

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**AKVARYUM BİTKİSİ *Rotala macrandra'nın in vitro* KOŞULLARDA
HIZLI ÇOĞALTIMI VE GEN AKTARIMI**

Şule ŞUMLU

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2009**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

AKVARYUM BITKİSİ *Rotala macrandra*'nın *in vitro* KOŞULLARDA
HIZLI ÇOĞALTIMI VE GEN AKTARIMI

Şule ŞUMLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan Hüseyin ATAR
Eş Danışman: Doç. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Rotala macrandra Türkiye'de akvaryum bitkisi olarak kullanılan ve genellikle yurt dışından değişik şartlarda getirilen bir su bitkisidir. Bu çalışmada *R. macrandra* bitkisinin uç, 1'inci koltukaltı ve 2'inci koltukaltı meristemi ile yaprak, 1'inci ve 2'inci boğum arası, eksplantlarından değişik oran ve kombinasyonlarda sitokin ve oksin içeren agar ve jelrit ile katılaştıran ortamlarda ayrıca sıvı MS besi ortamında sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Yapılan çoğaltım çalışmasında en fazla sürgün rejenerasyonu (27.33 adet) 1'inci boğum arası eksplantında 0.25mg/l BAP-0.50 mg/l NAA içeren MS besi ortamda elde edilmiştir. Buna karşı sıvı kültürde ise 0.25 mg/l BAP-0.50 mg/l NAA ve 0.50 mg/l BAP-0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında birer eksplant üzerinde sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Daha sonra yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantlarıyla *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 P35 GUS-INT ve LBA 4404pRGGbar hatları kullanılarak gen aktarım çalışması yapılmıştır. Her iki hatta da değişik oranda GUS pozitif transgenik aday bitkiler elde edilmiştir. Elde edilen tüm rejenere olmuş ve transgenik aday bitkileri akvaryum ortamına adapte edilmiştir.

Nisan 2009, 129 sayfa

Anahtar Kelimeler: Akvaryum bitkisi, *Rotala macrandra*, çoğaltım, *in vitro*, bitki büyüme düzenleyicileri, adaptasyon, *Agrobacterium tumefaciens*.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

In vitro MICRO PROPAGATION AND GENETIC TRANSFORMATION OF AQUARIUM PLANT *Rotala macrandra*

Şule ŞUMLU

University of Ankara
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries and Aquaculture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan Hüseyin ATAR

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Rotala macrandra is widely used as aquarium plant in Turkey and is generally brought from abroad through various means. This study reports *in vitro* regeneration of *R. macrandra* using leaf, first internode, 2nd internode, shoot meristem, 1st node and 2nd node on agar and gelrite solidified or liquid MS medium containing variants of cytokinins and auxins. Maximum shoot regeneration (27.33) was recorded on agar solidified MS medium containing 0.25 mg/l BAP-0.50 mg/l NAA. Contrarily, shoot regeneration in liquid culture was recorded on two explants only on MS medium containing 0,25 mg/l BAP - 0,50 mg/l NAA and 0,50 mg/l BAP - 0,50mg/l NAA. Genetic transformation was carried out with GV2260 P35 GUS-INT and LBA 4404 pRGGbar strains of *Agrobacterium tumefaciens*. The results showed variable percentage of GUS positive transgenic plants from both bacterial strains. All regenerated and putative transgenic plants were acclimatized to external conditions and transferred to the aquariums.

April 2009, 129 pages

Key Words: Aquarium plant, *Rotala macrandra*, propagation, *In vitro*, plant growth regulators, adaptation, *Agrobacterium tumefaciens*.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında yardım ve desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren, danışman hocalarım, Sayın Doç. Dr. Hasan Hüseyin ATAR'a (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü) ve Sayın Doç. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'a (Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü) çalışmalarımın her aşamasında yardım ve desteğini gördüğüm Tarla Bitkileri Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü), Sayın Yrd. Doç. Dr. Süleyman BEKCAN'a (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü) ve Su Ürünleri Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Serap PULATSÜ'ye (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü) saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Sahil Güvenlik Komutanlığı Plan Prensipler Başkanı Sayın Dz.Kur.Kd.Alb. Hulusi ULUDAĞ ve Strj. ve And. D. Bşk. Vek. Sayın S.G.Kur.Yb. A.Necdet DOLUEL'e tezimin yazımı sırasında göstermiş olduğu anlayış ve destekten dolayı teşekkür ederim. Tüm arkadaşlarıma çalışmalarındaki doğrudan veya dolaylı katkılarından dolayı teşekkür ederim. Birçok fedakarlık göstererek eğitimimi gerçekleştirmemi sağlayan değerli annem ve babam, Esmâ ve Semih ŞUMLU'ya ve çalışmalarım boyunca gösterdikleri anlayıştan dolayı, ablam Serap ŞUMLU ve kardeşim Esra ŞUMLU'ya en derin duygularla teşekkürler ederim.

Şule ŞUMLU

Ankara, Nisan 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tath Su Bitkilerinin Sınıflandırılması	2
1.1.1 Clayton <i>et al.</i> (2000)'e göre tath su bitkileri grupları	2
1.1.2 Cirik vd (2001)'e göre sucul ve bataklık ortamlardaki bitki grupları.....	4
1.2 Tath Su Bitkilerinin Önemi.....	4
1.3 Akvaryum Bitkilerinin Yetiştirme Teknikleri.....	6
1.4 <i>In vitro</i> Üretim.....	8
1.4.1 Organogenesis.....	9
1.4.2 Meristem kültürü.....	10
1.4.3 Doku kültürleriyle hızlı çoğaltım.....	11
1.5 <i>Agrobacterium</i> Aracılığıyla Gen Aktarımı.....	11
1.4 Akvaryum Bitkilerinin Yetiştirme Teknikleri.....	13
1.6 <i>Rotala</i> Bitkisinin Genel Özellikleri.....	15
2. KURAMSAL TEMELLER	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1 Materyal.....	31
3.1.1 Bitki materyali.....	31
3.1.2 Deneme yeri.....	31
3.1.3 <i>In vitro</i> çalışmalarındaki büyüme ortamları ve kültür koşulları.....	31
3.1.4 Bitki büyüme düzenleyicileri.....	32
3.1.5 <i>Agrobacterium</i> bakteri materyali.....	33
3.1.6 Antibiyotikler.....	34
3.1.7 Kullanılan aletler ve kaplar.....	34

3.2	Yöntem.....	36
3.2.1	Eksplant yüzey sterilizasyonu.....	35
3.2.2	Eksplant izolasyonu.....	35
3.2.3	Adventif sürgün rejenerasyonu.....	35
3.2.4	Mikroçoğaltım.....	36
3.2.5	<i>Agrobacterium</i> bakteri kültürünün saflaştırılması ve büyütülmesi	36
3.2.6	Bakterinin uzun süreli korunması.....	36
3.2.7	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı.....	36
3.2.8	Histokimyasal GUS analizi.....	37
3.2.9	Elde edilen bitkilerin akvaryum koşullarına adaptasyonu.....	37
3.2.10	İstatistiki analizler	38
4.	BULGULAR.....	39
4.1	<i>R. macrandra</i> Eksplantlarının Yüzey Sterilizasyonu.....	39
4.1.1	Çamaşır suyu ile yüzey sterilizasyonu.....	39
4.1.2	PPM ile yüzey sterilizasyonu.....	41
4.1.3	PPM ve çamaşır suyu ile yapılan yüzey sterilizasyonu.....	44
4.2	Adventif Sürgün Rejenerasyonu Aracılığıyla Hızlı Çoğaltım.....	51
4.2.1	Agar ile katılaştırılan ortamlarda yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna BAP ve NAA'nın etkisi.....	51
4.2.2	Gelrit katılaştırılmış ortamlarda yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna BAP ve NAA'nın etkisi.....	55
4.2.3	Agar ile katılaştırılan ortamlarda 1'inci boğum arası eksplantında sürgün rejenerasyonuna BAP ve NAA'nın etkisi...	57
4.2.4	Gelrit ile katılaştırılan ortamlarda 1'inci boğum arası eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu.....	60
4.2.5	Agar içeren ortamlarda 2'inci boğum arası eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu.....	62
4.2.6	Gelrit ile katılaştırılmış ortamlarda 2'inci boğum arası eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu.....	66
4.3	<i>In vitro</i> Koşullarda <i>R. macrandra</i> Bitkisinin Hızlı Çoğaltım.....	75
4.3.1	Agar ile katılaştırılmış ortamlarda uç meristemi eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu.....	68
4.3.2	Gelrit ile katılaştırılan ortamlarda uç meristemi eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu.....	71
4.3.3	Agar ile katılaştırılan ortamlarda farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'inci koltukaltı meristemi eksplantında ile sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	74

4.3.4	1'inci koltukaltı meristeminde gelrit ile katılaştırılan ortamlarda BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu	77
4.3.5	Agar içeren ortamlarda 2'inci koltukaltı meristemi eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu.....	79
4.3.6	Gelrit ile katılaştırılan ortamlarda 2'inci koltukaltı meristemi eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu	82
4.3.7	Agar ile katılaştırılan ortamlarda uç meristemi. 1'inci ve 2'inci koltukaltı meristemi eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu	84
4.3.8	Kinetin ve NAA ile hızlı çoğaltımı	87
4.4	<i>R. macrandra</i> Bitkisinden Sürgün Rejenerasyonu ve Hızlı Çoğaltımdan Elde Edilen Bitkilerin Adaptasyonu	91
4.5	Sıvı Kültürde Sürgün Rejenerasyonu.....	94
4.6	<i>A. tumefaciens</i> ile <i>R. macrandra</i> 'nın Gen Aktarımı.....	96
4.7	Transgenik Adayı <i>R. macrandra</i> Bitkilerinin Akvaryum Ortamına Alıştırılması.....	111
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	112
	KAYNAKLAR	120
	ÖZGEÇMİŞ.....	128

SİMGELER DİZİNİ

BAP	⁶ Benzilaminopurin
2, 4-D	2, 4-Diklorofenoksi Asetik Asit
ÇS	Çamaşır Suyu
GA ₃	Giberellik Asit
g, mg, µg	Gram, Miligram, Mikrogram
HCl	Hidroklorik Asit
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
IBA	Indol Bütirik Asit
IAA	Indol-3-Asetik Asit
K.O.	Kareler Ortalaması
l, ml, µl	Litre, Mililitre, Mikrolitre
µM	Mikro Molar
cm	Santimetre
MS	Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
MSO	Hormonsuz Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
NAA	α- Naftalen Asetik Asit
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
NaOH	Sodyum Hidroksit
N	Normal
NBL	Nitsch'in Temel Sıvı Ortamı
NBS	Nitsch'in Temel Yarı Katı Ortamı
PIS	Sürekli Daldırma Yöntemi
PPM [®]	Plant Preservative Mixture
S.D.	Serbestlik Derecesi
SH	Schenk and Hildebrandt Temel Besin Ortamı
TDZ	Thidazuron (1 Phenyl 3-(1, 2, 3-thiazol 5yL) urea)
TIS	Aralıklarla Daldırma Yöntemi
WPM	Woody Plant Medium (Ağaçsı bitkiler ortamı)
V.K.	Varyasyon Kaynakları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Clayton <i>et al.</i> (2000) tarafından yapılan su bitkileri sınıflandırması.....	2
Şekil 1.2	<i>In vitro</i> bitki rejenerasyonunda görülen organogenesis çeşitleri.....	10
Şekil 1.3	Bakteriden Bitki Hücrelerine T-DNA Aktarımının Mekanizması (Özcan ve Özgen 1996).....	14
Şekil 1.4	<i>Rotala macrandra</i> bitkisinin akvaryumda görünüşü (Anonymous 2008e).....	17
Şekil 4.1	Steril olmayan bitkiler üzerinde gelişen mantar ve bakteriler...	40
Şekil 4.2	Gövde eksplantları üzerinde gelişen fungus bulaşığı.....	42
Şekil 4.3	<i>R. macranda</i> bitkisinin yüzey sterilizasyonu	45
Şekil 4.4	0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi gelişme gösteren sürgünler.....	52
Şekil 4.5	a.c. 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS içeren ortamdan, b.d. 0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS içeren ortamdan elde edilen fenotip bakımdan kıvrık sürgünler.....	53
Şekil 4.6	0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilen bitkiler.....	56
Şekil 4.7	<i>R. macrandra</i> bitkisinde 0.25 mg/l BAP ve 0.75 mg/l NAA içeren MS ortamında en uzun sürgün elde edilen bitkilerden bir görünüm	57
Şekil 4.8	0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilen bitkiler.....	61
Şekil 4.9	0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilen bitkiler.....	63
Şekil 4.10	0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilen bitkiler.....	69
Şekil 4.11	En uzun sürgün taşıyan 0.25 mg/l BAP - 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamından gelişen bitkilerin görüntüsü ortamında büyütülmüş bitkiler.....	70
Şekil 4.12	Uç meristemi eksplantında 0.25 mg/l BAP - 0.00 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilen bitkiler.....	72
Şekil 4.13	0.25mg/ BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamda en fazla gelişim gösteren bitkiler.....	75
Şekil 4.14	0.25 mg/l BAP-0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında gelişim gösteren bitkiler.....	78
Şekil 4.15	0.25 mg/l BAP - 0.75 mg/l NAA içeren MS ortamında en iyi sürgün gelişimi gösteren bitkiler.....	80

Şekil 4.16	0.25 mg/l BAP - 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilen en uzun sürgünler.....	83
Şekil 4.17	0.2 mg/l BAP ve 0.001 mg/l NAA içeren ortamdan, a. uç meristemden, b.1'inci koltukaltı ve c. 2'inci koltukaltı meristeminden elde edilen bitkilerin sayım öncesi görünüşü...	87
Şekil 4.18	0.3 mg/l Kinetin ve 0.001 mg/l NAA içeren ortamdan; a. uç meristemden, b. 1'inci koltukaltı ve c. 2'inci koltukaltı meristeminden elde edilen bitkilerin sayım öncesi görünüşü...	89
Şekil 4.19	<i>R. macrandra</i> bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarından 0.25 mg/l BAP - 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında gelişim gösteren bitkilerin %50 torf ve % 50 su içeren saksılara adaptasyonunda görünüşü.....	92
Şekil 4.20	a.,b. <i>R. macrandra</i> bitkisinin saksıda çiçek açmış şekilde ve c.,d.direkt akvaryum koşullarına adaptasyonu.....	93
Şekil 4.21	a.,b.,c.,d.,e., f. sıvı kültüre konulan bitkilerin magenta ve erlen mayerdeki görünüşleri g.,h.durgun ortamda elde edilen 2 adet bitkinin görünüşü.....	95
Şekil 4.22	<i>A. tumefaciens</i> 'in GV2260 hattı ile muamele edilen 1'inci boğum arası eksplantına elde edilen GUS pozitif örnekleri....	98
Şekil 4.23	<i>A. tumefaciens</i> 'in GV2260 hattı ile muamele edilen yaprak eksplantına elde edilen GUS pozitif örnekleri.....	99
Şekil 4.24	<i>A. tumefaciens</i> 'in GV2260 hattı ile daldırma yöntemiyle muamele edilen 1'inci boğum arası eksplantına elde edilen GUS pozitif sonuçlar.....	102
Şekil 4.25	<i>A. tumefaciens</i> 'in GV2260 hattı ile daldırma yöntemiyle muamele edilen yaprak eksplantına elde edilen GUS pozitif sonuçlar.....	102
Şekil 4.26	<i>A. tumefaciens</i> 'in LBA4404 hattı ile genetik transformasyon ; a.,b.,c.yaprak ve d.,e.,f. 1'inci boğum arası eksplantında elde edilen GUS pozitif örnekler.....	105
Şekil 4.27	<i>A. tumefaciens</i> 'in LBA4404 hattı ile muamele edilen transformasyon; a.,b.,c. yaprak ve d.,e.,f. 1'inci boğum arası eksplantından daldırma yöntemi elde edilen GUS pozitif örnekleri.....	108
Şekil 4.28	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile muamele edilen transgenik aday bitkilerin a.,b.GV2260 p35 GUS INT hattı ve c.,d. LBA4404 pRGGbar geni kullanılarak akvaryumlara adaptasyonu.....	111
Şekil 5.1	Akvaryum ortamında adapte edilmiş <i>R. macrandra</i> bitkilerinin görüntüsü.....	119

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	<i>Rotala macrandra</i> 'nın sistematikteki yeri (Anonymous 2008 b).....	15
Çizelge 1.2	<i>Rotala</i> cinsine ait bazı türlerin dağılım alanları.....	16
Çizelge 3.1	Murashige and Skoog (1962), ortamında bulunan makro. mikro elementler vitaminler ve konsantrasyonları	32
Çizelge 3.2	Kullanılan büyüme düzenleyicilerin çözücüleri, saklama koşulları ve sterilizasyon yöntemleri	33
Çizelge 3.3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> hatları ve özellikleri (Becker <i>et al.</i> 1992. Özcan 1993).....	33
Çizelge 3.4	<i>Agrobacterium</i> hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları.....	34
Çizelge 3.5	Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda ve <i>Agrobacterium</i> gelişiminin engellenmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları.....	34
Çizelge 4.1	Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan çamaşır suyunun eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi.....	41
Çizelge 4.2	Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan PPM'in eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi.....	46
Çizelge 4.3	Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS ve %1.5 PPM'in eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi.....	48
Çizelge 4.4	Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS ve %1.5 PPM ile 4 saat bekletilen eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi.....	47
Çizelge 4.5	Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS ve %2 PPM'le 4 saat beklemenin eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi.....	49
Çizelge 4.6	Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS ve PPM'in eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi.....	50
Çizelge 4.7	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantında sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	51
Çizelge 4.8	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	54
Çizelge 4.9	Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi.....	55
Çizelge 4.10	Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	56
Çizelge 4.11	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'nci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	58

Çizelge 4.12	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	59
Çizelge 4.13	Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi.....	60
Çizelge 4.14	Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	61
Çizelge 4.15	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi ...	64
Çizelge 4.16	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	65
Çizelge 4.17	Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	66
Çizelge 4.18	Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	67
Çizelge 4.19	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının uç meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi .	68
Çizelge 4.20	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının uç meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	70
Çizelge 4.21	Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının uç meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi.....	71
Çizelge 4.22	Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının uç meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	73
Çizelge 4.23	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'nci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	74
Çizelge 4.24	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'inci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	76
Çizelge 4.25	Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'nci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi.....	77
Çizelge 4.26	Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'inci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	78
Çizelge 4.27	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'nci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	79

Çizelge 4.28	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'inci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	81
Çizelge 4.29	Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'nci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi.....	82
Çizelge 4.30	Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'inci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	83
Çizelge 4.31	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının uç meristemi, 1'nci ve 2'nci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi.....	84
Çizelge 4.32	Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının uç, 1'inci ve 2'inci koltukaltı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	86
Çizelge 4.33	Farklı Kinetin ve NAA konsantrasyonlarının uç meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	88
Çizelge 4.34	Farklı Kinetin ve NAA konsantrasyonlarının uç, 1'inci ve 2'inci koltukaltı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	90
Çizelge 4.35	<i>A. tumefaciens</i> 'in GV2260 hattı ile muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve gus pozitif bitkilerine etkisine ait varyans analizi.....	97
Çizelge 4.36	<i>A. tumefaciens</i> 'in GV2260 hattı ile muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve gus pozitif bitkilerine etkisi.....	100
Çizelge 4.37	<i>A. tumefaciens</i> 'in GV2260 hattı ile daldırma yöntem ile muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve gus pozitif bitkilerine etkisine ait varyans analizi	103
Çizelge 4.38	<i>A. tumefaciens</i> 'in GV2260 hattı ile daldırma yöntemiyle muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve gus pozitif bitkilerine etkisi.....	104
Çizelge 4.39	<i>A. tumefaciens</i> 'in LBA4404 hattı ile muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve gus pozitif bitkilerine etkisine ait varyans analizi	106
Çizelge 4.40	<i>A. tumefaciens</i> 'in LBA4404 hattı ile muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve gus pozitif bitkilerine etkisi.....	107
Çizelge 4.41	<i>A. tumefaciens</i> 'in LBA4404 hattı ile muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve gus pozitif bitkilerine etkisine ait varyans analizi	109
Çizelge 4.42	<i>A. tumefaciens</i> 'in LBA4404 hattı ile daldırma yöntemiyle muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve gus pozitif bitkilerine etkisi	110

1. GİRİŞ

Sucul ortamın asıl üreticileri olan su bitkileri. tek hücreliden çok hücrelilere kadar çeşitli şekilleri olan ve klorofil içeren canlılardır (Cirik vd 2001). Doğal floranın. sucul peyzaj alanlarının ve akvaryum ortamlarının vazgeçilmez üyeleridir. Akvaryum sektöründe süs bitkileri üretimi Amerika, Avrupa ve Japonya da önemli bir yer tutmaktadır (Öztürk 2008). Ülkemizde kullanılan akvaryumlardaki bitkilerin birçoğu Amerika ve Uzak Doğu ülkelerinden temin edilmektedir. Akvaryum bitkileri açısından yeni teknolojilerden yararlanan ülkelerin başında Batı Avrupa, Amerika ve Japonya yer almaktadır. Son on yılda akvaryumlar için bitki üreten ve ithal eden ülkelerin başında Singapur, Malezya, Sri Lanka, Madagaskar gibi ülkelerin yanısıra Avrupa ülkelerinden Macaristan ve Danimarka yer almaktadır. Ayrıca Almanya, Hollanda ve Danimarkada su bahçeleri peyzajı için üretim yapan seralarda önemli bir miktarda su bitkisi yetiştirilmektedir. Bunun nedeni Avrupa ülkelerinde bilgisayar kontrollü tesislerin kurulması, bu ortamlarda üretilen bitkilerin görünüş bakımından insanların tercih ettiği kalitede olması ve kolay pazar bulması şeklinde açıklanabilir (Welander *et al.* 2007).

Amatör amaçlı akvaryumculuk ve su bitkisi üretimi ile ilgili dikkat edilecek noktaları bilimsel olarak açıklamak amacıyla birçok yayın yapılmıştır. Bu konuda Dünya'da özellikle akvaryum bitkileri ile ilgili olarak Bruner (1973), Rataj and Horeman, (1977) Christopher *et al.* (1998) eserlerinden bahsedilebilir .

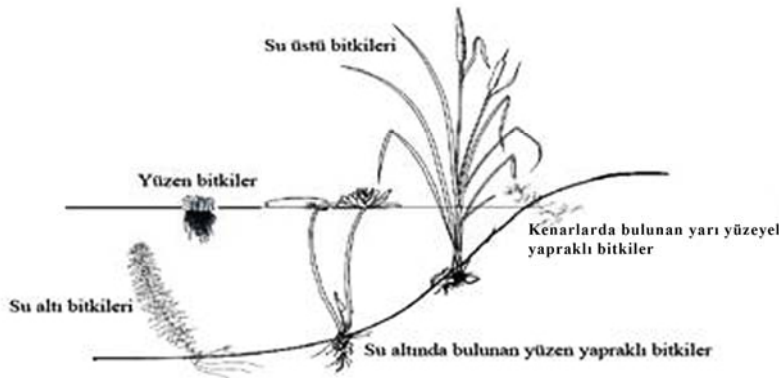
Ülkemiz sınırlarında, yasal prosedürler gereği ithal akvaryum bitkilerini sokmak yasaktır. Bununla birlikte yıl bazında miktarları net olarak bilinmemekle birlikte kaçak yollarla yabancı orijinli akvaryum bitkilerinin ülkemizde satıldığı bilinen bir gerçektir. Kaçak yollarla ve steril olmayan koşullarda gelen bu su bitkilerinin ülkemiz ekonomisine zararları yanısıra getirildikleri ülkelere kaynaklanan mikroflora ve mikrofaunaları üzerlerinde barındırmaları nedeniyle ülkemiz biyolojik çeşitliliğine zarar vermekte ve sucul ortamlarda geri dönüşü olmayan hastalık ve kirlilik problemlerine neden olmaktadır.

Türkiyede akvaryumlarda kullanılan su bitkileri amatör yöntemlerle üretilmektedir. Akvaryumlarda ticari olarak üretilen tatlı su bitkilerinin düzenli üretimi; ülkemizde daha çok *ex vitro* koşullarda yapılan çoğaltım şekillerinin kullanılması, akvaryum ortamında meydana gelen hastalıklar, yurt dışı kaynaklı bitkilerin ülkemize düzenli bir şekilde getirilememesi ve geleneksel yöntemlerle yapılan çoğaltımda yaşanan sıkıntılar nedeniyle yapılamamaktadır. Bundan dolayı günümüzde birçok akvaryum üreticisi canlı su bitkileri satmak yerine plastik bitkileri satmaktadır. Akvaryum bitkilerinin yerli üreticiler tarafından yetiştirilmesi ve sürdürülebilirliğinin sağlanması açısından; su bitkilerinde hem *ex vitro* yöntemlerle az maliyette yavaş üretilerek hemde üretime uygun bitkilerle *in vitro* olarak ilk maliyeti fazla olan hızlı ve kolay şekilde biyoteknolojik yöntemlerle laboratuvar ortamında üretim yapmak mümkündür. Hızlı çoğaltım yöntemiyle ekonomik öneme sahip bitkiler kısa zamanda ticari amaçlara uygun olarak başarıyla çoğaltılmaktadır. Bu yöntemlerle hastaliksız kaliteli bitkiler elde edilmekte ve yıl boyunca istenilen miktarda bitki üretimi yapılabilmektedir.

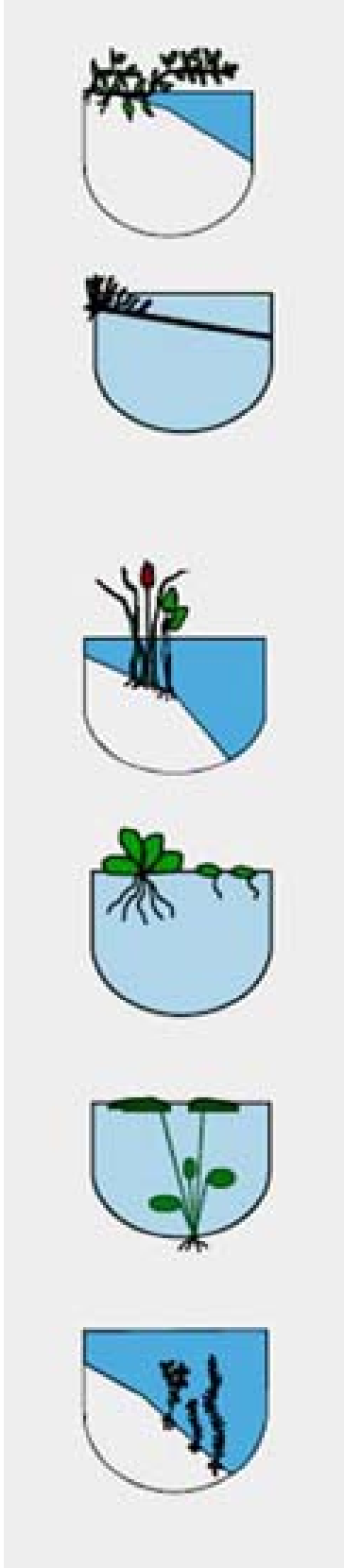
1.1 Tatlı Su Bitkilerinin Sınıflandırılması

Tatlı su bitkileri doğada buldukları yer ve fizyolojik özellikleri göz önüne alınarak araştırmacılar tarafından farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.1).

1.1.1 Clayton *et al.* (2000)'e göre tatlı su bitkileri grupları



Şekil 1.1 Clayton *et al.* (2000) tarafından yapılan su bitkileri sınıflandırması



a. Su kenarlarında gelişen bitkiler: Bu tür bitkiler su kenarlarından büyümeye başlarlar. büyürken su içine doğru bir yönelim gösterirler. Örneğin; *Alternanthera reineckii*, *Bacopa monnieri*

b. Küçük çim benzeri bitkiler: Bu bitkiler sığ sularda bulunur ve Genellikle boyları genellikle 2-3 cm arasında değişir. Bazen tamamen su altında bazen de su kenarlarında bulunurlar. Örneğin; *Elatine gratioloides*, *Glossostigma elatinoides*

c. Su altındaki toprakta kökleri bulunan su üstünde gelişen bitkiler: Bitki türlerine göre değişim göstermekle birlikte su içinde 2 metre derinliğe kadar bulunabilirler. Örneğin; *Apodasmia similis*, *Carex secta*

d. Yüzen yapraklı serbest bitkiler: Su üstünde yüzen bu bitkilerin kökleri su içerisinde topraktan bağımsızdır. Örneğin; *Riccia fluitans*, *Lemna minor*

e. Yüzen yapraklı bitkiler: Gövde ve kökleri tamamen su altında kalan çiçek ve yapraklarıyla su üzerinde asılı şekilde kalan su bitkileridir. Örneğin; *Ceratopteris thalictroide*, *Nymphaea sp.*

f. Su altı bitkileri: Bitki tamamen su altında gelişimini gösterir. Örneğin; *Ranunculus amphitrichus*, *Sagittaria subulata*

1.1.2 Cirik vd (2001)'e göre sucul ve bataklık ortamlardaki bitki grupları

Bir göl kıyısındaki bitkilere bakıldığında yaşam ortamlarına göre üç grup altında sınıflandırılmaktadır.

a. Hidrofit topluluklar: Suda yüzen bitkilerin oluşturduğu gruplar. Tamamen sucul ortamlarda yaşamaya uyum göstermiş türlerden oluşur. Genellikle bitkinin kök, gövde ve yaprakları su içinde sadece çiçekleri su dışında gelişir. Bu bitki topluluklarına durgun ve akarsularda rastlanır.

- Akarsulardaki hidrofit topluluklar: *Ranunculus* ve *Fontinalis* türleri vb.
- Durgun sulardaki hidrofit topluluklar: *Potamogeton*, *Sagittaria*, *Elodea*, *Nymphaea*, *Myriophyllum*, *Alisma*, *Trapa* vb

b. Amfibi topluluklar: Kıyıya yakın, bir kısmı su içinde, bir kısmı karada gelişen bitki grupları, bu grup bitkiler öncekilerden farklı olarak daima su içinde bulunmazlar. Özellikle kurak periyotlarda bitkinin bir kısmı su dışında kalır. Bu bitkilere göller ve sulak alanlarda kıyı zonunda ve menderes oluşumu görülen akarsuların kenarlarında rastlanır.

- Kıyı ve bataklık zonundaki amfibi bitki toplulukları: *Alisma*, *Equisetum*, *Juncus* vb.
- Alüvyonlu topraklardaki amfibi bitki toplulukları: *Polygonum* vb.

c. Helofit topluluklar: Islak, nemli alanlarda gelişen bitki grupları, Bu grup bitkiler geniş alanlar oluşturur ve büyük boyutludurlar. Bu nedenle, diğer iki grupta yer alanlara oranla daha çok tanınırlar. Bu grupta bataklık ve turbalıklarda gelişen helofit topluluklar olarak tanımlanan bitki toplulukları baskındır.

- Helofit topluluklar: *Phragmites*, *Scirpus*, *Typha*, vb.
- Kamış toplulukları: *Carex*, vb.

1.2 Tatlı Su Bitkilerinin Önemi

- Tatlı su bitkileri ortamın dengesinin korunmasında büyük öneme sahiptir. Birincil üreticiler olarak tanımlanan yeşil bitkiler klorofil sayesinde fotosentez olayı sonucu organik madde üretimini sağlarlar (Cirik vd. 2001).

- Akvaryum dibinde çakılların içinde yaşayan bakterilerle birlikte güçlü bir arıtma sistemi oluşturur. Bitkiler, balıkların dışkılarından meydana gelen amonyumu ve nitrati ortamdaki uzaklaştırırlar.
- Akvaryum bitkileri sağladıkları güzel görünüş yanında, bir akvaryumda canlılar arası dengenin oluşturulmasında da vazgeçilmezdir. Bitkiler sudaki karbondioksiti alarak oksijen üretirler ve balıklar için elzem olan oksijen üretiminde önemli rol oynarlar. Balıklar tarafından bırakılan artıkları kökleri ile alarak akvaryum suyunun bozulmasına engel olurlar. Diğer yandan, akvaryum bitkileri küçük balık ve yavruların saklanabileceği stressiz bir ortam oluştururlar (Alpbaz 1984).
- Bitkisel protein kaynaklarını oluştururlar. Bu nedenle sucul ortamdaki besin zincirinin ilk halkasıdır.
- Klorofil taşıyan bitkisel organizmalar fotosentez aktivitesiyle oksijen oluşturarak, suyun oksijen kazanmasını sağlarlar. Balıklar yaşamlarının başlangıcından itibaren bitkilerle sıkı ilişki içerisindeyler. Balıklara doğal ortamlarındaki gibi bir akvaryum hazırlanırken, mutlaka bitkiler de bulunmalıdır (Seçer 2002).
- Gıda maddesi olarak; Çin, Pakistan ve Hindistan'da su kestanesine benzer emergent bir tür olan *Eleocharis dulcis* sulak alanlarda, genelde pirinçle dönüşümlü olarak yetiştirilir. Uzak Doğu'da su kestanesinin yetiştiriciliği yapılmaktadır. Diğer su kestaneleri de (*Trapa natans*) Akdeniz bölgesinde yetiştirilmektedir. *T. natans*'ın tuhaf ve dikenimsi meyvelerinin içinde büyük, etli tohumları vardır. Bunlar da yenilmekte, bu sebeple yetiştiriciliği ve ticari olarak dağıtımı yapılmaktadır. ABD'de düzenli olarak tüketilen ve salatalarda kullanılan sucul bitkileri de birisi olan su teresinin hem yetiştiriciliği yapılmakta, hem de doğadan fazla miktarlarda toplanmaktadır (Agrawal and Ram1995).
- Su bitkileri kirliliğin biyolojik yöntemlerle saptanmasındaki belirleyici organizmalardır. Bazı bitkiler suların arıtımında da kullanılmaktadır Sucul bitkiler, kanalizasyon veya atıksu arıtma sistemlerinin sıvı atıklarından ağır metallerin ayrılmasında kullanılmaktadırlar. Bu sistemlerin sıvı atıkları fosfor, azot ve diğer bitki besin elementlerini içerir. Atık sulardan bu metallerin uzaklaştırılması arıtmaya yönelik bir işlemdir. Kimyasal uzaklaştırma pahalıdır ve her element için ayrı bir işlem gereklidir. Fenol gibi organik kirleticileri de absorbe ederler. Genellikle serbest yüzen

(*Scirpus*, *Phragmites*, vb.) ve gelişmiş (*Eichornia crassipes*, *Lemnaceae*, vb.) bitkiler bu amaçla kullanılmaktadır (Zhang and Hong 2006).

- Yapı malzemesi, hayvan yemi ve eşya yapımında kullanılmaktadır. Dünyanın ılıman ve tropikal bölgelerinde geniş dağılıma sahip *Phragmites* genusunun türleri, damların örtülmesi, çit yapımı, müzik enstrümanı yapımı ve ok yapımı gibi işlerde kullanılmaktadır. Avrupa'da yapı materyali olarak kullanılmaktadır. Bu bitkilerden elde edilen lif kağıt, mukavva, selofan ve benzer ürünlerin ana maddesini oluşturmaktadır. Ayrıca su bitkilerinin lifleri izolasyon malzemesi, fiber tahta gibi daha kaba ürünlerin yapımında kullanılmaktadır. Kuru ağırlıkları esas alındığında sucul bitkilerin çoğunun protein içeriği yoncadan yüksektir. Hayvan yemi olarak kullanımı besin içeriği, lezzeti, sindirilebilirliği ve maliyetine bağlıdır (Öztürk vd. 2006).

- Akvaryumlarda süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Ayrıca park ve bahçelerin düzenlenmesinde Nilüfer gibi güzel çiçekli bitkiler kullanılmaktadır (Şumlu 2005).

1.3 Akvaryum Bitkilerinin Yetiştirme Teknikleri

Akvaryum bitkilerinin yetiştirme tekniklerinden birisi eşeysel üretimdir. Vejetatif yolla ürememiş bir bitkinin çiçeğindeki polenler, bir fırça ile diğer bitkinin çiçeğine taşınabilir. Tohumların çimlendirilmesi yoluyla da üretim yapılabilir. Bu yöntem daha çok vejetatif üretimlerinde sorun bulunan bitkilerde uygulanmaktadır. İkinci üretim şekli ise eşeysiz üretimdir. Bunun için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bitkide oluşan küçük filizler kesilerek tepe kısmı yukarıya gelecek şekilde toprağa dikilir ve yeni bitkiler elde edilir. Bazı bitkilerde rizom yeni bir yavru bitki oluşturur. Yavru zamanla sürgün verir ve yeni bir bitki meydana gelir. Bu bitkiler birbirinden ayrılarak pekçok yeni bitki elde edilebilir. Bazı türlerde de bitkinin çiçek sapında köklü yavru bir bitki oluşur. 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 kullanılır. Kullanılan yöntemlerden biri de, ana bitkinin kesilerek üretimidir. Boğum bölgesi bulunan bitkilerde boğum bölgesinden kesim yapılarak toprağa dikilir ve yeni bireyler elde edilir (Cirik vd. 2001).

Akvaryum bitkilerini çoğaltım yöntemleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (Anonymous 2008a).

a. *Generatif (Tohumla) 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.

b. *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.

c. *Doku Kültürü Yöntemleriyle Mikroçoğaltım*

Bitkiler steril ortamda çoğaltılmaktadır. Kullanılan eksplantlar koltukaltı meristemi, yaprak, petiol, hipokotil, vb.'dir .

Bitkiler ilk önce kontrollü koşullar (ışık, sıcaklık vb.) altında tutulmaktadır. Ortamlarda bitkiyi tutmak için katılaştırıcı bir madde, besin ortamları, şeker ve antibiyotik kullanılmaktadır. Bitkiler istenen boya ulaştığında akvaryum seralara aktarılıp dış koşullara adaptasyon sağlanmaktadır. Örneğin *Rotala sp.*, *Hygrophyla sp.*, *Ludwigia sp.*, vb. bitkiler vejetatif çoğaltım yoluyla akvaryum ticaretinde kullanılmaktadır. Bitkiyi çoğaltmak için ana stok bitkilerin bulunması gerekmektedir. Ayrıca yavaş bir yöntem olmasının yanısıra ana stok bitkileri ve çoğaltılan bitkileri depolamak için çok yer gerektirmektedir. Bunun yanısıra bu yöntemde hastalık yayılma riski çok fazladır. *Anubias sp.* gibi yavaş gelişen bitkilerin çoğaltımı da sorun olabilmektedir. Hızlı çoğaltım ya da doku kültüründe bitki ilk üretim aşamasının maliyetinin fazla olmasına rağmen az yerde kısa sürede çok sayıda bitki üretilebilmektedir. Geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında doku kültürüyle bitki çoğaltımı hızlı ve maliyeti düşüktür. Ancak doku kültürü yapabilmek için özel tesis ve eğitilmiş personelin bulunması gerekmektedir. Doku kültürü ile yabancı ve tehlike altındaki flora kolayca muhafaza altına alınabilmektedir. Doku kültüründe tekniği optimize etmek için çok fazla zaman ve masraf gerekebilmesine rağmen optimizasyondan sonra fazla sayıda sağlıklı bitki elde etmek mümkün olmaktadır.

Türkiye’de son yirmi yıldan beri su ürünleri eğitimi ile birlikte su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli gelişmeler kaydedilmiş ve üretim artmış ancak su bitkileri konusunda yeterince gelişme sağlanamamıştır (Öztürk 2002). Su bitkilerinin yoğun üretimine yönelik çalışmalar bulunmamaktadır. Üretim daha çok amatörce ve düşük miktarlarda olmaktadır.

1.4 *In vitro* Üretim

In vitro kültürleri temelde bir üretim yöntemidir. Bilinen diğer klasik üretim yöntemlerinden farklı olarak bitkinin çeşitli kısımlarından alınan küçük bir parçanın (eksplant) steril edildikten sonra, çeşitli besin maddelerini içeren steril besin ortamında (*in vitro*) ve uygun çevre koşullarında (ışık, sıcaklık) kültüre alınması işlemidir. Bu nedenle yöntemin diğer adları “ mikro üretim” veya “aseptik kültür”dür (Fakharai and Fakharai 1990).

Bitki doku kültürü alanındaki ilk çalışmalar 19’uncu yüzyılın sonları ve 20’nci yüzyılın başlarında yapılmıştır. Ancak kullanılan eksplantların ve yetiştirme ortamlarının uygun olmayışı sebebiyle başarı sağlanamamıştır. 1960’lı yıllarda uygun besi ortamının bulunmasıyla gözle görülür ilerlemeler kaydedilmiştir. Bugün elde edilen sonuçlar laboratuvar dışına çıkarak pratikte ve ticarete kullanım alanı bulmuştur (Er ve Canpolat 1992).

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) orijinini oluşturan ana materyalin dezenfekte edilmesi.
3. Doğal koşullardan temin edilen bitkiden istenen eksplantın (meristem, anter, embriyo, yaprak ucu, vb.) alınarak steril besin ortamına, steril şartlarda konulması ve gelişmesi için uygun çevre şartlarına yerleştirilmesidir (Gönülşen 1987).

Bitki doku kültürlerinin avantajlarını şöyle sıralayabiliriz (Er ve Canpolat 1992).

1. Normal çoğaltım yöntemlerinde üretim materyali bir iken, doku kültüründe bir bitkinin farklı organları kullanılarak binlerce üretim materyali sağlanabilmektedir.
2. Doku kültürü çalışmalarında çoğaltım materyalinden tasarruf sağlanmaktadır.
3. Üretimde kullanılan alan çok küçüktür.
4. Çoğaltım kısa sürede gerçekleştirilmektedir.
5. Doku kültürü gen kaynağı olan bitkisel materyalin hiç bozulmadan ve kayba uğramadan yıllarca vejetatif olarak korunmasını sağlanmaktadır.
6. Ticari açıdan önemli bitkilerin, tohumla veya diğer yöntemlerle çoğaltılması mümkün olmayan bitkilerin vejetatif olarak çoğaltılması sağlanmaktadır.
7. Üretimde mevsimlere bağlılık ortadan kalkmakta, yılın her mevsimi üretim sağlanabilmektedir.
8. İslah çalışmalarında süreyi kısaltmaktadır.
9. Büyüme uçlarındaki meristemlerin virüs taşımaması nedeniyle bu meristemlerin kültüre alınması ile virüssüz bitki elde edilebilmektedir.
10. Bütün dış etmenler kontrol altına alınabildiğinden hücre biyolojisi, fizyolojisi, biyokimya ve gen transferi altındaki araştırmalara imkan sağlamaktadır.

Bitki doku kültürü çalışmalarının kullanım amaçlarına göre bazı önemli uygulamalar aşağıda verilmektedir.

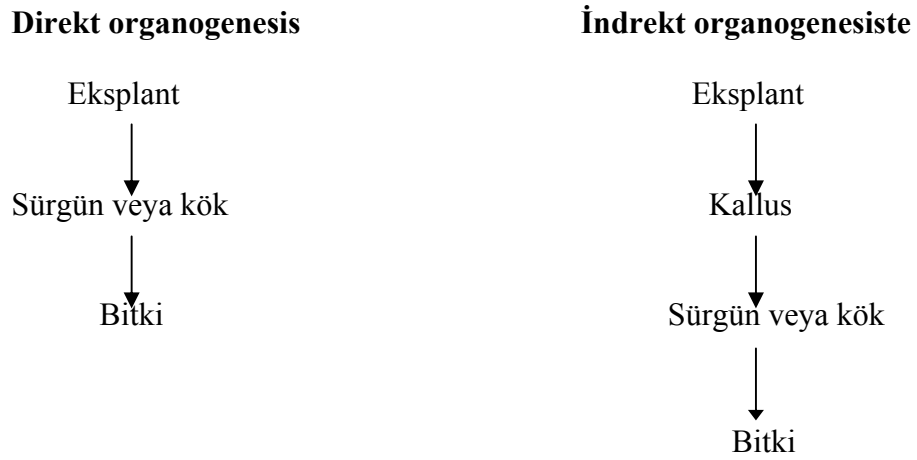
1.4.1 Organogenesis

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 işlemdir (Babaoğlu vd. 2001).

Normalde bir bitkinin tohumunu oluşturan hücreler, büyüme ve farklılaşma dönemi geçirerek bitkinin kök, gövde ve yapraklar gibi farklı organlarını oluştururlar. Farklı hücre tiplerinin ortaya çıkmasına yol açan bu değişiklikler bitkinin normal hayat döngüsünde yaşamının sonuna kadar aynı kalır. Ancak yapılan araştırmalar; tamamen farklılaşan hücrelerin eğer bozulmamış bir hücre membran sistemi ve canlı bir çekirdeğe sahip ise tekrar meristematik bir özellik kazanarak mitotik bölünme

gösterebileceğini ortaya koymuştur. Bu bölünmeler sonunda ya doğrudan adventif sürgün veya kök (direkt organogenesis) ya da hücreler yığını olan kallus ve bu kallusdan sürgün ya da kök (indirekt organogenesis) meydana gelir (Gürel 1997). İndrekt organogenesisde eksplant belirli bir form ve polaritesi olmayan hücre yığınlarının (kallus) oluşması için uyarılır. Daha sonra bu kallus üzerinde meristematik bir merkez ve ardından sürgün ya da kök oluşumu gözlenir. Direkt organogenesisde ise; hiç kallus gelişimi olmadan sürgün gelişimi izlenir (Şekil 1.2) , (Bhatti 2001).

Organogenesis çeşitleri



Şekil 1.2 *In vitro* bitki rejenerasyonunda görülen organogenesis çeşitleri

Besin ortamına ilave edilen hormonlardan oksin ve sitokin oranına göre kök veya sürgün oluşabilir ya da kallus gelişmeye devam eder. Birçok bitkide sitokin adventif sürgün oluşumunu teşvik eder. Oksin ise genellikle kök oluşumunu teşvik eder. Ortamın fiziksel hali, pH değeri, nem, sıcaklık, ışık ve kültür kaplarında biriken gazlar organogenesisdeki başarıyı etkileyen faktörlerdir.

1.4.2 Meristem kültürü

Meristem kültürü; bitkilerin büyüme konisi yanında birkaç yaprak primordiasının steril koşullarda suni besi ortamlarında kültür edilerek bunlardan tam teşekküllü bitkiler elde edilmesidir (Grout 1990).

Sürgün ucu kültürü; büyümekte olan sürgünlerin 2 cm veya daha kısa uç kısımlarının steril koşullarda suni besi ortamlarında kültür edilerek bunlardan tam teşekküllü bitkiler elde edilmesidir.

Tomurcuk kültürü; büyümekte olan veya dormant durumdaki sürgünlerden izole edilen tepe ya da koltukaltı tomurcuklarının steril koşullarda suni besi ortamlarında kültür edilerek bunlardan tam teşekküllü bitkiler elde edilmesidir.

Meristem, sürgün ucu ve tomurcuk kültürünün bitki yetiştirme ve islahındaki kullanım alanları şöyle sıralanabilir:

- Mikro çoğaltım
- Virüssüz bitki elde edilmesi
- Germplasm muhafazası

1.4.3 Doku kültürleriyle hızlı çoğaltım

Bitki doku kültürleri, bitkilerin doku, organ, hücre ya da hücre kısımlarının bitkiden ayrılarak (izole edilerek) kapalı ve cam kaplarda '*in vitro*' suni besin ortamında ve steril şartlar altında yetiştirilerek bütün organları tam bitkilerin elde edilmesi işlemidir (Biondi and Thorpe 1981).

Doku kültürlerinden yararlanma şekillerinden birisi de hızlı çoğaltımdır.

- Bu teknikle bitkilerin *in vitro* şartlarda kısa bir sürede, fazla sayıda çoğaltılabilmesi mümkün olmaktadır. Bu sayede ekonomik önemi olan pekçok bitkinin kısa bir zamanda ticari amaçlara uygun miktarda çoğaltılması başarılabilmektedir.
- Virüs ve diğer sistemik hastalıklar, vegetatif çoğalma yoluyla bitkiden bitkiye kolaylıkla geçmektedir. Bu tip hastalıklar, ürünün kalite ve kantitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Yine bu teknik sayesinde, hastalıklardan arındırılmış olan stoklardan üretim mümkün olabilmektedir.
- Bu teknikle yıl boyu üretim yapılabilmektedir.
- Kültür aşamasında olan bitkiler kolaylıkla ülkeler arasında transfer edilebilmektedir.

Doku kültürleri ile vegetatif üretimin esası sürgün meristemlerinin oluşmasını ve çoğalmasını sağlamaktır. Bir bitkinin vegetatif olarak çoğaltılması, koltukaltı (axillary) ve adventif olmak üzere iki şekilde bulunan sürgün meristemlerinin oluşumuna bağlı olmaktadır.

1.5 *Agrobacterium* Aracılığıyla Gen Aktarımı

Bitkilerde hastalıklara neden olan bakterilerden birisi de *Agrobacterium* cinsi bakterilerdir. Bitkilerde oluşturdukları hastalıklar nedeniyle bitki patoloğları bir taraftan bunlarla mücadele yollarını araştırırken diğer taraftan bitki biyoteknolojisinde son yıllardaki akıllara durgunluk veren gelişmeler sayesinde, bu mikro organizmalar bitki genetik mühendisliğinin en gözde canlıları haline gelmiştir. *Agrobacterium* bakterisi yardımıyla birçok kültür bitkisine başarıyla ve sürekli olarak gen aktarımının yapıldığı bilinmektedir. Bu özelliklerinden dolayı *A. tumefaciens* bakterisine bitkilerin doğal genetik mühendisi adı verilmektedir (Özcan ve Özgen 1996).

Doğadaki bitkilerde, genetik transformasyon kendiliğinden olmaktadır (Walden 1988. Bechtold *et al.* 1993). Genetik transformasyon geçici veya stabil olabilir ve transgenik hücrelerden oluşan gametlerde bir sonraki generasyona genetik materyal tamamen veya kısmen geçebilmekte ya da hiç geçememektedir.

Moleküler biyolojide bir organizmanın fenotipini değiştirmek için DNA'nın organizmaya geçmesi gerekmektedir. *E-coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* bakterilerinde gen aktarımı kolaydır. Ancak ökaryot bitkilerde transformasyon zordur. Fakat *Arabidopsis* bitkisinde *ex vitro* transformasyon yöntemleri kolaylıkla gerçekleştirilmiştir. Diğer bitkilerde ise genel olarak *ex vitro* transformasyon zordur veya başarılı olamamıştır. *Arabidopsis*'te transformasyon yöntemlerinin mekanizması iyice anlaşılamamaktadır. Diğer bitkilerde *ex vitro* gen aktarım yöntemleri çok az sayıda kullanılmaktadır (Bechtold *et al.* 1993).

Genel olarak bitki transformasyonunda iki engel bulunmaktadır. Birincisi; bitki hücrelerinin transformasyonu için uygun yöntemin geliştirilememesi, ikincisi; transgenik hücrelerden yeni bitkilerin oluşumudur (Khawar *et al.* 2004). Her iki engeli aşmak için yeni transformasyon yöntemleri geliştirilmektedir. Genel olarak bitki transformasyonu için önce uygun *in vitro* rejenerasyon sağlanıp daha sonra transformasyon ile birleştirilerek gerçekleştirilmektedir. Ancak bazı laboratuvarlarda doku kültürü yöntemleri kullanılmadan bitki transformasyonu gerçekleştirmek amacıyla çalışmalar yapılmaktadır.

Agrobacterium'den bitki hücrelerine T-DNA aktarımının mekanizması

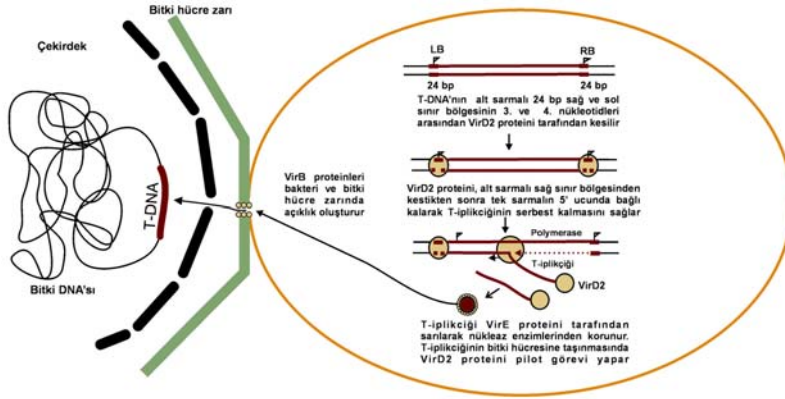
Yaralanan bitki fenolik bileşikler salgılar. Fenolik bileşikleri algılayan *Agrobacterium* bakterisi bitkinin yaralanmış hücrelerine tutunur. Bitkinin hücre duvarına tutunan bakteri hücrelerine fenolik bileşikler girer ve *vir* genlerini aktif hale getirir (Stachel *et al.* 1985, Leroux *et al.* 1987, Hooykaas and Schilperoot 1984). *Vir* bölgesi 7 adet operon içerir. Bunlardan *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* ve *virG* gen aktarımı için mutlaka gerekli olup, geriye kalan *virF* genleri yalnızca bazı türlere T-DNA aktarımında gereklidir (Hooykaas and Schilperoot 1984, Stachel and Nester 1986).

Vir genlerinin uyarılmasının ardından T-DNA bölgesi, *vir D1* ve *vir D2* genlerinin ürettiği bir endonükleaz enzimi tarafından alt sınır bölgesinden kesilmektedir (Stachel and Zymbrysky 1968, Zambryski 1992). *Vir D2* proteini sağ sınır bölgesinin 5' ucuna bağlanarak T-iplikliğinin serbest kalmasını sağlamaktadır (Ward and Barnes 1988, Zambryski *et al.* 1989, Hooykaas and Schilperoot 1992). Serbest kalan tek zincirli T-DNA, *vir E* proteini tarafından kaplanarak ortamda bulunan nükleaz enzimlerinin olumsuz etkilerinden korunmaktadır (Christie *et al.* 1988). *Vir D2* proteini, T-DNA'nın bitki hücrelerine aktarılmasında rol oynarken (Herra-Estrella *et al.* 1990). *Vir B* proteininin bakterinin hücre zarında T-DNA'nın geçebileceği büyüklükte bir açıklık oluşturduğu düşünülmektedir (Nester and Gordon 1988, Özcan ve Özgen 1996).

Bitki hücrelerine giren T-DNA, hücre çekirdeğine *vir D* proteini ile taşınmaktadır (Zambryski 1992, Howard *et al.* 1992). T-DNA'nın çekirdek içine alınmasında *Vir E₂* proteinin rol oynadığı düşünülmektedir (Zambryski 1992). Böylece bitki hücre çekirdeğine giren T-DNA, bir veya birkaç kopya halinde rastgele bölgelerde bitki kromozomuyla birleşmektedir (Şekil 1.3), (Lemmers *et al.* 1980, Thomashow *et al.* 1980, Draper *et al.* 1988a, b).

Gen aktarımı yapılmış bitkilerin analizleri sonucunda, T-DNA'larda değişiklik olduğu saptanmıştır (Ream 1989). T-DNA'nın bitki kromozomuyla birleşme işleminin sağ sınırdaki belli bir noktadan başladığı, ancak sol sınırdaki bu işlemin değişik noktalarda olabildiği belirlenmiştir (Slightom *et al.* 1985, Yadav *et al.* 1988). Son aşamada ise

bitki DNA'sı onarılmakta ve T-iplikliğinin çift zincirli DNA'ya dönüşümü için replikasyon yapılmaktadır.



Şekil 1.3 Bakteriden Bitki Hücrelerine T-DNA Aktarımının Mekanizması (Özcan ve Özgen 1996)

Bitkilere gen aktarımında Ti plazmidlerinden yararlanma

Non-onkojenik (tümör oluşturmeyen) plazmidler aracılığıyla gen aktarımı yapılmış bitki hücreleri, gen aktarımı yapılmamış hücreler gibi davranmaktadırlar. Yani gen aktarımı yapılmış hücrelerin ve bu hücrelerden gelişen transgenik bitkilerin normallerinden ayrılması olanaksızdır. Bu sorun gen aktarılmış hücrelerin ve bunlardan gelişen sürgünlerin seçimi için işaret (markör) genlerinin geliştirilmesiyle çözülmüştür. Bu markör genler sayesinde antibiyotik ya da herbisitleri içeren doku kültürü ortamlarında sadece markör genlerin aktarıldığı bitki hücreleri gelişebilmektedir.

Günümüzde birçok seçici markör geni taşıyan bitki transformasyon plazmidleri geliştirilmiştir (Özcan ve Özgen 1996). Örneğin bakteriyel Tn5 transposonundan elde edilen (Bevan *et al.* 1983) ve kanamasine dayanıklılığı sağlayan “Neomisin fosfotransferaz (*NPT II*); *E coli*’den izole edilen (Waldron *et al.* 1985) ve higromisin’e dayanıklılığı sağlayan higromisin fosfotransferaz (*HPT*); ve farelerden elde edilen (Eichholtz *et al.* 1987) ve methotrexate’a dayanıklılığı sağlayan dihidrofolat redüktaz (*DHFR*) *Streptomyces hygrosopicus*’dan izole edilen” (DeBlock *et al.* 1987) ve bialaphos’a dayanıklılığı sağlayan “*bar*”geni sayılabilir.

Seçici markör genlerin başında bitkilere aktarılan yabancı genlerin belirtilerinin kontrol edilmesinde kullanılan raportör markör genleri de vardır ki, bunların en önemlisi β

glukoronidaz (GUS) genidir. Bitkilere aktarılabacak gen ya da genler, T- DNA’da seçici markör genin yanına klonlanır.

1.6 *Rotala* Bitkisinin Genel Özellikleri

Rotala türü Çizelge 1.1’de belirtildiği gibi *Lythracea* familyasından Asya orijinli tek yıllık veya çok yıllık ve derin olmayan sularda ve su kenarlarında gelişim gösteren bir bitkidir (Şekil 1.4). Bu türün kırmızı ve yeşil olmak üzere iki rengi bulunması nedeniyle yerel olarak “yeşil ve kırmızı rotala” olarak adlandırılmaktadır. 5 ile 7 pH aralığında bulunan çok yumuşak sulardan çok sert sulara kadar geniş bir sertlik toleransı bulunan sularda gelişim göstermektedir. Durgun, bol ışıklı ortamlarda ortalama 25-55 cm boyutlarına ulaşmaktadır. Bazı türlerin yaygın olarak görüldüğü ülkeler Çizelge 1.2’de verilmiştir (Cook1979, McMullen 2000).

Çizelge 1.1 *Rotala macrandra*’nın sistematikteki yeri (Anonymous 2008b)

Alem	<i>Plantae</i>
Alt alem	<i>Tracheobionta</i>
Üst bölüm	<i>Spermatophyta</i>
Bölüm	<i>Magnoliophyta</i>
Sınıf	<i>Magnoliopsida</i>
Alt sınıf	<i>Rosidae</i>
Takım	<i>Myrtales</i>
Familya	<i>Lythraceae</i>
Cins	<i>Rotala</i>
Tür	<i>Rotala macrandra</i>

Çizelge 1.2 *Rotala* cinsine ait bazı türlerin dağılım alanları

Tür	Ülke	Kaynak
<i>Rotala indica</i>	Kore Nepal Filipinler	Kasselmann (2003)
<i>Rotala rotundifolia</i>	İtalya Tayvan Vietnam	Micheli <i>et al.</i> (2006)
<i>Rotala tripartita</i>	Avustralya	Highet and Wilson (2007)
<i>Rotala hexandra</i>	Endonezya Filipinler	Jie <i>et al.</i> (2007)
<i>Rotala hippuris</i>	Çin	Jie <i>et al.</i> (2007)
<i>Rotala cordata</i>	Hindistan Tayvan Vietnam	Jie <i>et al.</i> (2007)
<i>Rotala densiflora</i>	Endonezya Pakistan Sri Lanka	Jie <i>et al.</i> (2007)
<i>Rotala rosea</i>	Tayvan Malezya Filipinler	Jie <i>et al.</i> (2007)
<i>R. taiwaniana</i>	Tayvan Çin	Jie <i>et al.</i> (2007)
<i>Rotala macrandra</i>	Hindistan	Anonymous (2008b)
<i>Rotala filiformis</i>	Zimbabve	Hyde and Wursten (2008)
<i>Rotala fluitans</i>	Zimbabve	Hyde and Wursten (2008)
<i>Rotala ramosior (l.) Koehne</i>	ABD	Anonymous (2008c)
<i>Rotala juniperina</i>	Zimbabve	Hyde and Wursten (2008)
<i>Rotala longistyla</i>	Zimbabve	Hyde and Wursten (2008)
<i>Rotala lucalensis</i>	Zimbabve	Hyde and Wursten (2008)
<i>Rotala wallichii</i>	Tayvan	Anonymous (2008d)
<i>Rotala mexicana</i>	Zimbabve	Hyde and Wursten (2008)
<i>Rotala myriophylloides</i>	Zimbabve	Hyde and Wursten (2008)
<i>Rotala dentifera</i>	ABD	Anonymous (2008d)
<i>Rotala capensis</i>	Zimbabve	Hyde and Wursten (2008)
<i>Rotala serpiculoides</i>	Zimbabve	Hyde and Wursten (2008)
<i>Rotala catholica</i>	ABD	Anonymous (2008d)
<i>Rotala gossweileri</i>	Zimbabve	Hyde and Wursten (2008)
<i>Rotala tenella</i>	Zimbabve	Hyde and Wursten (2008)



Şekil 1.4 *Rotala macrandra* bitkisinin akvaryumda görünüşü (Anonymous 2008e)

Türkiye’de son 30 seneden beri su ürünleri eğitimi ile birlikte su ürünleri yetiştiriciliğinde de önemli gelişmeler görülmektedir. Akvaryum bitkileri ticari olarak büyük oranda satılmaktadır. Geçmişte önem gösterilmeyen ve büyük oranda dışa bağımlı olan akvaryum bitkileri ticareti, farklı yöntemlerin kullanılmasıyla birlikte gelişime açık bir üretim kolu haline gelecektir. Gelecekte bu yöntemle üretilen bitkilerle ilgili farklı gelişmeler sayesinde yeni iş kolları olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı ekonomik önemi olan akvaryum bitkisi *Rotala macrandra*’nın *in vitro* koşullarda çoğaltımı ve herbisitlere dayanıklılık genlerinin bitkiye aktarılarak akvaryumlarda yosun oluşumunu engellenmesi ve istenilen bitkilerin çoğaltılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Kawashima *et al.* (1986), enteromorpha türlerinde protoplast izolasyonu yapmışlardır. *E. plorifera*'nın 5 cm uzunluğundaki vejetatif yaprakları deniz altı taşlarından protoplast izolasyonu için toplanmıştır. Bitki materyalleri epifit ve epizoidalardan uzaklaştırmak için steril bez ile temizlenmiş ve 20 dakika karıştırıldıktan sonra steril deniz suyunda % 11'lik povidon iyot içeren deniz suyu solüsyonunda 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra bu çözelti 18°C'de iki gün boyunca antibiyotikli ortama manyetik süzgeç yardımıyla ilave edilmiştir. Yapılan sterilizasyondan sonra bitki materyali steril deniz suyu ile yıkanıp proteaz solüsyonunda 20 dakika bekletilmiştir. Taze ağırlığı 1g olan, $1.5 \cdot 10^6$ protoplast izole edilmiş ve aksenik protoplastlar kültür çözeltilisine aşılınıp kültürü yapılıncı inokülasyondan 1 hafta sonra yenilenmiş hücre duvarını oluşturmuş ve tek hücreler gelişmiştir. Başarılı şekilde elde edilen ürünler 160 litrelik tanklara transfer edilmiştir. Bir ay sonra ürünler 3 cm yarıçapa ulaşmıştır. Dört ay sonunda protoplast kültür çalışmalarında 1g taze alg yaprağından 440.000 somatik klon parçası elde edilmiştir.

Arnold and Tillberg (1987), *Picea abies* bitkisinin 12 ve 24 yaşlı kalemlerini iklim odasında kültüre almışlardır. Kalemler ilk önce 3 saat 250 µM BA ile muamele edilmiş ve sonra 5 µM BA ve Kin içeren ortamda 1 hafta bekletilmiştir. Bu muamele ile 8 hafta sonra en fazla adventif tomurcuk oluşumu gözlenmiştir. Adventif tomurcuk oluşumunun denemede kullanılan genotiplerin endogen sitokinlerinin miktarıyla bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Fazla endogen sitokin içeren vejetatif kalemlerde fazla oranda adventif tomurcuk oluşumu gözlenmiştir.

Henry *et al.* (1987), *Hygrophila erecta* bitkisinde hücre süspansiyon kültürü çalışması yapmışlardır. Hipokotil eksplantından gelişen kalluslarda % 2.6 oranında kafeik glikozit ester ve verbaskozitin birikmesi görülmüştür. Buna karşın gövde eksplantından elde edilen kalluslarda % 1 oranında verbaskozit ve bazı kalluslarda kafeoil glikozid esterleri tespit edilmiştir.

Kane *et al.* (1988), Amerikan nilüferi *Nelumbo lutea*'nın 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.

Straub *et al.* (1988), su bitkisi *Phragmites australis*' in olgun tohumlarını 1 mg/l 2.4-D ve IAA içeren besi ortamında doku kültürüne almışlardır. Katı, sarı, parlak ve embriyogenik kallustan sonra IAA'siz ortamda çok sayıda bitki elde etmişlerdir. Yapılan histolojik çalışma hem embriyogenik hücrelerin elde edildiğini hem de rejenere olan sürgünlerin embriyogenik olduğunu göstermiştir.

Cook *et al.* (1989), su bitkisi *Kosteletzkya virginica*' nın olgunlaşmış embriyo ve gövde eksplantlarını kültüre alarak 30 g/l glukoz, 2 mg/l IAA ve 1 mg/l Kin içeren MS ortamında kallus yoluyla rejenerasyon sağlamışlardır. Gövde ve kök kullanılarak kallus yoluyla bitki rejenere edilip, değişik sitokin 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 *et al.* (1989), su bitkisi *Distichlis spicata*' nın 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 organogenesisi 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.

Jenks *et al.* (1990), Su zambak bitkisinde *in vitro* bitki rejenerasyonu çalışmasını yapmışlardır. Yaprak (Epiphyllous bitki) eksplantı 30 dk çeşme suyunda tutulduktan sonra 90 sn % 50 etanolla muamele edilmiş ve 5 dk durulama yapılmıştır. Daha sonra 12 dk % 1.31'lik NaOCl ve Tween-20 (2d/100ml) ile 5 dk muamele edildikten sonra 3 kere durulanmıştır. Besi ortamı olarak üç ortam kullanılmıştır. Birinci ortam ; MS ve 0.56 mM myo-inositol, 1.2 µM thiamin-HCL ve 10 µM 2İP ve 3 µM IAA ve 87.6 mM sükroz İkinci ortam ; Birinci ortama % 0.8 agar ilave edilmiştir. Üçüncü ortam; MS+0.56 mM myo-inositol, 1.2 µM thiamin-HCL ve 3 µM TDZ ve 3 µM IAA ve 87.6 mM sükroz, 150x25 mm kültür tüpleri kullanılmış, 25±2 °C'de 16 saat fotoperyot uygulanmış ve polypropilen membran raflar kullanılmıştır. En iyi sonuç üçüncü ortamdandır ve bitki başına ortalama 8 adet yaprak olarak elde edilmiştir.

Kane *et al.* (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 LS ortamında elde edilmiştir. 18 hafta sonunda en iyi adaptasyon topraksız bitki ortamı ya da poliürethan köpük tablalarda gerçekleştirilmiştir.

Bird *et al.* (1993), su bitkisi *Ruppia maritima*'yı *in vitro* koşullarda kültüre almışlardır. Rizom oluşumunun, saf su ya da % 05 deniz suyu ile hazırlanmış yarım kuvvette MS ortamında, % 010, % 015 ve % 020 deniz suyu kullanımına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. % 05 ve % 010 deniz suyu içeren ortamda yüksek oranda köklenme elde edilmiştir. Beton tanklarda, bitkilerin adaptasyonu için akan deniz suyu kullanmışlar ve *ex vitro* koşullarda direkt köklenme ve % 100 başarı elde etmişlerdir. Böylece bitkinin *in vitro* koşullarda çoğaltılabileceğini göstermişlerdir.

Bird and 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 besin ortamı konmuştur. Katı ortamda inorganik besin maddeleri, bitki büyüme düzenleyicileri, % 1 sükroz 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 and 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, boğum 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.

Naseem *et al.* (1998), *Cicer arietinum* tohumlarında yüzey sterilizasyonu çalışmışlardır. En iyi sonuçlar (% 98), % 10 NaOCl'de 10 dk ve % 70 etanolde 3 dk muamelelerinden elde etmişlerdir.

Purohit and 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 1/2 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.

Taylor *et al.* (1998), *Piper methysticum* bitkisinin doku kültürü çalışmasında endojen bulaşıklığın büyük bir sorun olduğunu bildirmişlerdir. Seradan alınan bitkilerin benomil ve rifampicin ile muamelesi sonucu bulaşıklığın önüne geçilemediğini rapor etmişlerdir. Bir diğer uygulama da, ayrı ayrı birkaç çeşit antibiyotik kültür ortamına ilave edilmesinden sonra 3-5 hafta hiç bulaşıklık çıkmamasına rağmen daha sonra bulaşıklığın tekrar çıktığını gözlemişlerdir. Bulaşıklık olmayanlar yeni bir ortama aktarılırken bulaşık olanlara ikinci bir yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır.

Das *et al.* (1999), *Litchi chinensis* türünde iki yöntem kullanarak sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Birinci yöntemde; tohumlar 20 mg/l BAP içeren MS ortamda kağıt 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 *in planta* 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 *et al.* (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 oluşuktan sonra sürgünler gelişmiştir. Sürgünler 1.23 µM IBA muamelesi ile % 91.4 oranında başarı ile köklendirilmiştir. Bitkilerde ilk köklenme 11’inci günde gözlenmiştir.

Kane *et al.* (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 sükroz, 2.2 µM BA, 0.57 µM IAA, 87.6 mM sükroz 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 fotoperyot 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.

Suri *et al.* (1999), bu çalışmada *Curculigo orchioides* bitkisinde direkt Organogenesis ve *in vitro* koşullarda adventif soğan oluşumunu gerçekleştirmişlerdir. Yaprak eksplantından 4.4 µM BAP içeren B5 besi ortamında eksplant başına 4 adet ve yer altı gövdeden 10 adet sürgün elde edilmiştir. 22µM ya da fazla oranda BAP konsantrasyonu yaprak eksplantlarından sürgün gelişimi üzerinde olumsuz etkiye neden olmuştur. Gövde eksplantından gelişen kallus üzerinde 8.8-35.2 µM BAP içeren ve 0.12- 0.23 mol sükroz içeren ortamlarda çok sayıda adventif soğan gözlenmiştir. Eksplant başına en fazla soğancık 35.2 µM BAP ve 0.18 M sükroz içeren ortamdan elde edilmiştir. İzole edilen soğancıklar, 35.2 µM BAP ve 0.23 M sükroz içeren ortama aktarıldığında sekonder soğancıklar (6 adet soğancık/eksplant başına) oluşmuştur. Soğancıkların köklendirilmesi için bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamlara aktarılmıştır. Elde edilen bitkilerin % 90’ı başarı ile toprağa aktarılmış ve adapte edilmiştir. Bitkiler bir sezon soğuğa maruz kaldıktan sonra gelişmeye devam etmişlerdir.

Jenks *et al.* (2000), çeşit seleksiyonu ve mutasyon ıslah çalışmalarında kullanmak amacıyla süs ve su bitkisi olan *Nymphoides indica*’ da yaprak sapı eksplantından sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. 2-IP, BAP ya da Kinetin (0-25 µM) ile IAA veya NAA (0-25 µM) optimize edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonunu (% 80) ve eksplant başına sürgün sayısını (11.5 adet), 0.56 mM myo-inositol, 1.2 µM thiamine-HCl, 116.8 mM sükroz, 10 µM BAP, 20 µM IAA ve % 0.8 agar içeren MS besin ortamından elde etmişlerdir. Histolojik kesit alınarak aynı eksplantta direkt ve indirekt sürgün organogenesisi ile sürgün rejenerasyonu doğrulanmıştır.

Lopez-Escamilla *et al.* (2000), *Picea chihuahuana* türünde zigotik embriyoları kullanarak adventif embriyo oluşumunu gözlemişlerdir. Embriyo oluşumu için BAP ve NAA. Kin ve 2.4-D içeren ve içermeyen B5 besi ortamı kullanılmıştır. Kin içeren ortamlarda 14 günde, BAP içeren ortamda ise 17 günde embriyo oluşumu gözlenmiştir. Embriyo oluştuktan sonra % 50 makro-mikro elementler içeren ve içermeyen, Bitki büyüme düzenleyici içeren ve içermeyen ortamlarda 30 gün bırakılmıştır. 15 gün sonra gelişen embriyolar 1/2 SH besi ortamında bırakılmışlardır. En fazla embriyo oluşumu 3 mg/l Kin içeren ortamdan (5 adet) ve 5 mg/l BAP içeren ortamdan (7 adet) elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler, köklendirmek amacıyla 3 ve 5 mg/l IBA içeren sıvı yarım kuvvette SH ortamda 24 ve 48 saat bekletilmiştir. Sonra sürgünler bitki büyüme düzenleyici içermeyen yarım kuvvette SH ortamda kağıt köprüler üzerinde bırakılmıştır. Histolojik analiz sonuçları Somatik embriyo oluşumu için Kin'in BAP'a göre daha erken uyarı verdiğini gözlemişlerdir.

Te-chato and Lim (2000), *In vitro* gelişen mangosteen (Uzakdoğu'da yetişen tropik meyveli bir bitki) fidelerinden elde edilen 5-15 mm uzunluğundaki yaprak eksplantını kullanarak bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 2.22 µM BAP ve 2.25 µM TDZ içeren MS ortamda % 66.8 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallus başına ortalama 4.45 adet sürgün ucu 4 alt kültürden sonra elde edilmiştir. 0.44 µM BAP içeren WPM (Woody Plant Medium) ortamında ortalama eksplant başına 9.3 sürgün elde edilmiştir. Sürgün uzaması için 5-6 sürgün aynı ortamda kültüre alındıktan sonra 0.32 µM NAA ve 0.13 µM BAP içeren sıvı ½ MS ilave edilmiştir. 1.11 µM BAP ve 0.25 g aktif kömür içeren WPM'da % 68.2 oranında köklenme elde edilmiştir. Bitkiler saksılara aktarılmış ve başarılı bir şekilde adaptasyon sağlanmıştır.

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

Lin *et al.* (2001)'e göre bitkiler ve hayvanlarda yabancı genleri başarılı olarak aktarmak mümkündür. Fakat birçok önemli algde gen aktarım sisteminin geliştirilmesi hala gelişme aşamasındadır. *Chlamydomonas reinhardtii*'de gen aktarımı sistemi başarı ile geliştirilmiştir. Diğer algler örneğin; mikroalg olan *Volvox carteri* 'de gen aktarımı çalışması başlangıç aşamasındadır. Bu aşamada ticari olarak önemli kırmızı alg *Porphyra*'nın genetik transformasyonu yapılamamıştır. Elektroporasyon ile yöntemi için seleksiyon markeri içeren *P. leustoica* arktasporları elektroporasyona uğramıştır. Elektroporasyona uğramış örnekler 24 saat, bir hafta, iki hafta ve sekiz haftalık örneklerden PCR analizi sonucu tüm örneklerde plazmid DNA'nın varlığı görülmüştür.

Öztürk (2002), *Ludwigia sp*'nin *in vitro* hızlı çoğaltımı çalışmasını yapmıştır. Yüze 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 sükröz, % 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 fotoperiyot 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 24°C ± 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.

Damiano *et al.* (2003), çilek, armut, elma ve su bitkisi *Hygrophila corymbosa sp.* *Stricta*'nın hızlı çoğaltımında TIS (aralıklarla daldırma) yöntemi, durgun sıvı ve agar ile katılaştırılmış ortam arasında karşılaştırma yapmışlardır. Çilek bitkisinde TIS yönteminde daha fazla sürgün rejenerasyonu görülmüştür. Armutta ise sonuçlar genotipe bağlı olarak değişmiştir. Fakat yine TIS yöntemi ile daha fazla sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Bunun yanısıra TIS ile çoğaltılan sürgün uçlarında

nekrozis gözlenmemiştir. Benzer şekilde *H. corymbosa* bitkisinde de TIS yönteminde diğer yöntemlere göre daha fazla sürgün oluşmuştur. Tüm yöntemlerde sıvı ortamda yüksek oranda vitrifikasyon gözlenmesine rağmen TIS ile geliştirilen bitkilerde vitrifikasyon görülmemiştir. Çilek bitkisinde 0.3 mg/l BAP, 0.1 mg/l IBA, 0.1 mg/l gibberalitik asit içeren pH 5.7 olan MS ortamı kullanılmıştır. Armut bitkisinde 0.5 mg/l nikotik asit, 0.5 mg/l piridoksin, 2 mg/l glisin, 0.5 mg/l tiamin-HCl, 150 mg/l inositol, 1 mg/l Ca-pantotenat, 0.1 mg/l biyotin, 0.5 mg/l riboflavin, % 2 sükröz, 0.4 mg/l BAP, 0.05 mg/l IBA içeren ve pH 5.7 olan MS ortam kullanılmıştır. Elma bitkisinde 0.4 mg/l BAP, 0.05 mg/l IBA içeren ve pH 5.6 olan MS ortam kullanılmıştır. *Hygrophila* bitkisinde % 2 sükröz, 0.6 mg/l gibberalitik asit içeren pH 6.8 olan ortam kullanılmıştır. Denemelerde her muamelede 10 eksplant kullanılmış olup 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. En son değerler 60 gün sonra kaydedilmiştir.

Moncaleán *et al.* (2003), Bu çalışmada. *Actinidia deliciosa* türünün sürgün uçlarını değişik oranda BAP ile muamele ettikten sonra selüloz ile sabitleştirilen MS ortama yerleştirmişlerdir. 4.4 µM BAP ile 30 dk. 1 gün, 2 gün, 35 gün muamele edilmiş eksplantlardan gelişen bitkilerin yapraklarında absisik asit, IAA, zeatin, dehidrozeatin zeatinribosit, dihidrozeatinribosit, N6 isopentiladenin, N6 isopentenil adenosin oranlarına bakılmıştır. Analizler üç alt kültürden 31 gün sonra *ex vitro* koşullarda yapılmıştır. Çalışma sonucunda endogen fitohormonlar ve bitkinin gelişimi arasında bir etkileşim olduğu görülmüştür. En iyi bitkicikler 4.4 µM BAP ile 1 gün muameleden elde edilmiştir. Bu bitkilerde, diğer bitkilere göre yüksek oranda IAA, sitokinler ve absisik asit kaydedilmiştir.

Gasdaska *et al.* (2003), *Lemna* bitkisinde interferon alfa 2b (IFN), insan büyüme hormonu (hGH), Fab ve Mab proteinleri aktarılmıştır. Bu dört rekombinant proteinler *Lemna* bitkisine aktararak terapötik protein *Lemna* bitkisinde üretilmiştir. Bu çalışmayla şeker hastalarının doğal yollarla tedavisi amaçlanmıştır.

Vikrant and Rashid (2003), *Paspalum scrobiculatum* bitkisinde doku kültürü çalışması yapmışlardır. Olgunlaşmış embriyolar 2.4-D içeren MS ve N6 besi ortamlarına yerleştirilmiş ve 5 haftada somatik embriyolar oluşmuştur. Somatik embriyolar 2.4-D içermeyen ortama yerleştirilmiş ve bitkiler elde edilmiştir. MS ve N6 ortamları

kıyaslandığında; N6 ortamının somatik embriyogenesis için daha uygun olduğu gözlenmiştir. Eksplantların ilk aşamada 11 gün 100 µM 2.4-D ile muamelesinin somatik embriyogenesis için önemli olduğu gözlenmiştir. 2.4-D'nin en uygun muamele süresinin 4 ve 7 gün olduğu görülmüştür. Bu çalışma monokotil bitkilerde hem somatik embriyogenesis hemde sürgün rejenerasyonu açısından ilk çalışma olmuştur.

Wawrzyn'czak and Goszczyńska (2003), *Dianthus caryophyllus* türünde çalışmışlardır. *D. caryophyllus* (Karanfil-Dianthus) bitkisinin 'Dolce Vita', 'İmpala', 'Domingo', 'Tanga' ve 'Charlotte' çeşitlerinden elde edilen kalemler 24 saat BA ve Kin içeren ortamda bırakılmıştır. Karanfil çiçeklerinin fazla süre taze kalabilmesi 0.05 veya 0.1 mM Kin ve BA kullanarak sağlanabilmiştir. 'Dolce Vita', 'İmpala', 'Domingo' ve 'Tango' çeşitlerinde 0.05 mM Kin veya BA kullanılarak çiçek ömründe belirgin bir fark gözlenmiştir. Fakat 'Charlotte' çeşidinde 0.05 mM Kin, 0.1 mM BAP muamelesi ile çiçek ömrü ve çiçek çapı üzerinde olumlu etki görülmüştür.

Anthony *et al.* (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 kırılabilir 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.

Anderson and 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.

Madhulatha *et al.* (2004), *in vitro* muz (*Musa spp.*) çoğaltımında yüksek oranda BAP ve Kin muamelesinin etkisini incelemişlerdir. En iyi sürgün rejenerasyonu eksplantın 50 mg/l BAP ve 50 mg/l Kin içeren ortamda 60 dk bekletilmesiyle elde edilmiştir. Kök gelişimi sürgünlerin 100 mg/l NAA ve 100 mg/l IBA içeren ortamda 60 dk bekletilmesi ile elde edilmiştir.

Othman and Hock (2005), *Cryptocoryne minima* Malezya'nın Malay yarımadasında *Araceae* familyasına ait akuatik ve endemik bir türdür. Tanjung 'da Selarong nehri ve Jelutung nehirlerinden alınan bitkilerde RAPD tekniği ile bu bitkisinde genotip varyasyonu bulmaya çalışılmıştır. Primer olarak OPA -20.OPC-01.OPC-12.OPC-14.OPH-08.OPH-12 kullanılmış bu primerlerden 135 polimorfik bant elde edilmiştir.

Sakulkoo *et al.* (2005), güney batı Asyada yaygın olan bir su bitkisi olan su ıspanağı (*Ipomoea aquatica*) ile yapılan bu çalışmada Tayland Mac Mohan Maden ocağının drenaj suyunda yüksek oranda bulunan sülfatın (800-2000 mg/l) etkisini önlemek için *Arabidopsis* APS (APR1) reductaz geni *I. aquatica* genine aktarılmıştır. *Aquatica* tohumları doku kültür çalışmasında yüzey sterilizasyonu uygulanıp tohumlar katı MS ortamında yarı MS inorganik tuzları ile 100 mg/l inositol 0.1mg/l tiamin-HCl, 0.5 mg/l folik asit 30 g/L şeker 2.5 g/L gellan zımkı ile kültür alınmıştır. 25°C altında 16 saat/ 8 saat fotoperiod ve 3000 lux ışık altında tutulmuştur. Bu çalışmada 200 kotiledon parçası 20 ml *A.tumafaciens* içeren MS ortamında bekletilmiştir bunun dışında kokültüvasyon esnasında 50mM asetosiringon ilave edilerek 25°C'de bekletilmiştir. Kokültüvasyondan sonra 10 µM TDZ, 300 mg/l sefotaksim 25°C'de 16 saat fotoperiyotta bir ay bekletilmiştir. 2 cm büyüklüğünde sürgünler elde edildikten sonra MS ortamda 12 µM TDZ, 25mg/l hidromisin 30mg/l sefotaksim içeren kültür kutularına aktarılmıştır. Yaşayan sürgünler bir ay sonra 30 mg/l sefotaksim içeren MS ortamına konulmuş, iyi gelişenleri cam seraya aktarılmıştır. Bu bitkilerde gen aktarımı yapıp yapılmadığını anlamak amacıyla Xhal ve Xhol enzimleri ile kesilmiş DNA parçalarıyla *APR1* gen aktarılması tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerde sülfat ve kadmiyuma karşı dayanıklılık ve yüksek oranda sülfat birikmesi görülmüştür. Hasatta edilen bitkilerden çeşitli amaçlarda kullanılmak üzere sülfat elde edilebileceği belirtilmiştir.

Şumlu (2005), Türkiye’de göl ve göletlerde doğal olarak bulunan nilüfer bitkisinin iki türünden biri olan *Nymphaea alba* L. (nilüfer) 'nin *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi ve çoğaltımı amacıyla yapılan araştırmada tohum çimlenmesi % 60 oranında 1 mg l⁻¹ BAP ve 0.1 mg l⁻¹ IAA içeren MS besi ortamında elde edilmiştir. Ancak 5 ay sonra tohumların dormansiye girmeleri nedeniyle, tohumla yapılan çalışmada MSO ortamı ve kağıt filtre köprülerine değişik oranlarda GA₃, KNO₃ ve TDZ ilave edilerek dormansinin kırılmasına çalışılmıştır. Yalnız değişik oranlarda TDZ’li sıvı ortamlarda kağıt filtre köprüler üzerinde çimlenme elde edilmiş, en fazla çimlenme 0.05, 2.00 ve 4.00 mg l⁻¹ TDZ ilaveli ortamlarda görülmüştür. Aydınlığa (16 saat aydınlık / 8 saat karanlık) göre oda sıcaklığında karanlıkta çimlenen fideciklerin daha uzun oldukları kaydedilmiştir. 0.05 mg/l TDZ kullanımı daha ekonomik bulunmuş ve çimlenen tohumlardan elde edilen bitkicikler akvaryumlara konulmuştur.

Andrade *et al.* (2006), *Eucalyptus grandis* türünde *in vitro* çoğaltım için yüksek oranda bitki büyüme düzenleyici uygulaması denemişlerdir. BAP’ın 0, 200, 400 ve 600 mg/l oranları 1, 2 ve 3 saat süreyle 3 ve 5.8 pH derecesinde uygulanmış ve eksplantlar üzerindeki morfolojik etkisi incelenmiştir. Eksplantların her hafta yaş ağırlıkları kaydedilmiştir. 21 günlük kültürden sonra muamele başına sürgün rejenerasyonu, eksplant başına sürgün rejenerasyonu incelenmiştir. Deneme sonucunda, pH’ın BAP konsantrasyonları ve muamele süresi üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür. En etkili sonuçlar BAP’ın 200 mg/l oranının 1 ve 2 saat muamelesinden elde edilmiştir. Her iki muamele sonucunda bitkinin kortikal parenkima ve prokambiyum hücrelerinde yoğun oranda çoğaltım görülmüştür. Çalışma sonucunda yüksek oranda BAP uygulamasının *E. grandis* bitkisinin çoğaltımı için uygun olduğu görülmüştür.

Micheli *et al.* (2006), *Cryptocoryne beckettii*, *Cryptocoryne lutea* ve *Rotala rotundifolia* 'nın *in vitro* çoğaltımını yapılmıştır. Eksplantlarda sterilizasyon amacıyla %1-1.5 oranında sodyum hipoklorit kullanılmıştır. En iyi çoğaltım 0.5 mg/l NAA ve 1.00-4.00 mg/l BAP içeren LS (Linsmaier and Skoog medium, 1965) ortamdan elde edilmiştir. Her 2 BAP konsantrasyonundan 1 mg/l’ BAP’da diğer ortamlara göre daha fazla kök oluşumu gözlenmiştir. 4 mg/l’ BAP içeren ortamda fazla sayıda sürgün oluşumu gözlenirken düşük sayıda kök ve kısa kökler tespit edilmiştir. Bitki adaptasyonu için bitkiler organik madde, kil ve kum (%1-1-10) içeriğiyle hazırlanmış

akvaryumlara aktarılmıştır. Bu karışımda yetişen bitkiler Compo Cactea ticari karışımına göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Adaptasyona bırakılan bitkilerden 1 mg/l'de çoğaltılmış olanlarda kök oluşumu diğer bitkiler nazaran daha fazla sayıda tespit edilmiştir. Çalışılan bitkiler içinde en fazla adaptasyon yüzdesi *Rotala rotundifolia*'da elde edilirken bu türdeki sürgün çoğaltımında fazla olmuştur. *Cryptocoryne*'in her iki türünde ise çoğaltım ile köklenme arasında herhangi bir fark gözlenememiştir.

Panigrahi *et al.* (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 *et al.* (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 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'inde 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 oranında aktarılmıştır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Çalışmada *Rotala macrandra* türü su bitkisi kullanılmıştır. Bitkiler, çeşitli yollarla yurt dışından getiren yerel akvaryumculardan temin edilmiştir. Bitkinin tür tayini Doç. Dr. K. M. Khawar (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü) ve Doç. Dr. H. H. Atar (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü) tarafından yapılmıştır. Ticari akvaryumculardan alınan bitkiler adaptasyon amacıyla kontrollü koşullardaki akvaryumlara dikilerek büyütülmüştür.

3.1.2 Deneme yeri

Denemeler Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü Laboratuvarları ile Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1.3 *In vitro* çalışmalarındaki büyüme ortamları ve kültür koşulları

Denemelerde Murashige and Skoog 1962 mineral tuz ve vitaminleri (Çizelge 3.1) ile % 3 sükröz içeren ve % 0.8 (type A, Sigma), % 0.6'lık agar (Duchefa, Almanya) veya % 0.215 gelrit (Sigma Aldrich, St. Lo, Mo) 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 (sitokin ve oksin) ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1N NaOH ve 1N HCl kullanılarak 5.7'e ayarlandıktan sonra 1.4 kg basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır.

Tüm kültürler beyaz floresan ışığı (30.000 lüks) altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda 24±1°C sıcaklıkta tutulmuşlardır.

Çizelge 3.1 Murashige and Skoog (1962) ortamında bulunan makro. mikro elementler, vitaminler ve konsantrasyonları

Makro elementler	Konsantrasyon (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikro elementler	Konsantrasyon (mg/l)
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.600
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.850
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.250
Vitaminler	Konsantrasyon (mg/l)
Myo-Inositol	100.000
Nicotinic Acid	0.500
Pyrotinic Acid	0.500
Thiamine-HCl	0.100
Glycine	2.000

3.1.4 Bitki büyüme düzenleyicileri

Büyüme düzenleyiciler uygun çözücülerde çözüldükten sonra standart şekilde istenilen miktar ve oranda stok solusyonları hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). Hazırlanan stok solusyonların bir kısmı +4 °C’ de iki ay bir kısmında -20 °C saklanmıştır. Büyüme

düzenleyiciler ortamlara otoklavda steril edilmeden önce ilave edilmiştir. Bazıları da otoklavda tutulduktan sonra ilave edilmiştir.

Çizelge 3.2 Kullanılan büyümeyi düzenleyicilerin çözücüleri, saklama koşulları ve sterilizasyon yöntemleri

Büyümeyi düzenleyiciler	Çözücü	Saklama koşulları (°C)	Sterilizasyon şekli
<i>Oksinler</i> NAA	1N NaOH	+4	Otoklav
<i>Sitokininler</i> BAP Kinetin	1N NaOH 1N NaOH	+4 +4/-20	Otoklav Filtre

3.1.5 *Agrobacterium* bakteri materyali

Çalışmada. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Tarla Bitkileri Bölümü'nden temin edilen kanamisin antibiyotigine ve herbisitlere dayanıklılık genlerini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* hatları kullanılmıştır.

Çizelge 3.3 *Agrobacterium tumefaciens* hatları ve özellikleri (Becker *et al.*1992, Özcan 1993)

Bakteri hattı	Yardımcı plazmid	İkili vektör	Bitki seleksiyonu
(Seçici antibiyotik)			
GV2260 (100 mg/l rif)	pGV2260	p35S GUS-INT (50 mg/l km)	km (50-100 mg/)
LBA4404 (100 mg/l rif)	pAL 4404	pRGGbar (25 mg/l km)	bas/fos (0.5-1.0 mg/l)

km:Kanamisin, fos=fosfonitirisin, bas= basta, rif= rifampisin

3.1.6 Antibiyotikler

Büyüme ortamlarına ilave edilmeden önce her antibiyotik mikro filtreler kullanılarak steril edilmiş ve otoklavdan çıktıktan sonra ısısı 45°C'ye düşmüş olan katı ortamlara ilave edilmiştir. Çizelge 3.4 ve 3.5'de kullanılan antibiyotikler ve konstrasyonları yer almaktadır.

Çizelge 3.4 *Agrobacterium* hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları

Antibiyotikler	Kullanılan oranları (mg/l)	Stok (mg/ml)	Çözücüler	Saklama koşulları (°C)
Rifampisin	100	25	Methanol	-20
Kanamisin	100	50	su	-20

Çizelge 3.5 Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda ve *Agrobacterium* gelişiminin engellenmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları

Antibiyotikler	Stok solüsyon (mg/ml)	Kullanılan konsantrasyon (mg/l)	Çözücü	Saklama koşulları (°C)
Kanamisin	50	50	Su	-20
Augmentin *	100	500	Su	-20

* Ko kültürasyondan sonra *A. tumefaciens*'in gelişimini engellemek için kullanılmıştır.

3.1.7 Kullanılan aletler ve kaplar

Yapılan çalışmalarda; Nuair marka steril kabin, Otoklav, kimyasal maddeler, ısıya dayanıklı cam malzemeler, Magenta GA7, iklim dolabı, manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Eksplant yüzey sterilizasyonu

In vitro çalışmalardaki ilk aşama yüzey sterilizasyonudur. Bitkinin yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarımın sağlanacağı en düşük dezenfektan dozu belirlenmeye çalışılmıştır. Bitkiler, üzerindeki kalıntıların uzaklaştırılması amacıyla 15-30 dakika çeşme suyunun altında tutulduktan sonra çamaşır suyu (NaOCI- Ace), Tween 20 ve PPM® (Bitki Koruyucu Karışım; methylchloroisothiazolinone and methylisothiazolinone içerikli bitki koruyucu karışım - Plant Cell Technology Inc. Washington ABD, tarafından geliştirilen bir biosittir ve doku kültürü çalışmalarında mikroorganizmaları önlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır) kullanılarak değişik muamelelere tabi tutulmuştur. Yüzey sterilizasyonu amacıyla her konsantrasyon %100, %50, %30 %10 ve %5 oranındaki ticari çamaşır suyunda (Ace) 30, 5, 10 ve 5 dk ve %1.5-%2-%2.5-%3 PPM – 1, 2, 4, 8 ve 12 saat bekletme uygulamaları yapılmış ve steril saf su ile durulanmıştır. Fakat tam olarak steril bitki elde edilememiştir. %1.5-%2-%2.5 PPM’de 4 saat bekletilen ve kısmen steril olan bitkilerin boğum aralarından elde edilen steril bitki parçaları yine steril petri kapları içerisinde % 3 süzkroz içeren ve % 0.8 agar (Sigma), % 0.6’lik agar (Duchefa. Almanya) veya % 0.215 gelrit (Sigma Aldrich. St Lo. Mo) ile katılaştırılan MS besin ortamında $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de tutularak steril bitkiler elde edilmiştir. Steril olan eksplantlar doku kültürü çalışmaları için ayrılmışlardır.

3.2.2 Eksplant izolasyonu

In vitro gelişen steril sürgünlerden yaprak, kök ve gövde eksplantları (boğum arası), uç, 1’inci koltukaltı ve 2’nci koltukaltı meristemi izole edilmiştir. Her biri 5-6 mm uzunluğunda parçalara ayrılarak çoğaltım ortamına konulmuştur.

3.2.3 Adventif sürgün rejenerasyonu

Denemelerde yaprak, 1’inci boğum arası ve 2’nci boğum arası eksplantları BAP sitokininleri ile NAA oksinlerini içeren ortamlara yerleştirilmiştir. Eksplantlar 4 hafta büyümeyi düzenleyiciler içeren ortamlarda tutulduktan sonra büyüme düzenleyici içermeyen MSO ortama alınmış ve 4 hafta bu ortamda tutulmuştur.

Sıvı kültür denemesinde uç meristemi, 1'inci ve 2'inci koltukaltı meristemi, yaprak, gövde (boğum arası) eksplantları BAP, NAA ilave edilmiş sıvı MS içeren Magenta kaplarında kültüre alınarak çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. Bütün doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde aseptik koşullarda yapılmıştır.

3.2.4 Mikroçoğaltım

Denemelerde uç meristem. 1'inci ve 2'nci koltukaltı meristemleri BAP ile NAA içeren ortamlara yerleştirilmiştir. Eksplantlar 4 hafta büyümeyi düzenleyiciler içeren ortamlarda tutulduktan sonra MSO ortama alınmış ve 4 hafta bu ortamda tutulmuştur.

3.2.5 *Agrobacterium* bakteri kültürünün saflaştırılması ve büyütülmesi

Sıvı bakteri kültürlerinin çoğaltılmasına, Nutrient agar (NA) besin ortamında büyütülmüş olan bireysel kolonilerden başlanmış, tek koloniler steril lup ile alındıktan sonra gerekli antibiyotikleri içeren Nutrient Broth (NB) (Sigma Chemical Co St. Lo. Mo) bakteri büyüme ortamına konulmuştur. Daha sonra bakteri kültürleri çalkalamalı inkübatörde $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lik sıcaklıkta 1 ya da 2 gün süreyle büyütülmüştür. Bu kültürler daha sonra gen aktarımında kullanılmıştır. Yeniden bireysel koloniler elde edebilmek için çok az miktarda bakteri kültürü agarlı besin ortamı üzerine steril bir lupla yayılmış, bu kültürleri içeren petri kutuları ters çevrilerek $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. 2 gün içinde kolonilerin oluştuğu gözlenmiştir. Herhangi bir bulaşmayı önlemek için bütün bakteriyel çalışmalar steril kabin içerisinde yapılmıştır.

3.2.6 Bakterinin uzun süreli korunması

Bakteri kültürleri stretch film ile sarılmış, ters çevrilen petri kutularında 4°C 'de 6 hafta korunmuştur. Daha uzun süreli muhafaza işlemi eşit miktarda bakteri kültürü ve % 40 gliserol içeren NB 1.5 ml'lik 'kryogenik' tüplerde karıştırıldıktan sonra sıvı azotla hızlı bir şekilde dondurulup, -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Bu yolla bakteri kültürlerinin canlılığını 10 yıl boyunca muhafaza etmek mümkündür.

3.2.7 *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı

Çalışmalarında. denemeye alınan eksplantlardan yüksek rejenerasyon gösteren eksplantlar gen aktarma çalışmalarında kullanılmıştır.

GV2260 p35S GUS-INT ve LBA 4404 pRGGbar *A. tumefaciens* hatları ile bu eksplantlar inoküle edilmiştir. Her iki *A. tumefaciens* hattı 28 °C’de 50 mg/l km ve 100 mg/l rifampisin içeren NB ortamında 1-2 gün süreyle, büyütülmüş daha sonra eksplantlar sıvı rejenerasyon ortamı ile 1/50 oranında seyretile bu bakteri kültürleri içerisinde 30 dakika süreyle tutularak inokulasyon sağlanmıştır. Bunlardan eksplant kesildiği şekliyle inokulasyona konulmuştur. Ayrıca Clough and Bent (1998) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek sürgün uçları yukarıda belirtilen *Agrobacterium tumefaciens* hatlarıyla seyreltilmeden hazırlanmış süspansiyonlara 30 sn daldırılarak inokulasyon sağlanmıştır.

İnokulasyondan sonra eksplantlar 2 günlük sürede rejenerasyon ortamında tutularak ko-kültivasyona alınmıştır. Eksplantların etrafında aşırı bakteri gelişimi olduğu durumlarda. eksplant 500 mg/l augmentin içeren sıvı rejenerasyon ortamında yıkandıktan sonra steril kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. Bundan sonra, eksplantlar *Agrobacterium* gelişimini önlemek için augmentin (500 mg/l), sadece gen aktarılmış sürgünlerin gelişimini sağlamak için de kanamisin (50 mg/l) içeren rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Bu ortamda gelişen kalluslar sürekli olarak kontrol altında tutularak aktarılan genlerin etkileri gözlenmiştir. Eksplantlar 3 haftada bir alt kültüre alınmıştır.

3.2.8 Histokimyasal GUS analizi

Histokimyasal gen analizi Jefferson (1987) ve Özcan (1993)’ın tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Bitki dokuları 100 mM sodyum fosfat (pH=7.0), 10mM EDTA, %0.1 Triton X-100 ve 1 mM 5 bromo-4 chloro 3 indolyl glucoronide (X-GLUC) içeren solüsyonda 37° C’de gece boyu inkübe edilmiştir. Daha sonra dokular %70’lik alkolde yıkanarak mavi bölge belirlenmiştir.

3.2.9 Elde edilen bitkilerin akvaryum koşullarına adaptasyonu

Rejenere olan sürgünler sayıldıktan sonra uzun sürgünler MSO’da tekrar kültüre alınmış, adaptasyon ortamına aktarılacak bitkilerden yarısı direkt olarak akvaryum ortamına aktarılmış, yarısı %50 distile su ve otoklavda steril edilmiş %50 torf içeren saksılarda geliştirildikten sonra akvaryumlara aktarılmıştır. Akvaryum dibine 4-5 cm

yükseklüğünde ince kum yerleştirilmiş ve akvaryum suyuna haftada bir sifonlama işlemi yapılmış ve sıvı gübre (FloraPride, Tetra Plant) ilave edilmiştir. Akvaryumlarda 24 °C MO2000 Aquarium heater® kullanarak ve 1-2 Adet florasan-Sylvania Aquastar® F 30w/174 10000 K Recyclable lambalar ışıklandırma amacıyla kullanılmıştır.

3.2.10 İstatistiki analizler

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulan. her muamele içerisinde 4 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü 100x10 mm'lik petri kapları, GA⁷ Magenta kutuları veya kültür tüpler (Sigma Aldrich)'den oluşturulmuştur. Çalışmadan elde edilen veriler bilgisayarda "SPSS 16 for Windows" programı ile tesadüf parselleri deneme desenine göre analiz edilmiştir. Post hoc testleri için t test veya Duncans testleri uygulanmıştır. Yüzde değerleri istatistik analizi yapılmadan önce "arcsin transformasyon'una tabi tutulmuştur (Snedecor and Cochran 1967).

4. BULGULAR

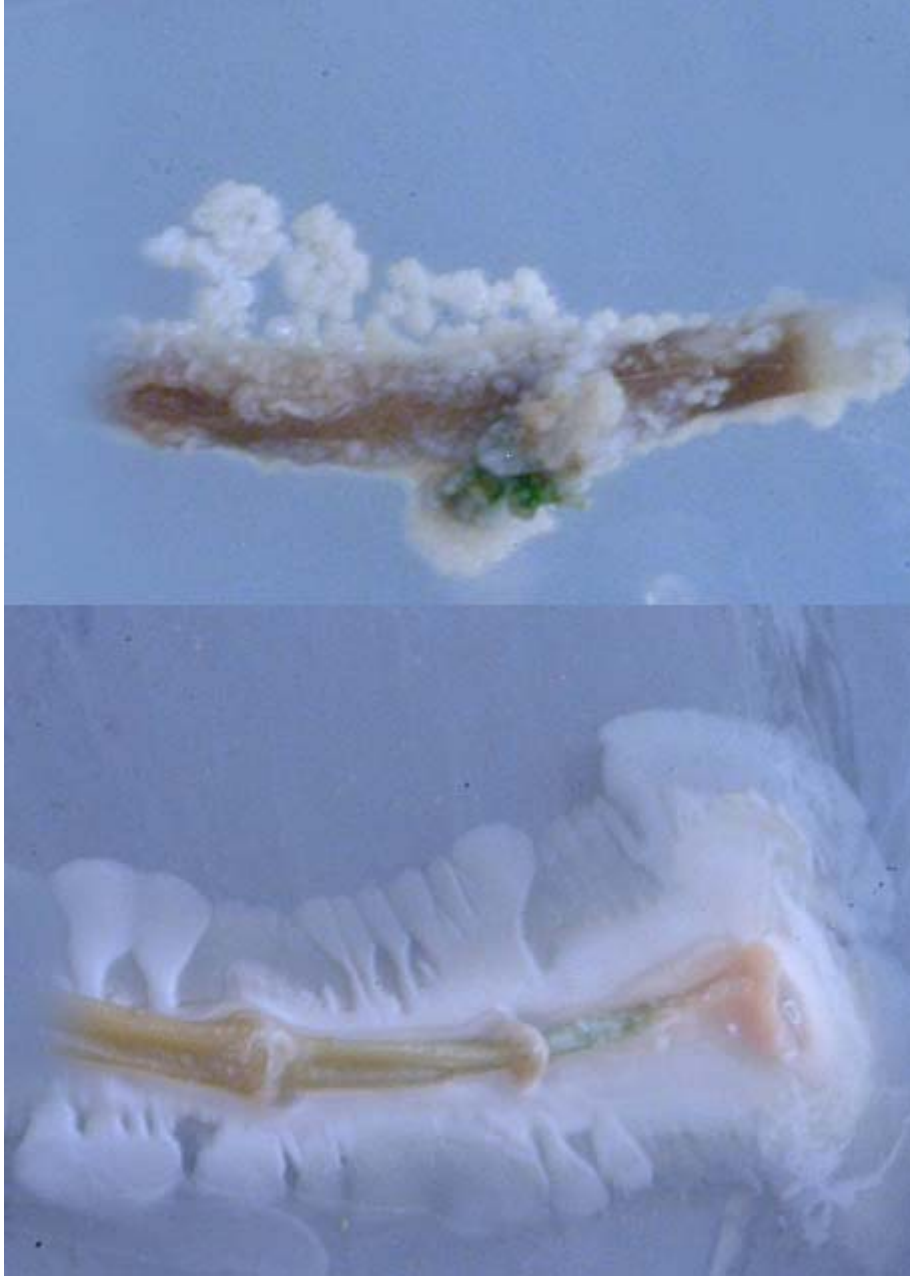
4.1 *R. macrandra* Eksplantlarının Yüzey Sterilizasyonu

Her bitki parçasının yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzer organizmalardan temizlenebilmesi için gerekli olan optimum dezenfektan türleri ve kullanım süreleri birbirinden farklılık göstermektedir. Bundan dolayı bir sterilizasyon çalışmasında amaç en etkili ancak en düşük seviyede dezenfektan dozunun belirlenmesidir (Şumlu 2005).

R. macrandra bitkisi üzerindeki kalıntıların uzaklaştırılması için 30-45 dk çeşme suyunun altında tutulduktan sonra gövde alt ve üst kısım olmak üzere yapraklarından ayrılmış ve ayrı ayrı sterilizasyon yapılmıştır. Tween-20 (1 damla/100 ml) ile 5 dk muameleden sonra yüzey sterilizasyonu için ticari çamaşır suyu (Ace, % 5-6 NaOCl) ve PPM® kullanılmıştır.

4.1.1 Çamaşır suyu ile yüzey sterilizasyonu

Çalışmaya başlanılan alt ve üst gövde eksplantlarının kullanılan en düşük doz ve sürede eksplantların parçalanması nedeniyle Çizelge 4.1.'de görülen iki farklı eksplant farklı konsantrasyon ve sürede çamaşır suyu ile yüzey sterilizasyonunda tutulmuş olup. %10 çamaşır suyunda 5 dk. bekletilen üst gövde eksplantı ve %10 çamaşır suyunda 15 dk. bekletilen alt gövde eksplantında diğer muamelelere nazaran daha az bulaşıklık yüzdesi elde edilmiştir. Fakat kullanılan dezenfektanın etkisiyle çoğu eksplantta klorofil parçalanması olmuş ve renkte sararma ve beyazlaşma gözlenmiştir. Eksplantlar üzerinde %75 bulaşıklık bulunan sağlam kısımları kesilerek MSO ortamına aktarılmıştır (Şekil 4.1). Fakat bir hafta sonra eksplantlarda yeniden bulaşıklık görülmesi nedeniyle farklı konsantrasyonlarda PPM ile sterilizasyon çalışması yapılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.1 Steril olmayan bitkiler üzerinde gelişen mantar ve bakteriler

Çizelge 4.1 Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan çamaşır suyunun eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi

Çamaşır suyu		Eksplant	
		Üst gövde	Alt gövde
Yüzde oranı (%)	Süre (dk)	Bulaşıklık (%)	Bulaşıklık (%)
100	30	100	100
50	30	100	100
30	30	100	100
10	30	100	100
5	30	100	100
100	15	100	100
50	15	100	100
30	15	100	100
10	15	100	75
5	15	100	100
100	10	100	100
50	10	100	100
30	10	100	100
10	10	100	100
5	10	100	100
100	5	100	100
50	5	100	100
30	5	100	100
10	5	75	100
5	5	100	100

4.1.2 PPM ile yüzey sterilizasyonu

Yaprak. üst gövde ve alt gövde eksplantları Çizelge 4.2’de belirtilen süre ve yüzdelerde PPM uygulaması yapılmıştır. Eksplantlarda tamamen klorofil parçalanması (zarar) olmamasına rağmen çoğu eksplantta kısmen renk açılması gözlenmiştir. Az zarar gören eksplantlarda bulaşıklık görülürken steril olan eksplantlarda da zarar nedeniyle

denemelerde başarı sağlanamamıştır (Şekil 4.2). Süre bazında 4 saat bekletilen eksplantlarda diğer uygulamalara nazaran daha az bulaşıklık yüzdesi tespit edilmesi nedeniyle çamaşır suyu ve PPM içeren yeni bir strelizasyon çalışması denemesi yapılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.2 Gövde eksplantları üzerinde gelişen fungus bulaşığı

Çizelge 4.2 Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan PPM'in eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi

PPM*		Eksplant					
		Yaprak		Üst gövde		Alt gövde	
		Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk
(%)	Süre (saat)						
1.5	1	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
1.5	2	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
1.5	4	100	Yeşil	50	Yeşil	75	Yeşil
1.5	8	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
1.5	12	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
2	1	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
2	2	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
2	4	100	Yeşil	50	Yeşil	100	Yeşil
2	8	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
2	12	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
2.5	1	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
2.5	2	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
2.5	4	100	Yeşil	75	Yeşil	100	Yeşil
2.5	8	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
2.5	12	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
3	1	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
3	2	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
3	4	100	Yeşil	50	Yeşil	75	Yeşil
3	8	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil
3	12	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil

** PPM: Methylchloroisoithiazolinone and methylisoithiazolinone içerikli bitki koruyucu karışım

4.1.3 PPM ve çamaşır suyu ile yapılan yzey sterilizasyonu

Bu denemede yaprak. st ve alt gvde eksplantları %5-10-30-50 ve 100 oranında 5-10-15 ve 30 dk. Çamaşır suyu ile steril edildikten sonra 4 saat %1.5 ve %2 PPM içeren steril distile su içinde bekletilmiştir.

Bir hafta sonra yaprak eksplantlarında izelge 4.3'de gvrdg gibi %30, 50 ve 100 oranında çamaşır suyu 30 dk ve %1.5 PPM 4 saat süre ile %50 ile 100 oranında çamaşır suyu 15 dk ve %1.5 PPM ile 4 saat muamele edilen eksplantlarda klorofil parçalanmasıyla birlikte beyazlaşma gvrlmştir. Diğer oran ve srelerde ise eksplantlar zarar gvrmemiştir. Fakat %100 bulaşıklık rastlanmıştır.

st gvde eksplantlarında %30 -100 oranında çamaşır suyu 30 dk ve %1.5 PPM 4 saat süreyle muamele edilen eksplantlarda klorofil parçalanmasıyla birlikte beyazlaşma gvrlmştir. Diğer oran ve srelerde ise eksplantlarda %100 zarar ve bulaşıklığa rastlanmıştır.

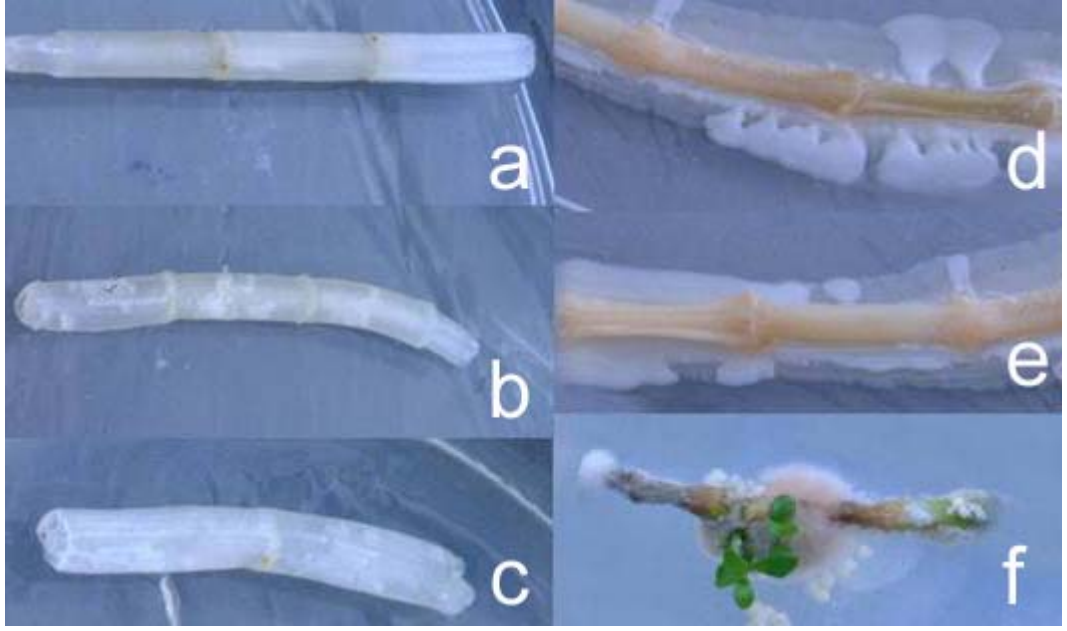
Alt gvde eksplantlarında %30 çamaşır suyu 15 dk ve %1.5 PPM 4 saat süre muamele edilen eksplantlarda bulaşıklık bulunmazken klorofil parçalanmasıyla birlikte beyazlaşma gvrlmştir. Geri kalan tüm oran ve srelerde ise eksplantlar hem zarar hemde %100 bulaşılığa rastlanmıştır.

Çizelge 4.4'de belirtilen sterilizasyon bulgularında; %50-100 çamaşır suyu yüzdesinde 10 dk. ve %1.5 PPMde 4 saat süre ile bekletilen yaprak eksplantlarında bulaşıklık elde edilmezken klorofil parçalanması nedeniyle materyal kullanılamaz hale gelmiştir (şekil 4.3). st gvde eksplantındaki %100 ve %30 çamaşır suyunda 10 dakikadan sonra %50 ve %5 çamaşır suyunda sonra 1.5 PPMde 4saat bekletilen uygulamalarda da bulaşıklık yüzdesi bulunmazken yaprak eksplantıda gvzlendiği gibi klorofil parçalanması gvzlenmiştir.

Aynı uygulamalarda %30 ve %10 çamaşır suyunda 5 dakikadan sonra 1.5 PPM'de 4saat bekletilen st gvde eksplantında kısmen klorofil parçalanması ile %50 oranında bulaşıklık elde edilmiş, bu eksplantların yeşil ve steril olan kısımları kesilerek MSO besin ortamında kültüre alınmıştır.

Alt gövde eksplantında %10 çamaşır suyunda 10 dk ve %30 çamaşır suyunda 5 dk dan sonra %1.5 PPM'de 4 saat bekletilen eksplantlarda da benzer şekilde bulaşıklık elde edilmezken klorofil parçalanmasına bağlı renkte beyazlaşma bulunmuştur.

Çizelge 4.4'de yapılan diğer uygulamalarda ise eksplantaların büyük çoğunluğunda parçalanma ve %100 bulaşıklık gözlenmiştir.



Şekil 4.3 *R. macranda* bitkisinin yüzey sterilizasyonu

a.b.c. Farklı konsantrasyonlarda PPM

d.e.f. Çamaşır suyu ile yapılan yüzey sterilizasyonunda gelişen bulaşıkların görüntüsü

Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS* ve %1.5 PPM**'in eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi

ÇS		PPM		Eksplant					
				Yaprak		Üst gövde		Alt gövde	
(%)	Süre (dk)	(%)	Süre (saat)	Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk
100	30	1.5	4	0	Beyaz	0	Beyaz	100	Beyaz
50	30	1.5	4	0	Beyaz	100	Beyaz	100	Beyaz
30	30	1.5	4	0	Beyaz	0	Beyaz	100	Beyaz
10	30	1.5	4	100	Yeşil	100	Beyaz	100	Beyaz
5	30	1.5	4	100	Yeşil	100	Beyaz	100	Beyaz
100	15	1.5	4	0	Beyaz	100	Beyaz	100	Beyaz
50	15	1.5	4	0	Beyaz	100	Beyaz	100	Beyaz
30	15	1.5	4	100	Beyaz	100	Beyaz	0	Beyaz
10	15	1.5	4	100	Yeşil	100	Beyaz	100	Beyaz
5	15	1.5	4	100	Yeşil	100	Beyaz	100	Beyaz

* ÇS : Çamaşır suyu

** PPM: Methylchloroisothiazolinone and methylisothiazolinone içerikli bitki koruyucu karışım.

Çizelge 4.4 Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS* ve %1.5 PPM** ile 4 saat bekletilen eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi

ÇS		PPM		EKSPLANT					
				Yaprak		Üst gövde		Alt gövde	
				Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk
(%)	Süre (dk)	(%)	Süre (saat)						
100	10	1.5	4	0	Beyaz	0	Beyaz	100	Beyaz
50	10	1.5	4	0	Beyaz	100	Beyaz	100	Beyaz
30	10	1.5	4	100	Beyaz	0	Beyaz	100	Beyaz
10	10	1.5	4	100	Yeşil	100	Beyaz	0	Beyaz
5	10	1.5	4	100	Beyaz	100	Beyaz	100	Beyaz
100	5	1.5	4	100	Beyaz	100	Beyaz	100	Beyaz
50	5	1.5	4	100	Beyaz	0	Beyaz	100	Beyaz
30	5	1.5	4	100	Beyaz	50	Beyaz-yeşil	0	Beyaz
10	5	1.5	4	100	Yeşil	50	Beyaz-yeşil	100	Beyaz
5	5	1.5	4	100	Yeşil	0	Beyaz	100	Beyaz

* ÇS : Çamaşır suyu

** PPM: Methylchloroisothiazolinone and methylisothiazolinone içerikli bitki koruyucu karışım.

Çizelge 4.5 - 4.6 'da %5-10-30-5 ve 100 çamaşır suyunda 30-15-10 ve 5 dk bekletildikten sonra %2 PPM'de 4 saat bırakılıp MSO besin ortamına alınan ve 1 hafta bekletilen eksplantlardan; yaprak eksplantının %100 -50-30 çamaşır suyunda 30 dakika, %50 çamaşır suyunda 15 dakika, %100-50 çamaşır suyunda 10 dakika ve %100 çamaşır suyunda 5 dakika bekletildikten sonra %2 PPMde 4 saat süreyle steril edilmeye çalışılan eksplantlarda bulaşıklık yüzdesi bulunmazken klorofil kaybına bağlı olarak beyaz renkli yapraklarda herhangi bir gelişim gözlenememiştir.

Aynı şekilde üst ve alt gövde eksplantının da Çizelge 4.5 ve 4.6 belirtildiği gibi benzer şekillerde bulaşıklık yüzdesi bulunmayan eksplantlarda klorofil parçalanmasına bağlı olarak ilerleyen dönemlerde herhangi bir gelişim gözlenememiştir.

Çizelge 4.2'de belirtilen %75 ve %50 bulaşıklık yüzdesi bulunan ve Çizelge 4.4'de belirtilen %50 bulaşıklık yüzdesi bulunan eksplantlarda kesilerek MSO besi ortamında üç hafta bekletilen eksplantlardan bulaşıklık gözükmeyen petri kaplarından alınan gövdeler sterilizasyondan emin olmak amacıyla steril tüplerde de 2 hafta bekletilmiş ve bekletilen eksplantlarda gelişim elde edilmesiyle birlikte *in vitro* koşullarda çoğaltım çalışmasında kullanılmak amacıyla %100 steril bitkiler elde edilmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS* ve %2 PPM**'le 4 saat beklemenin eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi

ÇS		PPM		Eksplant					
				Yaprak		Üst gövde		Alt gövde	
(%)	Süre (dk)	(%)	Süre (saat)	Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk
100	30	2	4	0	Beyaz	0	Beyaz	100	Beyaz
50	30	2	4	0	Beyaz	100	Beyaz	100	Beyaz
30	30	2	4	0	Beyaz	0	Beyaz	100	Beyaz
10	30	2	4	100	Yeşil	100	Beyaz	0	Beyaz
5	30	2	4	100	Yeşil	100	Beyaz	100	Beyaz
100	15	2	4	100	Yeşil	100	Beyaz	100	Beyaz
50	15	2	4	0	Beyaz	100	Beyaz	100	Beyaz
30	15	2	4	100	Beyaz	0	Beyaz	0	Beyaz
10	15	2	4	100	Yeşil	100	Beyaz	100	Beyaz
5	15	2	4	100	Yeşil	0	Beyaz	100	Beyaz

* ÇS : Çamaşır suyu

** PPM: Methylchloroisothiazolinone and methylisothiazolinone içerikli bitki koruyucu karışım.

Çizelge 4.6 Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS* ve PPM**'in eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi

ÇS		PPM		Eksplant					
				Yaprak		Üst gövde		Alt gövde	
(%)	Süre (dk)	(%)	Süre (saat)	Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk
100	10	2	4	0	Beyaz	100	Beyaz	100	Beyaz
50	10	2	4	0	Beyaz	100	Beyaz	100	Beyaz
30	10	2	4	100	Yeşil	0	Beyaz	100	Beyaz
10	10	2	4	100	Yeşil	100	Beyaz	100	Beyaz
5	10	2	4	100	Yeşil	100	Beyaz	100	Beyaz
100	5	2	4	0	Beyaz	100	Beyaz	100	Beyaz
50	5	2	4	100	Beyaz	100	Beyaz	100	Beyaz
30	5	2	4	100	Yeşil	100	Beyaz	100	Beyaz
10	5	2	4	100	Yeşil	100	Beyaz	100	Beyaz
5	5	2	4	100	Yeşil	0	Beyaz	100	Beyaz

* ÇS : Çamaşır suyu

** PPM: Methylchloroisothiazolinone and methylisothiazolinone içerikli bitki koruyucu karışım.

4.2 Adventif Sürgün Rejenerasyonu Aracılığla Hızlı Çoğaltım

4.2.1 Agar ile katılaştırılan ortamlarda yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna BAP ve NAA'nın etkisi

Steril bitkilerden elde edilen yaprak eksplantları sürgün rejenerasyonu için BAP ve NAA içeren agar ile katılaştırmış 4 farklı ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Ortamlarda bulunan değişik orandaki hormonların etkisiyle tüm eksplantlarda kallus ve sürgün oluşumu gözlenmiştir. Ortamlarda eksplant başına kallus oran bakımından 0.05 düzeyinde ve eksplant başına sürgün sayısı ve uzunluğu, eksplant başına kök oranı, eksplant başına kök uzunluğu ve kök sayısı bakımından 0.01 düzeyinde istatistiki farklılık görülmüştür (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	4583.33	5.50*	110.44	32.32**	4.29	59.68**
Hata	8	833.33		3.42		0.71	
Toplam	11						
V. K.	S.D.	Kök oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)		Eksplant başına kök sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	6440.97	24.73**	233.56	10.74**	2.75	8.25**
Hata	8	260.42		21.75		0.33	
Toplam	11						

**0.01 düzeyinde önemli

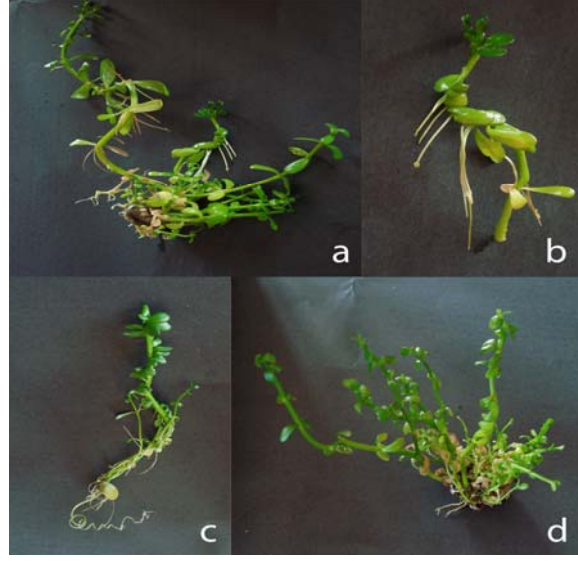
* 0.05 düzeyinde önemli

Varyans analizi yapılan eksplantlarda farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncans testi yapılmıştır. Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi dört ortamda elde

edilen eksplant başına kallus oranı %25.00 ile %100.00 arasında değişmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı; 0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında 18.33 adet iken (Şekil 4.4) 0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l NAA içeren MS ortamdan en az 5.33 adet sürgün elde edilmiştir. 0.25 mg/l BAP ve 0.25-0.50 mg/l NAA içeren MS içeren ortamdan 2 adet fenotip bakımından kıvrık sürgün gözlenmiştir (Şekil 4.5). Eksplant başına sürgün uzunluğu 1.70 cm ve 4.50 cm arasında değişmiştir. En uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamdan, en kısa sürgün ise 0.25 mg/l BAP ve 0.75 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir. 8 hafta sonunda 3 ortamda da %0-100 arasında kök elde edilmiştir. Eksplant Başına Kök Oranı bakımından %100.00 kök elde edilen bitkiler 0.25 mg/l BAP ve 0.25-0.50 mg/l NAA içeren MS içeren ortamdan 18.33 cm'lik en uzun kök ve 0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l NAA içeren MS ortamından % 83.33 ile 8.66 cm'lik en kısa kök olarak elde edilmiştir. 0.25 mg/l BAP ve 0.75 mg/l NAA içeren MS içeren ortamında kök oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 4.4 0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi gelişme gösteren sürgünler



Şekil 4.5 a.c. 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS içeren ortamdan, b.d. 0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS içeren ortamdan elde edilen fenotip bakımından kıvrık sürgünler

Çizelge 4.8 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar		Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	Kök oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına kök sayısı (adet)	Eksplant başına kök uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)						
0.25	0.25	41.66b ¹	18.00a ²	4.50a ²	91.67a ²	2.00a ²	18.33a ¹
0.25	0.50	100.00a	18.33a	3.00b	100.00a	2.00a	18.33a
0.25	0.75	25.00b	13.00b	1.70d	0.00b	0.00b	0.00b
0.25	1.00	100.00a	5.33c	2.43c	83.33a	2.00a	8.66b

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

²Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.2.2 Gelrit katılaştırılmış ortamlarda yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna BAP ve NAA'nın etkisi

Ortamda bulunan Yaprak eksplantları sürgün rejenerasyonu için gelrit ile jelleştirilmiş. BAP ve NAA içeren 4 farklı ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Eksplant başına kallus ve sürgün oranı %100 olduğu için varyans analizi yapılmamıştır. Ortamlarda bulunan değişik orandaki hormonların etkisiyle eksplant başına sürgün uzunluğu ve sayısı bakımından 0.01 düzeyde ve Eksplant Başına Kök Oranı bakımından 0.05 düzeyinde farklılık görülmüştür. Eksplant başına kök sayısı ve uzunluğu bakımından ortamlar arasında farklılık tespit edilmemiştir (Çizelge 4.9). Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncans testi sonuçları Çizelge 4.10'de verilmiştir.

Çizelge 4.9 Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Kök oluşturan eksplant oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	33.38	34.38**	0.41	42.34**	468.75	3.00*
Hata	8	0.96		0.01		156.25	
Toplam	11						
V. K.	S.D.	Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)			
		K.O.	F	K.O.	F		
Ortam	3	30.13	2.21*	2.75	5.35*		
Hata	8	13.62		0.51			
Toplam	11						

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Eksplant başına sürgün sayısı bakımından incelendiğinde 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında 11.66 adet ile en fazla sürgün sayısı elde edilmiştir. Çizelge 4.10 'da belirtildiği gibi sürgün uzunluğu 1.43 cm ile 2.06 cm arasında değişmektedir. En uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir (Şekil 4.6). Ortamlardaki eksplant başına kök oluşum yüzdesi üç ortamda %100 elde

edilmişken 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında %75 oranında elde edilmiştir. Eksplant başına kök sayısı 2.33 ve 9.83 adet arasında değişmektedir. Kök sayısı 0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında en fazla bulunmuş, bunu 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında ve 0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l NAA içeren MS ortamlar takip ederken en düşük oran 0.25 mg/l BAP ve 0.75 mg/l NAA içeren MS ortamında da elde edilmiştir. En uzun kök 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Eksplant başına kök uzunluğu 1-3.03 cm arasında değişmektedir.

Çizelge 4.10 Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

ORTAMLAR		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	Kök oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına kök sayısı (adet)	Eksplant başına kök uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)					
0.25	0.25	11.66a ²	2.06ab ²	75.00 ¹	5.13ab ¹	3.03a ¹
0.25	0.50	5.00b	1.43c	100.00	9.83a	1.00b
0.25	0.75	4.43b	2.00b	100.00	2.33b	1.00b
0.25	1.00	5.867b	2.30a	100.00	7.13ab	1.66b

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

²Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.6 0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilen bitkiler

4.2.3 Agar ile katılaştırılan ortamlarda 1'inci boğum arası eksplantında sürgün rejenerasyonuna BAP ve NAA'nın etkisi

1'inci boğum arası eksplantları sürgün rejenerasyonu için BAP ve NAA içeren 4 farklı ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Ortamlarda bulunan değişik orandaki hormonların etkisiyle kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallus oluşturan eksplant oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve uzunluğu, eksplant başına kök uzunluğu bakımından ortamlar arasındaki farklılık istatistiki olarak 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Eksplant başına sürgün oranı, eksplant başına yan sürgün sayısı, kök oranı ve eksplant başına kök sayısı bakımından istatistiki olarak herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir (Çizelge 4.11).

Duncans testi sonuçlarına ait Çizelge 4.12 incelendiğinde; 1'inci boğum arası ile yapılan uygulamada kallus oluşturan eksplant oranı bakımından incelendiğinde 0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l NAA içeren MS ortamında %100 kallus oluşumu elde edilmiştir. 0.25 mg/l BAP ve 0.75 mg/l NAA içeren MS ortamında %100 sürgün oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.7). En uzun sürgün (5.33 cm) 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Ayrıca Eksplant başına sürgün sayısı bakımından 0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında 27.33 adet sürgün oluşumu tespit edilmiştir.



Şekil 4.7 *R. macrandra* bitkisinde 0.25 mg/l BAP ve 0.75 mg/l NAA içeren MS ortamında en uzun sürgün elde edilen bitkilerden bir görünüm

Çizelge 4.11 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'nci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	1024.30	15.06**	468.75	1.28	7.55	72.53**	243.88	77.018**
Hata	8	0.07		364.58		0.10		3.16	
Toplam	11								
V. K.	S.D.	Eksplant başına yan sürgün sayısı (adet)		Kök oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	0.33	1.00	1658.33	1.59	40.30	1.08	3.83	10.07**
Hata	8	0.33		1039.58		37.03		0.38	
Toplam	11								

**0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.12 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortam		Kallus Oluşturan Eksplant Oranı (%)	Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Eksplant Başına Yan Sürgün Sayısı (adet)	Eksplant Başına Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Oluşturan Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)	Eksplant Başına Kök Uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)								
0.25	0.25	58.33ab ¹	75.00	22.66b ¹	0.66	5.33a ¹	75.00	15.66	3.66b ¹
0.25	0.50	91.66a	83.33	27.33a	0.00	2.66b	91.66	14.66	2.00b
0.25	0.75	91.66a	100.00	12.00c	0.00	2.00c	40.00	12.00	1.00b
0.25	1.00	100.00a	100.00	8.00d	0.00	2.00c	50.00	7.46	1.70b

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.2.4 Gelrit ile katılıştırılan ortamlarda 1'inci boğum arası eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu

1'inci boğum arası eksplantları sürgün rejenerasyonu için BAP ve NAA içeren 4 farklı ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm Ortamlarda sürgün ve kök oluşumu %100 olduğu için varyans analizi yapılmamıştır. Değişik orandaki hormonların etkisiyle meydana gelmiş istatistiki farklılık eksplant başına sürgün sayısı, uzunluğu ve eksplant başına kök sayısı da 0.01 derecede ve eksplant başına kök uzunluğuda 0.05 derecede önemli bulunmuştur (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 Gelrit ile katılıştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	29.61	15.63**	0.24	41.71**
Hata	8	1.89		0.01	
Toplam	11				
V. K.	S.D.	Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	8.04	11.48**	5.71	6.34*
Hata	8	0.70		0.90	
Toplam	11				

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.14'de belirtildiği gibi 0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında eksplant başına sürgün sayısı 11.23 adet olarak diğer ortamlara nazaran daha fazla olarak elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün uzunluğu 1.60 cm ile 0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir (Şekil 4.8). Eksplant başına kök sayısı ise 0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında ve 0.25 mg/l BAP ve

1.00 mg/l NAA içeren MS ortamında 4.73 adet olarak tespit edilmiştir. 1.00 cm ve 3.63 cm arasında değişen kök uzunluğu en çok 0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında tespit edilmiştir.



Şekil 4.8 0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilen bitkiler

Çizelge 4.14 Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	Kök oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına kök sayısı (adet)	Eksplant başına kök uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)						
0.25	0.25	100.00	1.26b ²	7.80b ²	100.00	3.33a ²	3.16a ¹
0.25	0.50	100.00	1.00c	11.23a	100.00	4.13a	3.63a
0.25	0.75	100.00	1.00c	5.00c	100.00	1.00b	1.00b
0.25	1.00	100.00	1.60a	4.33c	100.00	4.73a	1.66b

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

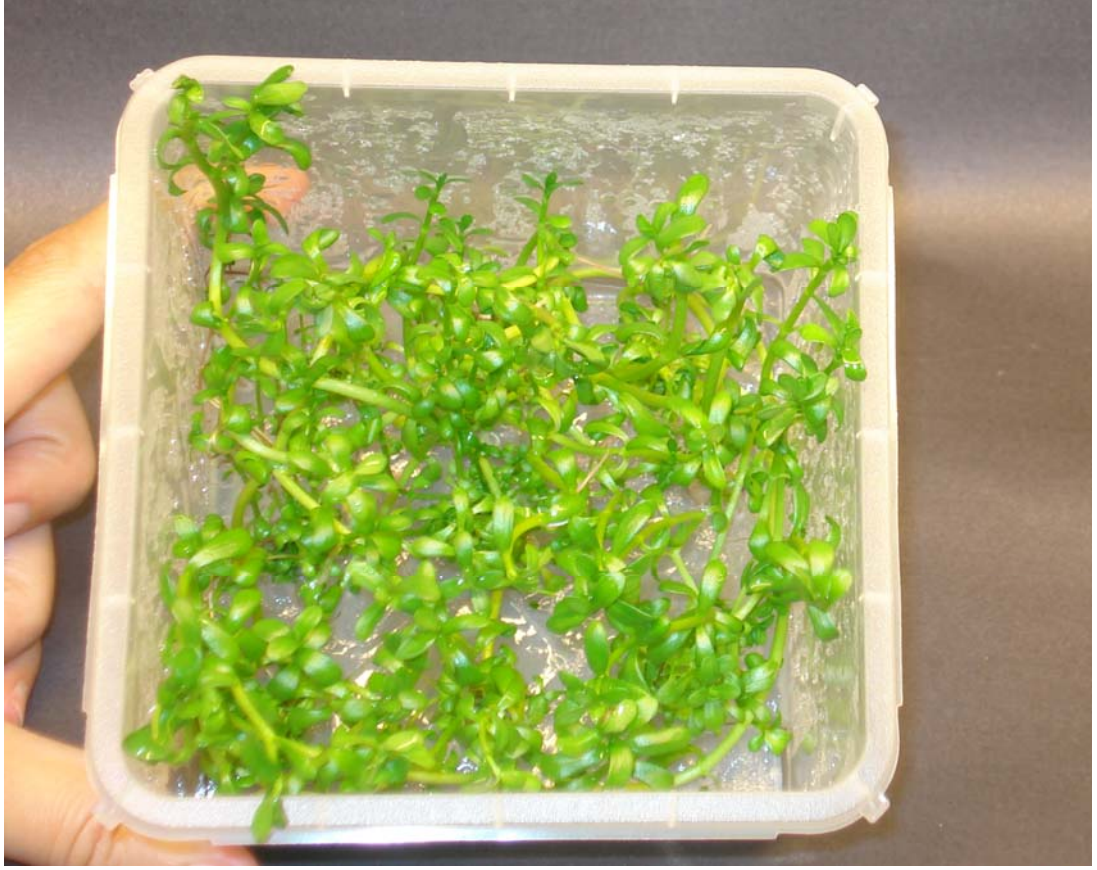
²Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.2.5 Agar içeren ortamlarda 2'inci boğum arası eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu

2'nci boğum arası eksplantları sürgün rejenerasyonu için BAP ve NAA içeren 4 farklı ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra kallus oluşturan eksplant oranı, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, eksplant başına kök veren eksplant oranı, kök sayısı ve kök uzunluğu incelenmiştir.

Çizelge 4.15'de 2'inci boğum arası eksplantından elde edilen bitkilerde yapılan incelemede ortamlar arası farklılık kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün veren eksplant oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına kök yüzdesi 0.01 düzeyde ve eksplant başına sürgün uzunluğu 0.05 düzeyde tespit edilmiştir. Kök sayısı ve uzunluğu bakımından ortamlar arasında farklılık bulunmamıştır. Farklılığın önem derecesi belirlenmek amacıyla Duncans Testi sonucu Çizelge 4.16'da verilmiştir. Eksplant başına kallus oluşumu %50-100 arasında değişmektedir. Ortamlar arasında 0.25 mg/l BAP ve 0.75 mg/l NAA içeren MS ortamında %50 oranında eksplant başına sürgün yüzdesi tespit edilirken geri kalan bütün eksplantlarda %100 sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı 6.66-18.33 adet arasında ve sürgün uzunluğu 1.80-3.33 arasında değişmiştir (Şekil 4.9). Eksplant başına sürgün sayısı 18.33 ve en uzun sürgün 3.33 cm 0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Kök yüzdesi, kök sayısı ve uzunluğu sırasıyla %0.66- 15 adet/ 5.66-14.33 adet ve 1.33-2.70 cm arasında değişmiştir. Eksplant başına en fazla kök yüzdesi 0.25mg/l BAP -0.50mg/l NAA içeren ortamdan ve en fazla kök sayısı 14.53 adet ile 0.25mg/l BAP -1.00 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Kök uzunluğu 1.33-2.70 cm arasında değişmiştir.



Şekil 4.9 0.25 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilen bitkiler

Çizelge 4.15 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	2500.00	8.00**	1875.00	12.00**	88.50	14.34**	1.545	3.66*
Hata	8	312.50		156.25		6.16		0.42	
Toplam	11								
V. K.	S.D.	Kök oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)			
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F		
Ortam	3	2910.75	18.61**	47.24	1.76	1.25	1.83		
Hata	8	156.33		26.75		0.68			
Toplam	11								

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.16 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar		Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Sürgün oluşturan eksplant oranı(%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	Kök oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına kök sayısı (adet)	Eksplant başına kök uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)							
0.25	0.25	50.00b ¹	50.00b ¹	6.66b ¹	2.83ab ²	50.00b ¹	5.66	2.66
0.25	0.50	50.00b	100.00a	18.33a	3.33a	75.00a	11.00	2.00
0.25	0.75	100.00a	100.00a	11.28b	1.80b	0.66c	6.86	1.33
0.25	1.00	100.00a	100.00a	7.00b	2.00b	50.00b	14.33	2.70

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

²Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

4.2.6. Gelrit ile katılaştırılmış ortamlarda 2'inci boğum arası eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu

Gelrit içeren eksplantları sürgün rejenerasyonu için BAP ve NAA içeren 4 farklı ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm eksplantlarda %100.00 sürgün ve kök oluşumu olduğu için varyans analizi yapılamamıştır. Eksplant başına sürgün uzunluğu ve eksplant başına kök sayısı bakımından ortamlar arasındaki farklılık 0.05 düzeyde önemli çıkmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına kök uzunluğu bakımından ortamlar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemsiz çıkmıştır (Çizelge 4.17). Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncans testi yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.17 Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	2.10	0.59	0.10	3.87*
Hata	8	3.58		0.03	
Toplam	11				
V. K.	S.D.	Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	12.00	3.16*	0.19	1.29
Hata	8	3.79		0.15	
Toplam	11				

*0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.18'de görüldüğü gibi NAA'nın her konsantrasyonunda artış ile sürgün sayısında artış gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 5.93 adet ile 7.66 adet arasında değişmektedir. En fazla sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP ve 1.00 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu 1.00-1.40 cm arasında değişmiştir. 0.25 mg/l BAP ve 0.25-0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında sürgün uzunluğu bakımından her hangi bir farklılık görülmemiştir. En uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l

NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.10). Eksplant başına kök sayısı ise 2.60 adet ile 7.16 adet arasında değişmektedir. En çok kök sayısı 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Ortamlar arasında kök uzunluğu ise 1.00cm ile 1.33cm arasında değişmektedir (Çizelge 4.18).



Şekil 4.10 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilen bitkiler

Çizelge 4.18 Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	Eksplant başına kök sayısı (adet)	Eksplant başına kök uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)				
0.25	0.25	5.93	1.40a ¹	7.16a ¹	1.00
0.25	0.50	6.00	1.36a	6.36ab	1.33
0.25	0.75	7.00	1.30ab	5.00ab	1.00
0.25	1.00	7.66	1.00b	2.60b	1.50

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

4.3 *In vitro* Koşullarda *R. macrandra* Bitkisinin Hızlı Çoğaltımı

4.3.1 Agar ile katılaştırılmış ortamlarda uç meristemi eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu

Steril bitkilerden alınan uç meristemleri hızlı çoğaltım amacıyla farklı oranlarda BAP (0.25 mg/l) ve NAA (0.00-0.1-0.25-0.50 mg/l) içeren 4 farklı ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm ortamlarda %100 sürgün oluşumu gözlemlendiği için varyans analizi yapılmamıştır. Varyans analizi sonuçları Çizelge 4.19’ da verilmiştir.

Çizelge 4.19 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının uç meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (Adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	5188.49	4.15*	92.20	5.096**	17.74	9.03**
Hata	8	1250.00		18.09		1.96	
Genel Toplam	11						
V. K.	S.D.	Kök oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	119.04	1.00	87.60	3.24	0.82	0.75
Hata	8	119.04		27.04		1.09	
Genel Toplam	11						

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.19’da görüldüğü gibi kallus oluşturan eksplant oranı 0.05 düzeyde önemli, eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğu 0.01 düzeyde önemli bulunmuştur. Farklılığın önem derecesi belirlenmek amacıyla Duncans Testi yapılmıştır.

Çizelge 4.20’de görüldüğü gibi kallus oluşturan eksplant oranı 0.25mg/IBAP ve 0.25mg/l NAA içeren ortamda %66.66 ve %33.33 kallus oluşumu gözlenirken geri

kalan iki ortamda kallus oluşumu gözlenmemiştir. Tüm eksplantlarda sürgün oluşumu gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından sayı 2.00-18.00 adet arasında değişmiştir. Ortalama sürgün uzunluğu 7.00 ile 12.66 arasında değişmiştir. Tüm eksplant üzerinde kök oluşumu gözlenirken en fazla 11.66 adet ve en uzun 2.33cm kök 0.25 mg/l BAP içeren ortamda gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 En uzun sürgün taşıyan 0.25 mg/l BAP - 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamından gelişen bitkilerin görüntüsü

Çizelge 4.20 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının uç meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar		Kallus Oluşturan Eksplant Oranı (%)	Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Eksplant Başına Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Oluşturan Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)	Eksplant Başına Kök Uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)							
0.25	0.00	66.66a ¹	100.00	14.00ab ²	7.00bcd ²	100.00	11.66	2.33
0.25	0.1	33.33a	100.00	2.00c	8.58bc	100.00	12.33	1.66
0.25	0.25	0.00b	100.00	16.66a	9.23b	100.00	9.00	2.33
0.25	0.50	0.00b	100.00	18.00a	12.66a	100.00	10.00	1.33

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

²Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.3.2 Gelrit ile katılaştırılan ortamlarda uç meristemi eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu

Uç meristem eksplantları BAP ve NAA içeren 4 farklı ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm eksplantlarda kallus, sürgün ve kök oluşumu gözlenmiştir. bu yüzden varyans analizi yapılmamıştır. Tüm parametrelerde ortamlar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık görülmemiştir (Çizelge 4.21). Azda olsa ortamlar arasındaki farklılık Çizelge 4.22’de verilmiştir.

Çizelge 4.21 Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının uç meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (Adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	1111.11	0.93	14.33	1.354	3.29	1.06
Hata	8	1197.91		10.58		3.10	
Genel Toplam	11						
V. K.	S.D.	Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)			
		K.O.	F	K.O.	F		
Ortam	3	36.00	0.82	1.86	1.31		
Hata	8	43.50		1.42			
Genel Toplam	11						

Çizelge 4.22’de görüldüğü gibi eksplant başına kallus oluşum yüzdesi, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğu sırasıyla %0-33.33 / 3-8 adet, 5-17.6 cm /12.33 adet ve 1-2.66 cm arasında değişmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Uç meristemi eksplantında 0.25 mg/l BAP - 0.00 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilen bitkiler

Çizelge 4.22 Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının uç meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar		Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	Eksplant başına kök sayısı (adet)	Eksplant başına kök uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)					
0.25	0.00	33.33	8.00	7.16	17.00	1.00
0.25	0.1	0.00	7.00	7.00	14.33	1.66
0.25	0.25	33.33	3.00	5.66	12.33	2.66
0.25	0.50	0.00	6.66	5.00	20.33	1.00

4.3.3 Agar ile katılaştırılan ortamlarda farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'inci koltukaltı meristemi eksplantında ile sürgün rejenerasyonuna etkisi

1'inci koltuk altı meristemi eksplantları hızlı çoğaltım amacıyla BAP ve NAA içeren 4 farklı ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Varyans analizine tabii tutulmuştur. Çizelge 4.23'de görüldüğü gibi kallus oluşturan eksplant, sürgün sayısı ve uzunluğu bakımından ortamlar arası farklılık 0.01 düzeyde, eksplant başına kök sayısı ve uzunluğu bakımından ortamlar arasında 0.05 düzeyde farklılık önemli bulunmuştur. Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncans Testi sonuçları Çizelge 4.24'de verilmiştir.

Çizelge 4.23 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'nci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	55049.60	8.48**	267.8	3.00	60.22	26.90**
Hata	8	595.23		89.28		2.24	
Toplam	11						
V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	53.90	27.08**	41.85	3.44*	2.85	3.15*
Hata	8	1.99		12.14		0.90	
Toplam	11						

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.24'de görüldüğü gibi 0.25 mg/l BAP -0.1 ve 0.50mg/l NAA içeren ortamlarda kallus oluşumu gözlenmezken diğer ortamlarda %33.33-83.33 arasında değişmiştir. Tüm eksplantlarda sürgün oluşumu gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 7-17 arasında değişmiştir ve en fazla 17 adet sürgün 0.25mg/ BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamda elde edilmiştir. En kısa sürgün 7.70 cm 0.25mg/ BAP içeren MS ortamdan ve en uzun sürgün 11.00 cm 0.25mg/ BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde

edilmiştir (Şekil 4.13). Tüm ortamlarda kök oluşumu gözlenirken kök sayısı 11.00-15.00 adet arasında değişmiştir. En uzun 2.66 cm lik kökler 0.25mg/ BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir.



Şekil 4.13 0.25mg/ BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamda en fazla gelişim gösteren bitkiler

Çizelge 4.24 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'inci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar		Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	Kök oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına kök sayısı (adet)	Eksplant başına kök uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)							
0.25	0	83.33a ¹	100.00	10.33b ¹	7.70c ¹	100.00	11.00b ²	1.66b ²
0.25	0.1	0.00c	100.00	7.00c	8.00c	100.00	11.00b	2.66ab
0.25	0.25	33.33bc	100.00	10.66b	16.00a	100.00	15.00b	1.33b
0.25	0.50	0.00c	100.00	17.00a	11.00b	100.00	13.00b	1.00b

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

²Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.3.4 1'inci koltukaltı meristeminde gelrit ile katılaştırılan ortamlarda BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu

Birinci koltukaltı merstemi eksplantları hızlı çoğaltım amacıyla BAP ve NAA içeren 4 farklı ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm eksplantlardan sürgün oluşumu ve tüm sürgünlerden kök oluşumu gözlenmiştir. Bu yüzden sonuçların varyans analizi yapılmamıştır. Ortamlarda eksplant başına kök sayısı ve sürgün uzunluğu farklılık 0.01 düzeyde önemli. eksplant başına sürgün sayısı 0.05 düzeyde önemli çıkmıştır. Eksplant başına kök uzunluğu bakımından ortamlar arasında farklılık bulunamamıştır (Çizelge 4.25). Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncans Testi sonuçları Çizelge 4.26'de verilmiştir.

Çizelge 4.25 Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'nci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	18.00	4.40*	13.44	20.16**
Hata	8	4.08		0.66	
Toplam	11				
V. K.	S.D.	Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	90.00	10.8**	2.11	1.81
Hata	8	8.33		1.16	
Toplam	11				

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.26'da belirtildiği gibi eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğu sırayla 2.66-8.00 adet, 4.66-9.00cm, 4.66-15.66 adet ve 1-3 cm arası değişmiştir. En fazla sürgün sayısı (8 adet) sürgün uzunluğu 9 cm, kök sayısı (15.66 adet) ve kök uzunluğu (2.33cm) 0.25 mg/l BAP-0.50 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir (Şekil 4.14).

Çizelge 4.26 Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 1'inci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	Eksplant başına kök sayısı (adet)	Eksplant başına kök uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)				
0.25	0.25	2.66b ¹	5.00b ²	4.66b ²	3.00
0.25	0.50	8.00a	9.00a	15.66a	2.33
0.25	0.75	3.00b	4.66b	6.66b	2.33
0.25	1.00	5.00ab	4.66b	14.33a	1.00

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

²Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.14 0.25 mg/l BAP-0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında gelişim gösteren bitkiler

4.3.5 Agar içeren ortamlarda 2'inci koltukaltı meristemi eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu

2'nci koltukaltı meristemleri hızlı çoğaltım amacıyla için BAP ve NAA içeren 4 farklı ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra sonuçlar varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Ortamlarda kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına kök uzunluğu 0.05 düzeyde önemli bulunurken; eksplant başına kök sayısı, eksplant başına sürgün sayısı ve uzunluğu bakımından ortamlar arasındaki farklılık istatistiki olarak 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Eksplant başına sürgün yüzdesi arasında bir istatistiksel farklılık bulunamamıştır (Çizelge 4.27). Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncans Testi sonuçları Çizelge 4.28'de verilmiştir.

Çizelge 4.27 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'nci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı(adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	446.42	1.25*	26.36	18.44**	77.82	23.02**
Hata	8	357.14		1.43		3.38	
Toplam	11						
V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün uzunluğu(cm)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	3958.33	2.55*	100.63	32.02**	2.65	3.48*
Hata	8	1547.61		3.14		0.76	
Toplam	11						

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.28'de belirtildiği gibi 0.25 mg/l BAP -0.25. 0.50 ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamında kallus oluşumu gözlenmemiştir. Diğer ortam 0.25 mg/l BAP -0.75 mg/l NAA içeren MS ortamda kallus oluşum yüzdesi %33.33 olarak tespit edilmiştir. Eksplant başına sürgün yüzdesi %75-100 arasında değişirken ortamların sürgün oluşumu üzerinde istatistiksel bir etki bulunamamıştır. Sürgün sayısı 4.33-17.33 adet ve uzunluğu 7.00-13.66 cm arasında değişmiştir. En fazla sürgün 0.25 mg/l BAP - 1 mg/l NAA içeren MS ortamında ve en uzun sürgün 0.25 mg/l BAP - 0.75 mg/l NAA içeren MS

ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.15). Elde edilen tüm sürgünlerde %100 kök oluşumu gözlenmiştir. Eksplant başına kök sayısı 7-18 adet arasında ve uzunluğu 1-2.33 cm arasında değişmiştir. En fazla ve uzun kökler 0.25 mg/l BAP - 1 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir.



Şekil 4.15 0.25 mg/l BAP - 0.75 mg/l NAA içeren MS ortamında en iyi sürgün gelişimi gösteren bitkiler

Çizelge 4.28 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'inci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar		Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	Kök oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına kök sayısı (adet)	Eksplant başına kök uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)							
0.25	0.25	0.00b ¹	100.00 ²	6.00bc ²	7.70c ¹	100.00	13.66c ²	2.00b ¹
0.25	0.50	0.00b	100.00	4.33cd	7.00bc	100.00	7.00d	1.66b
0.25	0.75	33.33a	75.00	8.33b	13.66a	100.00	18.00b	2.33ab
0.25	1.00	0.00b	75.00	17.33a	8.66b	100.00	15.00bc	1.00b

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

²Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.3.6 Gelrit ile katılaştırılan ortamlarda 2'inci koltukaltı meristemi eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu

2'inci koltukaltı meristemi eksplantları 4 farklı BAP ve NAA içeren ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra sonuçlar varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Tüm eksplant üzerinde sürgün oluşumu ve tüm sürgünlerde kök oluşumu gözlenmiştir. Bu yüzden veriler varyans analizine tabi tutulmamıştır. Varyans analizi sonucunda eksplant başına sürgün ve kök sayısı bakımından ortamlar arasında farklılık bulunamamıştır. Sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasında 0.05 düzeyde ve kök uzunluğu bakımından 0.01 düzeyinde farklılık bulunmuştur (Çizelge 4.29). Elde edilen sonuçların önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncans testi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.30'da verilmiştir.

Çizelge 4.29 Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'nci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	25.41	1.29*	16.63	9.58*
Hata	8	19.58		1.73	
Toplam	11				
V. K.	S.D.	Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	2.44	2.10*	104.11	20.15
Hata	8	1.16		5.16	
Toplam	11				

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.30'da görüldüğü gibi; eksplant başına sürgün sayısı 10.33 adet olarak 0.25 mg/l BAP - 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında ve eksplant başına sürgün uzunluğu 8.16 cm ile 0.25 mg/l BAP - 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Ekplant başına kök sayısı 5.00 ile 17.00 arasında değişmektedir. En yüksek değer 0.25 mg/l BAP - 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında bulunmuştur. Ayrıca 3.00 cm ile 0.25 mg/l BAP - 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında en uzun kök tespit edilmiştir.



Şekil 4.16 0.25 mg/l BAP - 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilen en uzun sürgünler

Çizelge 4.30 Gelrit ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının 2'inci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	Eksplant başına kök sayısı (adet)	Eksplant başına kök uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)				
0.25	0.25	10.33a ¹	3.06b ¹	17.00a ¹	1.00
0.25	0.50	3.33b	8.16a	16.66a	3.00
0.25	0.75	5.66b	5.00b	5.00b	1.33
0.25	1.00	6.33b	7.53a	16.66a	1.33

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

4.3.7 Agar ile katılaştırılan ortamlarda uç meristemi, 1'inci ve 2'inci koltukaltı meristemi eksplantında BAP ve NAA ile sürgün rejenerasyonu

Eksplantlar 3 farklı BAP ve NAA içeren ortamda kültüre alınarak 8 hafta sonra sonuçlar varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Tüm eksplant üzerinde sürgün ve daha sonra sürgünlerde kök oluşumu gözlenmiştir. Bu yüzden veriler varyans analizine tabi tutulmamıştır. Varyans analizi sonucunda kallus oluşturan eksplant oranı, eksplant başına sürgün sayısı, eksplant başına kök sayısı (adet) ve eksplant başına kök uzunluğu (cm) bakımından ortamlar ve eksplantlar arasında 0.05 düzeyinde ve eksplant başına sürgün uzunluğu bakımından 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur (Çizelge 4.31). Elde edilen sonuçların önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncans testi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.32'de verilmiştir.

Çizelge 4.31 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının uç meristemi, 1'nci ve 2'nci koltuk altı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	2	2592.58	1.40	337.44	23.91**	5.87	11.60**
Eksplant	2	4514.81	2.60	0.33	0.02	0.49	0.96
Ortam*Eksplant	4	3703.70	2.00*	43.61	3.09*	3.35	6.62**
Hata	18	1851.85		14.11		0.50	
Toplam	26						
V. K.	S.D.	Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)			
		K.O.	F	K.O.	F		
Ortam	2	6.48	0.26	0.11	0.17		
Eksplant	2	72.48	2.94	2.33	3.50		
Ortam*Eksplant	4	78.82	3.20*	2.44	3.67*		
Hata	18	24.63		0.67			
Toplam	26						

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

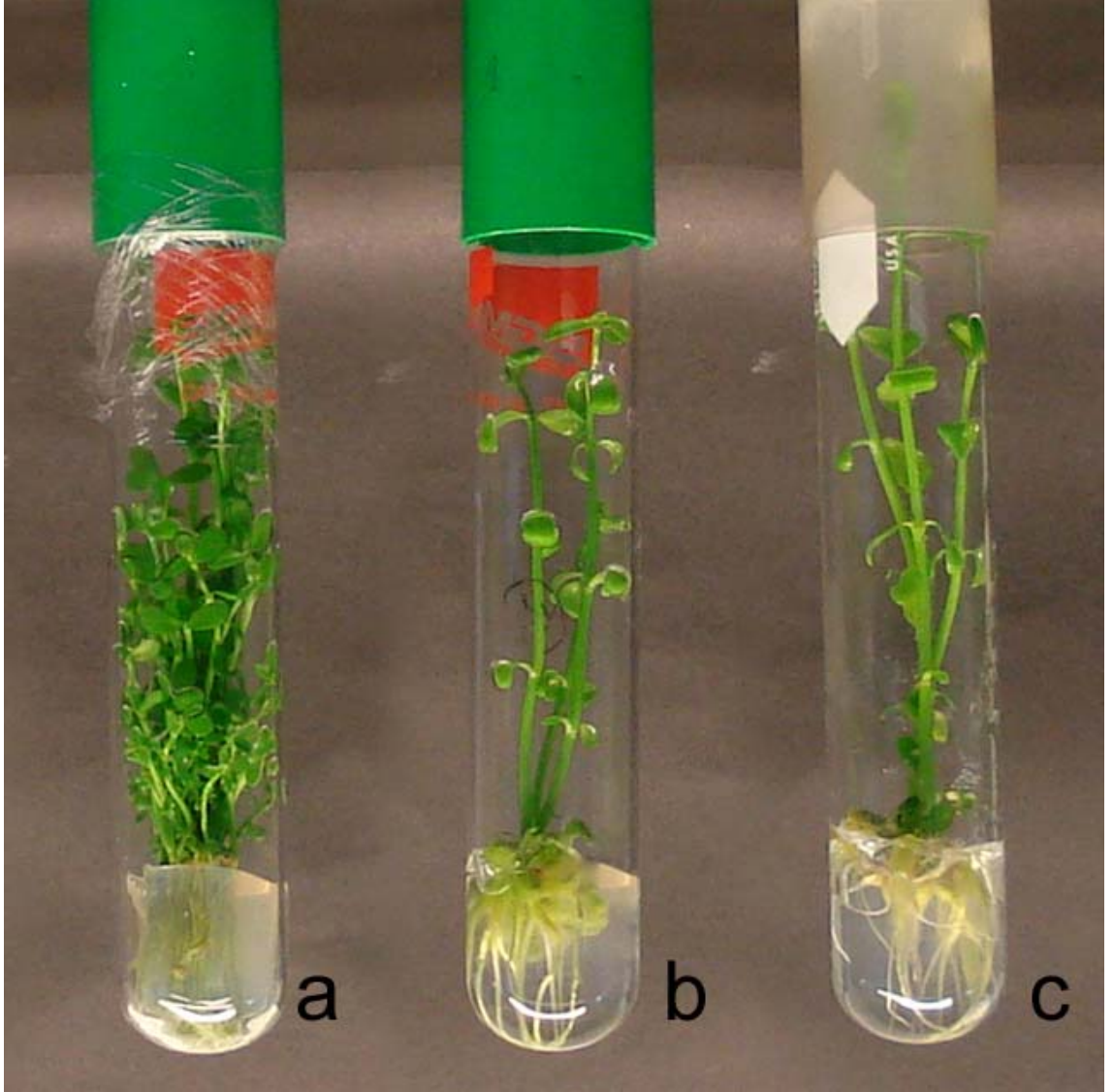
Kallus oluşturan eksplant oranı her üç BAP ve NAA içeren ortam da %58.33 ve %100 değişmektedir. Uç meristem için istatistiksel olarak benzer şekildedir. 1'inci ve 2'nci koltukaltında 0.2mg/l BAP ve 0.001 mg/l NAA'ya oranla diğer ortamlarda belirgin bir düşüş gözükmemektedir. Eksplant başına sürgün yüzdesi her üç ekplantta da %75 ve %100 arasında değişmektedir. Sadece 0.2mg/l BAP ve 0.001 mg/ NAA 1'inci koltukaltı eksplantında %75 oranı bulunurken diğer ortamlarda %100 eksplant başına sürgün yüzdesi gelişimi gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı her 3 ekplantta ve her ortam arasında belirgin bir farklılık görülürken uç meristemde birinci ortam ve üçüncü ortam arasında yukarıdan aşağıya bir düşüş gözlenirken 1'inci ve 2'inci koltukaltı meristeminde ortamlar arasında aşağıdan yukarıya bir azalma görülmektedir. Uç meristemde 7.33 ile 13 adet arasında bitki elde edilirken. 1'inci koltukaltında 3.33-5.66 adet bitki ve 2'inci koltukaltında 1.66-5 adet arasında bitki elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün uzunluğu her uç ekplantta 3.76 ile 7.33 arasında değişmektedir (Şekil 4.17). Uç meristemde 0.4mg/l BAP ve 0.001 mg/l NAA ortamında, 0.2mg/l BAP ve 0.001 mg/l NAA doğru bakıldığında bitki uzunluğu bakımından bir artış gözlenirken bu durum 1'inci ve 2'inci koltukaltı eksplantı için tam tersi yönünde gözlenmektedir. Kallus oluşturan eksplant oranı bakımından incelendiğinde tüm ortamlardaki ekplantlarda %100 gelişim gözlenmiştir. Eksplant başına kök sayısı; uç meristem ekplantında 21.00 ve 26.00 adet arasında, 1'inci koltukaltı meristeminde 12.66 ve 16.33 adet arasında ve 2'inci koltukaltı meristeminde 14.33-22.66 adet arasında değişim göstermektedir. Her üç ekplantta da en fazla kök sayısı 0.2mg/l BAP ve 0.001 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Eksplant başına kök uzunluğu her üç ekplantta 1.00 ve 3.00 arasında değişmektedir. En uzun kök 0.2mg/l BAP ve 0.001 mg/l NAA içeren ortamdan uç meristeminde 2.00 cm, 1'inci koltukaltı meristemi 3.66 ve 2'inci koltukaltı meristemi için 3.66 cm olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.32 Agar ile katılaştırılmış farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının uç, 1'inci ve 2'inci koltukaltı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar		Kallus oluşturan eksplant oranı (%)			Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Uç meristemi	1. Koltuk altı meristemi	2. Koltukaltı meristemi	Uç meristemi	1. Koltukaltı meristemi	2. Koltukaltı meristemi
0.2	0.001	100.00	100.00a ¹	100.00a ¹	100.00	100.00	100.00
0.3	0.001	91.66	75.00ab	58.33ab	100.00	100.00	100.00
0.4	0.001	75.00	75.00ab	66.66ab	100.00	100.00	100.00
Ortamlar		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)			Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Uç meristemi	1. Koltuk altı meristemi	2. Koltukaltı meristemi	Uç meristemi	1. Koltukaltı meristemi	2. Koltukaltı meristemi
0.2	0.001	13.00ab ¹	3.33d ¹	1.66d ¹	7.33bcd ²	5.46cd ²	5.00c ²
0.3	0.001	12.00ab	6.66c	4.33cd	6.00cd	4.76d	6.00c
0.4	0.001	7.33bc	5.66cd	5.00bcd	5.46d	3.76d	5.70c
Ortamlar		Kök oluşturan eksplant oranı (%)			Eksplant başına kök sayısı (adet)		
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Uç meristemi	1. Koltuk altı meristemi	2. Koltukaltı meristemi	Uç meristemi	1. Koltukaltı meristemi	2. Koltukaltı meristemi
0.2	0.001	100.00	100.00	100.00	21.00ab ¹	22.00a ¹	26.00a ¹
0.3	0.001	100.00	100.00	100.00	16.33abc	14.00b	12.66b
0.4	0.001	100.00	100.00	100.00	22.66a	15.00b	14.33b
Ortamlar		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)					
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Uç meristem		1. koltukaltı meristemi	2. koltukaltı meristemi		
0.2	0.001	2.00a ¹		3.66a ¹	3.66a ¹		
0.3	0.001	1.00b		1.00b	1.00b		
0.4	0.001	1.33b		2.00ab	1.33b		

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

²Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.17 0.2 mg/l BAP ve 0.001 mg/l NAA içeren ortamdan, a.uç meristemden, b.1'inci koltukaltı ve c. 2'inci koltukaltı meristeminden elde edilen bitkilerin sayım öncesi görünüşü

4.3.8 Kinetin ve NAA ile hızlı çoğaltımı

Kinetin ve NAA içeren 3 farklı ortamda kültüre alınarak 6 hafta sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm ortamlarda eksplant üzerinde rejenerasyon ve kök oluşumu gözlenmiştir. bu nedenle varyans analizi yapılmamıştır. Kallus oluşturan eksplant oranı ve sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasında 0.05 düzeyde farklılık çıkmışken eksplant başına kök sayısı ve kök uzunluğu bakımından ortamlar arasında bir farklılık

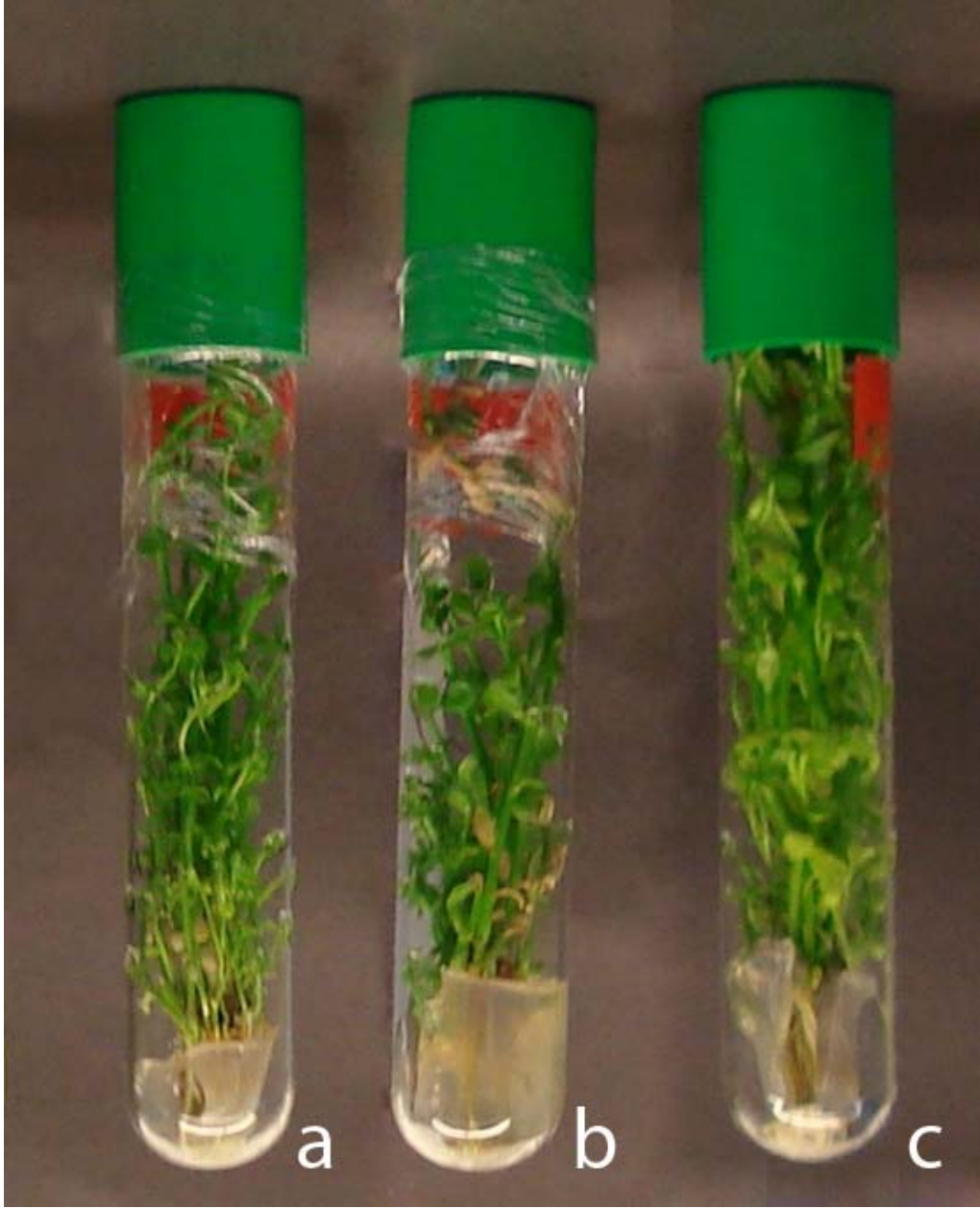
bulunmamıştır (Çizelge 4.33). Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncans Testi sonuçları Çizelge 4.34’de verilmiştir.

Çizelge 4.33 Farklı Kinetin ve NAA konsantrasyonlarının uç meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	2	995.37	2.39	92.59	4.00	54.11	4.64*
Eksplant	2	1550.93	3.72*	92.59	4.00	61.00	5.23*
Ortam*Eksplant	4	1620.37	3.89*	92.59	4.00	46.11	3.95*
Hata	18	416.67		23.15		11.67	
Toplam	26						
V. K.	S.D.	Ortalama sürgün uzunluğu (cm)		Kök oluşturan eksplant oranı (%)		Ortalama kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	2	13.92	12.79**	1481.78	1.00	0.70	2.38
Eksplant	2	14.44	13.27**	2592.59	1.75	0.26	0.88
Ortam*Eksplant	4	3.11	2.86*	1481.48	1.00	0.15	0.50
Hata	18	1.09		1481.48		0.30	
Toplam	26						

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli



Şekil 4.18 0.3 mg/l Kinetin ve 0.001 mg/l NAA içeren ortamdan; a. uç meristemden, b. 1'inci koltukaltı ve c. 2'inci koltukaltı meristeminden elde edilen bitkilerin sayım öncesi görünüşü

Çizelge 4.34 Farklı Kinetin ve NAA konsantrasyonlarının uç, 1'inci ve 2'inci koltukaltı meristemi eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar		Kallus oluşturan eksplant oranı (%)			Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		
Kinetin (mg/l)	NAA (mg/l)	Uç meristem	1. Koltuk altı meristemi	2. Koltukaltı meristemi	Uç meristemi	1. Koltukaltı meristemi	2. Koltukaltı meristemi
0.2	0.001	0.00b ¹	0.00	0.00	100.00	100.00	100.00
0.3	0.001	0.00b	0.00	0.00	100.00	100.00	100.00
0.4	0.001	66.66a	0.00	0.00	100.00	100.00	100.00
Ortamlar		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)			Ortalama sürgün uzunluğu (cm)		
Kinetin (mg/l)	NAA (mg/l)	Uç meristem	1. Koltuk altı meristemi	2. Koltukaltı meristemi	Uç meristemi	1. Koltukaltı meristemi	2. Koltukaltı meristemi
0.2	0.001	5.66b ¹	6.66ab ¹	7.33b ¹	3.66b ¹	7.00ab ¹	7.33a ¹
0.3	0.001	6.66ab	6.00b	11.33a	6.00a	3.00c	3.00b
0.4	0.001	7.00a	7.33a	6.00c	7.66a	12.00a	9.33a
Ortamlar		Eksplant başına kök oranı (%)			Eksplant başına kök uzunluğu (cm)		
Kinetin (mg/l)	NAA (mg/l)	Uç meristem	1. Koltuk altı meristemi	2. Koltukaltı meristemi	Uç meristemi	1. Koltukaltı meristemi	2. Koltukaltı meristemi
0.2	0.001	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.3	0.001	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.4	0.001	33.33	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Kallus oluşturan eksplant oranı her üç kinetin ve NAA içeren ortamdan sadece 0.4mg/l kinetin ve 0.001 mg/l NAA içeren eksplantlarda kallus oluşum yüzdesi %66.66 olarak bulunmuştur. Eksplant başına sürgün yüzdesi her üç eksplantta %100 olarak tespit edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı her 3 eksplantta ve her ortam arasında belirgin bir farklılık görülmemekle birlikte uç ve 1'inci koltukaltı meristeminde birinci ortam

ve üçüncü ortam arasında yukarıdan aşağıya bir artış gözlenirken ve 2'inci koltukaltı meristeminde 0.3 mg/l Kinetin ve 0.001 mg/l NAA içeren ortamda 11.33 adet bitki elde edilmiştir. Ortalama Sürgün Uzunluğu uç meristemde 3.66 ile 7.66 cm arasında bitki elde edilirken, 1'inci koltukaltında 3.00-12.00cm bitki ve 2'inci koltukaltında 3.00-9.33cm arasında bitki elde edilmiştir. eksplant başına kök oranı bakımından incelendiğinde tüm ortamlardaki eksplantlardan sadece 0.4 mg/l Kinetin ve 0.001 mg/l NAA içeren uç meristem eksplantından %33.33 gelişim gözlenmiştir. Eksplant başına kök sayısında da aynı ortamdaki uç meristem eksplantında 2.00 cmlik bitkiler tespit edilmiştir.

4.4. *R. macrandra* Bitkisinden Sürgün Rejenerasyonu ve Hızlı Çoğaltımdan Elde Edilen Bitkilerin Adaptasyonu

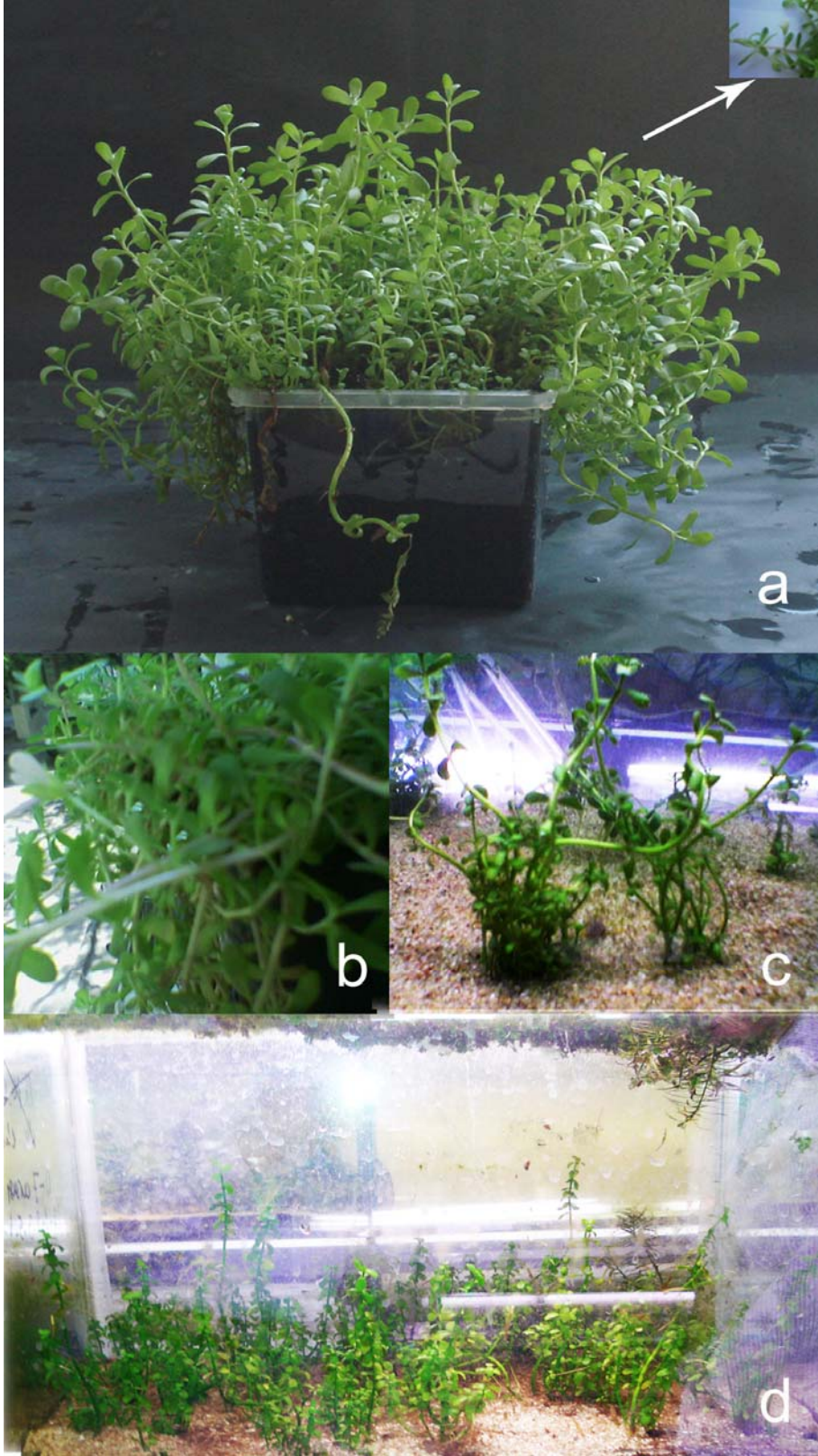
Adventif sürgün rejenerasyonu ve hızlı çoğaltım denemelerinde elde edilen *R. macrandra* bitkiciklerinin akvaryum koşullarına adaptasyonu amacıyla direkt akvaryum koşullarına konarak bir deneme yapılmış ayrıca %50 torf ve % 50 su içeren saksılarda 2 hafta bekletildikten sonra akvaryum koşullarına adaptasyonu yapılmıştır (Şekil 4.19).

Akvaryum koşullarına direkt olarak konulan bitkiler akvaryum içinde hazırlanmış olan 4-5 cm yüksekliğinde ince kum yerleştirilmiş ve akvaryum suyuna haftada bir sifonlama işlemi yapılmış ve sıvı gübre (FloraPride, Tetra Plant) ilave edilmiştir. Akvaryumlarda 24 °C MO2000 Aquarium heater kullanarak ve 1-2 Adet floraslan-Sylvania Aquastar F 30w/174 10000 K Recyclable lambalar ışıklandırma amacıyla kullanılmıştır. 2 hafta sonunda bitki ara boğum aralarında belirgin şekilde uzama ve boğum arası aralarından kök gelişimi gözlenmiştir (Şekil 4.20.c.,d.). Akvaryuma konulan bitkilerde %100 adaptasyon sağlanmıştır.

%50 torf ve %50 su içinde bulunan bitkilerde 2 hafta sonunda %100 adaptasyon sağlanmış yapraklar su üstünde kalması nedeniyle akvaryum koşullarındaki bitkilere nazaran daha kalın olmuş ve boğum arası arası kısalmıştır (Şekil 4.20. a.,b.). Bu bitki ortam koşullarının ortam koşullarına adaptasyon sağladıktan sonra 5 saksı akvaryuma aktarılmadan 4 hafta süre ile saksılarda bekletilmiş ve ortam koşulları sayesinde saksıda bekletilen bitkilerden bir saksıda beyaz küçük bir çiçek açtığı gözlenmiştir (Şekil 4.20. a.,b.).



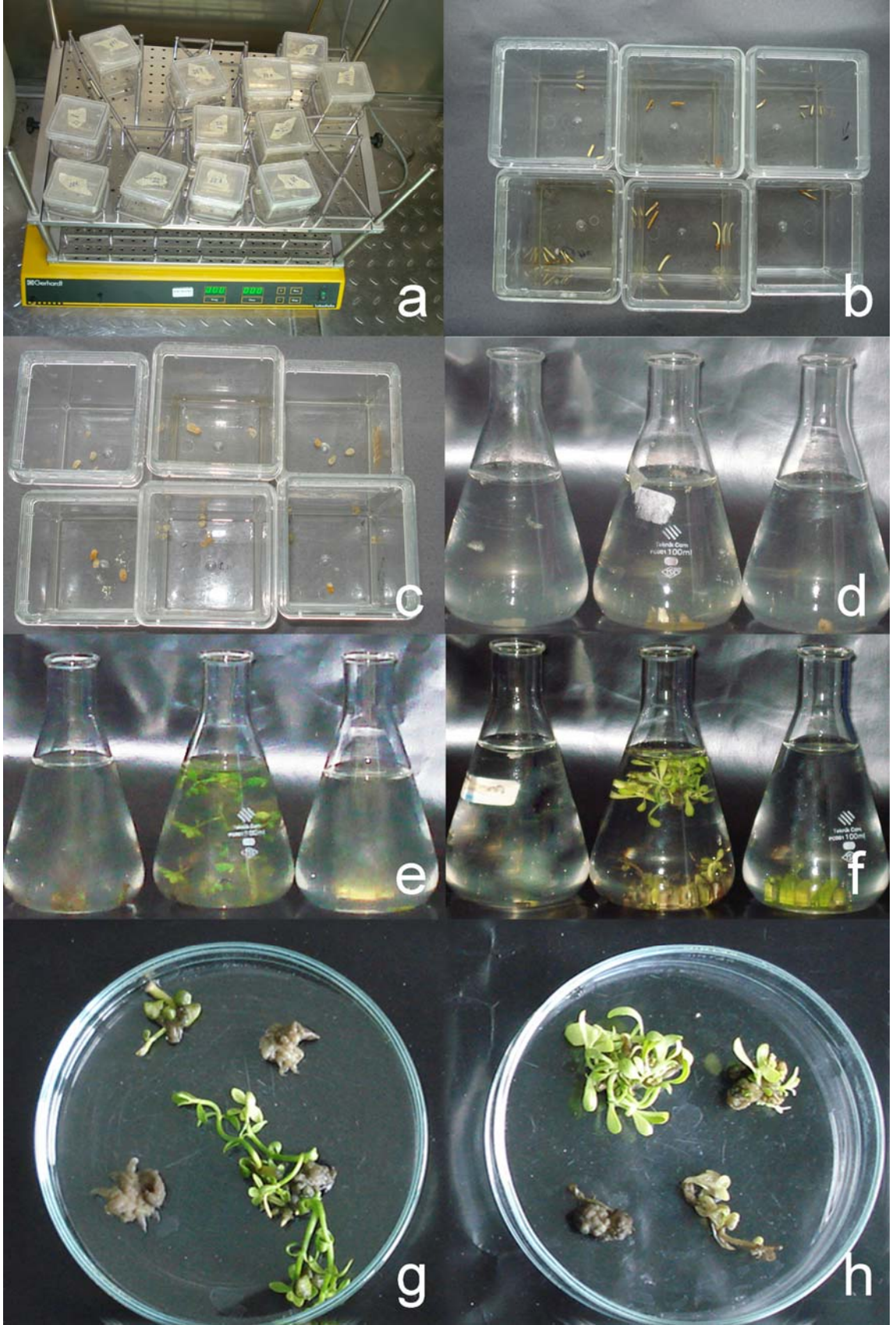
Şekil 4.19 *R. macrandra* bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarından 0.25 mg/l BAP - 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında gelişim gösteren bitkilerin %50 torf ve % 50 su içeren saksılara adaptasyonunda görünüşü



Şekil 4.20 a.,b. *R. macrandra* bitkisinin saksıda çiçek açmış şekilde ve c.,d.direkt akvaryum koşullarına adaptasyonu

4.5 Sıvı Kültürde Sürgün Rejenerasyonu

In vitro koşullarda elde edilen bitkilerden uç meristemi, 1'inci koltukaltı meristemi, 2'inci koltukaltı meristemi, yaprak, 1'inci ve 2'inci boğum arası eksplantları alınarak bitki büyüme düzenleyicilerden 0.25 mg/l BAP - 0.50mg/l NAA ve 0.50 mg/l BAP - 0.50mg/l NAA içeren sıvı MS ortamda kültüre alınmıştır. Magenta kapları çalkalayıcıya yerleştirilmiş 60 rpm hızda çalkalama yapılmıştır (Şekil 4.21.a.). Hemde herhangi bir çalkalama işlemi gerçekleştirilmeden erlen mayerler kültür odasında bekletilmiştir (Şekil 4.21.d.). Ancak 2 hafta sonra sadece kültür odasında bulunan iki adet erlen mayerdeki birer eksplant gelişim göstermiştir (Şekil 4.21.e.,f.,g.,h.). İki adet bitki %50 torf ve %50 su içerikli saksılara ekilmiş fakat ortama adaptasyon sağlanmamıştır. Çalkalayıcı cihazdaki eksplantlarda 2'inci hafta sonunda kararma ve bozulma meydana gelmiş ve 4 hafta sonunda bitki elde edilememesi nedeniyle çalışmaya son verilmiştir (Şekil 4.21.b.,c.). Belirgin bir sonuç elde edilememesi nedeniyle herhangi bir istatistiksel analiz yapılamamıştır .



Şekil 4.21 a.,b.,c.,d.,e., f. sıvı kültüre konulan bitkilerin magenta ve erlen mayerdeki görünüşleri g.,h. durgun ortamda elde edilen 2 adet bitkinin görünüşü

4.6 *A. tumefaciens* ile *R. macrandra*'nın Gen Aktarımı

Yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantı *A. tumefaciens*'in GV2260 P35 GUS-INT hattı ile 1/50 süspansiyonu ile yarım saat muamele edilerek bir günde 16 saatlik ışık fotoperiyodu ve 24°C'de ko kültürasyon ortamına ve sonra 50mg/l kanamisin ve 500mg/l augmetin içeren 0.25 mg/l BAP - 0.50mg/l NAA ve 0.50 mg/l BAP - 0.50mg/l NAA içeren sıvı MS ortamda kültüre alınmıştır. Yapılan uygulamada elde edilen sonuçlar 8 hafta sonra varyans analizine tabii tutulmuştur. Varyans analizi sonuçlarına göre eksplant başına GUS pozitif örnekler oranı ve eksplant başına kök uzunluğu bakımından ortamlar arasında 0.001 düzeyinde farklılık gözlenmiştir. Buna karşı eksplant başına sürgün sayısı ve kallus oluşturan eksplant oranı bakımından eksplantlar arasında 0.05 düzeyinde farklılık görülmüştür. Tüm yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantlarında GUS pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Ancak ekspresiyon düzeyinde farklılık görülmüştür. Gövdelerde ekspresyon yok iken yapraklarda açık maviden koyu möaviye kadar gus pozitif örnekler elde edilmiştir (Şekil 4.22-4.23). Eksplant başına sürgün yüzdesi, uzunluğu, kök yüzdesi ve kök sayısı bakımından hem eksplant hem de ortamlarda farklılık bulunamamıştır. (Çizelge 4.35). Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan t testi sonuçları Çizelge 4.36'de yer almaktadır.

Çizelge 4.35 *A. tumefaciens*'in GV2260 hattı ile muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve GUS pozitif bitkilerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	GUS pozitif örnekler oramı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oramı (%)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	1	12100.00	13.570**	25.00	0.66	15.682	1.38	10.24	0.19
Eksplant	1	100.00	0.112	25.00	0.66	52.42	4.61	190.44	3.64*
Ortam*Eksplant	1	100.00	0.112	100.00	2.74	27.46	2.42	100.00	1.91
Hata	96	891.66		36.45		11.35		52.25	
Toplam	100								
V. K.	S.D.	Kök oluşturan eksplant oramı (%)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)		Eksplant başına kallus yüzdesi (%)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	1	8556.25	16.80	169.00	2.19	10.89	12.24**	156.25	0.14
Eksplant	1	8556.25	16.80	19.36	0.25	0.09	0.10	4556.25	4.02*
Ortam*Eksplant	1	8556.25	16.80	81.00	1.04	0.09	0.10	7656.25	6.76
Hata	96	509.375		77.23		0.89		1132.81	
Toplam	100								

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.36’de görüldüğü gibi her iki eksplantta kallus yüzdesi %68 -99, eksplant başına sürgün yüzdesi %97-100 eksplant başına sürgün sayısı 12.76-17.52 adet. eksplant başına sürgün uzunluğu 5.88-8.12 cm, eksplant başına kök oranı %63-100 arası. kök sayısı 11.20-15.60 adet arası değişmiştir. 0.25 mg/l BAP - 0.25g/l NAA içeren MS ortamında yapraktan %80 ve 1’inci boğum arasından %76 ve 0.25 mg/l BAP - 0.50 mg/l NAA içeren ortamdan %100 GUS pozitif bitkiler elde edilmiştir (Şekil 4.22). Ancak her iki eksplantta da 0.25 mg/l BAP - 0.25mg/l NAA içeren ortamdan daha uzun kökler (2.40cm-1.97cm) ve 0.25 mg/l BAP - 0.50mg/l NAA içeren ortamdan daha kısa kökler (1.68cm-0.87cm) elde edilmiştir.



Şekil.4.22 *A. tumefaciens*'in GV2260 hattı ile muamele edilen 1'inci boğum arası eksplantına elde edilen GUS pozitif örnekleri



Şekil 4.23 *A. tumefaciens*'in GV2260 hattı ile muamele edilen yaprak eksplantına elde edilen GUS pozitif örnekleri

Çizelge 4.36 *A. tumefaciens*'in GV2260 hattı ile muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve GUS pozitif bitkilerine etkisi

Ortamlar		GUS pozitif örnekler oranı (%)		Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		Eksplant		Eksplant		Eksplant		Eksplant	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası
0.25	0.25	80.00b ¹	76.00b ¹	99.00 A ²	68.00 B	97.00	100.00	6.28	5.88
0.25	0.50	100.00a	100.00a	84.00 A	88.00 B	100.00	99.00	8.12	5.62
Ortamlar		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Kök oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		Eksplant		Eksplant		Eksplant		Eksplant	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası
0.25	0.25	17.52 A ²	12.76 B	63.00	100.00	15.60	14.68	2.40a ¹	1.97a
0.25	0.50	16.16 A	15.40 A	100.00	100.00	11.20	13.88	1.68b	0.86b

¹Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

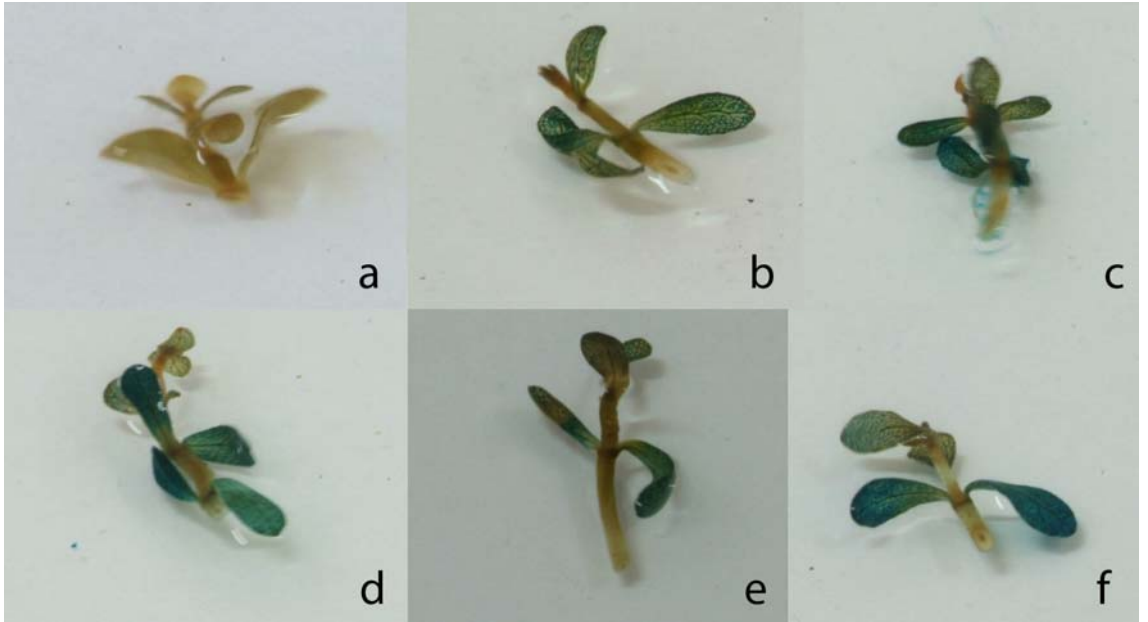
²Aynı satır farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantın *A. tumefaciens*'in GV2260 P35 GUS-INT hattın seyreltilmemiş süspansiyonları ile daldırılıp 24 saat ko kültürasyon için 16 saat ışık fotoperiyot ve 24°C'de bırakılmıştır. Kokültürasyondan sonra eksplantlar 50 mg/lkanamisin ve500mg/l Augmentin içeren seleksiyon ortamlarına aktarılarak kültür odasına biralıkmıştır. Elde edilen sonuçlar 8 hafta sonra varyans analizine tabii tutulmuştur (Çizelge 4.37). Varyans analizi sonuçlarına göre kaluus oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına kök uzunluğu bakımından ortam ve eksplantlar arasında sırasıyla 0.05 ve 0.01 düzeyinde farklılık tespit edilmiştir. Geri kalan tüm parametrelerde ortamlar ve ya eksplantların gen aktarım üzerine istatistiksel olarak benzer etki görülmüştür.

Çizelge 4.38'de yer alan tabloda yaprak eksplantında kallus oluşum yüzdesi %73.21-88 iken 1'inci boğum arasita sürgün yüzdesi eksplant başına sürgün sayısı, kök yüzdesi, kök sayısı ve yan sürgün sayısı sırasıyla 94.23-100, 10-16, 3.66-5.50, 4.16-8.28, 1.16-2.15 ve 0-0.15 arasında değişmiştir. Yaprak eksplantından gelişen sürgünlerde kök uzunluğu ise 0.25 mg/l BAP-0.25 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP-0.50 mg/l NAA içeren ortamlarda sırasıyla 1.71 ve 1.92 olarak tespit edilmiştir. 1'inci boğum arası dan gelişen sürgünlerde 0.25 mg/l BAP-0.25 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP-0.50 mg/l NAA içeren ortamda sırasıyla 2.15 ve 1.16 cmlik kökler izlenmiştir. Yaprak eksplantından gelişen sürgünlerde 69.23-71.42 ve 1'inci boğum arasitan %61.53-66.66 GUS pozitif bitki elde edilmiştir. Hem yaprak hem de tüm boğum arası eksplantlarından GUS pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Ancak boğum arasılarda ekspresiyon yok iken yapralarda değişik düzeyde ekspresyon gözlenmiştir (Şekil 4.24-Şekil 4.25).



Şekil 4.24 *A. tumefaciens*'in GV2260 hattı ile daldırma yöntemiyle muamele edilen 1'inci boğum arası eksplantına elde edilen GUS pozitif sonuçlar



Şekil 4.25 *A. tumefaciens*'in GV2260 hattı ile daldırma yöntemiyle muamele edilen yaprak eksplantına elde edilen GUS pozitif sonuçlar

Çizelge 4.37 *A. tumefaciens*'in GV2260 hattı ile daldırma yöntem ile muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve GUS pozitif bitkilerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı		GUS pozitif örnekler oranı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	1	2003.02	4.06*	173.91	0.07	44.02	0.64	11.75	3.28
Eksplant	1	2670.68	5.41*	502.60	0.21	44.02	0.64	2.87	0.80
Ortam*Eksplant	1	2003.02	4.06*	27.82	0.01	199.80	0.64	10.18	2.84
Hata	48	492.86		2368.74		68.02		3.35	
Toplam	52								
V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına yan sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	1	6.98	0.06	0.00	0.00	0.50	0.01	4.635	19.97**
Eksplant	1	359.43	3.37	0.28	2.53	31.52	0.71	0.32	1.40
Ortam*Eksplant	1	5.48	0.05	0.00	0.00	84.91	1.92	1.96	8.460**
Hata	48	106.54		0.11		44.17		0.23	
Toplam	52								

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.38 *A. tumefaciens*'in GV2260 hattı ile daldırma yöntemiyle muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve GUS pozitif bitkilerine etkisi

Ortamlar		Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		GUS pozitif örnekler oranı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		Eksplant		Eksplant		Eksplant		Eksplant	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası
0.25	0.25	98.00a ²	100.00	69.23	61.53	94.23	100.00	4.07	3.66
0.25	0.50	73.21b	100.00	71.42	66.66	100.00	97.91	4.14	5.50
Ortamlar		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına yan sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		Eksplant		Eksplant		Eksplant		Eksplant	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası
0.25	0.25	14.61	10.00	0.15	0.00	5.92	6.92	1.92a ¹	2.15a
0.25	0.50	16.00	10.083	0.14	0.00	8.28	4.16	1.71b	1.16b

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

²Aynı sütün farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Yaprak ve 1'inci boğum arası eksplant *A. tumefaciens*'in LBA 4404pRGGbar hattının 1/50 oranda seyreltilmiş susupansiyonuyla ½ saat muamle edilerek 24 saat kokültürvasyon için 16 saat ışık fotoperiyodunda bırakılmıştır. Kokültürvasyondan sonra eksplantlar 25 mg/l fosfonitrisin ve 500 mg/l augmentin içeren seleksiyon ortamına aktarılarak kültür odasına bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlara ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.39'de yer almaktadır.

Gen aktarımında kallus yüzdesi bakımından ortam ve eksplant arasında 0.01 düzeyinde ve kök sayısı ise ortamlar arasında 0.01 düzeyinde farklılık görülmüştür. Geri kalan tüm parametrelerde ortamlar ve eksplantların istatistiksel olarak benzer etki görülmüştür. Önem düzeyini belirlemek için t-testi yapılmıştır. Çizelge 4.40 'de görüldüğü gibi her 2 eksplantta kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök sayısı, kök uzunluğu ve kök yüzdesi sırasıyla %84-100, %96-97, 4.96-1276 adet, 3.44-3.58cm, 4.88-12.72 adet, 0.96-2.52cm. %88-100 arasında değişmiştir. Yaprak eksplantında 0.25 mg/l BAP-0.25 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP-0.50 mg/l NAA, içeren ortamda sırasıyla %84 ve 48 GUS pozitif bitki elde ederken 1'inci boğum arasına ise aynı ortamlardan sırasıyla %64 ve 72 GUS pozitif bitki elde edilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 *A. tumefaciens*'in LBA4404 hattı ile genetik transformasyon ; a.,b.,c.yaprak ve d.,e.,f. 1'inci boğum arası eksplantında elde edilen GUS pozitif örnekler

Çizelge 4.39 *A. tumefaciens*'in LBA4404 hattı ile muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve GUS pozitif bitkilerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		GUS pozitif örnekler oranı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	1	156.25	0.24	4900.00	2.30	6.25	0.01	7.50	2.27
Eksplant	1	56.25	0.08	100.00	0.47	6.25	0.01	0.11	0.03
Ortam*Eksplant	1	4556.25	7.22**	12100.00	5.694	6.25	0.01	1.12	0.34
Hata	96	631.25		2125.00		330.20		3.30	
Toplam	100								
V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Kök oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	1	306.25	7.40	100.00	0.17	734.41	13.60**	0.81	0.52
Eksplant	1	462.25	11.17**	900.00	1.55	146.41	2.71	2.89	1.87
Ortam*Eksplant	1	2.89	0.70	900.00	1.55	22.09	0.41	37.21	24.16
Hata	96	41.34		580.00		53.99		1.54	
Toplam	100								

**0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.40 *A. tumefaciens*'in LBA4404 hattı ile muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve GUS pozitif bitkilerine etkisi

Ortamlar		Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		GUS pozitif örnekler oranı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		Eksplant		Eksplant		Eksplant		Eksplant	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası
0.25	0.25	99.00a ²	84.00b	84.00	64.00	97.00	96.00	4.20	3.92
0.25	0.50	88.00b	100.00a	48.00	72.00	96.00	96.00	3.44	3.58
Ortamlar		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Kök oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		Eksplant		Eksplant		Eksplant		Eksplant	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası
0.25	0.25	12.76A ¹	8.80B	92.00	92.00	9.36	12.72	2.52	0.96
0.25	0.50	9.60A	4.96B	88.00	100.00	4.88	6.36	1.12	2.00

¹Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

²Aynı satır farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Yaprak ve 1'inci internod eksplantı eksplant *A. tumefaciens*'in LBA 4404pRGGbar hattının seyreltilmemiş süspansiyonlarına daldırılıp 24 saat kokültürvasyon için 16 saat ışık fotoperiyodunda bırakılmıştır. Kokültürvasyondan sonra eksplantlar 25 mg/l fosfonitrisin ve 500mg/l augmentin içeren seleksiyon ortamına aktarılmıştır. Seleksiyon ortamına aktarılmış bitkiler kültür odasında inkübe edilmiştir. 8 hafta sonra elde edilen sonuçlar varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.41). Varyans analizi sonuçlarına göre kallus oluşturan eksplant oranı bakımından 0.01 ve eksplant başına gus pozitif örnek oranı ile ortalama sürgün uzunluğu bakımından 0.05 düzeyinde ortam ve eksplant etkileşimi bulunmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından ortam ve eksplantlar arasında sırasıyla 0.05 ve 0.01 düzeyinde farklılık görülmüştür. Eksplant başına kök sayısı bakımından ortamlar arasında 0.01 düzeyinde farklılık görülmüştür. Önem düzeyini belirlemek amacıyla t-testi yapılmıştır (Çizelge 4.42).

Çizelge 4.42'de görüldüğü gibi her 2 eksplantta kallus oluşturan eksplant yüzdesi, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, sürgün uzunluğu, kök oluşturan eksplant yüzdesi, sürgün başına kök sayısı ve uzunluğu sırasıyla %62.23-100, %85.71-100, 3,58-14.38 adet, 2.35-4cm, %80.71-95.83, 6.50-16.07 adet ve 1.07-2.38 cm arasında değişmiştir. Yaprak eksplanttan 0.25 mg/l BAP-0.25 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP-0.50 mg/l NAA MS ortamda sırasıyla %64.28-76.92 ve %61.53-100 GUS pozitif bitki elde edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27 *A. tumefaciens*'in LBA4404 hattı ile muamele edilen transformasyon; a.,b.,c. yaprak ve d.,e.,f. 1'inci boğum arası eksplantından daldırma yöntemi elde edilen GUS pozitif örnekleri

Çizelge 4.41 *A. tumefaciens*'in LBA4404 hattı ile muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve gus pozitif bitkilerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		GUS pozitif örnekler oranı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	1	146.79	0.12	2160.95	1.20	140.86	0.25	2.33	0.78
Eksplant	1	146.79	0.12	1339.22	0.74	140.86	0.25	1.51	0.50
Ortam*Eksplant	1	15102.28	12.36**	8460.88	4.72*	1565.20	2.84	19.23	6.48*
Hata	48	1221.45		1791.43		549.45		2.96	
Toplam	52								
V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Kök oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	1	245.70	4.80*	4.24	0.00	475.19	8.98**	11.89	28.57
Eksplant	1	538.78	10.52**	469.89	0.59	160.77	3.04	0.87	2.10
Ortam*Eksplant	1	0.77	0.01	217.66	0.27	0.11	0.00	1.63	3.93
Hata	48	51.19		793.50		52.87		0.41	
Toplam	52								

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.42 *A. tumefaciens*'in LBA4404 hattı ile daldırma yöntemiyle muamele edilen yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve GUS pozitif bitkilerine etkisi

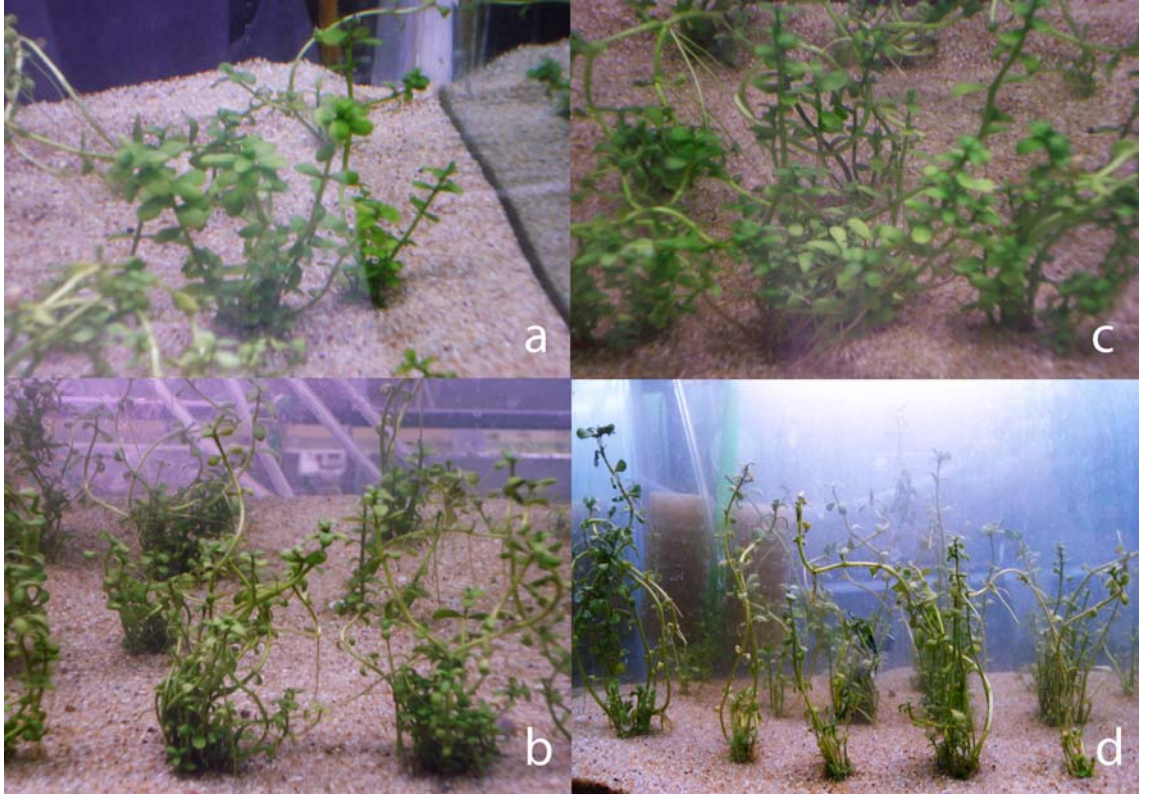
Ortamlar		Kallus oluşturan eksplant oranı (%)		GUS pozitif örnekler oranı (%)		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		Eksplant		Eksplant		Eksplant		Eksplant	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası
0.25	0.25	100.00A ²	62.23B	76.92a ¹	61.53b	100.00	92.30	14.38A ²	7.69B
0.25	0.50	62.50B	100.00A	64.28b	100.00a	85.71	100.00	9.78A	3.58B
Ortamlar		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Kök oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına kök sayısı (adet)		Eksplant başına kök uzunluğu (cm)	
		Eksplant		Eksplant		Eksplant		Eksplant	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası	Yaprak	1'inci boğum arası
0.25	0.25	4.00a ¹ A ²	3.12bB	90.38	92.30	16.07a ²	12.46a	2.38	1.76
0.25	0.50	2.35bB	3.91aA	85.71	95.83	9.92b	6.50b	1.07	1.16

¹Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

²Aynı satır farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.7 Transgenik Adayı *R. macrandra* Bitkilerinin Akvaryum Ortamına Alıştırılması

Transgenik aday *R. macrandra* bitkicikleri akvaryum koşullarına adaptasyon amacıyla hazırlanmış olan 4-5 cm yüksekliğinde ince kuma yerleştirilmiş ve akvaryum suyuna haftada bir sifonlanmış ve sıvı gübre (FloraPride.Tetra Plant) ilave edilmiştir. Akvaryumlarda 24 °C MO2000 Aquarium heater ve 1-2 Adet florasana-Sylvania Aquastar F 30w/174 10000 K Recyclable lambalar ışıklandırma amacıyla kullanılmıştır. Akvaryuma konulan bitkilerden GV2260 p35 Gus Int hattı (Şekil 4.28.a.,b.) ve LBA4404 pRGGbar geni (Şekil 4.28.c.,d.) kullanılarak akvaryumlara %100 adaptasyon sağlanmıştır.



Şekil 4.28 *Agrobacterium tumefaciens* ile muamele edilen transgenik aday bitkilerin a.,b.GV2260 p35 GUS INT hattı ve c.,d. LBA4404 pRGGbar geni kullanılarak akvaryumlara adaptasyonu

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiyede akvaryum bitkileri üretimi bakımından herhangi bir istatistiki veri bulunmamakla birlikte ülkemiz akvaryum sektöründeki bitkilerin bir çoğu daha çok yurt dışından yasa dışı bir şekilde getirilerek satılmaktadır. Bu bitkilerle birlikte taşınan yabancı flora ve faunanın yerel kaynakları kirletmesini önlemek amacıyla doku kültür teknikleri kullanılarak üretim yapılması gerekmektedir. *R. macrandra* bitkisi klasik şekillerde üretimi yapılarak iç pazarda dekoratif amaçla satılan bir bitkidir.

Bu tez kapsamındaki çalışmada doku kültürü ile bitki çoğaltımı amacıyla ilk önce yüzey sterilizasyonu sağlamak için çamaşır suyu ve PPM ile değişik denemeler kurulmuştur. Bunun sonucunda çalışılan su bitkisinin sterilizasyonunda sorunlar yaşanmış ve çok sayıda fungal ve bakteriyel içerikli bitkiler gözlenerek, bazı eksplantlarda çamaşır suyunun olumsuz etkisi ile klorofil parçalanması yaşanması ve bazı bitkilerde beyazlaşma kaydedilmiştir. Bu sonuçlar Taylor *et al.* (1998)'in *Piper methysticum* bitkisinin doku kültürü çalışmasında yüzey sterilizasyonunda sonuçlara uyum sağlamaktadır. Araştırmacılar bu bitkide endojen bulaşıklığın büyük bir sorun olduğunu bildirmiştir. Seradan alınan bitkilerin benomil ve rifampicin ile muamelesi sonucu bulaşıklığın önüne geçilemediğini rapor etmiştir.

Bu çalışmada sterilizasyon aşaması %50-75 oranında bulaşıklı bitkilerden alınan steril parçalar 2 hafta MSO ortamında bekletilerek %100 steril bitkiler elde edilmiştir. Benzer şekilde; Jenks *et al.* (1990), su zambağı bitkisinde yaprak (Epiphyllous bitki) eksplantı 30 dk çeşme suyunda tutulduktan sonra 90 sn % 50 etanolle muamele edilmiş ve 5 dk durulama yapılmıştır. Daha sonra 12 dk % 1.31'lik NaOCl ve Tween-20 (2d/100ml) ile 5 dk muamele edildikten sonra 3 kere durulanmıştır. Micheli *et al.* (2006). *Cryptocoryne beckettii*, *Cryptocoryne lutea* ve *Rotala rotundifolia*'nın eksplantlar da sterilizasyon amacıyla %1-1.5 oranında sodyum hipoklorit kullanılmıştır. Kane *et al.* (1999), *Cryptocoryne wendtii*'nin *in vitro* çoğaltımı yüzey sterilizasyonu amacıyla 15 dk çeşme suyunda tutulduktan sonra, 12 dk % 1.05'lik NaOCl+Tween-20 (1d/100ml) ile muamele edilmiş ve 3 kez durulanmasıyla sağlanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar Öztürk (2002), Şumlu (2005) ve Öztürk (2008)'in çalışmalarının sonuçlarına benzerlik göstermektedir.

Ancak; Kawashima *et al.* (1986), *E. plorifera*' Bitki materyallerini epifit ve epizoalardan uzaklaştırmak için steril bez ile temizlenmiş ve 20 dakika karıştırıldıktan sonra steril deniz suyunda % 11'lik povidon iyot içeren deniz suyu solusyonunda 1 dakika bekletmiştir. Daha sonra bu çözelti 18°C'de iki gün boyunca antibiyotikli ortama steril süzgeç yardımıyla ilave edilmiştir. Yapılan sterilizasyondan sonra bitki materyali steril deniz suyu ile yıkanıp proteaz solusyonunda 20 dakika bekletilmiştir.

Farklı eksplantlar, ortamlar ve katılaştırıcıların kullanımında;

Genel bakımından agar ortamında elde edilen bitkilerden gelrite oranla daha fazla eksplant başına sürgün ve kök sayısı tespit edilmiştir. Ayrıca 0.25 mg/l BAP ve 0.25-0.50 mg/l NAA içeren MS içeren ortamdan 2 adet fenotip bakımdan kıvrık sürgün gözlenmiştir.

Bunun sebebinin ilk önce ortamdan kaynaklanan bir mutasyon olduğu düşünülmüş ancak bahse konu bitkilerin 3-4 kere alt kültüre alınması sonucunda bu özelliği kaybettikleri ve ortamda bulunan ışık faktörü ve rekabet yüzdesinden dolayı bu olayın meydana geldiği düşünülmektedir. Eksplant başına sürgün uzunluğu 1.70 cm ve 4.50 cm arasında değişmiştir.

Gelrit ve agar kullanılan denemelerde bitkilerde herhangi bir genotip değişikliği beklenilmemiştir. Çünkü her iki denemede eşit miktarda bitki büyüme düzenleyici maddeler, MS besin ortamı, ışık ve sıcaklık sağlanmıştır. Kullanılan katılaştırıcı maddelere bakıldığında; agarın içeriğinde, D-galaktoz ve 3.6-anhidrogalaktoz ve agaropektin içerikli 1.3-glikosidically benzeri D-galaktoz (Sigma-Aldrich. St.Louis.MO) bulunmakta, gelritte ise glukuronik asit, rhamnose ve glükoz (Phytotechnology Lab. Katalog. 2006) yer almaktadır. Tüm denemelerde MS ortam üzerinde yaprak, 1'inci - 2'inci boğum arası ve 1'inci - 2'inci koltuk altı meristemi eksplantlarına benzer sitokinin-oksin kombinasyonlarıyla fakat değişik katılaştırıcı maddelerle yapılan uygulamalarda eksplantların rejenerasyonunda farklılıklar görülmüştür. Her iki katılaştırıcı maddenin biyokimyasal ve yapısal değişikliklerinin doku kültür tekniği ile çoğaltılmış bitkiler üzerine etkisi olduğu düşünülmektedir (Özel vd. 2008). Çünkü moleküler ve yapısal değişiklik eksplantlarda değişik şekilde bitki büyüme maddelerinin ve besleyici maddelerin değişik şekilde eksplantlar üzerine etkisi olduğu düşünülmüştür.

Her iki katılaştırıcı madde kıyaslandığında agar içeren ortamda daha fazla sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve kök uzunluğu belirlenmiştir ancak gelrit içeren ortamlarda kök oranı ve kök sayısı az olduğu görülmüştür. Agar ve gelrit içeren ortamlarda meydana gelen farklılığın agarın içerisinde bulunan değişik karbonhidratlardan meydana geldiği ayrıca her iki katılaştırıcı maddenin moleküler yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun başka bir sebebi de agarın bitki besin ortamı ve büyüme düzenleyici maddelerin eksplantlara gelrite oranla daha iyi şekilde nüfuz etmesi nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir. Gelrite içeren ortamın agar göre daha sert şekilde donması nedeniyle eksplantlar üzerinde olumsuz bir etkiye yol açtığı kıymetlendirilmektedir. Gelrit içerisinde bulunan eksplantlarda kök oluşumunu diğer ortama göre değişik sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu sonuçlar Özel vd. (2008) tarafından tütün bitkisinde yapılan çalışmada elde edilen bulgulara benzerlik göstermektedir.

Yaprak, 1'inci ve 2'nci boğum arası, 1'inci ve 2'nci koltukaltı meristeminin eksplantları sürgün rejenerasyonu için BAP(0.25 mg/l) ve NAA (0.00-0.1-0.25-0.50 mg/l) agar ve gelrit içeren ortamlarda genel olarak agar ve gelrit ile 2'inci boğum arası eksplantında BAP ve NAA konsantrasyonlarında agardaki eksplantlarda kallus oluşumu gözlenirken gelrit içeren ortamlarda kallus oluşumuna rastlanılmamıştır. Benzer şekilde agar içeren eksplantların sürgün uzunluğu, eksplant başına sürgün sayısı, kök uzunluğu ve eksplant başına kök sayısına bakıldığında agar içeren ortamlardan gelrit içeren ortamlara oranla daha gelişmiş bitkiler elde edilmiştir.

Uç meristemleri hızlı çoğaltım amacıyla farklı oranlarda BAP(0.25 mg/l) ve NAA (0.00-0.1-0.25-0.50 mg/l) agar ve gelrit içeren ortamlarda bekletildiğinde yaprak, 1'inci ve 2'inci boğum arasına oranla hem gelrit hemde agar içeren ortamlarda eksplant başına kallus oluşum yüzdesi görülürken agar içeren ortamda gelrite oranla bitkilerin eksplant başına sürgün ve kök oluşum yüzdelerinin daha fazla olduğu ayrıca uzunluk bakımından sürgün ve köklerde agar içeren ortamlarda daha büyük bitkiler elde edildiği gözlenmiştir.

Her iki katılaştırıcı madde üzerinde aynı eksplanttan gelişen sürgünler ve kökler kıyaslandığında, agar içeren ortamda gelrit içeren ortama göre daha fazla sürgün elde edilmiştir. Agar içeren ortamda eksplant başına 8-22.66 sürgün elde edilirken gelrit içeren ortamlarda 1-1.66 sürgün elde edilmiştir. Agarda sürgün sayı fazla iken gelrit içeren ortamda daha uzun sürgün elde edilmiştir. Kök gelişmeler kıyaslandığında, agar içeren ortamda %40-91.66 kök oluşum gözlenirken gelritli ortamda %100 kök gözlenmiştir. Ancak kök sayısı bakımından yine en fazla 15.66 adet kök agarlı ve 4.73 adet kök gelrit içeren ortamdan elde edilmiştir. Kök uzunluğu bakımından her iki ortamda da gelişen köklerde benzerlik görülmüştür.

Bu tez kapsamındaki çalışmada 0.2-0.3-0.4mg/l Kinetin ve 0.001 mg/l NAA ile yapılan uç, 1'inci ve 2'nci koltukaltı meristeminde kallus oluşumu az yada hiç gözlenmez iken 0.2 ve 0.4 mg/l kinetinin sürgün oluşturan eksplant oranı, sayısına ve sürgün uzunluğunda olumlu etkisi bulunmuştur. Benzer şekilde, Micheli *et al.* (2006). *Cryptocoryne beckettii*, *Cryptocoryne lutea* ve *Rotala rotundifolia*'nın *in vitro* çoğaltımını yapılmıştır. 1 mg/l' BAP'da diğer ortamlara göre bitkilerde daha fazla kök oluşumu gözlenmiştir. 4 mg/l BAP içeren ortamlarda fazla sayıda sürgün oluşumu gözlenirken düşük sayıda kök ve kısa kökler tespit edilmiştir. Straub *et al.* (1989), su bitkisi *Distichlis spicata*'da rejenerasyon ortamına oksin yerine 1 mg/l BAP ilave edince rejenere kabiliyeti yükselmiştir. Kane *et al.* (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. Purohit and Singhvi (1998), *Achras sapota* bitkisinin 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. Guillermo *et al.* (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. Jenks *et al.* (2000). *Nymphoides indica*'nın sürgün rejenerasyonunu 2-IP. BAP ya da Kinetin (0-25 µM) ile IAA veya NAA (0-25 µM) optimize edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonunu (% 80) ve eksplant başına sürgün sayısını (11.5 adet), 0.56 mM myo-inositol, 1.2 µM thiamine-HCl, 116.8 mM sükröz, 10 µM BAP, 20 µM IAA ve % 0.8 agar içeren MS

besin ortamından elde etmişlerdir. Lopez-Escamilla *et al.* (2000), *Picea chihuahuana* türünde zigotik embriyoları kullanarak adventif embriyo oluşumunu gözlemişlerdir. Embriyo oluşumu için BAP ve NAA, Kin ve 2.4-D içeren ve içermeyen B5 besi ortamı kullanılmıştır. Kin içeren ortamlarda 14 günde, BAP içeren ortamda ise 17 günde embriyo oluşumu gözlenmiştir.

Kane *et al.* (1988), Amerikan nilüferi *Nelumbo lutea*'nin embriyosunu *in vitro* koşullardaki rizom gelişimine BAP ve Zeatinin etkisi olmamış ve 290 µM GA₃ içeren ortam en iyi sonuçları almıştır.

Jenks *et al.* (1990), Su zambak bitkisinde *in vitro* koşullarda MS+0.56 mM myo-inositol, 1.2 µM thiamin-HCL ve 3 µM TDZ ve 3 µM IAA ve 87.6 mM sükroz, 150x25 mm kültür tüpleri kullanılmış, 25±2°C'de 16 saat fotoperyot uygulanmış ve polypropilen membran raftlar kullanılmıştır. En iyi sonuç 3'üncü ortamdaki ve bitki başına ortalama 8 adet yaprak elde edilmiştir.

Adaptasyon aşamasında;

Bu tez çalışması kapsamındaki çalışma sonuçları Öztürk (2008)'e uyum sağlamaktadır. Kirk (1987)'e göre kara bitkileri gibi su bitkileride fotosentez için CO₂ kullanmaktadır. Kara bitkiler havanın direkt CO₂'sini alıp fotosentez yaparken su bitkileri suda bulunan erimiş haldeki CO₂ kullanarak fotosentez olayını gerçekleştirmektedirler. CO₂ suyun pH'sı ve sıcaklıktan etkilenerek her ikisinin etkisiyle sudaki karbonat ve bikarbonatlardan CO₂ bırakılarak oluşur. Suda bulunan yapraklar su üzerinde bulunan yapraklara oranla daha ince ve küçük şekillerde olmaktadır. Su bitkilerinde bulunan kloroplastlar genel olarak epidermisin yüzey tabakalarında bulunmaktadır. örneğin epidermis, sualtı bitkileri daha az güneş ve ışık almaları nedeniyle kara bitkilerine oranla yaprakları ve bitki gövdeleri bitki hücrelerinde daha geniş oluşumlar meydana gelip yaprakların ince olmasına ve yapraklar arasındaki gövdelerin aralıklarını açılmasına neden olmaktadır.

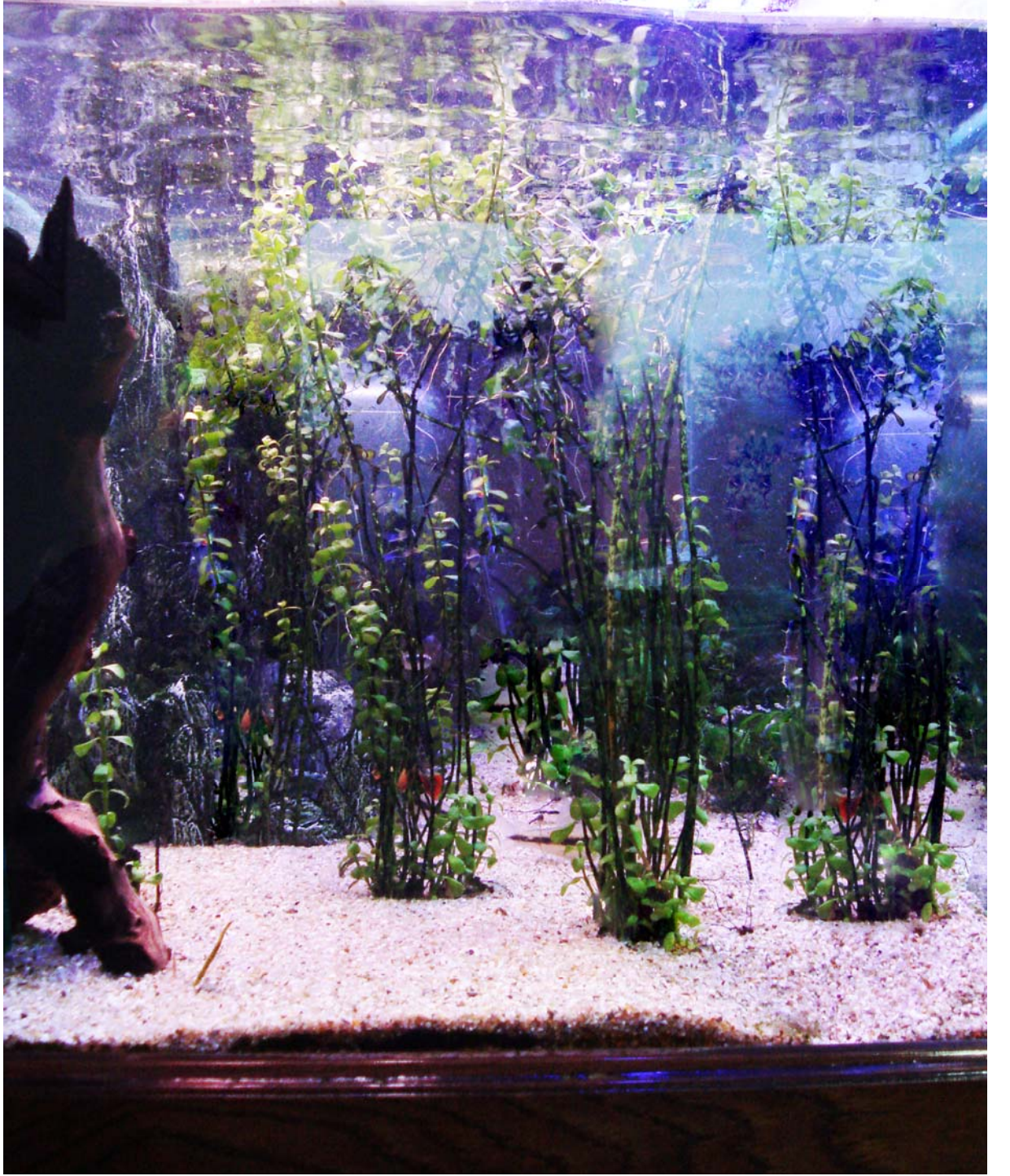
Gen aktarımda;

Su bitkilerde gen aktarım çalışmaları ilgili çok az sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Transgenik aday bitkilerden tez çalışması kapsamında yapılan yöntemlerle elde edilen sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından yayımlanan çalışmalara uyum sağlamaktadır. Benzer şekilde Gasdaska *et al.* (2003) *Lemna* bitkisinde interferon alfa 2b (IFN), insan büyüme hormonu (hGH), Fab ve Mab proteinleri aktarılmıştır. Bu dört rekombinant proteinler *Lemna* bitkisine aktarılarak terapötik protein *Lemna* bitkisinde üretilmiştir. Bu çalışmayla şeker hastalarının doğal yollarla tedavisi amaçlanmıştır. Sakulkoo *et al.* (2005)'e göre güney batı Asyada yaygın olan bir su bitkisi olan su ıspanağı (*Ipomoea aquatica*) ile yapılan bu çalışmada Tayland Mac Mohan Maden ocağının drenaj suyunda yüksek oranda bulunan sülfatın (800-2000mg/l) etkisini önlemek için *Arabidopsis* APS (APR1) reductaz geni *I. aquatica* genine aktarılmıştır. Elde edilen bitkilerde gen aktarımı yapıp yapılmadığını anlamak amacıyla Xhal ve Xhol enzimleri ile kesilmiş DNA parçalarıyla *APR1* gen aktarılması tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerde sülfat ve kadmiyuma karşı dayanıklılık ve yüksek oranda sülfat birikmesi görülmüştür. Hasatta edilen bitkilerden çeşitli amaçlarda kullanılmak üzere sülfat elde edilebileceği belirtilmiştir. Lin *et al.* (2001), bu çalışmada ticari olarak önemli kırmızı alg *Porphyra*'nın arktasporlara elektroprocess ile gen aktarım yapılmıştır ve örnekler 24 saat, bir hafta, iki hafta, ve sekiz hafta muamele edilmiş örneklerin PCR analizi sonucu tüm örneklerde plazmid DNA'nın varlığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; çalışma sonucunda belirlenen hedeflerin *R. macrandra* bitkisinde elde edildiği düşünülmektedir.

1. Su bitki sterilizasyonunda zorluklarla karşılaşmış ve yeşil materyalin sterilizasyonu için çamaşır suyu ile PPM'in olumlu etkisi olduğu tespit edilmiştir.
2. Adventif sürgün rejenerasyonu bakımından, 1'inci boğum arası eksplanttan en fazla sürgün elde edilmiştir.
3. Yan sürgün sayısı bakımından en fazla sürgün uç meristem eksplantından elde edilmiştir.

4. Elde edilen bitkilerde %100 adaptasyon sağlanmıştır (Şekil 5.1).
5. Akvaryum bitkileri yasa dışı yollarla Ülkemize getirilmektedir ve yıl boyunca bu bitkiler farklı yollarla getirilmelerinden dolayı piyasada düzenli olarak bulunamamaktadır. Bu sayede elde edilen bitkilerin akvaryum ortamına %100 oran da adapte olmaları ve istenildiği zaman laboratuvar koşullarında alt kültüre alınarak yıllar boyu steril halde bekletilmeleri nedeniyle ülkemizde bulunan akvaryum bitkileri için bir doku kültürü labrotuvarı kurulması ve bu şekilde doku kültürü sağlanmış bitkilerin muhafazasının sağlanacağı değerlendirilmesi çok önemlidir.
6. Çalışma sonucunda elde edilen veriler ve optimize edilmiş protokollerle yıl boyunca piyasaya bitki sağlamak mümkündür.
7. Bu çalışmada kullanılan teknikler ile üretilen yabancı bitkilerin piyasaya verilmesi diğer ülkelerden gelen pek çok hastalığın ülkemiz florasına yayılımını önleyeceği düşünülmektedir.
8. Bu çalışmada başarılı transgenik aday bitkilerin elde edilmesi. su bitkilerde başka önemli proteinler içeren genlerin aktarılmasına olanak sağlayacak ve bir türlü faydalı proteinlerin kolayca üretilmesine yol açacaktır.



Şekil 5.1 Akvaryum ortamında adapte edilmiş *R. macranda* bitkilerinin görüntüsü

KAYNAKLAR

- Agrawal, A. and Ram, H.Y. M. 1995. *In Vitro* Germination and Micropropagation of Water Chestnut (*Trapa* sp.). *Aquatic Botany*, 51,135-146.
- Alpbaz, A. 1984. Akvaryum Tekniği ve Balıkları. Acargil Basımevi . 433 s., İzmir.
- 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.
- Andrade, W. F., Almeida, M. and Gonçalves, A. N. 2006. *In vitro* multiplication of *Eucalyptus grandis* under BAP pulse. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41 (12), 153-158.
- Anonymous.2008a Web Sitesi <http://www.aquariumplants.co.za/propagation.htm>. Erişim Tarihi 16.11. 2008.
- Anonymous.2008b Web Sitesi http://fish.mongabay.com/plants/Rotala_macrandra.htm Erişim Tarihi 16.11. 2008 <http://species.wikimedia.org/wiki/Rotala>. Erişim Tarihi 20.11. 2008.
- Anonymous.2008c Web Sitesi <http://www.Newyork.Planatlas.usf.edu/Plant>. Erişim Tarihi 16.11. 2008.
- Anonymous.2008d Web Sitesi <http://pick1.pick.uga.edu/mp/20q?search=Rotala+wallichii> Erişim Tarihi 16.11. 2008.
- Anonymous. 2008e. <http://www.floraaquatic.com>. Erişim tarihi 28.12.2008.
- 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.
- Arnold, S.V. and Tillberg, E. 1987. The influence of cytokinin pulse treatments on adventitious bud formation on vegetative buds of *Picea abies*, *Plant Cell. Tissue Culture*, 9, 253-261.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. and Özcan, S. 2001. Bitki Biyoteknolojisi I- Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, s. 374. Konya.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. 1993. *In planta Agrobacterium* gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences*, 316, 1194-1199.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. and Masterson, R. 1992, New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.*, 20,1195-1197.
- Bevan, M., Flavel, R.B. and Chilton, M.D. 1983. Achimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304,185-187.
- Bhatti, K.M.K. 2001. Mercimek (*Lens culinaris* Medik)'te doku kültürü çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. Doktora tezi (basılmamış) Ankara Üniversitesi, Ankara.

- Biondi, S. and Thorpe, T.A. 1981. Requirements for A Tissue Culture Facility. "Plant tissue Culture" Academic press. 1-20, New York.
- Bird, K. T., Cody, B. R., Smith, J. J. and Kane, M. E. 1993. Salinity Effects on *Ruppia maritima* L. Cultured *In vitro*. *Botanica Marina*, 36, 23-28.
- 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.
- Bruner, G. 1973. *Aquarium Plants*. T.F.H. Pub. Inc.Ltd. USA.
- 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.
- Christopher, D., Cook, K. and Donald, H.1998. *The Quarterly Review of Biology*, The University of Chicago Press, Vol. 73, No. 1 pp. 93-94.
- Christie, P.J., Ward, J.E., Winans, S.C. and Nester, E.W. 1988. The *Agrobacterium tumefaciens* vir E product is a single stranded DNA binding protein that associates with T strands. *J. Bacteriol*, 170, 2659-2667.
- 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.
- Clayton, J., Reeves, P., Champion, P. and Edwards, T. 2000. Plant Identification Guide Low-risk aquarium and pond plants Planting these in your pond or aquarium is environmentally-friendly. National Centre of Aquatic Biodiversity and Biosecurity, NIWA with funding from the Department of Conservation. New Zealand. <http://www.niwa.co.nz/ncabb/tools>. Erişim tarihi 28.12.2008.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* *The Plant Journal*, 16,735-743.
- Cook, C.D.K. 1979 A revision of the genus *Rotala* (*Lythraceae*). *Boissiera*, 29, 1- 156.
- Cook, D. A., Decker, D. M. and Gallagher, J.L. 1989. Regeneration of *Kosteletzkya virginica* (L.) Presl. (Seashore Mallow) from callus cultures. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 17, 111-119.
- Damiano, C., Gentile, A., La Starza, S.R., Frattarelli, A, and Monticelli, S. 2003. Automation in Micropropagation through Temporary Immersion Techniques. Eds. A.S.Economou & P.E.Read.Proc.1st IS on Accl. & Estab.Micropop. Plants,1, 359-364, Sanı- Halkideki, Macedonia,Greece.
- 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.

- DeBlock, M., Botterdam, J., Vanderwiele, M., Dockz, J., Thoen, C., Gossde, V., Movva, N. R., Thompson, C., Van Montagu, J. and Leemans, J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO. J.*, 6, 2513-2518.
- Draper, J., Scott, R. and Hamil, J. 1988a. Transformation of Dicotyledonous plant Cells using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri plasmid of *A. rhizogenes*. Draper, J., Scott, R., Armitage, P., Walden, R. Plant genetic transformation and Gene expression. A lab. Manual, 71-160., Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Draper, J., Scott, R. and Armitage, P. 1988b. Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Lab. Manual, pp,1-68.
- Eichholtz, D. A., Rogers, S.G., Horsh, R.B., Klee, H. J. and Hayford, M. 1987. Expression of mouse dehydrofolate reductase gene confers methotrexate resistance in transgenic petunia plants. *Somat. Cell Mol. Genet.* ,13.,67-76.
- Er, C. ve Canpolat, N. 1992. Bitki Islahında Doku Kültürleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı-Ankara.
- Fakharai, H.K. and Fakharai, F. 1990. Hormonal control of growth and development .In: Pollard JW. Walker JM (eds)., Plant Cell and Tissue culture. Humana press Clifto, New York, pp 49-56.
- Gasdaska, J.R., Spencer, D. and Dickey, L. 2003. Advantages of Therapeutic protein production in the aquatic plant Lemna. *Bioprocessing journal.* pp.1-6.
- 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.
- Grout, B.W.W. 1990. Meristem tip culture. (Ed: Pollard, J.W. and Walker, J.M.), *Methods in Molecular Biology*, Vol.6, Plant Cell and Tissue culture. Humana Press NJ. pp 581-593.
- Guillermo, J. Martinez, P. and Miriam, E. A.1999. *In Vitro* Propagation of Juvenile *Nothofagus leoni* Espinosa (Fagaceae). *J. For. Res.*, 4, 295-298.
- 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.
- Henry, M., Roussel, J.L. and Andary, C., 1987. *Verbascoside production in callus and suspension cultures of Hygrophila erecta*. *Phytochemistry*, 26 (7), 1961-1963.
- Herra-Estrella, A., Van Montagu, M. and Wang, K. 1990. A bacterial peptide acting as a plant nuclear targeting signal: the amino terminal portion of *Agrobacterium vir D2* protein directs a β -galactosidase fusion protein into tobacco nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 9534-9537.

- Hight, J. and Wilson, P. G. 2007. *Rotala tripartita*. in PlantNET- The Plant Information Network System of Botanic Gardens Trust, Sydney, Australia.
- Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. 1984. The molecular genetics of Crown gall tumorigenesis. In *Advances in Genetics 22. Molecular Genetics of Plants*, 209-283 Scandalios, J.G and Caspari, E. W. (eds.).
- Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. 1992. *Agrobacterium tumefaciens* and plant genetic engineering *Plant Mol. Biol.*, 19, 15-38.
- Howard, A. E., Zupan, J. R. and Zambryski, P.C. 1992. The Vir D2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* contains a C terminal bipartite nuclear localization signal implications for nuclear uptake of DNA into plant cells. *Cell*, 68, 109-118.
- Husain, M. K., Anis, M. and Shahzad, A. 2007. *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 43, 59–64.
- Hyde, M.A. and Wursten, B. 2008. Flora of Zimbabwe: Utilities: Living plant images of *Rotala*. <http://www.zimbabweflora.co.zw>. Erişim Tarihi: 01.12.2008.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5, 387-405.
- Jenks, M., Kane, M., Marasca, F., McConnell, D. and Sheeran, T. 1990. *In Vitro* Establishment and Epiphyllum Plantlets Regeneration of *Nymphaea "Daubeniana"*. *Hortscience*, 25, 1664-1665.
- Jenks, M. A., Kane, M. E. and McConnell, D. B. 2000. Shoot organogenesis from petiole explant in the aquatic plant *Nymphoides indica*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 63, 1-8.
- Jie, J.C.S., Qin, H. and Shirley, G. 2007. *Rotala* Linnaeus. *Mant. Pl.* 2: 143. 175. 1771. *Flora of China*, 13, 283–286.
- Kasselmann, C. 2003. *Aquarium Plants*. Krieger Publishing Company, Malabar.
- Kane, M. E., Sheehan, T. J. and Ferwerda, F. H. 1988. *In vitro* Growth of American Lotus Embryos. *Hortscience*, 23 (3), 611-613.
- 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., Davis, G. L., McConnell, D.B. and Gargiulo, J. A. 1999. *In vitro* propagation of *Cryptocoryne wendtii*. *Aquatic Botany*, 63, 197-202.
- Kawashima, Y., Matsumata, M. and Tokuda, H. 1986. Protoplast isolation and regeneration of a green alga *Enteromorpha polifera*. *Current topic in marine biotechnology*, p. 231-235.

- Kirk, J.T.O. 1987. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. *Ecology* 6 (83), 758.
- Khawar, K.M., Sancak, C., Uranbey, S. ve Özcan, S. 2004. Effect of Thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik) via organogenesis. *Turk J Bot.* 28,421-426.
- Lemmers, M., DeBeuckeleer, M., Zambryski, P.C. and Depickers, A. 1980. Internal organization, Boundaries and integration of Ti –plasmid DNA in napoline crown gall tumors. *J. Mol. Biol.*, 144, 353-376.
- Leroux, B., Yanofsky, M.F., Winans, S.C., Ward, J.E., Ziegler, S. F. and Nester, E. W. 1987. Characterization of the *vir A* locus of *Agrobacterium tumefaciens*. a transcriptional regulator and host range determinant. *EMBO. J.*, 6, 849-856.
- Lin, C.M., Larsen, J., Yarish, C. and Chen, T. 2001. A novel gene transfer in *porphyra*. *Journal of Phycology*, 37, 31.
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18,100-127.
- Lopez-Escamilla, A. L., Olguin-Santos, L. P., Marquez, J., Chavez, V.M. and Bye, R. 2000. Adventitious Bud Formation from Mature Embryos of *Picea chihuahuana* Martinez, an Endangered Mexican Spruce Tree. *Annals of Botany*, 86,921-927.
- Madhulatha, P., Anbalagan, M., Jayachandran, S. and Sakthivel, N. 2004. Influence of Liquid Pulse Treatment with Growth Regulators on *in vitro* Propagation of Banana (*Musa* spp. AAA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76 (2), 189-192.
- McMullen, L. 2000. *Rotalla macrandra*. London Aquaria Society. Web Sitesi <http://www.londonaquariasociety.com> http://www.aquarticles.com/articles/plants/McMullen_Rotala_macrandra.html Erişim Tarihi: 08.02.2008.
- Micheli, M., Gasperis, A., De Prospero, F. and Standardi, A. 2006. Micropropagation of three species of aquatic plants *Agricoltura Mediterranea* (Italy), 136(1),46-51.
- Moncaleán, P., Rodríguez, A. and Fernández, B. 2003. Effect of different benzyladenine time pulses on the endogenous levels of cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid in micropropagated explants of *Actinidia deliciosa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41,149–155.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Naseem, A.A., Tahir, F. and Sultana, K. 1998. Optimal sterilization procedure for *Cicer aritinum* L. Seeds. *Hamdard Medicus*, 42 (2), 49-50.

- Nester, E. W. and Gordon, M. 1988. Early events in the transformation of higher plants by *Agrobacterium*. Physiology and Biochemistry of Plant Microbial Interactions. Keen, N.T., Kosuge, T and Walling, L.L. (eds.), the Am Soc of Plant Physiolog.
- Othman, A.S. and Hock, S.C. 2005. Genetic variation of *Cryptocoryne minima* of Selargong river and Jelutung river in Perak. Universiti Sains Malaysia, 16(1), 1-12.
- Özel, CA., Khawar, KM. and Arslan, O. 2008. A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on in vitro shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Scientia Horticulturae, 117(2), 174-181.
- Özcan, S. 1993. Tissue culture in pea and engineering a marker gene for specific expression in target cells for plant transformation (Ph.D. Thesis), University of Leicester, U.K.
- Özcan, S. ve Özgen, M. 1996. Bitki genetik mühendisliği. Kükem dergisi, 1, 69-95.
- 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.
- Öztürk, M., Şumlu, Ş., Khawar, K.M., Atar, H.H. and Özcan. S. 2006. *In vitro* Micropropagation of Aquarium plant *Hygrophyla difformis*. International Congress of Plant Tissue Culture and Biotechnology, August 13-18 2006, Beijing, China Poster No.1420. page No. 153.
- Öztürk, M. 2008. Akvaryum Bitkileri *Hygrophyla difformis* ve *Microsorium pteropus*'un *In Vitro* Koşullarda Çoğaltımı. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi. Biyoteknoloji Enstitüsü 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.
- Purohit, S.D. and Singhvi, A. 1998. Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. Scientia Horticulturae, 76, 219-229.
- Rataj, K. and Horeman, T. J. 1977. Aquarium plants their identification cultivation and ecology. T.F.H. Publication. Inc. P.O. Box 27. 448 p.. New Jersey.
- Ream. W. 1989. *Agrobacterium tumefaciens* and inter kingdom genetic exchange. Annu. Rev. Phytopathol, 27, 583- 618.
- Sakulkoo, N., Akaracharanya, A., Chareonpornwattana, S., Leepipatpiboon, N. Nakamura, T., Yamaguchi, Y., Shinmyo, A. and Sano, H. 2005. Hyper-assimilation of sulfate and tolerance to sulfide and cadmium in transgenic water spinach expressing an arabidopsis adenosine phosphosulfate reductase. Plant Biotechnology, 22(1),27-32.

- Seçer, S. 2002. Akvaryum Balıkları ve Üretimi. Yüksek Lisans ders notları (basılmamış). Ankara Üniversitesi Ziraat Fak. Su Ürünleri Böl. Ankara.
- Slightom, J.L., Jouanin, L., Leach, F., Drong, R.F. and Tepfer, D. 1985. Isolation and identification of T_L-DNA plant junctions in *Convolvulus arvensis* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. EMBO J., 4,3069-3077.
- Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. 1997. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa. USA.
- 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 Rejuvenation of *Distichlis spicata* (Gramineae). Amer. J. Bot., 76 (10), 1448-1451.
- Stachel, S.E. and Zambryski, P.C. 1968. VirA VirG control the plant induced activation of the T -DNA transfer process of *A. tumefaciens*. Cell, 46, 325-33.
- Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu. M. and Zambryski, P.C.1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature, 318, 624-629.
- Stachel, S.E. and Nester, E. 1986. The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J., 5,1445-1454.
- Suri, S.S., Jain, S. and Ramawat, K.G. 1999. Plantlet regeneration and bulbil formation *in vitro* from leaf and stem explants of *Curculigo orchioides*. an endangered medicinal plant. Scientia Horticulturae, 79, 127-134.
- Şumlu, Ş. 2005. Yüzen Yapraklı Su Bitkisi Nilüfer'in (*Nymphaea sp.*) *In Vitro* Koşullarda Çoğaltımı.Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Su ürünleri Anabilim Dalı. Ankara.
- Taylor, M., Taufa, L. and Drew, R. A. 1998. Decontamination of *kava* (*Piper methysticum*) for *in vitro* propagation. Proc. Intern. Symp. Biotechnol. Tropical and subtropical species, pp. 267-461.
- Te-chato, S. and Lim, M. 2000. Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from *in vitro*-derived leaf explant. Scientia Horticultura, 86, 291-298.
- Thomashow, M.F., Nutter, R., Montoya, A.C., Gordon, M.P. and Nester, E. W. 1980. Integration and organization of the Ti plasmid sequences in crown gall tümörs. Cell, 19, 729-739.

- Vikrant A. and Rashid. A. 2003. Somatic embryogenesis or shootformation following high 2,4-D pulse-treatment of mature embryos of *Paspalum scrobiculatum*. *Biologia Plantarum*. 46 (2). 297-300.
- Walden, R. 1988. Genetic transformation in plants. Open university press. Milton Keynes, pp- 7-23.
- Waldron, C., Murphy, E.B., Roberts, J.L., Gustafson, G.D., Armour, S. and Malcolm, S.K. 1985. Resistance to hygromycin B. A new marker for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 5,103-108.
- Ward, E.R. and Barnes, W.M. 1988. *Vir D2* protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of the T strand DNA. *Science*, 242, 927-930.
- Wawrzyn'czak, A. and Goszczyń'ska, D. M. 2003. Effect of pulse treatment with exogenous cytokinins on longevity and ethylene production in cut carnations (*Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, vol 11.
- Welander, M., Zhu, L.H. and Li, X.Y. 2007. Factors influencing conventional and semi-automated micropropagation. *Propagation of Ornamental Plants*. 7(3), 103-111.
- Yadav, N.S., Postle, K., Saiki, R. K., Thomashow, M.F. and Chilton, M.D. 1988. T-DNA of a crown gall tumor is covalently joined to host plant DNA. *Nature*, 287, 458-461.
- Zambryski, P.C., Tempe, J. and Schell, J. 1989. Transfer and function of T- DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell*, 56, 193-201.
- Zambryski, P. C. 1992. Chronicles from the *Agrobacterium* plant cell DNA transfer story. *Annu. Rev.Plant Phsiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 465-490.
- Zhang, H.G. and Hong, J.M. 2006. Functions of plants of constructed wetlands. *Wetland Science*. 4 (2). 146-154.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şule ŞUMLU
Doğum Yeri : Balıkesir
Doğum Tarihi : 17 Temmuz 1979
Medeni hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü
(2002)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri
Anabilim Dalı (2005)

Çalıştığı Kurum/ Kurumlar ve Yıl:

Sahil Güvenlik Komutanlığı (2007)

Yayımları :

SCI yayımlar

Atar HH. **Sumlu S.** Khawar K.M., Sebahattin Ozcan. Efficient plant regeneration from seeds of Water lily (*Nymphaea alba*) under *in vitro* conditons. Journal of biotechnology. August 21-24. 2005.

Yurt içi kongrelerdeki sunumlar

Şumlu S. Khawar K.M., Sebahattin Ozcan. ATAR HH. Öztürk M. Nilüfer (*Nymphaea alba* L.) Bitkisinin *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi. 14. Biyoteknoloji kongresi. Eskişehir. 31 Ağustos - 2 Eylül 2005. Sunum bildiri

Sumlu S. Khawar K.M., Öztürk M. Atar HH.Su Bitkisi Nilüfer'in (*Nymphaea* sp) *in vitro* Koşullarda Çoğaltımı.XIII. Ulusal su ürünleri sempozyumu. Çanakkale.1-4 Eylül 2005. Sunum bildiri

Oztürk M, Khawar KM, **Sumlu S**, Özcan S. Mısır Anasonu (*Carum copticum*) Tohumlarının *In Vitro* Çimlenmesi ve Bitkicik Gelişimi Üzerine Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Etkisi. 14. Biyoteknoloji kongresi Eskişehir..2005. 31 Ağustos - 2 Eylül 2005. Sunum bildirisi

Yurt dışı kongrelerde sunumlar

Öztürk M, **Şumlu Ş**, Khawar KM, Atar HH and Özcan S. *In vitro* Micropropagation of Aquarium plant *Hygrophyla difformis*. International Congress of Plant Tissue Culture and Biotechnology. August 13-18. '006. Beijing. China Poster No.1420. page No. 153. 13-18 Ağustos. 2006. Poster sunumu.

Khawar KM., Sağlam S, Özel ÇA, Öztürk M, **Şumlu Ş**., Sevimay CS, Özcan S. *In Vitro* Somatic Embryogenesis in Lavender (*Lavandula angustifolia* Miller) under Different Light Intensities. Agro Environ 2006. Ghent University. Ghent. Belgium. 4 - 7 September 2006. Sunum bildirisi

Öztürk M, **Şumlu Ş**, Khawar KM, Atar HH and Özcan S, *In vitro* Micropropagation of Aquarium plant *Hygrophyla difformis*. International Congress of Plant Tissue Culture and Biotechnology. August 13-18. '006. Beijing. China Poster No.1420. page No. 153. 13-18 Ağustos. 2006 Poster sunumu.

Oztürk M, **Sumlu S**, Khawar KM, Yucel AZ, Atar HH, Ozcan S, Efficient tissue culture based propagation from leaf explants of water wisteria (*Hygrophyla difformis* Vasetto). 5th International conference. Propagation of ornamental plants. 5-8 september 2007. Sofia Bulgaria- p-148. 2007 Poster sunumu.

Oztürk M, Khawar KM, **Sumlu S**, Atar HH, Ozcan S, Micropropagation of *Hygrophyla difformis* (L. F.) Blume and acclimatisation under different temperature and light regimes International Symposium on Biotechnology, Sfax, Tunus ISB 2008, May 4th – 8th, 2008 Sfax – Tunisia. Poster sunumu.