

***Thymus sipyleus* Boiss. (Lamiaceae)'un In Vitro Çoğaltılması**

Bengi BABA ERDAĞ

ADÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 09010 Kepez, Aydın-TÜRKİYE

A. Kamil YÜREKLİ

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü 35100 Bornova, İzmir-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 03.08.1999

Özet: Batı Anadolu endemiklerinden *Thymus sipyleus* Boiss. (Lamiaceae) 'un In vitro çoğaltılması araştırılmıştır. Sterilize edilmiş bitki tohumları modifiye edilmiş Murashige-Skoog besi ortamı (mMS) ve Heller besi ortamlarında çimlendirilmişlerdir. Daha sonra 0.4 mg/l (NAA) Naftalenasetik asit ve 3 mg/l Benziladenin (BA) ilaveli Murashige-Skoog temel ortamına aktarılan fideler ortama temas ettikleri noktalardan kallus oluşturmuşlardır. Yine aynı ortamda rejeneren olan bitkicikler, 2 hafta sonra çoklu sürgün halini almış ve 4. alt kültür sonunda aynı ortamda köklenmişlerdir.

Anahtar Sözcükler: *Thymus sipyleus*, kallogenezis, bitki rejenerasyonu.

In Vitro Propagation of *Thymus sipyleus* Boiss. (Lamiaceae)

Abstract: In vitro propagation of *Thymus sipyleus* Boiss. (Lamiaceae), an endemic from western Anatolia was investigated. Sterilized seeds of the plant were germinated on modified Murashige-Skoog medium (mMS) and Heller's nutrient media. Then, seedlings were transferred to Murashige-Skoog basal medium containing 0.4 mg/l Naphtaleneacetic acid, (NAA) and 3 mg/l Benzyladenin (BA) and then they formed callus where they were in contact with the medium. Plantlets which regenerated on the same medium formed multiple shoots within 2 weeks and they were rooted after the 4th subculture.

Key Words: *Thymus sipyleus*, callus formation, plant regeneration.

Giriş

Koruma kavramının giderek daha yaygın ve etkin bir konum almasının sonucu olarak endemikler bir çok biyolojik disiplin tarafından inceleme altına alınmışlardır. Koşullarda oluşan değişimlere yeterince ve hızlı biçimde uyarlanamayışın getirdiği bir durum olarak endemik bitkiler sınırlı alanlarda ve özgün habitatlarda yaşama şansı bulabilmektedirler. Nadirlikleri ve içermeleri olası çeşitli önemli kimyasallar nedeniyle bu tip bitkiler için alternatif çoğaltılma süreçlerinin belirlenmesi önem arzeden bir konumdur. *Thymus sipyleus* Boiss. Anadolu insanı tarafından tıbbi ve besin amaçlı olarak (baharat) kullanılmaktadır. Ek olarak bu türün "sitral" adı verilen uçucu yağ açısından da uygun bir kaynak olduğu belirtilmektedir (1). Sitral, koku verici olarak kullanıldıktan başka A vitamini sentezinde başlangıç maddesi olarak da yer almaktadır. Ayrıca son yıllarda hazırlanan yerinde (*in situ*) koruma raporlarına (2) göre *Thymus* L. cinsi Türkiye'nin en önemli ekonomik bitki grupları arasında sayılmaktadır.

Bu alışmada Türkiyenin ekonomik öneme sahip endemik bitkilerinden biri olan *Thymus sipyaleus* Boiss. türünün In vitro çoğaltılması için bir prosedür belirlenmesi ve bunun aynı trzerine gelecekte yapılacak çalışmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışma materyalimiz olan *Thymus sipyaleus* Boiss. Manisa ili sınırları içindeki Spil Dağ'ından, 850 m. yükseklikten toplanmıştır.

Bitkinin öncelikle tohumları, yaprak ve yaprak sapları explant olarak kullanılmıştır. Öte yandan, In vitro imlenen tohumlardan elde edilen bitkiciklerin sürgünleri de deneme materyali olarak değerlendirilmiştir. Kullanılan tohumların bir kısmı Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Bahçesi tohum koleksiyonundan sağlanmıştır.

Saf su ile 3 kez yıkanan tohumlar sırasıyla steril saf su, % 4.5 Sodyum hipoklorit zeltisi ve % 70 etanol içinde 10 dakika tutularak sterilize edilmişlerdir. Son adımda steril distile suda yıkanıp yine steril kurutma kağıtları arasında kurutulmuşlardır.

Doğal ortamlarından alınan yaprak ve yaprak sapı explantlarının (~1 cm. boyutlarında) sterilizasyonu % 4.5 sodyumhipoklorit zeltisinde 10 dakika, %10 luk sodyumhipoklorit zeltisinde 8, 9, ve 10 dakikalık srelerde aynı sterilizasyon serilerinde 1 damla Tween 80 (deterjan) ilavesi ile denenerek gerçekleştirilmiştir.

Denemelerde kullanılan tüm araçlar ve ortamlar 121 C'de 1.4 atm. basıncı altında 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir.

In vitro çimlenme çalışmalarında temel besi ortamı olan Murashige-Skoog (MS) besi ortamı (3), Saez ve arkadaşlarının çalışmalarında olduğu gibi (4) bitkinin doğal yayılış alanlarındaki toprak yapısı ve madde isteklerine göre modifiye edilmiştir (mMS no.1 ve mMS no.2) (Tablo 1). Ayrıca Heller (5) besi ortamı da çimlenme ortamı olarak kullanılmıştır.

Kallus eldesi için 2 mg/l NAA, 2 mg/l BA ilaveli modifiye MS (mMS no.2) ortamı ve 0.4 mg/l NAA, 3 mg/l BA ilaveli MS temel ortamı kullanılmıştır. Elde edilen kalluslar 0.4 mg/l NAA, 3 mg/l BA eklenmiş MS temel ortamında rejenerere olmuşlardır. Rejenerantlar 2 hafta sonra çoklu sürgün halini almış ve 4. alt kültürün sonunda aynı ortamda kklenmişlerdir.

Tüm ortamlara 7 g/l agar, 30 g/l sakkaroz ilave edilmiş ve pH 5.8'e ayarlanmıştır.

Çimlenme denemeleri 27 ± 2 C'da karanlıkta büyüme odasında gerçekleştirilmiştir. Kallogenez ve rejenerasyon denemeleri ise 27 ± 2 C'da 16/8 saatlik uzun gün periyodunda büyüme odası koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar ve Tartışma

Steril edilen tohumlar laminar akımlı steril çalışma kabininde çimlenme denemelerine alınmışlardır.

Çimlenme denemeleri tüp, erlen ve maçentalarda gerçekleştirilmiş ve mMS no. 1 ve mMS no. 2 ortamının yanısıra eterik yağ salgılanması sonucu fidelerin hemen kararmasını engelleyen Heller besi ortamı da denenmiştir. 211 tohumun denendiği mMS no. 1 ortamında çimlenme % 1 ± 1 oranındadır, mMS no. 2'de ise 304 tohum denenmiş ve % 26 ± 6 lik çimlenme oranı görülmüştür. Heller ortamı için çimlenme sonuçları erlende 160 tohumla % 4 ± 1 , tüpte 50 tohumla % 14 ± 2 , maçentada ise 50 tohumla % 12 ± 2 olarak gerçekleşmiştir (Tablo 2).

Bu sonuçlarla *Thymus sipyleus*'ta en iyi çimlenmenin mMS no. 2 'de gerçekleştiği, ancak bitkinin sonraki gelişmesi için ise Heller ortamının uygun olduğu görülmüştür (Şekil 1). Heller ortamı fenoliklerin salgılanmasını aza indirdiğinden *Orchis L.* ve *Digitalis L.* türleri için ortamı belirleyen Heller tarafından önerilmektedir. *Thymus sipyleus*'unda sekonder metabolit içermesi ve gelişim sürecinde bunları ortama salgılaması sonucu kendine toksik etki yapması Heller besi ortamı kullanılarak engellenmeye çalışılmıştır.

Tablo 1. MS temel ortamı ile modifiye edilmiş MS ortamları arasındaki organik ve inorganik madde içeriği farkları.

NORGANİK		MS	mMS no.1	mMS no.2
NH ₄ NO ₃	mg/l	1650	2000	2000
Na ₃ PO ₄	mg/l	-	510	340
CaCl ₂ .2H ₂ O	mg/l	440	220	660
MnSO ₄ .4H ₂ O	mg/l	22,3	17	17
ORGANİK				
Tiamin HCL	mg/l	0,1	0,5	0,5
Nikotinik asit	mg/l	0,5	0,025	0,025
Sakkaroz	g/l	3	30	30

MS: Murashige-Skoog temel ortamı.

mMS: Modifiye edilmiş Murashige-Skoog ortamları.

Ortam	Tohum sayısı	% Çimlenme	Kap tipi
mMS no.1	211	1±1	Erlen
mMS no.2	304	26±6	Erlen
Heller	160	4±1	Erlen
Heller	50	14±2	Tüp
Heller	50	12±2	Maçenta

Tablo 2. Farklı ortamlarda görülen çimlenme sonuçları.



Şekil 1. Heller ortamında imlenmiŐ *Thymus sipyleus* fideleri.

Thymus sipyleus'un yaprak ve yaprak sapları 2 mg/l NAA ve 2 mg/l BA ilaveli mMS no. 2 ortamında kallus oluşumu için denenmiş ancak baŐarılı olunamamıŐtır. Aynı bitkinin In vitro çimlenmiŐ fideleri 0.4 mg/l NAA ve 3 mg/l BA ilave edilmiş MS temel ortamında % 100 verimle kallus vermiŐlerdir.

Kalluslar sağlıksız görünmesine karŐın aynı ortamda alt kültüre alınmaları sürecinde rejenerasyon görülmüştür. Rejenere olan köksüz bitkicikler önceleri baskın sürgün konumunda olmasına karŐın aynı ortamda alt kültüre alındıkça çoklu sürgün geliŐtirmiŐlerdir. Ancak bu bitkicikler 2 haftadan fazla alt kültürde bekletildiklerinde kararmıŐlardır (Şekil 2). *Thymus sipyleus* rejenerantları 4. alt kültürden sonra aynı ortamda kklenmiŐlerdir.

Yüksek alanlarda yayılış gösteren bitkilerde bazı morfolojik ve fizyolojik deęiŐiklikler gözlenebilir (6). Yüksek yerlerde yaŐayan kara bitkileri deniz yüzeyine yakın yerlerde yaŐayan kara bitkilerine göre mavi ve ultraviole iŐıęın daha çok etkisi altında bulunurlar. Bu durum bazı morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirleyici etkeni olabilir. Klein (7) ultraviole'nin bitki büyümesine etkisini ve büyüme maddeleri ile iliŐkisini araŐtırdık çalıŐmasında, U.V.



Şekil 2. 3 haftalık alt kültürde kararmış *Thymus ssp. fideli*.

ışıklandırmasının hücrelerin oksini gerektiği şekilde kullanabilme yeteneklerini etkileyerek, büyüme modifikasyonu meydana getirdiğini ileri sürmüştür.

Bizim çalışmamız sırasında, oksin miktarı sitokinin miktarından daha az olan ortamda , kallus ve köklenme oluşumu görülmesi oksin metabolizması ile ilgili olabilir. Eksplantın başlangıç hormon düzeyi alt kültüre alınma sürecinde artarak istenilen düzeye gelmiş olabilir. Bu yüzden yükseklerde yayılış gösteren endemik bitkilerin kültüre alındığı besi ortamında sitokinin miktarı fazla ise, ortam bileşenlerini değiştirmeden alt kültüre almak kallus oluşumu, rejenerasyon ve köklenme olgularını sırası ile verebilir.

Teşekkür

Çalışmamızı bir doktora projesi olarak destekleyen TÜBİTAK (TBAG-1190) ve Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynaklar

1. Tanker, M.; Tanker, N., Farmakognozi Cilt 2, Reman Matbaası, 1976 İstanbul, sf. 46-47.
2. Kaya, Z.; Kün, E.; Güner, A., Türkiye bitki çeşitliliğinin yerinde (in situ) korunması ulusal planı.Çevre Bakanlığı Çevre Koruma Genel Müdürlüğü Bitki Koruma ve Erozyonla Mücadele Daire Başkanlığı, Eylül 1998, sf. 73.
3. Murashige, T. and Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Plant Physiol. 15: 473-97 (1962).
4. Saez, F., Sanchez, P., Piğueras, A. Micropropagation of *Thymus piperella*, Plant cell tissue and organ culture 39 (3): 269-272 (1994).
5. Heller, R. Recherces sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives in vitro. Ann. Sci. Nat. Bot.; Biol. Vege. 14:1-223 (1953).
6. Yıldız, L. and Güven, A.. Investigations of Some Physiological Aspects of Some Plants from Different Altitude. XIII National Biology Congress Book., I: 65-74 (1997).
7. Klein, R.M.. Influence of ultraviolet radiation on auxin controlled plant growth. Amer. J. Bot., 54:904-914 (1967).