



Rhododendron smirnowii Trautv.’nin Sürgün Ucu Kültürü ile Mikroçoğaltımı

Sevil Sağlam Yılmaz*¹ Bahadır Altun² Hüseyin Çelik³ Hatice Gümüş⁴ Özgür Eminağaoğlu⁵ Müge Türet⁶ Tuğba Yücel² İsmail Tuğberk Kaya⁶

¹ Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü-Kırşehir/Türkiye

² Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkiler Bölümü-Kırşehir/Türkiye

³ Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkiler Bölümü-Samsun/Türkiye

⁴ Artvin Orman Bölge Müdürlüğü-Artvin/Türkiye

⁵ Artvin Çoruh Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü-Artvin/Türkiye

⁶ Boğaziçi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik-İstanbul/Türkiye

***Sorumlu Yazar**

E-mail:saglamsevil@gmail.com

Özet

Rhododendron smirnowii Trautv. güzel pembe çiçekleri ile Türkiye'nin önemli bir süs bitkisidir. Bu araştırma, *R. smirnowii* bitkisinin üretimi için etkili bir mikroçoğaltım protokolünü belirlemek için tasarlanmıştır. Tohumlar Murgul/Artvin/Türkiye'den getirilmiş ve yüzey sterilizasyonundan sonra Anderson (AND), Murashige & Skoog (MS) ve Chu (N6) ortamlarına ekilmiştir. Denemelerde *in vitro* koşullarda çimlenen iki aylık bitkiciklerden izole edilmiş olan sürgün ucu eksplantları kullanılmıştır. En yüksek çimlenme oranı, AND ortamında gözlenmiştir. Sürgün oluşum çalışmaları sırasında sabit oranlarda IAA (0.0 ve 0.2 mg/L) ile takviye edilmiş değişken N6- [2-izopentenil] adenin (2ip)'in 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0 mg/L konsantrasyonları kullanılmıştır. 6-8 hafta sonunda en uzun sürgün 5.0 cm ve eksplant başına en fazla sürgün sayısı 4 adet olarak 6.0 mg/L 2ip ve 0.2 mg/L Indol-3-asetik asit (IAA) kombinasyonu ile desteklenmiş AND besin ortamından gözlenmiştir. *R. smirnowii* sürgünlerinin köklendirilmesinde üç farklı köklendirme prosedürü izlenmiş ancak bunlardan yalnızca sürgünlerin 60 sn-1.0 g/L IBA solüsyonunda bekletildikten sonra herhangi bir oksin içermeyen AND besin ortamına alınan sürgünlerde köklenme başlangıcı gerçekleşmiştir. Diğer yöntemlerin ise (0.5 mg/L IBA ve 3.0 mg/L α -naftalenasetik asit (NAA) içeren yarıkatı AND besin ortamına ekim) köklenmede etkisiz olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Rhododendron smirnowii* Trautv., mikroçoğaltım, sürgün ucu, 2ip, IAA

Micropropagation of *Rhododendron smirnowii* Trautv. via Shoot Bud Cultures

Abstract

Rhododendron smirnowii Trautv. with its beautiful pink flowers, is an important ornamental plant of Turkey. This research was designed to determine the most effective medium and thereby an effective micropropagation protocol for the production of *R. smirnowii* via shoots cultures. The mature seeds of mother plants which were previously brought from Murgul/Artvin/Turkey were employed as explants. Seeds were planted in Anderson (AND), Murashige&Skoog (MS) and Chu (N6) media after surface sterilization. Shoot bud explants from 2-month-old were isolated and used in experiments. The maximum germination rate was observed in the AND medium. Various plant growth regulators (PGRs) as well as their concentrations were employed in the course of shoot formation trials. In shoot multiplication experiments, AND basal medium was then supplemented with stable IAA (0.0 and 0.2 mg/L) and variable N6-[2-isopentenil]adenin (2ip) were applied with various concentrations (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0 mg/L). The highest shoot height (5.0 cm) and the maximum number of shoots per explant (4.0) were observed from the AND basal medium supplemented with 6.0 mg/L 2ip and 0.2 mg/L Indol-3-asetic acid (IAA) combination and was found to be more effective in terms of shoot formation in 6-8 weeks. The shoots were planted in pots after 60 second duration in 1.0 g/L IBA and this method was found to be more effective. 0.5 mg/L IBA and 3.0 mg/l α -naphthaleneacetic acid (NAA) concentration was ineffective in terms of root formation for *R. smirnowii*.

Keywords: *Rhododendron smirnowii* Trautv., micropropagation, Shoot bud, 2ip, IAA

GİRİŞ

Ormangülleri, Ericaceae (fundagiller) familyasının *Rhododendron* cinsine dahil bitkilerdir. Doğu Karadeniz'de kızılıkumar olarak isimlendirilen *Rhododendron simirnowii*, 1885 yılında Baron Ungern Stenberg tarafından Artvin civarında keşfedilerek aynı yıl Trautvetter tarafından tanımlanmış [1] ve Sternberg'in arkadaşı olan M. Smirnov'un adıyla bilim dünyasındaki yerini almıştır. Daima yeşil bir ormangülü türü olan *R. smirnowii*, yaklaşık 4 metre boylanabilmektedir (Şekil 1.). Bitkinin, Kuzey Avrupa ülkelerinde süs ağacı ve süs çalısı olarak kullanımı yaygındır. Hediye süs bitkisi olarak bütün dünyada büyük ilgi görmektedirler.



Şekil 1. *Rhododendron smirnowii* bitkisinin Murgul/Artvin'de 1982 m yüksekte doğal habitusu (Fotoğraf Bahadır ALTUN, 2014)

Ormangüllerinin üretimi için meristematik dokulardan *in vitro* çoğaltım uygun bir metodur. Tohumla, çelikle, vb. klasik metodlarla üretimleri hem zor hem de etkili bir çoğaltım metodu değildir [2]. Aksiller meristemlerin gelişimi, kültür ortamındaki büyüme düzenleyicilerinin varlığına bağlıdır [3], fakat pek çok kültürde sitokininlere genotipin cevabı henüz açıklanmamıştır. *R. praecox* ve *R. scintillation* genotiplerinde sürgün oluşumu ve çoğaltımı üzerine isopentenyladenine (2ip) sitokininin pozitif bir etkisinin olduğu bulunmuştur [4]. *R. indicum*'da ise en fazla sürgün oluşumu 4.0 adet olarak Zeatin/IAA kombinasyonunu içeren ortamdan elde edildiği rapor edilmiştir [5]. Bu çalışmanın amacı, büyüme düzenleyicilerinin meristematik dokuları içeren vejetatif tomurcukların organogenez ve sürgün oluşumu üzerindeki etkisini bulmaktır. *R. smirnowii*'de sürgün rejenerasyonu, çoğaltımı ile sürgünlerin köklenmesi belirlenmiştir. Bu amaçla farklı temel besin ortamları ve farklı bitki büyüme düzenleyicilerin çeşitli konsantrasyon ve kombinasyonları *R. smirnowii*'nin *in vitro* ortamlarda yetiştirilmesi üzerine denenmiş ve sürgün oluşumu, sürgün çoğaltımı ve kök gelişiminde bu faktörlerin etkileri araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

R. smirnowii tohumları Eylül 2014 tarihinde 1982 m yükseklikte (40°14'743 K, 41°35'699 D) Murgul/ Artvin'den toplanmıştır. Doku kültürü çalışmaları, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Eksplantların yüzey sterilizasyonu %10 sodyum hipoklorürde (NaOCl-%5 kimyasal içeriğe sahip çamaşır suyu ACE) 4 dakika çalkalanarak üç kez beşer dakika steril saf su ile durulanma şeklinde sağlanmıştır. *R. smirnowii* türüne ait iki aylık *in vitro*'da yetiştirilmiş bitkiciklerden alınan yaklaşık 1.0 cm uzunluğunda sürgün ucu eksplantları kullanılmıştır.

Besin ortamları olarak MS [6], N6 [7] ve AND [8], ortamları kullanılmıştır. Katılaştırıcı olarak % 0,5 (w/v) oranında Plant Agar (Duchefa, Haarlem-Hollanda) eklenmiştir. Ortamların pH'sı 0,1 N NaOH veya 0,1 N HCl ile 5.5-5.8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan ortamlar 121 °C'de 1,2 atm basınç altında 20 dk sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Sürgün oluşturma ve çoğaltma çalışmalarında değişken N6-[2-isopentenil]adenin (2iP) (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0 mg/L) konsantrasyonları ile sabit Indol-3-asetik asit (IAA) (0.0, 0.2 mg/L) kombinasyonları AND ortamına ilave edilmiştir. Sürgün çoğaltım çalışmaları sonucu en az 2.0 cm büyüklüğüne ulaşan fidelerin *in vitro*'da köklendirilmesi amacıyla üç farklı köklendirme denemesi kurulmuştur. İlkinde sürgünler 60 sn-1.0 g/L IBA solüsyonunda bekletildikten sonra herhangi bir oksin içermeyen AND besin ortamına alınmıştır. İkincisinde sürgünler 0.5 mg/L IBA ve üçüncü denemede ise 3.0 mg/L α -naftalenasetik asit (NAA) içeren yarıkatı AND besin ortamında kültüre alınmıştır.

Çalışmada kullanılan ve kültüre alma işlemi tamamlanan eksplantlar için inkübasyon ortamı olarak 24 \pm 2 °C sıcaklık, 3000 lüks ışık şiddeti (μ E/m²/s), 16/8 h fotoperiyot koşulu ile % 50 neme ayarlı iklim dolabı kullanılmıştır. Eksplantların, kültüre alınmalarından itibaren gelişme durumları, canlılıkları, sürgün ve kök oluşumları iki haftada bir gözlemlenmiştir. Sürgün çoğaltım ortamlarında, denemelerin başlangıcından itibaren 6-8 hafta sonra; eksplant başına sürgün sayısı (e.b.s.s.) ve sürgün uzunluğu

(s.u.) belirlenerek kaydedilmiştir. Köklenme ortamına alınan sürgünlerin ise 8 hafta sonunda köklenme oranlarına bakılmıştır. Kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından sürgün ve bu sürgünlerden kök oluşumu için AND besin ortamına eklenen sitokinin ve oksin konsantrasyonları Çizelge 1'de verilmiştir.

Her bir muamele içinde bir eksplantın bulunduğu en az 15 deney tüpünden oluşmuş üç tekrarlı olarak kurulmuş ve toplam olarak en az 45 eksplant kullanılmıştır. Elde edilen veriler varyans analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS 21.0) paket programı içerisinde yer alan Duncan testine tabi tutulmuş ve değerlendirme yapılmıştır [9].

Çizelge 1. *R. smirnowii* sürgün ucu eksplantlarından sürgün ve kök oluşumu için kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) ve konsantrasyonları

BBD (mg/L)	AND							
	Sürgün Oluşumu							
2 İP	1	2	3	4	5	6	7	8
IAA	0.0	0.2						
Köklendirme								
IBA 1. deneme	6 0							
	sn-1							
	gr/L							
IBA 2. deneme	0.5							
NAA	3.0							

BULGULAR VE TARTIŞMA

R. smirnowii Tohumlarının *In Vitro* Koşullarda Yüzey Sterilizasyonu ve Çimlenmesi

Ericaceae familyasının Rhododendron taksonlarının doku kültürü yöntemiyle üretim çalışmalarında bugüne kadar besin ortamı olarak genellikle MS, AND ve WPM temel besin ortamları kullanılmıştır [3; 10]. Bu çalışmada ise, *R. smirnowii*'nin mikroçoğaltımı için tohumlar öncelikle, Rhododendron türlerinin *in vitro* koşullarda üretiminde sıklıkla kullanılan Anderson Rhododendron besin ortamı (AND), Murashige & Skoog (MS) ve Chu (N6) ortamlarına ekilmiştir. En yüksek çimlenme oranı (%100) AND besin ortamında gözlemlenmiştir (Şekil 2.). Anderson Rhododendron besin ortamı Anderson tarafından 1984 yılında özellikle Rhododendronların ve Ericaceae familyasına ait diğer bitkilerin *in vitro* çoğaltımları amacıyla oluşturulmuş düşük inorganik besin elementi içeriğine sahip yapay bir besin ortamıdır. Anderson Yapay Besin Ortamının İçeriği Çizelge 2.'de verilmiştir.



Şekil 2. *R. smirnovii* tohumlarının *in vitro* koşullarda AND besin ortamına ekimi ve çimlendirilmesi

Çizelge 2. Anderson Yapay Besin Ortamının Organik ve İnorganik Madde İçeriği

Besin Elementi İçeriği	Miktar (mg/L)
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
FeNaEDTA	73.40
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.30
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
CaCl ₂	332.02
KNO ₃	480.00
MgSO ₄	180.54
NaH ₂ PO ₄	330.60
NH ₄ NO ₃	400.00
Adenine sülfat	80.00
Myo-Inositol	100.00
Thiamine HCl	0.40

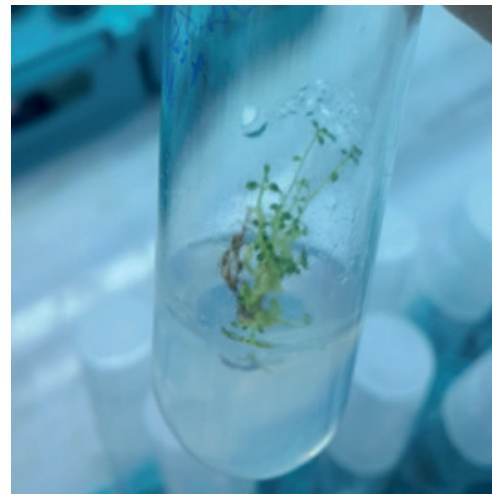
R. smirnovii Bitkisinin Sürgün Ucu Eksplantlarından Sürgün Oluşturma Çalışmaları

AND temel besi ortamında gerçekleştirilmiş ve 2 farklı bitki büyüme düzenleyicisi denenmiştir. Sürgün oluşumu görülen kültür ortamlarında, denemelerin başlangıcından 6-8 hafta sonra; eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu belirlenmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda, sürgün oluşumu ve sürgünlerin boylanmasında 2ip'in tek başına etkisine göre IAA ile etkileşimde daha etkili olduğu görülmüştür. Farklı konsantrasyonlardaki 2ip ile yapılan denemeler sonucunda konsantrasyon artışının boy uzamasına olumlu etki yaptığı ancak en uzun sürgün boyunun 5.0 cm ve eksplant başına en fazla sürgün sayısının ise 4 adet olarak 6.0 mg/L 2ip ve 0.2 mg/L Indol-3-asetik asit (IAA) kombinasyonu ile desteklenmiş AND bazal ortamından gözlenmiştir (Şekil 3., Çizelge 3.).

Çizelge 3. *R. smirnovii* sürgün ucu eksplantlarının 2ip ve IAA içeren AND besin ortamlarında eksplant başına sürgün sayısı (e.b.s.s.) ve sürgün uzunluğu (s.u.) değerleri

BBD (mg/L)		e.b.s.s. (adet)*	s.u. (cm)*
2 İP	IAA		
1.0	0.0	1.0d	1.9d
1.0	0.2	1.5d	2.0d
2.0	0.0	1.8d	2.0d
2.0	0.2	2.0d	2.2d
3.0	0.0	2.2c	1.8d
3.0	0.2	3.5b	1.6d
4.0	0.0	0.5d	1.5d
4.0	0.2	3.5b	3.0c
5.0	0.0	3.0b	2.6d
5.0	0.2	3.0b	2.7d
6.0	0.0	3.1b	4.2b
6.0	0.2	4.0a	5.0a
7.0	0.0	2.2c	3.8c
7.0	0.2	2.5c	4.5b
8.0	0.0	2.2c	3.8c
8.0	0.2	2.5c	3.7c

*p < 0,05



Şekil 3. *R. smirnovii* sürgün ucu eksplantlarından 6.0 mg/L 2ip ve 0.2 mg/L IAA içeren AND besin ortamında sürgün oluşumu

R. smirnowii Bitkisinin Köklendirilmesi Üzerine Çalışmalar

R. smirnowii sürgün ucu eksplantlarından gelişen yaklaşık 2.0-3.0 cm uzunluğu ulaşan sürgünlerin köklendirilmeleri işlemi sırasında en uygun oksinin ve bu oksin konsantrasyonunun ve uygulama süresinin belirlenmesi fidelerin daha kısa sürede köklenmelerini bu sayede de dış ortama adaptasyon çalışmalarının daha hızlı olmasını bakımından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada üç farklı deneme kurulmuştur:

1. Deneme: IBA köklendirme çalışmalarında sıklıkla kullanılan önemli bir oksin türüdür. İlk denemede sürgünler 1.0 mg/L sıvı IBA solüsyonunda 60 sn tutulmuş ardından AND0 ortamına dikilerek kültüre alınmıştır. Bu deneme diğer iki denemeye göre daha iyi sonuç vermiştir. 8 hafta sonunda köklenme başlamış ancak bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması sağlanamamıştır. Veriler istatistik analiz yapmaya elverişli olmamıştır. Köklenme oranının artırılması için çevresel faktörler tekrar değerlendirilerek yeni denemelerin kurulmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

2. Deneme: Sürgünler 0.5 mg/L IBA ile desteklenmiş AND köklendirme ortamına ekilerek kültüre alınmıştır. 8 hafta sonunda yapılan gözlemler neticesinde hiçbir anlamlı sonuç elde edilememiş ve bu doz uygulamasının *R. smirnowii* sürgünlerin köklendirilmesi için uygun olmadığı belirlenmiştir.

3. Deneme: Son denemede *R. smirnowii* sürgünleri 3.0 mg/L NAA ile desteklenmiş AND besin ortamında kültüre alınmış ancak ikinci denemede olduğu gibi hiçbir anlamlı köklenme verisi elde edilememiştir.

Her üç uygulama neticesinde IBA'nın NAA'ye göre *R. smirnowii* sürgünlerinin köklenmesi üzerine daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda IBA dozu 0.5 mg/l yerine 1.0 mg/L olarak uygulandığında daha önemli sonuçlar elde edilmiştir. Sıvı IBA solüsyonunda bekletilerek yapılan köklendirme çalışması ayrıca diğer yöntemlere göre daha ekonomik olması bakımından da değerlidir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, *R. smirnowii*'nin sürgün ucu eksplantları kullanılarak doku kültürü yöntemlerinden "mikroçoğaltım" tekniği kullanılarak *in vitro* koşullarda üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmadan elde edilen veriler gelecekte Türkiye'de doğal olarak yetişen *Rhododendron* türlerinden daha üstün hatların oluşturulmasında kullanılabilir. Odunsu bitki türlerinin bitki biyoteknolojisi yöntemleri ile üretimi otsu bitkilere göre nispeten daha zor olmaktadır. Bu çalışma ile odunsu bir tür olan *R. smirnowii* bitkisinin mikroçoğaltım yolu ile üretimini gerçekleştirmek için yeni ve başarılı bir sistem geliştirilmiştir. Yürütülen bu çalışma *R. smirnowii*'nin doku kültürlerinde üretimine yönelik bir ilk çalışmadır.

Teşekkür

Bu çalışmada sunulan veriler, "Türkiye Orman Güllerinde (*Rhododendron* spp.) genotipleri belirleme, morfolojik ve moleküler tanımlama, çoğaltma ve ex- situ

muhafaza çalışmaları" isimli 1120500 No'lu TÜBİTAK Projesinden alınmıştır. TÜBİTAK'a, T.C. Ahi Evran Üniversitesi'ne ve laboratuvar çalışmalarına katkılarından dolayı Ziraat Yük. Müh. Özlem ÜNER'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] Gelderen D.M., Smith H.J.R.P., 1992. *Rhododendron* Portraits, Timber Press.
- [2] Vejsadova H., 2008. Growth Regulator effect on *in vitro* regeneration of *Rhododendron* cultivars. Horth. Sci. (PRAGUE), 35, 90-94.
- [3] Iapichino G., Chen T.H.H., 1995. Genotypic effects on plant regeneration from leaf segments of *Rhododendron*, *Advances in Horticultural Science*, 9, 170-172.
- [4] Norton C.R., Norton M.E., 1989. *Rhododendrons*. In: Bajaj Y. P. S. (ed) *Agriculture and Forestry 5, Trees II*. Springer, Berlin, 428-451.
- [5] Almeida R., Goncalves, S., Romano, A., 2005. *In vitro* micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti, *Biodivers. Conserv.*, 14, 1059-1069.
- [6] Murashige T., Skoog F., 1962. A revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- [7] Chu C.C. et al., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinic.*, 18, 659.
- [8] Anderson W.C., 1984. A Revised Tissue Culture Medium For Shoot Multiplication of *Rhododendron*, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 109, 3, 343-347.
- [9] Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1980. *Statistical methods*. Seventh edition. The Iowa State University Press
- [10] Mertens, M., Werbrouck, S., Samyn, G., Silva, H. ve Debergh, P., 1996. *In vitro* regeneration of evergreen azalea from leaves, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45, 231-236.