



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

AKVARYUM BİTKİLERİ *Hygrophila difformis* ve
Microsorium pteropus'UN *IN VITRO* KOŞULLARDA
ÇOĞALTIMI

Meryem ÖZTÜRK

ANKARA
2008

Akvaryum Bitkileri *Hygrophila difformis* ve *Microsorium pteropus*'un *In Vitro* Koşullarda Çoğaltımı

ÖZET

Hygrophila difformis ve *Microsorium pteropus* türleri Türkiye’de akvaryum ticaretinde yaygın olarak kullanılan iki önemli bitkidir. Bu bitkiler amatör yetiştiriciliğin dışında Türkiye’ye yurt dışından yasadışı yollarla getirilmektedir. Bu çalışmada, bu bitkilerin *in vitro* çoğaltımının gerçekleştirilerek, yeterli miktarda bitki üretiminin sağlanması dolayısıyla akvaryum ticaretinde dışa bağımlılığın ortadan kalkması ve aynı zamanda dış kaynaklardan gelen bitkilerle birlikte yabancı flora ve faunanın taşınması sonucu yerel flora ve fauna kaynaklarının kirletilmesinin önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

Hygrophila difformis türünde farklı oranlarda Kin, TDZ, NAA ve 2,4-D içeren MS besi ortamı kullanılmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu (80.56 adet/eksplant), 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamında yaprak eksplantından elde edilmiştir. Çalışmada sıvı MS ortam da kullanılmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu (62.20 adet/eksplant), yine 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren sıvı MS ortamında gövde eksplantından elde edilmiştir. Sıvı ortamda fazla sayısı sürgün elde edilmesine rağmen katı ortama göre daha düşük sonuç alınmıştır. *In vitro* elde edilen bitkilerin akvaryum koşullarına adaptasyonu amacıyla iki farklı uygulama yapılmıştır. İlk uygulamada akvaryumlarda iki farklı ışık yoğunluğu (2000 lüks ve 4000 lüks), ikinci uygulamada iki farklı su sıcaklığı (24°C- 28°C) uygulanmıştır. 24°C ve 4000 lüks ışık kullanılan denemelerde bitkilerdeki uzama miktarı daha fazla olmuştur.

Microsorium pteropus bitkisinde materyal azlığı ve bulaşıklık oranının fazla olmasından dolayı iki farklı çalışma yapılmıştır. İlk çalışmada, *in vitro* koşullarda farklı oranda NAA içeren şekersiz sıvı MS besi ortamında sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. İkinci çalışmada, *ex vitro* koşullarda “pulse treatment” uygulaması yapılmış bitkinin yaprakları yüksek oranda kısa süreli olarak BAP ve IBA ile muamele edilmiş ve akvaryum ortamında gelişmeye bırakılmıştır. Bu denemede *in vitro* yapılan çalışmaya göre daha iyi sonuç alınmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu (14 adet/eksplant), 250 mg/l BAP ve 250 mg/l IBA ile 30 dk süreyle yapılan muameleden elde edilmiştir.

Bu tezdeki çalışma yüksek oranda amacına ulaşmış ve ekonomik önemi olan iki akvaryum bitkisinin doku kültürü yöntemiyle çoğaltımı gerçekleştirilmiştir.

2008, 106 sayfa

Anahtar kelimeler: Akvaryum bitkisi, Dış koşullara alıştırma, *Hygrophila difformis*, *In vitro*, Mikroçoğaltım, *Microsorium pteropus*

In Vitro Propagation of Aquarium Plants Hygrophila difformis and Microsorium pteropus

Abstract

Hygrophila difformis and *Microsorium pteropus* are two important plant species that are widely used in the aquarium plant trade in Turkey. Besides multiplication by amateur, these plants are brought into Turkey through illegal ways. This study reports *in vitro* multiplication of these species independent of foreign connections; as the exotic flora also bear foreign flora and fauna which could pollute the local flora and fauna.

Hygrophila difformis was multiplied using MS medium containing different concentrations of Kin, TDZ and 2,4-D. Maximum shoot regeneration (80.56 shoots per explant), was achieved on MS medium containing 0.25 mg/l Kin and 1 mg/l NAA from leaf explant. Liquid MS medium was also used in the study. Similarly, maximum shoot regeneration (62.20 shoots per explant), was achieved on 0.25 mg/l Kin and 1 mg/l NAA from stem explant. Although large number of shoots were obtained on liquid culture; however, comparing with culture on solid medium only lower number of shoots could be recorded. Two experiments were conducted to acclimatise these plants in aquariums. The first experiment made use of two different light regimes (2000 lux and 4000 lux) and the 2nd experiment made use of two temperature regimes (24-28°C). Better growth was recorded when the plants were kept at 24°C under 4000 lux light regime.

Due to poor availability of *Microsorium pteropus* plant material and large number of contamination after surface sterilisation; the experiments were performed in two different ways. The first study made use of MS medium containing NAA devoid of sucrose to achieve shoot regeneration. The second experiment made use of pulse treatment with BAP and IBA to obtain shoot regeneration from leaf explants. These were cultured in aquariums for regeneration and development. Higher number of shoots were recorded in this experiment compared to shoot regeneration using *in vitro* conditions. The highest number of shoots (14 shoots per explant) were recorded on explants treated with 250 mg/l BAP-250 mg/l IBA with pulse treatment for 30 min.

The study reports successful achieving the aim of this thesis with the efficient multiplication of two economically important aquarium plants.

2008, 106 pages

Key words: *Acclimatisation, Aquarium plant, Hygrophila difformis, In vitro, Microsorium pteropus, Multiplication*

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımnda beni yönlendiren, yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a, yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Cengiz SANCAK ve Sayın Doç. Dr. Hasan Hüseyin ATAR'a, çalışmamın her aşamasında yardım ve desteğini gördüğüm Doç. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'a, Su Ürünleri Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Selçuk SEÇER'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tüm laboratuvar arkadaşlarıma çalışmalarımındaki doğrudan veya dolaylı katkılarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca çalıştığım kurum olan Haymana Tarım Kredi Kooperatifi Müdürü Sayın Hayrullah BADEMCİ'ye tez yazımı sırasında göstermiş olduğu anlayış ve destekten dolayı teşekkür ederim. Değerli arkadaşım Hülya TAŞÇI'ya çabalarından dolayı teşekkür ederim. Değerli aileme her zaman yanımda oldukları ve göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı teşekkür ederim.

Meryem ÖZTÜRK

Ankara, Temmuz 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tatlı Su Bitkilerinin Sınıflandırılması	1
1.1.1. Sucul ve bataklık ortamlardaki bitki grupları	1
1.2. Su Bitkilerinin Kullanım Alanları	2
1.2.1. Sucul bitkilerin insan gıdası olarak kullanımı	2
1.2.2. Suyun biyolojik filtrasyonu için bitkilerin kullanımı.....	2
1.2.3. Katkı ve destek maddesi olarak kullanımı.....	2
1.2.4. Gübre ve hayvan yemi olarak kullanımı	3
1.2.5. Süs bitkisi ve peyzaj amaçlı kullanımı	3
1.3. Akvaryum Bitkilerinin Yetiştirme Teknikleri	7
1.4. <i>In Vitro</i> Üretim	8
1.4.1. Doku kültürü teknikleri	8
1.4.2. Organogenesis	10
1.4.3. Embriyogenesis	11
1.4.4. Meristem kültürü	12
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. <i>Hygrophila difformis</i> Türünde Yürütülen Çalışmalar	26
3.1.1. Bitki materyali	26
3.1.2. Akvaryum koşulları	26
3.1.3. <i>In vitro</i> çalışmalardaki büyüme ortamları ve kültür koşulları	26
3.1.4. Bitki büyüme düzenleyicileri	27
3.1.5. Eksplant yüzey sterilizasyonu	28
3.1.6. Eksplant izolasyonu	29
3.1.7. Adventif sürgün rejenerasyonu ile hızlı çoğaltım	29

3.1.8.	Meristemlerden hızlı çoğaltım	29
3.1.9.	Elde edilen sürgünlerin akvaryum koşullarına adaptasyonu	29
3.2.	<i>Microsorium pteropus</i> Türünde Yürütülen Çalışmalar	30
3.2.1.	Bitki materyali	30
3.2.2.	Akvaryum koşulları	30
3.2.3.	Büyüme ortamları ve kültür koşulları	30
3.2.4.	Yüzey sterilizasyonu	31
3.2.5.	Adventif sürgün rejenerasyonu ile hızlı çoğaltım.....	31
3.2.6.	<i>Ex vitro</i> hızlı çoğaltım çalışmaları	31
3.2.7.	İstatistik Analizler	32
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	33
4.1.	<i>Hygrophila difformis</i> Türünde Hızlı Çoğaltım	33
4.1.1.	Eksplantların yüzey sterilizasyonu	33
4.1.2.	Adventif sürgün rejenerasyonu ile hızlı çoğaltım	37
4.1.2.1.	Kin ve 2,4-D'nin etkisi	37
4.1.2.2.	Yüksek oranda 2,4-D ve NAA'nın etkisi	38
4.1.2.3.	TDZ ve NAA'nın etkisi	40
4.1.2.4.	0.5 mg/l Kin ve farklı oranda NAA'in etkisi	43
4.1.2.5.	0.25 mg/l Kin ve farklı oranda NAA'in etkisi	45
4.1.3.	Meristemlerden hızlı çoğaltım	48
4.1.3.1.	İki farklı oranda TDZ ve NAA'in etkisi	48
4.1.3.2.	İki farklı oranda TDZ ve NAA'in etkisi	52
4.1.4.	Sıvı kültürde sürgün rejenerasyonu	57
4.1.4.1.	TDZ ve NAA'in uç meristemi, 1. koltukaltı meristemi, yaprak ve yaprak sapından sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	57
4.1.4.2.	Kin, TDZ ve NAA'in yaprak ve gövdeden sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	62
4.1.4.3.	Kin ve NAA'in yaprak ve yaprak sapından sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	66
4.1.5.	Elde edilen bitkiciklerin akvaryum koşullarına adaptasyonu	69
4.1.5.1.	Işığın ve başlangıç besi ortamının etkisi	69
4.1.5.2.	Akvaryum su sıcaklığının etkisi	76
4.2.	<i>Microsorium pteropus</i> (Java Fern) türünde hızlı çoğaltım	82

4.2.1.	Eksplantların yüzey sterilizasyonu	82
4.2.2.	<i>In vitro</i> hızlı çoğaltım	86
4.2.3.	<i>Ex vitro</i> hızlı çoğaltım	88
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	92
5.1.	<i>Hygrophila difformis</i> Bitkisinde Yürütülen Çalışmalar	92
5.2.	<i>Microsorium pteropus</i> (Java Fern) Bitkisinde Yürütülen Çalışmalar	98
KAYNAKLAR	100	
ÖZGEÇMİŞ.....	106	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	<i>Hygrophila difformis</i> bitkisinin görünüşü	5
Şekil 1.2.	<i>Microsorium pteropus</i> bitkisinin görünüşü	6
Şekil 1.3.	<i>In vitro</i> bitki rejenerasyonunda görülen organogenesis çeşitleri.....	10
Şekil 4.1.	0.25 mg/l 2,4-D içeren MS ortamda adventif sürgün rejenerasyonu ..	38
Şekil 4.2.	15 mg/l NAA içeren ortamda bekletilip 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortama alınan eksplantlardaki gelişim.....	40
Şekil 4.3.	TDZ ve NAA içeren MS ortamda yapraktan sürgün rejenerasyonu...	41
Şekil 4.4.	TDZ ve NAA içeren MS ortamdan elde edilen sürgünlerin görünüşü	43
Şekil 4.5.	Kin ve NAA içeren MS ortamdan elde edilen sürgünlerin MSO ortama alındıktan 4 hafta sonraki görünüşü.....	45
Şekil 4.6.	Kin ve NAA içeren MS ortamdan elde edilen sürgünlerin MSO ortama alındıktan 4 hafta sonraki görünüşü.....	48
Şekil 4.7.	TDZ ve NAA içeren MS ortamdan uç meristeminden elde edilen sürgünlerin 4 haftalık görünüşleri.....	49
Şekil 4.8.	TDZ ve NAA içeren MS ortamında 1.koltukaltı meristeminden elde edilen sürgünlerin 4 haftalık görünüşleri.....	50
Şekil 4.9.	0.1 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda elde edilen sürgünlerin MSO ortama alındıktan 4 hafta sonraki görünüşü.....	56
Şekil 4.10.	0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda elde edilen sürgünlerin MSO ortama alındıktan 4 hafta sonraki görünüşü.....	57
Şekil 4.11.	Sıvı kültürden 1. koltukaltı meristeminden adventif sürgün rejenerasyonu	60
Şekil 4.12.	Sıvı kültürden uç meristeminden adventif sürgün rejenerasyonu	61
Şekil 4.13.	Sıvı kültürde 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamda gövdeden adventif sürgün rejenerasyonu.....	64
Şekil 4.14.	Sıvı kültürde 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamda gövdeden adventif sürgün rejenerasyonu.....	64
Şekil 4.15.	Sıvı kültürde 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamda gövdeden adventif sürgün rejenerasyonu.....	65

Şekil 4.16.	Sıvı kültürde 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamda yapraktan adventif sürgün rejenerasyonu.....	68
Şekil 4.17.	<i>In vitro</i> elde edilen bitkiciklerin akvaryum koşullarına adaptasyonu..	73
Şekil 4.18.	<i>In vitro</i> elde edilen bitkiciklerin akvaryum koşullarına adaptasyonu..	76
Şekil 4.19.	<i>In vitro</i> elde edilen bitkiciklerin akvaryum koşullarına adaptasyonu..	80
Şekil 4.20.	<i>In vitro</i> elde edilen bitkiciklerin akvaryum koşullarına adaptasyonu..	82
Şekil 4.21.	Gövde eksplantındaki bulaşıklık.....	83
Şekil 4.22.	Yaprak eksplantındaki renk kaybı	85
Şekil 4.23.	<i>In vitro</i> koşullarda yapraktan adventif sürgün rejenerasyonu.	88
Şekil 4.24.	<i>Ex vitro</i> koşullarda yapraktan adventif sürgün rejenerasyonu.....	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Hygrophila cinsine ait bazı türlerin dağılım alanları	4
Çizelge 1.2.	Microsorium cinsine ait bazı türlerin dağılım alanları	6
Çizelge 3.1.	Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları	27
Çizelge 3.2.	Kullanılan büyümeyi düzenleyicilerin çözücüleri, saklama koşulları ve sterilizasyon yöntemleri.....	28
Çizelge 4.1.	Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS ve PPM'in eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi	34
Çizelge 4.2.	Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS ve PPM'in bulaşıklık oranına etkisi	35
Çizelge 4.3.	Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS ve PPM'in bulaşıklık yüzdesine etkisi	36
Çizelge 4.4.	Farklı Kin ve 2,4-D konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	37
Çizelge 4.5.	Farklı Kin ve 2,4-D konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün oluşumuna etkisi	37
Çizelge 4.6.	Yüksek oranlarda 2,4-D ve NAA'in yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	39
Çizelge 4.7.	Farklı 2,4-D ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	39
Çizelge 4.8.	Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün ve kök oluşumuna etkisine ait varyans analizi	40
Çizelge 4.9.	Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün ve kök oluşumu üzerine etkisi	42
Çizelge 4.10.	Farklı Kin ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün ve kök oluşumu üzerine etkisine ait varyans analizi	44
Çizelge 4.11.	Farklı Kin ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün ve kök oluşumu üzerine etkisi	44
Çizelge 4.12.	Farklı Kin ve NAA konsantrasyonlarının sürgün oluşumu ve gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi	45
Çizelge 4.13.	Farklı Kin ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün oluşumu ve gelişimi üzerine etkisi	46

Çizelge 4.14.	Farklı Kin ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün, yan sürgün sayısı ve kök uzunluğuna ait varyans analizi ...	46
Çizelge 4.15.	Farklı Kin ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün, yan sürgün sayısı ve kök uzunluğuna etkisi	47
Çizelge 4.16.	Farklı oranlardaki TDZ ve NAA konsantrasyonlarının uç ve 1. koltukaltı meristemlerinde sürgün uzunluğu ve kök oluşum oranı üzerine etkisine ait varyans analizi	49
Çizelge 4.17.	Farklı meristem kullanımının sürgün uzunluğu üzerine etkisi	50
Çizelge 4.18.	Farklı ortamların köklenme yüzdesi üzerine etkisi	50
Çizelge 4.19.	Uç meristemi ve 1. koltukaltı meristeminden TDZ ve NAA içeren ortamda sürgün ve kök gelişimine ait varyans analizi	51
Çizelge 4.20.	TDZ ve NAA içeren iki ortamın uç ve 1. koltukaltı meristeminden oluşan sürgünlerin sayısı üzerine etkisi	51
Çizelge 4.21.	TDZ ve NAA içeren ortamın uç ve 1. koltukaltı meristeminden oluşan yan sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluğu üzerine etkisi ...	52
Çizelge 4.22.	TDZ ve NAA içeren iki ortamın uç ve 1. koltukaltı meristeminden sürgün oluşumu ve gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi	52
Çizelge 4.23.	Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının sürgün gelişimi üzerine etkisi	53
Çizelge 4.24.	Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının uç ve 1. koltukaltı meristeminden sürgün, yan sürgün ve kök oluşumu üzerine etkisine ait varyans analizi	53
Çizelge 4.25.	Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının sürgün ve yan sürgün oluşumu üzerine etkisi	54
Çizelge 4.26.	Meristem tipinin sürgün sayısı üzerine etkisi	54
Çizelge 4.27.	Ortamların ve eksplantların sürgün ve kök uzunluğuna etkisi	55
Çizelge 4.28.	TDZ ve NAA içeren sıvı ortamda dört farklı eksplanttan sürgün ve kök gelişimine ait varyans analizi	59
Çizelge 4.29.	TDZ ve NAA içeren sıvı ortamda dört farklı eksplantın sürgün ve kök gelişimi.....	60
Çizelge 4.30.	TDZ ve NAA içeren sıvı ortamda dört farklı eksplantın yan sürgün sayısına etkisi	61
Çizelge 4.31.	Kin, TDZ ve NAA içeren ortamda yaprak ve gövdeden sürgün	

	rejenerasyonuna ait varyans analizi	62
Çizelge 4.32.	Kin, TDZ ve NAA'nın sürgün sayısı üzerine etkisi	63
Çizelge 4.33.	Farklı eksplantların sürgün sayısı ve uzunluğu üzerine etkisi	63
Çizelge 4.34.	Kin, TDZ ve NAA'nın yan sürgün sayısı ve kök uzunluğu üzerine etkisi	65
Çizelge 4.35.	Yaprak ve gövde eksplantlarının kök uzunluğu üzerine etkisi.....	66
Çizelge 4.36.	Kin ve NAA içeren ortam ve MSO ortamda yaprak ve yaprak sapından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	67
Çizelge 4.37.	Farklı eksplantın sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluğuna etkisi...	68
Çizelge 4.38.	Farklı ışık yoğunluğunun bitki ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi	70
Çizelge 4.39.	Bitkiciklerin elde edildiği ortamın deneme başlangıcındaki bitkicik boyuna etkisi	71
Çizelge 4.40.	Bitkiciklerin elde edildiği ortamın bitkilerdeki uzamaya etkisi	72
Çizelge 4.41.	Işık yoğunluğunun bitkilerdeki uzamaya etkisi	74
Çizelge 4.42.	Bitkiciklerin elde edildiği ortamların ve ışık yoğunluğunun akvaryumda yan sürgün sayısı üzerine etkisi	74
Çizelge 4.43.	Bitkiciklerin elde edildiği ortamların köklerin başlangıç boyları ve uzama miktarına etkisi	75
Çizelge 4.44.	Farklı su sıcaklığının bitkiciklerin elde edildiği ortamın bitki gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi	77
Çizelge 4.45.	Bitkinin elde edildiği ortamın deneme başlangıcındaki bitki boyuna etkisi	78
Çizelge 4.46.	Farklı akvaryum su sıcaklığı uygulamalarının bitki boyuna etkisi	79
Çizelge 4.47.	Bitkiciklerin elde edildiği ortamların bitkilerdeki uzama ve yan sürgün sayısına etkisi	79
Çizelge 4.48.	Farklı su sıcaklığının bitknini uzaması üzerine etkisi	80
Çizelge 4.49.	Bitkiciklerin elde edildikleri ortamların ve sıcaklıkların köklerdeki uzama miktarına etkisi	81
Çizelge 4.50.	ÇS ve PPM ile gövde ve yaprak eksplantının yüzey sterilizasyonu	82
Çizelge 4.51.	Farklı oran ve sürede uygulanan ÇS ve PPM ile yaprak eksplantının yüzey sterilizasyonu	83
Çizelge 4.52.	Farklı oran ve sürede uygulanan ÇS ve PPM ile gövde	

	eksplantının yüzey sterilizasyonu	83
Çizelge 4.53.	Farklı oran ve sürede uygulanan ÇS ve PPM ile yaprak sapı eksplantının yüzey sterilizasyonu	84
Çizelge 4.54.	Farklı oran ve sürede uygulanan ÇS ve PPM ile gövde eksplantının yüzey sterilizasyonu	84
Çizelge 4.55.	Yüzey sterilizasyonu yapılan yaprak ve yaprak sapı üzerinde sitrik asitin etkisi	85
Çizelge 4.56.	Yaprakta sukroz içermeyen ortamın bulaşıklık üzerine etkisi.....	86
Çizelge 4.57.	Farklı NAA konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkisine ait varyans analizi	86
Çizelge 4.58.	Farklı NAA konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	87
Çizelge 4.59.	Farklı ortam ve muamele sürelerinin sürgün oluşumu üzerine etkisine ait varyans analizi	89
Çizelge 4.60.	Farklı oranda ve sürede kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin sürgün oluşumuna etkisi	89
Çizelge 4.61.	Farklı oranda ve sürede uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerin sürgün gelişimine etkisi	90
Çizelge 4.62.	İki muamele süresinin sürgün gelişimine etkisi	90

SİMGELER DİZİNİ

BAP	⁶ Benzylaminopurine
2, 4-D	2, 4-Diklorofenoksi Asetik Asit
ÇS	Çamaşır Suyu
GA ₃	Giberellik Asit
g, mg, µg	Gram, Miligram, Mikrogram
HCl	Hidroklorik Asit
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
IBA	Indol 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
NBL	Nitsch'in Temel Sıvı Ortamı
NBS	Nitsch'in Temel Yarı Katı Ortamı
PIS	Sürekli Daldırma Yöntemi
PPM®	Plant Preservative Mixture
S.D.	Serbestlik Derecesi
SH	Schenk and Hildebrandt Temel Besin Ortamı
TDZ	Thidazuron (1 Phenyl 3-(1, 2, 3-thidiazol 5yL) urea)
TIS	Aralıklarla Daldırma Yöntemi
WPM	Woody Plant Medium (Ağaçsı bitkiler ortamı)
V.K.	Varyasyon Kaynakları

1. GİRİŞ

Sucul ortamın asıl üreticileri olan su bitkileri, tek hücreliden çok hücrelilere kadar çeşitli şekilleri olan ve klorofil içeren canlılardır. Ortamın dengesinin korunmasındaki önemleri büyüktür. Birincil üreticiler olarak tanımlanan yeşil bitkiler klorofil sayesinde fotosentez olayı sonucu organik madde üretimini sağlarlar. Böylece bitkisel protein kaynaklarını oluştururlar. Bu nedenle akvatik ortamdaki besin zincirinin ilk halkasıdır. Klorofil taşıyan bitkisel organizmalar ayrıca fotosentez aktivitesiyle oksijen oluşturup suyun oksijenasyonunu sağlarlar. Su bitkileri kirliliğin biyolojik yöntemlerle saptanmasında önemli belirleyici organizmalardır. Bazı bitkiler suların arıtımında da kullanılmaktadır (Cirik vd 2001).

1.1. Tatlı Su Bitkilerinin Sınıflandırılması

1.1.1. Sucul ve bataklık ortamlardaki bitki grupları

Bir göl kıyısındaki bitkilere bakıldığında yaşam ortamlarına göre üç grup altında sınıflandırılabilir (Cirik vd 2001):

a. Hidrofit topluluk: Suda yüzen bitkilerin oluşturduğu grup

b. Amfibi topluluk: Kıyıya yakın, bir kısmı su içinde, bir kısmı karada gelişen bitkiler grubu

c. Helofit topluluk: Islak, nemli alanlarda gelişen bitkiler grubu

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

-Akarsulardaki hidrofit topluluklar: *Ranunculus* ve *Fontinalis* türleri vb.

-Durgun sulardaki hidrofit topluluklar : *Potamogeton*, *Sagittaria*, *Elodea*, *Nymphaea*, *Myriophyllum*, *Alisma*, *Trapa* vb.

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

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

- Alüvyonlu topraklardaki amfibi bitki toplulukları : *Polygonum* vb.

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

1. Helofit topluluklar : *Phragmites*, *Scirpus*, *Typha* vb.

2. Kamış toplulukları : *Carex* vb.

1.2. Su Bitkilerinin Kullanım Alanları

Sudan öncelikle günlük ihtiyaçları olmak üzere çeşitli şekillerde yararlanan insanoğlu başta balık ve su bitkileri dahil olmak üzere çeşitli su ürünlerini gıda ve değişik sektörlerde değerlendirmektedir (Cirik vd 2001).

1.2.1. Sucul bitkilerin insan gıdası olarak kullanımı

Uzak Doğu'da su kestanenin yetiştiriciliği yapılmaktadır. Çin'de su kestanesine benzer emergent bir tür olan *Eleocharis dulcis* sulak alanlarda, genelde pirinçle dönüşümlü olarak yetiştirilir. Diğer su kestaneleri de (*Trapa natans*) Akdeniz bölgesinde yetiştirilmektedir. *T. natans*'ın tuhaf ve dikenimsi meyvelerinin içinde büyük, etli tohumları vardır. Bunlar da yenilmekte, bu sebeple yetiştiriciliği ve ticari olarak dağıtımı yapılmaktadır.

Dünyanın farklı bölgelerinde çeşitli sucul bitkilerin taze yaprakları tüketilmektedir. ABD'de düzenli olarak tüketilen ve salatalarda kullanılan sucul bitkilerin birisi de su teresidir. Su teresinin hem yetiştiriciliği yapılmakta, hem de doğadan fazla miktarlarda toplanmaktadır.

1.2.2. Suyun biyolojik filtrasyonu için bitkilerin kullanımı

Sucul bitkiler, kanalizasyon veya atıksu arıtma sistemlerinin sıvı atıklarından ağır metallerin ayrılmasında kullanılmaktadırlar. Bu sistemlerin sıvı atıkları fosfor, azot ve diğer bitki besin elementlerini içerir. Atık sulardan bu metallerin uzaklaştırılması arıtmaya yönelik bir işlemdir. Kimyasal uzaklaştırma pahalıdır ve her element için ayrı bir işlem gereklidir. Bunlar dışında bitkiler diğer elementleri hatta fenol gibi organik kirleticileri de absorbe ederler. Genellikle serbest yüzen (*Scirpus*, *Phragmites* vb.) ve emergent (*Eichornia crssipes*, *Lemnaceae* vb.) bitkiler bu amaçla kullanılmaktadır.

1.2.3. Katkı ve destek maddesi olarak kullanımı

Dünyanın ılıman ve tropikal bölgelerinde geniş dağılıma sahip *Phragmites* genusunun türleri damların örtülmesi, çit yapımı, müzik enstrümanı yapımı ve ok yapımı gibi işlerde kullanılmaktadır. Avrupa'da yapı materyali olarak kullanılmaktadır.

Bu bitkilerden elde edilen lif kağıt, mukavva, selofan ve benzer ürünlerin ana maddesini oluşturmaktadır. Ayrıca su bitkilerinin lifleri izolasyon malzemesi, fiber tahta gibi daha kaba ürünlerin yapımında kullanılmaktadır. Hatta bunlar bina bloklarının içine sıkıştırılmaktadır. Bu bitkilerden alkol ve furfurol elde edilmektedir.

1.2.4. Gübre ve hayvan yemi olarak kullanımı

Hasat edilmiş sucul bitkilerin en sık kullanımları çiftlik hayvanları için yem ve gübre kaynağıdır. Kimyasal kompozisyonları gübre olarak kullanım için uygundur. Ancak kurutma ve taşıma işlemlerinde sorunlar görülebilmektedir. Kuru ağırlık esas alındığında sucul bitkilerinin çoğunun protein içeriği yoncadan yüksektir. Hayvan yemi olarak kullanımı besin içeriği, lezzeti, sindirilebilirliği ve maliyetine bağlıdır.

1.2.5. Süs bitkisi ve peyzaj amaçlı kullanımı

Yukarıda belirtilen kullanımlardan başka su bitkileri, yaygın olarak akvaryumlarda süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Ayrıca park ve bahçelerin düzenlenmesinde nilüfer gibi güzel çiçekli bitkiler kullanılmaktadır.

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

Akvaryum bitkileri, doğal yaşam ortamları tropikal ve subtropikal bölgeler olan canlılardır. Ayrıca akvaryum ortamında da aynı koşullara istek duyarlar. Tropik bitkiler 19-25 °C su sıcaklığı isterler. Derelerden toplanan ve soğuk sularda yaşama özelliği gösteren pek çok bitki için ısıtma gerekmez. Avrupa ve Kuzey Amerika kökenli *Elodea*, *Ceratophyllum*, *Ludwigia*, *Myriophyllum*, *Potamogeton*, *Sagittaria*, *Vallisneria*, *Azolla*, *Lemna* ve *Riccia* gibi cinsler bu gruba dahildir. Su bitkisi yetiştiriciliğinde önemli diğer etkenler ise besleyici tuzlar, ışık ve su kalitesi olarak sıralanabilir (Cirik vd 2001).

Bu tez çalışmasında *Hygrophila* cinsine ait bir su bitkisi olan *Hygrophila difformis* ve *Microsorium* cinsine ait *Microsorium pteropus* türü çalışılmıştır.

Hygrophila cinsi *Acanthaceae* familyasına aittir (Rataj ve Horeman 1997). Bu cins her kıtada olmasına rağmen türlerin çoğunun orjini Asya'dır. Bu cinse ait 90 civarında tür bulunmaktadır. Fakat hepsi tanımlanıp sınıflandırılmamıştır (Amano 2002). Bazı türlerin yaygın olarak görüldüğü ülkeler Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Bu bitkiler çeşitli amaçlarla kullanılmaktadırlar. Örneğin; *H. auriculata* bitkisi Hindistan'nın geleneksel tedavi sisteminde karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Shanmugasundaram ve Venkataraman 2005). *H. stricta* bitkisi geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite göstermektedir (Khan ve Omoloso 2002).

Çizelge 1.1. *Hygrophila* cinsine ait bazı türlerin dağılım alanları

Tür	Ülke	Kaynak
<i>H. angustifolia</i>	Doğu Asya, Endonezya, Avustralya, Yenizelanda	Cirik vd (2001)
<i>H. corymbosa</i>	Güney Doğu Asya	Cirik vd (2001)
<i>H. polysperma</i>	Hindistan, Malezya, ABD'nin Florida, Teksas ve Virginia Eyaletleri	Cirik vd (2001), Şahin (1997)
<i>H. stricta</i>	Papua Yeni Gine	Khan ve Omoloso (2002)
<i>H. difformis</i>	Hindistan Bangladeş, Butan, Nepal, Güney Asya	Amano (2002)
<i>H. lacustris</i>	Afrika'nın ılık Bölgeleri, Güney Asya	Rataj ve Horeman (1997)
<i>H. pogonocalyx</i>	Tayvan	Huang vd (2005)
<i>H. auriculata</i>	Pakistan, Çin, ABD	Ahmed vd (2007), Ding vd (2006)
<i>H. spinosa</i>	ABD, Hindistan (Kalkuta)	Godbole vd (1941), Dewanji vd (1997)

Bu tez kapsamında çalışılan *H. difformis* Türkiye'de akvaryumlarda kullanılan türlerden birisidir (Şekil 1.1.). Bu tür 'water wisteria' (su çınarı) olarak bilinmektedir. Anavatanı Asya'dır. 20-50 cm uzunluğa, 15-25 cm genişliğe sahiptir. 22-30 °C sıcaklıkta, orta dereceden çok yüksek derecelerde ışıkta gelişebilmektedir. Çok yumuşak sulardan çok sert sulara kadar geniş bir sertlik toleransı vardır. 5 ile 9 pH aralığında gelişebilmektedir. Akvaryum severlerin çok tercih ettiği bir bitkidir (Anonim 2008.a). Suüstü yaprakların uçları parçalıdır. Suüstü yaprakları koyu, sualtındaki yapraklar ise açık yeşil renklidir. Işıklı yerlerde çok çabuk gelişmektedirler. Yetersiz ışıklı yerlerde bitki dik, uzun

internodlu ve az parçalı ya da parçasız yapraklara sahip olmaktadır. Bitki termofilik olup akvaryumlarda 24 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda iyi gelişmektedir (Amano 2002).



Şekil 1.1. *Hygrophila difformis* bitkisinin görünüşü

Bu tez kapsamında çalışılan ikinci bitki *Microsorium pteropus* (Java fern); Polypodiacea familyasına aittir (Rataj ve Horeman 1997). Bu familyaya ait fernler epifitik (Başka bitkiler üzerinde yaşayan bitki) karasal, rizomlu, sürünücü, peltat (yaprak sapının kenardan değil yüzeyden bir noktadan yaprak ayasına bağlı olması) taşıyan, genel olarak koletrat (ksilem ve floemin üst üste bulunması), pullar bulduran bitkilerdir. Frondlar (eğreltiotu yaprağı) uzun ve artikulat vasküler (düzenli bir şekilde birbirine bağlı damarlar) yığın yuvarlak şekilde olmaktadır. Yaprak basit şekildedir. Bazen lob şeklinde bazen loblar rizomlarla birleşir bazen de stelat (yıldız şeklinde) tüylü ya da pulludur. Meyveler eksindusiat (kabuksuz) yuvarlak bazen uzun ve düz, yaprak üzerinde bazen de tüm yaprak üzerinde yayılmış durumdadır ve sporlar monolittir (tek parçalı) (Croft 1985).

Habitat olarak dereler şelaleler ya da bataklıklarda tamamen veya yarı gölgede kayalar üzerinde ya da çamurda bulunmaktadır. Java fern (Şekil 1.2.) denizden 25 ile 5000 m yükseklikte bulunmaktadır. Yağmurlu mevsimde su içerisinde uzun zaman kalabilmektedir (Holttum 1954). Bu bitki amfibiktir. İriyanca (Endonezya)'da bu bitki özellikle bataklıkta bol miktarda bulunmaktadır. Yayılış alanı Hindistan, Güney Çin, G.Batı Asya, Filipin, Endonezya ve Yeni Gine'dir. Bazı türlerin yaygın olarak görüldüğü ülkeler Çizelge 1.2.'de verilmiştir (Boufford vd 1993-2003).

Çizelge 1.2. *Microsorium* cinsine ait bazı türlerin dağılım alanları

TÜR	ÜLKE
<i>M. buergerianum</i>	Hindistan, Çin, Japonya, Tayvan
<i>M. dilatatum</i>	Hindistan, Çin, Güney Çin, Güney Çin, Tayvan
<i>M. fortunei</i>	Çin, Butan, Burma, Tayvan
<i>M. membranaceum</i>	Çin, Hindistan, Tayland, Tayvan, Filipinler
<i>M. pteropus</i>	Hindistan, Vietnam, Malezya, Çin, Tayvan, Filipinler
<i>M. punctatum</i>	Afrika, Hindistan, Vietnam, Güney Çin, Tayvan, Pasifik adaları
<i>M. rubidum</i>	Hindistan, Tayland, Çin, Tayvan, Malezya
<i>M. scolopendrium</i>	Hindistan, Güney Çin, Tayvan, Filipinler, Afrika, Polinezya
<i>M. steerei</i>	Vietnam, Güney Çin, Tayvan



Şekil 1.2. *Microsorium pteropus* bitkisinin görünüşü

1.3. Akvaryum Bitkilerinin Yetiştirme Teknikleri

Akvaryum bitkilerinin yetiştirme tekniklerinden birisi eşeysel üretilimdir. Vejetatif yolla ürememiş bir bitkinin çiçeğindeki polenler, bir fırça ile diğler bitkinin çiçeğine taşınabilir. Tohumların çimlendirilmesi yoluyla da üretim yapılabilir. Bu yöntem daha çok vejetatif üretimlerinde sorun bulunan bitkilerde uygulanmaktadır. İkinci üretim şekli ise eşeysiz üretilimdir. 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. Diğler bir yöntemde, büyüme rizomu bulunan bitkilerin rizomlarının küçük parçalar şeklinde kesilip su bulunan bir kaba yerleştirilmesi ve yeni bitkilerin elde edilmesidir. Bazı bitkilerde de yeni bitki elde etmek için yapraklar kullanılır. Kullanılan yöntemlerden biri de, ana bitkinin kesilerek üretimidir. Boğum bölgesi bulunan bitkilerde boğum bölgesinden kesim yapılarak toprağa dikilir ve yeni bireyler elde edilir (Cirik vd 2001).

Akvaryum bitkilerini çoğaltım yöntemleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

- a. Vejetatif Çoğaltım: Bitkinin herhangi bir vejetatif organından alınan örnek kalem, yaprak vb.'den çoğaltım yapılmaktadır. Su bitkisi çoğaltımında bu yöntem çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Vejetatif çoğaltım kolay, ucuz ve özel eğitim gerektirmeyen yöntemlerden biridir.
- b. Generatif (Tohumla) Çoğaltım: Bitki üzerinde gelişen tohum ya da spor kullanılmaktadır. Bu yöntem geleneksel olarak kullanılmaktadır. Örneğin Nilüfer, Samolus ve Cyperus bitkilerinde tercih edilen geleneksel bir yöntemdir.
- c. Mikroçoğaltım ve Doku Kültürü Yöntemleriyle Çoğaltım: Bitkiler steril ortamda çoğaltılmaktadır. Kullanılan eksplantlar koltukaltı meristemi, yaprak, petiol, hipokotil vb.'dir (Anonim 2008.b).

Fern bitkileri, Pteridophyta bölümüne aittir. Ve tohumsuz damarlı bitkiler olarak tanımlanmaktadır. Fern bitkilerinde, olgunlaşmamış protallus (haploit yapıdaki gametofit) tercih edilmektedir. Bitkiler ilk önce kontrollü koşullar (ışık, sıcaklık vb.) altında tutulmaktadır. Ortamlarda bitkiyi tutmak için jelleştirici bir madde, besin ortamları, şeker ve antibiyotik kullanılmaktadır. Bitkiler istenen boya ulaştığında akvaryum seralara

aktarılıp dış koşullara adaptasyon sağlanmaktadır. Örneğin Hygrophyla, Ludwigia, Rotola vb. bitkiler vejetatif çoğaltım yoluyla akvaryum ticaretinde kullanılmaktadır. Bitkiyi çoğaltmak için ana stok bitkilerin bulunması gerekmektedir. Ayrıca yavaş bir yöntem olmasının yanısıra ana stok bitkileri ve çoğaltılan bitkileri depolamak için çok yer gerektirmektedir. Bunun yanısıra bu yöntemde hastalık yayılma riski çok fazladır. Anubias gibi yavaş gelişen bitkilerin çoğaltımı da sorun olabilmektedir. Hızlı çoğaltım ya da doku kültürü geleneksel yöntemlere göre pahalı olmasına rağmen az yerde kısa sürede çok sayıda bitki üretilmektedir. Geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında doku kültürüyle bitki çoğaltımı hızlı ve maliyeti düşüktür. Ancak doku kültürü yapabilmek için özel tesis ve eğitilmiş personelin bulunması gerekmektedir. Doku kültürü ile yabancı ve tehlike altındaki flora kolayca muhafaza altına alınabilmektedir. Doku kültüründe tekniği optimize etmek için çok fazla zaman ve masraf gerekebilmesine rağmen optimizasyondan sonra fazla sayıda sağlıklı bitki elde etmek mümkün olmaktadır.

Türkiye’de son yirmi yıldan beri su ürünleri eğitimi ile birlikte su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli gelişmeler kaydedilmiş ve üretim artmış, ancak su bitkileri konusunda yeterince gelişme sağlanamamıştır (Öztürk 2002). Su bitkilerinin yoğun üretimine yönelik çalışmalar bulunmamaktadır. Üretim daha çok amatörce ve düşük miktarlarda olmaktadır. Kısa sürede fazla miktarda bitki elde edilebilen farklı yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerden biri de *in vitro* üretimdir. Doku kültürü tekniklerini kullanarak yapılan çoğaltım (mikroüretim) günümüzde, dünyada özellikle süs bitkilerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.4. *In Vitro* Üretim

1.4.1. Doku kültürü teknikleri

Doku kültürleri: Bitki doku kültürleri temelde bir üretim yöntemidir. Bilinen diğer klasik üretim yöntemlerinden farklı olarak bitkinin çeşitli kısımlarından alınan küçük bir parçanın (eksplant) sterilize edildikten sonra, çeşitli besin maddelerini içeren steril besin ortamında (*in vitro*) ve uygun çevre koşullarında (ışık, sıcaklık) kültüre alınması işlemidir. Bu nedenle yöntemin diğer adları “ mikro üretim” veya “aseptik kültür”dür (Gönülşen 1987).

Bitki doku kültürü alanındaki ilk çalışmalar 19. yüzyılın sonları ve 20. yüzyılın başlarında yapılmıştır. Ancak kullanılan eksplantların ve yetiştirme ortamlarının uygun olmayışı sebebiyle başarı sağlanamamıştır. 1960’lı yıllarda uygun besi ortamının bulunmasıyla

gözle görülür ilerlemeler kaydedilmiştir. Bugün elde edilen sonuçlar laboratuvar dışına çıkarak pratikte ve ticarete kullanım alanı bulmuştur (Er ve Canpolat 1992).

Bitki doku kültürleri tekniğinin esasları başlıca üç ana kısımdan oluşmaktadır:

1. Kültürün gelişmesi için gerekli organik ve inorganik maddeleri içeren steril bir gıda ortamının hazırlanması,
2. Bakteri, mantar veya her ikisini taşıyan ve kültüre alınacak bitki parçasının (eksplant) orijini oluşturulan ana materyalin dezenfekte edilmesi,
3. Orijin bitkiden istenen eksplantın (meristem, anter, embriyo, yaprak ucu vb.) alınarak steril gıda ortamına, steril şartlarda konulması ve gelişmesi için uygun çevre şartlarına yerleştirilmesidir (Gönülşen 1987) .

Bitki doku kültürlerinin avantajları şöyle sıralanabilir (Er ve Canpolat 1992).

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

Bitki doku kültürü çalışmalarının kullanım amaçlarına göre birbirinden ayrılan değişik uygulamaları vardır:

- Organogenesis
- Embriyogenesis
- Protoplast Kültürü ve Somatik melezleme

-Haploit Bitki Üretimi

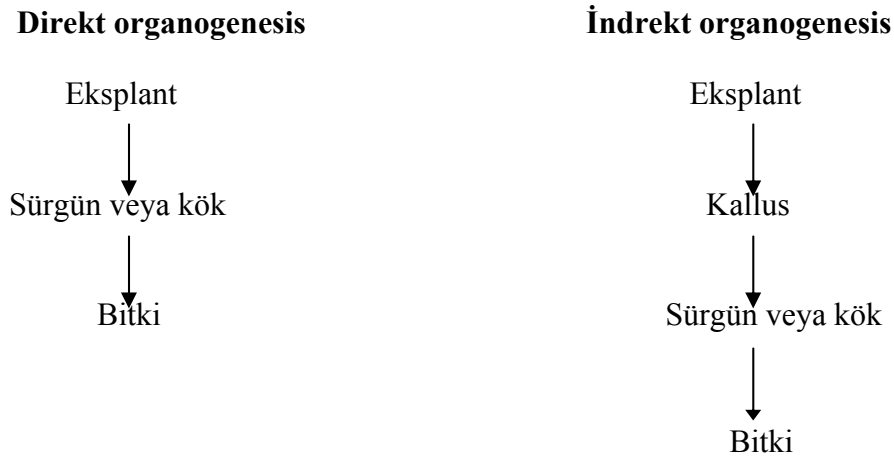
-Meristem Kültürü

1.4.2. Organogenesis

Organogenesis, hücre ve dokulara baskı uygulayıp bazı değişikliklere sebep olunarak sürgün veya kök primordiyumu (taslağı) diye isimlendirilen tek kutuplu ve vasküler sistemi kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının meydana gelmesine yol açan bir işlemdir (Gürel ve Türker 2001).

Normalde bir bitkinin tohumunu oluşturan hücreler, büyüme ve farklılaşma dönemi geçirerek bitkinin kök, gövde ve yapraklar gibi farklı organlarını oluştururlar. Farklı hücre tiplerinin ortaya çıkmasına yol açan bu değişiklikler bitkinin normal hayat döngüsünde yaşamının sonuna kadar aynı kalır. Ancak, yapılan araştırmalar; tamamen farklılaşan hücrelerin eğer bozulmamış bir hücre membran sistemi ve canlı bir çekirdeğe sahip ise tekrar meristematik bir özellik kazanarak mitotik bölünme gösterebileceğini ortaya koymuştur. İşte bu bölünmeler sonunda ya doğrudan adventif sürgün veya kök (direkt organogenesis) ya da hücreler yığını olan kallus ve bu kallusdan sürgün ya da kök (indirekt organogenesis) meydana gelir (Gürel 1997). İndrekt organogenesisde eksplant belirli bir form ve polaritesi olmayan hücre yığınlarının (kallus) oluşması için uyarılır. Daha sonra bu kallus üzerinde meristematik bir merkez ve ardından sürgün ya da kök oluşumu gözlenir. Direkt organogenesisde ise; hiç kallus gelişimi olmadan sürgün gelişimi izlenir.

Organogenesis çeşitleri



Şekil 1.3. *In vitro* bitki rejenerasyonunda görülen organogenesis çeşitleri

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

1.4.3. Embriyogenesis

Bitki hücrelerinden embriyo elde edilmesi döllenmiş yumurta hücresiyle sınırlı değildir. *In vitro* kültür şartlarını ve özellikle de bitki büyüme düzenleyicilerini ayarlayarak bir bitkinin herhangi bir somatik hücre, doku veya organından embriyo elde etmek mümkün olabilmektedir. Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak adlandırılır (Özcan vd 2001). Somatik ve zigotik embriyogenesis arasındaki önemli fark elde edilmiş yöntemlerinden kaynaklanmaktadır. Zigotik embriyo döllenmiş bir zigottan geliştiğinden dolayı, elde edilen bitkiler potansiyel olarak açılma gösterirler. Öte yandan, bireysel bitkilerin hücrelerinden geliştikleri için somatik embriyolardan elde edilen bitkiler genetik olarak klon oluştururlar (Bournman 1994). Döllenmiş yumurtadan gelişen embriyoda olduğu gibi, iki çenekli bitkilerde somatik embriyolar da “globular, kalp, torpido ve kotiledon oluşum safhalarını geçirirler. Öte yandan, somatik embriyolar organogenesis yoluyla gelişen sürgünlerden farklılık gösterirler. Gövde- kök eksenine aynı zamanda sahip olup, asıl doku ile vasküler bağlantıları olmadığından dolayı dokudan kolaylıkla ayrılabilirler (De Jong vd 1993).

Somatik embriyogenesis ilk defa havuç bitkisinin somatik dokularından elde edilmiştir. Genel olarak somatik embriyo için çok değişik bitki kısımları kullanılmaktadır. Ancak olgunlaşmamış zigotik embriyolar somatik embriyogenesis için önemli bir kaynak oluşturmaktadır (De Jong vd 1993, Parrott vd 1993). Eksplant kaynağı, genotip, bitki büyüme düzenleyicileri, azot kaynağı ve çevre şartları gibi etmenler somatik embriyogenesisi önemli ölçüde etkileyen faktörlerdir. Somatik embriyogenesis iki farklı yöntemle elde edilebilmektedir.

1. Direkt Somatik Embriyogenesis: Bu tip somatik embriyogenesis; embriyo kallus oluşumu olmadan direkt olarak somatik bir hücreden oluşur. Bu tip hücrelere

embriyogenik hücreler adı verilir. Bu tip somatik embriyogenesis için çok genç bitki doku ve hücreleri kullanılır. Örneğin anterler içinde bulunan çok genç polen tanelerinden ve hipokotilin epidermal hücrelerinden bu tip embriyogenesis elde edilebilir (Pollard ve Walker 1990).

2. İndirekt Somatik Embriyogenesis: Bu tip embriyogenesisde önce kallus oluşur. Daha sonra bu kallustan somatik embriyolar oluşur. Somatik embriyo oluşturan kallusa embriyonik kallus adı verilir. Embriyonik kallus ; kompakt yapıda ve beyazdan açık sarı renge kadar değişen renklerde dir. Embriyonik kallus genellikle başlangıçta yavaş büyüme gösterir. Bununla beraber bazı türlerde hızlı büyüme gösteren embriyonik kallus elde edilmiştir. Bazı durumlarda önce yumuşak, embriyonik olmayan kallus oluşur. Daha sonra bu kallusun belirli bölgelerinde kompakt yapıdaki embriyonik kallus oluşur. Besi ortamında oksin konsantrasyonu belirli düzeyde tutulduğu sürece embriyogenik kallusta hücreler sürekli olarak bölünürler. Embriyogenik hücreler; küçük, ince hücre duvarlı, sitoplazmaca zengindirler. Ve çok sayıda küçük vakuoller ve nişasta taneleri içerirler (Er ve Canpolat 1992, Pollard ve Walker 1990).

Besi ortamında oksin konsantrasyonu düştüğünde veya embriyogenik kallus büyüme düzenleyicisi içermeyen besi ortamına aktarıldığında, embriyogenik kallus üzerinde somatik embriyolar oluşur. Oluşan bu somatik embriyolardan zigotik embriyolarda olduğu gibi kök ve sürgün oluşur.

Somatik embriyoların döllenme sonucunda gelişen zigotik embriyolara göre en önemli üstünlükleri genetik açılmalarının olmamasıdır. Somatik embriyolar, kültüre alınan eksplantın somatik hücrelerinden gelişirler ve eksplantın alındığı bitkinin genotipini muhafaza ettirirler. Somatik embriyogenesis sonucunda oluşan ürün bir embriyo olup, tohum içerisinde bulunan embriyonun bir benzeridir. Daha da önemlisi somatik embriyolar tam bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Bu yüzden somatik embriyolar kaplanmış tohum olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Ayrıca somatik embriyogenesis gen aktarımında önemli bir potansiyele sahiptir (Hartmann vd 1990).

1.4.4. Meristem kültürü

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

- Mikroçoğaltım

- Virüssüz bitki elde edilmesi
- Germplasm muhafazası

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

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

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

Son yıllarda Dünyada akvaryum bitkilerinin üretim ve çoğaltımında büyük gelişmeler gözlenmiştir. Akvaryum bitkileri ticari amaçla büyük oranda üretilmektedir. Geçmişte önem gösterilmeyen akvaryum bitkileri ticareti bugünlerde çok güçlü ve hızlı gelişen bir endüstri haline gelmiştir. Birçok insan bu endüstriye parasal ve zamansal yatırım yapmaktadır. Bu yüzden gelecekte çok hızlı ve enteresan gelişmeler beklenmektedir. Bu çalışmanın amacı da ekonomik önemi olan akvaryum bitkileri *Hygrophila difformis* ve *Microsorium pteropus*'un *in vitro* koşullarda çoğaltımıdır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

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

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

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

Kane vd (1988), Amerikan nilüferi *Nelumbo lutea*'nın embriyosunu *in vitro* koşullarda izole etmişler ve BAP, Zeatin, GA₃ ya da ABA içeren yarım kuvvette sıvı MS ortamda kültüre almışlardır. Rizom gelişiminde, BAP ve Zeatinin etkisi olmamış ve 290 μ M GA₃ içeren ortam en iyi sonucu vermiştir. 0.38 μ M ABA içeren ortam rizom gelişimini

engellemiştir. Tohumlar % 50' lik etanolde 1 dakika bekletilmiş ve % 2.6 sodyum hipoklorit ile 12 dakika muamele edilip 3 defa saf su ile durulama işlemi uygulanmıştır.

Straub vd (1988), su bitkisi *Phragmites australis*' in olgun tohumlarını 1 mg/l 2,4-D ve IAA içeren besi ortamında doku kültürüne almışlardır. Katı, sarı, parlak ve embriyogenik kallustan sonra IAA'siz ortamda çok sayıda bitki elde etmişlerdir. Yapılan histolojik çalışma hem embriyogenik hücrelerin elde edildiği hem de rejenera olan sürgünlerin embriyogenik olduğunu göstermiştir.

Cook vd (1989), su bitkisi *Kosteletzkya virginica*' nın olgunlaşmış embriyo ve gövde eksplantlarını kültüre alarak 30 g/l glukoz, 2 mg/l IAA ve 1 mg/l Kin içeren MS ortamında kallus yoluyla rejenerasyon sağlamışlardır. Gövde ve kök kullanılarak kallus yoluyla bitki rejenera edilip, değişik sitokinin ve oksin içeren karbonhidratlı ortama aktarılmıştır. Histolojik olarak meristematik bölgeler, gövde ve kök ucu incelenmiş ve somatik embriyo oluşmadığı anlaşılmıştır. *Kosteletzkya virginica* tohumlarının yüzey sterilizasyonunda sülfirik asit ve etanol kullanmışlardır. Bir saat H₂SO₄ ile muamele edilen tohumlar, çeşme suyunda durulanmış ve % 95'lik etanolde 10 dakika bekletilmiştir. Tohumlar gece boyunca steril saf suda bekletildikten sonra yine % 95'lik etanolde 5 saniye bekletilmiş ve kurutulmuştur.

Straub vd (1989), su bitkisi *Distichlis spicata*' nın olgun tohumlarını kullanarak doku kültürü çalışmaları yapmışlardır. Katı, beyaz ve rejenera kabiliyeti olan kalluslar oluşmuş ve üzerinde turuncu-yeşil çizgiler gözlenmiştir. Rejenerasyon ortamına oksin yerine 1 mg/l BAP ilave edince rejenera kabiliyeti yükselmiştir. Yapılan histolojik çalışmalar hücrelerin embriyonik olduğunu göstermiş fakat rejenerasyon sürgün organogenesisi ile elde edilmiştir. Rejenera olan bitkiler doğal koşullarda tohum ve çiçek oluşturmuştur. Tohumların yüzey sterilizasyonunda çamaşır suyu veya etanol kullanılmıştır. Tohumlar 15 dakika çamaşır suyunda bekletildikten sonra 3 defa steril saf su ile durulanmıştır. Diğer bir yöntemde ise, % 95' lik etanolde 15 dakika bekletme ve durulamadan sonra kurutma uygulanmıştır.

Jenks vd (1990), Su zambak bitkisinde *in vitro* bitki rejenerasyonu çalışmasını yapmışlardır. Yaprak (Epiphyllous bitki) eksplantı 30 dk çeşme suyunda tutulduktan sonra 90 sn % 50 etanolla muamele edilmiş ve 5 dk durulama yapılmıştır. Daha sonra 12 dk %

1.31'lik NaOCl ve Tween-20 (2d/100ml) ile 5 dk muamele edildikten sonra 3 kere durulanmıştır. Besi ortamı olarak üç ortam kullanılmıştır. Birinci ortam ; MS ve 0.56 mM myo-inositol, 1.2 µM thiamin-HCL ve 10 µM 2IP ve 3 µM IAA ve 87.6 mM sukroz İkinci ortam ; Birinci ortama % 0.8 agar ilave edilmiştir. Üçüncü ortam ; MS+0.56 mM myo-inositol, 1.2 µM thiamin-HCL ve 3 µM TDZ ve 3 µM IAA ve 87.6 mM sukroz. 150x25 mm kültür tüpleri kullanılmış, 25±2 °C'de 16 saat fotoperiyot uygulanmış ve polypropilen membran raftlar kullanılmıştır. En iyi sonuç III. ortamdan ve bitki başına ortalama 8 adet aerial yaprak elde edilmiştir.

Kane vd (1990), akvaryum bitkisi *Cryptocoryne lucens*' in sürgün oluşumunu ve *ex vitro* koşullara adaptasyonunu incelemiştir. 2 µM BAP, 0.5 µM NAA ve % 0.8 agar içeren LS besin ortamında sürgün rejenerasyonunu optimize etmişlerdir. 35 günde sürgün rejenerasyonu görülmüştür. En fazla sürgün rejenerasyonu tek koltukaltı eksplantı kullanılarak, (7.7 adet/eksplant başına) 20 µM BAP ve 0.5 µM NAA içeren LS ortamda elde edilmiştir. 18 hafta sonunda en iyi adaptasyon topraksız bitki ortamı ya da poliüretan köpük tablalarda gerçekleştirilmiştir.

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

Bird 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 mM 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 mikroçoğaltımı konusunda çalışmışlardır. Yüzey sterilizasyonundan sonra embriyolar NBS (Nitsch'in temel yarı katı ortamı) ortamına yerleştirilerek bitkiler elde edilmiştir. Bu filizlerden sürgün ucu ve nodal kısımlar alınarak NBL (Nitsch'in temel sıvı ortamı) ortamında kültüre alınmıştır. Rejenere olan sürgülerden alınan eksplantlar çeşitli bitki büyüme düzenleyici bulunan NBL ortamına yerleştirilmiş ve sürgün uzunluğu, dallanma, nod sayısı ve kök gelişimi gibi özellikler incelenmiştir. Oksin axillary tomurcuk üretimini engellemiş ancak yeşil kök oluşumunu artırmıştır. Absisik asit genç yaprak gelişimini engellemiştir. 10^{-6} M BAP axillary dal üretimini artırmada çok etkili olmuştur. Bu dallar NBL'ye transfer edildiğinde gövde uzaması ve köklenme görülmüştür.

Purohit ve Singhvi (1998), *Achras sapota* bitkisinin mikroçoğaltımını yapmışlardır. Kotiledon boğum kullanılmıştır. 2 mg/l BAP içeren SH (Schenk and Hildebrandt's medium) ortamda, 42 günde eksplant başına ortalama 2.17 cm uzunluğunda 3 adet sürgün elde edilmiştir. Bundan sonra eksplantlar 21 günlük ara ile 3 kere kültüre alınmıştır. Her alt kültürde eksplantlardan 3 kat daha fazla sürgün elde edilmiştir. Ortama 1mg/l Giberellik asit ilave edildiğinde hem sürgün çoğaltımında hem de sürgün gelişiminde olumlu etkisinin olduğu görülmüştür. Elde edilen sürgünler 200 mg/l IBA ile muamele edildikten sonra 1/2 SH ortama yerleştirilmiş ve % 66 oranında köklenme sağlanmıştır. Deneme sonunda 500 bitki elde edilmiş ve 440 tanesi başarılı bir şekilde adapte edilmiş ve toprağa aktarılmıştır.

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

Das vd (1999), *Litchi chinensis* türünde iki yöntem kullanarak sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Birinci yöntemde; tohumlar 20 mg/l BAP içeren MS ortamda kağıt köprüler üzerinde çimlendirilmiştir. İkinci yöntemde; bitkinin koltukaltı meristemleri her iki günde bir 100 µg BAP ile muamele edilmiştir. Birinci yöntem ile kotiledon noddan 4 hafta içerisinde 27.5 sürgün elde edilmiştir. İkinci yöntemde ise her koltukaltı meristeminden 8

hafta içerisinde 8 sürgün elde edilmiştir. İkinci yöntemde yani implanta muamelesinde; ilk önce steril filtre kağıtları steril su ile ıslatıldıktan sonra koltukaltı meristemlerin üzerine sarılmıştır. Sonra üzerine değişik oranlarda BAP uygulanmıştır. Her iki yöntem bitkinin 5 genotipinde denenmiş ve iyi sonuç alınmıştır. Elde edilen sürgünler 25 mg/ml IBA ile 15 dk muamele edilmiştir. Bütün genotiplerde köklenme elde edilmiştir. Bu bitkinin doku kültüründe “Bavistin” fungusiti ve organik nutrient maddeler içermeyen ortam kullanılarak fungus bulaşıklığı kontrol altına alınmıştır.

Guillermo vd (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 11. günde gözlenmiştir.

Kane vd (1999), *Cryptocoryne wendtii*' nin *in vitro* çoğaltımını yapmışlardır. Bitki, yüzey sterilizasyonu için 15 dk çeşme suyunda tutulduktan sonra 12 dk % 1.05'lik NaOCl+Tween-20 (1d/100ml) ile muamele edilmiştir. Daha sonra 1dk % 50'lik etanol ile 5 dk muamele edildikten sonra 3 kere durulama yapılmıştır. Denemede katı ortam üzerine sıvı ortam ilave edilerek ikili ortam kullanılmıştır. I. ortam ; MS, 0.56 mM myo-inositol, 1.2 µM thiamin-HCL ve 87.6 mM sukroz, 2.2 µM BA, 0.57 µM IAA ; 87.6 mM sukroz ve % 0.8 agar II.ortam; MS, BA (0-25µM), IAA (0-10 µM). Sürgün ucu, katı ortama yerleştirilmiştir. 150x25 mm kültür tüpleri kullanılmış ve 25°C'de 16 saat 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 8 hafta sonra yüksek kaliteli satışa hazır bitkiler elde edilmiştir.

Suri vd (1999), bu çalışmada *Curculigo orchioides* bitkisinde direkt Organogenesis ve *in vitro* koşullarda adventif soğan oluşumunu gerçekleştirmişlerdir. Yaprak eksplantından 4.4 µM BAP içeren B5 besi ortamında eksplant başına 4 adet ve yer altı gövdeden 10 adet sürgün elde edilmiştir. 22 µM ya da fazla oranda BAP konsantrasyonu yaprak eksplantlarından sürgün gelişimi üzerinde olumsuz etkiye neden olmuştur. Gövde eksplantından gelişen kallus üzerinde 8.8-35.2 µM BAP içeren ve 0.12- 0.23 mol sukroz içeren ortamlarda çok sayıda adventif soğan gözlenmiştir. Eksplant başına en fazla

soğancık 35.2 µM BAP ve 0.18 M sukroz içeren ortamdan elde edilmiştir. İzole edilen soğancıklar, 35.2 µM BAP ve 0.23 M sukroz içeren ortama aktarıldığında sekonder soğancıklar (6 adet soğancık/eksplant başına) oluşmuştur. Soğancıkların köklendirilmesi için bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamlara aktarılmıştır. Elde edilen bitkilerin % 90'ı başarı ile toprağa aktarılmış ve adapte edilmiştir. Bitkiler bir sezon soğuğa maruz kaldıktan sonra gelişmeye devam etmişlerdir.

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

Lopez-Escamilla vd (2000), *Picea chihuahuana* türünde zigotik embriyoları kullanarak adventif embriyo oluşumunu gözlemişlerdir. Embriyo oluşumu için BAP ve NAA, Kin ve 2,4-D içeren ve içermeyen B5 besi ortamı kullanılmıştır. Kin içeren ortamlarda 14 günde, BAP içeren ortamda ise 17 günde embriyo oluşumu gözlenmiştir. Embriyo oluştuktan sonra % 50 makro-mikro elementler içeren ve içermeyen, Bitki büyüme düzenleyici içeren ve içermeyen ortamlarda 30 gün bırakılmıştır. 15 gün sonra gelişen embriyolar 1/2 SH besi ortamında bırakılmışlardır. En fazla embriyo oluşumu 3 mg/l Kin içeren ortamdan (5 adet) ve 5 mg/l BAP içeren ortamdan (7 adet) elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler, köklendirmek amacıyla 3 ve 5 mg/l IBA içeren sıvı yarım kuvvette SH ortamda 24 ve 48 saat bekletilmiştir. Sonra sürgünler bitki büyüme düzenleyici içermeyen yarım kuvvette SH ortamda kağıt köprüler üzerinde bırakılmıştır. Histolojik analiz sonuçları Somatik embriyo oluşumu için Kin'in BAP'a göre daha erken uyarı verdiğini gözlemişlerdir.

Te-chato 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. 2.22 µM BAP ve 2.25 µM TDZ içeren MS ortamda % 66.8 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallus başına ortalama 4.45 adet

sürgün ucu 4 alt kültürden sonra elde edilmiştir. 0.44 µM BAP içeren WPM (Woody Plant Medium) ortamında ortalama eksplant başına 9.3 sürgün elde edilmiştir. Sürgün uzaması için 5-6 sürgün aynı ortamda kültüre alındıktan sonra 0.32 µM NAA ve 0.13 µM BAP içeren sıvı ½ MS ilave edilmiştir. 1.11 µM BAP ve 0.25 g aktif kömür içeren WPM'da % 68.2 oranında köklenme elde edilmiştir. Bitkiler saksılara aktarılmış ve başarılı bir şekilde adaptasyon sağlanmıştır.

Chen vd (2001), *Oncidium* cinsinde çiçeklerin canlılık süresini artırmaya çalışmışlardır. Çiçek sapları, çiçeklerin uzun süre canlı kalabilmesi için 50 mg/l Kin ve 40 gr/l sukroz içeren ortamda bekletilmiştir. Yalnız Kin veya Sukroz içeren sıvı ortamda bekletilen çiçek dallarındaki sonuçlar Kin ve sukrozun birlikte kullanılmasına göre daha düşük olmuştur. Çiçek saplarının ilk önce Kin ve sonra sukroz içeren ortama konulması daha iyi sonuç vermiştir. Gibberalisk asitin bir etkisi gözlenmemiştir.

Öztürk (2002), *Ludwigia sp*'nin *in vitro* hızlı çoğaltımı çalışmasını yapmıştır. Yüzey sterilizasyonu için bitki 15 dk çeşme suyunda tutulmuş ve 9 dk % 20'lik ticari çamaşır suyuyla muamele edildikten sonra 3 dk 3 kere durulama işlemi yapılmıştır. Uç meristemi, birinci, ikinci ve üçüncü-dördüncü koltukaltı meristem eksplantları 4 hafta MS, % 3 sukroz, % 0.8 agar, BAP (0.1, 0.2 ve 0.3 mg/l), TDZ (0.05, 0.1, 0.15 mg/l), NAA (0.1 mg/l) içeren ortamlarda tutulduktan sonra ½ MS ortama alınmış ve 4 hafta bu ortamda tutulmuştur. Petri ve Magenta GA-7 kültür kapları kullanılmış ve 24 ± 1°C'de 16 saat fotoperiyot uygulanmıştır. En fazla sürgün (12.31 adet/eksplant) uç meristemi ile 0.05 mg/l TDZ ve 0.1mg/l NAA içeren MS besisi ortamından elde edilmiştir. Rejenere olan sürgünler 10-20 mm uzunluğa geldiklerinde kesilerek steril Magenta GA7 veya cam kavanozlar (baby jar) içinde ½ MS ortamda köklendirmeye alınmıştır. Burada köklenen sürgünler daha sonra akvaryum ortamına adapte edilmiştir. Akvaryum suyunun pH'sı 7 ve sıcaklığı 24°C ± 2° C'de tutularak 12 saat ışık ve 12 saat karanlık fotoperiyodunda gelişmeye bırakılmıştır. Akvaryum dibine 1-2 cm yüksekliğinde ince kum yerleştirilmiş ve akvaryum suyuna haftada bir sıvı gübre (FloraPride, Tetra Plant) ilave edilmiştir.

Damiano vd (2003), çilek, armut, elma ve su bitkisi *Hygrophila corymbosa sp. Stricta*'nın hızlı çoğaltımında TIS (Aralıklarla daldırma) yöntemi, durgun sıvı ve agar ile katılaştırılmış ortam arasında karşılaştırma yapmışlardır. Çilek bitkisinde TIS yönteminde

daha fazla sürgün rejenerasyonu görülmüştür. Armutta ise sonuçlar genotipe bağlı olarak değişmiştir. Fakat yine TIS yöntemi ile daha fazla sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Bunun yanısıra TIS ile çoğaltılan sürgün uçlarında nekrozis gözlenmemiştir. Benzer şekilde *H. corymbosa* bitkisinde de TIS yönteminde diğer yöntemlere göre daha fazla sürgün oluşmuştur. Tüm yöntemlerde sıvı ortamda yüksek oranda vitrifikasyon gözlenmesine rağmen TIS ile geliştirilen bitkilerde vitrifikasyon görülmemiştir. Çilek bitkisinde 0.3 mg/l BAP, 0.1 mg/l IBA, 0.1 mg/l gibberalisk asit içeren pH 5.7 olan MS ortamı kullanılmıştır. Armut bitkisinde 0.5 mg/l Nikotinic asit, 0.5 mg/l piridoksin, 2 mg/l glisin, 0.5 mg/l Tiamin-HCl, 150 mg/l inositol, 1 mg/l Ca-Pantotinat, 0.1 mg/l biyotin, 0.5 mg/l riboflavin, % 2 sukroz, 0.4 mg/l BAP, 0.05 mg/l IBA içeren ve pH 5.7 olan MS ortam kullanılmıştır. Elma bitkisinde 0.4 mg/l BAP, 0.05 mg/l IBA içeren ve pH 5.6 olan MS ortam kullanılmıştır. *Hygrophila* bitkisinde % 2 sukroz, 0.6 mg/l gibberalisk asit içeren pH 6.8 olan ortam kullanılmıştır. Denemelerde her muamelede 10 eksplant kullanılmış olup 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. En son değerler 60 gün sonra kaydedilmiştir.

Moncaleán vd (2003), bu çalışmada, *Actinidia deliciosa* türünün sürgün uçlarını değişik oranda BAP ile muamele ettikten sonra seluloz ile sabitleştirilen MS ortama yerleştirmişlerdir. 4.4 µM BAP ile 30 dk, 1 gün, 2 gün, 35 gün muamele edilmiş eksplantlardan gelişen bitkilerin yapraklarında Absisik asit, IAA, Zeatin, Dehidrozeatin Zeatinribosit, Dihidrozeatinribosit, N6 Isopentiladenin, N6 Isopentenil adenosin, oranlarına bakılmıştır. Analizler üç alt kültürden 31 gün sonra *ex vitro* koşullarda yapılmıştır. Çalışma sonucunda endogen fitohormonlar ve bitkinin gelişimi arasında bir etkileşim olduğu görülmüştür. En iyi bitkicikler 4.4 µM BAP ile 1 gün muameleden elde edilmiştir. Bu bitkilerde, diğer bitkilere göre yüksek oranda IAA, sitokininler ve Absisik asit kaydedilmiştir.

Vikrant ve Rashid (2003), *Paspalum scrobiculatum* bitkisinde doku kültürü çalışması yapmışlardır. Olgunlaşmış embriyolar 2,4-D içeren MS ve N6 besi ortamlarına yerleştirilmiş ve 5 haftada somatik embriyolar oluşmuştur. Somatik embriyolar 2,4-D içermeyen ortama yerleştirilmiş ve bitkiler elde edilmiştir. MS ve N6 ortamları kıyaslandığında; N6 ortamının somatik embriyogenesis için daha uygun olduğu gözlenmiştir. Eksplantların ilk aşamada 11 gün 100 µM 2,4-D ile muamelesinin somatik embriyogenesis için önemli olduğu gözlenmiştir. 2,4-D'nin en uygun muamele süresinin 4

ve 7 gün olduğu görülmüştür. Bu çalışma monokotil bitkilerde hem somatik embriyogenesis hemde sürgün rejenerasyonu açısından ilk çalışma olmuştur.

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

Anthony vd (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 kırılgan yapıya sahip olmuşlardır. Bu nedenle köklendirmek için kum ve arpa ortamı kullanılmıştır. Bu ortamda % 60 oranında kırılmayan kökler ve bitkiler elde edilmiş ve toprağa aktarılmıştır.

Anderson ve Levinsh (2004), olgun bitki dokularında düşük oranda morfogenezin sebeplerinden birinin sitokinin muamelesine tepki gösterilememesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada sitokininin etkisini artırmak için ilk önce *Pinus sylvestris* bitkisinin tomurcuk eksplantları soğukta bekletilmiştir. Yalnız 22 °C'de bekletilen tomurcuklarda sitokininin etkisi görülmemiştir. Fakat soğuk muamelesi yapılan eksplantlarda yüksek oranda BAP muamelesinin etkili olduğu ve tomurcuklardaki dormansiyi kırmak için hem fiziksel hemde biyokimyasal yöntemler kullanılarak fazla sayıda sürgün elde edilebileceğini belirtmişlerdir.

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

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

Panigrahi vd (2006), *Hygrophila auriculata* bitkisinin yaprak eksplantlarından BAP ve NAA içeren MS ortamda sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Yaprak eksplantından kallus yoluyla en iyi sürgün rejenerasyonu 2 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA içeren ortamda görülmüştür. 3 cm'den fazla gelişen sürgünler 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamda köklendirilmiştir. Elde edilen bitkilerin % 80'i başarıyla toprağa aktarılmış ve adaptasyon sağlanmıştır.

Husain vd (2007), *Pterocarpus marsupium* (kino zamkı) türünde çalışmışlardır. Bitkinin 18 günlük fidelerinden elde edilen kotiledon boğum eksplantları 0.1-10 µM TDZ içeren MS ortamda kültüre alınmıştır. En fazla sürgün yüzdesi (% 90) ve eksplant başına en fazla sürgün sayısı (15.2 Adet), 0.4 µM TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. Eksplantların uzun süre TDZ içeren ortamda bulunması sürgün uzunluğunda olumsuz etki yapmıştır. İlk aşamada; TDZ'nin etkisi ile sürgün oluşturan eksplantlar sürgün gelişimi ve uzaması için 5 µM BA içeren ortama aktarılmıştır. En fazla sürgün uzaması (% 90) 5.4 cm ortalama ile 5 µM BA içeren ortamdan elde edilmiştir. Fazla sayıda sürgün elde etmek amacıyla, sürgünler alındıktan sonra ana eksplant dokusu tekrar tekrar rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır. Böylece eksplant başına 44 adet sürgün elde edilmiştir. Sürgünlerin % 65'ninde en fazla sürgün başına 4.4 adet kök görülmüştür. Bu sürgünler 4 gün 200 µM IBA içeren ortamda bekletildikten sonra 0.2 µM IBA ve 3.96 µM floro glukinol içeren ortamda köklendirilmiştir. Elde edilen bitkiler ilk önce iklim odasında tutulmuş daha sonra seralara % 70 başarı ile aktarılmıştır.

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

Zalewska vd (2007), *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) (Karanfil) bitkisi ve 10 radyomutantının sürgün ucu ve yaprak eksplantları kullanılarak *in vitro* çoğaltım çalışması yapmışlardır. Çalışmanın amacı eksplant tipinin karanfil bitkisinin genotip ve fenotipi üzerindeki etkisinin incelenmesidir. Sürgün ucundan gelişen ve yaprak üzerinde gelişen adventif sürgünlerden elde edilen bitkiler *in vitro* koşullarda köklendirilmiştir. Adaptasyon sağlanmış ve çiçeklenmeye kadar cam serada tutulmuştur. Her iki eksplanttan elde edilen bitkilerin çiçek rengi ve şekli incelenmiştir. Sürgün ucundan gelişen bitkilerin çiçek rengi ve şekli ana bitkiye benzerlik göstermiştir. Ancak yaprak eksplantından gelişen adventif sürgünlerden elde edilen bitkilerde yalnız 4 çeşitte (Richmond, Lady Amber, Lady White, Lady Yellow) ana bitkiye benzer çiçek rengi gözlenmiştir. Fakat Lady Apricot ve Lady Salmon çeşitlerinden elde edilen tüm bitkilerin çiçeklerinde renk değişimi gözlenmiştir. Lady Bronzi, Lady Orange, Lady Rosy'den elde edilen bitkilerde hem ana bitkiye benzer hem de değişik çiçek renkleri gözlenmiştir. *L.vitroflora*'da hem yaprak hem de sürgün ucundan elde edilen bitkilerinde çiçekler gözlenmiştir. Bu değişikliklerin bitkilerin kimerik yapısından ya da somaklonal varyasyondan kaynaklandığı düşünülmüştür. Çalışmada; varyasyonlar yalnız meristematik olmayan eksplantlardan elde edilen bitkilerde gözlenmiştir. Bu çalışmadaki protokolün karanfil bitkisinin ıslahı için uygun olduğu düşünülmektedir.

Prakash vd (2007), *Hoslundia opposita* türünün olgunlaşmış ağaçlarından elde edilen koltukaltı eksplantlarını kullanarak mikroçoğaltım protokolü geliştirmişlerdir. 0, 2.2, 4.4,

6.6, 8.8 veya 11 μM BAP içeren, 30 g/l sukroz ve % 0.2 gelrite ile katılaştırılmış MS ortamda çok sayıda sürgün elde edilmiştir. BAP içeren ortamdan elde edilen sürgünler, Kin içeren ortamdan elde edilen sürgünlere göre daha sağlıklı ve normal olmuştur. 4.4 μM BAP içeren MS ortamda 30 gün içerisinde eksplant başına en fazla sürgün 7.3 adet ve % 91 sürgün oluşumu gözlenmiştir. MS ortamda ya da 3.6 μM IAA içeren ortamda 30 günden sonra elde edilmiştir. Serada üç ayın sonunda bitkilerin % 90'ı canlı kalmıştır. Bitkilerde herhangi bir fenotipik anormallik gözlenmemiştir. Bu protokol ile tıbbi bir bitki olan *Hoslundia opposita*'nın, doğaya bağımlı kalınmadan kısa sürede üretimi gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *Hygrophila difformis* Türünde Yürütülen Çalışmalar

3.1.1. Bitki materyali

Çalışmada *Hygrophila difformis* Vassetto türü kullanılmıştır. Bitkiler, çeşitli yollarla yurt dışından getiren yerel akvaryumculardan temin edilmiştir. Bitkinin tür tayini Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hasan Hüseyin ATAR tarafından yapılmıştır. Ticari akvaryumculardan alınan bitkiler adaptasyon amacıyla kontrollü koşullardaki akvaryumlara dikilmiş ve büyütülmüştür.

3.1.2. Akvaryum koşulları

Akvaryumlarda otomatik ısıtma, suların temizliği için filtre kullanılmıştır. Ayrıca bitkilerin ihtiyacı olan gün ışığı floresan lambalar ile temin edilmiştir. Akvaryum tabanına torf yerleştirilmiş ve üzerine kum ilave edilmiştir. Bitkiler akvaryumlarda tutularak hem yabancı kaynaklı bulaşıklık uzaklaştırılmaya hem de akvaryum koşullarına adaptasyon sağlanmaya çalışılmıştır. Adaptasyon sağlayan bitkiler *in vitro* çoğaltım için bitki materyali olarak kullanılmıştır.

3.1.3. *In vitro* çalışmalardaki büyüme ortamları ve kültür koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962, Çizelge 3.1.) ile % 3 sukroz içeren ve % 0.8'lik agar (type A, Sigma) veya % 0.6-0.65'lik agar (Duchefa) ile katılaştırılan temel besin ortamı (MSO) kullanılmıştır. Sıvı kültür denemelerinde agar ilave edilmemiştir.

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
	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
Nicotinic Acid		0.500
Pyrotinic Acid		0.500
Thiamine-HCl		0.100
Glycine		2.000

Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmış olup, gereken durumlarda besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (sitokin ve oksin) ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1N NaOH ve 1N HCl kullanılarak 5.7'e ayarlandıktan sonra 1.4 kg basınç altında ve 120 °C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı (30.000 Lüks) altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda 24±1°C sıcaklıkta tutulmuşlardır.

3.1.4. Bitki büyüme düzenleyicileri

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Merck, Sigma Aldrich Chemical Co.ve Duchefa'den temin edilmiştir. Büyüme düzenleyiciler uygun çözücülerde çözüldükten sonra standart şekilde istenilen miktar ve oranda stok solusyonları hazırlanmıştır (Çizelge 3.2.). Hazırlanan stok solusyonların bir kısmı +4 °C' de iki ay bir kısmı -20 °C saklanmıştır. Büyüme düzenleyiciler ortamlara otoklavda steril edilmeden önce ilave edilmiştir. Bazıları da otoklavlandıktan sonra ilave edilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan büyüme düzenleyicilerin çözücüleri, saklama koşulları ve sterilizasyon yöntemleri

Büyüme Düzenleyiciler	Çözücü	Saklama Koşulları (°C)	Sterilizasyon Şekli
Oksinler NAA IBA 2,4-D	1N NaOH Etanol Etanol, 1N NaOH	+4 -20/ +4 +4	- Otoklav - Filtre - Otoklav
Sitokininler TDZ Kinetin	% 50 etanol 1N NaOH	+4 -20/ +4	- Otoklav - Filtre

3.1.5. Eksplant yüzey sterilizasyonu

In vitro çalışmalarındaki ilk aşama yüzey sterilizasyonudur. Bitkinin yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarının sağlanacağı en düşük dezenfektan dozu belirlenmeye çalışılmıştır. Bitkiler, üzerindeki kalıntıların uzaklaştırılması amacıyla 15-30 dakika çeşme suyunun altında tutulduktan sonra çamaşır suyu (NaOCl- Ace), Tween 20 ve PPM® (Plant Preservative Mixture; Bitki koruyucu karışım - Plant Cell Technology Inc. Washington ABD, tarafından geliştirilen bir biosittir ve doku kültürü çalışmalarında mikroorganizmaları önlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır) kullanılarak değişik muamelelere tabi tutulmuştur. Yüzey sterilizasyonu amacıyla ticari çamaşır suyunun, % 5, % 10'luk konsantrasyonları 5,10 dakika ve % 1 ve 2 PPM – 1 ve 2 saat bekletme uygulamaları yapılmış ve steril saf su ile durulanmıştır. Steril edilen bitki parçasından alınan eksplantlar (uç meristemi, koltukaltı meristemleri) yine steril petri kapları içerisinde % 3 sukroz içeren ve % 0.8 agar (Sigma) veya % 0.6 agar (Duchefa) ile katılaştırılan MS besin ortamında $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de tutulmuşlardır. Steril olan eksplantlar doku kültürü çalışmaları için ayrılmışlardır.

3.1.6. Eksplant izolasyonu

In vitro gelişen steril sürgünlerden yaprak, yaprak sapı, gövde (internod), uç meristemi ve 1. koltukaltı meristemi izole edilmiştir. Her biri 5-6 mm uzunluğunda parçalara ayrılarak çoğaltım ortamına konulmuştur.

3.1.7. Adventif sürgün rejenerasyonu ile hızlı çoğaltım

Denemelerde yaprak eksplantları TDZ, Kinetin sitokininleri ile NAA ve 2,4-D oksinlerini içeren ortamlara yerleştirilmiştir. Eksplantlar 4 hafta büyümeyi düzenleyiciler içeren ortamlarda tutulduktan sonra büyüme düzenleyici içermeyen MSO ortama alınmış ve 4 hafta bu ortamda tutulmuştur.

Sıvı kültür denemesinde uç meristemi, 1. koltukaltı meristemi, yaprak, yaprak sapı, gövde (internod) eksplantları TDZ, Kinetin, NAA ilave edilmiş sıvı MS içeren Magenta kaplarında kültüre alınarak çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. 4 hafta kültürler burda kaldıktan sonra katı MS ortama alınmıştır. Bütün doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde aseptik koşullarda yapılmıştır.

3.1.8. Meristemlerden hızlı çoğaltım

Denemelerde uç ve 1. koltukaltı meristemleri TDZ ile NAA içeren ortamlara yerleştirilmiştir. Eksplantlar 4 hafta büyümeyi düzenleyiciler içeren ortamlarda tutulduktan sonra MSO ortama alınmış ve 4 hafta bu ortamda tutulmuştur.

3.1.9. Elde edilen sürgünlerin akvaryum koşullarına adaptasyonu

Rejenere olan sürgünler sayıldıktan sonra uzun sürgünler MSO'da tekrar kültüre alınmış ve geliştikten sonra akvaryumlara aktarılmıştır. Akvaryum dibine 4-5 cm yüksekliğinde ince kum yerleştirilmiş ve akvaryum suyuna haftada bir sifonlama işlemi yapılmış ve sıvı gübre (FloraPride, Tetra Plant) ilave edilmiştir. Akvaryumlarda farklı sıcaklık (24 °C, 28 °C-MO2000 Aquarium heater) ve ışık (1, 2 Adet florasan-Sylvania Aquastar F 30w/174 10000 K Recyclable) denemesi yapılmıştır. Sıcaklık denemesinde; iki farklı sıcaklık derecesinin bitkinin büyümesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Deneme 4 akvaryumdan oluşmuş ve her

akvaryumda 2 florasan lamba kullanılmıştır. İki akvaryumda su sıcaklığı 24 °C'e, diğer iki akvaryumda da 28 °C'e ayarlanmıştır. Işık denemesinde; iki farklı ışık yoğunluğunun bitkinin büyümesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Deneme 4 akvaryumdan oluşmuş ve akvaryumların su sıcaklığı 24 °C'ye ayarlanmıştır. Akvaryumların iki tanesinde 1 florasan diğer iki tanesinde de 2 florasan kullanılmıştır.

3.2. *Microsorium pteropus* Türünde Yürütülen Çalışmalar

3.2.1. Bitki materyali

Çalışmada *Microsorium pteropus* (Java fern) bitkisi kullanılmıştır. Bitkiler yerel akvaryumculardan temin edilmiştir. Bitkinin tür tayini Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hasan Hüseyin ATAR tarafından yapılmıştır. Ticari akvaryumculardan alınan bitkiler adaptasyon amacıyla kontrollü koşullardaki akvaryumlara aktarılmıştır.

3.2.2. Akvaryum koşulları

Bitkiler bu akvaryumlarda tutularak hem yabancı kaynaklı bulaşıklık uzaklaştırılmaya hem de akvaryum koşullarına adaptasyon sağlanmaya çalışılmıştır. Akvaryum içine bitkilerin tutunabilmesi için ağaç ve misina ipinden tutunma materyali konmuştur. Adaptasyon sağlayan bitkilerden *in vitro* çoğaltım için bitki materyali alınmıştır.

3.2.3. Büyüme ortamları ve kültür koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962, Çizelge 3.1.) ile % 3 sukroz içeren ve % 0.8'lik agar (type A, Sigma) ile katılaştırılan temel besin ortamı (MSO) kullanılmıştır. Bazı denemelerde agar ilave edilmemiş ve sıvı ortam kullanılmıştır. Bazı bulaşıklık denemelerinde de ortama sukroz ilave edilmemiştir.

Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmış olup, gerektiğinde besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (Sitokinin ve Oksin) ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1N NaOH ve 1N HCl kullanılarak 5.7'e ayarlandıktan sonra 1.4 kg

basınç altında ve 120 °C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı ($42 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta tutulmuşlardır.

3.2.4. Yüzey sterilizasyonu

Bitki, üzerindeki kalıntıların uzaklaştırılması amacıyla 15-30 dakika çeşme suyunun altında bekletildikten yaprak ve gövde ayrı ayrı ya da birleşik olarak çamaşır suyu, Tween 20 ve PPM® kullanılarak değişik muamelelere tabi tutulmuştur. Yüzey sterilizasyonu amacıyla ticari çamaşır suyunun, % 10'luk konsantrasyonları 2, 5, 8, 9, 10, 12 ve 15 dakika ve % 0.5, % 1, % 2, % 3 ve % 4 PPM 1.5, 2, 2.5, 3.5 ve 4,5 saat bekletme uygulamaları yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra steril saf su ile durulanmıştır. Alınan eksplantlar (yaprak, gövde) yine steril petri kapları içerisinde % 3 sukroz içeren ve % 0.8 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır. Bazı yüzey sterilizasyonu denemelerinde de şeker ve agar ilave edilmemiş sıvı ortam kullanılmıştır. Bazı denemelerde de sitrik asit ilave edilmiştir.

3.2.5. Adventif sürgün rejenerasyonu ile hızlı çoğaltım

Yaprak eksplantları, oksin (0.25, 0.5, 0.75 ve 1 mg/l NAA) içeren sıvı MS ortamda magenta kaplarında kültüre alınmıştır. Rejenere olan sürgünler akvaryuma aktarılmıştır.

3.2.6. Ex vitro hızlı çoğaltım çalışmaları

Java yaprakları yüksek dozda bitki büyüme düzenleyici içeren saf suda bekletilmiştir. 250-500 mg/l BAP ve IBA içeren saf suda 15 dk ve 30 dk bekletilmiştir. Yapraklar misinaya takıldıktan sonra akvaryuma yerleştirilmiştir. Akvaryum sıcaklığı 24°C 'e ayarlanmış ve 1 florasan lamba kullanılmıştır. Haftada bir sifonlama işlemi yapılmış ve sıvı gübre (FloraPride, Tetra Plant) ilave edilmiştir.

3.2.7. İstatistiki Analizler

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş, her muamele içerisinde 4 veya 5 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü 100 x10 mm'lik petri kapları, magenta ve bitki büyütme kaplarından oluşmuştur. Elde edilen veriler SPSS for Windows'' programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuştur. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce arcsin değerlerine çevrilmiştir (Snedecor and Cochran 1967).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Hygrophila difformis* Türünde Hızlı Çoğaltım

4.1.1. Eksplantların yüzey sterilizasyonu

Bitki, üzerindeki kalıntıların uzaklaştırılması için 30 dk çeşme suyunun altında tutulduktan sonra gövde ve yaprakları ayrı ayrı sterilizasyon yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonu için ticari çamaşır suyu (Ace, % 5-6 NaOCl) ve PPM® kullanılmıştır. Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi beş farklı eksplant farklı konsantrasyon ve sürede çamaşır suyu (ÇS) ve PPM ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Kullanılan dezenfektanın etkisiyle çoğu eksplantta klorofil parçalanması olmuş ve renkte beyazlaşma gözlenmiştir. Zarar görmeyen yeşil eksplantlarda sterilizasyon sağlanamamış ve bulaşıklık çıkmıştır. Daha sonraki çalışmada (Çizelge 4.2.) çamaşır suyu ve PPM'in uygulama süre ve oranlarında değişiklik yapılarak yeni bir deneme kurulmuştur. Eksplantlarda tamamen klorofil parçalanması (zarar) olmamasına rağmen çoğu eksplantta kısmen renk açılması veya kararma gözlenmiştir. Az zarar gören eksplantlarda bulaşıklık görülürken steril olan eksplantlarda da zarar nedeniyle yumuşama olmuş dolayısıyla denemede başarı sağlanamamıştır. Bu denemelerdeki sonuçlar değerlendirilerek meristemler % 10 çamaşır suyu ve Tween-20 (1 damla/100 ml) ile 5 dk muameleden sonra % 1 PPM'de 120 dk bekletilerek durulanmıştır. Yapraklar % 5 Çamaşır suyu ve Tween -20 (1 damla/100 ml)'de 3 dk muameleden sonra % 1 PPM'de 120 dk bekletilerek durulanmıştır (Çizelge 4.3.). Çizelgede görüldüğü gibi eksplantlarda farklı oranlarda bulaşıklık gözlenmiştir. Sonuçta bulaşık olmayan ve daha az zarar gören eksplantlar ayrılmıştır. 1. koltukaltı meristeminin % 30' unda, MSO ortamda 2 hafta içinde sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. 2 cm boyuna ulaşan sürgünler MSO ortamda alt kültüre alınmıştır. Alt kültüre alınan bitkiler 4 hafta bekletilmiş, fungal ve bakteriyel bulaşıklık taşımadığından emin olunduktan sonra doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS ve PPM'in eksplantlar ve bulaşıklık üzerindeki etkisi

MUAMELE				EKSPLANT									
				1. koltukaltı		2. koltukaltı		3. koltukaltı		4. koltukaltı		Yaprak	
ÇS		PPM		Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk	Bulaşıklık (%)	Renk
(%)	Süre (dk)	(%)	Süre (dk)										
20	7	-	-	0	Beyaz	0	Beyaz	0	Beyaz	0	Beyaz		
10	5	1	60	100	Yeşil	100	Beyaz	-	-	-	-	-	-
10	7	1	60	0	Beyaz	0	Beyaz	0	Beyaz	0	Beyaz	-	-
5	5	1	60	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil	-	-
-	-	2	60	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil	100	Yeşil		
10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	Beyaz
10	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	Beyaz

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS ve PPM'in bulaşıklık oranına etkisi

MUAMELE				EKSPLANT					
				1. koltukaltı	2. koltukaltı	3. koltukaltı	4. koltukaltı	Yaprak	Yaprak sapı
ÇS		PPM		Bulaşıklık (%)	Bulaşıklık (%)	Bulaşıklık (%)	Bulaşıklık (%)	Bulaşıklık (%)	Bulaşıklık (%)
(%)	Süre (dk)	(%)	Süre (dk)						
5	10	2	120	0	0	100	100	0	-
10	10	2	90	0	0	0	100	0	-
10	5	1	70	0	0	100	100	0	-
5	10	2	60	0	100	0	0	0	-
10	5	2	120	0	0	0	0	0	-
10	10	2	120	0	0	0	0	0	-
10	5	2	60	0	0	0	0	0	-
5	10	1	60	100	100	0	100	100	-
5	5	1	60	-	-	-	-	50	50
5	5	1	120	-	-	-	-	25	25

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan ÇS ve PPM'in bulaşıklık yüzdesine etkisi

MUAMELE				EKSPLANT					
				1. koltukaltı	2. koltukaltı	3. koltukaltı	4. koltukaltı	Yaprak	Yaprak sapı
Ç. S + Tween-20 (1 damla/100 ml)		PPM		Bulaşıklık (%)	Bulaşıklık (%)	Bulaşıklık (%)	Bulaşıklık (%)	Bulaşıklık (%)	Bulaşıklık (%)
(%)	Süre (dk)	(%)	Süre (dk)						
10	5	1	120	20	40	50	60	-	-
5	3	1	120	-	-	-	-	25	15

4.1.2. Adventif sürgün rejenerasyonu ile hızlı çoğaltım

4.1.2.1. Kin ve 2,4-D'nin etkisi

Yaprak eksplantları sürgün rejenerasyonu için Kin ve 2,4-D içeren 7 farklı ortamda kültüre alınarak 6 hafta sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Ortamlarda bulunan değişik orandaki hormonların etkisi ile hem kallus oluşumu hemde nekrozis gözlenmiştir. Kallus oluşturan eksplant ve nekrotik eksplant yüzdesi, sürgün veren eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından ortamlar arasındaki farklılık istatistiki olarak 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır (Çizelge 4.4.). Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı Kin ve 2,4-D konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Nekrotik Eksplant Yüzdesi (%)		Sürgün Veren Eksplant Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	6	2092.86	39.07**	5625.00	75.00**	1500.00	52.50**	205.96	360.44**
Hata	14	53.57		75.00		28.57		0.57	
Genel Toplam	20								

**0.01 düzeyinde önemli

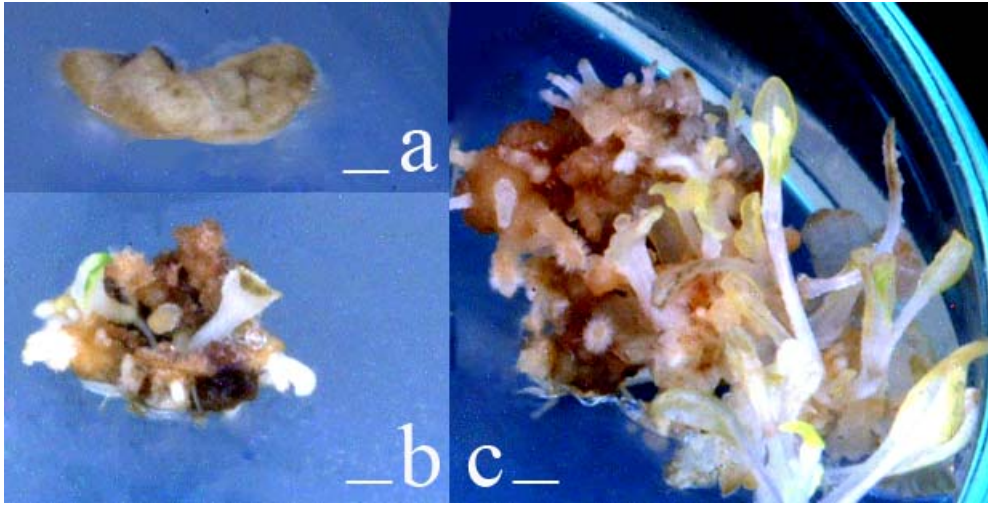
Çizelge 4.5. Farklı Kin ve 2,4-D konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün oluşumuna etkisi

Ortamlar		Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)	Nekrotik Eksplant Oranı (%)	Sürgün Veren Eksplant Yüzdesi (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)
Kin (mg/l)	2,4-D (mg/l)				
0.25	0.25	85.0 ab ¹	60.0 b ¹	0.0 b	0.0 b
0.25	0.5	95.0 a	100.0 a	0.0 b	0.0 b
0.25	1.0	100.0 a	100.0 a	0.0 b	0.0 b
0.25	2.0	70.0 b	85.0 a	0.0 b	0.0 b
-	0.25	70.0 b	50.0 b	60.0 a	6.2 a
-	0.5	75.0 b	40.0 c	10.0 b	0.5 b
-	2.0	20.0 c	30.0 c	0.0 b	0.0 b

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

Çizelge 4.5.'de görüldüğü gibi kallus oranı % 20 ile % 100 arasında değişmiştir. En fazla kallus oluşumu sırasıyla 0.25 mg/l Kin ve 0.5 mg/l 2,4-D ile 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamda, en az kallus oluşum oranı 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamda

gözlenmiştir. En fazla nekroz ise 0.25 mg/l Kin ve 0.5 mg/l 2,4-D ile 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamda gözlenirken, en az oranda nekroz (% 30) 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamda gözlenmiştir. Sürgün oluşumu sadece iki ortamda gözlenmiştir. Eksplantlar üzerinde 1 hafta sonra sürgün uçları belirmeye başlamıştır (Şekil 4.1.a.). 3 hafta sonra belirgin miktarda sürgün uçları görülmüştür (Şekil 4.1.b.). En fazla sürgün (6.2 adet/eksplant) 0.25 mg/l 2,4-D içeren MS ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.1.c.). 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamda eksplant başına 0.5 adet sürgün elde edilmiştir.



Şekil 4.1. 0.25 mg/l 2,4-D içeren MS ortamda adventif sürgün rejenerasyonu (a)1 haftalık eksplantlarda sürgün uçlarının oluşumu (b) 3 hafta sonra belirgin miktarda sürgün rejenerasyonu (c) 6 hafta sonunda sürgünler. Bar Şekil a, b, c = 0.35 cm

4.1.2.2. Yüksek oranda 2,4-D ve NAA'nın etkisi

Yukarda bahsedilen denemede yüksek sonuçlar alınmadığından dolayı yeni bir deneme planlanmış ve 15 mg/l 2,4-D ve 15 mg/l NAA konsantrasyonları denenmiştir. Yaprak eksplantları 1 hafta süresince 15 mg/l 2,4-D veya 15 mg/l NAA içeren MS besi ortamında hem aydınlık hem de karanlık ortamda kültüre alındıktan sonra 1 mg/l 2,4-D veya 1.5 mg/l 2,4-D içeren MS besi ortamına aktarılmıştır. 1 hafta burda tutulduktan sonra MSO ortama alınmıştır. Yüksek oranda 2,4-D veya NAA kullanımı kallus oluşumunu teşvik etse bile sürgün rejenerasyonu olmamıştır. Eksplantların çoğunda nekroz gözlenmiştir. Kallus oluşumu ve nekrotik eksplant bakımından yapılan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Yüksek oranlarda 2,4-D ve NAA'in yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Kallus Oluşturan Eksplant Oranı (%)		Nekrotik Eksplant Oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	6	2161.31	9.10**	5356.55	6.80**
Hata	14	237.54		787.50	
Genel Toplam	20				

**0.01 düzeyinde önemli

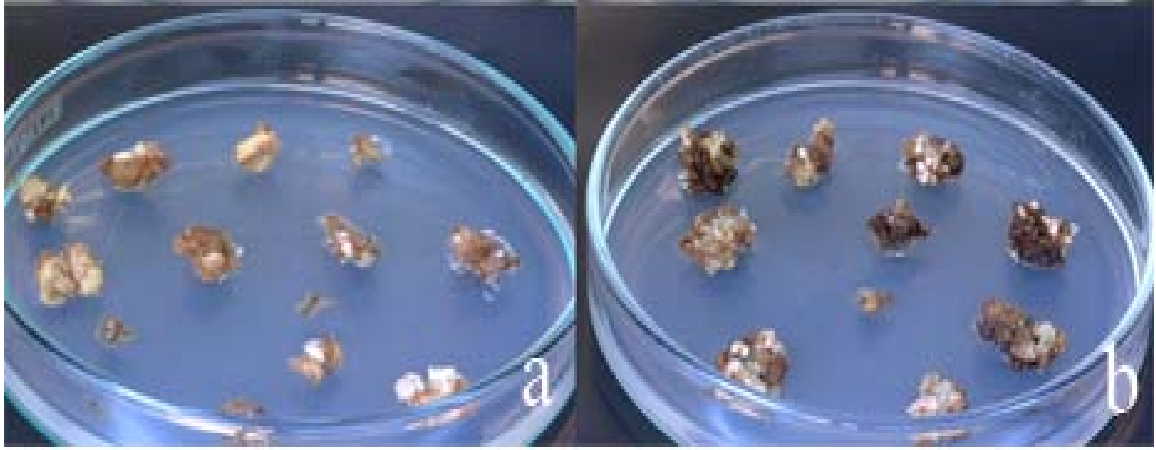
Kallus oluşturan eksplant ve nekrotik eksplant yüzdesi bakımından ortamlar arasındaki farklılık istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Bu farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Eksplantların % 20 ile % 93.3'ünde kallus oluşumu gözlenmiştir. En yüksek oranda kallus, aydınlık koşullarda 15 mg/l NAA içeren ortamda bekletilip 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortama alınan eksplantlarda elde edilmiştir (Şekil 4.2.). Kalluslar sert yapıda özellik göstermiştir. Bazı eksplantlarda kallus oluşumu elde edilse dahi zamanla kararma gözlenmiştir. Nekrozis görülen eksplant oranı % 0 ile % 100 arasında değişmiştir. En fazla zarar yine yüksek oranda kallus elde edilen ortamda gözlenmiştir (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. Farklı 2,4-D ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortamlar			Kallus Oluşturan Eksplant (%)	Nekrotik Eksplant (%)
İlk Ortam		İkinci Ortam		
		2,4-D (mg/l)		
15 mg/l 2,4-D	aydınlık	1	33.33 cd ¹	0.00 b
		1.5	43.33 cd	66.67 a
	karanlık	1	76.67 ab	60.00 a
		1.5	60.00 bc	6.67 b
15 mg/l NAA	aydınlık	1	93.33 a	100.00 a
		1.5	80.00 ab	83.33 a
	karanlık	1	30.00 d	0.00 b
		1.5	20.00 d	0.00 b

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



Şekil 4.2. 15 mg/l NAA içeren ortamda bekletilip 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortama alınan eksplantlardaki gelişim (a) Kallus oluşumu (b) Kallusların 4 hafta sonraki hali ve kararma

4.1.2.3. TDZ ve NAA'nın etkisi

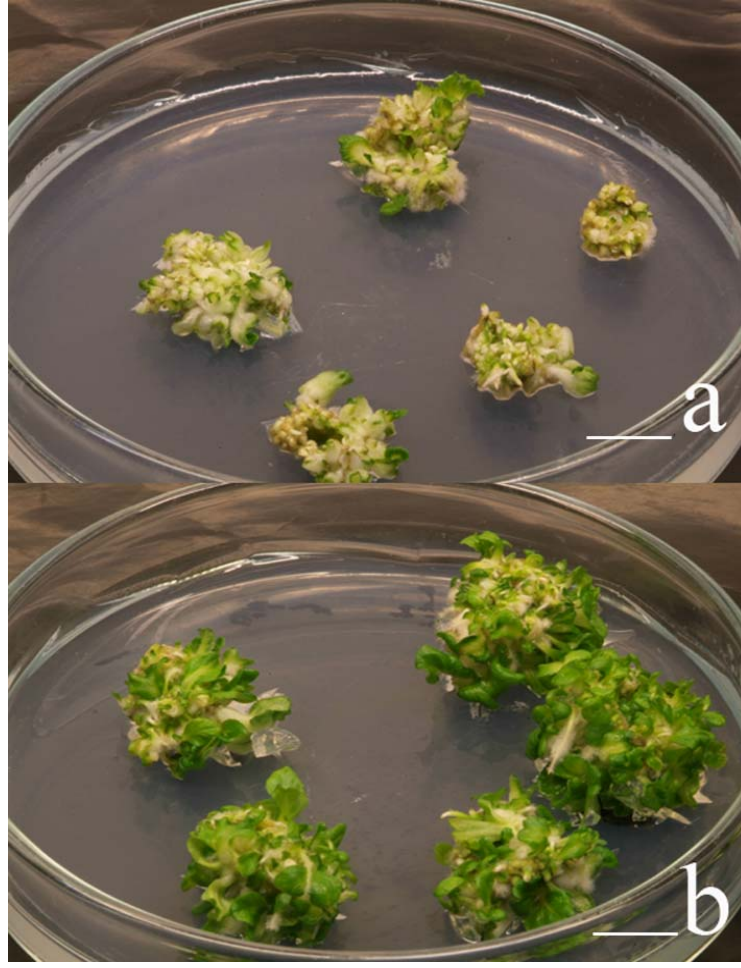
Steril bitkilerden alınan genç yaprak eksplantları sürgün rejenerasyonu amacıyla 4 hafta 0.025, 0.05 mg/l TDZ ve 0.25, 0.5, 1, 2 ve 4 mg/l NAA içeren MS besi ortamlarında kültüre alınmıştır (Şekil 4.3.). Daha sonra sürgün gelişiminin hızlanması için tüm eksplantlar MSO ortama aktarılmıştır. Bu ortamda 4 hafta kaldıktan sonra sayımları yapılmıştır. Çizelge 4.8.'de yaprak eksplantından on farklı konsantrasyonda TDZ ve NAA içeren ortamda oluşan Eksplant başına sürgün sayısı, eksplant başına yan sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluklarına ait varyans analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün ve kök oluşumuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)		Eksplant Başına Yan Sürgün Sayısı (Adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	9	51.11	1.80*	2.90	3.04**	2.60	1.52*	2.07	2.06**
Hata	20	28.27		0.95		1.71		1.00	
Genel Toplam	29								

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli



Şekil 4.3. TDZ ve NAA içeren MS ortamda yapraktan sürgün rejenerasyonu (a) 2 haftalık (b) 4 haftalık sonuçlar. Bar Şekil a,b=1.25 cm

Farklı ortamlardaki eksplant başına sürgün sayıları ve sürgün uzunlukları arasındaki fark istatistiki açıdan 0.05 düzeyinde, eksplant başına yan sürgün sayıları ve kök uzunluğu arasındaki fark ise 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.9.'da verilmiştir. Bütün eksplantlarda sürgün oluşumu gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 14.39 adet ile 28.30 adet arasında değişmiştir. En fazla sürgün 0.025 mg/l TDZ ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir (Şekil 4.4.a.b.). Eksplant başına en az sürgün 0.025 mg/l TDZ ve 2 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir.

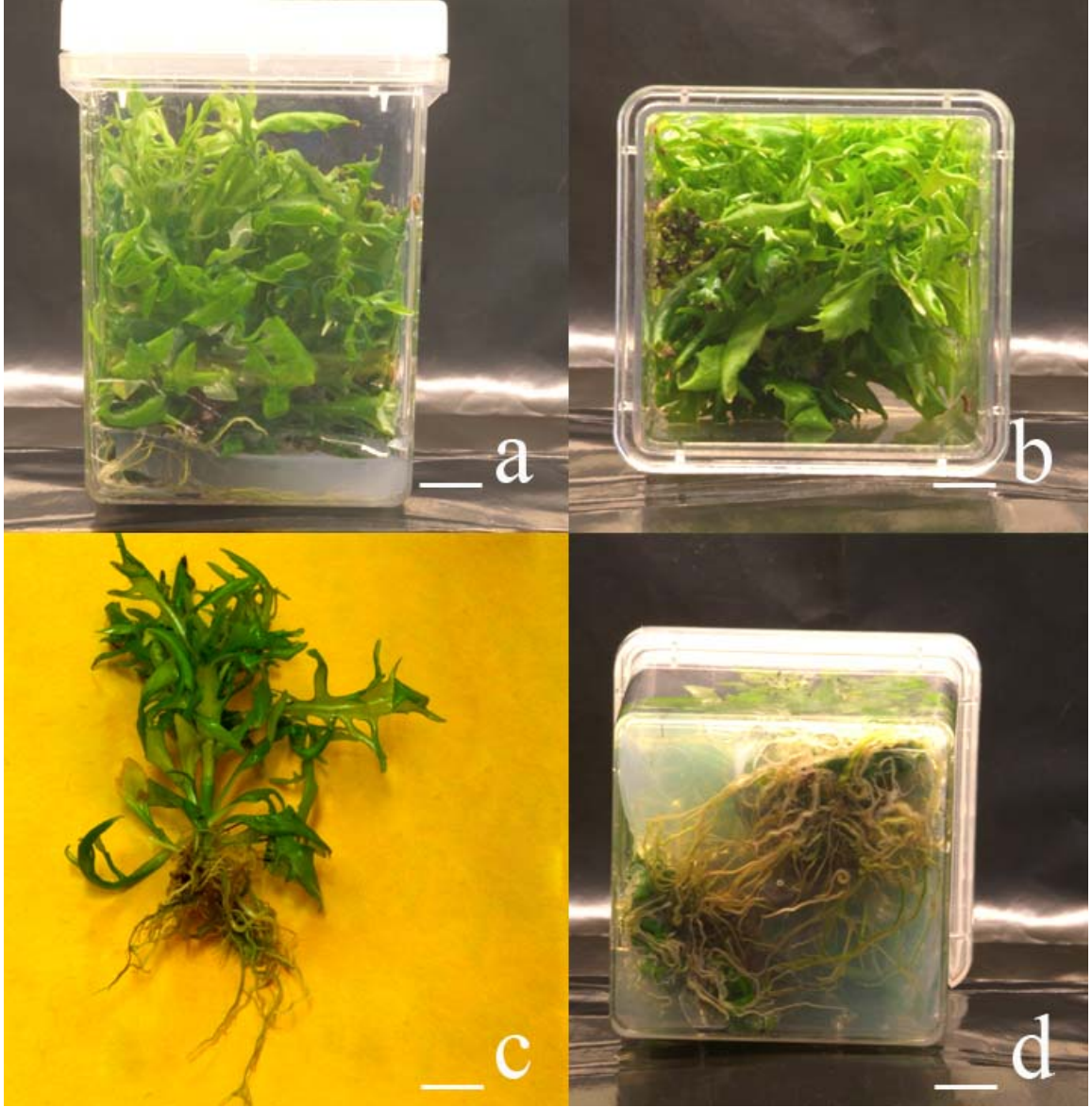
Çizelge 4.9. Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün ve kök oluşumu üzerine etkisi

Ortamlar		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Eksplant Başına Yan Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)				
0.025	0.25	22.22 ab ¹	2.05 abc ²	6.09 ab ¹	6.10 a ²
0.025	0.5	22.61 ab	0.83 c	6.44 ab	6.20 a
0.025	1	28.30 a	1.25 bc	5.33 ab	6.13 a
0.025	2	14.39 b	0.45 c	5.17 ab	5.50 ab
0.025	4	23.44 ab	0.83 c	5.83 ab	3.80 b
0.05	0.25	27.39 a	3.36 a	6.92 a	5.07 ab
0.05	0.5	20.18 ab	1.00 c	5.66 ab	5.26 ab
0.05	1	23.88 ab	2.99 ab	4.12 b	4.28 ab
0.05	2	27.77 a	1.22 bc	4.13 b	4.75 ab
0.05	4	24.06 ab	0.92 c	4.76 ab	4.56 ab

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

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

Eksplant başına yan sürgün sayısı 0.45 adet ile 3.36 adet arasında değişmiştir. En fazla yan sürgün, 0.05 mg/l TDZ ve 0.25 mg/l NAA içeren ortamdan, en az yan sürgün 0.025 mg/l TDZ ve 2 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir. Diğer taraftan sürgün uzunluğu 4.12 cm ile 6.92 cm arasında değişmiştir. En uzun sürgün, 0.05 mg/l TDZ ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamdan (Şekil 4.4.c.), en kısa sürgün ise 0.05 mg/l TDZ ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir. Kök uzunluğu ise 3.80 cm ile 6.20 cm arasında değişmiştir. En uzun kök, 0.025 mg/l TDZ ve 0.5 mg/l NAA ortamdan (Şekil 4.4.d.), en kısa kök ise 0.025 mg/l TDZ ve 4 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir (Çizelge 4.9).



Şekil 4.4. TDZ ve NAA içeren MS ortamdan elde edilen sürgünlerin görünüşü (a,b) 0.025 mg/l TDZ ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilen sürgünlerin görünüşü (c) 0.05 mg/l TDZ ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilen sürgünün görünüşü (d) 0.025 mg/l TDZ ve 0.5 mg/l NAA ortamdan elde edilen bitkiciklerin köklerindeki gelişim. Bar Şekil a, b, d=1.2 cm, Şekil c= 1.4 cm

4.1.2.4. 0.5 mg/l Kin ve farklı oranda NAA'in etkisi

Steril bitkilerden alınan genç yaprak eksplantları Kin (0.5 mg/l) ve dört farklı oranda NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Bir hafta sonra tüm eksplantlar üzerinde sürgün uçları gözlenmiştir. 2 hafta sonra sürgün uçlarında önemli derecede gelişme gözlenmiş ve tüm eksplantlar üzerinde her ortamda yüksek oranda sürgün rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Eksplantlar 4 hafta bu ortamlarda kaldıktan sonra sürgünlerin daha iyi gelişebilmeleri için bitki büyüme düzenleyici içermeyen MSO ortama alınmışlardır. Bu ortamda 4 hafta

sonunda sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve kök gelişim özellikleri dikkate alınarak sayımları yapılmıştır. Çizelge 4.10.'da yaprak eksplantından dört farklı konsantrasyonda Kin ve NAA içeren MS ortamda oluşan eksplant başına sürgün sayısı, yan sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluğuna ait varyans analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı Kin ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün ve kök oluşumu üzerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)		Eksplant Başına Yan Sürgün Sayısı (Adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	5	20.16	2.16*	1.16	1.28 ^{ös}	5.78	1.39*	0.81	0.50 ^{ös}
Hata	12	9.32		0.91		5.13		1.60	
Genel Toplam	17								

* 0.05 düzeyinde önemli

^{ös} önemsiz

Çizelge 4.11.'de görüldüğü gibi eksplant başına en fazla sürgün sırasıyla (47.83 adet, 53.56 adet) 0.5 mg/l Kin ve 0.25 mg/l NAA ile 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamlarından (Şekil 4.5.a,b,e,f), en fazla yan sürgün MSO ortamdan, en uzun sürgün (8.60 cm) 0.5 mg/l Kin ve 2 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir. Bu ortamlardaki kök uzunluğu 3.86 cm ile 3.88 cm arasında değişmiştir (Şekil 4.5.c,d,g,h) En uzun kök (5.53 cm) 0.5 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamda elde edilmiştir.

Çizelge 4.11. Farklı Kin ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün ve kök oluşumu üzerine etkisi

Ortamlar		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Eksplant Başına Yan Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
Kin (mg/l)	NAA (mg/l)				
0.5	0.25	47.83 a ¹	0.07 c ¹	5.43 ab ¹	3.86 ^{ös}
0.5	0.5	53.56 a	0.00 c	3.97 b	3.88
0.5	1	27.17 b	1.00 a	5.67 ab	5.53
0.5	2	25.89 b	1.00 a	8.60 a	4.80
0.5	4	26.33 b	0.15 b	7.80 a	4.60
MSO		15.22 c	1.50 a	4.62 b	5.04

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

^{ös} önemsiz



Şekil 4.5. Kin ve NAA içeren MS ortamdan elde edilen sürgünlerin MSO ortama alındıktan 4 hafta sonraki görünüşü (a,b) 0.5 mg/l Kin ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilen sürgünler ve (c,d) kök gelişimi (e,f) 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilen sürgünler ve (g,h) kök gelişimi. Bar Şekil a,b,c,e,f,g=1.2 cm, Şekil d, h= 1.33 cm

4.1.2.5. 0.25 mg/l Kin ve farklı oranda NAA'in etkisi

Yaprak eksplantları 0.25 mg/l Kin ve değişik oranlarda NAA içeren 5 farklı ortama yerleştirilmiş ve yaklaşık 3 hafta sonra sürgün ucu oluşturma ve sürgün gelişimi yönünden incelenmiştir. Çizelge 4.12.'de yaprak eksplantından farklı konsantrasyonda Kin ve NAA içeren ortamda sürgün ucu oluşturan eksplant oranı ve sürgün gelişimi görülen eksplant yüzdesine ait varyans analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı Kin ve NAA konsantrasyonlarının sürgün oluşumu ve gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Sürgün Ucu Oluşturan Eksplant Oranı (%)		Gelişme Gösteren Eksplant Oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	6	6666.67	14.00**	4596.82	4.31**
Hata	14	476.19		1066.67	
Genel Toplam	20				

**0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.12.'de görüldüğü gibi sürgün ucu oluşturan eksplant oranı ve gelişme gösteren eksplant oranı bakımından ortamlar arasındaki farklılık istatistiki açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu farkın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.13.'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Farklı Kin ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün oluşumu ve gelişimi üzerine etkisi

Ortamlar		Sürgün Ucu Oluşturan Eksplant Oranı (%)	Gelişme Gösteren Eksplant Oranı (%)
Kin (mg/l)	NAA (mg/l)		
0.25	0.25	100.00 a ¹	93.33 a
0.25	0.5	100.00 a	93.33 a
0.25	1	100.00 a	60.00 ab
0.25	2	66.67 a	33.33 ab
0.25	4	10.00 b	13.33 b

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

Ortamlardan, 0.25 mg/l Kin ve 4 mg/l NAA içeren MS ortamındaki eksplantlarda hiç sürgün ucu oluşmamıştır. 0.25 mg/l Kin ve 2 mg/l NAA içeren ortamdaki eksplantların % 66.67'sinde sürgün ucu oluşurken geri kalan ortamlarda bütün eksplantlarda sürgün ucu oluşumu gözlenmiştir. Eksplantlarda en fazla gelişim 0.25 mg/l Kin ve 0.25 mg/l NAA ile 0.25 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamlarında gözlenmiştir (Çizelge 4.13.).

Sürgünler daha iyi gelişebilmeleri için 4 hafta sonra MSO ortama aktarılmıştır. Bu ortamda 4 hafta kültüre alındıktan sonra sayımları yapılarak eksplant başına sürgün sayısı, yan sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluğu açısından sonuçlar değerlendirilmiş ve Çizelge 4.14.'de varyans analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı Kin ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün, yan sürgün sayısı ve kök uzunluğuna ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)		Eksplant Başına Yan Sürgün Sayısı (Adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	5	1204.50	4.34**	1.69	1.16*	2.89	1.39*	1.09	0.98*
Hata	12	277.69		1.45		2.07		1.11	
Genel Toplam	17								

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Eksplant başına sürgün sayısı bakımından ortamlar arasındaki fark 0.01 düzeyinde eksplant başına yan sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluğu bakımından ise 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklılığın önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.15.'de verilmiştir.

Çizelge 4.15. Farklı Kin ve NAA konsantrasyonlarının yaprak eksplantından sürgün, yan sürgün sayısı ve kök uzunluğuna etkisi

Ortamlar		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Eksplant Başına Yan Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
Kin (mg/l)	NAA (mg/l)				
0.25	0.25	41.56 bc ¹	1.22 b ²	3.30 b ²	3.74 ab ²
0.25	0.5	21.39 c	1.67 a	6.10 a	5.63 a
0.25	1	80.56 a	0.00 c	2.82 b	3.58 b
0.25	2	56.17 ab	0.00 c	2.85 b	3.07 b
0.25	4	36.22 bc	1.50a	4.44 ab	4.17 ab
MSO		15.22 c	1.50a	4.62 ab	5.04 a

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

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

Ortamlar arasında eksplant başına en fazla sürgün (80.56 adet), 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamında gözlenmiştir (Şekil 4.6.a,b). Bunu 0.25 mg/l Kin ve 2 mg/l NAA içeren MS ortamında gelişen eksplant başına 56.17 adet sürgün takip etmiştir (Şekil 4.6.d,e). En az sürgün (15.22 adet) ise bitki büyüme düzenleyici içermeyen MSO ortamdan elde edilmiştir. 0.25 mg/l Kin ve 4 mg/l NAA içeren ortamda ve MSO ortamda en fazla yan sürgün (1.5 adet) gözlenmiştir.

Sürgün uzunluğu 2.82 cm ile 6.10 cm arasında değişmiştir. En uzun sürgün 0.25 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamda, en kısa sürgün 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir. Kök uzunluğu 3.07 cm ile 5.63 cm arasında değişmiştir. Fakat 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA ile 0.25 mg/l Kin ve 2 mg/l NAA içeren ortamdan gelişen sürgünlerdeki kök uzunluğu sırasıyla 3.58 cm ve 3.07 cm olmuştur (Şekil 4.6.c,f). En uzun kök 0.25 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir. En kısa kök ise 0.25 mg/l Kin ve 2 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir (Çizelge 4.15.).



Şekil 4.6. Kin ve NAA içeren MS ortamdan elde edilen sürgünlerin MSO ortama alındıktan 4 hafta sonraki görünüşü (a,b) 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilen sürgünler ve (c) kök gelişimi (d,e) 0.25 mg/l Kin ve 2 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilen sürgünler ve (f) kök gelişimi. Bar Şekil a,b,c,d,e,f= 1 cm

4.1.3. Meristemlerden hızlı çoğaltım

4.1.3.1. İki farklı oranda TDZ ve NAA'in etkisi

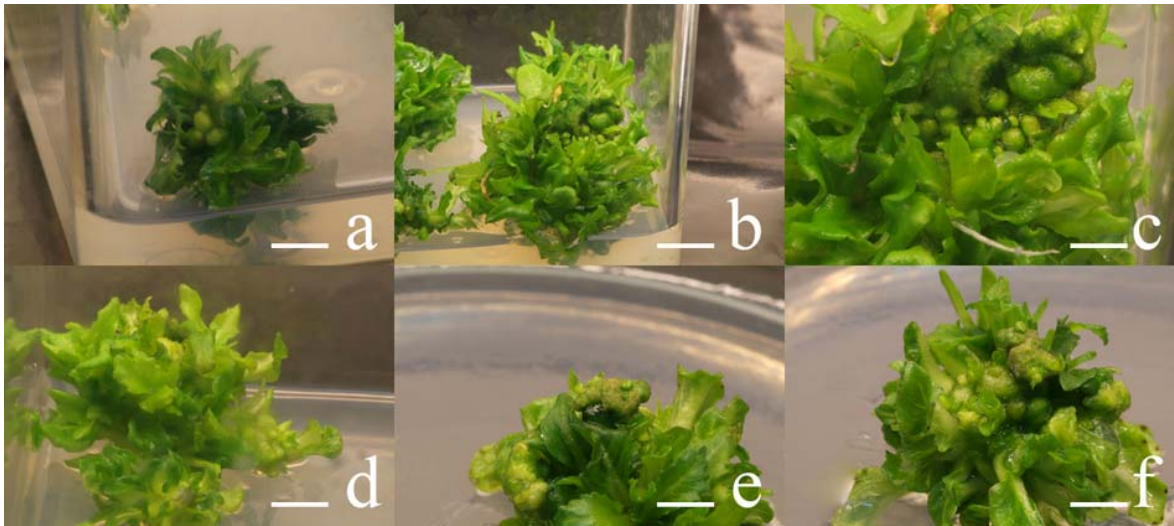
Steril bitkilerden alınan uç ve 1. koltukaltı meristemleri hızlı çoğaltım amacıyla 0.05 mg/l ve 0.1 mg/l TDZ ve 0.05 mg/l NAA içeren MS besi ortamlarında kültüre alınmıştır. 4-5 gün sonra eksplantlar üzerinde sürgün uçları gözlenmiştir. 4 hafta içinde sürgün uçlarından sürgünler ve kök oluşumu gözlenmiştir. Kültüre alınmış eksplantlarda ortamların etkisi ile şişme ve büyüme gözlenmiştir. Veriler alınırken uç meristemi 2.22 cm ve 1. koltukaltı meristemi 3.21 cm'e ulaşmıştır. Tüm eksplantlarda sürgün oluşumu gözlenmiştir. Sürgün uzunluğu farklılıkları istatistiki analize tabi tutulmuş ve Çizelge 4.16.'da varyans analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.16. Farklı oranlardaki TDZ ve NAA konsantrasyonlarının uç ve 1. koltukaltı meristemlerinde sürgün uzunluğu ve kök oluşum oranı üzerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Oluşum Oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	1	0.00	0.95	2133.33	7.11*
Eksplant	1	0.27	8.53*	0.00	0.00
Ortam x Eksplant	1	0.00	2.63	133.33	0.44
Hata	8	0.00		300.00	
Toplam	11				

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.16.' da görüldüğü gibi sürgün uzunluğu bakımından eksplantlar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Kök oluşum oranı bakımından ortamlar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan t testi sonucu sırasıyla Çizelge 4.17. ve Çizelge 4.18.'de verilmiştir. Uç meristeminde ortalama sürgün uzunluğu 0.73 cm olmuştur (Şekil 4.7.). Buna karşı 1. koltukaltı meristeminde, uç meristemine göre daha uzun sürgünler görülmüştür (Şekil 4.8.).

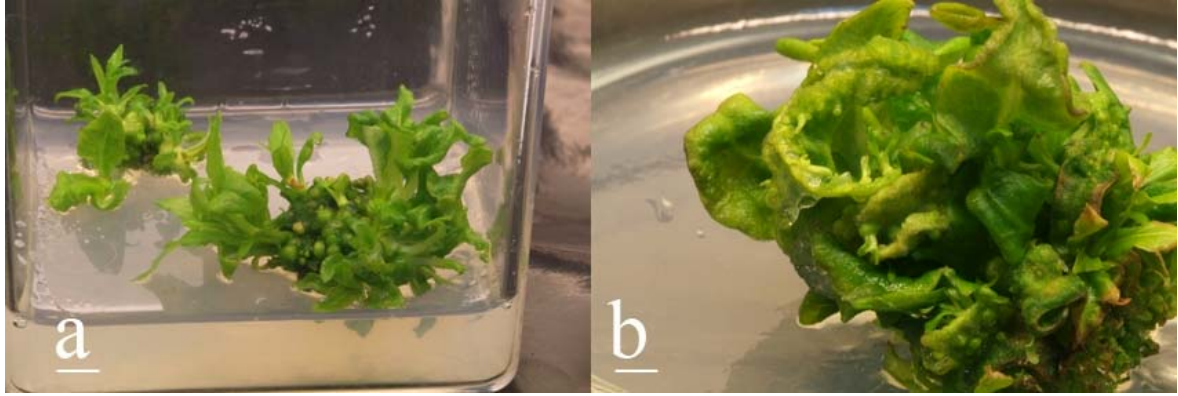


Şekil 4.7. TDZ ve NAA içeren MS ortamdan uç meristeminden elde edilen sürgünlerin 4 haftalık görünüşleri (a,b,c) 0.05 mg/l TDZ ve 0.05 mg/l NAA içeren ortamdaki sürgün rejenerasyonu ve gelişim aşamaları (d,e,f) 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdaki sürgün rejenerasyonu ve gelişim aşamaları. Bar Şekil a,b,d,e,f,= 0.6 cm, Şekil c=1.2 cm

Çizelge 4.17. Farklı meristem kullanımının sürgün uzunluğu üzerine etkisi

Eksplantlar	Sürgün Uzunluğu (cm)
Uç meristemi	0.73
1. koltukaltı meristemi	1.03 ¹

¹ Ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir



Şekil 4.8. TDZ ve NAA içeren MS ortamında 1.koltukaltı meristeminden elde edilen sürgünlerin 4 haftalık görünüşleri (a) 0.05 mg/l TDZ ve 0.05 mg/l NAA içeren ortamdaki sürgün rejenerasyonu (b) 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdaki sürgün rejenerasyonu. Bar Şekil a,b=0.6 cm

Çizelge 4.18. Farklı ortamların köklenme yüzdesi üzerine etkisi

Ortamlar		Köklenme (%)
TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)	
0.05	0.05	30.00 ¹
0.1	0.05	3.33

¹ Ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir

Ortamda 0.05 mg/l TDZ ve 0.05 mg/l NAA kullanıldığında eksplantların % 30'unda kök oluşmuştur. 0,1 mg/l TDZ ve 0.05 mg/l NAA içeren ortamda ise köklenme çok düşük olmuştur (% 3.33) (Çizelge 4.18.).

Bu denemedeki eksplantlar 4 hafta sonunda sürgünlerin daha iyi gelişebilmesi için 4 hafta bitki büyüme düzenleyici içermeyen MSO ortama aktarılmıştır. Burda gelişen sürgün ve kök ile ilgili özellikler dikkate alınarak sayım yapılmış ve Çizelge 4.19.'de varyans analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.19. Uç meristemi ve 1. koltukaltı meristeminden TDZ ve NAA içeren ortamda sürgün ve kök gelişimine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)		Eksplant Başına Yan Sürgün Sayısı (Adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	1	731.77	12.14**	0.36	1.46 ^{ös}	0.00	0.02 ^{ös}	0.00	0.01 ^{ös}
Eksplant	1	194.34	3.22	0.79	3.21	1.26	1.10	2.41	1.91
Ortam x Eksplant	1	4.74	0.08	0.79	3.21	0.41	0.36	0.12	0.10
Hata	8	60.30		0.25		1.14		1.26	
Toplam	11								

**0.01 düzeyinde önemli

^{ös} Önemsiz

Çizelge 4.19.'da görüldüğü gibi eksplant başına sürgün sayısı bakımından TDZ ve NAA içeren iki ortam arasındaki fark istatistiksel açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Eksplant başına yan sürgün sayısı sürgün ve kök uzunluğu açısından ortamlar ve eksplantlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır. Ayrıca ortam ve eksplant arasında etkileşim olmamıştır. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından ortamlar arasındaki farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan t testi sonucu Çizelge 4.20.'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. TDZ ve NAA içeren iki ortamın uç ve 1. koltukaltı meristeminden oluşan sürgünlerin sayısı üzerine etkisi

Ortamlar		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)
TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)	
0.05	0.05	23.32
0.1	0.05	38.94 ¹

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

Eksplant başına sürgün sayısı bakımından 0.1 mg/l TDZ ve 0.05 mg/l NAA içeren ortam daha iyi sonuç vermiştir. 0.05 mg/l TDZ ve 0.05 mg/l NAA içeren MS ortamda sürgün sayısı 23.32 iken, 0.1 mg/l TDZ ve 0.05 mg/l NAA içeren ortamda eksplant başına 38.94 adet görülmüştür. Çizelge 4.21.'de görüldüğü gibi her iki eksplantta yan sürgün sayısı 0.17 adet ile 0.33 adet arasında değişmiştir. Sürgün uzunluğu 4.73 cm ile 5.75 cm arasında değişmiştir. Kök uzunluğu 4.1 cm ile 5.2 cm arasında değişmiştir.

Çizelge 4.21. TDZ ve NAA içeren ortamın uç ve 1. koltukaltı meristeminden oluşan yan sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluğu üzerine etkisi

Ortamlar		Eksplantlar	Eksplant Başına Yan Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)				
0.05	0.05	Uç meristemi	0.17 ^{ös}	5.47 ^{ös}	5.20 ^{ös}
		1. koltukaltı meristemi	1.19	5.19	4.10
0.1	0.05	Uç meristemi	0.33	5.75	5.05
		1. koltukaltı meristemi	0.33	4.73	4.36

^{ös} Önemsiz

4.1.3.2. İki farklı oranda TDZ ve NAA'in etkisi

Steril bitkilerden alınan uç ve 1. koltukaltı meristemi hızlı çoğaltım amacıyla farklı oranda TDZ (0.05 – 0.1 mg/l) ve 0.1 mg/l NAA içeren MS besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlarda sürgün oluşumu gözlenmiştir. Eksplantlarda çok fazla sayıda sürgün ucu oluşmasına rağmen sürgün gelişimi yavaş olmuştur. Bu nedenle 3 hafta sonunda 0.5 cm ve üzerindeki uzunluklardaki sürgün sayısı belirlenmiştir. Varyans analizi sonuçları Çizelge 4.22.' de verilmiştir.

Çizelge 4.22. TDZ ve NAA içeren iki ortamın uç ve 1.koltukaltı meristeminden sürgün oluşumu ve gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Eksplant Başına Uzun Sürgün Sayısı (Adet)	
		K.O.	F
Ortam	2	3.17	1.04 ^{ös}
Eksplant	1	9.39	3.07
Ortam x Eksplant	2	1.06	0.34
Hata	12	3.06	
Toplam	17		

^{ös} Önemsiz

Çizelge 4.22.'de görüldüğü gibi eksplant başına uzun sürgün sayısı bakımından, ortamlar ve eksplantlar arasındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.23. Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının sürgün gelişimi üzerine etkisi

Ortamlar		Eksplant Başına Uzun Sürgün Sayısı (Adet)	
TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)	Uç meristemi	1. koltukaltı meristemi
0.05	0.1	2.25 ^{ös}	2.5 ^{ös}
0.1	0.1	2.4	2.4
MSO		2.0	2.4

^{ös} Önemsiz

Çizelge 4.23.'de görüldüğü gibi uç meristeminde 0.1 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda daha fazla (2.4 adet) uzun sürgün elde edilirken 1. koltukaltı meristeminde 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdaki daha fazla sayıda (2.5 adet) uzun sürgün elde edilmiştir. Sürgünlerdeki gelişimi hızlandırmak amacıyla eksplantlar MSO besli ortamına aktarılmıştır. 4 hafta sonunda sürgün sayısı ve yan sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluğu ölçümleri yapıp varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.24.).

Çizelge 4.24. Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının uç ve 1. koltukaltı meristeminden sürgün, yan sürgün ve kök oluşumu üzerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)		Eksplant Başına Yan Sürgün Sayısı (Adet)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	2	3356.51	44.90**	1.00	5.25*
Eksplant	1	448.90	6.00*	0.17	0.89
Ortam x Eksplant	2	145.76	1.95	0.17	0.89
Hata	12	74.76		0,19	
Toplam	17				
V. K.	S.D.	Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	2	2.47	6.58*	0.98	1.93 ^{ös}
Eksplant	1	9.72	25.88**	0.14	0.28
Ortam x Eksplant	2	2.13	5.68*	0.00	0.08
Hata	12	0.38		0.51	
Toplam	17				

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

^{ös} Önemsiz

Çizelge 4.24.'de görüldüğü gibi eksplant başına sürgün sayısı bakımından, ortamlar arasındaki farklılık 0.01 düzeyinde ve eksplantlar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemli çıkmıştır. Eksplant başına yan sürgün sayısı bakımından ortamlar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün uzunluğu bakımından, ortam x eksplant arasındaki etkileşim 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Kök uzunluğu bakımından ortamlar ve eksplantlar arasındaki fark veya etkileşim istatistiki olarak önemsiz çıkmıştır. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.25; 4.27.'de, t testi sonuçları ise Çizelge 4.26.'da verilmiştir.

Çizelge 4.25. Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının sürgün ve yan sürgün oluşumu üzerine etkisi

Ortamlar		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Eksplant Başına Yan Sürgün Sayısı (Adet)
TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)		
0.05	0.1	49.68 a ¹	0.00 b ²
0.1	0.1	38.60 b	0.00 b
MSO		4.31 c	0.70 a

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

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

Eksplant başına sürgün sayısı 4.31 adet ile 49.68 adet arasında değişmiştir. En fazla sürgün (49.68 adet), 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. En az sürgün MSO ortamdan elde edilmiştir. TDZ ve NAA içeren ortamlarda yan sürgün oluşmazken MSO ortamda eksplant başına 0.7 adet yan sürgün elde edilmiştir (Çizelge 4.25.). Eksplant başına sürgün sayısı bakımından meristem tipinin önemli derecede etkili olduğu tespit edilmiştir. 1. koltukaltı meristeminden 35.85 adet ve uç meristeminden 25.87 adet sürgün elde edilmiştir (Çizelge 4.26; Şekil 4.9.a,b,c,d).

Çizelge 4.26. Meristem tipinin sürgün sayısı üzerine etkisi

Eksplantlar	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)
Uç meristemi	25.87
1. koltukaltı meristemi	35.85 ¹

¹Ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir

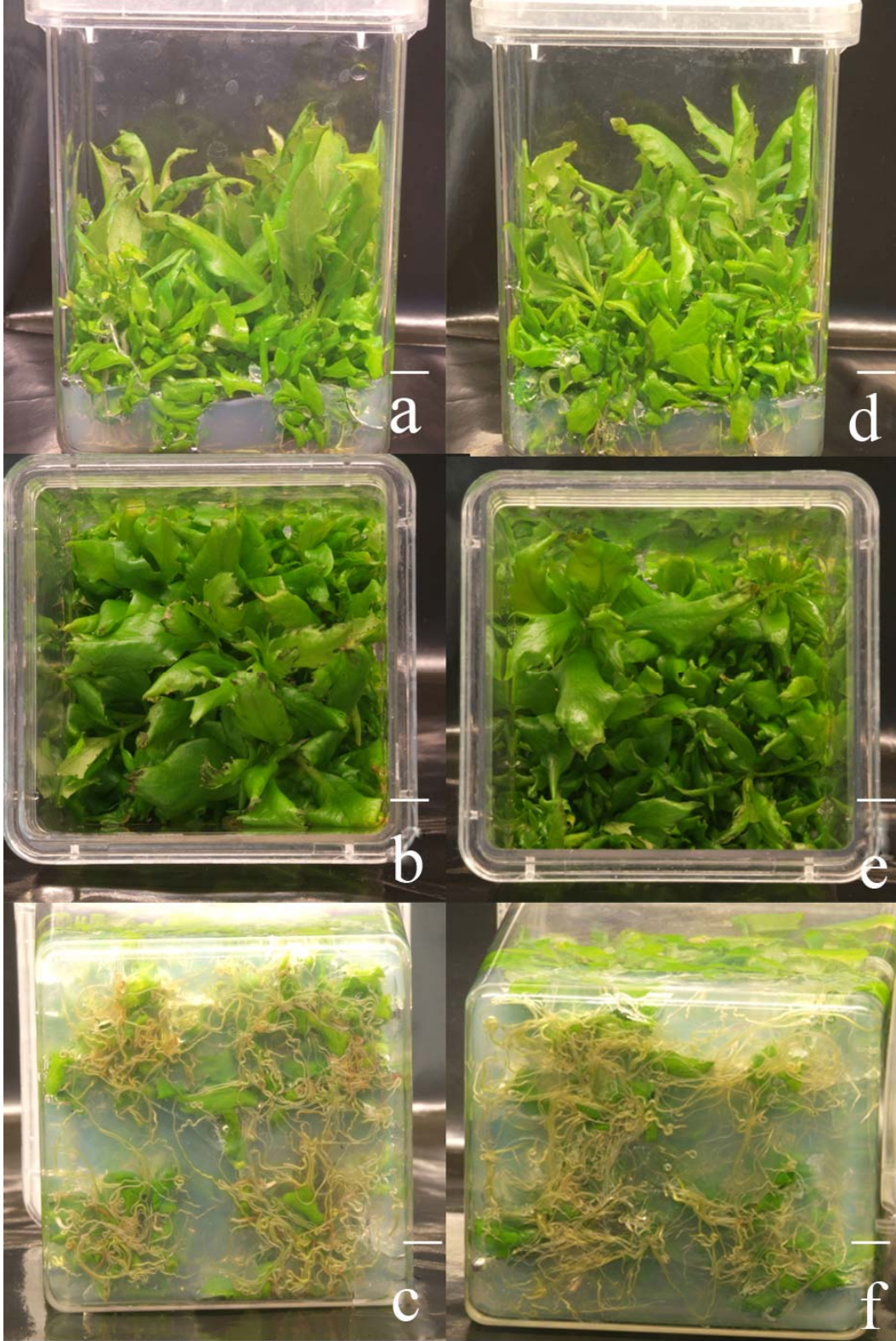
Çizelge 4.27. Ortamların ve eksplantların sürgün ve kök uzunluğuna etkisi

Ortamlar		Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Uzunluğu (cm)	
TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)	Uç meristemi	1. koltukaltı meristemi	Uç meristemi	1. koltukaltı meristemi
0.05	0.1	3.54 b ¹	6.12 a	4.26 ^{ös}	3.91 ^{ös}
0.1	0.1	4.28 a	4.49 b	3.47	3.43
MSO		2.75 c	4.38 b	4.28	4.13

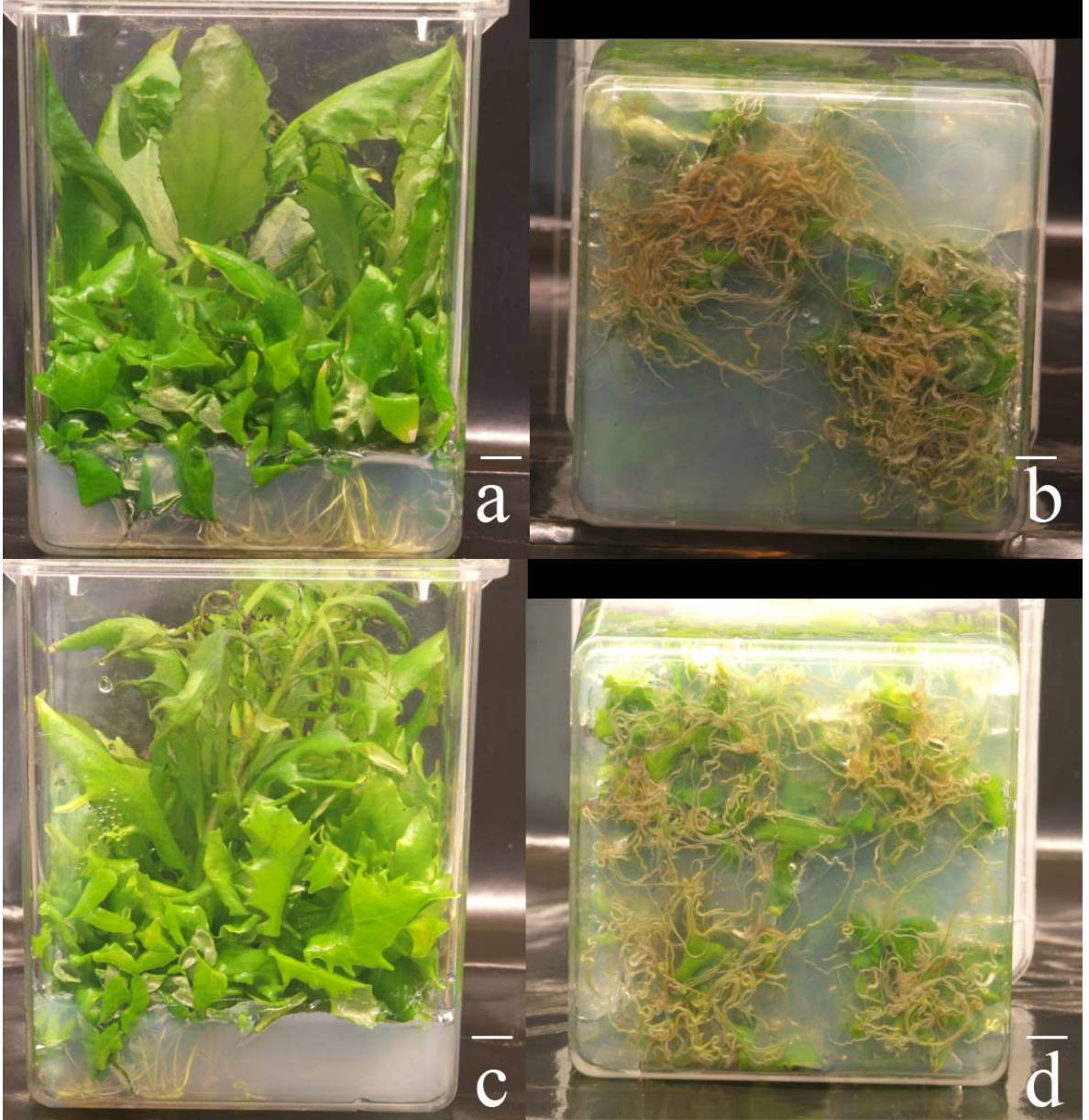
¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir

^{ös} Önemsiz

Çizelge 4.27.'de görüldüğü gibi uç meristeminde en uzun sürgün (4.28 cm), 0.1 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir (Şekil 4.9.a,b). En kısa sürgün (2.75 cm), MSO ortamda gözlenmiştir. 1. koltukaltı meristeminde uç meristemine göre daha uzun sürgünler elde edilmiştir. 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda en uzun sürgün (6.12 cm) elde edilirken (Şekil 4.10.c), en kısa sürgünler MSO ortamda gözlenmiştir. Uç meristeminde kök uzunluğu 1. koltukaltı meristemine göre daha fazla olmuştur. Kök uzunluğu 3.47 cm ile 4.28 cm arasında değişmiştir. En uzun kök MSO ortamdaki uç meristeminden elde edilmiştir.



Şekil 4.9. 0.1 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda elde edilen sürgünlerin MSO ortama alındıktan 4 hafta sonraki görünüşü (a,b) Uç meristeminden elde edilen sürgünler ve (c) kök gelişimi (d,e) 1. koltukaltı meristeminden elde edilen sürgünler ve (f) kök gelişimi. Bar Şekil a,b,c,d,e,f=0.7 cm



Şekil 4.10. 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda elde edilen sürgünlerin MSO ortama alındıktan 4 hafta sonraki görünüşü (a) Uç meristeminden elde edilen sürgünler ve (b) kök gelişimi (c) 1. koltukaltı meristeminden elde edilen sürgünler ve (d) kök gelişimi. Bar Şekil a,b,c,d=0.65 cm

4.1.4. Sıvı kültürde sürgün rejenerasyonu

4.1.4.1. TDZ ve NAA'in uç meristemi, 1. koltukaltı meristemi, yaprak ve yaprak sapından sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

In vitro koşullarda elde edilen bitkilerden uç meristemi, 1. koltukaltı meristemi, yaprak ve yaprak sapı alınarak bitki büyüme düzenleyicilerden TDZ ve NAA içeren sıvı MS ortamda kültüre alınmıştır. Magenta kapları çalkalayıcıya yerleştirilmiş 60 rpm hızda çalkalama

yapılmıştır. Eksplantlarda 2. haftada sürgün uçları görülmüştür. MSO ortamda gelişimin iyi olması nedeniyle 4 hafta sonra katı MSO ortama aktarılmıştır. 12 hafta sonunda sürgün ve kök ile ilgili özellikler dikkate alınarak sayım ve ölçümler yapılmıştır. Sürgün renenerasyonunun iyi olduğu görülmüş ve çok sayıda sürgün elde edilmiştir. Çizelge 4.28.'de TDZ ve NAA içeren ortamda dört eksplanttan oluşan sürgün ve kök gelişimine ait varyans analizi sonuçları verilmiştir. Sürgün sayısı ve uzunluğu bakımından eksplantlar arasındaki fark istatistiki olarak 0.05 düzeyinde önemli çıkmıştır. Yan sürgün sayısı bakımından ortam ve eksplantlar arasında 0.05 düzeyinde etkileşim çıkmıştır. Kök uzunluğu bakımından eksplantlar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemli olmuştur. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.29. ve 4.30.'da verilmiştir.

Çizelge 4.28. TDZ ve NAA içeren sıvı ortamda dört farklı eksplanttan sürgün ve kök gelişimine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Sürgün Sayısı (Adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)		Yan Sürgün Sayısı (Adet)		Kök Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	1	333.02	0.82	8.43	1.61	0.08	0.02	0.08	0.02
Eksplant	3	1989.03	4.87*	20.66	3.94*	4.68	0.97	20.63	5.24**
Ortam x Eksplant	3	781.63	1.91	1.93	0.37	5.41	1.12*	4.42	1.12
Hata	16	408.67		5.25					
Toplam	23								

** 0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.29. TDZ ve NAA içeren sıvı ortamda dört farklı eksplantın sürgün ve kök gelişimi

Eksplantlar	Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
Uç meristemi	41.03 ab ¹	2.62 b ¹	2.04 b ²
1. koltukaltı meristemi	52.63 a	5.63 a	4.83 a
Yaprak	14.50 c	1.25 b	0.83 b
Yaprak Sapı	18.53 bc	2.57 b	0.96 b

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

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

Sürgün sayısı 14.50 adet ile 52.63 adet arasında değişmiştir. En fazla sürgün 1. koltukaltı meristeminden (Şekil 4.11.), en az sürgün ise yapraktan elde edilmiştir. En uzun sürgün (5.63 cm), 1. koltukaltı meristeminden elde edilirken diğer üç eksplantın sonuçları arasında istatistiki olarak bir fark çıkmamıştır. Kök uzunluğu 0.83 cm ile 4.83 cm arasında değişmiştir. En uzun kök 1. koltukaltı meristeminden elde edilmiştir (Çizelge 4.29.).



Şekil 4.11. Sıvı kültürden 1. koltukaltı meristeminden adventif sürgün rejenerasyonu

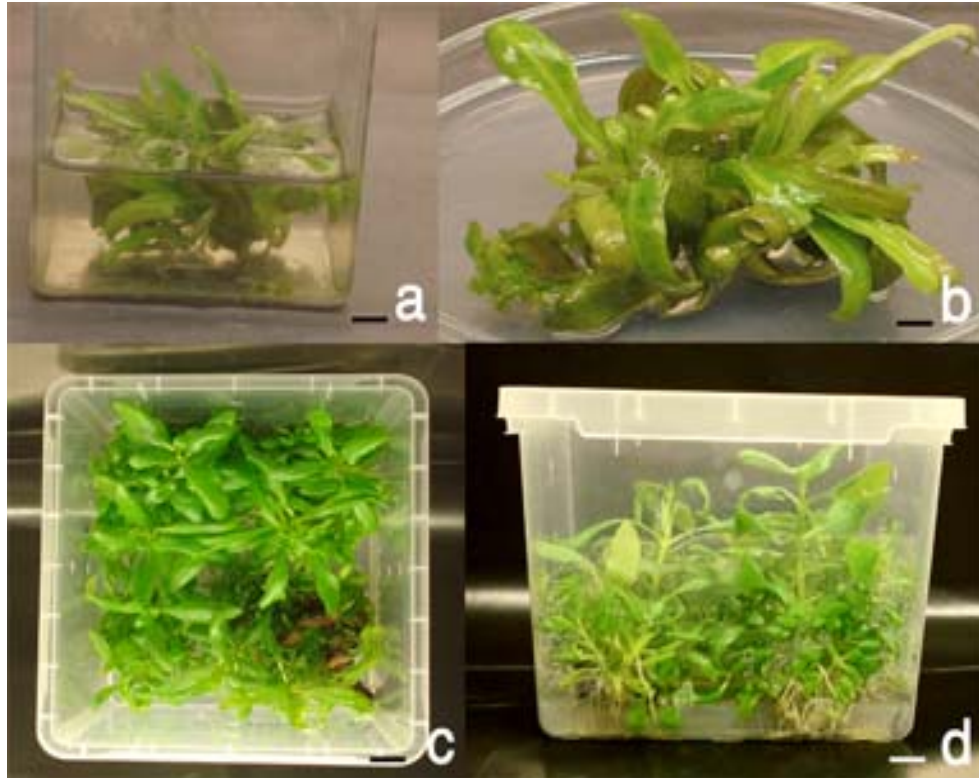
Çizelge 4.30. TDZ ve NAA içeren sıvı ortamda dört farklı eksplantın yan sürgün sayısına etkisi

Eksplantlar	Yan Sürgün Sayısı (Adet)	
	0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA	MSO
Uç Meristem	2.10 b ¹ A ²	0.00 d B
1. koltukaltı Meristemi	2.93 a A	2.58 a B
Yaprak	0.00 d B	2.47 ab A
Yaprak Sapı	1.07 c A	0.53 c B

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

² Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.30.'da görüldüğü gibi uç meristeminde TDZ içeren sıvı ortamda yan sürgün (2.10 adet/eksplant) oluşmuştur (Şekil 4.12.). 1. koltukaltı meristeminde de TDZ içeren sıvı ortamda daha fazla (2.93 adet/eksplant) yan sürgün oluşmuştur. Yaprakta TDZ içeren ortamda yan sürgün oluşmazken MSO ortamda 2.47 adet yan sürgün oluşmuştur. Yaprak sapında ise TDZ içeren ortamda MSO'a göre daha fazla yan sürgün (1.07 adet/eksplant) oluşmuştur.



Şekil 4.12. Sıvı kültürden uç meristeminden adventif sürgün rejenerasyonu. Bar Şekil a=0.65 cm, Şekil b= 04 cm, Şekil c= 1 cm, d=0.9 cm

4.1.4.2. Kin, TDZ ve NAA'in yaprak ve gövdeden sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Kin, TDZ ve NAA içeren üç ortamda yaprak ve gövde (internod) eksplantları sıvı kültüre alınmıştır. Kullanılan ortam ve eksplantların sürgün ve kök oluşumu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çizelge 4.31.'de sürgün ve yan sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluğuna ait varyans analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.31. Kin, TDZ ve NAA içeren ortamda yaprak ve gövdeden sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Sürgün Sayısı (Adet)		Yan Sürgün Sayısı (Adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	2	4267.87	20.94**	50.70	6.07*	4.86	2.10	5.11	4.87*
Eksplant	1	2382.80	11.69**	0.11	0.01	25.99	11.20**	17.50	16.66**
Ortam x Eksplant	2	297.24	1.46	5.24	0.63	1.78	0.77	1.94	1.85
Hata	12	203.79		8.35		2.32		1.05	
Toplam	17								

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Sürgün sayısı bakımından kullanılan ortamlar ve eksplantlar arasındaki farklılık 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Yan sürgün sayısı bakımından ortamlar arasındaki fark istatistiki olarak 0.05 düzeyinde önemli çıkmıştır. Sürgün uzunluğu bakımından kullanılan ortamlar arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz çıkarken eksplantlar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Kök uzunluğu bakımından ise ortamlar arasındaki fark istatistiki olarak 0.05 düzeyinde, eksplantlar arasındaki fark ise 0.01 düzeyinde önemli olmuştur. Bu farklılıkların önem derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.32 ve 4.34.'de, t testi sonuçları da Çizelge 4.33 ve 4.35.'de verilmiştir.

Çizelge 4.32. Kin, TDZ ve NAA'nın sürgün sayısı üzerine etkisi

Ortamlar		Sürgün Sayısı (Adet)
0.25 mg/l Kin	1 mg/l NAA	62.20 a ¹
0.05 mg/l TDZ	0.1 mg/l NAA	16.80 b
0.5 mg/l Kin	0.5 mg/l NAA	15.25 b

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

En fazla sürgün (62.20 adet) ile 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. En az sürgün (15.25 adet) ise 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren ortamda gözlenmiştir (Çizelge 4.32.).

Çizelge 4.33. Farklı eksplantların sürgün sayısı ve uzunluğu üzerine etkisi

Eksplantlar	Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)
Yaprak	19.91	0.92
Gövde (İnternod)	42.92 ¹	3.33 ¹

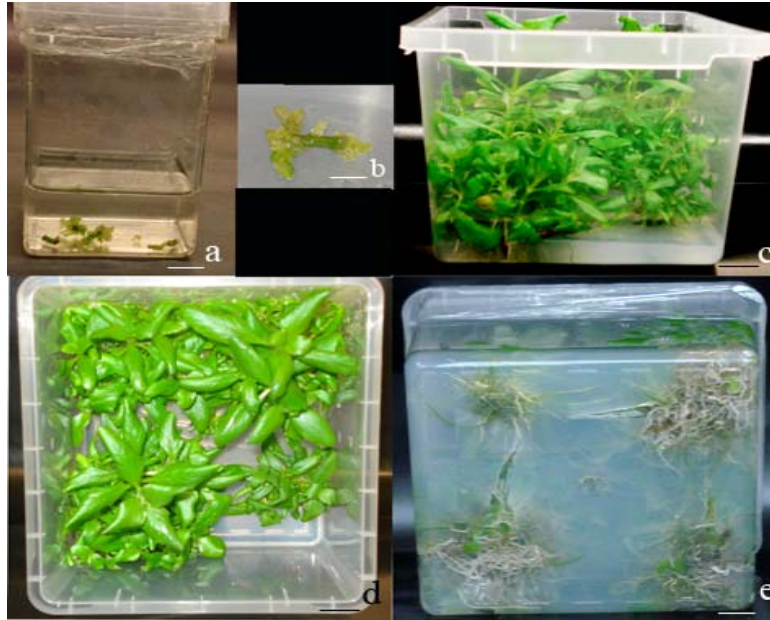
¹Ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir

Sıvı ortamdan alınan eksplantlarda vitrifikasyon görülmüştür (Şekil 4.13.a,b; 4.14.a,b; 4.15.a,b). Ancak sıvı kültürdeki eksplantlar katı MSO ortama alınınca vitrifikasyon sorunu giderilmiş ve eksplantlar üzerinde yüksek oranda sürgün rejenerasyonu görülmüştür (Şekil 4.13.c,d,e; 4.14.c,d,e; 4.15.c).

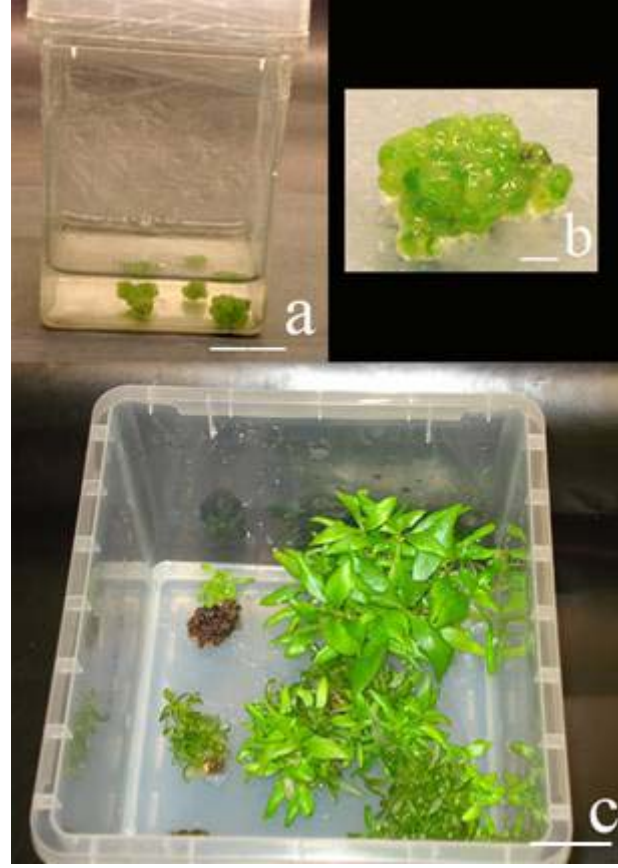
Çizelge 4.33.'de de görüldüğü gibi sürgün sayısı ve uzunluğu açısından gövde, yaprak eksplantına göre daha iyi sonuç vermiştir. Ortalama 3.33 cm uzunluğunda 42.92 adet sürgün elde edilmiştir.



Şekil 4.13. Sıvı kültürde 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamda gövdeden adventif sürgün rejenerasyonu (a,b) Sıvı kültürde 4 haftalık sonuçlar (c,d) MSO ortamda 10 haftalık kültürden sonraki sürgünler (e) MSO ortamda 10 haftalık kültürden sonraki kökler. Bar Şekil a=1.2 cm, Şekil b=0.3 cm, Şekil c,d,e=1.3 cm



Şekil 4.14. Sıvı kültürde 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamda gövdeden adventif sürgün rejenerasyonu (a,b) Sıvı kültürde 4 haftalık sonuçlar (c,d) MSO ortamda 10 haftalık kültürden sonraki sürgünler (e) MSO ortamda 10 haftalık kültürden sonraki kökler. Bar Şekil a=1.2 cm, Şekil b=0.3 cm, Şekil c,d,e=1.3 cm



Şekil 4.15. Sıvı kültürde 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamda gövdeden adventif sürgün rejenerasyonu. (a,b) Sıvı kültürde 4 haftalık sonuçlar (c) MSO ortamda 10 haftalık kültürden sonraki sürgünler. Bar Şekil a=2 cm, Şekil b=0.4 cm, Şekil c=1.8 cm

Çizelge 4.34. Kin, TDZ ve NAA'nın yan sürgün sayısı ve kök uzunluğu üzerine etkisi

Ortamlar		Yan Sürgün Sayısı (Adet)	Kök Uzunluğu (cm)
0.25 mg/l Kin	1 NAA mg/l	5.70 a ¹	2.41 a ¹
0.05 mg/l TDZ	0.1 NAA mg/l	0.73 b	1.98 a
0.5 mg/l Kin	0.5 NAA mg/l	0.60 b	0.64 b

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

En fazla yan sürgün 0.25 mg/l TDZ ve 1 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilirken en az sürgün (0.60 adet) ise 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren ortamda gözlenmiştir.

Kök uzunluğu 0.64 cm ile 2.41 cm arasında değişmiştir. 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren ortamdan en uzun kök elde edilirken en kısa kök 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamda gözlenmiştir (Çizelge 4.34.). Kök uzunluğu bakımından gövde yaprak

eksplantına göre daha iyi sonuç vermiş ve 2.66 cm kök uzunluğu elde edilmiştir (Çizelge 4.35.). Yapraktan elde edilen sürgünlerdeki ortalama kök uzunluğu 0.69 cm'dir.

Çizelge 4.35. Yaprak ve gövde eksplantlarının kök uzunluğu üzerine etkisi

Eksplantlar	Kök Uzunluğu (cm)
Yaprak	0.69
Gövde (İnternod)	2.66 ¹

¹ Ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir

4.1.4.3. Kin ve NAA'in yaprak ve yaprak sapından sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Sıvı kültürde yaprak ve yaprak sapı eksplantları sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi açısından 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren ortamlarla bitki büyüme düzenleyici içermeyen MSO ortam karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.36.'da sürgün sayısı ve uzunluğu, yan sürgün sayısı ve kök uzunluğuna ait varyans analizi sonuçları verilmiştir. Bütün bu özellikler bakımından ortamlar ve eksplantlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır.

Çizelge 4.36. Kin ve NAA içeren ortam ve MSO ortamda yaprak ve yaprak sapından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Sürgün Sayısı (Adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)		Yan Sürgün Sayısı (Adet)		Kök Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	1	57.20	0.14 ^{ös}	1.12	0.57 ^{ös}	0.08	0.02 ^{ös}	0.08	0.08 ^{ös}
Eksplant	1	18.75	0.05	0.43	0.22	0.16	0.03	2.43	2.33
Ortam x Eksplant	1	339.20	0.82	0.29	0.15	14.08	2.76	4.56	4.37
Hata	8	411.65		1.98		5.10		1.05	
Toplam	11								

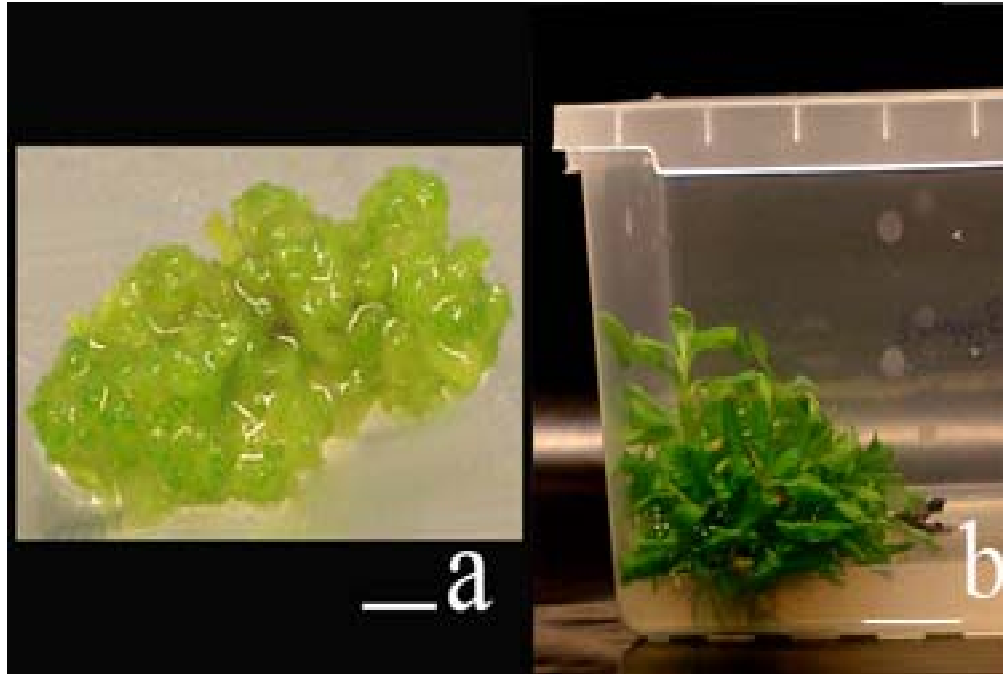
^{ös} Önemsiz

Sürgün sayısı 11.80 adet ile 26.80 adet arasında değişmiştir. En fazla sürgün MSO ortamda yapraktan elde edilmiştir (Şekil 4.16.). Sürgün uzunluğu 0.45 cm ile 1.43 cm arasında değişmiştir. En uzun sürgün MSO ortamında yaprak sapından elde edilmiştir. Yan sürgün sayısı 0.47 adet ile 2.87 adet arasında değişmiştir. En fazla yan sürgün 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren ortamda yaprak sapından elde edilmiştir. Kök uzunluğu 0.20 adet ile 2.33 adet arasında değişmiştir. En uzun kök 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren ortamda yaprak sapından elde edilmiştir (Çizelge 4.37.).

Çizelge 4.37. Farklı eksplantın sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluğuna etkisi

Ortam	Eksplantlar	Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Yan Sürgün Sayısı (Adet)	Kök Uzunluğu (cm)
0.5 mg/l Kin- 0.5 mg/l NAA	Yaprak	11.80 ^{os}	0.45	0.47	0.20
	Yaprak Sapı	19.93	1.13	2.87	2.33
MSO	Yaprak	26.80	1.37	2.47	1.27
	Yaprak Sapı	13.67	1.43	0.53	0.93

^{os} Önemsiz



Şekil 4.16. Sıvı kültürde 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamda yapraktan adventif sürgün rejenerasyonu (a) Sıvı kültürde 4 haftalık sonuçlar (b) MSO ortamda 10 haftalık kültürden sonraki sürgünler. Bar Şekil a= 0.3 cm, Şekil b=1.1 cm

4.1.5. Elde edilen bitkiciklerin akvaryum koşullarına adaptasyonu

Adventif sürgün rejenerasyonu ve hızlı çoğaltım denemelerinde elde edilen *Hygrophila difformis* bitkiciklerinin akvaryum koşullarına adaptasyonu amacıyla farklı denemeler kurulmuştur.

4.1.5.1. Işığın ve başlangıç besi ortamının etkisi

In vitro denemelerden elde edilen bitkicikler MSO ortamında geliştirildikten sonra her uygulama için 5'er bitki alınarak bitki boyu ve kök uzunluğu ölçümü yapılmış ve tabanında ince kum bulunan, bir ve iki florasan bulunan akvaryumlara yerleştirilmiştir. 10 hafta sonunda deneme sonuçlandırılmış ve bitkilerin ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 4.38.'de farklı ışık yoğunluğunun bitki ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları gösterilmiştir. Ayrıca bitkinin *in vitro* üretildiği ortamın adaptasyona etkisi de incelenmiştir. Bitkinin deneme başlangıcındaki boyu bakımından ortamlar arasındaki fark istatistiki olarak 0.01 düzeyinde önemli çıkarken uygulamalar arasındaki fark önemsiz çıkmıştır. Ortam x uygulama arasında etkileşim olup, 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Deneme sonunda bitkilerdeki uzama bakımından ortamlar arasındaki fark istatistiki olarak 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Uygulamalar arasındaki fark ise 0.01 düzeyinde önemli olmuştur. Yan sürgün sayısı bakımından ortam x uygulamalar arasındaki etkileşim 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Deneme başlangıcındaki kök uzunluğu bakımından ortamlar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Deneme sonunda köklerdeki uzama miktarı bakımından ortamlar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.38.). Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Tukey testi sonuçları Çizelge 4.39, 4.40, 4.41, 4.42 ve 4.43.' de verilmiştir.

Çizelge 4.38. Farklı ışık yoğunluğunun bitki ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Başlangıç Bitki Boyu ¹ (cm)		Sonuç Bitki Boyu ² (cm)		Bitkilerdeki Uzama Miktarı ³ (cm)		Yan Sürgün Sayısı (Adet)		Başlangıç Kök Uzunluğu ⁴ (cm)		Sonuç Kök Uzunluğu ⁵ (cm)		Köklerdeki Uzama Miktarı ⁶ (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	15	18.98	7.22**	87.74	4.88**	32.48	1.85*	3.72	3.32**	4.85	7.73**	30.50	2.26**	31.30	2.23**
Uygulama	1	2.63	1.00	212.93	11.84**	262.87	15.01**	6.50	5.80*	1.63	2.60	3.19	0.24	0.26	0.01
Ortam x Uygulama	15	8.82	3.35**	29.96	1.66	10.24	0.58	2.60	2.32**	0.74	1.18	10.41	0.77	9.39	0.67
Hata	110	2.63		17.98		17.51		1.12		0.63		13.49		14.04	
Toplam	141														

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

¹ : Akvaryumlara yerleştirilmeden önceki bitki boyu

² : Adaptasyon denemesi sonunda akvaryumlardaki bitkilerin boyu

³ : Deneme başlangıcındaki ve sonundaki bitki boy farkı

⁴ : Akvaryumlara yerleştirilmeden önce bitkilerin kök uzunluğu

⁵ : Adaptasyon denemesi sonunda akvaryumlardaki bitkilerin kök uzunluğu

⁶ : Deneme başlangıcında ve sonundaki bitki köklerindeki uzunluk farkı

Çizelge 4.39. Bitkiciklerin elde edildiği ortamın deneme başlangıcındaki bitkicik boyuna etkisi

Ortamlar			Kaynak Eksplant	Başlangıç Bitki Boyu (cm)	
Kin (mg/l)	TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)		Işık Yoğunluğu	
				2000 lüx	4000 lüx
MSO	-	-	Yaprak	6.50 c ¹ A ²	5.20 f A
0.25	-	0.25	“	7.10 b B	11.50 a A
0.25	-	0.5	“	3.50 h A	3.25 j A
0.25	-	1	“	6.40 cd A	5.50 e B
0.25	-	2	“	3.70 h A	3.90 i A
0.25	-	4	“	6.00 e A	4.20 h B
0.5	-	0.25	“	6.50 c A	4.80 g B
0.5	-	0.5	“	4.80 g A	5.40 ef A
0.5	-	1	“	4.60 g A	4.90 g A
0.5	-	2	“	7.40 a A	3.80 i B
0.5	-	4	“	4.60 g A	3.40 j A
MSO	-	-	Uç meristemi	5.75 f A	3.33 j B
-	0.05	0.1	“	3.25 i B	5.75 d A
-	0.1	0.1	“	7.20 ab A	4.70 g B
MSO	-	-	1. koltukaltı	7.00 b B	9.00 b A
-	0.1	0.1	“	6.20 de A	7.30 c A

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

²Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir

Birinci uygulamada (2000 lüx); denemede 3.25 cm ile 7.40 cm arasındaki uzunlukta bitkicikler kullanılmıştır. En uzun bitkiler 0.5 mg/l Kin ve 2 mg/l NAA içeren ortamda yaprak eksplantından elde edilen bitkilerdir. İkinci uygulamada (4000 lüx); denemede 3.90 cm ile 11.50 cm arasındaki uzunlukta bitkiler kullanılmıştır. En uzun bitkiler 0.25 mg/l Kin ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamda yaprak eksplantından elde edilen bitkilerdir (Çizelge 4.39.).

Çizelge 4.40. Bitkiciklerin elde edildiği ortamın bitkilerdeki uzamaya etkisi

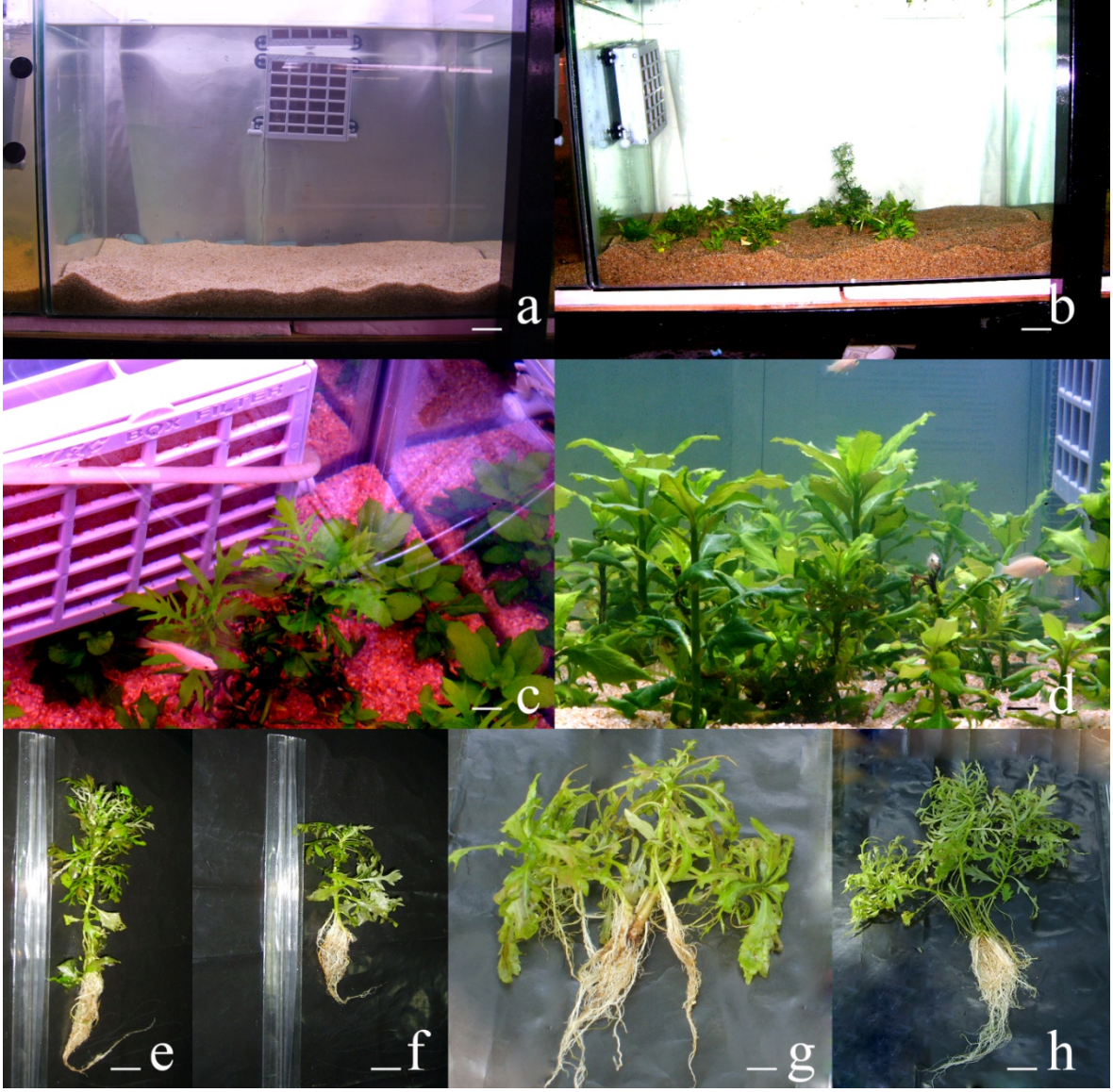
Ortamlar			Kaynak Eksplant	Sonuç Bitki Boyu (cm)	Bitkilerdeki Uzama Miktarı (cm)
Kin (mg/l)	TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)			
MSO	-	-	Yaprak	14.95 bc ¹	9.10 ab ²
0.25	-	0.25	“	22.39 a	13.33 a
0.25	-	0.5	“	9.22 c	5.83 b
0.25	-	1	“	13.67 bc	7.67 ab
0.25	-	2	“	10.70 bc	6.90 ab
0.25	-	4	“	12.90 bc	7.80 ab
0.5	-	0.25	“	14.25 bc	8.60 ab
0.5	-	0.5	“	13.60 bc	8.50 ab
0.5	-	1	“	13.95 bc	9.20 ab
0.5	-	2	“	12.80 bc	7.20 ab
0.5	-	4	“	12.25 bc	8.25 ab
MSO	-	-	Uç meristemi	11.14 bc	6.43 ab
-	0.05	0.1	„	17.62 ab	13.12 a
-	0.1	0.1	„	14.95 bc	9.00 ab
MSO	-	-	1. koltukaltı	17.37 ab	9.37 ab
-	0.1	0.1	„	16.50 ab	9.75 ab

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

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

Bitkilerdeki uzama miktarı 5.83 cm ile 13.33 cm arasında değişmiştir. En az uzama yaprak eksplantından 0.25 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren ortamda elde edilen bitkilerde olmuştur. Yaprak eksplantından elde edilen sürgünlerde en fazla uzama (13.33 cm), 0.25 mg/l Kin ve 0.25 mg/l NAA içeren ortamdan alınan bitkilerde gözlenmiştir (Şekil 4.17.). Uç meristeminden elde edilen sürgünlerde en fazla uzama (13.12 cm), 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdan alınan bitkilerde gözlenmiştir. 1. koltukaltı meristeminden elde edilen sürgünlerden ise en fazla uzama (9.75 cm), 0.1 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdan alınan bitkilerde gözlenmiştir (Çizelge 4.40.).

Bitkilerdeki uzama miktarı bakımından ışık yoğunlukları arasındaki farkın önem derecesini belirlemek için yapılan t testi sonucu Çizelge 4.41.'de verilmiştir. 4000 lüks ışık kullanılan akvaryumlarda bitkilerdeki uzama (10.23 cm) daha fazla olmuştur.



Şekil 4.17. *In vitro* elde edilen bitkiciklerin akvaryum koşullarına adaptasyonu (a,b) Işık yoğunluğu denemesinde akvaryum kurulumu ve bitkilerin yerleştirilmesi (c,d) Bitkilerdeki gelişme (e) 0.25 mg/l Kin ve 0.25 mg/l NAA içeren ortamdan alınan bitkideki boy ve kök gelişimi (f,g,h) Farklı ortamlardan alınan bitkilerin akvaryumda 10 hafta sonundaki gelişimleri. Bar Şekil a,b= 2 cm, Şekil c= 1.2 cm, Şekil d=1.3 cm, Şekil e,f= 2.4 cm, Şekil g,h= 1.2 cm

Çizelge 4.41. Işık yoğunluğunun bitkilerdeki uzamaya etkisi

Işık Yoğunluğu	Sonuç Bitki Boyu (cm)	Bitkilerdeki Uzama Miktarı (cm)
2000 lüx	13.03	7.37
4000 lüx	15.60 ¹	10.23 ¹

¹Ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir

Yan sürgün sayısı birinci uygulamada, 0.40 adet ile 2.80 adet arasında değişmiştir. En fazla yan sürgün 0.1 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda uç meristeminden elde edilen bitkilerde görülmüştür. İkinci uygulamada, 0 adet ile 3.75 adet arasında değişmiştir. En fazla yan sürgün 0.25 mg/l Kin ve 0.25 mg/l NAA içeren ortamda yapraktan elde edilen bitkilerde görülmüştür (Çizelge 4.42.).

Çizelge 4.42. Bitkiciklerin elde edildiği ortamların ve ışık yoğunluğunun akvaryumda yan sürgün sayısı üzerine etkisi

Ortamlar			Kaynak Eksplant	Yan Sürgün Sayısı (Adet)	
Kin (mg/l)	TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)		Işık Yoğunluğu	
				2000 lüx	4000 lüx
MSO	-	-	Yaprak	2.00 c ¹ A ²	0.20 f B
0.25	-	0.25	“	1.80 d B	3.75 a A
0.25	-	0.5	“	1.60 ef A	1.25 c A
0.25	-	1	“	0.80 ı A	0.00 g B
0.25	-	2	“	0.60 j A	0.80 e A
0.25	-	4	“	0.40 k A	0.20 f A
0.5	-	0.25	“	2.20 b A	1.40 c B
0.5	-	0.5	“	1.40 g A	1.00 d A
0.5	-	1	“	1.60 ef A	1.00 d B
0.5	-	2	“	1.60 ef A	0.80 e B
0.5	-	4	“	0.40 k A	0.20 f A
MSO	-	-	Uç meristemi	1.75 de A	0.67 e B
-	0.05	0.1	„	1.50 fg A	0.00 g B
-	0.1	0.1	„	2.80 a A	0.20 f B
MSO	-	-	1. koltukaltı	1.00 h B	3.00 b A
-	0.1	0.1	„	1.60 ef A	1.40 c A

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

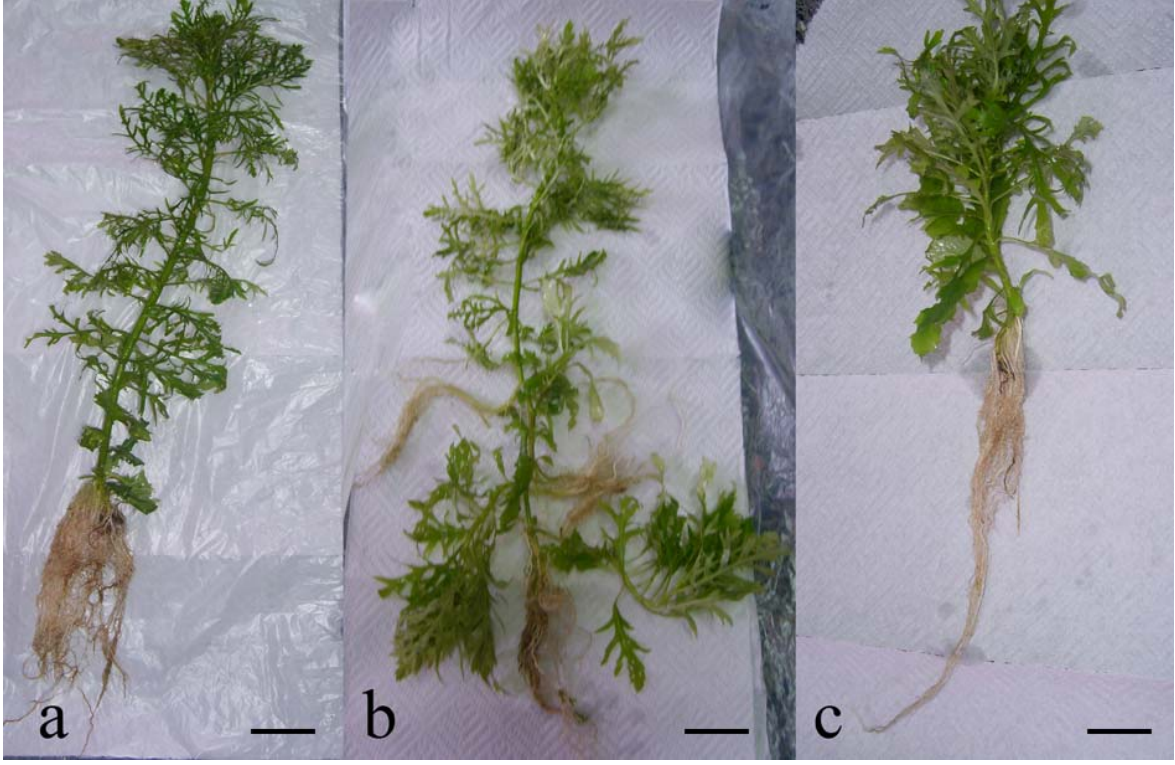
²Aynı satırda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.43. Bitkiciklerin elde edildiği ortamların köklerin başlangıç boyları ve uzama miktarına etkisi

Ortamlar			Kaynak Eksplant	Başlangıç Kök Boyu (cm)	Sonuç Kök Boyu (cm)	Kökdeki Uzama Miktarı (cm)
Kin (mg/l)	TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)				
MSO	-	-	Yaprak	2.05 cde ¹	16.15 b ¹	14.10 ab
0.25	-	0.25	“	3.22 bc	14.27 g	10.83 ab
0.25	-	0.5	“	1.50 e	14.10 g	12.78 ab
0.25	-	1	“	2.28 cde	12.32 ı	10.06 ab
0.25	-	2	“	2.35 cde	12.15 ı	9.80 ab
0.25	-	4	“	1.80 de	16.85 a	15.05 a
0.5	-	0.25	“	4.00 ab	16.95 a	12.95 ab
0.5	-	0.5	“	2.35 cde	12.25 ı	9.90 ab
0.5	-	1	“	2.20 cde	15.05 ef	12.85 ab
0.5	-	2	“	2.65 cde	11.05 j	8.40 b
0.5	-	4	“	2.10 cde	15.50 de	13.40 ab
MSO	-	-	Uç meristemi	2.64 cde	12.83 h	10.43 ab
-	0.05	0.1	“	3.12 bcd	15.62 cd	12.50 ab
-	0.1	0.1	“	3.10 bcd	14.40 g	11.30 ab
MSO	-	-	1. koltukaltı	4.75 a	16.12 bc	11.37 ab
-	0.1	0.1	“	2.20 cde	14.95 f	12.75 ab

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

Çizelge 4.43.'de görüldüğü gibi denemede kullanılan bitkilerin başlangıç kök uzunluğu 1.50 cm ile 4.75 cm arasında değişmiştir. En uzun kök bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamda 1. koltukaltı meristeminden elde edilen bitkilerde görülmüştür. Bitkilerin köklerindeki uzama miktarı 8.40 cm ile 15.05 cm arasında değişmiştir. En fazla uzama 0.25 mg/l Kin ve 4 mg/l NAA içeren ortamda yapraktan elde edilen bitkilerde görülmüştür (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. *In vitro* elde edilen bitkiciklerin akvaryum koşullarına adaptasyonu (a,b) Bitki boyu ve kök gelişimi (c) 0.25 mg/l Kin ve 4 mg/l NAA içeren ortamdan alınan bitkideki kök gelişimi. Bar Şekil a,b,c = 2.5 cm

4.1.5.2. Akvaryum su sıcaklığının etkisi

In vitro denemelerden elde edilen sürgünler MSO ortamda geliştirildikten sonra her uygulama için 5'er bitki alınarak bitki boyu ve kök uzunlukları ölçülüp tabanında ince kum bulunan, su sıcaklığı 24 °C ve 28 °C'e ayarlanmış akvaryumlara yerleştirilmiştir. 10 hafta sonunda deneme sonuçlandırılmış ve ölçümler yapılmıştır.

Çizelge 4.44.'de farklı su sıcaklığının bitki ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları gösterilmiştir. Ayrıca bitkinin *in vitro* üretildiği ortamın etkisi de incelenmiştir.

Çizelge 4.44. Farklı su sıcaklığının bitkiciklerin elde edildiği ortamın bitki gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Başlangıç Bitki Boyu ¹ (cm)		Sonuç Bitki Boyu ² (cm)		Bitkideki Uzama Miktarı ³ (cm)		Yan Sürgün Sayısı (Adet)		Başlangıç Kök Boyu ⁴ (cm)		Sonuç Kök Boyu ⁵ (cm)		Kökteki Uzama Miktarı ⁶ (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	15	15.32	4.21**	29.36	2.15*	12.48	1.79*	6.63	2.95**	3.32	3.21**	30.43	3.15**	27.95	2.91**
Uygulama	1	90.63	24.91**	1163.40	85.31**	608.06	87.06**	4.55	2.03	3.98	3.85	367.68	38.11**	295.11	30.74**
Ortam x Uygulama	15	4.90	1.35	25.98	1.90**	10.73	1.54	2.82	1.25	0.51	0.49	23.33	2.42**	22.95	2.39**
Hata	113	3.64		13.64		6.98		2.24		1.03		9.65	9.60		
Toplam	144														

** 0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

¹ : Akvaryumlara yerleştirilmeden önceki bitki boyu

² : Adaptasyon denemesi sonunda akvaryumlardaki bitkilerin boyu

³ : Deneme başlangıcındaki ve sonundaki bitki boy farkı

⁴ : Akvaryumlara yerleştirilmeden önce bitkilerin kök uzunluğu

⁵ : Adaptasyon denemesi sonunda akvaryumlardaki bitkilerin kök uzunluğu

⁶ : Deneme başlangıcında ve sonundaki bitki köklerindeki uzunluk farkı

Bitkinin deneme başlangıcındaki boyu bakımından ortamlar ve uygulamalar arasındaki fark istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli çıkarken ortam x uygulama arasında etkileşim olmamıştır. Bitkideki uzama miktarı bakımından ortamlar arasındaki fark 0.05 düzeyinde, uygulamalar arasındaki fark ise 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Yan sürgün sayısı bakımından ortamlar arasındaki fark istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Deneme başlangıcındaki kök uzunluğu bakımından ortamlar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Deneme sonundaki kök uzunluğu ve köklerdeki uzama bakımından ortamlar ve uygulamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemli çıkarken ortam x uygulamalar arasındaki etkileşim 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Tukey testi sonuçları Çizelge 4.45, 4.47. ve 4.49.'da, t testi sonuçları Çizelge 4.46. ve 4.48.'de verilmiştir.

Çizelge 4.45. Bitkinin elde edildiği ortamın deneme başlangıcındaki bitki boyuna etkisi

Ortamlar			Kaynak Eksplant	Başlangıç Bitki Boyu (cm)
Kin (mg/l)	TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)		
MSO	-	-	Yaprak	7.40 abc ¹
0.25	-	0.25	“	8.20 a
0.25	-	0.5	“	4.25 cd
0.25	-	1	“	7.10 abcd
0.25	-	2	“	5.90 abcd
0.25	-	4	“	5.45 abcd
0.5	-	0.25	“	5.89 abcd
0.5	-	0.5	“	7.65 ab
0.5	-	1	“	5.25 abcd
0.5	-	2	“	6.95 abcd
0.5	-	4	“	5.15 abcd
MSO	-	-	Uç meristemi	5.25 abcd
-	0.05	0.1	“	3.90 d
-	0.1	0.1	“	4.65 bcd
MSO	-	-	1.koltukaltı	7.83 ab
-	0.1	0.1	“	4.70 bcd

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

Denemede 3.90 cm ile 8.20 cm arasındaki uzunluklarda bitkiler kullanılmıştır. Ortalama en uzun bitkiler 0.25 mg/l Kin ve 0.25 mg/l NAA içeren ortamda yaprak eksplantından elde edilen bitkilerdir (Çizelge 4.45.).

Çizelge 4.46. Farklı akvaryum su sıcaklığı uygulamalarının bitki boyuna etkisi

Su Sıcaklığı	Başlangıç Bitki Boyu (cm)
24 °C	6.83 ¹
28 °C	5.14

¹ Ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.46.'da görüldüğü gibi 24 °C sıcaklık uygulamasında kullanılan bitkiler, diğer uygulamadaki bitkilerden daha uzun ve ortalama 6.83 cm uzunluğundadır.

Çizelge 4.47. Bitkiciklerin elde edildiği ortamların bitkilerdeki uzama ve yan sürgün sayısına etkisi

Ortamlar			Kaynak Eksplant	Bitkilerdeki Uzama (cm)	Yan Sürgün Sayısı (Adet)	Başlangıç Kök Boyu (cm)
Kin (mg/l)	TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)				
MSO	-	-	Yaprak	4,55 j ¹	1,80 abc ²	3,40 ab ²
0.25	-	0.25	“	5,85 gh	2,70 ab	2,20 b
0,25	-	0,5	“	4,35 j	2,80 ab	1,65 b
0.25	-	1	“	5,30 ı	0,10 c	2,55 b
0.25	-	2	“	6,95 cd	0,30 bc	2,00 b
0.25	-	4	“	6,45 ef	1,00 bc	3,15 ab
0.5	-	0.25	“	6,51 de	1,67 abc	3,33 ab
0.5	-	0.5	“	7,40 b	1,20 abc	2,00 b
0,5	-	1	“	7,15 bc	1,80 abc	2,45 b
0,5	-	2	“	8,80 a	2,10 abc	2,95 b
0,5	-	4	“	5,75 h	1,90 abc	2,10 b
MSO	-	-	Uç meristemi	5,62 hı	2,50 abc	2,94 b
-	0.05	0.1	“	7,21 e	1,40 abc	2,70 b
-	0.1	0.1	“	6,15 fg	1,00 bc	2,80 b
MSO	-	-	1. koltukaltı	6,10 de	3,67 a	4,67 a
-	0.1	0.1	“	7,25 bc	1,20 abc	2,05 b

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

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

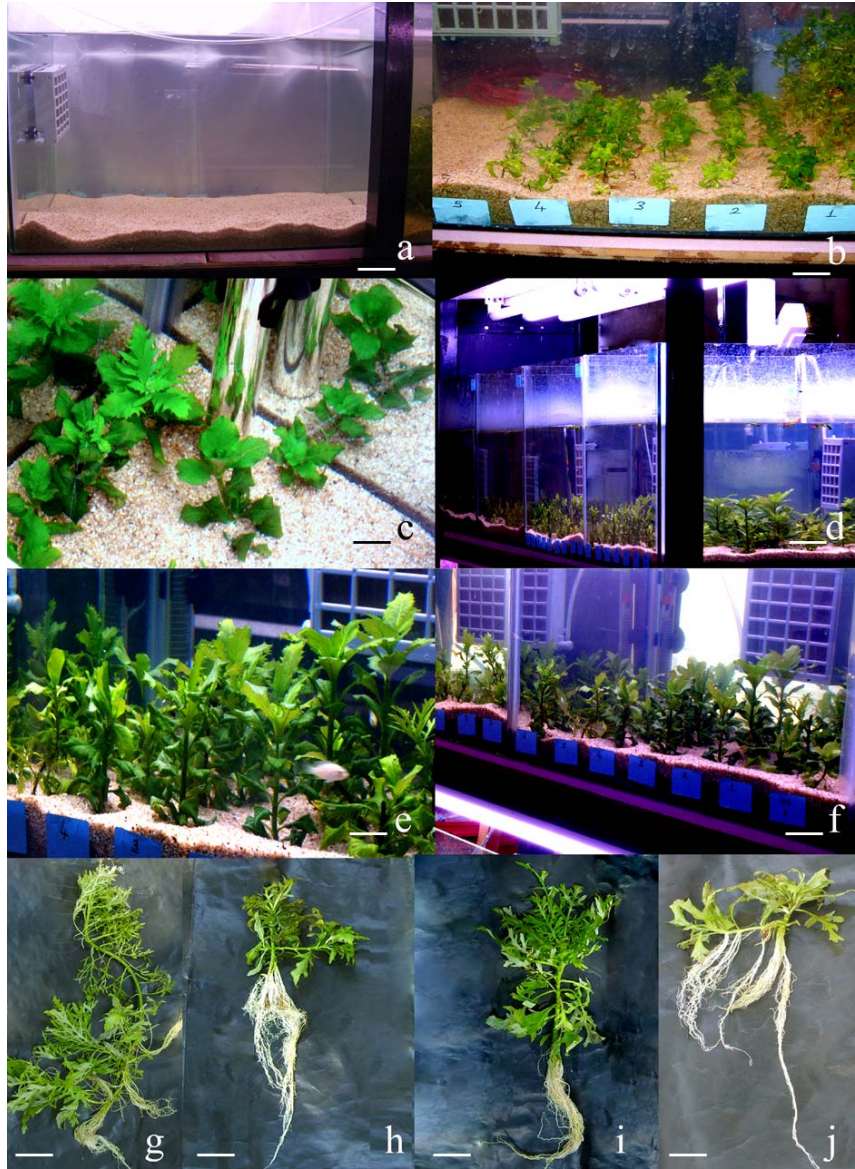
Deneme sonunda bitkilerdeki uzama 4.35 cm ile 8.80 cm arasında değişmiştir. En fazla uzama 0.5 mg/l Kin ve 2 mg/l NAA içeren ortamda yaprak eksplantından elde edilen bitkilerde olmuştur (Şekil 4.19.). En fazla yan sürgün (3.67 adet) ve en fazla başlangıç kök boyu (4.67 cm), MSO ortamda 1. koltukaltı meristeminden elde edilen bitkilerde olmuştur (Çizelge 4.47.).

Çizelge 4.48. Farklı su sıcaklığının bitkinin uzaması üzerine etkisi

Su Sıcaklığı	Bitkilerdeki Uzama (cm)
24 °C	8.53 ¹
28 °C	4.15

¹ Ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.48.'de görüldüğü gibi 24 °C su sıcaklığındaki bitkilerde daha fazla uzama gözlenmiştir. Bitkilerde ortalama 8.53 cm uzama olmuştur.



Şekil 4.19. *In vitro* elde edilen bitkiciklerin akvaryum koşullarına adaptasyonu (a,b) Sıcaklık denemesinde akvaryum kurulumu ve bitkiciklerin yerleştirilmesi (c,d,e,f) Bitkilerdeki gelişme (g) 0.5 mg/l Kin ve 2 mg/l NAA içeren ortamda yaprak eksplantından elde edilen bitkinin akvaryumda 10 hafta sonundaki gelişimi (h,i,j) Farklı ortamlardan alınan bitkilerin akvaryumda 10 hafta sonundaki gelişimleri. Bar Şekil a=4 cm, Şekil b=3.6 cm, Şekil c=2.5 cm, Şekil d=5 cm, Şekil e=2.8 cm, Şekil f=5 cm, Şekil g=2.5 cm, Şekil h,i,j =2 cm

Çizelge 4.49. Bitkiciklerin elde edildikleri ortamların ve sıcaklıkların köklerdeki uzama miktarına etkisi

Ortamlar			Kaynak Eksplant	Sonuç Kök Boyu (cm)		Kökdeki Uzama (cm)	
Kin (mg/l)	TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)		Sıcaklık (°C)		Sıcaklık (°C)	
				24	28	24	28
MSO	-	-	Yaprak	15.40d ¹ A ²	7.80 h B	12.0 e A	4.40 h B
0.25	-	0.25	“	11.70 h A	10.80 e A	9.30 h A	8.80 c A
0.25	-	0.5	“	9.80 ı A	10.00 f A	8.00 j A	8.50 c A
0.25	-	1	“	13.90 e A	11.30 d B	11.60 ef A	8.50 c B
0.25	-	2	“	16.40 c A	12.00 b B	14.40 b A	10.00 b B
0.25	-	4	“	15.50 d A	8.10 h B	12.00 e A	5.30 g B
0.5	-	0.25	“	19.00 a A	9.75 f B	15.60 a A	6.50 ef B
0.5	-	0.5	“	13.00 g A	8.20 h B	10.40 gA	6.80 e B
0.5	-	1	“	16.30 c A	14.80 a B	13.80 c A	12.40 a A
0.5	-	2	“	16.10 c A	14.80 a B	12.60 d A	12.40 a A
0.5	-	4	“	9.80 ı B	11.80 bc A	7.70 j B	9.70 b A
MSO	-	-	Uç meristemi	13.75 ef A	8.75 g B	10.50 g A	6.12 f B
-	0.05	0.1	“	18.50 b A	11.33 d B	15.50 a A	8.83 c B
-	0.1	0.1	“	12.00 h A	10.60 e B	9.30 h A	7.70 d B
MSO	-	-	1. koltukaltı	13.50 ef A	12.00 b B	8.50 ı A	8.00 d A
-	0.1	0.1	“	13.40 fg A	11.50 cd B	11.20 f A	9.60 b A

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

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

Birinci uygulamada (24 °C); denemede kullanılan bitkilerin sonuçtaki kök uzunluğu 9.80 cm ile 19.00 cm arasında değişmiştir. En uzun kök 0.5 mg/l Kin ve 0.25 mg/l NAA içeren ortamda yapraktan elde edilen bitkilerde görülmüştür. İkinci uygulamada (28 °C); kök uzunluğu 7.80 cm ile 14.80 cm arasında değişmiştir. En uzun kök 0.5 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l Kin ve 2 mg/l NAA içeren ortamlarda yapraktan elde edilen bitkilerde görülmüştür. Deneme sonunda bitki köklerindeki uzama birinci uygulamada; 8 cm ile 15.60 cm arasında değişmiştir. En uzun kök 0.5 mg/l Kin ve 0.25 mg/l NAA içeren ortamda yapraktan elde edilen bitkilerde gözlenmiştir (Şekil 4.20.). İkinci uygulamada; kök uzunluğu 4.40 cm ile 12.40 cm arasında değişmiştir. En uzun kök 0.5 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l Kin ve 2 mg/l NAA içeren ortamlarda yapraktan elde edilen bitkilerde görülmüştür (Çizelge 4.49.).



Şekil 4.20. *In vitro* elde edilen bitkiciklerin akvaryum koşullarına adaptasyonu (a) 0.5 mg/l Kin ve 0.25 mg/l NAA içeren ortamdan alınan bitkilerdeki kök gelişimi (b) Farklı ortamlardan alınan bitkilerdeki kök gelişimi. Bar Şekil a, b= 1.4 cm

4.2. *Microsorium pteropus* (Java Fern) türünde hızlı çoğaltım

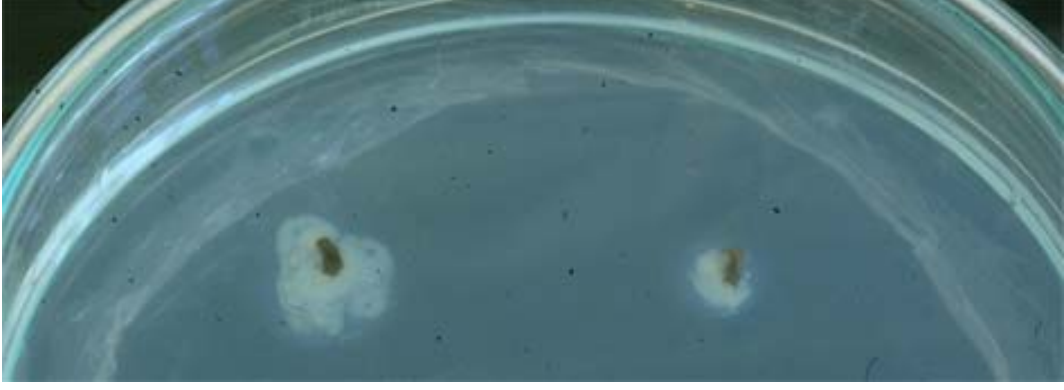
4.2.1. Eksplantların yüzey sterilizasyonu

Bitkiler yüzey sterilizasyonundan önce çeşme suyunda tutulduktan sonra gövde, yaprak ve gövde yaprak birlikte % 10 ÇS ve Tween -20 (1 damla/100 ml) ile 5 dk muameleden sonra % 1 PPM'de 120 dk bekletilerek steril su ile durulanmış ancak yüksek oranda bulaşıklık gözlenmiştir (Çizelge 4.50; Şekil 4.21.).

Çizelge 4.50. ÇS ve PPM ile gövde ve yaprak eksplantının yüzey sterilizasyonu

Eksplant	Ortam	Bulaşıklık oranı (%)
Gövde	Agar ile katılaştırılmış MS	100.00
	Sıvı MS	100.00
	Agar ile katılaştırılmış MS ortam + 100 ml saf su	33.33
Yaprak	Agar ile katılaştırılmış MS	100.00
	Sıvı MS	100.00
	Agar ile katılaştırılmış MS ortam + 100 ml saf su	100.00
Gövde-Yaprak	Agar ile katılaştırılmış MS ortam + 100 ml saf su	100.00

Yüzey sterilizasyonu amacıyla gövde, yaprak ve yaprak sapı tekrar farklı oran ve sürelerde çamaşır suyu ve PPM ile muamele edilmiştir. Yapraklarda NaOCl'in olumsuz etkisiyle klorofil parçalanması nedeniyle renk kaybı ve daha sonra gövdede kararmalar meydana gelmiştir (Çizelge 4.51; Çizelge 4.52.).



Şekil 4.21. Gövde eksplantındaki bulaşıklık

Çizelge 4.51. Farklı oran ve sürede uygulanan ÇS ve PPM ile yaprak eksplantının yüzey sterilizasyonu

Muameleler	PPM Uygulama Süresi (dk)	Bulaşıklık (%)	Renk
% 10 ÇS ile 5 dk muameleden sonra 5 dk durulama yapılmış ve % 1 PPM'de bekletme uygulanmıştır	150	0	Yeşil, renk açılması, zarar
	210	0	
	270	0	Yeşil, renk açılması
% 10 ÇS ile 2 dk. muameleden sonra % 2 PPM'de bekletme uygulanmıştır	150	0	Yeşil, renk açılması
	210	20.00	Yeşil, renk açılması, zarar
	270	10.00	
% 3 PPM'de bekletme uygulanmıştır	150	60.00	Yeşil
	210	20.00	
	270	50.00	

Çizelge 4.52. Farklı oran ve sürede uygulanan ÇS ve PPM ile gövde eksplantının yüzey sterilizasyonu

Muameleler	PPM Uygulama Süresi (dk)	Bulaşıklık (%)	Renk
%10 ÇS ile 10 dk muameleden sonra 5 dk durulama yapılmış ve % 2 PPM'de karıştırma yapıldıktan sonra 3 kere 5'er dk süreyle durulama yapılmıştır	150	25	Koyu Kahve
	210	20	Açık Kahve
	270	33.33	Kahve
%10 ÇS ile 10 dk muameleden sonra % 3 PPM'de karıştırma yapılmıştır	150	60	Koyu Kahve
	210	25	Kahve
	270	0	Koyu Kahve

Yaprak sapı eksplantında bulaşık gözlenmemesine rağmen eksplantlarda renk kaybı meydana gelmiştir (Çizelge 4.53.)

Çizelge 4.53. Farklı oran ve sürede uygulanan ÇS ve PPM ile yaprak sapı eksplantının yüzey sterilizasyonu

Muameleler	PPM Uygulama Süresi (dk)	Bulaşıklık (%)	Renk
% 10 ÇS ile 8 dk muameleden sonra 5 dk durulama yapılmış ve % 3 PPM'de karıştırma uygulandıktan sonra 3 kere 5'er dk durulama yapılmıştır	150	0	Sarı
	210	0	Sarı-yeşil
	270	0	Açık yeşil
% 10 ÇS ile 8 dk muameleden sonra 5 dk durulama yapılmış ve % 4 PPM'de karıştırma uygulandıktan sonra 3 kere 5'er dk durulama yapılmıştır	150	0	Sarı-yeşil
	210	0	Açık yeşil
	270	0	Sarı-yeşil

Gövdedeki kararmanın, dezenfektan uygulama süresinin fazla gelmesinden kaynaklandığı düşünülerek süre kısaltılmıştır (Çizelge 4.54.). Ancak uygulama süresinin azaltılması etkili olmamış ve bulaşıklık oranı da artmıştır. Yaprak ve yaprak sapında zararı azaltmak için katı, sıvı, katı ve sıvı ortamlar denenmiş ayrıca kararmayı önlemek için Çizelge 4.55.'de görüldüğü gibi ortamda sitrik asit de kullanılmıştır. Sitrik asit muamelesiyle kararmanın kısmen önlenmiştir. Genel olarak yaprakta orta damar dışındaki kısımlarda kararmanın olmuştur (Şekil 4.22.).

Çizelge 4.54. Farklı oran ve sürede uygulanan ÇS ve PPM ile gövde eksplantının yüzey sterilizasyonu

Muameleler				Bulaşıklık (%)	Renk
ÇS (%)	Süre (dk)	PPM (%)	Süre (dk)		
10	12	2	120	25	Yeşil
10	12	3	90	60	Kahve
10	9	2	120	0	Sarı-kahve
10	9	3	90	60	Açık kahve
20	10	-	-	50	Kahve
20	15	-	-	0	Kahve
30	5	-	-	50	Kahve

Çizelge 4.55. Yüzey sterilizasyonu yapılan yaprak ve yaprak sapı üzerinde sitrik asitin etkisi

Eksplant	Muamele	Ortam	Renk
Yaprak	% 10 ÇS ile 5 dk muameleden sonra % 1 PPM'de 120 dk bekletme uygulanmıştır	Katı MS	Orta damarın 3/4'ü yeşil
		Sitrik asit (1mg/l) ilaveli katı MS	Orta damarın 3/5'i yeşil
		Katı MS+ saf su	Orta damar yeşil
		Sitrik asit(1mg/l) ilaveli Katı MS + saf su	Orta damar yeşil
		Sıvı MS	Orta damarın 1/2'si yeşil
		Katı MS + sitrik asit (1mg/l) ilaveli sıvı MS	Orta damar yeşil
Yaprak sapı	% 10 ÇS ile 8 dk muameleden sonra % 2 PPM'de 120 dk karıştırma uygulanmıştır	Katı MS	Sarı
		Sitrik asit (1mg/l) ilaveli katı MS	Koyu yeşil



Şekil 4.22. Yaprak eksplantındaki renk kaybı

Ortamda kullanılan şeker (sukroz) bakteri ve fungus çoğalmasına yardımcı olmaktadır. Bitkiler az miktarda olduğu için mikroorganizmaların çoğalmasını azaltmak amacıyla yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan eksplantlar Çizelge 4.56.'da görüldüğü gibi sukroz içermeyen sıvı MSO ortamda kültüre alınmıştır. Başlangıçta hiçbir eksplant üzerinde mikroorganizma gelişimi gözlenmemesine rağmen ilerleyen zamanlarda bulaşıklık gözlenmiştir.

Çizelge 4.56. Yaprakta sukroz içermeyen ortamın bulaşıklık üzerine etkisi

Muameleler	Ortam	Bulaşıklık Oranı (%)	Renk (%)
% 10 ÇS ve Tween-20 (1 d/100 ml) ile 5 dk muameleden sonra durulama yapılmış ve % 0.5'lik PPM'de 210 dk bekletme ve 3 kere durulama yapılmıştır	Sıvı MS (Sukroz içermeyen)	0	36.33 yeşil
% 10 ÇS ve Tween-20 (1 d/100 ml) ile 5 dk muameleden sonra durulama yapılmış ve % 1'lik PPM'de 150 dk bekletme ve 3 kere durulama yapılmıştır		0	36.83 yeşil

4.2.2. *In vitro* hızlı çoğaltım

Denemede kullanılan bitki materyalinin çok sınırlı olması ve bulaşık miktarının fazla çıkması gibi nedenlerden dolayı mikroorganizmaları en az düzeyde tutabilmek için sterilizasyondan sonra ortamda şeker (sukroz) kullanılmamıştır. Yukarıda belirtilen şekersiz ortam kullanılan deneme de bu amaçla yapılmıştır. Her iki muameleden alınan bulaşık olmayan yapraklar, oksin ilave edilmiş şekersiz sıvı MS ortamda kültüre alınmıştır. Yaprak eksplantları üzerinde sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. 6 hafta sonunda sayım yapılarak sürgün sayısı ve uzunluğu belirlenmiştir. Çizelge 4.57'de sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, sürgün sayısı ve uzunluğuna ait varyans analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.57. Farklı NAA konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	4	1993.33	1.00*	5.77	1.12*	0.02	0.34 ^{ös}
Hata	10	2000.00		5.13		0.05	
Genel Toplam	14						

* 0.05 düzeyinde önemli

Sürgün oluşturan eksplant ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından ortamlar arasındaki fark istatistiki olarak 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün uzunluğu arasındaki fark önemsiz çıkmıştır.

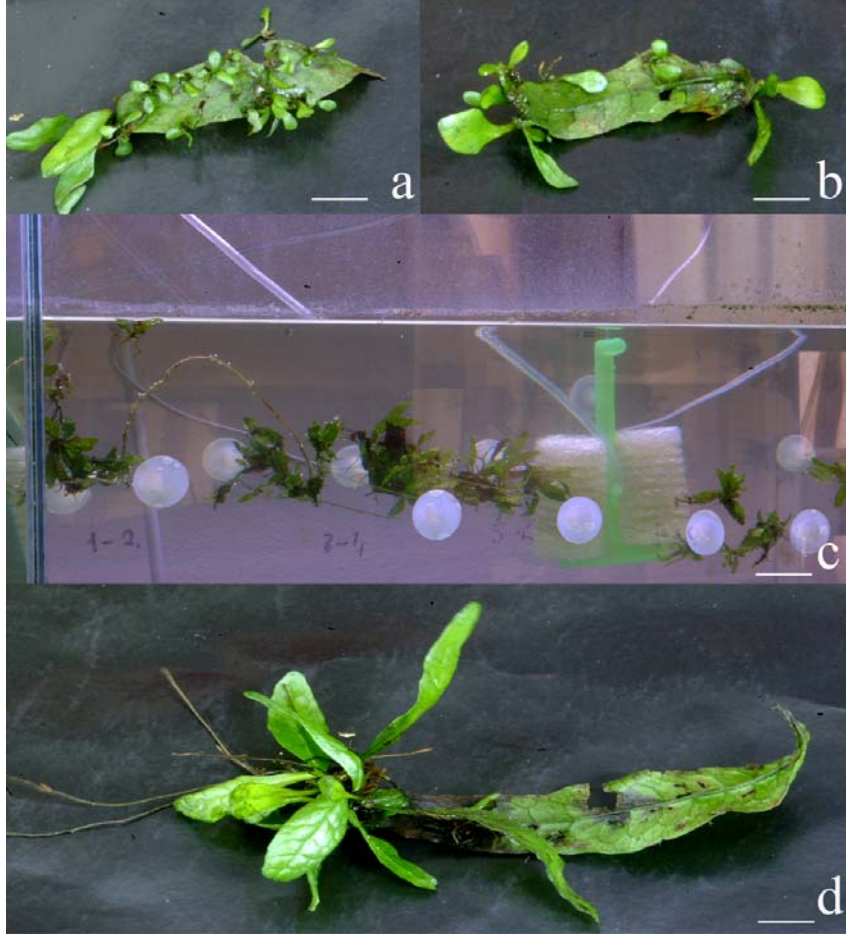
Çizelge 4.58. Farklı NAA konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Ortam	Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)
Sıvı MSO	90 a ¹	4.00 b ¹	0.26 ^{ös}
0.25 mg/l NAA	30 c	6.50 a	0.27
0.50 mg/l NAA	60 b	1.00 d	0.10
0.75 mg/l NAA	100 a	2.00 c	0.27
1.00 mg/l NAA	30 c	2.67 c	0.27

¹Ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir

^{ös} Önemsiz

Çizelge 4.58.'de görüldüğü gibi sıvı MSO ortamda eksplant başına 4 adet sürgün oluşmuştur. NAA içeren sıvı MS ortamlardan eksplant başına en fazla 6.5 adet sürgün elde edilmiştir. 0.25 mg/l den fazla NAA kullanıldığında sürgün sayısında önemli derecede düşüş görülmüştür. Sürgün uzunluğu 0.10 cm ve 0.27 cm arasında değişmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından eksplantlar arasında bir farklılık görülmemiştir. Elde edilen bitkicikler akvaryumlara aktarılmıştır (Şekil 4.23.).



Şekil 4.23. *In vitro* koşullarda yapraktan adventif sürgün rejenerasyonu (a,b) Sürgün rejenerasyonu (c) Akvaryumdaki gelişim (d) 10 hafta sonunda bitkinin görünüşü. Bar Şekil a,b= 0.9 cm, Şekil c= 5 cm, Şekil d=0.43 cm

4.2.3. *Ex vitro* hızlı çoğaltım

M. pteropus'un *in vitro* koşullarda yüzey sterilizasyonu ve sürgün rejenerasyonunda kısmen başarı sağlandığı ve bitki materyali sınırlı miktarda olduğu için '*ex vitro*' hızlı çoğaltım çalışması yapmaya karar verilmiştir. *Ex vitro* doku kültürü çalışmalarında "**pulse treatment**" (Eksplantın yüksek oranda bitki büyüme düzenleyici ile muamelesi) uygulaması yapılmıştır. Yapraklar BAP (250 ve 500 mg/l) ve IBA (250 ve 500 mg/l) içeren saf suda 15 ve 30 dk bekletilmiştir. Muameleden sonra yapraklar içerisinde çeşme suyu bulunan pH 8-8.5'da, akvaryum koşullarında misina ipine tutturularak gelişmeye bırakılmıştır (Şekil 4.24.). Akvaryum suyunun sıcaklığı 24 °C'ye ayarlanmış ve 2000 lüks beyaz ışık florasan lamba (Philips) kullanılmıştır. Bu ortamda 10-15 gün sonra yapraklar (frond) üzerinde sürgün uçları gözlenmeye başlamıştır. Daha sonra bu sürgün uçları bitki büyüme düzenleyici maddelerin miktarına bağlı olarak farklı sayıda ve uzunlukta sürgün oluşturmuştur.

Çizelge 4.59’da verilen varyans analizi sonuçlarına göre eksplant başına sürgün sayısı bakımından ortam x uygulama süresi arasında 0.05 düzeyinde etkileşim olmuştur. Sürgün uzunluğu bakımından ise ortamlar arasındaki fark 0.01, uygulama süreleri arasındaki fark ise 0.05 düzeyinde önemli çıkmıştır. Farklılıkların önem derecesini belirlemek için yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.60; 4.61.’de verilmiştir.

Çizelge 4.59. Farklı ortam ve muamele sürelerinin sürgün oluşumu üzerine etkisine ait varyans analizi

V. K.	S.D.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)		Sürgün Uzunluğu (Adet)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	6.72	1.18	7.11	11.23**
Uygulama Süresi	1	1.50	0.26	3.21	5.07*
Ortam x Uygulama Süresi	3	20.28	3.55*	0.58	0.91
Hata	16	5.71		0.63	
Toplam	23				

**0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.60.’da görüldüğü gibi eksplant başına sürgün sayısı 8 adet ile 14 adet arasında değişmiştir. 15 dakika muamelede en fazla 11.00 adet sürgün, 250 mg/l BAP ve 500 mg/l IBA uygulamasından elde edilmiştir. 30 dakika muamelede ise en fazla sürgün (14 adet/eksplant) 250 mg/l BAP ve 250 mg/l IBA uygulamasından elde edilmiştir.

Çizelge 4.60. Farklı oranda ve sürede kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin sürgün oluşumuna etkisi

Ortamlar		Uygulama Süresi (dk)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)
BAP (mg/l)	IBA (mg/l)		
250	250	15	8.00 c ¹
		30	14.00 a
250	500	15	11.00 a
		30	9.67 b
500	250	15	9.00 bc
		30	8.00 c
500	500	15	10.67 a
		30	9.00 bc

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

En uzun sürgün (4.47 cm), 500 mg/l BAP ve 250 mg/l IBA muamelesinde elde edilmiştir. En kısa sürgünler (1.97 cm), 250 mg/l BAP ve 250 mg/l IBA muamelesinde elde edilmiştir (Çizelge 4.61.).

Çizelge 4.61. Farklı oranda ve sürede uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerin sürgün gelişimine etkisi

Ortamlar		Sürgün Uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	IBA (mg/l)	
250	250	1.97 c ¹
250	500	2.82 bc
500	250	4.47 a
500	500	3.74 ab

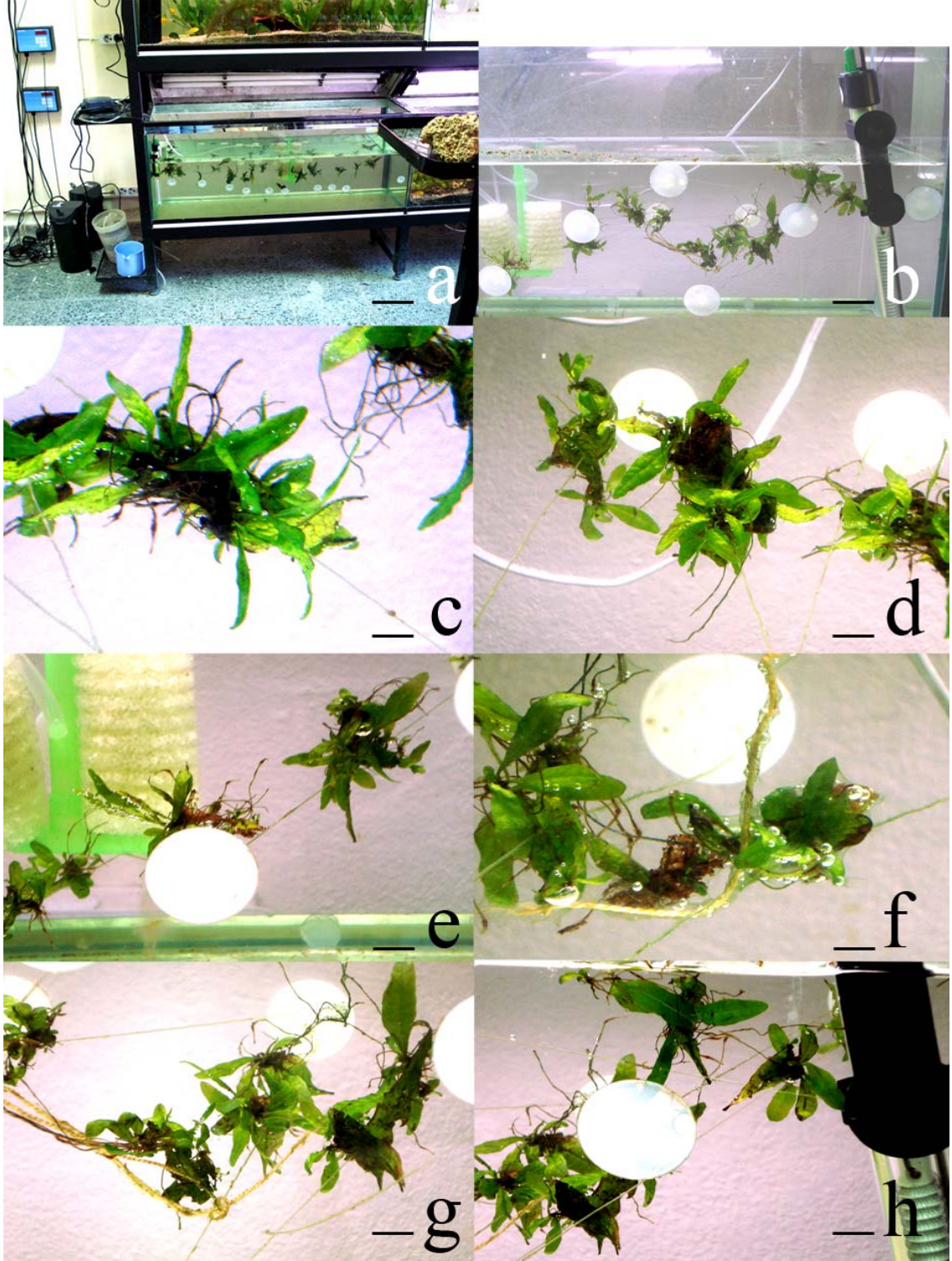
¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir

Bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulama süresi arttıkça sürgün uzunluğunda azalma görülmüştür. 15 dk uygulama süresi daha iyi sonuç vermiş ve ortalama 3.61 cm uzunluğunda sürgün elde edilmiştir (Çizelge 4.62.).

Çizelge 4.62. İki muamele süresinin sürgün gelişimine etkisi

Uygulama Süresi (dk)	Sürgün Uzunluğu (cm)
15	3.61 ¹
30	2.88

¹Aynı sütunda gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir



Şekil 4.24. *Ex vitro* koşullarda yaprakтан adventif sürgün rejenerasyonu (a,b) Akvaryum düzeni ve sürgün rejenerasyonu (c,d,e,f,g,h) Elde edilen bitkiciklerin görünümü. Bar Şekil a= 8 cm, Şekil b=2.5 cm, Şekil c= 1 cm, Şekil d=0.8 cm, Şekil e=0.75 cm, Şekil f=0.5 cm, Şekil g=1 cm, Şekil h=0.75 cm

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye’de akvaryum bitkileri üretimi, amatör yetiştiriciliğin dışında yurt dışından ithalata dayalı ve kayıt dışı bir sektör durumundadır. Bu yolla hem çok fazla miktarda döviz kaybı olmakta hem de yerel kaynaklarımız yabancı kaynaklı kirliliğe maruz kalmaktadır.

Akvatik bitkilerde doku kültürü çalışmaları sınırlı miktarda olup Türkiye dahil 4-5 ülkede yapılmaktadır. Bu Tez çalışmasında, yerel kaynaklarla yeterli miktarda bitki üretimi sağlayabilmek ve bitkilerin dış kaynaklardan yasadışı yollarla getirilmesinin önlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda dış kaynaklardan gelen bitkilerle birlikte yabancı flora ve faunanın taşınmasının ve dolayısıyla yerel flora ve fauna kaynaklarının kirlenmesinin önlenmesi amaçlanmıştır.

5.1. *Hygrophila difformis* Bitkisinde Yürütülen Çalışmalar

Hygrophila difformis Türkiye’ye, çeşitli yollarla yurt dışından getirilerek akvaryumlarda yetiştirilen ticari öneme sahip bir bitkidir. Bu nedenle yurt içinde çoğaltımı hem ekonomik açıdan, hem de istenildiği an yeterli miktarda bitki temini açısından önem arz etmektedir. Bu çalışmada bitkinin *in vitro* olarak hızlı bir şekilde ve çok sayıda çoğaltımı amaçlanmış ve doku kültürü çalışmaları yapılmıştır. Bu bitki ile ilgili daha önce yapılmış bir doku kültürü çalışması bulunmamaktadır.

Yüzey sterilizasyonu doku kültürü işlemlerinde en önemli aşamalardan biridir. Doku kültüründe en uygun eksplant kaynağını, daha önceden steril edilmiş tohumlardan elde edilen aseptik fideler oluşturur. Çünkü bu şekilde elde edilen fidelerin sterilizasyona ihtiyacı olmamakta ve yüzey sterilizasyon işleminin zararlı etkilerinden sakınılmaktadır. Bitkinin yeşil aksamıyla çalışıldığında yüzey sterilizasyonundan çok zarar görmekte ve sterilizasyon işlemi zorlaşmaktadır. Kara bitkilerinin yüzey sterilizasyonu için literatürde değişik yöntemler bulunmaktadır. Ancak su bitkilerinin doku kültürü çalışmalarında çok fazla literatür bulunmamaktadır. Çalışmada kullanılan materyal sudan alındığı için yüksek miktarda fungus ve bakteri bulaşıklığı taşımaktadır. Bu bulaşıklık hem egzogen hemde endogen olduğu için bitki sterilizasyonunda önemli problemler yaşanmıştır. Eksplantlar sterilizasyon aşamasında zarar görmüş veya yüksek oranda bulaşıklık çıkmıştır. Benzer şekilde Taylor vd (1998), *Piper methysticum* bitkisinin doku kültürü çalışmasında endogen bulaşıklığın büyük bir engel olduğunu bildirmişlerdir. Seradan alınan bitkilerin benomil ve rifampicin ile muamelesi sonucu bile bulaşıklığın önüne geçilemediğini rapor

etmişlerdir. Taylor vd (1998), diğ er bir uygulamalarında ise, ayrı ayrı birkaç çeş it antibiyotiğ in kùltür ortamına ilave edilmesinden sonra 3-5 hafta hiç bulaş ıklık ç ıkmamasına rağ men daha sonra bulaş ıklığ ın tekrar ç ıktığ ını gözlemlemiş lerdir. Özel (2002)'de Centaurea (Sevgi ç içeğ i) bitkisinde yeş il aksamların yüzey sterilizasyonunda steril edilmiş eksplantlarda 2-3 hafta sonra tekrar bulaş ıklığ ın ç ıktığ ını gözlemlemiştir.

Her bitki parç asının yüzeyssel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için gerekli dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresi farklıdır. Dolayısıyla en uygun dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresinin belirlenmesi önemlidir. Bir eksplantın yüzey sterilizasyonu için en etkili, ancak en düşük dezenfektan dozunun belirlenmesi gerekmektedir. Yüzey sterilizasyonunda hidrojen peroksit, civa, gümüş nitrat ve antibiyotikler kullanılabilirse de sodyum hipoklorit (ticari ç amaş ır suyu), en yaygın kullanıma sahiptir (Öztürk 2002).

Bu ç alışmada, ç amaş ır suyu ve PPM kullanılmış olup, en uygun dezenfektan dozu ve uygulama süresi belirlenmeye ç alışılmıştır. Ancak bu bitkilerde yeş il aksam ile ç alışılması ve sucul ortamda bulaş ıklığ a neden olabilecek bakteri, mantar vb. organizmaların daha yoğ un olarak bulunması ve endogen kaynaklı bulaş ık gözlenmesi doku kùltürünün ilk ve en önemli aş aması kabul edilen yüzey sterilizasyonunda problemlere yol açmakta dolayısıyla bu iş lem bir hayli zorlaşmaktadır. Bu nedenle ç alışmaya ç ok sınırlı miktardaki bitkilerle devam edilmiştir. Yüzey sterilizasyonu iş leminden sonra steril olan bitkiler seç ilerek denemelerde bu bitkiler kullanılmıştır.

Bu ç alışmada; yaprak eksplantları sürg ün rejenerasyonu için Kin (0- 0.25 mg/l) ve 2,4-D (0.25, 0.5, 1, 2 mg/l) iç eren MS ortamda kùltüre alınmıştır. Ortamlarda bulunan bitki büyüme düzenleyicilerin etkisi ile hem sert yapıda kallus oluş umu hem de kararma gözlenmiştir. En fazla kallus oranı (% 100), 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/2,4-D iç eren MS ortamında gözlenmiştir.

En fazla kararma görülen eksplant yüzdesi (% 100) 0.25 mg/l Kin ve 0.5 mg/l 2,4-D iç eren MS ortam ile 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D iç eren MS ortamında gözlenirken yalnızca 2 mg/l 2,4-D iç eren MS ortamda en düşük oranda (% 30) kararma gözlenmiştir. Kin ve 2,4-D'nin birlikte kullanıldığ ı ortamlarda sürg ün rejenerasyonu olmamıştır. En fazla sürg ün 0.25 mg/l 2,4-D iç eren ortamda eksplant baş ına 6.2 adet elde edilmiştir.

2,4-D içeren MS ortamlarda kültüre alınan eksplantlar üzerinde ilk aşamalarda sürgün oluşumu gözlenmiştir. Ancak eksplantlar 2,4-D içeren ortamda kaldığı zaman kararma gözlenmiştir. Bunun nedeninin etilen oluşumu nedeniyle eksplanttan ortama fenolik bileşiklerin salgılanması ve zamanla ortamda birikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Denemede dokulardaki kararmanın bu nedenle olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde Housti vd (1992), *Hevea brasiliensis* bitkisinin kallus kültüründe kararma gözlemişlerdir.

Straub vd (1988), su bitkisi *Phragmites australis*' in olgun tohumlarını 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l IAA içeren besi ortamında doku kültürüne almışlardır. Katı, sarı, parlak ve embriyogenik kallus elde etmişler ve IAA içermeyen ortamda çok sayıda bitki elde etmişlerdir. Buna karşın bizim çalışmamızda, sadece oksin içeren ortamda sürgün elde edilmiştir. Lopez vd (2000), *Picea chihuahuana* bitkisinde zigotik embriyoları kullanarak adventif embriyo oluşumunu gözlemişlerdir. Embriyo oluşumu için Kin ile 2,4-D içeren ve içermeyen B5 besi ortamı kullanmışlardır. Kin içeren ortamlarda 14 günde embriyo oluşumunu gözlemişlerdir. Aynı şekilde Vikrant ve Rashid (2003), *Paspalum scrobiculatum* bitkisinde yaptıkları çalışmada olgunlaşmış embriyoları 2,4-D içeren MS ve N6 besi ortamlarına yerleştirmişler ve 5 haftada somatik embriyolar oluşmuş ve 2,4-D içermeyen ortamda bitkiler elde edilmiştir.

Diğer bir çalışmada yaprak eksplantları 1 hafta süresince 15 mg/l 2,4-D veya 15 mg/l NAA içeren MS besi ortamında hem aydınlık hem de karanlık ortamda kültüre alındıktan sonra 1 mg/l 2,4-D veya 1.5 mg/l 2,4-D içeren MS besi ortamında tekrar kültüre alınmıştır. Kültürler 1 hafta sonra MSO ortama aktarılmıştır. Yüksek oranda 2,4-D veya NAA kullanımı kallus oluşumunu teşvik etse bile sürgün rejenerasyonu olmamıştır. Eksplantların çoğunda kararma gözlenmiştir. En fazla oranda kallus (% 93.33), aydınlık koşullarda 15 mg/l NAA içeren ortamda tutulup 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortama alınan eksplantlarda görülmüştür. Kalluslar sert yapıda özellik göstermiştir. Bazı eksplantlarda kallus oluşumunun yanısıra kararma gözlenmiştir. En fazla kararma oranı (% 100), yine yüksek oranda kallus elde edilen ortamda gözlenmiştir. Buna karşı Monnier (1990), somatik doku hücrelerinin öncelikle yüksek oranda oksin (genellikle 2,4-D) içeren ortamda kültüre alınıp daha sonra oksin içermeyen yeni ortama aktarıldıklarında embriyo üretme yeteneği kazandıklarını, oksinlerin somatik bitki hücrelerine embriyo üretimi için yeniden zigotik bir kapasite kazandırdığını belirtmektedir.

Çalışmada kararına gözlemlendiği ve olumlu sonuçlar alınmadığı için başka bitki büyüme düzenleyiciler kullanmaya karar verilmiş ve steril bitkilerden alınan genç yaprak eksplantları sürgün rejenerasyonu amacıyla 4 hafta TDZ (0.025 ve 0.05 mg/l) ve NAA (0.25, 0.5, 1, 2 ve 4 mg/l) içeren MS besisi ortamında kültüre alınmıştır. Daha sonra sürgün gelişiminin hızlanması için tüm eksplantlar MSO ortama aktarılmıştır. Bütün eksplantlarda sürgün oluşumu gözlenmiştir. En fazla sürgün (28.3 adet/eksplant) 0.025 mg/l TDZ ve 1mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir. Benzer şekilde Jenks vd (1990), Su zambaklarında yaprak eksplantını kullanmışlardır. 0.56 mM myo-inositol, 1.2 µM thiamin-HCL ve 3 µM TDZ, 3 µM IAA ve 87.6 mM sukroz içeren MS ortamda ortalama bitki başına 8 adet aerial yaprak elde etmişlerdir. Aynı şekilde He vd (2007), *Hydrastis canadensis* bitkisinin yaprak eksplantından 2.5 µM TDZ ve 5 µM NAA kullanarak eksplant başına 26 adet sürgün elde etmişlerdir.

Hossain vd (2007) *Chrysanthemum morifolium* bitkisinde 5 mg/l TDZ ile 0.25 mg/l NAA ve 0.5 mg/l Gibberellik asit kullanarak kallustan sürgün rejenerasyonu için uygun olduğunu tespit etmişlerdir. Te-chato ve Lim (2000), *in vitro* gelişen mangosteen fidelerinden elde edilen 5-15 mm uzunluğundaki yaprak eksplantında 2.22 µM BAP ve 2.25 µM TDZ içeren MS ortamda % 66.8 oranında kallus oluşumu ve dört alt kültürden sonra 4.45 adet sürgün ucu elde etmişlerdir. Anthony vd (2004), *Leucopocon verticillatus* bitkisinin somatik embriyogenesis çalışmasında en iyi sonucu 10 µM TDZ, 5 µM IAA, % 4 Maltoz ve % 0.7 agar içeren Gamborg B5 ortamından elde etmişlerdir.

Bu çalışmada, TDZ uç ve 1. koltukaltı meristemlerinde denenerek hızlı çoğaltım üzerindeki etkisi incelenmiştir. Eksplantlar 0.05 mg/l – 0.1 mg/l TDZ ve 0.05 mg/l NAA içeren MS besisi ortamlarında kültüre alınmıştır. 4-5 gün sonra eksplantlar üzerinde sürgün uçları gözlenmiştir. 4 hafta içinde sürgün uçlarından sürgünler ve bazı eksplantlarda kök oluşumu gözlenmiştir. Kültüre alınan eksplantlarda ortamların etkisi ile rejenerasyon aşamasında değişik oranda gelişme gözlenmiştir. 1. koltukaltı meristeminde uç meristemine göre hem daha fazla büyüme hem de daha uzun sürgünler elde edilmiştir. Kültürler 4 hafta sonra gelişebilmeleri için bitki büyüme düzenleyici içermeyen MSO ortama aktarılmıştır. Eksplant başına en fazla sürgün (38.94 adet) 0.1 mg/l TDZ ve 0.05 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Benzer şekilde Öztürk (2002)'ün, *Ludwigia sp.*'nin *in vitro* hızlı çoğaltımı çalışmasında uç meristemi, birinci, ikinci ve üçüncü-dördüncü koltukaltı meristemleri 4 hafta BAP (0.1, 0.2 ve 0.3 mg/l) ve NAA (0.1

mg/l) veya TDZ (0.05, 0.1, 0.15 mg/l) ve NAA (0.1 mg/l) içeren MS ortamda tutulduktan sonra ½ MS ortama alınmış ve 4 hafta bu ortamda tutulmuştur. En fazla sürgün (12.31 adet/eksplant) uç meristemi ile 0.05 mg/l TDZ ve 0.1mg/l NAA içeren MS besisi ortamından elde edilmiştir.

Diğer bir denemede; farklı oranda TDZ (0.05 – 0.1 mg/l) ve 0.1 mg/l NAA içeren MS besisi ortamı kullanılmıştır. Yaklaşık 3 hafta sonra eksplantlardaki uzun sürgün (0.5 cm ve üzeri) sayısı ve eksplant başına sürgün sayısı belirlenmiştir. Uç meristeminde 0.1 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda daha fazla sayıda (2.4 adet) uzun sürgün elde edilmiştir. Sürgünlerin bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda daha fazla geliştikleri TDZ oranı fazla olan ortamda sürgün boylarının daha kısa olduğu gözlenmiştir. 1. koltukaltı meristeminde 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda 2.5 adet uzun sürgün elde edilmiştir. Kültürler 4 hafta sonra MSO besisi ortamına aktarılmış ve sürgünlerdeki gelişme hızlanmıştır. En fazla (49,68 adet) ve en uzun (6.12 cm) sürgün 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. MSO ortamda uç meristeminden elde edilen sürgünlerdeki kök gelişimi daha iyi olmuştur. Benzer şekilde Husain vd (2007), *Pterocarpus marsupium* bitkisindeki çalışmalarında 18 günlük fidelerden elde edilen kotiledon boğum eksplantlarını 0.1-10 µM TDZ içeren MS ortamda kültüre almışlardır. En fazla sürgün yüzdesi (% 90) ve eksplant başına en fazla sürgün (15.2 adet), 0.4 µM TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. İlave olarak Bairu vd (2006) muz bitkisinin mikroçoğaltım çalışmalarında TDZ ve NAA kullanımının meristemden sürgün çoğaltımında etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Bu Tez çalışmasında, Kin ve NAA'ın yaprak eksplantı üzerindeki etkisine de bakılmıştır. Yaprak eksplantları Kin (0.5 mg/l) ve NAA (0.25, 0.5, 1, 2 ve 4 mg/l) içeren MS ortamda kültüre alınmıştır. Bir hafta sonra tüm eksplantlar üzerinde sürgün uçları gözlenmiştir. 2 hafta sonra sürgün uçlarında önemli derecede gelişme olmuş ve bütün eksplantlarda her ortamda yüksek oranda sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Kültürler 4 hafta bu ortamlarda kaldıktan sonra bitki büyüme düzenleyici içermeyen MSO ortamda 4 hafta kültüre alınmıştır. Köklenmede bir sorun olmamıştır. Eksplant başına en fazla sürgün (53.56 adet) 0.5 mg/l Kin ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir.

Diğer bir denemede; Kin'in farklı oranları denenmiştir. Yaprak eksplantları Kin (0.25 mg/l) ve NAA (0.25, 0.5, 1, 2 ve 4 mg/l) içeren ortama yerleştirilmiştir. Bütün eksplantlarda sürgün ucu oluşumu gözlenmiştir. Kültürler MSO ortamda gelişmeye

bırakılmıştır. Eksplant başına en fazla sürgün (80.56 adet), 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamda gözlenmiştir. Sürgünler kolaylıkla köklenmiştir. Jenks vd (2000), su bitkisi *Nymphoides indica*' da yaprak sapı eksplantından sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Kinetin (0-25 µM) ile IAA veya NAA (0-25 µM) kullanmışlardır. Cook vd (1989), su bitkisi *Kosteletzkya virginica*' nın olgunlaşmış embriyo ve gövde eksplantlarını kültüre alarak 1 mg/l Kinetin ve 2 mg/l IAA içeren MS ortamda kallus yoluyla rejenerasyon sağlamışlardır. Lopez vd (2000), *Picea chihuahuana* bitkisinde zigotik embriyoları kullanarak adventif embriyo oluşumunu gözlemişlerdir. Embriyo oluşumu için Kin ve 2,4-D içeren ve içermeyen B5 besi ortamı kullanılmıştır. Kin içeren ortamlarda 14 günde embriyo oluşumu gözlenmiştir.

In vitro olarak elde edilen bitkiler adaptasyon amacıyla akvaryumlara yerleştirilmiştir. Bütün bitkiler canlı kalmış ve adaptasyon sağlanmıştır. En uygun akvaryum sıcaklık ve ışık yoğunluğunu belirleyebilmek amacıyla yapılan denemelerde iki florasan (4000 lüks) kullanımının ve 24 °C su sıcaklığının daha uygun olduğu belirlenmiştir.

Günümüzde patojen içermeyen bitkilerin üretimi ve hızlı çoğaltım için doku kültürü yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki doku kültüründe kullanılan katılaştırıcı maddeler ne kadar saf olursa olsun nötr olmadıkları için doku kültürü yapılan bitkiler üzerinde değişik etki yapmaktadırlar. Değişik katılaştırıcı maddeler kullanıldığında bitki büyüme düzenleyici maddelerin oranları aynı kalsa bile sonuçlarda farklılık görülebilmektedir. Son zamanlarda jelleştirici madde içermeyen sıvı ortamlarda bitki rejenerasyonu çalışmaları üzerinde yoğunlaşmıştır. Sıvı kültürlerde sürekli daldırma sistemi (PIS) ve aralıklı daldırma sistemi (TIS) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler bitkinin üretim maliyetini düşürdüğü ve genel olarak çoğaltım hızını artırdığı için birçok bitkide kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada da eksplantlar (uç meristemi, 1. koltukaltı meristemi, yaprak, yaprak sapı ve gövde) PIS yöntemiyle Kinetin, TDZ ve NAA içeren sıvı MS ortamda kültüre alınarak bitki büyüme düzenleyicilerin eksplantlar üzerindeki etkisi araştırılmaya çalışılmıştır. Çalışma sonunda eksplantlardan başarılı bir şekilde sürgün rejenerasyonu ve çok sayıda sürgün elde edilmiştir. En fazla sürgün (62.20 adet) 0.25 mg/l Kin ve 1 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Ortamlarda yüksek oranda sitokin kullanıldığında anormal sürgün uçlarının geliştiği belirtilmektedir (Haq ve Dahot 2007). Bu çalışmada düşük oranda sitokin kullanılmıştır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalardaki katı ve sıvı kültürler karşılaştırıldığında; sıvı kültürde de sürgün sayısının fazla olduğu ancak sürgün gelişiminin daha yavaş olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, Haq ve Dahot (2007)' in PIS yöntemi ile muz çoğaltım çalışması ve Ilczuk vd (2005)'nin *Hippeastrum x chmielii* bitkisinde PIS yöntemi ile yapılan çalışmalarla uyum sağlamaktadır. Her iki çalışmada da genel olarak sürgün rejenerasyonu açısından normal doku kültürüne göre daha fazla sürgün ve belirgin farklılık görülmüştür. Sıvı kültürden katı kültüre alınan eksplantlarda gelişmedeki yavaşlamanın nedeninin, ortamla temasın az olması sonucu besin maddesi alımının düşük olmasına bağlanmaktadır.

Damiano vd (2003), çilek, armut, elma ve su bitkisi *Hygrophila corymbosa* sp. *Stricta*'nın hızlı çoğaltımında TIS yöntemi, durgun sıvı ve agar ile katılaştırılmış ortam arasında karşılaştırma yapmışlardır. Çilek bitkisinde; TIS yönteminde daha fazla sürgün rejenerasyonu görülmüştür. Armutta ise sonuçlar genotipe bağlı olarak değişmiştir. Fakat yine TIS yöntemi ile daha fazla sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Bunun yanısıra TIS ile çoğaltılan sürgün uçlarında nekrozis gözlenmemiştir. Benzer şekilde *H. corymbosa* bitkisinde de TIS yönteminde diğer yöntemlere göre daha fazla sürgün oluşmuştur. Tüm yöntemlerde sıvı ortamda yüksek oranda vitrifikasyon gözlenmesine rağmen TIS ile geliştirilen bitkilerde vitrifikasyon görülmemiştir. Bu çalışmada çoğu eksplantta vitrifikasyon gözlenmesine rağmen kültürler katılaştırılmış MS ortama alındıktan sonra bu sorun ortadan kalkmıştır.

5.2. *Microsorium pteropus* (Java Fern) Bitkisinde Yürütülen Çalışmalar

Denemede kullanılan bitki materyalinin sınırlı olması ve bulaşıklığın fazla çıkması gibi nedenlerden dolayı mikroorganizmaları en az düzeyde tutabilmek için sterilizasyondan sonra ortamlarda şeker (sukroz) kullanılmamıştır. Bulaşık olmayan yapraklar, oksin (0.25, 0.5, 0.75 ve 1 mg/l NAA) içeren şekersiz sıvı MS ortamda kültüre alınmıştır. Yaprak eksplantlarında sürgün rejenerasyonu gözlenmiş, kallus oluşmamıştır. Eksplant başına en fazla 6.5 adet sürgün elde edilmiştir. NAA oranı artırıldığında sürgün sayısında düşüş görülmüştür. Gelişen sürgünler akvaryumlara aktarılmış ve tamamı canlı kalmıştır.

'Pulse treatment' çalışmasında yüksek oranda BAP (250 ve 500 mg/l) ve IBA (250 ve 500 mg/l) ile muamele edilen yapraklar üzerinde 10-15 gün sonra sürgün uçları gözlenmeye başlamıştır. Daha sonra bu sürgün uçları bitki büyüme düzenleyici maddelerin miktarına

bağlı olarak farklı sayıda ve uzunlukta sürgün oluşturmuştur. En fazla sürgün (14 adet/eksplant) 250 mg/l BAP ve 250 mg/l IBA ile 30 dakika muamelede elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu açısından, 15 dk uygulama süresi daha iyi sonuç vermiştir. Benzer şekilde Arnold ve Tillberg (1987), *Picea abies* bitkisinin 12 ve 24 yaşlı kalemlerini kültüre almışlardır. Kalemler ilk önce 3 saat süreyle 250 µM BA ile muamele edilmiş ve sonra 5 µM BA ve Kin içeren ortamda 1 hafta bekletilmiştir. Bu muamele ile 8 hafta sonra en fazla adventif tomurcuk oluşumu gözlenmiştir. Das vd (1999), *Litchi chinensis* bitkisinin tohumlarını 20 mg/l BAP içeren MS ortamda kağıt köprüler üzerinde çimlendirmişlerdir. Kotiledon noddan 4 hafta içerisinde 27.5 adet sürgün elde edilmiştir. Ayrıca bitkinin koltukaltı meristemleri her iki günde bir 100 µg BAP ile muamele edilmiştir. Her koltukaltı meristeminden 8 hafta içerisinde 8 sürgün elde edilmiştir. Andersone ve Levinsh (2004), sitokininin etkisini artırmak için ilk önce *Pinus sylvestris* bitkisinin tomurcuk eksplantlarında soğuk muamelesinden sonra yüksek oranda BAP muamelesinin etkili olduğunu belirtmişlerdir. Madhulatha vd (2004), *in vitro* Muz (*Musa* spp. AAA) çoğaltımını 50 mg/l BAP ve 50 mg/l Kin içeren ortamda 60 dk bekleterek elde etmişlerdir. Kök gelişimi sürgünlerin 100 mg/l NAA ve 100 mg/l IBA içeren ortamda 60 dk bekletilmesi ile elde edilmiştir. Andrade vd. (2006), *Eucalyptus grandis* bitkisinde *in vitro* çoğaltım için yüksek oranda bitki büyüme düzenleyici uygulamasını denemişlerdir. BAP'ın 0, 200, 400 ve 600 mg/l oranlarını 1, 2 ve 3 saat süreyle uygulamışlar ve 21 günlük kültürden sonra en etkili sonuçları BAP'ın 200 mg/l oranının 1 ve 2 saat muamelesinden elde etmişlerdir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında ekonomik önemi olan *H. difformis* ve *M. pteropus*'un doku kültürü yoluyla hızlı çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Özellikle *H. difformis* türünde kısa sürede çok sayıda bitki elde edilmiştir. Akvatik bitkilerle ilgili doku kültürü çalışmalarının devam etmesi büyük önem taşımaktadır. Bu alanda önemli bir açığın olduğu düşünülmektedir. Çalışmada kurulan denemeler çok karışık olmadığı için tecrübesiz kişiler biraz eğitimden sonra bu tip çalışmalara yönlendirilebilecektir. Bu şekilde akvaryum bitkilerinin ticari boyutlarda üretimi de söz konusu olabilecektir. Bu çalışmanın, ekonomik önemi olan akvaryum bitkilerinin hızlı ve yoğun üretimine ve konuyla ilgili ilerki çalışmalara yardımcı olacağı ve dolayısıyla sektöre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Agrawal, A. and Mohan Ram, H.Y. 1995. *In Vitro* Germination and Micropropagation of Water Chestnut (*Trapa* sp.). *Aquatic Botany*, 51; 135-146.
- Ahmed, S., Riaz, M. A., Malik, A. H. and Shahid, M. 2007. Effect of seed extracts of *Withania somnifera*, *Croton tiglium* and *Hygrophila auriculata* on behavior and physiology of *Odontotermes obesus* (Isoptera, Termitidae). *Biologia*, Bratislava, 62 (6); 770-773.
- Alpbaz, A. 1984. *Akvaryum Tekniği ve Balıkları*. Acargil Basımevi , 433 s., İzmir.
- Amano, T. 2002. *The Aquarium Plant Handbook*. Oriental Aquarium (s) Pre Ltd., p. 184.
- Andersone, U. and Levinsh, G. 2004. Regulation of cytokinin response-competence by cold treatment of mature *Pinus sylvestris* tissues *in vitro*. *Acta Universitatis Latviensis, Biology*, 676; 143-148.
- Andrade, W. F., Almeida, M. and Gonçalves, A. N. 2006. *In vitro* multiplication of *Eucalyptus grandis* under BAP pulse. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41 (12); 153-158.
- Anonim 2008.a. <http://www.akvaryum.com>
- Anonim 2008.b. <http://www.aquariumplants.co.za/propagation.htm>
- Anthony, J.M., Senaratna,T., Dixon, K.W. and Sivasithamparam, K. 2004. Somatic embryogenesis for mass propagation of Ericaceae – a case study with *Leucopogon verticillatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76; 137–146.
- Arnold, S.V. and Tillberg, E. 1987. The influence of cytokinin pulse treatments on adventitious bud formation on vegetative buds of *Picea abies*. *Plant Cell, Tissue Culture*, 9; 253-261.
- Bairu, M. W., Fennell, C. W. and Staden, J. V. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in *Cavendish banana* (*Musa* AAA cv. ‘Zelig’). *Scientia Horticulturae*, 108 (4), 347-351.
- Bird, K. T., Cody, B. R., Smith, J. J. and Kane, M. E. 1993. Salinity Effects on *Ruppia maritima* L. Cultured *In vitro*. *Botanica Marina*, 36; 23-28.
- Bird, K. T. and Smith, J. J. 1994. Development of a medium and culture system for *in vitro* propagation of the seagrass *Halophila engelmannii*. *Can. J. Bot.*, 72; 1503-1510.
- Bornman, C. 1994. Micropropagation and somatic embriyogenesis. In: Hayward MD, Bosemark No and Romagasa I (eds), *Plant Breedibg: Principles and Prospects*, pp. 246-260, Chapman and Hall, London.
- Boufford, D., Chang-Fu, H., Tseng-Chieng, H., Chang-Sheng, K., Hiroyoshi, O., Ching-I, P., Jinn-Lai, T. and Kuoh-Cheng, Y. 1993-2003. *Flora of Taiwan*. Vol 1-6. National Taiwan University, Taipei, Taiwan.

- Chen, P.W.S., Liao, L.J., Chen, C.Y. and Huang, K.U. 2001. Kinetin, gibberellic acid and sucrose affect vase life in *Oncidium* spp..Acta Bot.Gallica, 148 (3); 177-181.
- Cirik, S. Cirik, Ş. ve Dalay, M. C. 2001. Su bitkileri II. (İçsu Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi, Yetiştirme Teknikleri). Ege Üniv. Su Ürünleri Fakültesi Yay. No: 61. İzmir.
- Cook, D. A., Decker, D. M. and Gallagher, J.L. 1989. Rejuvenation of *Kosteletzkya virginica* (L.) Presl. (Seashore Mallow) from callus cultures. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 17; 111-119.
- Croft, J.R. 1985. Ferns and Fern Allies, In: Leach, G.J., Osborne, P.L. edits. Freshwater Plants of Papua New Guinea. pp 33-74.
- Damiano, C., Gentile, A., La Starza, S.R., Frattarelli, A. and Monticelli, S. 2003. Automation in Micropropagation through Temporary Immersion Techniques. Eds. A.S.Economou & P.E.Read.Proc.1st IS on Accl. & Estab.Micropop. Plants,1 ; 359-364, Sanı- Halkideki, Macedonia,Greece.
- Das, D. K., Prakash, N. S. and Sarin, B. N. 1999. Multiple shoot induction and plant regeneration in litch (*Litchi chinensis* Sonn.). Plant Cell Reports, 18; 691–695.
- De Jong, A.J., Schimidt, E.D.L. and De Veries, S.C. 1993. Early events in higher- plant embryogenesis. Plant Mol. Biol., 22; 337-367.
- Dewanji, S., Chanda, L., Sı, S. Barik and Mata, S. 1997. Extractability and nutritional value of leaf protein from tropical aquatic plants. Plant Foods for Human Nutrition 50; 349-357.
- Ding, J., Reardon, R.,Wu,Y., Zheng, H. and Fu, W. 2006. Biological control of invasive plants through collaboration between China and the United States of America: a perspective. Biological Invasions, 8; 1439–1450.
- Er, C. ve Canpolat, N. 1992. Bitki ıslahında doku kültürleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı-Ankara.
- Godbole, N. N., Gunde, B. G. and Srivastava, P. D. 1941. An investigation of oil from seed of *Hygrophila spinosa*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 18 (10).
- Gönülşen, N. 1987. Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. T.O.K.B., Ege Tarımsal Araş. Ens. Müd. Yayın No: 78, 140 p., İzmir.
- Gönülşen, N. ve Özcan, Ö. 1983. Asma (*Vitis* spp.)' nın doku kültürü ile üretilebilmesi üzerinde araştırmalar. TÜBİTAK, TOAG, VII. Bilim Kongresi, 6-10 Ekim 1980, 291-297.
- Grout, B.W.W. 1990. Meristem tip culture. (Ed: Pollard, J.W. and Walker, J.M.). Methods in Molecular Biology, Vol.6, Plant Cell and Tissue culture. Humana Press NJ. pp 581-593.
- Guillermo, J. Martinez, Pastur, and Miriam, E. Arena.1999. *In Vitro* Propagation of Juvenile *Nothofagus leoni* Espinosa (Fagaceae). J. For. Res., 4; 295-298.

- Gürel, E. 1997. Callus and root development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris L.*) . Variability and variety, plant and organ level. Turkish j. Bot., 21;131-136.
- 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.
- Haq, I. and Dahot, M. 2007. Effect of immersion systems on chlorophyll contents in micro-propagating banana. African Journal of Biotechnology, 6 (9); 1095-1101.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, J.R.F.T. and Geneve, R.L. 1990. Plant propagation. Principles and practices sixth edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ,700 p.
- He, S.S., Liu, C. Z. and Saxena, P. K. 2007. Plant regeneration of an endangered medicinal plant *Hydrastis canadensis L.* Scientia Horticulturae, 113; 82–86.
- Henry, M., Roussel, J.L. and Andary, C., 1987. *Verbascoside production in callus and suspension cultures of Hygrophila erecta.* Phytochemistry, 26 (7); 1961-1963.
- Holtum, R. E. 1954. Revised Flora of Malaya II.Ferns of Malaya. Govt. Printing Office, Singapore.
- Hossain, Z., Mandal, A.K.A., Datta, S.K. and Biswas, A. K.2007. Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line. Biotechnol. 2007 Mar 1; 17408797 (P,S,E,B,D)
- Housti, F., Coupé. M. and Auzac. J.D. 1992. Effect of ethylene on enzymatic activities involved in the browning of *Hevea brasiliensis* callus. Physiologia Plantarum, 86 (3) ; 445–450.
- Huang, J. C., Wang, W. K., Peng, C. I. and Chiang, T.Y. 2005. Phylogeography and conservation genetics of *Hygrophila pogonocalyx* (Acanthaceae) based on atpB–rbcL noncoding spacer cpDNA. J. Plant Res., 118; 1–11.
- Husain, M. K., Anis, M. and Shahzad, A. 2007. *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 43; 59–64.
- Ilczuk, A., Winkelmann, T., Richartz, S., Witomska, M. and Serek M. 2005. *In vitro* propagation of *Hippeastrum 3 chmielii* Chm. influence of flurprimidol and the culture in solid or liquid medium and in temporary immersion systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83; 339–346.
- Jenks, M., Kane, M., Marasca, F., Mcconnell, D. and Sheeran, T. 1990. *In Vitro* Establishment and Epiphyllum Plantlets Rejuvenation of *Nymphaea “Daubeniana”*. Hortscience, 25; 1664-1665.
- Jenks, M. A., Kane, M. E. and McConnell, D. B. 2000. Shoot organogenesis from petiole explant in the aquatic plant *Nymphoides indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63; 1-8.

- Kane, M. E., Sheehan, T. J. and Ferwerda, F. H. 1988. *In vitro* Growth of American Lotus Embryos. Hortscience, 23 (3); 611-613.
- Kane, M. E., Gilman, E.F., Jenks, M. A. and Sheehan, T. J. 1990. Micropropagation of the Aquatic Plant *Cryptocoryne lucens*. Hortscience, 25 (6); 687-689.
- Kane, M. E., Davis, G. L., McConnell, D.B. and Gargiulo, J. A. 1999. *In vitro* propagation of *Cryptocoryne wendtii*. Aquatic Botany, 63; 197-202.
- Kawashima, Y., Matsumata, M. and Tokuda, H. 1986. Protoplast isolation and regeneration of a green alga *Enteromorpha polifera*. Current topic in marine biotechnology. p, 231-235.
- Khan, M.R. and Omoloso, A.D. 2002. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta*. Department of Applied Sciences, Papua New Guinea University of Technology ,P:M.B. Lae, Papua New Guinea.
- 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
- Lopez-Escamilla, A. L., Olguin-Santos, L. P., Marquez, J., Chavez, V.M. and Bye, R. 2000. Adventitious Bud Formation from Mature Embryos of *Picea chihuahuana* Martinez, an Endangered Mexican Spruce Tree. Annals of Botany, 86; 921-927.
- Madhulatha, P., Anbalagan, M., Jayachandran, S. and Sakthivel, N. 2004. Influence of Liquid Pulse Treatment with Growth Regulators on *in vitro* Propagation of Banana (*Musa* spp. AAA). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76 (2); 189-192.
- Moncaleán, P., Rodríguez, A. and Fernández, B. 2003. Effect of different benzyladenine time pulses on the endogenous levels of cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid in micropropagated explants of *Actinidia deliciosa*. Plant Physiology and Biochemistry, 41; 149–155.
- Monnier, M. 1990. Induction of embryogenesis in callus culture. In: Pollard JW, Walker JM (Eds), Plant Cell and Tissue Culture, pp. 141-148, Humana Pres, New Jersey.
- Murashige, T. and 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.
- Özcan, S., Babaoğlu, M. ve Sancak, C. 2001. Somatik Embriyogenesis.(Editörler: Babaoğlu, M. Gürel, E., Özcan, S.). Bitki Biyoteknolojisi, I- Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, s. 374, Konya.
- Özel, Ç. A. 2002. *Centaurea tchihatcheffi*' nin *in vitro* çoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji. Ankara.

- Öztürk, M. 2002. Akvaryum Bitkisi *Ludwigia sp*'nin *In Vitro* Koşullarda Çoğaltımına Farklı Oranlardaki Büyüme Düzenleyicilerin Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Su ürünleri Anabilim Dalı. Ankara.
- Panigrahi, J., Mishra, R. R. and Behera, M. 2006. *In vitro* multiplication of *Asteracantha longifolia* (L.) Nees- a medicinal herb. Indian Journal of Biotechnology, 5 (4); 562-564.
- Parrott, W.A., Merkle, S.A. and Williams, E.G. 1993. Somatic embriyogenesis: Potential for use in propagation and gene transfer system. In: Murray DR (Ed), Advanced Methods in plant Breeding and Biotechnology, pp. 158-200, C.A.B International, UK.
- Pollard, J.W. and Walker, J.M. 1990. Methods in Molecular Biology. Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press, Clifton.
- Prakash, S. and Van Staden, J. 2007. Micropropagation of *Hoslundia opposita* Vahl a valuable medicinal plant. South African Journal of Botany, 73 ; 60–63.
- Purohit, S.D. and Singhvi, A. 1998. Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. Scientia Horticulturae, 76; 219-229.
- Rataj, K. and Horeman, T. J. 1977. Aquarium plants their identification cultivation and ecology. T.F.H. Publication, Inc. P.O. Box 27, 448 p., New Jersey.
- Seçer, S. 2002. Akvaryum Balıkları ve Üretimi. Yüksek Lisans ders notları (basılmamış). Ankara Üniversitesi Ziraat Fak. Su Ürünleri Böl. Ankara.
- Shanmugasundaram, P., Venkataraman, S. 2005. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Hygrophila auriculata* (K.Schum) Heine Acanthaceae root extract. Department of Pharmacology and Environmental Toxicology, Dr.ALM Post Graduate Institute of Basic Medical Sciences, University of Madras, Chennai, India.
- Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. 1997. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa. USA.
- Straub, P. F., Decker, D. M. and Gallagher, J. L. 1988. Tissue culture and long-term regeneration of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 15; 73-78.
- Straub, P. F., Decker, D. M. and Gallagher, J. L. 1989. Tissue culture and Rejuvenation of *Distichlis spicata* (Gramineae). Amer. J. Bot., 76 (10); 1448-1451.
- Suri, S.S., Jain, S. and Ramawat, K.G. 1999. Plantlet regeneration and bulbil formation *in vitro* from leaf and stem explants of *Curculigo orchoides*, an endangered medicinal plant. Scientia Horticulturae, 79; 127-134.
- Şahin, Y. 1997. A'dan Z'ye Akvaryum. İnkılap Kitapevi. 320 s.
- 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.
- Vikrant and Rashid, A. 2003. Somatic embryogenesis or shootformation following high 2,4-D pulse-treatment of mature embryos of *Paspalum scrobiculatum*. *Biologia Plantarum*, 46 (2); 297-300.
- Wawrzyn'czak, A. and Goszczyńska, 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.
- Zalewska, M., Lema-Rumin'ska, J. and Miler, N. 2007. *In vitro* propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in chrysanthemum. *Scientia Horticulturae*, 113 ; 70–73.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Meryem ÖZTÜRK

Doğum Yeri : Kızılcahamam

Doğum Tarihi : 19.12.1976

Medeni hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lisans : A.Ü. Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü, 1999

Yüksek Lisans: A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı, 2002

Çalıştığı Kurum/ Kurumlar ve Yıl: Tarım Kredi Kooperatifi, 2006

Yayınlari (SCI ve diğeri):

- Öztürk, M., Khawar, K.M., Atar, H.H., Sancak, C. and Özcan, S. 2004. *In Vitro* Micropropagation of the aquarium plant *Ludwigia repens*. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 12; 21-25.

- Öztürk, M., Khawar, K.M., Özcan, S. and Atar, H.H. 2002. Ludwigia akvaryum süs bitkisinde *in vitro* hızlı çoğaltım çalışması. II. Ulusal süs bitkileri kongresi. Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü, Antalya. 22-24 Ekim 2002. S.17.

- Öztürk, M., Khawar, K.M., Özcan, S., Sancak, C. ve Atar, H.H. 2003. Su bitkisi *Ludwigia repens*'in *in vitro* mikroçoğaltımı. Bildiriler Kitabı. XIII. Biyoteknoloji Kongresi. Çanakkale. S.98./sunum. 25-29 Ağustos 2003.

- Şumlu, Ş., Khawar, K.M., Özcan, S., ATAR, H.H. ve Öztürk, M. 2005. Nilüfer (*Nymphaea alba* L.) Bitkisinin *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi. 14. Biyoteknoloji kongresi. Eskişehir. 31 Ağustos - 2 Eylül 2005.

- 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.

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

- Khawar, K.M., Sağlam, S., Özel, Ç.A., Öztürk, M., Şumlu, Ş., Sevimay, C.S. and Özcan, S. 2006. *In Vitro* Somatic Embryogenesis in Lavender (*Lavandula angustifolia* Miller) under Different Light Intensities. Agro Environ 2006. Ghent University, Ghent, Belgium. 4 - 7 September 2006.