

Araştırma Makalesi

**Farklı Sıcaklık ve pH'ın *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne'nin Aksillar Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi**

Muhammet DOĞAN\*

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Karaman, Türkiye

\*Sorumlu yazar: mtdogan1@gmail.com

Geliş Tarihi: 07.05.2019

Düzeltilme Geliş Tarihi: 04.09.2019

Kabul Tarihi: 10.09.2019

**Özet**

Bitki doku kültürü çalışmalarında sıcaklık ve pH önemli faktörlerdir. Bu faktörlerin optimizasyonu çoklu bitki üretimi için önemlidir. Bu çalışmada, farklı sıcaklık (15-30°C) ve pH (5.5-6.6) koşullarında *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne'nin etkili ve hızlı üretimi için bir optimizasyon çalışması amaçlanmıştır. Sıcaklık çalışmalarında, ilk sürgün rejenerasyonları 25°C'de 12. günde gözlenmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyon frekansları (%100) 20 ve 25°C'de elde edilmiştir. Maksimum eksplant başına sürgün sayısı (23.38 adet) ve en uzun sürgünler (1.74 cm) 25°C'de elde edilmiştir. Farklı pH uygulamalarında, en yüksek sürgün rejenerasyon oranları (%100) pH 5.5 ve 6'da tespit edilmiştir. En fazla eksplant başına sürgün sayısı (20.44 adet) ve en uzun sürgünler (1.71 cm) pH 6'da kaydedilmiştir. Eksplantlar genellikle yüksek pH değerlerinde daha uzun sürgünler vermiştir. Kültür ortamında üretilen sürgünler köklendirildikten sonra akvaryum ortamına başarıyla alıştırılmıştır. Sonuç olarak, *R. rotundifolia*'nın *in vitro* üretimi için optimum değerler 25°C sıcaklık ve pH 6 olarak bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Doku kültürü, pH, sıcaklık, sürgün rejenerasyonu, sürgün ucu eksplantı.

**The Effect of Different Temperature and pH on Axillary Shoot Regeneration of *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne**

**Abstract**

Temperature and pH are important factors in plant tissue culture studies. The optimization of these factors is important for multiple production of plants. In this study, an optimization study for the efficient and rapid production of *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne in different temperature (15-30°C) and pH (5.5-6.6) conditions was aimed. In temperature studies, the first shoot regeneration was observed at 25°C on the 12th day. The highest shoot regeneration frequencies (100%) were obtained at 20 and 25°C. The maximum number of shoots per explant (23.38) and the longest shoots (1.74 cm) were obtained at 25 °C. In different pH applications, the highest shoot regeneration rate (100%) was determined at pH 5.5 and 6. The maximum number of shoots per explant (20.44) and the longest shoot (1.71 cm) were recorded at pH 6. The explants usually gave longer shoots at higher pH values. After the shoots produced in the culture medium were rooted, they were successfully used in the aquarium environment. As a result, the optimum values for *in vitro* production of *R. rotundifolia* were found to be 25°C temperature and pH 6.0.

**Key words:** Tissue culture, pH, temperature, shoot regeneration, shoot tip explant.

**Giriş**

*Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne Lythraceae familyasına ait (Zhang ve ark., 2011) tıbbi bitkiler arasında yer almaktadır. *R. rotundifolia*, Çin'in Yunnan eyaletinde, romatizma ve eklem ağrısının tedavisinde kullanılmaktadır (Tan

ve ark., 2009). *R. rotundifolia*'da bulunan aktif bileşiklerin, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal ve süperoksit anyon üretimi yoluyla antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve kaempferol ve kuersetin gibi bileşiklerin anti-HBV aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2011).

Bitki doku kültürü, aseptik ortamda ve kontrollü ışık, sıcaklık ve nem koşulları altında sentetik bir besin ortamı kullanılarak bitki hücre, doku ve organlarını kültüre alma tekniğidir. Bitki doku kültürünün temel bir bilim olarak gelişimi, bitki hormonlarının keşfi ve karakterizasyonu ile yakından ilişkilidir. Bitki hücrelerini ve dokularını büyütme ve gelişimlerini kontrol etme yeteneği sayesinde doku kültürü tarım ve bahçecilik gibi önemli alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca, bu teknik bitki genetik mühendisliği için ön koşuldur (Rai ve ark., 2011; Dagla, 2012; Hussain ve ark., 2012). Doku kültürü tekniklerinin geliştirilmesi temelde hücrelerinin totipotensitesi özelliğine dayanır (García-González ve ark., 2010). Hücrenin totipotensi özelliği, tüm canlı hücrelerin genetik olarak özdeş hücreyi meydana getirme ve ardından hücresel bölünme ve farklılaşma ile doku, organ, sistem ve tam bir birey oluşturabilmesidir (Takebe ve ark., 1971; García-González ve ark., 2010).

Bir bitkinin hücre veya doku bölümünden gelişimini tetikleyen mekanizmalar, bitki türüne, doku çeşidine ve yaşına ve çevresel koşullara göre değişen faktörlere bağlıdır (Razdan, 2003). Bu nedenle, bu çalışmada abiyotik faktörler olan sıcaklık ve pH'ın doku kültürü koşullarında bitki üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Farklı sıcaklık ve pH koşullarında *R. rotundifolia*'nın *in vitro* etkili ve hızlı üretimi için bir optimizasyon çalışması kurgulanmıştır. Daha önce bu bitkinin *in vitro* üretimi üzerine pH ve sıcaklık etkilerinin araştırıldığı bir çalışma tespit edilememiştir. Bu rapordaki bilgilerin ve tartışmaların tıbbi bitki *R. rotundifolia*'nın doku kültürü ile büyük ölçekli üretilmesinde yardımcı olabileceğini umuyorum. Ayrıca, bu bitkinin büyük ölçekli üretilmesi ile değerli biyoaktif bileşikler yüksek seviyelerde elde edilebilir ve böylece kimya sanayi ve ilaç sanayi gibi alanlarda kullanılabilir (Ho ve ark., 2012).

## Materyal ve Yöntem

### Yüzey sterilizasyonu

Bitki materyali olan *R. rotundifolia*, Türkiye'nin Konya ilinde yer alan akvaryumculardan temin edilmiş ve tanımlanması Haining ve ark. (2007)'ye göre teyit edilmiştir. *R. rotundifolia*'nın yüzey sterilizasyonu, 10 dakika boyunca %20 hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile muamele edilerek sağlanmıştır. 5 dk süre ile 3 kez durulamadan sonra, sürgün ucu eksplantları izole edilmiştir. Eksplantlar daha sonra hormonsuz Murashige ve Skoog (MS) temel besin ortamına aktarılmıştır (Murashige ve Skoog, 1962). Deneylerde, bu kültür ortamında geliştirilen 4 haftalık sürgün ucu eksplantları kullanılmıştır.

### Sıcaklık denemesi

Doku kültürü için %3 sukroz, %0.65 agar ve 0.50 mg L<sup>-1</sup> Zeatin (ZEA) içeren MS besin ortamları oluşturulmuştur. Kültürlerin pH'ı otoklavlanmadan önce 1N NaOH ve 1N HCl ile 5.7 ± 0.1'e getirilmiştir. Ardından ortamlar 120°C'de 20 dakika boyunca 118 kPa atmosferik basınçta otoklava alınmıştır. Bütün kültürler, beyaz floresan lambalar altında 16 saat ışık fotoperiyodunda (5000 lüks), 24±1°C'de inkübe edilmiştir. Sıcaklık uygulamaları için *R. rotundifolia*'nın sürgün ucu eksplantları izole edilerek, kültür ortamı içerisine yerleştirilmiştir. Kültürler iklim kabininde 15, 20, 25 ve 30 °C de altı hafta süresince bekletilmiştir. Ardından deneme sonlandırılmış ve veriler alınmıştır.

### pH denemesi

pH uygulamaları için MS besin ortamlarına %3 sukroz, %0.65 agar ve 0.50 mg L<sup>-1</sup> ZEA eklenmiştir. Kültür ortamlarının pH'sı 1N NaOH ve 1N HCl ile 5, 5.5, 6 ve 6.5 olarak ayarlanmıştır. Ardından ortamlar 120°C'de 20 dakika boyunca 118 kPa atmosferik basınçta otoklava alınmıştır. *R. rotundifolia*'nın sürgün ucu eksplantları izole edilerek bu farklı pH'lara sahip MS besin ortamlarına transfer edilmiştir. Bütün kültürler, beyaz floresan lambalar altında 16 saat ışık fotoperiyodunda (5000 lüks), 24±1°C'de inkübe edilmiştir. Ardından deneme sonlandırılmış ve veriler alınmıştır.

### *In vitro* köklendirme ve alıştırma

*In vitro* köklendirme çalışması için rejenere sürgünlerden yaklaşık 2.5 cm uzunluğunda kesilen üst gövde parçaları, 4 hafta boyunca 0.25 mg L<sup>-1</sup> İndol-3-bütirik asit (IBA) ile takviye edilmiş MS ortamındaki Magenta GA7® kaplarında kültüre alınmıştır (beyaz floresan lambalar altında 16 saat ışık fotoperiyodunda (5000 lüks). Köklü sürgünler daha sonra dış koşullara alışmak için akvaryum ortamına aktarılmıştır. Akvaryum zeminine yüksekliği 4-5 cm olan nehir kumu yerleştirilmiştir. Akvaryum koşulları 24°C sıcaklıkta ve 16 saat ışık (beyaz floresan lambalar-5000 lüks) 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır.

### İstatistiksel analizler

Denemelerde 6 tekrar halinde kurulmuştur. Çalışmadan elde edilen veriler, SPSS 21 programı ile analiz edilmiştir. Post Hoc testleri için Duncan testleri uygulanmıştır. İstatistiksel analiz yapılmadan önce yüzde değerler arksin transformasyonuna tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran, 1997).

### Bulgular ve Tartışma

*In vitro* mikroçoğaltım çalışmaları sıcaklık ve pH bağımlıdır. 6.3 ile 5.7 arasında değişen hafif

asidik pH değerleri ve 20 ile 25°C arasındaki sıcaklık değerleri özellikle çoğu türün *in vitro* gelişimi ve kök oluşumu için uygun gibi görünmektedir (Ebrahim ve Ibrahim, 2000; Emsen ve Dogan, 2018; Benahmed ve ark., 2018; Dogan, 2019). Fakat, pH ve sıcaklık için bitkilerin istedikleri optimum değerler türe göre değişim gösterebilmektedir. Bu çalışmada, *R. rotundifolia*'nın sürgün ucu eksplantları farklı sıcaklık ve pH uygulamalarına tabi tutulmuş ve *in vitro* çoğaltım için optimum sıcaklık ve pH değerleri belirlenmiştir.

**Çizelge 1.** Farklı sıcaklık etkisinin *R. rotundifolia*'nın sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

Varyasyon kaynakları	Serbestlik derecesi	Sürgün rejenerasyon yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		Kareler ortalaması	F değeri	Kareler Ortalaması	F değeri	Kareler ortalaması	F değeri
<b>Sıcaklık</b>							
Ortam	3	393.68	4.25*	42.51	2.99 <sup>ös</sup>	0.22	30.62**
Hata	8	92.63	-	14.22	-	0.01	-
Genel toplam	11	-	-	-	-	-	-

\*\*  $p < 0.01$  düzeyinde önemli; \*  $p < 0.05$  düzeyinde önemli; <sup>ös</sup> önemsiz.

Varyans analizinde gözlemlendiği gibi (Çizelge 1), sıcaklık uygulamalarında eksplant başına sürgün sayısı önemsiz bulunurken, sürgün rejenerasyon yüzdesi  $p < 0.05$  seviyesinde ve sürgün uzunluğu  $p < 0.01$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır (Şekil 1).

Farklı sıcaklık uygulamaları sonucu sürgün rejenerasyon yüzdeleri %77.77-100 arasında sıralanmıştır (Şekil 1A). En yüksek sürgün rejenerasyon frekansları (%100) 20 ve 25 °C'de elde edilmiştir. En düşük sürgün rejenerasyon frekansı ise (%77.77) 15°C'de belirlenmiştir. Düşük sıcaklık eksplantların sürgün rejenerasyon değerlerini düşürmüştür.

Eksplant başına sürgün sayısı farklı sıcaklık uygulamaları ile istatistiksel olarak  $p < 0.05$  seviyesinde anlamlı bulunmuş olup, 14.36-23.38 adet arasında değişmiştir (Şekil 1B). En yüksek eksplant başına sürgün sayısı 23.38 adet ile 25°C sıcaklıkta (Şekil 2), arından ise 20.27 adet ile 20°C sıcaklıkta elde edilmiştir. Buna karşın, en düşük sürgün sayısı 14.36 adet ile 15°C sıcaklıkta tespit edilmiştir.

Genel olarak artan sıcaklık uygulaması sürgünlerin uzunlukları üzerinde olumlu etki göstermiştir. Rejenere sürgünlerin uzunlukları 1.15-

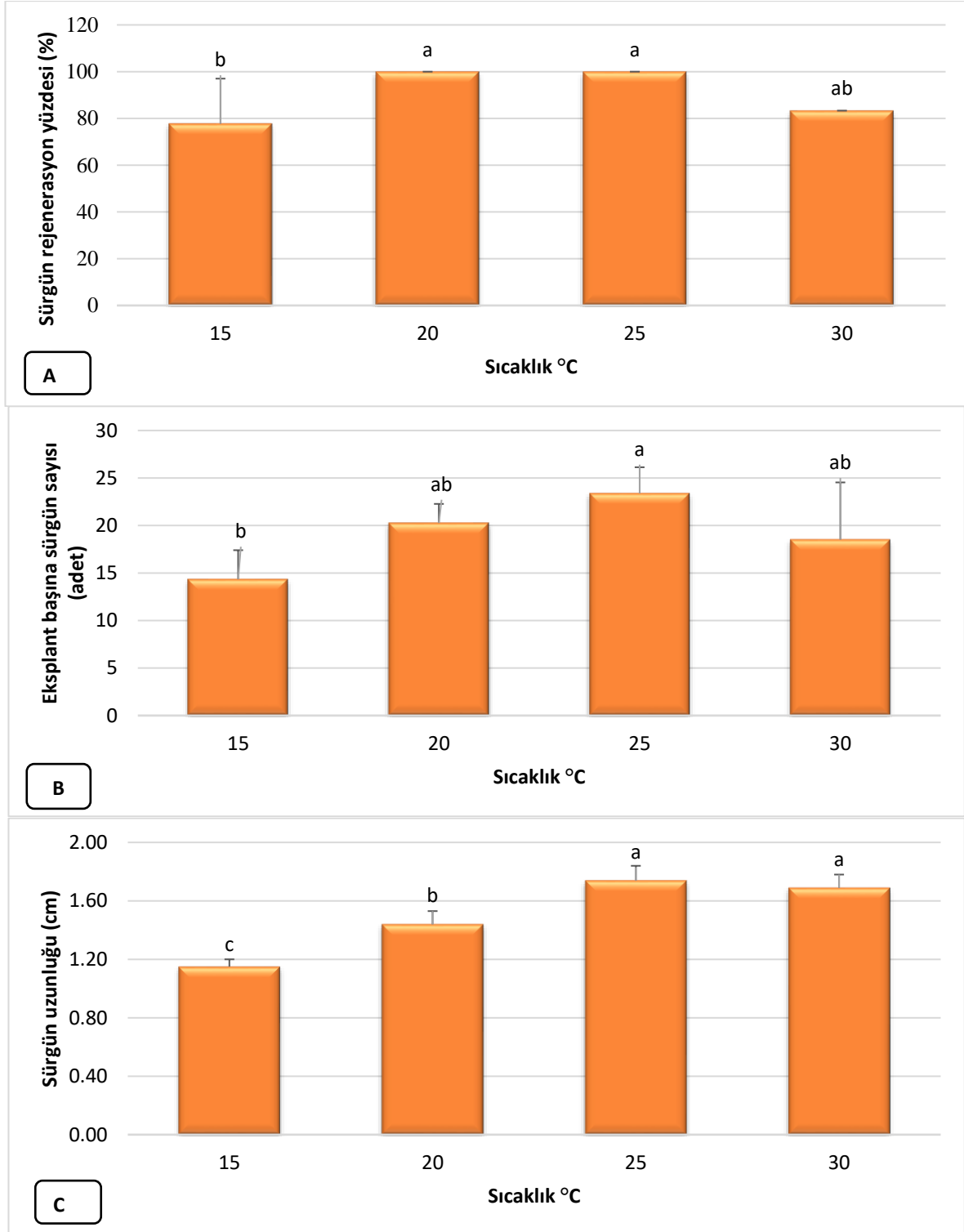
#### Farklı sıcaklık denemesi

Farklı sıcaklıklarda kültür alınan *R. rotundifolia*'nın ilk sürgün rejenerasyonları 25°C'de 12. günde belirlenirken, 15°C'de ise 18. günde belirlenmiştir. Dört hafta sonunda çoklu sürgünler kültür ortamında belirgin şekilde gözlenmiştir. Altı hafta sonunda deneme sonlandırılmış ve kültür ortamında gelişen ve büyüyen sürgünlerin verileri alınarak varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 1).

1.74 cm arasında sıralanmıştır (Şekil 1C). Kültür ortamında en uzun sürgünler 1.74 cm ile 25°C sıcaklıkta elde edilmiştir. En kısa sürgünler ise en düşük sıcaklık uygulamasında 1.15 cm olarak ölçülmüştür.

Farklı sıcaklık uygulamaları altında eksplantların rejenerasyon kapasiteleri değişmiştir. Sıcaklık, bitki büyümesini, gelişimini etkileyen ve ayrıca bitkilerde morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri tetikleyen başlıca çevresel faktörlerdir (Waraich ve ark., 2012). Özellikle sıcaklık internod uzunluğu, bitki boyu, yaprak yönü, sürgün yönü, klorofil içeriği, yan dallanma ve yaprak sapı ve bitkilerde çiçek sapı uzamasını etkiler (Myser ve Moe, 1995).

Mevcut çalışmada 25°C'den daha yüksek sıcaklıklara geçişlerde sürgün sayıları azalış göstermiştir. Bunun sebebi yüksek sıcaklık etkisi ile birlikte reaktif oksijen türlerinin (ROS) hızlı üretimi ve birikmesinden kaynaklanabilir (Almeselmani ve ark., 2006; Xu ve ark., 2008). Bu yüksek ROS seviyeleri tüm hücrel bileşikler için zararlıdır ve hücrel metabolik süreçleri olumsuz yönde etkiler (Breusegem ve ark., 2001). Ayrıca, yüksek sıcaklıkların bitkilerde protein denatürasyonu, protein sentezinin inhibisyonu ve membran lipidlerinin akışkanlığının artması gibi doğrudan zararları da bulunur (Waraich ve ark., 2012).



**Şekil 1.** Farklı sıcaklık uygulamalarının *R. rotundifolia*'nın sürgün ucu sürgün rejenerasyonuna etkisi. Farklı sıcaklıklarda *R. rotundifolia*'nın sürgün ucu eksplantlarının sürgün rejenerasyon yüzdesi (A), eksplant başına sürgün sayısı (B) ve sürgün uzunluğu (C) verileri. Tüm değerler altı tekrarın ortalaması almaya gelir (n = 6). Dikey çubuklar, standart hataları gösterir. Farklı harfler ile gösterilen değerler, istatistiksel olarak farklıdır ( $p < 0.05$ ; Duncan).



Şekil 2. 25°C sıcaklık uygulaması altında rejenere *R. rotundifolia* sürgünleri.

#### Farklı pH denemesi

Farklı pH seviyelerinin *R. rotundifolia*'nın *in vitro* üretimi üzerine etkileri Şekil 3'de gösterilmiştir. İlk sürgün çıkışları genel olarak 11. günde gözlenmeye başlanmıştır. Dört hafta

sonunda çoklu sürgünler kültür ortamında belirgin şekilde izlenebilmiştir. Altı hafta sonunda deneme sonlandırılmış ve veriler alınarak varyans analizi uygulanmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Farklı pH etkisinin *R. rotundifolia*'nın sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

Varyasyon kaynakları	Serbestlik derecesi	Sürgün rejenerasyon yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		Kareler ortalaması	F değeri pH	Kareler ortalaması	F değeri	Kareler ortalaması	F değeri
Ortam	3	185.26	2.00 <sup>ös</sup>	42.89	4.03*	0.05	9.60**
Hata	8	92.63	-	10.64	-	0.01	-
Genel toplam	11	-	-	-	-	-	-

\*\*  $p < 0.01$  düzeyinde önemli; \*  $p < 0.05$  düzeyinde önemli; <sup>ös</sup> önemsiz

pH etkisi ile ortamlar arasında eksplant başına sürgün sayısı bakımından  $p < 0.05$  seviyesinde, sürgün uzunluğu bakımından  $p < 0.01$  seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilirken, sürgün rejenerasyon yüzdesi önemsiz bulunmuştur (Çizelge 2). Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır (Şekil 3).

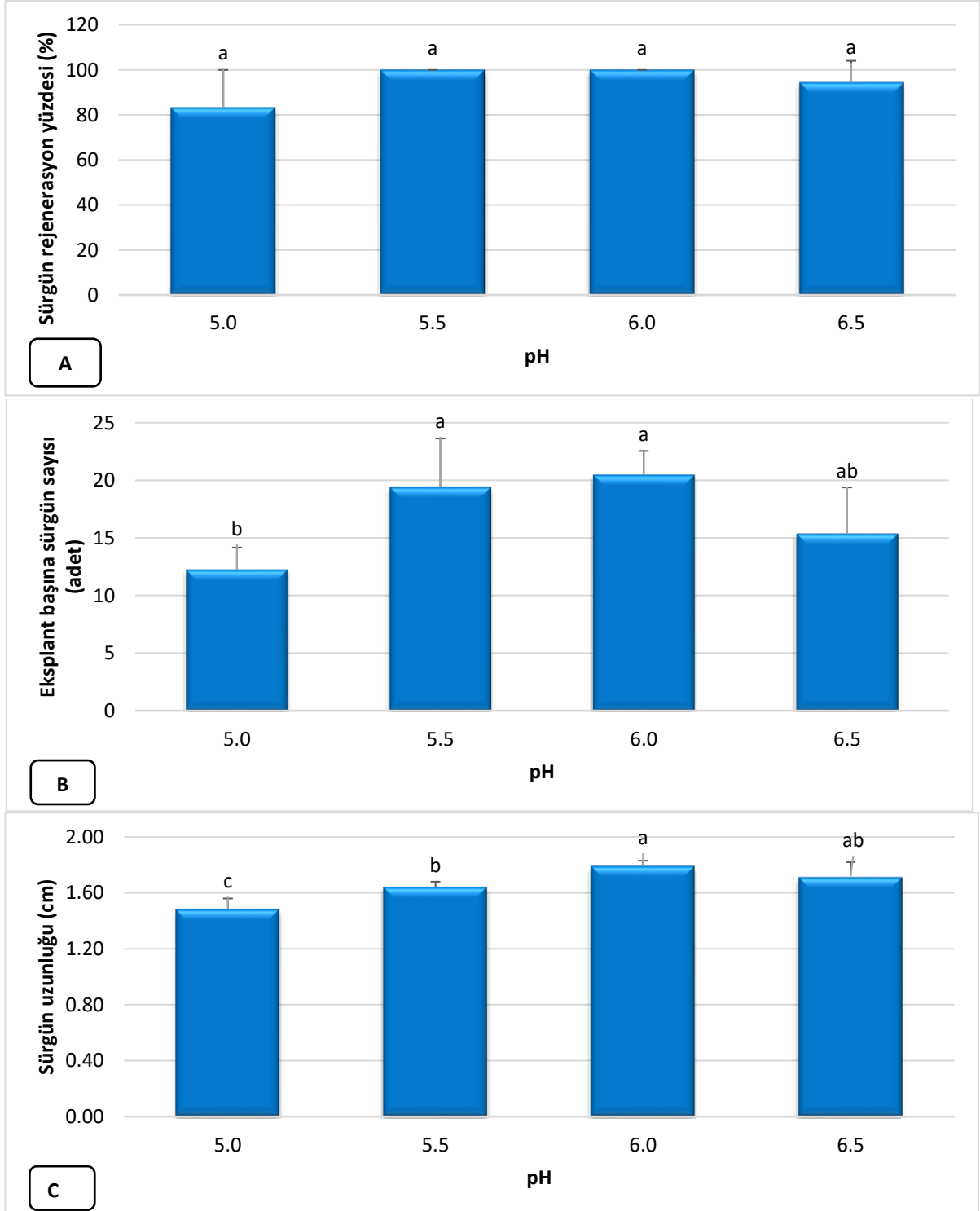
Kültür ortamının pH'sı sürgün rejenerasyon yüzdelerini etkilemiş ve %83.33-100 arasında sıralanmıştır (Şekil 3A). En yüksek sürgün rejenerasyon oranları (%100) pH 5.5 ve 6'da tespit

edilmiştir. En düşük rejenerasyon yüzdesi (%83.33) pH 5'te belirlenmiştir.

Sürgün sayısı bakımından pH önemli bir faktör olarak bulunmuştur. Kültür ortamında sürgün rejenerasyon sayıları pH etkisi ile değişmiştir (Şekil 3B). En fazla eksplant başına sürgün sayısı (20.44 adet) pH 6'da (Şekil 4), arından ise pH 5.5'te tespit edilmiştir (19.38). En düşük ortalama sürgün sayısı pH 12.33 adet ile pH 5'te kaydedilmiştir. pH 5.5, 6 ve 6.5 değerlerinde elde edilen sürgün sayıları kendi aralarında istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p > 0.05$ ).

pH değişimleri rejenere sürgün uzunluklarını önemli ölçüde değiştirmiştir ( $p<0.05$ ) (Şekil 3C). Kültür ortamlarındaki sürgün uzunlukları 1.48-1.71 cm arasında kaydedilmiştir. En uzun sürgünler pH'ın

6 olduğu kültür ortamında elde edilirken, en kısa sürgünler pH'ın 5 olduğu kültür ortamında tespit edilmiştir. Eksplantlar genellikle yüksek pH değerlerinde daha uzun sürgünler vermiştir.



**Şekil 3.** Farklı pH uygulamalarının *R. rotundifolia*'nin sürgün ucu sürgün rejenerasyonuna etkisi. Farklı pH'larda *R. rotundifolia*'nin sürgün ucu eksplantlarının sürgün rejenerasyon yüzdesi (A), eksplant başına sürgün sayısı (B) ve sürgün uzunluğu (C) verileri. Tüm değerler altı tekrarın ortalaması almaya gelir ( $n = 6$ ). Dikey çubuklar, standart hataları gösterir. Farklı harfler ile gösterilen değerler, istatistiksel olarak farklıdır ( $p<0.05$ ; Duncan).





Şekil 4. pH 6 uygulaması altında rejenere *R. rotundifolia* sürgünleri.

Sonuçlar incelendiğinde pH etkisi ile eksplantlardan çıkan sürgün rejenerasyon yüzdesi, sürgün sayısı ve uzunluğu önemli derecede değişmiştir. Bunun temel sebebi, doku ve organ kültürlerinde ortamın pH seviyesinin bitkinin büyüme, gelişme ve sekonder metabolit seviyesi etkilemesinden kaynaklanabilir (Williams ve ark., 1990). Çünkü bitki hücreleri ve dokuları kültür ortamında büyüme ve gelişme için optimum bir hidrojen iyon konsantrasyonu gerektirir. pH, bitkilerin besin alımını ve enzimatik ve hormonal aktivitelerini etkiler (Bhatia ve Ashwath, 2005). Optimum pH seviyesi, hücre bölünmesini ve sürgünlerin büyümesini etkileyen sitoplazmik aktiviteyi düzenler (Brown ve ark., 1979). pH, kök ve sürgün indüksiyonu gibi farklı morfogenetik fazlara göre de değişiklik gösterebilir (Ostrolucka ve ark., 2004). Ayrıca, hüresel büyüme, gen ekspresyonu ve transkripsiyonu da pH sayesinde etkilenebilir (Lager ve ark., 2010).

Farklı pH'larda sürgünlerin rejenerasyon kapasitelerindeki değişim, kültür ortamının katılaşma durumu ile de ilişkili olabilir. Çünkü pH, katılaşma maddesinin (agar) ortamdaki durumunu da etkiler. 6'dan yüksek bir pH çok sert bir ortam oluştururken ve 5'ten düşük bir pH yeterince sert ortam oluşturmaz (Bhatia ve Ashwath, 2005). Bu da eksplantların sürgün rejenerasyon kapasitesi üzerinde farklı etkiler göstermesine neden olabilir.

Çoklu üretim amaçlanan bitkilerde pH'ya bağlı değişimler daha önce de bildirilmiştir. Bademde maksimum rejenerasyon hızı, orta pH 5.9'da kaydedilmiştir (Tabachnik ve Kester, 1977).

Oksinsiz bir ortamda pH 5.7'de zigotik havuç embriyolarından somatik embriyolar geliştirilmiştir (Smith ve Krikorlan, 1990). Yine kültürün etkin üretimi için optimum pH 5.5 ile 6.0 arasında değiştiğini bildirmiştir (Jalil ve ark., 2015). Ortam pH'nın daha da artması ise  $\text{NO}_3^-$  ve mikro besinlerin zayıf mevcudiyeti nedeniyle büyümeyi engelleyebilir (Owens ve ark., 2005).

MS besin ortamında pH ve sıcaklık uygulamaları altında üretilen bitkiler 2.5 cm uzunluğunda kesilerek  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$  IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Ardından akvaryum ortamına başarıyla alıştırılmıştır.

#### Sonuç ve Öneriler

Bu çalışma, farklı pH ve sıcaklık uygulamaları altında *R. rotundifolia*'nın sürgün rejenerasyon kapasitelerindeki değişimleri ortaya koymaktadır. Ayrıca bu bitkinin üretimi için gerekli pH ve sıcaklık değerlerinin optimizasyonunu sunmaktadır. Yürütülen çalışma sonucunda, üretim için en iyi sıcaklık  $25^\circ\text{C}$  ve pH 6.0 olarak tespit edilmiştir. Doku kültürü ortamında bitkilerin çoklu üretimi için çeşitli optimizasyon çalışmaları yürütülmektedir. Bu çalışmalar genellikle, farklı eksplant ve bitki büyüme düzenleyicileri üzerine yürütülmektedir. Mevcut bu çalışma, bitki gelişimini doğrudan etkileyen sıcaklık ve pH faktörleri üzerine odaklanmıştır. Böylece *in vitro* üretim için bitkilerin istedikleri pH ve sıcaklık değerleri için ön fikir sunabilir. Ayrıca *R. rotundifolia*'nın çoklu üretimi için yardımcı olabilir.

**Kaynaklar**

- Almeselmani, M., Deshmukh, P.S., Sairam, R.K., Kushwaha, S.R., Singh, T.P. 2006. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Science*, 171: 382-388.
- Benahmed, A., Harfi, B., Benbelkacem, I., Daas, A., Laouer, H., Belkhir, A. 2018. *In vitro* propagated *Mentha rotundifolia* (L.) Huds and antioxidant activity of its essential oil. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 31(4): 204-208.
- Bhatia, P., Ashwath, N. 2005. Effect of medium pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of Tomato. *Biotechnology*, 4: 7-10.
- Breusegem, F.V.E., Vranova, J.F., Dat, D.I. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction, *Plant Science*, 161: 405-414.
- Brown, D.C.W., Leung, D.W.M., Thorpe, T.A. 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiologia Plantarum*, 46: 36-41.
- Dagla, H.R. 2012. Plant tissue culture. *Resonance*, 17(8): 759-767.
- Dogan, M. 2019. Multiple shoot regeneration via indirect organogenesis from shoot tip and nodal meristem explants of *Ceratophyllum demersum* L. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 29: 568-577.
- Ebrahim, M. K., Ibrahim, I. A. 2000. Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana. *Scientia Horticulturae*, 86(3): 211-221.
- Emsen, B., Dogan, M. 2018. Evaluation of antioxidant activity of *in vitro* propagated medicinal *Ceratophyllum demersum* L. extracts. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 17: 23-33.
- García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B., Caligari, P. 2010. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria*, 37(3): 5-30.
- Haining, Q., Graham, S., Gilbert, M.G. *Lythraceae*. In: Wu, Z. Y., P. H. Raven, D.Y. Hong, eds. 2007. *Flora of China*. Vol. 13 (*Clusiaceae* through *Araliaceae*). Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Ho, Y.L., Huang, S.S., Deng, J.S., Lin, Y.H., Chang, Y.S., Huang, G.J. 2012. *In vitro* antioxidant properties and total phenolic contents of wetland medicinal plants in Taiwan. *Botanical Studies*, 53(1): 55-66.
- Hussain, A., Qarshi, I.A., Nazir, H., Ullah, I. 2012. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In *Recent Advances in Plant In Vitro Culture*. IntechOpen.
- Jalil, M., Annuar, M.S.M., Tan, B.C., Khalid, N. 2015. Effects of Selected Physicochemical Parameters on Zerumbone Production of *Zingiber zerumbet* Smith Cell Suspension Culture. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2015.
- Lager, I.D.A., Andreasson, O., Dunbar, T.L., Andreasson, E., Escobar, M.A., Rasmusson, A.G. 2010. Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. *Plant, Cell and Environment*, 33(9): 1513-1528.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plantarum*, 15: 473-497.
- Myster, J., Moe, R. 1995. Effect of diurnal temperature alternations on plant morphology in some greenhouse crops-a mini review. *Scientia Horticulturae*, 62(4): 205-215.
- Ostrolucka, M.G., Libiakova, G., Ondruskova, E., Gajdosova A., 2004. *In vitro* propagation of *Vaccinium species*. *Acta Universitatis Latviensis*, 670: 7-15.
- Owens, P.R., Wilding, L.P., Lee, L.M., Herbert, B.E. 2005. Evaluation of platinum electrodes and three electrode potential standards to determine electrode quality. *Soil Science Society of America Journal*, 69(5): 1541-1550.
- Rai, M.K., Shekhawat, N.S., Harish, Gupta, A.K., Phulwaria, M., Ram K., Jaiswal U. 2011. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 106: 179.
- Razdan, M.K. 2003. Introduction to plant tissue culture. Science Publishers.
- Smith, D.L., Krikorlan, A.D. 1990. Somatic pre-embryo production from excised wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium. Evaluation of the effects of pH ethylene activated charcoal. *Plant Cell Reports*, 9: 34-37.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G. 1997. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Tabachnik, L., Kester, D.E. 1977. Shoot culture for almond and almond peach hybrid clones *in vitro*. *Horticultural Science*, 12: 545-547.
- Takebe, I., Labib, C., Melchers, G. 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, 58: 318-320.



- Tan, Q.G., Cai, X.H., Feng, T., Luo, X.D. 2009. Megastigmane-type compounds from *Rotala rotundifolia*. Chinese Journal of Natural Medicines, 7: 187-189.
- Waraich, E.A., Ahmad, R., Halim, A., Aziz, T. 2012. Alleviation of temperature stress by nutrient management in crop plants: a review. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 12(2): 221-244.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelk, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535.
- Xu, P.L., Guo, Y.K., Bai, J.G., Shang, L., Wang, X.J. 2008. Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. Physiologia Plantarum, 132: 467-478.
- Zhang, L.J., Yeh, S.F., Yu, Y.T., Kuo, L.M.Y., Kuo, Y.H. 2011. Antioxidative flavonol glucuronides and AntiHBsAg flavonol from *Rotala rotundifolia*. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 1: 57-63.