

Araştırma Makalesi/Research Article (Original Paper)

## Tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) Bitkisinin Doku Kültürü Yoluyla Çoğaltılması Üzerinde Çalışmalar

Didem TÜRKÖZÜ<sup>1</sup>, Fikret YAŞAR<sup>\*2</sup>, Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU<sup>3</sup>, Bünyamin YILDIRIM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Iğdır Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü, Iğdır

<sup>2</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Van

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara

\*e-mail: fikretyasar65@gmail.com

**Özet:** Tıbbi ve aromatik bir bitki olan, kurutulmuş veya taze olarak tüketilen tarhun bitkisinin (*Artemisia dracunculus* L.) doku kültürü yoluyla çoğaltımı üzerinde çalışılmıştır. Tarhun bitkisinde yapılan doku kültürü çalışmasında, *in vitro* koşullarda çoğaltım için en uygun eksplant tipi, karbonhidrat kaynağı, alt kültür sayısının belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada farklı besin ortamları denenmiş ve en uygun besin ortamının 1.8 µM BA, 0.3 µM NAA, % 3 toz şeker ve % 0.7 agar ilave edilen Murashige ve Skoog besin ortamı olduğu tespit edilmiştir. En yüksek gelişme oranı % 92.0 değeriyle 'Sürgün ucu x Toz şeker' kombinasyonundan elde edilmiştir. Üç kere alt kültür yapılmış, alt kültürlerde rozetleşme ve albino bitki oluşumu gözlenmiştir. Besin ortamına GA<sub>3</sub> ilave edilmesi gelişmeyi olumsuz yönde etkilemiştir. En iyi durumda olan sürgünler ile köklendirme denemeleri kurulmuştur. Köklendirme aşamasında en uzun köklerin 0.5 mg/l IBA ilave edilen tam MS ve ½ MS ortamlarından elde edildiği (sırasıyla 44±14.0 ve 46±16.0 mm), hormonsuz ortamlardaki kök uzunluklarının daha kısa olarak belirlendiği görülmüştür (34±11.0 ve 35±08.0 mm). Köklenen tarhun bitkicikleri saksılara aktarılmıştır. Tarhunun doku kültürüyle çoğaltılması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Klonal mikroçoğaltımı sınırlandıran bir sorun olarak görülen albino bitki oluşumu ve bunun giderilmesi konularında detaylı çalışmalar yapılması gerektiği ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Tarhun (*Artemisia dracunculus* L.), Mikro çoğaltım, Ortam, Sürgün ucu, Tek boğum

### Researches on *in Vitro* Propagation of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.)

**Abstract:** Medicinal and aromatic plants, which are consumed as a dried or fresh tarragon plant (*Artemisia dracunculus* L.) through tissue culture propagation were studied. The tissue culture study on tarragon, explant type most suitable for *in vitro* propagation, carbohydrate source, and sub-culture tried to determine the number. In this study, the optimal nutritional environment of different nutrient media tried and BA 1.8 µM, 0.3 µM NAA, 3 % sugar and 0.7 % agar supplemented Murashige and Skoog nutrient medium were determined. The highest growth rate of 92.0 % according to this value, 'Shoot tip x Granulated sugar' were obtained from the combination. Three times were sub-culture, sub-cultures rosette and albino plant formation was observed. Addition of GA<sub>3</sub> adversely affected the development. The longest roots were obtained from 0.5 mg /l IBA supplemented MS and ½ MS media (44±14.0 and 46±16.0 mm, respectively), hormone-free medium was determined to be shorter root lengths (34±11.0 and 35±08.0 mm ). Tarragon rooted plants were transferred to pots. Tarragon propagation by tissue culture was carried out successfully. Clonal micropropagation seen as a problem limiting the formation of albino plants and eliminate about it was that detailed studies should be performed.

**Keywords:** Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.), Micropropagation, Medium, Shoot tip, Single node

### Giriş

Asteraceae familyası bitki türlerinden birisi olan *Artemisia dracunculus* L., çok yıllık çalimsı bir bitkidir. Yaprak altında bulunan yağ bezeleri biberimsi acı tadı olan, güzel bir koku yayar. İki önemli formu bulunmaktadır. Bunlardan birisi Fransız tarhunu (estragonu) olarak bilinen Form *dracunculus* olup steril çiçekleri nedeniyle tohum oluşturmadığından, vegetatif olarak kök parçası ve yaprak koltuklarından

alınan sürgünler ile çoğaltılır. Diğer kültürü yapılan Rus tarhununu ise Form *redowskii* (*A. dracunculoides*) daha az aromatik olmakla birlikte tohumla çoğaltılabilen özellik taşımaktadır (Ceylan, 1996). Özellikle Güneydoğu ve Doğu Anadolu Bölgeleri başta olmak üzere ülkemizin çeşitli bölgelerinde taze baharat olarak kullanıldığı gibi tarhun, kurutulduktan sonra da değerlendirilmektedir (Asımgil, 1997). Tarhun otu yağda kızartılarak çorbalara, tavuk, balık ve deniz ürünlerinin, av etlerinin üzerine dökmede kullanılır. Nane-anason karışımı bir aromaya sahip olması nedeniyle sirkeli yemeklerde ve balıkta özel bir tatlandırma etkisi vardır. İştah açıcı olarak, hazmettirici, barsak gazlarını giderici, romatizma engelleyici kürlerde ve diş ağrısını gidermede kullanıldığı bilinmektedir. Antioksidant ve antifungal özellikleri sayesinde gıdaların saklanması yararlanılmaktadır. Likörlerde de bulunabilir. Fransız mutfağının değerli otlarından biridir. Tarhun, kekik, maydanoz ve frenk maydanozundan yapılan taze karışım klasik bir kombinasyon olarak kullanılır. Bearnaise ve Remoulade soslarının yapımında vazgeçilmezdir (Anonim 2009b).

Hititlerin hava tanrısından adını alan ve ayrıca tarragon adıyla da bilinen bu bitki kuzey yarım kürede yetişir. Kökeni Orta Asya veya Sibiryaya olup, buradan tüm Avrasya'ya yayılmıştır (Gülpınar, 2012). Pelinotugillerden olan tarhun Türkistan'dan Horasan, Türkiye, Avrupa, Hindistan ve Çin'e kadar yayılmıştır. Tarhun, 'küçük ejderhaotu' diye anılır. İlk defa M.Ö. 2000'de Çinliler tarafından kullanıldığı, yazılı belgelerden anlaşılmaktadır. Bitkinin Fransız, Türk ve Rus Tarhununu üç türü mevcuttur. Türkiye ve Türkistan'da yetişen tarhun, Fransız tarhununa oldukça benzer (Anonim, 2009a). Polimorfik bir bitkidir ve çeşitli varyeteleri tanımlanmıştır (2n=36). Kök parçalarıyla vegetatif olarak çoğaltılabildiği gibi, ticari olarak çoğaltımında doku kültüründen faydalanılmaktadır (Sutton ve ark., 1985). Tohumla üretiminin yapılamaması, tarhun bitkisinin doku kültürü yoluyla çoğaltılması konusunu gündeme getirmiş, dünyada bu konuda öncü çalışmalar yapılmıştır (Garland ve Stoltz, 1980; Mackay ve Kitto, 1987; 1988; Minas, 2007; Pedroza, 2008; Fernandez-Lizarazo ve Mosquera-Vasquez, 2012). *A. vulgaris* L. (Ardiana ve ark., 1998; Sujatha ve Kumari, 2007), *A. absinthium* L. (Nin ve ark., 1996; Le ve ark., 2007; Yattoo, 2010), *Artemisia petrosa* ssp. *eriantha* (Pace ve ark., 2004), *A. pallens* L. (Nathan ve Yattoo, 2014), *Artemisia annua* L. (Tang ve ark., 2008); *A. judaica* L. (Liu ve ark., 2003) gibi diğer akraba türlerde yapılan doku kültürü çalışmalarına da rastlanmakla birlikte; ticari tarhunun mikroçoğaltımı konusunda literatür bilgisi oldukça sınırlıdır. Son yıllarda alternatif ürün ve fonksiyonel gıdalara olan ilginin artmasıyla tarhun bitkisinin daha sık gündeme geldiği gözlemlenmektedir. Bu çalışmada, tarhun bitkisinin (*Artemisia dracunculus* L.) *in vitro* koşullarda üretilmesi ve etkin bir üretime olanak sağlayacak optimal şartların belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece Türkiye'de tarhun çoğaltım materyalinin kısa süre içinde çok sayıda elde edilebilmesi yolunda bilgi ve deneyimlerin oluşturulması hedeflenmiştir.

## Materyal ve Metot

### Bitkisel Materyal

Denemede *Artemisia dracunculus* L. bitkisine ait olan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bahçe Bitkileri seralarında yetiştirilen Fransız Tarhununu kullanılmıştır.

### Besin Ortamlarının Bileşimi, Dokuların Kültüre Alınması, Alt Kültürler

Besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel ortam bileşimi kullanılmıştır. Ayrıca besin ortamına 1.8 µM BA + 0.3 µM NAA katıldıktan sonra (Mackay ve Kitto, 1988); % 3 oranında toz şeker veya glukoz ilave edilmiş, besin ortamları son hacmine gelecek şekilde distile saf su ile tamamlanmıştır. Bunun ardından ortam pH'sı 5.7'ye ayarlanmış ve son olarak besin ortamına jelleştirici madde olarak % 0.7 oranında agar ilave edilmiştir. Mackay ve Kitto (1988), tarhun doku kültürü için % 3 oranında sakaroz (Difco-Bacto) kullanımını tavsiye etmektedir. Ticari üretime yönelik bir çalışma olması nedeniyle, daha ucuz olan toz şeker kullanımının sakaroz yerine geçip geçemeyeceği araştırılmış, aynı dozda kullanılan glukoz da diğer bir enerji kaynağı olarak denemede yer almıştır.

Tarhun sürgünleri % 15'lik ticari sodyum hipoklorit içinde 15 dakika çalkalanarak yüzeysel sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bunun ardından, 3 defa 5'er dakika steril saf su ile durulama işlemi yapılmıştır. Sürgünler steril kurutma kağıdı üzerine alınarak eksplant hazırlanmak üzere hazır hale getirilmiştir. Tüm bu işlemler laminar akışlı kabinde aseptik koşullarda yapılmıştır. Eksplant olarak iki tip kullanılmıştır: Sürgün ucu eksplantı ve tek boğum eksplantı. Sürgünlerin ucundaki apikal bölgeden 1 cm civarında, 1-2 genç yapraklı kısım sürgün ucu eksplantı olarak hazırlanmıştır. Sürgünlerin üzerindeki boğumların

üzerinden ve altından yarımşar santimetre kalacak şekilde hazırlanan ve yaprakları kesilen boğumlar da, tek boğum eksplantlarını oluşturmuştur. Sürgün ucu eksplantları besin ortamına dikey, boğumlar ise yatay biçimde yerleştirilmişlerdir. Petri kutuları içerisine 5'er adet eksplant ekilmiştir. Eksplantların petri kutularındaki besin ortamlarına dikilmesinden sonra kültürler 2 hafta süreyle  $26\pm 2$  °C sıcaklık ve sürekli karanlık koşullarda tutulmuş (Minas, 2007), daha sonra 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış fotoperiyodik düzene sahip iklim odasına aktarılmışlardır.

Kültür ortamında gelişen sürgünler, tek boğumlara ve yine sürgün uçlarına bölünerek taze ortamlara aktarılmıştır. I. alt kültür ortamı olarak kullanılan besin ortamı ilk dikim ortamının aynı bileşimine sahip olacak şekilde (MS + 1.8 µM BA + 0.3 µM NAA + % 3 toz şeker + % 0.7 agar; pH: 5.7) hazırlanmıştır. Karbon kaynağı olarak sadece sofralık kullanıma uygun toz şeker kullanılmıştır (30 g/l). I. alt kültüre almadan önce her petrideki sürgünlere numaralandırma yapılarak sürgünlerin geldikleri kombinasyonlar kayıt altında tutulmuştur. Aktarma tamamlandıktan sonra kültürler fotoperiyodik olarak aydınlatılan iklim odasına yerleştirilmişlerdir ve alt kültüre alma işleminin ardından 4 hafta sonra sayım ve değerlendirme yapılmıştır. II. alt kültüre alma işlemi için, I. alt kültür süresini tamamlayan, yeni gelişen sürgünler tekrar kodlandırılarak kayıt altına alınmış; II. alt kültüre alma işlemi için yeniden sürgün ucu ve tek boğumlardan oluşan mikro çeliklere ayrılmıştır. I. alt kültürde kullanılan besin ortamı bileşimine ayrıca 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ilavesi yapılmıştır.

Birinci alt kültür aşamasında bir yan deneme daha kurulmuştur. İlk dikim ortamında olduğu gibi alt kültürde de toz şeker kullanımı ve sakaroz kullanımının etkisinin bulunup bulunmadığı incelenmiştir. Bu amaçla tek boğum ve sürgün ucu eksplantlarından 50'şer adet, 30 g/l sakaroz veya toz şeker bulduran I.alt kültür ortam bileşimine aktarılmıştır. Diğer uygulamalarda olduğu gibi 4 haftanın sonunda değerlendirme yapılmış, eksplant başına oluşan sürgün sayısı hesaplanmıştır.

Sürgün boylarının uzatılabilmesi ve boğum aralarının kısalmasıyla ortaya çıkan rozetleşme eğiliminin ortadan kaldırılması için yapılan 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ilavesi, bir sonraki aktarma aşaması olan III. alt kültürde de kullanılmış, ancak bu defa GA<sub>3</sub> ilave edilmeyen bir grup daha oluşturulmuştur. Böylece GA<sub>3</sub>'ün sürgünler üzerindeki etkisini görebilmek için, GA<sub>3</sub> ilave edilmeyen ve GA<sub>3</sub>'lü ortamlara aktarım yapılmıştır. III. alt kültürde sadece sağlıklı gelişmesine devam eden iki boğumlu mikroçelikler eksplant olarak kullanılarak alt kültürler kurulmuştur. Her uygulamada 20'şer adet mikroçelik yer almıştır. 4 hafta sonunda sürgün sayısı ve gelişme durumlarının değerlendirilmesi işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **Köklendirme aşaması**

Köklendirme aşamasında MS ortamı tam kuvvette veya ½ kuvvette hazırlanmış, bu ortamlara 0.5 mg/l IBA ilavesi yapılmış veya tamamen hormonsuz olarak bırakılmıştır. Ortamlara 150'şer adet 2-3 boğumlu mikroçelikler vertikal olarak yerleştirilmiştir. Üç hafta sonra köklenme oranları belirlenmiş ve % olarak gösterilmiş, 3 ve 6 hafta sonraki kök boyları ölçülmüştür.

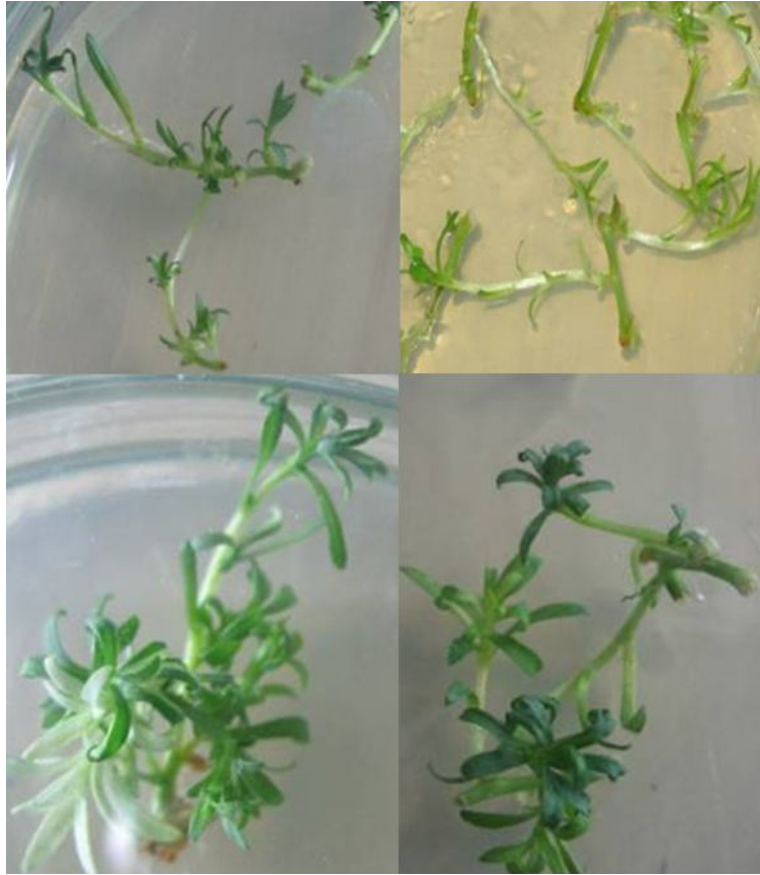
Tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulan denemelerden elde edilen sayısal değerler, varyans analizine tabi tutulmuş ve uygulamalar arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan önemlilik derecesi ortaya konulmuştur.

### **Bulgular ve Tartışma**

#### **İlk geliştirme aşaması**

Saksıda yetiştirilen bitkilerden alınan sürgünlerden hazırlanan sürgün ucu ve tek boğum eksplantlarının ve besin ortamına ilave edilen iki farklı karbonhidrat kaynağının (toz şeker ve glukoz) sürgün gelişimi ve yaşama oranı üzerine etkilerinin incelendiği ilk dikim aşamasında (=establishment stage) elde edilen sonuçlar, Çizelge 1'de verilmiştir. En yüksek gelişme oranı % 92.0 değeriyle 'Sürgün ucu x Toz şeker' kombinasyonundan elde edilmiş, bunu 'Tek boğum x Glukoz' kombinasyonu % 90.0'lık gelişme oranıyla izlemiştir. 'Sürgün ucu x Glukoz' ve 'Tek boğum x Toz şeker' kombinasyonları da % 84.0 ve % 81.1 gelişme oranı vermişlerdir. Sürgün ucu ve tek boğum eksplantlarının birbirine yakın yaşama ve gelişme oranı vermelerinin yanı sıra, karbon kaynağı olarak aynı dozda olmak kaydıyla toz şeker veya glukoz kullanılması arasında da, gelişmeyi önemli ölçüde etkileyebilecek büyük bir farklılık bulunmamıştır. Şekil 1'de sürgün ucu ve tek boğum eksplantlarından gelişen sürgünler görülmektedir. Eksplant başına

sürgün sayısı bakımından denemede yer alan uygulamalar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmamıştır. Bu nedenle genel bir ortalama olarak  $2.47 \pm 1.46$  adet sürgün sayısının, ilk dikimin yapılmasından sekiz hafta sonra elde edilebileceği söylenebilir. Çalışmamızda kullanılan eksplant tiplerine benzer olarak değişik türlerin mikroçoğaltımında farklı eksplant tiplerinin kullanıldığı birçok araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir. Kumari ve Saradhi (1992), *Origanum vulgare*'nin kallus kültüründen bitki rejenerasyonunu ve hızlı çoğaltımını araştırdıkları çalışmalarında kotiledon, hipokotil ve kök segmentlerini eksplant olarak kullanmışlardır. Nanenin (*Mentha* sp.) doku kültürü ile çoğaltılma olanaklarının araştırıldığı çalışmalarda (Čellárová, 1992; Ellialtıoğlu ve ark., 1998) sürgün ucu ve tek boğumlar kullanılmıştır. Erzen-Vodenik ve Baricevic (1996) *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum*'un doku kültürü ile çoğaltılmasında sürgün uçlarını, Yürekli ve Baba (1995) *Thymus sipyleus*, *Sideritis sipylea*'de yaprak sapı, yaprak parçaları, tek boğum ve sürgün uçlarını, Arrebola ve ark. (1997), *Satureja obovata* türünün mikroçoğaltımında tek boğumları eksplant olarak kullanmışlardır.



Şekil 1. İlk dikim ortamındaki tarhun sürgünleri: a. Sürgün ucu eksplantından gelişen ve sakarozlu ortamdaki bir sürgün, b. Tek boğum eksplantından gelişen ve sakarozlu ortamdaki bir sürgün, c. Sürgün ucu eksplantından gelişen ve toz şekerli ortamdaki bir sürgün, d. Tek boğum eksplantından gelişen ve toz şekerli ortamdaki bir sürgün

Çizelge 1. Tarhunda ilk gelişme aşamasında elde edilen sayısal değerler ve oranları

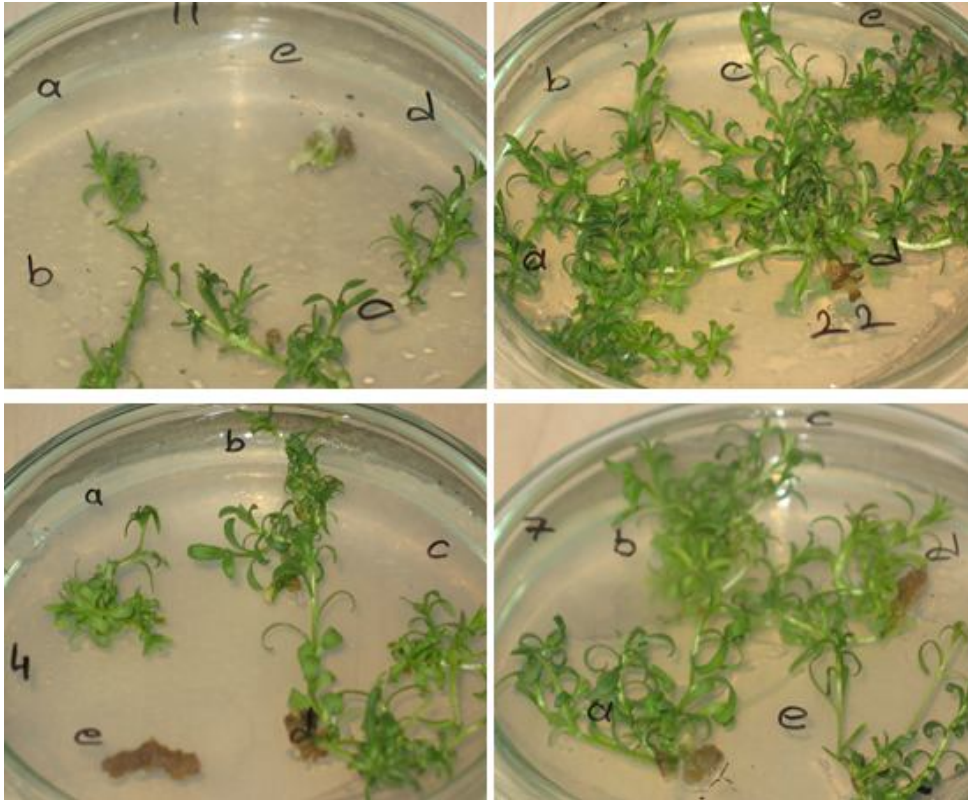
Eksplant Tipi	Karbon Kaynağı (%3)	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı	Enfeksiyon Nedeniyle Elemine Olanlar	Gelişmeyen Eksplant Sayısı	Gelişme Oranı (%)	Ortalama Sürgün Sayısı/ Eksplant	8.Hafta Sonunda Gelişen Sürgün Sayısı
Sürgün ucu	Toz şeker	50	-	4	92.0	$2.50 \pm 1.18$	115
Tek boğum	Glukoz	50	-	8	84.0	$2.57 \pm 1.25$	108
Sürgün ucu	Toz şeker	35	24	1	81.8	$2.70 \pm 1.11$	37
Tek boğum	Glukoz	45	25	2	90.0	$2.11 \pm 2.28$	48

İlk iki hafta tamamen karanlık koşullarda inkübe edildikten sonra fotoperiyodik düzende ışıklandırılan koşullara aktarılan kültürler, 1-2 gün içerisinde hemen yeşil renklerine kavuşmuşlardır. Kültürlerde herhangi bir kararma veya vitrifikasyon sorunu ile karşılaşmamıştır. Sürgün ucu veya tek boğum eksplantlarını kültüre alma bakımından bir tercih yapmayı sağlayacak önemli bir sayısal farklılık bulunmamıştır. Mackay ve Kitto (1988), Fransız tarhununu (*A. dracunculus*) bitkisinin hızlı çoğaltımı için sürgün uçlarının en iyi eksplant olduğundan bahsetmekte, ancak bunların dikey değil yatay olarak besin ortamına yerleştirilmesinin daha başarılı sonuçlar verdiğini bildirmektedir. Minas (2007), apikal meristemleri kullanarak tarhun bitkisinde *in vitro* kültür yapmış, bu eksplant tipinin de tarhun için kullanılabilir olduğundan bahsetmiştir.

MS ortamı, çalışmamızda Mackay ve Kitto (1988) ile Minas (2007) tarafından da belirtildiği gibi başarıyla kullanılmıştır. BAP ve NAA dozu da ilk gelişme aşaması için olumlu bulunmuştur ve herhangi bir değişiklik yapılmasına gerek duyulmamıştır. Bu yönüyle Mackay ve Kitto (1988)'nin önerileri uygun görülmüştür. Bitki dokularından organ farklılaşmasında oksin ve sitokininler önemli rol oynamaktadır. Bilindiği gibi sitokinin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin/sitokinin yüksek olması kök oluşumunu desteklemektedir (Werbrouck ve Debergh, 1994).

### Alt kültür aşamaları

Tek boğumlara ve yine sürgün uçlarına bölünerek taze ortamlara aktarılan tarhun eksplantları ile I. alt kültürler kurulmuştur. I. alt kültür sonunda başlangıçta toz şekerli ortamdan gelen sürgün ucu eksplantlarından ortalama 2.42 sürgün/eksplant; başlangıçta glukozlu ortamdan gelen sürgün ucu eksplantlarından ortalama 1.99 sürgün/eksplant; başlangıçta toz şekerli ortamdan gelen tek boğum eksplantlarından ortalama 1.26 sürgün/eksplant; başlangıçta glukozlu ortamdan gelen tek boğum eksplantlarından ortalama 3.72 sürgün/eksplant elde edildiği belirlenmiştir. Çizelge 2'de I. ve II. alt kültüre alınan toplam eksplant sayısı ve 4 hafta sonunda sayılan yeni sürgünlerin toplam sayıları, Şekil 2'de ise alt kültürde gelişen sürgünlerin görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2. I. alt kültürün sonunda gelişen yeni tarhun sürgünleri (MS + 1.8 µM BA + 0.3 µM NAA + % 3 toz şeker + % 0.7 agar; pH: 5.7); üst sıradakiler: tek boğum eksplantından çoğalan yeni sürgünler, alt sıradakiler: sürgünucu eksplantından çoğalan yeni sürgünler.

Çizelge 2. Tarhunda I. ve II. alt kültür aşamasında elde edilen sayısal değerler ve oranları

Eksplant Tipi	İlk Dikimdeki Karbon Kaynağı	I. Alt Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (sürgün + boğum)	Kültüre Toplam 4 Hafta Sonunda Gelişen Sürgün Sayısı	II. Alt Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (sürgün + boğum)	4 Hafta Sonunda Gelişen Sürgün Sayısı	Toplam Sürgün Sayısının Başlangıç Eksplantı Sayısına Oranı
Sürgün ucu	Toz şeker	115 + 41	378	378 + 216	750	15.00
	Glukoz	108 + 21	257	257 + 145	531	10.62
Tek Boğum	Toz şeker	27 + 7	43	43 + 73	150	15.00
	Glukoz	38 + 8	171	171 + 115	332	18.44

BAP ve NAA kombinasyonu, aksiller sürgün oluşumunu sağlamıştır. Değişik türler ile yapılan pek çok araştırmalarda da, tek başına BAP veya farklı BAP, NAA kombinasyonlarını içeren MS ve B5 besin ortamlarının ve değişik eksplant tiplerinin sürgün oluşumu üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Cellorává (1992) ve Ellialtıoğlu ve ark. (1998), *Mentha longifolia*'nın mikro-çoğaltımı için sürgün ucu ve tek boğumları eksplant olarak kullanmışlardır. 30 g/l sukroz ve 2 mg/l BAP içeren MS ortamının etkin bir sürgün rejenerasyonu için uygun olduğunu bildirmişlerdir. Tek boğum eksplantlarının bu amaçla kullanılabilirliğinden bahsetmişlerdir. Yürekli ve Baba (1995), bazı endemik türler ile yaptıkları çalışmada sürgün oluşumunun 0.4 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BA içeren MS besin ortamında gerçekleştiğini belirlemişlerdir.

İlk dikim ortamında geliştirilen sürgünlerin bir kısmı, karbon kaynağı olarak sakaroz ve toz şeker arasındaki farkın belirlenmesi amacıyla tekerrürlü olarak paralel bir denemeye tabi tutulmuştur. Sürgün uçları ve boğum eksplantları % 3 oranında toz şekerli veya sakarozlu ortamlara dikilmiştir. Toz şeker kullanılan ortamdaki sürgün uçları sürgün sayısı/eksplant bakımından en yüksek değeri vermiş (5.02±2.10), bunu sakarozdaki sürgün ucu, toz şekerdeki tek boğumlar ve sakarozdaki tek boğumlar izlemiştir (4.73±1.91, 4.18±1.49, 3.83±1.37 sürgün sayısı/eksplant) (Çizelge 3). Besin ortamında 30 g/l sakaroz bulunması, Garland ve Stoltz (1980), Mackay ve Kitto (1988) tarafından tarhun için sürgün çoğaltımı aşamasında en uygun bulunmuştur. Minas (2007) da, benzer sonuçlar elde etmiştir. Bu çalışmada sakaroz yerine yine aynı tabiatla olan fakat sofrada kullanılabilir safliktaki toz şeker kullanılmıştır. Toz şekerin sakaroz yerine kullanılabilirliği görülmüştür. Toz şekerin fark yaratmaksızın başarılı sonuçlar vermesi, *in vitro* çoğaltım maliyetini düşürebilecek önemli bir bulgu olarak öne çıkmıştır.

Çizelge 3. Birinci alt kültürde eksplantların toz şekerli veya sakarozlu ortamlara aktarılmasından 4 hafta sonraki sürgün sayıları

Eksplant Tipi	Uygulama	Kültüre alınan eksplant sayısı	Sürgün sayısı/Eksplant	Canlı kalan eksplant sayısı	Albino oluşan eksplant sayısı
Toz şeker	Sürgün ucu	50	5.02±2.10 <sup>a</sup>	47	5
	Tek boğum	50	4.18±1.49 <sup>ab</sup>	50	4
Sakaroz	Sürgün ucu	50	4.73±1.91 <sup>ab</sup>	48	7
	Tek boğum	50	3.83±1.37 <sup>b</sup>	48	2

\*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir.

0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ilavesi yapılan ve toz şeker içeren standart ortamlarda II.alt kültüre alınan sürgünler ilk iki hafta içerisinde oldukça iyi gelişme göstermişlerdir. Sürgünler yeşil ve canlı görünümünü muhafaza etmişler, yapraklar bir miktar irileşmiştir. Ancak üçüncü haftadan itibaren II. alt kültürdeki gelişme hızında ve bitkilerin görünümünde gerilemeler ortaya çıkmaya başlamıştır. Cüceleşme ve rozetleşmelerin belirgin olduğu bu aşamada, elde edilen sürgünlerin kalitesinde de azalmalar meydana gelmiştir. Doku ölümleri meydana gelmeye başlamıştır. İkinci alt kültürün 4. haftası tamamlandığında beyazlaşma, rozetleşme ve gelişme geriliği daha da belirgin olmaya başlamıştır. İkinci alt kültürde sürgün ölümleri ve albino bitkilerin oluşumu nedeniyle alt kültüre alma işlemine son verilmiştir.

İkinci alt kültürden sonra sağlıklı sürgünler iki boğumlu mikroçelikler haline getirilerek taze ortamlara aktarılmıştır. Böylece III. alt kültür denemesi kurulmuştur. GA<sub>3</sub> ilave edilmeyen ve GA<sub>3</sub>'lü ortamlara

aktarım yapılmıştır. Kontrol ortamlarında sürgünler gelişmelerini sürdürmeye devam etmişler ve sürgün oluşturmuşlar, buna karşılık GA<sub>3</sub> katkılı ortamlara aktarılan sürgünler kahverengilemiş ve canlılıklarını yitirmişlerdir. Miyoshi ve Mii (1995), *Calanthe discolor* orkide türünde çimlenme oranını artırmak amacıyla 0, 10, 100 ve 1000 mg/l GA<sub>3</sub> solüsyonunda bir gün boyunca daldırma yapıp tohumları bu işlemin ardından kültüre almışlar veya besin ortamına 1 ya da 10 mg/l GA<sub>3</sub> ilave etmişlerdir. GA<sub>3</sub> uygulaması çimlenmeyi engelleyici etki yapmıştır. Gümüş (2009) de, bazı salep orkidelerinin *in vitro* çimlendirilmesi ve bitki geliştirilmesi üzerine yaptığı çalışmasında besin ortamına GA<sub>3</sub> ilavesinin çimlenme ve gelişme oranlarına engelleyici etki yaptığını bildirmiştir. Çalışmamızda GA<sub>3</sub> ilave edilen ortamlara aktarılan sürgün uçlarının % 38'i, tek boğumların ise % 14'ü canlılığını sürdürmüş olduğu halde; GA<sub>3</sub> ilave edilmeyen kontrol ortamlarında bu oranlar % 93 ve 91 olmuştur (Çizelge 4).

Çizelge 4. Üçüncü alt kültür aşamasında GA<sub>3</sub> içeren ve içermeyen ortamlara aktarılan tarhun sürgünlerinin, 4 hafta sonraki canlı sürgün sayıları

Eksplant Tipi	Uygulama	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı	Sürgün Sayısı/Eksplant	Canlı Eksplant Sayısı	Kalan Eksplant Sayısı	Albino Eksplant Sayısı	Oluşan
Sürgün ucu	Kontrol	20	5.32±1.76	17		5	
	GA <sub>3</sub>	20	2.12±1.18	8		-	
Tek boğum	Kontrol	20	4.23±2.69	18		4	
	GA <sub>3</sub>	20	2.14±1.57	3		-	

#### Köklendirme aşaması

Tam kuvvette veya ½ kuvvette hazırlanan ve 0.5 mg/l IBA ilavesi yapılmış veya tamamen hormonsuz olarak bırakılan MS ortamlarına aktarım yapılmıştır. Köklenme amacıyla uygulama yapılan ve sağlıklı 2-3 boğumlu tek sürgünlerin dikildiği farklı dört bileşime sahip ortamlardaki köklenme oranlarına ilişkin bilgiler Çizelge 5'te verilmiştir. Tarhun sürgünlerinin *in vitro* koşullarda köklenmesiyle ilgili herhangi bir sorun oluşmamıştır.

Çizelge 4.5. Köklendirme aşamasında dört farklı bileşimdeki ortamda tarhun sürgünlerinin köklenme oranları

Besin Ortamları	Köklendirme Ortamına Dikilen Sürgün Sayısı	Köklenen Sürgün Oranı (%)	3 Hafta Sonra Kök Uzunluğu (mm)	6 hafta Sonra Kök Uzunluğu (mm)
K1 (MS hormonsuz)	150	100	34± 11.0 <sup>b</sup>	157±20.4 <sup>b</sup>
K2 (½ MS hormonsuz)	150	100	35±08.0 <sup>b</sup>	173±25.5 <sup>a</sup>
K3 (MS + 0.5 mg/l IBA)	150	100	44±14.0 <sup>a</sup>	121±18.4 <sup>c</sup>
K4 (½ MS + 0.5 mg/l IBA)	150	100	46±16.0 <sup>a</sup>	142±24.0 <sup>b</sup>

Denemede yer alan hormon ilave edilen veya hormon ilavesi yapılmayan tam kuvvetteki veya yarı kuvvette hazırlanan MS ortamlarının tümünde % 100 oranında köklenme meydana gelmiştir. Kök oluşumu için farklı IBA konsantrasyonlarını (0.0, 0.5 mg/l) içeren MS ve ½ MS ortamlar kullanılmıştır. Bu ortamların kök oluşumu üzerindeki etkilerinin önemli düzeyde olmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Piatczak ve ark. (2005) da, hormon içermeyen MS ortamının köklendirmeyi artırdığını rapor etmişlerdir. Mackay ve Kitto (1988), köklendirme aşamasındaki tarhun eksplantlarının NAA veya IBA ilave edilen ve kontrol ortamlarında köklendirildiğini bildirmiş; ancak en yüksek köklenme oranı % 86 olmuştur. Bizim çalışmamızda bu açıdan başarı daha yüksek bulunmuştur. Minas (2007), köklendirme konusunda sayısal verilere yer vermemiş ancak herhangi bir sorundan da bahsetmemiştir. *In vitro* köklenen bitkilerin dış koşullara aktarıldığını, bazı sürgünlerin serada *ex vitro* köklendirildiklerinden de söz etmiştir. Bu bulgu, ½ MS ortamında %100 oranındaki köklenme ile de uyumludur.

Köklenen tarhun bitkiciklerinin dış koşullara alıştırılması amacıyla perlit doldurulmuş saksılara aktarma işlemi yapılmış ve ardından naylon torbalarla saksılar kapatılmıştır. İklim odalarında bu şekilde 2 hafta yaşatılan bitkileri koruyan naylon torbaların açılması ile birlikte birkaç gün içerisinde materyal kaybedilmiştir.

## Sonuç

Tarhun bitkisi için uygun besin ortamının MS + 1.8 µM BA + 0.3 µM NAA + % 3 toz şeker + % 0.7 agar; pH: 5.7 olduğu tespit edilmiştir. En yüksek gelişme oranı % 92.0 değeriyle ‘Sürgün ucu x Toz şeker’ kombinasyonundan elde edilmiş, bunu ‘Tek boğum x Glukoz’ kombinasyonu % 90.0’lık gelişme oranıyla izlemiştir. Kullanılan karbon kaynağı açısından aynı dozda olmak kaydıyla toz şeker veya glukoz kullanılması arasında, gelişmeyi önemli ölçüde etkileyebilecek bir farklılık ortaya çıkmamıştır. Bu çalışmada sakaroz yerine yine aynı yapıda olan fakat sadece sofrada kullanılacak saflıktaki toz şeker kullanılmıştır. Toz şekerin sakaroz yerine kullanılabilmesi görülmüştür. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından denemede yer alan uygulamalar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır.

GA<sub>3</sub> katkısı tarhun sürgünlerinin doku kültürü aşamalarında özellikle alt kültürlerde olumlu bulunmamıştır. Olumsuz etkisi belirlenen gibberellik asit ilavesi sürgünlerde kahverengileşme ve canlılık kaybının artmasına neden olmuştur. Birinci alt kültürde birkaç adet olmakla birlikte daha sonraki alt kültürlerde albino bitki veya kimerik albino görünümle %15-25 arasında karşılaşmıştır. Bu konunun araştırılmaya gereksinim duyduğu kanaati oluşmuştur.

Köklendirme ortamına aktarılan sürgünlerin 6 haftalık olduklarında köklerinin uzadığı ve en uzun köklerin K2 ortamından (1/2 MS hormonsuz) elde edildiği (173±25.5 mm), bunu K1, K4 ve K3 ortamlarının izlediği görülmüştür (157±20.4, 142±24.0 ve 121±18.4 mm). IBA içeren ortamların köklenmelerinin dallanarak oldukça fazla yoğunluk oluşturduğu ve bazı köklerin kalınlaştığı da dikkat çekmiştir ancak kök uzunluğu daha az olmuştur. Çalışmamızda kök oluşumu için farklı IBA konsantrasyonlarını (0.0, 0.5 mg/l) içeren MS ve ½ MS ortamlar kullanılmıştır. Bu ortamların kök oluşumu üzerindeki etkilerinin önemli düzeyde olmadığı belirlenmiştir. IBA katkısı ile köklenme % 100 olduğu, IBA içermeyen hormonsuz MS ortamının etkisinin de IBA ile benzer bulunduğu ve kök oluşumunu % 100 oranında meydana getirdiği tespit edilmiştir. Dış koşullara alıştırma aşamasında nem ve iklimlendirme koşullarının optimize edilmesi gerektiği, atmosfer neminin yeterli olmaması halinde bitkiciklerin yaşama şansı bulamayacakları anlaşılmıştır.

Sonuç olarak tarhun bitkisinin doku kültürü ile çoğaltılmasında sürgün ucu ve tek boğum eksplantlarının başarıyla kullanılabilmesi, toz şekerin maliyeti düşüren bir faktör olarak kullanımının önerilebileceği, iki alt kültürün başarı ile yapılabilmesi ortaya konmuştur. Alt kültür sayısının artırılması, fizyolojik doku kültürü sorunlarının çözülmesi ve kültürün devamlılığının sağlanması konusunda yeni çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

## Kaynaklar

- Anonim (2009a). <http://www.alternatif-tip.net/>. Erişim Tarihi: 15.09.2007.
- Anonim (2009b). <http://www.superbherbs.net/Frenchtarragon.htm>. Erişim Tarihi: 21.10. 2009.
- Ardiana H. K., Joko B. S. (1998). Callus induction of *Artemisia (Artemisia vulgaris L.)* by in vitro culture. *Agris Record*, 6 (2), p. 135-141.
- Arrebola ML., Socorro O., Barcelo MA., Simon PE., Pliego AF (1997). Micropropagation of *Satureja obovata* Lag.s, *Hort Science*, 32 (7), 1278-1280.
- Asımgil A (1997). Şifalı Bitkiler. Timaş Yayınları-176 s: 276. İstanbul.
- Ceylan A (1996). Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ Bitkileri), Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayını, No:481, Bornova/İzmir.
- Čellárová E (1992). Micropropagation *Mentha L.*, *Biotechnology in Agriculture And Forestry* 19, High Tech. and Micropropagation II, Bajaj, Y. P. S. (eds.) Springer-Verlag, pp. 262-276.
- Ellialtıoğlu Ş., Özcan S., Demir K., Tepe Ş (1998). Nanenin (*Mentha sp.*) Doku Kültürü ile Çoğaltma Olanakları. III. Ulusal Biyoteknoloji Sempozyumu, Biyoteknolojide Üniversite-Sanayi İşbirliği, 23-24 Ekim, Eskişehir.
- Erzen-Vodenik M., Baricevic D (1996). Tissue propagation of medicinal and aromatic plants, *Novi izzivi v poljedelstvu* 96, *Zbornik simpozija*, Ljubljana, Sloveria, 9-10 decembra, 201-206.
- Fernandez-Lizarazo JC., Mosquera-Vasquez T (2012). Efficient Micropropagation of French Tarragon (*Artemisia dracuncululus L.*). *Agron. colomb.* [online]. 30(3): 335-344.
- Garland P., Stoltz LP (1980). *In vitro* Propagation of Tarragon. *Hortscience*, 15 (6) : 739.



- Gülpınar Y (2012). Tarhun Bitkisinin (*Artemisia dracunculus* L.) Wistar Albino Ratlarda Oluşturulmuş Akut Karaciğer Toksik Hasarına Karşı Koruyucu ve Tedavi Edici Etkisinin Araştırılması. Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 48, Gaziantep.
- Gümüş C (2009). Batı Karadeniz Bölgesi'nde Salep Elde Edilmesinde Kullanılan Bazı Orkide Türlerinin (*Orchidaceae*) Çoğaltım Yöntemleri Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bil. Enst. Doktora Tezi, 205, Ankara.
- Kumari N., Saradhi PP (1992). Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgare* L., Plant Cell Rep., 11 (9), 476-479.
- Le CL., Julmi C., Tschuy F (2007). *In vitro* micropropagation of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). Agris Record, 39 (4), p. 263-267.
- Liu CZ., Murch SJ., El-Demerdash M., Saxena PK (2003). Regeneration of the Egyptian Medicinal plant *Artemisia judaica* L. Plant Cell Reports, 21 (6), p. 525-530.
- Mackay WA., Kitto SL (1987). Rapid propagation of French Tarragon using *in vitro* techniques. ISHS Acta Horticulturæ 208: 251-261.
- Mackay WA., Kitto SL (1988). Factors affecting *in vitro* shoot proliferation of French Tarragon. Journal of The American Society for Horticultural Science, 113 (2): 282-287
- Minas GJ (2007). A protocol for *in vitro* rapid micro propagation of French Tarragon starting from apical meristem. ISHS Acta Horticulturæ 741: I International Symposium on Fresh Food Quality Standards: Better Food by Quality and Assurance.
- Miyoshi K., Mii M (1995). Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (*Orchidaceae*), in asymbiotic culture. Scientia Hort., 63:263-267.
- Murashige T., Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum, 15, 473-497.
- Nathan VN., Yatoo GM (2014). Micropropagation of an Antidiabetic Medicinal Plant, *Artemisia pallans*. Turkish J. of Botany. 38: 1-8.
- Nin S., Morosi E., Schiff S., Bennici A (1996). Callus cultures of *Artemisia absinthium* L.: initiation, growth optimization and organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45 (1): 67-72.
- Pace L., Pacioni G., Spano L (2004). *In vitro* propagation of *Artemisia petrosa* ssp. *eriantha*: potential for the preservation of an endangered species. Plant Biosystems- An International Dealing with all Aspects of Plant Biology, 138 (3): 291-294.
- Pedroza J (2008). Aplicaciones del cultivo de tejidos en condiciones *in vitro*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogota.
- Piateczak E., Wielanek M., Wysokinska H (2005). Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaurium erythrae* Rafn. Plant Science, 168: 431-437.
- Sujatha G., Kumari RBD (2007). Effect of phytohormones on micropropagation of *Artemisia vulgaris* L. Acta Physiologica Plantarum, 29 (3): 189-195.
- Sutton S., Humphries C., Hopkinson J (1985). Tarragon. Garden, Uk 110 (5) : 237-240.
- Tang F., Wei J., Jiang Y., Jiang S., Huang N., Wei X (2008). Rapid propagation and germplasm conservation *in vitro* of *Artemisia annua* L. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2008-05.
- Werbrouck SPO., Debergh PC (1994). Applied aspects of plant regeneration (micropropagation). Plant Cell Culture-A practical Approach, Dixon, R. A and Gonzales, R. A. (eds.) Oxford Üni. Pres., New York, pp. 127-135.
- Yatoo GM (2010). Callogenesis and direct organogenesis from aseptically cultured plant of *Artemisia absinthium* L. growing wild in Kashmir. J. Ind. Bot.Soc., 89: 248-252.
- Yürekli AK., Baba B (1995). Ekonomik Öneme Sahip Endemiklerin Doku Kültürü Teknikleri ile Çoğaltılması. TBAG-1190, 61s.