

**ANASON (*Pimpinella anisum L.*) VE PAMUK (*Gossypium hirsutum L.*)
TOHUMLARININ IN VİTRO ORTAMDA STERİLİZASYONU
ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA**

Nedret TORT

**Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
35100 Bornova, İzmir TURKEY**

ÖZ: *In vitro* kültür konusunda sağlanan tüm gelişmelere karşın, başarının koşulları arasında canlı materyalin, ekipmanın ve besi ortamının sterilizasyonu önemli bir yere sahiptir. Bu amaçla tohum sterilizasyonunda en yaygın kullanılan kimyasal maddelerden birisi ise, sodyum hipoklorittir. Bu çalışmada anason (*Pimpinella anisum L.*) ve pamuk (*Gossypium hirsutum L.*) tohumlarının sterilizasyonunda sodyum hipoklorit' in dört farklı konsantrasyonu (% 3, 6, 9 ve 12) ile üç farklı uygulama süresi (2, 5 ve 10 dakika) denenmiştir. Sonuçlar, çözelti konsantrasyonu ile uygulama süresinin sterilizasyon üzerinde çok etkili olduğunu ($P < 0,001$) göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Anason, pamuk, *in vitro* kültür, sterilizasyon.

**AN INVESTIGATION ON IN VITRO STERILISATION OF SEEDS OF
ANISE (*Pimpinella anisum L.*) AND COTTON
(*Gossypium hirsutum L.*) PLANTS**

ABSTRACT: *It has been well known that sterilisation of medium, equipment and lived material has a big importance for in vitro culture studies, although there has potential developments in this field. For this purpose, Na-hypochlorid is one of the chemicals used for sterilisation of seed. In this investigation for sterilisation of the seed of anise (*Pimpinella anisum L.*) and cotton (*Gossypium hirsutum L.*) plants, four different concentrations of Na-hypochlorid (3, 6, 9 and 12 %) were applied for three different application period (2, 5, 10 minutes). According to the results, it has been revealed that the length of application period and concentrations of solutions were effective ($P < 0.001$) on sterilisation.*

Keywords: Anise, cotton, *in vitro* culture, sterilisation.

GİRİŞ

Biyoloji alanında doku kültürünün, yada başka bir deyişle, doku yetiştiriciliğinin tarihçesi oldukça eskidir ve temeli Schleiden ve Schwann' ın 1938 ve 1939 yıllarında ortaya attıkları "hücre kuramı" na dayanmaktadır. Bu kuram iki hipotezi içermektedir ki, bunlardan ilki "tüm hücrelerin kuramsal olarak aynı değerde olmaları", ikincisi ise "tüm

hücrelerin otonom (özerk) fizyolojik birimler olarak kabul edilmeleridir" (Gautheret, 1982).

İlk kez Haberlandt, 1902 yılında bitkilerden izole edilmiş vegetatif hücrelerin elementer organizmalar gibi fonksiyon görebilme yeteneklerini incelemeye, böylece yüksek bitkilerin tüm hücreleri için tahmin edilen totipotensi yeteneğini deneysel olarak göstermeye ve hücrelerin doğal dış faktörlerin etkisi olmaksızın farklılaştıkları biçimindeki görüşlerin doğruluğunu saptamaya çalışmıştır. Bu amaçla *Ornithogalum* ve *Tradescantia* gibi bitkilerin yaprak palizat dokuları ile parankima ve epidermis dokularının kültüre alındığı çalışmada hücre ve dokuların bir süre yaşaması ve uzunlamasına büyümesi sağlanmışsa da, herhangi bir hücre bölünmesi gözlenmemiştir (Hartmann ve Kester, 1975).

Bu konuda ilk uygulama 1922 yılında W.J. Robbins ve W. Kotte tarafından yapılmış; araştırmacılar fide köklerinin uçlarından aldıkları parçaları sıvı besin ortamında kültüre almışlardır. Sonuçta bu tür çalışmalarda başarılı sonuçların ancak steril koşullarda alınabileceğini göstermişlerdir (Gönülşen, 1987).

Daha sonra White (1934), domatesin kök uçlarını şeker, organik tuz ve bira mayası içeren besin ortamında aktif olarak geliştirmeyi başarmıştır. Aynı dönemde Gautheret (1934), aseptik koşullarda birçok ağacın (*Populus nigra*, *Salix capraea* v.b.) kambiyumlarından yaptığı kültürlerde gelişmeler saptamıştır.

Bu ilk çalışmalardan günümüze değin epey yol alınmış; dünyada W.J. Robbins, W. Kotte, G. Haberlandt, L. Knudson, P.R. White, R.J. Gautheret, F. Skoog, G. Morel, J. van Owerbach, M.E.Lonkin ve L. Nickell gibi araştırmacıların çabalarıyla doku kültürü alanında önemli gelişmeler sağlanmıştır. Konuya olan ilgi ülkemizde de giderek artmaktadır.

Doku kültürü tekniğinin başarı koşulları arasında besin ortamlarının, kültür kaplarının ve bitki materyalinin sterilizasyonu önemli bir yere sahiptir. Dokunun bulunduğu kültür ortamına düşen bir spor, dehal bir misel yada bakteri kitlesi oluşturmakta ve dokunun ölümüne yol açmaktadır. Sporların tahribi ise; sıcaklık, kimyasal ajanlar, antibiyotikler ve steril filtrasyon gibi yöntemler yardımıyla sağlanabilmektedir.

Sıcaklık uygulaması genellikle besin ortamlarıyla kültür kaplarının sterilizasyonu için önerilmektedir (Krieg ve ark., 1986). Ancak besin ortamı sıcaklığa duyarlı maddeleri içeriyorsa, otoklavlama yerine steril filtrasyon yöntemi yeğlenmektedir. Kimyasal ajanlar

ise, çoğunlukla kültüre alınacak dokuların yer aldığı bitki organlarının sterilizasyonunda kullanılmaktadır.

Farklı etki mekanizmalarına sahip olan kimyasal ajanlarda aranan kimi ortak özellikler arasında en önemlileri; güvenilir, irreversibl (geri dönüşümsüz) bir etki mekanizmasına ve geniş bir etki spektrumuna sahip olmaları, stabilite ve ekonomiklidir (Grossgebauer, 1981).

Bunlar arasında özellikle hipohalojen asitleri ve bunların tuzları ilk akla gelenlerdir. Örneğin hipoklorit ve hipobromit gibi. Ancak klorlu ve bromlu su da aynı işlevi görebilmektedir. Çünkü halojenler sulu çözeltilerde hipohalojenit ve halojenitlere ayrılırlar.

Bu tip kimyasal sterilizasyonların temeli, çözeltilerde yer alan maddelerin, hücrenin büyümesini ve dokunun gelişmesini önleyecek zehirli artıklar bırakmadan parçalanmasına dayanmaktadır.

Sterilizasyon maddelerinde aranan bir başka özellik de, bitki materyalinden kolayca uzaklaştırılabilir özellikte olmalarıdır. Çünkü bunun için materyalin steril saf su ile tekrar tekrar yıkanması gerekmektedir (Pierik, 1987).

Sterilizasyon olayında bitkinin yapısal özellikleri, eksplantın cinsi, çalışmanın amacı, kullanılan maddenin özellikleri ve uygulama süresi gibi çok çeşitli faktörler etkili olduğundan; hangi bitki için hangi yöntemin, hangi maddenin, hangi konsantrasyonda ve ne kadar süreyle uygulanması gerektiği, ancak kapsamlı araştırmalarla ortaya konabilmektedir.

Bu tür sterilizasyon maddeleri arasında yer alan ve araştırmamızda da denenen sodyum hipoklorit (NaOCl), günümüzde evlerde, hastanelerde, restoranlarda ve turistik tesislerde içme sularının ve yüzme havuzlarının dezenfeksiyonunda yaygın biçimde kullanılmaktadır (Block, 1983). Ancak stabilitesi ışık, sıcaklık, konsantrasyon ve pH derecesi gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Wallhäuser, 1978). Bu nedenle de, çalışmamızda pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) ve anason (*Pimpinella anisum* L.) gibi ekonomik önemi olan iki bitkide kullanılma olanakları araştırılırken, sodyum hipoklorit-tin farklı konsantrasyonları, farklı uygulama süreleri ile birlikte denenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Çalışma ile ilgili denemeler, 1993 yılında Federal Almanya'da Hannover Üniversitesi Süs Bitkileri Yetiştirme Enstitüsü Laboratuvarlarında yürütülmüş, bitki materyali olarak Türkiye için ekonomik önemi olan anason (*Pimpinella anisum* L.) ' un

Burdur ekotipi ile pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) ' un Nazilli 87 çeşidinin tohumları kullanılmıştır.

Tohum sterilizasyonu için kimyasal madde olarak sodyum hipoklorit (NaOCl), çimlendirme çalışmalarında besin ortamı olarak ise MS (Murashige ve Skoog, 1962) seçilmiştir.

Pamuk tohumlarının dışını kaplayan hav tabakası, MS ortamında mantar ve bakteri gelişimini kolaylaştırdığından, önce derişik sülfürik asit (H₂SO₄) ile muamele edilerek, olabildiğince yok edilmiştir. Tohumların testası uzun süreli sülfürik asit uygulamasından zarar gördüğü için, asitte bırakma süresi yavaş yavaş arttırılmış ve maksimum dokuz dakikaya kadar uzatılmıştır. Sülfürik asitten çıkarıldıktan sonra beş dakika süreyle, otoklavlanmış saf su ile yıkanıp süzülen tohumlar farklı konsantrasyonlardaki (% 3, 6, 9, 12' lik) NaOCl çözeltisine alınmışlardır. Ayrıca çözelti içine Tween 20 (1-2 damla) eklenmiştir (Meyer, 1976; Fonnesbech ve Fonnesbech, 1979; Smith ve Nightingale, 1979; Tanaka ve Sakanishi, 1978). Farklı süreler (2, 5 ve 10 dakika) bu çözelti içersinde bekletilen tohumlar, çözeltiden alındıktan sonra beş dakika süreyle otoklavlanmış saf su ile iyice yıkanarak MS besin ortamına alınmışlardır.

Anason tohumlarının sterilizasyonunda da, sülfürik asit uygulaması dışında tümüyle aynı yol izlenmiştir.

Kültür odasında sıcaklık 25°C'ye ayarlanmış, 16 saat ışık + 8 saat karanlık dönemi kapsayan bir aydınlanma programı uygulanmıştır.

Besin ortamında kaldıkları süre içinde tohumların çimlenmeleri 24 saatlik aralıklarla izlenmiş ve her kontrolde her grupta çimlenmiş olan sağlıklı tohum sayıları not edilmiştir. En son çimlenen tohumdan sonra 10 gün süreyle hiç çimlenme gözlenmeyen gruplarda deneme sona ermiştir.

Denemeler; her muamele grubunda yüzer tohumla, her muamele beşer tekerrürlü olacak şekilde ve faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme desenine uygun olarak yürütülmüştür. Araştırma sonuçları, Genstat 5 Release 1.2 (IBM / CMS) paket programı kullanılarak değerlendirilmiş; kimyasal madde (NaOCl) konsantrasyonu ile uygulama süresinin sterilizasyon oranı üzerindeki etkileri, varyans analizi yöntemi ile araştırılmıştır (Schuster ve Lochow, 1992). Muamele grupları arasında sağlıklı çimlenen tohum oranları bakımından gözlenen farkların önem dereceleri ise, her iki faktör için bitki gruplarında ayrı ayrı hesaplanan EKÖF (En küçük önemli fark) değerleri ile karşılaştırılarak kontrol edilmiştir (Püskülcü ve İkiz, 1986).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Daha önce de değinildiği gibi, sterilizasyon maddesi olarak geniş kullanım alanı bulan sodyum hipoklorit, sarı renkli ve kendine özgü yakıcı kokusu olan bir bileşiktir. Stabilitesi ve etkisi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Çalışmamızda anason ve pamuk tohumlarının sterilizasyonunda dört farklı sodyum hipoklorit konsantrasyonu ile üç farklı uygulama süresi denenmiştir.

Araştırma sonuçlarına göre pamuk tohumları arasında en etkili sterilizasyon, % 6' lık NaOCl çözeltisinde 10 dakika bekletilen grupta gerçekleşmiş ve tohumların ortalama % 78.6' sı sağlıklı çimlenmiştir. Bu grubu daha sonra % 9' luk NaOCl ile 10 dakika muamele edilen grup izlemiştir (Çizelge 1). Pamuk tohumları arasında tüm konsantrasyonlarda iki dakika bekletilen gruplardaki tohumların hemen hemen tümü, MS besin ortamına taşındıktan çok kısa bir süre sonra enfekte olduğundan, iki dakikalık sterilizasyondan vaz geçilmiş ve denemeye kalan iki sterilizasyon süresi (5 ve 10 dakika) ile devam edilmiştir.

Çizelge 1. Pamuk tohumlarının değişik NaOCl konsantrasyonlarında ve uygulama sürelerinde çimlenme oranları (%).

Table 1. Seeding rate of cotton seeds in different NaOCl concentrations and application periods. (%)

NaOCl konsantrasyonu (%)	Uygulama süreleri (Application period)		
	5 Dakika (5 min.)	10 Dakika(10 min.)	Ortalama(mean)
3	52,6	67,8	6,02
6	61,8	78,6	70,2
9	64,0	73,2	68,6
12	65,6	61,6	63,6
Ortalama(mean)	61,0	70,3	
LSD (0,001)	kons. (conc.) : 2,093 ; süre (period) : 1,480		

Uygulanan varyans analizi sonuçlarına göre (Çizelge 2), NaOCl konsantrasyonu ile uygulama süresinin, pamuk tohumlarının sterilizasyonu, yani sağlıklı olarak çimlenen tohum oranları üzerindeki etkileri istatistik olarak çok önemlidir ($P<0,001$).

Dört değişik konsantrasyonda ve iki farklı sürede bekletilen tohum gruplarının sağlıklı olarak çimlenen ortalama tohum oranları arasındaki farklar, her iki faktör için ayrı ayrı hesaplanan EKÖF değerleri ile karşılaştırıldığında; ayrıcalıksız hepsinin istatistik olarak yine çok önemli ($P<0,001$) oldukları görülmüştür.

Çizelge 2. Pamuk tohumlarında NaOCl konsantrasyonu ve uygulama süresinin sterilizasyon oranı üzerine etkileri.

Table 2. The effect of NaOCl concentration and application period on the sterilisation rate of Cotton plant seeds.

Varyasyon kaynağı Source of variation	S.D. D.F.	Kareler ortalaması Mean square	F
Konsantrasyon (conc.)	3	211,033	126,94 ***
Lin.	1	36,980	22,24 ***
Quad.	1	562,500	338,35 ***
Cub.	1	33,620	20,22 ***
Uygulama süresi (period)	1	864,900	520,24 ***
Konsant.X Uyg.Süresi (conc. x per.)	3	669,900	134,32 ***
Lin.Uyg.Süresi	1	531,380	319,63 ***
Quad.Uyg.Süresi	1	36,900	82,35 ***
Cub.Uyg.Süresi	1	1,620	0,97
Hata (Error)	32	53,200	
Genel	39	2221,100	

*** : P<0,001

Yapılan varyans analizi sonuçlarına göre (Çizelge 4.), anason tohumlarında da, çözeltinin konsantrasyonu ile uygulama süresinin sterilizasyon oranı üzerindeki etkileri, son derece belirgin ve istatistik olarak çok önemli (P< 0,001)' dir.

Ayrıca Çizelge 2 ve 4' te görüldüğü gibi, her iki bitki grubunda da, konsantrasyon X uygulama süresi interaksyonunun linear ve kuadratik etkileri de çok önemli (P<0,001) bulunmuştur. Anason tohumlarında en sağlıklı sterilizasyon % 6' lık çözelti-de beş dakika bekletilen gruplarda, en zayıf sterilizasyon ise % 3' lük çözeltide iki dakika bekletilen gruplarda gözlenmiştir (Çizelge 3).

Araştırmamızda her iki bitki grubunda dikkati çeken ortak nokta, % 100' lük bir sterilizasyonun sağlanamamış olmasıdır. Nitekim çeşitli araştırmacıların değişik bitkiler için bildirdikleri sonuçlar da aynı niteliktedir. Örneğin Hussey (1975), *Hyacinthus*' ta sterilizasyonun ancak % 40-50 oranında sağlanabildiğini bildirmektedir.

Çizelge 3. Anason tohumlarının farklı NaOCl konsantrasyonlarında ve uygulama sürelerinde çimlenme oranları (%).

Table 3. Seeding rate of anise seeds in different NaOCl concentrations and application periods (%).

NaOCl konsantrasyonu concentration (%)	Uygulama süreleri (Application period)			
	2 Dakika	5 Dakika	10 Dakika	Ortalama Mean
3	11,6	43,6	58,6	37,9
6	24,0	78,6	69,4	57,3
9	29,8	67,8	65,4	54,3
12	34,2	55,0	58,0	49,0
Ortalama (Mean)	24,9	61,2	62,8	
LSD (0,001)	kons. (conc.) : 2,281 ; süre (period) : 1,975			

Çizelge 4. Anason tohumlarında NaOCl konsantrasyonu ve uygulama süresinin sterilizasyon oranı üzerine etkileri.

Table 4. The effect of NaOCl concentration and application period on the sterilisation rate of Anise seeds.

Varyasyon kaynağı	S.D.	Kareler ortalaması	F- değeri
Konsantrasyon (conc.)	3	3278,800	346,05 ***
Lin.	1	693,120	219,46 ***
Quad.	1	2281,666	722,43 ***
Cub.	1	304,013	96,26 ***
Uygulama süresi (period)	2	18427,223	2917,24 ***
Lin.	1	12037,168	3811,24 ***
Quad.	1	6390,051	2023,24 ***
Konsant. X Uyg.süresi (conc. x period)	1	089,698	110,27 ***
Lin.Lin.	6	738,309	233,77 ***
Quad.Lin.	1	11,943	3,78
Lin.Quad	1	68,111	21,57 ***
Cub.Lin.	1	0,010	0,00
Quad.Quad.	1	1056,490	334,51 ***
Sapma (Deviation)	1	214,836	68,02 ***
Hata (Error)	48	151,600	
Genel	59	23947,332	

*** : P<0,001

Girmen ve Zimmer (1988) ise, *Galanthus*, *Leucojum* ve *Tulipa* bitkilerinin farklı kı-sımlarından alınan eksplantlarda elde edilen sterilizasyon oranlarının tohumlarınkiler-den daha düşük olduğuna dikkati çekmektedir. Bu çalışmada, *Galanthus*' da tohum-larda

% 80-90 gibi bir sterilizasyon değerine ulaşılırken, bitkinin diğer kısımlarından alınan eksplantlarda bu değer ancak % 50-60 olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar ayrıca düşük konsantrasyonlarda sterilizasyonun zayıfladığını, yüksek konsantrasyon ve uzun uygulama sürelerinde ise, eksplantlarda büyük ölçüde bozulmaların meydana geldiğini bildirmektedirler. Literatürde yeterli düzeyde sterilizasyon sağlayabilen araştırmacıların birisi Groenewald'dır. Adı geçen bilim adamı, bu sonuçlara; *Aloe pretoriensis* (Liliaceae) tohumlarını 30 dakika süreyle % 5'lik NaOCl ve % 1'lik HgCl₂'de daha sonra 10 dakika süreyle Nalauryl sülfatta bekleterek ve dört kez de destile su ile çalka-layarak ulaştığını bildirmektedir (Groenewald ve ark., 1975).

Bunların dışında dünyada daha birçok bilim adamı çeşitli bitkilerin farklı organ ve dokularında çok çeşitli maddeler, yöntemler kullanarak sterilizasyonu denemiş ve doğal olarak çok farklı sonuçlara ulaşmışlardır. Ancak ulaşılabildiği kadarıyla, ülkemiz için karakteristik olan anason ve pamukta NaOCl ile yapılmış çalışmalara rastlanamamıştır. Bu nedenle de, bulgularımızı karşılaştırma olanağı bulunamamıştır. Bununla birlikte elde edilen sonuçlara dayanılarak, anason ve pamuk tohumlarının sterilizasyonunda uygulanan konsantrasyon ve süreler göz önünde bulundurularak NaOCl'nin başarıyla kullanılabileceği söylenebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, DAAD (Alman Akademik Mübadele Kurumu) ve TÜBİTAK'ın burs desteği ile Almanya'daki Hannover Üniversitesi Süs Bitkileri Yetiştirme Enstitüsü'nde yapılmıştır. Adı geçen kuruluşlara sağladıkları destek için teşekkürü bir borç bilirim.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Block, S. 1983. Desinfection, sterilisation and preservation. Verlag Lea + Febiger 3.ed. Philadelphia. S. 157, 167-182.
- Fonnesbech, M., and A. Fonnesbech. 1979. *In vitro* propagation of *Spathiphyllum*. Scientia Horticulturae 10: 21-25.
- Gautheret, R.J. 1934. Culture du tissue cambial. C.R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. p. 2195-2196.
- Gautheret, R.J. 1982. Plant tissue culture: The History Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture: 7-12.

- Girmen, M. und K. Zimmer. 1988. In vitro-Kultur von *Galanthus elwesii* I. Sterilisation, Regeneration, Phytohormone. Gartenbauwissenschaft, 53(1). S. 26-29.
- Gönülþen, N. 1987. Bitki Doku Kùltürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. T.C. Tarım Orman ve Köyiþleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araþtırma Enstitüsü Müdürlüğü. Yayın No: 78. Menemen-İzmir.
- Groenewald, E.G., A. Koeleman, and D.C. Wessels. 1975. Callus formation and plant regeneration from seed tissue of aloe pretoriensis. Z. Pflanzenphysiol. 75, s. 270-272.
- Grossgebauer, K. 1981. Die desinfektion. bemerkungen über einen klinischen begriff. Mat. Med. Nordm. 33, s. 132-135.
- Hartmann, H.T., and D.E. Kester. 1975. Plant propagation: Principles and practices. Prentice-Hall, Inc. Engle Wood Cliffs, N.J., U.S.A.
- Hussey, G. 1975. Propagation of *Hyacinthus* by tissue culture. Scient. Hort. (3), S. 21-28.
- Krieg, R. , E.C. Chan, and M.J. Peiczar. 1986. Microbiology . 5. ed. Mc Graw Hill Book Comp.
- Meyer, M. M. 1976. Propagation of daylilies by tissue culture. Hort. Sci. 11(5): 485-487.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15 : 473-497.
- Pierik, R. L. 1987. In vitro Culture of Higher Plants. M. Nighoff Pub. Dordrecht, Boston.
- Püskülcü, H., ve F. İfiz. 1986. İstatistiğe giriþ. E.Ü. Mühendislik Fakùltesi Ders Kitapları Yayın No:1, 2. Baskı. Bornova, İzmir.
- Schuster, W. H., and J. von Lochow 1992. Anlage und Auswertung von Feldversuchen. 3. Auflage. Verlag Alfred Strothe, Frankfurt.
- Smith, R.H., and A. E. Nightingale. 1979. In vitro propagation of *Kalanchoe*. Hort. Science 14 (1) : 20.
- Tanaka, M., and Y. Sakanishi 1978. Factors effecting the growth of in vitro cultured lateral buds from *Phalaenopsis* flower stalks. Scientia Hort. 8 : 169-178.

Wallhäuser, K.H. 1978. Sterilisation, desinfektion, konservierung. 2. Auflage, G. Thieme Verlag. s. 194 -195, 341.

White, P.R. 1934. Potentially unlimited growth of exised tomato root tips in liquid medium. Plant Physiol. 9 : 585-600.