

***In Vitro* KOŞULLARDA
TİLKI KUYRUĞU (*Ceratophyllum demersum* L.)'NUN ÇOĞALTIMI**

Muhammet DOĞAN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Hidrobiyoloji Programı

Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

Ocak - 2013

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

***In Vitro* KOŞULLARDA
TİLKİ KUYRUĞU (*Ceratophyllum demersum* L.)'NUN ÇOĞALTIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammet DOĞAN

Anabilim Dalı: BİYOLOJİ

Programı: HİDROBİYOLOJİ

Tez DanıŐmanı: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

KARAMAN-2013

TEZ ONAYI

Muhammet DOĞAN tarafından hazırlanan “*In Vitro Koşullarda Tilki Kuyruğu (Ceratophyllum demersum L.)’nun Çoğaltımı*” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

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

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR
(Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Tarla Bitkileri Bölümü)

Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ
(Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)

Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN
(Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Tarla Bitkileri Bölümü)

Prof. Dr. Hasan Hüseyin ATAR
(Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü)

Yrd. Doç. Dr. Muhammad AASIM
(Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)

Tez Savunma Tarihi: 03.01.2013

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez 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.

Muhammet DOĞAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

In Vitro KOŞULLARDA TİLKİ KUYRUĞU (*Ceratophyllum demersum* L.)'NUN ÇOĞALTIMI

Muhammet DOĞAN

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

Ocak, 2013, 80 sayfa

Tilki kuyruğu (*Ceratophyllum demersum* L.) Ceratophyllaceae familyasına ait bir su bitkisidir. Su ortamındaki ağır metallerin uzaklaştırılmasında (fitoremediasyon) ve kirliliğin izlenmesinde (biyomonitör) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı çiftlik hayvanları ve kümes hayvanları için iyi bir besin kaynağıdır. Ayrıca, akvaryumlarda ticareti yapılan popüler bitkiler arasında yer almaktadır. Bu çalışma, su ekosisteminde ve ticari açıdan önemli olan *C. demersum*'un *in vitro* koşullarda çoğaltımı için hazırlanmıştır. Bitkinin yüzey sterilizasyonu için çeşitli konsantrasyon ve sürelerde hidrojen peroksit (H_2O_2) ve çamaşır suyu (NaOCI) kullanılmıştır. En fazla steril ve sağlam eksplantlar, %5'lik H_2O_2 ile 7 dk muamele ile elde edilmiştir. Sürgün rejenerasyonu amacıyla sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantları farklı konsantrasyonlarda veya kombinasyonlarda sitokininleri (BAP, TDZ ve Kinetin), oksinleri (IBA ve NAA) veya gibberellik asiti (GA_3) içeren agarla katılaştırılmış ya da sıvı MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Agarla katılaştırılan kültür ortamlarında eksplant başına sürgün sayısı en fazla (61,92 adet) 0,10 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA ve 0,10 mg/l GA_3 kombinasyonlarını içeren MS ortamında sürgün ucu meristem eksplantından elde edilmiştir. Sıvı kültür ortamlarında ise en fazla (204,33 adet) sürgün 0,40 mg/l BAP içeren MS ortamında 2. koltukaltı meristem eksplantından elde edilmiştir. Her iki kültür ortamlarından elde edilen rejenere bitkilerin su ortamına başarıyla adaptasyonu sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Adaptasyon, *Ceratophyllum demersum*, Çoğaltım, Doku Kültürü, *In Vitro*, Sterilizasyon, Sürgün Rejenerasyonu,

ABSTRACT

MSc. Thesis

In Vitro PROPAGATION OF COONTAIL (*Ceratophyllum demersum* L.)

Muhammet DOĞAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

January, 2013, 80 pages

Coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) is an aquatic plant belongs to Ceratophyllaceae family. The plant has been widely used to remove heavy metals (photoremediation) and pollution monitoring (biomonitor) in the aquatic environment. It is also a good food source for livestock and poultry. Furthermore, it is one of the popular plants in aquatic industry. The present study was designed for *in vitro* propagation of *C. demersum*, which is commercially valuable and important for water ecosystem. Hydrojen peroxide (H₂O₂) and commercial bleaching agent (NaOCl) were used at various concentrations and times for surface sterilization. Maximum sterile and live explants were obtained from 5% H₂O₂ with application time of 7 minutes. Shoot meristem, 1st and 2nd node explants were cultured on agar solidified or liquid MS medium supplemented with different concentrations or combinations of cytokinins (BAP, TDZ and Kin), auxins (IBA and NAA) or gibberellic acid (GA₃) for shoot regeneration. Maximum number of shoots per explant (61,92) was obtained from shoot meristem on agar solidified MS medium containing 0,10 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA and 0,10 mg/l GA₃. Whereas, maximum number of 204,33 shoots was achieved on liquid MS medium supplemented with 0,40 mg/l BAP from 2nd node explant. The regenerated plants obtained from both cultures media were succesfully acclimatized in aquatic environments.

Keywords: Acclimatization, *Ceratophyllum demersum*, *In Vitro*, Propagation, Shoot Regeneration, Sterilization, Tissue Cultere

ÖN SÖZ

Bu çalışmanın başından sonuna kadar desteğini benden esirgemeyen, engin bilgileriyle beni yönlendiren ve özellikle böylesi önemli bir konuda yüksek lisans tezi yapmamı sağlayan tez danışmanım çok değerli Sayın Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ'a (Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü), çalışmamın her aşamasında yardım ve desteğini gördüğüm Sayın Yrd. Doç. Dr. Muhammad AASIM'a (Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü), bilgi ve görüşleriyle yardımını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'a (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü) en içten teşekkürlerimi sunarım. Yine laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım aşamasında göstermiş olduğu katkı ve hoşgöründen dolayı Arş. Gör. Buğrahan EMSEN'e (Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü) ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma doğrudan veya dolaylı katkılarından dolayı teşekkür ederim. Büyük fedakarlıklar göstererek eğitimimi gerçekleştirmemi sağlayan, tez çalışmam boyunca da maddi ve manevi olarak hep yanımda olan çok değerli aileme de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Muhammet DOĞAN

Ocak, 2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖN SÖZ	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Sekonder Su Bitkilerinin Ekolojik Sınıflandırılması	1
1.2. Su Bitkilerinin Önemi ve Kullanım Alanları	2
1.3. Tatlı Su Bitkilerinin Üretim Teknikleri	4
1.4. <i>Ceratophyllum demersum</i> L. Bitkisinin Genel Özellikleri	5
1.5. <i>C. demersum</i> Bitkisinin Bazı Kullanım Alanları	6
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	8
2.1. Kuramsal Temeller	8
2.1.1. Bitki Materyalinin Yüze Sterilizasyonu	8
2.1.2. <i>In Vitro</i> Üretim.....	8
2.1.2.1. Doku Kültürü Teknikleri	8
2.1.2.2. Organogenesis.....	9
2.1.2.3. Mikroçoğaltım	9
2.2. Kaynak Araştırması	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Deneme Yeri	19
3.1.2. Bitki Materyali	19
3.1.3. Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları	19
3.1.4. Bitki Büyüme Düzenleyicileri	20
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Eksplant Yüze Sterilizasyonu	21
3.2.2. Eksplant İzolasyonu	21
3.2.3. Rejenerasyonu Sağlanmış Bitkiler İçin Uygun pH Aralığının Belirlenmesi ...	22
3.2.4. Bitkilerin Dış Koşullara Adaptasyonu	22
3.2.5. İstatistik Analizler.....	23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	24
4.1. <i>C. demersum</i> Eksplantlarının Yüze Sterilizasyonu.....	24

4.1.1.Çamaşır Suyu ile Yüzey Sterilizasyonu	24
4.1.2. Hidrojen Peroksit ile Yüzey Sterilizasyonu	26
4.2. <i>In Vitro</i> Koşullarda <i>C. demersum</i> 'un Çoğaltımı	28
4.2.1. Agar ile Katılaştırılmış MS Ortamında Farklı Kinetin Dozlarının <i>C. demersum</i> 'un Farklı Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu.....	28
4.2.2. Agar ile Katılaştırılmış MS Ortamında Farklı BAP Dozlarının <i>C. demersum</i> 'un Farklı Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu.....	32
4.2.3. Agar ile Katılaştırılmış MS Ortamında Farklı BAP ve 0,10 mg/l NAA Dozlarının <i>C. demersum</i> 'un Farklı Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu .	37
4.2.4. Agar ile Katılaştırılmış MS Ortamında 0,10 mg/l IBA, 0,10 mg/l GA ₃ ve Farklı TDZ Dozlarının <i>C. demersum</i> 'un Farklı Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu	45
4.3. Sıvı Kültürde Sürgün Rejenerasyonu	50
4.3.1. Farklı TDZ Dozlarının <i>C. demersum</i> 'un Farklı Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu	50
4.3.2. Farklı BAP Dozlarının <i>C. demersum</i> 'un Farklı Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu	55
4.3. <i>In Vitro</i> Köklendirme	61
4.4. Rejenerasyonu Sağlanmış Bitkiler İçin Uygun pH Aralığının Belirlenmesi Bitki İçin Uygun pH Aralığının Belirlenmesi	62
4.5. <i>In Vitro</i> Koşullarda Rejenere Sürgünlerin Dış Şartlara Adaptasyonu	63
5. SONUÇ	65
6. KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 : Bazı su bitki cinslerinin temel kullanım alanları	4
Çizelge 3.1 : Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları	20
Çizelge 3.2 : Denemelerde kullanılan büyüme düzenleyicilerinin çözücüleri, sterilizasyon yöntemleri ve saklama koşulları	21
Çizelge 4.1 : Farklı konsantrasyonlarda uygulanan çamaşır suyunun sterilizasyon ve eksplant gelişimi üzerine etkisi	25
Çizelge 4.2 : Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan hidrojen peroksitin sterilizasyon ve eksplant gelişimi üzerine etkisi	26
Çizelge 4.3 : Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı Kinetin dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	29
Çizelge 4.4 : Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı Kinetin dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları	30
Çizelge 4.5 : Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı BAP dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	34
Çizelge 4.6 : Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı BAP dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları	35
Çizelge 4.7 : Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı BAP ve 0,10 mg/l NAA dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	39
Çizelge 4.8 : Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı BAP ve 0,10 mg/l NAA dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları	41
Çizelge 4.9 : Agar ile katılaştırılmış MS ortamında 0,10 mg/l IBA, 0,10 mg/l GA ₃ ve farklı TDZ dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	47
Çizelge 4.10 : Agar ile katılaştırılmış MS ortamında 0,10 mg/l IBA, 0,10 mg/l GA ₃ ve farklı TDZ dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları	48
Çizelge 4.11 : Farklı TDZ dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	52
Çizelge 4.12 : Farklı TDZ dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları	53
Çizelge 4.13 : Farklı BAP dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	57
Çizelge 4.14 : Farklı BAP dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 : Su bitkilerinin net birincil üretkenliklerinin, bitkisel planktonlar ve kara bitkileri ile karşılaştırılması	2
Şekil 1.2 : <i>Ceratophyllum demersum</i> L. bitkisinin sistematığı ve akvaryum ortamındaki genel görünümü	6
Şekil 3.1 : Mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılan eksplantların bitki üzerinde gösterimi	22
Şekil 4.1 : Laminar flow kabinde bitkilerin yüzey sterilizasyon çalışması	24
Şekil 4.2 : %10'luk çamaşır suyunun uygulandığı ortamda bakteriyel ve fungal bulaşıklar, steril-sağlam eksplantlar ve beyazlaşan eksplant	26
Şekil 4.3 : Hidrojen peroksitin %5'lik konsantrasyonunda 7 dk bekletilen 1. koltukaltı meristem eksplantında bakteriyel ve fungal bulaşıklar ...	27
Şekil 4.4 : Agar ile katılaştırılmış farklı Kinetin dozlarını içeren MS ortamında uzun sürgün oluşumu	32
Şekil 4.5 : Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı BAP dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonu	33
Şekil 4.6 : Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı BAP ve 0,10 mg/l NAA dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonu	38
Şekil 4.7 : Agar ile katılaştırılmış MS ortamında 0,10 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA dozlarını içeren MS ortamlarında eksplantlar üzerinde rizoid oluşumu	44
Şekil 4.8 : 0,40 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA içeren MS ortamında eksplantların rizoid durumları	45
Şekil 4.9 : Beşinci haftada farklı TDZ, IBA ve GA ₃ kombinasyonlarını içeren MS ortamında sürgünler üzerinde kahverengi renk oluşumları ve sekizinci haftada sürgün ucu meristem eksplantından bir adet rizoid oluşumu	46
Şekil 4.10 : 0,10 mg/l IBA, 0,10 mg/l GA ₃ ve farklı TDZ içeren MS ortamında uzun sürgün oluşumları	50
Şekil 4.11 : Sıvı kültürde farklı TDZ dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonu	51
Şekil 4.12 : 0,10 mg/l TDZ içeren MS ortamında sürgün üzerindeki yaprakta sürgün oluşumu ve yaprak üzerinde oluşan sürgünlerin genel görünümü	51
Şekil 4.13 : Sıvı kültürde farklı BAP dozlarının <i>C. demersum</i> 'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonu	56
Şekil 4.14 : Farklı BAP oranlarını içeren MS ortamlarında sürgünler üzerinde yan dal oluşumları	60
Şekil 4.15 : Büyüme düzenleyici içermeyen (MSO) ortamlarda rizoid oluşumu....	61
Şekil 4.16 : Dört hafta sonra farklı pH ortamındaki bitkilerin genel görünümü ve pH 7 ortamında en iyi gelişim gösteren bitkiler	62
Şekil 4.17 : Rejenerasyonu sağlanan bitkilerin akvaryuma aktarılmadan önceki görünümleri	63
Şekil 4.18 : Rejenere olan bitkilerin akvaryum ortamına adaptasyonu	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
g, mg	Gram, Miligram
HCl	Hidroklorik Asit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroskit
HgCl ₂	Civa Klorit
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
l, ml, µM, M	Litre, Mililitre, Mikro Molar, Molar
cm	Santimetre
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
NaOH	Sodyum Hidroksit

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
BAP	6-Benzilaminopurin
2,4-D	2, 4-Diklorofenoksi Asetik Asit
2-iP	2- izopentenil adenin
Ç.S.	Çamaşır Suyu
GA ₃	Giberellik Asit
IBA	Indol 3 Butirik Asit
IAA	Indol-3-Asetik Asit
K.A.	Koltukaltı
Kin.	Kinetin
K.O.	Kareler Ortalaması
MS	Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
MSO	Hormonsuz Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
NAA	α- Naftalen Asetik Asit
S.D.	Serbestlik Derecesi
S.U.	Sürgün Ucu Meristemi
TDZ	Thidazuron (Fenil-3-1,2,3-thidiazol-5-il) üre
V.K.	Varyasyon Kaynakları

1. GİRİŞ

1.1. Sekonder Su Bitkilerinin Ekolojik Sınıflandırılması

Kormofit özellikteki bitkilerin kara ortamındayken yeniden su ortamına adaptasyon sağlamış tiplerine sekonder su bitkileri denir. Bu bitkiler suyun farklı derinliklerinde yaşayabilirler. Yaşadıkları ortamın şartlarına ve suyun derinliğine göre 3 sınıfa ayrılırlar (Güner, 2004).

Su altı bitkileri : Vejetatif organlarının tümü su yüzeyinin altında bulunan, genelde kökleri ya da kök benzeri organları ile çamurlu zemine tutunmuş olarak yaşayan bitkilerdir. Bu bitkilerin yalnızca çiçekleri su yüzeyine çıkabilir. Bu bitkilere örnek olarak; *Ceratophyllum sp.*, *Elodea sp.*, *Potamogeton sp.* ve *Utricularia sp.* verilebilir.

Su üstü bitkileri : Bu bitkilerin bazı kısımları su ortamıyla bazı kısımları hava ortamıyla temas halindedir. Örneğin, bitkinin kökleri su altındaki toprak içinde, yapraklarının bir bölümü ile çiçekleri su yüzeyi üzerinde bulunabilir. Bu sınıftaki bitkilerde, hem su altında hem de su üstündeki yaprakların, ortam değişikliği nedeniyle farklı tiplerde geliştiği görülür. Bu olaya ontogeni denmektedir. Bu bitkilere örnek olarak; *Ranunculus sp.*, *Alisma sp.* ve *Sagittaria sp.* verilebilir.

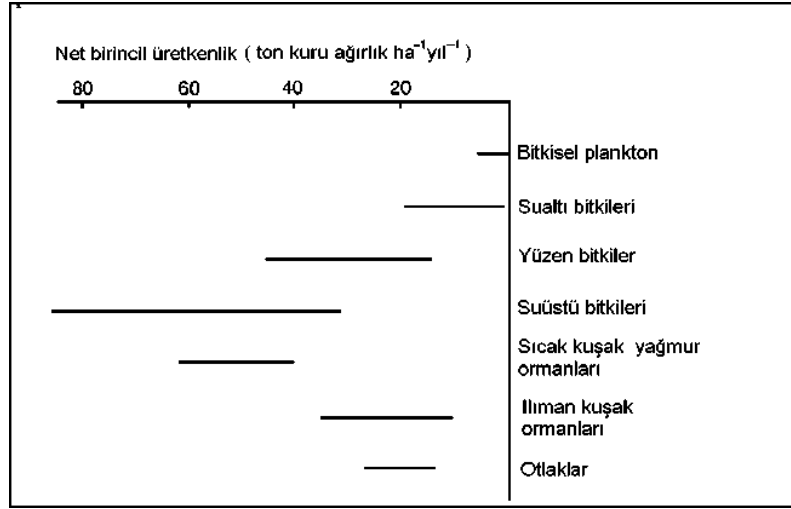
Yüzücü yapraklı su bitkileri : Bu sınıftaki bitkilerden bazıları kök veya kök benzeri yapılarıyla kendini bir yere tutturduktan sonra yapraklarını su yüzeyine çıkartırlar. Bazıları da kök veya benzeri yapılarıyla hiçbir yere tutunmadan suda serbest yüzerler. Bu nedenden dolayı yüzen su bitkileri ikiye ayrılır:

- a. *Suda serbest yüzenler* : Bu bitkilerin kökleri su içerisinde hiçbir yere tutunmadan serbest halde bulunurlar. Böylece su hareketleriyle ve rüzgarlarla yer değiştirebilirler. Bu gruptaki bitkilere örnek olarak; *Azolla sp.*, *Lemna sp.*, *Salvinia sp.* ve *Eichornia sp.* verilebilir.
- b. *Kökleri ile tutunup yaprakları su yüzeyinde yüzenler* : Bu gruptaki bitkiler kalın rizomlarından çıkan kökleriyle su tabanındaki toprağa tutunduktan sonra yapraklarını geliştirerek su yüzeyine çıkartır ve su yüzeyinde yüzerler. Bu

yapraklarda olumsuz dış şartlara karşı koyabilecek kalın kütikula tabakası yer alır. Bu gruptaki bitkilere örnek olarak; *Nymphaea sp.*, *Nuphar sp.* ve *Victoria sp.* verilebilir.

1.2. Su Bitkilerinin Önemi ve Kullanım Alanları

- Su bitkileri, klorofilleri sayesinde su ve suda eriyik halde bulunan karbondioksiti ve ışık enerjisini kullanarak fotosentez olayı sonucunda organik madde ve oksijen üretirler (Cirik ve ark., 2011). Ayrıca net birincil üretkenlikleri diğer karasal bitkilere kıyasla (Şekil 1.1) daha fazladır (Anonim, 2009).



Şekil 1.1. Su bitkilerinin net birincil üretkenliklerinin, bitkisel planktonlar ve kara bitkileri ile karşılaştırılması (Anonim, 2009)

- Su bitkileri sucul ortamda bitkisel protein kaynaklarını oluşturduklarından dolayı besin zincirinin ilk halkasıdır. Bu bitkiler daha sonra gıda zincirinde hayvansal proteine dönüştükleri için çok önemlidir (Cirik ve ark., 2011).

- Su bitkileri patojen bakterilerin ortamdaki uzaklaştırılmasında rol alırlar. Patojen bakteriler yaşamak için asidik ortamları tercih ederler. Bitkisel organizmalar ise ortamı bazikleştirdiği için patojen bakterilerin uzaklaşmasını sağlarlar (Cirik ve ark., 2011).

- Su bitkileri, balıklar ve diğer yaban hayatı için yaşam ortamı oluştururlar (Savino ve Stein, 1982). Ayrıca bu bitkilerle beslenen herbivor canlılar ile yumurtalarını bu bitkiler üzerine bırakan canlıların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için bu bitkiler hayati öneme sahiptir (Anonim, 2009).

- Su bitkileri, suyun berraklığını ve kalitesini artırırken, kıyı erozyonu ve sediment resüspanسیون oranını azaltır (Smart, 1998).

- Su bitkileri, suyun sertliğini ayarlayarak yumuşak sularda yaşayan canlılar için yaşam ortamı oluştururlar (Cirik ve ark., 2011).

- Bazı su bitkileri, besinleri (Gottschall ve ark., 2007; Chung ve ark., 2008) ve ağır metalleri (Miretzky ve ark., 2004; Upadhyay ve ark., 2007; Dhir, 2010) su ortamından uzaklaştırabildiklerinden (Iqbal ve Tachibana, 2007) dolayı atık suların arıtılmasında (Zimmelsa, 2009) veya fitoremediasyon amacıyla kullanılabilirler (Lu ve ark., 2010). Fitoremediasyon, kirliliğin uzaklaştırılmasında kullanılan çevre dostu, güvenli ve ucuz bir tekniktir (Mudgal ve ark., 2010). Ayrıca bazı su bitkileri, sucul ekosistemde kirliliğin izlenmesinde de (biomonitör) kullanılmaktadır (Zurayk ve ark., 2001; Cardwell ve ark., 2002).

- Bazı su bitkileri insan gıdası olarak kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan sucul bitkilerden biri pirinçtir. Uzak Doğu'da su kestanesi yetiştiriciliği yapılmaktadır. Yine Akdeniz bölgesinde yetiştirilen *Trapa natans*'ın dikenimsi meyvelerinin içinde büyük, etli tohumları insan gıdası olarak kullanılmaktadır. Ayrıca su teresi gibi yaprakları tüketilen sucul bitkilerde vardır (Cirik ve ark., 2011).

- Bazı su bitkileri çiftlik hayvanlarının yemi olarak kullanılmaktadır (Çizelge 1.1). Bu bitkiler protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve mineralleri yeterli düzeyde içermelerinden dolayı çiftlik hayvanları için iyi bir besin kaynağını oluştururlar (Boyd, 1974). Fakat taze ve yeşil sucul bitkilerin ağırlık başına besin değerleri düşüktür. Kaliteli bir yem için sucul bitkilerin her zaman kurutulmuş ve işlenmiş olması gerekir (Cirik ve ark., 2011).

Çizelge 1.1. Bazı su bitki cinslerinin temel kullanım alanları (Anonim, 2009'dan değiştirilerek alınmıştır).

Kullanım Alanı	Bitki Cinsleri
1. Atık su arıtımı	<i>Azolla, Ceratophyllum, Eichhornia, Elodea, Hydrocotyle, Juncus, Lemna, Myriophyllum, Phragmites, Pistia, Potamogeton, Salvinia, Scirpus, Schoenoplectus, Spirodela, Trapa, Typha, Wolffia, Canna, Pontederia, Sagittaria</i>
2. Hayvan yemi	<i>Althernanthera</i> (kerevit), <i>Azolla</i> (sığır), <i>Brachiaria</i> (sığır), <i>Ceratophyllum</i> (sığır), <i>Eichhornia</i> (domuz, balık, tavşan, kümes hayvanları), <i>Elodea</i> (kümes hayvanları), <i>Heteranthera</i> (sığır), <i>Lemna, Myriophyllum, Panicum</i> (sığır), <i>Pistia</i> (sığır), <i>Potamogeton</i> (kümes hayvanları), <i>Ruppia</i> (sığır), <i>Sagittaria</i> (kerevit), <i>Salvinia</i> (balık, koyun), <i>Vallisneria</i> (sığır)
3. Kılavuz bitki (<i>bioindicator</i>)	<i>Azolla, Callitriche, Lemna, Myriophyllum, Ranunculus, Zannichellia</i>
4. Doğal gaz (metan ve alkol)	<i>Eichhornia, Hydrilla, Myriophyllum, Salvinia, Typha</i>
5. Bitkisel gübre (karma gübre)	<i>Azolla, Eichhornia, Lemna, Myriophyllum, Pistia, Salvinia</i>
6. İnsan ilacı	<i>Acorus, Alisma, Elatine, Nelumbo, Nymphaea, Polygonum, Scirpus,</i>
7. İnsan besini	<i>Colocasia, Lemna, Ipomoea, Oryza, Scirpus, Trapa, Typha, Vallisneria, Zizania</i>
8. Kağıt, kağıt hamuru vb.	<i>Cyperus, Juncus, Panicum, Pandarus, Phragmites, Salvinia,</i>
9. Dam örtüsü	<i>Phragmites, Scirpus, Typha</i>

- Bazı su bitkileri (Örneğin, *Ceratophyllum demersum, Ludwigia repens* ve *Bacopa monnieri* gibi) akvaryumlarda kullanılmaktadır. Bu bitkiler, akvaryumlarda doğal ve güzel görünümü sağlamalarının yanında akvaryumdaki canlılar için gerekli olan oksijeni de üretirler. Ayrıca akvaryum bitkileri, küçük balık ve yavrulara gizlenebilecekleri güvenli bir ortam sağlarlar (Alpbaz, 1984).


1.3. Tatlı Su Bitkilerinin Üretim Teknikleri

Tatlı su bitkilerini yetiştirme teknikleri eşeyli ve eşeysiz olmak üzere ikiye ayrılır. Eşeyli üretimde yapay polenleme ve tohumla üretimden yararlanılmaktadır. Yapay polenleme, kendini dölleyemeyen türlerde uygulanan bir yöntemdir. Döllenme olayı, bir fırça yardımıyla alınan polenlerin diğer bitkinin çiçeğine taşınmasıyla sağlanabileceği gibi olgunlaşmış anterleri bulunan çiçeklerin koparılarak diğer çiçeğin stigmasına sürülmesi ile de sağlanabilir. Tohumla üretim, bitkinin normal hayat döngüsünde bulunan bir olaydır. Özellikle vejetatif yolla üreyemeyen bitkilerin üretilmesinde ve çok sayıda taze fideler elde edilmek istendiğinde bu yöntem başvurulur (Cirik ve ark., 2011).

Diğer üretim şekli eşeysiz üretilmektedir. Bu yöntem ticari olarak en yaygın kullanılan yöntemdir. Çeşitli şekillerde yapılabilmektedir. Örneğin; ana bitkiden kesilen parçaların toprağa dikilmesiyle, rizoma sahip bazı su bitkilerinde, rizomlar üzerinde yeni çıkan bitkilerin kesilip toprağa aktarılmasıyla ve çiçek açmayan bazı su bitkilerinde ana bitkinin yapraklarından yeni bitkilerin gelişmesiyle (Cirik ark., 2011).

1.4. *Ceratophyllum demersum* L. Bitkisinin Genel Özellikleri

Ceratophyllum demersum L. (tilki kuyruğu) Ceratophyllaceae familyasına ait tamamen su altında yaşayan çok yıllık bir bitkidir (Şekil 1.2). Koyu yeşilden açık yeşile kadar değişen renklerde olabilen çatallı yapıdaki yaprakları, gövde üzerinde halkasal dizilmişlerdir. Bu halkalar, gövde ucuna doğru sıklaşarak tilki kuyruğu görünümünü aldıklarından sucul ortamda tilki kuyruğu olarak da bilinirler (Bakacak, 2010). Kökleri bulunmaz fakat bazı modifiye yapıları sayesinde (rizoid) suyun dip kısımlarına tutunabilirler (Cook, 1996; Arber, 2010). Çoğalmaları tohum ya da kolay kırılan gövdeleriyle olmaktadır. Su altında ve küçük olan çiçekleri yaprakların tabanında bulunmakta, erkek ve dişi çiçekler aynı bitki üzerinde ayrı olarak oluşmaktadır. Erkek çiçekler gövdenin karşıt taraflarında çiftler halinde bulunurken dişi çiçekler yalnız bulunmaktadırlar. Çiçeklerin, besin açısından zengin sulara yoğun koloniler oluşturma eğilimleri vardır. Çiçeklenme zamanı haziran ve eylül ayları arasında olmaktadır (Anonim, 2012a).

Alem	Plantae	
Alt bölüm	Tracheobionta	
Üst bölüm	Spermatophyta	
Bölüm	Magnoliophyta	
Sınıf	Magnoliopsida	
Alt sınıf	Magnoliidae	
Takım	Nymphaeales	
Aile	Ceratophyllaceae	
Cins	<i>Ceratophyllum</i> L.	
Tür	<i>Ceratophyllum demersum</i> L.	

Şekil 1.2. *Ceratophyllum demersum* L. bitkisinin sistematığı (Anonim, 2012b) ve akvaryum ortamındaki genel görünümü (Anonim, 2012e.)

Morfolojik tanımı: Gövdeleri 15 cm'den uzundur. Yapraklar koyu yeşil, 6-16 mm uzunlukta, 1-2 kez çatallanmış, sert yapıda, segmenler linear, dentikulattır. Meyve 4-5 x 2-2,5 mm, uçtaki diken 4-6 mm, tabana yakın olan yanal dikenler hafifçe geriye doğru kıvrık ve 2-3 mm uzunluktadır (Seçmen ve Leblebici, 1997).

1.5. *C. demersum* Bitkisinin Bazı Kullanım Alanları

1. *C. demersum* akvaryumlarda ticareti yapılan en popüler bitkiler arasındadır. Su bahçesi sektöründe havuzların ve küçük su alanlarının oksijenini artırmak için kullanımı oldukça yaygındır (Anonim, 2012c).
2. Balıklara ve diğer akuatik hayvanlara içinde barınmaları için mükemmel bir yaşam ortamı sağlarlar (Arber, 2010; Anonim, 2012c).
3. Birçok akuatik bitki insanlar ve hayvanlar için besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. *C. demersum* sığır, koyun, keçi gibi çiftlik hayvanları ve kümes hayvanları için iyi bir besin kaynağıdır (Anonim, 2012d).

4. Ağır metaller (Fe, Cu, Cd, Pb gibi), canlı dokularda birikebilen ve konsantre olabilen son derece toksik elementlerdir (Foroughi ve ark., 2011). Yapılan çalışmalar, *C. demersum*'un sudaki ağır metali uzaklaştırma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Pourkhabbaz ve ark., 2011; Abdallah, 2012; Fawzy ve ark., 2012). Bitkilerle ağır metal giderimi (fitoremediasyon), geleneksel temizleme teknolojilerine alternatif olarak, oldukça etkili, maliyeti ucuz, ekolojik olarak uygun ve güvenli bir teknolojidir (Kamal ve ark., 2004).

5. *C. demersum* su ortamında kirliliğin izlenmesinde biyomonitör olarak kullanılabilir (Marchese, 2008; Park ve ark., 2011).

Bu çalışmanın amacı, hem su ekosisteminde ve hem de ticari açıdan önemli olan *C. demersum*'un *in vitro* koşullarda çoğaltılmasıdır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kuramsal Temeller

2.1.1. Bitki Materyalinin Yüzey Sterilizasyonu

Sterilizasyon, doku kültürü çalışmalarının en önemli aşamalarından biridir. Çalışma ortamının, besin ortamının, alet ve ekipmanların sterilizasyonunun yanında kültüre alınacak eksplantın da (bitki kısımları) steril olması gerekmektedir. Ancak sterilizasyon yöntemlerinde kullanılacak dezenfektanların cinsi (etil alkol, sodyum hipoklorit, civa klorür, gümüş nitrat ve hidrojen peroksit gibi.), konsantrasyonları ve uygulama süresi eksplant kaynağına göre farklılıklar göstermektedir. Ayrıca sterilizasyon aşamasında eksplantların zarar görmemelerine dikkat edilmelidir. Bu bakımdan doku kültürü çalışmalarında en iyi eksplant kaynağı daha önceden steril edilmiş eksplantlardan çıkan yeni sürgünlerdir. Bu şekilde dezenfektanların eksplantlar üzerindeki olumsuz etkilerinin de önüne geçilmiş olmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2001; Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

2.1.2. *In Vitro* Üretim

2.1.2.1. Doku Kültürü Teknikleri

Steril şartlarda ve suni bir besin ortamında gerçekleştirilen bitki doku kültürü tekniği; bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımları kullanılarak yeni doku, bitki ya da bitkisel ürünlerin elde edilmesidir. Bu teknik sayesinde, yeni bitki çeşitleri geliştirilmekte, var olan türlerde genetik çeşitlilik sağlanmakta, nesli yok olma tehlikesi altında olan türler korunmakta ve zor çoğalan türler çoğaltılmaktadır. Ayrıca hücre, doku ve bitki beslenmesi, protoplast izolasyonu ve füzyonu, sitogenetik çalışmalar, morfogenezis çalışmaları ve biyolojik azot fiksasyonu gibi bazı araştırmalarda da doku kültüründen yararlanılmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2001).

2.1.2.2. Organogenesis

Organogenesis hakkında birçok tanımlamalar mevcut olup, Gürel ve Türker (2001) organogenesisi, “Hücrelere ve dokulara baskı uygulayıp bazı değişikliklere sebep olunarak sürgün veya kök primordiyumu (taslağı) diye isimlendirilen tek kutuplu ve vasküler sistemi kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının oluşmasına yol açan bir işlemdir.” şeklinde tanımlamışlardır.

Organogenesis, indirekt organogenesis (Jiang ve ark., 2012) ve direkt organogenesis (Kesari ve ark., 2012) olmak üzere ikiye ayrılır (Gürel ve Türker, 2001). İndirekt organogenesisde; besin ortamına aktarılan eksplantın sürgün veya kök oluşturmasından önce, farklılaşmamış hücre yığını olan kallusun oluşumu sağlanır daha sonra bu kallustan sürgün veya kök oluşumu elde edilir. Direkt organogenesisde ise kallus oluşmadan doğrudan sürgün veya kök oluşur (Cavusoglu ve ark., 2011).

Organogenesis çalışmalarında bitkinin herhangi bir parçası kullanılabilir. Örneğin, gövde (Wang ve ark., 2011), kök (Da Silva ve ark., 2011), yaprak (Yang ve ark., 2012), çiçek (Ramogola ve Fennell, 2007), yumurtalık veya yumurta hücresi (Kasumi ve ark., 2006), kotiledon ve hipokotil (Burbulis ve ark., 2012) gibi fide organları ve zigotik embriyo (Aasim ve ark., 2011) verilebilir.

2.1.2.3. Mikroçoğaltım

Klonal çoğaltımda denilen mikroçoğaltım, bitkiden izole edilen kısımlardan steril şartlarda ve suni besin ortamında tam bir bitkinin meydana gelmesi olayıdır (Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Mikroçoğaltımın amacı, büyük oranda genetiksel olarak özdeş, fizyolojik olarak tek tip, gelişimsel olarak normal ve tercihen zor şartlarda hayatta kalma potansiyeli yüksek olan bitkileri kısa bir süre içerisinde ve düşük maliyetle elde etmektir. Vejetatif çoğaltım yöntemlerine göre daha fazla avantaja sahiptir. Ayrıca bahçecilik, tarım ve ormancılık alanlarındaki uygulamaları dünya genelinde artmaktadır (Singh, 2002).

Doku kültürü çalışmalarında uygun bir eksplant kaynağının seçimi oldukça önemlidir. Fakat kültüre alınan aynı tür iki bitkinin aynı dokusundan alınan eksplantların davranışları arasında farklılıklar olabilir. Bu farklılıklar; eksplant kaynağı olarak kullanılan dokuların ontogentik ve fizyolojik yaşı, eksplantların bitkiden alındığı dönem, eksplantların büyüklükleri (Gürel ve Türker, 2001) ve bitkilerin yetiştiği ortamlarda ışık, sıcaklık ve besin ile ilişkileri gibi nedenlerden kaynaklanabilir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Mikroçoğaltım çalışmalarında çeşitli eksplantlar kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; gövde (Kaur ve ark., 2011), kök (Parveen ve Shahzad, 2011), sürgün ucu (Sharaf ve ark., 2011), yaprak (imen ve zge, 2009), koltuk altı tomurcuklarıdır (Abdelmageed ve ark., 2011).

2.2. Kaynak Araştırması

Kane ve ark. (1988), *in vitro* koşullarda Amerikan nilüferi *Nelumbo lutea*'nın embriyosunu alarak BAP, Zeatin, GA₃ ya da ABA içeren yarı sıvı MS ortamda kültüre almışlardır. BAP ve Zeatinin rizom gelişimine etkisi olmamıştır. En iyi sonuç, 290 µM GA₃ içeren ortamdan elde edilmiştir.

Bird ve Smith (1994), deniz yosunu *Halophila engelmannii*'nin koltukaltı meristemi ile *in vitro* çalışmalar yapmışlardır. Aynı kültür kabının alt kısmına %0,8 agar içeren katı ortam, üst kısmına da sıvı besi ortamı konmuştur. Katı ortamda inorganik besin maddeleri, bitki büyüme düzenleyicileri, %1 sükröz ve aktif karbon içeren yapay deniz suyu eklenmiştir. Sıvı ortama ise yapay deniz suyu ve inorganik besin maddeleri eklenmiştir. En iyi gelişme, azot kaynağı olarak 3,4 mM GA₃ kullanıldığında elde edilmiştir. Sürgün oluşumu en fazla 0,25 mg/l NAA ve 10 mg/l BAP içeren ortamda kaydedilmiştir.

Huang ve ark. (1994), *in vitro* koşullarda *Anubias barteri* Engler var. undulata'nın hızlı çoğaltımı için bir protokol oluşturmuşlardır. Aktif bir şekilde büyüyen yanal sürgünlerin küçük uçlarından alınan eksplantların, antibiyotik ve fungusit içermeyen besin ortamlarına aktarılmasıyla aseptik kültürler elde edilmiştir. Bulaşıklı kültürlerin sadece pasif tomurcuk eksplantlardan ürediği kaydedilmiştir. Hızlı sürgün çoğaltımı MS tuzları, %3 sükröz, %0,8 (Sigma) agar, 10 mg/l tiamin HCl, 10 mg/l piridoksin HCl, 5 mg/l nikotinik asit, 2 mg/l glisin, 100 mg/l i-inositol, 0,3 mg/l BA, 0,01 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren besin ortamında elde edilmiştir.

Agrawal ve Ram (1995), yaptıkları çalışmada su kestanesi (*Trapa sp.*)'nin *in vitro* çimlenmesi ve mikroçoğaltımı için steril embriyoları NBS (Nitsch'in temel yarı katı ortamı) ortamında kültüre almışlardır. Yeni çıkan fidelerden elde edilen sürgün ucu ve nodal eksplantlar NBL (Nitsch'in temel sıvı ortamı) ortamında kültüre alınmıştır. Rejenere olan sürgünlerden alınan eksplantlar çeşitli bitki büyüme düzenleyici bulunan NBL ortamına yerleştirilmiştir. Oksinin aksillary tomurcuk üretimini engellediği ancak yeşil kök oluşumunu artırdığı gözlenmiştir. Absisik asit genç yaprak gelişimini engellemiştir. 10⁻⁶ M BAP aksillar dal üretimini artırmada çok etkili olmuştur.

Öztürk (2002), *Ludwigia sp*'nin *in vitro* hızlı çoğaltımı ile ilgili çalışma yapmıştır. Bitki yüzey sterilizasyonu için 15 dk çeşme suyunda tutulan bitkilere sonra 9 dk %20'lik ticari çamaşır suyu uygulanmıştır. Ardından 3 dk 3 kez durulama işlemi yapılmıştır. Uç meristem, birinci, ikinci ve üçüncü-dördüncü koltukaltı meristem eksplantları 4 hafta boyunca, %3 sükröz, %0,8 agar, BAP (0,1, 0,2 ve 0,3 mg/l), TDZ (0,05, 0,1, 0,15 mg/l), NAA (0,1 mg/l) içeren MS ortamlarında tutulduktan sonra ½ MS ortama alınmış ve 4 hafta bu ortamda tutulmuştur. Eksplant başına en fazla sürgün 12,31 adet ile 0,05 mg/l TDZ ve 0,1 mg/l NAA içeren MS besin ortamındaki uç meristemlerden elde edilmiştir. Köklendirme çalışması için uzayan sürgünler, için ½ MS ortamına aktarılmıştır. Köklenen sürgünler daha sonra akvaryum ortamına adapte edilmiştir.

Öztürk ve ark. (2004), akvaryum bitkisi *Ludwigia repens* J.R.Forst.'in *in vitro* şartlarda çoğaltımı ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Apikal meristem, birinci, ikinci ve üçüncü-dördüncü koltukaltı meristem eksplantları 4 hafta MS, % 3 sukroz, % 0,8 agar, BAP (0,1, 0,2 ve 0,3 mg/l), TDZ (0,05, 0,1, 0,15 mg/l), NAA (0,1 mg/l) içeren ortamlarda tutulduktan sonra ½ MS ortama alınmış ve 4 hafta da 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 besin ortamından elde edilmiştir. Rejenere olan sürgünler 10-20 mm uzunluğa geldiklerinde kesilerek steril Magenta GA7 veya cam kavanozlar içinde ½ MS ortamda köklendirmeye alınmıştır. Burada köklenen sürgünler daha sonra akvaryum ortamına aktarılmıştır. Bitkilerin adaptasyonu %100 başarı ile sağlanmıştır.

Şumlu (2004), Türkiye'de yetişen nilüfer (*Nymphaea alba* L.)'in *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi ve çoğaltımı amacıyla bir çalışma yapmıştır. En yüksek tohum çimlenmesi %60 oranında 1 mg/l BAP ve 0,1 mg/l IAA içeren MS besin ortamında elde edilmiştir. Ancak 5 ay sonra tohumların dormansiye girmeleri nedeniyle MSO ortamı ve kağıt filtre köprülerine değişik oranlarda GA₃, KNO₃ ve TDZ ilave edilerek dormansinin kırılmasına çalışılmıştır. En fazla çimlenme 0,05, 2,00 ve 4,00 mg/l TDZ içeren kağıt filtre ortamında görülmüştür.

Zhou ve ark. (2006), akuatik makrofitler olan *Myriophyllum spicatum* L. ve *Potamogeton crispus* L. bitkilerinin *in vitro* ortamda çoğaltımı ile ilgili protokol geliştirme çalışması yapmışlardır. Bitki yüzey sterilizasyonu için her iki türden alınan taze sürgünler 2 gün sabunlu suda, ardından 1 gün boyunca musluk suyunda bekletilmiştir. Sürgünler daha sonra 2-3 cm uzunluğunda parçalara ayrılıp, %70'lik etanolde 30 saniye ve %10'luk çamaşır suyunda 3 dk boyunca muamele görmüştür. Ardından 5 kez 3'er dk steril distile su ile yıkanmıştır. Eksplant olarak yeni çıkan sürgünlerden alınan gövde eksplantları kullanılmıştır. Her iki bitki türünde de sürgün rejenerasyonu için 0-0,2 mg/l BA, 0-0,1 mg/l IAA ve %3 sükröz içeren sıvı MS ortamı kullanılmıştır. Kök oluşumu için ise 0, 0,1 ve 0,2 mg/l NAA hormon oranlarını sırasıyla tam, yarım ve çeyrek oranlarında içeren MS besi ortamında denemeler yapılmıştır. Her iki türde gövde parçalarının daha fazla bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmadan da rejenerasyon yeteneğinin olduğu gözlenmiştir. Ancak, *P. crispus*'un rejenerasyon yeteneği, 0,2 mg/l BA ile 0,2 ya da 0,5 mg/l IAA içeren MS ortamında önemli derecede uyarıldığı gözlenirken, *M. spicatum*'un ise rejenerasyon yeteneği 0,2 mg/l BA ile 0,2 ya da 1,0 mg/l IAA içeren MS ortamında önemli ölçüde uyarıldığı gözlenmiştir. Kök oluşumu için *M. spicatum*'da 0,1 ya da 0,2 mg/l NAA oranlarını içeren MS ortamı tercih edilmişken, *P. crispus* için ise MSO ya da 0,1 mg/l NAA içeren MS ortamları tercih edilmiştir. Doku kültürü odasında üretilen her bir bitki türünün fidelerinin yapay göletteki kil, verimli kum ve bunların karışımlarında (1:1) %100 adaptasyonu sağlanmıştır.

Alizadeh (2008), Çin soğanı (*Allium tuberosum* L.)'nin çoğaltım çalışması için boğum eksplantları ve *in vitro*'da gelişen fidecik eksplantları değişik oranlarda BAP-IBA, TDZ-NAA ve TDZ-2,4-D içeren MS ortamlarında kültüre almıştır. En fazla sürgün oranı ve eksplant başına sürgün sayısı, 1 mg/l BAP - 2 mg/l IBA içeren ortamda boğum eksplantından elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler 0,5 mg/l IBA içeren köklendirme ortamında köklendirilmiş ve ardından dış şartlara adaptasyonu sağlanmıştır.

Behera ve ark. (2008) *Bacopa monnieri* (Linn) Wettst bitkisinin *in vitro* koşullarda çoğaltımı için sürgün eksplantlarını farklı oranlarda BAP ve Kin (0,5 mg/l, 1,0 mg/l, 1,5 mg/l ve 2 mg/l) içeren MS ortamında 8 hafta boyunca kültüre almışlardır. En fazla oranda sürgün ve kök rejenerasyonu 2 mg/l BAP-Kin içeren ortamda ve eksplantların

boğum kısımlarından elde edilmiştir. Sekiz hafta boyunca *in vitro* koşullarda büyütülen bitkilerin biyokimyasal analizlerinde, maksimum miktarda primer ve sekonder metabolitlerin varlığını 2 mg/l BAP - Kin içeren MS ortamında kaydedilmiştir. Ayrıca 2 mg/l BAP - Kin içeren MS ortamında, büyüme oranlarının ve biyokimyasal parametrelerin iki ile sekiz hafta arasında arttığı da kaydedilmiştir.

Öztürk (2008) akvaryum bitkileri *Hygrophila difformis* ve *Microsorium pteropus*'un *in vitro* koşullarda çoğaltımıyla ilgili çalışma yapmıştır. *Hygrophila difformis* türünde farklı oranlarda Kin, TDZ, NAA ve 2,4-D içeren MS ortamlarını kullanmıştır. Eksplant başına en fazla sürgün rejenerasyonu 80,56 adet ile 0,25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamında yaprak eksplantından elde edilmiştir. Ayrıca sıvı MS ortamı da kullanmıştır. En fazla sürgün oluşumu 0,25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren sıvı MS ortamındaki gövde eksplantından elde edilmiştir. *M. pteropus* türünde sürgün rejenerasyonu için farklı oranlarda NAA içeren sıvı MS ortamı kullanılmıştır. Ayrıca *ex vitro* şartlarda "pulse treatment" çalışması yapılmıştır. Bu çalışmayla bitkinin yaprakları yüksek oranda BAP ve IBA ile muamele edilmiş olup, en fazla sürgün rejenerasyonunu 250 mg/l BAP ve 250 mg/l IBA da 30 dk boyunca yapılan uygulamadan elde edilmiştir.

Yücel (2008), *Ludwigia repens* (2n=32) bitkisine iki farklı kolkisin muamelesi ile bitkinin kromozom sayısını iki katına çıkartarak, özelliklerini iyileştirmek ve akvaryumlarda daha çekici görünmesini sağlamak için çalışma yapmıştır. Birinci metotta sürgün ucu ve birinci koltukaltı meristemleri farklı dozlarda (0,5-4,0 mg/l) kolkisin içeren büyüme ortamına (0,05 mg/l TDZ and 0,5 mg/l NAA) aktarılmıştır. İkinci metotta ise, eksplantlar farklı oranlardaki (250 - 2000 mg/l) kolkisin çözeltisine daldırılarak 30 dk muamele edildikten sonra büyüme ortamına aktarmıştır. Bir ay sonra daha fazla büyüyen ve gelişen bitkiler, ½ MS ortamına aktarılmıştır. 500 mg/l kolkisinde 30 dk daldırma ile muamele edilip, büyümeye alınan birinci koltuk altı meristeminde sitolojik analizlerle katlanmış kromozom sayısı 44 olarak kaydedilmiştir.

Şumlu (2009), *Rotala macrandra* Koehne'nin *in vitro* koşullarda hızlı çoğaltımı ve gen aktarımı ile ilgili yaptıkları çalışmada, *R. macrandra*'nın 1. koltukaltı ve 2. koltukaltı meristemi ile yaprak, 1. ve 2. boğum arası, eksplantları agar ve gelrit ile katılaştırılan ve içerisinde sitokin ve oksin bulunan ortamlarda kültüre almıştır. Ayrıca sıvı MS besin

ortamında da sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu 27,33 adet ile 1. 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 1. boğum arası eksplantlarıyla gen aktarım çalışması yapılmıştır. Elde edilen tüm rejenere olmuş ve transgenik aday bitkiler akvaryum ortamına adapte edilmiştir

S. Sharma ve ark. (2010), yüksek ticari potansiyele sahip tıbbi bitki olan *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 dk 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.

Somsri ve ark. (2010), *Lemna minor* bitkisinin *in vitro* tekniklerle mikroçoğaltılmasına floresan aydınlatmanın etkileri üzerine bir çalışma yapmışlardır. *In vitro* çoğaltım sırasında Philips TLD 36W/54 ve Toshiba FL40T8BRF/36 olmak üzere iki farklı türde ışık kaynakları kullanılmıştır. Bitkiler, hormon içermeyen, vitaminli MS (4,43 g/l), sukroz (30 g/l) ve MES (1 g/l) içeren sıvı ortamda kültüre alınmıştır. Her iki ışık kaynağı altındaki bitki kültürlerinde de sürekli artma eğiliminde olan normal eşeysiz üreme gözlenmiştir. Toshiba FL40T8BRF/36'ya maruz kalan kültürlerin, Philips TLD 36W/54'e maruz kalan kültürlere göre biraz daha hızlı çoğaldığı ve belirgin bir şekilde daha yeşil yapraklara sahip olduğu kaydedilmiştir. Yapılan çalışmadaki veriler, Toshiba FL40T8BRF/36'dan yayılan ışığın daha kaliteli ve sağlıklı kültürler ürettiğini ortaya koymuştur.

Yenice (2010), Su mercimeği (*Lemna minor* L.) bitkisiyle yaptığı çalışmada, Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktör ile *in vitro* çoğaltımının sağlanması ve kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin bitkinin protein miktarına etkilerini belirlemeyi amaçlamıştır. Çoğaltım için farklı oranlarda BAP, kinetin ve TDZ içeren şekerli ve şekersiz sıvı MS ortamları kullanılmıştır. Eksplant başına en fazla bitki 50,44 adet ile 0,2 mg/l BAP içeren şekersiz sıvı MS ortamında pH 7,23 te kaydedilmiştir. Ayrıca 0,05 mg/l Kinetin içeren sıvı MS ortamında eksplant başına düşen bitki sayısı en fazla 57,823 adet ve 0,6 mg/l TDZ içeren sıvı MS ortamında eksplant başına düşen bitki sayısı en fazla 50,74 adet hesaplanmıştır. Kjeldahl Yöntemi ile yapılan azot tayini çalışmaları sonucunda bitkinin protein değeri %25,5 olarak tespit etmiştir. 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 çoğaltımının bitkinin protein miktarına olumlu yönde etkileri belirlenmiştir.

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

Gao ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb'in bitki büyüme düzenleyicilerinin, eksplant çeşitinin ve karanlık ortamın *in vitro* rejenerasyon üzerine etkisini araştırmışlardır. Kallus oluşumu için gövde, petiyol ve yaprak eksplantları, farklı oranlarda BAP, 2,4-D ve BAP-2,4-D içeren yarı-katı MS ortamında 0,10 ve 20 gün karanlık ortamda bekletilmiştir. Optimal durumlarda kallus oluşumu 2,2 µM BAP ve 2,2 µM 2,4-D içeren yarı katı MS ortamında 20 gün karanlıkta bekletilen gövde eksplantlarından elde edilmiştir. Sürgün rejenerasyonu için oluşan bu kalluslardan alınan parçalar, farklı oranlarda BAP ve NAA içeren yarı katı MS

ortamında 0, 7, 14 gün süreyle alt kültüre alınmıştır. En yüksek oranda sürgün rejenerasyonu karanlık olmayan koşullarda 8,8 µM BAP içeren yarı katı MS ortamından elde edilmiştir.

Gnanaraj ve ark. (2011) *Alternanthera sessilis* (L.)'in *in vitro* koşullarda hızlı çoğaltımı için sürgün ucu, yapraklar, gövde nodları ve internodları farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Sürgün ucu eksplantlarında, en yüksek sürgün rejenerasyon oranı ($94,3 \pm 0,43$) ve eksplant başına en fazla sürgün sayısı ($23,4 \pm 0,38$) 2,0 mg/l BAP içeren MS ortamında kaydedilmiştir. Nodal eksplantlarda ise en yüksek sürgün rejenerasyon oranı ($90,4 \pm 0,82$) ve nod başına en fazla sürgün sayısı ($15,2 \pm 0,63$ adet) 1,5 mg/l BAP içeren MS ortamında kaydedilmiştir. En fazla orandaki kallus oluşumu 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamındaki yaprak ($92,4 \pm 0,61$) ve internod ($88,9 \pm 0,83$) eksplantlarından elde edilmiştir. En fazla oranda kök oluşumu ($97,4 \pm 1,36$) ve sürgün başına en fazla kökçük sayısı ($6,3 \pm 0,42$) 3 mg/l IBA içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamında elde edilmiştir. Rejenere olan sürgünlerin adaptasyonu başarıyla sağlanmıştır (%78).

Shahzad ve ark. (2011), *Veronica anagallis-aquatica* L.'nin nodal eksplantları sürgün rejenerasyonu için çeşitli sitokininleri (BAP, Kin ve 2-iP) farklı oranlarda (0,1-5,0 µM) içeren katı MS ortamında kültüre almışlardır. Ayrıca farklı oranlarda BAP (0,1-5,0 µM) içeren sıvı MS ortamında da denemeler yapılmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu sayısı ($43,7 \pm 1,85$) ve sürgün uzunluğu ($5,0 \pm 0,25$) 0,5 µM BAP içeren katı MS ortamında elde edilmiştir. Daha sonra sürgün rejenerasyonu için optimal sitokinin konsantrasyonu olan 0,5 µM BAP ile farklı oranlarda (0,1, 0,5 ve 1,0 µM) IBA ve NAA içeren katı MS ortamında çalışmalar yapılmıştır. Uzayan sürgünleri köklendirmek için farklı oranlarda (0,1-2,0 µM) IBA ve NAA içeren MS ve $\frac{1}{2}$ MS ortamlarına aktarılmıştır. En fazla kök oluşumu 0,5 µM NAA içeren MS ve $\frac{1}{2}$ MS ortamlarında kaydedilmiştir. Köklendirilen bitkilerin %80 başarıyla adaptasyonu sağlanmıştır.

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 BA 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 ortamında 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 sağlanmıştır.

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

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) ve katı (41,9) ortamda elde edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneme Yeri

Bu çalışma, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan *Ceratophyllum demersum* L. Karaman'da bulunan akvaryumculardan temin edilmiştir. Bitkinin tür tayini Prof. Dr. Khalid Mahmood Khawar (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü) ve Prof. Dr. Mehmet Karataş (Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü) tarafından yapılmıştır.

3.1.3. Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları

Denemelerde MS (Çizelge 3.1) mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog, 1962) ile %3 sükroz içeren %0,65'lik agar (Duchefa) ile katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır. Sıvı kültür ile yapılan denemelerde agar ilave edilmemiştir.

Ortam hazırlığında distile saf su kullanılmıştır. Denemelerde MS besin ortamında farklı konsantrasyonlarda veya kombinasyonlarda sitokininler (TDZ, BAP, Kin), oksinler (NAA, IBA) ve gibberellik asit (GA₃) kullanılmıştır. Besin ortamının pH'sı, 1N NaOH ve 1N HCl kullanılarak 5,7±0,1'e ayarlandıktan sonra 1,2 atmosfer basıncı altında ve 120°C'de 20 dk tutularak sterilizasyon sağlanmıştır.

Denemelerde eksplantlar, agarla katılaştırılan MS ortamlar için beyaz florasan ışık (4000 lüks), sıvı MS ortamlar için ise beyaz LED ışık (1500 lüks) altında 24±1°C sıcaklıkta ve 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.

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

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

3.1.4. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Bitki büyüme düzenleyicileri, uygun çözücülerle çözüldükten sonra 1 mg/ml oranında stok solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlarının bir kısmı +4°C’ de bir kısmı da -20°C saklanmıştır. Büyüme düzenleyicilerinden BAP, TDZ ve NAA otoklavda steril edilmeden, Kinetin, GA₃ ve IBA ise otoklavda steril edildikten sonra MS ortamlara ilave edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Denemelerde kullanılan büyüme düzenleyicilerinin çözücüleri, sterilizasyon yöntemleri ve saklama koşulları

Büyüme düzenleyiciler		Çözücü	Sterilizasyon şekli	Saklama koşulları (°C)
<i>Oksinler</i>	NAA	1 N NaOH	Otoklav	+4
	IBA	Etanol	Filtre	-20
<i>Sitokininler</i>	BAP	1 N NaOH	Otoklav	+4
	TDZ	Etanol	Otoklav	+4
	Kinetin	1 N NaOH	Filtre	-20
<i>Gibberellin</i>	GA ₃	Su	Filtre	-20

3.2. Yöntem

3.2.1. Eksplant Yüzeysel Sterilizasyonu

C. demersum bitkisinin yüzeysel sterilizasyonu için en yüksek başarımın sağlanacağı en düşük dezenfektan dozu belirlenmeye çalışılmıştır. Bitkiler, sterilizasyon işleminden önce üzerindeki kalıntıları uzaklaştırmak için 15 dk akan çeşme suyunun altında tutulmuştur. Ardından üst gövdeden 3-5 cm uzunluklarında kesilen parçalar %5, %10, %20, %30 ve %40 oranlarında ticari çamaşır suyu (%5 NaOCl- ACE) ile 5'er dk veya %5, %10, %20, %30 ve %40 oranlarda hidrojen peroksit (H₂O₂) ile farklı sürelerde (5, 7 ve 8 dk) muamele edilmiştir. 5 dk süreyle 3 kez durulama işlemi uygulandıktan sonra sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantları izole edilerek, MSO besin ortamına aktarılmıştır.

3.2.2. Eksplant İzolasyonu

In vitro koşullarda büyüyen sürgünlerden sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantları (Şekil 3.1) izole edilmiş ve mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılmıştır.



2. Koltukaltı (meristemi) 1. Koltukaltı (meristemi) Sürgün ucu (meristemi)

Şekil 3.1. Mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılan eksplantların bitki üzerinde gösterimi

3.2.3. Rejenerasyonu Sağlanmış Bitkiler İçin Uygun pH Aralığının Belirlenmesi

Uygun pH derecesinin belirlenmesi amacı ile 4 cm uzunluklarında 5'er bitki pH'ı 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olan distile suda cam beherler içerisine alınarak, dört hafta süreyle 16 saat aydınlık ortamda (beyaz floresan, 4000 lüks) bekletilmiştir.

3.2.4. Bitkilerin Dış Koşullara Adaptasyonu

Rejenere olan sürgünlerin üzerindeki besin ortamı çeşme suyu ile bitkilere zarar vermeden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bitkiler çeşme suyu içinde 15 dk bekletilmiştir. Ardından dış koşullara adaptasyon için akvaryum ortamına aktarılmıştır. Akvaryum tabanına 4-5 cm yüksekliğinde dere kumu yerleştirilmiş olup, 24°C sıcaklık ayarlı termostat (Tetrattec HT-100, 100W) ve 16 saat beyaz floresan (Roxin RX-500 12W) aydınlatma kullanılmıştır. Haftada bir kez akvaryum suyuna sıvı gübre (Sera Florena, Fertilizer) ilave edilmiştir.

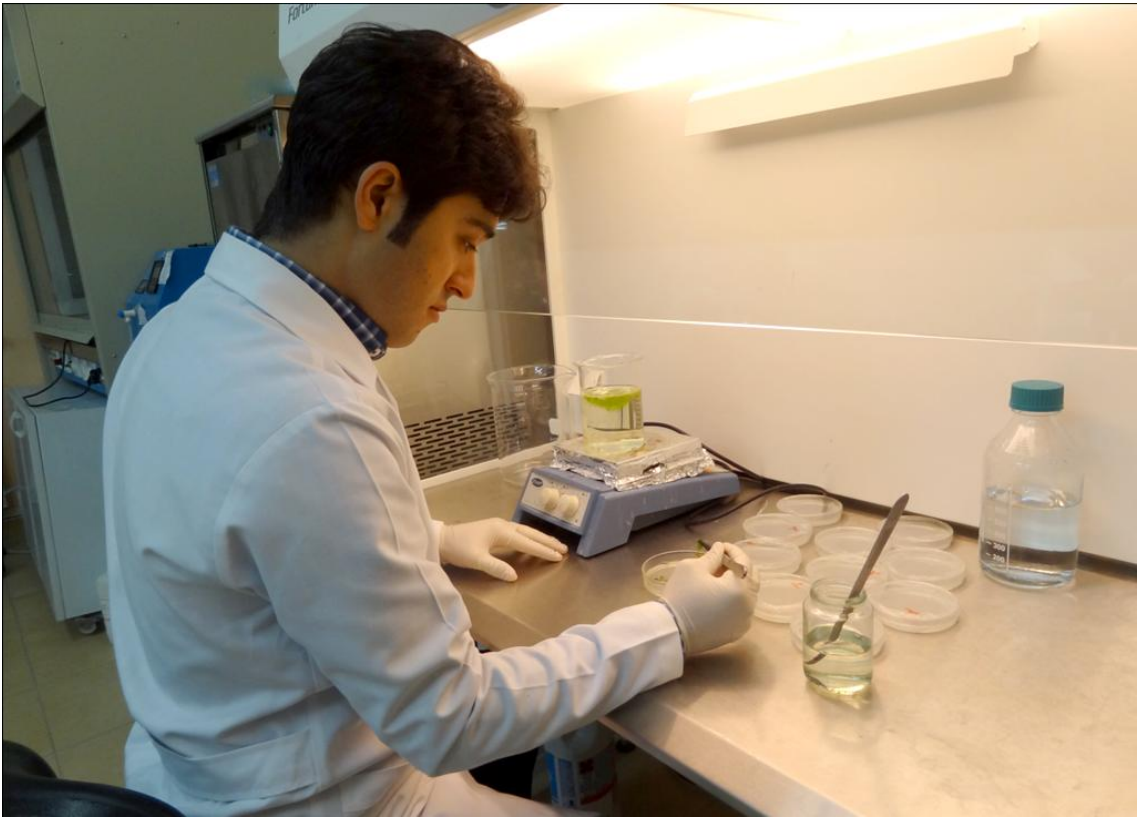
3.2.5. İstatistiki Analizler

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulan 3 tekerrürlü 100x10 mm'lik petri kapları veya GA7 Magenta kutuları oluşturulmuştur. Çalışmadan elde edilen veriler, bilgisayarda "SPSS 16 for Windows" programı ile tesadüf parselleri deneme desenine göre analiz edilmiştir. Post Hoc testleri için Duncan testleri uygulanmıştır. Yüzde değerleri istatistik analizi yapılmadan önce 'arcsin transformasyon'una tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran, 1967).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *C. demersum* Eksplantlarının Yüzey Sterilizasyonu

C. demersum bitkisinin yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarının sağlanacağı en düşük dezenfektan dozu belirlenmeye çalışılmıştır. Bitkinin yüzey sterilizasyonu için üst gövdeden 3-5 cm uzunluklarında parçalar kesilerek, farklı konsantrasyonlarda ticari çamaşır suyu (NaOCl) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Laminar flow kabinde bitkilerin yüzey sterilizasyon çalışması

4.1.1. Çamaşır Suyu ile Yüzey Sterilizasyonu

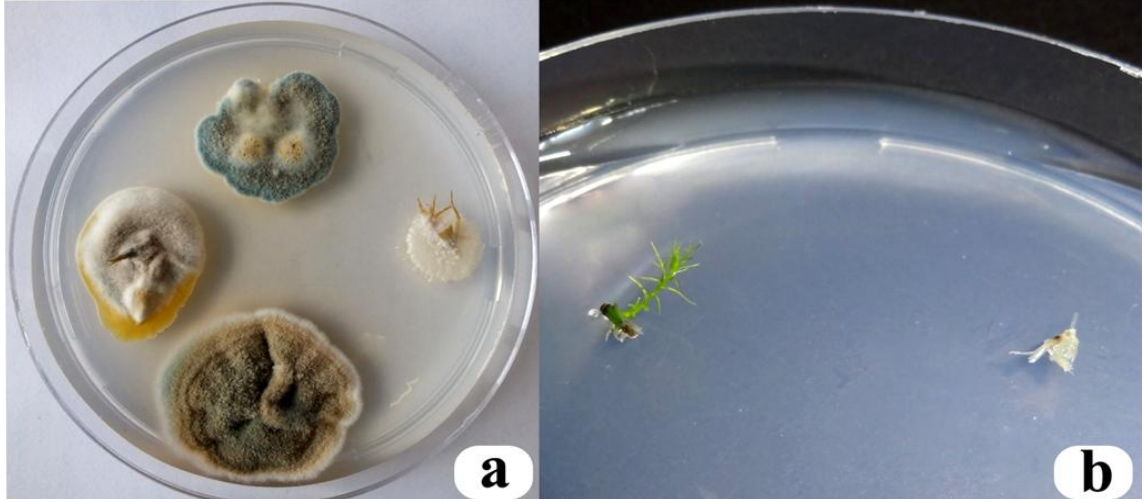
Bitkinin yüzey sterilizasyonu için üst gövdeden 3-5 cm uzunluklarında parçalar kesilerek, farklı konsantrasyonlarda çamaşır suyu ile 5'er dk muamele edilmiştir (Çizelge 4.1). Bir hafta sonra eksplantlar üzerinde hem bakteriyel hem de fungal bulaşıklar gözlenmiştir (Şekil 4.2 a). Çamaşır suyunun etkisinden dolayı çoğu eksplantta beyazlaşmalar ve dolayısıyla da ölümler kaydedilmiştir (Şekil 4.2 b). Benzer

şekilde Şumlu (2009), *Rotala macrandra* bitkisiyle yürüttüğü çalışmasında çamaşır suyunun etkisiyle klorofillerin parçalandığını ve dolayısıyla eksplantların beyazladığını veya sarardığını rapor etmiştir. Öztürk ve ark. (2004) *Ludwigia repens*'te ve Zhou ve ark. (2006) *Myriophyllum spicatum* L. ve *Potamogeton crispus* L.'ta yürüttükleri çalışmada, yüzey sterilizasyonu için ticari çamaşır suyunu kullanmışlardır.

En fazla steril ve sağlam eksplantlar %10'luk çamaşır suyunda 5 dk bekletilen eksplantlardan elde edilmiş olup (Şekil 4.2 b) eksplant tiplerine göre en fazla sonuçlar sırasıyla sürgün ucu meristem eksplantında %25, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantında %15 olarak kaydedilmiştir. Steril eksplantlar daha sonra mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılmıştır. Öztürk ve ark. (2004), *L. repens*'in yüzey sterilizasyonunu % 20'lik ticari çamaşır suyunda 9 dk bekletilen eksplantlardan elde etmişlerdir.

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan çamaşır suyunun sterilizasyon ve eksplant gelişimi üzerine etkisi

Muamele		Eksplantlar								
Çamaşır suyu		Sürgün ucu			1. Koltukaltı			2. Koltukaltı		
%	Süre (dakika)	Bulaşık Oranı (%)	Steril ve Ölen Eksplant Oranı (%)	Steril ve Sağlam Eksplant Oranı (%)	Bulaşık Oranı (%)	Steril ve Ölen Eksplant Oranı (%)	Steril ve Sağlam Eksplant Oranı (%)	Bulaşık Oranı (%)	Steril ve Ölen Eksplant Oranı (%)	Steril ve Sağlam Eksplant Oranı (%)
5	5 dk	100	0	0	100	0	0	100	0	0
10	5 dk	60	15	25	50	35	15	75	10	15
20	5 dk	25	60	15	40	50	10	30	60	10
30	5 dk	15	85	0	5	95	0	10	90	0
40	5 dk	10	90	0	0	100	0	15	85	0



Şekil 4.2. %10'luk çamaşır suyunun uygulandığı ortamda (a) bakteriyel ve fungal bulaşıklar (b) steril-sağlam eksplant ve beyazlaşan ekplant

4.1.2. Hidrojen Peroksit ile Yüzey Sterilizasyonu

C. demursum'un yüzey sterilizasyonu amacıyla bitkinin 3-5 cm'lik üst gövde kısımları farklı konsantrasyonlarda ve sürede hidrojen peroksit ile muamele görmüştür (Çizelge 4.2). Eksplantlar üzerinde 5. günde bakteriyel ve fungal bulaşıklar belirmeye başlamış olup bunların çoğunluğunu fungal bulaşıklar oluşturmuştur (Şekil 4.3). Bazı eksplantlarda sterilizasyon sağlanmasına rağmen hidrojen peroksitin etkisinden dolayı eksplantlar ölmüşlerdir.

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan hidrojen peroksitin sterilizasyon ve eksplant gelişimi üzerine etkisi

Muamele		Eksplantlar								
Hidrojen Peroksit		Sürgün ucu			1. Koltukaltı			2. Koltukaltı		
%	Süre (dakika)	Bulaşık Oranı (%)	Steril ve Ölen Eksplant Oranı (%)	Steril ve Sağlam Eksplant Oranı (%)	Bulaşık Oranı (%)	Steril ve Ölen Eksplant Oranı (%)	Steril ve Sağlam Eksplant Oranı (%)	Bulaşık Oranı (%)	Steril ve Ölen Eksplant Oranı (%)	Steril ve Sağlam Eksplant Oranı (%)
5	7 dk	55	15	30	65	15	20	60	15	25
10	7 dk	40	40	20	50	40	10	45	40	15
20	5 dk	35	50	15	40	45	15	30	65	5
30	8 dk	20	70	10	25	70	5	10	90	0
40	8 dk	15	85	0	10	85	5	15	85	0



Şekil 4.3. Hidrojen peroksitin %5'lik konsantrasyonunda 7 dk bekletilen 1. koltukaltı meristem eksplantında bakteriyel ve fungal bulaşıklar

En fazla steril ve sağlam eksplant oranı %5'lik hidrojen peroksit konsantrasyonunda 7 dk bekletilen eksplantlardan elde edilmiştir. Daha sonra *in vitro* çoğaltım çalışmalarında kullanılan bu eksplantlar arasında en iyi sonuçlar sırasıyla sürgün ucu (%30), 2. koltukaltı (%25) ve 1. koltukaltı (%20) meristem eksplantlarından elde edilmiştir. Fakat, Karatas ve ark. (2013), *Bacopa monnieri* ile yaptıkları sterilizasyon çalışmasında steril eksplantları %40'lık hidrojen peroksitte 10 dk bekletilen eksplantlardan elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yüzey sterilizasyonunu yüksek oranda hidrojen peroksit kullanarak sağlamalarının sebebi, bitkinin alındığı ortamın kirlilik derecesinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

C. demersum bitkisinin yüzey sterilizasyonu için kullanılan dezenfektanlar incelendiğinde, hidrojen peroksidin çamaşır suyundan daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Çamaşır suyu kullanıldığında eksplantların büyük bir çoğunluğu klorofil parçalanmasından dolayı beyazlaşmıştır ve fotosentez yapamadıklarından dolayı eksplantlar ölmüştür.

4.2. In Vitro Koşullarda *C. demersum*'un Çoğaltımı

Tez kapsamında yapılan tüm çoğaltım çalışmalarında *C. demersum*'un farklı eksplantları (sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristemleri) kullanılmıştır. Çalışmalar hem agar ile katılaştırılmış hem de sıvı MS ortamlarında yürütülmüş olup, beyaz floresan (agarla katılaştırılmış MS ortam) veya beyaz LED ışıkları (sıvı MS ortam) kullanılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak sitokininler (BAP, TDZ ve Kinetin), oksinler (IBA ve NAA) ve gibberellik asit (GA_3) farklı oran veya kombinasyonlarda MS besin ortamında kullanılmıştır.

4.2.1. Agar ile Katılaştırılmış MS Ortamında Farklı Kinetin Dozlarının *C. demersum*'un Farklı Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu

C. demersum'un sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantları sürgün rejenerasyonu için 0,05, 0,10, 0,20, 0,40 ve 0,80 mg/l Kinetin içeren MS ortamlarında ve MSO ortamlarında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra deneme sonlandırılmış olup, sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri için varyans analizi uygulanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı Kinetin dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
Sürgün Ucu							
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	284,72	1,37 ^{ös}	0,30	1,99 ^{ös}	1,52	1,57 ^{ös}
Hata	12	208,33	-	0,15	-	0,97	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-
^{ös} Önemsiz							
1. Koltukaltı Meristem							
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	222,22	1,60 ^{ös}	0,64	4,95*	0,52	2,42 ^{ös}
Hata	12	138,89	-	0,13	-	0,22	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-
* $p < 0,05$ düzeyinde önemli, ^{ös} Önemsiz							
2. Koltukaltı Meristem							
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	138,89	1,33 ^{ös}	0,30	10,78 ^{ös}	0,13	0,26 ^{ös}
Hata	12	104,18	-	0,38	-	0,49	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-
^{ös} Önemsiz							

Çizelge 4.3'de de görüldüğü gibi, denemede kullanılan tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından ise sürgün ucu ve 2. koltukaltı meristem eksplantlarında önemli bir farklılık bulunmazken, 1. koltukaltı meristem eksplantında istatistiki önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı Kinetin dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları

Büyüme Düzenleyici (Kin-mg/l)	Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)			Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			Sürgün Uzunluğu (cm)			Rizoid Oluşturan Eksplant Oranı (%)		
	S.U. ^{ös}	1. K.A. ^{ös}	2. K.A. ^{ös}	S.U.*	1. K.A.*	2. K.A. ^{ös}	S.U.*	1. K.A.*	2. K.A. ^{ös}	S.U.	1. K.A.	2. K.A.
0,05	83,33	91,67	83,33	1,42 ^{ab}	2,47 ^{ab}	1,66	2,44 ^{ab}	2,35 ^b	2,78	100	100	100
0,10	75,00	91,67	91,67	1,17 ^{ab}	1,44 ^c	1,89	2,71 ^{ab}	2,92 ^{ab}	3,18	100	100	100
0,20	91,67	91,67	100,00	1,25 ^{ab}	2,08 ^b	2,25	4,14 ^a	3,43 ^a	2,61	100	100	100
0,40	100,00	91,67	91,67	1,42 ^{ab}	2,12 ^b	2,17	2,12 ^b	2,63 ^{ab}	2,83	100	100	100
0,80	91,67	100,00	100,00	1,92 ^a	2,17 ^{ab}	2,42	2,87 ^{ab}	2,39 ^b	2,92	100	100	100
MSO (Kontrol)	100,00	75,00	100,00	1,00 ^b	2,83 ^a	1,67	2,42 ^{ab}	2,45 ^b	2,66	100	100	100

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir.

^{ös}Önemsiz

S.U. : Sürgün ucu meristemi

1. K.A. : 1. Koltukaltı meristemi

2. K.A. : 2. Koltukaltı meristemi

Çizelge 4.4’de görüldüğü gibi Kinetin içeren MS ortamında, sürgün ucu ve 1. koltukaltı meristemde sürgün rejenerasyon oranı %75,00-%100,00 ve 2. koltukaltı meristemde %83,33-%100,00 arasında kaydedilmiştir. Şumlu (2009), farklı oranlarda Kin ve NAA içeren MS ortamında *R. macrandra* bitkisinin sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristemlerinde %100,00 sürgün rejenerasyonu elde etmiştir. Gnanaraj ve ark. (2011) ise farklı oranlarda Kin içeren MS ortamında *A. sessilis* bitkisinin sürgün ucu ve nodal eksplantlarında en yüksek sürgün rejenerasyon oranlarını sırasıyla, $70,4 \pm 0,56$ ve $65,4 \pm 0,34$ olarak bildirmişlerdir. Sürgün rejenerasyonları arasındaki bu farklılıklar bitki türlerinin farklı olmasından ve sıcaklık, nem ve ışık gibi kültür koşullarından kaynaklanmış olabilir.

Farklı Kinetin içeren MS ortamlarında eksplant başına sürgün sayısı, sürgün ucu meristeminde 1,00-1,92 adet, 1. koltukaltı meristeminde 1,44-2,83 adet ve 2. koltukaltı meristeminde 1,66-2,42 adet arasında kaydedilmiştir. Sürgün ucu (1,92 adet) ve 2. koltukaltı (2,42 adet) meristem eksplantlarında en fazla sürgün sayısı 0,80 mg/l Kin içeren MS ortamında kaydedilirken, 1. koltukaltı (2,83 adet) meristem eksplantında ise MSO ortamında kaydedilmiştir. Benzer şekilde Sahoo ve Chand (1998), 0,5, 1,0, 2,0 ve 5,0 mg/l Kin içeren MS ortamında *Vitex negundo* bitkisinin nodal eksplantlarıyla yaptığı çalışmada, düşük oranda sürgün elde ettiğini (1,00-1,78 adet) rapor etmişlerdir. Fakat, S. Sharma ve ark. (2010) *B. monnieri*’nin sürgün ucu eksplantlarıyla yaptıkları çalışmada 0,01-0,3 mg/l Kin içeren MS ortamında eksplant başına sürgün sayısını $21,0 \pm 0,19$ ile $33,0 \pm 0,16$ adet arasında kaydetmişlerdir. Bunun sebebinin bitki türlerinin büyüme düzenleyicilere verdikleri cevapların farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca aynı bitkinin farklı eksplantları bile aynı dozdaki bitki büyüme düzenleyicilere farklı cevaplar verebilir.

Sürgün uzunlukları sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantlarında sırasıyla, 2,12-4,14 cm, 2,35-3,43 cm ve 2,61-3,18 cm arasında değişmiştir. Sürgün ucu (4,14 cm) ve 1. koltukaltı (3,43 cm) meristem eksplantında en uzun sürgünler 0,20 mg/l Kin içeren MS ortamında elde edilirken, 2. koltukaltı (3,18 cm) eksplantında ise 0,10 mg/l Kin içeren MS ortamında (Şekil 4.4 a, b ve c) elde edilmiştir. Şumlu (2009), farklı oranlarda Kin ve NAA kombinasyonlarını içeren ortamda *R. macrandra*’nın sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristemlerinde, sürgün uzunluklarını sırasıyla 3,66-7,66 cm, 3,00-7,00 cm

ve 3,00-9,33 cm arasında elde ettiğini bildirmiştir. Banerjee ve Shrivastava (2008) *B. monnieri* bitkisinin internodal eksplantlarıyla yaptıkları çalışmada en uzun sürgünleri MS+Kin (1,5 mg/l), ½MS+Kin (1,5 mg/l) ve MS+BAP (1,0 mg/l)+Kin (0,5 mg/l) içeren ortamlarda sırasıyla $8,0 \pm 2,15$ cm, $7,0 \pm 2,06$ cm ve $9,5 \pm 2,25$ cm olarak elde ettiklerini bildirmişlerdir.

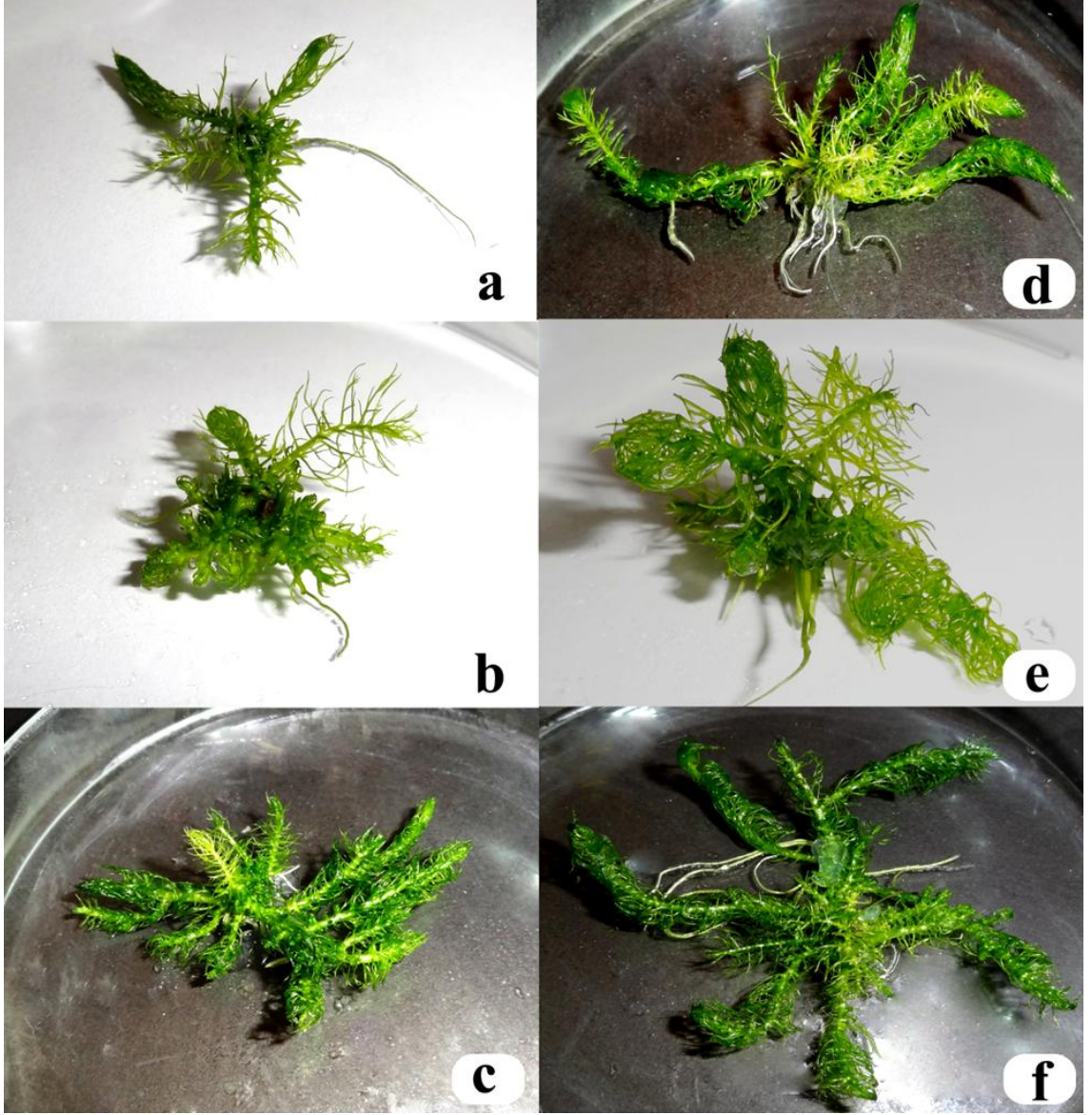
0,20 mg/l Kin içeren MS ortam hariç diğer tüm Kin içeren MS ortamlarında en uzun sürgünler 2. koltukaltı eksplantlarından elde edilmiştir. Ayrıca Kinetin içeren MS ortamlarında rizoid oluşturan eksplant oranı %100,00 olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.4. Agar ile katılaştırılmış farklı Kinetin dozlarını içeren MS ortamında uzun sürgün oluşumu; (a) 0,20 mg/l Kin içeren MS ortamında sürgün ucu meristem eksplantından (b) 1. koltukaltı meristem eksplantından ve (c) 0,10 mg/l Kin içeren MS ortamında 2. koltukaltı meristem eksplantından sürgün rejenerasyonu

4.2.2. Agar ile Katılaştırılmış MS Ortamında Farklı BAP Dozlarının *C. demersum*'un Farklı Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu

C. demersum bitkisinin sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı eksplantları sürgün rejenerasyonu için 0,05, 0,10, 0,20, 0,40 ve 0,80 mg/l BAP içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Kontrol olarak tüm eksplantlar, MSO (kontrol) ortamında da kültüre alınmıştır. İki hafta sonra eksplantlar üzerinde sürgün uçları belirgin bir şekilde gözlenmeye başlamış olup, dört hafta sonra (Şekil 4.5 a, b ve c) çoklu sürgün oluşumları kaydedilmiştir. Sekiz hafta sonra (Şekil 4.5 d, e ve f) sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve rizoid oluşturan eksplant oranı verileri varyans analizine tabi tutulmuştur.



Şekil 4.5. Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı BAP dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonu; dördüncü (**a**, **b** ve **c**) ve sekizinci (**d**, **e** ve **f**) haftada sırasıyla sürgün ucu (a ve d), 1. koltukaltı (b ve e) ve 2. koltukaltı (c ve f) meristem eksplantında sürgün oluşumu

Varyans analizi sonuçlarına göre (Çizelge 4.5) tüm eksplantlarda, sürgün rejenerasyon oranı bakımından ortamlar arasında önemli bir farklılık bulunmazken, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve rizoid oluşturan eksplant oranı bakımından ortamlar arasında $p < 0,01$ düzeyinde önemli bir farklılık bulunmuştur. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi uygulanmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5. Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı BAP dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)		Rizoid Oluşturan Eksplant Oranı (%)	
Sürgün Ucu									
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	62,50	0,60 ^{ös}	48,08	7,46**	3,53	35,88**	4201,39	121,00**
Hata	12	104,17	-	6,44	-	0,10	-	34,72	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-	-	-
** $p < 0,01$ düzeyinde önemli, ^{ös} Önemsiz									
1. Koltukaltı Meristem									
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	305,56	2,20 ^{ös}	55,27	25,33**	5,31	28,21**	6312,50	60,60**
Hata	12	138,89	-	2,18	-	0,19	-	104,17	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-	-	-
** $p < 0,01$ düzeyinde önemli, ^{ös} Önemsiz									
2. Koltukaltı Meristem									
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	333,33	1,20 ^{ös}	87,30	25,97**	3,31	57,15**	7368,06	212,20**
Hata	12	277,78	-	3,36	-	0,06	-	34,72	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-	-	-
** $p < 0,01$ düzeyinde önemli, ^{ös} Önemsiz									

Çizelge 4.6. Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı BAP dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları

Büyüme Düzenleyici (BAP-mg/l)	Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)			Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			Sürgün Uzunluğu (cm)			Rizoid Oluşturan Eksplant Oranı (%)		
	S.U. ^{ös}	1. K.A. ^{ös}	2. K.A. ^{ös}	S.U.**	1. K.A.**	2. K.A.**	S.U.**	1. K.A.**	2. K.A.**	S.U.**	1. K.A.**	2. K.A.**
0,05	100,00	100,00	100,00	2,66 ^{bc}	4,92 ^{bc}	5,75 ^{cd}	1,94 ^b	1,97 ^b	2,44 ^{ab}	50,00 ^b	100,00 ^a	100,00 ^a
0,10	100,00	100,00	91,67	5,00 ^{abc}	6,08 ^b	6,61 ^c	1,38 ^b	1,78 ^b	2,28 ^{bc}	41,67 ^b	100,00 ^a	100,00 ^a
0,20	100,00	100,00	100,00	8,50 ^{ab}	11,17 ^a	11,47 ^b	1,35 ^b	0,90 ^{bc}	1,75 ^c	50,00 ^b	100,00 ^a	100,00 ^a
0,40	91,67	100,00	100,00	9,44 ^a	11,50 ^a	12,25 ^{ab}	0,44 ^c	0,62 ^c	0,52 ^d	0,00 ^c	25,00 ^b	8,33 ^b
0,80	91,67	75,00	75,00	11,41 ^a	11,95 ^a	16,75 ^a	0,43 ^c	0,38 ^c	0,42 ^d	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00 ^b
MSO (Kontrol)	91,67	91,67	83,33	1,36 ^c	1,58 ^c	1,75 ^e	3,34 ^a	4,00 ^a	2,97 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a

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

^{ös} Önemsiz

S.U. : Sürgün ucu meristemi

1. K.A. : 1. Koltukaltı meristemi

2. K.A. : 2. Koltukaltı meristemi

Çizelge 4.6 'da görüldüğü gibi sürgün rejenerasyon oranı sürgün ucu eksplantlarında %91,67 veya %100,00 olarak kaydedilirken, 1. ve 2. koltukaltı meristemlerinde %75,00-%100,00 arasında değişmiştir. Farklı oranlarda BAP içeren MS ortamlarında eksplant başına sürgün sayıları, sürgün ucu meristemlerinde 2,66-11,41 adet, 1. koltukaltı meristemlerinde 4,92-11,95 adet ve 2. koltukaltı meristemlerinde ise 5,75-16,75 adet arasında kaydedilmiştir. Eksplant tipleri bakımından en fazla eksplant başına sürgün sayısı, 0.80 mg/l BAP içeren MS ortamında 2. koltukaltı meristemden elde edilmiştir. Benzer şekilde, daha önce Raja ve Arockiasamy (2008) *Mentha viridis*'te, Janarthanam ve ark. (2009) *Stevia rebaudiana*'da, Islam ve ark. (2009) *Vitex negundo*'da ve Ugraiah ve ark. (2010) *Marsdenia brunoniana*'da BAP içeren ortamda nodal ve sürgün ucu meristem eksplantlarından çoklu sürgün oluşumu elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Büyüme düzenleyici içeren MS ortamlarındaki sürgün uzunlukları, sürgün ucu meristemlerinde 0,43-1,94 cm, 1. koltukaltı meristemlerinde 0,38-1,97 cm ve 2. koltukaltı meristemlerinde 0,42-2,44 cm arasında kaydedilmiştir. Her üç eksplantta da en fazla sürgün sayısı ve en kısa sürgünler, 0,80 mg/l BAP içeren MS ortamda elde edilirken, en az ve en uzun sürgünler ise 0,05 mg/l BAP içeren MS ortamda elde edilmiştir. Gnanaraj ve ark. (2011), *A. sessilis*'in sürgün ucu eksplantlarını 0,5-0,20 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre almışlardır. En fazla en fazla sürgün sayısını ve en uzun sürgünleri, en yüksek (0,20 mg/l) BAP içeren MS ortamında elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Her üç eksplant arasında kıyaslama sonucunda 2. koltukaltı meristemlerde, sürgün ucu ve 1. koltukaltı meristemlerden daha fazla sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. Tiwari ve ark. (2001) *B. monnieri*'nin nod, internod ve yaprak eksplantlarını 0,44-2,2 µM BAP içeren ortamlarda kültüre almış ve en fazla sürgün sayısını yaprak eksplantından elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

BAP dozlarının artırılması, eksplantların sürgün oluşturma yeteneği üzerinde olumlu etki gösterirken, sürgün uzunluğu üzerinde ise olumsuz etki göstermiştir. Ayrıca en fazla sürgün sayısının bulunduğu ortamda en kısa sürgünlerin elde edilmesinin sebebinin, sürgünlerin birbirleriyle rekabetlerinden de kaynaklanıyor olabileceği

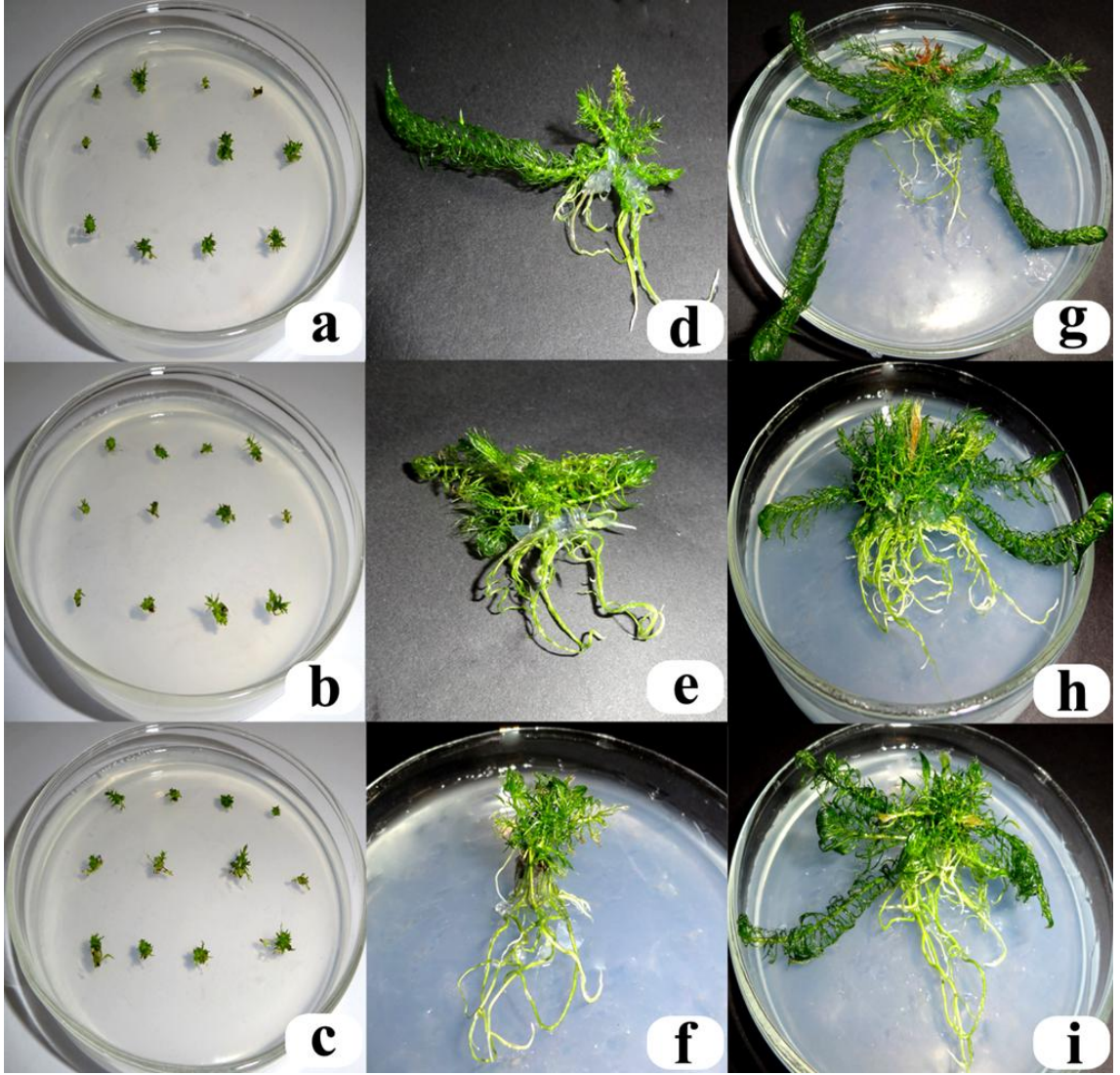
düşünülmektedir. Fakat N. Sharma ve ark. (2007) *B. monnieri*'nin nodal eksplantların bulunduğu 0,2-2,0 mg/l BAP içeren MS ortamında yaptıkları çalışmada en az sürgün sayısını ve en kısa sürgünleri 2,0 mg/l BAP içeren MS ortamda kaydettiklerini rapor etmişlerdir.

Eksplantlar ve ortamlar arasında kıyaslama yapıldığında her üç eksplantta da en uzun sürgünler MSO (kontrol) ortamında elde edilmiştir. En uzun sürgünler sırasıyla, 1. koltukaltı (4,00 cm), sürgün ucu (3,34 cm) ve 2. koltukaltı (2,97 cm) meristem eksplantlarında kaydedilmiştir.

Farklı BAP dozlarını içeren MS ortamında eksplantların rizoid oluşturma oranları %0-%100,00 arasında değişmiştir. Eksplantlarda en fazla rizoid oluşumları düşük oranda BAP içeren MS ortamlarında kaydedilmiş olup, yüksek oranda BAP içeren MS ortamlarında ise eksplantlar üzerinde ya kısa ve az sayıda rizoidler kaydedilmiş ya da rizoid oluşumu gözlenmemiştir. Sürgün ucu meristem eksplantlarında 0,40 ve 0,80 mg/l BAP içeren MS ortamlarında, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantlarında da 0,80 mg/l BAP içeren MS ortamlarında herhangi bir rizoid oluşumu kaydedilmemiştir.

4.2.3. Agar ile Katılaştırılmış MS Ortamında Farklı BAP ve 0,10 mg/l NAA Dozlarının *C. demersum*'un Farklı Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu

In vitro sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantları 0,05, 0,10, 0,20 ve 0,40 mg/l BAP ile 0,10 mg/l NAA dozlarını içeren MS ortamlarında sekiz hafta boyunca kültüre alınmıştır. İki hafta sonra (Şekil 4.6 a, b ve c) MS ortamlarda sürgün uçları belirmeye başlamış olup, dört hafta sonra (Şekil 4.6 d, e ve f) çoklu sürgün oluşumları gözlenmiştir. Sekiz hafta sonra (Şekil 4.6 g, h ve i) sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve rizoid oluşturan eksplant oranı verileri için varyans analizi uygulanmıştır (Çizelge 4.7).



Şekil 4.6. Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı BAP ve 0,10 mg/l NAA dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonu; ikinci (**a**, **b** ve **c**), dördüncü (**d**, **e** ve **f**) ve sekizinci (**g**, **h** ve **i**) haftada sırasıyla sürgün ucu (a, d ve g), 1. koltukaltı (b, e ve h) ve 2. koltukaltı (c, f ve i) meristem eksplantında sürgün oluşumu

Çizelge 4.7. Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı BAP ve 0,10 mg/l NAA dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)		Rizoid Oluşturan Eksplant Oranı (%)	
Sürgün Ucu									
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	4	62,50	0,30 ^{ös}	344,57	21,39**	5,95	89,88**	9000,00	2,22**
Hata	10	208,33	-	16,11	-	0,07	-	4,05	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-	-	-	-	-
** $p < 0,01$ düzeyinde önemli, ^{ös} Önemsiz									
1. Koltukaltı Meristem									
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	4	520,83	1,79 ^{ös}	248,21	103,76**	1,22	54,90**	3375,00	9,00**
Hata	10	291,67	-	2,39	-	0,02	-	375,00	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-	-	-	-	-
** $p < 0,01$ düzeyinde önemli, ^{ös} Önemsiz									
2. Koltukaltı Meristem									
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	4	1520,83	12,17**	205,16	26,37**	2,16	21,04**	2666,67	2,00 ^{ös}
Hata	10	125,00	-	7,78	-	0,10	-	1333,33	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-	-	-	-	-
** $p < 0,01$ düzeyinde önemli, ^{ös} Önemsiz									

Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi sürgün ucu ve 1. koltukaltı meristem eksplantlarında ortamlar arasında sürgün rejenerasyonu bakımından ortamlar arasında önemli bir farklılık bulunmazken, 2. koltukaltı meristem eksplantlarında önemli bir farklılık bulunmuştur ($p<0,01$). Eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından kullanılan tüm eksplantlarda ortamlar arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0,01$). Rizoid oluşturan eksplant oranları bakımından 2. koltukaltı meristem eksplantlarında ortamlar arasındaki farklılık önemsiz bulunurken, sürgün ucu ve 1. koltukaltı meristem eksplantları istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$). Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Agar ile katılaştırılmış MS ortamında farklı BAP ve 0,10 mg/l NAA dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları

Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)			Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			Sürgün Uzunluğu (cm)			Rizoid Oluşturan Eksplant Oranı (%)		
BAP	NAA	S.U. ^{ös}	1. K.A. ^{ös}	2. K.A. ^{**}	S.U. ^{**}	1. K.A. ^{**}	2. K.A. ^{**}	S.U. ^{**}	1. K.A. ^{**}	2. K.A. ^{**}	S.U. ^{**}	1. K.A. ^{**}	2. K.A. ^{ös}
0,05	0,10	83,33	66,67	58,33 ^b	19,67 ^{ab}	18,55 ^b	24,66 ^a	1,49 ^b	1,33 ^c	1,23 ^{bc}	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00
0,10	0,10	83,33	75,00	50,00 ^b	29,53 ^a	26,89 ^a	15,55 ^b	1,73 ^b	1,93 ^b	1,68 ^b	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00
0,20	0,10	91,67	58,33	91,67 ^a	10,94 ^{bc}	17,44 ^b	14,94 ^b	0,66 ^c	1,04 ^c	0,79 ^c	0,00 ^b	100,00 ^a	66,67
0,40	0,10	91,67	83,33	58,33 ^b	10,33 ^{bc}	16,25 ^b	12,42 ^b	0,50 ^c	0,94 ^c	0,68 ^c	0,00 ^b	25,00 ^b	33,33
MSO		91,67	91,67	100,00 ^a	1,19 ^c	1,72 ^c	1,58 ^c	4,02 ^a	2,45 ^a	2,78 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00

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

^{ös} Önemsiz.

S.U. : Sürgün ucu meristemi

1. K.A. : 1. Koltukaltı meristemi

2. K.A. : 2. Koltukaltı meristemi

Çizelge 4.8’de de görüldüğü gibi sürgün rejenerasyon oranı sürgün ucu eksplantında %83,33-%91,67, 1. koltukaltı meristem eksplantında %58,33-%91,67 ve 2. koltukaltı meristem eksplantında %50,00-%100,00 arasında değişmiştir. Öztürk (2004) *L. repens* ile yaptığı çalışmada sürgün rejenerasyon oranını BAP ve NAA içeren ortamda, sürgün ucu meristeminde %37,50-%68,75, 1. koltukaltı meristeminde %56,25-%100,00 ve 2. koltukaltı meristeminde %14,00-%21,50 olarak bildirmiştir.

Farklı kombinasyonlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarında eksplant başına sürgün sayıları, sürgün ucu meristemlerinde 10,33-29,53 adet, 1. koltukaltı meristemlerinde 16,25-26,89 adet ve 2. koltukaltı meristemlerinde ise 12,42-24,66 adet arasında değişmiştir. Sürgün ucu eksplantında en fazla 29,53 adet ve 1. koltukaltı eksplantında 26,89 adet sürgün 0,10 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilirken, 2. koltukaltı eksplantında en fazla 24,66 adet sürgün 0,05 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir. Öztürk (2004), 0,10, 0,20 ve 0,30 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA oranlarını içeren ortamda *L. repens*’in sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristemlerinden elde ettiği maksimum sürgün sayısını sırasıyla; 3,69, 4,75 ve 5,36 adet olarak rapor etmiştir. Şumlu (2009), sürgün rejenerasyonu amacıyla *R. macrandra* bitkisinin sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantlarını agar ile katılaştırılmış BAP (0,2, 0,3 ve 0,4 mg/l) ve NAA (0,001 mg/l) içeren ortamlarda 8 hafta boyunca kültüre almıştır. Eksplant başına sürgün sayısını sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristemlerde sırasıyla, 7,33-13,00 adet, 3,33-6,66 adet ve 1,66-5,00 adet olarak bildirmiştir. Ortamlarda en fazla sürgünleri elde ettiğimiz eksplant çeşitleri, *R. macrandra* ile yapılan çalışmayla benzerlik gösterirken, *L. repens* ile benzerlik göstermemiştir.

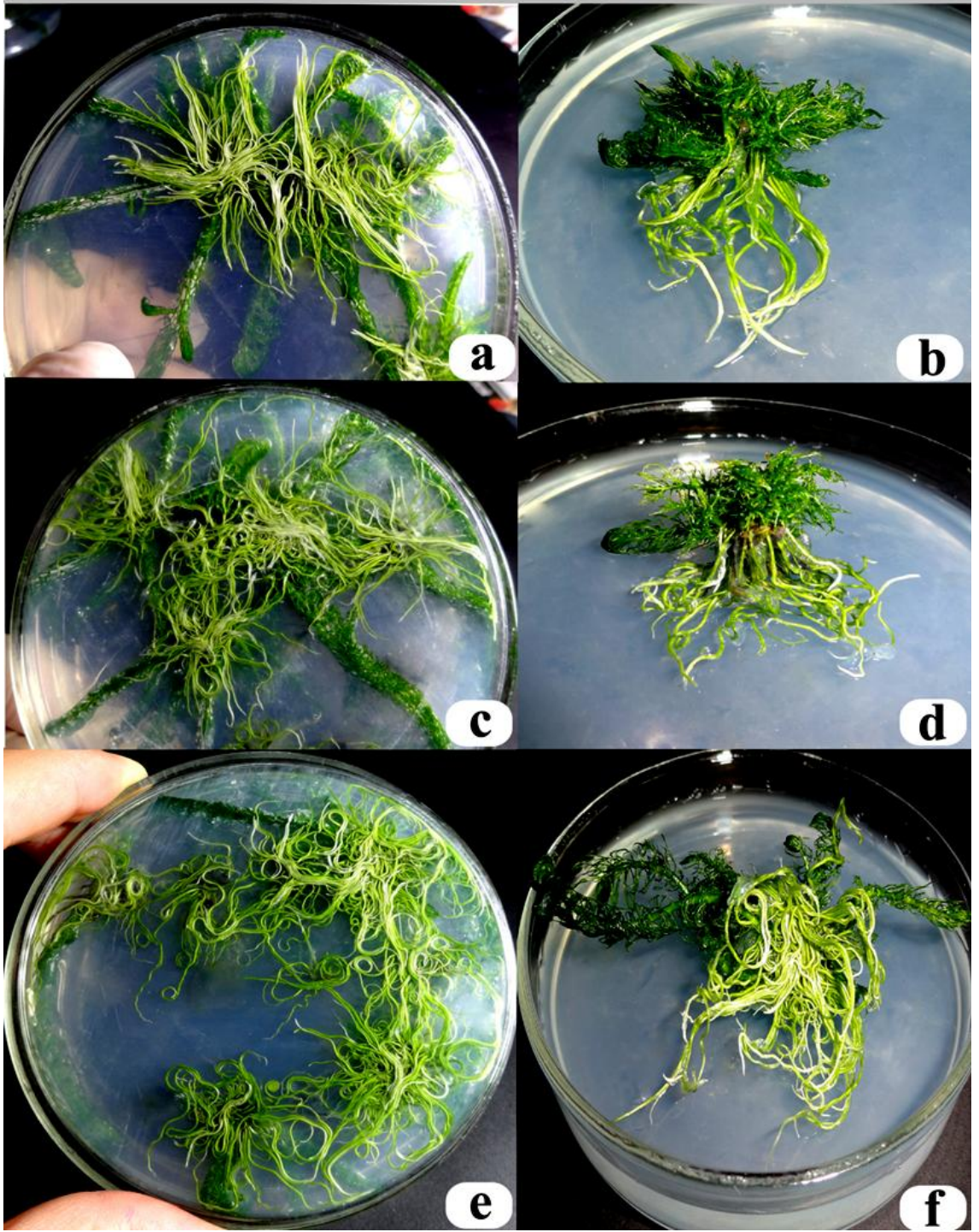
Sürgün ucu ve 1. koltukaltı meristemlerinde BAP oranı 0,10 mg/l’den fazla kullanıldığında, sürgün sayısında azalma görülmüştür.

Büyüme düzenleyici içeren MS ortamlarındaki sürgün uzunlukları, sürgün ucu meristemlerinde 0,50-1,73 cm, 1. koltukaltı meristemlerinde 0,94-1,93 cm ve 2. koltukaltı meristemlerinde 0,68-1,68 cm arasında değişmiştir. Tüm eksplantlarda da en uzun sürgünler 0,10 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilirken, en kısa sürgünler 0,40 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA içeren MS ortamında

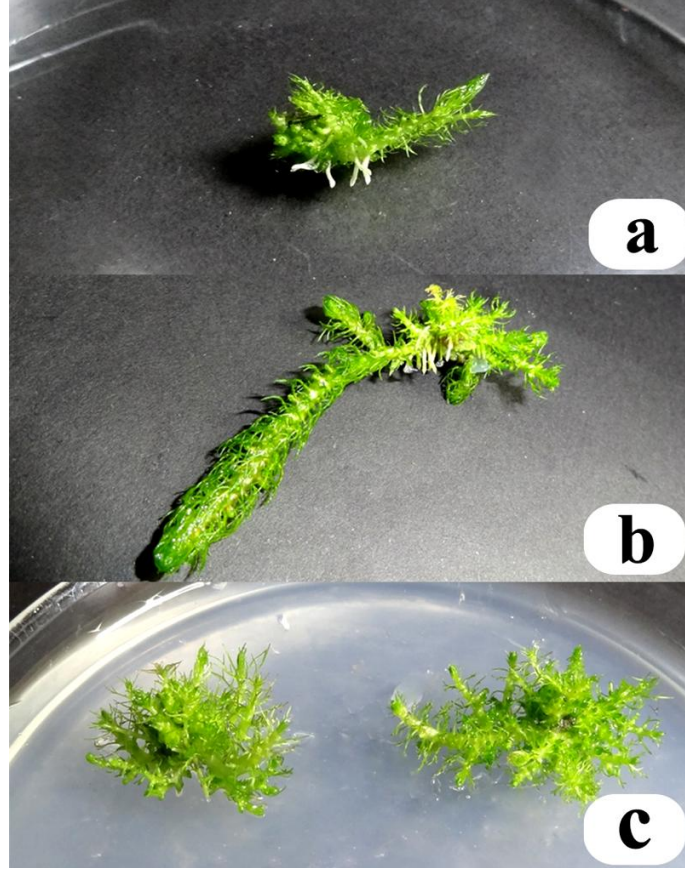
kaydedilmiştir. MS ortamında 0,10 mg/l NAA ile yüksek oranda BAP dozlarının (0,20 ve 0,40 mg/l) kullanılması, sürgün sayısı ve uzunluğunda azalmalara sebep olmuştur. Benzer şekilde, daha önce börülce (*Vigna unguiculata*) (Aasim ve ark., 2008; 2009) ve mercimek (*Lens culinaris*) (Aasim, 2012) bitkilerinde NAA ve BAP oranının artmasının, sürgün uzunluğunu azalttığı rapor edilmiştir.

MSO (kontrol) ortamında sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantlarından en az sayıda sürgün (sırasıyla 1,19, 1,72 ve 1,58 adet) elde edilmesine karşın, en uzun sürgünler de (sırasıyla 4,02, 2,45 ve 2,78 cm) elde edilmiştir.

Farklı kombinasyonlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarında rizoid oluşturan eksplant oranları sürgün ucu eksplantında %0-%100,00, 1. koltukaltı eksplantında %25,00-%100,00 ve 2. koltukaltı eksplantlarda %33,33-%100,00 arasında değişmiştir. İki hafta sonra 0,05 ve 0,10 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA içeren MS ortamlarında her üç eksplant tipinde de rizoid oluşumları kaydedilmiştir. Sekiz hafta sonra yine aynı ortam ve eksplantlarda uzun ve fazla miktarda rizoid oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.7 a, b, c, d, e ve f). Ayrıca 0,20 ve 0,40 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA içeren MS ortamında, 1. ve 2. koltukaltı eksplantlarında kısa ve az sayıda rizoidler oluşurken (Şekil 4.8 a ve b), sürgün ucu eksplantlarında herhangi bir rizoid oluşumu kaydedilmemiştir (Şekil 4.8 c).



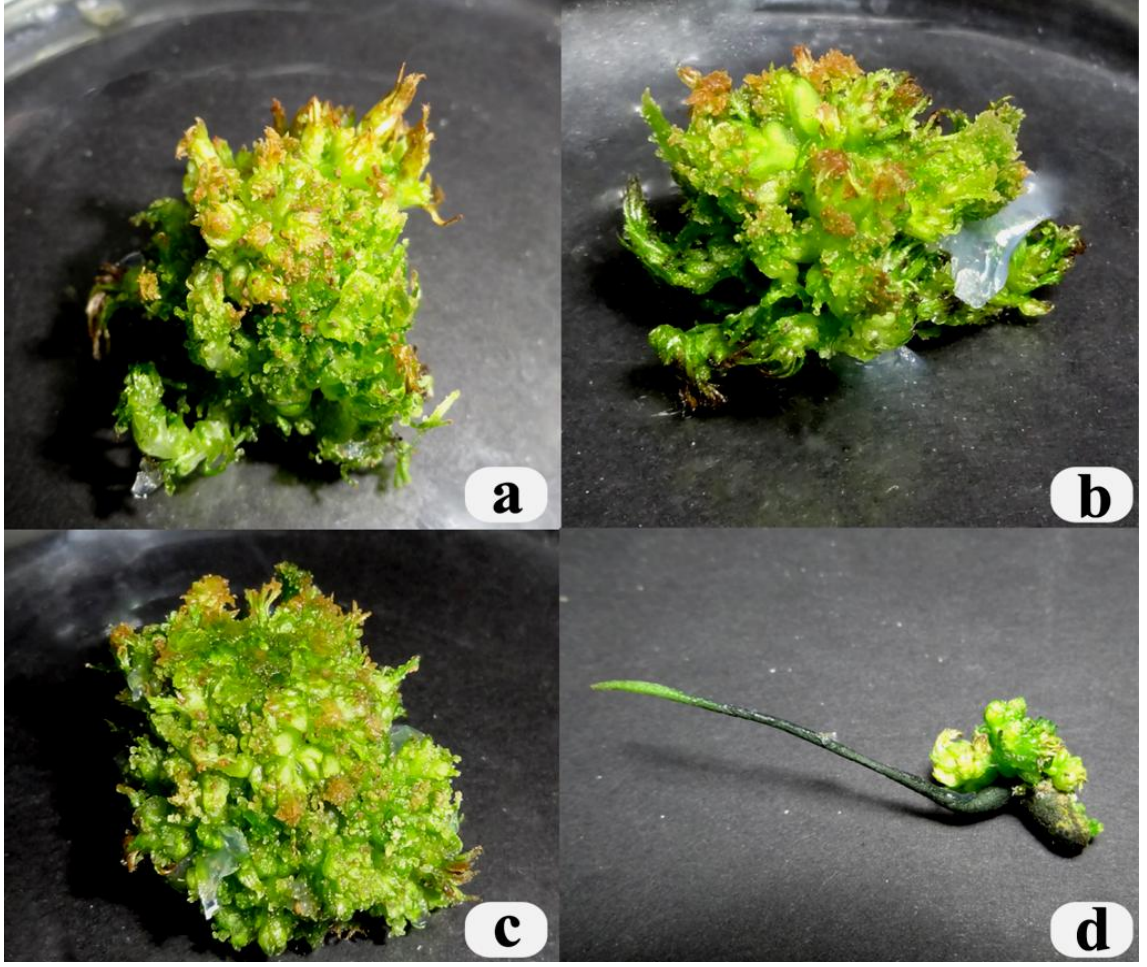
Şekil 4.7. Agar ile katılaştırılmış MS ortamında 0,10 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA dozlarını içeren MS ortamlarında eksplantlar üzerinde rizoid oluşumu; **(a ve b)** sürgün ucu meristem eksplantından, **(c ve d)** 1. koltukaltı meristem eksplantından ve **(e ve f)** 2. koltukaltı meristem eksplantından uzun ve fazla rizoid oluşumu



Şekil 4.8. 0,40 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA içeren MS ortamında eksplantların rizoid durumları; **(a)** 1. ve **(b)** 2. koltukaltı meristem eksplantında kısa ve az sayıda rizoid oluşumu ve **(c)** rizoid oluşumu gerçekleşmeyen sürgün ucu meristem eksplantları

4.2.4. Agar ile Katılaştırılmış MS Ortamında 0,10 mg/l IBA, 0,10 mg/l GA₃ ve Farklı TDZ Dozlarının *C. demersum*'un Farklı Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu

In vitro sürgün rejenerasyonu için *C. demersum*'un sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantları 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 besin ortamında sekiz hafta boyunca kültüre alınmıştır. İkinci haftada ortamlarda sürgün oluşumları gözlenmeye başlanmıştır. Beşinci haftada, rejenere olan bazı sürgünlerin uç kısımlarında kahverengi tonlarında bir renk oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.9 a, b ve c). Sekizinci haftada 0,80 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA ve 0,10 mg/l GA₃ içeren MS ortamında bulunan sürgün ucu meristem eksplantı üzerinde bir adet rizoid oluşumu kaydedilmiş olup diğer tüm MS ortamlarında herhangi bir rizoid oluşumuna rastlanılmamıştır. Oluşan rizoidin gövde kısmı siyaha yakın renkte olup, uç kısımlara doğru açık yeşil bir renk almıştır (Şekil 4.9 d).



Şekil 4.9. Beşinci haftada farklı TDZ, IBA ve GA₃ kombinasyonlarını içeren MS ortamında sürgünler üzerinde kahverengi renk oluşumları; (a) sürgün ucu (b) 1. koltukaltı ve (c) 2. koltukaltı meristem eksplantında sürgün uçlarında renklenmeler (d) Sekizinci haftada 0,80 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA ve 0,10 mg/l GA₃ içeren MS ortamında sürgün ucu meristem eksplantı üzerinde bir adet rizoid oluşumu

Sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri alınarak varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.9). Sürgün ucu ve 1. koltukaltı meristem eksplantlarında sürgün rejenerasyon oranı bakımından ortamlar arasında önemli bir farklılık bulunmazken, 2. koltukaltı meristem eksplantında ise $p<0,01$ düzeyinde önemli bir farklılık bulunmuştur. Her üç eksplant tipinde de eksplant başına sürgün sayısı bakımından ortamlar arasında $p<0,05$ düzeyinde farklılık tespit edilmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından, sürgün ucu ve 1. koltukaltı meristem eksplantlarında, ortamlar arasında önemli bir farklılık yokken, 2. koltukaltı meristem eksplantlarında $p<0,01$ seviyesinde önemli bir farklılık bulunmuştur. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.9. Agar ile katılaştırılmış MS ortamında 0,10 mg/l IBA, 0,10 mg/l GA₃ ve farklı TDZ dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
Sürgün Ucu							
V.K.	S.D	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	468,75	2,25 ^{ös}	571,14	7,68*	0,02	0,92 ^{ös}
Hata	8	208,33	-	74,37	-	0,02	-
Genel Toplam	11	-	-	-	-	-	-
* $p<0,05$ düzeyinde önemli, ^{ös} Önemli							
1. Koltukaltı Meristem							
V.K.	S.D	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	625,00	2,00 ^{ös}	336,03	5,44*	0,13	2,50 ^{ös}
Hata	8	312,50	-	61,76	-	0,05	-
Genel Toplam	11	-	-	-	-	-	-
* $p<0,05$ düzeyinde önemli, ^{ös} Önemli							
2. Koltukaltı Meristem							
V.K.	S.D	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	1440,97	9,22**	180,01	6,27*	0,42	12,87**
Hata	8	156,25	-	28,69	-	0,03	-
Genel Toplam	11	-	-	-	-	-	-
** $p<0,01$ düzeyinde önemli, * $p<0,05$ düzeyinde önemli							

Çizelge 4.10. Agar ile katılaştırılmış MS ortamında 0,10 mg/l IBA, 0,10 mg/l GA₃ ve farklı TDZ dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları

Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)			Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)			Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			Sürgün Uzunluğu (cm)		
TDZ	IBA	GA ₃	S.U. ^{ös}	1. K.A. ^{ös}	2. K.A.*	S.U.*	1. K.A.*	2. K.A.*	S.U.*	1. K.A.*	2. K.A.*
0,10	0,10	0,10	100,00	100,00	91,67 ^a	61,92 ^a	56,08 ^a	44,08 ^{bc}	0,63 ^{ös}	0,75 ^b	0,55 ^c
0,20	0,10	0,10	100,00	100,00	100,00 ^a	53,08 ^a	45,17 ^{ab}	50,08 ^{ab}	0,73	0,98 ^{ab}	0,94 ^b
0,40	0,10	0,10	75,00	75,00	58,33 ^b	47,75 ^a	41,17 ^{ab}	56,17 ^a	0,70	1,24 ^a	1,46 ^a
0,80	0,10	0,10	83,33	75,00	58,33 ^b	29,25 ^b	30,47 ^b	38,17 ^c	0,54	0,86 ^{ab}	0,97 ^b

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir

^{ös} Önemsiz

S.U. : Sürgün ucu meristemi
 1. K.A. : 1. Koltukaltı meristemi
 2. K.A. : 2. Koltukaltı meristemi

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi ortamlarda sürgün rejenerasyon oranı sürgün ucu ve 1. koltukaltı meristemlerinde %75,00-%100,00 arasında, 2. koltukaltı meristemlerinde %58,33-%100,00 arasında kaydedilmiştir. Tüm eksplantlarda en fazla sürgün rejenerasyonu (%100,00) 0,20 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA ve 0,10 mg/l GA₃ içeren MS ortamında elde edilmiştir. Sahoo ve Chand (1998), 0,5 mg/l TDZ ve 0,2, 0,4 ve 0,6 mg/l GA₃ kombinasyonlarını içeren ortamda *Vitex negundo* bitkisinin nodal eksplantlarıyla yaptığı çalışmada sürgün rejenerasyonunu %27,55 - %31,61 olarak bildirmişlerdir.

Hormon kombinasyonlarını içeren MS ortamlarda eksplant başına sürgün sayısı sürgün ucu meristemlerinde 29,25-61,92 adet, 1. koltukaltı meristemlerinde 30,47-56,08 adet ve 2. koltukaltı meristemlerinde 38,17-56,17 adet arasında değişmiştir. En fazla eksplant başına sürgün sayısı, sürgün ucu (61,92 adet) ve 1. koltukaltı (56,08 adet) meristem eksplantlarında büyüme düzenleyicilerinin eşit oranda kullanıldığı 0,10 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA ve 0,10 mg/l GA₃ içeren MS ortamında elde edilirken, 2. koltukaltı (56,17 adet) meristem eksplantlarında ise 0,40 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA ve 0,10 mg/l GA₃ içeren MS ortamında elde edilmiştir. Tüm eksplantlarda en az sürgün sayısı ise TDZ oranının en yoğun kullanıldığı 0,80 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA ve 0,10 mg/l GA₃ içeren MS ortamında kaydedilmiştir. Buna karşın, Akram ve Aftab (2008) 1-10 µM TDZ ve 1 µM IBA içeren ortamda *Tectona grandis* bitkisinin nodal eksplantlarıyla yaptığı çalışmada en fazla sürgün sayısını (5,00 adet) 10 µM TDZ ve 1 µM IBA içeren ortamda elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Farklı kombinasyonlarda TDZ, IBA ve GA₃ içeren MS ortamında sürgün uzunlukları sürgün ucu meristemlerinde 0,54-0,73 cm, 1. koltukaltı meristemlerinde 0,75-1,24 cm ve 2. koltukaltı meristemlerinde 0,55-1,46 cm arasında değişmiştir. En uzun sürgünler 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantlarında 0,40 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA ve 0,10 mg/l GA₃ içeren MS ortamında elde edilirken, sürgün ucu meristem eksplantlarından ise 0,20 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA ve 0,10 mg/l GA₃ içeren MS ortamında elde edilmiştir (Şekil 4.10 a, b ve c). Genelde GA₃ kullanmamıza rağmen beklenenden kısa sürgünler elde edilmiştir. Fakat Mohamed ve ark. (2006) *Phaseolus angularis* bitkisiyle yaptıkları çalışmada, GA₃'ün, IBA ve AgNO₃ (gümüş nitrat) ile olan kombinasyonlarında uzun sürgünler elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca Arous ve ark. (2001), GA₃'in, sürgünlerin uzaması üzerine olumlu rolünü *Capsicum annum* bitkisinde onaylamışlardır.

Sürgünlerin kısa kalmasının sebebinin, TDZ'nin sürgün uzamasını baskılayıcı bir etki yapmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. TDZ tarafından geç sürgün oluşumu ve TDZ'nin baskılayıcı etkisi daha önce, *Cercis canadensis* L. var. *alba* (Rehder) (Yusnita ve ark., 1990) ve *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Preece ve ark., 1987) bitkilerinde kaydedilmiştir. Malik ve Saxena (1992), Bezelye bitkisi için yüksek TDZ konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonunu azalttığını ve bodur sürgünler oluşturduğunu bildirmişlerdir.

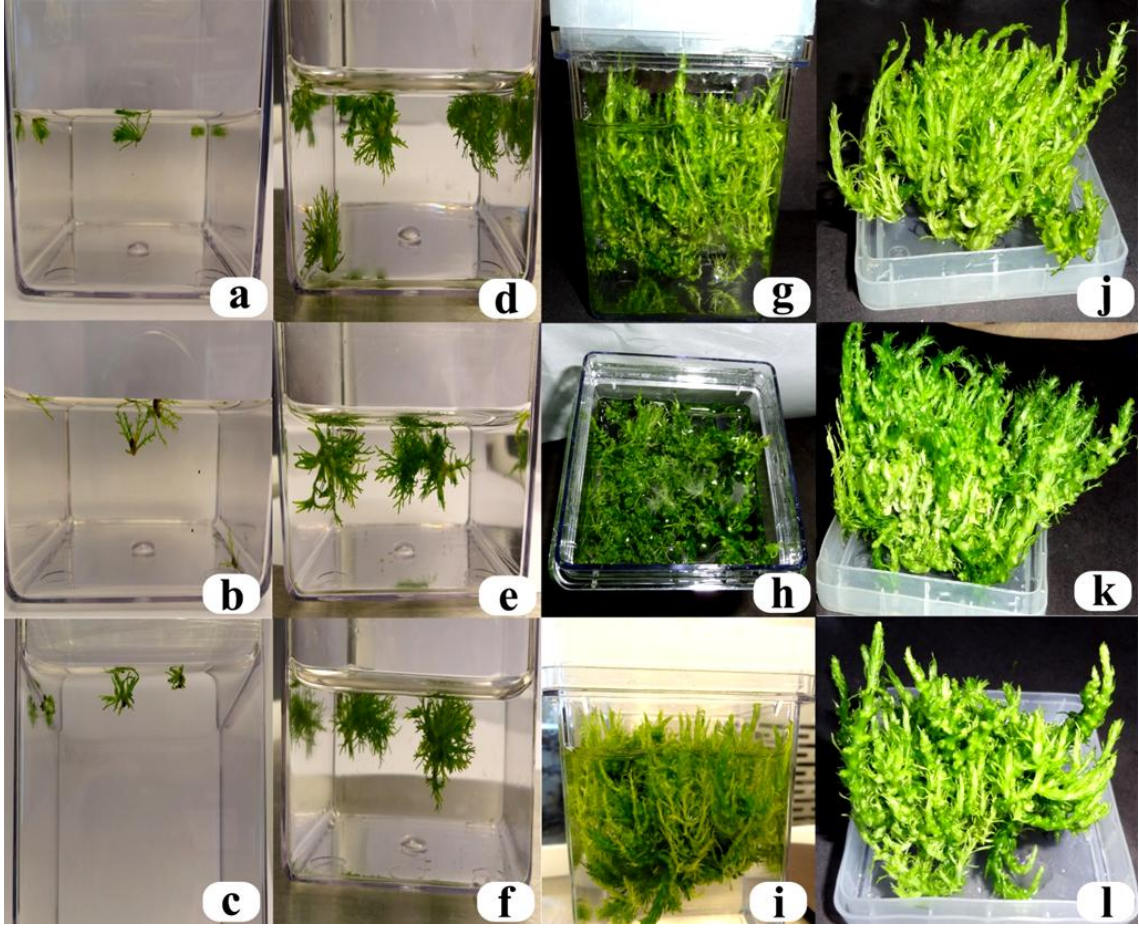


Şekil 4.10. 0,10 mg/l IBA, 0,10 mg/l GA₃ ve farklı TDZ içeren MS ortamında uzun sürgün oluşumları; 0,40 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA ve 0,10 mg/l GA₃ içeren MS ortamında 1. (b) ve 2. (c) koltukaltı meristem eksplantlarında (a) 0,20 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA ve 0,10 mg/l GA₃ içeren MS ortamında sürgün ucu meristem eksplantlarında uzun sürgün oluşumları

4.3. Sıvı Kültürde Sürgün Rejenerasyonu

4.3.1. Farklı TDZ Dozlarının *C. demersum*'un Farklı Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu

C. demersum bitkisinin *in vitro* sürgün rejenerasyonu için sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantları 0,05, 0,10, 0,20, 0,40 ve 0,80 mg/l TDZ dozlarını içeren 5 farklı MS ortamında sekiz hafta boyunca kültüre alınmıştır. İki hafta sonra eksplantlar üzerinde çoklu sürgün uçları gözlenmeye başlanmış olup, (Şekil 4.11 a, b ve c) dört hafta sonra ortamlarda belirgin şekilde çoklu sürgünler görülmüştür (Şekil 4.11 d, e ve f). 0,10 mg/l TDZ içeren MS ortamlarındaki bazı sürgünler üzerinde bulunan yapraklarda, sürgün oluşumları da kaydedilmiştir (Şekil 4.12 a ve b). Sekiz hafta sonra (Şekil 4.11 g, h, i, j, k ve l) sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait verileri ile yapılan varyans analizi Çizelge 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Sıvı kültürde farklı TDZ dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonu; ikinci (a, b ve c), dördüncü (d, e ve f) ve sekizinci (g, h, i, j, k ve l) haftada sırasıyla sürgün ucu (a, d, g ve j), 1. koltukaltı (b, e, h ve k) ve 2. koltukaltı (c, f, i ve l) meristem eksplantında sürgün oluşumu



Şekil 4.12. 0,10 mg/l TDZ içeren MS ortamında (a) sürgün üzerindeki yaprakta sürgün oluşumu ve (b) yaprak üzerinde oluşan sürgünlerin genel görünümü

Çizelge 4.11. Farklı TDZ dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
Sürgün Ucu							
V.K.	S.D	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	4	135,00	3,00 ^{ös}	942,12	9,03**	0,177	11,73**
Hata	10	45,00	-	104,29	-	0,015	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-	-	-
** $p < 0,01$ düzeyinde önemli, ^{ös} Önemli							
1. Koltukaltı Meristem							
V.K.	S.D	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	4	135,00	3,00 ^{ös}	1432,32	4,20*	0,03	5,95*
Hata	10	45,00	-	341,39	-	0,01	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-	-	-
* $p < 0,05$ düzeyinde önemli, ^{ös} Önemli							
2. Koltukaltı Meristem							
V.K.	S.D	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	4	202,50	2,25 ^{ös}	994,64	10,15**	0,04	0,68 ^{ös}
Hata	10	90,00	-	98,01	-	0,07	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-	-	-
** $p < 0,01$ düzeyinde önemli, ^{ös} Önemli							

Çizelge 4.11'de görüldüğü gibi, denemede kullanılan tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyon oranı bakımından ortamlar arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından, sürgün ucu ve 2. koltukaltı meristem eksplantlarıyla ortamlar arasında $p < 0,01$ düzeyinde önemli bir farklılık bulunurken, 1. koltukaltı meristem eksplantlarında $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün uzunluğu bakımından 2. koltukaltı meristem eksplantlarıyla ortamlar arasında önemli bir farklılık tespit edilmezken, sürgün ucu ve 1. koltukaltı meristemlerde ise sırasıyla $p < 0,01$ ve $p < 0,05$ düzeyinde önemli bir farklılık tespit edilmiştir. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı TDZ dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları

Büyüme Düzenleyici (TDZ-mg/l)	Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)			Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			Sürgün Uzunluğu (cm)		
	S.U.*	1. K.A.*	2. K.A. ^{ös}	S.U.**	1. K.A.*	2. K.A.**	S.U.**	1. K.A.*	2. K.A. ^{ös}
0,05	100,00 ^a	85,00 ^b	100,00	114,67 ^a	98,33 ^b	95,11 ^b	1,48 ^b	1,48 ^c	1,76
0,10	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00	109,11 ^{ab}	112,33 ^{ab}	129,22 ^a	1,33 ^b	1,59 ^{bc}	1,80
0,20	100,00 ^a	100,00 ^a	85,00	83,22 ^{bc}	87,44 ^b	103,22 ^b	1,44 ^b	1,64 ^{ab}	1,67
0,40	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00	79,22 ^c	138,44 ^a	97,67 ^b	1,93 ^a	1,63 ^{ab}	1,55
0,80	85,00 ^b	100,00 ^a	85,00	77,44 ^c	85,33 ^b	79,11 ^b	1,36 ^b	1,75 ^a	1,52

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

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p<0,05$ düzeyinde önemlidir

^{ös} Önemsiz

S.U. : Sürgün ucu meristemi

1. K.A. : 1. Koltukaltı meristemi

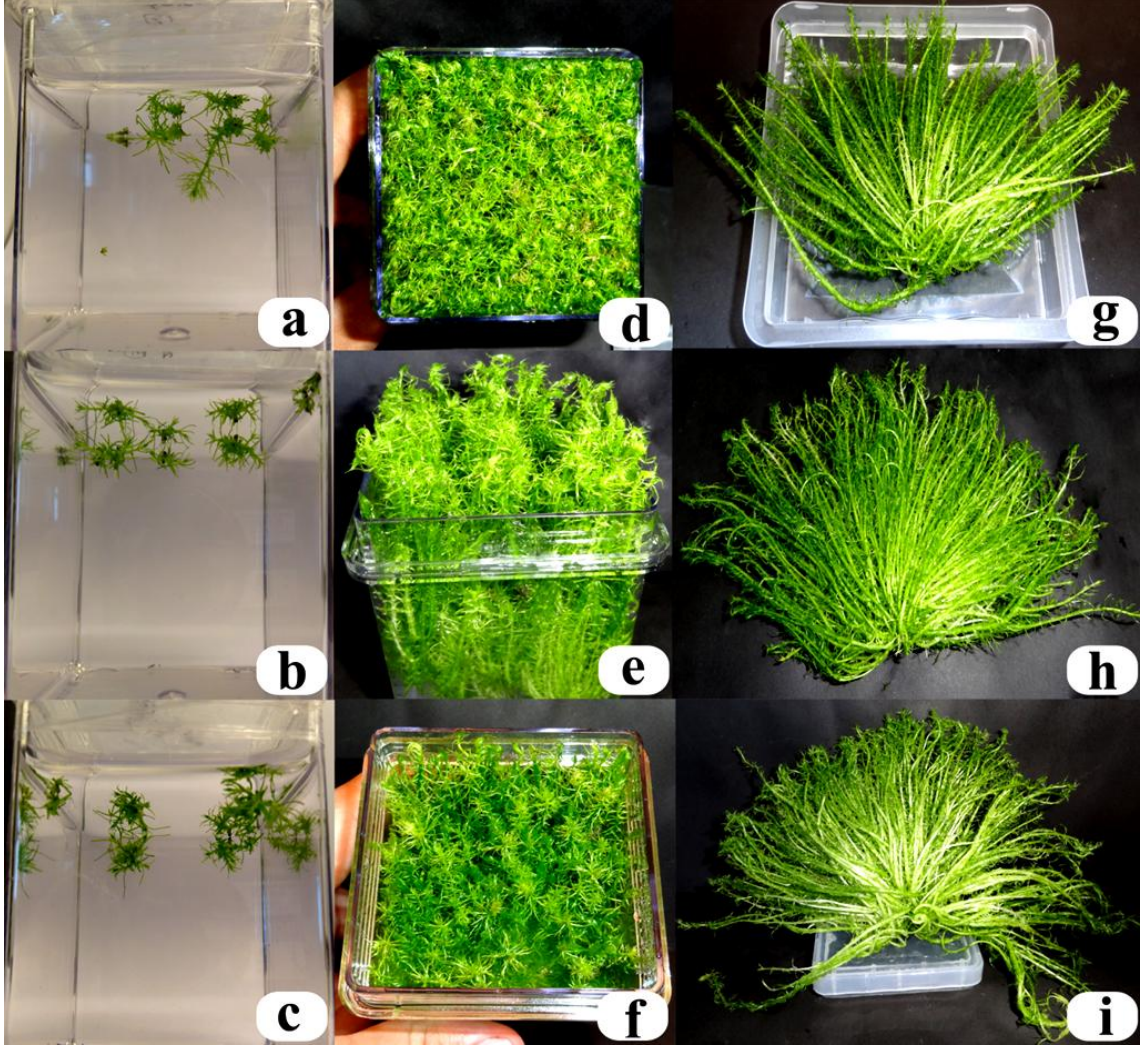
2. K.A. : 2. Koltukaltı meristemi

Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyon oranı %85,00 ile %100,00 olarak kaydedilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristemlerinde sırasıyla 77,44-114,67, 85,33-138,44 ve 79,11-129,22 adet arasında kaydedilmiştir. En fazla eksplant başına sürgün sayısı, sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantlarından sırasıyla 0,05 mg/l TDZ (114,67 adet), 0,40 mg/l TDZ (138,44 adet) ve 0,10 mg/l TDZ (129,22 adet) içeren MS ortamından elde edilmiştir. Tüm eksplantlarda en az sürgünler, en fazla TDZ (0,80 mg/l) içeren MS ortamında kaydedilmiştir. Sürgün uzunlukları ise sürgün ucu meristeminde 1,33-1,93 cm, 1. koltukaltı meristeminde 1,48-1,75 cm ve 2. koltukaltı meristem 1,52-1,80 cm arasında kaydedilmiştir. En uzun sürgün 0,40 mg/l TDZ içeren MS ortamında sürgün ucu eksplantından (1,93 cm), 0,80 mg/l TDZ içeren MS ortamında 1. koltukaltı eksplantından (1,75 cm) ve 0,10 mg/l TDZ içeren ortamda 2. koltukaltı eksplantından (1,80 cm) elde edilmiştir. Öztürk (2008), TDZ ve NAA içeren ortamda *Hygrophila difformis* bitkisinin uç meristemi, 1. koltukaltı meristemi, yaprak ve yaprak sapı eksplantını sürgün rejenerasyonu için sıvı ortamda kültüre almıştır. Eksplantlar arasında en fazla sürgün sayısını (52,63 adet) ve en uzun sürgünleri (5,63 cm) 1. koltukaltı meristeminden, en az (14,50 adet) ve en kısa sürgünleri (1,25 cm) ise yaprak eksplantından elde ettiğini bildirmiştir. Prathanturarug ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada, *Curcuma longa* bitkisinin aksillar tomurcuk eksplantlarını 72,64 µM TDZ içeren sıvı MS ortamında bir hafta boyunca bekletmişlerdir. Daha sonra eksplantlar katı MSO (kontrol) ortamında sekiz hafta boyunca kültüre alınmış ve en fazla eksplant başına sürgün sayısı 11,4±1,7 adet olarak kaydedilmiştir. Praveen ve ark. (2009), farklı oranlarda (0, 0,5, 1, 1,5, 2, ve 2,5 mg/l) sitokininleri (BAP, Kin ve TDZ) içeren sıvı ve katı MS ortamında *B. monnieri* yaprak eksplantlarını 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 edildiğini bildirmişlerdir.

4.3.2. Farklı BAP Dozlarının *C. demersum*'un Farklı Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu

In vitro çoğaltım çalışmalarında sıvı kültürler etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Jo, 2008; Zuraida ve ark., 2011). Bu çalışmada sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantları sürgün rejenerasyonu için 0,05, 0,10, 0,20, 0,40 ve 0,80 mg/l BAP içeren MS ve MSO (kontrol) ortamlarında kültüre alınmıştır. Bir hafta sonra eksplantlar üzerinde sürgün uçları ve MSO (kontrol) ortamında da rizoid oluşumları gözlenmiştir. İki hafta sonra eksplantlar üzerinde çoklu sürgünler (Şekil 4.13 a, b ve c) kaydedilmiş olup, dört hafta sonra düşük oranda BAP (0,05 ve 0,10 mg/l) içeren MS ortamlarında da rizoid oluşumları gözlenmiştir. Buna karşın, Şumlu (2009) 0,25 mg/l BAP - 0,50 mg/l NAA ve 0,50 mg/l BAP - 0,50 mg/l NAA içeren sıvı MS ortamında *R. macrandra* bitkisinin sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem, yaprak, 1. ve 2. boğum arası eksplantlarında iki hafta sonra bozulma ve kararma kaydedilmiş olup, dört hafta sonunda bitkilerin tamamının öldüğünü rapor etmiştir.

Sekiz hafta sonra (Şekil 4.13 d, e, f, g, h ve i) deneme sonlandırılmış olup, sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve rizoid oluşturan eksplant oranı verileri için varyans analizi uygulanmıştır (Çizelge 4.13).



Şekil 4.13. Sıvı kültürde farklı BAP dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonu; ikinci (a, b ve c) ve sekizinci (d, e, f, g, h ve i) haftada sırasıyla sürgün ucu (a, d ve g), 1. koltukaltı (b, e ve h) ve 2. koltukaltı (c, f ve i) meristem eksplantında sürgün oluşumu

Varyans analizi (Çizelge 4.13) incelendiğinde tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve rizoid oluşturan eksplant oranı bakımından ortamlar arasında farklılık $p < 0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi uygulanmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.13. Farklı BAP dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)		Rizoid Oluşturan Eksplant Oranı (%)	
Sürgün Ucu									
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	532,50	7,52**	13990,32	191,14**	4,04	9,81**	6795,56	23,19**
Hata	12	70,83	-	73,20	-	412	-	293,06	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-	-	-
** $p < 0,01$ düzeyinde önemli									
1. Koltukaltı Meristem									
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	300,00	7,20**	5624,16	41,94**	5,03	45,64**	6508,06	95,63**
Hata	12	41,67	-	134,08	-	0,11	-	68,06	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-	-	-
** $p < 0,01$ düzeyinde önemli									
2. Koltukaltı Meristem									
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	1670,00	5,89**	17603,89	493,56**	7,49	22,19**	7200,00	27,00**
Hata	12	283,33	-	35,67	-	0,34	-	266,67	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-	-	-
** $p < 0,01$ düzeyinde önemli									

Çizelge 4.14. Farklı BAP dozlarının *C. demersum*'un farklı eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları

Büyüme Düzenleyici (BAP-mg/l)	Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)			Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			Sürgün Uzunluğu (cm)			Rizoid Oluşturan Eksplant Oranı (%)		
	S.U.**	1. K.A.**	2. K.A.**	S.U.**	1. K.A.**	2. K.A.**	S.U.**	1. K.A.**	2. K.A.**	S.U.**	1. K.A.**	2. K.A.**
0,05	100,00 ^a	90,00 ^a	90,00 ^a	40,87 ^d	47,55 ^b	52,88 ^e	2,91 ^c	2,89 ^d	2,96 ^{cd}	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a
0,10	90,00 ^a	75,00 ^{abc}	75,00 ^{ab}	89,16 ^c	95,13 ^a	85,25 ^d	3,56 ^c	5,02 ^{ab}	4,02 ^{bc}	86,67 ^a	78,33 ^b	100,00 ^a
0,20	65,00 ^b	80,00 ^{ab}	65,00 ^{abc}	143,97 ^b	102,67 ^a	146,50 ^c	5,72 ^a	5,65 ^a	6,38 ^a	40,00 ^b	40,00 ^c	60,00 ^a
0,40	90,00 ^a	60,00 ^c	40,00 ^{bc}	157,43 ^{ab}	106,47 ^a	204,33 ^a	3,97 ^{bc}	3,98 ^c	4,52 ^b	0,00 ^b	0,00 ^d	0,00 ^b
0,80	80,00 ^{ab}	70,00 ^{bc}	25,00 ^c	169,07 ^a	109,43 ^a	170,11 ^b	3,08 ^c	2,18 ^d	1,77 ^d	0,00 ^b	0,00 ^d	0,00 ^b
MSO (Kontrol)	100,00 ^a	75,00 ^{abc}	55,00 ^{abc}	1,50 ^e	2,17 ^c	2,20 ^f	5,26 ^{ab}	4,33 ^{bc}	3,15 ^{bcd}	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a

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

S.U. : Sürgün ucu meristemi

1. K.A. : 1. Koltukaltı meristemi

2. K.A. : 2. Koltukaltı meristemi

Çizelge 4.14’de görüldüğü gibi sürgün rejenerasyon oranı sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantlarında sırasıyla %65,00-%100,00, %60,00-%90,00 ve %25,00-%90,00 arasında değişmiştir. Tüm MS ortamlarında en düşük sürgün rejenerasyonu (%25,00) 0,80 mg/l BAP içeren MS ortamında 2. koltukaltı meristem eksplantlarından elde edilirken, en yüksek sürgün rejenerasyonu (%100,00) ise 0,05 mg/l BAP ve MSO (kontrol) ortamlarındaki sürgün ucu mersistem eksplantlarından elde edilmiştir. Genel olarak tüm BAP oranlarını içeren MS ortamlarda en fazla sürgün rejenerasyon oranı sırasıyla sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantından elde edilmiştir.

Farklı oranlarda BAP içeren MS ortamlarında eksplant başına sürgün sayıları oldukça fazla miktarlarda kaydedilmiştir. Sürgün ucu meristemlerinde 40,87-169,07 adet, 1. koltukaltı meristemlerinde 47,55-109,43 adet ve 2. koltukaltı meristemlerinde ise 52,88-204,33 adet arasında sürgünler elde edilmiştir. En fazla eksplant başına sürgün sayısı, sürgün ucu (169,07 adet) ve 1. koltukaltı (109,43 adet) meristem eksplantlarında 0,80 mg/l BAP içeren MS ortamında elde edilirken, 2. koltukaltı (204,33 adet) meristem eksplantlarında 0,40 mg/l BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir. Sıvı MS ortamında eksplantlardan bu kadar fazla sürgün sayısının elde edilmesi *C. demersum*’un tamamen su altında yaşayan bir bitki olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca BAP dozlarının artırılmasının sürgün ucu ve 1. koltukaltı meristem eksplantlarında sürgün sayısını da artırdığı görülmüştür. Buna karşın, 2. koltukaltı meristem eksplantlarında ise 0,40 mg/l BAP dozuna kadar bir artış gözlenirken, 0,80 mg/l BAP dozunda azalma gözlenmiştir. Genel olarak tüm BAP oranlarında 1. koltukaltı meristem eksplantları diğer eksplantlara göre daha az eksplant başına sürgün sayısı vermiştir. Dandin ve Murthy (2012) *Nothapodytes nimmoniana* bitkisinin nodal eksplantlarından elde ettikleri kallusları sürgün rejenerasyonu için 1, 2, 5 ve 10 µM BAP, Kin ve 2-iP içeren sıvı ve yarı-katı MS ortamlarına aktarmışlardır. En fazla sürgün sayısını sıvı MS ortamında 165,9 adet, yarı-katı MS ortamında ise 41,9 adet ile 2 µM BAP içeren MS ortamında elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

MS ortamlarında kullanılan BAP dozları (özellikle 0,20, 0,40 ve 0,80 mg/l) sürgünler üzerinde yoğun bir yan dal oluşumuna sebep olmuştur. 0,80 mg/l BAP içeren MS ortamında, yan dal uzunluğunun diğer MS ortamındakilerden daha kısa olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14 a, b ve c). Diğer bitki büyüme düzenleyici içeren yarı katı ve sıvı MS ortamlarında bu kadar uzun veya fazla yan dal oluşumu görülmemiştir.



Şekil 4.14. Farklı BAP oranlarını içeren MS ortamlarında sürgünler üzerinde yan dal oluşumları; (a) 0.20 mg/l BAP (b) 0.40 mg/l BAP (c) 0.80 mg/l BAP içeren MS ortamında 1. koltukaltı meristem eksplantları

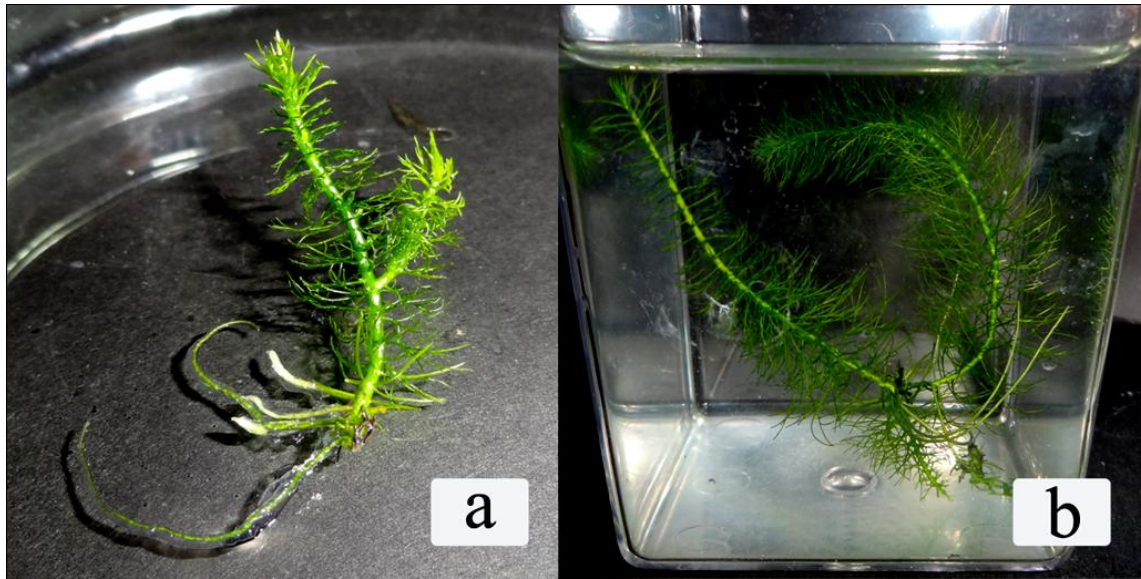
BAP bulunan MS ortamlarındaki sürgün uzunlukları, sürgün ucu meristemlerinde 2,91-5,72 cm, 1. koltukaltı meristemlerinde 2,18-5,65 cm ve 2. koltukaltı meristemlerinde 1,77-6,38 cm arasında değişmiştir. Tüm eksplantlarda en uzun sürgünler, 0,20 mg/l BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir. Dandin ve Murthy (2012) *N. nimmoniana* bitkisiyle yaptıkları çalışmada, 1, 2, 5, ve 10 μ M BAP, Kin ve 2-iP içeren sıvı ortamda en fazla sürgün uzunluğunu, $4,2\pm 0,3$ cm ile 5 μ M 2-iP'de, ardından $2,5\pm 0,2$ cm ile 5 μ M BAP içeren ortamda elde ettiklerini raporlaştırmışlardır. Hung ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, *Wasabia japonica* bitkisinin sürgün ucu meristemlerini %3 sukroz ve 0,5 μ M BAP içeren sıvı MS, $\frac{1}{2}$ MS ve $\frac{1}{4}$ MS ortamlarında 6 hafta boyunca kültüre almışlardır. En uzun sürgünlerin $34,7\pm 0,8$ cm ile MS ortamında, ardından $27,0\pm 0,8$ cm ile $\frac{1}{2}$ MS ortamında kaydedildiğini bildirmişlerdir.

MSO (kontrol) ortamında bulunan eksplantlarda sürgün sayısı ve uzunluğu bakımından bir karışıklık söz konusudur. Yani eksplantlar arasında en az sürgün (1,50 adet) ve en uzun sürgün (5,26 cm) sürgün ucu meristemlerinde, en fazla (2,20 adet) ve en kısa sürgün (3,15 cm) ise 2. koltukaltı meristemlerinde kaydedilmiştir.

Rizoid oluşturan eksplant oranı ortamlardaki tüm eksplantlarda %0-%100,00 arasında değişmiştir. MS ortamlarında kullanılan BAP dozlarının artırılması ile eksplantların rizoid oluşturma yeteneğinin azaldığı gözlenmiştir. Yüksek oranda kullanılan BAP (0,40 ve 0,80 mg/l) dozlarında ise rizoid oluşumunun tamamen durduğu kaydedilmiştir.

4.3. *In Vitro* Köklendirme

C. demersum doğal ortamında köksüz bir bitki olduğu (Cook, 1996) için ayrıca bir köklendirme çalışması yapılmamıştır. Fakat kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisiyle rizoid oluşturdukları gözlenmiştir. Ayrıca kontrol amaçlı kullanılan bitki büyüme düzenleyici içermeyen (MSO) tüm MS ortamlarında da rizoid oluşumları kaydedilmiştir (şekil 4.15).



şekil 4.15. Büyüme düzenleyici içermeyen (MSO) MS ortamlarında rizoid oluşumu; (a) agarla katılaştırılan (b) sıvı MS ortamlarında rizoid oluşumu

4.4. Rejenerasyonu Sağlanmış Bitkiler İçin Uygun pH Aralığının Belirlenmesi Bitki İçin Uygun pH Aralığının Belirlenmesi

C. demersum bitkisinin optimum pH derecesinin belirlenmesi amacıyla 0,20 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında sürgün ucu eksplantlarından elde edilen rejenere sürgünlerden 5 adet alınmıştır. Tüm sürgünlerin boy uzunlukları sabit tutulmuştur (4 cm). Sürgünlerin üzerindeki besin ortamı uzaklaştırıldıktan sonra pH'ı 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olan distile su bulunan cam beherler içerisinde, 16 saat aydınlatılmış ortamda dört hafta süreyle bekletilmiştir. En uzun bitkiler pH 7 ortamında elde edilmiştir (Şekil 4.16). Ortamın asidik veya bazik derecesi arttıkça bitki gelişiminin yavaşladığı gözlenmiştir. Karatas ve ark. (2013) *in vitro* ortamda çoğaltıkları *B. monnieri* bitkisinin uygun pH aralığının belirlenmesi için çalışma yapmışlardır. Bitkiler, farklı pH'lara sahip (4-10) su ortamlarında bir ay boyunca bekletilmiştir. En uzun bitkileri pH 8'de elde ettiklerini ve en kısa bitkileri de en asidik (pH 4) ve en bazik (pH 10) ortamdan elde ettiklerini rapor etmişlerdir.



Şekil 4.16. Dört hafta sonra farklı pH ortamlarındaki bitkilerin genel görünümü ve pH 7 ortamında en iyi gelişim gösteren bitkiler

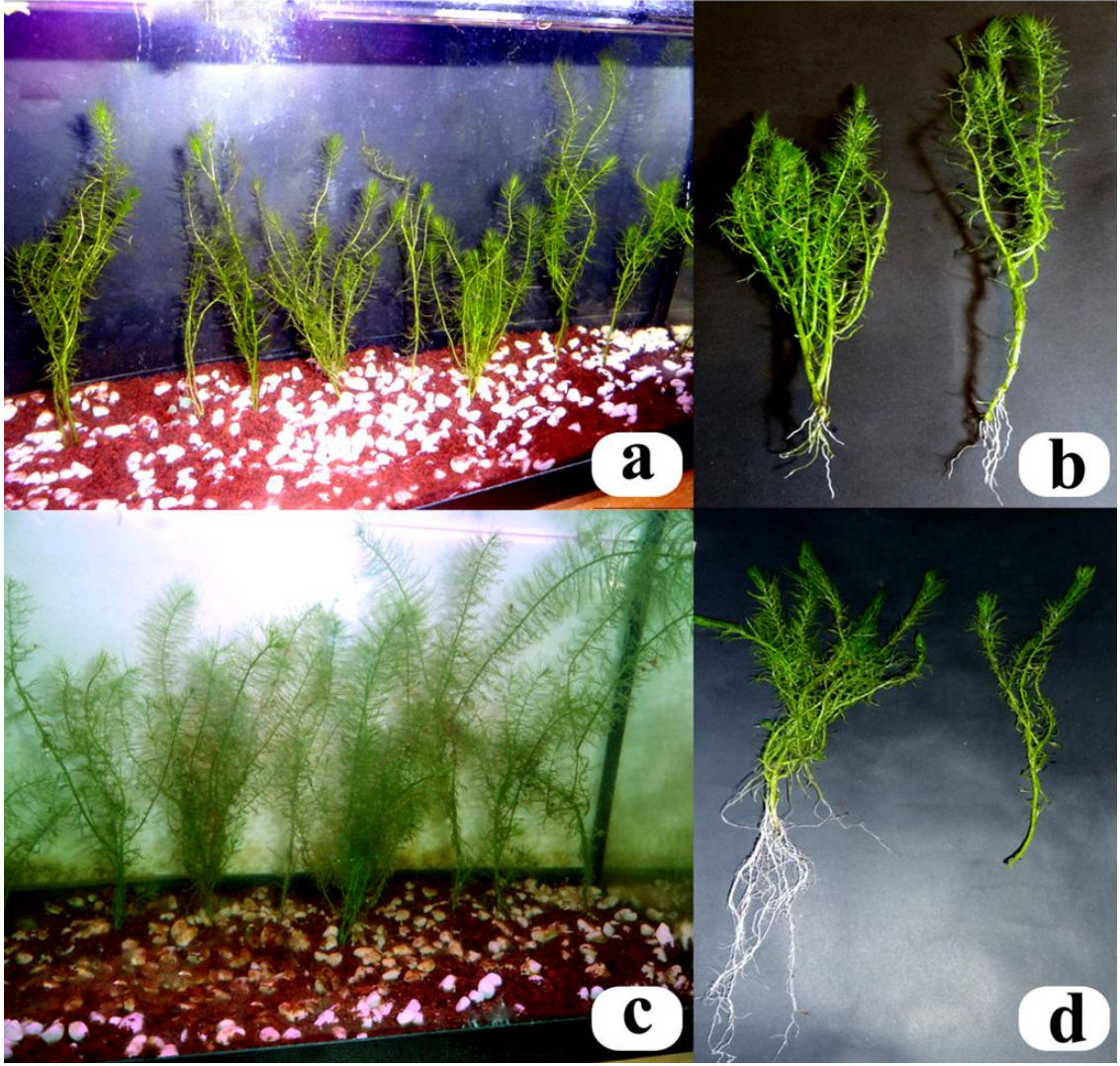
4.5. In Vitro Koşullarda Rejenere Sürgünlerin Dış Şartlara Adaptasyonu

Rejenere olan bitkiler üzerindeki besin ortamı, çeşme suyu ile bitkilerden uzaklaştırılmış ve bitkiler çeşme suyu içinde 15-20 dk bekletilmiştir. Ardından rizoid oluşturan ve rizoid oluşturmeyan rejenere sürgünler (Şekil 4.17 a ve b), dış koşullara adaptasyon için akvaryum ortamına aktarılmıştır. Dördüncü ve sekizinci haftalarda yapılan incelemelerde bitkilerin boylarında ve yapraklarında belirgin şekilde uzama ve gelişmeler kaydedilmiştir.



Şekil 4.17. Rejenere sürgünlerin akvaryuma aktarılmadan önceki görünüşleri; (a) rizoid oluşturan ve (b) rizoid oluşturmeyan bitkiler

Dördüncü haftada akvaryum ortamındaki bitkilerin durumu incelendiğinde, bitki boylarının ve yapraklarının geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.18 a ve b). Sekizinci haftada ise bitkiler gelişimini devam ettirmiştir ve yaprakların renkleri, dördüncü haftaya göre koyu yeşil bir hal almıştır (Şekil 4.18 c). Sonuç olarak, rizoid oluşturan ve rizoid oluşturmeyan bitkilerin adaptasyonu başarıyla sağlanmıştır (Şekil 4.18 d). Benzer şekilde Jenks ve ark. (2000) *Nymphoides indica*'da, Şumlu (2009), *R. macrandra*'da, Gnanaraj ve ark. (2011) *A. sessilis*'de, Shahzad ve ark. (2011) *Veronica anagallis-aquatica*'da, Stanly ve ark. (2011) *Cryptocoryne wendtii* ve *Cryptocoryne beckettii*'de ve Banerjee ve Shrivastava (2012) *B. monnieri*'de başarıyla adaptasyon sağladıklarını bildirmişlerdir.



Şekil 4.18. Rejenere olan bitkilerin akvaryum ortamına adaptasyonu; Dördüncü haftada (a) akvaryumdaki bitkilerin genel görünümü ve (b) rizoidli bitkiler. Sekizinci haftada (c) gelişimi devam eden ve rengi koyu yeşil olan bitkilerin akvaryum ortamındaki genel görünümü (d) adaptasyonu sağlanan rizoid oluşturan ve rizoid oluşturmeyen bitkiler

5. SONUÇ

Dünya’da su/akvaryum bitkilerinin yetiştiriciliği konusunda çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Ülkemizde de su/akvaryum bitkilerinin üretiminin yarı profesyonel bir şekilde, vejetatif yolla yapıldığı ve bu üretimin uzun zaman aldığı bilinmektedir. Fakat doku kültürü teknikleri kullanılarak kısa zamanda fazla bitki üretimi yapılabilir. Bu tez kapsamında akvaryum bitkisi olan *C. demersumun*’un doku kültürü teknikleri aracılığıyla çoklu üretimi gerçekleştirilmiştir.

Eksplantların yüzey sterilizasyonu; Bitkinin yüzey sterilizasyonu farklı oran ve sürelerde çamaşır suyu ve hidrojen peroksit kullanılmıştır. Çamaşır suyu ile yapılan yüzey sterilizasyonunda %10’luk çamaşır suyunda 5 dk bekletilen eksplantlardan elde edilmiş olup, eksplant tiplerine göre sıralandığında en fazla steril ve sağlam eksplantlar, sürgün ucu meristem eksplantında %25, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantlarında %15 olarak elde edilmiştir. Hidrojen peroksit ile yüzey sterilizasyonunda ise en fazla oranda steril ve sağlam eksplantlar, %5’lik hidrojen peroksit konsantrasyonunda 7 dk bekletilen eksplantlardan kaydedilmiş olup, bu eksplantlar arasında en fazla steril ve sağlam eksplantlar, %30 ile sürgün ucu, %25 ile 2. koltukaltı ve %20 ile 1. koltukaltı meristem eksplantlarından elde edilmiştir. *C. demersum* bitkisinin yüzey sterilizasyonu için kullanılan dezenfektanlar kıyaslandığında, hidrojen peroksitin çamaşır suyundan daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmalarda, sıvı ve agar ile katılaştırılan MS ortamları kullanılmıştır. Oksin ve sitokinin kombinasyonları da dahil olmak üzere yapılan tüm demelerde eksplantlar üzerinde herhangi bir kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Agarla katılaştırılan MS ortamında yapılan çoğaltım çalışmaları; i. Kinetin, ii. BAP, iii. BAP ve NAA ve iv. TDZ, IBA ve GA₃ olmak üzere 4 farklı şekilde ve 4 farklı kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyici içeren MS ortamlarında yürütülmüştür. Tüm çalışmalarda genel olarak en fazla sürgün rejenerasyon oranı, BAP’ın tek başına kullanıldığı denemede elde edilmiştir. En fazla eksplant başına sürgün sayıları ise 0,10 mg/l TDZ, 0,10 mg/l IBA ve 0,10 mg/l GA₃ içeren MS ortamında 61,92 adet ile sürgün ucu meristeminden, 56,17 adet ile 2. koltukaltı meristeminden ve 56,08 adet ile

1. koltukaltı meristeminden elde edilmiştir. En uzun sürgünler her üç eksplant tipinde de Kinetin içeren MS ortamında sırasıyla, 4,14 cm ile sürgün ucu meristeminde (0,20 mg/l Kin), 3,43 cm ile 1. koltukaltı meristeminde (0,20 mg/l Kin) ve 3,18 cm ile 2. koltukaltı meristeminde (0,10 mg/l Kin) kaydedilmiştir.

Sıvı kültürle yapılan çoğaltım çalışmaları: TDZ ve BAP hormonlarını içeren MS ortamında yürütülmüştür. Yapılan çalışmalar incelendiğinde en fazla sürgün rejenerasyon oranı TDZ içeren MS ortamında kaydedilirken, en fazla eksplant başına sürgün sayısı ve en uzun sürgünler BAP içeren MS ortamında kaydedilmiştir. Eksplant tiplerine göre en fazla sürgün sayıları sırasıyla 204,33 adet ile 2. koltukaltı meristem eksplantından (0,40 mg/l BAP), 169,07 adet ile sürgün ucu meristem eksplantından (0,80 mg/l BAP) ve 109,43 adet ile 1. koltukaltı meristem eksplantından (0,80 mg/l BAP) elde edilmiştir. Sürgün uzunlukları bakımından en uzun sürgünler, 0,20 mg/l BAP içeren MS ortamında sırasıyla, 6,38 cm ile 2. koltukaltı meristem eksplantından, 5,72 cm ile sürgün ucu meristem eksplantından ve 5,65 cm ile 1. koltukaltı meristem eksplantından elde edilmiştir.

C. demersum doğal yaşam ortamında köksüz bit bitki olduğundan dolayı ayrıca köklendirme çalışması yapılmamıştır. Ancak farklı hormonların etkisiyle rejenere olan sürgünlerde farklı oranlarda rizoid oluşumları kaydedilmiştir. Ayrıca denemelerde kontrol amaçlı kullanılan bitki büyüme düzenleyici içermeyen (MSO) MS ortamlarında da rizoid oluşumları kaydedilmiştir. Farklı hormonları içeren MS ortamları arasında en fazla rizoid oluşturan eksplant oranı, Kinetin içeren MS ortamında %100 olarak kaydedilmiştir. Genel olarak rejenere olan sürgünlerde rizoid oluşturan eksplant oranları 1. ve 2. koltukaltı meristemlerinden gelişen sürgünlerde, sürgün ucu meristemlerinden gelişen sürgünlere göre daha fazla olduğu kaydedilmiştir.

Adaptasyon çalışması için akvaryum ortamına aktarılan bitkiler incelendiğinde, *C. demersum*'un dış şartlarda gelişimini devam ettirdiği ve bitki renginin sekizinci haftada koyu yeşil bir renk aldığı görülmüştür. Akvaryuma aktarılan tüm rizoid oluşturan ve rizoid oluşturmeyen bitkilerin adaptasyonu başarıyla sağlanmıştır.

C. demersum bitkisinde optimum pH derecesini belirlemek için bitkiler farklı pH'lara sahip su ortamlarına aktarılmıştır. Bitkinin gelişimi için en uygun ortam pH 7 olarak kaydedilmiş olup, en düşük gelişim gösteren bitkiler pH 4 ve pH 10 değerlerinde gözlenmiştir.

Bu çalışmada, farklı eksplantlara (sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem) farklı dozlarda büyüme düzenleyiciler uygulanmış ve verimli sonuçlar elde edilmiştir. Agarla katılaştırılan MS ortamında BAP, BAP ve NAA ve TDZ, IBA ve GA₃ hormonlarının ve sıvı MS ortamında BAP ve TDZ hormonlarının, çoklu sürgün oluşumunda etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çoğaltım çalışmasından elde edilen sonuçlara göre en fazla eksplant başına sürgün sayısı ve en uzun sürgünler sıvı BAP içeren MS ortamındaki eksplantlardan elde edilmiştir.

Öneriler;

Araştırmalarımıza göre, bu tez kapsamında kullanılan *C. demersum* bitkisinin doku kültürü ile çoğaltımı konusunda herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Yaptığımız çalışmalar, *C. demersum*'un *in vitro* koşullarda doku kültürü yöntemleriyle hızlı ve çoklu üretiminin yapılabileceğini göstermiştir. Ayrıca doku kültürü teknikleri ile yapılan bu çalışma, bu bitkiyle yapılacak gen aktarım çalışmaları ve sekonder metabolit üretimi gibi çalışmalara yardımcı olacak niteliktedir.

Akvaryumlarda süs bitkisi olarak ticareti yapılan *C. demersum*'un doku kültürüyle çoklu üretilmesi, akvaryum bitkileri üreticilerine önemli katkı sağlayabilir.

C. demersum su ortamında bulunan ağır metalleri absorbe etme yeteneği yüksek bir bitki olduğundan, fitoremediasyon amacıyla da kullanılmaktadır. Bu çalışmada *in vitro* koşullarda hiç ağır metal içermeyen bitkiler elde edilmiştir. Bu bitkilerin dış ortamda yetişmiş bitkilere göre daha fazla ağır metali absorbe etme özelliğine sahip olabileceğini düşükteyiz ve gelecekte bununla ilgili çalışmalar da yapmayı planlıyoruz.

Yaptığımız çalışmada *C. demersum* beyaz LED ışık altında olumlu sonuçlar vermiştir. Farklı renkteki LED ışıklarıyla yapılacak olan çalışmalar sonucunda bu bitki için en uygun LED ışıklar belirlenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Aasim, M., Khawar, K.M. ve Özcan, S., 2008. *In Vitro* Micro Propagation From Shoot Meristems of Turkish Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Cultivar Akkiz. *Bangladesh Journal of Botany*, 37(2), 149-154.
- Aasim, M., Khawar, K.M. ve Ozcan, S., 2009. *In Vitro* Micropropagation from Plumular Apices of Turkish Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Cultivar Akkiz. *Scientia Horticulturae*, 122(3), 468-471.
- Aasim, M., Sahin-Demirbag, N., Khawar, K.M., Kendir, H. ve Ozcan, S., 2011. Direct Axillary Shoot Regeneration from the Mature Seed Explant of the Hairy Vetch (*Vicia Villosa* Roth). *Archives of Biological Sciences*, 63(3), 757-762.
- Aasim, M., 2012. Micropropagation of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Using Pulse Treatment of Immature Plumular Apices. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 49(2), 149-154.
- Abdallah, M.A.M., 2012. Phytoremediation of Heavy Metals From Aqueous Solutions by Two Aquatic Macrophytes, *Ceratophyllum demersum* and *Lemna gibba* L. *Environmental Technology*, 33(14), 1609-1614.
- Abdelmageed, A.H.A., Faridah, Q.Z., Norhana, F.M.A., Julia, A.A. ve Kadir, M.A., 2011. Micropropagation of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae) by Using Axillary Bud Explants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18), 4465-4469.
- Agrawal, A. ve Ram, H.Y.M., 1995. *In Vitro* Germination and Micropropagation of Water Chestnut (*Trapa sp.*). *Aquatic Botany*, 51(1-2),135-146.
- Akram, M. ve Aftab F., 2008. High Frequency Multiple Shoot Formation from Nodal Explants of Teak (*Tectona grandis* L.) Induced By Thidiazuron. *Propagation of Ornamental Plants*, 8(2), 72-75.
- Alpbaz, A., 1984. *Akvaryum Tekniği ve Balıkları*. Acargil Basımevi, 433 s, İzmir.
- Alizadeh, B., 2008. *Allium tuberosum*'un *In Vitro* Hızlı Çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Arber, A. 2010. *Water Plants. A Study of Aquatic Angiosperms*. Cambridge University Press, 88 s, New York, U.S.

- Anonim, 2009. *Su Yabanciotları (Yayılış Alanları, Yaşamları, Çevresel İlişkileri, Sorunları ve Savaşım Yöntemleri)*. T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü, İşletme ve Bakım Dairesi Başkanlığı, 14-40 s, Ankara.
- Anonim, 2012a. Submersed Plants.
<http://www.ecy.wa.gov/programs/wq/plants/plantid2/descriptions/cerdem.html>-
(Erişim Tarihi: 20.10.2012).
- Anonim, 2012b. *Ceratophyllum demersum* L.
<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=CEDE4>- (Erişim Tarihi: 20.10.2012).
- Anonim, 2012c. *Ceratophyllum demersum*.
http://www.floridaaquatic.com/aquarium_plant_ceratophyllum_demersum.html-
(Erişim Tarihi: 20.10.2012).
- Anonim, 2012d. Supplementary and Complete Feeds.
<http://www.fao.org/docrep/field/003/T8389E/T8389E03.htm>- (Erişim Tarihi: 25.11.2012).
- Anonim, 2012e. Hornwort (*Ceratophyllum demersum*).
http://www.aquariumdomain.com/viewFreshwaterPlantSpecies.php?plant_fresh_water_id=19 – (Erişim Tarihi: 03.12.2013).
- Arous, S., Boussaid, M. ve Marrakchi, M., 2001. Plant Regeneration from Zygotic Embryo Hypocotyls of Tunisian Chili (*Capsicum annum* L.). *Journal of Applied Horticulture*, 3(1), 17-22.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak, M.A., 2001. Doku Kültürleri: Tarihçe ve Temel Teknikleri. *Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. *Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları*, Konya, 1-35.
- Bakacak, A., 2010. İstanbul Üniversitesi, Alfred Heilbronn Botanik Bahçesinin Su Bitkileri Üzerinde Sistemik Araştırmalar. *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul.
- 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.

- Bird, K.T. ve Smith, J.J., 1994. Development of a Medium and Culture System for *In Vitro* Propagation of the Seagrass *Halophila engelmannii*. *Canadian Journal of Botany*, 72(10), 1503-1510.
- Boyd, C.E., 1974. Utilization of Aquatic Plants. *Aquatic Vegetation and Its Use And Control*, Ed: Mitchell, D.S. *United Nations, Unesco, Paris*, 107-115.
<http://unesdoc.unesco.org/images/0000/000072/007263eo.pdf> - (Erişim Tarihi: 01.10.2012)
- Burbulis, N., Blinstrubiene, A., Masiene, R., Jankauskiene, Z. ve Gruzdeviene, E., 2012. Genotypic and Growth Regulator Effects on Organogenesis from Hypocotyl Explants of Fiber Flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Food Agriculture & Environment*, 10(1), 397-400.
- Cardwell, A.J., Hawker, D.W. ve Greenway, M., 2002. Metal Accumulation in Aquatic Macrophytes from Southeast Queensland, Australia. *Chemosphere*, 48(7), 653-663.
- 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.
- Cavusoglu, A., Ipekci-Altas, Z., Bajrovic, K., Gozukirmizi, N. ve Zehir, A., 2011. Direct and Indirect Plant Regeneration from Various Explants of Eastern Cottonwood Clones (*Populus deltoides* Bartram ex Marsh.) with Tissue Culture. *African Journal of Biotechnology*, 10(16), 3216-3221.
- Chung, A.K.C., Wu, Y., Tam, N.F.Y. ve Wong, N.F.Y., 2008. Nitrogen and Phosphate Mass Balance in a Sub-Surface Flow Constructed Wetland for Treating Municipal Wastewater. *Ecological Engineering*, 32(1), 81-89.
- Cirik, ř., Cirik, S. ve Conk-Dalay, M., 2011. *Su Bitkileri II (İçsu Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi, Yetiştirme Teknikleri)*. E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No:61, 4-150 s, İzmir.
- Cook, C.D.K., 1996. *Aquatic Plant Book*. SPB Academic Publishing, 60 p, Amsterdam/New York.
- Çimen, A. ve Özge, Ç., 2009. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from Leaf Explants. *Pakistan Journal of Botany*, 41(3), 1155-1161.

- 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.
- Da Silva, C.V., de Oliveira, L.S., Loriato, V.A.P., da Silva, L.C., de Campos, J.M.S., Viccini, L.F., de Oliveira, E.J. ve Otoni, W.C., 2011. Organogenesis from Root Explants of Commercial Populations of *Passiflora edulis* Sims and a Wild Passionfruit Species, *P. cincinnata* Masters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107(3), 407-416.
- Dhir, B., 2010. Use of Aquatic Plants In Removing Heavy Metals From Wastewater. *Int. J. Environmental Engineering*, 2(1-3), 185-201.
- Fawzy, M.A., El-sayed Badr, N., El-Khatib, A. ve El-Kassem, A.A., 2012. Heavy Metal Biomonitoring and Phytoremediation Potentialities of Aquatic Macrophytes in River Nile. *Environmental Monitoring And Assessment*, 184 (3), 1753-1771.
- Foroughi, M., Najafi, P. ve Toghiani, S., 2011. Trace Elements Removal from Waster Water by *Ceratophyllum demersum*. *Journal of Applied Science & Environmental Management*, 15(1), 197 -201.
- Gao, J., Li, J., Luo, C., Yin, L., Li, S., Yang, G. ve He, G., 2011. Callus Induction and Plant Regeneration in *Alternanthera philoxeroide*. *Molecular Biology Reports*, 38(2), 1413-1417.
- 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.
- Gottschall, N., Boutin, C., Crolla, A., Kinsley, C. ve Champagne, P., 2007. The Role of Plants In the Removal of Nutrients at a Constructed Wetland Treating Agricultural (Dairy) Wastewater, Ontario, Canada. *Ecological Engineering*, 29(2), 154-163.
- Güner, H., 2004. *Hidrobotanik*. E.Ü. Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:91, E.Ü. Basımevi, 83-95 s, İzmir.
- Gürel, E. ve Türker, A.U., 2001. Organogenesis. *Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. *Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları*, 36-70 s, Konya,.

- Huang, L.C., Chang, Y.H. ve Chang, Y.L., 1994. Rapid *In Vitro* Multiplication of the Aquatic Angiosperm, *Anubias barteri* var. *Undulata*. *Aquatic Botany*, 47(1), 77-83.
- Hung, C.D., Johnson, K. ve Torpy, F., 2006. Liquid Culture for Efficient Micropropagation of *Wasabia japonica* (Miq.) Matsumura. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(6), 548-552.
- Iqbal, R. ve Tachibana, H., 2007. Water Chemistry in Sarobetsu Mire and Their Relations to Vegetation Composition. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 53(1), 13-31.
- 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 and Biotechnology*, 19(2), 253-255.
- Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M., Lakshmi Sai, G. ve Sekar, T., 2009. Plant Regeneration from Leaf Derived Callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 19(2), 133-141.
- Jenks, M.A., Kane, M.E., Dennis, B. ve McConnell, D.B., 2000. Shoot Organogenesis from Petiole Explants in the Aquatic Plant *Nymphoides indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63(1), 1-8.
- Jiang, Q., Zhang, Y., Zhong, C., Zeng, B., Bogusz, D. ve Franche, C., 2012. Establishment of an *In Vitro* Plant Regeneration Protocol for *Casuarina cunninghamiana* Miq. Via Indirect Organogenesis. *New Forests*, 43(2), 143-154.
- 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 Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44(1), 26-32.
- Kamal, M., Ghaly, A.E. ve Mahmoud, N., 2004. Phytoaccumulation of Heavy Metals by Aquatic Plants. *Environment International*, 29(8), 1029-1039.
- Kane, M.E., Sheehan, T.J. ve Ferwerda, F.H., 1988. *In Vitro* Growth of American Lotus Embryos. *HortScience*, 23(3), 611-613.
- Karatas, M., Aasim, 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, Belgrade*, 65(1), 297-303.

- Kasumi, M., Suzuki, K., Gonai, T., Nogi, M., Yamada, T. ve Takatsu, Y., 2006. Adventitious Bud Formation and Plant Regeneration from Ovary Explants In Balloon Flower (*Platycodon grandiflorus*). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 75(3), 284-286.
- Kaur, H., Anand, M. ve Goyal, D., 2011. Establishment of an Efficient Protocol for Micropropagation of Stem Explants of *Tylophora indica*, an Important Medicinal Plant. *African Journal of Biotechnology*, 10(36), 6928-6932.
- Kesari, V., Ramesh, A.M. ve Rangan, L., 2012. High Frequency Direct Organogenesis and Evaluation of Genetic Stability For *In Vitro* Regenerated *Pongamia pinnata*, a Valuable Biodiesel Plant. *Biomass and Bioenergy*, 44, 23-32.
- Lu, Q., He Z.L., Graetz, D.A., Stoffella, P.J., ve Yang, X., 2010. Phytoremediation to Remove Nutrients and Improve Eutrophic Stormwaters Using Water Lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 17(1), 84-96.
- Malik, K.A. ve Saxena, P.K., 1992. Thidiazuron Induces High Frequency of Shoot Regeneration in Intact Seedlings of Pea (*Pisum sativum*) Chickpea (*Cicer arietinum*) and Lentil (*Lens culinaris* Medik). *Australian Journal of Plant Physiology*, 19(6), 731-740.
- Mansuroğlu, S. ve Gürel, E., 2001. Mikroçoğaltım. *Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. *Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları*, 262-281 s, Konya,.
- Marchese, M., Gagneten, A.M., Parma, M.J., ve Pavé, P.J., (2008). Accumulation and Elimination of Chromium by Freshwater Species Exposed to Spiked Sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(4), 603–609.
- Miretzky, P., Saralegui, A. ve Cirelli, A.F., 2004. Aquatic Macrophytes Potential for the Simultaneous Removal of Heavy Metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere*, 57(8), 997-1005.
- Mohamed, S.V., Sung, J.M. ve Wang, C.S., 2006. Organogenesis of *Phaseolus angularis* L. High Efficiency of Adventitious Shoot Regeneration from Etiolated Seedlings in the Presence of N6- Benzyl Aminopurine and Thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 187-199.
- Mudgal, V., Madaan, N. ve Mudgal, A., 2010. Heavy Metals in Plants: Phtyremediation: Plants Used to Remediate Heavy Metal Pollution. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(1), 40-46.

- 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., Khawar, K.M., Atar, H.H., Sancak, C. ve Özcan, S., 2004. *In Vitro* Micropropagation of the Aquarium Plant *Ludwigia repens*. *Asia Pasific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 12, 20-24.
- Öztürk, M., 2008. Akvaryum Bitkileri *Hygrophila difformis* ve *Microsorium pteropus*'un *In Vitro* Koşullarda Çoğaltımı. *Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü*, Ankara.
- Park, S., Kang, D., Kim, Y., Lee, A.M., Chung, Y. ve Sung, K., 2011. Biosorption and Growth Inhibition of Wetland Plants In Water Contaminated with a Mixture of Arsenic and Heavy Metals. *Engineering in Life Sciences*, 11(1), 84-93.
- Parveen, S. ve Shahzad, A., 2011. A Micropropagation Protocol For *Cassia angustifolia* Vahl. from Root Explants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), 789-796.
- Prathanturarug, S., Soonthornchareonnon, N., Chuakul, W., Phaidee, Y. ve Saralamp, P., 2005. Rapid Micropropagation of *Curcuma longa* Using Bud Explants Pre-Cultured in Thidiazuron-Supplemented Liquid Medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80(3), 347-351.
- 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.
- Preece, J.E., Huetteman, C.A., Puello, C.H. ve Neuman, M.C., 1987. The Influence of Thidiazuron on *In Vitro* Culture of Woody Plants. *HortScience*, 22, 1071.
- Pourkhabbaz, A.R., Pourkhabbaz, H.R., Khazaei, T., Behraves, S. ve Ebrahimpour, M., 2011. Assessment of Heavy Metal Accumulation in Anzali Wetland, Iran, Using a Submerged Aquatic Plant, *Ceratophyllum demersum*. *African Journal of Aquatic Science*, 36(3), 261-265.
- Raja, H.D. ve Arockiasamy, D.I., 2008. *In Vitro* Propagation of *Mentha viridis* L. from Nodal and Shoot Tip Explants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 18(1), 1-6.

- Ramogola, W.P.N. ve Fennell, C.W., 2007. The Use of Inflorescence Explants for Micropropagating *Eucomis Zambesiaca*. *South African Journal of Botany*, 73(2), 334-334.
- Sahoo, Y. ve Chand, P.K., 1998. Micropropagation of *Vitex negundo* L., a Woody Aromatic Medicinal Shrub, Through High-Frequency Axillary Shoot Proliferation. *Plant Cell Reports*, 18(3-4), 301-307.
- Savino, J.F. ve Stein, R.A., 1982. Predatory-Prey Interactions Between Large Mouth Bass And Bluegills As Influenced Simulated, Submerged Vegetation. *Transactions of the American Fisheries Society*, 111(3), 225-266.
- Seçmen, Ö. ve Leblebici, E., 1997. *Türkiye Sulak Alan Bitkileri ve Bitki Örtüsü*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No:158, s 159, İzmir.
- 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.
- Sharaf, A.R.N., Hamidoghli, Y. ve Zakizadeh, H., 2011. *In Vitro* Seed Germination and Micropropagation of Primrose (*Primula heterochroma* Stapf.) an Endemic Endangered Iranian Species Via Shoot Tip Explants. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 52(3), 298-302.
- 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.
- Sharma, N., Satsangi, R., Pandey, R. ve Devi, S.V., 2007. *In Vitro* Clonal Propagation and Medium Term Conservation of Brahmi [*Bacopa monnieri* (L) Wettst]. *Journal of Plant Biochemistry And Biotechnology*, 16(2), 139-143.
- Singh, I.P., 2002. Micropropagation in *Citrus* - A Review. *Agricultural Revolution*, 23(1), 1-13.
- Smart, R.M., Dick, G.O. ve Doyle, R.D., 1998. Techniques for Establishing Native Aquatic Plants. *Journal of Aquatic Plant Management*, 36, 44-49.
- Snedecor, G.W. ve Cochran, W.G., 1997. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Iowa. USA.

- Somsri, K., Pinyopich, P. ve Mohammed, W.S., 2010. Effects of Fluorescent Lighting on *In Vitro* Micropropagation of *Lemna minor*. *Conference on Southeast Asian International Advances in Micro/Nanotechnology*, Bangkok, Thailand.
- 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.
- Tiwari, V., Tiwari, K.N. ve Singh, B.D., 2006. Shoot Bud Regeneration From Different Explants of *Bacopa monniera* (L.) Wettst. by Trimethoprim and Bavistin. *Plant Cell Reports*, 25(7), 629-635.
- Ugraiyah, A., Karuppusamy, S. ve Pullaiah, T., 2010. Micropropagation of *Marsdenia brunoniana* Wight and Arn. A Rare Antidiabetic Plant. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 20(1), 7-12.
- Upadhyay, A.R., Mishra, V.K., Pandey, S.K. ve Tripathi, B.D., 2007. Biofiltration of Secondary Treated Municipal Wastewater in a Tropical City. *Ecological Engineering*, 30(1), 9-15.
- Wang, H.M., Chen, Y.J., Yu, H.D. ve Zu, Y.G., 2011. Adventitious Shoot Regeneration from *In Vitro* Stem Explants of *Phellodendron amurense*. *African Journal of Biotechnology*, 10(64), 14024-14028.
- Yang, X., Lu, J., da Silva, J.A.T. ve Ma, G., 2012. Somatic Embryogenesis and Shoot Organogenesis from Leaf Explants of *Primulina tabacum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(2), 213-221.
- Yenice, Z., 2010. Geçici Daldırma Sistem Biyorektörlerle Su Mercimeği (*Lemna minor* L.) Bitkisinin *In Vitro* Çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü*, Ankara.
- Yücel, A.Z., 2008. Farklı Kolkisin Dozlarının Akvaryum Bitkisi Gül (*Ludwigia repen* Forster)'de Kromozom Katlanmasına Etkileri. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

- Yusnita, S., Geneve, R.L. ve Kester, S.T., 1990. Micropropagation of White Flowering Eastern Redbud (*Cercis canadensis* var. *alba* L.). *Journal of Environmental Horticulture*, 8(4), 177-179.
- Zhou, C.F., An, S.Q., Jiang, J.H., Yin, D.Q., Wang, Z.L., Fang, C., Sun, Z.Y. ve Qian, C., 2006. An *In Vitro* Propagation Protocol of Two Submerged Macrophytes for Lake Revegetation in East China. *Aquatic Botany*, 85(1), 44-52.
- Zimmelsa, Y., Kirzhnera, F. ve Kadmon, A., 2009. Effect of Circulation and Aeration on Wastewater Treatment by Floating Aquatic Plants. *Separation and Purification Technology*, 66(3), 570-577.
- Zuraida, A.R., Nurul Shahnadz, A.H., Harteeni, A., Roowi, S., Che Radziah, C.M.Z. ve Sreeramanan, S., 2011. A Novel Approach For Rapid Micropropagation Of Maspine Pineapple (*Ananas Comosus* L.) Shoots Using Liquid Shake Culture System. *African Journal of Biotechnology*, 10(19), 3859-3866.
- Zurayk, R., Sukkariyah, B. ve Baalbaki, R., 2001. Common Hydrophytes As Bioindicators of Nickel, Chromium and Cadmium Pollution. *Water, Air and Soil Pollution*, 127(1-4), 373-388.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Muhammet DOĞAN
Doğum Tarihi ve Yer : 21.03.1988/ Yüreğir
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0(338) 226 20 00/ 3831
e-mail : mdogan@kmu.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Yıl
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2013
Lisans	Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Abdulkadir Paksoy Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2011-Devam etmektedir	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü	Araştırma Görevlisi

SCI/SCIE Makaleler

1. Karatas, M., Aasim, M., **Dogan, M.**, ve Khawar, K.M., 2013. Adventitious Shoot Rejuvenation of the Medicinal Plant Water Hyssop (*Bacopa monnieri* L. Pennell) Using Different Internodes. *Archives of Biological Science, Belgrade*, 65(1), 297-303.

Projeler

Proje ismi	Finansman Kurumu	Proje tipi	Proje no:	Tarihi	Pozisyon	Süreç
Bazı Akvaryum Bitkilerinin <i>In Vitro</i> Koşullarda Mikroçoğaltımı	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi	BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri)	50-M-12	Eylül 2012	Araştırmacı	Devam ediyor
Bazı Akvaryum Bitkilerinin Doku Kültürü ile Çoğaltımı	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi	BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri)	32-M-12	Haziran 2012	Araştırmacı	Devam ediyor
<i>Azolla anabaena</i> Bitkisinde Doku Kültürü Çalışmaları	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi	BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri)	31-M-12	Mayıs 2012	Araştırmacı	Devam ediyor

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Özeti Basılan Bildiriler

1. Karataş, M., **Doğan, M.**, Aasim, M. ve Khawar K.M., 2012. *In Vitro* Koşullarda *Bacopa monnieri* (L.) Pennell Bitkisinin Çoğaltımı. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, 15-18 Kasım, 2012- Antalya, Türkiye. Sayfa No:74.
2. Karataş, M., **Doğan, M.**, Çiftçioğlu, M. ve Aasim, M., 2012. Tilki Kuyruğu (*Ceratophyllum demersum* L.) Bitkisinde Sterilizasyon Çalışmaları. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, 15-18 Kasım, 2012- Antalya, Türkiye. Sayfa No: 139.
3. Karataş, M., **Doğan, M.** ve Aasim, M., 2012. Türkiye’de Akuatik Bitkilerin Biyoteknolojisi. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, 15-18 Kasım, 2012-Antalya, Türkiye. Sayfa No: 141.
4. Karataş, M., Çiftçioğlu, M., **Doğan, M.** ve Aasim, M., 2012. *Rotala* [*Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. Ex Roxb.) Koehne] Bitkisinin Doku Kültürü ile Çoğaltımı. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, 15-18 Kasım, 2012-Antalya, Türkiye. Sayfa No: 151.

5. Karataş, M., Çiftçioğlu, M., **Doğan, M.** ve Aasim, M., 2012. Su Bitkilerinin Üretim Tekniklerine Genel Bakış. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, 15-18 Kasım, 2012-Antalya, Türkiye. Sayfa No: 140.
6. 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.