

Araştırma Makalesi/Research Article (Original Paper)

## Endemik *Astragalus trojanus* Stev'in Nodal Kültür ile Mikroçoğaltımı

Emine ATALAY<sup>1\*</sup>, Münüre TANUR ERKOYUNCU<sup>1</sup>,  
Semiha ERİŞEN<sup>2</sup>, Mustafa YORGANCILAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 42075, Konya, Türkiye

<sup>2</sup> YTÜ Fen-Ed. Fak., Moleküler Biy. ve Gen. Bölümü, Davutpaşa Kampüsü, 34220 İstanbul, Türkiye

\*e-posta: eatalay@selcuk.edu.tr; Tel: +90 (332) 223 28 63; Faks: +90 (332) 241 01 08

**Özet:** Bu çalışmada, tıbbi özelliklere sahip endemik *Astragalus trojanus* Stev. bitkisinin nodal kültürleri ile klonal çoğaltım amaçlanmıştır. Tohumlar Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında çimlendirilmiş ve elde edilen steril fidelerin nodal segmentleri eksplant olarak kullanılmıştır. İlk olarak MS ve Woody Plant Medium (WPM) besin ortamlarının sürgün çoğaltımına etkileri araştırılmıştır. Eksplantlar farklı konsantrasyonlarda (0,2, 0,5, 1,0, 2,0 mg/L) 6-benzil amino purin (BAP) içeren MS ya da WPM besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültürden 4 hafta sonra en fazla sürgün sayısı (2,80 adet/eksplant) 0,5 mg/L BAP içeren WPM ortamında elde edilmiştir. Çalışmanın devamında nodal segmentler, sitokin kaynağı ve konsantrasyonlarının sürgün çoğaltımına etkisini belirlemek amacıyla BAP, thidiazuron (TDZ), kinetin (KIN)'in farklı konsantrasyonlarını (0,2, 0,5, 1,0, 2,0 mg/L) içeren WPM temel besin ortamında kültüre alınmıştır. 4 hafta sonunda elde edilen sürgün sayıları bakımından TDZ ve KIN'in benzer etki gösterdiği, en yüksek sürgün sayısının (2,09 adet/eksplant) BAP'dan elde edildiği tespit edilmiştir. Rejenere sürgünler köklenme için 1 veya 3 mg/L indol-3-butirik asit (IBA), naftalen asetik asit (NAA) veya indol-3-asetik asit (IAA) içeren WPM ortamlarına aktarılmıştır. Kültürden 4 hafta sonra en yüksek köklenme yüzdesi (%80) 3 mg/L IBA içeren WPM ortamından elde edilirken, en fazla kök sayısı (4,33 adet/eksplant) 3 mg/L IAA içeren WPM ortamından elde edilmiştir. Köklenen bitkicikler 1:1 oranında torf ve perlit içeren plastik bardaklara aktarılarak dış ortama başarıyla alıştırmış ve tam bitki gelişimi 15 hafta sonunda tamamlanmıştır. Bu araştırma ile, *Astragalus trojanus* Stev. endemik türünde etkili bir klonal çoğaltım metodu tanımlanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Astragalus*, Klonal çoğaltım, Köklenme, Nodal segment, WPM

### Micropropagation of Endemic *Astragalus trojanus* Stev. with Nodal Culture

**Abstract:** The clonal propagation with nodal cultures of the medicinal endemic plant species *Astragalus trojanus* Stev. was aimed in this study. Seeds were germinated in Murashige and Skoog (MS) medium, and the nodal segments obtained from seedlings were used as an explant. Firstly, the effects of MS and (Woody Plant Medium) WPM nutrient media on shoot multiplication were investigated. The explants were cultured in MS or WPM nutrient media containing at different concentrations (0,2, 0,5, 1,0, 2,0 mg L<sup>-1</sup>) 6-benzyl amino purine (BAP). After 4 weeks from culture, the highest number of shoots (2,80 number/explant) was obtained in WPM medium containing 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP. Nodal segments were cultured in WPM medium containing different concentrations of BAP, thidiazuron (TDZ), kinetin (KIN) (0,2, 0,5, 1,0, 2,0 mg L<sup>-1</sup>) to determine the effect of cytokinin source and concentrations on shoot multiplication. At the end of 4 weeks, it was determined that TDZ and KIN had similar effect on number of shoots. The highest number of shoots (2,09 number/explant) was obtained from WPM media containing BAP. Regenerated shoots were transferred to WPM media containing 1 or 3 mg L<sup>-1</sup> indole-3-butyric acid (IBA), naphtalene acetic acid (NAA) or indole-3-acetic acid (IAA) for rooting. After 4 weeks from culture, the most root number (4,33 number/explant) were obtained from the WPM medium containing 3 mg L<sup>-1</sup> IAA, while the highest rooting percentage was obtained from WPM medium containing 3 mg L<sup>-1</sup> IBA with 80%. Rooted seedlings were transferred to plastic cups containing peat and perlite in a ratio of 1:1 and successfully acclimatized. Plant culture was completed at 15 weeks. The effective clonal propagation method was described for the endemic species *Astragalus trojanus* Stev.

**Keywords:** *Astragalus*, Clonal propagation, Rooting, Nodal segment, WPM

## Giriş

*Astragalus* sp. L., dünyanın özellikle yarı kurak step bölgelerinde yayılış gösteren vasküler bitkiler içerisindeki en büyük cinslerden birisidir. Dünyada 3000 civarında taksonu olan cinsin, Türkiye’de de 210’u endemik yaklaşık 463 takson ile temsil edilen en büyük cinslerden birisi olduğu bilinmektedir (Dinç ve ark. 2013).

*Astragalus* türlerinin kullanım alanlarından en önemlisinin tıp olduğu görülmektedir. Bu bitkileri tıbbi açıdan önemli bir noktaya taşıyan özellik, köklerinin tıbbi değeri yüksek sekonder metabolitlerce (polisakkaritler, saponinler ve izoflavonoidler) zengin oluşudur (Bedir ve ark. 2000). *Astragalus* L. türlerinin 40’den fazla element, çeşitli aminoasitler, bioflavonoidler, kolin, Astragalan B, çeşitli polisakkaritler, folik asit içerdikleri; bundan dolayı da antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir (Ağar ve ark. 2008). Çin tıbbında vücudun bağışıklık sistemini kuvvetlendirmek için kuvvetli bir ilaç olarak kabul edilen bu bitki türleri, aynı zamanda diüretik, kan damarlarını genişletici ve solunumla ilgili rahatsızlıkların tedavisinde son derece etkilidir. Ayrıca, yaşam süresini artırma, kanser ve AIDS hastalarının kısmi tedavisi için alternatif tıpta kullanılmaktadır (Ekici 2000). Ülkemizde de bazı türlerine ait kök özlerinden lösemi tedavisi ve yaraların iyileştirilmesinde yararlanılmaktadır (Bedir ve ark. 2000).

Tıbbi kullanımı dışında *Astragalus* türlerinin farklı özelliklerinden de yararlanılabilmektedir. Çok yıllık, dikenli türlerinden elde edilen kitre zamkı sanayide oldukça geniş kullanım alanına sahiptir (Uysal 1997). *Astragalus* türlerinden bazıları meralar için önemli bir baklagil yem bitkisidir. Bununla birlikte çok yıllık ve yastık formunda bitkiler olması nedeniyle erozyonun önlenmesinde etkilidir. Cinsine ait bazı türlerin ekolojik toleransları yüksektir. Bu türler soğuğa, kuraklığa, tuza ve hastalıklara dayanıklılık gösterirler ve kayalık, step, çalılık, orman altı ve açıklığı, tarla kenarları gibi farklı habitatlarda yetişebilmektedirler (Kadioğlu ve ark. 2008; Erisen ve ark. 2010).

*Astragalus trojanus* Stev. endemik bir tür olup, tıbbi açıdan önemli sekonder metabolitlere sahiptir (Mamedova ve Isaev 2004). Özellikle, yüksek sikloartan (cycloartane) glikozitleri içeriği ile bu bitkinin *Astragalus* L. cinsinin dikkat çeken türlerinden biri olduğu belirtilmiştir (Bedir ve ark. 2001). Bu özelliklerine rağmen, uzun gelişme periyotları ve kaliteli tohum oluşturma kapasitelerinin az olması, diğer *Astragalus* türlerinde olduğu gibi *A. trojanus*’un da yetişmesini zorlaştırmaktadır *Astragalus* türlerinin genel olarak tohumla üreme yeteneklerinin sınırlı olması doku kültürü ile klonal çoğaltım yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır (Erisen ve ark. 2011; Erkoymcu 2010). Doku kültürü ile bitkilerin mikroçoğaltımı, germplasmın korunması ve seçilmiş bitkilerin hızla çoğaltılabilmesi gibi sağladığı faydaların yanı sıra nesli tehlikede olan bitkilerin korunması, üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerliğin sağlanması (homojenite) ve sekonder metabolitlerin *in vitro* yöntemlerle çoğaltılması gibi ciddi avantajlar sağlar (Gübbük ve Pekmezci 2004; Shilpashree ve Ravishankar 2009).

*Astragalus* türleri tıbbi ve ticari açıdan değerli olmasına rağmen, bugüne kadar yapılan çalışmalar sınırlı sayıda kalmıştır. *Astragalus* cinsine ait diğer türlerle yapılan çalışmalarda *A. adsurgens* (Lou ve Jia 1998a, 1998b), *A. cicer* (Uranbey ve ark. 2003; Basalma ve ark. 2008), *A. melilotoides* (Hou ve Jia 2004), *A. polemoniicus* (Mirici 2004), *A. maximus* (Turgut-Kara ve Arı 2006), *A. chrysochlorus* (Turgut-Kara ve Arı 2008), *A. schizopterus* (Yorgancılar ve Erisen 2011) türlerinde somatik embriyogenesis ve organogenesis yoluyla etkili bir rejenerasyon sistemi elde edildiği bildirilmiştir. Oltulu (2008), *Astragalus trojanus*’da hem sürgün hem de kök oluşumunun düşük oranlarda olduğunu bildirmiştir. Nartop ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise sürgün oluşum oranı artırılırken, kök oluşum oranında ciddi bir artış sağlanamamıştır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, *A. trojanus*’un klonal çoğaltımında, düşük köklenme oranı ciddi bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca *A. trojanus*’ta klonal çoğaltımın araştırıldığı bu çalışmalarda, sadece BAP büyüme düzenleyicisinin etkisi belirlenmiştir.

Bu araştırma ile farklı temel besin ortamları (MS, WPM) kullanarak *A. trojanus* bitkisinin klonal çoğaltımı için, farklı sitokinin tiplerinin (BAP, TDZ ve KIN) sürgün çoğaltımına etkisinin belirlenmesi ve köklenme oranının artırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Yöntem

Çalışmada başlangıç materyali olarak kullanılan *A. trojanus* tohumları Prof. Dr. Yüksel Kan'dan temin edilmiştir. Sert kabuklu olmaları nedeniyle (Oltulu 2008) çimlenebilmeleri için tohumlar bistüri ile çizilmiştir (Yorgancılar ve Erişen 2011). Çizimden sonra tohumların yüzey sterilizasyonu %20'lik ticari çamaşır suyunda (%50 NaOCl içeren Yetiş ticari markası) 10 dakika manyetik karıştırıcı yardımıyla çevrilerek yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonu sonrasında tohumlar, steril saf su ile 3 kez 5'er dakika durulama işlemine tabi tutulmuş ve büyüme düzenleyici içermeyen Murashige ve Skoog (MS) (Murashige ve Skoog 1962) besin ortamında çimlendirmeye alınmışlardır. Rejenerasyon çalışmalarında 40 günlük steril fidelere ait nodal segmentler eksplant olarak kullanılmıştır.

Çalışma iki aşamadan oluşmuştur. İlk olarak temel besin ortamlarının sürgün çoğaltımına etkisini belirlemek için eksplantlar farklı konsantrasyonlarda 6-benzil amino pürin (BAP) içeren (0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) MS ya da Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd ve McCown 1980) besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültürden 4 hafta sonra nodal segmentlerden gelişen sürgünler sayılarak eksplant başına sürgün sayıları adet olarak belirlenmiştir. İkinci aşamada ise farklı sitokin kaynaklarının sürgün çoğaltımına etkisini belirlemek için en iyi sonucun alındığı WPM temel besin ortamına 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L BAP, thidiazuran (TDZ) veya kinetin (KIN) eklenerek nodal segmentler ile yeni bir deneme kurulmuştur. Kültürün 4. haftasında denemeye ait sürgün sayıları adet olarak belirlenerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Rejenere sürgünler köklenme için indol-3-butirik asit (IBA), naftalen asetik asit (NAA) veya indol-3-asetik asit (IAA) (1 veya 3 mg/L) içeren WPM ortamlarına aktarılmış ve kültürden 4 hafta sonra köklenen sürgün yüzdesi (%), sürgün başına kök sayısı (adet) ve kök uzunlukları (cm) belirlenmiştir.

Çalışmalarda MS veya WPM mineral tuz ve vitaminleri ile %3 sakkaroz içeren ve %8'lik agar ile katılaştırılan temel besin ortamları kullanılmıştır. Besin ortamlarının hazırlığında deiyonize saf su kullanılmış ve besin ortamlarının pH'sı 1 N KOH ve 1 N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandıktan sonra otoklavda 1.2 atmosfer basınç altında 121 °C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Tüm kültürler 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyot ve 24 °C sıcaklığa ayarlanmış 4LS floresans ışığa sahip iklim dolabında (SANYO: MLR-351H; JAPAN) muhafaza edilmiştir.

Denemeler her birinin içerisinde 5 adet eksplantın bulunduğu magenta kaplarında 3 tekerrürlü olarak tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre kurulmuştur. Elde edilen veriler MSTAT-C istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiş, önemli farklar LSD testi ile karşılaştırılmıştır (MSTAT-C, Version 3, Michigan State University, USA).

## Bulgular ve Tartışma

*A. trojanus* bitkisine ait steril fidelere alınan nodal segmentler farklı konsantrasyonlarda BAP içeren MS veya WPM besin ortamlarında kültüre alındığında, elde edilen sürgün sayısı bakımından iki ortam arasındaki (BO) farklılığın istatistik olarak önemli olduğu ( $p < 0.01$ ) belirlenmiştir. WPM, 2.08 adet eksplant başına sürgün sayısı değeri ile en iyi sonucun elde edildiği ortam olurken, denemede kullanılan MS besin ortamında eksplant başına ortalama 1.28 adet sürgün olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan BAP konsantrasyonları (Kon) ve bu konsantrasyonların besin ortamları ile interaksyonu (BOxKon) da istatistik olarak  $p < 0.01$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Yapılan uygulamalar içinde en fazla sürgün sayısı (2.80 adet) 0.5 mg/L BAP içeren WPM ortamından elde edilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Farklı BAP konsantrasyonları içeren MS ve WPM temel besin ortamlarının sürgün sayısına etkisi

Besin Ortamları	Sürgün Sayısı (adet/eksplant)				Ortalama
	BAP				
	0.2 mg/L	0.5 mg/L	1.0 mg/L	2.0 mg/L	
MS	1.00 d	1.13 cd	1.03 cd	1.97 b	<b>1.28 b</b>
WPM	2.27 ab	2.80 a	1.57 bcd	1.73 bc	<b>2.08 a</b>
<b>Ortalama</b>	<b>1.60 ab</b>	<b>1.97 a</b>	<b>1.30 b</b>	<b>1.85 a</b>	

LSD<sub>0.01(Kon)</sub>:0.49, LSD<sub>0.01(BO x Kon)</sub>: 0.70

Bitki doku kültürlerinde dikkate alınması gereken faktörlerden biri de çeşitli mineral besin elementleri ve vitaminleri içeren temel besin ortamlarıdır (Üçler ve ark. 2000). Farklı tuz konsantrasyonlarına sahip besin ortamlarının sürgün rejenerasyonunu etkilediği bilinmektedir. Nas ve ark. (2013), eksplantların morfogenez tepkilerinde besin ortamının önemli bir etkisi olduğunu ve birçok araştırmacının farklı ortamlar önerdiğini ifade etmişlerdir. Özellikle çalı formundaki ve inatçı (recalcitrant) bitkilerde WPM'dan daha iyi sonuçların elde edildiği rapor edilmiştir (Lloyd ve McCown 1980; Kobayashi ve ark. 2003; Lu 2005). Araştırmamızın sonuçları değerlendirildiğinde de, WPM besin ortamının MS besin ortamına göre; sürgün çoğalması bakımından daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Temel besin ortamlarının etkisi belirlendikten sonra farklı sitokinin kaynaklarının eksplant başına sürgün sayısına etkisini belirleyebilmek için yürütülen çalışmanın ikinci kısmında hem sitokinin kaynakları (SK) arasında hem de uygulanan konsantrasyonlar (Kon) arasında sürgün çoğaltımı değerlendirilmiş olup, SK ve Kon ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.01$ ). Sitokinin kaynakları ile uygulama konsantrasyonları arasındaki etkileşim (SKxKon) de istatistik olarak  $p < 0.05$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün çoğaltımı bakımından TDZ ve KIN benzer etki gösterirken, en iyi sonuç (2.09 adet) BAP'dan elde edilmiştir. 0.5 mg/L BAP içeren ortam ise 2.80 adet sürgün ile en iyi sonucu vermiştir. Sürgün sayısı bakımından en düşük değerler TDZ içeren ortamlardan (0.2 mg/L hariç) elde edilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. WPM besin ortamında farklı sitokinin kaynaklarının sürgün sayısına etkisi

Sitokinin Kaynağı	Sürgün Sayısı (adet/eksplant)				Ortalama
	0.2 mg/L	0.5 mg/L	1.0 mg/L	2.0 mg/L	
BAP	2.27 ab	2.80 a	1.57 cd	1.73 bc	<b>2.09 a</b>
TDZ	1.67 cd	1.43 cde	1.17 de	0.90 e	<b>1.29 b</b>
KIN	1.60 cd	1.90 bc	1.77 bc	1.97 bc	<b>1.81 b</b>
<b>Ortalama</b>	<b>1.84 ab</b>	<b>2.04 a</b>	<b>1.50 b</b>	<b>1.53 b</b>	

LSD<sub>0.01 (SK)</sub>:0.37, LSD<sub>0.01(Kon)</sub>:0.43, LSD<sub>0.05 (SK x Kon)</sub>:0.54

Oltulu (2008) ve Nartop ve ark. (2015), *A. trojanus*'un sürgün çoğaltımında 0.5 mg/L BAP içeren ortamın en iyi sonucu verdiğini belirtmişlerdir. Araştırmamızda da, benzer şekilde 0.5 mg/L BAP içeren ortamda en fazla sürgün sayısı elde edilmiştir. *Astragalus* cinsinin diğer türlerinde yapılan hızlı çoğaltım çalışmalarında farklı büyüme düzenleyicilerinde başarılı sonuçların elde edildiği bildirilmiştir. *A. maximus* Willd. türünde en yüksek sürgün rejenerasyonu 0.5 mg/L zeatin riboside (ZR) içeren ortamdan elde edilmişken (Turgut-Kara ve Arı 2006), *A. duranii* türünde en fazla sürgün oluşumunun 0.2 mg/L TDZ içeren ortamdan elde edildiği bildirilmiştir (Çöçü ve ark. 2005). *A. nitidiflorus*'da ise 0.1 mg/L BAP içeren ortamın en iyi sonucu verdiği rapor edilmiştir (Cano-Castillo ve ark. 2009). *A. schizopterus*'da sürgün sayısı bakımından TDZ içeren ortamların en iyi sonucu vermesine rağmen sürgün gelişiminin sağlıklı olmadığı bildirilmiş ve hızlı çoğaltım için, 1 mg/L BAP içeren ortam önerilmiştir (Yorgancılar ve Erisen 2011). Tüm bu sonuçlar *Astragalus* cinsinde kullanılan büyüme düzenleyici çeşidinin ve konsantrasyonunun sürgün çoğaltımına etkisinin türlere göre değiştiğini göstermektedir. Büyüme düzenleyiciler, sürgün çoğaltımını etkileyen önemli bir faktördür. Doku kültüründe büyüme düzenleyicilerinin bitki hücrelerinin gelişimiyle ilgili önemli bir ortam bileşeni olduğu, sitokininlerin genellikle apikal meristem dormansisini azaltarak meristematik eksplantlardan hem apikal hem de adventif sürgün oluşumunu uyardığı bilinmektedir (Jafari ve ark. 2011). Eksplantların içsel sitokinin içerikleri, alınmaları, taşınma ve metabolizmadaki etkileri bakımından genotipler arası farklılıklar nedeniyle uygulanan farklı sitokinin tipi ve konsantrasyonu, doku kültüründe başarıyı etkilemektedir (Magyar-Tábori ve ark. 2010). Dobránszki ve Teixeira da Silva (2010), sürgün çoğaltımının bitki türü, çeşidi veya genotipi, besin ortamının içeriği ve bitki büyüme düzenleyici içeriği ve uygunluğu gibi birçok faktöre bağlı olarak başarılabileceğini vurgulamıştır.

Rejenerasyon çalışmalarından elde edilen sürgünler, köklenme ortamlarına aktarılmış ve kültürler 4 hafta sonra köklenme oranı, kök sayısı ve kök uzunluğu bakımından değerlendirilmiştir (Çizelge 3).

Köklenme oranı incelendiğinde, oksin kaynağı (OK) ve oksin kaynağı ile konsantrasyon etkileşimi (OKxKon) istatistik olarak anlamlı ( $p < 0.01$ ) bulunurken, tek başına oksin konsantrasyonu istatistik olarak anlamlı etki göstermemiştir. Çizelge 3'te görüldüğü gibi kullanılan oksin kaynakları ve uygulama konsantrasyonları içinde en yüksek köklenme oranının %80 değeri ile 3 mg/L IBA içeren ortamlardan elde edildiği belirlenmiştir.

Çizelge 3. Farklı oksin kaynaklarının köklenmeye etkisi

Oksin Kaynağı	<sup>1</sup> Köklenme Oranı (%)			<sup>2</sup> Kök Sayısı (adet)			<sup>3</sup> Kök Uzunluğu (cm)		
	1 mg/L	3 mg/L	Ort.	1 mg/L	3 mg/L	Ort.	1 mg/L	3 mg/L	Ort.
IBA	66.63 ab	80.00 a	<b>73.32 a</b>	2.37 bc	3.57 ab	<b>2.97 a</b>	2.90	3.20	<b>3.05 a</b>
NAA	42.17 b	- c	<b>21.08 b</b>	1.80 c	-d	<b>0.90 b</b>	0.97	-	<b>0.48 b</b>
IAA	56.67ab	66.67 ab	<b>61.67 a</b>	1.73 c	4.33 a	<b>3.03 a</b>	4.20	3.73	<b>3.97 a</b>
<b>Ortalama</b>	<b>55.16</b>	<b>48.89</b>		<b>1.97 b</b>	<b>2.63 a</b>		<b>2.69</b>	<b>2.31</b>	

<sup>1</sup>LSD<sub>0.01</sub>(OK):20.69 <sup>1</sup>LSD<sub>0.01</sub>(OK x Kon.):29.26 <sup>2</sup>LSD<sub>0.01</sub>(O.K.):1.072 <sup>2</sup>LSD<sub>0.01</sub>(O.K. x Kon.):1.52

<sup>3</sup>LSD<sub>0.01</sub>(O.K.):1.07

Machakova ve ark. (2008), IBA'nın özellikle çeliklerin köklendirilmesinde en yaygın kullanılan ve bitki bünyesinde hızlıca IAA'ya dönüştürülmekle birlikte onunla aynı etkiler gösteren sentetik bir oksin olduğunu ifade etmiştir. Dobránszki ve Teixeira da Silva (2010), köklenmeye birçok faktörün etki ettiğini, büyüme düzenleyicilerin çeşidi ve ortamdaki konsantrasyonunun bu faktörlerden bazıları olduğunu, genotip ve oksin konsantrasyonu arasındaki kuvvetli etkileşimin köklenme yüzdesini önemli ölçüde etkilediğini açıklamışlardır. *Astragalus* türlerinin köklenmeye ilgili farklı tepkiler verdiği, araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Erisen ve ark. 2010; Erkoyncu 2010; Hasancebi ve ark. 2011). Hou ve Jia (2004), *Astragalus melilotoides* ile yaptığı çalışmada köklendirme için IBA'nın NAA'dan daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Turgut-Kara ve Arı (2006), *Astragalus maximus* Wild. türünde 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 ve 1.5 mg/L NAA içeren MS besin ortamlarında kök oluşumunun gözlenmediğini belirlemişlerdir. Mirici (2004) ise, en iyi köklenmeyi 2 mg/L NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Çöcü ve ark. (2005) benzer şekilde, *Astragalus duranii*'den elde edilen sürgünlerde en iyi köklenmenin 0.5 mg/L NAA içeren ortamda olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada *A.trojanus* için IBA'da daha yüksek köklenme oranının elde edilmesi ve NAA'da çok düşük oranda köklenme görülmesi genotipik farklılığın etkisi olarak yorumlanabilir. *A. trojanus* ile yürütülen bir başka araştırmada en iyi köklenmenin (%17.8 ve %14.4) sırasıyla 1mg/L veya 0.5 mg/L IBA içeren WPM ortamlarından elde edildiği rapor edilmiştir (Oltulu 2008).

Kök sayısı incelendiğinde, oksin kaynaklarının (OK) ve oksin kaynağı ile uygulanan konsantrasyon etkileşiminin (OKxKon) istatistik olarak  $p<0.01$  düzeyinde, uygulanan konsantrasyonun (Kon) ise  $p<0.05$  düzeyinde anlamlı etki yaptığı belirlenmiştir. Sürgünler, IAA içeren ortamlarda diğerlerine göre fazla kök oluştururken (3.03 adet), en fazla kök 4.33 adet ile 3 mg/L IAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Aynı konsantrasyonda NAA içeren ortamlarda ise köklerin gelişmediği ve en az köklenmenin bu ortamda olduğu belirlenmiştir. Elde edilen kök uzunlukları incelendiğinde IBA ve IAA'nın, NAA'ya göre daha uzun kök oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3). Büyüme düzenleyici ve konsantrasyon etkileşimi arasında istatistik olarak anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte en uzun kökler 1 mg/L IAA içeren ortamda (4.20 cm) belirlenmiştir.

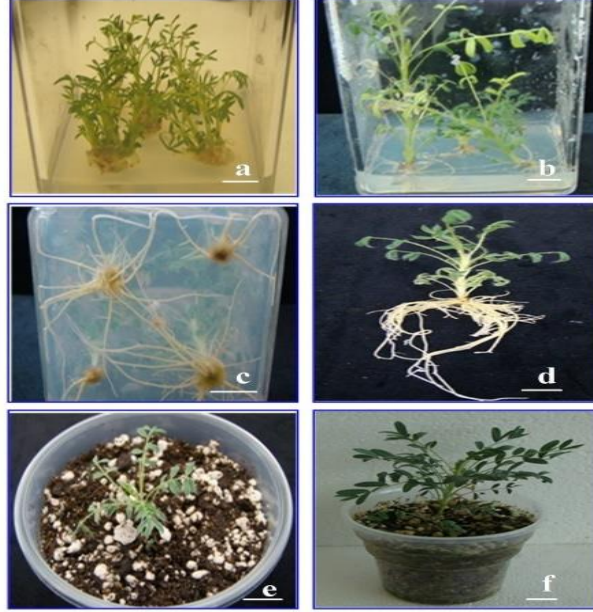
Kök uzunluğu incelendiğinde ise sadece oksin kaynağının istatistik olarak anlamlı etki gösterdiği ( $p<0.01$ ) belirlenmiştir. Çizelge 3'te görüldüğü gibi IAA içeren ortamda en uzun köklerin (3.97 cm) oluştuğu tespit edilmiştir.

Hasancebi ve ark. (2011), *Astragalus chrysochlorus* türünde *in vitro* köklendirme için IAA, IBA ve NAA'yı farklı konsantrasyonlarda denediklerinde, kullanılan oksinlerin kök morfolojisini etkilediğini belirlemişlerdir. IAA içeren ortamlarda oluşan köklerin kalın, uzun ve daha az lateral kök oluşturan yapıda olduklarını, NAA ve IBA'da ise ince kısa ve lateral kökleri daha fazla yapıda köklerin oluştuğunu belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlar Hasancebi ve ark. (2011), sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Benzerliğin her iki çalışmada da *Astragalus* kullanılmasından ve Dobránszki ve Teixeira da Silva (2010)'nın belirttiği gibi büyüme düzenleyicilerin aynı tür ve genotipte benzer etkiler oluşturmasından kaynaklanabileceği söylenebilir.

*A. trojanus* ile yapılan çalışmalarda yüksek oranlarda köklenme sağlanamamıştır. Oltulu (2008)'de en yüksek köklenme, %17.8 oranında elde edilirken, Nartop ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada bu oran en yüksek %26.67 olmuştur. George ve Debergh (2008), mikroçoğaltımda başarı için köklenmenin önemli bir aşama olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada köklenmeyi arttırmak için farklı olarak büyüme düzenleyici çeşidi ve bunların yüksek konsantrasyon oranlarının etkisi araştırılmıştır. IBA ve IAA büyüme düzenleyicilerinde konsantrasyon artışının köklenme oranını arttırdığı gözlenmiş ve 3 mg/L IBA içeren

WPM ortamından %80 oranında köklenme yüzdesi elde edilmiştir. Ayrıca yüksek konsantrasyonda (3 mg/L) kullanılan NAA'nın kök oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür.

Heloir ve ark. (1997), IBA'nın *Vitis vinifera*'da köklendirme için uygun oksin kaynağı olduğunu ifade etmişler ve NAA'nın kök oluşumunda çok etkili olmadığını ancak kallus oluşumunu sağladığını vurgulamıştır. NAA, *A. trojanus*'da kallus oluşturmamış, ancak köklenmeyi engelleyerek sürgünlerin besin ortamlarıyla temas ettikleri noktalarda dokularda şişkinliklere neden olmuştur. Köklenen bitkicikler 1:1 oranında torf ve perlit içeren plastik bardaklara aktarılarak dış ortama alıştırılmıştır (Şekil 1).



**Şekil 1.** *A. trojanus*'da *in vitro* klonal çoğaltım: a. 0.5 mg/L BAP içeren WPM besin ortamında gelişen sürgünler, b-c-d Gelişen sürgünlerin 3 mg/L IBA içeren WPM besin ortamında kök gelişimi, e-f. Aklimatizasyon sonrası 4-8 haftalık fideler, bar: 1cm.

## Sonuç ve Öneriler

Geleneksel yöntemlere kıyasla, doku kültürü teknikleri ile çoğaltımın en önemli avantajlarından birisi başlangıç materyali olarak alınan eksplantandan, kısa sürede çok sayıda mikro sürgünün elde edilerek, bunların *in vitro* ve *in vivo*'da köklendirilmesi ve bu şekilde çok sayıda bitkinin elde edilebilmesidir (Üçler 2000). Mikroçoğaltım ile elde edilen bitkiler kontrollü çevre koşullarında yetiştirilmekte ve bu şekilde etken madde içeriği bakımından daha homojen bir ürün elde edilebilmektedir (Couceiro ve ark. 2006). Bu yolla tıbbi bitkilerde standart kalitenin basit bir şekilde artırılması mümkündür. *In vitro* mikroçoğaltım ilaç sanayine standart bitkisel materyal sağlama bakımından yardımcı bir teknik olarak kabul edilmektedir (Motallebi-Azar ve Kazemiani 2011). Yine benzer nedenlerden dolayı mikroçoğaltım tıbbi bitkilerin değerli genotiplerinin klonal çoğaltımında kullanılan etkili yöntemlerden biridir.

Bu çalışmada *A. trojanus*'un *in vitro* sürgün çoğaltımı ve rejenere sürgünlerin yüksek oranda köklendirilmesi amaçlanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Sürgün çoğaltımında, bu tür için 0.5 mg/L BAP içeren WPM ortamı önerilirken, köklendirme ortamı olarak da 3 mg/L IBA içeren WPM ortamı tavsiye edilebilir. Çalışmada *A. trojanus* ile bu güne kadar yapılan çalışmalara ilave olarak, farklı sitokinin tiplerinin (TDZ ve KIN) sürgün çoğaltımına etkisi belirlenmiş ve *A. trojanus*'un klonal çoğaltımında önemli aşamalardan biri olan köklenmede ciddi başarı sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar endemik olan bu türe ait değerli genotiplerin çoğaltılmasında ve muhafazasında kullanılabilir.

## Kaynaklar

Ağar G, Şahin F, Sökmen M, Güllüce M, Şengül M, Adıgüzel A, Özkan H, Barış Ö (2008). Erzurum ve çevresindeki *Astragalus* L. türlerinin tanılanması ve bu türlerin biyolojik aktivitelerinin saptanması. TÜBİTAK TOVAG 105O070 No'lu Araştırma Projesi. Erzurum.

- Bedir E, Çalış İ, İkhlas KA (2000). Macrophyllsaponin E: A novel compound from the roots of *Astragalus oleifolius*, Chem. Pharm. Bull. 48(7): 1081-1083.
- Bedir E, Tatlı I, Çalış I, Khan IA (2001). Trojanosides I-K: New cycloartane-type glycosides from the aerial parts of *Astragalus trojanus*, Chemical & Pharmaceutical Bulletin 49(11): 1482-1486.
- Basalma D, Uranbey S, Gurlek D, Ozcan S (2008). TDZ-induced plant regeneration in *Astragalus cicer* L. African Journal of Biotechnology, 7(8): 955-959.
- Blakesley D, Constantine D (1992). Uptake and metabolism of 6- benzyadenine in shoot cultures of a range of species. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 28: 183-186.
- Cano-Castillo M, Serrano-Martínez F, Casas JL (2009). *In vitro* Propagation of *Astragalus nitidiflorus* (Leguminosae), An Endemic and Endangered Species from South-East of Spain. ISHS Acta Horticulturæ 812: III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants.
- Couceiro MA, Afreen F, Zobayed SMA, Kozai T (2006). Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: Effects of harvesting time, temperature and germplasm. Plant Science, 170: 128-134.
- Çöcü S, Erişen S, Duran A, Hamzaođlu H, Gürlek D, Parmaksız İ, Mirici S (2005). Lokal endemik *Astragalus duranii* türünün *In vitro* hızlı çoğaltımı. XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 31 Ağustos-2 Eylül, Eskiřehir.
- Diñç M, Aytaç Z, Dođu S (2013). A new species of *Astragalus* (Fabaceae) from Turkey. Turk J Bot, 37: 841-846.
- Dobrąnszki J, Teixeira da Silva JA (2010). Micropropagation of apple: A review. Biotech. Adv. 28(4): 462-488.
- Ekici M (2000). Türkiye'nin *Holoeuce Bunge* ve *Acmothrix Bunge* (*Astragalus* L.) Seksiyonlarının Revizyonu, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Erişen S, Yorgancilar M, Atalay E, Babaoglu M (2010). Prolific shoot regeneration of *Astragalus cariensis* Boiss. Plant Cell Tiss Organ Cult, 100: 229-233.
- Erişen S, Atalay E, Yorgancilar M (2011). The effect of thidiazuron on the *in vitro* shoot development of endemic *Astragalus cariensis* in Turkey. Turk J Bot 35, 521-526
- Erkoyuncu R (2010). Endemik *Astragalus schizopterus* Bitkisinin *In vitro* Rejenerasyon Potansiyelinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Konya.
- George EF (2008). Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Ed. (eds: George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J.). Volume 1. p, 1-28. Published by Springer, Nedherlans.
- George EF, Debergh PC (2008). Micropropagation: uses and methods. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ, editors. Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. Dordrecht, Netherlands: Springer; p.29-64.
- Gübbük H, Pekmezci M (2004). *In Vitro* Propagation of Some New Banana Types (*Musa* spp.). Turk. J. Agric. For., 28: 355-361.
- Hasancebi S, Turgut Kara N, Çakır Ö, Arı ř (2011). Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). Turk J Bot, 35: 203-210
- Heloir MC, Fournioux JC, Oziol L, Bessis R (1997). An improved procedure for the propagation in vitro of grapevine (*Vitis vinifera* cv Pinot noir) using axillary bud microcuttings. Plant Cell Tissue Org. Cult. 49: 223-225.
- Hou SW, Jia JF (2004). High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explants via somatic embriyogenesis and organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79: 95-100.
- Jafari N, Othman RY, Khalid N (2011). Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on *in vitro* shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan African Journal of Biotechnology Vol. 10(13): 2446-2450.
- Kadioğlu B, Kadioğlu S, Turan Y (2008). Gevenlerin (*Astragalus* sp.) Farklı kullanım alanları ve önemi. Alinteri Zirai Bilimler Dergisi. Cilt 14, Sayı 1,17-26.
- Kobayashi AK, Besspalhok JC, Pereira LFP, Vieira LGE (2003). Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74: 99-102.
- Lloyd G, McCown B (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proc Int Plant Prop Soc 30: 421-427.
- Lou JP, Jia JP (1998a). Callus induction and plant regeneration from hypocotyl explants of the forage legume *Astragalus adsurgens*, Plant Cell. Rep., 17: 567-570.

- Lou JP, Jia JP (1998b). Plant regeneration from callus protoplasts of the forage legume *Astragalus adsurgens*, Pall. Plant Cell. Rep., 17: 313-317.
- Lu MC (2005). Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture. Scientia Horticulturae, 107: 64-69.
- Machakova I, Zazimalova E, George EF (2008). Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Ed. (eds: George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J.). Volume 1. p, 175-204. Published by Springer, Nedherlans.
- Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Teixeira da Silva JA, Bulley SM, Hudák I (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell Tiss Organ Cult, 101:251-267.
- Mamedova RP, Isaev MI (2004). Triterpenoids from Astragalus Plants, Chemistry of Natural Compounds, Vol. 40, No. 4.
- Mirici S (2004). Endemik geven (*Astragalus polemoniicus bunge*) bitkisinin yaprak sapı ve yaprak eksplantlarından yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonu, S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi 18(34): (2004) 31-34
- Mohebalipour N, Aharizad S, Mohammadi SA, Motallebiazar AR, Arefi HM (2012). Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.10 (1): 280-286.
- Motallebi-Azar A., Kazemiani S (2011). Effect of Carbon Source and Hydrolyzed Casein on Callus and Shoot Induction in *Hypericum perforatum* cv Helos. Int. J. Med. Arom. Plants, 1(3): 313-318.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- Nartop P, Gürel A, Akgün İH, Bedir E (2015). Astragaloside IV and cycloastragenol productionin *in vitro* produced *Astragalus trojanus* Stev. Indian Journal of Biotechnology, 14: 540-546.
- Nas MN, Bölek Y, Sevgin N (2013). Shortcut to long-distance developing of a tissue culture medium: micropropagation of mature almond cultivars as a case study. Turk J Bot, 37: 1134-1144.
- Oltulu B (2008). *Astragalus trojanus* (geven) Bitkisinin Farklı *İn vitro* Besin Ortamlarında Rejenerasyonu. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik A.B.D. Yüksek Lisans Tezi. İzmir.
- Turgut-Kara N, Arı Ş (2006). Micropropagation of *Astragalus maximus* Willd. *Biotechnol Biotech Eq* 20(1): 20-22.
- Turgut-Kara N, Arı Ş (2008). *In vitro* plant regeneration from embryogenic cell suspension culture of *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). African Journal of Biotechnology, 7(9): 1250-1255, 2 May, 2008
- Uranbey S, Mirici S, Sancak C, Parmaksız İ, Khawar KM, Mirici S, Özcan S (2003). Adventitious shoot regeneration in Cicer milkvetch. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 17: 33-37.
- Uysal İ (1997). *Astragalus trojanus* endemik türünün morfolojisi, anatomisi ve ekolojisi üzerinde gözlemler, Erc. Üniv. Fen Bil. Derg. 13:1-2, 54-66.
- Üçler AO, Yahyaoğlu Z, Güneş İ (2000). Sürgün çoğaltılması ile *in vitro*'da elde edilen kivi (*Actinidia chinensis* Planch.) sürgünlerinin farklı yöntemlerle köklendirilmesi üzerine bir çalışma. Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi (AÇÜOFD), 1(1): 10-17.
- Shilpashree HP, Ravishankar R (2009). In vitro plant regeneration and accumulation of flavonoids in *Hypericum mysorence*. International Journal of Integrative biology, 8(1): 43-49.
- Yorgancılar M, Erisen S (2011). The effect of thidiazuron (TDZ) on shoot regeneration of *Astragalus schizopteris*. The Journal of Animal & Plant Sciences, 21(3): 519-524.