

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI KOLKİSİN DOZLARININ AKVARYUM BİTKİSİ GÜL (*Ludwigia repens*
FORSTER)'DE KROMOZOM KATLANMASINA ETKİLERİ**

Ayla Zeynep YÜCEL

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2008**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI KOLKISIN DOZLARININ AKVARYUM BITKİSİ GÜL (*Ludwigia repens* FORSTER)'DE KROMOZOM KATLANMASINA ETKİLERİ

AYLA ZEYNEP YÜCEL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan Hüseyin ATAR
Eş Danışman: Doç. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Türkiye’de önemli bir su bitkisi olan *Ludwigia repens* ($2n=32$) yaygın olarak akvaryumlarda dekoratif amaçlı kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, iki farklı kolkisin muamelesi ile bitkinin kromozom sayısını iki katına çıkartarak, özelliklerini iyileştirmek ve akvaryumlarda daha çekici görünmesini sağlamaktır. Birinci metotta sürgün ucu ve birinci koltukaltı meristemleri farklı dozlarda (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 ve 4.0 mg/l) kolkisin içeren büyüme ortamında (0.05 mg/l TDZ and 0.5mg/l NAA) muamele edilmiştir. İkinci metodta ise, eksplantlar farklı oranlardaki (250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ve 2000 mg/l) kolkisin çözeltisine daldırılarak 30 dakika muamele edilip, büyüme ortamına aktarılmıştır. Bir ay sonra daha fazla büyüyen ve gelişen bitkiler, ½ MS ortamına aktarılmıştır. Tüm büyütülen sürgünler kromozom katlanması için test edilmiştir. 500 mg/l kolkisinde 30 dakika daldırma ile muamele edilip, büyümeye alınan birinci koltuk altı meristeminde sitolojik analizlerle katlanmış kromozom sayısı 44 olarak doğrulanmıştır. Yaprak ve stoma boylarındaki fenotipik değişiklikler, morfolojik incelemelerle kromozom sayısındaki artışı doğrulamıştır.

Temmuz 2008, 44 sayfa

Anahtar Kelimeler: Akvaryum bitkisi, *Ludwigia repens*, kromozom katlanması, *in vitro*, kolkisin, agar, batırma, sürgün ucu, birinci koltuk altı meristemi

ABSTRACT

Master Thesis

USE OF DIFFERENT COLCHICINE DOSES FOR EFFECTS OF CHROMOSOME DUPLICATION IN AN AQUARIUM PLANT, WATERPURSLANE (*Ludwigia repens* FORSTER)

Ayla Zeynep YÜCEL

University of Ankara
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries and Aquaculture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan Hüseyin ATAR

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Ludwigia repens (2n=32) is an important aquatic plant widely used to decorate aquariums in Turkey. The study aimed to multiply chromosome number of the plant using two different colchicine treatment methods with aim to improve the plant characteristics and make it more attractive for use in the aquariums. In the first method the shoot tips and first nodes from the tops were treated with different doses (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 and 4.0 mg/l) of colchicine contained the micropropagation medium (0.05 mg/l TDZ and 0.5mg/l NAA). In the second method, the explants were pulse treated with different doses (250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 and 2000 mg/l) of colchicine solution for 30 min and then transferred micropropagation medium (0.05 mg/l TDZ and 0.5mg/l NAA). Micropropagated shoots from both experiments were transferred to ½ MS medium after one month for further growth and development. The micro propagated shoots from both were tested for chromosome multiplication. Cytological analysis confirmed the multiplication of chromosomes to 44 in micro propagated plants from first nodes obtained after pulse treatment with 500 mg/l colchicines for 30 min. Morphological observations on leaf size and stomata also confirmed the phenotypic changes confirmed through chromosomal count.

July 2008, 44 pages

Key words: Aquarium plant, *Ludwigia repens*, chromosome duplication, *in vitro*, colchicine, agar, immersion, shoot tip, first node

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada beni engin bilgileriyle yönlendiren ve çalışmamın her safhasında desteklerini benden esirgemeyen çok değerli danışman hocalarım Doç. Dr. Hasan Hüseyin ATAR (Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Bölümü) ve Doç. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'a(Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. Yine çalışmalarımı, yürüttüğüm Tarla Bitkileri Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a, tez çalışmamın sitolojik araştırmalarını yürüttüğüm Tarla Bitkileri Bölümü Sitoloji Laboratuvarı sorumlusu Prof. Dr. Cafer S. SEVİMAY' a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, değerli arkadaşlarım Çağlayan SAĞLIK ve Burçak ÇABUK'a çalışmalarımındaki doğrudan veya dolaylı katkılarından dolayı teşekkür ederim. Tez çalışmalarım boyunca gösterdikleri anlayıştan dolayı değerli annem ve babam Gülseren- Tarık YÜCEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayla Zeynep YÜCEL

Ankara, Temmuz 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ	1
1.2 Kolkisin.....	5
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	14
3.1 Materyal.....	14
3.1.1 Deneme yeri.....	14
3.2 Yöntem.....	14
3.2.1 <i>In vitro</i> hızlı çoğaltımı ile <i>L. repens</i> 'in çoğaltılması.....	14
3.2.2 Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ile kolkisin hazırlanışı ve saklama koşulları.....	15
3.2.3 Kolkisin bitki eksplantlarına uygulama yöntemleri.....	16
3.2.4 Kültür koşulları.....	16
3.2.5 Sürgünlerin köklendirilmesi.....	17
3.2.6 Somatik kromozomların gözlemi için materyalin hazırlanması.....	17
3.2.7 Mikroskop incelemesi için preparatların hazırlanması.....	19
3.2.7.1 Preparatların görüntülenmesi.....	19
3.2.8 Devamlı preparatların yapılması.....	20
3.2.9 Stomaların preparatlarının hazırlanması ve görüntüleme.....	20
3.2.10 Yaprak boylarının ölçülmesi.....	21
3.3 İstatistiksel Analiz.....	21
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	22
4.1 <i>In vitro</i> Hızlı Çoğaltımı ile <i>L. repens</i> 'in Çoğaltımı.....	22
4.2 Köklendirme Çalışması.....	24
4.3 <i>L. repens</i> 'in Sürgün Ucu ve Birinci Koltuk Altı Meristemlerinin Kolkisinle Muamele Edilmemiş Bitkilerin Kromozomlarının İncelenmesi.....	25
4.4 Kolkisin Bitki Eksplantlarına Uygulama Yöntemleri.....	26
4.4.1 <i>L. repens</i> 'in sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemlerinin değişik oranda kolkisinle muamelesi.....	26
4.4.2 <i>L. repens</i> 'in sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemlerinin kolkisin içeren sıvı ortamda bekletilmesi.....	27
4.5 Stomaların İncelenmesi.....	29
4.6 Yaprakların İncelenmesi	30
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	33
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ.....	43

SİMGELER DİZİNİ

BAP/BA	6- Benzylaminopurine/N6-Benzyladenine
IBA	İndol 3 butirik asit
MS	Murashige ve Skoog bazal besin ortamı
TDZ	Thidazuron (1 Phenyl 3-(1,2,3-thidiazol 5yL) urea)
NAA	Naftalin asetik asit
1N NaOH	1 Normal Sodyum Hidroksit
HCl	Hidroklorik asit
°C	Santigratderece
mg	Milligram
L	Litre
µm	mikromolar
mm	milimetre
MN-urea	<i>N</i> -Metil- <i>N</i> -nitrosoüre
MNU	<i>N</i> -Metil- <i>N</i> -nitrosoüretan
PFP	<i>p</i> -Floro-d-l-fenilalanin
EMS	Etilamineletilinoksit
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
SPM	Shoot Proliferation Medium
GA	Gibberilik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Akvaryumda gelişen <i>L. repens</i> bitkisi.....	2
Şekil 1.2	Kolkisinin moleküler yapısı.....	6
Şekil 1.3	Doğada <i>Colchicum autumnale</i> bitkisi.....	6
Şekil 4.1	<i>L.repens</i> 1.koltuk altı meristemi eksplantından büyümüş bitki.....	22
Şekil 4.2	Sürgün ucu eksplantından büyümüş <i>L.repens</i> bitkisi.....	23
Şekil 4.3	Uç meristem ve birinci koltuk altı meristem ile gelişen bitkilerin ½ MS ortamındaki gelişimi.....	23
Şekil 4.4	Kök gelişimi sırasında meydana gelen yosunlaşma.....	24
Şekil 4.5	Kök gelişimi için , ½ MS ortamına aktarılan eksplantlar.....	25
Şekil 4.6	<i>L. repens</i> 'in sürgün ucu eksplantından elde edilmiş kolkisin ile muamele edilmeyen bitkilerin (a,b,c) 2n=32 kromozom görüntüsü.....	26
Şekil 4.7	<i>L. repens</i> 'in 1. koltuk altı meristemi eksplantından elde edilmiş 500 mg/l kolkisin ile 30 dk muamele edilen bitkilerin (a,b,c) 3n=48-4x kromozom görüntüsü.....	28
Şekil 4.8	Diploid ve aneuploid bitki stomalarının görüntüleri (a) Kolkisin ile muamele edilmemiş bitki stoması (b) aneuploid bitkiden elde edilen stoma görüntüsü.....	30
Şekil 4.9	Bitki boyları: a. normal bitkiler, b. kolkisin ile muamele edilen bitkiler.....	31
Şekil 4.10	İki aylık poliploid bitkisinde çiçeklenme (a) açılmış çiçek (b) tomurcuk	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	<i>Ludwigia repens</i> 'in sistematikteki yeri.....	1
Çizelge 1.2	<i>Ludwigia</i> cinsine ait bazı türlerin dağılım alanları.....	3
Çizelge 3.1	Murashige ve Skoog (1962), ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları.....	15
Çizelge 4.1	<i>L. repens</i> 'in sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemlerin değişik oranda kolkisinle muamelesi sonuçları.....	26
Çizelge 4.2	İkinci denemenin kromozom sayısı sonuçları.....	28
Çizelge 4.3	Stoma hücrelerinin karşılaştırılması.....	29
Çizelge 4.4	Yaprak boylarının karşılaştırılması.....	31

1. GİRİŞ

Sucul ortamın asıl üreticileri olan su bitkileri bir hücreliden çok hücrelilere kadar çeşitli şekilleri olan ve klorofil içeren canlılardır. Yeşil bitkilerin, ortamın dengesinin korunmasındaki önemleri büyüktür. Yeşil bitkiler ve fitoplanktonik organizmalar klorofilleri sayesinde fotosentez olayı sonucu organik madde üretimini sağlarlar ve bitkisel protein kaynaklarını oluştururlar. Bundan dolayı akvatik ortamdaki besin zincirinin ilk halkasıdır (Öztürk 2002).

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. Su bitkileri, Uzak Doğu’da ve ABD’ de insan gıdası olarak tüketilmekte ve yetiştiriciliği yapılmaktadır (Mitchell 1974).

Ludwigia repens J.R.FORSTER, 1771 (Synonym *L. natans*) (Şekil 1.1) bataklık ve sığ sularda bulunan bir bitkidir. Anavatanı Güney Amerika, Orta Amerika ve Karayip adalarıdır. *L.repens* *Onagraceae* familyasına ait olup (Çizelge 1.1) aslen Florida’nın yerel bitkisidir. Genellikle farklı iki renkte bulunmaktadır. Yapraklar sadece yeşil veya sadece kırmızı olabildiği gibi her iki renk aynı bitkide de görülebilmektedir. Kırmızı renkli yapraklarından dolayı akvaryum sevenler arasında popüler olan bir bitkidir ve yeni başlayanlar için büyütülmesi kolaydır (Hiscock 2003).

Çizelge 1.1 *Ludwigia repens*’in sistematikteki yeri

Alem	<i>Plantae</i>
Alt alem	<i>Tracheobionta</i>
Üst bölüm	<i>Spermatophyta</i>
Bölüm	<i>Magnoliophyta</i>
Sınıf	<i>Magnoliopsida</i>
Alt sınıf	<i>Rosidae</i>
Takım	<i>Myrtales</i>
Familya	<i>Onagraceae</i>
Cins	<i>Ludwigia</i> L.
Tür	<i>Ludwigia repens</i> J.R. Forst.

Kaynak: (Anonymous 2008 a, www.plants.usda.gov. -Türkçeye çevrilerek- erişim tarihi 11.07.2008)



Şekil 1.1 Akvaryumda gelişen *Ludwigia repens* FORSTER, 1771 bitkisi

L. repens hem su altında ve hem de suyun dışında yetişen amfibik bitki olup karasal şartlarda tamamiyle büyüebilmektedir. *L.repens* substratta köklendirilir fakat tüm gelişmiş kökler sap boyunca direk sudadır. Çoğunlukla, toprak içinde kıyı şeridi ile sığlık alan arasındaki sınır boyunca yetişir. Bitkinin suyun altındaki kısımları genellikle kırmızı pigmentasyona sahiptir fakat onlar hava ile temas ettiğinde yeşil renge kaymaktadır (Lytle, 2003).

Çoğunluğu, Amerika' nın ılıman bölgelerinden tropik olmayan bölgelere kadar değişik yerlerden gelen yaklaşık 650 tür ile 20'den fazla cinse ayrılmıştır. Çoğu tanınmış çiçekli bitkilerdir (Ford and Gottlieb, 2007). *Ludwigia* cinsi de bu familyaya aittir. *Ludwigia* cinsi 82 tür içermektedir (Wogu ve Ugborogho, 2000). Sadece birkaç tür tropik Afrika, Asya ve Avustralya' da yetişir. Bazı türlerin yaygın olarak görüldüğü ülkeler Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2 *Ludwigia* cinsine ait bazı türlerin dağılım alanları (Öztürk 2002)

Tür	Ülke	Kaynak
<i>Ludwigia epilobioides</i>	Japonya	Asano 2001, Asano vd 2001, Inubushi vd 2001
<i>L. parviflora</i>	Hindistan	Mathew ve Jagadeeshkumar 1999, Bhowmick 2001
<i>L. peruviana</i>	Hindistan (Andaman adaları) , Avustralya	Kumar ve Sreekumar 2000, Jacobs vd 1994
<i>L. prostrata</i>	Çin, Kore, Venezuela	Wang vd 1999, He vd 1999, He vd 2000, Wang vd 2000, Kim ve Pyon 1998, Park 1999, Gordon 2000
<i>L. hyssopifolia</i>	Trinidad -Tobago, Malezya	Maharaj ve Brathwaite 1997, Baki vd 1997
<i>L. lithospermifolia</i>	Venezuela	Gordon 1999
<i>L. octovalvis</i>	Venezuela, Kore, Filipin, Hindistan	Gordon 1999, Moon vd 1999, Patel vd 1998
<i>L. peploides</i>	Avustralya, Güney Kaliforniya	Yen ve Myerscough 1989, Rejmankova 1992
<i>L. uruguayensis</i>	Güney Kaliforniya	Patterson ve Davis 1991
<i>L. stolonifera</i>	Botswana, Mısır (El-selam), Zimbabwe	Bonyongo vd 2000, Serag ve Khedr 2001, Mhlanga ve Mapaure 2000
<i>L. perennis</i>	Hindistan (Orissa, Kerala), Malezya	Subudhi ve Dixit 1998, Thomas vd 1997, Baki vd 1997
<i>L. linifolia</i>	Tayland	Polthane vd 1996
<i>L. alternifolia</i>	Georgia, ABD	Hinton vd 1999
<i>L. longifolia</i>	Avustralya	Hosking vd 1997
<i>L. curtissii</i>	ABD	Ward 2001
<i>L. erecta</i>	Kosta Rika	Sanchez vd 2001
<i>L. stolonifera</i> , <i>L. palustris</i>	Türkiye	Seçmen ve Leblebici 1997
<i>L. arcuata</i>	Kuzey ABD, Kanada	Britton and Brown 1913
<i>L. palustris</i> x <i>L. repens</i> = Bastard <i>Ludwigia</i>	Kuzey Amerika, Eurasia	Peng et al. 2005

Bu bitkiler doğada yaygın olarak bulunmalarının yanısıra çeşitli amaçlarla kullanılmaktadırlar. Örneğin; *L. natans* tatlı su sistemlerinde civanın toksitesini azaltmak için kullanılmaktadır (Ribeyre *et al.* 1990). Khedr and Serag (1998), Mısır'da *L. stolonifera*'yı tuzlu su göllerini ve kanalları ıslah etmek için kullanarak, tavsiye etmişlerdir. Amerika'nın Luizyana eyaletinde balık yetiştiricileri *Ludwigia spp.*'yi balıklar için organik besin kaynağı olarak kullanmakta ve ekonomik fayda sağlamaktadırlar (Brunson 1988, Brundu *et al.* 2001). *L. octovalvis*'in *Streptococcus mutans*'a karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Chen *et al.* 1989). Brezilya'da *L. elegans*'ın çiçeklerinden bal üretiminde yararlanılmaktadır (Marques and Gimenes 1996). *L. peploides* Avustralya'da suları temizlemek amacıyla kullanılmaktadır (Greenway and Woolley 1999). Çin'de halk arasında *L. octovalvis* tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır (Kuo *et al.* 1999). *L. linifolia* Malezya'da sebze olarak tüketilmekte ve antitümör etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Mooi *et al.* 1999, Öztürk 2002).

İki yüz seksen üç (283) doğal populasyondan seçilmiş 302 bitki üzerinde yapılan kromozom incelemesinin sonucunda Myrtocarpus takımına ait 45 türden 38'nin kromozom sayıları bildirilmiştir. *Ludwigia* $x=8$ genomu taşımaktadır (Raven and Tai 1979).

Poliploid bitkilerle elde edilmiş bitkiler, heterosis nedeniyle ana bitkilerden daha güçlü olmaktadır. Bunun yanı sıra bazı diploid bitkilerde yabani tip aleller etki gösterip bitki gelişmesini engel olabilmektedir. Fakat poliploid bitkilerde kromozom sayısı fazla olduğu için yabani aleller etkisiz hale gelmekte ve bitkiler daha güçlü olmaktadır. Poliploid de hem allopoliploid hem de otoploid bitki elde edilmektedir (Tate *et al.* 2005).

Çoğu organizma normalde diploid olduğu halde, poliploidi, anormal hücre bölünmesinden dolayı ortaya çıkmaktadır. Bu da çoğunlukla bitkilerde bulunur. Dünyada muz, elma ve zencefilde triploid bitkiler; buğday, mısır, pamuk, patates, lahana, tütün, yerfıstığı vb. de tetraploid bitkiler; karanfil, ekmeklik buğday, arpa da hekzaploidler; çelik, şeker kamışı ve birçok süs bitkilerinde oktoploid bitkiler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı bitkilerde hem diploid hem poliploid birlikte bulunmaktadır (Tate *et al.* 2005).

Kromozom katlanması, pratikte çoğunlukla kimyasal uygulamalarıyla gerçekleştirilmektedir. Günümüzde kromozom katlaması için bitki ıslahçıları tarafından en yaygın kullanılan kimyasal, kolkisinidir. Kolkisin, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve dolayısıyla replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar (Poehlman and Borthakur 1968).

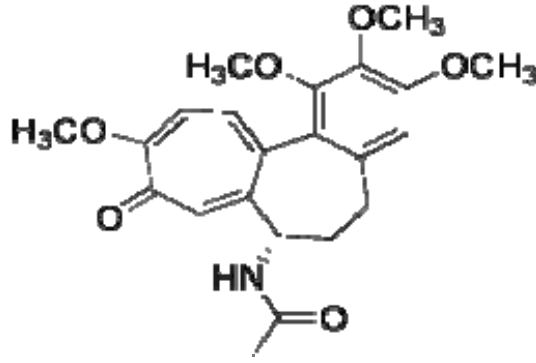
Ammonia, Kolkisin, Dietilsülfat, Etilamineletilinoksit (EMS), *p*-Floro-d-l-fenilalanin (PFP), Formaldehit, 2(5H)-Furonan, 4,5,5-trimetil-3-[2-(fenilamin)-4-tiazolil]-(9Cl), Gibberelik asit, Heteroaksin, Hidrojenflorid, Hidroksilamin, Kinetin, Ribosit, Maleik hidrazit metilosiyanat, *N*-Metil-*N*-nitrosoüre (MN-urea), *N*-Metil-*N*-nitrosoüretan(MNU), Fitohemaglutinin, mayozda etkili Trietilamine ve sıcaklık kromozom katlanmasına, poliploid bitkilerin elde edilmesine neden olan kimyasalların başında gelmektedir (Grant and Owens 2002).

Gama ışınları, hızlı nötronlar, termal nötronlar, x-ray, ³²P ve lazer kromozom katlanmasına neden olan fiziksel tekniklerdir (Grant and Owens 2002).

1.2 Kolkisin

Colchium autumnale'den (Şekil 1.3) çıkarılan zehirli bir alkaloiddir.

Kolkisinin sistematik adı (IUPAC); N-((7S)-5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo(a)heptalen-7-yl)-acetamide'dir (Şekil 1.2) (Anonymous b, 2008. Web sitesi: <http://en.wikipedia.org/wiki/Colchicine>, Erişim Tarihi: 28. 06.2008).



Şekil 1.2 Kolkisinin moleküler yapısı

(Anonymous b, web sitesi: <http://en.wikipedia.org/wiki/Colchicine>, Erişim Tarihi: 28. 06.2008).



Şekil 1.3 Doğada *Colchicum autumnale* bitkisi

(Anonymous b, web sitesi: <http://en.wikipedia.org/wiki/Colchicine>, Erişim Tarihi: 28. 06.2008).

Kolkisin çok toksik doğal bir ürün ve orjinal olarak *Colchicum* cinsinden (*Colchicum autumnale* (Şekil 1.3) ekstre edilmiş ikincil metabolizma ürünüdür. Asıl kullanım alanı olarak romatizmal hastalıkların tedavisinde ve özellikle gut'ta, bununla beraber bağırsak temizleyici ve kusturucu etkisi olduğu da belirtilmiştir (Anonymous b, web sitesi: <http://en.wikipedia.org/wiki/Colchicine>, Erişim Tarihi: 28. 06.2008).

Microtübüller'deki kromozomların ayrılması devam ederken, poliploidiye sebep olmak için kolkisin kullanıldığında, bitki hücrelerindeki mayozda hücre bölünmesi sırasında kromozomların bölünmesi engellenir. Bundan dolayı gametlerin bir kısmı kromozom içermez. Gametlerin diğer kısmı da normal, çift kromozomlu ve embriyolar da ikiye katlanmış kromozomlara sahiptirler (diploid yerine tetraploid). Bu durumun sonucunda sıklıkla bitkilerde olumlu etkiler görülmektedir. Bitkiler daha geniş yapraklara sahip ayrıca daha dayanıklı, hızlı gelişen ve normal diploid bitkilere göre daha çok tercih edilen haline gelmektedir. Bu sebepten dolayı, bu tip genetik manuplasyonlar sıklıkla bitki ıslahında ticari olarak kullanılmaktadır (Anonymous b, web sitesi: <http://en.wikipedia.org/wiki/Colchicine>, Erişim Tarihi: 28. 06.2008).

Türkiye'de yapılan su bitkileri çalışmaları, daha çok akvaryum bitkilerinin biyolojisi ve teknik çalışmaları içerikli olmuştur. Poliploid bitkiler, genel olarak diploid bitkilerden kromozom çoğalması ile morfolojik veya fizyolojik yönden daha sağlam ve sağlıklı olmaktadır. Bitki ıslahında pozitif yöndeki değişimler sayesinde güçlü sağlam ve daha sağlıklı bitki seçerek verim artırma çalışmaları değişik karasal bitkiler üzerinde devam etmektedir. Daha önce su bitkilerinde kolkisin ile poliploidi bitki eldesi çalışmasına rastlanmamaktadır. Bu çalışmada kolkisin muamelesi ile kromozom çoğaltımı yani poliploid veya aneuploid bitki elde edilerek, akvaryum bitkisi *Ludwigia repens*'de ($2n=32$) daha çekici, güzel görünümlü, sağlıklı, renkli ve değişik boyutlarda bitkiler geliştirerek yeni bir çeşit elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bürün ve Emiroğlu (2008), Androjenik tütün (*Nicotiana tabacum* cv. Karabağlar 6265) dihaploidlerini elde etmek için anter kültürünün üç farklı döneminde kolkisin uygulaması yapılmış olup, anterler, kültür öncesi % 0.4 kolkisin çözeltisi ile 0, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 saat muamele edilmiştir. Anterlerin kültüre tepkisi, en yüksek diploidleşmeyi % 27.9 olarak 6 saat muamele ile elde etmişlerdir. % 0.2 kolkisin çözeltisi ile ısılatılmış, pamuk arasında, üç gün bırakılmış olan anterler ile % 60 diploidleşme elde edilmiş, fakat muamele edilen embrioidlerden sadece 5 bitki elde edilebilmiştir. Kromozom katlanma oranları ve bitkiciklerin yaşatılması dikkate alındığında, 7 saat % 0.2 kolkisin uygulamasının daha avantajlı olduğunu bildirmişlerdir (% 42.3 dihaploid).

Rubuluza *et al* (2007), *Colophospermum mopane*, yarı tropik iklime sahip olan Güney Afrika da bulunan tıbbi ve ekonomik yönden önemli bir bitki olduğunu bildirmişlerdir. Kolkisin etkisi ile poliploidizasyon *C. mopane* tohumlarında *in vitro* çalışma yapılmış olup, *C. mopane* tohumları %0.05, 0.1 ve 1.0 (w/v) oranlarındaki kolkisin çözeltisi ile 24, 48 ve 96 saat muamele edildikten sonra 1/8 MS ortamına aktarılmıştır. *In vitro* koşullarda elde edilen bitkiciklerin ploidi oranlarını flow sitometri ile tespit etmişlerdir. Elde edilen bitkiciklerden %44'ü tetraploid, bir tane kimerik ve geri kalanlarını da diploid olarak bulmuşlardır. Fidelerin %0.05 ve %0.1 (w/v) oranlarındaki kolkisin çözeltisinde bekletilmesi ile tetraploid bitkicikler meydana gelmiştir. Muamele edilmemiş bitkicikler ile karşılaştırıldığında, tetraploidlerde morfolojik farklılıklar görülmüştür. Örneğin yan tomurcukların erkenden büyümesi ve her bir tohum kültüründen çoklu sürgün meydana gelmesi, morfolojik farklılıklardandır. Kolkisin konsantrasyonları ile muamelede %0.1'den fazla kolkisin konsantrasyonu ile 48 saatten fazla muamele süresinin bitki gelişimini olumsuz etkilediği bildirilmiştir.

Özgen (2007), Kısırlığın giderilmesinde, geriye melezleme ve kromozom katlanmasının etki sağlayabileceğini bildirmişlerdir. Buğdaya genel olarak uygulanan kolkisin yöntemlerinden, saf kolkisin; % 0.25'lik kolkisinde 18–20 °C'de 30 dakika, % 0.1 kolkisinli

pamuk içerisinde 3 gün boyunca uygulama yapılmış olup, saf kolkisin uygulamasında, 0.05-0.1 kolkisin+ % 2 DMSO + Tween20, %0.01 kolkisin+ %2 DMSO + Tween 20 + 10 ppm GA (Tween 20 1 damla/100ml) olarak açıklamışlardır.

Anonymous (2006)' ya göre, tatlı suda yaşayan *Ludwigia* türlerin büyüme formları çevresel şartlara göre değişmektedir. *Ludwigia hexapetala* dekaploid olup $2n=80$ kromozom içerir. *Ludwigia peploides* alt türleri olan *peploides*, *montevidensis* ve *Ludwigia repens* sırasıyla $2n=16$, 16 ve 32 kromozom içermektedir.

Rauf *et al.*, (2006), pamuğun iki kültürü olan *Gosypium. arboreum* L. cv. FDH-228 ve HK-113'ün kolkisin (1%) ile muamelesinde 3 farklı metot kullanmışlardır. Fide aşamasında sürgün ucuna yapılan kolkisin uygulaması başarıya ulaşmıştır. Tetraploid bitki olan *G.arboretum* daha geniş vejetatif üremeye, üreme organlarında daha az stoma ve onların normal diploid kopyasından ($2n=26$) daha yüksek DNA optikal yoğunluğuna sahiptir. Yapılan çalışmalar sonucunda, kolkisin etkisi ile önemli, nokta mutasyonları oluşmasına rağmen bazı bireysel özelliklerinde olumsuz etki görülmüştür. Bitkilerde, kolkisin ile muamele edildikten sonraki farklılıkları RAPD DNA markörleri kullanarak değerlendirilmişlerdir.

Anonymous (2005)'e göre, *Ludwigia* cinsinde 83 tür bulunmaktadır. Bitkinin varyasyonları göz önünde alındığında Güney Amerika anavatan olarak bilinmektedir. *Ludwigia hexapetala* (dekaploidtir)'da $2n=80$ kromozom bulunmaktadır. *L. peploides* alt türleri, *peploides* $2n=16$, *montevidensis* $2n=16$ ve *Ludwigia repens* $2n=32$ kromozom içermektedir.

Yetisir and Sari (2003), Haploid kavun (*Cucumis melo* L.) bitkisinde dihaploidzasyon için 3 farklı metot denemiştir. Ploidi seviyesi, kolkisin muamelesinin ardından yapılan morfolojik ve sitolojik araştırmalardan sonra bitkilerde saptanmıştır. *In vitro* koşullarda elde edilen bitkileri veya tek node explantları ile serada yetişen bitkilerin sürgün uçlarını karşılaştırmak amacıyla daldırma yöntemi kullanılarak kolkisin çözeltisi ile muamele edilmiştir. Ek olarak, serada yetişen bitkilerin yan tomurcuklarına bir damla kolkisinli

  zeltisi ile muamele etmişlerdir. Sürgün ucu muamelesi ile yaklaşık %89 oranında diploid bulunmuştur. Buna karşın *in vitro* bitkiciklerde ve diğ r explantlarda aynı uygulama ile düşük sonuçlar g r lm ştur.

Kadota and Niimi (2002), tetraploid bitkilerden olan japon armutu (*Pyrus pyrifolia* N.) kültürünü, *in vitro* koşullarda kolkisin ile muamele etmişlerdir. Hızlı çoğalan sürgünler %0.1 veya %0.01 kolkisin içeren sürgün arttırıcı ortama (SPM) aktarılmış ve 1, 2, 4 veya 8 gün muamele edilmiş. Sonra yeni hazırlanmış SPM' ye aktarılmış. Ploidi oranı flow sitometri ile incelenmiş ve 4 ay sonra kolkisin muamelesine maruz kalmış 4 değişik ploidi içeren bitkiler seçilmiş ve seçilen bitkiler 5 aydan daha fazla SPM 'de kültüre alınmışlar. Hızlı çoğalan sürgünlerin poliploidi seviyeleri incelenerek 5 tetraploid sürgün seçilmiş. Seçilen tetraploid sürgünler köklendirilmiş olup, bitkiler saksılara aktarılarak serada büyümeye bırakılmış. Diploid ve tetraploid bitkilerin stomaları karşılaştırıldığında tetraploid bitkilerin stomaları daha uzun bulmuşlardır.

Öztürk (2002), *In vitro* hızlı çoğaltım amacıyla *Ludwigia repens* bitkisinin farklı eksplantlarını (uç meristemi, birinci, ikinci ve üçüncü-dördüncü koltukaltı meristemi), değişik oranlarda Benzylaminopurine (BAP), Thidazuron (TDZ) ve  -Naftalen asetik asit (NAA) içeren MS besi ortamında kültüre almıştır. Uç meristemi eksplantından 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren MS besi ortamında %100 sürgün oluşturma oranı ile en fazla sürgün (12.31 adet/eks. başına) elde etmiştir. BAP içeren ortamlar arasında en iyi sonucu (5.37 adet/eks. başına) 0.1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda ikinci koltukaltı meristemi vermiştir. TDZ içeren ortamların BAP'lı ortamlara göre daha iyi sonuç verdiği g r lm ştur. TDZ ve BAP hormonu hızlı çoğaltımda iyi sonuçlar vermiştir. Ancak sürgün gelişiminde yavaşlatıcı etki göstermiştir. Bu nedenle 4 hafta sonunda eksplantlar yarı MS ortama alınmıştır. K klenmede sorun olmadığı görülmüş ve bütün eksplantlarda çoğunlukla iyi sonuç veren 0.05 mg/l TDZ-0.1 mg/l NAA ve 0.3 mg/l BAP-0.1 mg/l NAA'nın kullanıldığı ortamlardan alınan sürgünler yarı MS ortama aktarılmış ve köklenme sağlanmışır. Köklenen sürgünler akvaryum ortamına aktarılmış ve %100 adaptasyon elde etmiştir.

Adaniya and Shirai (2001), tetraploid zencefilin *in vitro* başlangıcında, polen fertilitasını ve çimlenmeyi araştırmıştır. Sürgün ucu kültürlerinin gelişimi açısından 2.0 mg/l BA içeren agarlı MS ortamı ve aynı oranda BA içeren sıvı MS ortamı karşılaştırıldığında katı ortamın daha olumlu etkiye sebep olduğu anlaşılmıştır. Sıvı ortamda, 0.5, 1.0, or 2.0 mg/l BA ile 0.05 mg/l NAA kombinasyonları kültürde olumlu etki yapmışlardır. Tetraploidin etkisinin doğruluğu agar içindeki eksplantların sürgün uçlarının muamelesine veya likit MS'in 2.0 mg/l BA, 0.05 mg/l NAA, ve %0.2 (w/v) kolkisin içeren ortamlarda 4, 8, 12, ve 14 gün bekletilmesine bağlı olarak vermişlerdir. Tespit edilen tetraploidler 18 adet katı ve 5 adet sıvı ortamdan elde edilmiştir. Bu yüzden, tetraploid zencefilin bulunmasına neden olan sürgün ucu explantları 8 gün için 2.0 mg/l BA, 0.05 mg/l NAA, ve % 0.2 (w/v) kolkisin içeren agarlı ortam en etkili yoldur.

Pinheiro *et al.*, (2000)'a göre *Brachiaria* bitkisinin bazı türleri özellikle tetraploid apomiktik çeşitleri tropik bölgelerde gıda olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada *Bracharia*'nın kromozom katlanması için *in vitro* elde edilen bitkilerden eksplantlar 1 mg/l NAA, 3 mg/l kinetin ve %0.01 kolkisin içeren ortamda 48 saat muamele ettikten sonra kolkisinsiz ortama sürgün oluşumu başlayıncaya kadar bırakılmışlardır. Elde edilen bitkiler, flow sitometri sayesinde belirlenmiş ve kromozom sayılarındaki duplikasyon, kök uçlarından sitolojik analiz ile doğrulamışlardır.

Takamura and Miyajima (1996), Diploid sarı-çiçekli siklamende, kolkisin muamelesi ile tetraploid bitki elde edilmesi, bu bitkide poliploidi oluşumunun gerçekleştiğini doğrulamıştır. Yumru bölgelerine, 4 gün boyunca *in vitro* koşullarda 100 mg/l kolkisin muamelesi sonucunda 2 tetraploid bitkinin meyve verdiği bildirilmiştir.

Gömürgen (1991), diploid *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.'in diploid tohumlarını % 0.1 kolkisin + % 0.2 DMSO'te 48 saat bekleterek tetraploid bitki elde etmiştir. Uygulamadan olumlu sonuç almışlardır.

Aslım (1989), tetraploid çokyıllık çavdar elde etme imkanlarını araştırdığı çalışmasında, diploid çokyıllık çavdar fidelerinin % 0.2 lik DMSO içinde çözerek hazırlamış % 0.1 lik kolkisin çözeltisinde, 27 °C’de 3 saat bekletmiştir.

Morgan *et al.* (1988), yaptığı çalışmada, *Festuca gigantea* Vill. ve *Lolium multiflorum* Lam. melezinin tohumunu % 0.2’lik kolkisin çözeltisinde 5 saat bekleterek poliploid bitkiler elde etmişlerdir.

Sevimay (1986), diploid ve tetraploid *Secale montanum* Guss. bitkilerinin bazı morfolojik özelliklerini incelediği araştırmada, 100 gözlemin ortalaması olarak, stoma boyu diploidlerde 48.94 µm, stoma eni ise 10.99 µm, tetraploidlerde ise bu rakamlar sırasıyla, 71.35 µm ve 15.69 µm olarak ölçülmüştür.

Subrahmanyam and Kasha (1975), arpa bitkisinde kromozom katlanmasında uyguladıkları farklı yöntemlerde nitrat oksit ve kolkisin uygulamış, kromozom katlanmasının % 0-100 arasında değiştiğini gözlemiştir. Nitrat oksit ile %17, saf % 0.1’lik kolkisin çözeltisi ile % 37.4 ve % 4 DMSO içerisinde hazırlanan % 0.1’lik kolkisin çözeltisi ile %55.8 oranında kromozom katlanması gözlenmiştir.

Elçi (1966), çok yıllık çavdar ile yaptığı bir araştırmada, diploid olan bitkinin tohumlarını oda sıcaklığında çimlendirdiğini, 4-10 mm kökçüğü bulunan fideleri % 0.1’lik kolkisin çözeltisinde 25-27 °C’de 3 saat bekletip, musluk suyunda yıkadıktan sonra, 150 fideden 68 tanesinin yaşadığını, bunlardan 30 tanesinin tetraploid olduğunu bildirmiştir.

Essad (1962), çalışmasında $2n=14$ suni melez bitkiler elde etmiştir. Bunun için F_1 klonlarını, %0.9’luk kolkisinde 15 saat, %0.5 likte ise 24 ve 40 saat bekletmiştir. Başka bir işlemde ise %0.1 lik kolkisinde 16 ve 24 saat bırakmıştır. Kolkisin ile muamele edilen 258 klondan 78 tanesi canlılığını kaybetmiştir. Geri kalan bitkilerden $2n$ ve $4n$ kromozomlu miksoploid bitkiler elde etmiştir.

Buckner *et al.* (1961), *Lolium perenne* x *Festuca arundinacea* melez klonlarını, % 0.2'lik kolkisin çözeltisinde 24 saat bekletmişlerdir. Bu uygulama sonunda 1 adet $2n=42$, 3 adet $2n=70$ ve 30 adet de $2n=56$ kromozomlu bitkiler elde etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez çalışmasında materyal olarak 2002'den beri Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında, *in vitro* hızlı çoğaltımı yöntemi ile elde edilmiş (Öztürk 2002), 24 ± 2 °C'de ½ MS ortamında sürekli alt kültürü yapılarak saklanmış 200 adet *Ludwigia repens* (2n=32) bitkisi kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Merck.(Almanya) ve Sigma Aldrich Chemical Co.(St Lo. Mo ABD)'dan dan temin edilmiştir.

3.1.1 Deneme yeri

Deneme, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü Akvaryum Ünitesi ve Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji ile Sitogenetik laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.2 Yöntem

3.2.1 *In vitro* hızlı çoğaltımı ile *Ludwigia repens*'in çoğaltılması

Sürekli alt kültüre alınmış olan *Ludwigia repens* bitkisinin sürgün ucu ile 1. koltuk altı meristemi Öztürk (2002)'de belirtilmiş yöntem ile MS (Çizelge 3.1) ortamına 0.05 mg/l TDZ ve 0.5 mg/l NAA eklenerek çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.1 Besin ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları (Murashige and Skoog, 1962)

Ortamda bulunan maddeler		Konsantrasyonu (mg/l)
Makro Elementler	NH ₄ NO ₃	1650.000
	KNO ₃	1900.000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370.000
	KH ₂ PO ₄	170.000
Mikro Elementler	KI	0.830
	H ₃ BO ₃	6.200
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.300
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.600
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.850
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.250
Vitaminler	Myo-Inositol	100.000
	Nicotinic Acid	0.500
	Pyrotinic Acid	0.500
	Thiamine-HCl	0.100
	Glycine	2.000

3.2.2 Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ile kolkisinin hazırlanışı ve saklama koşulları

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Merck. ve Sigma Aldrich Chemical Co.'dan temin edilmiştir. Büyüme düzenleyiciler uygun çözücülerde çözüldükten sonra standart şekilde istenilen miktarda ve oranda stok solusyonları hazırlanmıştır. NAA 1 N NaOH çözeltisinde çözünürken TDZ %50'lik etanol'de çözüldükten sonra saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Stok çözelti falkon tüpleri içerisinde +4 °C'de muhafaza edilmiştir. kolkisin ise saf su da çözülmüştür. Büyüme düzenleyiciler ve kolkisin +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Büyüme düzenleyiciler, ortama, otoklavda steril edilmeden önce ilave edilmiştir. Kolkisinin yüksek ısıya duyarlılığı olduğundan dolayı, ortam steril edildikten sonra ilave edilmiştir. Hazırlanan büyüme düzenleyicilerin ve kolkisinin stok solüsyonları +4 °C'de iki ay saklanmıştır. Kolkisin ise her zaman çalışma başlamadan önce hazırlanmış ve steril kabin

içerisinde filtre edilerek kullanılmıştır. (Anonymous 2008 c, web sitesi: <http://www.orchidmall.com/general/colchic.htm>, Erişim Tarihi: 28.06.2008)

3.2.3 Kolkisinin bitki explantlarına uygulama yöntemleri

Hazırlanan explantlara 2 yöntem ve 8 farklı konsantrasyonda kolkisin muamelesi yapılmıştır. Bu işlemler aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. yöntem: *L. repens* in alt kültüründen alınan sürgün uçları ve yukarıdan birinci koltuk altı meristemleri, 0.05 mg/l TDZ ve 0.5 mg/l NAA ile 0 (kontrol-kolkisinsiz ortam), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 ve 4.0 mg/l kolkisinli MS ortamı bulunan magenta kaplarına 3'er tekerrür halinde aktarılmıştır (Griesbach 1990, modifiye edilerek).

2. yöntem: Bu yöntemde, 0.05 mg/l TDZ ve 0.5 mg/l NAA ile 0 (kontrol-kolkisinsiz ortam), 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ve 2000 mg/l kolkisinli sıvı ortam içerisinde ½ saat bekletildikten sonra 0.05 mg/l TDZ ve 0.5mg/l NAA içeren katı MS ortamı bulunan magenta kaplarına 3'er tekerrür olarak kültüre alınmıştır (Tepe vd 2002, modifiye edilerek).

3.2.4 Kültür koşulları

Ortam hazırlığında distile saf su kullanılmış olup, gerektiğinde besin ortamına farklı konstrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (Sitokinin ve Oksin) ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.6- 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atm basınç altında ve 120 °C'de 20 dakika otoklav içerisinde 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 °C $\pm$ 2 °C sıcaklıktaki iklim odasında tutulmuştur. Eksplantlar 4 hafta büyümeyi düzenleyiciler içeren ortamlarda tutulduktan sonra ½ MS ortamına alınmıştır. Bütün doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde aseptik koşullarda yapılmıştır. Bitkiler steril Magenta GA⁷ veya cam kavanozlar içerisinde büyütülmüştür (Öztürk 2002).

3.2.5 Sürgünlerin köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünlerden kromozom çalışması için 3 değişik yöntem ile köklendirme yapılmıştır. Birinci çalışmada elde edilen bitkiler, köklenmesi için akvaryum ortamına adapte edilmiştir. Akvaryum suyunun sıcaklığı $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de tutularak 12 saat ışık ve 12 saat karanlık fotoperiyodu ayarlanmıştır. Akvaryum dibine 1-2 cm yüksekliğinde ince kum yerleştirilmiş ve akvaryum suyuna haftada bir 10 mg/l sıvı gübre (FloraPride, Tetra Plant) ilave edilmiştir.

İkinci yöntemde bitki eksplantları, 25 mg/l IBA ile 10 dakika muamele edilmiştir. Muamele edilen eksplantlar, $\frac{1}{2}$ MS ortamına aktarılmış ve kök gelişimi oluncaya kadar bu ortamda bekletilmiştir.

Üçüncü yöntemde, bitki eksplantları, 25 mg/l IBA ile 10 dakika muamele edilmiştir. Muamele edilen bitki eksplantları, su içerisine konarak iklim odasında köklendirilmiştir.

3.2.6 Somatik kromozomların gözlemi için materyalin hazırlanması

Bitki kök ucu meristem hücrelerinden kromozom sayımı yapabilmek için, kök uçlarının maksimum boy uzunlukları 0.5- 1 cm'yi geçmeden pens ve jilet yardımı ile alınmıştır. Alınan köklerden, standart teknik (Reader 2003) modifiye edilerek somatik kromozomlar mikroskopta görüntülenmeye hazır hale getirilmiştir. Yapılan işlemler aşağıdaki sıra ile gerçekleştirilmiştir.

Kök ucu örneklerinin alınması: Kök ucu örnekleri, köklendirme çalışmalarında bahsedilen yöntemler kullanılarak elde edilmiştir. Kökler, ilk 1-1,5 hafta içerisinde 0.5- 1 cm uzunluğa ulaştığı zaman, pens ve jilet yardımı ile kesilmiştir.

İlk işlem: İlk işlem de kök uçları doymuş α -monobromonaftalin çözeltisi içerisine konulmuştur. Çözelti, 250 ml saf suya 250 μL (3-4 damla) α -monobromonaftalin damlatılarak hazırlanmıştır. 4-5 cm boyunda ve 1.5 cm çapındaki cam tüplere bu çözeltiden 2-2.5 cm yüksekliğinde doldurulmuştur. Çözeltinin bulunduğu cam tüplerin içerisine

kesilen kök uçları konulup, ağızları mantar tıpa veya parafilm ile kapatıldıktan sonra materyal, 2 saat oda sıcaklığında çözelti içerisinde bekletilmiştir.

Materyalin tespiti: İlk işlemten sonra, tüp içerisindeki α -monobromonaftalin süzülerek, eksplantlar saf su ile 5dk. boyunca yıkanmıştır. Yıkanan eksplantların fazla suyu kurutma kağıdı ile alınıp, hazırlanmış olan Propionik asit: Etanol (1:3) (Singh 2003) çözeltisinde tespite alınmıştır. Bu çözelti yine cam tüpler içerisine 2 cm yüksekliğe kadar doldurulduktan sonra, eksplantlar hazırlanmış olan tüplere aktarılmıştır. Tüplerin ağızları yine mantar tıpa veya parafilm ile kapatılıp, 24 saat + 4 °C'de buzdolabında bekletilerek, kök uçlarının tespit işlemi tamamlanmıştır.

Hidroliz: Kök uçları, tesbit işleminden sonra hidroliz için öncelikle tespit çözeltisinden distile su ile arındırılmıştır. Arındırma için, soğuk distile su kullanılmıştır. Kökler, distile suyun içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra kurutma kağıdı ile fazla suyu alınıp, hidroliz işlemine geçilmiştir. Hidroliz işlemi için, su banyosunda 60 °C'de 1N HCl içeren tüpler içerisine kök uçları konulup, bu işlem tüm örnekler için 1 dakika süre ile yapılmıştır.

Boyama: Kök uçlarının boyanmasında feulgen ve asetokarmin çözeltisi, kromozomların etkili şekilde görünebilmesi için birlikte kullanılmıştır. Feulgen ile, kök uçlarının hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra muamele edilmiştir. Araştırmada kullanılan Feulgen boyası Singh 2003'ye göre hazırlanmıştır.

Hidroliz edilen kök uçları 1N HCl'den çıkarılarak soğuk distile su içerisinde 5 dakika bekletilip kurutma kağıdı ile fazla suyu alınan kökler, içerisinde Feulgen bulunan tüplere aktarılmıştır. Tüpler, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda ½ saat bekletilmiştir. ½ saat bekletilen kökler, ok uçlu iğne yardımı ile lam üzerine alınıp asetokarmin ile tekrar boyama yapılmıştır. Asetokarmin damlatılmış kökler, 15 dakika boya içinde bekletilmiştir. Koyu mor renk olan 1–2 mm'lik kök uçlarından preparatlar hazırlanmıştır.

3.2.7 Mikroskop incelemesi için preparatların hazırlanması

Boyanmış kök uçları, daha sonra jilet yardımı ile yaklaşık 1-2 mm'lik uç kısmı kesilerek, jilet ile kıyılıp çok küçük parçalara bölünmüştür. Hücrelerin preparat üzerinde düzgün şekilde dağılımı, jiletle yapılan kıyma işleminin sonucudur. Kıyma işlemi esnasında kök ucu parçalarının kurummasını engellemek için, arada damla şeklinde asetokarmin boya veya %45' lik asetik asit ile muamele yapılmıştır. Çözelti damlalarının büyük olması, kök ucu parçalarının kıyılmasını güçleştirdiğinden dolayı asetik asit veya asetokarmin küçük damlalar halinde koyulmuştur.

Kıyma işlemi bittikten sonra asetokarminden tekrar bir damla parçaların üzerine damlatılıp, ok uçlu iğne ile parçaların homojen şekilde dağılımı sağlanıp ayrıca kromozomların daha koyu şekilde boyanması için de asetokarmin içerisinde karıştırılmıştır. Bu işlemden sonra parçaların üzeri lamel ile çok dikkatli bir şekilde kapatılmıştır. Lamel ile kapatılan preparat üzerine kurutma kağıdı koyulup elimizin baş parmağı ile sıkıca bastırılmıştır. Bu işlemden sonra, mikroskopta incelenmeye hazır hale getirilmiştir. Mikroskopta incelenen ve hücrelerinde amaca uygun kromozomların bulunduğu gözlenen preparatlar devamlı hale getirilmiştir.

3.2.7.1 Preparatların görüntülenmesi

Hazırlanmış preparatlar, mikroskop altında incelenirken, aynı zamanda amaca uygun kromozomları bulunan hücreler bulunduğu zaman, fotoğraflandırılmıştır. Fotoğraf makinesi, mikroskobun üstüne eklenmiş şekilde bulunmaktadır. Bu sayede hem inceleme hem de görüntüleme işi aynı anda yapılabilmiştir. Olympus-BH2 mikroskobunda incelenen preparatlar, Olympus C-35AD-4 fotoğraf makinası ile görüntülenmiştir. Görüntülenen örneklerden amaca uygun kromozomların bulunduğu gözlenen preparatlar devamlı hale getirilmiştir.

3.2.8 Devamlı preparatların yapılması

Hazırlanan preparatlar mikroskopta incelenmiş, kromozomları iyi şekilde boyanan ve sayılabilir hücrelere sahip olanlar devamlı preparatlar haline getirilmiştir.

Devamlı preparatları yapmak için alkol buharı değiş - tokuşu yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde lam ile lamel arasından, alkol buharı ile kanada balzamının lamelin altına kolayca girmesi kolaylaştırılmış olur. Lamın üzerine gerekli bilgileri kurşun kalemle yazılıp veya etiket yapıştırıldıktan sonra preparat, bir lam yıkama kabının içine konulmuştur. Kabin ve kapağının iç tarafı kurutma kağıdı ile kaplanmıştır. Cam kaba, 4-5 mm yüksekliğine kadar saf (%96- 99) alkol konulmuş ve içerisindeki kurutma kağıdı alkol ile nemlendirilmiştir. Nemlendirme işleminde, alkol miktarının fazla olması buharlaşma oranını azalttığından dolayı kurutma kâğıdının ıslanmasına yetecek kadar alkol kullanılmıştır. Daha sonra preparat bu kabin içerisine konulup, alkol buharının kapaktan uçmasını engellemek için de, kapağın iç kısmına vazelin sürülerek kapak kapatılmıştır.

Hazır hale gelen kap, buzdolabında +4 °C'de 2 gece bekletilmiştir. Beklemiş olan preparatlar, bu cam kaptan çıkartılıp petri kutusuna konulmuştur. Petri kutusunun içi de kurutma kağıdı ile kaplanmıştır. Kurutma kâğıtları saf alkol ile nemlendirilmiş ve preparatlar dizilmiştir. Preparatlardaki lamelin üst ve yan kenarı boyunca kanada balsamı damlatılmıştır. Balsam, ok uçlu iğne yardımı ile iki kenar boyunca sürülmüştür. Bu şekilde kanada balsamının lam ve lamel arasına girmesi kolaylaştırılmıştır. Petrinin kapağı kapatılıp oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Böylece preparatlar, yıllarca bozulmadan muhafaza edilebilir hale getirilmiştir.

3.2.9 Stomaların preparatlarının hazırlanması ve görüntüleme

Stomaları görüntülemek için yaprak eksplantı alındı.Yaprak üzerine ince bir tabaka şeffaf oje sürülmüştür. Oje kuruduktan sonra jilet yardımıyla ojeli tabaka dikkatlice epidermisten ayrılmıştır. Ayrılmış olan kısım, bir damla distile su damlatılmış lam üzerine konularak,

lamel ile dikkatlice sabitlenmiş ve sonrada, Zeiss mikroskop ve Zeiss axiocam mrc-5 fotoğraf makinası ile görüntülenmiştir.

3.2.10 Yaprak boylarının ölçülmesi

Elde edilen bitkilerin tepe ucundan yaprak sapına kadar olan boyu ve yaprağın en geniş olan bölgesinden ölçülen yaprak genişliği, mm bölmeli cetvel ile ölçölüp ortalamaları alınmıştır.

3.3 İstatistiksel Analizi

Kolkisinsiz ve katlama görülen bitkilerin 11'er örneğinden alınan stoma ve yaprak boyları ortalaması, SPSS 15 computer software program ile hesaplanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

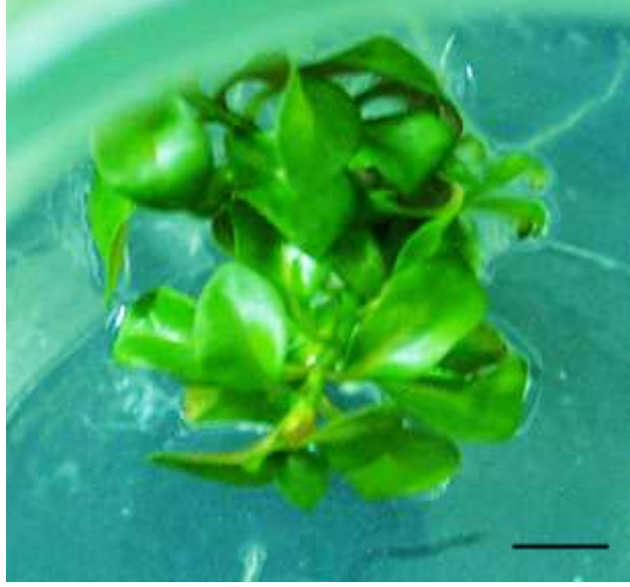
4.1 *In vitro* Hızlı Çoğaltımı ile *L.repens*'in Çoğaltımı

Ludwigia repens, doku parçalarından çoğalabilme özelliğine sahip bir bitkidir. Rejenerasyon yapılabilmek için 2002'den beri sürekli ½ MS ortamda alt kültür ile saklanmış *L. repens* bitkisinin uç ve koltuk altı meristemleri 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamda (Öztürk 2002) çoğaltılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Uç meristem ve birinci koltuk altı meristem ile gelişen bitkilerin ½ MS ortamındaki gelişimi.(bar= 0.5 cm)

Altı seneden beri sürekli alt kültüre alınmış bitkilerin uç meristemlerinden ortalama 12.50 ve koltuk altı meristemlerinden ise 10.33 sürgün elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile Öztürk (2002)'nin hızlı çoğaltım sonuçları birbirine benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik sürekli alt kültürün bitkinin genetik yapısı üzerinde her hangi olumsuz etki yapmadığını belirtmektedir. Her iki eksplanttan gelişmiş sürgünlerde büyüme aşamasında da her hangi anormallik gözlenmemiştir (Şekil 4.2 ve 4.3).



Şekil 4.2 *Ludwigia repens*'in 1. Koltuk altı meristeminden gelişen bitkicik (bar=0.5 cm)



Şekil 4.3 Sürgün ucu eksplantından büyümüş *L.repens* bitkisi (bar=0.5 cm)

4.2 Köklendirme Çalışması

Akvaryumda yapılan köklendirme çalışmasının ilk haftasında bitkiler, ortama adapte olmakla beraber köklenme ilk hafta hızlı bir şekilde olmadığı için kök elde edilememiştir. İki hafta sonra, akvaryumda yosun oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.4). Yosunlar, tüm bitkilerin üstünü halı gibi kapladığından dolayı, bitkilerden kök alınamamıştır. 3. haftadan itibaren bitkilerin tamamı suyun içerisinde bozuldu ve akvaryum çalışmasından sonuç alınamamıştır. Öztürk (2002), bitkilerin akvaryumlarda hızlı köklendiğini belirtmiştir. Bu çalışmada köklenmesinde ki başarısızlığın sebebi yosun gelişmesinin köklenmede olumsuz etki yaptığı düşünülmektedir.



Şekil 4.4 Kök gelişimi sırasında meydana gelen yosunlaşma (bar= 5 cm)

İkinci yöntemde bitki eksplantları, 25 mg/l IBA ile 10 dakika muamele edilmiş, muamele edilen eksplantlar, $\frac{1}{2}$ MS ortamına aktarılmıştır. Aktarılan eksplantlar, magenta içerisinde gelişmiştir (Şekil 4.5). Fakat kökler yavaş büyümüşlerdir. 10 -15 günlük kökler alınmıştır. Bu devrede alınan köklerde, hücre içerisinde kromozoma nadiren rastlanmıştır. Yapılan preparatlarda da katlanma gözlenmemiştir.

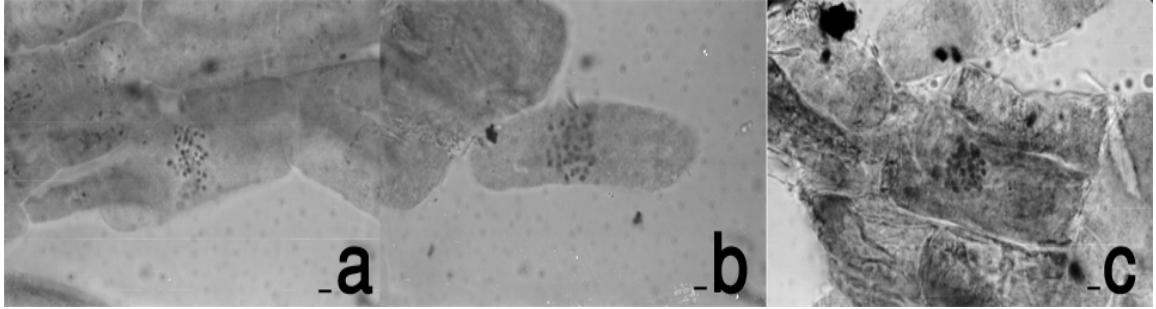


Şekil 4.5 Kök gelişimi için ½ MS ortamına aktarılan eksplantlar (bar= 1.5 cm)

Üçüncü yöntemde, bitki eksplantları, 25 mg/l IBA ile 10 dakika muamele edilip, su içerisine konan eksplantlardan 4-5 gün içerisinde 1-2 cm uzunluktaki kökler elde edilmiştir. Elde edilen köklerden yapılan preparatlarda kromozomlar görülmüş, kromozom katlanması gözlenmiştir.

4.3 *L. repens*'in Sürgün Ucu ve Birinci Koltuk Altı Meristemlerin Kolkisinle Muamele Edilmemiş Bitkilerin Kromozomlarının İncelenmesi

L. repens'in sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemlerinin, kolkisin ile muamele edilmemiş bitkilerin kromozom incelenmesi için, bitkilerin kök uçlarından hazırlanan 3'er preparat Olympus mikroskop ile 100' lük objektif ile yapılan inceleme sonucunda, kolkisin içermeyen bitki materyalinin 2n=32 kromozoma sahip olduğu tespit edilmiştir. Yapılan inceleme sonuçları, Anonymous 2006 ve Anonymous 2005'in sonuçları doğrulanmaktadır. Her iki kaynakta belirtildiği gibi *L. repens* bitkisinde kromozom sayısı 2n=32 olarak gözlenmiştir (Şekil 4.6. a,b,c).



Şekil 4.6 *L. repens*'in sürgün ucu eksplantından elde edilmiş kolkisin ile muamele edilmeyen bitkilerin (a,b,c) $2n=32$ kromozom görüntüsü (Katsayı=4 μ m).

4.4 Kolkisinin Bitki Eksplantlarına Uygulama Yöntemleri

4.4.1 *L. repens*'in sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemlerinin değişik oranda kolkisinle muamelesi

Alt kültürden alınıp çoğaltılan bitkiciklerin, sürgün uçları ve birinci koltuk altı meristemleri, 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA ile 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 ve 4 mg/l kolkisinli MS ortamı bulunan magenta kaplarında gelişen bitkilerin kök ucundan yapılan 3'er preparat Olympus mikroskop ve 100'lük objektif ile incelendiğinde bitki kromozomlarında herhangi katlanma gözlenmemiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 *L. repens*'in sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemlerin değişik oranda kolkisinle muamelesi sonuçları

Kolkisin oranı (mg/l)	Eksplant	Kromozom sayısı
0	Sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemi	$2n=32$
0,50		$2n=32$
1		$2n=32$
1,5		$2n=32$
2		$2n=32$
2,5		$2n=32$
3		$2n=32$
3,5		$2n=32$
4		$2n=32$

Sonuç olarak yapılan bu denemede kullanılan kolkisin dozlarının kromozom çoğaltımı için yetersiz olduğu espit edilmiştir. Buna karşın yapılan kaynak araştırmasındaki bitkilerde (*Colophospermum mopane*, *Gosypium. arboreum* L. cv. FDH-228 ve HK-113, *Brachiaria* bitkisi, *Nicotiana tabacum* cv. Karabağlar 6265 vs.) kromozom katlanma görmüşlerdir. Yapılan bu denemede görülmemesinin sebebi *in vitro* ortamda agarla beraber kullandığımız kolkisin oranlarının bu bitkinin kromozom katlanması için yetersiz olduğu ayrıca yapılan tüm çalışmalar karasal bitkilerde yapılan çalışmalardır. Bundan dolayı su bitkilerinin kolkisine olan tepkisi karasal bitkilere göre farklı olabileceği düşünülmektedir.

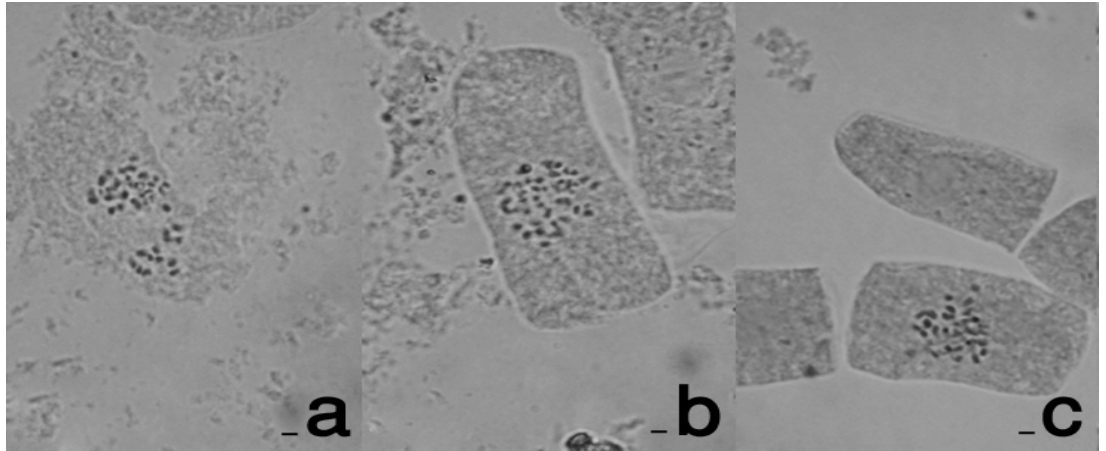
4.4.2 *L. repens*'in sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemlerinin kolkisin içeren sıvı ortamda bekletilmesi

Alt kültürden alınıp çoğaltılan bitkiciklerin, sürgün uçları ve birinci koltuk altı meristemleri, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ve 2000 mg/l kolkisinli sıvı ortam içerisinde ½ saat bekletildikten sonra 0.05 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamda çoğaltılmıştır.

Yapılan ikinci denemede tüm eksplantların, kök ucu örneklerinin alınması, ilk işlem materyalin tespiti, hidroliz, boyama ve mikroskop incelemesi için preparatların hazırlanması aşamaları tüm eksplantlar için aynı şekilde uygulanmıştır. Mikroskop altında yapılan incelemelerin, sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 500 mg/l kolkisin çözeltisinde, daldırma yöntemi kullanılarak birinci koltuk altı meristemi eksplantına yapılan muamele eksplantta kromozom katlanmasının sebep olmuş olup $2n=32$ yerine $3n=48-4$ (aneuploid) kromozom göstermiştir (Şekil 4.7). Başka uygulamalarda ise kromozomlarda her hangi bir katlanma görülmemiştir.

Çizelge 4.2 *L. repens*'in sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemlerin kolkisin içeren sıvı ortamda bekletilmesi

Kolkisin oranı (mg/l)	Eksplant	Kromozom sayısı
250	Sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemi	$2n=32$
500-1	Sürgün ucu	$2n=32$
500-2	Birinci koltuk altı meristemi	$3n=48-4$ (aneuploid)
750	Sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemi	$2n=32$
1000	Sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemi	$2n=32$
1250	Sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemi	$2n=32$
1500	Sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemi	$2n=32$
1750	Sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemi	$2n=32$
2000	Sürgün ucu ve birinci koltuk altı meristemi	$2n=32$



Şekil 4.7 *L. repens*'in 1. koltuk altı meristemi eksplantından elde edilmiş 500 mg/l kolkisin ile 30 dk muamele edilen bitkilerin (a,b,c) $3n=48-4$ (aneuploid) kromozom görüntüsü. [Katsayı= $4\mu\text{m}$ (mikron)]

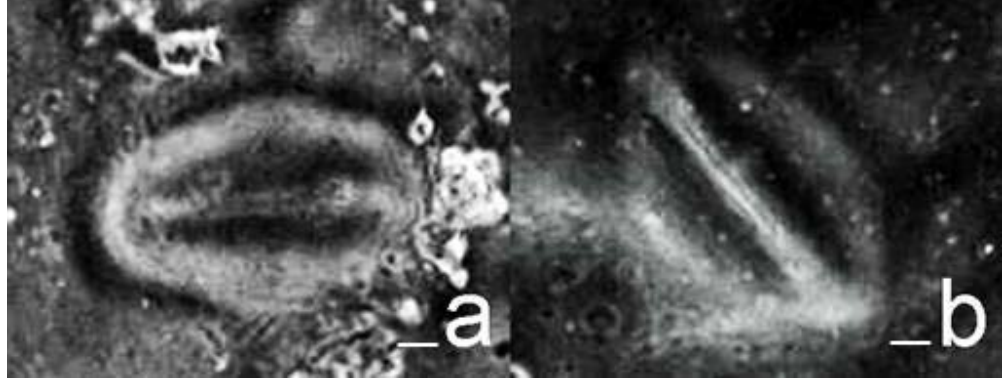
Normal olarak sonuç veren kolkisin oranından daha fazla kolkisin kullandığımızda kromozomlarda daha fazla katlanma olması beklenilmiştir. Fakat, kromozom katlanması gözlenmemesinin sebebi, diğer eksplantlarda kolkisinin kromozom katlanması için etkili olmadığını ve rastgele bir etki yaptığını göstermektedir. Buna benzer olarak *Nicotiana tabacum* cv. Karabağlar 6265 (Bürün 2008)'de de muamele edilen embriyoidlerden sadece 5 bitki de kromozom katlanması elde edilebilmişlerdir. Buna karşılık, *Ludwigia* cinsinde doğal koşullarda poliploidi bitkiler bulunmaktadır (Anonymous 2005, 2006).

4.5 Stomaların İncelenmesi

Kolkisinin fenotip üzerindeki değişimini de tespit etmek amacıyla 11 yaprak örneğinin stomaları incelendi. İncelemede, kolkisin ile muamele edilmiş ve edilmemiş her bir örnekte stoma hücrelerindeki değişim Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. İnceleme sonucunda normal bitkilerin ortalama stoma uzunluğu 7.88 μm , genişliği 4.43 μm olarak katlanmış bitkilerin ortalama stoma uzunluğu 8.13 μm , genişliği ise 5.43 μm olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Stomaların uzunluk ve genişlikleri, Elçi (1994)'nin tarif ettiği gibi mikroskopta görüntü boyutlarının ölçülmesi ile yapılmıştır. Benzer şekilde Zeiger (1971)'de arpa bitkisinin kolkisin ile muamelesinde stoma hücrelerindeki büyüme tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3 Stoma hücrelerinin karşılaştırılması

NO	Kolkisinsiz yaprak eksplantı (Normal bitki)		Katlanma görülen kolkisinli yaprak eksplantı (500 mg/l)	
	Uzunluk(μm)	Genişlik (μm)	Uzunluk (μm)	Genişlik (μm)
1	7,56	4,73	7,34	4,47
2	8,31	4,17	8,96	5,25
3	8,16	4,26	8,27	5,58
4	7,82	4,29	8,03	5,23
5	7,67	4,36	8,08	5,62
6	7,23	4,34	8,03	5,43
7	9,09	4,31	8,09	6,6
8	6,91	4,79	8,75	5,96
9	7,95	4,26	8,7	6,16
10	8,53	4,67	7,71	4,63
11	7,46	4,57	7,5	4,82
Ortalama	7,88	4,43	8,13	5,43



Şekil 4.8 Diploid ve aneuploid bitki stomalarının görüntüleri (a) Kolkisin ile muamele edilmemiş bitki stoması (b) aneuploid bitkiden elde edilen stoma görüntüsü (Katsayı= 1.12 μm).

4.6 Yaprakların İncelenmesi

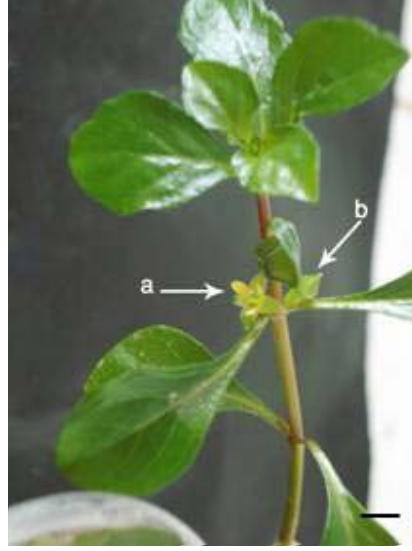
Yapılan yaprak boyu incelemesinde kolkisin ile muamele edilmeyen normal bitkilerin yaprak uzunlukları ortalaması 0.76 μm , genişliği ise 0.41 μm olarak ölçülmüş olup Çizelge 4.4’de gösterilmiştir. Kolkisin ile muamele edilen bitkilerin yaprak uzunlukları ortalaması 1.98 μm , genişliği 1.07 μm hesaplanmıştır (Şekil 4.8). Polipliod bitkilerde 2 aylık sürede çiçeklenme ve tomurcuk oluşumu da gözlenmiştir (Şekil 4.9, 4.10). Benzer şekilde Rauf *et al.* (2006), *Gossypium arboretum* L. bitkisinde poliploid bitkilerin yapraklarında büyüme tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4 Yaprak boylarının karşılaştırılması

NO	Kolkisinsiz yaprak eksplantı (Normal bitki)		Katlanma görülen kolkisinli yaprak eksplantı (500 mg/l)	
	Uzunluk(cm)	Genişlik (cm)	Uzunluk (cm)	Genişlik (cm)
1	0.7	0.3	2.5	1.1
2	1	0.5	2	1.2
3	1.2	0.5	2	0.9
4	0.8	0.4	2.1	1.2
5	1	0.4	1.5	0.9
6	0.6	0.3	2	1.1
7	0.8	0.4	2	1.3
8	1	0.5	2.2	1.1
9	1	0.4	1.8	1.1
10	0.8	0.4	2	1
11	0.7	0.5	1.7	0.9
Ortalama	±0.76	±0.41	±1.98	±1.07



Şekil 4.9 Bitki boyları: a. normal bitkiler, b. kolkisin ile muamele edilen bitkiler
[Bar = 1.3 cm, şekil a ve b]



Şekil 4.10 İki aylık *L. repens* poliploid bitkisinde çiçeklenme (a) açılmış çiçek (b) tomurcuk (Bar =0.75 cm).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ludwigia bitkisinin normal kromozom sayısı $2n=32$ 'dir. Bu çalışma da yapılan çeşitli kolkisin muamelelerinden sonra kromozom sayısı $3n=48-4$ aneuploid bitki elde edilmiştir. Sonuç olarak, yeni bir tür başarıyla geliştirilmiştir. Bu türün ayrıntılı taksonomik ve sistematik çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

L. repens kromozomlar çok küçük olduğu için normal ışık mikroskopunda tespit etmek oldukça zor olmaktadır. İlerdeki çalışmalarda normal ışık mikroskobu yerine daha gelişmiş mikroskoplarla çalışmanın kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir.

Kolkisin ile *L.repens* arasındaki kromozom çoğaltım mekanizmasının araştırılması gerekmektedir. Bunu anlayabilmek içinde radyoizotop kullanarak (Fluorescence *in situ* hybridization) veya daha gelişmiş yöntemler ile kolkisin etkisini tespit etmek gerekmektedir.

Bu çalışmada elde edilen kromozom katlanması olan bitkilerin morfolojik özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir. Bunun yanısıra bitkiyi daha iyi şekilde anlamak ve amaca uygun olarak kullanabilmek için kimyasal analiz yapılması ve ikincil metabolit varlığının tespit edilebilmesi ile bitkinin, kullanım alanının genişleyeceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Adaniya, S. and Shirai D., 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Scientia Horticulturae* 88-4, 31, 277-28.
- Anonymous a, 2008. Web sitesi: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=LURE2> , Erişim Tarihi: 21.07.2008.
- Anonymous b, 2008. Web sitesi: <http://en.wikipedia.org/wiki/Colchicine>, Erişim Tarihi: 28. 06.2008.
- Anonymous c, 2008. Web sitesi: <http://www.orchidmall.com/general/colchic.htm>, Erişim Tarihi: 28.06.2008)
- Anonymous, 2006. Invasive *Ludwigia* Management Plan for the Laguna de Santa Rosa Sonoma County, California 2005-2010.
- Anonymous, 2005. Sonoma County Water Agency (SCWA) Aquatic Pesticide Application Plan For Application of Aquatic Pesticides to Portions of the Laguna de Santa Rosa Consistent with Statewide General NPDES Permit for the Discharge of Aquatic Pesticides for Aquatic Weed Control in Waters of the United States Water Quality Order No. 2004–0009-DWQ
- Asano, H. 2001. Effect of shading on weed emergence in paddy fields. *Journal of Weed Science and Technology*, 46 (1); 31-36.
- Asano, H., Kanehira, T. and Isobe, K. 2001. Changes in weed emergence in paddy fields with continious Aigamo duck farming, an example in Yabe Town, Kumamoto Prefecture. *Journal of Weed Science and Technology*, 46 (1); 19-24.
- Aslım, B. 1989. Diploid avdardan (*Secale montanum* Guss.) tetraploid çokyıllık çavdar elde edilmesi imkanları ve bitkilerde mitoz, mayoz kromozomlar ile bazı morfolojik zelliklerin mukayesesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi niversitesi, s.84, Ankara

- Baki, B., Yin, F. W. N. and Yong, W. K. 1997. Weed flora of arable peat in Selangor, Malaysia- quantitative and spatial pattern analyses. *Korean Journal of Weed Science*, 17 (4) 153-169.
- Bhowmick, M. K. 2001. Impact of herbicides on energy utilization by high yielding summer paddy and associated weeds. *Annals of Plant Protection Sciences*, 9 (1); 104-108.
- Bonyongo, M. C., Bredenkamp, G. J. and Veenendaal, E. 2000. Foodplain vegetation in the Nxaraga Lagoon area, Okavango Delta, Botswana. *South African Journal of Botany*, 66 (1);15-21.
- Britton N.L., and Brown A., 1913. An illustrated flora of the Northern United States, Canada and the British possessions second edition vol. 2, p. 585.
- Brunson, M. W. 1988. Forage and feeding systems for commercial crawfish culture. *J. Shellfish Res.*, 7 (1); 210.
- Brundu, G., Brock, J., Camarda, I., Child, L. and Wade, M. 2001. Plant Invasions – Species Ecology and Ecosystem Management. Backhuys Publishers, Leiden, 338, Netherlands.
- Buckner, R.C., Hill, H.D. and Burrus P.B. 1961. Some characteristics of perennial and annual *ryegrass* x tall *fescue* hybrids and the amphidiploids progenies of annual *ryegrass* x tall *fescue*. *Croop Sci.* 1: 75-80.
- Bürün, B. and Emiroğlu Ü. 2008. A Comparative Study on Colchicine Application Methods in Obtaining Doubled Haploids of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), *Turk J Biol* 32, 105-111
- Chen, C. P., Lin, C. C. and Namba, T. 1989. Screening of Taiwanese Crude drugs for antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. *Index medicus*, 27 (3); 285-295.

- Elçi, Ş. 1994. Sitogenetikte araştırma yöntemleri ve gözlemler. 100. Yıl Üniversitesi Yayınları No:18 .Van.
- Elçi, Ş. 1966. Yem bezelyesinde (*Pisum arvense* L.) kromozom sayısının tespiti ve karyotip analizi. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları : 259
- Essad, S. 1962. Etude Genetique et cytogenetique des especes *Lolium perenne* L., *Festuca pratensis* Huds. et de leurs hybrids. I.N.R.A., Anneles de L'Amelioraiton des plantes, Wersailles.
- Ford, V.S. and Gottlieb, L.D. 2007. Tribal relationships within Onagraceae inferred from PgiC sequences. *Systematic Botany* 32(2):348-356.
- Gömürgen, A.N. 1991. Diploid ve suni tetraploid adi otlak ayrığı (*Agropyron cristatum* L.) Gaertn.)’da mitoz kromozomlarının yapısı ve mayoz bölünmenin tohum oluşumu ile ilgisi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, 185 s. Ankara.
- Gordon, E. 2000. Vegetation and seed bank dynamics in a lacustrine harbaceous wetland (Venezuela). *Revista de Biologia Tropical*, 48 (1); 25-42.
- Gordon, E. 1999. Size and composition of seed bank in herbaceous wetlands in Laguna Grande (Manages, Venezuela). *Acta Biologica Venezuelica*, 19(4); 41-60.
- Grant, W. F. and Owens E. T. 2002. *Lycopersicon* assays of chemical/radiation genotoxicity for the study of environmental mutagens, *Mutation Research* 511 207–237.
- Greenway, M. and Woollyey, A. 1999. Constructed wetlands in Queensland: Performance efficiency and nutrient bioaccumulation. *Ecological Engineering*, 12; 39-55.
- Griesbach, R.J., 1990. A fertile tetraploid *Anigozanthos* hybrid produced by *in vitro* colchisine treatment. *Hort. Sci.* 25 (7): 802-803

- He, J. H., Zhou, X. J., Sun, Y. J., Ma, Z. J. and Bao, H. Z. 2000. Occurrence of weeds in early direct seeded rice fields and their control in Jinhua, Zhejiang. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 12 (6); 331-334.
- He, J. H., Sun, Y. J., Zhou, X. Y. and Bao, H. Z. 1999. Occurrence of weeds in arid seedling nursery of early rice and their control. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 11 (5); 229-233.
- Hinton, T. G., Bell, C. M., Whicker, F. W. and Philippi, T. 1999. Temporal changes and factors influencing ¹³⁷CS concentration in vegetation colonizing an exposed lake bed over a three-year period. *Journal of Environmental Radioactivity*, 44 (1); 1-19.
- Hiscock, P. 2003. *Encyclopedia of aquarium plants*. Barnes Educational Series. N.Y. USA.
- Hosking, J.R., Groves, R. H., Michelmore, M. 1997. Recent naturalizations of species in Australia- some species Which could become a problem in New south Wales. *Improving weed management systems and NSW Agriculture*, RMB 944, Tamworth, NSW 2340, Australia.
- Jacobs, S. W. L., Perrett, F., Sainty, G. R., Bowner, K. and Jacobs, B. J. 1994. *Ludwigia peruviana* (Onagraceae) in the Botany wetlands near Sydney, Australia. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.*, 45 (8); 1481-1490.
- Kadota M. and Niimi Y., 2002. In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Rep.* 21:282–286.
- Khedr, A. and Serag, M. 1998. Environmental influences on the distribution and abundance of waterlettuce (*Pistia stratiotes* L.) in Egypt. *Limnologica*, 28 (4); 387-393.
- Kim, H. H. and Pyon, J.Y. 1998. Weed occurrence and yield loss due to weeds in different direct-seeded rice paddy fields. *Korean Journal of Weed Science*, 18 (1); 12-19.

- Kumar, V. S. and Sreekumar, P.V.2000. *Ludwigia peruviana* (L.) Hara - a shrub new to Andamans. Journal of Economic and Taxonomic Botany, 24 (2); 276-278.
- Kuo, Y. C., Sun, C. M., Tsai, W. J., Ou, T. C., Chen, W. P. and Lin, C. Y. 1999. Blocking of cell proliferation, cytokines production and genes expression following administration of Chinese herbs in the human mesangial cells. Life Sciences, 64 (23); 2089-2099.
- Lytle, S.T. 2003. Adaptation And Acclimation Of Populations Of *Ludwigia Repens* To Growth In High- And Lower-CO₂ Springs. A Dissertation Presented To The Graduate School Of The University Of Florida In Partial Fulfillment Of The Requirements For The Degree Of Doctor Of Philosophy.
- Maharaj, K. and Brathwaite, R. A. I. 1997. Effect of herbicide treatments on the main rice (*Oryza sativa* L.) crop and its subsequent influence on the ratoon crop in Trinidad. Tropical Agriculture, 74 (3); 216-220.
- Mhlanga, L. and Mapaire, I. 2000. A floristic classification of Shoreline vegetation around Lake Kariba, Zimbabwe. Kirkia, 17(2); 153-169.
- Marques, M. D. and Gimenes, M. 1996. Control of environmental variables in a field study using a chronobiological protocol. Index medicus, 29 (1); 141-145.
- Mathew, J. and Jagadeeshkumar, T. N. 1999. Chemical weedling strategies with improved crop safety in direct seeded puddled rice. Oryza, 36 (4); 355-357.
- Mitchell, D. S. 1974. Aquatic Vegetation and Its Use and Control. UNESCO, Paris. 135 pp.
- Mooi, L. Y., Ali, A. M., Norhanom, A. B., Salleh, K. M., Murakami, A. and Koshimizu, K. 1999. Anti-tumor promoting activity of some Malaysian traditional vegetables (Ulam). Naturel product Sciences, 5 (1); 33-38.
- Moon, B. C., Park, S. T., Kim, S. C., Kwon, S. J., Mortimer, A. M. and Piggin, C. 1999. Weed emergence as effected by burying depth and water management. Korean Journal of Crop Science, 44 (1); 32-37.

- Morgan, W.G., Thomas, H. and Lewis, E.J. 1988. Cytogenetic studies of hybrids between *Fescuta gigantean* Vill. and *Lolium multiflorum* Lam., Plant Breeding 101, 335-343.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15; 473-497.
- Özgen, M. 2007. Bitki ıslahı ders notları. Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü, 270 s., Ankara
- Öztürk, M. 2002. Akvarum bitkisi *Ludwigia spp*'nin *in vitro* koşullarda çoğaltımına farklı oranlardaki büyüme düzenleyicilerin etkisi. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi, 46 s., Ankara.
- Patel, S. R., Nageshwar, L., Thakur, D. S. and Lal, N. 1998. Integrated weed management in direct seeded rice (*Oryza sativa* L.). Environment and Ecology, 16 (4); 852-854.
- Patterson, G. G. and Davis, B. A. 1991. Distribution of aquatic macrophytes in 15 lakes and streams in South Carolina. Water Resour. Invest. U. S. Geol. Surv. 66 pp.
- Peng, C.I., Schmidt, C.L., Hoch, P.C. and Raven, P.H. 2005. Systematics and evolution of *Ludwigia* Section *Dantia* (Onagraceae). Annals of the Missouri Botanical Garden 92 (3): 307-359.
- Pinheiro A.A, Pozzobon M.T., do Valle, C.B., Penteado, M.I.O. and Carneiro, P.V.T.C. 2000. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicines. Plant Cell Reports 19: 274–278.
- Poehlman, J.M. and Borthakur, D. 1968. Breeding Asian Field Crops. Oxford & IBH publishing Co. New Delhi, Bombay Calcutta.
- Polthanee, A., Ta, O. M., Panchapan, S., Lasirikul, M., Pramojchani, P., Yamazaki, K., Nakno, M. and Fukami, M. 1996. Effects of weed management on growth and

yield of rainfed, direct-seeded rice. Khon Kaen Agriculture Journal, 24 (2); 76-80.

Rauf, S., Khan I.A. and Khan F.A. 2006. Colchicine-Induced Tetraploidy and Changes in Allele Frequencies in Colchicine-Treated Populations of Diploids Assessed with RAPD Markers in *Gossypium arboreum*. L. Turk J Biol 30 93-100.

Raven, P.H. and Tai W. 1979. Observation of chromosomes in *Ludwigia* (ONAGRACEAE) Missouri Bot. Gard. 66: 862-879.

Reader, S. 2003. A technique for the examination of somatic chromosomes in the root-tips of cereals. Department of Crop Genetics. John Innes Centre UK, Protocols. <http://www.jic.ac.uk/staff/steve-reader/pdf/Root-tipping.pdf>

Rejmankova, E. 1992. Ecology of creeping macrophytes with special reference to *Ludwigia peploides* (H.B.K.) Raven. Aquat. Bot., 43(3); 283-299.

Ribeyre, F., Boudou, A. and Maury, B. R. 1990. Multicompartment ecotoxicological models for experimental studies on the accumulation and transfeer processes and the chenmical transformation of contaminants in water systems. Evolution of Concepts and Methods of Assessment of Pollution in Water and Sediments, Seminar, 16(4); 257-265.

Rubuluza, T., Nikolova, R.V., Smith, M.T. and Hannweg, K. 2007. *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicines. South African Journal of Botany V: 73, I: 2, P: 259-261

Sanchez, M. V., Aguero, R. and Rivera, C. 2001. Host Plants of *Aphis gossypii* (Aphididae), a virus vector for the cantoloupe *Cucumis melo* (Cucurbitaceae) in Costa Rica. Revista de Biologia Tropikal, 49 (1); 305-311.

Seçmen, Ö. ve Leblebici, E. 1997. Türkiye Sulak Alan Bitkileri ve Bitki Örtüsü. Ege Üniv. Fen Fak. Yay. No: 158, 404 s., Bornova, İzmir.

- Serag, M.S. and Khedr, A. H. A. 2001. Vegetation environment relationships along El-Salam Canal, Egypt. *Environmetrics*, 12 (3); 219-232.
- Sevimay, C.S. 1986. Diploid çokyıllık çavdardan (*Secale montanum* Guss.) kolkisin etkisi tetraploid çavdarın elde edilmesi. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 33 s., Ankara.
- Singh, R.J. 2003. Plant cytogenetics. Second Edition 003 by CRC Press LLC. 443 p., Florida.
- Subrahmanyam, N.C. and Kasha, K.J. 1975. Chromosome doubling of barley haploids by nitrous oxide and colchicine treatments. *Canadian Journal. Genet. Cytol.* 17:573-583.
- Subudhi, H. N. and Dixit, N. 1998. Weed flora of rice fields in Orissa. *Journal of Economic and Taxonomic Botany*, 22 (3); 737-739.
- Takamura, T. and Miyajima, I. 1996. Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. *Scientia Horticulturae*, 65; 305-3, 12.
- Tate, J.A., Soltis, D.E., and Soltis, P.S. 2005. Polyploidy in plants. In *The Evolution of the Genome* (edited by T.R. Gregory). Elsevier, San Diego, 371-426.
- Tepe, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., Yenice, N., Tıpırdamaz, R., 2002. *In vitro* kolhisin uygulaması ile poliploid nane (*Mentha longifolia* L.) bitkilerinin elde edilmesi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(2);63-69
- Thomas, C.G., Abraham, C. T. and Sreedevi, P. 1997. Weed flora and their relative dominance in semi-dry rice culture. *Journal of Tropical Agriculture*, 5; 51-53.
- Wang, Q., He, J. H., Li, M. S., Dai, Y. Y., Shi, D. and Ye, G. B. 2000. Weed species and their damage in rice fields in Zhejiang. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 12 (6); 317-324.
- Wang, Q., Feng, K. Q., Zhao, X. P., Wu, C. X. and Zhang, R. J. 1999. Emergence trend and number fluctuation of weeds in fields of wet direct seeded rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 13 (2); 104-108.

- Ward, D. B. 2001. New combination in the Florida flora. *Novon*, 11 (3); 360-365.
- Wogu, A. and Ugborogho, R.E. 2000. Seed morphology, germination and seedling characters in *Ludwigia species* (Onagraceae) in Nigeria as aids to identification. *Seed Science and Technology*, 28 (3); 657-697.
- Yen, S. and Myerscough, P.J. 1989. Co-existence of three species of amphibious plants in relation to spatial and temporal variation: Investigation of plant responses. *Aust. J. Ecol.*, 14 (3); 305-318
- Yetisir, H. and Sari, N. 2003. A new method for haploid muskmelon (*Cucumis melo L.*) dihaploidization, *Scientia Horticulturae* 98, 277–283.
- Zeiger, E. 1971. Cell kinetics, development of stomata and some effects of colchicine in barley. *Planta*. 99 (2): 89-111.

ÖZGEÇMİŞ

Adı- Soyadı : Ayla Zeynep YÜCEL

Doğum Tarihi : 02.09.1980

Doğum Yeri : İZMİR

Medeni Durumu : Bekar

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu Kurum ve Yılı

Lise : İzmir Karşıyaka Şemikler Lisesi

Lisans : Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Hayvansal
Üretim- Zootekni Anabilim Dalı (1999- 2004)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ziraat
Fakültesi Su Ürünleri Anabilim Dalı
(Şubat 2006- Ağustos 2008)

YAYINLAR

Ulusal Konferans ve Sempozyumlardaki Posterler

Açıkgöz, H. N., **Yücel AZ** ve Selçuk S. **2004**. Arılar ölüm zamanı tayinini nasıl etkiler? 2. Anadolu Adlibilimler Kongresi ,2004 Kayseri-Türkiye poster No: 14

Yücel AZ, Oguz İ. 2006.İmportant of genetic resources in stockbreeding. Hayvancılıkta genetik kaynakların önemi. 14th National Biotechnology Congress September 1-3, 2006 Eskişehir-Turkey [In Turkish].

Uluslararası Konferans ve Sempozyumlardaki Posterler

Konuklugil B., Sağlık Ç., **Yucel AZ**. **2006**. Aryltetralin lignans from *Linum Triflorum*. Chemistry, Pharmacology and Biosynthesis of Alkaloids April 25-29,2006 Antalya-Turkey

Ozturk M, Sumlu S, Khawar KM, **Yucel AZ**, Atar HH, Ozcan S. **2007**. Efficient tissue culture based propagation from leaf explants of water wisteria (*Hygrophila difformis* Vasetto). 5th International conference. Propagation of ornamental plants. 5-8 september 2007, Sofia Bulgaria- poster No.148