



Araştırma Makalesi

Siklamende Türler Arası Melezleme Olanaklarının Araştırılması

Mehmet TÜTÜNCÜ^{1*}, Tolga İZGÜ², Başar SEVİNDİK³, Yeşim YALÇIN MENDİ⁴

ÖZ

Siklamen Myrsinaceae familyasına ait özellikle Akadeniz havzasına dağılmış 23 tür ile yayılış göstermektedir. Toplamda 23 türün 12'si Türkiye'de doğal olarak yayılış göstermektedir ve 6 tanesi endemiktir. Türler arası melezleme yeni çeşitler elde etmek için önemli bir tekniktir. Siklamen gibi türlerde melezleme sonrası abortif hibrid embriyo oluşumuna neden olan problemler bulunmaktadır. Melezleme sonrası oluşan abortif embriyoların rejenerasyonu ve yeni hibridlerin elde edilmesi amacıyla embriyo kurtarma tekniği uygulanmaktadır. Bu çalışmada ticari siklamen türü olan 'Maxora', Türkiye'de doğal olarak yayılış gösteren *C. persicum* ve *C. coum* türlerinde karşılıklı melezleme yapılmış ve embriyo kurtarma amacıyla tozlamadan 35 gün sonra ovül kültürü yapılmıştır. Çiçek tomurcuğu içerisinden ovüller izole edilmiş ve ½ MS + 2.0 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP ve ½ MS + 0.4 mg/l BA + 0.4 mg/l GA₃ içeren besi yerlerinde kültüre alınmıştır. Eksplantlardan ½ MS 2.0 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP besi yerinde %30 oranında kallus oluşumu sağlanmıştır. Elde edilen kalluslardan embriyoya dönüşüm oranı %19, bitkicik oluşumu ise %12 olarak belirlenmiştir. *In vitro* rejenerasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bitkilerde aklimatizasyon oranı %29.41 olmuştur.

Anahtar kelimeler: *C. persicum*, *C. coum*, ovül, tozlanma, dölleme

Investigation on Interspecific Hybridization in Cyclamen Species

ABSTRACT

Cyclamen sp., belongs to Myrsinaceae family, contains 23 species especially across over the Mediterranean basin. A total of 23 species 12 of them growing naturally in Turkey and 6 of them are endemic. Wide cross is an important technique for obtaining new cultivars. In some species such as Cyclamen crossing barriers could be emerged after wide crossing due to abortion of the hybrid embryos. To regenerate the abortive embryos after crossing, embryo rescue technique are applied for obtaining new varieties. In this study, commercial variety of the *C. persicum* var. Maxora F1 and *C. coum* grown naturally in Turkey were crossed and *in vitro* ovule cultures were performed 35 day after pollination for the embryo rescue. Ovules were dissected and cultured on ½ MS + 2.0 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP and ½ MS + 0.4 mg/l BA + 0.4 mg/l GA₃. Callus regeneration was derived at ½ MS + MS 2.0 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP with response to 30%. It was determined that embryo regeneration ratio was 19% and plantlets regeneration was 12%. After acclimatization of plantlets, survival ratio was determined as 29.41%.

Keywords: *C. persicum*, *C. coum*, ovule, pollination, fertilization

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0003-4354-6620, 0000-0003-3754-7694, 0000-0002-1448-6617, 0000-0002-4587-5156

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 07.12.2020

Kabul Tarihi: 21.12.2020

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 55270, Atakum, Samsun, Türkiye

² National Research Council of Italy (CNR), IBE/Institute of BioEconomy, 50019, Florence, İtalya

³ İzmir Demokrasi Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Park ve Bahçe Bitkileri Bölümü, İzmir, Türkiye

⁴ Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana, Türkiye

*E-posta: mehmet.tutuncu@omu.edu.tr

Siklamende Türler Arası Melezleme Olanaklarının Araştırılması

Giriş

Türkiye, süs bitkisi potansiyeli yüksek, bitkisel genetik kaynaklar bakımından oldukça zengin bir ülkedir. Ülkemizde 15.276 bitki türü yayılış göstermektedir ve bu türlerin 4.080 tanesi endemiktir. Ülkemizde yayılış gösteren türlerden 1286 tanesi nadir ve tehlike altında türler olarak rapor edilmiştir. Ayrıca ülkemizde daha önceden yayılış gösteren 12 bitki türünün ise soyu tükenmiştir (Kurt ve ark., 2019). Türkiye biyoçeşitlilik açısından oldukça avantajlı bir ülke olmasına rağmen biyoçeşitliliğin korunması ve sahip olduğumuz genetik materyallerimizin ekonomiye kazandırılması sınırlı kalmıştır. Bu zengin bitkisel biyoçeşitlilik içerisinde geofitler önemli bir yere sahiptir. Türkiye’de doğal olarak yayılış gösteren geofitlerin sayısının 500’ün üzerinde olduğu bilinmektedir (Özhatay ve Byfield, 2005). Türkiye, süs bitkileri yetiştiriciliğinde uygun iklimsel ve coğrafi koşullara, pazar ülkelerine yakınlığa ve ucuz işgücüne sahip olması gibi nedenlerle önemli avantajlara sahiptir (Aka Kaçar ve ark., 2020). Bu nedenle doğal olarak yayılış gösteren geofitlerin süs bitkileri sektörüne kazandırılması gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Dünyada süs bitkisi olarak kullanılan en önemli geofitlerden biri de *Cyclamen* sp. türleridir. Siklamen dünyada 20’nin üzerinde tür ile yayılış göstermektedir. Özellikle Akdeniz havzasında yayılış gösteren bu tür Türkiye, Yunanistan, Lübnan, İsrail, Kıbrıs, Suriye ve Kuzey Afrika’nın bazı bölgelerinde doğal olarak yayılış göstermektedir. Süs bitkisi sektöründe yaygın olarak kullanılan siklamen türü *C. persicum* ve bu türden geliştirilmiş çeşitlerdir. Süs bitkisi olarak kullanılan siklamen çeşitlerinin atası olarak kullanılan *C. persicum* $2n=2x=48$ kromozoma sahiptir (Çürük, 2015). *C. persicum* türünde yeni çeşitlerin geliştirilmesi melezleme ıslahı ile klasik yöntemlerle yapılmaktadır. Doğada yabani siklamen türlerinin tohumları toprağa düştükten 2 yıl sonra çiçeklenmektedir. *C. persicum* türü ülkemizde Ocak ve Mayıs ayları arasında çiçek açmaktadır. Yabani siklamen türlerinde beyaz, pembe, açık pembe ve bölgesel mor renkli petallere sahip çiçekler bulunmaktadır. Kültür çeşitlerinde tohumdan

çiçeğe 12 ay geçmektedir. Kültür tiplerinde çiçeklerdeki petal uzunluğu 3 ile 7 cm arasında değişmektedir. Ayrıca ıslah süreci sonucunda elde edilen çiçeklerde tekli, çift çiçekli, kıvrımlı çiçek yapısı, beyaz, kırmızı, pembe, mor veya açık sarı renkli petaller elde edilmiştir (Grey-Wilson, 2002a; Takamura, 2007). Türkiye’de doğal yayılış gösteren siklamen türleri arasında *C. coum* soğuğa dayanıklılığından dolayı ıslah materyali olarak önemli potansiyel oluşturmaktadır. *C. coum* türü $2n=30$ kromozom sayısına sahiptir ve çiçekleri kasım ayının sonundan mayıs ayının ortalarına kadar devam etmektedir. Çiçek rengi açık ve koyu kırmızı olan bu türde beyaz çiçekler neredeyse yoktur (Sevindik, 2018; Çürük, 2013).

Türler arası melezleme gül, orkide, lilyum gibi birçok türde yeni çeşitlerin geliştirilmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Ishizaka 2008). *C. persicum*’un diğer türler ile melezlenmesi yüksek ekonomik öneme sahip yeni ıslah materyallerinin ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır (Uematsu, 1995; Ewald, 1996). Türler arası melezlemelerde döllenme sonrası gelişim bozuklukları meydana gelebilmektedir. Bu durum genelde melez kısırlığı olarak da karşımıza çıkabilmektedir. Türler arası melezlemeler meydana gelen embriyonun gelişim bozukluklarının önüne geçilmesi için embriyo kültürü tekniğinden yararlanılmaktadır. Embriyo kültüründe embriyolar tohumlardan ve tohum taslaklarından izole edilerek *in vitro* şartlarda kültüre alınmaktadır. Siklamende türler arası melezlemelerden sonra ovül kültürü tekniği kullanılarak farklı melez bitkilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Ishizaka ve Uematsu, 1990; Ishizaka ve Uematsu, 1992; Ishizaka ve Uematsu, 1994; Kobayashi ve Ogawa, 1997; Ishizaka, 1996; 2002; Yamashita ve Takamura, 2007). Yapılan çalışmalarda *C. persicum* türü ile doğal olarak yayılış gösteren farklı türler (*C. repandum*, *C. hederifolium*, *C. purpurascens*, *C. greacum*, *C. rohlfianum*, *C. africanum*, *C. ibanoticum*) melezlenmiştir.

Türler arası melezleme ıslahı ve ploidi ıslahı süs bitkilerinde son yıllarda yeni çeşitlerin geliştirilmesinde ve ara türlerin

Siklamende Türler Arası Melezleme Olanaklarının Araştırılması

oluşturulmasında kullanılan etkili bir tekniktir. Bu çalışma ile ülkemizde doğal olarak yetişen türlerin, türler arası melezleme olanaklarını araştırmak ve literatürde daha önceden rastlanmamış *C. coum* x *C. persicum* ve *C. persicum* C. *coum* melezlerini elde ederek süs bitkileri sektöründe yeni çeşitler geliştirmeye yönelik protokollerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitkisel materyal

Çalışma kapsamında ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren *C. coum* türü ve *Cyclamen persicum* türüne ait ticari Maxora F1 (Varinova / Hollanda) siklamen çeşidi kullanılmıştır.

Cyclamen persicum cv. Maxora F1

Büyük çiçekli kompakt F1 siklamen çeşidi olan Maxora, yaprak yaşlanmasına karşı toleranslı, homojen büyümeye sahiptir ve uygun ortamlarda kolayca üretilebilir. Hastaliksız ve yüksek çimlenme gücü olan tohumları vardır. Uzun süre çiçeklenme ve güçlü bitki yapısı, renk kaybına toleranslı olması iç mekan ve dış mekan süs bitkisi olarak kullanılmasında önemli bir unsurdur.

Cyclamen coum Mill.

Yumru, 2-5 cm çapında ve basık küre şeklinde, genellikle kuru ve çatlaklara sahiptir. Yapraklar dairesel veya yarı dairesel şekilde, 2.3-7.8 cm uzunlukta ve 2-2.8 cm genişlikte türe bağlı olmaksızın oldukça parlak, koyu yeşil veya grimsi yeşil ya da beyaz renklenmelere sahiptir. Korolla açık veya koyu kırmızı, pembe veya nadiren beyaz renkli; loplari kısa, küt ve genellikle 10 mm'den kısadır. Meyve, kapsül şeklindedir. Şubat-Mayıs aylarında çiçeklenen bu varyete, kızılçam ormanlarında, karışık ormanlarda ve kayalık tepeliklerdeki çalılıklar altında yetişir. Türkiye'de en yaygın olarak yetişen bu tür Trakya'da Istranca Dağlarından Karadeniz kıyısı boyunca Rusya sınırına, oradan da Kafkasya'ya uzanmaktadır. Güneyde Amanos dağları ve Osmaniye çevresinde ve

ayrıca Bilecik, Kütahya, Eskişehir, Samsun ve Bursa'da da yetişmektedir.

Bu çalışmada kullanılmış olan genotipler Ondokuz Mayıs Üniversitesi kampüsünden toplanmış ve bir popülasyon oluşturulmuştur.

Türler arası melezleme ve *in vitro* ovül kültürü

Türler arası melezleme çalışmaları kapsamında 50 adet *Cyclamen coum* ile 50 adet ticari siklamen çeşidi kullanılmıştır. Melezleme çalışmalarında her iki türde hem ana hem de baba olarak kullanılmıştır. Melezlemeler öncesinde donör bitkiden alınan anterlerden çiçek tozları elde edilmiştir. Bu amaçla henüz açmamış çiçek tomurcukları toplanmıştır. Toplanan çiçek tomurcuklarından anterler izole edilerek, yağlı kağıt üzerinde güneş ışığı altında bekletilerek anterlerin patlaması sağlanmıştır. Çiçek tozları güneş ışığı geçirmeyen kuru plastik kutucuklarda melezleme işlemine kadar saklanmıştır. Ana olarak kullanılan bitkide çiçekler, anthesis aşamasından 3-5 gün önce emasküle edilerek örtü materyali ile izole edilmiştir. Emaskülasyon yapılan çiçeklerde tozlama işlemi emaskülasyon yapılmayan çiçeklerin çiçek açım zamanına ulaştığı zamanda donör bitkiden alınan çiçek tozları ile tozlama işlemi yapılmıştır (Takamura, 2006). Melezlemeden 35 gün sonra, meyveler henüz tam olgunlaşmadan önce alınarak laboratuvara getirilmiştir. Yüzey sterilizasyon işlemi (20 dk. çeşme suyu altında bekletmeden sonra örnekler steril kabin içerisine alınmıştır ve 1 dk. %70'lik etil alkolde, 15 dk. ise %20 ticari hipokloritde (Domestos, Unilever) bekletilmiştir. Sonrasında steril saf su ile deterjan arınana kadar (3-5 defa) örnekler yıkanmıştır. Stereo mikroskop altında erken dönemde alınan meyveler içerisinden ovüller izole edilerek modifiye edilmiş MS besi ortamı içeren petrilere aktarılmış ve 25 °C'de karanlıkta kültüre alınmıştır. Kültüre alınan örnekler çimlenme başlangıcında büyütme odası koşullarında (16 saat fotoperiyodisite, 25±1°C'de) kültüre alınmıştır. Deneme planı Çizelge 1'de verilmiştir.

Siklamende Türler Arası Melezleme Olanaklarının Araştırılması

Çizelge 1. Deneme planı

Besi Ortamları	
K-Kontrol (½ MS)	10 petri x 10 eksplant
MS-A (½ MS + 2,0 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l 2IP)	10 petri x 10 eksplant
MS-B (½ MS + 0,4 mg/l BA + 0,4 mg/l GA ₃)	10 petri x 10 eksplant

Bitkiciklerin aklimatizasyonu

Yeterli miktarda olgunluğa erişen bitkicikler ilk olarak yetiştirme odalarında magentaların kapakları yarı açık şekilde bir hafta süre ile bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda magentaların kapakları tamamen açılarak bir hafta daha bu şekilde bekletilme işlemi gerçekleştirilmiştir. İki haftalık sürecin ardından bitkicikler yetiştirme ortamlarından çıkarılarak kök ve yumru kısımları musluk suyu ile yıkanarak besiyerinden tamamen arındırılmıştır. Kök ve yumruları sıvı fungusit (Benomyl etken maddeli) içerisine daldırılarak, otoklavda steril edilmiş perlit-torf (1:1) içeren viollere dikilmiş, kültürel bakım işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Deneme planı ve İstatistiksel Analizler

Deneme kapsamında her bir genotipten alınan çiçekler saksı numaralarına göre işaretlenerek hangi donör bitkiden geliştiği belirlenmiştir. *In vitro* embriyo kültürü denemelerinde 3 besi ortamı kullanılmıştır. Deneme 10 tekkerrür (10 petri) her tekerrürde (her petride) 10 eksplant olacak şekilde faktöriyel düzende tesadüf blokları deneme desenine göre yürütülmüştür. Elde edilen yüzde değerler hesaplandıktan sonra açılı transformasyonu uygulanarak verilerin analizi JMP (versiyon 5.01) paket programı ile yapılmıştır. Ortalamaların önem seviyeleri LSD (P<0.01) testi ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Çiçeklenme dönemine gelen *C. persicum* ve *C. coum* türlerinde balon aşamasında çiçeklerde emaskülasyon işlemi yapılmıştır. Çiçek tozu çıkartmak amacıyla anterler izole edilerek yağlı kâğıt üzerine alınmış 30±2 °C de bir gece bekletilerek polenler elde edilmiştir. Ertesi gün *C. persicum* x *C. coum* ve *C. coum* x *C. persicum* türlerarası melezlemeler yapılmıştır. Melezleme sonrasında tozlama işlemi yapılan

çiçekler işaretlenmiştir. Kontrolsüz tozlanmanın önüne geçmek için melezleme işlemi yapılmayan çiçekler uzaklaştırılmıştır. Tozlamadan sonra çiçek tomurcukları ve meyve tutumu takip edilmiştir. *C. coum* türünün ana olarak kullanıldığı kombinasyonda çiçek tomurcukları tozlanmadan 1 hafta kadar sonra kurumaya başlamıştır. Benzer şekilde ticari *C. persicum* F1 çeşidine ait çiçek tomurcuklarında da kurumalar tespit edilmiştir (Şekil 1). *C. coum* türünün ana ebeveyn olduğu kombinasyonda çiçeklerin neredeyse tamamı tozlamadan sonraki ilk 1-2 hafta içerisinde kurumuştur ve meyveye dönen çiçek tomurcuğu oranı %0.41 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle *C. coum* türünün ana ebeveyn olarak kullanıldığı kombinasyonda ovül kültürü denemeleri kurulamamıştır. Ticari siklamen çeşidinin ana ebeveyn olarak kullanıldığı kombinasyonda da benzer olarak çiçek tomurcuklarının bir kısmının kuruduğu gözlenirken, büyük bir çoğunluğunda ise çiçek tomurcuklarının canlı kaldığı ancak meyve tutumunun gerçekleşmediği gözlenmiştir. Ticari çeşidin ana ebeveyn olduğu kombinasyonda meyve tutma oranının %1.25 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2). Siklamen cinsi içerisinde klasik yöntemlerle türler arası melez bireylerin kromozom sayıları 2n= 20 olan *C. balearicum* x *C. repandum*, *C. creticum* x *C. repandum*, *C. balearicum* x *C. peloponnesiacum* melez kombinasyonları ile kromozom sayısı 2n=30 olan *C. coum* x *C. alpinum*, *C. libanoticum* x *C. pseudibericum*, *C. cyprium* x *C. libanoticum*, *C. cilicium* x *C. intaminatum* kromozom sayıları 2n=34 olan *C. africanum* x *C. hederifolium* türlerinden elde edildiği bildirilmiştir (Grey-Wilson, 2002b). Ancak klasik melezlemeler ile farklı kromozom sayılarına sahip özellikle *C. persicum* çeşitleri ile yabani siklamen türleri arasında henüz melez bireyler elde edilememiştir (Ishizaka, 2008).

Siklamende Türler Arası Melezleme Olanaklarının Araştırılması



Şekil 1. a: *C. coum* x *C. persicum* arasında tozlama işlemi, b: Tozlamadan 1 hafta sonra kuruyan *C. coum* çiçek tomurcukları, c: *C. coum*'da meyve tutumu, d: *C. persicum* x *C. coum* arasında tozlama işlemi, e: Tozlamadan 1 hafta sonra kuruyan ticari *C. persicum* çeşidine ait çiçek tomurcukları, f: ticari *C. persicum* çeşidinde meyve tutumu

Çizelge 2. Melezleme kombinasyonları ve kombinasyonlarda çiçek tomurcuğu gelişimi

Melez Kombinasyonu	TÇTS	KÇTS	GÇTS	MTO
<i>C. coum</i> x <i>C. persicum</i>	240	239	0	%0.41
<i>C. persicum</i> x <i>C. coum</i>	240	89	148	%1.25

TÇTS: Tozlanan çiçek tomurcuğu sayısı, KÇTS: Kuruyan çiçek tomurcuğu sayısı, GÇTS: Gelişimi duran çiçek tomurcuğu sayısı, MTO: Meyve tutma oranı

Türler arası melezlemelerde melez bireylerin oluşmasında döllenme öncesi ve sonrası bazı engeller başarısızlığa neden olmaktadır. Döllenme öncesinde polenlerin stigma üzerinde çimlenmemesi veya polen tüpü büyümesinin durması döllenmenin gerçekleşmemesine neden olmaktadır. Diğer taraftan, döllenme sonrasında ise zigotun gelişmemesi, endospermin dejenerasyonu sonucunda embriyo gelişimini destekleyecek yapıda bulunmaması türler arası melez bireylerin elde edilmesini engellemektedir (Uysal ve ark., 2007). Çalışmamızda, *C. coum* türünün ana ebeveyn olarak kullanıldığı durumda çiçek tomurcuklarının tozlama işleminden hemen

sonra kurumaya başlaması *C. persicum* türüne ait polenlerle tozlamının başarısız olduğunu düşündürmektedir. Ticari siklamen çeşidinin ana ebeveyn olarak kullanıldığı durumda ise her ne kadar ovaryum genişlemesinin görülmemesine rağmen çiçek tomurcuklarının canlılığının devam etmesi 3 farklı senaryoyu düşündürmektedir. 1. durumda çiçek tozları stigma üzerinde çimlenmemiş ancak çiçek tomurcuğunun reseptif kalma süresi uzun olduğundan canlılık devam etmiştir. 2. durumda polenler çimlenmiş ancak dişi borusu içerisinde gelişimi durmuştur. 3. durumda ise polen tüpü ovaryuma ulaşmış veya uyartım sağlamıştır. Ancak, tüm bu olasılıkların test

Sıklamende Türler Arası Melezleme Olanaklarının Araştırılması

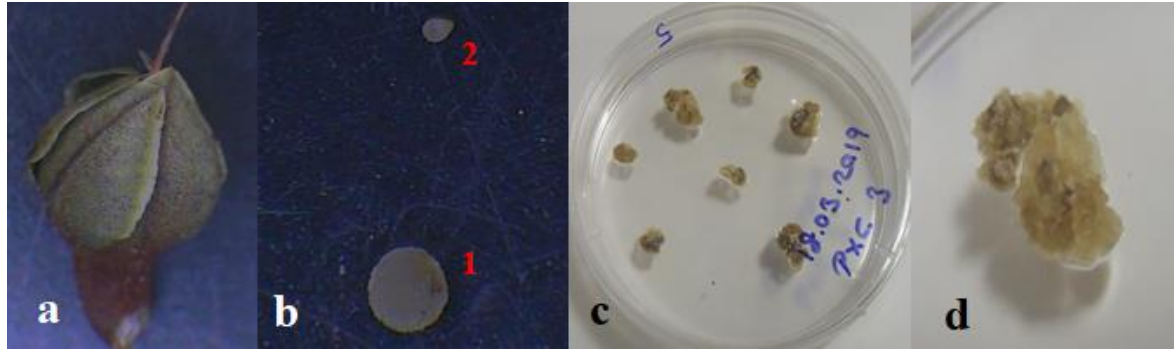
edilmesi için histolojik çalışmaların yapılması gereklidir. 'Maxora' F1 çeşidine ait çiçek tomurcuklarının *C. coum* çiçek tozları ile tozlanmasından 35 gün sonra canlılığı devam eden çiçek tomurcukları toplanarak laboratuvara getirilmiştir. Yüze sterilizasyonu gerçekleştirilen çiçek tomurcuklarından mikroskop altında ovül izolasyonu yaparak *in vitro* ovül kültürü denemeleri kurulmuştur.

Ovüller farklı besi yerlerinde rejenerasyonu sağlamak amacı ile kültüre alınmışlardır. MSB besi yeri olan 0.4 mg/l BA + 0.4 mg/l GA₃ içeren ½ MS besi yerinde ve kontrol grubu olan hormonsuz MS besi yerinde rejenerasyon gözlemlenmemiştir. MSA besi yeri olan ½ MS + 2.0 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l 2iP kültüre alınan ovüllerde %32 oranında kallus oluşumu gözlemlenmiştir (Çizelge 3; Şekil 2).

Çizelge 3. *In vitro* ovül kültüründe rejenerasyon oranları (%)

Besi Ortamları	Kallus	Embriyo	Bitki	Bitki Yaşama Oranı
Kontrol K- (½ MS)	0 b	0 b	0 b	-
MS-A (½ MS + 0.4 mg/l BA + 0.4 mg/l GA ₃)	0 b	0 b	0 b	-
MS-B (½ MS + 2.0 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP)	32.00 a (30.83)	19.00 a (20.16)	12.00 a (15.64)	% 29.41

LSD_{kallus}=10.64, LSD_{embriyo} = 10.43, LSD_{bitki} = 7.59 p<,0001* Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlerin açığı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

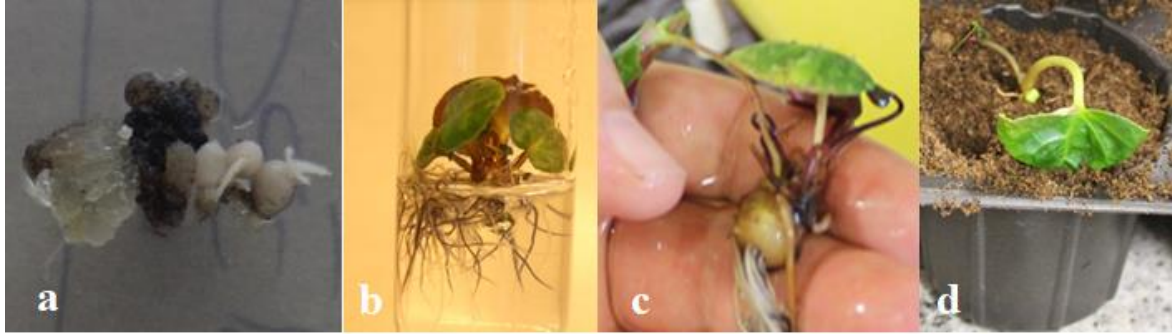


Şekil 2. Ticari sıklamende çeşidinde ovül kültürü, a: Tozlamadan 35 gün sonra toplanan çiçek tomurcuğu, b1: tozlamadan 35 gün sonra şişmiş tohum taslağı, b2: tozlamadan 35 gün sonra gelişmemiş tohum taslağı, c: kültüre alınan ovüllerden kallus oluşumu, d: kallusun yakından görünümü.

Elde edilen kallusların aynı koşullarda (25 °C'de karanlıkta) ve rejenerasyonu olduğu besi ortamında kültürleri devam ettirilerek kallusların embriyojenik yapıya dönmesi sağlanmıştır. Embriyojenik yapıya dönen kalluslar hormonsuz besi ortamına transfer edilmiş ve aydınlıkta (16 saat fotoperiyodisite, 25±1 °C'de) farklılaşmaları için kültüre alınmıştır. Farklılaşma ortamında kültüre alınan

kalluslardan kültürün ilerleyen safhalarında embriyo oluşumu (%19) gerçekleşmiştir. Oluşan embriyoların gelişmesiyle %12 oranında bitkiciğe dönüşüm gerçekleşmiştir. 17 bitkicik *in vitro* ortamda dış ortama aktarılacak büyüklüğe gelmiştir. Bu bitkiler dış ortama aktarıldıktan sonra yalnızca 5'tanesi hayatta kalmış ve bitkilerin yaşama oranı %29.41 olarak belirlenmiştir.

Siklamende Türler Arası Melezleme Olanaklarının Araştırılması



Şekil 3. Eksplantlardan bitkicik elde edilmesi, a: kalluslar üzerinde beyaz renkli embriyojenik yapıların oluşması, b: embriyoların farklılaşarak bitkiciğe dönüşümü, c: bitkiciklerin akan su altında besiyerinden arındırılması, d: bitkilerin aklimitizasyonu.

In vitro ovül kültürü denemelerinde sadece oksin ve sitokinin içeren ortamda rejenerasyon sağlanmıştır. Bu durum siklamende somatik embriyogenezis amacıyla yapılan ovül kültürü denemelerinde Winkelmann ve ark. (2006) ve Koçak ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmalarla benzerlik göstermiştir. Gelişimin sınırlı kalmasının ise genotip etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca siklamende farklı türlerde yapılmış ovül kültürü çalışmaları incelendiğinde Tütüncü ve ark. (2019), yabancı *C. persicum* türüne ait genotiplerde ovül kültürü çalışması sonucunda 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren B5 ortamında % 70 oranında kallus rejenerasyonu elde ederken, en yüksek embriyo uyartımının ve bitkicik oluşumunun aynı bitki büyüme düzenleyicisi içeren ½ MS ortamında tespit edildiğini bildirmiştir. İzgü ve ark. (2016) *C. cilicium* Boiss. et Heldr., *C. parviflorum* Pobed., *C. mirabile* Hildebr. ve *C. pseudibericum* Hildebr türlerinde somatik embriyo elde etmek amacı ile ovülleri kültüre almışlardır. *C. cilcium* türünde %12 embriyojenik kallus elde edilmişken *C. mirabile* türünde 2 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l 2iP içeren MS besiyerinde ovüllerden %12 oranında kallus oluşumları gözlenmiştir. *C. pseudibericum* türünde ise 2.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP içeren MS besiyerinde ovüllerin kültüre alınması ile %20 oranında rejenerasyon sağlanmıştır. İzgü ve ark. (2016)'nın ovül kültürü denemeleri sonucu *C. cilicium* Boiss. et Heldr., *C. parviflorum* Pobed., *C. mirabile* Hildebr. ve *C. pseudibericum* Hildebr

türlerinden elde etmiş oldukları kallusların embriyoya ve bitkiye dönüşüm oranlarının oldukça düşük olduğunu belirtmişlerdir. Embriyo kurtarma amacıyla yaptığımız ovül kültürü denemelerinde ise 2.0 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l 2iP içeren ½ MS besiyerinde %32 oranında rejenerasyon sağlanmıştır. Türler arası melezleme çalışmaları siklamen türlerinde özellikle *C. persicum* ile kromozom sayısı yakın olan ve doğal olarak yetişen diğer türler arasında yapılmıştır. Ticari *C. persicum* (Salmon Scarlet) ile *C. hederifolium* türlerinde yapılan melezlemelerden 35 gün sonunda alınan ovaryum örnekleri incelenmiş ve embriyoların oluştuğu gözlemlenmiştir. Elde edilen embriyolar 10-100 g/l sükröz içeren Murashige and Skoog (1962) (MS), White ve Nitsch (N) besiyerlerinde kültüre alınmış ve MS besiyerinde 249 bitki elde edilmiş, White ve N besiyerinde ise yalnızca 2 adet bitki elde edildiği saptanmıştır (Ishizaka, 2008; Ishizaka ve Uematsu, 1992). Ishizaka ve Uematsu (1992) elde ettikleri bitkiler içerisinde türler arası melezlerin olduğunu sitolojik analizler sonucunda ortaya koymuşlardır. Siklamen türlerinde yapılan çalışmalarda kullanılan bir diğer tür, kokulu özelliği ile bilinen *C. purpurascens* türüdür (Ishizaka ve Uematsu, 1995a; Ewald, 1996; Ishizaka ve Kondo, 2004; Kameari ve ark., 2010). *C. persicum* türünün "Schubert" ve "Pure White" çeşitleri ile melezlenmiş *C. purpurascens* türü melezlemeden 35 gün sonra hasat edilmiştir. MS besiyerinde kültüre alınan ovüllerden rejenerasyon edilen bitkilerin kısır oldukları

Siklamende Türler Arası Melezleme Olanaklarının Araştırılması

belirlenmiştir. *C. greacum* ve *C. persicum* türlerinin melezlenmesinde 35. güne kadar endosperm oluşumu gözlemlenmemiştir. Embriyolar melezlemelerden sonra 35. günde MS3 veya MSCM10 besi yerlerinde kültüre alınmış ve yalnızca MSCM10 besi yerinde üç bitki elde edilmiştir (Ishizaka, 2008). Ishizaka (2008) yapmış olduğu çalışmada *C. persicum* türü ile *C. repandum*, *C. libonaticum*, *C. colchicum*, *C. africanum*, *C. cypricum* türleri ile melezleme yapmıştır. Elde edilen hibritlerin kısır oldukları belirtilmiştir. Siklamen türlerinde daha önce farklı türler arası melezlemeler yapılmış fakat bu çalışma ile *C. coum* ve *C. persicum* türü arasında ilk kez türler arası melezlemeler yapılmıştır. *C. persicum* ticari çeşidinin ana, yabani *C. coum* türünün ise baba ebeveyn olarak kullanıldığı melezlemeler sonrasında yapılan *in vitro* ovül kültürü denemelerinde 17 adet bitki elde edilmiştir. Elde edilen bitkiler hormonsuz MS besi yerinde kendiliğinden kök yapısı oluşturmuştur. Siklamen türlerinde yapılan *in vitro* rejenejrasyon çalışmalarında köklenmenin hormonsuz MS besi yerinde gerçekleştiği farklı araştırmacılar tarafından da ortaya konulmuştur (Koçak ve ark., 2014; Sevindik ve ark., 2017; Sevindik 2018). Sevindik ve ark. (2017) yabani *C. persicum* ve ticari Melodi F1 çeşidinde ovül kültürü üzerine NAA ile birlikte iki farklı sitokinin (Kinetin, Benzyladenin) etkilerini incelemiştir. Ovül kültürü sonucu elde edilen bitkilerin hormonsuz MS besi yerinde kendiliğinden köklendiği belirtilmiştir. Hormonsuz MS besi yerinde köklendirilen bitkiler dış ortama aktarılmıştır.

Sonuç

Siklamen türleri özellikle *C. persicum* türünden elde edilmiş farklı ticari çeşitlerle süs bitkileri sektöründe uzun yıllardır kullanılan bir bitkidir. Siklamen ıslahında tür içi melezlemeler ile *C. persicum* türünden farklı çeşitler geliştirilmiş olsa da, günümüzde çeşitli stres koşullarına dayanıklı siklamenlerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Özellikle soğuğa dayanıklı *C. coum* türünün son zamanlarda Avrupa pazarına girmesi ıslah kriterlerine farklı bir yön vermiştir. Türler arası melezleme tekniği, birçok farklı türde yeni çeşit geliştirmede

yaygın kullanılan bir yöntemdir. Siklamende türler arası melezlemeler özellikle *C. persicum* türünün yabani türler ile melezlenmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir. Günümüzde siklamene kokululuk, biyotik ve abiyotik strese dayanıklılık gibi farklı özellikler kazandırmak için türler arası melezleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Türler arası melezlemelerden sonra meydana gelen embriyolar ise ovül kültürü yöntemi ile bitkiye dönüştürülüp kullanıma sunulmuştur. Bu çalışmada *C. coum* ve ticari *C. persicum* çeşidi olan Maxora F1 melezlenmiş olgunlaşmamış tohum taslakları içerisinde oluşan embriyolar MS besi yerinde kültüre alınmış ve bitkiler elde edilmiştir. Ancak, ilerleyen çalışmalarda ve benzer çalışmalarda elde edilen bitkilerin türler arası melez birey olup olmadıklarının sitolojik veya moleküler yöntemlerle belirlenmesi gereklidir. Çünkü, siklamen gibi doğrudan embriyo kurtarmanın teknik olarak mümkün olmadığı ve bu sebeple ovül veya ovaryum kültürü yapıldığı türlerde zigot gelişip büyüyebileceği gibi bitkilerin somatik embriyogenesis yolağından rejenerasyonu da mümkündür.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi BAP birimince desteklenmiştir (Proje No: FBA-2018-10668).

Kaynaklar

- Curuk, P., Sogut, Z., Bozdogan, E., Izgu, T., Sevindik, B., Tagipur, E. M., Da Silva, J. A. T., Serçe, Kaçar Y. A., S., Mendi, Y. Y. (2015) Morphological characterization of *Cyclamen* sp. grown naturally in Turkey: Part I. *S Afr J Bot* 100, 7-15.
- Ewald, A. (1996) Interspecific hybridization between *Cyclamen persicum* Mill, and *C. purpurascens* Mill. *Plant Breed* 115: 162– 166.
- Grey-Wilson, C. (2002a) Sprenger's alpine cyclamen. *Plantsman* 1(3):173-177.
- Grey-Wilson, C. (2002b) *Cyclamen* (A Guide For Gardeners, Horticulturists And Botanists). B.T. Bastsford, England.
- Ishizaka, H., Uematsu J. (1990) Production of interspecific hybrids between *Cyclamen*

Siklamende Türler Arası Melezleme Olanaklarının Araştırılması

- persicum Mill. and *C. repandum* Sibth. Sm. through ovule culture. *Jpn J Breed* 40 (suppl 1): 60–61.
- Ishizaka, H., Uematsu, J. (1992) Production of interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton by ovule culture. *Jpn J Breed* 42: 353–366
- Ishizaka, H., Uematsu, J. (1994) Amphidiploids between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton induced through colchicine treatment of ovules *in vitro* and plants. *Breed Sci* 44: 161–166.
- Ishizaka, H., Uematsu, J. (1995a) Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. produced by ovule culture. *Euphytica* 82: 31–37.
- Ishizaka, H., Uematsu, J. (1995b) Amphidiploids between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. induced by treating ovules with colchicine *in vitro* and sesquidiploids between the amphidiploid and the parental species induced by conventional crosses. *Euphytica* 86: 211–218.
- Ishizaka, H., Yamada, H., Sasaki, K. (2002) Volatile compounds in the flowers of *Cyclamen persicum*, *C. purpurascens* and their hybrids. *Sci Hort* 94: 125–135.
- Ishizaka, H. (2008) Interspecific hybridization by embryo rescue in the genus *Cyclamen*. *Plant Biotechnol* 25: 511–519.
- Ishizaka, H., Kondo, E. (2004) Production of amphidiploid of tetraploid *Cyclamen persicum* and tetraploid *C. purpurascens* by ovule culture. *J Japan Soc Hort Sci* 73 (Suppl. 2): 207.
- İzgu, T., Sevindik, B., Çürük, P., Şimşek, Ö., Kaçar, Y. A., da Silva, J. A. T., Mendi, Y. Y. (2016) Development of an efficient regeneration protocol for four *Cyclamen* species endemic to Turkey. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 127(1), 95-113.
- Kaçar, Y. A., Dönmez, D., Biçen, B., Erol, M. H., Şimşek, Ö., Mendi, Y. Y. (2020) Micropropagation of *Spathiphyllum* with Temporary Immersion Bioreactor System. *TURJAF* 8(5):1195-1200.
- Kameari, N., Kondo, E., Nakayama, M., Tanikawa, Morita, N., Kurihara, Y. Y., Saotome, T., Ishizaka, H. (2010) Analysis of flower pigments and volatile compounds of hybrids between yellowflowered cultivar (*Cyclamen persicum*) and fragrant wild species (*C. purpurascens*). *Breed Res* 12 (Suppl. 1): 53.
- Kocak, M., Izgu, T., Sevindik, B., Tutuncu, M., Curuk, P., Simsek, O., Aka Kaçar Y., Teixeira da Silva J., Mendi, Y. Y. (2014) Somatic embryogenesis of Turkish *Cyclamen persicum* Mill. *Sci Hort* 172: 26-33.
- Kurt, O., Çelik, N., Göre, M., Kurt, H. (2019) Threats to Biodiversity Bio-Trafficking in Turkey. *TURJAF* 7(2):46-51.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15(3):473-497.
- Nitsch, J. P. (1951) Growth and development *in vitro* of excised ovaries. *Amer J Bot* 38:566–577.
- Özhatay, N., Byfield, A. (2005) Türkiye'nin 122 Önemli Bitki Alanı, Doğal Hayatı Koruma Vakfı, İstanbul.
- Sevindik, B. (2018) Siklamende anter ve ovül kültürü yöntemleri ile haploid bitkilerin elde edilmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sevindik, B., İzgü, T., Tütüncü, M., Çürük, P., Söğüt, Z., Mendi, Y. Y. (2017) Effects of different plant growth regulators on ovule culture of Turkish cyclamen persicum mill. and commercial variety “Maxora F1”. *Alatarım* 16(2):1-9.
- Kobayashi, N. Ogawa, K. (1994) Production of interspecific hybrids between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. rohlfsianum* Aschers. or *C. libanoticum* Hildebr. by ovule culture. *Breed Sci* 44(2):85.
- Takamura, T., Imose, Y., Nagita, Y., Tanaka, M. (2006) Effects of nitrogen source and gellan-gum concentration in medium on plant regeneration from somatic embryos in *Cyclamen* (*Cyclamen persicum* Mill.). *Journal of Society of High Technology in Agriculture* 18(2):105-109.

Siklamende Türler Arası Melezleme Olanaklarının Araştırılması

- Takamura, T. (2007) *Cyclamen: Flower Breeding and Genetics*. N. O. Anderson (Ed.), 459-478, Springer, Dordrecht.
- Uysal, H., Seyis, F., Kurt, O. (2007) Tarla bitkilerinde melezleme bariyerlerinin aşılmasında alternatif bir yöntem: embriyo kültürü. *Anadolu J Agr Sci* 22(1):116-122.
- Tütüncü, M., Özcan, M., Mendi, Y. Y. (2019) Bazı siklamen türlerinde farklı doku kültürü ortamlarının gynogenesis üzerine etkileri. *Anadolu J Agr Sci*, 34(3):239-249.
- White, P.R. (1963) *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. Roland Press, New York.
- Winkelmann, T. (2010) Clonal propagation of *Cyclamen persicum* via somatic embryogenesis: In *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. J. S. Mohan, S. J. Ochatt (Ed.), 281-290, Humana Press.
- Yamashita H, Takamura T (2007) Production of interspecific hybrids between *Cyclamen persicum* and *C. colchicum*, or *C. persicum* and *C. mirabile*. *Hort Res (Japan)* 6(2): 587.