GALANTHUS ELWESII HOOK. f. BİTKİSİNİN OLGUNLAŞMAMIŞ EMBRİYOLARINDAN *IN VITRO* SOĞAN ÜRETİMİ

Ayşe Gül NASIRCILAR[1] Özgül KARAGÜZEL[2]
[1]Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Antalya/ Türkiye
[2]Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Antalya/ Türkiye

Özet

Galanthus elwesii Hook. f. bitkisi ülkemizden ihraç edilen çiçek soğanları listesinde ilk sıralarda yer almaktadır. Bu nedenle bu bitkinin *in vitro* çoğaltımı hem gen kaynaklarının korunması hem de ticari üretim için büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada kullanılan *Galanthus elwesii* Hook. f. bitkisinin meyveleri nisan ayının ilk haftası içerisinde doğal yetişme ortamı olan Antalya ilinin Akseki ilçesi civarından toplanmıştır. Meyveler yüzey sterilizasyonu için % 80' lik ticari sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dakika tutulduktan sonra üç kez steril saf su ile durulanmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlardan çıkarılan olgunlaşmamış embriyolar 1-4 mg/l 6-benzilaminopurin (BA) ve 0,5 mg/ l α- naftalen asetik asit (NAA) içeren Murashige-Skoog (MS) ortamında kültüre alınmıştır. En yüksek soğancık oluşumu 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiş olup, bu ortamda elde edilen soğancık sayısı eksplant başına 7,7 adet olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Galanthus elwesii*, *İn Vitro* Çoğaltım.

In Vitro Bulb Propagation from Immature Embryos of *Galanthus elwesii* Hook. f. Plants

Abstract

Galanthus elwesii Hook f. is one of the first plants in the list of flower bulbs which are exported from Turkey. Because of this, *In Vitro* production of this plant is important not only to protect gene pool but also for commercial production. Fruits of this plant, used in this study, were collected in Akseki, Antalya, a place where this plants naturally grown up, first week of April. Fruits were hold in 80 % commercial sodium hypocloride solution about 20 minutes for surface sterilization after that washed by sterile distilated water for three times. Immature embriyos extracted from the sterile seeds were cultered in a MS medium that contains 1-4 mg/l 6-benzileaminopurine (CBA) and 0.5 mg/l α-naftalene asetic acid (NAA). The highest bulb formation was obtained from MS medium contained 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA. The number of the bulbs obtained from this medium was found 7.7 per explant.

Keywords: *Galanthus elwesii*, *In-Vitro* propagation

1. Giriş

Ülkemiz florasında bulunan 9000 türün yaklaşık 3000 kadarını endemik bitkiler oluşturmaktadır (Ekim ve ark., 2000). Geofit adı verilen ve soğan, tuber, rizom gibi toprak altı organlarına sahip olan soğanlı bitkiler, bu biyoçeşitliliğin oluşmasına önemli bir katkı sağlamaktadır (Tıpırdamaz ve ark., 1999). Geofitler güzel çiçekli olmalarının yanında, parfüm ve ilaç sanayiinde de kullanılmaları nedeniyle ekonomik yönden oldukça önemli bitkilerdir (Ekim ve ark., 2000). Bu nedenlerden dolayı özellikle Ege, Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinde doğal olarak yetişen *Galanthus, Anemone* ve *Cyclamen* gibi bitkilerin soğanları, yaklaşık yüz yıldır doğal ortamlarından sökülerek ihraç edilmekte ve bu ihracattan yılda yaklaşık 2 milyon dolar gelir sağlanmaktadır (Yazgan ve ark., 2005). Doğadan toplanan ve genellikle süs bitkisi olarak ihraç edilen soğanlı bitkilerin ticaretinde ilk sırada *Galanthus* cinsi yer almaktadır (Tıpırdamaz ve ark., 1999). Son yıllarda tehlike altında bulunan geofitlerin korunması amacıyla, uluslararası anlaşmalar yapılmış ve doğada nesli tükenmekte olan bazı türlerin doğal ortamdan toplanarak ticaretinin yapılması yasaklanmıştır (Ekim ve ark., 2000).

Geofitlerin çoğunun doğal ortamda yeni soğancık oluşturma süresi oldukça uzun ve soğan oluşum oranı da oldukça düşüktür (Ziv ve Kipnis, 2000, Arslan ve ark., 2002). Kardelen doğal ortamda tohum ve yeni soğancık oluşumuyla çoğalmaktadır. Tohumdan yeni bir soğancık oluşumu için 4-5 sene gibi uzun bir süre geçmesi gerekmektedir. Hem doğadaki soğanların

sökülmesi, hem de bitkinin doğal hayat döngüsünün uzun olması nedeniyle, *Galanthus* cinsine ait türler giderek azalmakta ve bitkinin üretimine yönelik hızlı çoğaltım yöntemlerinin kullanılması zorunlu hale gelmektedir (Tıpırdamaz ve ark., 1999).

İn vitro çoğaltım, *Lilium longiflorum* (Nhut ve ark., 2002), *Narcissus pseudonarcissus* (Sage ve ark., 2000), *Fritillaria thunbergii* (Paek ve Murthy 2002) gibi bazı soğanlı bitki türlerinde uygulanmaktadır. Fakat *Galanthus* cinsine ait türlerde doku kültürüyle ilgili çalışmalar sınırlı sayıda bulunmaktadır (Tıpırdamaz 2003). *Galanthus elwesii* Hook f. bitkisinin doku kültürü çalışmalarında ovaryum, çiçek sapı, yaprak sapı ve soğan pul yaprakları kullanılan eksplant tipleri arasında yer almaktadır (Tıpırdamaz ve ark., 1999). Bu bitkide olgunlaşmamış embriyonun yeni soğancık oluşumu için eksplant kaynağı olarak kullanıldığına dair herhangi bir literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, doğadaki stokları gün geçtikçe azalan ve bu nedenle zarar görebilir bitkiler kapsamında bulunan *Galanthus elwesii* Hook f. bitkisinin olgunlaşmamış embriyolarından soğan üretilmesidir.

2. Materyal ve Yöntem

Çalışma materyali olarak kullanılan *Galanthus elwesii* Hook f. bitkisine ait meyveler, nisan ayının ilk haftası içinde doğal yetişme ortamı olan Antalya ilinin Akseki ilçesi civarından toplanmıştır. Tohumları içeren meyveler %80'lik ticari sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dakika süreyle sürekli karıştırılarak steril edildikten sonra üç kez steril saf su ile durulanmıştır.

Tohumlar, yüzey sterilizasyonu yapılan meyvelerden steril koşullarda çıkarılmıştır. Olgunlaşmamış embriyolar ise steril koşullarda pens ve bistüri yardımıyla diseksiyon mikroskobu altında tohumlardan izole edilmiştir. Bu şekilde elde edilen olgunlaşmamış embriyolar 1, 2 ve 4 mg/l 6 benzilaminopurin (BA) ve 0,5 mg/l α-naftelenasetik asit (NAA) içeren, pH'sı 5,7 olan Murashige-Skoog (MS) ortamında kültüre alınmıştır. Her üç ortam için denemeler üç tekrarlı olarak yapılmış ve her bir tekrar için 5 adet eksplant kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanan denemeler 25±1◦C sıcaklık ve 16/8 saatlik aydınlık/karanlık fotoperiyota sahip olan iklim odasına yerleştirildikten sonra ayda bir kez taze ortama transfer edilmek suretiyle alt kültüre alınmıştır. 6 ay süre ile petri kaplarında muhafaza edilen eksplantlardan bu sürenin sonunda sürgün oluşturanlar aynı besin ortamını içeren kavanozlara transfer edilmiştir. 11.ayın sonunda oluşan soğanlar sayılmış ve kallus dokusundan ayrılarak hormon içermeyen MS_0 ortamında köklenmeye alınmıştır.

Verilerin istatistiksel analizinde ve temel paremetrelerin hesaplanmasında MINITAB 13.0 paket programı kullanılmıştır.

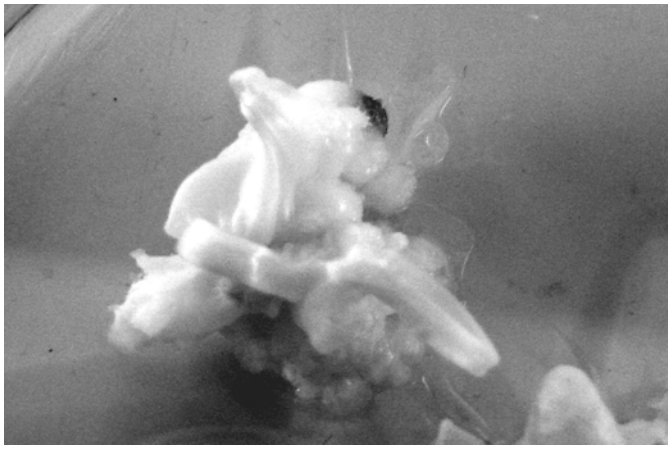
3. Bulgular

Galanthus elwesii Hook f. bitkisine ait olgunlaşmamış embriyolar, *in vitro* ortamda soğancık oluşumu için üç farklı kombinasyonda BAP ve NAA içeren üç farklı MS ortamında kültüre alınmış ve her ay taze ortama transfer edilerek alt kültürü yapılmıştır. Kültür başlangıcından sonra 15. günde her üç ortamda, embriyo eksplantlarının etrafında kallus oluşumu başlamıştır. 3-4 ay içinde bu kalluslar gelişerek açık sarı renkli ve kompakt yapıdaki kallus kitlesini oluşturmuştur (Şekil1).

Kallus oluşum yüzdesi bakımından en verimli ortam 1BAP+0.5 NAA ortamı olup, bu ortamda eksplantların %73,3'ü kallus oluşturmuştur (Çizelge 1).

Kallus oluşum yüzdesi bakımından en düşük verim 4 BAP + 0,5 NAA ortamında elde edilmiştir. Kültür başlangıcından itibaren yaklaşık 6 ay sonra her üç ortamda bulunan kallusların yüzeyinden sürgün rejenerasyonu başlamıştır (Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4).

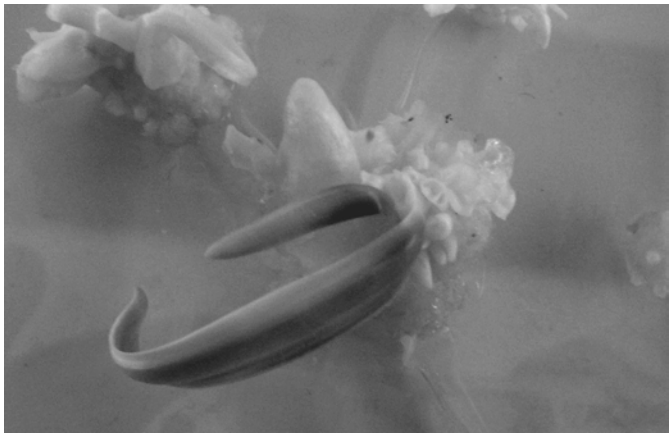
Bu aşamadan sonra sürgün oluşturan kalluslar kavanozlara aktarılmış ve yaklaşık bir ay içinde kallus yüzeyinden soğancık oluşumu başlamıştır (Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7).



Şekil 1. 2 BAP + 0,5 NAA Ortamında Oluşan Kallus ve Sürgünler

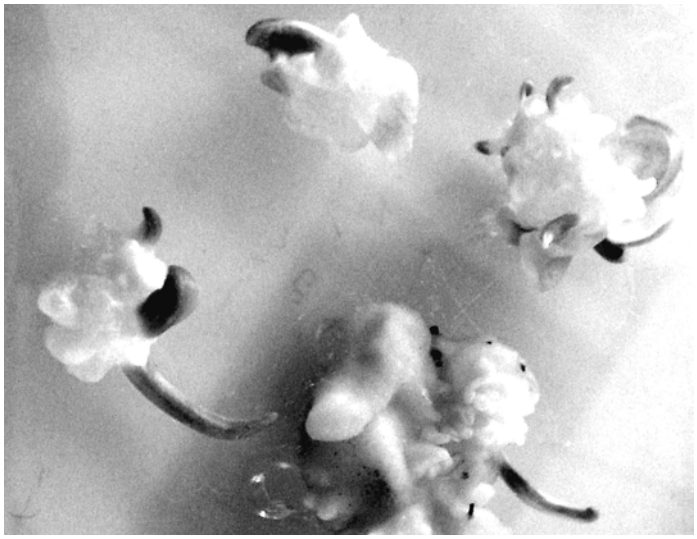
Çizelge 1. 11 aylık kültürlerde *Galanthus elwesii* Hook f. Bitkisinin Olgunlaşmamış Embriyo Explantlarından Kallus Oluşumu ve Soğancık Rejenerasyonu

Besin ortamı	Kallus oluşturan eksplant yüzdesi (%)	Soğan oluşturan kallus yüzdesi (%)	Eksplant başına düşen soğan sayısı
1 BAP + 0,5 NAA	73,30 ± 17,60	46,70 ± 20,30	7,70 ± 4,46
2 BAP + 0,5 NAA	66,60 ± 17,60	100,00 ± 0,00	5,92 ± 0,47
4 BAP + 0,5 NAA	53,30 ± 6,67	72,00 ± 14,70	6,70 ± 1,68

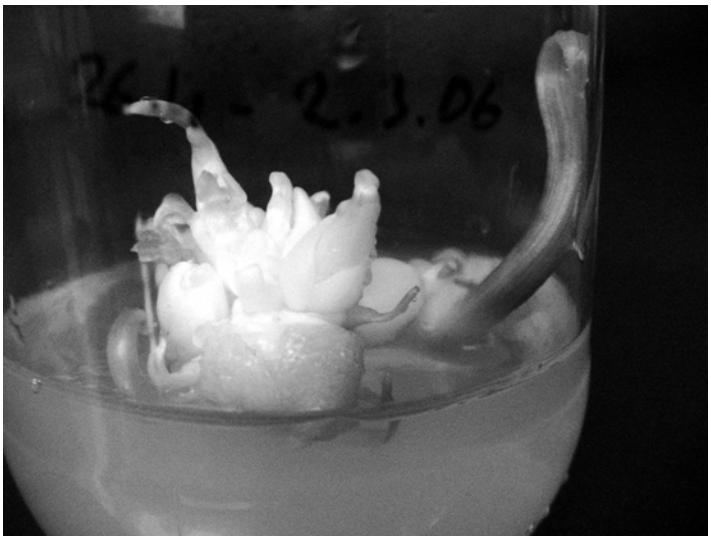


Şekil 2. 2 BAP + 0,5 NAA Ortamında 6 Ay Sonra Kallus Yüzeyinde Oluşan Sürgün Rejenerasyonu.

Şekil 3. 1BAP + 0,5 NAA Ortamında Kallus Yüzeyinden Oluşan Sürgünler.

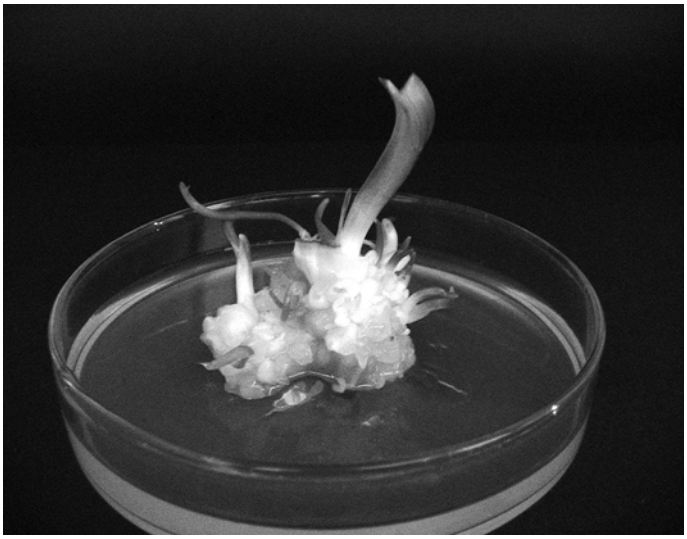


Şekil 4. 4 BAP + 0,5 NAA Ortamında Kallus Yüzeyinden Oluşan Sürgünler.



Şekil 5. 1 BAP + 0,5 NAA Ortamında 10 Ay Sonunda Oluşan Soğanlar

Şekil 6. 10. Ayın Sonunda 2 BAP + 0,5 NAA Ortamında Soğanlardan Gelişen Sürgünler.



Şekil 7. 4 BAP + 0,5 NAA Ortamında Soğanlardan Gelişen Sürgünler.

Soğan oluşturan kallus yüzdesi bakımından en verimli ortam 2 BAP + 0,5 NAA ortamı olup bu ortamda kallusların % 100'ü soğan oluşturmuştur. Eksplant başına düşen soğancık sayısı bakımından en yüksek verim 1 BAP + 0,5 NAA ortamında elde edilmiştir. Burada eksplant başına düşen soğan sayısı ortalama 7,7 olarak bulunmuştur. Ortamlar arasında kallus, soğan oluşumu ve eksplant başına düşen soğan sayısı bakımından farklılık olup olmadığı varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiş ve istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$).

4.Tartışma ve Sonuç

Liliaceae, Iridaceae ve *Amaryllidaceae* familyalarına ait soğanlı ve kormlu bitkilerin doğal ortamlarındaki çoğalma oranı oldukça düşüktür. Gerek besin maddesi olarak gerekse de tıp ve peyzaj alanında kullanılmaları nedeniyle, ekonomik açıdan önem taşıyan geofitler bu önemleri nedeniyle, doku kültürü teknikleri ile daha hızlı bir şekilde üretilmeye çalışılmaktadır (Zaidi v e ark., 2000).

Soğan pul yaprakları, geofitlerin *in vitro* çoğaltımı için en yaygın olarak kullanılan eksplant kaynağıdır (Mirici ve ark., 2005). *Nerine sarniensis* bitkisinde soğan pul yaprakları eksplant kaynağı olarak kullanıldığında eksplant başına 7-9 soğancık, (Vishnevetsky ve ark., 2003), ve *Fritillaria thunbergii* bitkisinde ise 13,7 soğancık elde edilmiştir (Paek ve Murthy 2002). *Galanthus elwesii* bitkisinde ise soğan pul yaprakları kullanılarak eksplant başına ortalama 15 adet soğancık elde edildiği bildirilmektedir (Girmen ve Zimmer, 1988). Soğan pul yaprakları yanında yaprak, olgun tohum, ovaryum, çiçek sapı ve yaprak sapı gibi çok farklı eksplant kaynakları yeni soğancık oluşumu için kullanılmaktadır (Tıpırdamaz, 2003). Olgunlaşmamış embriyonun soğancık oluşumu için eksplant kaynağı olarak kullanıldığı ilk bitki *Stenbergia fischeriana* olup, bu çalışmada 4 BAP + 0,25 NAA ortamında eksplant başına 80 yeni soğancık elde edilmiştir (Mirici ve ark., 2005). Bizim çalışmamızda da eksplant kaynağı olarak *Galanthus elwesii* Hook f. bitkisine ait olgunlaşmamış embriyolar eksplant kaynağı olarak kullanılmış ve eksplant başına 5,9-7,7 arasında yeni soğancık oluşumu elde edilmiştir. Bu oran *Stenbergia fischeriana'*da elde edilen sayıya göre oldukça düşük olmasına rağmen *Galanthus elwesii* Hook f. bitkisinde olgunlaşmamış embriyonun eksplant kaynağı olarak kullanıldığı ilk çalışma olması açısından önemlidir. Ayrıca soğan pul yapraklarının kullanılması durumunda yoğun olarak bakteri ve fungus kontaminasyonu görülmektedir. Olgunlaşmamış embriyo kullanıldığında ise herhangi bir kontaminasyon oluşumu gözlenmemektedir (Mirici ve ark., 2005).Yaptığımız çalışmada

da olgunlaşmamış embriyonun eksplant kaynağı olarak kullanılması sonucunda herhangi bir bakteri ve fungus kontaminasyonu gözlenmemiştir.Bu nedenle bu eksplant tipi geofitlerin *in vitro* çoğaltımı için en uygun eksplant kaynaklarından birisi olarak bundan sonra yapılacak çalışmalara bir örnek oluşturabilir.

Sonuç olarak bu çalışma *Galanthus elwesii* Hook f. bitkisinin *in vitro* çoğaltımı için olgunlaşmamış embriyonun eksplant kaynağı olarak kullanıldığı ilk çalışma olup, diğer eksplant tiplerine bir alternatif oluşturması açısından önemlidir.

Teşekkür

Araştırmamızın her safhasında bize destek olan Doç.Dr. Semra MİRİCİ'ye yardımlarından dolayı teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Arslan, N., Gürbüz, B., Gümüşçü, A., Özcan, S., Mirici, S. ve Khawar, K.M., 2002. Cultivation of *Sternbegia fischeriana* (Herbert) Rupr. and a study on its morfological characteristics. Pakistan J. Bot. 34: 411-418.

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N., 2000. Red Data Book of Turkish Plants: Pteridophyta and Spermatophyta. Barışcan Ofset, Ankara.

Girmen, M. and Zimmer, K., 1988. In vitro culture of Galanthus elwesii. I. Sterilization, regeneration, phytohormones. Gartenbauwissenschaft 53(1): 26-29.

Mirici, S., Parmaksız, İ., Özcan, S., Sancak, C., Uranbey, S., Sarıhan, E.O., Gümüşcü, A., Gürbüz, B. and Arslan, N., 2005. Efficient *In Vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbegia fischeriana* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 239-246.

Nhut, D.T., Le, B.V., Minh, T., De Silva, J.T., Fukai, S., Tanaka, M. and Van, K.T.T., 2002. Somatic embryogenesis through pseudobulblet thin cell layer of *Lilium longiflorum.*Plant Growth Reg. 37:193-198.

Paek, K.Y. and Murthy, H.N., 2002. High freuency of bulblet regeneration from bulb scale ections of *Fritillaria thunbergii.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68: 247-252.

Sage, D.O., Lynn, J. and Hammatt, N., 2000. Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne. Plant Sci. 150: 209-216.

Tıpırdamaz, R., Ellialtıoğlu, Ş. ve Çakırlar H., 1999. Kardelenin (*Galanthus ikariae* Baker.) Doku Kültür Yoluyla Çoğaltımı: Eksplant Tipi, Ortam pH'sı ve Karbonhidrat Kaynağının Soğancık Oluşumuna Etkisi. Tr. J. of Agriculture and Forestry 4: 823-830.

Tıpırdamaz, R., 2003. Rooting and acclimatization of *In Vitro* micropropagated snowdrop (*Galanthus ikariae* Baker.) bulblets. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 16(2): 121-126.

Vishnevetsky, J., Zamski, E. and Ziv, M., 2003. Enhanced bud and bulblet regeneration from bulbs of *Nerine sarniensis* Cultured *In Vıtro.* Plant Cell Rep. 21:645-650.

Yazgan, M.E., Korkut, A.B., Barış, E., Erkal, S., Yılmaz, R., Erken, K., Gürsan, K. ve Özyavuz, M., 2005. Süs Bitkileri Üretiminde Gelişmeler. Ziraat Mühendisleri Odası Teknik Kongresi, 3-7 Ocak 2005.

Zaidi, N., Khan, N.H., Zafar, F. and Zafar, S.I., 1999. Bulbous and cormous monocotyledonous ornamental plants. In Vitro. Science Vision 6(1):58-73.

Ziv, M. and Lillien-Kipnis, H., 2000. Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes In Vitro. Plant Cell Rep. 19: 845-850.