

***IN VITRO* KOŞULLARDA *Hygrophila polysperma*'nın**

ÇOĞALTIMI

Ayşegül ÇINAR

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Hidrobiyoloji Programı

Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

Mayıs-2013

T.C
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***IN VITRO* KOŞULLARDA *Hygrophila polysperma*'nın ÇOĞALTIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ayşegül ÇINAR

Anabilim Dalı : Biyoloji

Programı : Hidrobiyoloji

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

KARAMAN-2013

TEZ ONAYI

Ayşegül ÇINAR tarafından hazırlanan “*In Vitro* Koşullarda *Hygrophila polysperma*’nın Çoğaltımı” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Prof.Dr. Mehmet KARATAŞ

Jüri Üyeleri

İmza:

Prof.Dr. Mehmet KARATAŞ

Prof. Dr. Khalid Mahmood Khawar

Yrd. Doç.Dr. Muhammad Aasim

Tez Savunma Tarihi: .../.../...

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.

Ayşegül ÇINAR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IN VITRO KOŞULLARDA *Hygrophila polysperma*'nın ÇOĞALTIMI

Ayşegül ÇINAR

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

Mayıs, 2013, 58 sayfa

Hygrophila polysperma yüksek ışıktaki yaprakları pembeye dönen ve akvaryum bitki endüstrisinde süs bitkisi olarak kullanılan bir türdür. Hindistan ve Bengal'da tıbbi amaçlı olarak kullanılmakla beraber tıbbi bitkiler listesinde de yerini almaktadır. Ayrıca toksisite tarama aracı olarak ve alg tespiti için de kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, bitkinin *in vitro* koşullarda hem sıvı hem de katı ortamlarda çoğaltımıdır. Bitkinin 3-5 cm'lik gövdeleri alınarak H₂O₂ 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. Katı denemelerde endojenik bakteri kontaminasyonunu önlemek için 500 mg/L bakteriyostatik antibiyotik Amoklavim de ilave edilmiştir. Agar ile katılaştırılmış ortamlarda eksplant başına en fazla 31,00 adet sürgün, sürgün ucu eksplantından 0,40 mg/L kinetin içeren ortamdan, eksplant başına en az sürgün (1,33 adet) ise yaprak eksplantında saptanmıştır. Sıvı ortamlarda ise en fazla eksplant başına 25,33 adet sürgün, sürgün ucu eksplantında gözlenirken, eksplant başına en az sürgün sayısı (2,85 adet) yaprak eksplantından elde edilmiştir. Rejenere olan sürgünler 0,20-1,00 mg/L IBA içeren ortamlarda köklendirildikten sonra akvaryumlarda başarıyla adaptasyon 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.

Anahtar Kelimeler: *Acanthaceae*, Doku kültürü, *Hygrophila*, *In vitro*

ABSTRACT

MSc. Thesis

IN VITRO PROPAGATION OF *Hygrophila polysperma*

Ayşegül ÇINAR

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

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

May, 2013, 58 pages

Hygrophila polysperma is used as an ornamental plant in aquarium industry that change its leaf colours to pink under high light. It has been used as medicinal plant and enlisted in medicinal plant lists of India and Bengal. It is also used as screening tool for toxicities and to detect and control algae. The purpose of this study was to obtain *in vitro* shoot regeneration in both liquid and solidified medium. Shoot tip, 1st nodal and leaf explants were isolated from 3-5 cm long stems that were surface sterilised with H₂O₂ followed by culture on different concentrations and combinations of BAP, TDZ, kinetin and IBA. All solidified mediums were also supplemented with 500 mg/L bacteriostatic antibiotic Amoklavin to eradicate endogenic bacterial contaminations. On agar solidified mediums, maximum of 31.00 shoots per explant were obtained on shoot tip explants on MS medium containing 0,40 mg/L Kin and minimum number of 1.33 shoots per explants were recorded from leaf explant cultured on Kin containing medium. On liquid culture mediums, maximum of 25.33 shoots per explant were obtained from shoot tip explants and minimum of 2.85 shoots per explants were recorded on leaf explant. Regenerated shoots were rooted on MS medium supplemented with 0.20-1.00 mg/L IBA followed by successful adaptation in the aquariums. Regenerated plantlets were taken in the jars containing water at different pH levels and pH 7.0-9.0 was found most suitable for plant growth and development.

Key words: *Acanthaceae*, Tissue culture, *Hygrophila*, *In vitro*

ÖN SÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim süresince bana her türlü desteği veren danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ'a, çalışmalarım sırasında tüm konularda yardımlarını esirgemeyen ve engin bilgileriyle beni yönlendiren Sayın Yrd. Doç. Dr. Muhammad AASIM'a teşekkürlerimi sunarım. Bu süre çerçevesinde göstermiş olduğu hoşgörü ve yardımlarından dolayı da Asuman KOCA'ya, teyzem Narine DAŞLI'ya ve diğer çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayşegül ÇINAR

Mayıs,2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖN SÖZ	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Deneme Yeri	14
3.1.2. Bitki Materyali	14
3.1.3. Büyüme Ortamları ve Koşulları	14
3.1.4. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması ve Muhafazası	15
3.2. Yöntem	16
3.2.1. <i>Hyrophila polysperma</i> 'nın Yüzey Sterilizasyonu	16
3.2.2. Eksplant İzolasyonu	16
3.2.3. Rejenere Olan Sürgünlerin Köklendirilmesi	17
3.2.4. Bitki için Uygun pH Aralığının Belirlenmesi	17
3.2.5. İstatiksel Değerlendirme	17
4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR	18
4.1. <i>H. polysperma</i> Bitkisinin <i>In vitro</i> Sürgün Rejenerasyonu	18
4.2. <i>In vitro</i> Yüzey Sterilizasyon Çalışmaları	18
4.3. Sıvı Kültürü ile <i>H. polysperma</i> Bitkisinin <i>In vitro</i> Sürgün Rejenerasyonu ...	20

4.3.1. Sıvı Ortamda Farklı BAP Dozlarının <i>H. polysperma</i> Bitkisinin Sürgün Ucu ve Birinci Koltukaltı Meristem Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu	20
4.3.2. Sıvı BAP ortamda <i>H. polysperma</i> Bitkisinin Sürgün Ucu Eksplantından İkincil Sürgün Rejenerasyon Çalışması	22
4.3.3. Sıvı Ortamda Farklı BAP Oranlarının <i>H. polysperma</i> Bitkisini Yaprak Eksplantından Sürgün Rejenerasyonu	24
4.3.4. Sıvı Ortamda Farklı BAP-GA ₃ Oranlarının <i>H. polysperma</i> Bitkisinin Yaprak Eksplantından Sürgün Rejenerasyonu	26
4.4. Agar ile Katılaştırılmış Ortamlarda <i>H. polysperma</i> Bitkisinin <i>In vitro</i> Sürgün Rejenerasyonu	28
4.4.1. Farklı Kinetin Dozlarının <i>H. polysperma</i> Bitkisinin Sürgün Ucu Eksplantından Sürgün Rejenerasyonu	28
4.4.2. <i>H. polysperma</i> Bitkisinin Yaprak Eksplantında KİN-IBA ile Sürgün Rejenerasyonu	30
4.4.3. <i>H. polysperma</i> Bitkisinin Yaprak Eksplantından TDZ-IBA ile Sürgün Rejenerasyonu	33
4.5. <i>In vitro</i> Köklendirme	36
4.5.1. Farklı IBA Oranlarının Kök Oluşumuna Etkisi	36
4.5.2. Farklı Sukroz Oranlarının Kök Oluşumuna Etkisi	36
4.6. <i>In vitro</i> Koşullarda Elde Edilen Sürgünlerin Dış Şartlara Adaptasyonu	38
4.6.1. Büyüme ve Gelişme için En Uygun pH'ın Belirlenmesi	38
4.6.2. Akvaryumda Adaptasyon	41
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	57

ÇİZELGELER

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1:	Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları	15
Çizelge 3.2:	Kullanılan büyüme düzenleyici ve antibiyotik çözücüleri, stok konsantrasyonu ve saklama koşulları	16
Çizelge 4.1:	<i>H. polysperma</i> bitkisinin H ₂ O ₂ ile yüzey sterilizasyonu çalışmasına ait varyans analizi	19
Çizelge 4.2:	H ₂ O ₂ 'in sürgün ucu, birinci koltukaltı meristemi ve ikinci koltukaltı meristem eksplantları üzerine etkisi	19
Çizelge 4.3:	Sıvı ortamda farklı BAP dozlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin sürgün ucu ve birinci koltukaltı meristem eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analiz	21
Çizelge 4.4:	Sıvı ortamda farklı BAP dozlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin sürgün ucu ve birinci koltukaltı meristem eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisi	21
Çizelge 4.5:	Sıvı ortamda farklı BAP dozlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi	23
Çizelge 4.6:	Sıvı ortamda farklı BAP dozlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	23
Çizelge 4.7:	Sıvı ortamda farklı BAP oranlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi	24
Çizelge 4.8:	Sıvı ortamda farklı BAP oranlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından sürgün sayısı ve rejenerasyonuna etkisi	25
Çizelge 4.9:	Sıvı ortamda farklı BAP-GA ₃ oranlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından ikincil sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi	26
Çizelge 4.10:	Sıvı ortamda farklı BAP-GA ₃ oranlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	27
Çizelge 4.11:	Farklı kinetin dozlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi	29

Çizelge 4.12:	Katı ortamda farklı kinetin dozlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	29
Çizelge 4.13:	Katı ortamda farklı kinetin ve IBA oranlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi	31
Çizelge 4.14:	Farklı kinetin ve Kin-IBA oranlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	32
Çizelge 4.15:	Katı ortamda farklı TDZ ve IBA oranlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi	34
Çizelge 4.16:	Farklı TDZ-IBA oranlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantının sürgün rejenerasyonuna etkisi	35
Çizelge 4.17:	Katı ortamda farklı sukroz oranlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından elde edilen kök uzunluğu analizi	37
Çizelge 4.18:	Katı ortamdaki farklı sukroz oranlarının <i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından kök uzunluğuna etkisi	38
Çizelge 4.19:	Farklı pH'larda su içeren cam kavanozlarda bitkilerin üç hafta sonunda boyunda ve boğum araları sayılarındaki artış	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1:	<i>Hygrophila polysperma</i> bitkisi	2
Şekil 4.1:	<i>In vitro</i> koşullarda H ₂ O ₂ ile yüzey sterilizasyon çalışması	18
Şekil 4.2:	Sıvı Ortamda <i>H. polysperma</i> bitkisinin sürgün rejenerasyonu ...	20
Şekil 4.3:	Sürgün ucu eksplantından sıvı BAP ortamında sürgün oluşumu.	22
Şekil 4.4:	Sıvı ortamda <i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonu	25
Şekil 4.5:	<i>H. polysperma</i> bitkisinin sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu	28
Şekil 4.6:	<i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonu	30
Şekil 4.7:	<i>H. polysperma</i> bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonu	33
Şekil 4.8:	Farklı IBA ortamlarında kök oluşumları	36
Şekil 4.9:	Rejenere bitkilerden elde edilen kök oluşumları	37
Şekil 4.10:	Cam kavanozlarda büyümüş bitkiler	40
Şekil 4.11:	Farklı pH'larda bitki büyüme ve gelişmesi	40
Şekil 4.12:	Akvaryumda <i>in vitro</i> gelişen bitkilerin adaptasyonu	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
g, mg, µg	Gram, Miligram, Mikrogram
HCl	Hidroklorik Asit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
IAA	Indol-3-Asetik Asit
IBA	Indol Butirik Asit
L, ml, µl	Litre, Mililitre, Mikrolitre
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

Kısaltmalar

Açıklama

2,4-D	2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit
2-iP	2- izopentenil adenin
BAP	6 Benzylaminopurin
ÇS	Çamaşır Suyu
GA ₃	Gibberellik Asit
KO	Kare Ortalaması
TDZ	Thidazuron (1 Phenyl 3-(1,2,3-thidiazol 5yL) urea)
VK	Varyasyon Kaynakları

1. GİRİŞ

Akvaryum bitkileri, doğal yaşam ortamları tropikal ve subtropikal bölgeler olan canlılardır (Alpbaz, 1984). Dünya çapında akvaryum bitkilerinin talebinde hızlı bir artış kaydedilmektedir. Avrupa’da su bitkilerini en çok ithal eden ilk on ülke ise Hollanda, Fransa, Çek Cumhuriyeti, Almanya, Macaristan, İsviçre, Avusturya, Türkiye, Letonya ve Estonya olarak sıralanmıştır. Toplamda kullanılan 6,5 milyon sucul bitkinin %73’ünü Hollanda’nın kapsadığı tahmin edilmektedir. Bu bitkilerin çoğu ithal edilen türlerdir. Bu ithal edilen bitkilerin en popülerleri *Egeria densa* bitkisidir. Diğer popüler süs türleri (büyüklük sırasına göre) ise *Cabomba caroliniana*, *Hygrophila polysperma*, *Vallisneria spiralis*, *Echinodorus bleheri*, *Vallisneria americana*, *Najas marina* ve *Hygrophila difformis*’dir (Brunel, 2009). Süs havuzları ve akvaryum son on yıl içinde birçok ülkede hızla yayılan bir hobi haline gelmektedir (Maki ve Galatowitsch, 2004). Sadece Amerika’da yaklaşık 16 milyon evde süs havuzu bulunmaktadır (Crosson, 2010). Avustralya’da yapılan istatistiklere göre son 30 yılda 400 akvaryum bitki türü kullanılmaktadır (Petroeschovsky ve Champion, 2008).

Acanthaceae familyasına ait (Rataj ve Horeman, 1997) olan *Hygrophila* cinsinde 90 civarında tür bulunmaktadır. Fakat hepsi tanımlanıp sınıflandırılmamıştır (Amano, 2002). Dünyanın her kıtasında olmasına rağmen türlerin çoğunun orjini Asya’dır. *Hygrophila* cinsi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Örneğin; *H. auriculata* bitkisi Hindistan’ın geleneksel tedavi sisteminde karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Shanmugasundaram ve Venkataraman, 2005). *H. stricta* bitkisi geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite göstermektedir (Khan ve Omoloso, 2002). *H. spinosa* ödem, kronik bright hastalığı, ishal, dizanteri, astım, kan hastalıkları, romatizma ve mide hastalıklarının tedavisinde yararlılığını göstermektedir (Kshirsagar ve ark., 2010). Bodur higrofila, bodur higro, Miramar otu ya da Hint su otu olarak bilinen *H. polysperma* (Roxb.) T. Anderson (Şekil 1.1), Hindistan ve Malezya’ya özgüdür. Daha sonra, Amerika’nın Florida, Teksas ve Virjinya eyaletlerinde de doğallaştırılmıştır (Langeland ve Burks., 1998). *H. polysperma* “Doğu Ludwigia’sı” adı altında 1945 yılında akvaryum ticaretine girmiştir (Innes, 1947). Akvaryum bitki endüstrisinde süs bitkisi olarak kullanımı oldukça yaygın olup (David ve ark., 2012) evrensel bir bitki olarak yıllardır akvaryumun bir parçası olmuştur. Hem orta ve arka alanı bol miktarda

kaplamasıyla hem de uzun gövdeleri sayesinde büyük ve etkileyici alanlar oluşturmasıyla bitkili akvaryumlarda büyük potansiyele sahip bitkidir.



Şekil 1.1. *Hygrophila polysperma* bitkisi

Uzun ömürlü olan *H. polysperma* düzgün gövdeye sahiptir ve sürünerek çıkar. Çoğunlukla batık, genelde kökleri substrat içinde ayrıktır. Yapraklar yaklaşık 8 cm uzunluğunda ve 2 cm genişliğinde, uca doğru daha çok genişleyen, sapsız düğüm ile 1,55 mm uzunluğunda gözle görünen tüyleri bulunmaktadır. Çiçekleri küçüktür ve üstte tek bir yaprak bulunur. 5 loblu kalikse, mavi-beyaz ve 2 loblu karollaya sahiptir. Meyve dar bir kapsül içindedir ve etrafa küçük tohumlar yayar (Les ve Wunderlin, 1981). Çoğu türler düşük ışıkta fotosentez yapabilir (Spencer ve Bowes, 1984). 18-30 °C sıcaklığında ve 6,5-7,8 pH aralığında yaşayabilirler (Anonim, 2010). Akan sulara daha hızlı büyürler (Van Dijk ve ark., 1986). Düşük ışık değerleri daha yavaş ve daha az büyümeye neden olur. Yüksek ışık altında yaprakları pembe renge dönüşebilir, akvaryumun üst kısımlarına kadar ulaşabilirler ve CO₂ bu tür için kesinlikle zorunlu değildir.

Hindistan'da *H. polysperma* tohumlarının bir ilaç gibi kullanıldığı kanıtlanmıştır (Bowes, 1982). Ayurvedik tedavi sisteminde kullanılan Mashabaladi Kvatha isimli ilacın yapımında diğer bitkiler ile beraber boyun-yüz felci, kulak uğuldaması ve başağrısı gibi hastalıklar için kullanılmıştır (Anonim 2013a). *H. polysperma* Batı Bengal (Anonim, 2013b) ve Karnataka (Anonim, 2013c) da tıbbi bitkiler listesinde yerini almıştır.

H. polysperma toksik sürfaktanlar ile beraber toksisiteleri tarama aracı olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır (1mg/l altındaki standart OECD (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) EC50 (Etkili Konsantrasyon) ile sürfaktanların sonuçları). *H. polysperma*'nın bu sonuçları standart OECD sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Person, 2012). Bunların yanı sıra *H. polysperma* ile beraber yüzen Hint eğreltiotu alg kontrolü tespiti için kullanılan iki türdür (Anonim, 2013d).

Bitki doku kültürleri, bitkilerin doku, organ, hücre ya da hücre kısımlarının bitkiden ayrılarak (izole edilerek) kapalı ve cam kaplarda suni besin ortamında yetiştirilerek tam bitkilerin elde edilmesi işlemidir (Biondi ve Thorpe, 1982). Doku kültürleri ile vegetatif üretimin amacı sürgün meristemlerinin oluşmasını ve çoğalmasını sağlamaktır. Bir bitkinin vegetatif olarak çoğaltılması, koltuk altı (axillary) ve adventif olmak üzere iki şekilde bulunan sürgün meristemlerinin oluşumuna bağlıdır.

Türkiye'de son yirmi beş yıldan beri su ürünleri eğitimi ile birlikte su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli gelişmeler kaydedilmiş ve üretim artmıştır. Ancak su bitkileri konusunda yeterince gelişme sağlanamamıştır. Bu nedenle yapılan çalışmalar dahilinde kısa zamanda daha verimli ve kontrollü üretimin yapıldığı farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en önemlisi ise *in vitro* üretimidir.

Bu tezin amacı; *H. polysperma*'nın, doku kültürü tekniklerinden yararlanarak *in vitro* koşullarda çoğaltılması ve bununla beraber bitkinin yerel kaynaklarla yeterince üretilmesini sağlamaktır. Akvaryumlarda süs bitkisi, su kirliliği için biyoindikatör ve tıbbi amaçlı kullanılması dışında gen transferi açısından da oldukça uygun bir bitkidir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

Jenks ve ark. (2000), çeşit seleksiyonu ve mutasyon ıslah çalışmalarında kullanmak amacıyla süs su bitkisi olan *Nymphoides indica*'da yaprak sapı eksplantından sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Bu çalışma için 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 (11,50 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 besi ortamından elde etmişlerdir. Histolojik kesit alınarak aynı eksplantta direkt ve indirekt sürgün organogenesi ile sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır.

Te-chato ve Lim (2000), *in vitro* gelişen *Garcinia mangostana L.* (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 ortamlarında %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 adet 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 V 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.

Öztürk ve ark. (2002), akvaryum bitkisi *Ludwigia repens*'in *in vitro* şartlarda çoğaltımı ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Yüzey sterilizasyonu için bitki 15 dk çeşme suyunda tutulmuş ve 9 dk %20'lik ticari çamaşır suyuyla muamele edildikten sonra 3 dk 3 kere durulama işlemi yapılmıştır. Apikal meristem, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü koltukaltı meristem eksplantları 4 hafta MS, %3 sukroz, %0,8 agar, BAP (0,1, 0,2 ve 0,3 mg/L), TDZ (0,05, 0,1, 0,15 mg/L), NAA (0,1 mg/L) içeren ortamlarda tutulduktan sonra ½ MS ortama alınmış ve 4 hafta bu ortamda tutulmuştur. En fazla sürgün (12,31 adet/eksplant) apikal meristemi ile 0,05 mg/L TDZ ve 0,1 mg/L NAA içeren MS besi ortamından elde edilmiştir. Rejenere olan sürgünler 10-20 mm uzunluğa geldiklerinde kesilerek steril Magenta GA⁷ veya cam kavanozlar (baby jar) içinde ½ MS ortamda köklendirilmeye alınmıştır. Burada köklenen sürgünler daha sonra akvaryum ortamına adapte edilmiştir. Adaptasyonda %100 başarı sağlanmıştır.

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

Moncalean ve ark. (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 izopentiladenin, N6 izopentenil 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.

Wawrzyn'czak ve Goszczyńska (2003), *Dianthus caryophyllus* türünde çalışmışlardır. *D. caryophyllus* (Karanfil-Dianthus) bitkisinin 'Dolce Vita', 'İmpala', 'Domingo', 'Tango' ve 'Charlotte' çeşitlerinden elde edilen kalemler 24 saat BAP ve kinetin içeren ortama bırakılmıştır. Karanfil çiçeklerinin fazla süre taze kalabilmesi 0,05 veya 0,1 µM kinetin ve BAP kullanarak sağlanabilmiştir. 'Dolce Vita', 'İmpala', 'Domingo' ve 'Tango' çeşitlerinde 0,05 µM kinetin veya BAP kullanılarak çiçek ömründe belirgin bir fark gözlenmiştir. Fakat 'Charlotte' çeşidinde 0,05 µM kinetin, 0,1 µM BAP muamelesi ile çiçek ömrü ve çiçek çapı üzerinde olumlu etki görülmüştür.

Anthony ve ark. (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 (6,0 pH) 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.

Keskinkan (2004), tekstil ve metal sanayi atık sularının ileri arıtımında *Myriophyllum spicatum* ve *Ceratophyllum demersum* içeren yapay sulak alanları kullanılmıştır.

Bitkilerin tutunmaları ve dik durmaları için yapay sulak alanın tabanında nehir kumu kullanılmıştır. Akım düzeni sağlandıktan sonra sulak alana *M. spicatum* ve *C. demersum* ekilmiştir. 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. Sonuçlar, sulak alan sisteminin boyar maddelerle ağır metalleri giderebileceğini ve iyi bir giderim kapasitesi olduğunu göstermiştir. Buna göre *M. spicatum* olan akvaryumlarda %91,3-96,8 ve *C. Demersum* olan akvaryumlarda %92,5-95,4 oranında boyar madde giderimi görülmüştür.

Şumlu (2004), yüzen yapraklı su bitkisi Nilüfer (*Nymphaeae sp.*)'in *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi ve çoğaltımı yapılmıştır. En yüksek tohum çimlenmesi %60 oranında 1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L IAA içeren MS besisi ortamından 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 kırılması için çalışılmıştır. Yalnız değişik oranlardaki TDZ'li sıvı ortamlarda kağıt filtre köprüleri üzerinde çimlenme elde edilmiş olup en fazla çimlenme 0,05, 2,00 ve 4,00 mg/L TDZ ilaveli ortamlarda görülmüştür. Oda sıcaklığında aydınlığa (16 saat aydınlık/8 saat karanlık) göre karanlıkta çimlenen fideliklerde daha fazla boy artışı kaydedilmiştir. 0,05 mg/L TDZ kullanımı daha ekonomik bulunmuş ve çimlenen tohumlardan elde edilen bitkicikler akvaryumlara konulmuştur.

Andrade ve ark. (2006), *Eucalyptus grandis* türünde *in vitro* çoğaltım için yüksek oranda bitki büyüme düzenleyici uygulaması denemileridir. BAP'in 0, 200, 400 ve 600 mg/L oranları 1, 2 ve 3 saat süreyle 3,0 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 ve eksplant başına sürgün rejenerasyonu incelenmiştir. Deneme sonucunda, pH'ın BAP konsantrasyonları ve muamele süresi üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür. En etkili sonuçlar BAP'in 200 mg/L oranının 1 ve 2 saat muamelesinden elde edilmiştir. Her iki muamele sonucunda bitkinin kortikal parenkima ve prokambiyum hücrelerinde yoğun oranda çoğaltımı görülmüştür. Çalışma sonucunda yüksek oranda BAP uygulamasının *E. grandis* bitkisinin çoğaltımı için uygun olduğu görülmüştür.

Micheli ve ark. (2006), *Cryptocoryne beckettii*, *Cryptocoryne lutea* ve *Rotala rotundifolia* türlerinin *in vitro* çoğaltımını yapmışlardır. 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 ortamından (Linsmaier ve Skoog 1965) elde edilmiştir. Her iki BAP konsantrasyonundan 1 mg/L BAP'de 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. 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 bitkilere nazaran daha fazla sayıda tespit edilmiştir. Çalışılan bitkiler içinde en fazla adaptasyon yüzdesi *R. rotundifolia*'da elde edilirken, bu türdeki sürgün çoğaltımı da fazla olmuştur. *Cryptocoryne*'in her iki türünde ise çoğaltım ile köklenme arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir.

Panigrahi ve ark. (2006), *Hygrophila auriculata* bitkisinin yaprak eksplantlarından BAP ve NAA içeren MS ortamlarında 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.

Li ve ark. (2007), Mango bitkisinin kotiledon parçalarını 28 gün agar içeren ortamda kültüre almışlardır. Eksplantlara ön muamele uygulaması sonraki gelişme üzerinde etkili olmuştur. Bu eksplantlarda kotiledonun sap kısmında adventif kökler oluşmuş, uç tarafında (karşı taraf) hiç kök gözlenmemiştir. Köklenmede kotiledon yaprağın uzunluğu, IAA ya da IBA ile 1 saat muamelenin etkisi olmuştur. Bunun yanı sıra eksplantın 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA-antioksin) ile muamelesi adventif kök oluşumunda inhibisyona neden olmuştur. 2700 µM NAA ile 1 saat muamelede kotiledonların abaksial tarafında köklenme görülmüştür. Histolojik incelemede her iki tip kökün parenkima hücrelerinden olduğu tespit edilmiştir. Fakat kök primordiaların gelişimi değişik olmuştur. Sonuçta oksinlerin polar (kutuplu) taşınması adventif kök oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Fakat NAA'in etkisi difüzyon ile nüfuz nedeniyle eksenden uzak tarafta kök oluşumuna sebep olmuştur.

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 költüre almışlardır. En fazla oranda sürgün ve kök rejenerasyonu 2 mg/L BAP+Kin içeren ortamda ve eksplantların boğum kısımlarından elde edilmiştir. Sekiz hafta boyunca *in vitro* koşullarda büyütölen 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.

Öztürk ve ark. (2008), akvaryum bitkisi *Hgrophila difformis* ve *Microsorium pteropus*'un *in vitro* şartlarda çoğaltımı ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. *H. difformis* türünde farklı oranlarda kinetin, TDZ, NAA ve 2,4-D içeren MS besi ortamı kullanılmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu (80,56 adet/eksplant), 0,25 mg/L kinetin ve 1 mg/L NAA içeren MS ortamında yaprak eksplantından elde edilmiştir. Çalışmada sıvı MS ortamı da kullanılmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu (62,20 adet/eksplant), yine 0,25 mg/L kinetin ve 1 mg/L NAA içeren sıvı MS ortamında gövde eksplantından elde edilmiştir. Sıvı ortamda fazla sayıda sürgün elde edilmesine rağmen katı ortama göre daha düşük sonuç alınmıştır. *In vitro* elde edilen bitkilerin akvaryum koşullarına adaptasyonu amacıyla iki farklı uygulama yapılmıştır. İlk uygulamada akvaryumlarda iki farklı ışık yoğunluğu (2000 lüx ve 4000 lüx), ikinci uygulamada iki farklı su sıcaklığı (24°C- 28°C) uygulanmıştır. 24°C ve 4000 lüx ışık kullanılan denemelerde bitkilerdeki uzama miktarı daha fazla olmuştur. *Microsorium pteropus* bitkisinde materyal azlığı ve bulaşıklık oranının fazla olmasından dolayı iki farklı çalışma yapılmıştır. İlk çalışmada, *in vitro* koşullarda farklı oranda NAA içeren şekersiz sıvı MS besi ortamında sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. İkinci çalışmada, *ex vitro* koşullarda “pulse treatment” uygulaması yapılmış, bitkinin yaprakları yüksek oranda kısa süreli olarak BAP ve IBA ile muamele edilmiş ve akvaryum ortamında gelişmeye bırakılmıştır. Bu denemede *in vitro* yapılan çalışmaya göre daha iyi sonuç alınmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu (14 adet/eksplant), 250 mg/L BAP ve 250 mg/L IBA ile 30 dk süreyle yapılan muameleden elde edilmiştir. Bu tezdeki çalışma yüksek oranda amacına ulaşmış ve ekonomik önemi olan iki akvaryum bitkisinin doku költürü yöntemiyle çoğaltımı gerçekleştirilmiştir.

Şumlu (2009), *Rotala macrandra* Koehne'nin *in vitro* koşullarda hızlı çoğaltımı ve gen aktarımı ile ilgili çalışmada *R. macrandra*'nın birinci ve ikinci koltukaltı meristemi ile yaprak, birinci ve ikinci boğum arası eksplantları agar ve jelrit ile katılaştıran ve içerisinde sitokin ve oksin bulunan ortamlarda kültüre alınmıştır. Ayrıca sıvı MS besi ortamında sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu (27,33 adet) birinci boğum arası eksplantında 0,25 mg/L BAP+0,50 mg/L NAA içeren 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 birer eksplant üzerinde sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Daha sonra yaprak ve birinci boğum arası eksplantlarıyla *Agrobacterium tumefaciens* Smith ve Townsend 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.

Yenice (2010), bitkinin Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktör ile *in vitro* çoğaltımının yapılması ve kullanılmış bitki büyüme düzenleyicilerin bitkinin protein miktarına etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Su mercimeği (*Lemna minor* L.) bitkisini farklı oranlarda BAP, kinetin ve TDZ içeren şekerli ve şekersiz sıvı MS ortamlarında kültüre almıştır. Mikroçoğaltım için yapılan denemeler 8 saat karanlıkta ve 16 saat beyaz floresan ışığı (150 µmol photons m⁻²s⁻¹) fotoperiyot altında ve 24±1°C sıcaklıkta gerçekleştirmiştir. En fazla bitki çoğaltımı 0,2 mg/L BAP içeren şekersiz sıvı MS ortamında pH 7,23'te görülmüştür. Bu ortamda eksplant başına 50,44 adet bitki kaydetmiştir. Ayrıca 0,05 mg/L Kin içeren sıvı MS ortamında eksplant başına düşen bitki sayısı en fazla 57,82 adet ve 0,6 mg/L TDZ içeren sıvı MS ortamında eksplant başına düşen bitki sayısı en fazla 50,74 adet hesaplamıştır. Kjeldahl Yöntemi ile yapılan azot tayini çalışmaları sonucunda bitkinin protein değeri %25,5 olarak tespit edilmiştir. Hormon uygulaması sonucunda ise 0,5 mg/L BAP ile bitkideki protein oranının %29,18'e çıktığı görülmüştür. Bu tezdeki çalışma amacına ulaşmış ve bitki büyüme düzenleyicilerin geçici daldırma sistem biyoreaktörleriyle çoğaltımın bitki protein miktarına olumlu yönde etkileri belirlenmiştir.

Sharma ve ark. (2010), *Bacopa monnieri* (L) Wettst'in çoğaltımı için bir protokol geliştirmişlerdir. Bitki yüzey sterilizasyonu için aksillar tomurcukları içeren nodal segmentler, %0,1 oranında civa klorid ile 5 dakika muamele edilmiş ve ardından steril kültür ortamına aktarılmıştır, 0,2 mg/L BAP içeren yarı katı MS ortamında %100

kültürler elde edilmiştir. *In vitro* koşullarda çoğaltılan aksillar 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. Yücel ve ark. (2010), *Myriophyllum spicatum* Porsuk Çayındaki ağır metal (Fe^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} ve Zn^{+2}) kirliliğinde biyoindikatör olarak kullanılmıştır. Porsuk çayında izin verilebilir sınır değerlerin üzerinde bir ağır metal kirliliğinin olduğu saptanmıştır. Ayrıca ortamdaki ağır metal kirliliğinin temizlenmesinde absorbant olarak kullanılabilirliği de araştırılmıştır. *M. spicatum* bitkisinin ağır metalleri absorbe ettiği ve kirliliği su ortamlarının temizlenmesinde kullanılabilecek özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir.

Carter ve Gunawardena (2011), *Aponogeton madagascariensis* bitkisinde kallustan sürgün rejenerasyonu 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 kurumasını 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 adet) 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 adet) ve sürgün başına en fazla kökçük sayısı (6,3±0,42 adet) 3 mg/L IBA içeren ½ MS ortamında elde edilmiştir. Rejenere olan sürgünlerin adaptasyonu başarıyla sağlanmıştır (%78).

Stanly ve ark. (2011), *Cryptocoryne wendtii* de Wit ve *Cryptocoryne beckettii* Thwaites ex Trimen türlerinin sürgün uçlarını kullanarak *in vitro* ortamda çoğaltım çalışması yapmışlardır. Her iki türde de çoklu sürgün oluşumu 0,5 mg/L BAP ve 0,2 mg/L IBA içeren sıvı veya agar ile katılaştırılan MS besi ortamında görülmüştür. Her iki türde de yüksek oranda çoklu sürgün oluşumu, kültürün dördüncü haftasından sonra sıvı ortamda görülmüştür. En az çoklu sürgün oluşumu ise agar kullanılmış besi ortamında görülmüştür. Ayrıca her iki ortamda ve her iki türden alınan eksplantlarda dördüncü hafta sonunda kök ve yaprak oluşumu görülmüştür. Bu çalışmada, %95'in üzerinde adaptasyon gözlenmiştir.

Shahzad ve ark. (2011), *Veronica anagallis-aquatica* L.'nin nodal eksplantları sürgün rejenerasyonu 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 adet) ve sürgün uzunluğu (5,0±0,25 cm) 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 kullanılmıştır. Sürgün rejenerasyonu için 0,5-2 mg/L BAP ve 0,5-2 mg/L 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. Elde edilen sürgünler 0,5-2,0 mg/L NAA içeren katı veya sıvı MS ortamlarına kültüre alınmıştır. 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) ortamdaki elde edilmiştir.

Karataş ve ark. (2012a), su ortamındaki ağır metallerin uzaklaştırılmasında ve kirliliğin ölçülmesinde yaygın olarak kullanılan, *Ceratophyllaceae* familyasına ait *Ceratophyllum demersum* L. bitkisi ile ilgili sterilizasyon çalışması yapmışlardır. İlk olarak bitkiler,

yüzey sterilizasyonu için 15 dakika çeşme suyunun altında bekletilmiş ve ardından bitkinin üst gövdeleri izole edilerek çeşitli oranlarda ve sürede hidrojen peroksit (H₂O₂) ve ticari çamaşır suyu (NaOCI-ACE) ile muamele edilmiştir. Daha sonra bitki parçalarına 5 dakika süreyle 3 kere durulama işlemi uygulanmıştır. En iyi sonuç 7 dakika %5'lik hidrojen peroksit ile muamele edilen eksplantlardan elde edilmiştir. Bu çalışma, *C. demersum* ile yapılacak olan doku kültürü çalışmalarına yardımcı olacaktır. Karataş ve ark. (2012b), *R. rotundifolia*'nın doku kültürü tekniklerinden yararlanarak adventif sürgün rejenerasyonu ile hızlı çoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. Bitki yüzey sterilizasyonu için hidrojen peroksit kullanılmış olup, steril bitkilerden alınan yaprak eksplantları farklı oranlarda BAP içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. En fazla sürgün sayısı 1,00 mg/L BAP içeren ortamda, en fazla sürgün uzunluğu ise 0,50 mg/L BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. BAP içeren ortamda kök oluşumu da sağlandığı için, ayrıca köklendirme çalışması yapılmamıştır. Köklenen bitkilerin dış koşullara adaptasyonu gözlemlenmiştir.

Karataş ve ark. (2012c), akvaryum bitki endüstrisinde süs bitkisi olarak kullanımı oldukça yaygın olan Bodur higro, Miramar otu ya da Hint su otu olarak bilinen *H. polysperma* (Roxb.) T. nin *in vitro* çoğaltımını yapmışlardır. *H. polysperma* bitkileri %30 H₂O₂ 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. İki hafta sonra, tüm eksplantlarda çoklu sürgün oluşumu gözlenmiştir. Dört hafta sonra, eksplantlar farklı oranda GA₃ (0,50, 1,00, 1,50 mg/L) içeren sıvı ortamlarda sürgün uzaması için kültüre alınmıştır. GA₃ içeren ortamlarda bitki üzerinde kök oluşumu da gözlenmiştir. Elde edilen bitkicikler başarıyla akvaryum koşullarına adapte edilmiştir.

Çiftçioğlu (2013), *Rotala rotundifolia*'nin *in vitro* şartlarda çoğaltımı ile ilgili bir çalışma yapmıştır. *R.rotundifolia*'nın *in vitro* çoğaltımı, sıvı ve MS agar ortamda yaprak, sürgün ucu, birinci ve ikinci koltukaltı meristemleri için BAP, TDZ, kinetin ve GA₃'in farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Sürgün ucu eksplantlarından 0,20 mg/L BAP ve 0,20 mg/L GA₃'de sıvı kültür ortamında, agar jel ortamına göre maksimum sayıda sürgün elde edilmiştir. TDZ'nin kullanıldığı MS ortamda da sürgün ucu eksplantından sıvı kültür ortamına göre daha fazla sürgün elde edilmiştir. Sürgün ucu eksplantından 0,05 mg/L TDZ' nin kullanıldığı MS ortamda, eksplant başına 59,67 adet sürgün meydana gelmiştir. *In vitro* çoğaltımla meydana gelen 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. Ama pH 8,0-9,0'daki diğer bitkilerde büyüme gözlenmiş olup, rejenerasyon ortamı bakımından bu ortamın uygun olduğu kaydedilmiştir.

Doğan (2013), hem su ekosisteminde hem de ticari açıdan önemli olan *C. demersum*'un *in vitro* koşullarda çoğaltımını hedeflemiştir. Bitkinin yüzey sterilizasyonu için çeşitli oran ve sürelerde hidrojen peroksit (H₂O₂) ve çamaşır suyu (NaOCI) kullanılmış ve en uygun steril eksplantlar, %5'lik H₂O₂ 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 GA₃) 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 GA₃ 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, köklendirme çalışması yapılmamıştır. Fakat kültür ortamlarında hormonların etkisiyle farklı oranlarda köklü bitkiler elde edilmiştir. Köklü ve köksüz bitkilerin su ortamına adaptasyonu sağlandığı rapor edilmiştir (%100).

Karataş ve ark. (2013), sucul ve tıbbi bitki olan *Bacopa monnieri*'nin adventif sürgün oluşumu için nodal eksplantlar ve yaprak eksplantları BAP-NAA içeren ortamlarda kültüre almışlardır. Tüm BAP-NAA içeren ortamlarda kallus ve sürgün oluşumu kaydedilmiştir. Her iki eksplantta en fazla eksplant başına sürgün sayısı 0,25 mg/L BAP+0,25 mg/L NAA içeren MS ortamlarında elde edilmiştir. Ortamdaki yüksek NAA oranı BAP'in tüm oranlarıyla olumsuz etki göstermiştir. 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.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneme Yeri

Tez kapsamında yapılan tüm *in vitro* çoğaltım ve adaptasyon çalışmaları Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Bitki Materyali

Tez kapsamında kullanılan *H. polysperma* bitkileri Karamandaki akvaryumcudan temin edilmiştir. Çalışmalar başlamadan önce bitkinin tayini Prof. Dr. Mehmet Karataş (Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü) ve Prof. Dr. Khalid Mahmood Khawar (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü) tarafından yapılmıştır.

3.1.3. Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları

Bu çalışmalarda MS (Murashige ve Skoog, 1962) mineral tuz ve vitaminleri (Çizelge 3.1) kullanılmıştır. Besi ortamı hazırlamak için %3 sukroz (Duchefa) ve %0,65'lik agar (Duchefa) ile katılaştırılan temel besin ortamı (MSO) kullanılmıştır. Sıvı kültür ile yapılan tüm denemelerde agar ilave edilmemiştir. Ortamın hazırlanmasında distile saf su kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalara göre besin ortamlarına farklı dozlarda bitki büyüme düzenleyicileri olarak sitokinin (BAP, TDZ, kinetin), oksin (IBA) ve Gibberellik asit (GA₃) ilave edilmiştir. Eksplantlarda endojenik bakteri kontaminasyonu önlemek amacıyla agar ile katılaştırılmış ortamlarda 500 mg/L Amoklavın de ilave edilmiştir. Buna karşı, agar ile katılaştırılmamış (sıvı) kültür ortamında ise Amoklavın kullanılmamıştır.

Hazırlanan ortamların pH'ı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5,8'e ayarlandıktan sonra 1,2 atmosfer basınç altında ve 121°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon

sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı veya LED ışığı altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta tutulmuşlardır. Tüm sıvı kültür çalışmaları beyaz LED ışık altında yürütülürken katı ortamlardaki denemeler floresan beyaz ışık altında devam ettirilmiştir.

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

Ortamda Bulunan Maddeler		Konsantrasyonu (mg/l)
<i>Makro Elementler</i>	NH_4NO_3	1650,000
	KNO_3	1900,000
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,000
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,000
	KH_2PO_4	170,000
<i>Mikro Elementler</i>	KI	0,830
	H_3BO_3	6,200
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,300
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,850
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,250
<i>Vitaminler</i>	Myo-Inositol	100,000
	Nicotinic Acid	0,500
	Pyrotinic Acid	0,500
	Thiamine-HCl	0,100
	Glycine	2,000

3.1.4. Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Hazırlaması ve Muhafazası

Bitki büyüme düzenleyicileri, uygun çözücülerle çözüldükten sonra 1 mg/L oranında stok solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonları $+4^{\circ}\text{C}$ veya -20°C sıcaklıkta saklanmıştır (Çizelge 3.2). Büyüme düzenleyicilerinden BAP, TDZ ve NAA otoklavda steril edilmeden, kinetin, GA_3 ve IBA ise otoklavda steril edildikten sonra

ortamlara ilave edilmiştir (Çizelge 3.2). Denemelerde kullanılan antibiyotik (Amoklavın) ise 100 mg/mL oranında stok solüsyon olarak hazırlanmıştır.

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

Bitki büyüme düzenleyicileri	Çözücü	Stok konsantrasyonu (mg/ml)	Sterilizasyon şekli	Saklama koşulları (°C)
Oksinler				
IBA	1N NaOH	1/1	Filtre	- 20
Sitokininler				
TDZ	DMSO	1/1	Otoklav	4
BAP	1N NaOH	1/1	Otoklav	4
Kinetin	1N NaOH	1/1	Filtre	- 20
Giberellin				
GA ₃	dH ₂ O	1/1	Filtre	- 20
Antibiyotik				
Amoklavın	dH ₂ O	100/1	-	- 20

3.2. Yöntem

3.2.1. *H. polysperma*'nın Yüzey Sterilizasyonu

H. polysperma bitkisinin yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarının sağlanacağı en düşük dezenfektan dozu belirlenmeye çalışılmıştır. Yüzey sterilizasyonu için 3-5 cm uzunluklarında gövdeler (2-3 boğum arası) farklı oranlarda ve sürelerde hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edilmiştir. Yüzey sterilizasyonundan sonra eksplantlar steril saf su ile 3 kez 5'er dakika durulanmıştır. Sterile olan eksplantlar (uç ve koltukaltı meristemi) steril petri tüpler içerisinde %3 sukroz içeren ve %0,65 agar ile katılaştırılan MS besi ortamında 24±1°C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.

3.2.2. Eksplant İzolasyonu

Sterilizasyon çalışmaları sonucunda bulaşıksız gövdelerden sürgün ucu ve birinci koltukaltı meristem eksplantları alınıp kültüre alınmıştır. *In vitro* koşullarda elde edilen

sürgünlerden daha sonraki denemeler için yaprak eksplantı izole edilmiştir. Bütün doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde aseptik koşullarda yapılmıştır.

3.2.3. Rejenere Olan Sürgünlerinin Köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler uygun uzunluğa geldiklerinde kesilerek steril Magenta GA⁷ içinde 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 ve 1,00 mg/L IBA ve 500 mg/L Amoklavin içeren MS ortamında köklendirilmeye alınmıştır. Sürgünlerin köklendirilmesi için farklı oranlarda sukroz (45, 60, 75 ve 90 g/L) denemesi de uygulanmıştır.

3.2.4. Bitki İçin Uygun pH Aralığının Belirlenmesi

Köklenen bitkilerin adaptasyonu için farklı pH'larda (4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0) su ayarlanmıştır. pH'ları ayarlanmış su içeren cam kavanozların (baby jar) dibine 2-3 cm yüksekliğinde ince kum yerleştirilmiştir. Daha sonra bitkiler, kavanozlara yerleştirilip, 24°C±2°C sıcaklığı ve 16 saat aydınlık (beyaz floresan, 4000 lüks) fotoperiyodunda gelişmeye bırakılmıştır. Bir diğer adaptasyon çalışması ise köklenmiş bitkilerin oda sıcaklığında çeşme suyu içeren akvaryumlara alınmasıdır.

3.2.5. İstatiksel Değerlendirme

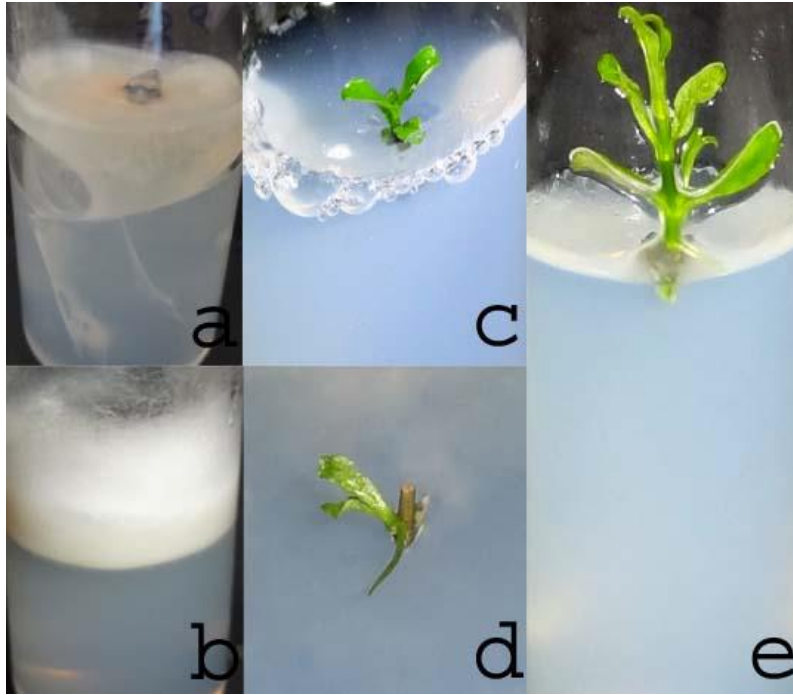
Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup her muamele, içerisinde 3 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü Magenta GA⁷ kutuları veya petrilerden oluşmuştur. Elde edilen veriler "SPSS 17 for Windows" programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuş muamele ortamlarını karşılaştırmak amacıyla M-STAT C bilgisayar programında Duncan testi kullanılmıştır. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce arcsin değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran, 1967).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *H. polysperma* Bitkisinin *In vitro* Sürgün Rejenerasyonu

4.2. *In vitro* Yüzey Sterilizasyon Çalışmaları

H. polysperma bitkisinin yüzey sterilizasyonu için 4-5 cm lik gövdeler ilk olarak çeşme suyu altında 5 dk yıkanmıştır. Daha sonra gövdeler %30-70 H₂O₂ ile 10 dakika muamele edilmiştir. Sürgün ucu, birinci ve ikinci koltukaltı meristem eksplantları steril koşullarda izole edilerek MS ortamında kültüre alınmıştır. Bir hafta içinde eksplantlar üzerinde bakteri (Şekil 4.1a) ve mantar (Şekil 4.1b) oluşumu gözlenmiştir. İki hafta sonra sağlam sürgün ucu (Şekil 4.1c) ve birinci koltukaltı meristem (Şekil 4.1d) eksplantlarında da sürgün oluşumu (Şekil 4.1e) gözlenmeye başlanmıştır. Sağlam bitkiler aynı ortamlarında büyümeye bırakılmıştır (Şekil 4.1e). Bir ay sonra bulaşık oran yüzdesine ait varyans analiz sonuçları çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *In vitro* koşullarda H₂O₂ ile yüzey sterilizasyon çalışması (a) bakteri ve (b) mantar oluşumu (c) sürgün ucu ve (d) birinci koltukaltı meristeminden sürgün oluşumu (e) büyümüş steril bitkiler

Çizelge 4.1. *H. polysperma* bitkisinin H₂O₂ ile yüzey sterilizasyonu çalışmasına ait varyans analizi

VK	SD	Sürgün ucu (%)		1. Koltukaltı meristemi (%)		2. Koltukaltı meristemi (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
H ₂ O ₂	4	2518,22	6,80**	3592,61	4,85**	307445,45	23,72**
Hata	10	370,36	-	7407,73	-	1296,60	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-	-	-

** $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Çizelge 4.1’de bulaşık oranı bakımından sürgün ucu, birinci ve ikinci koltukaltı meristem eksplantları ile H₂O₂ oranı arasındaki farklılık $p < 0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. H₂O₂’in sürgün ucu, birinci ve ikinci koltukaltı meristem eksplantları üzerine etkisi

H ₂ O ₂ oranı (%)	Sürgün ucu bulaşıklık oranı (%)	1. Koltukaltı meristemi bulaşıklık oranı (%)	2. Koltuk altı meristemi bulaşıklık oranı (%)
30	66,66 ^a	88,88 ^a	100,00 ^a
40	44,44 ^{ab}	77,77 ^{ab}	100,00 ^a
50	22,22 ^{bc}	33,33 ^{bc}	49,99 ^b
60	0,00 ^c	22,22 ^c	44,44 ^b
70	0,00 ^c	11,11 ^c	33,33 ^b

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

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi sürgün ucu, birinci ve ikinci koltukaltı meristem eksplantları üzerine bulaşık oranı sırasıyla %0,00-66,66; %11,11-88,88 ve %33,33-100,00 arasında kaydedilmiştir. Tüm eksplantlarda H₂O₂ oranı arttıkça bulaşık oranı azaldığı gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Tüm eksplantlarda en fazla bulaşık oranı %30 H₂O₂ muamelesinde gözlenmişken, en az bulaşık oranı %70 H₂O₂ oranında tespit edilmiştir. Eksplantlar bakımından sürgün ucu eksplantında H₂O₂’in her oranında diğer eksplantlara göre daha az bulaşık olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2). Sterilizasyon

çalışmalarından sonra elde edilen steril sürgün ucu ve birinci koltukaltı meristem eksplantları denemeler için kullanılmıştır.

4.3. Sıvı Kültürü ile *H. polysperma* Bitkisinin *In vitro* Sürgün Rejenerasyonu

4.3.1. Sıvı Ortamda Farklı BAP Dozlarının *H. polysperma* Bitkisinin Sürgün Ucu ve Birinci Koltukaltı Meristem Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu

H. polysperma bitkisinin sürgün ucu ve birinci koltukaltı meristem eksplantları 0,10-0,80 mg/L BAP içeren ve agar ile katılaştırılmamış MS ortamına alınarak bir haftalık gözleme tabi tutulmuştur. Denemede kullanılan eksplantlarda, tüm ortamlarda iki hafta içinde hem kallus hem de sürgün oluşumu gözlenmeye başlanmıştır. Altı hafta sonra (Şekil 4.2 a,b) kallus oluşumu oranı, sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı sonuçları kaydedilmiştir. Her iki eksplantta, kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon oranı %100 olduğu için varyans analizine tabi tutulmamış olup, sürgün sayısı için varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.3).



Şekil 4.2. Sıvı ortamda *H. polysperma* bitkisinin sürgün rejenerasyonu (a) sürgün ucu ve (b) birinci koltukaltı meristeminden sürgün ve kallus oluşumu

Çizelge 4.3. Sıvı ortamda farklı BAP dozlarının *H. polysperma* bitkisinin sürgün ucu ve birinci koltukaltı meristem eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Sürgün ucu (adet)		1. koltukaltı meristemi (adet)	
		KO	F	KO	F
BAP	4	47,17	1,54**	25,07	2,71**
Hata	10	30,67	-	9,27	-
Genel toplam	14	-	-	-	-

** $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Her ortamda %100 rejenerasyon sağlanmıştır. Çizelge 4.3'e bakıldığında farklı oranlardaki sıvı BAP bitki büyüme düzenleyici maddesi konsantrasyonları sürgün ucu ve birinci koltukaltı meristem eksplantlarında $p < 0,01$ düzeyinde farklılık göstermiştir. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Sıvı ortamda farklı BAP dozlarının *H. polysperma* bitkisinin sürgün ucu ve birinci koltukaltı meristem eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisi

BAP (mg/l)	Sürgün ucu (adet)	1. koltukaltı meristemi (adet)
0,10	25,33 ^a	21,67 ^a
0,20	21,00 ^a	17,67 ^{ab}
0,40	20,00 ^a	14,67 ^b
0,60	17,00 ^a	15,67 ^b
0,80	15,00 ^a	15,00 ^b

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

Denemede kullanılan 0,10-0,80 mg/L BAP içeren MS ortamlarında her iki eksplanttan kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon oranı %100 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.4). Eksplant başına sürgün sayısı bakımından sürgün ucu ve birinci koltukaltı meristem eksplantlarından sırasıyla 15,00-25,33 ve 14,67-21,67 adet elde edilmiştir. Tüm eksplantlarda en yüksek sürgün sayısı 0,10 mg/L BAP içeren ortamda gözlenirken; en düşük sürgün sayısının ise sürgün ucunda 0,80 mg/L BAP ve birinci koltukaltı meristeminde 0,40 mg/L BAP'lı ortamlarda olduğu görülmüştür. Her iki eksplantta da

hormon miktarı arttıkça sürgün sayısı azalmaktadır (Çizelge 4.4). Her iki eksplant kıyaslandığında sürgün ucu eksplantından birinci koltukaltı meristem eksplantlarına göre 0,80 mg/L BAP ortamı hariç BAP'in her oranında daha fazla eksplant başına sürgün sayısı kaydedilmiştir. Meydana gelen tüm sürgünler IBA'lı ortamda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

4.3.2. Sıvı BAP Ortamda *H. Polysperma* Bitkisinin Sürgün Ucu Eksplantından İkincil Sürgün Rejenerasyon Çalışması

Bir önceki denemedeki (4.3.1) sürgün ucu eksplantından sürgün alındıktan sonra kallus ile sürgün uçlarından kalan eksplantlar kesilerek yine aynı ortamda kültüre alınmıştır. İki hafta içinde eksplantlar üzerinde sürgün oluşumu (Şekil 4.3a) görülmeye başlanmıştır. Üç hafta sonra çoklu sürgün oluşumu (Şekil 4.3b) gözlenirken, beş hafta sonra kallus oluşumu (Şekil 4.3c) da kaydedilmiştir. Sekiz hafta sonra (Şekil 4.3d,e) sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu sonuçları alınmış olup bu oranlar varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.5).



Şekil 4.3. Sürgün ucu eksplantından sıvı BAP ortamında sürgün oluşumu (a) iki hafta (b) üç hafta (c) beş hafta ve (d,e) sekiz hafta sonra sürgün rejenerasyonu

Çizelge 4.5. Sıvı ortamda farklı BAP dozlarının *H. polysperma* bitkisinin sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Sürgün rejenerasyon oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
BAP	4	88,54	0,61 ^{ös}	11,40	0,22 ^{ös}	0,63	2,80**
Hata	10	145,83	-	51,65	-	0,23	-
Genel toplam	14	-	-	-	-	-	-

** $p < 0,01$ düzeyinde önemli, ^{ös} önemsiz

Çizelge 4.5'te farklı BAP (sıvı) ortamlarında sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu oranı ve eksplant başına sürgün sayısı istatistiki olarak önemsiz bulunurken, sürgün uzunluğunun $p < 0,01$ düzeyinde öneme sahip olduğu görülmüştür. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Sıvı ortamda farklı BAP dozlarının *H. polysperma* bitkisinin sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

BAP (mg/l)	Sürgün rejenerasyonu oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Sürgün uzunluğu (cm)
0,10	100,00 ^{ös}	11,58 ^{ös}	0,61 ^b
0,20	91,66	15,91	1,61 ^a
0,40	95,83	13,83	0,63 ^b
0,60	87,50	13,41	0,51 ^b
0,80	87,50	11,02	0,61 ^b

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

^{ös} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark yoktur.

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi BAP'in farklı konsantrasyonları sürgün rejenerasyonu oranı ve eksplant başına sürgün sayısı üzerinde benzer etkiler yapmış olup, aralardaki farklılığı önemsiz bulunmuştur. Sürgün rejenerasyonu %87,50-100,00 olarak kaydedilirken eksplant başına sürgün sayısı ise 11,02-15,91 adet arasında elde

edilmiştir. En fazla eksplant başına sürgün sayısı ise 0,20 mg/L BAP içeren ortamdan elde edilmiştir (Çizelge 4.6). Sürgün uzunluğu ise 0,61-1,61 cm arasında gözlenirken, en uzun sürgün 0,20 mg/L BAP içeren ortamda bulunmuştur (Çizelge 4.6). Diğer tüm ortamlarda sürgün uzunluğunda istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Elde edilen sürgünler farklı oranlardaki IBA ortamında köklendirildikten sonra adaptasyonu sağlanmıştır.

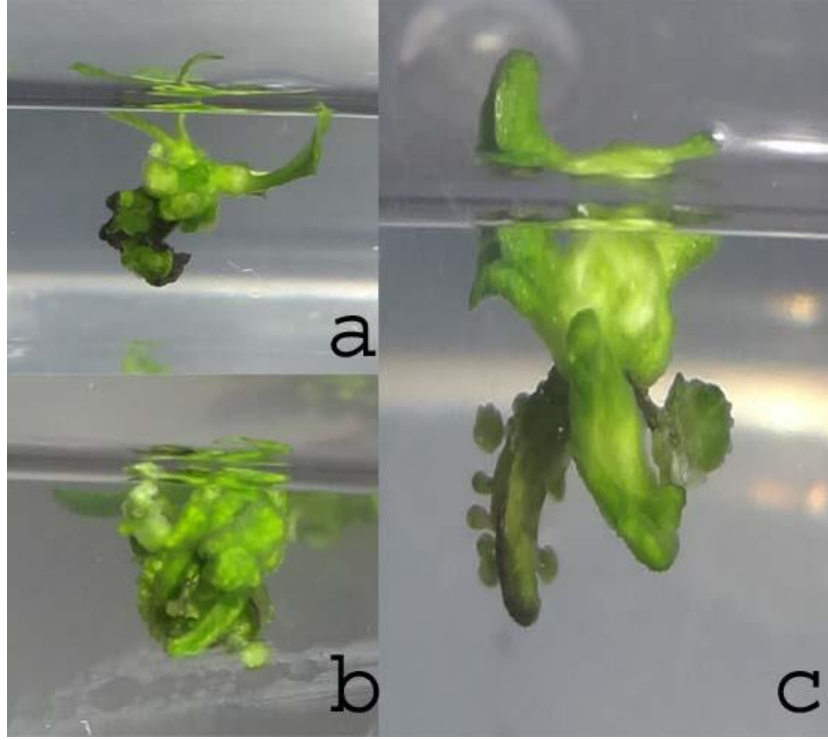
4.3.3. Sıvı Ortamda Farklı BAP Oranlarının *H. Polysperma* Bitkisinin Yaprak Eksplantından Sürgün Rejenerasyonu

Bu denemede *in vitro* koşullarda elde edilen *H. polysperma* bitkilerinden yaprak eksplantı alınarak 0,50-2,50 mg/L BAP içeren ve agar ile katılaştırılmamış MS ortamlarında kültüre alınmıştır. İki hafta içinde ortamlarda eksplant üzerinde sürgün oluşumu görülmeye başlanmıştır (Şekil 4.4a). Dört hafta sonra, eksplant üzerinde kallus oluşumu ile çoklu sürgün oluşumu (Şekil 4.4b) gözlenmiştir. Altı hafta sonra bazı yaprakların kenarlarında da sürgün uçları (Şekil 4.4c) görülmeye başlamıştır. Altı hafta sonra sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı sonuçları kaydedilmiş olup varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Sıvı ortamda farklı BAP oranlarının *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Sürgün rejenerasyonu oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F
BAP	4	3,78	2,99**	67,71	0,2**
Hata	10	1,27	-	281,25	-
Genel toplam	14	-	-	-	-

** $p < 0,01$ düzeyinde önemli



Şekil 4.4. Sıvı ortamda *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonu (a) iki hafta sonra sürgün oluşumu (b) dört hafta sonra çoklu sürgün ve kallus oluşumu (c) yaprakların kenarlarında sürgün oluşumu

Çizelge 4.7 incelendiğinde farklı oranlardaki BAP içeren ortamlarda yaprak eksplantından eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün rejenerasyonunun $p < 0,01$ düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları aşağıdaki Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Sıvı ortamda farklı BAP oranlarının *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından sürgün sayısı ve rejenerasyonuna etkisi

BAP (mg/l)	Sürgün rejenerasyon oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
0,50	66,33 ^a	5,03 ^{ab}
1,00	62,33 ^a	5,11 ^a
1,50	53,67 ^a	2,99 ^{ab}
2,00	45,33 ^a	3,30 ^{ab}
2,50	58,00 ^a	2,85 ^b

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

^{ös}Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark yoktur.

Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi sürgün rejenerasyonunda en yüksek oranın (% 66,33) 0,50 mg/L BAP’lı ortamda, en düşük oranın ise (% 45,33) 2,00 mg/L BAP’lı ortamda olduğu saptanmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı 2,85-5,11 adet arasında değişmiştir. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı 1,00 mg/L BAP içeren ortamdan elde edilirken, en düşük sürgün sayısı 2,50 mg/L BAP içeren ortamda kaydedilmiştir. Deneme sonuçlarına göre MS ortamda 0,50, 1,00 mg/L BAP dozları 1,50, 2,00 ve 2,50 mg/L BAP dozlarına göre hem sürgün rejenerasyonu hem de eksplant başına sürgün sayısı bakımından daha iyi olmuştur (Çizelge 4.8). *In vitro* koşullarda elde edilen sürgünler IBA içeren ortamda köklendirilip akvaryumlarda adaptasyon sağlanmıştır.

4.3.4. Sıvı Ortamda Farklı BAP-GA₃ Oranlarının *H. Polysperma* Bitkisinin Yaprak Eksplantından Sürgün Rejenerasyonu

Deneme 4.3.3’te yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait veriler alındıktan sonra ortamların üzerine 1 mg/L GA₃ dökülmüştür. Bir hafta sonunda bitkilerin büyümeye başladığı görülmüştür. Ortamlara GA₃ döküldükten üç hafta sonra ise eksplant başına sürgün sayısı, sürgün rejenerasyonu ve sürgün uzunluğu sonuçlarının varyans analizi yapılmış olup aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Sıvı ortamda farklı BAP-GA₃ oranlarının *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından ikincil sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Sürgün rejenerasyon oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F		
BAP-GA ₃	4	901,04	2,54*	27,51	3,20**	0,60	4,71**
Hata	10	354,17	-	8,60	-	0,13	-
Genel toplam	14	-	-	-	-	-	-

** $p < 0,01$ düzeyinde önemli, * $p < 0,05$ düzeyinde önemli

Çizelge 4.9’a bakıldığında farklı oranlardaki BAP ve 1 mg/L GA₃ içeren ortamlarda yaprak eksplantının sürgün rejenerasyonunda önemin $p < 0,05$, eksplant başına sürgün sayısının ve sürgün uzunluğunu ise $p < 0,01$ düzeyinde önemli olduğu kaydedilmiştir. Bu

farklılığın önem düzeyini belirlemek amaçlı Duncan testi yapılmış ve sonuçları aşağıdaki Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Sıvı ortamda farklı BAP-GA₃ oranlarının *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

BAP (mg/l)	Sürgün rejenerasyonu oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Sürgün uzunluğu (cm)
0,50	70,83 ^a	7,27 ^{ab}	1,24 ^a
1,00	75,00 ^a	10,92 ^a	0,23 ^b
1,50	45,83 ^{ab}	3,27 ^b	0,37 ^b
2,00	58,33 ^{ab}	5,10 ^b	0,24 ^b
2,50	33,33 ^b	4,33 ^b	0,18 ^b

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

Çizelge 4.10’da görüldüğü gibi sürgün rejenerasyonu %33,33-75,00, eksplant başına sürgün sayısı 3,27-10,92 adet ve sürgün uzunluğu 0,18-1,24 cm arasında kaydedilmiştir. En fazla sürgün rejenerasyonu (%75,00) ve eksplant başına sürgün sayısı (10,92 adet) 1,00 mg/L BAP+1 mg/L GA₃ içeren ortamdan elde edilirken en yüksek sürgün uzunluğu (1,24 cm) ise 0,50 mg/L BAP+1 mg/L GA₃ içeren ortamda görülmüştür (Çizelge 4.10). En düşük eksplant başına sürgün sayısı (3,27 adet) 1,50 mg/L BAP+1 mg/L GA₃’li ortamda gözlenirken en düşük sürgün rejenerasyonu (%33,33) ve uzunluğu (0,18 cm) 2,50 mg/L BAP+1 mg/L GA₃ içeren ortamda saptanmıştır. BAP oranının az olmasının eksplant başına sürgün sayısının, sürgün uzunluğunun ve sürgün rejenerasyonunun artmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). Bu denemeden elde edilen sürgünler IBA içeren ortamlarda köklendirilmiş olup adaptasyon için akvaryumlara alınmıştır.

4.4. Agar ile Katılaştırılmış Ortamlarda *H. polysperma* Bitkisinin *In vitro* Sürgün Rejenerasyonu

4.4.1. Farklı Kinetin Dozlarının *H. Polysperma* Bitkisinin Sürgün Ucu Eksplantından Sürgün Rejenerasyonu

Bu çalışmada *H. polysperma* bitkisinin yaprakları 0,1, 0,2, 0,4 ve 0,8 mg/L oranlarında kinetin içeren ortamlara konulmuştur. Üç hafta içinde eksplant üzerinde kallus oluşumu ile çoklu sürgün oluşumu (Şekil 4.5a) gözlenmiştir. Dört hafta sonra eksplant ve yapraklar üzerinde kararma da (Şekil 4.5b) görülmüştür. Ontogenetik değişiklikle beraber rejenere olan sürgünlerde yaprakları ilk önce ince, dar, uzun (Şekil 4.5c) ve daha sonra normal şekline dönüştüğü (Şekil 4.5d) görülmüştür. Dokuz hafta sonunda ise kallus oluşumu oranı, sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu sonuçları alınmıştır. Tüm eksplantlarda %100 kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu gözleendiği için varyans analizi yapılmamıştır. Eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.5. *H. polysperma* bitkisinin sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu (a) üç hafta sonra sürgün ve kallus oluşumu (b) eksplant ve yapraklarda kararma (c) ince yaprakların oluşumu (d) yaprakların normal şeklini alması

Çizelge 4.11. Farklı kinetin dozlarının *H. polysperma* bitkisinin sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
Kinetin	3	260,67	11,42**	1,28	44,21**
Hata	8	22,83	-	0,03	-
Genel toplam	11	-	-	-	-

** $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Çizelge 4.11’de oluşan sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunun $p < 0,01$ önem derecesine sahip olduğu saptanmıştır. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları aşağıdaki Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Katı ortamda farklı kinetin dozlarının *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Kinetin (mg/l)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Sürgün uzunluğu (cm)
0,10	9,33 ^c	0,77 ^b
0,20	14,00 ^{bc}	0,98 ^b
0,40	31,00 ^a	2,17 ^a
0,80	19,00 ^b	0,87 ^b

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

Denemede kullanılan 0,10-0,80 mg/L kinetin içeren MS ortamlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon oranı %100 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.12). Çizelgeye bakıldığında eksplant başına sürgün sayısı 9,33-31,00 adet arasında kaydedilmiştir. Sürgün uzunluğu ise 0,77-2,17 cm olarak bulunmuştur. En düşük sürgün sayısı (9,33 adet) ve uzunluğu (0,77 cm) 0,10 mg/L kinetin içeren ortamda görülürken, en çok sürgün sayısı (31,00 adet) ve sürgün uzunluğu (2,17 cm) ise 0,40 mg/L kinetin içeren ortamda olduğu saptanmıştır. Elde edilen sürgünler köklendirildikten sonra akvaryum ortamına aktarılmıştır.

4.4.2. *H. Polysperma* Bitkisinin Yaprak Eksplantında Kin-IBA İle Sürgün Rejenerasyonu

H. polysperma bitkisinin sürgün rejenerasyonu için yaprak eksplantları 0,10-1,60 mg/L kinetin veya 0,10-1,60 mg/L Kin+0,10 mg/L IBA içeren 10 farklı ortamda kültüre alınmıştır. İki hafta içinde ortamlarda çoklu sürgün oluşumu (Şekil 4.6) gözlenmeye başlanmıştır. Altı hafta sonra ise kallus oluşturan eksplant yüzdesi, sürgün rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunun varyans analizi Çizelge 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.6. *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonu (a) iki hafta sonra sürgün oluşumu (b) yapraklarda kararma (c) dört hafta sonra sürgün oluşumu (d) altı hafta sonraki görünümü

Çizelge 4.13. Katı ortamda farklı kinetin ve IBA oranlarının *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün rejenerasyon oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Kinetin-IBA	9	3706,02	14,82**	3706,02	29,65**
Hata	20	250,00	-	125,00	-
Genel toplam	29	-	-	-	-
VK	SD	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
Kinetin-IBA	9	100,46	119,80**	0,33	3,21**
Hata	20	0,84	-	0,10	-
Genel toplam	29	-	-	-	-

** $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Çizelge 4.13 incelendiğinde kallus oluşumu, sürgün rejenerasyonu, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunda farklı kinetin-IBA dozlarının $p < 0,01$ düzeyinde etkileşimi görülmüştür. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı kinetin ve Kin-IBA oranlarının *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Kin (mg/l)	IBA (mg/l)	Kallus oluşum oranı (%)	Sürgün rejenerasyon oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Sürgün uzunluğu (cm)
0,10	-	0,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^e	0,00 ^c
0,20	-	0,00 ^b	33,33 ^b	2,53 ^d	0,70 ^{ab}
0,40	-	0,00 ^b	50,00 ^b	1,83 ^d	0,47 ^{bc}
0,80	-	8,33 ^b	41,67 ^b	1,83 ^d	0,42 ^{bc}
1,60	-	8,33 ^b	41,67 ^b	1,33 ^{de}	0,45 ^{bc}
0,10	0,10	50,00 ^a	100,00 ^a	2,41 ^d	1,15 ^a
0,20	0,10	75,00 ^a	91,67 ^a	8,66 ^c	0,76 ^{ab}
0,40	0,10	75,00 ^a	91,67 ^a	11,20 ^b	0,78 ^{ab}
0,80	0,10	66,66 ^a	100,00 ^a	16,33 ^a	1,03 ^{ab}
1,60	0,10	75,00 ^a	91,67 ^a	12,58 ^b	0,82 ^{ab}

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

Çizelge 4.14'e bakıldığında 0,10-1,60 mg/L kinetin içeren ortamlarda kallus oluşumu %0,00-8,33, sürgün rejenerasyonu %0,00-50,00, eksplant başına sürgün sayısı 0,00-2,53 adet ve sürgün uzunluğu 0,00-0,70 cm arasında kaydedilmiştir. 0,10 mg/L kinetin içeren ortamda herhangi bir gelişme olmadığı için kallus oluşumu, sürgün rejenerasyonu, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu kaydedilmemiştir (Çizelge 4.14). En fazla eksplant başına sürgün sayısı (2,53 adet) ve sürgün uzunluğu (0,70 cm) 0,20 mg/L kinetin içeren ortamda, en fazla kallus oluşumu (%8,33) 0,80, 1,60 mg/L kinetin içeren ortamlarda, sürgün rejenerasyonu (%50,00) ise 0,40, mg/L kinetin içeren ortamda görülmüştür (Çizelge 4.14). Ortamlara 0,10 mg/L IBA eklenmesinin kallus oluşumu, sürgün rejenerasyonu, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu üzerinde olumlu etki gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.14). 0,10-1,60 mg/L Kin+0,10 mg/L IBA içeren ortamlarda ise kallus oluşumu %50,00-75,00, sürgün rejenerasyonu %91,67-100,00, eksplant başına sürgün sayısı 2,41-16,33 adet ve sürgün uzunluğu 0,76-1,15 cm olarak saptanmıştır. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı (16,33adet) 0,80 mg/L Kin+0,10 mg/L IBA içeren ortamdandır, en uzun sürgünler (1,15 cm) 0,10 mg/L Kin+0,10 mg/L IBA içeren ortamdandır, en çok sürgün rejenerasyonu (%100,00) 0,10, 0,80 mg/L

Kin+0,10 mg/L IBA içeren ortamlardan, en yüksek kallus oluşumu ise (%75,00) 0,20, 0,40, 1,60 mg/L Kin+0,10 mg/L IBA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Bu denemeden elde edilen sürgünler farklı oranlarda sukroz ve 0,40 mg/L IBA içeren ortamlarda köklendirilmeye alınmış daha sonra adaptasyon için farklı pH'larda ayarlanan su içeren cam kavanozlara aktarılmıştır.

4.4.3. *H. Polysperma* Bitkisinin Yaprak Eksplantından TDZ-IBA İle Sürgün Rejenerasyonu

H. polysperma bitkisinin yaprak eksplantı sürgün rejenerasyonu için 0,10-1,60 mg/L TDZ+0,10 mg/L IBA içeren 10 farklı ortamda kültüre alınmıştır. 1 hafta içinde eksplant üzerinde bakteri kontaminasyonu gözlenmiş olup, eksplantlar 500 mg/L Amoklavim ilave edilen ortamda kültüre alınmıştır. 7 gün içinde eksplantların kenarlarında direkt sürgün oluşumu gözlenirken 3 hafta sonra kallus oluşumu görülmüştür (Şekil 4.7). 8 hafta sonra ise kallus oluşturan eksplant yüzdesi, sürgün rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu incelenmiş olup varyans analizi aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.15).



Şekil 4.7. *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonu (a) üç hafta sonra sürgün ve kararma (b) altı hafta sonraki sürgünler ve beliren yapraklar (c) sekiz hafta sonunda yaprakların büyümesi

Çizelge 4.15. Katı ortamda farklı TDZ ve IBA oranlarının *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün rejenerasyonu oranı (%)	
		KO	F	KO	F
TDZ-IBA	9	1069,44	4,11**	701,39	6,73**
Hata	29	260,42	-	104,17	-
Genel toplam	38	-	-	-	-
VK	SD	Eksplant Başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
TDZ-IBA	9	60,21	2,16**	0,13	19,0**
Hata	29	27,83	-	0	-
Genel toplam	38	-	-	-	-

** $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Çizelge 4.15 gözlemlendiğinde kallus oluşumu, sürgün rejenerasyonu, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunda TDZ-IBA dozlarının $p < 0,01$ düzeyinde etkileşimi görülmüştür. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.16’ya bakıldığında denemede 0,10-1,60 mg/L TDZ içeren ortamlarda kallus oluşumu %50,00-93,75 arasında kaydedilirken, 0,10-1,60 mg/L TDZ+0,10 mg/L IBA içeren ortamlarda %81,25-100,00 olarak kaydedilmiştir. 0,80 mg/L TDZ içeren ortam dışında tüm ortamlarda kallus oluşumunun istatistiksel olarak önemi bulunmamıştır (Çizelge 4.16). Sürgün rejenerasyon oranına bakıldığında 0,10-1,60 mg/L TDZ içeren MS ortamlarda 62,50-100,00 arasında kaydedilmiştir. Buna karşın, ortama 0,10 mg/L IBA eklendiğinde sürgün rejenerasyonu %100,00 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.16). Eksplant başına sürgün sayısı ise 9,40-13,67 adet ve 13,43-20,55 adet olarak sırasıyla 0,10-1,60 mg/L TDZ ve 0,10-1,60 mg/L TDZ+0,10 mg/L IBA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu verilerine göre 0,10-1,60 mg/L TDZ içeren MS ortamlarda 0,35-0,43 cm arasında kaydedilirken, istatistiksel olarak aralarında farklılık

bulunmamıştır (Çizelge 4.16). Fakat 0,10 ve 0,20 mg/L TDZ içeren ortamlara 0,10 mg/L IBA ilave edildiğinde sürgün uzunluğunda artış görülmüştür. 0,10-1,60 mg/L TDZ+0,10 mg/L IBA içeren ortamlarda sürgün uzunluğu 0,31-0,86 cm arasında kaydedilmiştir.

Çizelge 4.16. Farklı TDZ-IBA oranlarının *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantının sürgün rejenerasyonuna etkisi

TDZ (mg/l)	IBA (mg/l)	Kallus oluşumu oranı (%)	Sürgün rejenerasyon oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Sürgün uzunluğu (cm)
0,10	-	75,00 ^a	87,50 ^{ab}	10,18 ^{bc}	0,43 ^c
0,20	-	93,75 ^a	100,00 ^a	12,68 ^{abc}	0,35 ^c
0,40	-	75,00 ^a	75,00 ^{bc}	11,95 ^{abc}	0,36 ^c
0,80	-	50,00 ^b	62,50 ^c	9,40 ^c	0,36 ^c
1,60	-	87,50 ^a	87,50 ^{ab}	13,67 ^{abc}	0,38 ^c
0,10	0,10	81,25 ^a	100,00 ^a	20,55 ^a	0,86 ^a
0,20	0,10	100,00 ^a	100,00 ^a	19,61 ^a	0,72 ^b
0,40	0,10	100,00 ^a	100,00 ^a	13,43 ^{abc}	0,38 ^c
0,80	0,10	100,00 ^a	100,00 ^a	18,43 ^{ab}	0,34 ^c
1,60	0,10	100,00 ^a	100,00 ^a	15,52 ^{abc}	0,31 ^c

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

Genel olarak, en çok ve uzun sürgünler 0,10 mg/l TDZ +0,10 mg/l IBA içeren ortamda bulunmuştur (Çizelge 4.16). En düşük kallus oluşumu, sürgün rejenerasyonu, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu 0,80 mg/l TDZ içeren ortamda gözlenmiştir (Çizelge 4.16). Elde edilen sürgünler farklı dozlardaki IBA ortamında köklendirildikten sonra adaptasyon için akvaryuma alınmıştır.

4.5. *In vitro* Köklendirme

4.5.1. Farklı IBA Oranlarının Kök Oluşumuna Etkisi

Sürgün rejenerasyonu denemelerinden elde edilen *H. polysperma* sürgünleri köklendirme için 0,20, 0,40, 0,60, 0,80, 1,00 mg/L IBA içeren ve 500 mg/L Amoklavın içeren MS ortamlara alınmıştır. Bir hafta içinde sürgünlerin alt kısmında kök uçları görülmeye başlanırken, iki hafta içinde tüm ortamlarda %100 köklendirme sağlanmıştır. Dört hafta sonra sürgünler alınıp adaptasyon çalışmaları için kullanılmıştır.



Şekil 4.8. Farklı IBA ortamlarında kök oluşumları

4.5.2. Farklı Sukroz Oranlarının Kök Oluşumuna Etkisi

Yaprak eksplantlarından elde edilen sürgünler köklendirilme amacıyla 45, 60, 75 ve 90 g sukroz ile 0,40 mg/L IBA içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Üç hafta sonra tüm sürgünlerde kök oluşumu (Şekil 4.9) gözlenmiş olup, elde edilen verilerin varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Katı ortamda farklı sukroz oranlarının *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından elde edilen kök uzunluğu analizi

VK	Kök Uzunluğu	
	KO	F
Sukroz	0,15	3,20**
Hata	0,46	-
Genel toplam	-	-

** $p < 0,01$ düzeyinde önemli



Şekil 4.9. Sukroz içeren ortamlardan kök oluşumları

Çizelge 4.17 incelendiğinde farklı oranlardaki sukroz içeren MS ortamlarında yaprak eksplantından elde edilen kök uzunluğunun $p < 0,01$ düzeyinde öneme sahip olduğu bulunmuştur. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.18’te verilmiştir.

Çizelge 4.18. Katı ortamdaki farklı sukroz oranlarının *H. polysperma* bitkisinin yaprak eksplantından kök uzunluğuna etkisi

Sukroz (g)	IBA (mg/l)	Kök uzunluğu (cm)
45	0,40	0,80 ^b
60	0,40	0,87 ^{ab}
75	0,40	1,20 ^a
90	0,40	0,80 ^b

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

Sukroz miktarının az ya da çok olması kök oluşumunu olumsuz etkilemediği görülmüştür. Çizelge 4.18'te en fazla kök uzunluğunun 75 g sukroz+0,40 mg/l IBA ve en kısa kökün ise 45 g+0,40 mg/l IBA içeren ortamda olduğu kaydedilmiştir. Ortamlarda sukroz oranı artışıyla (45-75 g/l) paralel olarak kök uzunluğunda arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.18). Köklendirilmiş bitkilerin akvaryumlarda başarıyla adaptasyonu sağlanmıştır.

4.6. *In vitro* Koşullarda Elde Edilen Sürgünlerin Dış Şartlara Adaptasyonu

4.6.1 Büyüme ve Gelişme için En Uygun Ph'ın Belirlenmesi

In vitro köklendirilmiş bitkilerin adaptasyonu için en uygun pH'ı belirlemek amacıyla distile su 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 pH'larda toprak-taş marka akvaryum kumu (Şekil 4.10) cam kavanozlara doldurulmuştur. Bitkileri cam kavanozlara aktarmadan önce bitkilerin uzunluğu ve boğum arası sayıları alınmıştır. Daha sonra, rastgele 5'er adet bitki seçilerek cam kavanozlara dikilmiştir. Cam kavanozlarda üç hafta bekletilen (Şekil 4.11) bitkilerin uzunluğu ve boğum arası sayıları ölçülmüştür (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. Farklı pH'larda su içeren cam kavanozlarda bitkilerin üç hafta sonunda boyunda ve boğum araları sayılarındaki artış

pH	Uzunluk (cm)	3 hafta sonraki uzunluğu (cm)	Fark (%100)	Boğum Arası Sayıları	3 hafta sonraki sayıları	Fark (%100)
4,0	3,75	4,12	9,86	3,50	4,75	35,71
5,0	3,37	4,25	26,11	3,00	4,75	58,33
6,0	2,75	4,25	54,54	2,25	4,50	100
7,0	2,87	5,00	74,21	2,75	4,75	72,72
8,0	3,37	5,12	51,92	2,75	4,75	72,72
9,0	3,62	6,00	65,74	2,75	5,25	90,90
10,0	3,37	4,87	44,51	3,25	4,25	30,76

Çizelge 4.19 gözlemlendiğinde bitkilerin üç hafta sonunda boylarının uzunlukları ve boğum arası sayılarının arttığı görülmüştür. Uzunluklara bakıldığında en çok artış (%74,21) pH'ı 7,0 olarak ayarlanmış su içeren cam kavanozda gözlenirken en az artışın (%9,86) su pH'ı 4,0 olan cam kavanozda olduğu kaydedilmiştir (Çizelge 4.19). Bitkinin boğum arası sayısında en çok artış (%90,90) pH 9,0'da gözlemlenirken en az artışın (%30,7) ise pH 10,0'da olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.19). Bitkinin boğum arası sayı artışının uzunluk artışına oranla daha fazla olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.19). Hem bitkinin uzunluğu açısından hem de boğum arası sayıları açısından en uygun pH 7,0, 8,0 ve 9,0 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.19). Buna karşı, hem sürgün uzunluğundaki hem de boğum arası sayılarındaki en az artışın çok bazik (pH 10,0) ortamda olduğu gözlemlenmiştir.



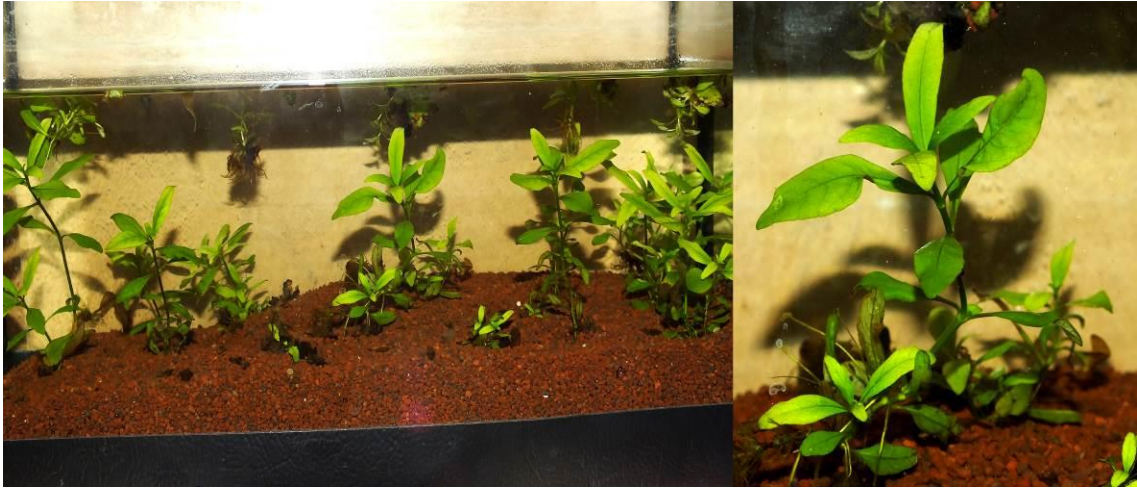
Şekil 4.10. Cam kavanozlarda büyümüş bitkiler



Şekil 4.11. Farklı pH'larda bitki büyüme ve gelişmesi

4.6.2 Akvaryum Koşullarda Bitkilerin Adaptasyonu

Rejenere olan köklü sürgünlerin dış koşullara adaptasyonu için çeşme suyu (Cl: 0,5 ppm, pH: 8,5) içeren akvaryum ortamına da aktarılmıştır. Akvaryumlarda bir hafta içinde bitkilerin boylarında ve yapraklarında belirgin şekilde uzama ve gelişmeler kaydedilmiştir (Şekil 4.12). *In vitro* rejenere olan bitkiler akvaryumda iklim oda koşullarında büyüme ve gelişmede herhangi olumsuz etki göstermeden devam etmişlerdir.



Şekil 4.12. Akvaryumda *in vitro* gelişen bitkilerin adaptasyonu

5. TARTIŞMA

Türkiye’de akvaryum bitkileri genelde yurt dışından ithal edilmektedir. Bu yolla ülkemiz önemli derecede döviz kaybına uğramaktadır. *H. polysperma* da Türkiye’de akvaryumlarda kullanılan önemli bitkilerden birisidir ve çeşitli yollardan ülkemize getirilmesi büyük mali kayıplara neden olmaktadır. Bu tez çalışmasında doku kültürü ile bitki çoğaltımı yapılarak yerel kaynaklarla akvaryum ve akar sularda biyoindikatör olarak bitki üretimini sağlamak amaçlanmıştır.

In vitro koşullarda mikroçoğaltım için bitkilerin yüzey sterilizasyonu sağlamak amacıyla farklı oranlarda ve sürede H₂O₂ denenmiştir. H₂O₂ birçok akvaryum bitkisinin yüzey sterilizasyonunda başarıyla kullanılmıştır (Çiftçioğlu, 2013; Doğan, 2013). En iyi sonuç %70 H₂O₂ ile 10 dk muamele sonucu elde edilmiştir. Benzer şekilde *Bacopa monnieri* bitkisinde %40 H₂O₂ (Karataş ve ark., 2013), *C. demersum* bitkisinde %5 H₂O₂ (Doğan, 2013) ve *R. rotundifolia* bitkisinde %9 ve %12 H₂O₂ (Çiftçioğlu, 2013) kullanılmıştır. Buna karşın, Jenks ve ark. (1990), *Epiphyllous* bitkisinin yaprak eksplantını 30 dk çeşme suyunda tuttuktan sonra 90 sn %50 etanolla muamele etmiş ve 5 dk durulama yapmışlardır. Daha sonra 12 dk %1,31’lik NaOCl ve Tween-20 (2d/100mL) ile 5 dk muamele ettikten sonra 3 kere durulamışlardır. Karataş ve ark. (2012), *Ceratophyllum demersum* L. bitkisinin üst gövdelerini izole ederek çeşitli oranlarda ve sürede H₂O₂ ve ticari çamaşır suyu (NaOCl-ACE) ile muamele etmiş ve H₂O₂’in çamaşır suyuna göre daha iyi olduğunu rapor etmişlerdir.

Sterilizasyon sonrasında fungal kontaminasyon önlenmiş olup, bakteriyel bulaşıklığın devamı görülmüştür. Bakteriyel bulaşıklığı önlemek amacıyla eksplantlar 500 mg/L geniş spektrumlu bakteriyostatik Amoklavın antibiyotiği ile 30 dk muamele edildikten sonra tekrar 500 mg/L Amoklavın içeren MS ortamında kültüre alınmış ve bakteri kontaminasyonu önlenmiştir. Fakat Taylor ve ark. (1998), *Piper methysticum* bitkisinde benomil (fungisit) ve rifampicin antibiyotikleriyle endojen bulaşıklığın önüne geçilemediğini rapor etmişlerdir.

In vitro çoğaltım için sürgün ucu, birinci koltukaltı meristem ve yaprak eksplantları hem katı hem de sıvı kültüre alınmıştır. Benzer şekilde *Hgrophila difformis* (Öztürk, 2008), *Mentha viridis* (Raja ve Arockiasamy, 2008), *Rotala macrandra* (Şumlu, 2009), *Stevia rebaudiana* (Janarthanam ve ark., 2009), *Vitex negundo* (Islam ve ark., 2009),

Marsdenia brunoniana (Ugraiyah ve ark., 2010), *Bacopa monnieri* (Karataş ve ark., 2013), *Ceratophyllum demersum* (Doğan, 2013) ve *Rotala rotundifolia* (Çiftçioğlu, 2013) bitkilerinin *in vitro* rejenerasyonu için katı ve sıvı kültür ortamları kullanılmıştır. Katı ve sıvı MS ortamları kıyaslandığında her iki kültür ortamından sürgün rejenerasyonu elde edilirken katı ortamlarda sıvı ortamlara göre daha erken sürgün oluşumu gözlenmiştir. Şumlu (2009), *Rotala macandra*'nın birinci ve ikinci nodal eksplantlarının olduğu sıvı MS ortamında sürgün rejenerasyonun olmadığını görmüş, 0,25 mg/L BAP+0,50 mg/L NAA ve 0,50 mg/L BAP+0,50 mg/L NAA içeren katı MS ortamlarında 4 hafta sonra sürgün oluşumlarını gözlemiştir. Doğan (2013), çalışmalarında ise sıvı ortamlardaki sürgün rejenerasyonunun katı ortamlara oranla daha erken başladığını rapor etmiştir.

Katı ortamlarda kullanılan tüm hormonlarda (TDZ, kinetin) kallus oluşumu gözlenmiştir. Çiftçioğlu (2013), *R. rotundifolia* bitkisinde katı ortamda kallus oluşumunu rapor etmiştir. Benzer şekilde, Doğan (2013), *C. demersum* bitkisinde katı ortamda kallus oluşumu gözlerken, sıvı ortamda gözlememiştir. BAP, kinetin ve 2-iP içeren katı ortamlarda nodal meristem eksplantlarında kallus oluşumu rapor edilmiştir (Dandin ve Murthy, 2012). Karataş ve ark. (2013)'da *B. monnieri* bitkisinin boğum arası ve yaprak eksplantlarında BAP-NAA içeren ortamlarda kallus oluşumunu rapor etmişlerdir.

Sürgün rejenerasyon oranına bakıldığında hem katı hem de sıvı ortamda kullanılan tüm eksplantlar ve içerdiği hormonlarda çok yüksek oranda sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. *Alocasia amazonica* (Jo ve ark., 2008), *Bacopa monnieri* (Praveen ve ark., 2009) ve *Nothapodytes mimmonia* (Dandin ve Murthy, 2012) bitkilerinde katı ortamın sıvı ortama göre daha fazla sürgün rejenerasyonu oluşturduğu tespit edilmiştir. Buna karşın, Shahzad ve ark. (2011), sıvı BAP konsantrasyonunun katı konsantrasyona oranla daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Eksplant başına sürgün sayısı bakımından ise katı ortamda en fazla sürgün 0,40 mg/l kinetin içeren ortamda görülürken sıvı ortamda en fazla sürgünler 0,10 mg/l BAP içeren ortamda sürgün ucu eksplantında kaydedilmiştir. Dandin ve Murthy (2012), *N. Nimmoniana*'nın nodal eksplantları 1, 2, 5 ve 10 µM BAP, Kin ve 2-iP içeren sıvı ve yarı sıvı MS ortamlarına aktarıp 2 µM BAP konsantrasyonuna sahip ortamda maksimum eksplant başına sürgün sayısının 165,9 adet olarak belirtmişlerdir. Praveen ve ark. (2009) da *B. monnieri* yaprak eksplantlarını farklı oranlarda (0, 0,5, 1, 1,5, 2,0

ve 2,5 mg/L) sitokininler (BAP, Kin ve TDZ) içeren sıvı ve katı MS ortamında kültüre almışlardır. Tüm sitokinin oranlarında sıvı MS ortamının katı MS ortamına göre daha fazla eksplant başına sürgün sayısı verdiğini ve sıvı ortamlar içerisinde ise en yüksek sürgün sayısının kinetin içeren ortamdan elde etmişlerdir.

Eksplantlar kıyaslandığında sürgün ucu, yaprak ve birinci koltukaltı eksplantları farklı sitokinin (BAP, TDZ ve kinetin) ile oksin (IBA) içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlarda çoklu sürgün oluşumu kaydedilmiştir. *Mentha viridis* (Raja ve Arockiasamy, 2008), *Stevia rebaudiana* (Janarthanam ve ark., 2009), *Vitex negundo* (Islam ve ark., 2009) ve *Marsdenia brunoniana* (Ugraiah ve ark., 2010) bitkilerinde sürgün ucu ve nodal meristem eksplantlarından çoklu sürgün oluşumu elde edilmiştir. En iyi sürgün rejenerasyonu sırasıyla sürgün ucu, birinci koltukaltı meristem ve yaprak eksplantında saptanmıştır. Bunun sebebi ise sürgün ucu eksplantında daha fazla genç ve bölünebilen hücrelerin bulunmasıdır (Çelikleş ve ark., 2006). Benzer şekilde Öztürk (2008), *H. difformis* bitkisinin sürgün ucu, birinci nodal meristem, yaprak ve petiol eksplantlarını TDZ-NAA içeren ortamlarda kültüre aldığı en iyi rejenerasyonu birinci nodal meristeminden elde etmiştir. Sürgün ucu eksplantında hem katı hem de sıvı ortamlarda %100 sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. Dandin ve Murthy (2012) ise 1 µM BAP'lı ortamda maksimum sürgün rejenerasyonunu %83 olarak kaydetmişlerdir.

H. polysperma bitkisinden alınan sürgün ucu eksplantından en fazla sürgün sayısı (31,00 adet) 0,40 mg/L kinetin içeren katı MS ortamında olduğu belirtilmiştir. Sıvı ortamda ise en fazla (25,33 adet) 0,10 mg/L BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. Jo ve ark. (2008), *Alocasia amazonica* bitkisinde BAP içeren ortamda eksplant başına sürgün sayısını 13,42 adet olarak bulmuşlardır. Sharma ve ark. (2010) da *B. monnieri*'nin sürgün ucu eksplantlarıyla yaptıkları çalışmada 0,1-0,3 mg/L kinetin içeren ortamda eksplant başına sürgün sayısını 21,0±0,19 ile 33,0±0,16 adet arasında kaydetmişlerdir. Gnanaraj ve ark. (2011), *A. sessilis*'in sürgün meristem eksplantlarını 0,20 mg/L BAP içeren ortamda maksimum sayıda kaydetmişlerdir. Stanly ve ark. (2011) ise *Cryptocoryne wendtii* de Wit ve *Cryptocoryne beckettii* Thwaites ex Trimen türlerinin sürgün uçlarını kullanarak *in vitro* ortamda çoğaltım çalışması yapmışlardır. Her iki türde de çoklu sürgün oluşumu 0,5 mg/L BAP+0,2 mg/L IBA içeren sıvı veya agar ile katılaştırılmış MS besisi ortamında görülmüştür. Her iki türde de yüksek oranda çoklu sürgün oluşmuştur. Aynı şekilde, Behera ve ark. (2008) *Bacopa monnieri* (Linn) Wettst

bitkisinin *in vitro* koşullarda çoğaltımı için sürgün ucu eksplantlarını farklı oranlarda BAP ve kinetin (0,5, 1,0, 1,5 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 ve eksplantların boğum kısımlarından elde etmişlerdir.

H. polysperma'dan alınan birinci koltuklatı mersitem eksplantının en iyi sonuç verdiği ortamın agar ile katılaştırılmamış 0,10 mg/L BAP içeren ortam olduğu saptanmıştır. Öztürk (2002), 0,10, 0,20 ve 0,30 mg/L BAP ve 0,10 mg/L NAA oranlarını içeren ortamlarda *L. repens*'in sürgün ucu, birinci ve ikinci koltukaltı meristemlerinden elde ettiği maksimum sürgün sayısını sırasıyla; 3,69, 4,75 ve 5,36 adet olarak rapor etmiştir. Yine Öztürk (2008), *H. difformis* bitkisinden aldığı sürgün meristemi, birinci nodal eksplantı, yaprak ve petiol eksplantları TDZ-NAA ortamlarına aktarmış olup, eksplant başına sürgün sayısını 52,63 adet, en uzun sürgünleri ise 5,63 cm olarak kaydetmiştir. Doğan (2013), *in vitro* sürgün rejenerasyonu için *C. demersum*'un sürgün ucu, birinci ve ikinci koltukaltı meristem eksplantlarını 0,10, 0,20, 0,40 ve 0,80 mg/L TDZ, 0,10 mg/L IBA ve 0,10 mg/L GA₃ kombinasyonlarını içeren MS besi ortamında sekiz hafta boyunca kültüre almıştır. Sekizinci haftada 0,80 mg/L TDZ+0,10 mg/L IBA+0,10 mg/L GA₃ içeren ortamda bulunan sürgün ucu meristem eksplantı üzerinde bir adet kök oluşumu kaydedilmiş olup diğer tüm ortamlarda herhangi bir kök oluşumuna rastlanılmamıştır.

Akvaryum bitkilerin adventif sürgün rejenerasyonu için *Nymphaea* (Jenks ve ark., 1990), *H. auriculata* (Panigrahi ve ark., 2006), *R. macaranda* (Şumlu, 2009) ve *B. monnieri* (Karataş ve ark., 2013) bitkilerinden alınan yaprak eksplantları başarıyla kullanılmıştır. *H. polysperma* bitkisi adventif sürgün oluşumu için *in vitro* koşullarda rejenerasyon olan bitkilerden elde edilen yaprak eksplantları farklı dozlarda TDZ-IBA ya da Kin-IBA içeren katı ortamlarda ve BAP ya da BAP-GA₃ içeren sıvı ortamlarda kültüre alınmıştır. *H. polysperma*'nın yapraklarından yapılan denemelerde kallus oluşumu gözlenmiştir. Yaprak eksplantından kallus oluşumu su marulu (Yong ve ark., 2008) ve *B. monnieri* (Karataş ve ark., 2013) gibi diğer sucul bitkilerde de rapor edilmiştir. Her iki denemede yüksek oranda sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. Benzer şekilde Vijaykumar ve ark. (2010), *B. monnieri* yapraklarının sürgün rejenerasyon sıklığını BAP ve TDZ ortamlarında sırasıyla %30,0-95,0 ve %50,0-95,0 olarak kaydetmişlerdir. Karataş ve ark. (2013) *Bacopa monnieri*'nin yaprak ve boğum arası eksplantlarının çeşitli oranlarda BAP-NAA içeren ortamlarda %100 kallus ve sürgün rejenerasyon

oluşturduğunu rapor etmişlerdir. En fazla sürgün rejenerasyonu 0,10 mg/L TDZ+0,10 mg/L IBA içeren ortamdan elde edilmiştir. Tiwari ve ark. (2001) da *B. monnieri*'nin nod, internod ve yaprak eksplantlarını 0,44-2,2 µM BAP içeren ortamlarda kültüre almış ve en fazla sürgün sayısının yaprak eksplantından elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Yaprak eksplantlarında BAP içeren sıvı kültürde sürgün oluşumu gözlenmiştir. Fakat sürgünler sıvı kültürde büyümemiş ve kısa sürgünler kaldığı için altı hafta sonra sıvı kültüre GA₃ eklenmiştir. GA₃ kullanıldığında sürgün oluşumu, sürgün sayısı ve uzunluğunda artış gözlenmiştir. Benzer şekilde, Xu ve ark. (2009), ortama 0,20 mg/L GA₃ eklediğinde %100 sürgün rejenerasyonu olduğunu kaydetmişlerdir. Sharma ve ark. (2010) da GA₃ içeren ortamda fazladan 18 ile 24 adet sürgün elde etmişlerdir. Aynı şekilde, Hoque ve ark. (2006), su kestanesi bitkisinde 0,5 mg/L GA₃ kullandıklarında sürgün uzunluğunda artış kaydetmişlerdir.

In vitro koşullarda akvaryum bitkilerin çoğaltım çalışmaları sonucunda köklü bitki oluşumu rapor edilmiştir (Çiftçioğlu, 2013). Tez kapsamında *H. polysperma* bitkisinde yapılan çalışmalardan direk köklü sürgün oluşmadığından adventif kök oluşumu için ayrı çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen sürgünler farklı oranlarda IBA içeren (0,10, 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 mg/L) ortamlara aktarılmış ve iki hafta içinde başarıyla köklenme gerçekleşmiştir. Diğer bitkilerde de IBA kullanılarak kolayca köklendirmenin gerçekleştiği rapor edilmiştir (Tiwari ve Singh, 2001; Sharma ve ark., 2010; Karataş ve ark., 2013).

Sucul bitkilerin toprak substratında kolayca bitki oluşturabildiği bulunmuştur (Tiwari ve Singh, 2001; Sharma ve ark., 2010). Bununla birlikte, Öztürk ve ark. (2002) *Ludwigia repens*'in akvaryumda başarılı bir şekilde adaptasyonunu sağlamışlardır. Karataş ve ark. (2013) ise *Bacopa monnieri* bitkisinin adaptasyonu için farklı pH'lar (4,0-10,0) denemişlerdir. Tüm pH'larda %100 adaptasyon sağlanırken, bitki büyümesinin ihtiyaç duyduğu ortamın hafif asidik olduğu saptanmıştır. Yüksek asidik ya da bazik pH aralıklarının bitki büyümesini engellediği görülmüştür. Benzer şekilde *Rotala rotundifolia* bitkisi pH 4,0'de büyümemiş olup iki hafta içinde ölmüştür (Çiftçioğlu, 2013).

Bir başka çalışmada köklendirilmiş bitkilerin çeşme suyu içeren akvaryumda başarıyla adaptasyonu sağlanmıştır. *N. indica* (Jenks ve ark., 2000), *R. macrandra* (Şumlu, 2009), *A. sessilis* (Gnanaraj ve ark., 2011), *V. anagallis-aquatica* (Shahzad ve ark., 2011), *C. wendtii* ve *C. beckettii* (Stanly ve ark., 2011), *B. monnieri* (Banerjee ve Shrivastava,

2012) gibi çalışılan türlerin de akvaryumlarda başarıyla adaptasyonu gerçekleştirilmiştir.

Büyüyen bitkiler köklendirme sonucu farklı pH'larda ayarlanan 7 cam kavanoza alınmış 3 hafta sonra bitkilerin yapraklarında büyüme ve boğum arası sayılarında artma görülmüştür. *Ludwiga repens* (ztrk ve ark., 2002) ve *B. monnieri* (Karataş ve ark., 2013) den *in vitro* olarak elde edilen rejenere bitkilerin suda veya akvaryumlarda ortama alışmasının oldukça önemli bir adım olduğu bildirilmiştir. Karataş ve ark. (2013) da *B. Monnieri'* nin ortama uyum sağlaması için pH aralığını 4,0-10,0 olarak ayarlamışlardır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında *H. polysperma*'nın *in vitro* koşullarda çoğaltımı başarıyla gerçekleştirilmiş olup bitki doğal ortamı dışında kısa sürede çoğaltılmış ve tüm olumsuz şartlar laboratuvar ortamında ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar maddeler halinde sıralanmıştır:

1. Bitkinin yüzey sterilizasyonu için farklı sürelerde ve oranlarda H₂O₂ kullanılmıştır. Steril ve sağlam eksplantlar %70 H₂O₂ oranı ile 10 dk muamele sonucu elde edilmiştir. Eksplant tipine bakıldığında ise sürgün ucunun diğer eksplantlara göre daha steril ve sağlam olduğu gözlenmiştir.
2. *In vitro* çoğaltım çalışmaları için sıvı ve agar ile katılaştırılan MS ortamları kullanılmıştır. Tüm denemelerde çoklu sürgün rejenerasyonu görülmüştür.
3. Denemede kullanılan oksin ve sitokin kombinasyonları kullanılarak hem sıvı hem de katı ortamda sürgün oluşumu kaydedilmiştir. Ayrıca, agar ile katılaştırılan MS ortamının sıvı MS ortamına göre daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.
4. Agar ile katılaştırılan MS ortamında yapılan çalışmalar kinetin, TDZ-IBA ve Kin-IBA olmak üzere üç farklı şekilde yürütülmüştür. En fazla eksplant başına sürgün sayısı (31,00 adet) kinetin ile yapılan çalışma da olurken en az eksplant başına sürgün sayısı (1,33 adet) da kinetin içeren ortamda saptanmıştır.
5. Sürgün uzunluklarına bakıldığında en uzun sürgünler (2,17 cm) yine kinetin çalışmasından elde edilmiştir.
6. Eksplant bakımından ise eksplant başına en fazla sürgün sayısı ve en uzun sürgünler sürgün ucu eksplantlarından elde edilirken eksplant başına en az sürgün sayıları ise yaprak eksplantından elde edilmiştir.
7. Sıvı ortamda yapılan çalışmalar BAP ve BAP-GA₃ denemelerinden oluşmuştur. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı (25,33 adet) ve en uzun sürgünler (1,63 cm) sürgün ucu ve birinci koltukaltı eksplantlarında gözlenirken, eksplant başına en az sürgün sayısı yaprak eksplantında görülmüştür.
8. Rejenere edilen bitkilerin köklendirilmesi farklı dozlarda IBA+500 mg/L Amoklavın ve farklı dozlardaki sukroz+0,40 mg/L IBA ile yapılan iki

denemeyle yürütülmüştür. Yapılan her iki köklendirme çalışmasından da başarıyla köklendirilme sağlanmıştır.

9. Adaptasyon çalışması için akvaryum ortamına aktarılan bitkiler incelendiğinde, *H. polysperma*'nın dış şartlarda gelişimini devam ettirdiği görülmüştür. Akvaryuma aktarılan tüm kök oluşturan bitkilerin adaptasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir.
10. *H. polysperma* bitkisinde optimum pH derecesini belirlemek için bitkiler farklı pH'lara sahip su ortamlarına aktarılmıştır. Bitkinin uzunluğu için en uygun ortam pH 7,0 olarak kaydedilirken boğum arası sayıları için en uygun pH'ın 9,0 olduğu rapor edilmiştir. En az gelişim gösteren bitkiler ise pH 4,0 ve pH 5,0 değerlerinde gözlenmiştir.

Bu tez kapsamında kullanılan *H. polysperma* bitkisinin doku kültürü ile çoğaltımı konusunda herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Yaptığımız çalışmalar, *H. polysperma*'nın *in vitro* koşullarda doku kültürü yöntemleriyle hızlı ve çoklu üretiminin yapılabileceğini göstermiştir. Sonuç olarak *H. polysperma* süs bitkisi, su kirliliği için biyoindikatör ve tıbbi amaçlı kullanılırken aynı zamanda gen transferi için de uygun bir bitkidir.

KAYNAKLAR

- Alpbaz, A., 1984. Akvaryum Tekniği ve Balıkları. *Acargil Basımevi*, 433 s, İzmir.
- Amano, T., 2002. The Aquarium Plant Handbook. *Oriental Aquarium Pte Ltd.*, 184 s.
- Andrade, W.F., Almeida, M. ve Gonçalves, A.N., 2006. *In vitro* Multiplication of *Eucalyptus Grandis* under BAP pulse. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 153-158.
- Anonim, 2010. *Hygrophila polysperma* (Acanthaceae): Indian swamp weed. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). http://www.eppo.int/INVASIVE_PLANTS/iap_list/Hygrophila_polysperm.html- (Erişim Tarihi: 26.02.2013).
- Anonim, 2013a. Mashabaladi Kvatha. Herbal Tonics/Combinations. http://www.holisticonline.com/Herbal-Med/Remedies/hol_herbal_tonics_mashabaladi_kvatha.htm- (Erişim Tarihi: 26.02.2013).
- Anonim, 2013b. Medicinal Plants of West Bengal Envis Centre on Medicinal Plants <http://envis.frlht.org/checklist/WestBengal.pdf>- (Erişim Tarihi: 26.02.2013).
- Anonim, 2013c. Medicinal Plants of Karnataka. Envis Centre of Medicinal Plants. <http://envis.frlht.org/checklist/karna.pdf>- (Erişim Tarihi: 26.02.2013).
- Anonim, 2013d. FAQs on Freshwater Algae & Their Control 2. <http://www.wetwebmedia.com/fwswebindex/fwalgfaqs2.htm>- (Erişim Tarihi:26.02.2013).
- 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.
- 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.
- Biondi, S. ve Thorpe, T.A., 1981. Requirements for A Tissue Culture Facility, Plant Tissue Culture. *Academic press*, 1-20, New York.

- Bowes, G., 1982. *Limnophila sessiliflora* and *Hygrophila polysperma*, Baseline Physiology of the Potential Problem Plants. *Department of Botany University of Florida*, 17, Gainesville.
- Brunel, S., 2009. Pathway Analysis: Aquatic Plants Imported in 10 EPPO Countries. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 39, 201-213.
- 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.
- Crosson H., 2010. Keeping Aquatic Plants in Their Place: Common Sense Tips to Protect Lakes and Rivers. *Landscape Online* available at: <http://www.landscapeonline.com/research/article5226>; (Erişim Tarihi: 08.12.2011).
- Çeliktas, N., Can, E., Hatipoglu, R. ve Avcı, S., 2006. Somatic Embryogenesis, Callus Production and Plantlet Growth in Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) *New Zealand Journal Agricultural Research*, 49, 383-388.
- Çiftçioğlu, M., 2013. *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.
- David, W.H., Vernon, V.V. ve Cody J.G., (2012). East Indian Hygrophila, *Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson, *University of Florida*, Florida.
- Doğan, M., 2013. *In vitro* Koşullarda Tilki Kuyruğu (*Ceratophyllum Demersum*) Bitkisinin Çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Karaman.
- 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.
- 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.
- Hoque, A., Nahar, A., Razvy, M.A., Biswas, M.K. ve Kabir, A.H., 2006. Micropropagation of Water Chestnut (*Trapa* sp.) Through Local Varieties of Rajshahi Division. *Asian Journal of Plant Sciences*, 5, 409-413.

- Innes, W.T., 1947. The Aquarium. *Hygrophila*, A *New Aquarium Plant*, 16, 30-1.
- Islam S.A.M.N., Banik, H., Alam, S., Tarek, M. ve Rahman, M., 2009. *In vitro* Propagation of *Holarrhena antidysenterica* Wall., *Wedelia chinensis* (Osb.) Merr. and *Woodfordia fruticosa* (L.) Kurz. *Plant Tissue Culture & Biotechnonology*, 19, 253-255.
- Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M., Lakshmi Sai, G., Sekar, T., 2009. Plant Regeneration from Leaf Derived Callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Tissue Culture & Biotechnonology*, 19, 133-141.
- Jenks, M., Kane, M., Marasca, F., Mcconnell, D. ve Sheeran, T., 1990. *In vitro* Astablishment and Epiphyllum Plantlets Rejeneration of *Nymphaea "Daubeniana"*. *Hortscience*, 25, 1664-1665.
- Jenks, M.A., Kane, M.E. ve McConnell, D.B., 2000. Shoot Organogenesis from Petiole Explant in the Aquatic Plant *Nymphoides indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 1-8.
- Jo, U.A., Murthy, H.N., Hahn, E.J. ve Paek, K.Y., 2008. Micropropagation of *Alocasia amazonica* Using Semisolid and Liquid Cultures. *In vitro Cell Developmental Biology-Plant*, 44, 26-32.
- 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., Aasım, M., Dogan, M. ve Khawar K.M., 2013. Adventitious Shoot Regeneration of the Medicinal Aquatic Plant Water Hyssop (*Bacopa monnieri* L. Pennell) Using Different Internodes. *Archives of Biological Sciences*, 65(1), 297-303, *Belgrade*.
- Keskinkan, O., 2004. Su Altı Bitkisi (*Myrophyllum spicatum*) Kullanılarak Sentetik Atık Sudan Kadmiyum Giderilmesi. *Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana*.

- Khan, M.R. ve Omoloso, A.D., 2002. Antibacterial Activity of *Hygrophila stricta*. *Department of Applied Sciences Papua New Guinea University of Technology*, Papua New Guinea.
- Kshirsagar, A.D., Ingale, K.G, Vyawahare, N.S. ve Thorve, V.S., 2010. *Hygrophila spinosa*: A comprehensive review. *Pharmacogon Reviews*, 4(8), 167-171.
- Langeland, K.A. ve Burks, K.C., 1998. Identification and Biology of Non-Native Plants in Florida's Natural Areas. *University of Florida*, Gainesville, Florida.
- Les, D.H. ve Wunderlin, R.P., 1981. *Hygrophila polysperma (Acanthaceae)* in Florida. *Florida Scientist*, 44, 189-192.
- Li, Y.H., Chen, Q.Z., Xiao, J.N., Chen, Y.F., Li, X.J. ve Huang, X.L., 2007. Characteristics of Adventitious Root Formation in Cotyledon Segments of Mango (*Mangifera Indica* L. Cv. Zihua): Two Induction Patterns, Histological Origins and the Relationship Withpolar Auxin Transport. *Plant Growth Regulation*, 54, 165-177.
- Linsmaier, E.M. ve Skoog, F., 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 18, 100-127.
- Maki, K. ve Galatowitsch, S., 2004. Movement of Invasive Aquatic Plants Into Minnesota (USA) Through Horticultural Trade. *Biological Conservation* 118, 389-396.
- 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., Rodriguez, 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(3), 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, Ankara.
- Öztürk, M., 2008. Akvaryum Bitkileri *Hygrophila difformis* ve *Microsorium pteropus*'un *In vitro* Koşullarda Çoğaltımı. *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 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.
- Persson, L., 2012., Screening Methods for Aquatic Toxicity of Surfactants. *Master of Science Thesis*, Chalmers University of Technology, Gothenburg, Sweden.
- Petroeschovsky, A. ve Champion, P.D., 2008. Preventing Further Introduction and Spread of Aquatic Weeds Through The Ornamental Plant Trade. *Sixteenth Australian Weed Conference*, 200-302, Cairns.
- Praveen, N., Naik, P.M., Manohar, S.H., Nayeem, A. ve Murthy, H.N., 2009. *In vitro* Regeneration of *Brahmi* Shoots Using Semisolid and Liquid Cultures and Quantitative Analysis of Bacoside A. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(4), 723-728.
- Raja, H.D. ve Arockiasamy, D.I., 2008. *In vitro* Propagation of *Mentha viridis* L. from Nodal and Shoot Tip Explants. *Plant Tissue Culture & Biotechnonology*, 18, 1-6.
- Rataj, K. ve Horeman, T. J., 1977. Aquarium Plants Their Identification Cultivation and Ecology. *T.F.H. Publication, Inc. P.O. Box, 27, 448, New Jersey*.
- 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.
- Shanmugasundaram, P. ve Venkataraman, S., 2005. Hepatoprotective and Antioxidant Effects of *Hygrophila auriculata* (K.Schum) Heine Acanthaceae Root Extract. *Department of Pharmacology And Environmental Toxicology, Dr.ALM Post Graduate Institute of Basic Medical Sciences University of Madras, Chennai, India*.
- 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*.
- Spencer, W. ve Bowes, G., 1984. Limnophila and Hygrophila: A Review and Physiological Assessment of Their Weed Potential in Florida. *Journal of Aquatic Plant Management*, 23, 7-16.

- 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.
- Şumlu, Ş., 2004. Yüzen Yapraklı Su Bitkisi Nilüferin (*Nymphaea sp.*) *in 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.
- Taylor, M., Taufan, L. ve Drew, R.A. 1998. Decontamination of Kava (*Piper methysticum*) for *In vitro* Propagation. *Proceedings of International Symposium on Biotechnology, Tropical and Subtropical Species*, 267-461.
- Te-chato, S. ve Lim, M., 2000. Improvement of Mangosteen Micropropagation Through Meristematic Nodular Callus Formation from *In vitro*-Derived Leaf Explant. *Scientia Horticultura*, 86, 291-298.
- Tiwari, V., Tiwari, K. N., ve Singh, B.D., 2001. Comparative Studies of Cytokinins on *In vitro* Propagation of *Bacopa monniera*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 66, 9-16.
- Ugraiah, A., Karuppusamy, S. ve Pullaiah, T., 2010. Micropropagation of *Marsdenia brunoniana* Wight & Arn. A rare antidiabetic plant. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 20, 7-12.
- Van Dijk, G.M., Thayer, D.D. ve Haller, W.T., 1986. Growth of *Hygrophila* and *Hydrilla* in Flowing Water. *Journal Aquatic of Plant Management*, 24, 85-87.
- Vijayakumar, M., Vijayakumar R., ve Stephen, R., 2010. *In vitro* Propagation of *Bacopa monnieri* L.-A Multipurpose Plant. *Indian Journal of Science Technology*, 3, 781-786.
- Wawrzyn'czak, A. ve Goszczyn'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*, 11, 77-88.
- Xu, L., Najeeb, U., Raziuddin, R., Shen, W.Q., Shou, J.Y., Tang, G.X. ve Zhou, W.J., 2009. Development of an Efficient Tissue Culture Protocol for Callus Formation and Plant Regeneration of Wetland Species *Juncus effusus* L. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(5), 610-618.

- Yenice, Z., 2010. Geçici Daldırma Sistem Biyorektörlerle Su mercimeği (*Lemna Minor* L.) Bitkisinin *in Vitro* Çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.*
- Yong, Z., Yao, W., Baoyu, Y. ve Shiyun, C., 2008. *In vitro* Regeneration and Propagation of Pistia Stratiotes: An Ideal Aquatic Plant for Biomanufacturing and Bioremediation. *Chinese Journal Applied Environmental Biology*, 14(4), 445-449.
- Yücel, E., Edirnelioğlu, E., Soydam, S., Çelik, S. ve Çolak, G., 2010. *Myriophyllum Spicatum* (Spiked Water-Milfoil) as A Biomonitor of Heavy Metal Pollution in Porsuk Stream. *Biological Diversity and Conservation*, 3(2), 33-144

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Ayşegül ÇINAR
Doğum Tarihi ve Yer : 05.02.1989/ İstanbul
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0(506) 727 92 68
e-mail : ays_89_gul@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Karaman	2013
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Eskişehir	2010
Lise	Yahya Kemal Beyatlı Lisesi, İstanbul	2005

Bilimsel Faaliyetleri

Ulusal Kongre/Sempozyum

1. Karataş, M., Çınar, A., Doğan, M. ve Aasim, M., 2012. *In vitro* Koşullarda *Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson Bitkisinin Mikroçoğaltımı. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, 15-18 Kasım, 2012-Antalya, Türkiye. Sayfa No: 152.
2. Ekmekci, H., Koca, A., Çınar, A., Aasim, M., 2012. *In vitro* Koşullarda Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) Bitkisinin mikroçoğaltım çalışmaları. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, 15-18 Kasım, 2012, Antalya, Türkiye.

Uluslararası Kongre/Sempozyum

1. Ekmekci, H., Koca, A., **Çınar, A.**, Aasim, M., Khawar, K.M., 2013. *In vitro* Shoot Regeneration Potential of Different Explants of Sweet Basil (*Ocimum Basilicum* L.). 1st Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. April 17-20, 2013-Gazimagosa (Famagusta), Turkish Republic of Northern Cyprus.
2. Koca, A., **Çınar A.**, Aasim, M. ve Khawar, K.M., 2013. *In vitro* Shoot Regeneration from Mature Zygotic Embryo of *Trachyspermum ammi*. *1st Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*. April 17-20, 2013, Gazimagosa (Famagusta), Turkish Republic of Northern Cyprus.
3. Karataş M., Aasim, M., **Çınar, A.** ve Doğan, M., 2013. *In vitro* Axillary Shoot Regeneration of Dwarf Hygro (*Hygrophylla Polysperma*). *International Conference on Environmental Science and Technology (ICOEST' 2013-Cappadocia)*, Turkey.