

ARAŞTIRMA MAKALESİ/RESEARCH ARTICLE

Gomphrena globosa L. (Hanım Düğmesi)'NİN İN VİTRO ŞARTLARDA EMBRYO KÜLTÜRÜ İLE ÜRETİMİ

Banu Aytül ASLANARGUN¹, Güneş BAYRAKTAR²

ÖZ

Bu çalışmada *Gomphrena globosa* L. (Hanım Düğmesi) bitkisinin tohumları üzerinde bitki doku kültürü çalışmalarından, embriyo kültürü tekniği uygulanarak kısa sürede bol ve kaliteli bitkiler elde edilmiştir. Steril şartlarda tohumlardan çıkarılan embriyolar in-vitro koşullarda iyi sonuçlar vermiştir.

Bitkimizin embriyolarının ilk gelişimi için Kinetin (KIN) (1.0 mg/lt) içeren MS besin ortamında, vejetatif gelişme için İndol Asetik Asit (IAA) (1.0 mg/lt) içeren Murashige & Skoog (MS) besin ortamında 8 gün gibi kısa bir süre de sağlıklı kök ve gövdeleri olan bitkilerin oluştuğu görülmüştür. Bir ay sonra da saksılara aktarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Gomphrena globosa*, Embriyo Kültürü, Tohum.

IN-VITRO REGENERATION OF *Gomphrena globosa* L. BY EMBRYO CULTURE

ABSTRACT

In this study, plentiful and qualified plants have been acquired in the short time by the study of plant tis-sue culture on the seeds of the plant of *Gomphrena globosa* by applying the technique of embryo culture. In sterile conditions, embryos taken out from the seeds have been given good results in in-vitro conditions.

It has been seen that the plants of *Gomphrena globosa*'s embryos in Murashige & Skoog (MS) medium which includes Kinetin (KIN) (1.0mg/lt) for the first growth and in MS medium which includes Indol Acetic Acid (IAA) (1.0mg/lt) for the vegetative growth have been transformed into the plants which have healthy root and stem in the short time as eight days. After a month they have been transferred into the pots.

Key Words: *Gomphrena globosa*, Embryo Culture, Seed.

1. GİRİŞ

Günümüzde besin ihtiyacının artması, ormanların azalması, süs bitkilerine olan ilginin artması, bu konudaki bitki doku kültürü çalışmalarını da aynı oranda arttırmıştır. Daha önce yapılmış olan embriyo kültürü çalışmaları incelenmiştir.

Alman botanikçi Haberlandt'ın 1902 yılında ilk kez ortaya attığı in-vitro kültür olgusundan yaklaşık 30 yıl sonra doku kültürü tekniği ile ilk bitki White (1932) tarafından elde edilmiştir (Morel, 1963).

Doku kültürü tekniğinin ilk uygulandığı çalışma orkidelerin meristem kültürü tekniği ile çoğaltılması olmuştur (Morel, 1960).

1952 yılında *Capsella bursa-pastoris* bitkisinin embriyo kültürü tekniği ile in-vitro şartlarda üretilmiştir (Risuen, 1952).

1988 yılında *Zea mays*'in somatik embriyolarının ve kalluslarının da in-vitro üretimi yapılmıştır (Fransz, 1988).

1993 yılında muzda triploid erkek çiçeklerde sıvı besiyeri kullanılarak embriyo kültür çalışmaları yapılmıştır (Escalant, 1994).

1997 yılında kauçuk ağacında, 1998 yılında kahve ve patates bitkilerinde sıcaklık denemeleri embriyo kültürü ile in-vitro şartlarda yapılmıştır (Etienne, 1997), (Teisson ve Alvard, 1998). 1998 yılında gül embriyo kültürü tekniği ile üretilmiştir (Snellenberger, 1998).

¹ Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, E-posta: baaslana@anadolu.edu.tr.

² Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, E-posta: gunesb@anadolu.edu.tr.

Geliş: 20 Ağustos 2000; Düzeltme: 25 Temmuz 2001; Kabul: 16 Ekim 2001.

Doku kültürü tekniği ile kısa sürede bol ve kaliteli ürün elde etmek mümkündür. Ayrıca virüssüz bitki yetiştirmek, uzun süreli muhafaza ve ulaşım kolaylığı, tarla enfeksiyonlarından ve don, dolu gibi benzeri çevre koşullarının olumsuzluğundan etkilenmeyen bitki üretebilmek gibi avantajları vardır (White, 1932). Bizde ekonomik olarak daha sonra yararlanılabilecek bir biyoteknolojik çalışma yapmaya karar verdik.

Bunları gözönüne alarak bu çalışmada süs bitkilerine, aynı zamanda doğada yabancı çiçeklere olan ilginin artması nedeniyle in-vivo şartlarda daha uzun sürede, daha sağlıklı olarak gelişen *Gomphrena globosa* bitkisi in-vitro şartlarda embriyo kültür tekniği ile hızlı ve sağlıklı elde edilmeye çalışılmıştır. Bu bitki tüm dünyada süs bitkisi olarak kullanılmaktadır.

2. MATERYAL VE METODLAR

2.1. Materyal

Araştırma materyalimiz vatanı tropik Amerika olan, tüm dünyada süs bitkisi olarak kullanılan Amaranthaceae (HIYU) familyasından, Hanım Düğmesi (*Gomphrena globosa*) tohumu Anadolu Üniversitesi serasından 1999 senesinde temin edildi.

2.2. Metodlar

2.2.1. Embriyoların Çıkarılması ve Ekilmesi

Embriyosu çıkarılacak tohumlar testalarının sertliklerine göre 1-2 gün suda bırakıldı. Yumuşaması sağlanan tohumlar steril kabin içine alındı. Steril kabin içinde 3 beher hazırlandı. Bir tanesine % 0.3-0.6'lık Na veya Ca hipoklorat (çamaşır suyu), ikincisine %75'lik alkol ve en sonuncusuna steril saf su kondu. Bu 3 beher tohumlar sırası ile çamaşır suyunda 1 dk., %75'lik alkolde 1 dk., en son olarak steril saf suda 1 dk. bekletildi. Sonra stereo binoküler altında alkollenip alevden geçirilmiş pens ve bistürüler yardımı ile tohum kabuğu ve endosperması ayrıldı. Zarar verilmeden embriyo çıkarıldı. Bek yanında petriye ekildi. Petriye yeteri kadar embriyo ekilince petri parafilm ile kapatıldı. Sonra 25°C' deki iklim dolabına kondu.

2.2.2. Besin Ortamlarının Hazırlanması

Çalışmada temel besiyeri olarak MS besiyeri kullanıldı. Besin ortamına; ilk gelişimi teşvik etmek için 1.0mg/lit KIN, sürgün gelişimi ve yapraklanmayı teşvik etmek için 1.0mg/lit IAA eklendi.

Besin ortamlarının sterilizasyonu; otoklavda 120°C' de ve 15 Lb altında 15 dk. süre bekletilerek gerçekleştirildi.

Besin ortamlarına katılan hormonlar (KIN, IAA) ise otoklavlanmadan ötürü özelliklerini yitirecekleri

için diğer besin elementleri otoklavlandıktan ve ısı 40°C' ye düştükten sonra besin ortamına ilave edildiler.

Besin ortamlarının döküleceği petriyeler (70-90mm), cam kavanozlarda sterilizatör' de 120°C' de 2 saat süre ile steril edildiler.

2.2.3. Fotoperiyot Uygulaması

Sürgünleri gelişen ve köklenen bitkicikler 25°C sıcaklıkta 20W'lık 3 beyaz floresans lambalarla aydınlatılan iklim dolabında fotoperiyota tabi tutuldular. Bitkiciklere 2 hafta süre ile 12 saat ışık, 12 saat karanlık fotoperiyod uygulandı.

2.2.4. Genç Bitkiciklerin Saksılara Alınması

Yeteri kadar gelişen ve köklenen bitkiciklerin her biri 8-10cm. çapında toprak saksılara aktarıldı. Ancak bitkiler aktarılmadan önce saksı ve içine konulacak toprak 120°C' de 2 saat süre ile sterilizatörde sterilize edildiler. Toprak ince kum ile perlit (1:1) karışımı olarak hazırlandı. Saksılara aktarılan bitkicikler komple besin çözeltisi ile sulandırıldılar.

3. BULGULAR

Tohumlardan steril şartlarda çıkarılan embriyolar MS temel besiyerine ekilip 2-3 günde kök ve yaprak gelişimi gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 1, 2, 3).

MS besiyerinde köklenen ve yaprak gelişimi devam eden eksplantlar IAA (1.0mg/lit) ve KIN (1.0mg/lit)' lı içeren MS besiyeri olan kavanozlara aktarımı yapıldı (Şekil 4).

Kavanozlara aktarılan bitkicikler hızlı ve iyi bir gelişme gösterdiler. Dört gün içinde boyca uzama, köklenme ve yaprak sayısında artma gözlemlendi (Şekil 5).

Kavanozlara aktarma işleminde IAA uygulanan (Şekil 6) ve IAA+KIN uygulanan (Şekil 7) kavanozlar karşılaştırıldığında IAA içeren besiyerindeki fidelerde daha hızlı ve çabuk bir gelişim gözlemlenmiş; bunun yanında hızlı ve güçlü bir köklenme görülmüştür .

İklim dolabında gelişme gösteren bitkiciklerin kavanozda ve saksıdaki görünümü (Şekil 8).

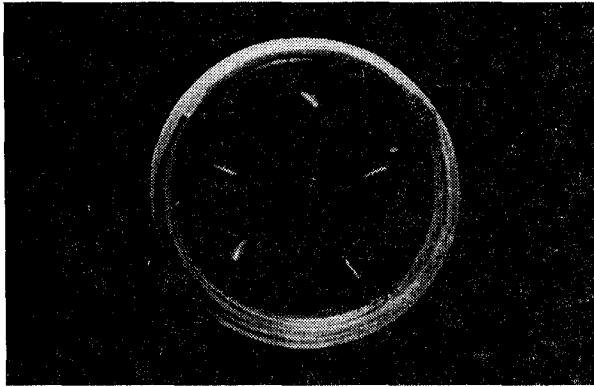
Kavanozdaki bitkiciklerde iyi bir vegetatif gelişme sağlanması sonucu 4 hafta sonunda kum ve perlit (1:1) karışımı bulunan saksılara alınmışlardır. Saksılara sterilize edilmiş komple sıvı besin çözeltisi verilmiştir (Şekil 9).

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada araştırma bitkisi *Gomphrena globosa*'nın in-vitro koşullarda kısa zamanda iyi ve sağlıklı sonuçlar verdiği görülmüştür.



Şekil 1. MS Besiyerine Ekilen Embriyoların İlk Görünümü. (Skala: 1cm)

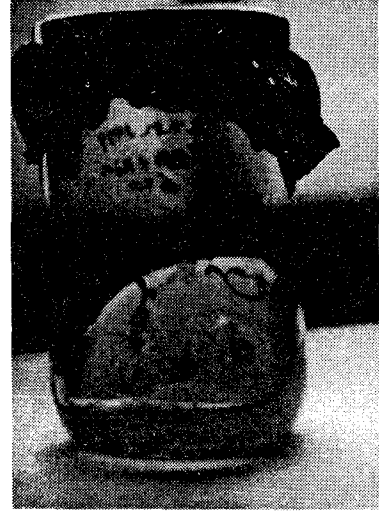


Şekil 2. 1.0 mg/lit KIN'lı MS Besiyerine Ekilen Eksplantların 1 Gün Sonraki Görünümü. (Skala: 1cm)



Şekil 3. 1.0 mg/lit KIN'lı MS Besiyerine Ekilen Eksplantların 2 Gün Sonraki Görünümü. (Skala: 1cm)

Bitkimizin tohumlarından steril şartlarda çıkarılan embriyolar ilk gelişimlerinde KIN (1.0mg/lit) + MS içeren petrilere ekilmiştir; 2 gün gibi kısa bir sürede kök ve yaprak oluşumu görülmüştür. Bunun kinetin hücre bölünmesine; ilk olarak mitoz, yani kromozomların duplikasyonu (eşleşmesi); değişik materyaller (soğan kökü, tütün özü, tütün yaprakları, bezelye kotiledonları, vb.) üzerinde yapılan çok sayıda çalışmada kinetin önemli oranda DNA oranını artırması (Akman ve Da-



Şekil 4. IAA (1.0 mg/lit) ve KIN (1.0 mg/lit)'lı MS Besiyerine 6 Gün Sonra Aktarılan Eksplantların Görünümü. (Skala: 1cm)



Şekil 5. IAA (1.0 mg/lit) ve KIN (1.0 mg/lit)'lı MS Besiyerine Aktarılan Eksplantların 4 Gün Sonraki Görünümü. (Skala: 1cm)

ricı, 1999) olduğu düşünülmüştür. Son olarak sitokinler protein sentezini kolaylaştırır. Bu olay protein zincirinde aminoasitlerin bağlanmasını sağlayan t-RNA'nın parçası, bir sitokin olan kinetinle açıklanabilir (Akman ve Darıcı, 1998).

Raphanus sativus (Turp) kotiledonlarının genişlemesi kinetinle teşvik edilmiştir (Letham, 1971).

Kültüre alınması daha zor olan Monokotiledonlar, Gymnosperm veya Pteridophyta dokuları hindistan cevizi sütü veya kinetin varlığında çoğalmaktadır.

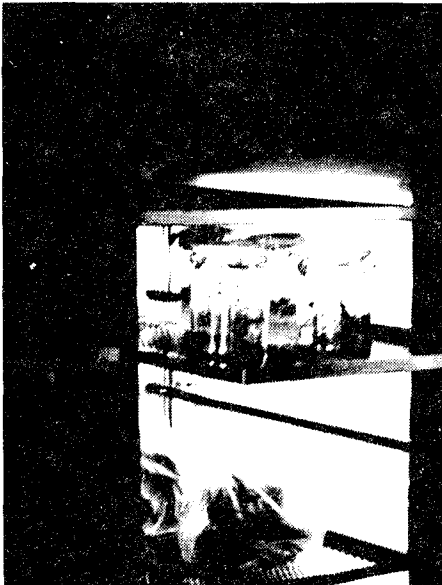
Daucus carota ile yapılmış çalışmada 4-6 hafta gibi uzun bir zamanda ilk gelişim görülmüştür. Bu çalışmada Zeatin +MS besiyeri kullanılmıştır. Dokulardaki sitokinler sitokinoksidadla parçalanırlar. Bu enzimlerin faaliyeti, ki bunlar bakır içeren glikolize protein-



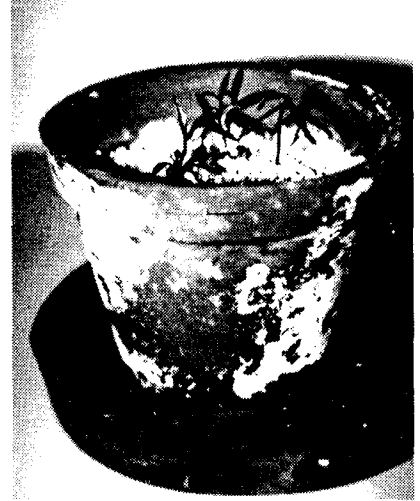
Şekil 6. IAA (1.0 mg/lit)'li MS Besiyerine Aktarılan Eksplantların Görünümü. (Skala: 1cm)



Şekil 7. IAA+KIN (1.0 mg/lit)'li MS Besiyerine Aktarılan Eksplantların Görünümü. (Skala: 1cm)



Şekil 8. İklim Dolabı içinde Kavanozlar da Kök Gelişimini Tamamlamış ve Saksılara Aktarılmış Bitkiciklerin Görünümü. (Skala: 1cm)



Şekil 9. 4 Hafta Sonra Kum ve Perlit (1:1) Karışımına Aktarılan Eksplantların Görünümü. (Skala: 1cm)

lerdir, moleküler oksijenin bulunması ile gerçekleşir. Bunlar doymamış izopren tabiatlı olduklarında (doğal sitokinler; Zeatin, DMAA) yan zincirindeki adeninin N⁶ seviyesinde oksidatif parçalanmaya neden olarak, amino oksidaz gibi davranırlar. Zeatin sitokinlerinin en yaygınıdır. Bunlar benzaladenin veya kinetin gibi siklik veya doymuş bir yan zincir içererek sitokinler üzerinde çok az etkilidirler. Doğal bir hormon olan zeatinin aktivitesi kinetinden 10 kez daha fazladır (Akman ve Darıcı, 1998). Buradaki ilk gelişimin uzun sürede olması ortamda moleküler oksijenin az bulunması veya bitkinin morfolojik yapısı olabilir.

Zea mays ile yapılmış diğer bir çalışma örneğinde de 6 saat gibi daha kısa bir sürede ilk gelişim gözlenmiştir (Fransz, 1988). Besiyerinde hormon kullanılmadan yapılmış bu çalışmada 2 gün sonra radikula, 3-4 gün sonra plumula ve 7-9 günde ilk kök ve yan kökler görülmüştür. Bilindiği gibi zeatin hormonu doğal bir hormondur ve *Zea mays* tohumlarından elde edilir. Bitki bunu ürettiği için buna gerek kalmamıştır.

Bir süs bitkisi olan bitkimiz 8 gün sonunda kavanoza aktarılacak duruma gelmiştir. Kavanozlara aktarma işlemi IAA (1.0mg/lit) + KIN (1.0mg/lit) + MS besiyeri olan kavanozlardaki bitkiler IAA (1.0mg/lit) + MS besiyeri olan kavanozlardaki bitkilere göre daha yavaş bir gelişim gözlenmiştir. Bunun nedeni doğal olan IAA ile sentetik bir sitokin olan KIN arasında oransal konsantrasyondur. Bu iki hormon göz ve kök teşekkülünde farklı etkiler yapar (Tanrıverdi, 1993). Bitkimizde yalnızca IAA içeren kavanozdaki fiducikler çok fazla yandal oluşması ve apikal dominans olması sebebiyle daha kısa gelişmişlerdir. Bu olay sitokinlerin yan gözlerde büyümeyi teşvik ettiğini göstermektedir.

İlk embriyoların gelişme ortamı karanlıkta 25°C ısı uygulaması, kavanozlara aktarıldıktan sonra 25°C ısı uygulaması 12 saat ışık 12 saat karanlık nötr fotoperi-

yot uygulaması yapılmıştır. Bitkimizde sağlıklı bir gelişim, köklenme ve farklılaşma olaylarının 8 gün gibi kısa bir sürede ve 12 saat ışık, 12 saat karanlık fotoperiyod uygulanması sonucunda fidiciklerin gelişimi çok iyi sonuçlar vermiştir.

Gomphrena globosa bitkilerinin gelişiminde hiç kontaminizasyon olmaması ve %100 hayatta kalma oranı tespit edilmiştir. *Capsella bursa-pastoris* ile yapılmış çalışmada hayatta kalma oranı %90 olarak tespit edilmiştir (Risuen, 1952).

Embriyo kültür tekniği uygulanan *Gomphrena globosa* bitkisi yapılan diğer çalışmalara göre daha kısa sürede daha sağlıklı ve kontaminizasyonsuz bir gelişme göstermiştir. Buda sadece kısa sürede sağlıklı bitki yetiştirme değil, bundan sonraki bilimsel çalışmalarda da bu bitkiyi in vitro şartlarda kullanabileceğimiz fikrini ortaya koymuştur.

Tablo 1. Murashige & Skoog (MS) Besiyer.

| Makro Elementler | Tam (mg/lt) |
|---|-------------|
| NH ₄ NO ₃ | 1650 |
| KNO ₃ | 1800 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 440 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 370 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 |
| Na ₂ Edta | 37.5 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 |
| Mikro Elementler | |
| H ₃ BO ₃ | 6.2 |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 22.3 |
| ZnSO ₄ ·4H ₂ O | 8.6 |
| KI | 0.86 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 |
| CuSO ₄ ·7H ₂ O | 0.025 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.025 |
| Organik Bileşikler | |
| Sucrose | 30000 |
| Agar | 10000 |
| Glycines | 2 |
| Inositol | 100 |
| Nikotinik asit | 0.5 |
| Pridoksin-HCl | 0.5 |
| Thiamin-HCl | 0.1 |

Tablo 2. Komple Sıvı Besin Çözeltisi.

| Makro Elementler | gr/lt saf su |
|---|--------------|
| Ca ₃ (PO ₄) ₂ | 0.5 |
| CaSO ₄ | 0.5 |
| MgSO ₄ | 0.5 |
| NaCl | 0.5 |
| KNO ₃ | 0.5 |
| FeCl ₃ | 0.5 |
| İz Elementler | cc/lt saf su |
| NH ₄ MoO ₄ | 1.0 |
| CuCl ₂ | 1.0 |
| MnCl ₂ | 1.0 |
| Na ₂ BO ₃ | 1.0 |
| ZnCl ₂ | 1.0 |

KAYNAKÇA

- Escalant, J.V. (1994). Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa sp.*), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 30, 181-186.
- Etienne, H. (1997). Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea Brasiliensis* (Müll. Arg) using the temporary mersion technique, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 33, 81-87.
- Franz, P.F. (1988). *Cytodifferentiation during callus initiation and somatic embryogenesis in Zea mays L.* WAU dissertation no. 1238. <<http://www.bib.wau.nl/abstracts/ab1238.html>>.
- Letham, D.S. (1971). Regulators of cell division in plant tissues XII. A cytokinins bioassay using excised radish cotyledons. *Physiol. Plant*, 25, 391.
- Morel, G. (1960). Producing virus-free Cymbidiums. *Amer. Orchid. Soc. Bul.*, 23, 2.
- Morel, G. (1963). *La culture in-vitro du meristeme apical de certains Orchidacees*, C. R. Acad. Sci. Paris, D., 256, 4955-4957.
- Palavan, N. (1993). *Bitki Büyüme Maddeleri*, İst. Üniv. Yayınları, No:3677, ss.44-51, İstanbul.
- Reinert, J. (1971). Determination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota*, In : *Les Culture de Tissus des Plants*. Paris: *Colloques International aux du C.N.R.S.*, 193, 261-268.

- Risuen, A. (1952). In vitro studies of the embryos of *Capsella bursa-pastoris*, *Acta Bot. Neerl.*, 1, 157-200 .
- Snellenberger, G.A. (1998). *Rose Embryo Culture*. 8.Nov.1998. *Plant Tissue Culture*, <www.plant-tc.umn.edu>.
- Tanrıverdi, F. (1993). *Çiçek üretim tekniği*, ss.111-114, İstanbul.
- Teisson, C. ve Alvard, D. (1998). In vitro propagation of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion, *Conf. Potato seed production by tissue culture*, Brussels, Cost 822, European Commission.
- White, P.R. (1932). Plant tissue cultures preliminary report of result obtained in the culturing of certain plant meristems. *Arch. Exp. Zellforsch*, 12.
- Akman, Y. ve Darıcı, C. (1998). *Bitki Fizyolojisi*, ss.445-449, Ankara.



Banu Aytül Aslanargun, 1968 yılında Babaeski’de doğdu. 1989 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden lisans, 1992 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’ndan Yüksek Lisans ve 1997 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’ndan Doktora derecesini aldı. 1992 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi ve 1997 yılında da Yardımcı Doçent oldu. Halen Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde öğretim üyesi olarak görev yapmaktadır.



Güneş Bayraktar, 1975 yılında Burhaniye’de doğdu. 1999 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden lisans derecesi aldı. 1999 yılından bu yana Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine devam etmektedir.