

***İN VİTRO* KOŞULLARDA ROTALA [*Rotala rotundifolia*
(Buch-Ham. ex Roxb) Koehne] BİTKİSİNİN ÇOĞALTIMI**

Muzaffer ÇİFTÇİOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Hidrobiyoloji Programı

Prof.Dr. Mehmet KARATAŞ

Ocak-2013

T.C
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİTRO KOŞULLARDA ROTALA [*Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb)
Koehne] BİTKİSİNİN ÇOĞALTIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muzaffer ÇİFTÇİOĞLU

Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Programı : HİDROBİYOLOJİ

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Mehmet KARATAŞ

KARAMAN-2013

TEZ ONAYI

Muzaffer ÇİFTÇİOĞLU tarafından hazırlanan “*In Vitro* Koşullarda *Rotala* [*Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne] Bitkisinin Çoğaltımı” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Prof.Dr. Mehmet KARATAŞ

Juri Üyeleri

İmza:

Prof.Dr. Mehmet KARATAŞ

(Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)

Prof. Dr. Khalid Mahmood Khawar

(Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü)

Yrd. Doç.Dr. Muhammad Aasım

(Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)

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

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof.Dr. Fevzi KILIÇEL
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Muzaffer ÇİFTÇİOĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***İN VİTRO* KOŞULLARDA *Rotala* [*Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne] BİTKİSİNİN ÇOĞALTIMI**

Muzaffer ÇİFTÇİOĞLU

**Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

Ocak, 2013, 50 sayfa

Rotala rotundifolia bitkisi akvaryumlarda kullanılan ve fazla bakıma ihtiyaç gerektirmeyen bir süs bitkisidir. Akvaryumlarda uyum sorunu olmayan, aşırı nitratı sevmeyen ve yüksek ısılara dayanıklı olup yüksek ışıkta kırmızı renge dönen akuatik bir bitkidir. *R. rotundifolia* 'nın *in vitro* çoğaltımı için yaprak, sürgün ucu, birinci koltukaltı ve ikinci koltukaltı meristemlerinin BAP, TDZ, Kinetin ve GA₃ içeren sıvı ve agarla katılaştırılan MS ortamda kültüre alınmıştır. Sürgün ucu eksplantlarından 0,20 mg/l BAP ve 0,20 mg/l GA₃'de sıvı kültür ortamında, eksplant başına 26 sürgün elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu ise 5,9 cm olarak kaydedilmiştir. TDZ'nin kullanıldığı MS ortamda da sürgün ucu eksplantından sıvı kültür ortamına göre daha fazla sürgün elde edilmiştir. Sürgün ucu eksplantından 0,05 mg/l TDZ' nin kullanıldığı MS ortamda, 1,87 cm uzunlukta eksplant başına 59,67 sürgün meydana gelmiştir. Sıvı kültür ortamı daha uygun bulunmuştur. *In vitro* çoğaltımla meydana gelen 4-5 cm uzunluğundaki sürgünler farklı pH'larda (4-10) kültüre alınmıştır. Dört hafta sonra, pH 8-9 'daki bitkilerde en fazla büyüme gözlenmiş olup, rejenerasyon ortamı bakımından bu ortamın en uygun olduğu kaydedilmiştir. pH 4'teki ortamda bulunan tüm bitkiler ölmüştür.

Anahtar Kelimeler: Çoğalma, *In vitro*, *Rotala* sp.

ABSTRACT

Ms Thesis

***In vitro* PROPAGATION of *Rotala* [*Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb)
Koehne] PLANTS**

Muzaffer ÇİFTÇİOĞLU

Department of Biology

Institute of Science

Karamanoğlu Mehmetbey University

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

January, 2013, 50 pages

Rotala rotundifolia is used in aquariums as an ornamental plant that do not require much maintenance. The plant does not have harmony issues in aquariums, they does not like excessive nitrate, are resistant to high temperatures and turn to red colour under high light intensity. *R. rotundifolia* was micropropagated under in vitro conditions using leaf, shoot tip, the first and second nodes on liquid and agar solidified MS medium containing BAP, TDZ, Kinetin and GA3. Shoot tip explants cultured on MS medium containing 0.20 mg/l BAP and 0.20 mg/l GA3' in liquid culture MS medium induced 26 shoots per explant with mean shoot length of 5,9 cm. More shoots were induced on agar solidified MS medium containing TDZ compared to TDZ shoots induced on MS medium in liquid culture. It was noted that Shoot tip eksplants on MS medium containing 0,05 mg/l TDZ induced 1.87 cm long 59.67 shoots per explant. Liquid culture medium was found more appropriate. Micropropagated shoots were cultured on MS medium at different pH (4-10). Four weeks later, the plants maintained at pH 8-9, showed the most vigorous growth and this pH was found as the most optimum for acclimatisation. However, all plants maintained at pH 4 were dead.

Key words: Multiplication, *In vitro*, *Rotala* sp.

ÖN SÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim süresince yardımlarından dolayı danışmanım Sayın Prof.Dr. Mehmet KARATAŞ'a, çalışmalarım sırasında her türlü desteği vererek beni yönlendiren Sayın Yrd. Doç.Dr. Muhammad Aasım'a teşekkürlerimi arz ederim.

Muzaffer ÇİFTÇİOĞLU

Ocak,2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖN SÖZ	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	6
3.MATERYAL ve YÖNTEM	14
3.1.1. Materyal	14
3.1.2. Bitki Materyali	14
3.1.3. Rejenerasyon İçin Kullanılan Eksplantlar	14
3.2. Büyüme Düzenleyicilerinin Çözücüler ve Saklama Koşulları	14
3.2. Yöntem	15
3.2.1. Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları	15
3.2.2. <i>Rotala rotundifolia</i>'nın Yüzey Sterilizasyonu	16
3.2.3. Eksplant İzolasyonu ve Kültüre Alınması	16
3.2.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	16
4.ARAŞTIRMA BULGULARI	17
4.1. Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu	17
4.2. <i>Rotala</i> Bitkisinde Sürgün Rejenerasyonu Çalışmaları	19
4.2.1. Farklı BAP Konsantrasyonlarının Yaprak Eksplantından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri	19
4.2.2. Farklı BAP İçeren MS Ortamdaki Sürgün Rejenerasyonundan Sonra Elde Edilen Kalluslaşmış Eksplant Kalıntılarının GA₃ İçeren MS Ortamda Yeniden Sürgün Rejenerasyonu	21
4.3. Farklı TDZ Konsantrasyonlarının Sürgün ucu Eksplantından Sürgün Rejenerasyonu	23
4.4. Farklı BAP Konsantrasyonlarının Sıvı MS Ortamda Sürgün ucu, 1. koltukaltı, 2. koltukaltı Eksplantından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri	25
4.5. Farklı Kinetin Konsantrasyonlarının Sıvı MS Ortamda Sürgün ucu Eksplantından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri	26

4.6. Farklı BAP ve GA₃ Konsantrasyonlarının sıvı MS Ortamda Sürgün ucu Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri.....	28
4.7. <i>İn vitro</i> koşullarda geliştirilmiş bitkilerin adaptasyonu için en uygun pH aralığının belirlenmesi	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	31
5.1.Sonuç.....	36
5.2.Öneriler.....	36
6. KAYNAKLAR.....	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1 :	<i>Rotala rotundifolia</i> 'nın sistematikteki yeri.....	3
Çizelge 3.1 :	Murashige ve Skoog (1962), ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları.....	14
Çizelge 3.2 :	Kullanılan büyümeyi düzenleyiciler ve çözücüleri.....	15
Çizelge 4.1:	Farklı konsantrasyonlarda ve sürede uygulanan hidrojen peroksit'in üç çeşit eksplantta bulaşıklık etkisine ait varyans analizi.....	17
Çizelge 4.2 :	Hidrojen peroksit'in farklı konsantrasyon ve sürelerin <i>R. rotundifolia</i> bitkisinin uç meristem, 1. koltukaltı meristem ve 2. koltukaltı meristem eksplantların yüzey sterilizasyon ile ilgili sonuçları.....	18
Çizelge 4.3 :	Farklı BAP konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna ait varyans analizi sonuçları.....	20
Çizelge 4.4 :	Farklı BAP konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna etkisi.....	20
Çizelge 4.5 :	Farklı BAP içeren MS ortamdaki sürgün rejenerasyonundan sonra elde edilen kalluslaşmış eksplant kalıntılarının GA ₃ içeren MS ortamda yeniden sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları.....	22
Çizelge 4.6 :	Farklı BAP içeren MS ortamdaki sürgün rejenerasyonundan sonra elde edilen kalluslaşmış eksplant kalıntılarının GA ₃ içeren MS ortamda yeniden sürgün rejenerasyonuna ait Duncan testi sonuçları.....	22
Çizelge 4.7 :	Farklı TDZ konsantrasyonlarının sürgünucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna ait varyans analizi.....	24
Çizelge 4.8 :	Farklı TDZ konsantrasyonlarının sürgünucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna etkisi.....	24
Çizelge 4.9 :	Farklı BAP konsantrasyonlarının MS sıvı ortamda sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna ait varyans analizi	25
Çizelge 4.10 :	Farklı BAP konsantrasyonlarının MS sıvı ortamda sürgünucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna etkisi.....	26
Çizelge 4.11:	Farklı kinetin konsantrasyonlarının sürgün ucu,1. koltukaltı ve 2. koltukaltı eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları.....	27
Çizelge 4.12:	Farklı kinetin konsantrasyonlarının sürgünucu,1. koltukaltı ve 2. koltukaltı eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait Duncan testi sonuçları.....	27
Çizelge 4.13 :	Farklı BAP ve GA ₃ konsantrasyonlarının sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna ait varyans analizi sonuçları.....	28

Çizelge 4.14 : Farklı BAP ve GA₃ konsantrasyonlarının sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait Duncan testi sonuçları.....

29

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 :	Akvaryum koşullarında yetiştirilen <i>Rotala rotundifolia</i> bitkisi.....	3
Şekil 4.1:	H ₂ O ₂ ile muamele edilen eksplantların üzerinde bulaşık görünümü.....	18
Şekil 4.2:	<i>R. rotundifolia</i> bitkisinin yaprak eksplantlarından sürgün Rejenerasyonu.....	19
Şekil 4.3:	<i>R. rotundifolia</i> bitkisinde GA ₃ içeren ortamında sürgünlerin büyümesi.....	21
Şekil 4.4:	<i>R. rotundifolia</i> bitkisinin sürgün ucu eksplantlarından MSO ortama aktarıldıktan iki hafta sonra kallus üzerinde sürgün uçlarının oluşumu.....	23
Şekil 4.5:	<i>R. rotundifolia</i> bitkisinin sıvı BAP ortamda sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonu.....	25
Şekil 4.6:	<i>R. rotundifolia</i> bitkisinin <i>in vitro</i> koşullarda adaptasyon çalışmaları (a,b,c) köklendirilmiş bitkiler.....	30

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
BAP	6 Benzylaminopurine
Ç.S.	Çamaşır Suyu
g, mg, µg	Gram, Miligram, Mikrogram
GA ₃	Giberellik Asit
TDZ	Thidazuron (1 Phenyl 3-(1, 2, 3-thidiazol 5yL) urea)
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
IBA	Indol Butirik Asit
IAA	Indol-3-Asetik Asit
K.O.	Kareler Ortalaması
l, ml, µl	Litre, Mililitre, Mikrolitre
µM	Mikro Molar
cm	Santimetre
MS	Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
MSO	Hormonsuz Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
NAA	α- Naftalen Asetik Asit
NaOCL	Sodyum Hipoklorit
NaOH	Sodyum Hidroksit
N	Normal

1. GİRİŞ

Okyanus, deniz ve tatlı sulardaki hayatın, enerji ve oksijen döngüsünün en önemli unsuru muhakkak ki birincil üreticiler olan su bitkileridir. Bu canlılar bir hücreliden çok hücreliye kadar çeşitlilik gösterir. İçerdikleri klorofil sayesinde organik madde sentezleyip bitkisel protein kaynağını oluştururlar. Aynı zamanda fotosentezle meydana getirdikleri oksijen, sulardaki çözünmüş oksijenin önemli bir kısmını teşkil eder (Cirik ve ark., 2011).

Su bitkileri ve diğer su ürünleri insanoğlunun vazgeçilmez besin kaynağını teşkil etmekle birlikte çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Örneğin, Uzak Doğu ve Amerika'da insan gıdası olarak kullanılmakta ve sektörel olarak üretilmektedir (Mitchhell, 1974). Özellikle Çin'de su kestanesine benzer bir tür olan *Eleocharis dulcis* sulak alanlarda pirinçle dönüşümlü olarak yetiştirilir. Su teresi ve su kestanesi de önemli besin kaynaklarıdır. Su bitkileri, kanalizasyon ve atık su sistemlerinde sıvı atıklarından ağır metallerin ayrılmasında biyolojik arıtma vazifesi görürler. Bu bitkilerden elde edilen lifler yalıtkan malzemesi ve fiber tahta gibi daha kaba ürünlerin yapımında kullanılmaktadır. Kuru ağırlık esas alındığında içerisindeki protein miktarının yonca bitkisinden fazla olması hayvan beslenmesinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca park ve bahçelerin peyzajlarında ve akvaryumlarda süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Mitchell 1974, Cirik ve ark., 2011).

Akvaryum bitkileri sağladıkları güzel görünüş yanında, bir akvaryumda canlılar arası dengenin oluşturulmasında vazgeçilmezdir. Bitkiler sudaki karbondioksiti solunumla alarak oksijen üretirler ve balıklar için elzem olan oksijen üretiminde önemli rol oynarlar. Balıklar tarafından bırakılan artıkları kökleri ile alarak akvaryum suyunun bozulmasına engel olurlar. Diğer yandan, akvaryum bitkileri küçük balık ve yavruların saklanabileceği bir ortam oluştururlar (Alpbaz, 1984). Balıklar yaşamlarının başlangıcından itibaren bitkilerle sıkı ilişki içerisinde dirler. Balıklara doğal ortamlarındaki gibi bir akvaryum hazırlanırken, mutlaka bitkilerde bulunmalıdır (Seçer, 2002).

Dünyada, akvaryum bitkileri açısından önemli bir pazar vardır. Akvaryum bitkileri pek çok tropikal bölgeden bitki toplanarak ithalat yapılmakla beraber yetiştiricilik yoluyla yapılan ticarete akvaryum sektörü içerisinde önemli bir yer tutar.

Avrupa ülkelerinde son 10 yılda görülen akvaryum bitkileri yetiştirme çalışmaları sonucu tropik ülkeler olan Singapur, Malezya, Sri Lanka, Tayland, Malezya, Kamerun, Madagaskar, Avustralya ve hatta bir Avrupa ülkesi olan Macaristan`dan yapılan ithalatta azalma olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeni olarak; Avrupa ülkelerinde yapılan yetiştiricilikte tamamen bilgisayar kontrollü üretim tesislerinin kurulması ve bu yolla üretilen üstün kalitedeki bitkilerin çok kolay pazar bulması şeklinde açıklanabilir. Almanya, Hollanda ve Danimarka`da su kaynaklarında kurulan seralarda önemli miktarlarda akvaryum bitkisi yetiştirildiği bildirilmektedir. Hollanda`daki üretim tesislerinde 240 çeşit bitki türü yetiştirilerek piyasaya sunulmaktadır. Hollanda`dan yılda 2-3 milyon dolar tutarında akvaryum bitkisi ithal edildiği bildirilmektedir (Hekimoğlu, 2006).

Türkiye`de su bitkileri yetiştiriciliği konusunda gelişmeler yeterli olmamakla beraber, bu bitkilerin yoğun üretimine yönelik çalışmalar daha çok amatörce ve düşük miktarlarda yapılmaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmalar içerisinde kısa zamanda daha verimli ve kontrollü üretimin yapıldığı farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en önemlisi *in vitro* üretimdir. Doku kültürü tekniklerini kullanarak yapılan çoğaltım (mikro üretim) günümüzde, dünyada özellikle süs bitkilerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Rotalla rotundifolia (Şekil 1) bitkisi akvaryumlarda kullanılan ve fazla bakıma ihtiyaç gerektirmeyen bir süs bitkisidir. Akvaryumlarda uyum sorunu olmayan, aşırı nitratı sevmeyen ve yüksek ısılarla dayanıklı olup yüksek ışıktaki kırmızı rengine döner. Işığın şiddetine bağlı olarak yaprakları özellikle yüksek ışıktaki kırmızı düşük ışıktaki pembe ve yeşil tonlarına döner. Low-Tech akvaryumlarda da tercih edilir. Fakat High-Tech akvaryumlarda büyüme hızı artacağından budamak gerekebilir.



Şekil 1. Akvaryum koşullarında yetiştirilen *Rotala rotundifolia* bitkisi

Rotala bitkisi çizelge 1'de belirtildiği gibi Lythracea familyasına ait Asya orjinli tek yıllık veya çok yıllık bir bitkidir. Derin olmayan sularda ve su kenarlarında gelişim gösterir. Bu türün kırmızı ve yeşil olmak üzere iki rengi bulunması nedeniyle yerel olarak "yeşil ve kırmızı rotala" olarak adlandırılmaktadır. Bu bitki, pH 5 ile 7 aralığında, çok yumuşak sulardan çok sert sulara kadar geniş bir sertlik toleransı bulunan sularda gelişim göstermektedir. Durgun, bol ışıklı ortamlarda ortalama 25-55 cm boyutlarına ulaşmaktadır.

Çizelge 1.1 *Rotala rotundifolia*'nın sistematikteki yeri (Anonim, 2008)

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

Türkiye'de uzun yıllardan beri akvaryum bitkileri ticari olarak büyük oranda satılmaktadır. Geçmişte önem gösterilmeyen ve büyük oranda dışa bağımlı olan akvaryum bitkileri ticareti, farklı yöntemlerin kullanılmasıyla birlikte gelişime açık bir üretim kolu haline gelecektir. Gelecekte bu yöntemle üretilen bitkilerle ilgili farklı gelişmeler sayesinde yeni iş kollarının doğabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın temel amacı, ticari öneme sahip akvaryum bitkisi *Rotala rotundifolia*'nın seri şekilde hızlı çoğaltımı gerçekleştirmektir. Bu sayede hem yurt dışına döviz çıkışını önlenmesi hem de bitkinin yerel kaynaklardan yeterli miktarda üretiminin sağlanmasıdır.

Akvaryum Bitkilerini Yetiştirme Teknikleri

Akvaryum bitkilerini yetiştirme tekniklerinden biriside eşeysel üretimdir. Bunun için ya ya suni polenleme ya da tohum kullanılır. Suni yolla döllenmeyi gerçekleştirebilmek için kendine kısır bir bitkinin tohumları kullanılabilir. Vejetatif yolla üreyememiş bir bitkinin çiçeğindeki polenler, bir fırça ile diğer bitkinin çiçeğine taşınabilir. Tohumların çimlendirilmesi yoluyla da üretim yapılabilir. Bu yöntem daha çok vejetatif üretimlerinde sorun bulunan bitkilerde uygulanmaktadır. İkinci üretim şekli ise eşeysiz üretimdir. Bunun için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bitkide oluşan küçük filizler kesilerek tepe kısmı yukarıya gelecek şekilde toprağa dikilir ve yeni bitkiler elde edilir. Bazı bitkilerde rizom yeni bir yavru bitki oluşturur. Yavru zamanla sürgün verir ve yeni bir bitki meydana gelir. Bu bitkiler birbirinden ayrılarak pekçok yeni bitki elde edilebilir. Bazı türlerde de bitkinin çiçek sapında köklü yavru bir bitki oluşur. Diğer bir yöntemde, büyüme rizomu bulunan bitkilerin rizomlarının küçük parçalar şeklinde kesilip su bulunan bir kaba yerleştirilmesi ve yeni bitkilerin elde edilmesidir. Bazı bitkilerde de yeni bitki elde etmek için yapraklar kullanılır. Kullanılan yöntemlerden biri de, ana bitkinin kesilerek üretimidir. Boğum bölgesi bulunan bitkilerde boğum bölgesinden kesim yapılarak toprağa dikilir ve yeni bireyler elde edilir (Cirik ve ark., 2011).

Ülkemizde, gelişmiş sucul kreşlerde seri üretime yönelik çalışmaların yapılması bu alanda bir çığır olarak karşımıza çıkacaktır.

Doku Kùltùrleriyle Hızlı oğaltım

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

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

Doku kùltùrleri ile vegetatif üretimin esası sürgün meristemlerinin oluşmasını ve çoğalmasını sağlamaktır. Bir bitkinin vegetatif olarak çoğaltılması, koltuk altı (axillary) ve adventif olmak üzere iki şekilde bulunan sürgün meristemlerinin oluşumuna bağlıdır. Sürgün ucu ve koltukaltı meristemleri izole edilerek kùltüre alınır. Gelişmiş bitkilerin çoğunda, her yaprağın koltuğunda bir meristem (axillary meristem) bulunmaktadır. Ana uç meristemlerinin bir kopyası olan bu meristemler, lateral sürgün veya dal meydana getirme potansiyeline sahiptir (Gönùřen, 1987). Bu sistem, meristem sayılarının artırılması bakımından önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Mikro üretimde bu özellikten yararlanılmaktadır. Örneğin; büyümeyi düzenleyiciler içermeyen bir ortamda kùltüre alınan sürgün uçları, dallanmadan tek bir sürgün şeklinde gelişmektedir (Gönùřen ve Özcan 1983). Oysa sitokin içeren gıda ortamında kùltüre alındığında, sürgün uçları çok sürgünden oluşan küçük bir demet şeklinde gelişmektedir. Besi ortamında sitokin bulunması, kök oluşumunu genelde engellemektedir. Bu nedenle sürgün sayısının çoğaltılması arzu edildiği sürece gıda ortamında bulunması istenen sitokin, kök oluşumu istendiğinde ortama ilave edilmemelidir. Sürgünler köklendirmek için bitkinin özelliğine göre ya sitokininsiz ya da köklenmeyi uyarıcı büyümeyi düzenleyicileri içeren bir besi ortamına transfer edilir.

1. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

Jenks ve ark., (1990), Su zambak bitkisinde *in vitro* bitki rejenerasyonu çalışmasını yapmışlardır. Yaprak (Epiphyllous bitki) eksplantı 30 dk çeşme suyunda tutulduktan sonra 90 sn % 50 etanolle muamele edilmiş ve 5 dk durulama yapılmıştır. Daha sonra 12 dk % 1,31'lik NaOCl ve Tween-20 (2d/100ml) ile 5 dk muamele edildikten sonra üç kere durulanmıştır. Besi ortamı olarak üç ortam kullanılmıştır. Birinci ortam; MS ve 0,56 µM myo-inositol, 1,2µM thiamin- HCl ve 10µM 2 İP ve 3µM IAA ve 87,6 µM sukroz İkinci ortam; Birinci ortama % 0,8 agar ilave edilmiştir. Üçüncü ortam; MS+0,56 µM myo-inositol, 1,2µM thiamin-HCl ve 3µM TDZ ve 3µM IAA ve 87,6 µM sukroz. Kültür tüpleri 150x25 mm kullanılmış, 25 + 2 °C'de 16 saat fotoperyot uygulanmış ve polypropilen membran raflar kullanılmıştır. En iyi sonuç üçüncü ortamdan ve bitki başına ortalama 8 adet yaprak elde edilmiştir.

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

Bird ve ark., (1993), su bitkisi *Ruppia maritima'yı in vitro* koşullarda kültüre almışlardır. Rizom oluşumunun, saf su ya da % 0,5 deniz suyu ile hazırlanmış yarım kuvvette MS ortamında, % 0,10, % 0,15 ve % 0,20 deniz suyu kullanımına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. % 0,5 ve % 0,10 deniz suyu içeren ortamda yüksek oranda köklenme elde edilmiştir. Beton tanklarda, bitkilerin adaptasyonu için akan deniz suyu kullanmışlar ve *ex vitro* koşullarda direkt köklenme ve % 100 başarı elde etmişlerdir. Böylece bitkinin *in vitro* koşullarda çoğaltılabileceğini göstermişlerdir.

Bird ve Smith (1994), deniz yosunu *Halophila engelmannii*'nin koltukaltı meristemini kullanarak doku kültürü çalışmaları yapmışlardır. Aynı kültür kabında iki ortam kullanmışlardır. Alt kısma % 0,8 agar içeren katı ortam, bunun üst kısmında sıvı besi ortamı konmuştur.

Katı ortamda inorganik besin maddeleri, bitki büyüme düzenleyicileri, % 1 sukroz ve aktif karbon içeren suni deniz suyu kullanılmıştır. Sıvı ortam ise suni deniz suyu ve inorganik besin maddeleri içermiştir.

Ortamda azot kaynağı olarak nitrit kullanıldığında, koltukaltı meristemden gelişen bitkilerde ölüm görülmüştür. En iyi gelişme, azot kaynağı olarak 3,4 µM GA₃ kullanıldığında elde edilmiştir. En fazla sürgün oluşumu 0,25 mg/l NAA ve 10 mg/l BAP içeren ortamda gözlenmiştir.

Agrawal ve Ram (1995), su kestanesi (*Trapa sp.*)'nin *in vitro* çimlenmesi ve mikro çoğaltımı konusunda çalışmışlardır. Yüzey sterilizasyonundan sonra embriyolar NBS (Nitsch'in temel yarı katı ortamı) ortamına yerleştirilerek bitkiler elde edilmiştir. Bu filizlerden sürgün ucu ve nodal kısımlar alınarak NBL (Nitsch'in temel sıvı ortamı) ortamında kültüre alınmıştır. Rejenere olan sürgülerden alınan eksplantlar çeşitli bitki büyüme düzenleyici bulunan NBL ortamına yerleştirilmiş ve sürgün uzunluğu, dallanma, nod sayısı ve kök gelişimi gibi özellikler incelenmiştir. Oksin axillary tomurcuk üretimini engellemiş ancak yeşil kök oluşumunu artırmıştır. Absisik asit genç yaprak gelişimini engellemiştir. BAP (1-6 µM) axillary dal üretimini artırmada çok etkili olmuştur. Bu dallar NBL'ye transfer edildiğinde gövde uzaması ve köklenme görülmüştür.

Taylor ve ark., (1998), *Piper methysticum* bitkisinin doku kültürü çalışmasında endojen bulaşıklığın büyük bir sorun olduğunu bildirmişlerdir. Seradan alınan bitkilerin benomil ve rifampicin ile muamelesi sonucu kontaminasyonun önüne geçilemediğini rapor etmişlerdir. Bir diğer uygulama da, ayrı ayrı birkaç çeşit antibiyotik kültür ortamına ilave edilmesinden sonra 3-5 hafta hiç kontaminasyon çıkmamasına rağmen daha sonra kontaminasyonun tekrar meydana geldiğini gözlemişlerdir. Kontamine olmayanlar yeni bir ortama aktarılırken kontamine olanlara ikinci bir yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Az sayıda bitkiyi kurtarabildiklerini bildirmişlerdir.

Guillermo ve ark., (1999), *Nothofagus leoni Espinosa* çeşidinde mikroçoğaltım çalışması yapmışlardır. Eksplantlara ilk önce 0,55 µM BAP uygulanmıştır. Sonraki iki alt kültürde BAP içermeyen ortamlarda çoğaltım yapılmıştır. Eksplantlar üzerinde kallus oluştuktan sonra sürgünler gelişmiştir. Sürgünler 1,23 µM IBA muamelesi ile % 91,4 oranında başarı ile köklendirilmiştir. Bitkilerde ilk köklenme onbirinci günde gözlenmiştir.

Kane ve ark., (1999), *Cryptocoryne wendtii*'nin *in vitro* çoğaltımını yapmışlardır. Bitki, yüzey sterilizasyonu için 15 dk çeşme suyunda tutulduktan sonra 12 dk % 1,05'lik NaOCl+Tween- 20 (1d/100ml) ile muamele edilmiştir. Daha sonra 1dk % 50'lik etanol ile 5 dk muamele edildikten sonra üç kere durulama yapılmıştır.

Denemede katı ortam üzerine sıvı ortam ilave edilerek ikili ortam kullanılmıştır. Birinci ortam; MS, 0,56 µM myo-inositol, 1,2 µM thiamin- HCl ve 87,6 µM sukroz, 2,2 µM BA, 0,57 µM I AA; 87,6 µM sukroz ve % 0,8 agar, ikinci ortam; MS, BA (0-25µM), IAA (0-10 µM). Sürgün ucu, katı ortama yerleştirilmiştir. Kültür tüpleri (150x25 mm) kullanılmış ve 25°C'de 16 saat fotoperiyot uygulanmıştır. En fazla sürgün oluşumu 20 µM BA bulunan ortamdan elde edilmiştir. Topraksız besi ortamında (MetroMix 500) % 100 köklenme sağlanmış ve bitkilerin tamamı seraya adapte olmuştur. Bitkinin aktarılmasından sekiz hafta sonra yüksek kaliteli satışa hazır bitkiler elde edilmiştir.

Jenks ve ark., (2000), çeşit seleksiyonu ve mutasyon ıslah çalışmalarında kullanmak amacıyla süs ve su bitkisi olan *Nymphoides indica*'da yaprak sapı eksplantından sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. BAP ya da Kinetin(0-25 µM), 2-IP ile IAA veya NAA (0-25 µM) optimize edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonunu (% 80) ve eksplant başına sürgün sayısını (11,5 adet), 0,56 µM myo-inositol, 1,2µM thiamine-HCl, 116,8 µM sukroz, 10µM BAP, 20µM IAA ve % 0,8 agar içeren MS besin ortamından elde etmişlerdir. Histolojik kesit alınarak aynı eksplantta direkt ve indirekt sürgün organogenesisi ile sürgün rejenerasyonu doğrulanmıştır.

Te-chato ve Lim (2000), *in vitro* gelişen Mangosteen (Uzakdoğu'da yetişen tropik meyveli bir bitki) fidelerinden elde edilen 5-15 mm uzunluğundaki yaprak eksplantını kullanarak bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. MS içeren ortamda 2,22µM BAP ve 2,25µM TDZ kullanarak % 66,8 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallus başına ortalama 4,45 adet sürgün ucu dört alt kültürden sonra elde edilmiştir.

BAP (0,44µM) içeren WPM (Woody Plant Medium) ortamında ortalama eksplant başına 9,3 sürgün elde edilmiştir. Sürgün uzaması için 5-6 sürgün aynı ortamda kültüre alındıktan sonra 0,32µM NAA ve 0,13µM BAP içeren sıvı MS ilave edilmiştir. BAP (1,11µM) ve 0,25 g aktif kömür içeren WPM'da % 68,2 oranında köklenme elde edilmiştir. Bitkiler saksılara aktarılmış ve başarılı bir şekilde adaptasyon sağlanmıştır.

Öztürk (2002), *Ludwigia sp*'nin *in vitro* hızlı çoğaltımı çalışmaları için uç meristemi, birinci, ikinci ve üçüncü-dördüncü koltukaltı meristem eksplantları dört hafta boyunca % 0,8 agar ile katılaştırılan 0,1, 0,2 ve 0,3 mg/l BAP, 0,05, 0,1, 0,15 mg/l ve 0,1 mg/l NAA içeren MS ortamlarında tutulduktan sonra ½ MS ortamına kültüre alınmıştır. En fazla sürgün (12.31 adet/eksplant) uç meristemi ile 0,05 mg/l TDZ ve 0,1mg/l NAA içeren MS besi ortamından elde edilmiştir.

Rejenere olan sürgünler 10–20 mm uzunluğa geldiklerinde kesilerek steril Magenta veya cam kavanozlar (baby jar) içinde ½ MS ortamda köklendirmeye alınmıştır. köklendirilmiş sürgünler daha sonra 24 °C ± 2 °C sıcaklık, pH 7, 12 saat ışık ve 12 saat karanlık fotoperiyodunda akvaryum ortamına adapte edilmiştir.

Moncalean ve ark., (2003), Bu çalışmada, *Actinidia deliciosa* türünün sürgün uçlarını değişik oranda BAP ile muamele ettikten sonra seluloz ile sabitleştirilen MS ortama yerleştirmişlerdir. BAP (4,4µM) ile 30 dk, bir gün, iki gün, otuzbeş gün muamele edilmiş eksplantlardan gelişen bitkilerin yapraklarında Apsisik asit, IAA, Zeatin, Dehidrozeatin Zeatinribosit, Dihidrozeatinribosit, N6 Isopentiladenin, N6 Isopentenil adenosin, oranlarına bakılmıştır. Analizler üç alt kültürden otuzbir gün sonra *ex vitro* koşullarda yapılmıştır. Çalışma sonucunda endogen fitohormonlar ve bitkinin gelişimi arasında bir etkileşim olduğu görülmüştür. En iyi bitkiler 4,4 µM BAP ile bir gün muameleden elde edilmiştir. Bu bitkilerde, diğer bitkilere göre yüksek oranda IAA, sitokininler ve Absisik asit kaydedilmiştir.

Wawrzyn'czak ve Goszczyn'ska (2003), *Dianthus caryophyllus* türünde çalışmışlardır. *D. caryophyllus* (Karanfil-Dianthus) bitkisinin 'Dolce Vita', 'İmpala', 'Domingo', 'Tanga' ve 'Charlotte' çeşitlerinden elde edilen kalemler 24 saat BAP ve Kinetin içeren ortamda bırakılmıştır.

Karanfil çiçeklerinin fazla süre taze kalabilmesi 0,05 veya 0,1 µM Kinetin ve BAP kullanarak sağlanabilmiştir. 'Dolce Vita', 'İmpala', 'Domingo' ve 'Tango' çeşitlerinde 0,05 µM Kinetin veya BAP kullanılarak çiçek ömründe belirgin bir fark gözlenmiştir. Fakat 'Charlotte' çeşidinde 0,05 µM Kinetin, 0,1 µM BAP muamelesi ile çiçek ömrü ve çiçek çapı üzerinde olumlu etki görülmüştür.

Anthony ve ark., (2004), *Leucopocon verticillatus* türünün rejenerasyonu için somatik embriyogenesis ile bir protokol geliştirmişlerdir.

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

Şumlu (2005), Türkiye’de göl ve göletlerde doğal olarak bulunan nilüfer bitkisinin iki türünden biri olan *Nymphaea alba* L. (nilüfer) 'nin *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi ve çoğaltımı amacıyla yapılan araştırmada tohum çimlenmesi % 60 oranında 1 mg l⁻¹ BAP ve 0,1 mg l⁻¹ IAA içeren MS besi ortamında elde edilmiştir. Ancak beş ay sonra tohumların dormansiye girmeleri nedeniyle, tohumla yapılan çalışmada MSO ortamı ve kağıt filtre köprülerine değişik oranlarda GA₃, KNO₃ ve TDZ ilave edilerek dormansinin kırılmasına çalışılmıştır. Yalnız değişik oranlarda TDZ’li sıvı ortamlarda kağıt filtre köprüleri üzerinde çimlenme elde edilmiş olup en fazla çimlenme 0,05, 2,00 ve 4,00 mg l⁻¹ TDZ ilaveli ortamlarda görülmüştür. Aydınlığa (16 saat aydınlık / 8 saat karanlık) göre oda sıcaklığında karanlıkta çimlenen fideliklerde daha fazla boy artışı kaydedilmiştir. TDZ (0,05 mg/l) kullanımı daha ekonomik bulunmuş ve çimlenen tohumlardan elde edilen bitkiler akvaryumlara konulmuştur.

Andrade ve ark., (2006), *Eucalyptus grandis* türünde *in vitro* çoğaltım için yüksek oranda bitki büyüme düzenleyici uygulaması denemişlerdir. BAP’ın 0, 200, 400 ve 600 mg/l oranları 1, 2 ve 3 saat süreyle 3 ve 5, 8 pH derecesinde uygulanmış ve eksplantlar üzerindeki morfolojik etkisi incelenmiştir. Eksplantların her hafta yaş ağırlıkları kaydedilmiştir.

Yirmibir günlük kültürden sonra muamele başına sürgün rejenerasyonu, eksplant başına sürgün rejenerasyonu incelenmiştir. Deneme sonucunda, pH’ın BAP konsantrasyonları ve muamele süresi üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür. En etkili sonuçlar BAP’ın 200 mg/l oranının 1 ve 2 saat muamelesinden elde edilmiştir. Her iki muamele sonucunda bitkinin kortikal parenkima ve prokambiyum hücrelerinde yoğun oranda çoğaltım görülmüştür. Çalışma sonucunda yüksek oranda BAP uygulamasının *E. grandis* bitkisinin çoğaltımı için uygun olduğu görülmüştür.

Micheli ve ark., (2006), *Cryptocoryne beckettii*, *Cryptocoryne lutea* ve *Rotala rotundifolia* 'nın *in vitro* çoğaltımını yapmıştır.

Eksplantlar da sterilizasyon amacıyla %1-1,5 oranında sodyum hipoklorit kullanılmıştır. En iyi çoğaltım 0,5 mg/l NAA ve 1,00-4,00 mg/l BAP içeren LS ortamından (Linsmaier ve Skoog 1965) elde edilmiştir. Her iki BAP konsantrasyonundan 1 mg/l BAP'da diğer ortamlara göre bitkilerde daha fazla kök oluşumu gözlenmiştir. BAP (4 mg/l) içeren ortamlarda fazla sayıda sürgün oluşumu gözlenirken düşük sayıda kök ve kısa kökler tespit edilmiştir. Bitki adaptasyonu için bitkiler organik madde, kil ve kum (%1-1-10) içeriğiyle hazırlanmış akvaryumlara aktarılmıştır.

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

Panigrahi ve ark., (2006), *Hygrophila auriculata* bitkisinin yaprak eksplantlarından BAP ve NAA içeren MS ortamda sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Yaprak eksplantından kallus yoluyla en iyi sürgün rejenerasyonu 2 mg/l BAP ve 0,2 mg/l NAA içeren ortamda görülmüş, 3 cm'den fazla gelişen sürgünler 0,1 mg/l NAA içeren MS ortamda köklendirilmiştir. Elde edilen bitkilerin % 80'i başarıyla toprağa aktarılmış ve adaptasyon sağlanmıştır.

Li ve ark., (2007), Mango bitkisinin kotiledon parçalarını yirmisekiz gün agar içeren ortamda kültüre almışlardır. Eksplantlara ön muamele uygulaması sonraki gelişme üzerinde etkili olmuştur. Bu eksplantlarda kotiledonun sap kısmında adventif kökler oluşmuş, uç tarafında (karşı taraf) hiç kök gözlenmemiştir.

Köklenmede kotiledon yaprağın uzunluğu, IAA ya da IBA ile bir saat muamelenin etkisi olmuştur. Bunun yanısıra eksplantın 2, 3, 5-triiodobenzoic acid (TIBA- antioksin) ile muamelesi adventif kök oluşumunda inhibisyona neden olmuştur. Bunu yanısıra 2700µM NAA ile bir saat muamelede kotiledonların abaksial tarafında köklenme görülmüştür. Histolojik incelemede her iki tip kökün parenkima hücrelerinden olduğu tespit edilmiştir. Fakat kök primordiaların gelişimi değişik olmuştur. Sonuçta oksinlerin polar (kutuplu) taşınması adventif kök oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Fakat NAA'nın etkisi difüzyon ile nüfuz nedeniyle eksenden uzak tarafta kök oluşumuna sebep olmuştur.

Panigrahi ve ark., (2006), *Hygrophila auriculata* bitkisinin yaprak eksplantlarından BAP ve NAA içeren MS ortamda sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Yaprak eksplantından kallus yoluyla en iyi sürgün rejenerasyonu 2 mg/l BAP ve 0,2 mg/l NAA içeren ortamda görülmüştür.

Üç cm'den fazla gelişen sürgünler 0,1 mg/l NAA içeren MS ortamda köklendirilmiştir. Elde edilen bitkilerin % 80'i başarıyla toprağa aktarılmış ve adaptasyon sağlanmıştır.

Şumlu (2009), *Rotala macrandra* Koehne'nin *in vitro* koşullarda çoğaltımı ve gen aktarımı ile ilgili 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 alınmıştır. Ayrıca sıvı MS besisi ortamında sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu (27,33 adet) 1. boğum arası eksplantında 0,25mg/l BAP-0,50 mg/l NAA içeren MS besisi 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 *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend GV2260 P35GUS-INT ve LBA4404 pRGGbar hatları kullanılarak gen aktarım çalışması yapılmıştır. Her iki hatta da değişik oranda GUS pozitif transgenik aday bitkiler elde edilmiştir. Elde edilen tüm rejenere olmuş ve transgenik aday bitkileri akvaryum ortamına adapte edilmiştir. Yenice (2010), bitkinin Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktör ile *in vitro* çoğaltımının yapılması ve kullanılmış bitki büyüme düzenleyicilerin bitkinin protein miktarına etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Su mercimeği (*Lemna minor* L.) bitkisini farklı oranlarda BAP, kinetin ve TDZ içeren şekerli ve şekersiz sıvı MS ortamlarında kültüre almıştır. Mikroçoğaltım için yapılan denemeler 8 saat karanlıkta ve 16 saat beyaz floresan ışığı ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fotoperiyot altında ve $24\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta gerçekleştirmiştir. En fazla bitki çoğaltımı 0,2 mg/l BAP içeren şekersiz sıvı MS ortamında pH 7,23 te görülmüştür. Bu ortamda eksplant başına 50,44 adet bitki kaydetmiştir. Ayrıca 0,05 mg/l 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 hesaplamıştır. Kjeldahl Yöntemi ile yapılan azot tayini çalışmaları sonucunda bitkinin protein değeri %25,5 olarak tespit etmiştir. Hormon uygulaması sonucunda ise 0,5 mg/l BAP ile bitkideki protein oranının %29,18 kadar çıktığı görülmüştür.

Bu tezdeki çalışma amacına ulaşmış ve bitki büyüme düzenleyicilerin geçici daldırma sistem biyoreaktörleriyle çoğaltımın bitki protein miktarına olumlu yönde etkileri belirlenmiştir.

Stanly ve ark., (2011), *C. wendtii* ve *C. beckettii* Thwaites ex Trimen türlerinin sürgün uçlarını kullanarak *in vitro* ortamda çoğaltmak için etkili bir protokol oluşturma çalışması yapmışlardır. Her iki türde de çoklu sürgün oluşumu 0,5 mg/L BA ve 0,2 mg/L IBA içeren sıvı MS ortamında ve agar kullanılmış MS ortamında görülmüştür. Her iki türde de çoklu sürgün oluşumu, kültürün dördüncü haftasından sonra sıvı çoğaltma ortamında görülmüştür. En az çoklu sürgün oluşumu ise dört hafta sonra agar kullanılmış MS ortamında görülmüştür. Ayrıca her iki türden alınan eksplantlarda dördüncü hafta sonunda kök ve yaprak her iki ortamda da gözlenmiştir. Bu çalışmada, %95'in üzerinde adaptasyon sağlanmıştır.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Rotala rotundifolia bitkileri akvaryumcudan temin edilmiş olup, bitki teşhisi ve tür tayini yapılırken Rataj ve Horeman (1997), McInerny ve Gerard (1963), Riehl ve Baensch (1985) ve Cirik ve ark., (2011)' den yararlanılmıştır.

3.1.2. Rejenerasyon İçin Kullanılan Eksplantlar

Denemelerde kullanılan sürgün ucu, yaprak, 1. koltukaltı ve 2. koltukaltı eksplantları *in vitro* MSO besin ortamında dört hafta boyunca gelişen bitki gövdelerinden alınmıştır.

3.2. Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Saklama Koşulları

Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler Merck ve Sigma Aldrich Chemical Co.'dan temin edilmiştir. Büyüme düzenleyiciler uygun çözücülerde çözüldükten sonra standart şekilde istenilen miktarda ve oranda stok solusyonları hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). Büyüme düzenleyiciler ortamlar otoklavda steril edilmeden önce ilave edilmiştir. Hazırlanan büyüme düzenleyicilerin stok solusyonları +4 °C' de iki ay saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Kullanılan büyüme düzenleyiciler ve çözücüler

Büyüme düzenleyiciler	Çözücü	Saklama koşulları (°C)
Oksinler NAA (α -Naftalen asetik asit)	1N NaOH	+4
Sitokininler TDZ (Thidazuron)	%50 etanol	+4
BAP(6-Benzylaminopurine)	1N NaOH	+4
Kinetin	1N NaOH	+4/-20

3.2. Yöntem

3.2.1. Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları

Denemelerde farklı MS (Murashige ve Skoog 1962; Çizelge 3.2) mineral tuz ve vitaminleri ile % 3 sukroz içeren ve % 0.65-0,8'lik agar ile katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır. Sıvı kültür denemelerinde agar ilave edilmemiştir. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmış olup, gereken durumlarda besin ortamına farklı konstrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1N NaOH veya 1N HCl kullanılarak 5,6-5,8'e ayarlandıktan sonra 118 kPa basınç altında ve 120°C'de 20 dk otoklavlanarak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler 16 saat beyaz floresan ışığı veya LED ışığı kullanarak 24±1°C sıcaklıkta tutulmuşlardır.

Çizelge 3.2. 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
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,850
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,250
Vitaminler	Myo-Inositol	100,000
	Nicotinic Acid	0,500
	Pyrotinic Acid	0,500
	Thiamine-HCl	0,100
	Glycine	2,000

3.2.2. *Rotala rotundifolia*'nın Yüzey Sterilizasyonu

Rotala bitkisinde yüzey sterilizasyonu için en iyi sonucun sağlanacağı ve en düşük dezenfektan miktarını belirlemek amacı ile farklı dozlarda H₂O₂ kullanılmıştır. Bitki, %9 ve %12'lik konsantrasyonlarında Hidrojen peroksit ile sırasıyla 5, 7,5 ve 10 dk. yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Yüzey sterilizasyonundan sonra bitki gövdeleri çift distile edilmiş saf suyla 3 x 5 dk durulanmıştır. Steril edilmiş uç, koltukaltı ve yaprak eksplantları, steril petri kapları içerisinde %3 sukroz içeren ve %0,65 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında 24±20°C'de 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır. *Rotala rotundifolia* bitkisinde bulaşıklık oranları bir hafta sonra kaydedilmiştir. Eksplantlar kültür başlangıcından dört hafta sonra gövdeden alınarak izole edilmiştir.

3.2.3. Eksplant İzolasyonu ve Kültüre Alınması

Uç meristemi, birinci, ikinci ve üçüncü koltukaltı meristem eksplantları, *in vitro* yetiştirilen dört haftalık steril bitkilerden elde edilmiştir. Her biri 5-10 mm uzunluğunda parçalara ayrılarak hızlı çoğaltım ortamına konulmuştur. Eksplantlar dört hafta farklı oranlarda BAP ile GA₃ içeren sıvı MS ortamlarda kültüre aldıktan sonra dört hafta boyunca iklim odasında tutulmuştur. Bütün doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde aseptik koşullarda yapılmıştır.

3.2.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirmeleri

Rejenerasyon denemeleri üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çalışmalardan elde edilen veriler bilgisayarda "SPSS 16 for Windows" programı ile faktöriyel deneme desenine göre analiz edilmiştir. Ortamların önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan, LSD testleri veya uygun testler uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu

R.rotundifolia bitkisinin gövdelerinin yüzey sterilizasyonu için eksplantlar hidrojen peroksit'in % 9 ve 12 'lik konsantrasyonda 5, 7,5 ve 10 dk muamele edilmiştir. Çizelge 4.1'de, hidrojen peroksit konsantrasyonları ve sürelerinin üç çeşit eksplant üzerine zarar ve bulaşıklık yüzdelerine ait varyans analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda ve sürede uygulanan hidrojen peroksit'in üç çeşit eksplantta bulaşıklık etkisine ait varyans analizi

V.K	S.D.	Eksplantlar					
		Sürgün ucu		1. Koltukaltı		2. Koltukaltı	
		Bulaşık Oranı					
		V.K.	S.D.	V.K.	S.D.	V.K.	S.D.
Muamele Süresi	5	2187,50	12,60**	2604,17	9,37**	3229,17	18,60**
Hata	8	173,61	-	277,78		173,61	
Toplam	11	-	-	-	-	-	-

**p<0,01 düzeyinde önemli

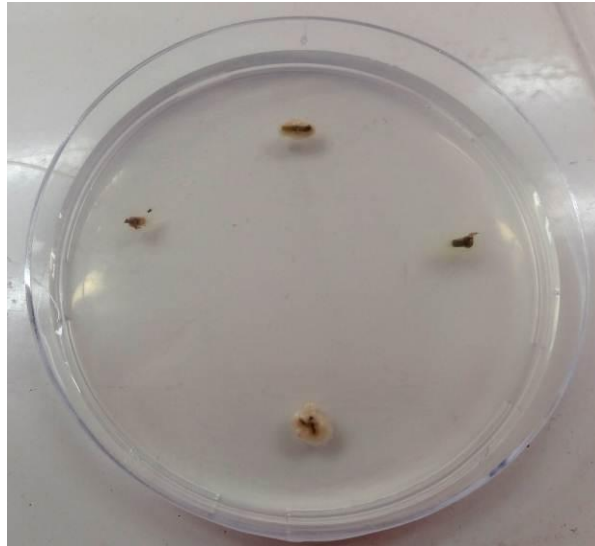
Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi bulaşık oranları bakımından sürgün ucu, 1. ve 2. koltukaltı meristem eksplantları ile muamele süreleri arasında 0,01 düzeyinde önemli bir farklılık tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Hidrojen peroksit'in farklı konsantrasyon ve sürelerin *R. rotundifolia* bitkisinin uç meristem, 1. koltukaltı meristem ve 2. koltukaltı meristem eksplantlarına yüzey sterilizasyonu ile ilgili sonuçları

H ₂ O ₂ ile Muamele		Eksplant		
		Uç meristemi	Birinci koltukaltı meristemi	İkinci koltukaltı meristemi
Oran (%)	Süre (dk)			
9	5	100,00 ^{a*}	100,00*	100,00 ^{a*}
9	7,5	58,33 ^b	75,00 ^{ab}	58,33 ^{ab}
9	10	50,00 ^{bc}	50,00 ^{ab}	50,00 ^b
12	5	50,00 ^{bc}	58,33 ^{ab}	66,67 ^{ab}
12	7,5	41,67 ^{bc}	41,67 ^b	50,00 ^b
12	10	25,00 ^c	25,00 ^c	25,00 ^c

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

Çizelge 4.2.'de görüldüğü gibi her üç eksplant çeşidinde de en az bulaşık oranı (%25,00) %12'lik hidrojen peroksit ile 10 dk muamele edilen eksplantlardan elde edilmiştir. Hidrojen peroksit'in %9'luk oranı ile 5 dk muamele ile elde edilen tüm eksplantlarda bulaşık görülmüştür.

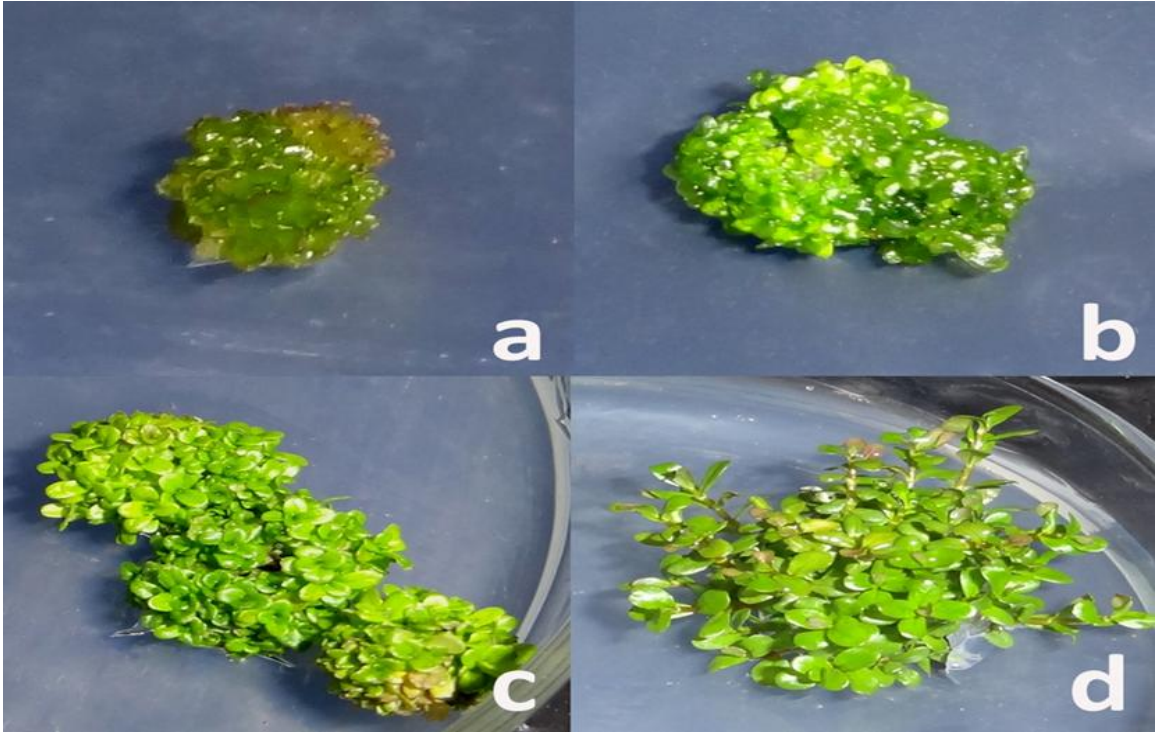


Şekil 4.1. H₂O₂ ile muamele edilen eksplantların üzerinde bulaşık görünümü

4. 2. Rotala Bitkisinde Sürgün Rejenerasyonu Çalışmaları

4.2.1. Farklı BAP Konsantrasyonlarının Yaprak Eksplantından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri.

R. rotundifolia bitkisinin yaprak eksplantları *in vitro* sürgün rejenerasyonu için 0,25, 0,50, 1,00, 1,50 ve 2,00 mg/l BAP içeren agar ile katılaştırılmış MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Tüm ortamlarda eksplant üzerine kallus oluşumu (Şekil 4.2.a) gözlenmiştir. Dört hafta sonra kallus üzerinde sürgün uçları belirli şekilde görülmeye başlanmıştır (Şekil 4.2.b). Altı hafta sonra, sürgünler (Şekil 4.2.c) belirgin şekilde gözlenirken sekiz (Şekil 4.2.d) hafta sonra sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve kök oluşturan eksplant oranı verileri varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.3).



Şekil 4.2. *R. rotundifolia* bitkisinin yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu (a) iki hafta sonra kallus oluşumu, (b) dört hafta sonra kallus üzerinde sürgün uçlarının oluşumu (c) altı hafta ve (d) sekiz hafta sonra eksplantlarda sürgün oluşumu.

Çizelge 4.3. Farklı BAP konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna ait varyans analizi sonuçları

V.K	S.D	Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F
Ortam	4	360.00	0.23 ^{ös}	59.52	2.80 ^{ös}
Hata	10	213.33		21.21	
Genel toplam	14				
V.K	S.D	Sürgün Uzunluğu (cm)			
		KO		F	
Ortam	4	0,31		12.93**	
Hata	10	0.24			
Genel toplam	14				

**p< 0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından ortamlar arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Buna karşın, sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasında farklılık 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı BAP konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna etkisi

Büyüme Düzenleyicileri BAP(mg/l)	Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)
0,25	26,67 ^{ös}	6,73 ^{ös}	1,37 ^{a**}
0,50	33,33	10,20	1,32 ^{ba}
1,00	53,33	17,06	1,06 ^{bc}
1,50	46,67	14,73	0,89 ^c
2,00	33,33	7,80	0,59 ^d

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

^{ös} Önemsiz

Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi sürgün rejenerasyonu oranı %26,67-%53,33 arasında değişmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise 6,73-17,06 adet olarak kaydedilmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından en uzun 1,37 cm sürgünler 0,25 mg/l BAP içeren MS ortamında elde edilirken, en kısa 0,59 cm sürgünler 2,00 mg/l BAP içeren MS ortamda gözlenmiştir.

4.2.2 Farklı BAP İçeren MS Ortamdaki Sürgün Rejenerasyonundan Sonra Elde Edilen Kalluslaşmış Eksplant Kalıntılarının GA₃ içeren MS Ortamda Yeniden Sürgün Rejenerasyonu

Yukarıda belirtilmiş farklı oranda BAP içeren MS ortamda sürgün rejenerasyonundan sonra kalan yaprak eksplantların kalıntıları 0,25, 0,50, 1,00, 1,50 ve 2,00 mg/l BAP ile 0,20 mg/l GA₃ içeren MS ortamlarında sekiz hafta kültüre alınmıştır. Deneme sürecinin ikinci haftasında tüm eksplantlarda sürgün oluşumu gözlenmeye başlanmıştır. Dördüncü haftadan itibaren de tüm sürgünlerde kök oluşumları da gözlenmiştir. Sekiz hafta sonra (şekil 4.3) sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve kök oluşturan eksplant oranı verileri varyans analizine tabi tutulmuştur (izelge 4.5).



şekil 4.3. *R. rotundifolia* bitkisinde GA₃ içeren ortamında sürgünlerin büyümesi (a) iki hafta sonra , (b) dört hafta ve (c) altı hafta sonra kallustan sürgün oluşumu ve büyümesi

Çizelge.4.5. Farklı BAP içeren MS ortamdaki sürgün rejenerasyonundan sonra elde edilen kalluslaşmış eksplant kalıntılarının GA₃ içeren MS ortamda yeniden sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları

V.K	S.D	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) (2)		Sürgün Uzunluğu (cm) (3)	
		KO	F	KO	F
Ortam	4	751,43	19,27 ^{**}	0,99	7,66 ^{**}
Hata	10	39,00		0,13	
Genel toplam	14				
V.K	S.D	Sürgün Rejenerasyon Oranı (%) (1)		Kök Oluşturan Eksplant Oranı (%) (4)	
		KO	F	KO	F
Ortam	4	426,67	0,25 ^{**}	426,67	0,25 ^{ös}
Hata	10	1706,67		1706,67	
Genel toplam	14				

^{ös} Önemsiz.

^{**}p < 0,01 düzeyinde önemli

Sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasında istatistiksel olarak 0,01 düzeyinde önemli farklılık görüldükçe, gelişen sürgünler üzerinde kök oluşum oranı arasında istatistiksel olarak bir farklılık görülmemiştir (Çizelge 4.5). Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.6’de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı BAP içeren MS ortamdaki sürgün rejenerasyonundan sonra elde edilen kalluslaşmış eksplant kalıntılarının GA₃ içeren MS ortamda yeniden sürgün rejenerasyonuna ait Duncan testi sonuçları

Büyüme Düzenleyicileri		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Oluşturan Eksplant Oranı (%)
BAP (mg/l)	GA ₃ (mg/l)				
0,25	0,20	73,33 ^b	24,00 ^a	4,01 ^a	73,33
0,50	0,20	73,33 ^b	16,00 ^b	3,77 ^a	73,33
1,00	0,20	100,00 ^a	8,17 ^c	2,93 ^b	100,00
1,50	0,20	73,33 ^b	11,67 ^b	2,69 ^b	73,33
2,00	0,20	73,33 ^b	23,67 ^a	3,03 ^b	73,33

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0,01 düzeyinde önemlidir.

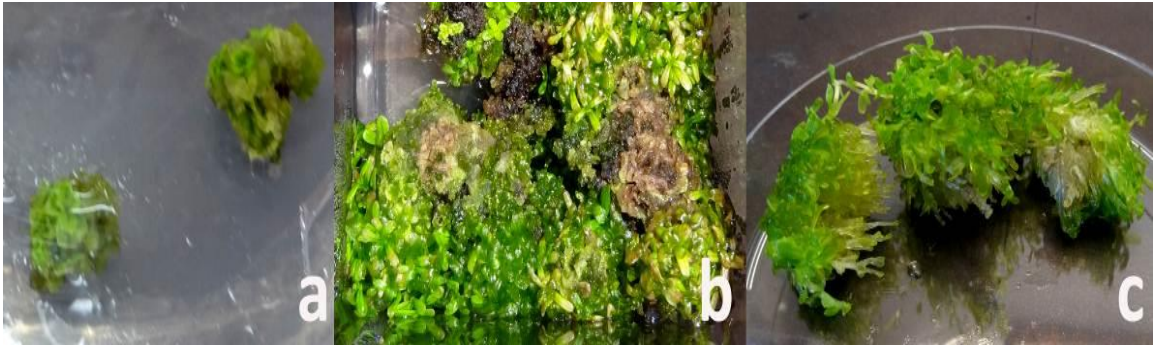
^{ös} Önemsiz.

Çizelge 4.6’ ya göre, sekiz hafta sonra sürgün rejenerasyon oranı %73,33-%100,00 arasında kaydedilmiştir. En fazla (%100,00) sürgün rejenerasyonu, 1,00 mg/l BAP -0,20 mg/l GA₃ içeren MS ortamında elde edilmiş olup, en az (%73,33) sürgün rejenerasyonu 0,25, 0,50, 1,50, 2,00 mg/l BAP 0,20 mg/l GA₃ içeren MS ortamından elde edilmiştir.

En fazla eksplant başına sürgün sayısı 24,00 adet ile 0,25 mg/l BAP 0,20 mg/l GA₃ içeren besin ortamında elde edilirken, en az sürgün ise 8,17 adet ile 1,00 mg/l BAP 0,20 mg/l GA₃ içeren MS MS ortamında kaydedilmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından en uzun sürgün 4,01 cm ile 0,25 mg/l BAP 0,20 mg/l GA₃ içeren MS ortamında ve en kısa sürgün ise 2,69 cm ile 1,50 mg/l BAP 0,20 mg/l GA₃ içeren MS ortamında elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından en uygun hormon oranı 0,25 mg/l BAP olarak kaydedilmiştir. Kök oluşturan eksplant oranı %73,33-%100,00 arasında değişmiştir. En fazla kök oluşturan eksplantlar 1,00 mg/l BAP- 0,20 mg/l GA₃ içeren ortamdan elde edilmiştir.

4.3. Farklı TDZ Konsantrasyonlarının Sürgün ucu Eksplantından Sürgün Rejenerasyonunu

In vitro sürgün rejenerasyonu elde etmek için sürgün ucu eksplantı 0,05, 0,10, 0,20, 0,40, 0,80 ve 1,60 mg/l TDZ içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlarda sekiz hafta sonra kallus oluşumu (Şekil 4.4.a) gözlenmiş olup her hangi sürgün oluşumu kaydedilmemiştir. Elde edilen kallustan sürgün oluşumu için eksplantlar fitajel ile katılaştırılmış MSO ortamına kültüre alınmıştır. İki hafta sonra tüm eksplantlarda (Şekil 4.4.b) sürgün uçları gözlenmeye başlamış olup, dört hafta sonra sürgün uçları belirgin şekilde gözlenmiştir. Sekiz hafta sonra (Şekil 4.4.c) sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.4: *R. rotundifolia* bitkisinin sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonunun (a) sekiz hafta sonra kallus oluşumu, (b) MSO ortama aktarıldıktan ik hafta sonra kallus üzerinde sürgün uçlarının oluşumu ve (c) sekiz hafta sonra eksplantlarda sürgün oluşumu

Çizelge 4.7. Farklı TDZ konsantrasyonlarının sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna ait varyans analizi

VK	SD	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
Ortam	4	368.86	21.21**	1.82	363.91**
Hata	10	17.39	-	0,005	-
Genel toplam	14	-	-	-	-

** p<0,01 düzeyinde önemli

Tüm eksplantlarda %100 sürgün rejenerasyonu gözleendiği için istatistik analiz yapılmamıştır. Eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu oranı bakımından ortamlar arasındaki farklılık 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Farklı TDZ konsantrasyonlarının sürgünucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna etkisi

TDZ (mg/l)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)
0,05	59,67 ^a	1,87 ^a
0,10	36,67 ^{bc}	1,67 ^b
0,20	44,00 ^b	1,60 ^b
0,40	40,00 ^b	0,50 ^c
0,80	29,33 ^c	0,23 ^d
1,60	30,67 ^c	0,20 ^d

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0,01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.8.'e göre, sekiz hafta sonra sürgün rejenerasyon oranı tüm ortamlarda %100,00 olarak kaydedilmiştir. En fazla eksplant başına 59,67 adet sürgün 0,05 mg/l TDZ içeren besin ortamında elde edilirken, en az 29,33 adet sürgün 0,80 mg/l TDZ içeren MS ortamında bulunmuştur. En uzun 1,87 cm'lik sürgün 0,05 mg/l TDZ içeren MS ortamında ve en kısa 0,20 cm'lik sürgün ise 1,60 mg/l TDZ içeren MS ortamında kaydedilmiştir.

Yapılan bu çalışmada eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından en uygun TDZ dozunun 0,05 mg/l olduğu görülmektedir. Genel olarak TDZ oranı artışı ile sürgün sayısı ve uzunluğunda azalma görülmüştür.

4.4. Farklı BAP Konsantrasyonlarının Sıvı MS Ortamda Sürgün ucu Eksplantından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri

R. rotundifolia bitkisinin *in vitro* sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla sürgün ucu eksplantları 0,05, 0,10, 0,20, 0,30 ve 0,40 mg/l BAP içeren sıvı MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlarda birinci haftadan itibaren sürgün, ikinci haftadan itibaren kök rejenerasyonu kaydedilmiştir. Sekiz hafta sonra (Şekil 4.4 a,b,c) sürgün rejenerasyonu oranı, sürgün uzunluğu ve kök oluşturan eksplant oranı verileri varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.9).



Şekil 4.5. *R. rotundifolia* bitkisinin sıvı BAP ortamda sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonunun (a) sürgün oluşumu (b) bitkiler üzerinde kök oluşumu (c) sıvı kültürde çoğaltılan bitki görünümü

Çizelge 4.9. Farklı BAP konsantrasyonlarının MS sıvı ortamda sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna ait varyans analizi

V.K	S.D	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) 2		Sürgün Uzunluğu (cm)3	
		K.O	F	K.O	F
Ortam	4	150,35	0,94*	9,41	1,40*
Hata	10	159,80		6,73	
Genel toplam	14				
V.K	S.D	Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)1		Kök Oluşturan Eksplant Oranı (%)4	
		K.O	F	K.O	F
Ortam	4	426,67	0,25 ^{ös}	426,67	0,25 ^{ös}
Hata	10	1706,67		1706,67	
Genel toplam	14				

^{ös} Önemsiz.

* p<0,05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.9 'da görüldüğü gibi sürgün rejenerasyon oranı bakımından ortamlar arasında önemli bir farklılık çıkmazken, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu bakımından 0,05 düzeyinde önemli çıkmıştır.

Kök oluşturma oranı da önemsiz bulunmuştur. Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Farklı BAP konsantrasyonlarının MS sıvı ortamda sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna etkisi

Büyüme Düzenleyicileri	Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Oluşturan Eksplant Oranı (%)
0.05	73,33 ^{ös}	24,00 ^a	4,77 ^{b*}	73,33 ^{ös}
0.10	73,33	16,00 ^b	5,35 ^a	73,33
0.20	100,00	8,17 ^c	7,5 ^d	100,00
0.30	73,33	11,67 ^c	3,46 ^c	73,33
0.40	73,33	23,67 ^a	3,45 ^c	73,33

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

^{ös} Önemsiz.

Çizelge 4.10'dan anlaşılacağı gibi, ortamlardaki sürgün rejenerasyon oranı önemsiz bulunurken, %73,33 ile %100 arasında değişmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise 8,17-24,00 adet arasında kaydedilmiştir. Eksplant başına en fazla 24,00 adet sürgün 0,05 mg/l BAP içeren MS ortamdan elde edilmiştir. En uzun sürgün 7,50 cm olarak 0,20 mg/l BAP içeren MS ortamdan elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu, farklı BAP içeren ortamlarda 3,45-7,50 arasında kaydedilmiştir. Kök oluşturan sürgünlerin oranı %73,33 - 100,00 arasında değişmiştir.

4.5. Farklı Kinetin Konsantrasyonlarının Sıvı MS Ortamda Sürgün ucu, 1. koltukaltı ve 2. koltukaltı Eksplantından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri

R. rotundifolia bitkisinin sürgün ucu, 1. koltukaltı ve 2. koltukaltı eksplantlarından *in vitro* koşullarda sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla eksplantları 0,05, 0,10, 0,20, 0,40 ve 0,80 mg/l Kinetin içeren sıvı MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlarda birinci haftadan itibaren sürgün uçları ve ikinci haftadan itibaren gelişen sürgünlerinde kök rejenerasyonunda kaydedilmiştir. Sekiz hafta sonra sürgün rejenerasyonu oranı, sürgün uzunluğu ve kök oluşturan eksplant oranı verileri varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Farklı kinetin konsantrasyonlarının sürgün ucu,1. koltukaltı ve 2. koltukaltı eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları

Sürgün ucu					
V.K	S.D.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	4	23,67	355,00**	1,60	861,12**
Hata	10	0,07	-	0,53	-
Genel toplam	14				
1. Koltukaltı meristem					
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	4	24,27	72,80**	3,43	8,58**
Hata	10	0,33	-	0,40	-
Genel toplam	14	-	-	-	-
2. Koltukaltı meristem					
V.K.	S.D.	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	4	27,73	138,67**	4,07	12,20**
Hata	10	0,20	-	0,33	-
Genel toplam	14				

**p<0,01 düzeyinde önemli

^{os} Önemsiz.

Kullanılan tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyonu ve gelişen sürgünlerde kök oluşumu gözlenmiştir. Tüm eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından farklılık istatistiksel olarak 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Farklı kinetin konsantrasyonlarının sürgün ucu,1. koltukaltı ve 2. koltukaltı eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait Duncan testi sonuçları

Büyüme Düzenleyicileri	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			Sürgün Uzunluğu (cm)		
	Sürgün ucu	1. koltuk altı eksplant	2. koltuk altı eksplant	Sürgün ucu	1. koltuk altı eksplant	2. koltuk altı eksplant
0,05	1,00 ^d	1,33 ^d	1,00 ^d	6,67 ^a	5,67 ^a	4,33 ^a
0,10	1,00 ^d	1,67 ^d	1,00 ^d	5,67 ^{ab}	5,33 ^a	5,33 ^a
0,20	2,00 ^c	4,00 ^c	3,67 ^c	5,33 ^{ab}	5,33 ^a	5,33 ^a
0,40	5,67 ^b	6,00 ^b	6,33 ^b	5,33 ^{ab}	5,00 ^a	5,33 ^a
0,80	7,00 ^a	8,00 ^a	7,67 ^a	4,67 ^b	3,00 ^b	2,67 ^b

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

Denemede kullanılan tüm eksplantlar üzerinde 0,05, 0,10, 0,20, 0,40 ve 0,80 mg/l kinetin içeren MS ortamında %100 sürgün oluşumu sağlanmıştır. Sürgün sayıları, sürgün ucu eksplantında, 1. koltukaltı eksplantı ve 2. koltukaltı eksplantlarında sırasıyla 1,0-7,0, 1,33-8,0 ve 1,0-7,67 adet arasında değişmiştir. MS ortamda kinetin oranı arttıkça sürgün sayısında da artış gözlenmiştir. Her üç eksplantta en fazla 7,0, 8,0 ve 7,67 adet sürgün sırasıyla sürgün ucu, 1. koltukaltı ve 2. koltukaltı meristem eksplantından 0,80 mg/l kinetin içeren ortamında elde edilmiştir. Buna karşın, her üç eksplantta kinetin oranı düşükten yükseğe doğru (0,05→0,10→0,20→0,40→0,80 mg/l kinetin) arttıkça sürgün ucu, 1. koltukaltı ve 2. koltukaltı eksplantlarındaki sürgün uzunluğunda azalma gözlenmiştir. Gelişen tüm sürgünler üzerinde kök oluşumu kaydedilmiştir.

4.6. Farklı BAP ve GA₃ Konsantrasyonlarının Sıvı MS Ortamda Sürgün ucu Eksplantından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri

R.rotundifolia bitkisinin sürgün ucu eksplantları *in vitro* sürgün rejenerasyonu için 0,20 BAP ile 0,05, 0,10, 0,20 mg/l GA₃ içeren sıvı MS besin ortamına kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlarda birinci haftadan itibaren hem sürgün hem de sürgünler üzerinde kök oluşumu gözlenmiş olup, on hafta sonra denemeye ait veriler alınmıştır. Elde edilen sonuçların sürgün rejenerasyonu oranı ve sürgün uzunluğu oranına ait verileri varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Farklı BAP ve GA₃ konsantrasyonlarının sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ve sürgün uzunluğuna ait varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	KO	F
Ortam	2	103,444	2,116*	10,448	30,565*
Hata	6	48,889	-	0,342	-
Genel toplam	8	-	-	-	-

^{os} Önemli.

* p<0,05 düzeyinde önemli

Tüm eksplantlar üzerinde sürgün oluşum görülmüştür. Eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak 0,05 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.13). Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı BAP ve GA₃ konsantrasyonlarının sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait Duncan testi sonuçları

Büyüme Düzenleyicileri		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)
BAP	GA ₃		
0,20	0,05	17,67 ^{b**}	2,30 ^{b**}
0,20	0,10	14,67 ^b	3,24 ^b
0,20	0,20	26,00 ^a	5,90 ^a

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

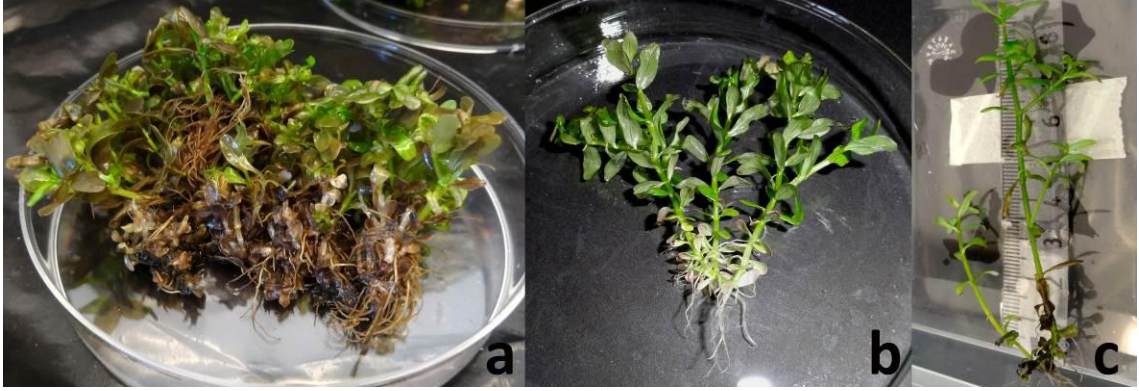
Çizelge 4.14'de görüldüğü gibi, MS içeren tüm BAP-GA₃ dozlarında sürgün oluşum gözlenmiş olup, sürgün rejenerasyon oranı bakımından eksplantlar arasında bir farklılık bulunmamıştır. Eksplant başına sürgün sayısı ise 14,67-26,00 adet arasında değişmiş olup, en fazla eksplant başına 26 adet sürgün ve 5,90 cm ile en uzun sürgün 0,20 mg/l BAP + 0,20 mg/l GA₃ içeren MS ortamdan elde edilmiştir. Farklı BAP-GA₃ içeren MS ortamında sürgün uzunluğu 2,30-5,90 cm arasında değişmiştir. Gelişen tüm sürgünler üzerinde kök oluşumu gözlenmiştir.

4.7. *In vitro* Koşullarda Geliştirilmiş Bitkilerin Adaptasyonu İçin En Uygun pH Aralığının Belirlenmesi

In vitro koşullarda elde edilen bitkilerde kök oluşumu (4.6 a,b,c,) gözlendiği için ayrı bir çalışma yapılmamıştır. Bu bitkilerin adaptasyonu için en uygun pH aralığının belirlenmesi amacıyla 4-5 cm uzunluğunda 5'er adet bitki, pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 pH değerlerdeki distile saf suda cam şişe içerisine alınarak 20°C'de 12 saat karanlık 12 saat ışıklı fotoperiyodunda otuz gün süreyle kültüre alınmıştır.

Bu süre sonunda pH 4 ortamındaki bitkilerde yaprakta tamamen renk kaybı gözlenmiş olup bitkilerinin öldüğü tespit edilmiştir. Bitkinin pH 5 ortamında ise yapraklarının kısmen yeşil'den sarıya döndüğü ve gelişme göstermediği tespit edilmiştir.

Bitki, pH 6-7'deki ortamlarda uyum göstermiş ve boy artışıda (6-7cm) kaydedilmiştir. Dış koşullarına en iyi uyumu ise pH 8 ve 9'daki ortamlarda sağlamış olup, bitkilerde deneme sonunda 8-9 cm uzunluğunda sürgünlerin geliştiği görülmüştür.



Şekil 4.6. *R. rotundifolia* bitkisinin *in vitro* koşullarda adaptasyon çalışmaları (a,b,c) ve köklendirilmiş bitkiler

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye’de akvaryum bitkilerinin üretimi sınırlı miktarda yapılmakta ve genellikle yurt dışından ithalata ve kayıt dışı bir sektöre dayanmaktadır. Akuatik bitkilerde yapılan doku kültürü çalışmaları ise Türkiye dâhil sınırlı sayıda ülkede yapılmaktadır. Bu tez çalışmasında akuatik bitkilerden olan akvaryum süs bitkisi *R. rotundifolia*’nın doku kültürü ile çoğaltılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda sürgün ucu, birinci ve ikinci koltukaltı meristemleri farklı oranlarda BAP, TDZ, Kinetin, NAA ve GA₃ içeren MS ortamı kullanarak bitkinin doğal koşullarından daha hızlı sürede ve daha çok miktarda çoğaltımı gerçekleştirilerek üretim sınırları genişletilmeye çalışılmıştır.

Her bitki eksplantının yüzeysel olarak mantar ve diğer mikroorganizmalardan temizlenebilmesi için gerekli dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresi farklıdır. Bu nedenle en uygun dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresinin belirlenmesi çok önemli olup, eksplantın yüzey sterilizasyonu için en etkili, ancak en düşük dezenfektan dozunun belirlenmesi gerekmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilmiş eksplantların yüzey sterilizasyonunda eksplanta en az zarar vermek amacıyla piyasada bulunan sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit, civa, gümüş nitrat gibi birçok dezenfektanlardan en uygun dezenfektanın seçilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, yeşil eksplantları kullanılmış olup, eksplantların klorofiline en az zarar verebilmesi amacıyla hidrojen peroksit kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonu için hidrojen peroksitin farklı konsantrasyonları denenmiş olup %12’lik hidrojen peroksit konsantrasyonunun ve 10 dk sterilizasyon muamelesinin, bu bitkinin eksplantlarının yüzey sterilizasyonu için en uygun olduğu görülmüştür. Benzer şekilde Türkiye’de daha önce yapılan çalışmalarda su bitkisinin sterilizasyonu için Doğan (2013) tarafından *Ceratophyllum demersum* bitkisinde de hidrojen peroksit kullanılmıştır. Buna karşın, Bhatti (2001) mercimeğin ve Aasim (2008) börülce bitkisinin tohumların sterilizasyonu için NaOCl kullanmışlar. Her iki çalışmada farklı dezenfektanların kullanımı eksplantların farklılığından kaynaklandığını düşünülmektedir.

Sürgün ucu eksplantından 0, 20 mg/l BAP ve 0, 20 mg/l GA₃ içeren sıvı MS ortamından eksplant başına en fazla 26,00 adet sürgün elde edilmiştir. Kane ve ark., (1990), *Cryptocoryne lucens*’ de yaptıkları çalışmada en fazla sürgün rejenerasyonunu (7,7 adet/eksplant) 20 µM BAP ve 0,5 µM NAA içeren ortamdan elde etmişlerdir.

Yine Kane ve ark., (1999), yaptıkları başka bir çalışmada *Cryptocoryne wendtii*' yi kültüre almışlar ve en fazla sürgün oluşumunu, 20µM BAP bulunan ortamdan elde etmişlerdir. Jenks ark., (2000), ise *Nymphoides indica*' da en fazla sürgün sayısını (11,5 adet/eksplant) 10 µM BAP ve 20 µM IAA içeren MS besin ortamından elde etmişlerdir. Bird ve Smith (1994), *Halophila engelmannii*'nin doku kültürü çalışmalarında 10 mg/l BAP ve 0,25 mg/l NAA içeren ortam ile en fazla sürgün oluşumunu elde etmişlerdir. Buna karşın, yalnız BAP içeren sıvı MS ortamda ise eksplant başına en fazla 24,00 adet sürgün 0,05 mg/l BAP içeren MS ortamdan elde edilmiştir. BAP konsantrasyonu arttırıldıkça, sürgün sayısında inhibasyon ve dolayısıyla azalma tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Aasim (2008)'de BAP içeren MS ortamında konsantrasyonun artışı ile börülce bitkisinin sürgün rejenerasyonuna olumsuz etkilerini kaydetmiştir.

BAP Konsantrasyonlarının Yaprak Eksplantından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri.

R. rotundifolia bitkisinin yaprak eksplantları 0,25, 0,50, 1,00, 1,50 ve 2,00 mg/l BAP içeren ve agar ile katılaştırılmış MS besin ortamında kültüre alınma sonucunda tüm ortamlarda eksplant üzerine kallus oluşumu ve daha sonra %26,67- 53,33 oranda sürgün oluşum ile 6,73-17,06 adet sürgün elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından 0,25 mg/l içeren BAP MS ortamda en uzun 1,37 cm sürgünler elde edilirken BAP dozu 2 mg/l kadar artırılınca sürgün uzunluğunda çok belirgin azalma görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre çalışma sonucunda endogen fitohormonlar ve bitkinin gelişimi arasında bir etkileşim olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, Panigrahi ve ark.,(2006), *Hygrophila auriculata* bitkisinin yaprak eksplantlarından BAP ve NAA içeren MS ortamda sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Yaprak eksplantından kallus yoluyla en iyi sürgün rejenerasyonu 2 mg/l BAP ve 0,2 mg/l NAA içeren ortamda görülmüştür. Araştırmacılar 3 cm'den fazla gelişen sürgünleri 0,1 mg/l NAA içeren MS ortamda köklendirmiştir. Elde edilen bitkilerin % 80'i başarıyla adaptasyon sağlanmıştır.

Şumlu (2009), *Rotala macrandra* Koehne'nın *in vitro* koşullarda hızlı çoğaltımı ve gen aktarımı ile ilgili çalışmada *R. macrandra*'nın yaprak eksplantları agar ve gelrit ile katılaştıran ve içerisinde sitokinin ve oksin bulunan ortamlarda kültüre alınmış olup, elde edilen tüm bitkileri akvaryum ortamına adapte edilmiştir.

Farklı BAP İçeren MS Ortamdaki Sürgün Rejenerasyonundan Sonra Elde Edilen Kalluslaşmış Eksplant Kalıntılarının GA₃ içeren MS Ortamda Yeniden Sürgün Rejenerasyonu

Yaprak eksplant kalıntıları 0,25, 0,50, 1,00, 1,50 ve 2,00 mg/l BAP ile 0,20 mg/l GA₃ içeren MS ortamlarında sekiz hafta kültüre alınmıştır. Sürgün rejenerasyon oranı %73,33-%100,00 arasında kaydedilmiştir. En fazla (%100,00) sürgün rejenerasyonu, 1,00 mg/l BAP – 0,20 mg/l GA₃ içeren MS ortamında olup, en az (%73,33) sürgün rejenerasyonu 0,25, 0,50, 1,50, 2,00 mg/l BAP – 0,20 mg/l GA₃ içeren MS ortamından elde edilmiştir. En fazla eksplant başına 24,00 adet sürgün 0,25 mg/l BAP – 0,20 mg/l GA₃ içeren besin ortamında elde edilirken, en az ise 8,17 adet sürgün 1,00 mg/l BAP – 0,20 mg/l GA₃ içeren MS ortamında kaydedilmiştir. Benzer şekilde, Abu-Qaoud (2012) *Petunia hybrida* kara bitkisinde yaparak eksplantından sürgün rejenerasyon elde ettikten sonra eksplant kalıntılarında tekrar sürgün rejenerasyon elde etmiştir.

Farklı TDZ Konsantrasyonlarının Sürgün ucu Eksplantından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri

Sürgün ucu eksplantı 0,05, 0,10, 0,20, 0,40, 0,80 ve 1,60 mg/l TDZ içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra sürgün rejenerasyon oranı tüm ortamlarda %100,00 olarak kaydedilmiştir. En fazla eksplant başına 59,67 adet sürgün 0,05 mg/l TDZ içeren besin ortamında elde edilirken, en az 29,33 adet sürgün 0,80 mg/l TDZ içeren MS ortamında bulunmuştur. En uzun sürgün 1,87 cm ile 0,05 mg/l TDZ içeren MS ortamında ve en kısa sürgün ise 0,20 cm ile 1,60 mg/l TDZ içeren MS ortamında kaydedilmiştir. Genel olarak TDZ oranı artışı ile sürgün sayısı ve uzunluğunda azalma görülmüştür. Elde edilen sonuçlarda yüksek oranda TDZ'nin bitki gelişmesinde olumsuz etkisi görülmüştür. Bu tez kapsamındaki çalışma sonuçları, Shirani (2010), muz bitkisindeki çalışmalar ile benzer sonuç elde etmişlerdir. Araştırmacılar, yüksek TDZ içeren ortamlarda bitki rejenerasyonunda olumsuz etkiler tespit etmişlerdir.

Farklı BAP Konsantrasyonlarının MS Sıvı Ortamda Sürgünucu Eksplantından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri

Sürgün ucu eksplantları 0,05, 0,10, 0,20, 0,30 ve 0,40 mg/l BAP içeren sıvı MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Ortamlardaki sürgün rejenerasyon oranı önemsiz bulunurken, %73,33 ile %100 arasında değişmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise 8,17-24,00 adet arasında kaydedilmiştir.

Eksplant başına en fazla 24,00 adet sürgün ve en uzun sürgün 7,50 cm olarak 0,20 mg/l BAP içeren MS ortamdan elde edilmiştir.

Sürgün uzunluğu, farklı BAP içeren ortamlarda 3,45-7,50 arasında kaydedilmiştir. Benzer şekilde, Moncalean ve ark.,(2003), *Actinidia deliciosa* türünün sürgün uçlarını değişik oranda BAP ile muamele ettikten sonra en iyi bitkileri 4,4 µM BAP ile bir gün muameleden elde etmişlerdir. Stanly ve ark., (2011), *C. wendtii* de Wit ve *C. beckettii* Thwaites ex Trimen türlerinin sürgün uçlarını kullanarak *in vitro* ortamda çoğaltmak için 0,5 mg/l BAP ve 0,2 mg/l IBA içeren sıvı MS ortamında ve agar kullanılmış MS ortamında kültüre almışlardır. Her iki türde de yüksek çoklu sürgün oluşumu, kültürün dördüncü haftasından sonra sıvı çoğaltma 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.

Farklı Kinetin Konsantrasyonlarının Sıvı MS Ortamda Sürgün ucu,1. koltukaltı ve 2. koltukaltı Eksplantından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri

Sürgün ucu, 1. koltukaltı ve 2. koltukaltı eksplantları 0,05, 0,10, 0,20, 0,40 ve 0,80 mg/l kinetin içeren sıvı MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Denemede kullanılan tüm eksplantlar üzerinde 0,05, 0,10, 0,20, 0,40 ve 0,80 mg/l kinetin içeren MS ortamında %100 sürgün oluşumu sağlanmıştır. Sürgün sayıları, sürgün ucu, 1. koltukaltı ve 2. koltukaltı eksplantlarında sırasıyla 1,0-7,0, 1,33-8,0 ve 1,0-7,67 adet arasında değişmiştir. MS ortamda kinetin oranı arttıkça sürgün sayısında da artış gözlenmiştir. Buna karşın, her üç eksplantta kinetin oranı düşükten yükseğe doğru (0,05,→ 0,10→0,20→0,40→0,80 mg/l kinetin) arttıkça sürgün ucu,1. koltukaltı ve 2. koltukaltı eksplantlarındaki sürgün uzunluğunda azalma gözlenmiştir. Kinetin'in yüksek dozları bitki bünyesine toksik etkileri yaptığı bilinmektedir (Pazurkiewicz-Kocot K ve ark., 2011).

Benzer şekilde bu tez kapsamındaki çalışmada da kinetin oranı düşükten yükseğe doğru arttıkça sürgün uzuluğunda bir olumsuz baskı oluşup, büyümesine ve sürgün uzamasına toksik etkisinden dolayı inhibasyon oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir. Aynı şekilde Yenice (2010), Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktör ile 0,05 mg/l kinetin içeren sıvı MS ortamında su mercimeği (*Lemna minor* L.) bitkisinde yaprak eksplant başına düşen bitki sayısının 57,823 âdete ulaştığını hesaplamıştır. Daha fazla kinetin içeren ortamlarda eksplant başına belirgin düşüş kaydedilmiştir.

Farklı BAP ve GA₃ Konsantrasyonlarının Sıvı MS Ortamda Sürgün ucu Eksplantından Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri

Sürgün rejenerasyonu için 0,20 BAP ile 0,05, 0,10, 0,20 mg/l GA₃ içeren sıvı MS besin ortamına kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlarda ikinci haftadan itibaren hem sürgün hem de sürgünler üzerinde kök oluşumu gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise 14,67-26,00 adet arasında değişmiş olup, en fazla eksplant başına 26 adet sürgün ve 5,90 cm'lik en uzun sürgün 0,20 mg/l BAP + 0,20 mg/l GA₃ içeren MS ortamdan elde edilmiştir. Farklı BAP-GA₃ içeren MS ortamında sürgün uzunluğu 2,30-5,90 cm arasında değişmiştir. GA₃ hücrelerin çoğaltım ve uzamasına yardımcı olmaktadır (Arney ve Mancinelli, 1965). Dolayısıyla GA₃, meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılmasında ve sürgünlerin boylarının uzatılmasında kullanılmaktadır. BAP sentetik bir sitokinindir ve sürgün çoğaltılmasında kullanılmaktadır (Kyte ve Kleyn 1987). Her ikisi bir araya kullanıldığında hem bitki boylarının uzatılmasında hemde sürgünlerin çoğaltılmasında olumlu etkiler yapmaktadırlar. Bu tez kapsamındaki çalışmalarına benzer Bird ve Smith (1994), deniz yosunu *Halophila engelmannii* bitkisinin koltukaltı meristemini kullanarak doku kültürü çalışmalarında katı ortamda inorganik besin maddeleri, bitki büyüme düzenleyicileri, % 1 sukroz ve aktif karbon içeren suni deniz suyu kullanılmıştır. Sıvı ortam ise suni deniz suyu ve inorganik besin maddeleri içermiştir. Ortamda en iyi gelişme, 3,4 µM GA₃ kullanıldığında elde edilmiştir.

5.1. Sonuç

Sonuç olarak bu çalışmada *R. rotundifolia* bitkisinin doku kültürü ile çoğaltımı başarıyla gerçekleştirilmiş olup bitki doğal ortamından daha kısa sürede ve daha fazla sayıda üretilmiştir. Üretim aşamasında oluşabilecek olumsuz riskler laboratuvar koşullarında tamamen ortadan kaldırılmış ve kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

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

5.2. Öneriler

Daha sonraki çalışmalarda daha farklı eksplantlar, hormon kombinasyonları, fotoperiyot ve sıcaklık uygulamaları ile daha ayrıntılı denemelerin yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR:

- Abu-Qaoud H. 2012. Improving adventitious shoot regeneration from cultured leaf explants of *Petunia hybrida* using thidiazuron. *African Journal of Biotechnology* 11(51): 11230-11235.
- Agrawal, A. ve Mohan Ram, H.Y. 1995. *In Vitro* Germination and Micropropagation of Water Chestnut (*Trapa* sp.). *Aquatic Botany*, 51; 135-146.
- Andrade, W. F., Almeida, M. and Gonçalves, A. N. 2006. *In vitro* multiplication of *Eucalyptus grandis* under BAP pulse. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41 (12);153-158.
- Anthony, J.M., Senaratna, T., Dixon, K.W. and Sivasithamparam, K. 2004. Somatic embryogenesis for mass propagation of Ericaceae – a case study with *Leucopogon verticillatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76; 137–146.
- Arney ve Mancinelli S. E. ve Mancinelli P. 1966. The basic action of gibberellic acid in elongation of 'meteor' pea stems. *New Phytologist*.65(2):161–175,
- Biondi, S. ve Thorpe, T.A. 1981. Requirements for A Tissue Culture Facility, “*Plant tissue Culture*” Academic press. 1-20, New York.
- Bird, K.T., Cody, B.R., Smith, J.J. ve Kane, M.E., 1993. Salinity Effects on *Ruppia maritima* L. Cultured *In vitro*. *Botanica Marina*, 36; 23-28.
- Bird, K.T. ve Smith, J.J., 1994. Development of a medium and culture system for *in vitro* propagation of the seagrass *Halophila engelmannii*. *Can. J. Bot.*, 72; 1503-1510.
- Cirik, S., Cirik, Ş. ve Dalay, M. C. 2011. Su bitkileri II. (İçsu Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi, Yetiştirme Teknikleri). *Ege Üniv. Su Ürünleri Fakültesi Yay. No: 61. İzmir.*
- Carter, J., Gunawardena, A ve H. 2011. Kallus ile su monocot Aponogeton madagascariensis (dantel bitki) çoğaltımı. *Su Botanik Cilt: 94 Sayı: 3 Sayfa: 143-149.*
- Doğan, M., 2013. *In vitro* koşullarda Tilki Kuyruğu (*Ceratophyllum demersum* L.)’nun çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karamanoğlu Mehmetbey Üniv. Karaman.*
- Guillermo, J., Martinez,, Pastur,, ve Miriam., E, Arena.1999. *In Vitro* Propagation of Juvenile *Nothofagus leoni* Espinosa (Fagaceae). *J. For. Res.* 4; 295-298.

- Gürel, E. ve Türker, A.U. 2001. Organogenesis. (Editörler: Babaoğlu, M. Gürel, E., Özcan, S.), *Bitki Biyoteknolojisi, I- Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi*, s. 374, Konya
- Hekimoğlu, MA. E.U. 2006. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences Cilt/Volume 23, Ek/Suppl. (1/2): 237-241*
- Jenks, M., Kane, M., Marasca, F., Mcconnell, D. ve Sheeran, T., 1990. *In vitro* Establishment and Epiphyllum Plantlets Regeneration of *Nymphaea "Daubeniana"*. *Hortscience*, 25; 1664-1665.
- Jenks, M.A., Kane, M.E. ve McConnell, D.B., 2000. Shoot organogenesis from petiole explant in the aquatic plant *Nymphaea indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63; 1-8.
- Kane, M.E., Gilman, E.F., Jenks, M.A. ve Sheehan, T.J., 1990. Micropropagation of the Aquatic Plant *Cryptocoryne lucens*. *Hortscience*, 25 (6); 687-689.
- Kane, M.E., Davis, G.L., Mc Connell, D.B. ve Gargiulo, J. A., 1999. *In vitro* propagation of *Cryptocoryne wendtii*. *Aquatic Botany*, 63; 197-202.
- Khawar, K M., Aasim, M., Öztürk, M., Bakhsh, A ., Özcan, S., Atar, HH .2011. Türkiye'de sucul bitki doku kültürü Durumu. *Biyoteknoloji Cilt Güncel Fikir: 22 Sayı: 1 Sayfa: S65-S65*
- Kyte L., Kleyn J., 1987. Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation. *Timber Press*. pp 60-83.
- Li, Y.H., Chen, Q.Z., Xiao, J.N., Chen, Y.F., Li, X.J. and Huang, X.L. 2007. Characteristics of adventitious root formation in cotyledon segments of mango (*Mangifera indica* L. cv. Zihua): two induction patterns, histological origins and the relationship with polar auxin transport. *Plant Growth Regul*, DOI 10.1007/s10725-007-9239-2
- Michelli, M., Gasperis, A. De., Prospero, F., Standardi, Micropropagation of three species of aquatic plants. *A. Journal Agricultura Mediterranea*, (2006) ISSN 0394-0438 Vol. No. v.136(1) p.46-51
- Moncalean, P., Rodriguez, A. ve Fernandez, B. 2003. Effect of different benzyladenine time pulses on the endogenous levels of cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid in micropropagated explants of *Actinidia deliciosa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41; 149-155.

- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15; 473-497.
- Özcan, S. ve Özgen, M. 1996. Bitki genetik mühendisliği. *Kükem dergisi*, 1; 69-95.
- Öztürk, M. 2008. *Hygrophila difformis* ve *Microsorium pteropus*'un *in vitro* koşullarda çoğaltımı. *Ankara Üniv. Doktora tezi*.
- Öztürk, M. 2002. Akvaryum bitkisi *Ludwigia sp*'nin *in vitro* koşullarda çoğaltımına farklı oranlardaki büyüme düzenleyicilerin etkileri. *Ankara Üniv. Yüksek Lisans tezi*
- Panigrahi, J., Mishra, R. R. and Behera, M. 2006. *In vitro* multiplication of *Asteracantha longifolia* (L.) Nees- a medicinal herb. *Indian Journal of Biotechnology*, 5 (4); 562-564.
- Pazurkiewicz-Kocot K, Kita A, Haduch A. 2011. 1 The effect of kinetin on the chlorophyll pigments content in leaves of *Zea mays* L. seedlings and accumulation of some metal ions. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*. 14(4): 397-409.
- Shirani S, Mahdavi F, Maziah M (2010). Morphological abnormality among regenerated shoots of banana and plantain (*Musa spp.*) after *in vitro* multiplication with TDZ and BAP from excised shoot-tips. *Afr. J. Biotechnol.* 8(21): 5755-5761.
- 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*, 33.619-624
- Şumlu, Ş., Khawar, K.M.; Öztürk, M. ve Atar, H.H. 2005. Su Bitkisi Nilüfer'in (*Nymphaea sp*) *in vitro* Koşullarda Çoğaltımı. *XIII. Ulusal su ürünleri sempozyumu, Çanakkale*. 1-4 Eylül 2005.
- Şumlu, Ş., Khawar, K.M.; Öztürk, M. ve Atar, H.H. 2009. Akvaryum bitkisi *Rotala macranda*'nın *in vitro* koşullarda hızlı çoğaltımı ve gen aktarımı. *Ankara Üniv. Doktora Tezi*.
- Taylor, M., Taufa, L. and Drew, R. A. 1998. Decontamination of *kava* (*Piper methysticum*) for *in vitro* propagation. *Proc. Intern. Symp. Biotechnol. Tropical and subtropical species*, pp. 267-461.

- Te-chato, S. and Lim, M. 2000. Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from *in vitro*-derived leaf explant. *Scientia Horticultura*, 86; 291-298.
- Wawrzyn'czak, A. and Goszczyn'ska, D. M. 2003. Effect of pulse treatment with exogenous cytokinins on longevity and ethylene production in cut carnations (*Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, vol 11.
- Yenice, Z., 2010. Geçici daldırma sistem biyorektörlerle su mercimeği (*Lemna minor* L.) bitkisinin *in vitro* çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara.*

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : **Muzaffer ÇİFTÇİOĞLU**
Doğum Tarihi ve Yer : **01.01.1968-Adıyaman**
Medeni Hali : **Evli**
Yabancı Dili : **Fransızca**
Telefon : **0505 22343 17**
e-mail : **ciftcioglumuzaffer@gmail.com**

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	KMÜ Fen Fakültesi	
Lisans	Fen Fakültesi Biyoloji Böl.	1990
Lise	Genel Lise	1986

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
1991-1993	Mimar Sinan Lisesi	Öğretmen
1993-1996	Atatürk Lisesi	Öğretmen
1996-2001	Açı Dersanesi	Müdür-Öğretmen
2002-2003	Başarı Fen Lisesi	Müdür
2003-2004	Bifa Lisesi	Öğretmen
2004-2006	Anadolu Öğretmen Lis.	Uzman Öğretmen
2006-2009	Anadolu Öğretmen Lis.	Müdür
2009-2013	Ticaret Lisesi	Müdür Yrd.

Yayımları :

Karataş,M., Çiftçioğlu,M., Doğan,M., Aasim,M.,(2012), Rotala [*Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb)Koehne] Bitkisinin Doku Kültürü ile Çoğaltımı. *II. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi,15-18 Kasım. Antalya.*

Karataş,M., Çiftçioğlu,M., Doğan,M., Aasim,M.,(2012), Türkiye’de Akuatik Bitkilerin Biyoteknolojisi. *II. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi,15-18 Kasım. Antalya.*

Karataş,M., Çiftçioğlu,M., Doğan,M., Aasim,M.,(2012), Tilki Kuyruğu (*Ceratophyllum demersum* L.) Bitkisinde Sterilizasyon Çalışmaları. *II. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi,15-18 Kasım. Antalya.*