

**T.C**  
**KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI LED İŐIKLARDAN *BACOPA MONNIERI***  
**BİTKİSİNİN İN VİTRO KOŞULLARDA ÇOĞALTIMI**

**Murat DAZKIRLI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ**

**Şubat-2015**

**T.C  
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI LED İŐIKLARDA *BACOPA MONNİERİ* BİTKİSİNİN İN VİTRO  
KOŞULLARDA ÇOĞALTIMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Murat DAZKIRLI**

**Anabilim Dalı : Hidrobiyoloji**

**Tez DanıŐmanı: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ**

**KARAMAN-2015**

## TEZ ONAYI

Murat DAZKIRLI tarafından hazırlanan “Farklı LED Işıklarda *Bacopa monnieri* Bitkisinin İn Vitro Koşullarda Çoğaltımı” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir

Danışman:

**Prof.Dr. Mehmet KARATAŞ**

Juri Üyeleri

**Prof.Dr. Mehmet KARATAŞ**  
Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi  
Kamil Özdağ Fen Fak. Biyoloji Bölümü

**Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR**  
Ankara Üniversitesi Ziraat Fak.  
Tarla Bitkileri Bölümü

**Doç. Dr. Muhammad AASIM**  
Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi  
Kamil Özdağ Fen Fak. Biyoloji Bölümü

Tez Savunma Tarihi: 14/01/2015

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL**  
Enstitü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**Murat DAZKIRLI**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### FARKLI LED IŞIKLARDA *BACOPA MONNIERI* BİTKİSİNİN İN VİTRO KOŞULLARDA ÇOĞALTIMI

Murat DAZKIRLI

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

Şubat, 2015, 43 sayfa

*Bacopa monnieri* (Linn) Wettst bitkisinin yan veya adeventif sürgün oluşumu için tam, alt ve üst yarım yaprak eksplantı ile sürgün ucu eksplantları 0,25, 0,50 ve 1,0 mg/l BAP içeren MS ortamına kültüre alınıp, farklı kombinasyonunda kırmızı : mavi (4:1, 3:1, 2:1, 1:1) veya beyaz LED ışıklarında hızlı çoğaltım için çalışmalar yapılmıştır. Tüm BAP içeren ortamlarda ve kullanılan farklı LED ışıklarda tüm eksplantlarda %100 sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. Sürgün ucu eksplantından en fazla sürgün kırmızı : mavi LED ışıklarından elde edilirken en düşük ise beyaz LED altında kaydedilmiştir. Sürgün uzunluğu bakımında tüm eksplantardan en uzun sürgünler kırmızı:mavi LED ışıklar altında kültüre alınmış eksplantlarında tespit edilmiştir. BAP oranların sürgün rejenerasyonu kıyaslandığında tam ve üst yaprak eksplantlarında istatistik olarak her hangi etki bulunmazken, *yarım lamina tabanı* ve sürgün ucu eksplantlarında en fazla sürgün sayısı 1.0 mg/l BAP içeren ortamında kaydedilmiştir. Tüm eksplantlardan en uzun sürgünler ise 0.25 mg/l BAP içeren ortamında elde edilmiştir. LED ×BAP kıyaslandığında, tam ve üst yaprak eksplantlarından en fazla eksplant başına sürgün sayısı beyaz LED+0.25 mg/l BAP içeren ortamından elde edilmiştir. Alt yaprak eksplantından ise en fazla sürgün beyaz LED+1.0 mg/l BAP içeren ortamında kaydedilmiştir. Tam ve üst yaprak eksplantlarından en uzun sürgünler 1:1 kırmızı:mavi +0.25 mg/l BAP içeren ortamından elde edilmiştir. Ancak, alt yaprak ve sürgün ucu eksplantından en uzun sürgünler 1:1 kırmızı:mavi +0.50 mg/l BAP içeren ortamında elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacopa*, *In vitro* LED ışıkları, Sürgün ucu, Yaprak eksplantı

## ABSTRACT

Ms Thesis

### REPRODUCTION OF THE *BACOPA MONNIERI* PLANT IN LABORATORY CONDITIONS UNDER THE DIFFERENT LED LIGHTS

**Murat DAZKIRLI**

**Karamanoğlu Mehmetbey University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology**

**Danışman: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ**

**February, 2015, 43 pages**

In this study, full, upper and lower half leaf explants and shoot tip explants of *Bacopa monnieri* (Linn) Wettst were cultured on MS medium containing 0.25, 0.50 ve 1.0 mg/l BAP followed by incubated under different combinations of Red:Blue (4:1, 3:1, 2:1, 1:1) or white LEDs for adventitious or axillary shoot regeneration. 100% shoot regeneration frequency of all explants were recorded irrespective of BA concentration or LED lighting systems. Maximum number of shoots per explant of shoot tip explant were recorded under 1:1 R:B LEDs light, while minimum under white LEDs. BAP concentrations had statistically insignificant effects on shoots per explant of full and upper half leaf explant. Whereas, maximum shoots per explant of lower half leaf and shoot tip explant were obtained on MS medium with 1.0 mg/l BAP. However, longer shoots from all explants were recorded at 0.25 mg/l BAP containing medium. Comparing effects of LEDs  $\times$  BAP, maximum number of shoots per explants on full and upper half leaf explant were achieved on MS medium with white LED+0.25 mg/l BAP. Whereas, lower half leaf explant generated maximum shoots on MS medium with white LED+1.0 mg/l BAP. Longer shoots from full and upper half leaf explant were scored on MS medium with 1:1 R:B LED+0.25 mg/l BAP. Whereas, lower half leaf explant generated maximum shoots on MS medium with 1:1 R:B LED+0.50 mg/l BAP. Regenerated shoots were successfully rooted on MS medium containing with 0.25-1.0 mg/l IBA. Rooted plantlets were acclimatised successfully in the aquariums containing tap water.

**Key words:** *Bacopa*, *In vitro*, LED lights, Shoot tip, Leaf explant

## ÖN SÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim süresince danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ'a ve çalışmalarım sırasında her türlü desteği vererek beni yönlendiren Sayın Doç. Dr. Muhammad AASIM'a teşekkürlerimi sunarım. Bu süre çerçevesinde göstermiş olduğu hoşgörü ve yardımlarından dolayı ve diğer çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Murat DAZKIRLI**

**Şubat, 2015**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>ÖN SÖZ</b> .....	iii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	vii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	4
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	11
3.1. Deneme Yeri .....	11
3.2. Bitki Materyali .....	11
3.3. Büyüme Ortamları ve Koşulları .....	12
3.4. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması ve Muhafazası .....	14
3.5. <i>Bacopa monnieri</i> Bitkisinin Yüzey Sterilizasyonu .....	14
3.6. Eksplant İzolasyonu .....	15
3.7. Rejenere Olan <i>Bacopa</i> Sürgünlerin Köklendirilmesi ve Adaptasyon	15
3.8. İstatiksel Değerlendirme .....	16
<b>4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR</b> .....	17
4.1. <i>In vitro</i> Koşullarda <i>B. monnieri</i> Bitkisinin Çoğaltım Çalışması .....	17
4.1.1. <i>B. monnieri</i> Bitkisinin <i>In vitro</i> Yüzey Sterilizasyon Çalışmaları	17
4.1.2. Farklı LED ışıkları ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> 'nin Lamina eksplantından sürgün rejenerasyonu	18
4.1.3. Farklı LED ışıkları ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> 'nin Lamina eksplantından sürgün rejenerasyonu	21
4.1.4. Farklı LED ışıkları ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> 'nin yarım lamina üstü eksplantından sürgün rejenerasyonu	25
4.1.5. Farklı LED ışıkları ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> 'nin sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu	27
4.2. <i>In vitro</i> Köklendirme ve Adaptasyon .....	32
4.2.1. <i>B. monnieri</i> bitkisinin <i>in vitro</i> köklendirilmesi	32
4.2.2. <i>In vitro</i> Koşullarda Elde Edilen Sürgünlerin Dış Şartlara Adaptasyonu ....	33
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	34
<b>KAYNAKLAR</b> .....	38
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	43



## ÇİZELGELER

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 3.1:</b>	Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları .....	12
<b>Çizelge 3.2</b>	Kullanılan büyüme düzenleyici ve antibiyotik çözücülerini, stok konsantrasyonu ve saklama koşulları .....	14
<b>Çizelge 4.1:</b>	Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> bitkisinin lamina eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	18
<b>Çizelge 4.2:</b>	Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> bitkisinin lamina eksplantından eksplant başına sürgün sayısına etkisi.....	20
<b>Çizelge 4.3:</b>	Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> bitkisinin lamina eksplantından sürgün uzunluğuna etkisi.....	20
<b>Çizelge 4.4:</b>	Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> bitkisinin yarım lamina tabanı eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi....	22
<b>Çizelge 4.5:</b>	Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> bitkisinin yarım lamina tabanı eksplantından eksplant başına sürgün sayısına etkisi .....	23
<b>Çizelge 4.6:</b>	Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> bitkisinin yarım lamina tabanı eksplantından sürgün uzunluğuna etkisi.....	24
<b>Çizelge 4.7:</b>	Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> bitkisinin yarım lamina üstü eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi .....	25
<b>Çizelge 4.8:</b>	Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> bitkisinin yarım lamina üstü eksplantından eksplant başına sürgün sayısına etkisi .....	26
<b>Çizelge 4.9:</b>	Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> bitkisinin yarım lamina üstü eksplantından sürgün uzunluğuna etkisi .....	27
<b>Çizelge 4.10:</b>	Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> bitkisinin sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	29
<b>Çizelge 4.11:</b>	Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> bitkisinin lamina eksplantından eksplant başına sürgün sayısına etkisi .....	30
<b>Çizelge 4.12:</b>	Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının <i>B. monnieri</i> bitkisinin sürgün ucu eksplantından sürgün uzunluğuna etkisi .....	31

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1:	<i>B. monnieri</i> bitkisinin bir görüntüsü .....	11
Şekil 3.2:	<i>B. monnier</i> bitkisinin <i>in vitro</i> koşullarda sürgün rejenerasyon için kullanılan LED ışıkları .....	13
Şekil 3.3:	<i>B. monnieri</i> bitkisinden izole edilen eksplantlar .....	15
Şekil 4.1:	Yüzey sterilizasyonundan sonra elde edilen eksplantlar.....	17
Şekil 4.2:	Farklı LED ışıklarının ve BAP dozlarının lamina eksplantından sürgün rejenrasyon oluşumu .....	19
Şekil 4.3:	Farklı LED ışıklarının ve BAP dozlarının <i>yarım lamina tabanı</i> eksplantından sürgün rejenrasyon oluşumu .....	22
Şekil 4.4:	Farklı LED ışıklarının ve BAP dozlarının <i>yarım lamina üstü</i> eksplantından sürgün rejenrasyon oluşumu .....	26
Şekil 4.5:	Farklı LED ışıklarının ve BAP dozlarının sürgün ucu eksplantından sürgün rejenrasyon oluşumu .....	29
Şekil 4.6:	İn vitro köklendirilmiş <i>Bacopa</i> bitkisi .....	32

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

<b>Cm</b>	san timetre
<b>g, mg,</b>	Gram, Miligram
<b>HCl</b>	Hidroklorik Asit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksit
<b>IAA</b>	Indol-3-Asetik Asit
<b>IBA</b>	Indol Butirik Asit
<b>l, ml, µl</b>	Litre, Mililitre, Mikrolitre
<b>MS</b>	Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
<b>MSO</b>	Hormonsuz Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
<b>NAA</b>	α- Naftalen Asetik Asit
<b>NaOCl</b>	Sodyum Hipoklorit
<b>NaOH</b>	Sodyum Hidroksit
<b>TDZ</b>	Thidiazuron

### Açıklama

### Kısaltmalar

<b>2,4-D</b>	2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit
<b>2-iP</b>	2- izopentenil adenin
<b>BAP</b>	6 Benzylaminopurin
<b>ÇS</b>	Çamaşır Suyu
<b>KO</b>	Kare Ortalaması
<b>VK</b>	Varyasyon Kaynakları

### Açıklama

## 1. Giriş

Akvaryum bitkileri, tropikal ve subtropikal bölgeler doğal yaşam ortamları gösteren canlılardır (Alpbaz, 1984). Dünya genelde akvaryum bitkilerinin talebinde hızlı bir artış kaydedilmektedir. Avrupa’da Hollanda, Fransa, Çek Cumhuriyeti, Almanya, Macaristan, İsviçre, Avusturya, Türkiye, Letonya ve Estonya su bitkilerini en çok ithal eden ilk on ülke olarak sıralanmaktadır (Karatas ve ark. 2013a). Su bitkileri bir hücreliden çok hücreliye kadar çeşitli şekilleri olan ve klorofil içeren anjiyosperm ve gimnosperm canlılardan oluşmaktadır. Birincil üreticiler olan bu bitkiler suda bulunan karbondioksiti ve ışık enerjisini kullanarak fotosentez yapmaktadır ve sucul ortamın besin zincirinin ilk halkası olarak bitkisel kaynakları oluşturmaktadırlar (Cirik ve ark. 2001, Öztürk 2002).

Su bitkileri, sulardaki besin ağının alt basamakları ile daha üst basamakları arasında bağ oluşturur. Su böcekleri, su kuşları, balıklar, su memeli hayvanları için korunma, beslenme ve üreme ortamı sağlar. Beslenmeleri bu bitkilere bağlı olan otçul canlılar (örneğin: Ot sazanı, büyükbaş sazan ve gümüş sazan gibi otçul balıklar) ve yumurtalarını bu bitkiler üzerine bırakan canlıların yaşamlarını sürdürmeleri bu bitkilerin varlığına bağlıdır (Anonim, 2009). Su bitkileri aynı zamanda patojen bakterilerin ortamdan uzaklaştırılmalarında rol oynamaktadırlar. Patojen bakteriler bilindiği gibi asidik ortamı tercih ederler. Bitkisel organizmalar ise ortamı bazikleştirdiği için patojen bakterilerin uzaklaşmasını sağlamaktadır (Cirik vd., 2011).

Şifalı bitkiler, tıbbi olarak önemli bileşiklerin kaynağı olarak ya da geleneksel ilaç olarak eski zamanlardan günümüze kadar hastalıkların iyileştirilmesinde kullanılagelmiştir. *B.monniери* Hindistan ve Pakistan’da bir kalp toniği şürübünde etkin madde olarak kullanılan bir tıbbi bitkidir (Vijaykumar et al 2010). İçerdikleri alkaloidler, saponinler, flavonoidler, betulinik asit, stigmastrol, beta-sitosterol ve Bacopa saponinler gibi aktif bileşikler içerdiklerinden geleneksel tıp sisteminde büyük öneme sahiptir (Ali et al., 1999).

Brahmi olarak bilinen tıbbi bitki bir bitki olan *Bacopa monniери* (Linn) Wettst, anti-oksidan (Bhattacharya vd., 2000) anti-depresan (Sairam vd., 2002), antiinflamatuvar ve anti-mikrobiyal etkiler göstermekte (Sairam vd., 2002; Chaudhuri vd., 2004; Channa vd., 2006;), en popüler nörotonik ve hafıza güçlendirici etkileye de sahiptir (Vollala vd., 2010). Ayrıca, rahatlama ile ilgili fiziksel süreçlere yardımcı olur ve zihinsel algılamının artmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bu bitkinin özleri hayvanlarda bilişsel etkiyi artırdığı bildirilmiştir (Stough vd., 2001; Uabundit vd., 2010). Bu bitkinin etanolik özleri kullanım ile farelerin farklı beyin

bölgelerinde anti-oksidan enzim aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir (Bhattacharya, 2000). Bu etanolik özlerin ayrıca, skopolamin, elektroşok ve immobilizasyon stresinin amnezik etkilerini inhibe ettiği ve görsel işlem, öğrenme oranı artırdığı olarak bildirilmişlerdir (Singh, 1997). Geleneksel olarak öğrenme, hafıza gelişimini artırma ve konsantrasyonu artırmada beyin toniği olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca, epileptik bozuklukları ve anksiyete hastalarına yardımcı olarak da kullanılmıştır (Chopra, 1958). Yapılan araştırmalar, anksiyete, epilepsi, bronşit ve astım, barsak sendromu ve mide ülserleri gibi hastalıklarda *Bacopa*'nın kullanımı desteklemiştir (Shakoor et al., 1994). <İL Akıl hastalığı, epilepsi, ses kısıklığı, dalak büyümesi, yılan sokması, romatizma, cüzam, egzama ve halka solucanı tedavisinde de kullanılmaktadır (Basu and Walia, 1994). Yine, 55 yaş üzeri olan 98 sağlıklı insanda *B. monnieri* ile yapılan bir çalışmada, hafızada tutma yeteneğinin önemli ölçüde arttığı görülmüştür (Morgan ve Stevens, 2010).

Işık fotosentez mekanizması nedeniyle bitkilerin gelişimi için çok önemlidir. Dalga halinde hareket eden ve foton taneciği adı verilen birimden oluşmuş enerji paketçikleridir. Işığın dalga boyu değiştikçe rengi de değişir. Örneğin uzun dalga boyları kırmızı ışığı oluştururken, kısa dalga boylu ışınlar mor ötesi ışınları oluşturur. Bitkiler, çeşitli dalga boyundaki ışığa karşı insanlardan farklı bir duyarlılığa sahiptir. İnsan gözü tarafından görülebilen ışığın sadece bir kısmı, yani 400 ile 700 nm arasında dalga boyuna sahip olan ışıklar bitkilerin büyümesine (fotosentez) yardımcı olur. Buna PAR alanı denir (PAR = Fotosentetik Aktif Radyasyon). Gün ışığının küresel radyasyonu yaklaşık %45'i 400 ile 700 nm arasındadır. Yani, küresel radyasyonun yaklaşık %45'i PAR'dur. Bir ışık kaynağının bitkilerin büyümesinde etkili olması için, mümkün olan en fazla elektrik enerjisinin PAR'a dönüştürülmesi gerekmektedir.

LED yapay ışık kaynaklarından en son bulunandıdır. P ve N tipi yarı iletken katmanlar (Led çipi), yansıtıcı yüzey ve iletken alanlar bir LED'in yapısını oluşturmaktadır. LED'in hangi renkte ışık yayması isteniyorsa galyum, arsenit, alüminyum, fosfat, indiyum, nitrit gibi kimyasallardan belirli ölçülerde yarı iletken malzemeye ilave edilir (TÜBİTAK, 2013). Işıklandırmada verim maksimum ışık yoğunluğunda kalış süresiyle ( $T_H$ ) ilişkilidir. LED ışıklarda kesikli ışık olmasına rağmen tübüler floresan lambalara göre maksimum ışık yoğunluğunda kalış süresi daha yüksektir (Jao, 2004). Bu nedenle LEDin bitki büyüme ve gelişmesi için olumlu sonuçlar oluşturacağı düşünülerek *in vitro* çalışmalarda LED ışık kullanımı artmaktadır (Li ve ark. 2010). Ayrıca bitki büyüme ve gelişmesinde ışığın önemi incelenerek; özellikle farklı renklerde LED ışık kombinasyonlarının pamuk bitkisinde bitki

büyümesi ve sürgün gelişimi üzerinde olumlu sonuçlar oluşturabileceği tespit edilmiştir. Bitki doku kültürü çalışmalarında henüz çok yeni olan LED ışık kullanımının *in vitro* kültürü zor olan bir çok bitki ve çeşit için de temel oluşturacağı düşünülmektedir.

Akvaryum bitkilerinin çoğaltımı ise geleneksel yöntemlerle çoğaltım (vejetatif çoğaltım), generatif çoğaltım veya biyoteknolojik yöntemlerle çoğaltım (mikroçoğaltım ve doku kültürü yöntemleriyle çoğaltım) olarak sınıflandırılabilir. Mikroçoğaltım ve doku kültürü yöntemleriyle çoğaltım sisteminde *in-vitro* olarak laboratuvar koşullarında bitkilerin üretilmesidir. Bitkiler aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir.

Türkiye’de son otuz beş yıldan beri su ürünleri eğitimi ile birlikte su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli gelişmeler kaydedilmiş ve üretim artmıştır, ancak su bitkileri çoğaltımında ve benzer konularda yeterince gelişme sağlanamamış olup, su bitkilerinin yoğun üretimine yönelik sayılı miktarda çalışmalar bulunmamaktadır. Üretim daha çok amatörece ve düşük miktarlarda yapılmaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmalar dahilinde kısa zamanda daha verimli ve kontrollü üretimin yapıldığı farklı yöntemler geliştirmeye çalışılmıştır. Bu yöntemlerden en önemlisi *in-vitro* üretimdir. Doku kültürü tekniklerini kullanarak yapılan çoğaltım (mikro üretim) günümüzde, dünyada özellikle süs bitkilerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı ise *B. monnieri* bitkisinin *in vitro* koşullarda çoğaltımı için uygun bir ışık kaynağı kullanılarak optimizasyonu ve geliştirilmesiyle beraber yerel kaynaklardan yeterli miktarda üretiminin sağlanması olmuştur.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Jenks vd (2000), süs su bitkisi olan *Nymphoides indica*' da yaprak sapı eksplantından sürgün rejenerasyon çalışmada 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 sukroz, 10 µM BAP, 20 µM IAA ve %0.8 agar içeren MS besin ortamından tespit etmişlerdir.

Öztürk (2002), *Ludwigia sp*'nin yüzey sterilizasyonu için ilk olarak 15 dk çeşme suyunda tutulduktan sonra 9 dk % 20'lik ticari çamaşır suyuyla muamele edilip, 3 dk 3 kere durulanmıştır. Uç meristemi, birinci, ikinci ve üçüncü-dördüncü koltukaltı meristem eksplantları 4 hafta MS, % 3 sukroz, % 0,8 agar, BAP (0,1, 0,2 ve 0,3 mg/l), TDZ (0,05, 0,1, 0,15 mg/l), NAA (0,1 mg/l) içeren ortamlarda kültüre alındıktan sonra 4 hafta boyunca ½ MS ortamında tutulmuştur. En fazla 12,31 adet sürgün (uç meristemi ile 0,05 mg/l TDZ ve 0,1mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Daha sonra 10-20 mm uzunluğundaki sürgünler kesilerek ½ MS ortamda köklendirilmiştir. Köklenenmiş sürgünler ise daha sonra başarıyla akvaryum ortamına adapte edilmiştir.

Yücel (2008), *Ludwigia repens* (2n=32) bitkisine iki farklı kolkisin muamelesi ile bitkinin kromozom sayısını iki katına çıkartarak, özelliklerini iyileştirmek ve akvaryumlarda daha çekici görünmesini ile ilgili çalışma yapmıştır. Birinci metotta sürgün ucu ve birinci koltukaltı meristemleri farklı dozlarda kolkisin (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 ve 4.0 mg/l) ve 0.05 mg/l TDZ+0.5mg/l NAA içeren ortamda muamele edilmiştir. İkinci metotta ise, eksplantlar farklı oranlardaki kolkisin (250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ve 2000 mg/l) çözeltisine daldırılarak 30 dk. muamele ettikten sonra 0.05 mg/l TDZ+0.5mg/l NAA içeren ortamına aktarmıştır. Bir ay sonra gelişen bitkiler, ½ MS ortamına aktarmıştır. Tüm büyütülen sürgünleri kromozom katlanması için yapılan test sonucunda 500 mg/l kolkisinde 30 dk. daldırma ile muamele edilip, büyümeye alınan birinci koltuk altı meristeminde sitolojik analizlerle katlanmış kromozom sayısı 44 olarak doğrulanmıştır. Yaprak ve stoma boylarındaki fenotipik değişiklikler, morfolojik incelemelerle kromozom sayısındaki artışı doğrulamıştır.

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

Moncalean ve ark. (2003), *Actinidia deliciosa* türünün sürgün uçlarını değişik oranda BAP ile muamele yapıp, 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. Çalışma sonucunda endogen fitohormonlar ve bitkinin gelişimi arasında bir etkileşim olduğu görülürken, en iyi bitkicikler 4,4 µM BAP ile 1 gün muameleden elde edilmiştir. Anthony ve ark. (2004), *Leucopocon verticillatus* bitkisinin somatik embriyogenez ile bir rejenerasyonu protokol geliştirmişlerdir. En iyi sonuçlar 10 µM TDZ ve 5 µM IAA içeren, %4 Maltoz ve %0,7 agar içeren Gamborg B5 (6,0 pH) ortamından elde edilmiştir. Embriyoların 100 µM IBA ile 2-5 günlük muamelesi köklenmeye yardımcı olmuştur. Agar içeren ortamda gelişen kökler ince ve kırılğan yapıya sahip olduğu için kum ve arpa ortamı kullanılmıştır. Bu ortamda %60 oranında kırılmayan kökler ve bitkiler elde edilmiş ve toprağa aktarılmıştır.

Keskinkan (2004), tekstil ve metal sanayi atık sularının ileri arıtımında *Myriophyllum spicatum* ve *Ceratophyllum demersum* içeren yapay sulak alanları kullanılmıştır. Tekstil sanayi sentetik atık suyu için 11,0 mg/l boyar madde, metal sanayi sentetik atık suyu için sırasıyla 0,4 mg/l Zn, 0,2 mg/l lik Cu ve Pb konsantrasyonları uygulanmıştır. Hidrolik bekletme süreleri 9 ve 18 gün olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, sulak alan sisteminin boyar maddelerle ağır metalleri giderebileceğini ve iyi bir giderim kapasitesi olduğunu göstermiştir. *M. spicatum* olan akvaryumlarda %91,3-96,8 ve *C. Demersum* olan akvaryumlarda ise %92,5-95,4 oranında boyar madde giderimi görülmüştür.

Şumlu (2004), Türkiye’de göl ve göletlerde doğal olarak bulunan *Nymphaea alba* L. (nilüfer) 'nin *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi ve çoğaltımı amacıyla yapılan araştırmada tohum çimlenmesi % 60 oranında 1 mg/lBAP ve 0.1 mg/ 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. Sıvı TDZ’li ortamlarda kağıt filtre köprüleri üzerinde çimlenme elde edilmiş olup 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 fiduciklerde daha fazla boy artışı kaydedilmiştir. 0,05 mg/l TDZ kullanımı daha ekonomik bulunmuş ve çimlenen tohumlardan elde edilen bitkicikler akvaryumlara konulmuştur.



Micheli vd (2006), *Cryptocoryne beckettii*, *Cryptocoryne lutea* ve *Rotala rotundifolia*'nın *in vitro* çoğaltım çalışmalarında sterilizasyon amacıyla %1-1,5 oranında sodyum hipoklorit kullanılmıştır. En iyi çoğaltım 0,5 mg/l NAA ve 1,00 ile 4,00 mg/l BAP içeren LS ortamından (Linsmaier ve Skoog 1965) elde edilmiştir. 4 mg/l BAP içeren ortamlarda 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. Adaptasyona çalışmada 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 vd (2006), *Hygrophila auriculata* bitkisinin yaprak eksplantlarından BAP ve NAA içeren MS ortamda sürgün rejenerasyonu elde edilirken, 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 köklendirildikten sonra % 80'i başarıyla toprağa aktarılmış ve adaptasyon sağlanmıştır.

Behera ve ark. (2008), *Bacopa monnieri* (Linn) Wettst bitkisinin *in vitro* koşullarda çoğaltımı için sürgün eksplantlarını farklı oranlarda BAP ve kinetin (0,5 mg/l, 1,0 mg/l, 1,5 mg/l ve 2 mg/l) içeren MS ortamında 8 hafta boyunca kültüre almışlardır. En fazla oranda sürgün ve kök rejenerasyonu 2 mg/l BAP+Kin içeren ortamda boğum kısımlarından elde edilmiştir. Sekiz hafta boyunca *in vitro* koşullarda büyütülen bitkilerin biyokimyasal analizlerinde, maksimum miktarda primer ve sekonder metabolitlerin varlığını 2 mg/l BAP+Kin içeren MS ortamında kaydedilmiştir. Ayrıca 2 mg/l BAP+Kin içeren MS ortamında, büyüme oranlarının ve biyokimyasal parametrelerin iki ile sekiz hafta arasında arttığı da kaydedilmiştir.

Şumlu (2009), *Rotala macrandra* Koehne'nın 1'inci koltukaltı ve 2'inci koltukaltı meristem,yaprak, 1'inci ve 2'inci boğum arası eksplantları agar ve jelrit ile katılaştırılan ve içerisinde sitokinin ve oksin bulunan katı ve sıvı ortamlarda kültüre alınmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu (27.33 adet) 1'inci boğum arası eksplantında 0.25mg/l BAP-0.50 mg/l NAA içeren katı MS besi ortamından 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 eksplant üzerinde birer sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Daha sonra yaprak ve 1'inci boğum arası eksplantlarıyla *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 P35GUS-INT ve LBA4404 pRGGbar 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.

Sharma ve ark. (2010), *Bacopa monnieri* (L) Wettst'in çoğaltımı için yapılan çalışmalarda yüzey sterilizasyonu için *yan* tomurcukları içeren nodal segmentler, %0,1 oranında civa klorid ile 5 dk. muamele edilmiştir. Daha sonra, 0,2 mg/l BAP içeren yarı katı MS ortamında %100 kültürler elde edilmiştir. *In vitro* koşullarda çoğaltılan *yan* sürgünler, hızlı sürgün çoğaltımı için 0,2 mg/l BAP içeren MS ortamında demetler halinde gruplara ayrılarak alt kültüre alınmıştır. Rejenere olan sürgünler, 0,15 mg/l IBA içeren MS ortamında %100 köklendirilmiş ve köklendirilen bitkiciklerin başarıyla adaptasyonu sağlanmıştır.

Yenice (2010), Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktör ile su mercimeği (*Lemna minor* L.) bitkisini farklı oranlarda BAP, kinetin ve TDZ içeren şekerli ve şekersiz sıvı MS ortamlarında kültüre almıştır. En fazla bitki çoğaltımı 0,2 mg/l BAP içeren şekersiz sıvı MS ortamında pH 7.23 te görülürken, eksplant başına 50.44 adet bitki kaydetmiştir. Ayrıca 0,05 mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamında eksplant başına düşen bitki sayısı en fazla 57,823 adet ve 0.6 mg/l TDZ içeren sıvı MS ortamında eksplant başına düşen bitki sayısı ise en fazla 50,74 adet hesaplamıştır. Kjeldahl Yöntemi ile yapılan azot tayini çalışmaları sonucunda bitkinin protein değeri %25,5 olarak tespit etmiştir. Hormon uygulaması sonucunda ise 0,5 mg/l BAP ile bitkideki protein oranının %29,18' e çıktığı görülmüştür.

Carter ve Gunawardena (2011), *Aponogeton madagascariensis* bitkisinde kallustan sürgün rejenerasyon elde etmek amacıyla soğan, kök ucu, yaprak sapı ve olgunlaşmamış çiçekleri kullanmışlardır. Pikloram ve TDZ kombinasyonlarını içeren ortamlardaki bitki soğan parçalarından başarıyla kallus oluşumu elde edilmesine rağmen sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir. 2 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA içeren ortamda olgunlaşmamış çiçeklerden hem kallus oluşumu hem de sürgün rejenerasyonu başarıyla elde edilmiştir. Denemede katı MS ortamında rejenere olan sürgünlerin uçları kurumasın diye üzerlerine sıvı MS ortamı ilave edilerek bitki rejenerasyonu sağlanmıştır.

Gnanaraj ve ark. (2011), *Alternanthera sessilis* (L.)'in *in vitro* koşullarda hızlı çoğaltımı için sürgün ucu, yaprak, gövde nodları ve internodları farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Sürgün ucu eksplantlarında, en yüksek sürgün rejenerasyon oranı (94,3±0,43) ve eksplant başına en fazla sürgün sayısı (23,4±0,38) 2,0 mg/l BAP içeren MS ortamında kaydedilmiştir. Nodal eksplantlarda ise en yüksek sürgün rejenerasyon oranı (90,4±0,82) ve nod başına en fazla sürgün sayısı (15,2±0,63 adet) 1,5 mg/l BAP içeren MS ortamında kaydedilmiştir. En fazla orandaki kallus oluşumu ise 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamındaki yaprak (92,4±0,61) ve internod (88,9±0,83) eksplantlarından elde edilmiştir. En fazla oranda kök oluşumu (97,4±1,36) ve sürgün başına

en fazla kökçük sayısı (6,3±0,42) 3 mg/l IBA içeren ½ MS ortamında elde edilmiştir. Rejenere olan %78 sürgünlerin adaptasyonu başarıyla sağlanmıştır ().

Stanly vd. (2011), *C. wendtii* de Wit ve *C. beckettii* Thwaites ex Trimen türlerinin sürgün uçlarını kullanarak *in vitro* ortamda çoğaltmak için 0,5 mg/L BA ve 0,2 mg/L IBA içeren sıvı ve agar'liMS besi ortamında görülmüştür. Her iki türde de yüksek çoklu sürgün oluşumu, kültürün 4. haftasından sonra sıvı çoğaltma ortamında görülmüştür. En az çoklu sürgün oluşumu ise agar kullanılmış besi ortamında görülmüştür. Ayrıca her iki ortamda ve her iki türden alınan explantlarda 4. hafta sonunda kök ve yaprak oluşumu görülmüştür. Bu çalışmada, %95'in üzerinde adaptasyon sağlanmıştır.

Shahzad ve ark. (2011), *Veronica anagallis-aquatica* L.'nin nodal eksplantlarından sürgün rejenerasyonu için BAP, kinetin ve 2-iP'in 0,1-5,0 µM içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Ayrıca farklı oranlarda BAP (0,1-5,0 µM) içeren sıvı MS ortamında da denemeler yapılmıştır. En fazla sürgün sayısı (43,7±1,85) ve sürgün uzunluğu (5,0±0,25) 0,5 µM BAP içeren katı MS ortamında elde edilmiştir. Elde edilen sürgünlerin köklendirmesi için 0,1-2,0 µM IBA ve NAA içeren MS ve ½ MS ortamlarına aktarılmıştır. En fazla kök oluşumu 0,5 µM NAA içeren MS ve ½ MS ortamlarında kaydedilmiştir. Köklendirilen bitkilerin %80 oranında adaptasyonu gerçekleştirilmiştir.

Banerjee ve Shrivastava (2012), *Bacopa monnieri* (L.)'nin doku kültürü için 2,5 cm'lik boğum arası eksplantları 0,5-2 mg/l BAP veya kinetin içeren MS veya ½ MS ortamında tek veya kombinasyonlarını olarak kullanılmıştır. 3 hafta sonra en fazla sürgün rejenerasyonu ve sürgün sayısı 1,0 mg/l BAP+0,5 mg/l Kin içeren MS besin ortamında kaydedilmiştir. En fazla kök oluşumu 0,15 mg/l NAA içeren sıvı MS ortamında kaydedilmiş olup, başarıyla adapte edilmiştir.

Dandin ve Murthy (2012), 1, 2, 5 ve 10 µM BAP, kinetin veya 2-iP içeren sıvı ve yarı katı besin ortamında *Nothapodytes nimmoniana* bitkisinin nodal eksplantlarını kullanarak *in vitro* çoğaltım çalışması yapmışlardır. En fazla sürgün sayısı, 2,0 µM BAP içeren sıvı (165,9 adet) ve katı (41,9 adet) ortamdan elde edilmiştir.

Karataş ve ark. (2012a), *Ceratophyllum demersum* L. bitkisi ile ilgili sterilizasyon çalışmada ilk olarak 15 dk. çeşme suyunun altında bekletilmiş ve ardından bitkinin üst gövdeleri izole edilerek çeşitli oranlarda ve sürede hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve ticari çamaşır suyu (NaOCl-ACE) ile muamele edilmiştir. Daha sonra bitki parçalarına 5 dk. süreyle 3 kere durulama işlemi uygulanmıştır. En iyi sonuç 7 dk. %5'lik hidrojen peroksit ile muamele edilen eksplantlardan elde edilmiştir. Karataş ve ark. (2012b), *R. rotundifolia*'nın yüzey

sterilizasyonu için hidrojen peroksit kullanılmış olup, yaprak eksplantları farklı oranlarda BAP içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. En fazla sürgün sayısı 1,00 mg/l BAP içeren ortamda ve en fazla sürgün uzunluğu ise 0,50 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. BAP içeren ortamda kök oluşumu da sağlandığı için, dış koşullara adaptasyonu sağlanmıştır.

Karataş ve ark. (2012c), *H. polysperma* (Roxb.) T. nin *in vitro* çoğaltım için %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile sterilizasyon yapıldıktan sonra sürgün ucu eksplantı düşük orandaki BAP (0,05, 0,10, 0,15, 0,20 mg/l) içeren sıvı MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Dört hafta sonra, eksplantlar farklı oranda GA<sub>3</sub> (0,50, 1,00, 1,50 mg/l) içeren sıvı ortamlarda sürgün uzaması için kültüre alınmıştır. GA<sub>3</sub> içeren ortamlarda bitki üzerinde kök oluşumu da gözlenmiştir. Elde edilen bitkiler başarıyla akvaryum koşullarına adapte edilmiştir.

Çiftçioğlu (2013), *Rotala rotundifolia*'nin yaprak, sürgün ucu, birinci ve ikinci koltukaltı meristemlerinden *in vitro* çoğaltım için sıvı veya agar içeren MS ortamda için BAP, TDZ, kinetin ve GA<sub>3</sub>'in farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Sürgün ucu eksplantından 0,05 mg/l TDZ' nin kullanıldığı MS ortamda, eksplant başına 59,67 adet sürgün meydana gelmiştir. Elde edilen 4-5 cm uzunluğundaki sürgünler farklı pH'larda (4,0-10,0 ) kültüre alınmıştır. Dört hafta sonra pH 4,0'teki ortamda bulunan tüm bitkiler ölmüştür. Ancak, pH 8,0-9,0'daki diğer bitkilerde büyüme gözlenmiş olup, rejenerasyon ortamı bakımından bu ortamın uygun olduğu kaydedilmiştir.

Doğan (2013), *C. demersum*'un yüzey sterilizasyonu için en uygun steril eksplantlar, %5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 7 dk muamele ile elde edilmiştir. Sürgün rejenerasyonu amacıyla sürgün ucu, birinci ve ikinci koltukaltı meristem eksplantları, farklı oranlarda sitokininleri (BAP, TDZ, kinetin ve GA<sub>3</sub>) tek olarak ya da farklı oranlarda oksinlerle (IBA ve NAA) birlikte içeren agarla katılaştırılmış ya da sıvı MS besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Agarla katılaştırılan ortamlarda eksplant başına sürgün sayısı en fazla (61,92 adet) 0,10 mg/l TDZ+0,10 mg/l IBA+0,10 mg/l GA<sub>3</sub> kombinasyonlarını içeren MS besi ortamında sürgün ucu meristem eksplantlarından elde edilmiştir. Sıvı ortamlarda ise (204,33 adet) 0,40 mg/l BAP içeren besi ortamında ikinci koltukaltı meristem eksplantlarından elde edilmiştir. *C. demersum* doğal ortamda köksüz bir bitki olmasından dolayı, su ortamına %100 adaptasyon sağlanmıştır.

Karataş ve ark. (2013), *Bacopa monnieri*'nin adventif sürgün oluşumu için nodal eksplantlar ve yaprak eksplantları BAP-NAA içeren ortamlarda kültüre alınmışlardır. Her iki eksplantta en fazla eksplant başına sürgün sayısı 0,25 mg/l BAP+0,25 mg/l NAA içeren MS ortamlarında elde edilmiştir. Yaprak eksplanttan elde edilen sürgünler diğer eksplantlardan elde edilenlere

göre daha uzun olarak kaydedilmiştir. Elde edilen sürgünler başarıyla 4,0-10,0 pH içeren suda adaptasyon sağlarken, pH'ı 8,0 olarak ayarlanan su en uygun olarak bulunmuştur.

Çınar (2013), *H. polysperma* bitkisinin 3-5 cm'lik gövdeleri alınarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile sterilizasyon sağlandıktan sonra izole edilen sürgün ucu, birinci koltukaltı meristemi ve yaprak eksplantları BAP, TDZ, kinetin ve IBA'nın farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarında kültüre alınmıştır. Agar ile katılaştırılmış ortamlarda en fazla (31,00 adet) eksplant başına sürgün sayısı, sürgün ucu eksplantından kinetin içeren ortamda elde edilirken, en az eksplant başına sürgün sayısı (1,33 adet) yine kinetin içeren ortamda yaprak eksplantında saptanmıştır. Sıvı ortamlarda ise en fazla eksplant başına sürgün sayısı (25,33 adet) sürgün ucu eksplantında gözlenirken, en az eksplant başına sürgün sayısı yaprak eksplantından elde edilmiştir. Rejenere olan sürgünler 0,20-1,00 mg/l IBA içeren ortamlarda köklendirildikten sonra akvaryumlarda başarıyla adaptasyonu sağlanmıştır. Köklenmiş bitkiler farklı pH'larda su içeren cam kavanozlara alınmış, büyüme ve gelişme için en uygun pH'ın 7,0-9,0 olduğu saptanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Deneme Yeri

Proje kapsamında yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmaları Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakóltesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarında, gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2. Bitki Materyali

*B. monnieri* bitkileri Doç. Dr. Muhammed Aasim, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakóltesi, Biyoloji Bölümünden temin edilmiştir.



Şekil 3.1. *B. monnieri* bitkisinin bir görüntüsü

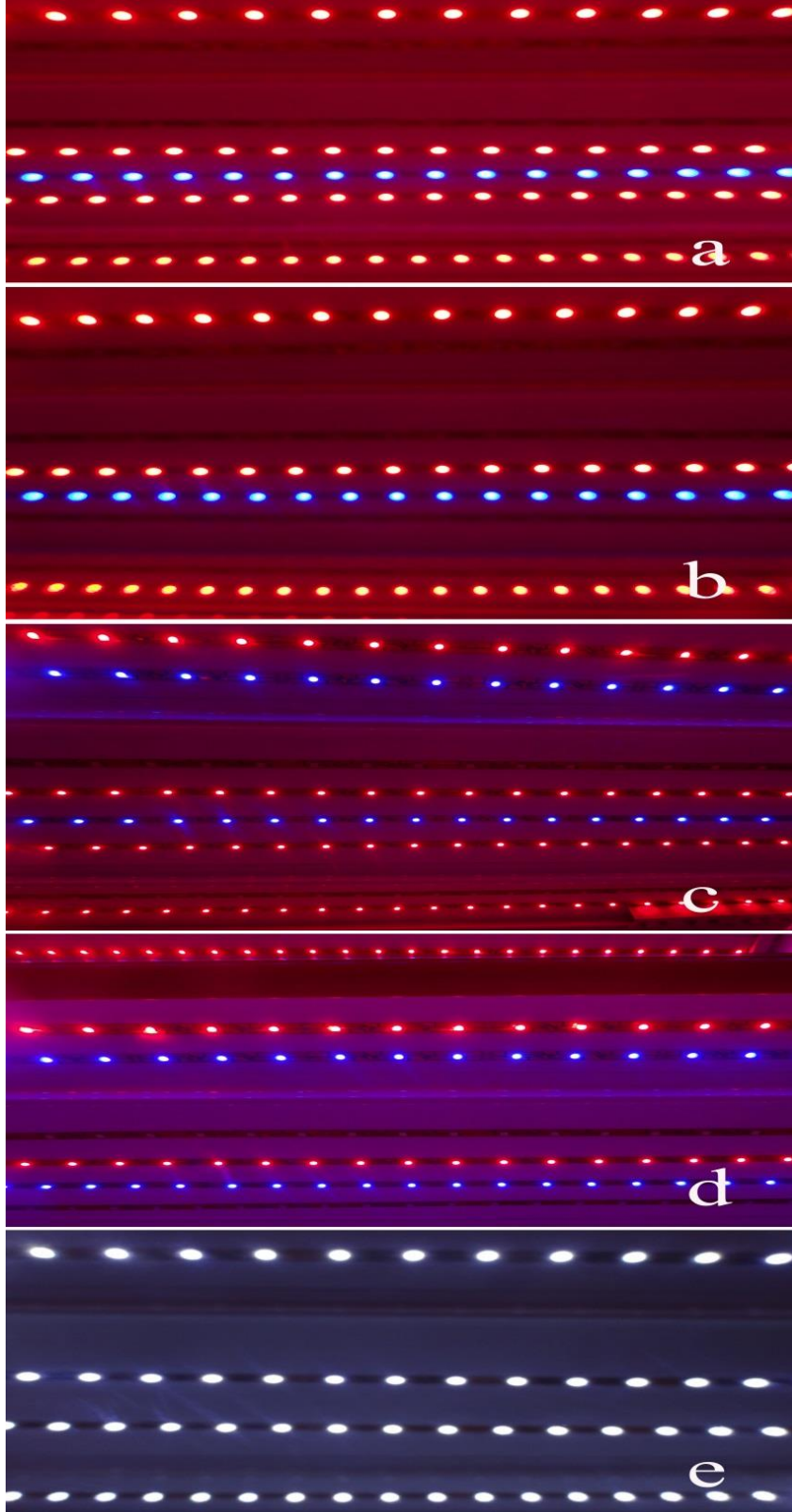
### 3.3. Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları

Tez kapsamında %3 sukroz içeren ve %0.65'lik agar (type A, Sigma) ile katılaştırılan temel besin ortamı olarak MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962; Çizelge 3.1) (MSO) kullanılmıştır. Ortam hazırlamak için distile saf su kullanılmış olup, gerektiğinde besin ortamına farklı konstrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri olarak 0.25-1.0 mg/l 6 Benzilaminopürin (BAP) ilave edilmiştir. Eksplantlar üzerinde endogenik bakteri kontaminasyonu önlemek amacıyla *in vitro* koşullarda agar ile katılaştırılmış ortamında 500 mg/l Duocid (Geniş spektrumlu antibiyotik) de ilave edilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan makro mikro elementler ve vitaminlerin konsantrasyonları

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

Besin ortamının pH'sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.8±0.1'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121°C'de 20 dk. tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler farklı LED ışıklar (kirmizi:mavi) kombinasyon veya beyaz LED (Şekil 3.1) ışık altında 16 saat ışık fotoperiyodunda 24±1°C sıcaklıkta tutulmuşlardır.



**Şekil 3.2.** *B. monnier* bitkisinin *in vitro* koşullarda sürgün rejenerasyon için kullanılan LED ışıkları (a) 4:1 (b) 3:1 (c) 2:1 (d) 1:1 ve (e) beyaz LED



### 3.4. Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Hazırlaması ve Muhafazası

Bitki büyüme düzenleyicileri, uygun çözücülerle çözüldükten sonra 1 mg/ml oranında stok solusyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solusyonları 4 °C veya -20 °C sıcaklıkta saklanmıştır (Çizelge 3.2). Büyüme düzenleyicilerinden BAP otoklavda steril edilmeden ve kinetin ise otoklavda ortamları steril edildikten sonra 40-45 °C de ilave edilmiştir (Çizelge 3.2.). Denmelerde kullanılan antibiyotik (Duocid) ise 100 mg/ml oranında stok solüsyonu olarak hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.2.** Kullanılan büyüme düzenleyici ve antibiyotik çözücülerini, stok konsantrasyonu ve saklama koşulları

Bitki büyüme düzenleyicileri	Çözücü	Stok konsantrasyonu (mg/ml)	Sterilizasyon şekli	Saklama koşulları (°C)
<b>Sitokininler</b>				
BAP	1N NaOH	1/1	Otoklav	4
<b>Oksin</b>				
IBA	1N NaOH	1/1	Otoklav	4
<b>Antibiyotik</b>				
Duocid	dH <sub>2</sub> O	100/1	Steril tıp şeklinde satılır-	- 20

### 3.5. *Bacopa monnieri* Bitkisinin Yüzeysel Sterilizasyonu

*Bacopa* bitkisinin yüzeysel sterilizasyonu için en yüksek başarımın sağlanacağı en düşük dezenfektan dozu belirlenmeye çalışılmıştır. Bitki, sterilizasyondan önce üzerindeki kalıntıları uzaklaştırmak için 15 dk. akan çeşme suyunun altında tutulmuştur. Yüzeysel sterilizasyonu amacıyla ticari çamaşır suyu (Ace) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır. Yüzeysel sterilizasyondan sonra eksplantlar steril saf su ile 3 kez 5'er dk. durulanmıştır. Steril edilen eksplantlar (uç ve koltukaltı meristemleri) yine steril petri kapları içerisinde %3 sukroz içeren ve %0.65 agar ile

katılaştırılan MS besin ortamında  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.

### 3.6. Eksplant İzolasyonu

Sterilizasyon sonucunda elde edilen bulaşıksız gövdelerden tam yaprak, alt ve yarım lamina üstü ile sürgün ucu eksplantlar (Şekil 3.2) izole edilerek kültüre alınmıştır. Bütün doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde aseptik koşullarda yapılmıştır. kaydedilmiştir.



Şekil 3.3. *B. monnieri* bitkisinden izole edilen eksplantları

### 3.7. Rejenere Olan *Bacopa* Sürgünlerinin Köklendirilmesi ve Adaptasyon

10-20 mm uzunluğundaki rejenere olan sürgünler *in vitro* koşullarda kesilerek “steril Magenta GA7 içinde 0.25, 0.50, 0.75 veya 1.0 mg/l IBA içeren MS ortamında 4 hafta boyunca köklendirmeye alınmıştır. Daha sonra köklenen sürgünler su (akvaryum) ortamına adapte edilmiştir. Suyun pH'sı 7 ve sıcaklığı  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de tutularak 16 saat ışık fotoperiyodunda gelişmeye bırakılmıştır. Kavanozun dibine 1-2 cm yüksekliğinde ince kum yerleştirilmiştir.

### **3.8. İstatistiksel Deęerlendirmeler**

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup her muamele, içerisinde 4 adet eksplantın bulunduğu 6 tekerrürlü olarak cam petrilerden (10 × 100 mm) oluşmuştur. Elde edilen veriler “SPSS 20 for Windows” programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuş, muamele ortamlarını karşılaştırmak amacıyla Duncan testi kullanılmıştır. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce arcsin değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran 1967).

## 4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR

### 4.1. *In vitro* Koşullarda *B. monnieri* Bitkisinin Çoğaltım Çalışması

#### 4.1.1. *B. monnieri* Bitkisinin *In vitro* Yüzey Sterilizasyon Çalışmaları

*B. monnieri* bitkisinin yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarımın sağlanacağı en düşük dezenfektan dozu belirlenmeye için çalışmalar yapılmıştır. 1-3 cm lik gövdeler çeşme suyu altında 5 dk yıkandıktan sonra Karataş ve ark. (2013) tarafından verilen protokolü kullanılarak %60 hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile yüzey sterilizasyon yapılmıştır. Daha sonra gövdeler 3 kez 5'er dk. steril saf su ile durulama işlemi uygulanmıştır. Yüzey sterilizasyondan sonra yaprak ve sürgün ucu eksplantlar *in vitro* koşullarda izole edilerek MSO ortamına aktarılmıştır. 2 hafta sonra bulaşksız yaprak, alt ve yarım lamina üstü ve sürgün ucu eksplantlar (Şekil 4.1) *in vitro* sürgün rejenerasyon çalışmaları için kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Yüzey sterilizasyonundan sonra elde edilen eksplantlar

#### 4.1.2. Farklı LED ışıkları ve BAP dozlarının *B. monnieri*'nin Lamina eksplantından sürgün rejenerasyonu

*B. monnieri* bitkisinin adventif sürgün oluşumu gerçekleştirilmek amacıyla lamina eksplantları farklı BAP (0.25, 0.50 ve 1.00 mg/l) ve 500 mg/l Duocid içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Daha sonra eksplantlar iklim odasında farklı LED (4:1, 3:1, 2:1, 1:1 kırmızı:mavi ve beyaz) ışıklar altında bırakılmıştır. İki hafta sonra eksplantlar üzerinde adventif sürgün oluşumu (Şekil 4.2a) görülmeye başlamıştır. Dört hafta sonra, tüm eksplantlar üzerinde belirgin şekilde sürgünler (Şekil 4.2b) kaydedilmiştir. Sekiz hafta sonra (Şekil 4.2c) eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu ile ilgili verileri varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.1). Sürgün rejenerasyon yüzdesi %100 olduğu için varyans analizine tabi tutulmamıştır.

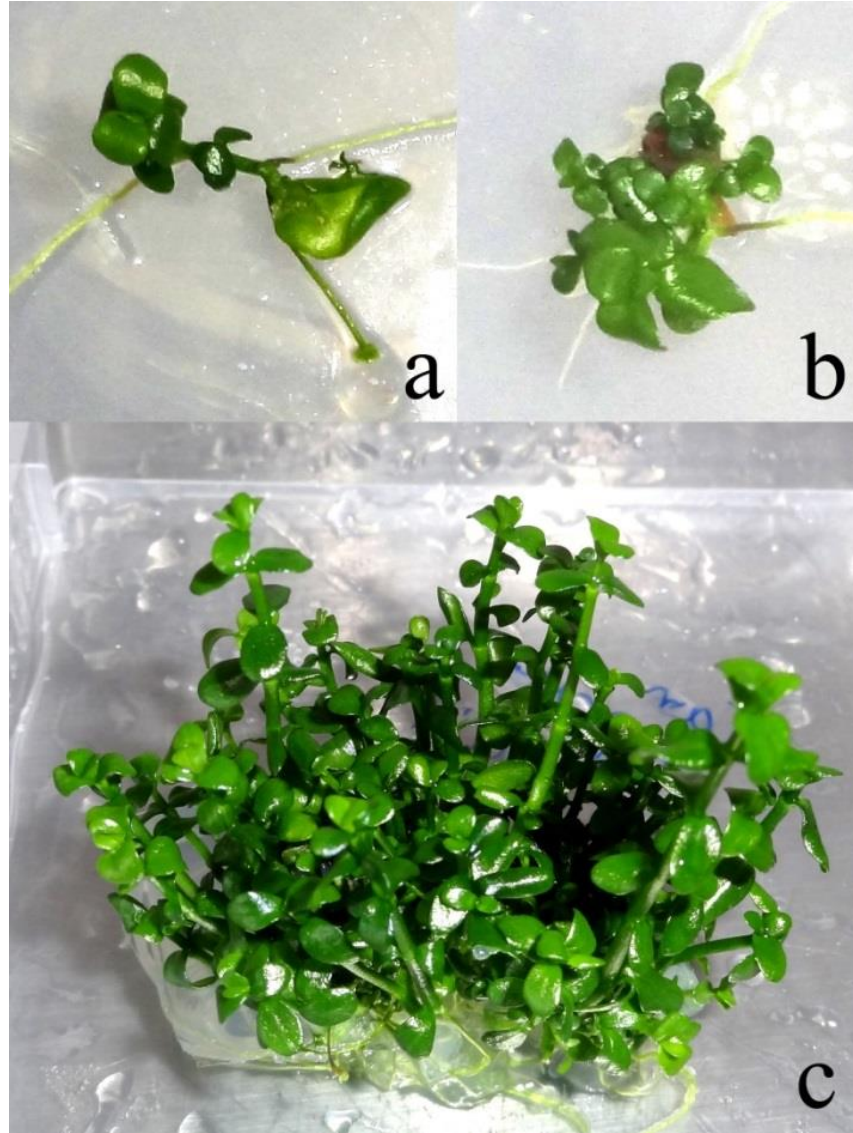
**Çizelge 4.1.** Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının *B. monnieri* bitkisinin lamina eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Eksplant Başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
Işık	4	91,70	5,61**	0,46	7,76**
Ortam	2	0,65	0,04ös	0,47	7,93**
Işık x Ortam	8	33,43	2,04**	0,15	2,58**
Hata	30	16,36	-	0,06	-
Genel toplam	44	-	-	-	-

\*\* $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu LED ışıklarının altında  $P < 0.01$  düzeyinde önemli farklılığı göstermiştir. BAP dozları bakımından sürgün sayısı arasında önemli farklılıkları bulunmazken, sürgün uzunluğu bakımından ( $p < 0,01$  düzeyinde) önemli farklılık görülmüştür. LED  $\times$  BAP etkileşimi hem sürgün sayısı bakımından hem de sürgün uzunluğu bakımında ( $p < 0,01$  düzeyinde) etkileşim göstermiştir. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.

Denemde kullanılan ışıkların etkileri (Çizelge 4.2) bakıldığında beyaz ışığı kırmızı:mavi kombinasyonundan daha iyi olduğunu tespit edilmiştir. Farklı kırmızı:mavi kombinasyon (4:1, 3:1, 2:1 ve 1:1) arasında istatistik olarak her hangi farklılığı kaydedilmemiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 13.58-21.56 adet arasında kaydedilirken en fazla 21.56 adet sürgün beyaz ışık altında elde edilmiştir. Denemede kullanılan BAP oranlarının sürgün sayısına etkileri önemsiz bulunurken, 16.13-16.55 arasında değişmiştir (Çizelge 4.2).



**Şekil 4.2.** Farklı LED ışıklarının ve BAP dozlarının lamina eksplantından sürgün rejenrasyon oluşumu (a) iki hafta (b) dört hafta ve (c) on hafta sonra gelişen sürgünlerin şematik görüntüsü

**Çizelge 4.2.** Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının *B. monnieri* bitkisinin lamina eksplantından eksplant başına sürgün sayısına etkisi

Işık	BAP			
	0,25 (mg/l)	0,50 (mg/l)	1,00 (mg/l)	Ortalama
4:1	12,67cd	17,08abcd	17,17abcd	<b>15,64b</b>
3:1	15,67bcd	16,83abcd	9,67d	<b>14,06b</b>
2:1	14,50bcd	16,00bcd	20,00abc	<b>16,83b</b>
1:1	13,83bcd	10,33d	16,58abcd	<b>13,58b</b>
Beyaz	24,00a	21,33ab	19,33abc	<b>21,56a</b>
Ortalama	16,13	16,32	16,55	

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında farklılığı Duncan testine göre  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.

LED × BAP interaksiyonu bakımında sürgün sayısı 9.67-24.00 arasında kaydedilmiştir. En fazla eksplant başına sürgün 0.25 mg/l BAP ve beyaz ışık kullanılarak elde edilmiştir. En düşük 9.67 (Çizelge 4.2) eksplant başına sürgün sayısı ise 3:1 LED ışık ve 1.00 mg/l BAP kombinasyonu kullanılarak kaydedilmiştir. Genel olarak, denemede en fazla eksplant başına sürgün beyaz LED×BAP interaksiyonu ile elde edilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının *B. monnieri* bitkisinin lamina eksplantından sürgün uzunluğuna etkisi

Işık	BAP			
	0,25 (mg/l)	0,50 (mg/l)	1,00 (mg/l)	Ortalama
4:1	1,92a	1,43bcd	1,19de	<b>1,51b</b>
3:1	1,87abc	1,43bcd	0,94e	<b>1,42b</b>
2:1	1,50abcd	1,47abcd	1,53abcd	<b>1,50b</b>
1:1	1,90ab	1,90ab	1,83abc	<b>1,88a</b>
Beyaz	1,27de	1,33de	1,18de	<b>1,26b</b>
Ortalama	<b>1,69a</b>	<b>1,51ab</b>	<b>1,34b</b>	

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.3 bakıldığında farklı kırmızı:mavi LED kombinasyonlarından beyaz LED ışıklara göre daha uzun sürgünler kaydedilmiştir. En uzun sürgün (1.88 cm) ise 1:1 kombinasyonundan elde edilirken, en kısa sürgün (1.26 cm) beyaz ışıkta kaydedilmiştir. BAP dozları incelendiğinde sürgün uzunluğu 1.34-1.69 cm arasında kaydedilmiştir. En uzun sürgün 0.25 mg/l BAP içeren ortamda kaydedilirken en kısa sürgün 1.00 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmiştir (Çizelge 4.3). Ortamda BAP oranının fazla olmasının sürgün uzunluğunun azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir.

*LED*×*BAP* interaksiyonu bakımında sürgün uzunluğu 0.94-1.92 cm arasında değişmiştir. En uzun (1.92) sürgün 0.25 mg/l BAP ve 4:1 kırmızı:mavi LED ışıklar altında saptanmıştır. En kısa (0.94 cm) sürgün ise 3:1 LED ışık ve 1.00 mg/l BAP kombinasyonunda (Çizelge 4.3) gözlenmiştir. Genel olarak, beyaz LED×BAP dan interaksiyonu daha kısa sürgün elde edilmiştir. Tüm BAP dozlarında en uzun sürgünler 1:1 kırmızı:mavi kombinasyonu ile elde edilmiştir.

Elde edilen sürgünler ise IBA içeren MS ortamda köklendirildikten sonra adaptasyonuna alınmıştır.

#### **4.1.3. Farklı LED ışıkları ve BAP dozlarının *B. monnieri*'nin Lamina eksplantından sürgün rejenerasyonu**

*B. monnieri* bitkisinin yapraklarından kesilmiş yarım lamina tabanı eksplantları farklı BAP konsantrasyonu (0.25, 0.50 ve 1.00 mg/l) ve 500 mg/l Duocid içeren MS besin ortamında kültüre alınıp, iklim odasında farklı LED (4:1, 3:1, 2:1, 1:1 kırmızı:mavi ve beyaz) ışıklar altında tutulmuştur. Dört hafta sonra, tüm eksplantlarda belirgin şekilde sürgün uçları ile sürgün oluşumu (Şekil 4.3a) gözlenmiştir. Sekiz hafta sonra (Şekil 4.3b), eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri alınıp, varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.4). Sürgün rejenerasyon yüzdesi %100 olduğu için varyans analizine tabi tutulmamıştır.

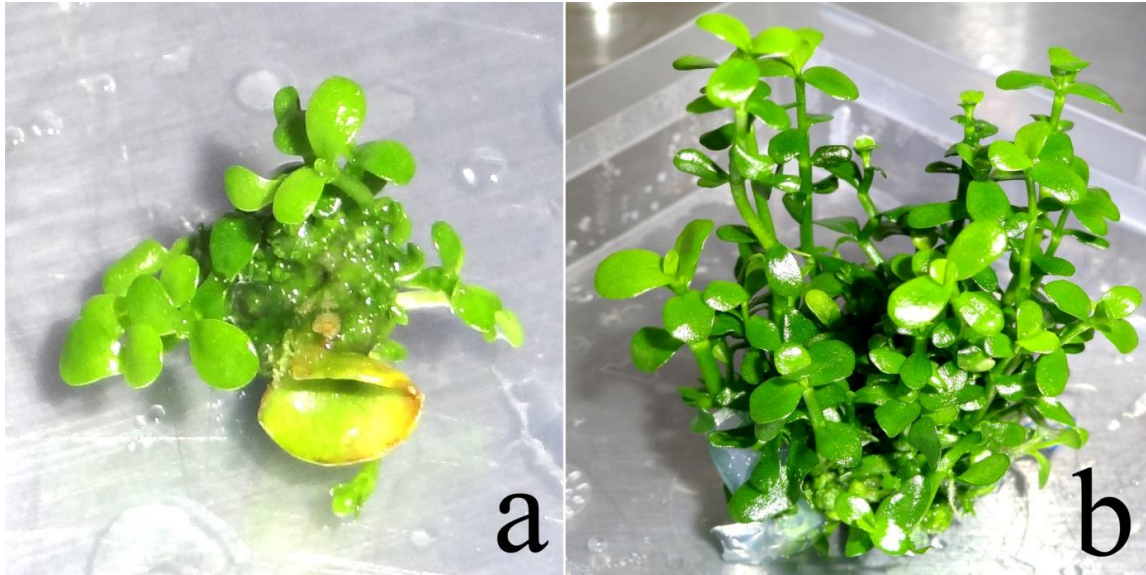


**Çizelge 4.4.** Farklı LED ışıkların ve BAP dozlarının *B. monnieri* bitkisinin yarım lamina tabanı eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
Işık	4	56,40	4,65**	1,01	16,06**
Ortam	2	27,20	2,24*	0,39	6,17**
Işık x Ortam	8	131,59	10,84**	0,30	3,63**
Hata	30	12,14	-	0,06	-
Genel toplam	44	-	-	-	-

\*\* $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından LED ışıkları, BAP dozları ve  $LED \times BAP$  etkileşimini  $p < 0,01$  düzeyinde farklılık göstermiştir. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.5 ve 4.6'te verilmiştir.



**Şekil 4.3.** Farklı LED ışıklarının ve BAP dozlarının yarım lamina tabanı eksplantından sürgün rejenerasyon oluşumu (a) dört hafta ve (b) on hafta sonra sürgün rejenerasyon oluşumu

**Çizelge 4.5.** Farklı LED ışıkların ve BAP dozlarının *B. monnieri* bitkisinin yarım lamina tabanı eksplantından eksplant başına sürgün sayısına etkisi

Işık	BAP			Ortalama
	0,25 (mg/l)	0,50 (mg/l)	1,00 (mg/l)	
<b>4:1</b>	12,92de	25,92a	13,42cde	<b>17,42a</b>
<b>3:1</b>	22,67ab	23,00ab	14,93cde	<b>20,20a</b>
<b>2:1</b>	16,50bcde	18,33bcd	17,83bcd	<b>17,56a</b>
<b>1:1</b>	6,33f	15,17cde	19,83abc	<b>13,78b</b>
<b>Beyaz</b>	22,33ab	10,67ef	25,58a	<b>19,53a</b>
<b>Ortalama</b>	<b>16,15b</b>	<b>18,62a</b>	<b>18,32a</b>	

\*\* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.5 incelendiğinde farklı LED ışıkların etkileri bakıldığında 4:1, 3:1 ve 2:1 kırmızı:mavi kombinasyon ile beyaz ışık arasında istatistik olarak ( $p<0,01$ ) aynı bulunurken, 17.56-20.20 arasında kaydedilmiştir. Öte yandan, en düşük 13,78 adet (Çizelge 4.5) eksplant başına sürgün sayısı ise 1:1 kırmızı:mavi kombinasyonundan elde edilmiştir.

Denemede kullanılan BAP oranlarının sürgün sayısına etkileri incelendiğinde önemli ( $p<0,01$ ) bulunurken, 16,15-18,62 arasında kaydedilmiştir. En düşük sürgün sayısı ise 0.25 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilirken, 0.50 ve 1.0 mg/l BAP içeren ortamdan istatistik olarak ( $p<0,01$ ) fark bulunmazken sırasıyla 18,62 ve 18,32 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.5).

*LED*×*BAP* etkileşimi bakımında sürgün sayısı 6,33-25,92 arasında görülmüştür. kaydedilirken, en fazla 25,92 adet eksplant başına sürgün 0,50 mg/l BAP ve 4:1 kırmızı:mavi kombinasyonundan elde edilmiştir. Buna karşı en düşük 6,33 adet eksplant başına sürgün ise 1:1 kırmızı:mavi LED ışık ve 0,25 mg/l BAP kombinasyonu kullanılarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.6.** Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının *B. monnieri* bitkisinin *yarım lamina tabanı* eksplantından sürgün uzunluğuna etkisi

Işık	BAP			Ortalama
	0,25 (mg/l)	0,50 (mg/l)	1,00 (mg/l)	
<b>4:1</b>	1,37e	1,43de	1,34e	<b>1,38c</b>
<b>3:1</b>	1,38e	1,45de	0,86f	<b>1,23c</b>
<b>2:1</b>	2,05ab	1,61bcde	1,40de	<b>1,69b</b>
<b>1:1</b>	2,00abc	2,11a	1,87abcd	<b>1,99a</b>
<b>Beyaz</b>	1,58cde	0,70f	1,33e	<b>1,21c</b>
<b>Ortalama</b>	<b>1,68a</b>	<b>1,46b</b>	<b>1,36b</b>	

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.6 bakıldığında farklı kırmızı:mavi LED kombinasyonları ve beyaz LED ışıkların sürgün uzunluğuna önemli şekilde etkileşim göstermiştir. Daha yoğun mavi ışıklarında daha uzun sürgün kaydedilmiştir. En uzun 1.99 cm ve 1.69 cm sürgünler ise sırasıyla 1:1 ve 2:1 kırmızı:mavi LED kombinasyonlarında elde edilmiştir. 4:1, 3:1 ve beyaz ışıklarda ise sırasıyla 1,38, 1,23 ve 1,21 cm uzunluğu kaydedilmiştir (Çizelge 4.6).

BAP dozları incelendiğinde sürgün uzunluğu 1,36-1.68 cm arasında kaydedilirken, en uzun (1,68 cm) sürgün 0.25 mg/l BAP içeren ortamda kaydedilmiştir. Ortamda BAP oranının fazla olmasının sürgün uzunluğunun azalmasına neden olduğu tespit edilirken, en kısa sürgün (1,36 cm) 1.0 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmiştir (Çizelge 4.6).

*LED*×*BAP* etkileşimi bakıldığında sürgün uzunluğu 0,70-2,11 cm arasında kaydedilmiştir. En uzun 2,11 cm sürgün ise 0,50 mg/l BAP ve 1:1 kırmızı:mavi kombinasyonundan elde edilmiştir. Buna karşı en kısa 0,70 cm sürgün ise 0,50 mg/l BAP ve beyaz LED kombinasyonu ile ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.6). Genel olarak 1:1 kırmızı:mavi kombinasyonu ile tüm BAP ortamlarda en uzun sürgün elde edilmiştir.

Elde edilen sürgünler ise IBA içeren MS ortamda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

#### 4.1.4. Farklı LED ışıkları ve BAP dozlarının *B. monnieri*'nin yarım lamina üstü eksplantından sürgün rejenerasyonu

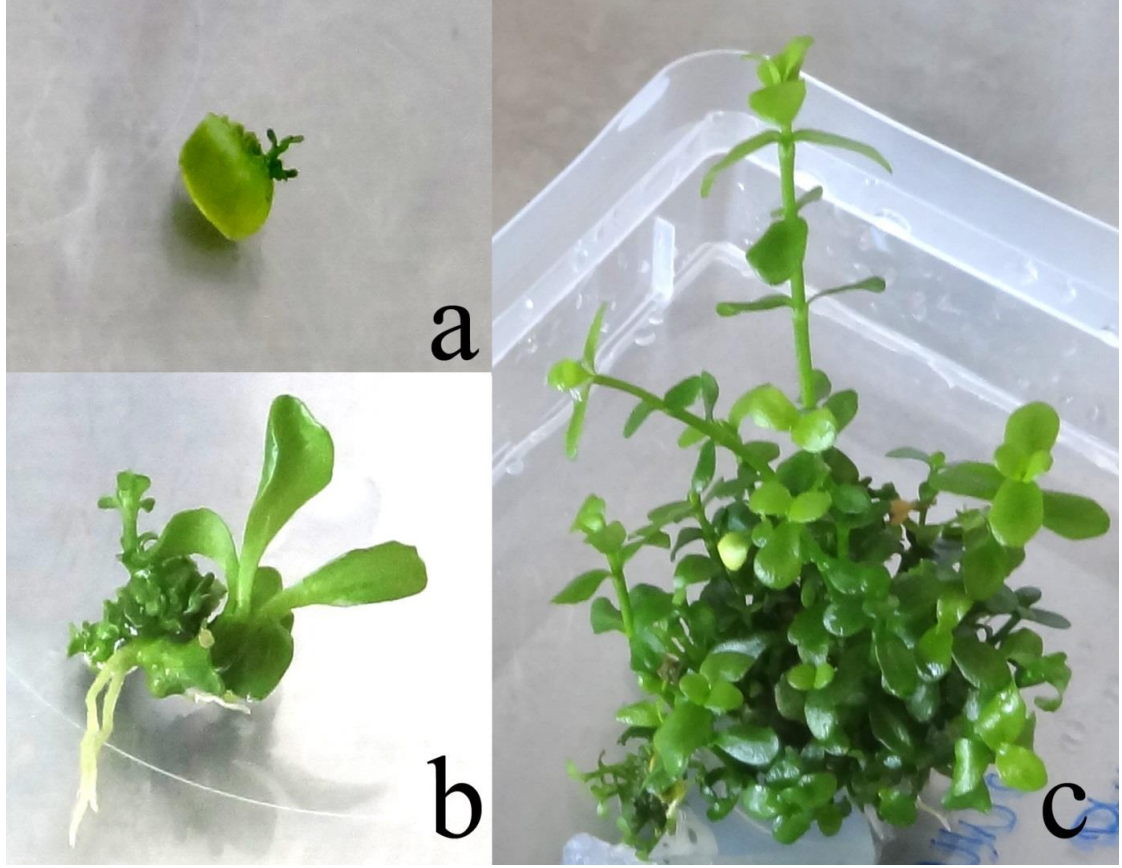
*B. monnieri* bitkisinin yarım lamina üstü eksplantından adventif sürgün oluşumu elde etmek amacıyla yapılan çalışmada eksplantlar farklı BAP konsantrasyonu (0.25, 0.50 ve 1.00 mg/l) ve 500 mg/l Duocid içeren MS besin ortamında kültüre aldıktan sonra iklim odasında farklı LED (4:1, 3:1, 2:1, 1:1 kırmızı:mavi ve beyaz) ışıklar altında bırakılmıştır. Eksplantların kenarlardan iki hafta içinde sürgün oluşumu (Şekil 4.4a) başlarken, dört hafta sonucunda belirgin şekilde tüm eksplantlarda (%100) sürgün uçları ile sürgün oluşumu (Şekil 4.4b) görülmüştür. Sekiz hafta sonra (Şekil 4.4c), eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.7). Sürgün rejenerasyon yüzdesi %100 olduğu için varyans analizi yapılmamıştır.

**Çizelge 4.7.** Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının *B. monnieri* bitkisinin yarım lamina üstü eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Eksplant Başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
Işık	4	236,04	26,53**	0,82	5,89**
Ortam	2	9,40	1,06 <sup>ös</sup>	1,68	12,16**
Işık x Ortam	8	81,33	9,14**	0,28	2,02**
Hata	30	8,90	-	0,14	-
Genel toplam	44	-	-	-	-

\*\* $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.7'de gösterildiği gibi eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu LED ışıklarının  $p < 0,01$  düzeyinde önemli kaydedilmiştir. BAP dozları bakımından ise sürgün sayısı önemli bulunmazken, sürgün uzunluğu  $p < 0,01$  düzeyinde etkileşim kaydedilmiştir. LED×BAP interaksyonu hem sürgün sayısı hem de sürgün uzunluğuna  $p < 0,01$  düzeyinde önemli etkileşim yapmıştır. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.



**Şekil 4.4.** Farklı LED ışıklarının ve BAP dozlarının yarım lamina üstü eksplantından sürgün rejenrasyonu(a) iki hafta (b) dört hafta ve (c) on hafta sonra sürgün rejenerasyon oluşumuna ait deneme sonuçların şematik görüntüsü

**Çizelge 4.8.** Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının *B. monnieri* bitkisinin yarım lamina üstü eksplantından eksplant başına sürgün sayısına etkisi

Işık	BAP			Ortalama
	0,25 (mg/l)	0,50 (mg/l)	1,00 (mg/l)	
<b>4:1</b>	15,83de	17,83cd	26,17ab	<b>19,94b</b>
<b>3:1</b>	19,25cd	18,00cd	15,08de	<b>17,44bc</b>
<b>2:1</b>	12,25ef	19,33cd	15,67de	<b>15,75c</b>
<b>1:1</b>	21,58bc	8,50f	7,33f	<b>12,47d</b>
<b>Beyaz</b>	27,33a	26,33ab	24,67ab	<b>26,11a</b>
<b>Ortalama</b>	19,25	18,00	17,78	

\*\* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark  $p < 0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi farklı LED ışıkların etkileri istatistik olarak ( $p<0,01$ ) önemli fark gösterirken 12,47-26,11 arasında kaydedilmiştir. En fazla 26,11 adet sürgün beyaz LED altında elde edilirken, en düşük (12,47 adet) ise 1:1 kırmızı:mavi kombinasyonundan elde edilmiştir (Çizelge 4.8). Denemde mavi ışık yoğunluğu artışı ile sürgün sayısında azalma kaydedilmiştir.

Denemede kullanılan BAP dozlarının sürgün sayısına etkileri önemsiz bulunurken, 0,25, 0,50 ve 1,00 mg/l BAP içeren ortamdan sırasıyla 19,25, 18,0 ve 17,78 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.8).

LED×BAP interaksyonu istatistik olarak ( $p<0,01$ ) önemli fark gösterirken 7,33 ile 27,33 arasında eksplant başına sürgün elde edilmiştir. Eksplant başına en fazla 27,33 adet sürgün 0,25 mg/l BAP ve beyaz LED kombinasyonu ile elde edilmiştir. Buna karşı, 1,0 mg/l BAP ve 1:1 kırmızı:mavi LED ışık kombinasyonundan en düşük 7,33 adet sürgün elde edilmiştir. Genel olarak tüm BAP ortamlarda en yüksek sürgün beyaz LED kullanılarak elde edilmiştir.

**Çizelge 4.9.** Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının *B. monnieri* bitkisinin yarım lamina üstü eksplantından sürgün uzunluğuna etkisi

Işık	BAP			Ortalama
	0,25 (mg/l)	0,50 (mg/l)	1,00 (mg/l)	
<b>4:1</b>	1,68bcde	1,78bcde	1,82bcd	<b>1,76b</b>
<b>3:1</b>	1,66bcde	1,28cdef	1,18def	<b>1,37c</b>
<b>2:1</b>	2,03b	1,67bcde	0,93f	<b>1,54bc</b>
<b>1:1</b>	2,83a	1,73bcde	1,83bcd	<b>2,13a</b>
<b>Beyaz</b>	1,92bc	1,43bcde	1,07ef	<b>1,47bc</b>
<b>Ortalama</b>	<b>2,02a</b>	<b>1,58b</b>	<b>1,37b</b>	

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.9’da görüldüğü gibi farklı LED ışıkların sürgün uzunluğunda önemli etkileşim ( $p<0,01$ ) bulunmuştur. En uzun sürgünler (2,13 cm) 1:1 kırmızı:mavi LED kombinasyonunda kaydedilmiştir (Çizelge 4.9).

BAP dozların etkileri incelendiğinde sürgün uzunluğuna etkileşim ( $p<0,01$ ) önemli bulunurken, 1,37-2,02 cm arasında kaydedilmiştir. En uzun sürgün (2,02 cm) 0.25 mg/l BAP içeren ortamda elde edilirken, en kısa sürgün (1,37 cm) 1,0 mg/l BAP içeren ortamda kaydedilmiştir (Çizelge 4.9). Ortamda BAP oranının fazla olmasının sürgün uzunluğunun azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9’da görüldüğü gibi  $LED \times BAP$  interaksiyonu önemli ( $p<0,01$ ) bulunurken, 0,93-2,83 cm uzun sürgün kaydedilmiştir. Denemde mavi ışık yoğunluğu artış ile sürgün uzunluğunda da artış gözlenmiştir. En uzun sürgünler (2,83 cm) 0,25 mg/l BAP ve 1:1 kırmızı:mavi kombinasyonundan elde edilirken, en kısa sürgünler 1,0 mg/l BAP ve 2:1 kırmızı:mavi kombinasyonunda tespit edilmiştir.

Elde edilen sürgünler ise IBA içeren MS ortamda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

#### **4.1.5. Farklı LED ışıkları ve BAP dozlarının *B. monnieri*’nin sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu**

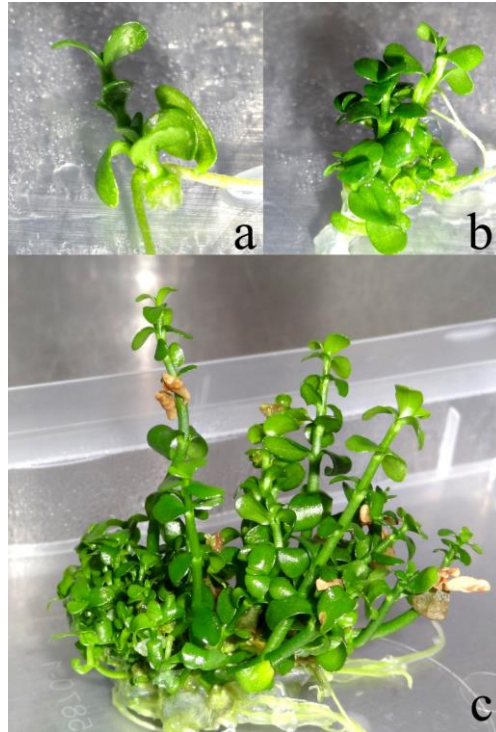
*B. monnieri* bitkisinin yan sürüğü oluşumu elde etmek amacıyla yapılan çalışmada sürgün uçları eksplantlar 0.25, 0.50 ve 1.00 mg/l BAP ve 500 mg/l Duocid içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Daha sonra eksplantlar iklim odasında farklı LED (4:1, 3:1, 2:1, 1:1 kırmızı:mavi ve beyaz) ışıklar altında sekiz hafta boyunca tutulmuştur. Eksplantların ilk olarak tek sürüğü oluşumu (Şekil 4.5a) gözlenirken, dört hafta içinde çoklu sürgün oluşumu (Şekil 4.5b) görülmüştür. Sekiz hafta sonucunda tüm eksplantlarda (%100) sürgün oluşumu (Şekil 4.5c) gözlendiği için varyans analizi yapılmamıştır. Eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait verileri ise varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.10).

**Çizelge 4.10.** Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının *B. monnieri* bitkisinin sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Eksplant Başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
Işık	4	32,75	14,81**	0,80	18,51**
Ortam	2	186,79	84,48**	0,83	19,21**
Işık x Ortam	8	20,59	9,31**	0,67	15,51**
Hata	30	2,21	-	0,04	-
Genel toplam	44	-	-	-	-

\*\* $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından LED ışıkları, BAP dozları ve LED×BAP etkileşimi  $p < 0,01$  düzeyinde etkileşim önemli bulunmuştur. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.11 ve 4.12'de verilmiştir.



**Şekil 4.5.** Farklı LED ışıklarının ve BAP dozlarının sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyon oluşumu (a) iki hafta (b) dört hafta ve (c) on hafta sonra sürgün rejenerasyonunun şematik görüntüleri



**Çizelge 4.11.** Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının *B. monnieri* bitkisinin sürgün ucu eksplantından eksplant başına sürgün sayısına etkisi

Işık	BAP			Ortalama
	0,25 (mg/l)	0,50 (mg/l)	1,00 (mg/l)	
4:1	4,08fg	8,92bcd	14,92a	9,31a
3:1	3,33g	6,08ef	10,25b	6,56b
2:1	6,92cde	9,17bc	15,17a	10,42a
1:1	4,17fg	14,17a	12,92a	10,42a
Beyaz	6,33def	7,33cde	6,67cdef	6,78b
Ortalama	4,97c	9,13b	11,98a	

\*\* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.11’de görüldüğü gibi farklı LED ışıkların etkileri istatistik olarak ( $p<0,01$ ) önemli bulunurken, 6,56-10,42 adet arasında kaydedilmiştir. 4:1, 2:1 ve 1:1 kırmızı:mavi kombinasyon arasında istatistikaik olarak fark bulunmazken, 3:1 kırmızı:mavi kombinasyon ve beyaz LED istatistikaik olarak aynı sonuç verilmiştir.

BAP dozlarının sürgün sayısına etkileri önemli ( $p<0,01$ ) bulunurken, 4,97 ile 11,98 arasında kaydedilmiştir. En düşük 4,97 sürgün ise 0,25 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmiştir (Çizelge 4.11). BAP dozların artışı ile sürgün sayısına da artış gözlenmiştir.

*LED*×*BAP* interaksyonu sonucunda sürgün sayısı 3,33-15,17 arasında kaydedilmiştir. En fazla 15,17 adet eksplant başına sürgün 1,0 mg/l BAP ve 2:1 kırmızı:mavi kombinasyonndan elde edilirken, en düşük 3,33 adet eksplant başına sürgün ise 0,25 mg/l BAP ve 3:1 kırmızı:mavi LED ışık kombinasyonu kullanılarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.12 incelendiğinde farklı kırmızı:mavi LED ve beyaz LED ışıkların sürgün uzunluğuna etkileşim önemli olarak göstermiştir. 1:1 kırmızı:mavi ışıklarında daha uzun sürgün kydedilirken 1,71 cm olarak kaydedilmiştir. En kısa (0,96 cm) sürgünler ise 3:1 kırmızı:mavi ışıklarında elde edilmiştir.

**Çizelge 4.12.** Farklı LED Işıkların ve BAP dozlarının *B. monnieri* bitkisinin sürgün ucu eksplantından sürgün uzunluğuna etkisi

Işık	BAP			Ortalama
	0,25 (mg/l)	0,50 (mg/l)	1,00 (mg/l)	
<b>4:1</b>	0,63g	1,05def	1,45bc	<b>1,04bc</b>
<b>3:1</b>	0,83efg	0,92defg	1,12cdef	<b>0,96c</b>
<b>2:1</b>	1,17cde	1,20cde	1,27cd	<b>1,21b</b>
<b>1:1</b>	0,73fg	2,68a	1,70b	<b>1,71a</b>
<b>Beyaz</b>	1,27cd	0,92defg	1,03def	<b>1,07bc</b>
<b>Ortalama</b>	<b>0,93b</b>	<b>1,35a</b>	<b>1,31a</b>	

BAP dozları incelendiğinde sürgün uzunluğu 0,93-1,35 cm arasında kaydedilmiştir. En kısa sürgün (0,93 cm) 0,25 0.25 mg/l BAP içeren ortamda elde edilmiştir. Buna karşı 0,50 ave 1,0 mg/l BAP içeren ortamda sırasıyla 1,35 cm ve 1,31 cm olarak bulunmuştur (Çizelge 4.12).

*LED*×*BAP* interaksiyonu incelendiğinde sürgün uzunluğu 0,63-2,68 cm arasında kaydedilmiştir. En uzun 2,68 cm'lik sürgün 0,50 mg/l BAP ve 1:1 kırmızı:mavi kombinasyonndan elde edilmiştir. Buna karşı en kısa 0,63 cm sürügn ise 0,25 mg/l BAP ve 4:1 kırmızı:mavi kombinasyonndan LED kombinasyonu ile ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.12). Genel olarak 1:1 kırmızı:mavi kombinasyonu ile 0,50-1,0 mg/l BAP ortamlarda en uzun sürgün elde edilmiştir.

Elde edilen sürgünler ise IBA içeren MS ortamda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

## 4.2. *In vitro* köklendirmesi ve Adaptasyonu

### 4.2.1. *B. monnieri* bitkisinin *in vitro* köklendirilmesi

*In vitro* koşullarda farklı yaprak (lamina, yarım lamina tabanı ve yarım lamina üstü) eksplantlardan elde edilen adventif sürgün rejenerasyonu ile sürgün ucu ile yapılan yan sürgün oluşumu sonucunda elde edilen *B. monnieri* sürgünleri köklendirme çalışması için yaklaşık  $\leq 1,0$  cm'lik sürgünler izole edilerek çeşitli oranlarda IBA (0,25, 0,50, 1 ve 2 mg/l) içeren MS ortamlara aktarılmıştır. Dört hafta sonra, tüm ortamlardaki %100 köklenme gözlemlendiği için istatistik analizine tabi tutulmamıştır.



Şekil 4.6. *In vitro* köklendirilmiş *B. monnieri* bitkisi

#### **4.2.2. *In vitro* Koşullarda Köklendirilen Sürgünlerin Dış Şartlara Adaptasyonu**

İn vitro koşullarda köklendirilmiş bitkilerin akvaryumda adaptasyon için ilk olarak çeşme suyu ile köklere zarar vermeden köklerindeki agar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, köklenmiş bitkiler dış koşullara adaptasyon için çeşme suyu içeren akvaryuma aktarılmıştır. Bir hafta içinde bitkilerin başarıyla akvaryumda adaptasyon sağlanarak bitki boy ve yapraklarda belirgin şekilde uzama ve gelişmeler görülmüştür. Daha sonra, bitkiler akvaryumda iklim oda koşullarında büyüme ve gelişmede herhangi olumsuz etki göstermeden devam etmişlerdir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

*B. monnieri*'nin doku kültürüyle çoğaltımı kapsamında yapılan bu çalışmada, farklı eksplantları (lamina, yarım lamina tabanı ve yarım lamina üstü) değişik oranda BAP içeren MS ortamına aktarılıp, farklı kombinasyonunda kırmızı:mavi (4:1, 3:1, 2:1, 1:1) veya beyaz LED ışıklarında hızlı çoğaltım kabiliyetlerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

*In vitro* koşullarda *yan* veya adeventif sürgün oluşumu için bakteri, mantar veya benzeri organizmalardan eksplantların yüzeysel olarak temizlenebilmesi gereklidir. *Bacopa* bitkisinin yüzey sterilizasyon için Karatas ve ark. (2013a) ve Karataş ve Aasim (2014) tarafından kullanılan yöntemler ile bulaşksız gövdeler elde edilmiştir. Sucul bitkilerin yüzey sterilizasyon için farklı oranda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanımı *H. polysperma* (Karatas ve ark. 2013a), *C. demersum* (Karatas ve ark. 2014a) ve *R. rotundifolia* (Karatas ve ark. 2014b) gibi diğer sucul bitkilerde de başarıyla kullanılmıştır. Daha sonra, gövdelerden elde edilen yaprak eksplantlar alınıp tam veya kesilerek ile sürgün uçları büyüme düzenleyici içeren MS ortamına kültüre alınmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre; farklı BAP oranları kullanılarak tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Karatas ve ark. (2013b), *B. monnieri* bitkisinin farklı boğum arası ve yaprak eksplantı ile yaptığı çoğaltım çalışmasında BAP-NAA içeren ortamda %100 sürgün rejenerasyon rapor edilmiştir. Benzer şekilde Karataş ve Aasim (2014) BAP ve TDZ içeren ortamında yaprak eksplantından %100 sürgün rejenerasyon rapor edilmiştir. Buna karşı, Fakat, Vijaykumar vd. (2010) *B. monnieri* ile yaptığı çoğaltım çalışmasında, BA içeren ortamda %30-95 oranında, TDZ içeren ortamda ise %50-95 oranında sürgün rejenerasyonu elde etmiştir. *R. rotundifolia* bitkisinin yaprak eksplantları 0,25, 0,50, 1,00, 1,50 ve 2,00 mg/l BAP içeren ve agar ile katılaştırılmış MS besin ortamında kültüre alındığında %26,67- 53,33 oranda sürgün oluşum kaydedilmiştir (Çiftçioğlu 2013).

LED ışıkları kallus oluşumu (Budiarto 2010; Chung ve ark. 2010) ile sürgün rejenerasyonu için bir çok bitkiler de başarıyla kullanılmıştır (Baque ve ark. 2011; Wu and DuToit 2012). Deneme sonuçlara göre farklı LED ışıkları sürgün rejenerasyon için etkili olduğunu tespit edilmiştir. Farklı yaprak eksplantlarından en fazla eksplant başına sürgün sayısı beyaz LED ışıklarından elde edilirken, en düşük ise 1:1 kırmızı:mavi LED kombinasyonunda tespit

edilmiştir. Sürgün ucu eksplantından en fazla sürgün 1:1 kırmızı:mavi LED ışıklarından elde edilirken en düşük ise beyaz LED altında kaydedilmiştir. Huan ve Tanaka (2004) 75%+25% (kırmızı: mavi) LED ışıkları daha iyi olarak tespit etmiştir. Benzer şekilde *Lilium* bitkisinde eksplant başına en fazla soğancık sayısı kırmızı: mavi LED ışıklarından elde edilmiştir (Lian et al. 2002). *Calanthe* hibrid bitkiciklerin sürgün rejenerasyonu için Kırmızı: mavi LED ışıkları daha uygun olarak rapor edilmiştir (Baque et al. 2011). Yalçın (2013) Pamuğun GSN-12 ve STN-468 çeşitlerinin kotiledon nod eksplantları 5, 10 ve 20 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası 1×MS, ½×MS, ¼×MS ve 0,05 mg/l Kinetin içeren 1×MS ortamlarında kültüre alındıktan sonra üç farklı ışık kombinasyonunda (4 kırmızı:1 mavi, 3 kırmızı:1 mavi, 2 kırmızı:1 mavi) bırakılmıştır. Işıkları kıyaslandığında tüm MS ortamları ve ön muamele sonucunda her iki çeşit için 4:1 kırmızı:mavi LED ışıkları diğer kombinasyona göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

Sürgün uzunluğu bakımında tüm eksplantardan en uzun sürgünler 1:1 kırmızı:mavi LED ışıklarından tespit edilmiştir. Chang ve ark. (2003), *Zantedeschia albomaculata* bitkisinde kırmızı:mavi LED ışıklarının sürgün uzunluğuna artış göstermiştir. Benzer sonuçlar ise pamuk bitkisinde de rapor edilmiştir (Li ve ark. 2010). Sonuçlara göre sürgün uzunluğu için mavi ışık çok önemli olduğunu tespit edilmiştir. Mavi ışığın yoğunluğu azalmasıyla sürgün uzuzluğunda da azalma kaydedilmiştir.

BAP oranların sürgün rejenerasyonu kıyaslandığında tam ve üst yaprak eksplantlarında herhangi etki bulunmazken, *yarım lamina tabanı* ve sürgün ucu eksplantlarında en fazla sürgün sayısı 1.0 mg/l BAP içeren ortamında kaydedilmiştir. Karataş ve Aasim (2014), *Bacopa* bitkisinin yaprak eksplantlarından en fazla eksplant başına sürgün sayısı 2 mg/l BAP içeren ortamda elde etmişlerdir. *Bacopa* bitkisinden en fazla sürgün sayısı elde etmek için düşük oranda BAP gerekli olduğunu rapor edilmiştir (Sharma ve ark. 2010). Benzer şekilde Panigrahi vd (2006), *Hygrophila auriculata* bitkisinin yaprak eksplantlarından 2 mg/l BAP ve 0,2 mg/l NAA içeren ortamda görülmüştür. Kane vd (1999), *Cryptocoryne wendtii*'nin sürgün ucu eksplantlarını kültüre almışlar ve en fazla sürgün oluşumu, 20 µM BAP bulunan ortamdan elde etmişlerdir. Stanly vd. (2011) *C. wendtii* de Wit ve *C. beckettii* Thwaites ex Trimen türlerinin sürgün uçlarını kullanarak her iki türde de çoklu sürgün oluşumu 0,5 mg/L BA ve 0,2 mg/L IBA içeren sıvı MS besi ortamında görülmüştür. Gnanaraj ve ark. (2011), *A. sessilis*'in sürgün ucu eksplantlarını 0,5-0,20 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre

alındığında en fazla en fazla sürgün sayısını ve en uzun sürgünleri, en yüksek (0,20 mg/l) BAP içeren MS ortamında elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Sürgün uzunluğu bakımında tüm eksplantlarda benzer sonuçlar elde edilmiştir. En uzun sürgünler ise 0.25 mg/l BAP içeren ortamında elde edilmiştir. Genel olarak BAP dozların artışı ile sürgün uzunluğunda azalma gözlenmiştir. Benzer sonuçlar ise Karataş ve Aasim (2014), *Bacopa* bitkisinin yaprak eksplantlarından rapor edilmiştir. *R. rotundifolia* bitkisinde 0,25 mg/l içeren BAP MS ortamda en uzun 1,37 cm sürgünler elde edilirken BAP dozu artışı ile sürgün uzunluğunda çok belirgin azalma rapor edilmiştir (Çiftçioğlu 2013). Benzer sonuçlar ise diğer sucül bitkilerde de rapor edilmiştir (Doğan 2013, Karatas ve ark. 2013b; Karatas ve ark. 2014c). Buna karşın Gnanaraj ve ark. (2011) *A. sessilis* L.'in *in vitro* çoğaltımı için yürüttükleri çalışmada en uzun sürgünleri (6,3 cm) olarak 2,00 mg/l BAP içeren MS ortamında elde etmiştir.

Farklı LED ışıkların x BAP dozların etkileri bakıldığında sürgün sayısı ve uzunluğunda istatistik olarak önemli bulunmuştur. Sonuçlara göre tam ve üst yaprak eksplantlarından en fazla eksplant başına sürgün sayısı beyaz LED+0.25 mg/l BAP içeren ortamından elde edilmiştir. Alt yaprak eksplantından ise en fazla sürgün beyaz LED+1.0 mg/l BAP içeren ortamında kaydedilmiştir. Sürgün ucu eksplantından eksplant başına en fazla sürgün 2:1 ve 4:1 kırmızı:mavi LED ile 1.0 mg/l BAP içeren ortamından elde edilmiştir.

Sürgün uzunluğu bakıldığında 1:1 kırmızı:mavi LED ışıkları sürgün uzunluğuna olumlu etkisi gösterdiği saptanmıştır. Tam ve üst yaprak eksplantlarından en uzun sürgünler 1:1 kırmızı:mavi +0.25 mg/l BAP içeren ortamından elde edilmiştir. Ancak, alt yaprak ve sürgün ucu eksplantından en uzun sürgünler 1:1 kırmızı:mavi +0.50 mg/l BAP içeren ortamında elde edilmiştir.

Tez kapsamında kullanılan eksplantlar kıyaslandığında yaprak eksplantlar sürgün ucu eksplantından daha iyi olarak tespit edilmiştir. Ancak, yaprak eksplantlar içinde yarım lamina üstü eksplantı en iyi eksplant olarak görülmüştür. Eksplantların farklı sonuçları ise daha önce de farklı kültür koşullarda rapor edilmiştir. Öztürk (2002), *Ludwigia sp*'nin *in vitro* çoğaltım için uç meristemi, birinci, ikinci ve üçüncü-dördüncü koltukaltı meristem eksplantlarından en iyi ise uç meristemi olarak rapor etmiştir. Şumlu (2009), *Rotala macrandra* Koehne'nin *in*

*vitro* çoğaltımında 1<sup>nci</sup> koltukaltı ve 2<sup>nci</sup> koltukaltı meristemi ile yaprak, 1<sup>nci</sup> ve 2<sup>nci</sup> boğum arası eksplantları kullanıldığında en fazla sürgün rejenerasyonu (27.33 adet) 1<sup>nci</sup> boğum arası eksplantında elde edilmiştir.

*Bacopa* bitkisinin *in vitro* çoğaltımı sonucunda elde edilen bitkilerin köklendirmek ve akvaryumda adaptasyon sağlamak için Karataş ve ark. (2013b) ve Karataş ve Aasim (2014) tarafından kullanılan protocol ile başarıyla sağlanmıştır. Sucul bitkilerin köklendirmek için farklı oranda IBA başarıyla diğer bitkilerde de kullanılmıştır (Karataş ve ark. 2013a,2014c; Çınar ve ark. 2013).

Akvaryumlarda bitkiler her hangi olumsuz etki göstermeden bitki boylarının ve yapraklarının geliştiği gözlenmiştir. Akvaryumlarda bitkilerin adaptasyon çalışmaları *Nymphoides indica* (Jenks ve ark. (2000), *R. macrandra* (Şumlu, 2009), *A. sessilis* (Gnanaraj ve ark. 2011; Shahzad ve ark. 2011) başarıyla adaptasyon sağladıklarını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak bu çalışmada *B. monnieri* bitkisinin doku kültürü ile çoğaltımı başarıyla gerçekleştirilmiş olup, çoğaltım için en uygun ışık kaynakları araştırılmıştır. Son yıllarda akuatik bitkilerle ilgili çalışmalar hız kazanmış olsa bile özellikle Türkiye’de bu alandaki çalışmalarla ilgili önemli bir açığın olduğu düşünülmektedir. Bu tes kapsamında yapılan çalışmalar diğer akuatik bitkilerdeki hızlı ve yoğun üretime katkı sağlayacağı ve ileride yapılacak olan akuatik bitki biyoteknolojisi çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışmanın, ekonomik önemi yüksek ve üretimi zor olan akvaryum bitkilerinin hızlı ve yoğun üretimine ve konuyla ilgili ilerki çalışmalara bir temel oluşturacağı ve dolayısıyla sektöre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



## KAYNAK

- Alpbaz, A., 1984. Akvaryum Tekniği ve Balıkları. *Acargil Basımevi*, 433 s, İzmir.
- Ali, G., Srivastava, P.S. ve Iqbal, M., 1999. Morphogenic and biochemical responses of *Bacopa monnieri* cultures to zinc toxicity. *Plant Science*. 143:187-193.
- Anonim, 2009. Su Yabancıotları (Yayıllş Alanları, Yaşamları, Çevresel İlişkileri, Sorunları ve Savaşım Yöntemleri). T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü, İşletme ve Bakım Dairesi Başkanlığı, Ankara.
- Anthony, J.M., Senaratna, T., Dixon, K.W. ve Sivasithamparam, K., 2004. Somatic Embryogenesis for Mass Propagation Of Ericaceae—A Case Study With *Leucopogon Verticillatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137-146.
- Banerjee, M. ve Shrivastava, S., 2008. An Improved Protocol for *In vitro* Multiplication of *Bacopa monnieri* (L.). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(8), 1355-1359.
- Baque, A., Shin, Y.K., Elshmary, T., Lee, E.J. ve Paek, K.Y., 2011. Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the microporpagation of *Calanthe* hybrids ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' × 'Hyesung'). *Australian Journal of Crop Science*, 5, 1247-1254.
- Basu, N. ve K. Walia., 1994. The chemical investigations of the leaves of *Herpestis monniera*. *Indian Journal of Pharmacology*, 4, 84-85.
- Behera, M., Thatoi, H.N. ve Sahoo, S.L., 2008. Effect of Growth Regulators on Biochemical Analysis of *Bacopa monnieri* (linn) Wettst *In vitro*. *Research Journal Of Biotechnology*, 3(2), 20-25.
- Bhattacharya, S.K., Bhattacharya, A., Kumar A. ve Ghosal S., 2000. Antioxidant activity of *Bacopa monniera* in rat frontal cortex, striatum and hippocampus, *Phytotherapy Research*, 14, 174-179.
- Budiarto, K., 2010. Spectral quality affects morphogenesis on anthurium plantlet during *in vitro* culture. *Journal of Agricultural Sciences*, 32, 234-240.
- Carter, J. ve Gunawardena, A.H.L.A.N., 2011. Regeneration of the Aquatic Monocot *Aponogeton madagascariensis* (Lace Plant) Through Callus Induction. *Aquatic Botany*, 94(3), 143-149.
- Chang, H.S., Charkabarty, D., Hahn, E.J. ve Paek, K.Y., 2003. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In vitro Cell Developmental Biology-Plant*, 39, 129-134.

- Channa, S., Dar, A., Anjum, S., Yaqoob M. ve Atta Ur, R., 2006. Anti-inflammatory activity of *Bacopa monniera* in rodents, *Journal of Ethnopharmacology*, 104, 286-289.
- Chaudhuri, P.K., Srivastava, R. ve Kumar, S., 2004. Phytotoxic and antimicrobial constituents of *Bacopa monnieri* and *Holmskioldia sanguinea*, *Phytotherapy Research*, 18, 114-117.
- Chopra, R.N., 1958. *Indigenous Drugs of India*. 2nd ed. Calcutta, India: U.N. Dhur and Sons; s341.
- Chung, J.P., Huang, C.Y. ve Dai, T.E., 2010. Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Scientia Horticulturae*, 124, 511-516.
- Cirik, S., Cirik, Ş. ve Dalay, M.C., 2001. Su bitkileri II. (İçsu Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi, Yetiştirme Teknikleri). Ege Üniv. Su Ürünleri Fakültesi Yay. No: 61. İzmir.
- Cirik, Ş., Cirik, S. ve Conk-Dalay, M., 2011. Su Bitkileri II (İçsu Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi, Yetiştirme Teknikleri). *E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları*, No:61, 4-58 s, İzmir.
- Çınar, A., 2013. *In vitro* Koşullarda *Hygrophila polysperma*'nın Çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Karaman
- Çiftçioğlu, M., 2013. Akvaryum Bitkisi *In vitro* Koşullarda *Rotala* [*Rotala Rotundifolia* (Buch-Ham. Ex Roxb) Koehne] Bitkisinin Çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Karaman.
- Dandin, V.S. ve Murthy, H.N., 2012. Enhanced *In vitro* Multiplication of *Nothapodytes nimmoniana* Graham Using Semisolid and Liquid Cultures and Estimation of Camptothecin in the Regenerated Plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 1381-1386.
- Doğan, M., 2013. Akvaryum Bitkisi *In vitro* Koşullarda *Ceratophyllum Demersum* Bitkisinin Çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Karaman
- Gnanaraj, W.E., Marimuthu, J., Subramanian, K.M. ve Nallyan, S., 2011. Micropropagation of *Alternanthera sessilis* (L.) Using Shoot Tip and Nodal Segments. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(3), 206-212.
- Gasdaska, J.R., Spencer, D. ve Dickey, L., 2003. Advantages of Therapeutic Protein Production in the Aquatic Plant Lemna. *Bioprocessing journal*, 2(2), 1-6.
- Huan, L.V.T. ve Tanaka, M., 2004. Effects of Red and Blue Light-Emitting Diodes on callus induction, callus proliferation, and protocorm-like body formation from callus in cymbidium orchid. *Environnemental Control in Biology*, 42, 57-64.

- Jao, R.J., 2004. Effect of Frequency and Duty Ratio on the Growth of Potato Plantlets *in vitro* Using of Light emitting Diodes. *HortScience*, 39: 375-379.
- Jenks, M.A., Kane, M.E. ve McConnell, D.B., 2000. Shoot Organogenesis from Petiole Explant in the Aquatic Plant *Nymphaea Indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 1-8.
- Karataş, M., Doğan, M., Çiftçioğlu, M. ve Aasim, M., 2012a. Tilki Kuyruğu (*Ceratophyllum demersum* L.) Bitkisinde Sterilizasyon Çalışmaları. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, Antalya.
- Karataş, M., Çiftçioğlu, M., Doğan, M. ve Aasim, M., 2012b. Rotala [*Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. Ex Roxb.) Koehne] Bitkisinin Doku Kültürü ile Çoğaltımı. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, Antalya.
- Karataş, M., Doğan, M. ve Aasim, M., 2012c. *In vitro* Koşullarda *Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson Bitkisinin Mikroçoğaltımı. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, Antalya.
- Karatas, M., Aasim, M., Çınar, A. ve Dogan, M., 2013a. Adventitious shoot regeneration from leaf explant of dwarf hygro (*Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson). *The Scientific World Journal*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/680425>
- Karatas, M., Aasim, M., Dogan, M. ve Khawar K.M., 2013b. Adventitious Shoot Regeneration of the Medicinal Aquatic Plant Water Hyssop (*Bacopa monnieri* L. Pennell) Using Different Internodes. *Archives of Biological Sciences, Belgrade*, 65(1), 297-303.
- Karatas, M., Aasim, M. ve Dogan, M., 2014a. Multiple shoot regeneration of *Ceratophyllum demersum* L. on agar solidified and liquid mediums. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24: 3-9.
- Karatas, M., Aasim, M. ve Çiftçioğlu, M., 2014b. Adventitious shoot regeneration of Roundleaf toothcup-*Rotala rotundifolia* [(Buch-Ham. ex Roxb) Koehne]. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24, 838-842.
- Karatas, M., Aasim, M., ve Çınar A., 2014c. Adventitious shoot regeneration of dwarf hygro (*Hygrophila Polysperma*) under *in vitro* conditions. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23: 2190-2194.
- Karataş, M. ve Aasim, M., 2014. Efficient Adventitious Shoot Regeneration of Medicinal Aquatic Plant Water Hyssop (*Bacopa monnieri* L. Pennell). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 51, 665-670.

- Keskinkan, O. ve Yücel, A., 2004. Su Altı Bitkisi (*Myrophyllum spicatum*) Kullanılarak Sentetik Atık Sudan Kadmiyum Giderilmesi. *Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.*
- Li, H., Xu, Z. ve Tang, C., 2010. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103, 155-163.
- Lian, M.L., Murthy, H.N. ve Paek, K.Y., 2002. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of Liliium oriental hybrid 'Pesaro'. *Scientia Horticulturae*, 94, 365–370.
- Micheli, M., Gasperis, A.D., Prosperi, F. ve Standardi, A., 2006. Micropropagation of Three Species of Aquatic Plants. *Agricoltura Mediterranea*, Italy, 136(1), 46-51.
- Moncalean, P., Rodríguez, A. ve Fernandez, 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. ve Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.*, 15, 473-497.
- Öztürk, M., 2002. Akvaryum Bitkisi *Ludwigia sp*'nin *In vitro* Koşullarda Çoğaltımına Farklı Oranlardaki Büyüme Düzenleyicilerin Etkileri. *Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Su ürünleri Anabilim Dalı.* Ankara.
- Panigrahi, J., Mishra, R.R. ve Behera, M., 2006. *In vitro* Multiplication of *Asteracantha Longifolia* (L.) Nees-a Medicinal Herb. *Indian Journal of Biotechnology*, 5(4), 562-564.
- Sairam, K., Dorababu, M., Goel, R.K. ve Bhattacharya, S.K., 2002. Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats, *Phytomedicine*, 9, 207-211
- Shahzad, A., Parveen, S. ve Fatema, M., 2011. Development of a Regeneration System Via Nodal Segment Culture in *Veronica anagallis-aquatica* L.-An Amphibious Medicinal Plant. *Journal of Plant Interactions*, 6(1), 61-68
- Shakoor, A., Akram, M., Asharaf C.M. ve Siddiqui, M.R., 1994. Pharmacognostic study and chemical / pharmacological evaluation of Brahmi-buti. *Hamdard Medicus*. 37: 92-109.
- Sharma, S., Kamal, B., Rathi, N., Chauhan, S., Jadon, V., Vats, N., Gehlot, A. ve Arya, S., 2010. *In vitro* Rapid and Mass Multiplication of Highly Valuable Medicinal Plant *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *African Journal of Biotechnology*, 9(49), 8318-8322.

- Snedecor, G.W. ve Cochran, W.G., 1967. Statistical Methods. *The Iowa State University Press*, Iowa, USA.
- Stanly, C., Bhatt, A. ve Keng, C.L., 2011. An Efficient *In vitro* Plantlet Regeneration of *Cryptocoryne wendtii* and *Cryptocoryne beckettii* Through Shoot Tip Culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(2), 619-624.
- Stough, C., Lloyd, J., Clarke, J., Downey, L.A., Hutchison, C.W., Rodgers, T. ve Nathan, P.J., 2001. The chronic effects of an extract of *Bacopa monniera* (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects, *Psychopharmacology (Berl)* 156, 481-484
- Şumlu, Ş., 2004. Yüzen Yapraklı Su Bitkisi Nilüferin (*Nymphaea sp.*) *İn Vitro* Koşullarda Çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Şumlu, Ş., 2009. Akvaryum Bitkisi *Rotala macrandra*'nın *In vitro* Koşullarda Hızlı Çoğaltımı ve Gen Aktarımı. *Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Uabundit, N., Wattanathorn, J., Mucimapura, S. ve Ingkaninan, K., 2010. Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model, *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 26-31.
- Vijayakumar, M., Vijayakumar R., ve Stephen, R., 2010. *In vitro* Propagation of *Bacopa monnieri* L.-A Multipurpose Plant. *Indian Journal of Science Techonology*, 3, 781-786.
- Vollala, V.R., Upadhyaya, S. ve Nayak, S., 2010. Effect of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi) extract on learning and memory in rats – a behavioral study, *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* 5, 69–74.
- Wu, H.C. ve DuToit, E.S., 2012. *In vitro* organogenesis of *Protea cynaroides* L. shoot-buds cultured under red and blue light-emitting diodes. In: Sato K.I. (ed.): *Embryogenesis*. InTech China. s151-166.
- Yenice, Z., 2010. Geçici Daldırma Sistem Biyorektörlerle su mercimeği (*Lemna Minor* L.) Bitkisinin *In vitro* Çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*, Ankara.
- Yücel, A.Z., 2008. Farklı kolkisin dozlarının akvaryum bitkisi gül (*Ludwigia repens* Forster)'de kromozom katlanmasına etkileri. *Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı*. Ankara.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

**Adı Soyadı** : Murat DAZKIRLI  
**Doğum Tarihi ve Yer** : 10.05.1982  
**Medeni Hali** : Evli  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**Telefon** : 0(532) 543 12 30  
**e-mail** : muratdazkirli@hotmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Yıl
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2015
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Zootekni Bölümü	2005
Lise	Meram Teknik Lisesi Elektrik Bölümü	2001