edilmiş eksplantlar hem katı ortamlarda hem de geçici daldırma sistem biyoreaktörlerle sıvı ortamda çoğaltılmak için ayrılmışlardır.

3.1.5 Bitki için uygun pH aralığının belirlenmesi

Uygun pH derecesinin belirlenmesi amacı ile 5'er bitki (pH 5, 6, 7, 7.23, 8 ve 9 pH değerlerdeki distile suda Erlen Meyerler içerisinde alınarak 190 rpm ve 28°C'de karanlık ortamda çalkalayıcı inkübatör içerisinde 1 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Bu değerlerden pH 7.23 ise bitkinin alındığı akvaryumun suyunun pH değeridir.

3.1.6 Geçici daldırma sistem biyoreaktör ile materyalin hızlı çoğaltımı

Su mercimeğinin hızlı çoğaltımı için kullanılacak olan sıvı kültür ortamında uygun MS konsantrasyonu ve sukroz miktarının belirlenmesi amacı ile 1 hafta süresince 20'şer eksplant ¼ MS, ½ MS, MS ve 30 gr sukroz içeren ve içermeyen ortamlarda kültüre alınmıştır. Deneme GDS biyoreaktörler içerisinde 3 tekerrürlü 6 ortam kullanılmıştır. Her GDS biyoreaktörde 410 ml sıvı ortam kullanılmıştır. Daha sonra optimize edilmiş sukroz içeren ¼ MS ortamı GDS biyoreaktör içersine 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 mg/l BAP ve 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 mg/l kinetin ve 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 mg/l TDZ ilave edilerek bitki çoğaltmak amacı ile kültüre alınmıştır. Kültürde bitki çoğaltımı 4 hafta süresince 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Denemelerde 4 hafta sonunda çoğaltım oranı (%), bitki sayısı (adet), bitkinin morfolojik görünüm, kuru ve yaş ağırlığı belirlenmiştir. Kuru ağırlık belirlemek amacı ile bitkiler 40°C'de 18 saat etüvde bekletilmiştir.

3.1.7 Bitki materyalinden azot ve protein tayini

Mikroçoğaltımı yapılan kurutulmuş bitkiler üzerinde farklı sitokinin konsantrasyonlarının protein ve azot miktar değişimindeki etkilerinin belirlenmesi için Pekyardımcı (2006)'nın belirttiği gibi Kjeldahl tayin yöntemi kullanılmıştır. İlk önce bitkide bulunan azot, derişik H₂SO₄'le ve Cu⁺² iyonları, civa iyonları ve metalik selenyum gibi katalizörlerle reaksiyona sokularak NH₃'a dönüştürülmüş olup NH₃ asidik ortamda NH₄⁺ iyonları halinde tutulmuştur. Çözelti H₂SO₄ ilavesinden sonra kahverengi-siyah bir renk almış, ısıtıldıkça berraklaşmıştır.

Soğuyan karışım distilasyon cihazına alınmış ve ortamın kuvvetli bazik olması için NaOH ilave edilmiş ve oluşan NH₃ destillenerek alınarak borik asit çözeltisinde tutulmuştur. NH₄⁺ iyonları, ayarlı HCl ile titre edilmiş olup proteindeki azot oranından hareket ederek protein miktarı belirlenmiştir. Protein miktarını hesaplamak için aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır.

$$\text{mg N/l} = [(A - B) \times N \times 14 \times 1000] / V$$

mg = miligram

N= H₂SO₄ titrasyon çözeltilisinin normalitesi

A= Numune için titrasyonda harcanan H₂SO₄ titrasyon çözeltilisi hacmi (ml)

B = Şahit için titrasyonda harcanan H₂SO₄ titrasyon çözeltilisi hacmi (ml)

V= Numune hacmi (ml)

3.2 Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi

Rejenerasyon denemeleri 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çalışmalardan elde edilen veriler bilgisayarda “SPSS 16 for Windows” programı ile faktöriyel deneme desenine göre analiz edilmiştir. Ortamların önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan, LSD veya t testleri uygulanmıştır. Yüzde değerleri istatistik analizi yapılmadan önce “arcsin transformasyon”una tabi tutulmuştur (Snedecor and Cochran 1967).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Eksplantın yüzey sterilizasyonu

In vitro denemede *L. minor* bitki eksplantları (20 adet) ilk önce %20 ticari çamaşır suyunda daha sonra % 10 ve 20 H₂O₂ ile 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 dak süresince yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yüzey sterilizasyonu sonucunda edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı süre ve konsantrasyonlardaki çamaşır suyu ve H₂O₂ ile yapılan yüzey sterilizasyona ait varyans analizi

V.K	Sd	K.O	F
Süre (dk)	5	2549,63	86,050
Konsantrasyon (%)	2	45029,63	1,520x10 ³
Süre x konsantrasyon	10	2549,63	86,050**
Hata	36	29,630	
Genel Toplam	53		

**p<0.05

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda süre 5, 6, 7, 7.23, 8 ve 9 ve 10 dak ile %20 lik ticari çamaşır suyu ve %20 ve 10 luk H₂O₂ konsantrasyonları ile yapılan yüzey sterilizasyonu bakımından 0,05 düzeyinde önemli farklılık bulunmuştur. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

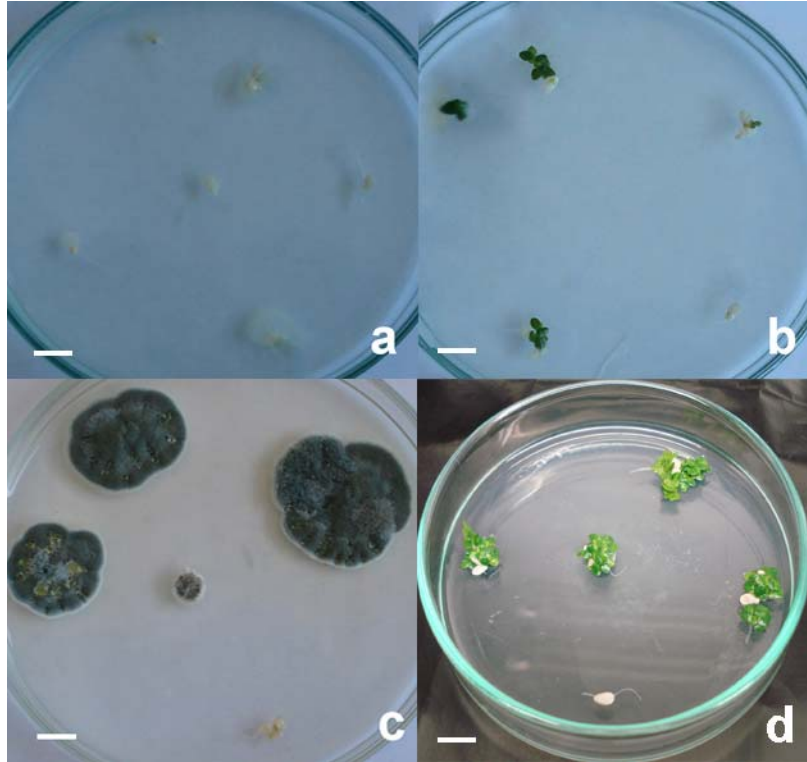
Çizelge 4.2 Farklı süre ve konsantrasyonlardaki çamaşır suyu ve H₂O₂ ile yapılan yüzey sterilizasyona ait Duncan testi sonuçları

Süre (dk)	Steril bitki oranı		
	% 20 Çamaşır suyu	%10 H ₂ O ₂	%20 H ₂ O ₂
5’	100,00	0,00	30,00d
6’	100,00	0,00	50,00c
7’	100,00	0,00	60,00b
8’	100,00	0,00	100,00a
9’	100,00	0,00	100,00a
10’	100,00	0,00	100,00a

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.2 ‘de görüldüğü gibi yapılan Duncan testi sonuçlarına göre %20 çamaşır suyu ve farklı dk süre muamelesiyle 0 ile % 100.00 arasında steril bitki elde edilmiştir. Çamaşır suyu ile farklı süre muamelesinde yapılan sterilizasyon uygulaması sonucunda %100 steril bitkiler

elde edilmesine rağmen klorofil parçalanması nedeniyle bitkilerde beyazlaşma görülmüşken (Şekil 4.1 a), %20 H₂O₂ muamelesiyle % 30 ile 100 arasında steril bitki elde edilmiştir. Ancak 9 ve 10 dk %20 H₂O₂ süre muamelesinde bitkilerde beyazlaşma ve zarar tespit edilmiştir (Şekil 4.1 b). Farklı dk süre ve %10 H₂O₂ muamelesiyle hiç steril bitki elde edilememiş (Şekil 4.1 c) olup, 8 dk muamelesiyle bitkilerde %100 sterilizasyon sağlanmıştır (Şekil 4.1 d). Bu nedenle bundan sonraki denemelerde sterilizasyon için 8 dk ve %20 H₂O₂ muamele tercih edilmiştir.



Şekil 4.1 *L. minor* bitkisinin yüzey sterilizasyonu. (a) %20 çamaşır suyu ve uygulanan tüm dk sürelerde bitkilerin klorofil parçalanması sonucunda meydana gelen beyazlaşma. (b) %20 H₂O₂ 9 dk muamelesi ile elde edilen kısmen yeşil steril bitkiler. (c) %10 H₂O₂ ve uygulanan tüm dk sürelerde bitkilerde meydana gelen bulaşıklık. (d) %20 H₂O₂ 8 dk muamelesi ile elde edilen steril bitkiler.

4.2. Farklı pH değerlerinin çalkalanmayan ortamda Erlen Meyerler içerisinde su mercimeğinin çoğaltımına etkisi

In vitro denemede *L. minor* bitki eksplantları farklı pH değerlerindeki distile su kullanılarak çalkalamasız ortamda Erlen Meyerler içerisinde 1 hafta süreyle kültüre alınmıştır. 1 hafta sonra elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı pH değerlerinin distile su kullanılarak çalkalamasız ortamda Erlen Meyerler içerisinde su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkisine ait varyans analizi

V.K	sd	Eksplant başına bitki sayısı (adet)		Toplam bitki sayısı (adet)	
		K.O	F	K.O	F
pH	5	5,76	20,56**	143,92	20,56**
Hata	12	0,28		7,00	
Genel Toplam	17				

**p<0.01

Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda pH 5; 6; 7; 7,23; 8 ve 9 değerlerinde çoğaltım oranı, eksplant başına düşen bitki sayısı ve toplam bitki sayısı ve 0,01 düzeyinde önemli farklılık bulunmuştur. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Farklı pH değerlerinin distile su kullanılarak çalkalamasız ortamda Erlenmeyerler içerisinde su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkisine ait Duncan testi sonuçları

pH	Eksplant başına bitki sayısı (adet)	Toplam bitki sayısı (adet)
5	5,00a	10,00cd
6	3,80b	12,67c
7	2,53c	19,00b
7,23	2,00cd	25,00a
8	1,67cd	8,33cd
9	1,47d	7,33d

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Denemede tüm pH değerlerinde bitki çoğaltımı gözlemlenmiştir. Çoğaltım oranı % 3,87 ile 280 arasında değişmiştir. Eksplant başına düşen bitki sayısı 1,47 ve 5,00 adet arasında değişmiştir. En fazla bitki sayısı artışı 5,00 adet ile pH 5 de ve en az bitki sayısı artışı 1,47 adet ile pH 9 değerlerinde elde edilmiştir. Toplam bitki sayısı adet olarak 7,33 ve 25,00 arasında değişmiştir; 5 adet eksplantla başlayan çoğaltımda en fazla bitki oluşumu pH 7,23 de 25,00 adet olup; en az bitki oluşumu pH 9 da 7,33 adet olarak kaydedilmiştir. Ayrıca pH 7 de 19,00 adet bitki sayısı, pH 7,23 de bitki sayısı 25 adet olarak kaydedilmiştir. Buna ek olarak pH 8 de 8,33 adet bitki elde edilmiş ve pH 9 da 7,33 adet bitki sayısı kaydedilmiştir. Bu çalışmaya göre bitki için en ideal pH aralığının 7–7,23 olduğu, pH 7–7,23 den düşük pH

aralıklarında (6–5,8) ve pH 7–7,23 den yüksek pH aralıklarında (pH 9–8) bitki oluşum yüzdesinin düştüğü gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4).

4.3. Farklı pH değerlerinin çalkalamalı ortamda Erlen Meyerler içerisinde su mercimeğinin çoğaltımına etkisi

In vitro denemede *L.minor* bitki eksplantları farklı pH değerlerindeki distile su kullanılarak çalkalamalı ortamda Erlenmeyerler içerisinde 1 hafta süreyle kültüre alınmıştır. 1 hafta sonra elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı pH değerlerinin çalkalamalı ortamda Erlenmeyerler içerisinde su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkisine ait varyans analizi

V.K.	sd	Eksplant başına bitki sayısı (adet)		Toplam bitki sayısı (adet)		Yaş ağırlık (g)		Kuru ağırlık (g)	
		K.O	F	K.O	F	K.O	F	K.O	F
pH	5	15,58	62,63**	1470,32	73,93**	0,03	65,02**	0,03	222,42**
Hata	12	0,25		19,89		0,00		0,00	
Genel toplam	17								

**p<0.01

Çizelge 4.5 ’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda pH 5, 6, 7, 7.23, 8 ve 9 değerlerinde çoğaltım oranı, eksplant başına düşen bitki sayısı, toplam bitki sayısı, yaş ağırlık ve kuru ağırlık değişikliği bakımından 0,01 düzeyinde önemli farklılık bulunmuştur. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Farklı pH değerlerinin çalkalamalı ortamda Erlen Meyerler içerisinde su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkisine ait Duncan testi sonuçları

pH	Eksplant başına bitki sayısı (adet)	Toplam bitki sayısı (adet)	Yaş ağırlık (g)	Kuru ağırlık (g)
5	0,63e	9,67d	0,04d	0,01c
6	1,26ed	12,67d	0,41d	0,13c
7	6,60a	66,00a	0,12a	0,07a
7,23	4,70b	47,00b	0,70b	0,55b
8	1,77d	17,67d	0,48cd	0,006d
9	2,93c	29,33c	0,05c	0,001d

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Denemede tüm pH değerlerinde bitki çoğaltımı gözlemlenmiştir. Çoğaltım oranı % -3.33 ile 560 arasında değişmiştir. Eksplant başına düşen bitki sayısı 0,63 ve 6,60 adet arasında değişmiştir. En fazla bitki sayısı artışı 6,60 adet ile pH 7 de ve en az bitki sayısı artışı 0,63 ile pH 5,8 değerlerinde elde edilmiştir. Toplam bitki sayısı 9,67 ve 66,00 adet arasında değişmiştir. En fazla bitki oluşumu pH 7'de ve en düşük bitki oluşumu pH 5,8'de elde edilmiştir. Gramaj olarak en ağır olan bitkiler 0,7 g olup pH 7.23 ve en hafif olan bitkiler 0.04 g olup pH 5 de rastlanmıştır. Kuru ağırlık değerleri gramaj olarak 0,55 g olup pH 7.23'de 0,001 g olup pH 9 'da gözlemlenmiştir (Çizelge 4.6).

4.4 GDS biyoreaktörlerde çoğaltım için uygun sıvı MS miktarının ayarlanması

Bitki için uygun pH derecesi belirlendikten sonra bitkilerin GDS biyoreaktör içersinde hızlı çoğaltımı için kullanılacak olan sıvı kültür ortamında uygun MS ve şeker konsantrasyonlarının saptanması için çalışmalar yapılmıştır. Çalışmada kullanılacak GDS biyoreaktörler karşılaşılabilecek herhangi bir kontaminasyon riskine karşın kullanılmadan önce her bir parçası ayrı ayrı 126°C de otoklavda 2 kere steril edilmiştir. Daha sonra 1 hafta süresince GDS biyoreaktörler içinde 20'şer eksplant ¼ MS, ½ MS, MS ve 30 gr sukroz içeren ve içermeyen ortamlarda kültüre alınmıştır. İlk başta biyoreaktörler içersinde 350 ml sıvı kültür ortamı kullanılmıştır fakat 2 hafta sonunda biyoreaktör içersindeki bitkilerin tamamen beyazlaştığı görülmüştür. 350 ml'lik sıvı kültür ortamında bitkilerin yeterli besini alamadıklarından gelişimlerinin yetersiz olduğu gözlemlenmiştir.

4.5. Geçici daldırma sistem biyoreaktörlerde sıvı MS ortam optimizasyonu

In vitro denemede *L. minor* bitki eksplantları (40 adet) farklı MS sıvı kültür ortamlarında (400ml) 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Daha sonra elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Farklı MS sıvı kültür ortamlarının su mercimeğinin bitki oluşumu etkilerine ait varyans analizi

V.K	sd	Eksplant başına bitki sayısı (adet)		Toplam bitki sayısı (adet)		pH son durum	
		K.O	F	K.O	F	K.O	F
Farklı MS ortamı	5	0,68	16,0**	224,72	61,28**	0,248	424,66**
Hata	12	0,043		3,66		0,001	
Genel Toplam	17						

**p<0.01

Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda şekerli ve şekerli MS, ½ MS ve ¼ MS sıvı kültür ortamlarında bitki oluşum oranı, eksplant başına düşen bitki sayısı, toplam bitki sayısı, pH değişikliği bakımından 0,01 düzeyinde önemli farklılık bulunmuştur.

Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Farklı MS sıvı kültür ortamlarının su mercimeğinin bitki oluşumu etkilerine ait Duncan testi sonuçları

MS ortamının oranları	Eksplant başına bitki sayısı (adet)	Toplam bitki sayısı (adet)	pH son durum
¼ MS şekerli	1,90a	38,00a	4,88e
½ MS şekerli	1,43b	28,67b	4,90e
MS şekerli	1,25b	25,00c	5,10c
¼ MS şekerli	0,51d	15,00d	5,22b
½ MS şekerli	1,18bc	23,67c	5,04d
MS şekerli	0,84cd	15,33d	5,66a

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Denemede bitki oluşum oranı % 75,00 ile 143,33 arasında değişmiştir. Eksplant başına düşen bitki sayısı 0,51 adet ve 1,90 adet arasında gözlemlenmiştir. En fazla bitki oluşum sayısı 1,90 adet, ¼ MS şekerli sıvı kültür ortamında ve en az bitki sayısı 0.51 adet, MS/4 şekerli sıvı

kültür ortamında elde edilmiştir. Toplam bitki sayısı en fazla 38,00 adet ve en az 15,00 adet elde edilmiştir. En fazla bitki sayısı (38,00 adet) ¼ MSşekerli sıvı kültür ortamında ve en az bitki sayısı (15,00 adet) ¼ MS şekerli sıvı kültür ortamında gözlemlenmiştir. Kültüre alınan eksplantların ortam pH'ına etkileri ise en düşük 4,88 ve en yüksek 5,66 değerlerinde elde edilmiştir. En düşük değişim oranı pH 4,88 değeri ¼ MS şekerli sıvı kültür ortamında en yüksek değişim oranı pH 5,66 değeri MS şekerli ortamında gözlemlenmiştir (Çizelge 4.8).

4.6. Farklı konsantrasyonlarda TDZ uygulaması

In vitro denemede su mercimeği bitki eksplantları (40 adet) farklı konsantrasyonlardaki TDZ hormon ilavesi ile MS sıvı kültür ortamlarında (400 ml) 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır; 4 hafta sonra elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9 Farklı konsantrasyonlardaki TDZ hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkilerine ait varyans analiz sonuçları

V.K	sd	Eksplant başına bitki sayısı (adet)		Toplam bitki sayısı (adet)			
		K.O	F	K.O	F		
TDZ hormon	5	164,225	31510**	262983,033	3,6980**		
Hata	12	0,005		7,111			
Genel toplam	17						
V.K	sd	Yaş ağırlık (g)		Kuru ağırlık (g)		Protein oranı (%)	
		K.O	F	K.O	F	KO	F
TDZ hormon	5	0,757	621,896**	0,167	755,001**	82.112	157,55**
Hata	12	0,001		0,000		0.02	
Genel toplam	17						

**p<0.01

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda sıvı MS kültür ortamına farklı konsantrasyonlardaki TDZ hormon uygulamasının bitki oluşum oranı, eksplant başına düşen bitki sayısı, toplam bitki sayısı, yaş ağırlık ve kuru ağırlık bakımından 0,01 düzeyinde önemli farklılık bulunmuştur. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.10'de verilmiştir.

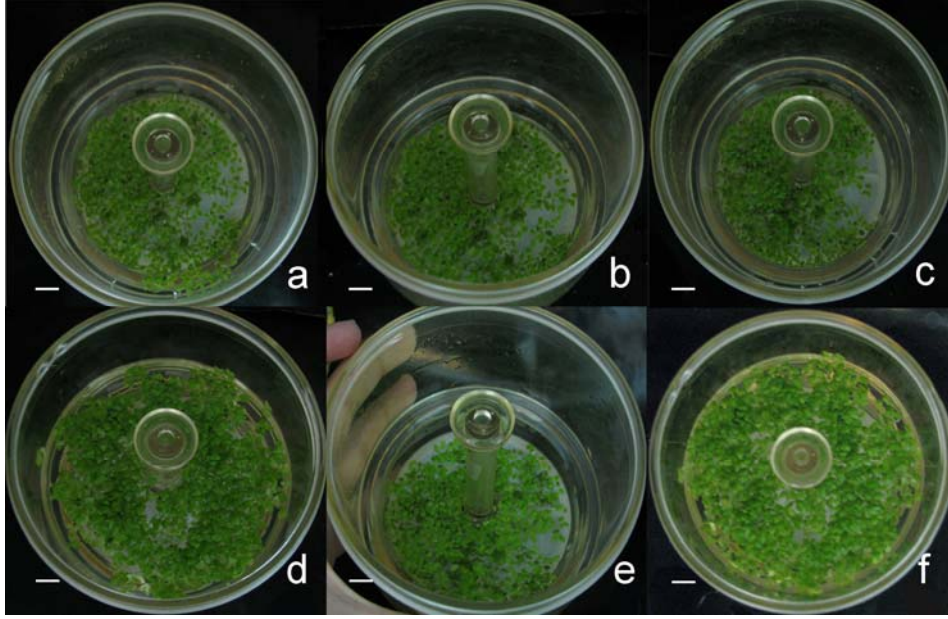
Çizelge 4.10 Sıvı kültür MS ortamına farklı konsantrasyonlardaki TDZ hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkilerine ait Duncan testi sonuçları

TDZ (mg/l)	Eksplant başına bitki sayısı (adet)	Toplam bitki sayısı (adet)	Yaş ağırlık (g)	Kuru ağırlık (g)	Protein oranı (%)
0,1	23,74a	949,67a	1,80a	0,68a	26.25b
0,2	15,59b	624,67b	1,25b	0,51b	26.96b
0,3	8,99d	359,67d	0,99c	0,03f	22.35cd
0,4	9,13c	365,33c	0,90d	0,36c	23.31c
0,5	3,76f	150,67f	0,36f	0,16e	27.72a
0,6	50.47e	219,00e	0,63e	0,24d	16.48e

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Denemede tüm TDZ hormon uygulaması yapılan sıvı kültür MS ortamlarında bitki oluşumu gözlemlenmiştir. Bitki oluşumu % 276 ve 2274 arasında değişmiştir. Eksplant başına düşen bitki sayısı en fazla 50,74 adet 0.6 mg/l TDZ içeren sıvı MS ortamında ve en az bitki sayısı 8,99 adet olarak 0.3 mg/l TDZ içeren sıvı besin ortamında elde edilmiştir. Toplam bitki oluşum sayısı bakımından sırasıyla 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 mg/l TDZ içeren sıvı MS ortamında 949,67; 624,67; 359,67; 365,33; 150,67 ve 219,00 adet bitki elde edilmiştir (Şekil 4.2 a,b,c,d,e,f). Kültüre alınan eksplantlarda en az yaş ağırlığa sahip bitkiler 0,36 g olup 0,5 mg/l TDZ içeren sıvı MS ortamında ve gramaj olarak en ağır bitkiler 1,80 g olup 0,1 mg/l TDZ içeren sıvı MS ortamında tespit edilmiştir. Bu sonuçlar kuru ağırlıkta benzer şekilde yansıma yapmıştır. Eksplantlarda en az kuru ağırlık 0,03 g olup 0,3 mg/l TDZ içeren sıvı besin ortamında ve en fazla kuru ağırlık 0,68 g olarak 0,1 mg /l TDZ içeren sıvı MS ortamında tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

Denemede farklı konsantrasyonlarda TDZ uygulaması yapılan bitkilerin protein oranları hesaplanmıştır. En yüksek protein oranı %26.96 olup 0.2 mg/l TDZ içeren sıvı MS ortamında görülmüştür En düşük protein oranı %16.48 olup 0.6 mg/l TDZ içeren sıvı MS ortamında kaydedilmiştir.



Şekil 4.2 Sıvı kültür MS ortamına farklı konsantrasyonlardaki TDZ hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkileri (a) 0.1 mg/l TDZ (b) 0.2 mg/l TDZ (c) 0.3 mg/l TDZ (d) 0.4 mg/l TDZ (e) 0.5 mg/l TDZ içeren ve (f) 0.6 mg/l TDZ içeren sıvı MS ortamında bitki çoğaltımı

4.7. Farklı Konsantrasyonlarda BAP Hormon Uygulaması

In vitro denemede su mercimeği bitki eksplantları (40 adet) farklı konsantrasyonlardaki BAP hormon ilavesi ile MS sıvı kültür ortamlarında (400 ml) 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır; 4 hafta sonra elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11 Farklı konsantrasyonlardaki BAP hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkilerine ait varyans analiz sonuçları

V.K	sd	Eksplant başına bitki sayısı (adet)		Toplam bitki sayısı (adet)			
		K.O	F	K.O	F		
BAP Hormon	5	1072,713	103400**	1716315,689	104000**		
Hata	12	0,010		16,500			
Genel toplam	17						
V.K	sd	Yaş ağırlık (g)		Kuru ağırlık (g)		Protein oranı (%)	
		K.O	F	K.O	F	K.O	F
BAP Hormon	5	6,824	20650**	0,019	264,459**	436,356	51700
Hata	12	0,000		0,000		0,05	
Genel toplam	17						

**p<0.01

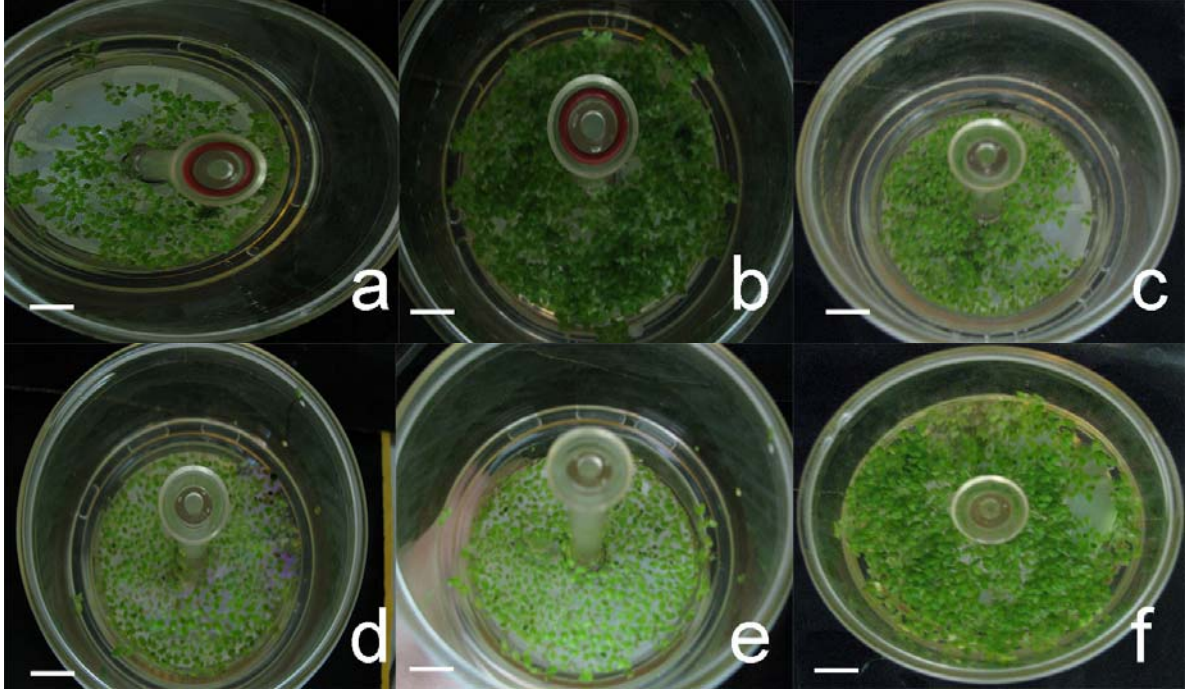
Çizelge 4.11’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda sıvı MS kültür ortamına farklı konsantrasyonlardaki BAP hormon uygulamasının bitki oluşum oranı, eksplant başına düşen bitki sayısı, toplam bitki sayısı, yaş ağırlık ve kuru ağırlık bakımından 0,01 düzeyinde önemli farklılık bulunmuştur. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12 Sıvı kültür MS ortamına farklı konsantrasyonlardaki BAP hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkilerine ait Duncan testi sonuçları

BAP (mg/l)	Eksplant başına bitki sayısı (adet)	Toplam bitki sayısı (adet)	Yaş ağırlık (g)	Kuru ağırlık (g)	Protein oranı (%)
0,1	3,99d	160,00d	2,89b	0,15d	28.43a
0,2	50,44a	2017,7a	3,65a	0,16d	20.45d
0,3	3,20e	128,33e	0,30e	0,21c	21.00d
0,4	2,78f	111,33f	0,15f	0,70e	27.72b
0,5	5,4c	217,00c	0,48d	0,24b	29.18a
0,6	5,62b	225,0 0b	0,66c	0,30a	26.18bc

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Denemede tüm BAP hormon uygulaması yapılan sıvı kültür MS ortamlarında bitki oluşumu gözlemlenmiştir. Bitki oluşumu % 220 ve 4944,2 arasında değişmiştir. Eksplant başına düşen bitki sayısı 2,78 adet ve 50,44 adet arasında değişmiştir. En fazla bitki sayısı 50,44 adet olup 0,2 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında ve en az bitki sayısı 2,78 adet olarak 0,4 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında gözlenmiştir. Toplam bitki sayısı en fazla 2017,7 adet olup 0,2 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında ve en az 111,33 adet olup 0,4 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında elde edilmiştir. Toplam bitki oluşum sayısı bakımından sırasıyla 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında 160,00; 2017,7; 128,33; 111,33; 217,00; 225,00; adet bitki elde edilmiştir (Şekil 4.3 a,b,c,d,e,f). Kültüre alınan eksplantlarda en az yaş ağırlık 0,15 g olup 0,4 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında ve en ağır bitkiler 3,65 g olup 0,2 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında tespit edilmiştir. Eksplantlarda kuru ağırlık hesaplamasında en hafif bitkiler 0,15 g olup 0,1 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında ve en ağır bitkiler ise 0,70 g olup 0,4 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında elde edilmiştir (Çizelge 4.12). Denemede farklı konsantrasyonlarda BAP uygulaması yapılan bitkilerin protein oranları hesaplanmıştır. En yüksek protein oranı % 29.18 olup 0.5 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında görülmüştür En düşük protein oranı % 20.45 olup 0.2 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında kaydedilmiştir.



Şekil 4.3 Sıvı kültür MS ortamına farklı konsantrasyonlardaki BAP hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkileri (a) 0.1 mg/l BAP (b) 0.2 mg/l BAP (c) 0.3 mg/l BAP (d) 0.4 mg/l BAP (e) 0.5 mg/l BAP içeren ve (f) 0.6 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamda bitki çoğaltımı

4.8. Farklı konsantrasyonlarda kinetin uygulaması

In vitro denemede su mercimeğinin bitki eksplantları (40 adet) farklı konsantrasyonlardaki kinetin hormon ilavesi ile MS sıvı kültür ortamlarında (400 ml) 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır; 4 hafta sonra elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13 Farklı konsantrasyonlardaki kinetin hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkilerine ait varyans analizi

V.K	sd	Eksplant başına bitki sayısı (adet)		Toplam Bitki sayısı (adet)			
		K.O	F	K.O	F		
Kinetin Hormon	5	1367,854	468300**	2189274,356	458200**		
Hata	12	0,003		4,778			
Genel toplam	17						
V.K	sd	Yaş ağırlık (g)		Kuru ağırlık (g)		Protein oranı (%)	
		K.O	F	K.O	F	K.O	F
Kinetin Hormon	5	6,211	44040	0,44	282,622**	683.927	234150**
Hata	12	0,000		0,00		0.006	
Genel Toplam	17						

**p<0.01

Çizelge 4.13’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda sıvı MS kültür ortamına farklı konsantrasyonlardaki BAP hormon uygulamasının bitki oluşum oranı, eksplant başına düşen bitki sayısı, toplam bitki sayısı, yaş ağırlık ve kuru ağırlık bakımından 0,01 düzeyinde önemli farklılık bulunmuştur. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.14’de verilmiştir.

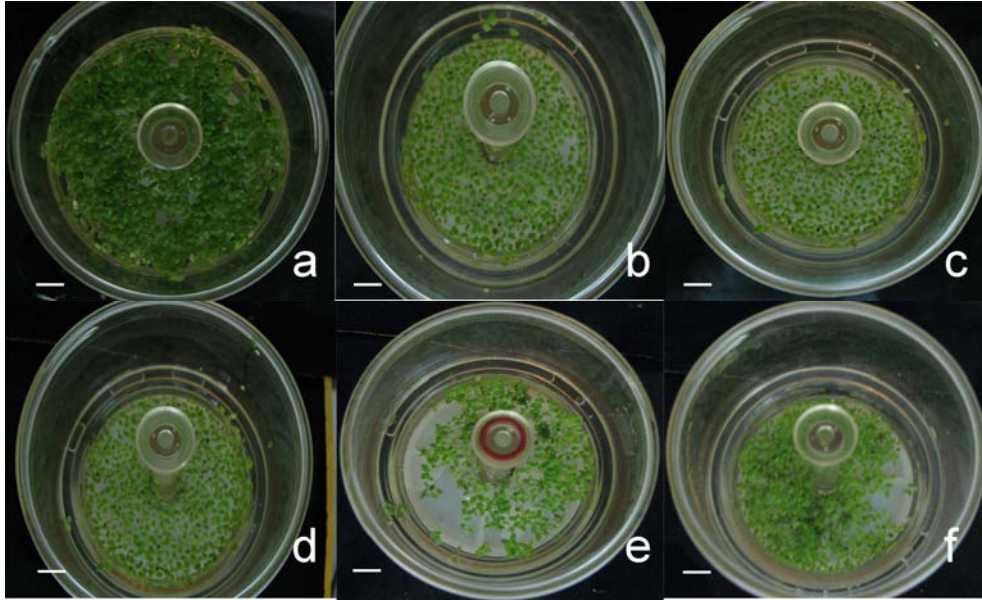
Çizelge 4.14 Sıvı kültür MS ortamına farklı konsantrasyonlardaki kinetin hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkilerine ait Duncan testi sonuçları

Kinetin (mg/l)	Eksplant başına bitki sayısı (adet)	Toplam bitki sayısı (adet)	Yaş ağırlık (g)	Kuru ağırlık (g)	Protein oranı (%)
0,05	57,82a	2313,3a	4,06a	0,19d	24.68b
0,1	9,11b	364,67b	0,90b	0,39a	25.44ab
0,15	2,86f	114,67f	0,24f	0,02e	26.96a
0,2	6,90c	276,33c	0,70d	0,24c	23.18c
0,5	3,56e	142,67e	0,32e	0,19d	26.18a
0,6	6,67d	267,00d	0,79c	0,29b	26.84a

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Denemede tüm kinetin hormon uygulaması yapılan sıvı kültür MS ortamlarında bitki oluşumu gözlemlenmiştir. Bitki oluşumu % 186,67 ve 5683,8 arasında değişmiştir. Eksplant başına düşen bitki sayısı en fazla 57,823 adet olup 0,05 mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamında ve en az 2,86 adet 0,15 mg/l kinetin içeren sıvı Ms ortamında elde edilmiştir. Toplam bitki sayısı en fazla 2313,3 adet olup 0.05 mg/l kinetin içeren MS ortamında ve en az 114,67 adet olup 0.15

mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamında gözlemlenmiştir. Toplam bitki oluşum sayısı bakımından sırasıyla 0,05; 0,15; 0,1; 0,2; 0,5; 0,6 mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamında 2313,3; 114,67; 364,67; 276,33; 142,67 ve 267,00 adet bitki elde edilmiştir (Şekil 4.4 a,b,c,d,e,f). Kültüre alınan eksplantlarda en az yaş ağırlık miktarı 0,24 g olup 0,15 mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamında ve en ağır bitkiler 4,06 g olarak 0,05 mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamında tespit edilmiştir. Ekspantlarda kuru ağırlık hesaplanmasında en hafif bitkiler 0,02 g olup 0,15 mg/l kinetin içeren besin ortamında ve en ağır bitkiler 0,39 g olup 0,1 mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamında gözlemlenmiştir (Çizelge 4.14). Denemede farklı konsantrasyonlarda kinetin uygulaması yapılan bitkilerin protein oranları hesaplanmıştır. En yüksek protein oranı %26.96 olup 0.15 mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamında görülmüştür. En düşük protein oranı %23.18 olarak 0.2 mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamında kaydedilmiştir.



Şekil 4.4 Sıvı kültür MS ortamına farklı konsantrasyonlardaki kinetin hormon uygulamasının su mercimeğinin bitki çoğaltımına etkileri (a) 0.05 mg/l kinetin (b) 0.15 mg/l (c) 0.1 mg/l kinetin (d) 0.2 mg/l kinetin (e) 0.5 mg/l kinetin (f) 0.6 mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamda bitki çoğaltımı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Türkiye’de akvaryum bitkilerinin üretimi sınırlı miktarda yapılmaktadır bu nedenle yurtdışından ithalata ve kayıt dışı bir sektöre dayanmaktadır. Akvatik bitkilerde yapılan doku kültür çalışmaları ise Türkiye dâhil sınırlı sayıda ülkede yapılmaktadır. Bu tez çalışmasında akvatik bitkilerden olan *L. minor* bitkisinin geçici daldırma sistem biyoreaktörler ile çoğaltılması amaçlanmıştır, bu amaç doğrultusunda bitkinin doğal koşullarından daha hızlı sürede ve daha çok miktarda çoğaltımı gerçekleştirilerek üretim sınırları genişletilmeye çalışılmıştır.

5.1 *L. minor* Bitkisinde Yürütülen Çalışmalar

Türkiye’ de daha önceden *L. minor* bitkisiyle ilgili yapılmış çalışmalar çok az sayıda bulunup geçici sistem biyoreaktörlerle mikroçoğaltım çalışması ise bulunmamaktadır. Yapılan çalışmaların geneli ağır metal atıkları gibi su kirliliğine neden olan maddelerin su kaynaklarından *L. minor* bitkisi kullanılarak kirliliğinin ortadan kaldırılması üzerinde gerçekleştirilmiştir (Artan vd 2007, Memmon 2008).

Yüzey sterilizasyonu doku kültür çalışmalarındaki en önemli aşamalardan biridir. Bitkinin yeşil aksamıyla çalışıldığında, yüzey sterilizasyonu için eksplanta uygulanacak olan kimyasalların bitkiye zarar verme olasılığı çok yüksektir. Bu nedenle kullanılacak kimyasalların en az miktarda ve en kısa sürede muamelesi gerekmektedir. Kara bitkilerinin sterilizasyonu ile ilgili literatürde birçok çalışma bulunmasına karşın su bitkilerinin yüzey sterilizasyonu ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Her bitkinin yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için gerekli dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresi farklıdır. Dolayısıyla en uygun dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresinin belirlenmesi önemlidir. Bir eksplantın yüzey sterilizasyonu için en etkili, ancak en düşük dezenfektan dozunun belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle bitkinin sterilizasyon çalışmalarında optimizasyon işlemleri oldukça zordur. Sterilizasyon aşamasında çamaşır suyu ile sterilizasyonun sağlanmasına rağmen eksplantlar zarar görmüşlerdir, buna karşın %10 H₂O₂ ile tüm uygulamalarda bulaşıklık görülmüştür ve artırılmış %20 H₂O₂ uygulamasıyla farklı dk sürelerle farklı oralanlarda steril bitki elde edilmiştir. Sterilizasyon aşamasında yaşanan problemler yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda ortadan kalkmış, %20 H₂O₂ 8 dk muamelesiyle steril eksplantlar elde edilmiştir.

Bu çalışmada yüzey sterilizasyonu için farklı konsantrasyonlarda ticari çamaşır suyu ve H₂O₂ kullanılmış olup en uygun dezenfektan dozu ve uygulama süresi belirlenmeye çalışılmıştır. Yüzey sterilizasyon işleminden sonra steril olan bitkilerle diğer çalışmalara devam edilmiştir.

Bu çalışmada sterilizasyona yönelik ticari çamaşır suyu ile yapılan denemede; çamaşır suyunun %20 ve 10'luk konsantrasyonlarında 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 dk bekletme uygulamaları ile yüzey steril edilmiştir. H₂O₂ ile yapılan denemede ise %20 ve 10'luk H₂O₂ konsantrasyonlarında 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 dk muamelesiyle yüzey steril edilmiştir. Ticari çamaşır suyu ile yapılan çalışmalarda bulaşıklığa rastlanmazken bitkilerin deneme sonunda klorofil parçalanması sonucunda tamamen beyaz olduğu ve tüm eksplantların zarar gördüğü gözlemlenmiştir. H₂O₂ ile yapılan denemede ise 4 hafta sonunda gözlemlenen eksplantlarda % 10'luk konsantrasyonunda tüm uygulamalarda bitkilerde bulaşıklık görülmüştür. H₂O₂ % 20 'lik konsantrasyonunda ise bulaşıklık oranı düşmüştür ve bitki materyali zarar görmemiştir. Buna rağmen % 20 H₂O₂ ile farklı sürelerde bulaşıklık oranında farklılıklara rastlanmıştır. En iyi sonuç %20 H₂O₂ 8 dk süre sterilizasyon ile elde edilmiştir. Cook vd. (1989) *Kosteletzkya virginica* tohumlarının yüzey sterilizasyonunda sülfirik asit ve etanol kullanmışlardır. Bir saat H₂SO₄ ile muamele edilen tohumlar, çeşme suyunda durulanmış ve % 95'lik etanolde 10 dakika bekletilmiştir. Tohumlar gece boyunca steril saf suda bekletildikten sonra yine % 95'lik etanolde 5 saniye bekletilmiş ve kurutulmuştur. Straub vd (1989) tohumların yüzey sterilizasyonunda çamaşır suyu veya ethanol kullanılmıştır. Tohumlar 15 dakika çamaşır suyunda bekletildikten sonra 3 defa steril saf su ile durulanmıştır. Diğer bir yöntemde ise, % 95' lik ethanolde 15 dakika bekletme ve durulamadan sonra kurutma uygulanmıştır. Agrawal ve Ram (1995), su kestanesi (*Trapa sp.*)'nin *in vitro* çimlenmesi ve mikroçoğaltımı konusunda çalışmışlardır. Yüzey sterilizasyonundan sonra embriyolar NBS (Nitsch'in temel yarı katı ortamı) ortamına yerleştirilerek bitkiler elde edilmiştir. Simon ve Helliwel (1998), saf su ile klorofil a'nın oluşturduğu düzeyde pH 8 den düşük olduğunda klorofil a'nın hızlı bir şekilde fiofitin a'ya dönüştüğü buna karşın pH 8 den büyük olduğu durumda ise hidrolize uğrayarak fitol grubundan ayrıldığı saptanmıştır. Araştırmacılar bitkilerdeki klorofilin bozulmasının fioforbitten sonrada devam ederek renksiz ürünlere kadar sürdürdüğünü göstermektedir. Sonuçta kimyasal sitoplazma membranı etkilenmektedir ve yeniden dönüştürülemez enzim aktivitesi ile hücrelerin metabolizmalarında biyosentetik değişim ve fosfolipit bozulması meydana gelmektedir. Bu yüzden NaOCl bakteri ve mikroorganizmalara karşı etkili olmaktadır.

Bu çalışmada yüzey sterilizasyonu yapılan bitkilerde uygun pH aralığının belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bitki için pH optimizasyonun yapılması uzun zaman almıştır. Optimizasyonun yapılabilmesi amacıyla farklı pH derecelerinde (pH 5, 6, 7, 7.23, 8 ve 9) bitkiler distile suda Erlen Meyerler içerisine alınarak çalkalamalı ve çalkalamasız ortamda 1 hafta süreyle gözlemlenmişlerdir. Materyal çalkalamalı ortam için 190 rpm ve 28°C'de karanlık ortamda çalkalayıcı içersine yerleştirilmiştir. Çalkalamasız ortam için ise 1 hafta süresince Erlen Meyerler içerisnde iklim odasında bekletilmiştir. Sonuç olarak bitki için en uygun pH aralığının 7.23 de çalkalamalı ortamda olduğu saptanmıştır. Denemede pH 8 ve 9 'de bitki sayısının pH 7.23 e göre daha az olduğu, pH 7.23 den düşük pH derecelerinde ise bitkinin gelişemediği ve çoğaltımının gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. Bu nedenle optimum pH aralığının bitki çoğaltımı üzerinde etkisi olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde Kim ve Jang (2004) *Drosera peltata* bitkisinin mikroçoğaltım çalışmalarında pH 3.7, 4.7, 5.7 ve 6.7 değerleri ve 3% (w/v) sukroz içeren 1/2 MS ortamı kullanılmıştır. Bitkinin mikroçoğaltımı için en uygun değeri pH 5.7 olarak belirlemişlerdir Perica and Berljak (1996)'da *Drosera spatulata* Labill bitkisinin mikroçoğaltımında pH 'ın etkili bir faktör olduğunu saptamışlardır. Simola (1978) *Drosera rotundifolia* L. bitkisinin mikroçoğaltımında en etkili değerin pH 6.00 olduğunu tespit etmişlerdir.

Bitki için uygun pH derecesi belirlendikten sonra bitkilerin GDS biyoreaktör içersinde hızlı çoğaltımı için kullanılacak olan sıvı kültür ortamında uygun MS ve şeker konsantrasyonlarının saptanması için çalışmalar yapılmıştır. GDS biyoreaktörler içinde ¼ MS, ½ MS, MS ve 30 gr sukroz içeren ve içermeyen ortamlarda kültüre alınmıştır. İlk başta biyoreaktörler içersinde 300 ml ve 350 ml sıvı kültür ortamı kullanılmıştır ancak 2 hafta sonunda bitkilerin tamamen beyazlaştığı görülmüştür. Bu miktarlarda sıvı kültür ortamında bitkilerin yeterli besini alamadıklarından gelişimlerinin yetersiz olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle sıvı kültür ortamının miktarı 410 ml olarak artırılmıştır. Sıvı kültür ortamının optimizasyon sonuçlarına göre en iyi bitki çoğaltım yüzdesi (%90) ve toplam bitki oluşum sayısı (38.00 adet) MS/4 şekerli sıvı kültür ortamında saptanmıştır. Kullanılacak olan sıvı kültür ortamının içerdiği kimyasal maddelerin ve konsantrasyonlarının, bitkinin mikroçoğaltımında etkili olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde Houllou-Kido vd. (2009) *Nopalea cochenilifera* bitkisinin heterotrofik ve fotoototrofik ortamda mikroçoğaltımını yapmışlardır. Mikroçoğaltım için kullanılacak MS ortamına % 3 (w/v) sukroz, % 0.8 (w/v) agar ,1.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA ilave etmişlerdir. Deneme sonunda sukroz içeren

ortamlarda içermeyen ortamlara göre 10 kat daha fazla mikroçoğaltım gerçekleştiği görülmüştür.

Sıvı kültür ortamının şeker ve MS konsantrasyonları belirlendikten sonra bitkinin hızlı çoğaltımı üzerine farklı dozlarda TDZ, BAP ve kinetin uygulamalarının etkileri saptanmıştır. Çalışmalarda farklı oranlarda (0,05–0,6mg/l) kinetin uygulanmasında, BAP ve TDZ uygulamalarına göre daha fazla eksplant başına düşen bitki sayısı (57,823 adet) ve toplam bitki sayısı (2313,3 adet) elde edildiği gözlemlenmiştir. Elde edilen bitki sayısı ve çoğaltım oranı yüksek olmasına karşın bitkilerin mat renkte ve sağlıklı oldukları görülmüş ve bitkilerde hiperhidrisiti olduğu saptanmıştır. Diğer bir çalışmada ise farklı dozlarda (0,1–0,6 mg/l) TDZ uygulaması yapılmış ve en fazla bitki sayısı (949,67 adet) 0,1 mg/l TDZ içeren sıvı kültür ortamında kaydedilmiştir. TDZ ilavesiyle yapılan hızlı çoğaltım çalışmasında bitki çoğaltım sayısı ve eksplant başına düşen bitki yüzdesi yüksek olmasına karşın, farklı dozlardaki BAP uygulamasına göre daha sağlıklı ve yaprak boyutları daha küçük bitkiler olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra sıvı kültür ortamlarına farklı dozlarda (0,1–0,6 mg/l) BAP hormon uygulaması yapılmıştır. Denemede en fazla eksplant başına düşen bitki sayısı (50,44 adet) ve en fazla toplam bitki sayısı (2017,7 adet) 0,2 mg /l BAP konsantrasyonda elde edilmiştir. Bitkilerin tamamı yeşil ve sağlıklıdır. Ayrıca bitkilerde hiperhidrisitiye rastlanmamıştır.

Tez kapsamında uygulanan farklı dozlardaki bitki büyüme düzenleyicilerin (BAP, kinetin ve TDZ) bitki mikroçoğaltımı üzerinde etkileri olduğu saptanmıştır. Hormon ilavesi olmadan yapılan mikroçoğaltım denemelerinde herhangi bir hiperhidrisitiye rastlanmazken TDZ ve kinetin farklı konsantrasyonlarında bitkilerde hiperhidrisiti gözlemlenmiştir. Çoğaltımı gerçekleştiren bitkilerde hiperhidrisiti gözlenmesinin nedeni, sıvı kültür ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerin varlığına ve konsantrasyonlarına bağlanmaktadır.

Bu çalışmada mikroçoğaltımı yapılmış kurutulmuş bitkiler üzerinde farklı sitokinin konsantrasyonlarının bitkinin protein oranına etkilerinin belirlenmesi amacıyla bitkide Kjeldahl yöntemi ile protein ve azot tayini gerçekleştirilmiştir. Literatür taramasında bu yöntemle daha önce *L.minor* bitkisinin protein ve azot tayini yapılmadığı görülmüştür. Denemelerde bitki büyüme düzenleyicilerin eklendiği ortamlardan alınan bitki örnekleri ile yapılan protein tayininde, 0,5 mg/l BAP uygulaması sonucu elde edilen bitkilerde %29,18 protein miktarı, 0,5 mg/l TDZ uygulaması sonucunda % 27,72 oranında protein miktarı ve 0,15 mg/l kinetin uygulaması sonucunda % 26,96 oranında protein miktarı saptanmıştır. Stewart vd (1952) havuç (*Daucus carota* L.) ile yapılan *in vitro* çalışmada biyoreaktör

içerisinde gelişen bitkilerde oksijen eksikliğinden dolayı kök uzamalarında olumsuz etki saptamışlardır. Bu sorunu gidermek ve ortamdaki O₂ dengesini sağlamak amacıyla 'Auxophyton' içeren biyoreaktörlerde eksplantlar kültüre alınarak sürekli hava girişi sağlanmış olup kök uzamasında olumlu etkiler gözlenmiştir. Bitkide yapılan yaş ağırlık ölçümlerinde 20 gün sonunda, bitkinin ağırlığının 2,6 kat arttığı kaydedilmiştir. Escalant vd (1994) muz bitkisinin geçici daldırma sistem biyoreaktörler ile mikroçoğaltımını gerçekleştirmiş ve buradan elde edilen sonuçları, muz bitkisinin agar kullanılan katı besin ortamında yapılan mikroçoğaltım deneme sonuçları ile karşılaştırmışlardır. GDS biyoreaktör içersinde kültüre alınan eksplantlarda 2 ay sonra oluşan somatik embriyoların sayısı 1375 adet kaydedilirken agar içeren katı ortamdaki embriyo sayısının 450 olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak biyoreaktör uygulaması ile yapılan mikroçoğaltımda bitki oluşum yüzdesi, agarlı ortamda gerçekleştirilen mikroçoğaltımdaki bitki oluşum yüzdesinden 3,05 kat daha fazla olduğu kaydedilmiştir. Denemede 6 ay sonunda yarı katı besin ortamında yapılan mikroçoğaltımla elde edilen sonuçlara kıyasla GDS biyoreaktörlerle yapılan mikroçoğaltımda % 60 -70 oranında daha fazla somatik embriyo üretimi sağlanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada *L. minor* bitkisinin geçici daldırma sistem biyoreaktörler ile çoğaltımı başarıyla gerçekleştirilmiş olup bitki doğal ortamından daha kısa sürede ve daha fazla sayıda üretilmiştir. Üretim aşamasında oluşabilecek olumsuz riskler laboratuvar koşullarında tamamen ortadan kaldırılmıştır ve kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikroçoğaltımı sırasında kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin bitki protein oranına olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlenmiş ve bitkinin protein oranında artışa sebep olduğu görülmüştür.

Son yıllarda akvatik bitkilerle ilgili çalışmalar hız kazanmış olsa bile özellikle Türkiye'de bu alandaki çalışmalarla ilgili önemli bir açığın olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle akvatik bitkilerle özellikle doku kültür çalışmaları çok önem kazanmaktadır. *L. minor* bitkisiyle yapılan bu çalışmanın, akvatik bitkilerdeki hızlı ve yoğun üretime katkı sağlayacağı ve ileride yapılacak olan akvatik bitki biyoteknolojisi çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir

KAYNAKLAR

- Agrawal, A. and Mohan Ram, H.Y. 1995. *In Vitro* Germination and Micropropagation of Water Chestnut (*Trapa* sp.). *Aquatic Botany*, 51; 135-146.
- Andersone, U. and Levinsh, G. 2004. Regulation of cytokinin response-competence by cold treatment of mature *Pinus sylvestris* tissues *in vitro*. *Acta Universitatis Latviensis, Biology*, 676; 143-148.
- Anthony, J.M., Senaratna,T., Dixon, K.W. and Sivasithamparam, K. 2004. Somatic embryogenesis for mass propagation of Ericaceae – a case study with *Leucopogon verticillatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76; 137–146.
- Artan R.O.2007.Ağır metal içeren atık suların ileri arıtımında su mercimeği (*lemna* sp) bitkisinin kullanılması. Yüksek lisans tezi. Çukurova Ünversitesi. Fen bilimleri enstitüsü. Adana
- Artan.O., Ağır metal içeren atık suların ileri arıtımında su mercimeği (*lemna* sp.) bitkisinin kullanılması.Çukurova Üniversitesi 2007.
- Babaoğlu M. 2002 bitki doku kültürü teknikleri. SÜ ziraat fakültesi yayınları
- Babaoğlu, M. Gürel, E., Özcan, S.). *Bitki Biyoteknolojisi, I- Doku Kültürü ve Basımevi*, s. 374, Konya.
- Bird, K. T. and Smith, J. J. 1994. Development of a medium and culture system for *in vitro* propagation of the seagrass *Halophila engelmannii*. *Can. J. Bot.*, 72; 1503-1510.
- Bornman, C. 1994. Micropropagation and somatic embriyogenesis. In: Hayward MD,
- Bosemark No and Romagasa I (eds), *Plant Breedibg: Principles and Prospects*, pp. 246–260, Chapman and Hall, London.
- Chen, P.W.S., Liao, L.J., Chen, C.Y. and Huang, K.U. 2001. Kinetin, gibberellic acid and sucrose affect vase life in *Oncidium* spp..*Acta Bot.Gallica*, 148 (3); 177-181.
- Cirik, S. Cirik, Ş. ve Dalay, M. C. 2001. Su bitkileri II. (İçsu Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi, Yetiştirme Teknikleri). Ege Üniv. Su Ürünleri Fakültesi Yay. No: 61. İzmir.
- Cirik, S. Cirik, Ş. ve Dalay, M. C. 2001. Su bitkileri II. (İçsu Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi, Yetiştirme Teknikleri). Ege Üniv. Su Ürünleri Fakültesi Yay. No: 61. İzmir.
- Cook, D. A., Decker, D. M. and Gallagher, J.L. 1989. Rejuvenation of *Kosteletzkya virginica* (L.) Presl. (Seashore Mallow) from callus cultures. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 17; 111-119.
- Cox K.M., Sterling D.J., and Regan J.T.2006.Glycan optimization of a human monoclonal antibodyin the aquatic plant Lemna minor. *Nature Biotechonogy*,12,1591–1597
- Das, D. K., Prakash, N. S. and Sarin, B. N. 1999. Multiple shoot induction and plant regeneration in litch (*Litchi chinensis* Sonn.). *Plant Cell Reports*, 18; 691–695.

- Davis, P.H. 1984. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 8, Edinburg
- De Jong, A.J., Schimdt, E.D.L. and De Veries, S.C. 1993. Early events in higher- plant embriyogenesis. Plant Mol. Biol., 22; 337-367.
- Er, C. ve Canpolat, N. 1992. Bitki ıslahında doku kültürleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı-Ankara.
- Escalant J-V., Teisson C., Cote F. (1994). Amplified somatic embriyogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (Musa spp). in Vitro Cell. Dev. Biol. 30: 181-186.
- Etienne.H., Berthouly. M, Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 215–231, 2002
- Geber G. 1986. Vienna, Austria, Landolt, p. 137.
- Gökçek C.K., Yılmaz E., Akyurt İ., 2005. Farklı oranlarda su mercimeği (*Lemna minor*) ilave edilmiş ticari rasyonların *Capoeta damascina* (valanciennes, 1842) nin büyüme performansı ve yem değerlendirme oranı üzerine etkisi.
- Gönülşen, N. 1987. Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. T.O.K.B., Ege Tarımsal Araş. Ens. Müd. Yayın No: 78, 140 p., İzmir.
- Gönülşen, N. 1987. Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. T.O.K.B., Ege Tarımsal Araş. Ens. Müd. Yayın No: 78, 140 p.
- Gönülşen, N. ve Özcan, Ö. 1983. Asma (*Vitis* spp.)' nin doku kültürü ile üretilebilmesi üzerinde araştırmalar. TÜBİTAK, TOAG, VII. Bilim Kongresi, 6-10 Ekim 1980, 291-297.
- Guillermo, J. Martinez, Pastur, and Miriam, E. Arena. 1999. *In Vitro* Propagation of Juvenile *Nothofagus leoni* Espinosa (Fagaceae). J. For. Res., 4; 295-298.
- Güner, H. 1985. Hidrobotanik, Ege Univ. Fen Fak. Yayınları. 91; 117
- Gürel, E. 1997. Callus and root development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) . Variability and variety, plant and organ level. Turkish j. Bot., 21; 131-136.
- Gürel, E. ve Türker, A.U. 2001. Organogenesis. (Editörler: Babaoğlu, M. Gürel, E., Özcan, S.), Bitki Biyoteknolojisi, I- Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, s. 374, Konya.
- Gürel, E. ve Türker, A.U. 2001. Organogenesis. (Editörler: Babaoğlu, M. Gürel, E., Özcan, S.), Bitki Biyoteknolojisi, I- Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi
- Hammouda O., Geber A. and Abdel-Hameed M.S. 1995. Enzyme and Microbial Technology, 17, 317-323
- Hang D.T., Lai N., Rodriguez L. and Ly, J. 1997. Livestock Research for Rural Development, 9
- Haslara, M., Sinkler, C.A., Wolseley, P.A. 1982. British Water Plants Field Studies .4; 243-351
- Haustein A., Gilman R., Skillicorn P. 1990. Brit. J. Nutr., 68, 329-335.

- Houllou-Kido L.M., Costa A.F., Lira M.A., Farias I. and Santos D.C., Silva K.S., Rivas R., Dias A.L.F. and Alves G.D. 2009. Proc. VIth IC on Cactus and Cochineal . Eds.: F.A.P. Campos et al. Acta Hort. 811: 309-314.
- Husain, M. K., Anis, M. and Shahzad, A. 2007. *In vitro* propagation of Indian Kinom (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 43; 59–64.
- Jain S.K., Vasudevan P. and Jha N.K.1990. *Water Res.*, 24, 177
- Kane, M. E., Gilman, E.F., Jenks, M. A. and Sheehan, T. J. 1990. Micropropagation of the Aquatic Plant *Cryptocoryne lucens*. *Hortscience*, 25 (6); 687-689.
- Kane, M. E., Sheehan, T. J. and Ferwerda, F. H. 1988. *In vitro* Growth of American Lotus Embryos. *Hortscience*, 23 (3); 611-613.
- Kim KW, Jang GW, 2004. Micropropagation of *Drosera peltata*, a *Tuberous Sundew*, by *Shoot Tip Culture*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 211–214.
- L'assainissement. Experimentation a partir de Plantes Aquatiques Superieures ,19; 378/379
- Lenge R.A.1990. *Nutr. Res. Rev.*, 3, 277-303
- Mardanov A.,Nikolai V., Boris R., Kuznetsov H., Andrey S., Antonov T.,V. 2008. Springer Science,66; 555–564 *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37: 349–353, May-June 2001 Society for In Vitro Biology
- Martin I.,Went D.,The role of bioreactors in tissue engineering.trends in biotechnology 22.80.86
- Martin, J.F.1978. Le Lagunage en Traitement Tertiaire, La Technique De L'eau et de
- Memmon A.2008.Bitki, Alg ve Mikroorganizmalarla Petrol Hidrokarbon Kaynaklı Kirliliğin Ortadan Kaldırılması. *Bilim ve Teknik*, Ocak sayısı;7-8.
- Oron G., Res. J. Water Pollut.1990. *Control Fed.*, 62 (5), 692-696
- Örencik, S., Karatüfenkçi, M., Güreşçi L.U.1983. Bazı Kirleticilerin Su Mercimeklerinden (Lemnaceae) *Lemna gibba*'da Klorofil Miktarına Etkisi, Atatürk Univ. Fen Fak. Dergisi Cilt I, 1: 461–467
- Öztürk, M. 2002. Akvaryum Bitkisi *Ludwigia sp*'nin *In Vitro* Koşullarda Çoğaltımına Farklı Oranlardaki Büyüme Düzenleyicilerin Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Su ürünleri Anabilim Dalı. Ankara.
- Panigrahi, J., Mishra, R. R. and Behera, M. 2006. *In vitro* multiplication of *Asteracantha longifolia* (L.) Nees- a medicinal herb. *Indian Journal of Biotechnology*, 5 (4); 562-564.
- Perica MC & Berljak J (1996) *In vitro* growth and regeneration of *Drosera spatulata* Labill on various media. *Hortscience* 31: 1033–1034.

Purohit, S.D. and Singhvi, A. 1998. Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. *Scientia Horticulturae*, 76; 219-229.

Rusoff L.L., Blakeney E. W., Culley Jr. D.D.1980. *Agric. Food Chem.*, 28, 848-850

Saygıdeğer S.1996.Lemna Gibba ve Lemna Minor,(Lemnaace)'nin morfolojik anatomik, ekolojikve fizyolojik özellikleri. *Ekoloji çevre dergisi*, 18; 8-11

Simola LK (1978) The effect of several amino acids and some inorganic nitrogen sources on the growth of *Drosera rotundifolia* in long and short-day condition. *Z. Pflanzenphysiol.* 90: 61-68

Simon, D. and Helliwell, S. 1998. Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae, *Wat. Res.*, 32, 2220-2223.

Straub, P. F., Decker, D. M. and Gallagher, J. L. 1988. Tissue culture and long-term regeneration of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 15; 73-78.

Straub, P. F., Decker, D. M. and Gallagher, J. L. 1989. Tissue culture and Rejeneration of *Distichlis spicata* (Gramineae). *Amer. J. Bot.*, 76 (10); 1448-1451.

Vatta G., Rota R., Boniardi N. and Nano G.1995. *The Chemical Engineering Journal*, 57; 37-48.

Wang W.C., Freemark K.1995.*Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 30, 289-301.

Yamamoto t., Rajbhandari N.,Xiaohong L.,Bergmann B.,Nishimura Y.,Stomp A.2001. *Society for In Vitro Biology. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 37;349-353

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad: Zehra

Soyad: Yenice

Uyruğu: T.C

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 19.01.1984

Medeni Hali: Bekâr

EĞİTİM BİLGİLERİ

1999- 2002 Ankara Gazi Anadolu Lisesi, Ortaokul-Lise

2002- 2007 Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Lisans

2007- Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek lisans