

Sucul Bitki *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.'nin Yaprak Eksplantlarından Çoklu Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Zeatin Ön Uygulamasının Etkisi

Muhammet DOĞAN*

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

*: <https://orcid.org/0000-0003-3138-5903>

Received date: 24.04.2019

Accepted date: 20.05.2019

Atf yapmak için: Dogan, M. (2019). Sucul Bitki *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.'nin Yaprak Eksplantlarından Çoklu Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Zeatin Ön Uygulamasının Etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 4(2), 161-165.

How to cite: Dogan, M. (2019). Effect of Pre-treatment of Zeatin on Multiple Shoot Regeneration from Leaf Explants of Aquatic Plant *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 4(2), 161-165.

Öz: *Bacopa monnieri* (L.) Wettst su ortamının iyileştirilmesinde ve geleneksel tıp sisteminde önemli bir bitkidir. Bu çalışmada, *B. monnieri*'nin doku kültürü teknikleri ile üretimi hedeflenmiştir. *B. monnieri*'nin yaprak eksplantları farklı dozlarda Zeatin (ZEA)'li solüsyonlarda (0.5-8.0 mg/L) bir saat bekletilmiş ve ardından bitki büyüme düzenleyici içermeyen kültür ortamına aktarılmıştır. Yaprak eksplantlarından ilk sürgün çıkışları 16. günde 4 mg/L ZEA ön uygulamasında gözlenmiştir. Sürgün rejenerasyon frekansı % 16.66-88.89 arasında sıralanmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyon frekansları 4 ve 8 mg/L ZEA ön uygulamasında elde edilmiştir. Genel olarak ZEA konsantrasyonu arttıkça sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu da artmıştır. Eksplant başına maksimum sürgün sayısı (10.31 sürgün/eksplant) 4 mg/L ZEA ön uygulamasında, en uzun sürgünler ise (2.02 cm) 8 mg/L ZEA ön uygulamasında tespit edilmiştir. Rejenere sürgünler 0.25 mg/L indol-3-butirik asit (IBA) içeren kültür ortamında köklendirildikten sonra dış koşullara başarıyla alıştırmıştır. Sonuç olarak, ZEA ön uygulamasının *B. monnieri*'nin *in vitro* üretimindeki etkinliği kaydedilmiştir.

Anahtar sözcükler: Sucul bitki, doku kültürü, sürgün rejenerasyonu, yaprak eksplantı.

Effect of Pre-treatment of Zeatin on Multiple Shoot Regeneration from Leaf Explants of Aquatic Plant *Bacopa monnieri* (L.) Wettst

Abstract: *Bacopa monnieri* (L.) Wettst is an important plant in the remediation of the aquatic environment and in the traditional medicine system. In this study, the propagation of *B. monnieri* by tissue culture techniques was aimed. Leaf explants of *B. monnieri* were kept in different doses of Zeatin (ZEA) solutions (0.5-8.0 mg/L) for one hour and then transferred to the culture medium without plant growth regulator. The first shoot exits from the leaf explants were observed at 16 days with 4 mg/L ZEA pre-treatment. The frequency of shoot regeneration was between 16.66-88.89 %. The highest shoot regeneration frequencies were obtained at 4 and 8 mg/L ZEA pre-treatment. In general, the number of shoots and shoot length increased as the ZEA concentrations increased. The maximum number of shoots per explant (10.31 shoots/explant) was determined in the 4 mg/L ZEA pre-treatment, and the longest shoot (2.02 cm) was detected in the 8 mg/L ZEA pre-treatment. The regenerated shoots were successfully acclimatized to the external conditions after rooting in culture medium containing 0.25 mg/L of indole-3-butyric acid (IBA). In conclusion, the efficacy of the ZEA pre-treatment for *in vitro* propagation of *B. monnieri* was recorded.

Keywords: Aquatic plant, tissue culture, shoot regeneration, leaf explant.

GİRİŞ

Sucul bitkiler su ortamının doğal elemanlarıdır. Diğer su organizmaları için oksijen ve organik madde üretmelerinin yanında korunma, beslenme ve üreme ortamı sağlarlar (Cirik vd., 2011). Bazı su bitkileri ağır metal ve diğer kirlilik etmenlerini uzaklaştırabilme özelliklerinden dolayı su ortamının iyileştirilmesine yardımcı olurlar (Rai, 2009; Singh vd., 2012).

Bitki hücre ve doku kültürü uygulamaları, aseptik şartlarda besleyici bir kültür ortamında bitki hücre veya dokularından yeni bitki veya bitkisel ürünler elde etmeye yardımcı olmaktadır. Doku kültürü teknikleri, hastaliksız bitki üretimi, nadir bitki genotiplerinin hızlı çoğaltılması, bitki gen aktarımı ve ticari değeri olan bitkisel sekonder metabolitlerin üretimi gibi bitki odaklı çalışmalarda önemli bir araç haline gelmiştir (Dias vd., 2016; Altpeter vd., 2016).

Genetik transformasyon ve büyük ölçekli üretim için verimli bir bitki rejenerasyon protokolü zorunludur. *İn vitro* bitki kültürünün başarısı, genotip, donör bitkilerin fizyolojik durumları, eksplant tipleri, yüzey dezenfeksiyon yöntemleri, kültür ortamı, bitki büyüme düzenleyicileri, kültür kaplarının büyüklüğü, ışık yoğunluğu ve sıcaklık gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Sivanesan ve Park, 2015). Kültür ortamının bileşimi, eksplantların morfojenetik potansiyelini güçlü bir şekilde etkiler. Besin ortamı genellikle makro ve mikro besinler, amino asitler, organik takviyeler, vitaminler, karbon kaynakları, bitki büyüme düzenleyicileri ve katılaştırıcı maddelerden oluşur. Kültür ortamındaki mineral elementlerin optimizasyonu, eksplantların büyümesini ve morfogenezini artırır (Kim vd., 2017). Bu nedenle, sitoloji, embriyogenez, morfogenez, patoloji, germplazm, genetik manipülasyon, büyük ölçekli klonal çoğaltım ve patojen içermeyen bitkilerin üretimi gibi bitki biyolojisinin hem temel hem de uygulamalı alanlarında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Kim vd., 2017). Bu teknik ile üretilen bitkilere *Ceratophyllum demersum* L. (Emsen ve Dogan, 2018; Dogan, 2019), *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. (Dogan, 2018), *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze (Dogan, 2019), *Nymphoides indica* (Jenks vd., 2000), *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne (Dogan, 2019) *Cryptocoryne wendtii* ve *Cryptocoryne beckettii* (Stanly vd., 2011) örnek verilebilir.

Yürütülen çalışmada bitki materyali olarak *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. kullanılmıştır. Bu bitki, sulak alanlarda, bataklıklarda ve nemli yerlerde yetişebilir (Sharma vd., 2010). *B. monnieri* ağır metallerin su ortamında uzaklaştırılmasında yaygın kullanılan önemli bir bitkidir (Hussain vd., 2011; Hussain ve Nabeesa, 2012). Ayrıca içerdikleri değerli aktif bileşiklerden dolayı geleneksel tıp sisteminde önemli bir yere sahiptir ve epilepsi, uykusuzluk, astım, romatizmaya ve idrar söktürücü gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Uabundit vd., 2010).

Bu çalışmada, önemli bir sucul bitki olan *B. monnieri*'nin doku kültürü ile hızlı ve etkili üretimi için yeni bir protokol geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bitkinin yaprak

eksplantları farklı konsantrasyonlarda Zeatin (ZEA) içeren solüsyonlarda bir saat bekletilmiş ve ardından bitki büyüme düzenleyici içermeyen kültür ortamına aktarılmıştır. Bitkinin yapraklarından çoklu sürgün rejenerasyonları başarıyla sağlanmıştır. Bu çalışma, *B. monnieri*'nin kütleli çoğaltımı ve bu bitkiden önemli sekonder metabolitlerin üretimi çalışmalarına yardımcı olabilir.

MATERYAL ve METOT

Bitki materyali: Çalışmada kullanılan steril *B. monnieri* bitkileri, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir.

Doku kültürü uygulamaları: *İn vitro* çoğaltım çalışmaları için yaprak eksplantları steril koşullarda bitkiden izole edilmiş ve 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ve 8.0 mg/L ZEA içeren solüsyonlarda 1 saat süre ile bekletilmiştir (Şekil 1). Ayrıca kontrol olarak ZEA içermeyen su ortamında yaprak eksplantları 1 saat süre ile tutulmuştur. Ardından yaprak eksplantları % 3 sukroz (Duchefa) ve % 0.65 agar (Duchefa) içeren hormonsuz-Murashige ve Skoog (1962) temel besin ortamında (MS) sekiz hafta süre ile kültüre alınmıştır.

Tüm ortamların pH'ı otoklavlanmadan önce 1N NaOH ve 1N HCl ile 5.8 ± 0.1 'e ayarlanmıştır. Ardından ortamlar 120°C'de 20 dakika boyunca 118 kPa atmosferik basınçta otoklavlanmıştır. Bütün kültürler, beyaz floresan lambalar altında 16 saat ışık fotoperiyodunda (5000 lüks), 24±1°C'de bekletilmiştir. Sekiz haftalık kültürden sonra, deney sonlandırılmış ve sürgün rejenerasyon verileri alınmış ve analiz edilmiştir.

Kültür ortamında elde edilen sürgünler ortalama 2.5 cm boyunda kesilmiş ve indol-3-butirik asit (IBA) içeren MS ortamında dört hafta süresince köklendirilmiştir. Ardından, dış koşullara alıştırmak için musluk suyu ve kum içeren akvaryuma transfer edilmiştir (16 saat ışık; 23°C).



Şekil 1. ZEA solüsyonu içerisinde 1 saat bekletilen *B. monnieri* yaprakları

İstatistiksel analizler: Tüm denemeler altı tekerrür olarak uygulanmıştır. Elde edilen veriler SPSS 21 for Windows programı ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Post Hoc testleri için de Duncan testleri uygulanmıştır.

Veriler arasındaki korelasyon analizi için Pearson tek yönlü analiz kullanılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

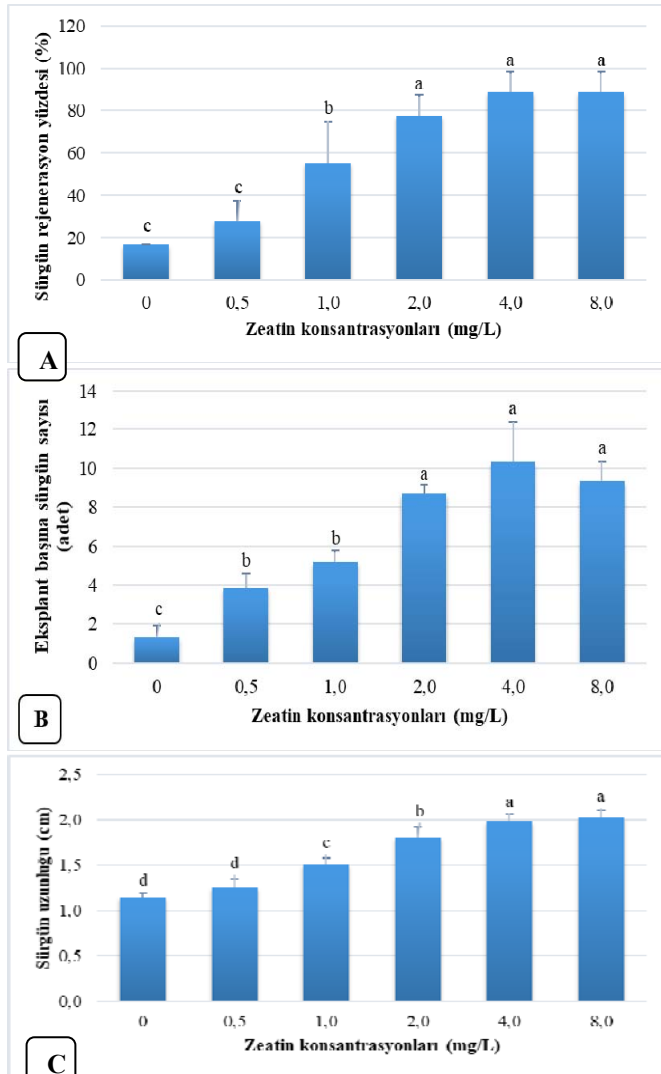
B. monneri'nin yaprak eksplantları ZEA'nın farklı konsantrasyonları ile ön muamele edilmiş ve ardından bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS temel besin ortamına aktarılmıştır. Kültür ortamında ilk sürgün çıkışları 16. günde

4 mg/L ZEA ön uygulamasına tabi tutulan yaprak eksplantlarında gözlenmiştir. Dört hafta sonunda çoklu sürgünler belirginleşmiştir. Sekiz hafta sonunda deneme sonlandırılmış ve veriler alınarak varyans analizine tabi tutulmuştur (Tablo 1). Benzer şekilde *in vitro* üretim için yaprak eksplantlarının kullanımı daha önce *Aechmea ramosa* (Faria vd., 2018), *Coffea arabica* L. (Chone vd., 2018) ve *Echinops kebericho* (Enyew ve Feyissa, 2019)'da bildirilmiştir.

Tablo 1. Farklı ZEA ön uygulamasının *B. monneri*'nin yaprak 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
Ortam	5	2950.89	23.90**	37.76	33.50**	0.42	63.10**
Hata	12	123.47	-	1.13	-	0.01	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-

** $p < 0.01$ düzeyinde önemli



Şekil 2. Farklı ZEA ön uygulamasının *B. monneri*'nin yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu.

Farklı konsantrasyonlarda ZEA ön uygulamasına bırakılan yaprak eksplantlarının doku kültürü şartlarındaki sürgün rejenerasyon yüzdesi (A), eksplant başına sürgün sayısı (B) ve sürgün uzunluğu (C) verileri. Tüm değerler altı tekrarın ortalaması almana gelir (n = 6). Dikey çubuklar, standart hataları gösterir. Farklı harfler ile gösterilen değerler, istatistiksel olarak farklı değerleri gösterir ($p < 0.05$; Duncan).

Varyans analizinde de görüleceği üzere (Tablo 1) farklı ZEA ön muamelesi ile sürgün rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunlukları arasında $p < 0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli farklılık tespit edilmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır (Şekil 2).

ZEA ön uygulaması ile yaprak eksplantlarının sürgün rejenerasyon değerleri farklılık göstermiş olup ($p < 0.05$), % 16.66-88.89 arasında değişmiştir (Şekil 2A). Maksimum sürgün rejenerasyon frekansları % 88.89 ile ZEA'nın 4 ve 8 mg/L ön uygulaması ile elde edilmiştir. Sürgün rejenerasyon frekansı, ZEA konsantrasyonunun azalması ile düşmüştür. Minimum sürgün rejenerasyon değerleri % 16.66 ile kontrol grubunda tespit edilmiştir. Bu sonuçlar kullanılan büyüme düzenleyicinin artışı ile yaprak eksplantlarının sürgün rejenerasyon kabiliyetinin arttığını ortaya koymuştur. Bu çalışma ile uyumlu olarak Özel (2018) *Isatis constricta* Davis'in yaprak eksplantlarını *in vitro* üretim için kültüre almış ve maksimum sürgün rejenerasyon yüzdesini hormon seviyesinin artışı ile elde etmiştir. Buna karşın Ribeiro de Souza vd. (2019), *Genipa americana* L.'nin yaprak eksplantlarını farklı konsantrasyonlarda (0, 1.12, 2.25 ve 3.37 mg/L) BAP içeren kültür ortamına aktarmış ve en yüksek sürgün rejenerasyon yüzdesini, en düşük BAP (1.12 mg/L) içeren kültür ortamında elde etmiştir. Bu sonuçlar sürgün rejenerasyon değerlerinin bitki türüne göre ve kullanılan bitki büyüme düzenleyicisine göre değişebileceğini göstermiştir.

Sürgünlerin çıkışı ile ZEA ön muamelesi arasında istatistiksel olarak $p < 0.05$ seviyesinde anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (Şekil 2B). Eksplant başına sürgün sayısı 1.33-10.31 sürgün/eksplant arasında sıralanmıştır. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı 10.31 sürgün/eksplant ile 4 mg/L ZEA uygulanan yapraklardan (Şekil 3a), ardından ise 9.32 sürgün/eksplant ile 8 mg/L ZEA uygulanan eksplantlarda (Şekil 3b) elde edilmiştir. Sürgün sayısı bakımından 2, 4 ve 8 mg/L ZEA uygulamaları kendi

aralarında istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır ($p>0.05$). Düşük oranda ZEA uygulaması yapraklardan çıkan sürgün sayısını olumsuz etkilemiştir. Bu düşüşün sebebi, hormon seviyelerinin eksplant üzerine farklı metabolik etkiler yapmasından ileri gelebilir.



Şekil 3. Yaprak eksplantlarından adventif sürgün oluşumu. (a) 4 mg/L, (b) 8 mg/L ZEA ön işlem uygulanan yaprak eksplantlarından doku kültürü şartlarında sekiz hafta sonunda sürgün oluşumları.

Kültür ortamında rejenerasyon sürgünlerinin uzunlukları 1.15-2.02 cm arasında değişmiştir (Şekil 2C). Yapraklara uygulanan ZEA konsantrasyonlarının artması ile sürgünlerin uzunlukları da artış göstermiştir. En yüksek değerlerde sürgün uzunluğu 2.02 cm ile 8 mg/L ZEA ön uygulamasında beklenen yapraklardan elde edilmiştir. Ardından ise 1.98 cm ile 4 mg/L ZEA uygulanan yapraklarda belirlenmiştir. 4 mg/L ve 8 mg/L ZEA uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Aynı şekilde en düşük sürgün uzunluğu kontrol grubu yapraklarda elde edilmesine rağmen, 0.5 mg/L ZEA uygulanan yapraklar ile kontrol grubu yapraklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmamıştır ($p>0.05$). Genel olarak hormon oranının artışı sürgün uzunlukları pozitif yönlü etkilemiştir. Benzer şekilde, hormon seviyesinin artışı ile sürgün uzunluklarında artışlar daha önce Shahzad vd. (2011) ve Enyew ve Feyissa (2019) tarafından da bildirilmiştir.

Elde edilen verilerin birbiri ile ilişkileri Tablo 2’de gösterilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ile sürgün rejenerasyon değerleri arasında ($r=0.945$, $p<0.01$) ve sürgün uzunluğu arasında ($r=0.914$, $p<0.01$) pozitif yönlü korelasyonlar tespit edilmiştir. Ayrıca, sürgün rejenerasyon yüzdesi ile sürgün uzunluğu arasında da pozitif yönde ilişkiler belirlenmiştir ($r=0.925$, $p<0.01$). Bu değerlerden yola çıkarak sürgün rejenerasyon yüzdesi, sürgün sayısı ve sürgün uzunluklarının birbiriyle ilişkili olduğu söylenebilir.

Tablo 2. Farklı ZEA ön uygulamaları için *B. monnieri*’de korelasyon katsayıları.

ZEA uygulamaları	Sürgün rejenerasyonu	Eksplant başına sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu
Sürgün rejenerasyonu	1	0.945**	0.925**
Eksplant başına sürgün sayısı	0.945**	1	0.914**
Sürgün uzunluğu	0.925**	0.914**	1

**Korelasyon 0.01 seviyesinde önemli (Tek yönlü)

Kültür ortamında uzayan sürgünler 2.5 cm uzunluğunda kesilerek 0.25 mg/L IBA içeren MS ortamında

dört hafta süresince köklendirilmiştir. Ardından, dış koşullara alıştırmak için akvaryuma aktarılmıştır. Dört hafta sonunda bitkilerin boylarında ve yapraklarında uzamalar gözlenmiştir. Bitkilerin dış koşullara alıştırılması başarıyla sağlanmıştır.

SONUÇ

Bitkiler, doğal ortamlarındaki çevresel rollerinin yanı sıra insanoğlu için de hayati önem taşırlar. İnsanlar için nefes almak dışında bitkiler ziraat, sanayi, ticaret, endüstri, gıda ve ilaç gibi alanlarda ham madde olarak kullanılmaktadır. Bu nedenlerle, bitkilerin üretimi için birçok yöntem denenmektedir. Bunlar arasında en etkili yöntemlerden olan doku kültürü, geniş ölçekli bitki üretimi için önemli bir alternatiftir. Bu çalışmada, tıbbi ve çevresel acıyan önemli sucül bitki *B. monnieri*’nin doku kültürü teknikleri ile üretimi sağlanmıştır. ZEA ön uygulaması ile yapraklardan bitki eldesi, güncel ve özgün bir protokol olarak sunulmuştur. En etkili ZEA değeri 4 ve 8 mg/L olarak belirlenmiştir. *B. monnieri*’nin *in vitro* üretimini içeren bu çalışma sonuçları, bu bitkiden değerli sekonder metabolitler büyük ölçeklerde elde edilmesine yardımcı olabilir. Ayrıca ağır metal arıtım uygulamaları için bu bitkilerin doğadan toplanmasının önüne geçilerek, biyoçeşitliliğe katkı sunulabilir.

KAYNAKLAR

- Altpeter, F., Springer, N.M., Bartley, L.E., Blechl, A.E., Brutnell, T.P., Citovsky, V., Conrad, L., Gelvin, S.B., Jackson, D., Kausch, A.P., Lemaux, P.G., Medford, J.I., Orozco-Cardenas, M., Tricoli, D., VanEck, J., Voytas, D.F., Walbot, V., Wang, K., Zhang, Z.J. & Stewart, C.N. (2016). Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell*, **28**, 1510-1520.
- Chone, R.M.S., Rocha, D.I., Monte-Bello, C.C., Pinheiro, H.P., Dornelas, M.C., Haddad, C.R.B. & Almeida, J.A.S. (2018). Brassinosteroid increases the cytokinin efficiency to induce direct somatic embryogenesis in leaf explants of *Coffea arabica* L. (Rubiaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **135**, 63-71.
- Cirik, Ş., Cirik, S. & Conk-Dalay, M. (2011). Su Bitkileri II (İçsu Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi, Yetiştirme Teknikleri). Ege Üniversitesi, *Su Ürünleri Fakültesi Yayınları*, İzmir.
- Dias, M.I., Sousa, M.J., Alves, R.C. & Ferreira, C.F.R.I. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, **82**, 9-22.
- Dogan, M. (2019). Callus formation from full leaf and leaf parts of *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne. *Acta Biologica Turcica*, **32**, 78-83.

- Dogan, M. (2019).** *In vitro* rapid propagation of an aquatic plant *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze. *Anatolian Journal of Botany*, **3**, 1-6.
- 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.
- Doğan, M. (2018).** *In vitro* shoot regeneration of *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. from nodal and internodal explants. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **8**, 77-84.
- 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.
- Enyew, M. & Feyissa, T. (2019).** *In vitro* shoot regeneration from leaf explants of *Echinops kebericho*: an endangered endemic medicinal plant. *Plant Biosystems*, **153**, 199-204.
- Faria, D.V., Simao, M.J., Cipriano, R., Werner, E.T., Soares, T.C.B. Aoyama, E.M. & Lima-Gontijo, A.B.P. (2018).** *In vitro* morphogenesis and micropropagation of *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. f. (Bromeliaceae) from leaf explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **54**, 530-536.
- Hussain K. & Nabeesa, S. (2012).** Bioaccumulation pattern of mercury in *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, **8**, 10-21.
- Hussain, K., Abdussalam, A.K., Chandra P.R. & Salim, N. (2011).** Heavy metal accumulation potential and medicinal property of *Bacopa monnieri*-a paradox. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* **7**, 39-50.
- Jenks, M.A., Kane, M.E., Dennis, B. & McConnell, D.B. (2000).** Shoot organogenesis from petiole explants in the aquatic plant *Nymphaeodes indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **63**, 1-8.
- Kim, D.H., Gopal, J. & Sivanesan, I. (2017).** Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. *RSC Advances*, **7**, 36492-36505.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- Özel, Ç.A. (2018).** Efficient *in vitro* plant regeneration from cultured leaf and petiole explants of *Isatis constricta* Davis. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, **17**, 49-55.
- Rai, P.K. (2009).** Heavy metal phytoremediation from aquatic ecosystems with special reference to macrophytes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **39**, 697-753.
- Ribeiro de Souza, R., Duarte de Oliveira Paiva, P., Reis da Silva, R., Corrêa da Silva, D.P., Valquíria dos Reis, M. & Paiva, R. (2019).** Morphogenetic potential of different sources of explants for efficient *in vitro* regeneration of *Genipa sp.* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **136**, 153-160.
- Shahzad, A., Parveen, S. & Fatema, M. (2011).** Development of a regeneration system via nodal segment culture in *Veronica anagallis-aquatica* L. - an amphibious medicinal plant. *Journal of Plant Interactions*, **6**, 61-68.
- Singh, D., Tiwari, A. & Gupta, R. (2012).** Phytoremediation of lead from wastewater using aquatic plants. *Journal of Agricultural Science and Technology*, **8**, 1-11.
- Sivanesan, I. & Park, S.W. (2015).** Optimizing factors affecting adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering and fruiting of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Industrial Crops and Products*, **76**, 323-328.
- Stanly, C., Bhatt, A. & Keng, C.L. (2011).** An efficient *in vitro* plantlet regeneration of *Cryptocoryne wendtii* and *Cryptocoryne beckettii* through shoot tip culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**, 619-624.

*Corresponding author's:

Muhammet DOGAN

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

✉E-mail: mtdogan1@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3138-5903>