

***In vitro* KOLHİSİN UYGULAMASI İLE POLİPLOİD NANE (*Mentha longifolia* L.) BİTKİLERİNİN ELDE EDİLMESİ**

Şenay TEPE Şebnem ELLİALTIOĞLU
Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü 06110, Ankara

Nilgün YENİCE
Adnan Menderes Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Fen Fakültesi, Fen Bilgisi Eğitimi Bölümü, Aydın

Rukiye TIPIRDAMAZ
Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü 06532, Ankara

Özet

Bu çalışmada, nane bitkisinde *in vitro* kolhisin uygulamaları ile poliploid bitkilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. *Mentha longifolia* türüne ait açık arazide yetişen nane bitkilerinden alınan tek boğum eksplantları aseptik koşullarda, 30 g/l sukroz, 6 g/l agar, 0.5 mg/l BA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bir ay sonra, gelişen *in vitro* sürgünlerden tek boğum eksplantları ve sürgün uçları hazırlanarak 100 veya 150 mg/l kolhisin içeren besin ortamlarında 5, 7 ve 10 gün süreyle yetiştirilmiş, bu uygulamanın ardından kolhisin içermeyen taze besin ortamlarına aktarılmışlardır. İki ay süreyle gelişen bitkiler serada dış koşullara alıştırılmış, kök uçlarında kromozom sayımları yapılarak poliploidi oluşum oranları belirlenmiştir. Kolhisin uygulamalarında hem sürgün ucu, hem de tek boğum eksplantının kullanılabilmesi, eksplantların 5 gün 100 mg/l kolhisin uygulamasının ardından kolhisin içermeyen ortamlara aktarılması halinde %25-27 oranında poliploid bitkiler elde edilebileceği ortaya konmuştur. Kolhisin uygulamaları sonucunda değişik ploidi düzeyleri kaydedilmiştir. Bazı bitkilerin ise miksploid yapıda oldukları belirlenmiştir. Uygulama süresinin 10 güne çıkarılması hem gelişme oranını, hem de dikilen eksplant başına elde edilen poliploid bitki oranını düşürmüştür. Ayrıca yaprak morfolojileri de incelenerek stoma sayısı ile kromozom sayısı arasında bir ilişki kurulabileceği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nane (*Mentha longifolia* L.), Poliploidi, Kolhisin, *In vitro*.

Obtaining Polyploid Mint (*Mentha longifolia* L.) Plants with *In Vitro* Colchicine Treatment

Abstract

The aim of this study was to obtain polyploid mint plants through *in vitro* colchicine. Single node explants of *Mentha longifolia* L. were aseptically removed from actively growing plants and transferred into *in vitro* MS medium that contained 30 g·l⁻¹ sucrose, 6 g·l⁻¹ agar, 0.5 mg·l⁻¹ BA. After one month shoot tips and single node explants were prepared by using newly formed shoots. The shoot tips or single node explants were incubated in the media with 100 or 150 mg·l⁻¹ colchicine for 5, 7 or 10 days. And then they were transferred to medium without colchicine. Plants were transferred to the greenhouse for acclimatization two months later. The chromosomes counted at the root tips of the plants was made and were determined the different polyploidy levels. Some of these plants determined to be mixoploid. And both the shoot tip and single node explants could be used, dosage of 100 mg·l⁻¹ colchicine and period of 5 day were appropriate to obtained 25%-27% polyploid plants. Period of treatment 10 day was decreased development and the polyploid plants ratios per explant. Also the leaf morphology was observed and it was perceived that there was a high rate of correlation between stoma and chromosome numbers.

Keywords: Mint, (*Mentha longifolia* L.), polyploidy, colchicine, *In vitro*

1. Giriş

Poliploid bitkilerin; gövde, yaprak, çiçek gibi organları diploid olanlara göre daha büyük olup yüzey alanları daha genişdir. Bu bitkiler daha büyük hücrelere ve daha fazla klorofil miktarına sahip olduklarından, koyu yeşil renkleriyle dikkati çekmektedirler. Fotosentez potansiyelleri de diploidlere göre fazladır (Molin ve ark., 1982; İlarıslan, 1990). Bu durum, süs

bitkilerinin ıslahı üzerinde çalışan araştırmacılar için ilginç olduğu kadar (Rose ve Tobutt 2000; Vainöle ve Repo, 2000), özellikle vegetatif organlarından yararlanılan bitkiler için de oldukça dikkat çekicidir. Hücre irilikleri artan bu bitkilerin, nane gibi uçucu yağ içeren türlerde bu özellik bakımından da daha yüksek performans göstermeleri söz konusu olabilmektedir

(Tyagii ve Nagvi, 1987; Griesbach, 1990).

Kromozom sayıları artırılmış poliploid bitkilerin elde edilmesinde kullanılan geleneksel yöntemler, tohumların veya *in situ* bitki organlarının bazı kimyasal maddelerle uygulamaya tabi tutularak yeni genotiplerin oluşmasını sağlamaktadır (Şehirli ve Yazgan, 1986). Doku kültürü, pek çok konuda olduğu gibi poliploid bitkilerin elde edilmesinde de ıslahçılara kolaylık sağlamaktadır. Besin ortamına ilave edilen kromozom katlamada kullanılan kimyasal maddeler yardımıyla *in vitro* koşullarda poliploid bitkiler elde edilebilmektedir. *In vitro* koşullarda poliploid bitkilerin elde edilmesi için kullanılacak en pratik yöntemlerden birisi, besin ortamı içerisine kolhisin ilave edilmesi ve eksplantların bir süre için bu ortamda geliştirilmesidir (Griesbach, 1990; Rose ve Tobutt, 2000; Vainöle ve Repo, 2000).

Bu araştırmada, *in vitro* koşullarda poliploid nane (*Mentha longifolia* L.) bitkilerinin elde edilmesi amacıyla; en uygun kolhisin konsantrasyonu ve uygulama süresinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

Araştırmada, İç Anadolu Bölgesi'nde doğada yaygın olarak bulunan ve $2n=24$ kromozom sayısına sahip olan *Mentha longifolia* L. nane türüne ait bitkiler kullanılmıştır. *M.longifolia*'nın doku kültürü yoluyla çoğaltılmasında Ellialtıoğlu ve ark. (1998) tarafından belirlenen eksplant tipi, besin ortamı ve kültür koşulları kullanılmıştır. Buna göre açık araziden alınan nane sürgünlerinden tek boğum eksplantları hazırlanarak %15'lik ticari NaOCl çözeltisinde 15 dakika süreyle yüzeysel dezenfeksiyon işlemi yapılmıştır. 3 kez 5'er dakika steril saf su ile durulama yapıldıktan sonra eksplantlar kültüre alınmıştır. Besin ortamı olarak 0.5 mg/l BA, %3 sukroz ve %0.6 agar ilave edilmiş Murashige ve Skoog (MS) (1962) besin ortamı kullanılmıştır. Gelişen sürgünlerden dört kez alt kültür yapılmış, bol miktarda sürgün gelişimi sağlanmıştır. *In vitro* koşullarda aseptik olarak geliştirilen

sürgünlerden hazırlanan tek boğum eksplantları ve sürgün uçları, kolhisin uygulamalarında deneme materyali olarak kullanılmıştır. Ortamlar erlenmayerler içinde otoklavlandıktan sonra jel kıvamına gelmeden hemen önce 100 ve 150 mg/l dozunda kolhisin ilave edilmiş ve Magenta kutularına 30'ar ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Kolhisin katılmayan bir miktar ortam da kontrol olarak kullanılmıştır. Eksplantlar 5, 7 veya 10 gün süreyle bu ortamlarda inkübe edilmiştir. Her uygulama süresinde 60'ar adet tek boğum eksplantı ve sürgün ucu olacak şekilde dikim yapılmıştır. Kolhisinli ortamda bekletme süresi tamamlanan doku parçaları, kolhisin içermeyen aynı bileşimdeki taze ortamlara transfer edilmiştir. Dört hafta sonra bir kez daha taze ortamlara aktarılan sürgünler, iklim odasında 8 haftalarını tamamlayınca seraya çıkartılmışlardır. Bitkicikler serada sisleme sistemi altında ve perlit içerisinde dış koşullara alıştırmış, haftada bir kez Hogland besin çözeltisi ile sulanmışlardır. Kökleri gelişen ve dış koşullara alışan nane bitkileri bir aylık olduklarında harç doldurulmuş 10 cm çapındaki küçük plastik saksılara alınmıştır.

Gelişen bitkilerin kök uçlarında kromozom sayımları yapılmış, bunun için kök uçları +4°C'de doymuş α -monobromonaftalin çözeltisi içinde 16 saat bekletilmiş, glacial asetik asitte 30 dakika tespit işleminden sonra %70'lik etil alkolde oda sıcaklığında iki kez 5'er dakika yıkanan materyal, daha sonra %70'lik etil alkol içinde +4°C'de depolanmıştır (Sertöz, 1989). Hidroliz için +60°C'de, 1 N HCl'te 10 dakika tutulan materyal %1'lik asetik asit içinde 30 dakika süreyle boyanmıştır. Boyanan kök uçlarında ezme preparatlar yapılarak Nikon xII mikroskopta incelenmiş ve mikro fotoğrafları çekilmiştir. Kromozom sayımlarının yanısıra yaprak morfolojileri de incelenmiş, yaprakların alt epidermisinde bulunan stoma hücrelerinin sayısı belirlenmiştir. Bu amaçla yaprakların alt yüzeyine renksiz tırnak cilası sürülmüş, kuruyunca dikkatlice soyulan ince şeffaf tabaka, bir damla su damlatılarak preparat haline getirilmiş ve mikroskopta incelenmiş, Olympus marka ışık mikroskobunda fotoğrafları çekilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Kolhisin uygulamalarından sonra herhangi bir şekilde canlılık göstergesine sahip olan eksplantlar 'yaşayan eksplant' olarak değerlendirilmiş ve yaşama oranının (%) belirlenmesinde kullanılmıştır. Sürgün oluşturarak gelişmesine devam eden eksplantların sayıları ise gelişme oranının belirlenmesinde kullanılmış, poliploid bitki sayısının dikilen eksplant sayısına oranı da poliploid bitki oluşum oranı (%) olarak nitelendirilmiştir (Çizelge 1).

Kolhisin uygulamaları sonrasında taze ortamlara alınan tek boğum eksplantlarının büyük çoğunluğu yaşamasını en az iki ay boyunca sürdürmüştür. Ancak yaşayan tüm eksplantlardan yeni sürgünlerin gelişmesi söz konusu olamamış, bunlardan bir bölümü sert dokulu bir kallus oluşturarak gelişme göstermeksizin oldukları gibi kalmıştır. Kolhisin içeren ortamda tutma süresi arttıkça, gelişme miktarında azalma ortaya çıkmıştır. Kontrol dışında, 100 mg/l kolhisin içeren ortamlarda 5 gün boyunca tutulan tek boğumlarda hem yaşama oranı en yüksek değeri vermiş (%85.4), hem de gelişen bitki sayısı, gelişme oranı (%60.6) yüksek

bulunmuş; poliploid bitki elde etme oranı da %25 ile en yüksek değeri vermiştir. Bunun yanında sürgün uçlarının 100 mg/l kolhisin içeren ortamda 5, 7 ve 10 gün bekletilmesi veya 150 mg/l kolhisin içeren ortamda 5 gün tutulmasının da poliploid bitki elde etme amacıyla kullanılabileceği görülmüştür. Araştırmadan elde edilen sonuçlara benzer olarak *M. canadiensis* x *M. acuatica* türlerarası melezlerinde poliploid bitki elde etme konusunda çalışan Bugaenko ve ark. (1988) da kolhisin içeren besin ortamında geçirilecek optimum sürenin yan tomurcuk meristemleri için 1- 4 gün, tepe tomurcuğu meristemi için 7-10 gün, en etkili kolhisin konsantrasyonunun ise 100 mg/l olarak belirlendiğini ve bu dozda %16.7 oranında poliploid bitki elde edildiğini bildirmişlerdir. Farklı bir tür olmasına karşılık 100 mg/l kolhisin içeren ortamda 7 gün tutulan sürgün ucu eksplantlarından yapılan bu çalışmada da %11.6 oranında poliploid bitki elde edilmiştir. Griesbach (1990), 100 mg/l kolhisin içeren ortamlarda 7 gün süre ile beklettiği *Anigozanthos* sürgün uçlarından tetraploid bitkiler elde etmiştir. *M. longifolia* L. nane türünde gerçekleştirilen bu çalışmada, 7 gün süren kolhisin uygulaması sürgün

Çizelge 1. Kolhisin Uygulamaları Sonrasında Eksplantların Yaşama Oranı, *In Vitro* ve Sera Koşullarında Gelişen Bitki Sayısı, Poliploid Bitki Sayısı ve Poliploid Bitkilerin Dikilen Eksplant Sayısına Oranı (%).

Eksplant tipi	Kolhisin dozu	Uygulama süresi (gün)	Kültüre alınan eksplant sayısı	Yaşama oranı (<i>in vitro</i>) (%)	Gelişme oranı (<i>in vitro</i>) (%)	Serada gelişimini sürdüren bitki sayısı	Poliploid bitki sayısı	Poliploid bitkilerin dikilen eksplant sayısına oranı (%)	
Sürgün ucu	100 mg/l	5	60	95.2 a	50.8 bc	24	16	26.6	
		7	60	92.8 a	58.3 b	13	7	11.6	
		10	60	67.7 e	34.4 de	6	6	10.0	
	150 mg/l	5	60	90.0 b	46.5 c	8	8	13.3	
		7	60	70.0 d	31.1 e	7	5	9.3	
		10	60	78.5 cd	23.5 e	1	1	1.6	
	Kontrol			60	91.2 ab	85.7 a	35	0	0.0
	Tek boğum	100 mg/l	5	60	85.4 c	60.6 b	21	15	25.0
			7	60	78.3 cd	48.3 bc	6	4	6.6
10			60	69.6 de	27.5 e	5	4	6.6	
150 mg/l		5	60	73.3 d	40.3 d	4	3	5.0	
		7	60	76.6 d	38.2 d	6	5	9.3	
		10	60	95.3 a	27.3 e	6	2	3.3	
Kontrol			60	90.7 b	90.7 a	48	0	0.0	

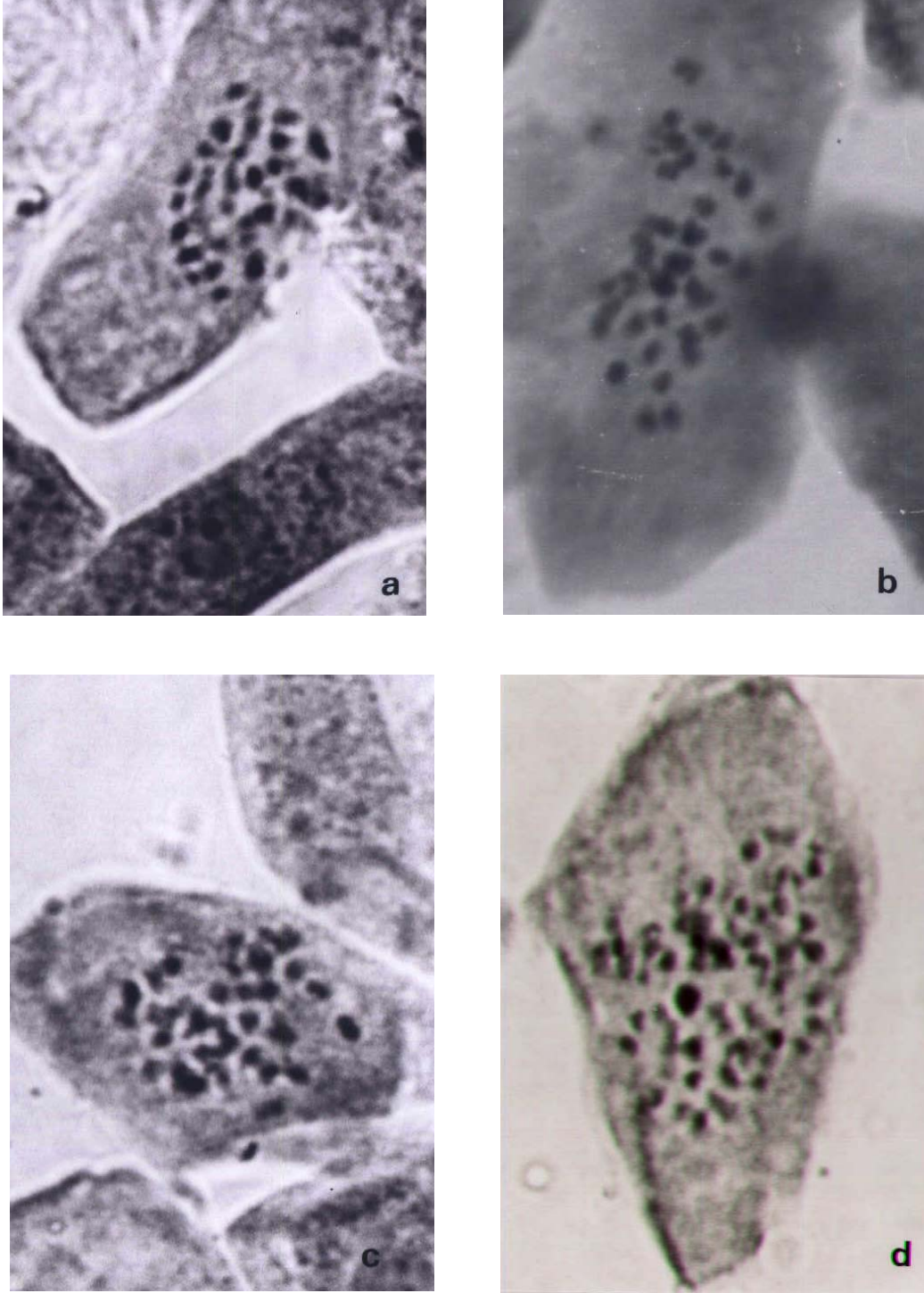
uçlarında iyi sonuç vermekle birlikte, tek boğum eksplantlarında düşük bir poliploid elde etme oranı sağlayabilmiştir. 10 gün süreyle kolhisinli ortamda bekletme ise, eksplantlardaki gelişme üzerinde olumsuz etkide bulunmuş ve diğer uygulamalara göre en düşük gelişme elde edilebilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada *M. longifolia* L.'da *in vitro* kolhisin uygulamaları ile poliploid bitki elde edilebilmiştir. Kolhisin uygulamalarında hem sürgün ucu hem de tek boğum eksplantının kullanılabilmesi, eksplantların 5 gün 100 mg/l kolhisin uygulamasının ardından kolhisin içermeyen ortamlara aktarılması halinde %25-27 oranında poliploid bitkiler elde edilebileceği ortaya konmuştur. Uygulama süresinin 10 güne çıkarılması hem gelişme oranını, hem de dikilen eksplant başına elde edilen poliploid bitki oranını düşürmüştür.

Kök uçlarında yapılan kromozom sayımları sonuçlarına göre; diploid kromozom sayısı $2n=24$ olan *M. longifolia* L.'da (Harley ve Brighton, 1977) kolhisin uygulamaları sonucunda bazı dokuların etkilenmeyerek diploid durumda kaldıkları, bazılarında triploid ($2n=36$), tetraploid ($2n=48$), pentaploid ($2n=60$) veya hekzaploid ($2n=72$) sürgünler geliştiği; bazı eksplantlardan ise birkaç farklı ploidi seviyesine sahip (miksoploid) bitkiler oluştuğu belirlenmiştir. Ploidi seviyeleri ile uygulama süresi arasında bir ilişki bulunmamıştır. Şekil 1 de, 5 gün boyunca kolhisin içeren ortamda bekletilen eksplantlardan gelişen değişik ploidi seviyelerine sahip bitkilerin kök uçlarındaki kromozom sayımları gösterilmiştir. Bu bitkilerin yaprak iriliklerinin arttığı, daha kuvvetli bir gelişme gösterdikleri ve daha koyu yeşil renkte oldukları gözlenmiştir (Şekil 2). Literatür bilgilerine göre poliploidlerin başlangıç bitkilerine göre morfolojik olarak farklılıklara sahip olduğu, çiçeklerinin tüylülük durumunun, stoma bekçi hücreleri büyüklüğünün ve uçucu yağ içeren keselerin, yapraklardaki pigment yoğunluğunun farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Buganenko ve ark., 1988). Poliploidinin tipik özelliklerinden olan koyu yeşil renklilik ile iri ve gösterişli habitus daha önce değişik bitki türleriyle yapılan çalışmalarda da belirtilmiştir (Tyagi ve

Nagvi, 1987, Rose ve Tobutt, 2000; Vainöle ve Repo, 2000).

Ayrıca, bitkideki kromozom sayısı ile yapraklardaki stoma sayıları arasında yüksek düzeyde bir ilişkinin bulunduğu ve bunun ploidi düzeyi hakkında önemli bir gösterge olabileceği belirlenmiştir. Araştırmada stoma sayımlarından elde edilen sonuçlar ile kromozom sayımları birlikte değerlendirildiğinde, bu iki özellik arasında yüksek oranda bir korelasyon bulunduğu izlenimine varılmıştır. Kromozom sayısı arttıkça hücre iriliklerinin arttığı ve yaprak birim alanına düşen stoma hücresi sayılarının azaldığı gözlenmiştir. Diploid bitkilerde 34-37 adet; triploid bitkilerde 24-27 adet; tetraploid bitkilerde 14-17 adet; hekzaploid bitkilerde 12-13 adet stoma sayılmıştır (Şekil 3). Hem fenolojik gözlemlerin, hem de yapraklardaki stoma sayılarının bitkideki ploidi seviyesi ile yakın bir ilişki içinde bulunduğu birçok bitki türünde önceki yıllarda ortaya konmuş bir olgudur. Ploidi seviyesi yükseldikçe bitki hücreleri irileşmekte ve birim alana düşen hücre sayısında azalma meydana gelmektedir (Mukherjee, 1986; Hömmö ve Valanne, 1987; İlarlan, 1990). Ancak bitkinin ploidi düzeyinin belirlenmesinde en güvenilir yöntem kuşkusuz kromozom sayımlarıdır. Diğer yöntemler araştırmacılara bir fikir vermekte, fakat kromozom sayımlarıyla desteklenmesi gerekmektedir.

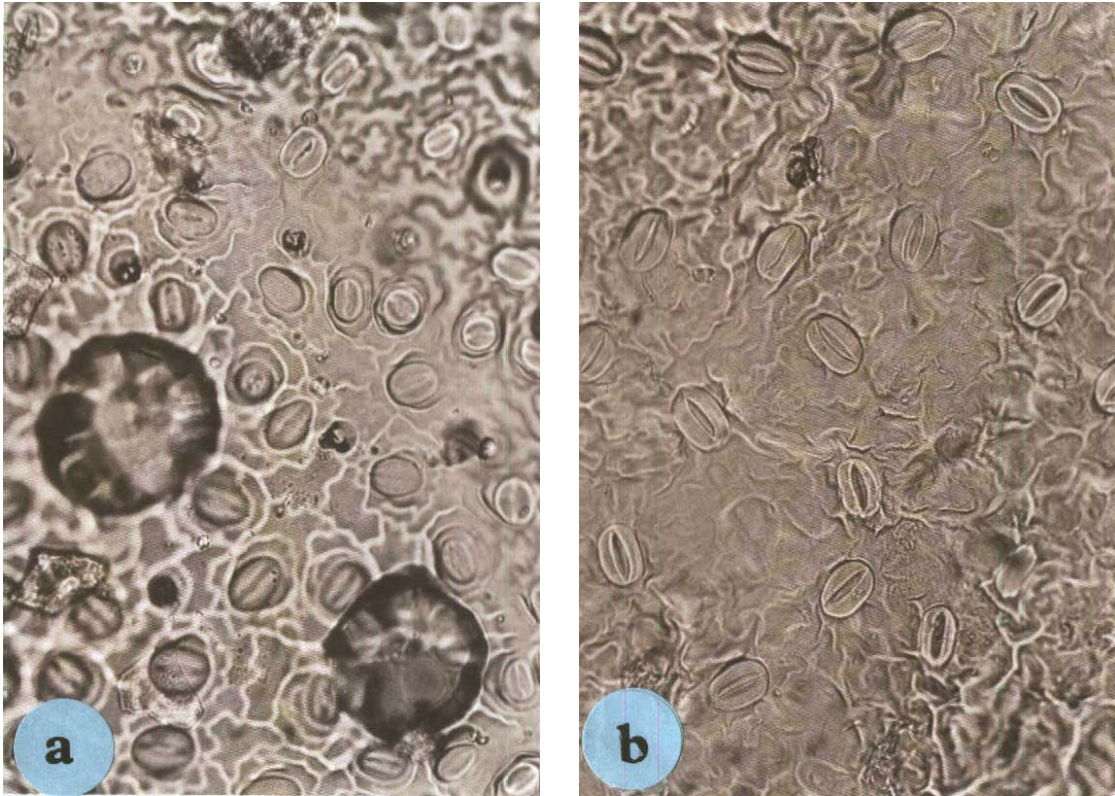
Yapılan bu çalışmanın sonucunda, içerisinde bulunan 'piperitenone oxide' adlı kimyasal bileşik nedeniyle değer taşıyan bir nane türü olan *M. longifolia*'da *in vitro* kolhisin uygulamasının; poliploid bitkilerin elde edilmesi amacıyla kullanılabilmesi ortaya konmuştur. Bunun için 5 gün süreyle 100 mg/l kolhisin içeren ortamda bekletilen ve daha sonra, kolhisin ilave edilmeyen ortamlara aktarılan tek boğum eksplantları diploid'den hekzaploid'e kadar değişik kromozom sayılarına sahip bitkiler elde edilmesine neden olmuştur. Kromozom sayımlarının yanısıra, yaprak epidermis dokusunun morfolojik olarak incelenmesinin, poliploidi seviyesi hakkında fikir verebileceği anlaşılmıştır. Elde edilen bu sonuçlar ışığında, ülkemizde doğal olarak yetişen 9 farklı nane türünde kolhisin uygulaması yapılarak, poliploid bitkilerin



Şekil 1. Nane Bitkilerinin Kök Ucu Hücrelerinde Metafaz Aşamasındaki Kromozomlar: a) Diploid ($2n=24$) Kontrol Bitkilerine Ait Kromozomlar (Büyütme: X1000), b) Uygulama Sonrasında Triploid ($2n=26$) Olan Bitkilerdeki Kromozomlar (Büyütme: X2000), c) Uygulama Sonrasında Tetraploid ($2n=48$) Olan Bitkilerdeki Kromozomlar (Büyütme: X1000), d) Uygulama Sonrasında Pentaploid ($2n=60$) Olan Bitkilerdeki Kromozomlar (Büyütme: X1000).



Şekil 2. Diploid (Sağda) ve Tetraploid (Solda) Nane Bitkilerinin Gelişmelerindeki Farklılık.



Şekil 3. a) Diploid ve b) Tetraploid Nane Bitkilerinde Yaprak Alt Epidermisindeki Stomaların Görünüşü.

elde edilmesi ve oluşacak bu bitkilerin uçucu yağ içeriklerindeki miktar yönünden meydana gelecek değişikliklerin belirlenmesi için çalışmalara devam edilmektedir.

Kaynaklar

- Bugaenko, L.A., Davydova, O.A., Rodov, V.S. and Gladun, S.M., 1988. Production poliploid plants of mint using *in vitro*. Biologiyе kul' tiviruemykh letok i biotekhnologiya, 1 (Ed: Butenko, R. G. J. 1988, 91, Novosibirsk, USSR)
- Ellialtıoğlu, Ş., Özcan, S., Demir, K. ve Tepe, Ş., 1998. Nanenin (*Mentha* sp.) doku kültürü ile çoğaltılma olanakları. III.Ulusal Biyoteknoloji Simpozyumu, Biyoteknolojide Üniversite - Sanayi İşbirliği, 23-24 Ekim 1998, Eskişehir.
- Griesbach, R.J., 1990. A fertile tetraploid *Anigozanthos* hybrid produced by *in vitro* colchicine treatment. Hort. Sci. 25 (7): 802-803
- Harley, R.M. and Brighton, C.A., 1977. Chromosome numbers in the genus *Mentha* L. J.of the Linnean Soc. 74: 71-96.
- Hömmö, L. and Valanne, T., 1987. Cytological and morphological analyses of grafted triploid aspens (*Populus tremula* L.) from Nonable Javri area in Finnish Lapland. Rep. Kevo Subarctic res. Stat. 20:21-25.
- İlarslan, İ. H., 1990. Diploid ve Tetraploid Çavdar (*Secale cereale* L.) Bitkisinin Morfolojik, Sitolojik ve Palinolojik Yapılarının Karşılaştırılması. A.Ü. Fen Bilimleri Enst., Doktora Tezi, Ankara, 92s.
- Molin, W.T., Mayers, S.P., Baer, G.R. and Schrader, L.E., 1982. Ploidy effects in isogenic populations of alfalfa. II. Photosynthesis chloroplast number, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase, chlorophyll, and DNA in protoplasts. Plant Physiol. 70: 1710-1714.
- Mukherjee, K.K., 1986. A comparative study of two cytotypes of *Chenopodium album* in West Bengal, India. Can. J.Bot. 64: 745-759.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Rose, J.B. and Tobutt, K.R., 2000. Induction of tetraploids for breeding hardy ornamentals. 4th International Symposium on *in vitro* culture and horticultural breeding. 2-7 July 2000, Tampere-Finland, Abstracts:12.
- Sertöz, N., 1989. Bazı *Mentha* Türlerinde Karyotip Analizler. Gazi Univ., Fen Bilimleri Enst., Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 46s.
- Şehirali, S. ve Yazgan, M., 1986. Bitki Islahı. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları: 971, Ofset Basım Ders Notu: 20, s:176-186.
- Tyagii, B.R. and Nagvi, A.A., 1987. Relevance of chromosome number variation to yield and quality of essential oil in *Mentha arvensis* L. Cytologia, 52 (2): 377-385.
- Vainöle, A. and Repo, T., 2000. Polyploidisation of *Rhododendron* cultivars *in vitro* and how it affects cold hardiness. 4th International Symposium on *in vitro* culture and horticultural breeding. 2-7 July 2000, Tampere-Finland, Abstracts:99.