

	SAKARYA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ SAKARYA UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE		
	e-ISSN: 2147-835X Dergi sayfası: http://www.saujs.sakarya.edu.tr		
	Geliş/Received 01.11.2017 Kabul/Accepted 17.04.2018	Doi 10.16984/saufenbilder.348480	

Spathiphyllum'un in vitro mikro çoğaltımı üzerine şeker konsantrasyonlarının etkileri

M.Ercan ÖZZAMBAK^{*1}, Emrah ZEYBEKOĞLU¹, İzzet GÜN¹, Tuğba KILIÇ^{2*}

ÖZ

Fotoototrofik mikro çoğaltım, doku kültüründe gereksinim duyulan karbonun karbondioksitten karşılanmasıdır. Bu yöntemin temeli besin ortamına organik karbon kaynağı olarak şekerin ilave edilmemesi veya konsantrasyonunun azaltılması koşuluna dayanmaktadır. Fotoototrofik mikro çoğaltım, doku kültürünün en önemli sakıncaları olan vitrifikasyon, dış koşullara adaptasyon güçlüğü, yoğun ışığı kullanımı, yüksek maliyet, kontaminasyon riski gibi sorunları azaltabilmekte ya da ortadan kaldırmaktadır. Bu çalışma ile *Spathiphyllum wallisii*'nin farklı şeker konsantrasyonları içeren besin ortamlarındaki sürgün çoğaltma-köklendirme kabiliyetinin in vitro fotoototrofik çoğaltıma uygunluk durumu belirlenmeye çalışılmıştır. Sürgün çoğaltma denemesinde 8-10 mm uzunluğunda iki yapraklı in vitro sürgünler MS + 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ortamında; köklendirme denemesinde ise 25 mm boyundaki in vitro sürgünler MS + 0.1 mg/l NAA ortamında kültüre alınmış olup; her iki ortam da 0, 10, 20, 30 g/l konsantrasyonlarında şeker içermektedir. Sürgün çoğaltma aşamasında, çoğalma oranı, kardeş sürgün adedi ve uzunluğu, sürgün yaş ağırlığı, yaprak renk değerleri ve gelişme puanı bakımından şekerli (10, 20, 30 g/l) ve şekerli (0 g/l) ortamlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur. 10, 20, 30 g/l şeker konsantrasyonlarında çoğalma sırasıyla 4.4, 4.6, 5.4 sürgün/eksp., 0 g/l şeker konsantrasyonunda 0.7 sürgün/eksp. olarak gerçekleşmiştir. Köklendirme aşamasında da ortamda şeker bulunması incelenen özellikler üzerine pozitif yönde etki göstermiştir. 20, 30 g/l şeker konsantrasyonlarında köklenme oranı %100 olup; kök sayısı sırasıyla 16.1-8.8 adet/eksp., yaş kök ağırlığı ise 518.9-440.6 mg olarak belirlenmiştir. Bu çalışma koşullarında fotoototrofik mikro çoğaltmanın tam olarak gerçekleşmediği; *Spathiphyllum*'un in vitro sürgün çoğaltma ve köklendirilmesi için besin ortamında 20 ya da 30 g/l konsantrasyonlarında şeker bulunması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Barış çiçeği, doku kültürü, fotoototrofik, besin ortamı, mikro sürgünler, sakkaroz

*m.ercan.ozzambak@ege.edu.tr

¹Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, İzmir

²Bozok Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Yozgat

Effects of sugar concentrations on in vitro micropropagation of spathiphyllum

ABSTRACT

Photoautotrophic micropropagation can be described as a tissue culture technique in which, all required carbon is supplied from carbon dioxide. Preparing the medium without or with low concentration of sugar, which is a source of organic carbon, is the main condition. Decreasing some problems as vitrification and contamination, lowering high input and labour costs and improving the acclimatization capacity of in vitro plantlets are the main advantages of photoautotrophic micropropagation. The present study was carried out to determine the compatibility of spathiphyllum for in vitro photoautotrophic micropropagation by proliferation and rooting ability of microshoots on different sugar concentrations. In shoot multiplication trial, micro shoots in 8-10 mm length with two leaflets were planted in MS + 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA medium and in rooting experiment shoots in 25 mm length were transferred on MS + 0.1 mg/l NAA. Both media prepared with four different sugar concentrations (0, 10, 20, 30 g/l). In multiplication stage, significant differences were found between medium with sugar and without sugar at proliferation rate, new shoot number/exp. and length, shoot fresh weight, leaf colour values and growth score parameters. 10, 20, 30 g/l sugar concentrations gave the highest proliferation rate with means of 4.4, 4.6, 5.4 shoots per explant and 0 g/l doses gave 0.7 shoot/exp. respectively. A positive relationship was found between the increase in sugar concentration and rooting rate, root number, shoot fresh weight, root dry weight. 100% rooting percentage, 16.1-8.8 root number per explant 518.9-440.6 mg root fresh weight were verified for 20, 30 g/l sugar respectively. In this study conditions, photoautotrophic micropropagation was not occurred exactly and the presence of 20 or 30 g/l sugar concentrations was necessary for efficient in vitro proliferation and rooting of Spathiphyllum.

Keywords: Peace lily, tissue culture, photoautotrophic, nutrient medium, micro shoots, sucrose

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Doku kültürü tekniğinin ticari yönden en önemli uygulama alanı olan mikro çoğaltım yöntemi, genetik olarak üstün bitkilerin patojenden arı olarak kısa sürede, hızlı ve çok sayıda çoğaltılması, köklendirilmesi ve dış koşullara aktarılmasıdır [1]. Bitki yetiştiriciliği ve genetiği bakımından büyük önem taşıyan mikro çoğaltmada; yavaş büyüme, vitrifikasyon (hiperhidrisite), kontaminasyon, yoğun işgücü ve girdi kullanımı sonucu oluşan yüksek birim maliyeti, zayıf köklenme, dış koşullara aktarmada düşük tutum oranı gibi sorunlarla karşılaşmaktadır [2, 3]. Belirtilen bu olumsuzlukların büyük bir kısmı besin ortamının içeriğinden kaynaklanmaktadır. Besin ortamı; temel olarak saf su, makro-mikro elementler, vitaminler, karbonhidratlar, bitki büyüme düzenleyicileri ile jel yapıcı maddelerden oluşmaktadır. Aktif kömür tozu, organik bileşikler, poliaminler gibi birçok madde de gereksinim duyulduğunda ortama eklenebilmektedir [2, 4].

Doku kültüründe yeni dikilen eksplantın enerji ihtiyacı besin ortamına ilave edilen karbonhidratlardan ve diğer organik bileşiklerden karşılanmaktadır. Karbonhidratlar metabolik yoldan organizmaya girerek parçalanmakta ve hücre, sürgün, bitki büyümesi-gelişmesi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Biyolojik işlemlere katılarak köklenmeyi etkilemekte, hücrenin sahip olduğu suyu muhafaza ederek ozmotik potansiyelini düzenlemekte, vasküler ve destek dokuların gelişimine katkıda bulunmaktadır [5].

Besin ortamı için en çok kullanılan karbonhidrat sakkaroz olup; birçok bitkinin floem öz suyunda bulunması nedeniyle tercih edilmektedir [6, 7]. Doku kültüründe glukoz ve fruktoz, daha az kullanılan karbonhidrat seçenekleridir [8].

Sakkaroz ve diğer karbonhidratların konsantrasyonu in vitro gelişme üzerine etkili bir faktördür [4]. Besin ortamında sakkaroz konsantrasyonu genellikle %3 (ağırlık/hacim)'dir. Yüksek şeker konsantrasyonlarının gelişmeyi sınırlandırdığı hatta sonlandırdığı ve in vitro bitkiciklerin fotosentetik potansiyelini azalttığı [9], düşük şeker konsantrasyonlarının ise fotosentez hızını arttırdığı ileri sürülmektedir [10, 11].

Sakkaroz yerine yararlanabilecek en önemli seçenek olan beyaz şekerin (kristal toz şeker) %97.7'si sakkarozdur ve saf sakkarozla göre çok daha ekonomiktir [12]. Bu nedenle doku kültüründe saf sakkaroz yerine beyaz şeker kullanılmaktadır [4, 13]. Nitekim sakkaroz ve toz şekerin karşılaştırıldığı bir çalışmada toz şekerin sakkaroz yerine kullanılabileceği ve birim maliyetin %34.6 ile %51.4 oranında azaltılabileceği belirlenmiştir [14].

Şekerli besin ortamı, mikroorganizma faaliyeti için elverişli bir ortam olup; kontaminasyon riski çok yüksektir. Besin ortamının sterilliğinin sürdürülebilmesi için kültür kaplarının ağız kısımları mikroorganizma, akar gibi etmenlerin girişini engelleyecek şekilde dizayn edilmekte, kapatılmakta ve hatta bantlanmaktadır [3]. Sayılan bu işlemler gerekli olmakla birlikte kap içindeki nem oranının artmasına neden olmaktadır. Yüksek nem ise dokularda vitrifikasyona (camsılaşma), yetersiz fotosentez faaliyetine ve in vitro bitkiciklerin dış koşullara adaptasyonunda güçlüğe neden olmaktadır [15].

Son yıllarda yapılan araştırmalara bağlı olarak geliştirilen fotoototrofik mikro çoğaltma, in vitro bitkiciklerin daha yüksek seviyede fotosentez yapmaya yönlendirilmesi ile karakterize edilmektedir. Bu yöntemde dokuların gereksinim duyduğu karbon ve enerji fotosentetik aktiviteden ve şeker dışındaki diğer inorganik besinlerden karşılanmaktadır. Bitkicikler fotosentez yapmaya yönlendirildiklerinden dolayı da yaprak yapıları değişmekte, kütikula tabakası oluşmakta, stoma hareketliliği başlamakta ve sayılan yönleriyle dış koşullarda gelişen bitkilere benzediği için dış koşullara aktarmada tutum oranı artmaktadır. Fotoototrofik mikro çoğaltmada kültür kabı hacminin artırılması, kap iç-dış hava akımının (değişiminin) sağlanması, yüksek ışık şiddeti, kap içinde CO₂ konsantrasyonunun artırılması gibi farklı yöntemlerde bulunmakla birlikte; en basit uygulama besin ortamındaki şeker konsantrasyonunun optimum konsantrasyona göre azaltılması veya hiç kullanılmamasıdır [9, 16].

Spathiphyllum wallisii, anavatanı Kolombiya-Venezuela olan, düşük ışık şiddetine uyum sağlayabilen, doğrudan güneş ışığı almayan aydınlık, yarı gölge yerlerde yetişebilen, ticari olarak ise doku kültürü yöntemiyle çoğaltılabilen iç mekan bitkisidir [17]. Bu çalışma ile şeker konsantrasyonlarının *Spathiphyllum wallisii*'nin in vitro çoğaltması ve köklenmesi üzerine etkileri

belirlenerek, deneme koşullarında fotoototrofik kültüre uygunluğu aydınlatılmaya çalışılacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM (MATERIAL AND METHODS)

2.1. Bitkisel Materyal (Plant Material)

Denemede bitkisel materyal olarak 0.5 mg/l BA ile 0.1 mg/l NAA, %3 sakkaroz (şeker) ve 2.0 g/l gelrite içeren MS [18] ortamında gelişmekte-çoğalmakta olan ve sekiz haftada bir alt kültüre alınan *Spathiphyllum wallisii* sürgünleri kullanılmıştır.

Sürgün çoğaltma denemesinde 8-10 mm uzunluğunda iki yapraklı sürgünler; sürgünlerin köklendirme denemesinde ise 25-30 mm boyundaki sürgünler kullanılmıştır.

2.2. Besin Ortamları ve Kültür Koşulları (Nutrient Media and Culture Conditions)

Sürgün çoğaltma denemesinde sürgünler MS + 0.5 BAP + 0.1 NAA içeren besin ortamında kültüre alınmıştır. Sürgünlerin köklendirilmesi denemesinde ise sürgünler MS + 0.1 NAA ortamına transfer edilmiştir. Şekerin sürgün çoğaltması ve köklenmesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla da besin ortamlarına 0, 10, 20, 30 g/l (%0-1-2-3ağırlık/hacim) konsantrasyonlarında toz şeker ilave edilmiştir.

Bütün denemelerde, besin ortamlarının pH'sı otoklavlama işleminden önce 5.8'e ayarlanmış, daha sonra 2.0 g/l gelrite ilavesi yapılmıştır. Besin ortamlarının sterilizasyonu 121°C sıcaklıkta 15 dk süre ile otoklavda gerçekleştirilmiştir.

Kültür kabı olarak cam kavanozlardan yararlanılmış, kapaklar gaz alışverişi olacak şekilde hafif gevşek bırakılmıştır [3]. Kültüre alınmış eksplantlar, 1200 lüks ışık şiddeti altında, 16 saat/gün ışık periyodunda ve 25±2°C sıcaklıkta inkübe edilmişlerdir.

2.3. İncelenen Özellikler (Inspected Parameters)

Dikilen eksplant adedine göre, canlılık oranı, gelişme oranı, çoğalma ve köklenen eksplant oranları, gelişen eksplant başına oluşan yeni sürgün (kardeş sürgün) adedi, yeni sürgün uzunluğu, ana sürgün uzunluğu artım miktarı (değişimi), sürgün-kök yaş ağırlıkları, sürgün kuru ağırlık oranları, kök kuru ağırlık oranları, gelişme

puanı, yaprak renk değerleri (L*a*b) belirlenmiştir.

Ana sürgün uzunluğu artım değeri, sürgünlerin kültür sonu uzunluğu ile ilk dikim boyu arasındaki farkı ifade etmektedir. Ana sürgünün dip kısmında oluşan sürgünler yeni (kardeş) sürgün olarak dikkate alınmıştır.

Sürgün ve kök kuru ağırlıkları, yaş örneklerin 65°C sıcaklıkta 24 saat tutulup kurutulması ile elde edilmiş olup yaş ağırlık ile oranlanarak % kuru ağırlık olarak saptanmıştır.

Yaprak renk değerleri, Minolta LR 32.1 renk ölçer ile ölçülmüştür. Renk ölçüm değerleri L*a*b parametreleri ile ifade edilmiştir. L; 0-100 skalasında siyah-beyaz arasındaki yansımayı, ax'de yüksek değerler kırmızı; düşük değerler yeşil, bx'de ise yüksek değerler sarı, düşük değerler mavi rengi temsil etmektedir. Gelişme puanı 1 (zayıf), 2 (orta), 3 (iyi), 4 (çok iyi) skalasına göre değerlendirilmiştir [19].

2.4. Deneme Deseni ve İstatistik Değerlendirme (Experimental Design and Statistical Analyses)

Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekrarlı olarak yürütülmüş, her uygulamada 5 birey yer almıştır. İki kez tekrar edilen denemeden elde edilen veriler SPSS programında varyans analizine tabi tutulmuş, ortalamalar Duncan çoklu testi ile $p \leq 0.05$ seviyesinde karşılaştırılmıştır.

3. BULGULAR (RESULTS)

Spathiphyllum in vitro kültüründe, farklı şeker konsantrasyonlarına göre sürgün çoğaltma denemesinde ele alınan kriterlerden elde edilen ortalama değerler ve istatistiksel değerlendirme Tablo 1'de; köklendirme denemesinde ele alınan kriterlerden elde edilen ortalama değerler ve istatistiksel değerlendirme Tablo 2 ve Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 1. Sürgün çoğaltma aşamasında şeker konsantrasyonlarına göre sürgün çoğaltma ve gelişmesi

(Shoot proliferation and development according to sugar concentrations during shoot multiplication stage)

İncelenen Özellikler	Şeker konsantrasyonu (g/l)				
	0	10	20	30	
Canlı or. (%)	100	100	100	100	
Çoğ. or. (%)	45	100	100	100	
Ana sür. uz. artımı (mm)	9.7b	13.9b	27.9a	29.7a	
Yav.sür./eksp. (adet)	0.7b	4.4a	4.6a	5.4a	
Yav. sür. uz. (mm)	3.0c	10.4b	13.9b	14.0a	
Sür. yaş ağ. (mg)	130.2c	212.3b	320.9a	339.5a	
Sür. kuru ağ. or. (%)	0.06c	0.08b	0.09ab	0.10a	
Yaprak renk değerleri	L	34.4c	36.8c	39.5b	50.7a
	a	-16.3b	-14.9c	-15.2b	-16.7a
	b	34.1a	20.7c	22.3c	24.8b
Gelişme puanı	0.6c	2.7b	3.7a	3.8a	

Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

Tablo 2. Şeker konsantrasyonlarının köklenme ve kök parametreleri üzerine etkileri (The effects of sugar concentrations on rooting and root parameters)

İncelenen Özellikler	Şeker konsantrasyonu (g/l)			
	0	10	20	30
Köklenme or. (%)	65.1b	95.7a	100.0a	100.0a
Kök adet/eksp. (adet)	1.4d	6.1c	8.8b	16.1a
Kök uz. (mm)	6.2b	5.8a	25.3a	21.0a
Kök yaş ağ. (mg)	83.6b	247.6b	518.9a	440.6a
Kök kuru ağ. or. (%)	0.03c	0.04b	0.06a	0.06a
Kök puanı	0.0c	1.7b	3.8a	3.8a

Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

Tablo 3. İn vitro köklendirme aşamasında Spathiphyllum mikrosürgünlerinin sürgün ve yaprak özellikleri üzerine şeker konsantrasyonlarının etkileri (The effects of sugar concentrations on shoot and leaf parameters during in vitro rooting of Spathiphyllum microshoots)

İncelenen Özellikler	Şeker konsantrasyonu (g/l)				
	0	10	20	30	
Canlı or. (%)	100	100	100	100	
Ana sür. uz. artımı (mm)	8.1b	19.2b	21.4b	28.2a	
Sür. yaş ağ. (mg)	206.0c	244.9b	295.8a	294.3a	
Sür. kuru ağ. or. (%)	0.06b	0.08ab	0.09a	0.10a	
Yaprak renk değerleri	L	30.2b	31.8ab	33.4ab	36.4a
	a	-12.9b	-13.3b	-13.7b	-16.7a
	b	20.9	18.1	19.1	18.5
Sürgün puanı	1.5b	3.0a	3.6a	3.8a	

Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

3.1. Sürgün Çoğaltma Denemesi (Shoot Multiplication Experiment)

Tablo 1'e göre; dikilen eksplantlarda belirlenen canlılık oranı tüm ortamlarda %100 olarak gerçekleşmiş, sürgün çoğalma oranı ise yalnız şeker içeren ortamlarda %100 seviyesinde belirlenmiş ve şekersiz ortamda %45 olarak tespit edilmiştir.

Ana sürgün uzunluğu artım değerleri sürgün çoğalma oranına benzer şekilde şeker içeren ortamlarda şekersiz ortama göre daha yüksek değerlere ulaşmıştır. %2 ve %3 şeker içeren ortamlar aynı istatistik grup içinde yer alarak sırasıyla 27.9-29.7 mm olarak saptanmıştır. %3 şeker içeren ortamda eksplantların uzunluğu şekersiz ortama göre 3 kat artmıştır. Şekersiz ortamda en küçük sürgün uzunluğu artım değeri elde edilmiş olup %1 şeker konsantrasyonunda %2-3 şeker konsantrasyonlarına göre daha kısa boylu sürgünlerin varlığı saptanmıştır (Tablo 1).

Sürgün yaş ağırlık değerleri bakımından; şekerin %1 konsantrasyonunda yaş ağırlık 212.3 mg/sürgün iken, şekersiz ortamda 130.2 mg/sürgün olarak belirlenmiştir. Aynı istatistik grup içinde yer alan %2-3 şeker konsantrasyonlarında sürgün yaş ağırlıkları en yüksek değerlere (320.9-339.5 mg/sürgün) ulaşmış olup şekersiz ortama göre 2.5 kat artmıştır (Tablo 1).

Sürgünlerdeki kuru ağırlık oranı ise %3 şeker konsantrasyonunda 0.10 değeri ile en yüksek seviyeye ulaşmış, %2 şeker konsantrasyonu ile aynı istatistik grup içinde yer almıştır. Şekersiz ortamda kuru ağırlık oranı 0.06 seviyesinde belirlenmiş ve en düşük kuru ağırlık oranına sahip uygulama olmuştur (Tablo 1).

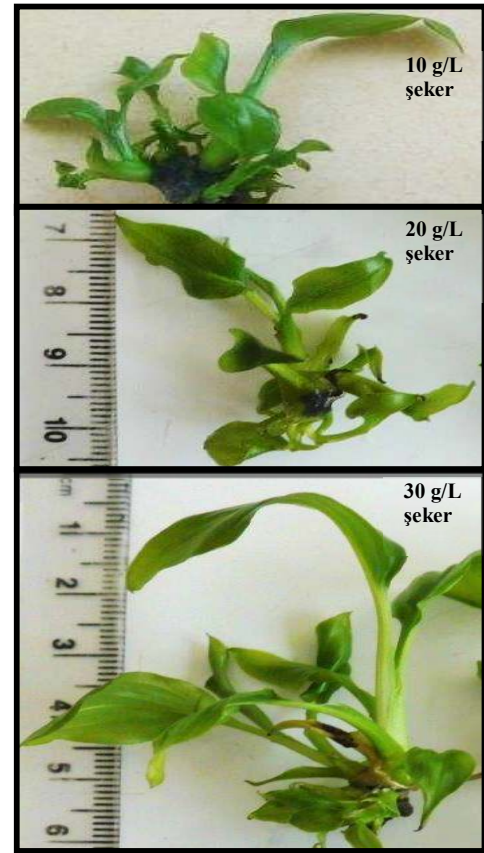
Eksplant başına oluşan yeni sürgün adedi, şekerli (%1-2-3) ve şekersiz ortamlar arasında $p \leq 0.05$ seviyesinde farklı bulunmuştur. %3 şeker konsantrasyonunun eksplant başına 5.4 adet kardeş sürgün ile en yüksek değer elde edilmiştir. %2 şeker konsantrasyonunda 4.4, %1 şeker konsantrasyonunda 4.5, %0 konsantrasyonunda ise 0.67 adet sürgün/eksplant değerlerine ulaşılmıştır (Tablo 1).

Yeni sürgün uzunluğu ölçümleri sonucunda elde edilen verilerde de en uzun yeni sürgünlerin 14.0 mm değeri ile %3 şeker konsantrasyonunda oluştuğu, en kısa sürgünlerin ise 3.0 mm değeri ile şekersiz ortamda meydana geldiği belirlenmiştir. %1 ve %2 şeker konsantrasyonları sırasıyla 10.4-

13.9 mm uzunluk değerleri ile aynı istatistik grup içinde yer almışlardır (Tablo 1).

Tablo 1'de verilen yaprak renk değerlerine göre L kriterinde %3 şeker konsantrasyonunda diğer konsantrasyonlara göre farklılık göstermiş, daha parlak yapraklara sahip olduğu belirlenmiştir. Yüksek değerlerin sarıyı ifade ettiği b değerlerinde, şekersiz ortamın ön plana çıktığı ve daha sarı rengin hakim olduğu saptanmıştır. Eksi olarak belirlenen a değerlerinde ise %3 şeker konsantrasyonu daha yeşil rengi temsil eden küçük değerleri vermiş ve istatistiksel anlamda da farklılık yaratmıştır.

Tüm bu kriterlere ilave olarak sürgün çoğaltma denemesinde oluşan sürgünler gelişme puanı bakımından değerlendirildiğinde, %2 ve %3 şeker konsantrasyonları sırasıyla 3.6-3.7 puanla aynı istatistik grup içinde yer almış olup; %1 şeker konsantrasyonu ve şekersiz ortama göre daha yüksek puanla değerlendirilmiştir (Tablo 1). Ayrıca %2 ve %3 konsantrasyonlarında ana sürgün gelişiminin ve çoğalmanın %1 şeker konsantrasyonuna ve şekersiz ortama göre daha iyi olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. 10, 20, 30 g/l şeker konsantrasyonlarında ana sürgün gelişimi ve yeni sürgün oluşumu (Main shoot development and new shoot formation at 10, 20, 30 g/l sugar concentrations)

3.2. Köklendirme Denemesi (Rooting Experiment)

In vitro sürgünlerin köklendirilmesi üzerine şeker konsantrasyonlarının etkisini belirlemek amacıyla yapılan denemede ele alınan kriterlerde de, sürgün çoğaltma aşamasında belirlenen eğilime benzer istatistiki gruplar ve farklılıklar saptanmıştır.

Dikilen explantlarda belirlenen canlılık oranı tüm ortamlarda %100 seviyesinde gerçekleşmiş; şekerli ortamlar ile şekerli ortam arasında bir farklılık tespit edilmemiştir (Tablo 3).

Tablo 2'ye göre köklenme oranı %2 ve %3 şeker konsantrasyonlarında %100'e ulaşmış olup %1 şeker konsantrasyonu ile aynı istatistik grup içinde yer almışlardır. Şekerli ortam ise %65.1 ile en düşük köklenme oranına sahip uygulama olarak belirlenmiştir.

Kök adedi, kök yaş ve kuru ağırlık oranlarında da benzer sonuçlar elde edilmiş; şekerli ortamlarda şekerli ortama göre önemli seviyede artışlar olduğu saptanmıştır. %3 şeker konsantrasyonunda kök adedi 16.1 adet/eksplant, kök uzunluğu 21.0 mm; kök yaş ağırlığı 440.6 mg ve kök kuru ağırlık oranı 0.06 olarak tespit edilmiş olup; 1.4 adet kök, 6.2 mm uzunluk, 83.6 mg yaş ağırlık ve 0.03 mg kuru ağırlık değerlerine sahip şekerli ortam ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. %3 şeker konsantrasyonu aynı zamanda kök uzunluğu, kök yaş ve kuru ağırlığı bakımından %2 şeker konsantrasyonu ile aynı istatistik grup içinde yer almıştır. %2 şeker konsantrasyonunda kök yaş ağırlığı (558.9 mg) en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Tablo 2).

Köklere ait gözlem puanlamasında, şekerli ortamların şekerli ortama göre istatistiksel anlamda önemli derece farklı olduğu ve daha yüksek puanlar aldığı görülmektedir. Şekerli ortamda kökle ilgili daha önce incelenen kriterlerin sonucuna benzer şekilde 0.0 puan gibi çok düşük bir değerlendirmeye ulaşılmış (Tablo 2); şekerli ortamda kök oluşumunun az ve gelişiminin de yetersiz olduğu Şekil 2'de görülmektedir. Şekerli (10, 20, 30 g/l) ortamlardaki kök ve sürgün gelişimi de Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 2. Şekerli ortamda köklenme ve kök gelişimi (Rooting and root development on sugar-free media)



Şekil 3. 10, 20, 30 g/l şeker konsantrasyonlarında köklenme, sürgün ve kök gelişimi (Rooting, root and shoot development at 10, 20, 30 g/l sugar concentrations)

Köklenme döneminde oluşan ana sürgün uzunluğu artımının şeker konsantrasyonlarına göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Şekerli ortamda büyüme 8.1 mm, %1 ve %2 şeker konsantrasyonlarında sırasıyla 19.2, 21.4 mm olarak saptanmış, %3 şeker konsantrasyonunda 28.2 mm değeri ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Tablo 3).

Köklenme dönemindeki sürgün yaş ağırlıkları bakımından %3 şeker konsantrasyonu 294.3 mg ile en yüksek değere ulaşmış olup; %2 şeker

konsantrasyonu ile arasında istatistiksel olarak farklılık belirlenmemiştir. En küçük sürgün yaş ağırlığı değeri 206.0 mg/sürgün değeri ile şekerli ortamdan elde edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3'den de anlaşılacağı üzere; köklenme döneminde oluşan sürgün kuru ağırlık oranları, çoğaltma denemesine benzer şekilde 0.06-0.10 değerleri arasında değişmiş, şeker konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak artış göstermiştir. %2 ve %3 şeker konsantrasyonları aynı istatistik grup içinde yer almıştır.

Köklenme döneminde oluşan yaprakların renk değerlerini incelediğimizde, sürgün çoğaltma denemesinden elde edilen sonuçlara yakın değerlerin bulunduğu, %3 şeker konsantrasyonunda yaprakların daha parlak beyaz (L=36.4) daha mavi yeşil (a=-16.7, b= 18.5), %0 şeker konsantrasyonunda ise yaprakların daha az parlak (L=30.2) ve daha sarı yeşil olduğu (a=-12.9, b= 20.9) sonucuna varılmıştır (Tablo 3).

Köklenme dönemine ait, sürgün gelişim puanı incelendiğinde şeker içeren ortamların aynı istatistik grup içinde bulunduğu ve şekerli ortama göre daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. En yüksek sürgün gelişim puanı %3 şeker konsantrasyonunda saptanmış olup; sürgün gelişim puanı şekerli ortam puanının 2.5 katı olarak değerlendirilmiştir. (Tablo 3).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ (DISCUSSION AND CONCLUSION)

Bu çalışma, şeker konsantrasyonlarının Spathiphyllum sürgünlerinin çoğaltma-gelişme ve köklenmesi üzerine etkilerinin belirlenmesi ile Spathiphyllum sürgünlerinin deneme koşullarında fototrofik mikro çoğaltma uygunluğunun ortaya konması amacıyla yapılmıştır. Bu hedef doğrultusunda, in vitro sürgünler çoğaltma ve köklendirme aşamaları için şekerli (0 g/l) ve şeker (10, 20, 30 g/l) içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Sürgün çoğaltma ve köklendirme safhalarında şekerli ve şekerli ortamlar arasındaki önemli farklılıklar yanında şekerli ortamlarda şeker konsantrasyonları arasında da farklılıklar belirlenmiştir.

Besin ortamında şekerin olamaması, hem çoğaltma hem köklendirme aşamasında dikilen sürgünlerin canlılık oranı dışında ele alınan bütün kriterlerini negatif yönde etkilemiştir. Canlılık oranının şeker konsantrasyonundan etkilenmediğini bildiren bir çalışma [20] ile

yukarıda belirttiğimiz sonuç benzerlik göstermektedir. Bu durumun canlılık oranının kültür başlangıcından iki hafta sonra saptanması ve kültüre alınan sürgün boyutlarının 10 mm'den büyük olmasından dolayı ileri geldiği düşünülmektedir.

Sürgün çoğaltma-geliştirme ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda çoğaltma oranı ve eksplant başına oluşan yeni sürgün oluşumu en önemli kriterlerdir. Bu çalışmada şekerli ortamda dikilen sürgünlerin %45'inde yeni sürgün oluşumu gözlenmiş olmakla birlikte, şekerli ortamların (10, 20, 30 g/l) %100'ünde yeni sürgün oluşumu gözlenmiştir. Alocasia bitkisinde ortamda şekerin bulunmaması durumunda çoğaltma oranının ve yeni sürgün oluşumunun azaldığını belirten bir çalışma ile elde ettiğimiz bulgular uyumludur [21]. Benzer şekilde Dendrobium orkidelerinde de şekerli besin ortamında bitki boyunun kısaldığı ve çoğaltma hızının düştüğü saptanmıştır [22].

Çalışmada şekerli ortamlarda şeker konsantrasyonunun artması ile birlikte ana sürgün uzunluğundaki değişimin artması, diğer bir ifade ile en uzun sürgünlerin 20 ile 30 g/l şeker konsantrasyonlarında saptanmış olması; Phalaenopsis orkidelerinde en uzun sürgünlerin 10, 20 g/l şeker konsantrasyonlarında elde edildiği bir çalışma ile kısmen [20], Dendrobium orkidesinde bitki boyunun şeker konsantrasyonunun artması ile pozitif olarak etkilendiğini gösteren diğer bir çalışma ile de [22] tam olarak uyumaktadır.

Şekerli ve şekerli ortamlar arasında çoğaltma katsayısı bakımından görülen bu farklılık köklendirme denemesinde köklenme oranı ve kök adedi kriterlerinde de ortaya çıkmıştır. Kök adedi bakımından şeker konsantrasyonunun artışına bağlı olarak daha pozitif sonuçlar elde edilmiş olup; çalışma sonuçlarımıza benzer olarak *Bilbergia zebrina* türünde in vitro kültüründe şeker konsantrasyonu artışına bağlı olarak kök adedinin arttığı belirlenmiştir [23].

Şekerin ortamda düşük konsantrasyonda olması çalışmada incelenen sürgün yaş ağırlığı, kök uzunluğu, kök yaş ve kuru ağırlığı gibi özellikler üzerine de olumsuz etkiler göstermiştir. İncir [19], japon armudu [24], *Pagestemon cahlin* [13] bitkileri ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçların elde edildiği bildirilmektedir.

Farklı bitkilerde yapılan çalışmalarda, ele alınan kriterlere, bitki türlerine ve denenen şeker konsantrasyonlarına göre elde edilen sonuçlar

arasında bazı farklılıkların olduğu görülmektedir. Gülde köklenme ve gelişme için 40, 50 g/l sakkarozun optimum konsantrasyon olduğu bildirilmesine [25] karşılık, japon armudunda ve muzda 30 g/l [24, 26], Phalaenopsis orkidesinde ise 10, 20 g/l şekerin [13] besin ortamına ilave edilmesi gerektiği öne sürülmektedir. Genel olarak şeker konsantrasyonunun %3 seviyesine göre azalması çoğaltmayı-gelişmeyi-köklenmeyi olumsuz yönde etkilemektedir [4]. Yürütülen bu çalışmada da benzer bir durumun oluştuğu, besin ortamında şeker konsantrasyonlarının 20, 30 g/l konsantrasyonuna göre azaltılması sonucu özellikle büyüme-gelişme ile köklenmenin negatif yönde etkilendiği belirlenmiştir. İn vitro çoğaltma, kök oluşumu ve büyüme yüksek enerji isteyen morfolojik değişimler olup; ortamda bazı metabolik maddeler özellikle de karbonhidratların bulunması durumunda gerçekleşmektedir [6]. Şekersiz ortamda çoğaltma ve köklenmenin az bir oranda gerçekleştiğini gösteren bu durum; şekerin gerekliliğini ve ortamdaki önemini vurgulayan bu araştırma sonuçlarını destekler ve açıklar niteliktedir.

Yapılan birçok çalışmada in vitro kültürde gelişmenin heterotropik olduğu ve yeterli fotosentetik aktivitenin yapılamadığı da vurgulanmaktadır [4, 15, 27]. Denemede şekersiz ortamda, sürgün ve kökte kuru madde oranının şekerli ortamlara göre daha az ve yaprak renklerinin daha açık, sarı renkli olması yetersiz fotosentezin belirtisi olabilir. Bu bakımdan in vitro bitkicikleri fotosenteze yönlendirecek yöntemlere gereksinim vardır.

Şekersiz ortam ile şekerli ortamlar arasında saptanan bu farklılığın yanında şeker konsantrasyonunun (10 g/l'den 30 g/l'ye çıkması) artması ile sürgün uzunluğunun, sürgün yaş ağırlığının, eksplant başına yavru sürgün adedinin, kök sayısının önemli derecede arttığı bulunmuştur. İn vitro çoğaltım ve köklendirme aşamasında yeterli ve kaliteli sayıda sürgün-kök oluşumu için, besin ortamına dışarıdan karbon kaynağı olarak %2-3 oranında şeker ilave edilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Yapılan bu değerlendirmelere bağlı olarak Spathiphyllum'un deneme koşullarında özellikle in vitro kültür odasında geçerli olan düşük ışık intensitesinde, şekere gereksinim duyulması nedeniyle, in vitro fotoototrofik çoğaltma ve köklendirme için tam olarak uygun olmadığı belirtilebilir. Buna rağmen şekersiz ortamda da çoğaltma ve köklenmenin olması bu bitkinin

fotoototrofik mikro çoğaltıma yönlendirilebileceğini göstermektedir. Farklı kültür koşullarında (yüksek ışık şiddeti ve yüksek CO₂ konsantrasyonlarında) farklı kültür kapları (havalanabilen, büyük hacimli) ile yürütülecek yeni denemeler ve yapılacak maliyet analizleri fotoototrofik mikro çoğaltıma uygunluğunun ve bu yöntemin sağlayacağı yararların belirlenmesine yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] I. Iliev, A. Gajdosova, G. Libiakov and S.M. Jain, "Plant micropropagation," in Plant Cell Culture: Essential Methods, M.R. Davey, P. Anthony, Ed. New York John Wiley & Sons, pp.1-23, 2010.
- [2] A. Gürel, Ş. Hayta, P. Nartop, M. Bayraktar, ve S. Fedakar, "Mikroçoğaltım," Bitki Hücre ve Organ Kültürü Uygulamaları, Ege Üniversitesi Yayınları, no. 58, İzmir, s.95-102, 2013.
- [3] S.D. Purohit, J.A.T. da Silva and N.Habibi, "Current approaches for cheaper and better micropropagation techniques," International journal of Plant Developmental Biology, vol. 5, no. 1, pp. 1-36, 2011.
- [4] R.L.M. Pierik, "In vitro culture of higher plants" ISBN. 90-2473531-9. Dordrecht- Netherlands, 1987.
- [5] T. Kozai, "Chapter I. Introduction," in Photoautotrophic (Sugar Free Medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System, T. Kozai, F. Afreen, S.M.A. Zobriyed, Ed. Springer, pp.19-31, 2005.
- [6] T.A. Thorpe, "Carbohydrate utilization and metabolism," in Tissue Culture in Forestry J.M. Bonga, D.J. Durzan, Ed. Springer Dordrecht, pp. 325-368, 1982.
- [7] T. Ahmad, N. A. Abbasi, I. A. Hafız and A. Ali, "Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock," GF-677 Pak. J. Bot., vol. 39, no.4, pp.1269-1275, 2007.
- [8] A.J. Ilczuk, K. Kubicec and K. Jacygrad, "The effect of carbon source in culture medium on micropropagation of common ninebark (P. opulifolius L.)," Mexim Diable D'or. Acta Sci. Pol. Horturum Cultus, vol. 12, no. 3, pp. 23-33, 2013.
- [9] T. Kozai and L. Kubota, "Concepts, definition, ventilation methods, advantages and disadvantage" in Photoautotrophic (Sugar Free Medium) Micropropagation as a New

- Micropropagation and Transplant Production System, T. Kozai, F. Afreen, S.M.A. Zobriyed, Ed. Springer, pp.19-31, 2005.
- [10] M. Cappellades, R. Lemeur and P. Debergh, "Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in Rosa cultured in vitro," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 25, no. 1, pp. 21-26, 1991.
- [11] C. Hdider and Y. Desjardins, "Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of in vitro cultured strawberry plantlets," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 1, no. 36, pp. 27-33, 1994.
- [12] Anonim, "Türk gıda kodeksi şeker tebliği," *Tebliğ No. 2006-40, Resmi Gazete No. 26268*, 2006.
- [13] K.M. Swamy, K.M. Snipta, S. Balasubramanya and M. Anuradha, "Effect of different carbon sources on in vitro morphogenetic response of Patchouli (*Pogostemon cahlin*)," *Journal of Phytology*, vol. 2, no. 8, pp.11, 2010.
- [14] P. Demo and Kuria, "Table sugar as an alternative low cost medium component for in vitro micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum L.*)," *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no. 15, pp. 2578-2584, 2008.
- [15] T. Kozai and Q.T. Nguven, "Photoautotrophic micropropagation of woody and topical plants," in *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, S.M. Jain, K. Ishii, Ed. Netherlands: pp. 757-781, 2003.
- [16] Y. Xio, T. Kozai, "Practical sugar-free micropropagation system using large vessels with forced ventilation," in *Transplant Production in the 21st Century*, C. Kubota, C. Chun, Ed. Kluwer Acedemics, Netherlands, pp. 266-273, 2000.
- [17] N. Oral, "Spathiphyllum," *İç Mekan Süs Bitkileri, TAV Yayınları*, No:14, s.168, Yalova, 1985.
- [18] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures," *Physiol Plant*, vol. 15, 473-497, 1962.
- [19] S.E. Doaa and M.S Mokhtar, "The impact of sucrose concentration on root growth and development in fig (*Ficus carica L.*) in vitro," *Assiut J. Agric. Sci.*, vol. 46, no. 6, pp. 67-75, 2015. [Online]. Available: from:<https://www.researchgate.net/publication/299791909>. [Accessed: 18-Aug-2017].
- [20] M. Zahara, A. Datta, P. Boonkorkaew and A. Mishra, "The effects of different media, sucrose concentrations and matural additivies on plantlet growth of Phalaenopsis hybrid 'Pink'," *Brazilian. Archives of Biology and Technology*, vol. 60, pp.1-15, 2017.
- [21] E.A. Jo, E.R.K. Tewari, E.J. Hahn and K.Y. Paek, "In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of Alocasia amazonica plantlets," *Plant Cell Tiss Organ Culture*, no. 96, pp. 307-315, 2009.
- [22] R. T. de Faria, F. N. Rodrigues, L. do V.R. Oliveira and C. Müller, "In vitro Dendrobium nobile plant growth and rooting in different sucrose concentrations," *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.22, n.4, p.780-783, 2004.
- [23] J.P.R. Martins, M. Pasqual, D.A. Martins and S.F. Riberia, "Effects of salts and sucrose concentration on in vitro propagation of *Bilbergia zebrine*," *Aust. J. of Crop Sci*, vol. 9, no.1, pp. 85-91, 2015.
- [24] M. Kadota and Y.Niimi, "Influences of carbon sources and their concentrations on shoot proliferation and rooting of 'Houi' Japanese pear," *Hortscience* vol.39, no.7, pp. 1681-1683, 2004.
- [25] N.S. Al-Khalifah, S. Hadi and F. Khan, "Influence of sucrose concentration on in vitro growth of five rose cultivars," *Plant Tissue Culture*, vol. 15, no. 1, pp. 43-49, 2005.
- [26] E.A. Morfeine, "Effect of sucrose and glucose concentrations on micropropagation of *Musa sp.cv. Grand Naine*," *Journal of Applied and Industrial Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 58-62, 2014.
- [27] R. Lembrechts, V. Verdoodt, M.P. De Proft and J. Ceusters, "Influence of sucrose concentration on photosynthetic performance of *Guzmania 'Hilda'*," *In Vitro. Acta Hortic.* vol. 1083, pp.403-408, 2015.