

***Spathaphyllum* (Sweet Chico)'nun *In vitro* Adventif Sürgün Oluşumunun Teşviki**

Şerife Evrim ARICI*

Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü/ ISPARTA
Alınış Tarihi:10.10.2011, Kabul Tarihi:15.11.2011

Özet: Bu çalışmada *Spathaphyllum* 'Sweet Chico'nun doku kültürü teknikleriyle klonal çoğaltım olanakları araştırılmıştır. *Spathaphyllum* 'Sweet Chico'nun kök meristemleri eksplant olarak kullanılmış ve eksplantlar BAP (1, 2, 4 ve 6 mg/L), NAA (0.2 ve 0.5 mg/L), ve IAA (0.2, 0.5 mg/L)'in değişik hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren Murashige-Skoog (MS) besi ortamında kültüre alınmıştır. Meristemlerde en fazla sürgün oluşumu eksplant başına 18 adet sürgün sayısı ile 0.2 mg/L NAA ile 4.0 mg/L BAP hormon kombinasyonunda gerçekleştiği gözlenmiştir. Bitkicikler 5-6 cm uzunluğa ulaştıklarında kök oluşumunu teşvik amacıyla bazal MS ortamı ve IBA'nın değişik konsantrasyonunu (0.5, 1.0 mg/L) içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır. En iyi kök oluşumunun MS+1 mg/L IBA içeren ortam üzerinde gerçekleştiği belirlenmiştir. Uygun kök uzunluğuna sahip olan bitkiler torf ve kum 1:1 (v/v) karışımına dikimi yapılarak doğal koşullara adaptasyonları sağlanmıştır. Böylece *Spathaphyllum* 'Sweet Chico'nun hızlı ve klonal çoğaltımı için bir protokol oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Bitki büyüme düzenleyicileri, Sweet Chico., *In vitro* , Klonal çoğaltım, Sürgün oluşumu

***In vitro* Microporopagation of *spathaphyllum* (Sweet Chico)**

Abstract: The aim of this research was investigated to facilitate propagation of *Spathaphyllum* 'Sweet Chico'. The root meristems of *Spathaphyllum* "Sweet Chico" were used as explant material and were cultured into MS medium with BAP concentration (1, 2, 4, 6) in combination with NAA (0.2, 0.5) and IAA (0.2, 0.5 mg/L). The highest shoot regeneration was observed (18 shoot/explant) from MS+0.2 mg/L NAA+ 4 mg/L BAP. Shoots grown 5-6 cm were cultured into MS medium with 3 different concentration IBA (0, 0.5, 1) for rooting stage. The best rooting was obtained MS+1 mg/L IBA. Plantless were acclimatized in a soil mixture consisting of peat moss and sand 1:1 (v/v) and transferred to the greenhouse. So a protocol was formed for the rapid and micropropagation of *Spathaphyllum* "Sweet Chico".

Key Words: Plant growth regulator, Sweet Chico, *In vitro*, Micropropagation, Shoot formation

Giriş

Spathaphyllum sp. (Barış çiçeği/beyaz yelken çiçeği) dünyanın ılıman iklim bölgelerine sahip birçok ülkesinde yetiştirilen ekonomik öneme sahip süs bitkilerinden birisidir. Anavatanı Amerika, Kolombiya ve Venezuela olan *Spathaphyllum* sp.'nin doğada 36 türü bulunmaktadır. Gelişme döneminde 18-20°C kışın ise 15 °C sıcaklığa ihtiyacı olan ve % 75-80 yüksek oransal neme ihtiyacı olan bir bitkidir (Oral, 1987).

Spathaphyllum türleri konvensiyonel olarak tohum ve bölme suretiyle üretilmektedir. Ancak tohumların yavaş çimlenmesi, çimlenen tohumlardan oluşan fidelerin yavaş gelişmesi ve çevre koşullarına çok duyarlı olması gibi nedenlerle bitkinin hızlı üretiminde güçlüklerle karşılaşmaktadır. Ayrıca bölme ile yapılan çoğaltmada köklerin zarar görmesi nedeniyle üretimde zorluklarla karşılaşmaktadır (Oral, 1987). Ülkemizde ise

Spathaphyllum üretimi yeterli olmadığından dolayı çoğunlukla ithal edilmekte bu durum ise ülkemiz için döviz kayıplarına neden olmaktadır. Çoğaltılmasında güçlüklerle karşılaşılan bitkilerin hızlı klonal çoğaltılmasında veya yeni bitkiler geliştirilmesinde bitki biyoteknolojisi birçok yeni olanaklar sunmaktadır. Bu olanaklardan birisi de bitki meristemlerinin steril koşullarda uygun yapay ortamlar üzerinde kültüre alınması ile genetik bakımından birbirinin tamamen benzeri bitkilerin hızlı bir şekilde çoğaltılması ile mümkün olmasıdır. Bu tür çoğaltım şeklinde bitki dokusu, bitki türü, yapay ortam içeriği, büyüme düzenleyiciler ve çevre faktörleri gibi etkenler kültüre alınan bitki dokusundan herhangi bir genetik farklılaşma (somaklonal varyasyon) olmadan direkt regenerasyonla bitkilerin elde edilmesinde etkili olmaktadır (Murashige ve Skoog, 1962; Kumar vd., 1987; Thorpe vd., 1991, Hennen ve Hotckiss, 1995; Werbrouck vd., 1995; Watad vd., 1997; Roy vd, 2004).

*evrimarici@sdu.edu.tr

Yukarıda değinilen çeşitli özellikleri nedeniyle ekonomik öneme sahip bir bitki olan, ancak çoğaltılmasında güçlüklerin bulunduğu *Spathiphyllum* sp'nin *in vitro* klonal çoğaltımı için yapılan bu çalışmada kültüre alınan meristemlerden adventif sürgün oluşumunun teşviki ve kültüre alınan bitki dokusu başına çok sayıda sürgün gelişimini teşvik etmek için hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarının etkinliği araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada, bitkisel materyal olarak ülkemizde saksılı süs bitkisi olarak kullanılan ve barış çiçeği ve beyaz yelken çiçeği olarak bilinen 'Sweet Chico' çeşidinin kök meristemleri kullanılmıştır. Alınan bitki materyalleri önce genel yüzeysel sterilizasyon yöntemlerinden olan %5'lik sodyum hipoklorit ile 20 dakika sterilize edildikten sonra değişik konsantrasyonlarda (1, 2, 4, 6 mg/L) BAP (Benzil Amino Purin), (0,2, 0,5 mg/L) NAA (Naftalin Asetik Asit), ve (0,2, 0,5 mg/L) IAA (İndol Asetik Asit) hormon kombinasyonlarını içeren katı MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı üzerinde 25-26 °C de 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullarda 400 ml iç hacme sahip cam kaplar içerisinde kültüre alınmışlardır.

Bitki dokusundan direkt olarak regene olan bitkicikler çoğaltılmak için bir bistüri yardımı ile parçalara ayrılarak tekrar aynı ortamlar üzerinde kültüre alınmışlardır. 21 gün sonra belli bir büyüklüğe ulaşan *in vitro* bitkiler köklendirilmeleri için bazal katı MS ortamı ve IBA (İndol Butirik Asit)'nın değişik konsantrasyonlarını (0,5,1,0 mg/L) içeren katı MS ortamına aktarılmıştır. Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekerrürlü ve her tekerrürde 5 eksplant olacak şekilde kurulmuş ve iki kez tekrarlanmıştır. Aynı besin ortamlarında 3 kez alt kültüre alınan kültürler hormon konsantrasyon ve kombinasyonları açısından incelenmeye tabii tutularak, sürgün poliferasyonu için en uygun bitki büyümeyi düzenleyici kombinasyonu belirlenmiştir.

Kök oluşumu gerçekleşen bitkiler ortamlardan alınıp köklerindeki ortam kalıntıları yıkandıktan sonra viollerdeki hacimsel olarak 1:1 oranındaki torf-kum karışımına dikilmiştir. Daha sonra dikilen bu bitkileri toprak kökenli patojenlere karşı korumak için torf-kum karışımına fungusit (captan) ilave edilmiştir. Bitkilerin doğal koşullara adaptasyonunu sağlamak amacıyla bitkilerin üzeri 10-15 gün süreyle polietilen torbalarla kapatılmış ve adaptasyon tamamlandıktan sonra bitkilerin üzeri açılmıştır. Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 16 paket programı kullanılmış ve uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma testi ($P \leq 0,05$) ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Bitki dokularının kültüre alma işleminden yaklaşık dört hafta sonra yapılan gözlemler sonucunda kesim yerlerinde direk regenerasyonla *in vitro* sürgünlerin oluştuğu saptanmıştır.

Araştırmada kullanılan hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarından IAA x BAP kombinasyonunda bitki dokularının kesim yerlerinde kallus oluşumu gözlenmiş ve kallus oluşumunun somaklonal varyasyona neden olabileceği düşünüldüğünden araştırmanın ileriki aşamalarında kullanılmamış ve araştırmaya sadece kültür ortamına ilave edilen BAP x NAA kombinasyonu ile devam edilmiştir. Bu kombinasyonun içeriği ve eksplant başına oluşan embriyo sayıları Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelge 1'den de anlaşıldığı gibi eksplant başına en yüksek embriyo oluşumu 5 numaralı hormon kombinasyonu olan 0,2 mg/L NAA ve 4,0 mg/L BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan doku parçalarından oluştuğu gözlenmiş ve eksplant başına 18 adet bitkicik elde edilmiştir.

Çizelge 1. Kullanılan hormon kombinasyon ve konsantrasyonları ile eksplant başına oluşan ortalama sürgün sayısı

Kombinasyon No	NAA (mg/L)	BAP (mg/L)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)
1	0.2	1	0.5±0.14 e
2	0.5	1	1±0.23 e
3	0.2	2	5±0.42 d
4	0.5	2	8±0.54 c
5	0.2	4	18±0.92 a
6	0.5	4	11±0.37 b
7	0.2	6	9±0.31 c
8	0.5	6	6±0.32 d

Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında farklar istatistiksel olarak önemlidir ($p \leq 0,05$)

Spathaphyllum 'Sweet Chico' doku parçasından en az sürgün oluşumu 0.2 mg/L NAA +1 mg/L BAP hormon kombinasyonunu içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan eksplantlardan elde edilmiştir (0.5 adet sürgün/eksplant). *In vitro* sürgün oluşumu

gerçekleştirildikten sonra bu sürgünler *in vitro* mikro çoğaltım için her biri parçalara bölünerek kavanozlar içerisinde 0.2 mg/L NAA +4 mg/L BAP içeren katı 50 ml'lik MS ortamları üzerinde kültüre alınmışlardır (Şekil 1).



Şekil 1. MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Spathaphyllum* 'Sweet Chico' sp nin sürgün parçaları

Çalışmada eksplant başına sürgün sayısı bakımından elde edilen sonuçlar *Spathaphyllum* sp.'de doku ile klonal çoğaltma çalışması yapan bazı araştırmacıların sonuçlarıyla paralellik göstermiştir. Fonnesbech ve Fonnesbech (1979); *Spathaphyllum* sp (Clevelandii)'nin *in vitro* klonal çoğaltımında 2 mg/L BAP içeren ortamda eksplant başına 8.1 sürgün elde etmiştir. Watad vd., (1997) *in vitro* koşullarda kültüre aldıkları *Spathaphyllum* sp.'nin doku parçalarından en fazla sürgünü (10.1 sürgün/eksplant) 2 mg/L kinetin içeren ortamdan elde ederken, Ramirez-Malagon vd., (2001) yapmış oldukları çalışmada *Spathaphyllum floribundum* L., için en iyi sürgün gelişiminin 2 mg/L BAP+ 1 mg/L Kinetin+1 mg/L NAA hormonlarını içeren ortam üzerinde olduğunu bildirmiş ve eksplant başına 11.6 sürgün elde etmiştir. Hoque vd., (1999) *in vitro* çoğaltımında en iyi hormon kombinasyonunun BAP ve NAA olduğunu rapor etmişlerdir. Amin vd., (2004) oksin ve sitokinin içeren MS ortamlarında kültüre alınan eksplantlardan bitki regenerasyon oranının çok yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Geneyikli vd., (2008) yapmış oldukları çalışmada *in*

vitro koşullarında *Spathayphyllum* spp'nin en iyi sürgün oluşumunun 1 mg/L BAP içeren MS ortamında 17.8 sürgün /eksplant olarak bildirmişlerdir. Dewir vd., (2006) *Spathaphyllum* spp'nin *in vitro* koşullarında en iyi regenerasyonun 13.32 µM BAP ve 4.9 µM IBA içeren MS ortamı üzerinde olduğunu bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmalar ile yapılan diğer çalışmalarda eksplant başına sürgün oluşumundaki farklılığın, farklı büyüme koşullarından ve *Spathaphyllum* kültürlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kültüre alınan eksplantlardan 21 günlük süre sonunda çoğaltılan sürgünler kök oluşumunu teşvik etmek için 50 ml bazal MS ortamı ve IBA'nın değişik konsantrasyonlarını (0, 0.5, 1 mg/L) içeren cam kaplara (400 ml) aktarılmış ve iklim odasında kültüre alınmışlardır. Köklenme aşamasında kullanılan 0; 0.5; 1 mg/L IBA konsantrasyonlarda köklenen sürgün sayısı arasında bir farklılık tespit edilmemiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Farklı IBA konsantrasyonlarının *Spathaphyllum* 'Sweet Chico' bitkisinin köklenme ve kök sayısı üzerine etkileri

Hormon Konsantrasyonu (mg/L)	Köklenme(%)	Kök Sayısı (Adet)
0	85.10	6.63±0.30
0.5	89.03	7.20±0.28
1	92.25	7.35±0.27

Bazal MS ortamları üzerinde bitkilerin kültüre alınması sonucunda bitkilerde kök oluşumu gerçekleşmiş, bitkilerin kökleri uzun sürede ve zayıf olarak gelişmiştir. 1 mg/L IBA kullanılan MS ortamlarında ise bitki köklerinin daha kısa sürede ve kuvvetli olarak gelişme gösterdiği gözlenmiş, toprağa adaptasyonlarının daha kolay olduğu saptanmıştır. Bu ortamlarda gelişen bitkilerin boyları ve kök uzunlukları

toprağa aktarılacak büyüklüğe üç hafta sonucunda ulaşmıştır. Bitkiler viollerdeki özel olarak hazırlanmış torf-kum karışımına dikilmiştir (Şekil 2). Nemli ortamlarda poşetler içerisinde 10-15 gün bekletilmiştir. Doğal koşullara adaptasyonu sağlanan bitkiler saksılara aktarılmış ve dış koşullara adaptasyonu sağlanmıştır (Şekil 3).



Şekil 2. Toprağa yeni aktarılmış *Spathiphyllum* 'Sweet Chico' bitkileri



Şekil 3. Doğal koşullara adaptasyonu sağlanmış 4 aylık bir *Spathiphyllum* 'Sweet Chico' bitkisi

Yapılan araştırmalarda bitki eldesinde en kritik dönemin toprağa adaptasyon aşamasında olduğu gözlenmiştir. Bu aşamada evapotranspirasyonu önlemek için uzun süre mislemenin yapılması veya

bitkilerin yaklaşık iki hafta süre ile polietilen plastik altında tutulması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Ayrıca bu bekleme sırasında da ortamda bulunan ışık yoğunluğunun oldukça düşük olması bitkileri toprağa

adaptasyonlarını kolaylaştırmıştır. Benzer sonuçlar Ramirez-Malagon vd., (2001) tarafından da rapor edilmiştir.

Spathiphyllum 'Sweet Chico' farklı bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS ortamında kültüre alınmış ve klonal çoğaltım olanakları araştırılmıştır. Bir *Spathiphyllum* türünün *in vitro* klonal çoğaltım olanaklarının incelendiği bu çalışmada, klasik yöntemlere göre çok daha kısa sürede çok sayıda bitkinin üretilebilmesi için gerekli olan bilgi ve deneyim kazanılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçların pratik çalışmalara aktarılabilirliği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Amin, M.N., Islam, M.A., Rahman, M.M., Ahmad, S. 2004. Micropropagation and Conservation of the Threatened Medicinal Plants of Bangladesh: A Case Study of *Alpinia Calcarata* Rosc. *In vitro* Culture, Transformation and Molecular Markers for Crop Improvement, pp, 25-33, 228 pages, A.S.Islam (ed).
- Dewir, Y.H., Chakrabarty, H.E.J., Paek, K.Y. 2006. A Simple Method For Mass Propagation of *Spathiphyllum canifolium* Using an Airlift Bioreactor. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 42, 291–297.
- Fonnesbech, M., Fonnesbech, A. 1979. *In Vitro* Propagation of *Spathiphyllum*. *Scientia Horticulturae*, 10, 21–25.
- Geneyikli, E. (2008). *Barış Zambağı*'nın (*Spathiphyllum*) Bazı Çeşitlerinde Mikroçoğaltım Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, CU, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 159s.
- Hennen, G.R., Hotchkiss, S.E. 1995. *Spathiphyllum*: Succes for Every Market. *Grower Talks*, 59(9), 31-36.
- Hoque, M.I., Perveen, S., Sarker, R.H. 1999. *In Vitro* Propagation of Ginger (*Z. Officinale* Rosc.). *Plant Tissue Culture*, 9, 45-51.
- Kumar, P.P., Reid, D.M., Thorpe, T.A. 1987. The Rolle of Ethylene and Carbon Dioxide in Differentiation of Shoot Buds in Excised Cotyledons of *Prunus Radiata* *In Vitro*. *Physiologia Plantarum*, 69, 244-252.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-493.
- Oral, N. 1987. İç Mekan Süs Bitkileri, Yayın no:14, Tav Yayınları, Yalova, 192s.
- Ramirez-Malagon, R., Borodanenko, A., Barrera-Guerra, J.L., Ochoa-Alejo, N. 2001. Shoot Number and Shoot Size as Affected by Growth Regulators in *In Vitro* Cultures by *Spathiphyllum floribundum* L. *Scientia Horticulturae*, 89, 227-236.
- Roy, S.K., Karim Mandal, M.R., Sinha, P., Sayeed Hassan, A.K.M. 2004. Utilization of Plant Tissue Culture Technique for Mass Propagation and Conservation of Endangered Medicinal Plants. *In Vitro Culture, Transformation and Molecular Markers for Crop Improvement*, pp. 37-48, 228 pages, A.S.Islam (ed).
- Thorpe T.A., Harry, I.S., Kumar, P.P. 1991. Micropropagation: Technology and Application. P.p 311-336. Debergh, P.C. and Zinunerman R.H. (Editors). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Nertherlands, 512pp.
- Watad, A.A., Raghotama, K.G., Nissim, A., Gaba, V. 1997. Micropropagation of *Spathiphyllum* and *Syngonium* by Use of Interfacial Rafts. *HortScience*, 32, 307-308.
- Werbrouck, S.P.O., Debergh, P.C. 1995. Imazalil Enhances the Shoot-Inducing Effect of Benzyladenine in *Spathiphyllum-Floribundum* Schott. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14 (2), 105-107.