



BAP ve IBA Etkisiyle *Acinos rotundifolius* Pers.' den *In Vitro* Bitki Üretimi

Fethi Ahmet ÖZDEMİR^{1*}

Murat KURŞAT²

¹ Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bartın

² Bitlis Eren Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitlis

*Sorumlu yazar

e-posta: ozdemirfethiahmet23@yahoo.com

Geliş Tarihi: 21 Şubat 2014

Kabul Tarihi: 03 Nisan 2014

Özet

Acinos rotundifolius Pers. tıbbi amaçlar için kullanılan bir bitkidir. Bu çalışmada *Acinos rotundifolius* Pers. in *in vitro*' da çoğaltımı amacıyla kotiledon boğum eksplantları BAP ve IBA'nın farklı kombinasyonlarını içeren, %3 sakkaroz ilave edilmiş ve % 0.8 agar ile katılaştırılmış MS ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma sonuçları kallus oluşum yüzdesi, rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, eksplant başına kök sayısı ve kök uzunluğu için BAP-IBA arasındaki kombinasyonların etkili olduğunu göstermiştir. Maksimum sürgün rejenerasyonu 0.50 mg/L BAP içeren MS besin ortamında, maksimum kallus oluşumu ise 0.25 mg/L BAP + 2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında kaydedilmiştir. Rejenerasyon sürgünler 0.5 mg/L NAA içeren MS besin ortamında köklendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: BAP, IBA, *Acinos rotundifolius* Pers., Mikroüretim

In vitro Plant Regeneration Influence by BAP and IBA in *Acinos rotundifolius* Pers.

Abstract

Acinos rotundifolius Pers. is used for medicinal purposes plant. In order to propagate *Acinos rotundifolius* Pers. in *in vitro*, cotyledon node explants were cultured in MS medium containing different combinations of BAP and IBA supplemented with 3% sucrose and solidified with 0.8% agar. The results showed a significant interaction between BAP and IBA combinations for callus formation percentage, shoot and root regeneration, number of shoots and roots per explant, shoot and root length. Maximum shoot regeneration was noted in MS medium containing 0.50 mg/L BAP. Maximum callus formation was determined in MS medium supplemented with 0.25 mg/L BAP + 2 mg/L IBA. The regenerated shoots were rooted on MS medium containing 0.5 mg/L NAA.

Key words: BAP, IBA, *Acinos rotundifolius* Pers., Micropropagation

GİRİŞ

Bir ülkenin floristik zenginliği, o ülkede yayılış gösteren türlerin (özellikle de endemik) sayısı ve çeşitli vejetasyon tiplerine sahip olmasıyla ölçülebilir. Ülkemiz sahip olduğu bitki zenginliği ile kıta özelliği gösterirken, mevcut bitkilerin oluşturduğu bitki örtüsü bakımından da bu zenginliği devam ettirmektedir [1]. Türkiye' de yetişen 9000 civarında vasküler bitki türüyle ülkemiz dünya üzerinde zengin bir floraya sahiptir. 3000 kadarı [2] endemik olan bu bitkiler arasında, Labiatae familyasının hem endemik hem de tıbbi ve aromatik bitkiler açısından önemi büyüktür. Yeryüzünün bütün bölgelerine yayılmış olan familya, özellikle Akdeniz bölgesi vejetasyonunun önemli bir kısmını oluşturur [3]. Labiatae familyasının bir üyesi olan *Acinos* cinsinin dünya üzerinde 10 kadar türü kayıtlı olup, tüm Avrupa'da, Orta Asya'da, Akdeniz'de, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika'da yayılış gösterir [4]. Ülkemizde ise başta Batı Anadolu olmak üzere,

Anadolu'nun her yerine yayılmış 5 türü kayıtlıdır. Bunlardan biri, endemik 2 alttürle temsil edilmektedir [5] [6]. *Acinos* cinsinin bazı türleri kuvvetli veya hafif aromatik özellikler göstermekte, birbirlerinden bu yönüyle de ayrılabilirler. Yine bazı türlerin halk arasında çay olarak ve tıbbi amaçla kullanılması bakımından da önemlidir. *Acinos* cinsi üyeleri süs bitkisi olarak da kullanılabilirler. Ayrıca kurak alanların yeşillendirilmesinde ve kentlerde bahçivandlıkta da kullanılabilir. *In vitro* koşullarda bir bitkinin oluşturulması için kotiledon nod eksplantı birçok çalışmada kullanılmıştır. Kotiledon nod eksplantı mercimekte [7] [8], fiğde [9] [10] ve börülcede [11] eksplant kaynağı olarak kullanılmış fakat *Acinos rotundifolius* Pers. in mikro çoğaltımında henüz kullanılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada kotiledon nod eksplantı kullanılarak daha önce hiç çalışılmamış olan *Acinos rotundifolius* Pers. için sürgün rejenerasyon protokolü geliştirmek amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bitki Materyali

Bu çalışmada doğal yetiştirme ortamından toplanmış olan *Acinos rotundifolius* Pers. bitkisinin tohumları, bitkisel materyal olarak kullanılmıştır. Bitkinin tür teşhisi Bitlis Eren Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde yapılmıştır.

Sterilizasyon

Çalışmada kullanılan petri, erlen gibi cam malzemeler ile pens, bistüri gibi aletlerin ve besin ortamının sterilizasyonu otoklavda 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C de, 20 dakika tutularak yapılmıştır. *Acinos rotundifolius* Pers. tohumlarının sterilizasyonu ise % 100 lük NaOCl (çamaşır suyu) içerisinde 20 dakika bekletilerek sağlanmıştır. Daha sonra tohumlar steril saf su ile 3 kez durulanmıştır. Sterilizasyonu tamamlanan tohumlar hormon içermeyen besin ortamlarına her petriye 5 adet tohum gelecek şekilde ekim yapılarak, bu ortamlarda çimlendirilmiştir.

Besin Ortamları ve Kültür Koşulları

Tohumların çimlendirilmesinde hormonsuz MS [12] ortamı kullanılmıştır. Kotiledon boğum eksplantlarının rejenerasyonu için MS besin ortamında farklı oranlarda 6-benzil amino pürin (BAP) ve indol-3-bütirik asit (IBA) kombinasyonları denenmiştir. Köklendirme ortamı olarak da 0.5 mg/L naftalen asetik asit (NAA) içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Bu ortamlar içerisinde % 3 sakkaroz ilave edilmiş ve % 0.8 agar kullanılarak katılaştırılmıştır. Ortam hazırlandığında çift distile saf su kullanılmış ve besin ortamının pH'sı 1N NaOH ve 1N HCl kullanılarak 5.8 e ayarlanmıştır. BAP, IBA ve NAA uygun çözücülerde çözdürüldükten sonra istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlar +4 °C de saklanmıştır.

In vitro' dan Elde Edilen Fidelerden Eksplantların İzolasyonu

In vitro ortamda steril olarak yetiştirilen 10 günlük *Acinos rotundifolius* Pers. fidelerinden alınan kotiledon

boğum, eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. 1 cm uzunluğunda kesilen eksplantlar her petride 5 adet olacak şekilde rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Uygulamalar 3 tekerrürlü olacak şekilde planlanmıştır. 90X15 mm steril petri kutularında MS ortamında uygun hormon konsantrasyonları eklenerek 16/8 ışık/karanlık fotoperiyodunda 500 $\mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$ floresans ışıklandırmasında iklim dolabında, 25±2 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Doku kültürü ile ilgili bütün çalışmalar steril hava akışlı kabin içerisinde yapılmıştır.

Rejenere Olan Sürgünlerin Köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler belirli bir uzunluğa geldikten sonra 0.5 mg/L NAA içeren köklendirme ortamına aktarılmıştır. Köklenen sürgünler saksılara aktarıldıktan sonra iklim dolabında çevre şartlarına uyumu sağlanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada *Acinos rotundifolius* Pers. bitkisinin tohumları *in vitro* ortamda çimlendirilmiş, 10 günlük fidelerden alınan kotiledon boğum, eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. kotiledon boğum eksplantları değişik konsantrasyonlarda BAP ve IBA içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Bu hormon konsantrasyonlarının eksplantlar üzerinde etkileri Çizelge 1'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre, sürgün rejenerasyonu için en uygun ortamın 0.50 mg/L BAP içeren MS besin ortamı olduğu; bu ortamda % 91 oranında sürgün rejenerasyonunun gözlemlendiği tespit edilmiştir. Kallus oluşumunun en fazla 0.25 mg/L BAP + 2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında olduğu bu ortamda %89 oranında kallus oluşumunun gerçekleştiği tespit edilmiştir. Eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı 0.25 mg/L BAP + 0.25 mg/L IBA içeren besin ortamında, ortalama sürgün uzunluğu, 0.50 mg/L BAP + 0.50 mg/L IBA içeren besin ortamında, eksplant başına düşen ortalama kök sayısının 0.25 mg/L BAP + 1 mg/L IBA içeren besin ortamında ve ortalama kök uzunluğu açısından en verimli ortamın ise 0.50 mg/L BAP 2 mg/L IBA içeren MS besin ortamının olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Farklı BAP ve IBA konsantrasyonlarının kotiledon boğum eksplantı üzerindeki etkileri.

Hormonlar		Kallus oluşum yüzdesi (%)	Rejenere sürgün yüzdesi (%)	Eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı	Ortalama sürgün uzunluğu (cm)	Eksplant başına düşen ortalama kök sayısı	Ortalama kök uzunluğu (cm)
BAP (mg/L)	IBA (mg/L)						
0.25	0	14.00	39.00	2.51±1.06	3.17±0.54	0.61±1.03	0.76±0.24
0.25	0.25	27.00	76.00	6.32±2.52	4.63±2.37	2.76±0.83	1.57±0.71
0.25	0.50	59.00	63.00	1.67±1.07	2.86±0.46	0.96±0.41	1.65±0.49
0.25	1	46.00	56.00	3.24±1.35	4.36±2.26	5.53±1.34	1.57±0.64
0.25	2	89.00	34.00	1.60±0.07	4.58±0.34	3.22±0.70	3.29±1.39
0.50	0	12.00	91.00	4.28±0.26	5.37±2.86	0.74±0.36	0.790±0.41
0.50	0.25	32.00	35.00	1.68±0.19	2.52±1.17	1.33±0.41	1.81±0.66
0.50	0.50	59.00	28.00	2.25±0.18	7.15±1.06	1.23±0.20	0.48±0.24
0.50	1	64.00	47.00	3.04±1.12	1.71±0.57	1.82±0.23	0.97±0.14
0.50	2	78.00	34.00	2.61±1.42	0.87±1.39	2.35±0.57	4.58±0.34

± = En az üç tekrarla elde edilen standart sapmayı ifade etmektedir.

In vitro şartlarda sürgün rejenerasyonunun sağlandığı besin ortamlarında her zaman köklenmeyi sağlamak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle sürgünlerin, köklenmeyi teşvik edici hormonların bulunduğu ortamlara transfer edilmesi gerekmektedir. Köklenmeyi teşvik etmek amacıyla 0.5 mg/L NAA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Çalışma sonrasında köklenen bitkiler, hormon içermeyen MS ortamına aktarılarak bitkilerin belirli bir büyüklüğe gelmeleri sağlanmıştır. Daha sonra bitkiler 3:1 oranında toprak:kum içeren saksılara aktararak dış ortama adaptasyonları gerçekleştirilmiştir.

Günümüzde insanlar için önem taşıyan bitkilerin, verimini, hastalık ve zararlılara karşı dirençlerini arttırmak amacı ile kullanılan klasik ıslah metodlarının yanı sıra, doku kültürü ve biyoteknoloji yöntemleri ile her yönü ile istenen özelliklere sahip bitki türlerinin üretimi çok daha kısa sürelerde ve kontrollü koşullarda elde edilerek bu bitkilerin doğa koşullarına uygun hale getirilmesi mümkündür.

Gelişmekte olan ülkelerdeki insanların %80 i tıbbi ve aromatik bitkileri, hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar [13]. Tedavi amaçlı kullanılan bu tıbbi ve aromatik bitkilerin kültürü yapılmamakta olup doğal yetişme ortamlarından toplanılmaktadır. Eczacılık sanayide de ilaç etken maddesi olarak tıbbi ve aromatik bitkilerden büyük oranda yararlanılmaktadır. Bu çalışmamızda tıbbi ve aromatik bir bitki olan *Acinos rotundifolius* Pers. in kotiledon boğumu, eksplant kaynağı olarak kullanılıp farklı oranlardaki BAP-IBA kombinasyonlarının etkisiyle *in vitro* mikro çoğaltımı için ilk defa bir rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. Bu protokolün önemli bir tıbbi bitki olan *Acinos rotundifolius* Pers. in büyük ölçekli üretiminde iyi bir rejenerasyon protokolü olacağını da ümit etmekteyiz.

Çalışmamızda bitkinin kotiledon boğum kısmı eksplant kaynağı olarak kullanılmış ve BAP-IBA nın 10 farklı kombinasyonu ile hazırlanmış MS besin ortamı denenmiştir. Sonuçlarımıza göre sürgün rejenerasyonu için en uygun ortam 0.50 mg/L BAP içeren MS besin ortamıdır. Bu sonuca göre sürgün gelişimi kısmi olarak kallus oluşumunu engellemektedir. Maksimum sürgün rejenerasyonu 0.50 mg/L BAP içeren MS besin ortamında olurken, aynı ortamda denenilen kombinasyonlar içinde en düşük kallus oluşum oranı tespit edilmiştir. Aynı şekilde kallus oluşum yüzdesi de rejenere sürgün yüzdesini etkilemiştir.

Bir başka tıbbi bitki olan *Swertia mussotii* ile yapılan bir çalışmada BAP-NAA' nın farklı kombinasyonları kullanılarak değişik oranlarda kallus ve sürgün geliştirilmiştir[14]. Geliştirilen kalluslar 6 hafta sonra sürgün rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Kallusların geliştiği ortamlarda sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir. Doku kültürü ortamında fiziksel ve kimyasal faktörler arasındaki karşılıklı etkileşim, sonuçları büyük oranda etkilemektedir. Bu sonuçlar çalışmamızın sonuçları ile uyusmaktadır. Çalışmamızda da kallus oluşumu sürgün gelişimini, sürgün gelişimi ise kallus oluşum oranlarını etkilemektedir. He ve arkadaşları [14] sadece BAP ve BAP-NAA kombinasyonlarını kullanmışlar ve benzer sonuçları elde etmişlerdir.

Sonuçlarımız Sahoo ve ark. [15], Liu ve Chen [16], Smolenskaya ve Ibragimova [17], Sivanesan ve ark. [18] yaptıkları çalışmalar ile uygunluk göstermektedir. Bahsedilen bu çalışmalarda da oksin ve sitokinler kombinasyonlarının özellikle BAP ile az miktarda kullanılan oksinin (IAA yada NAA gibi) sürgün rejenerasyonu için gerekli olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçlarından da kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonu için BAP miktarının

arttırılmasının sürgün rejenerasyon oranını arttırdığı ve kullanılan IBA konsantrasyonunun kallus oluşum yüzdesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Safdari ve Kazemitabar [19] *Portulaca grandiflora* ile yaptıkları bir çalışmada BAP konsantrasyonunun düşük miktarda olmasının sürgün rejenerasyonu için daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Bu bulgu çalışma sonuçlarımız ile uyumlu değildir.

Sonuç olarak bu çalışma *Acinos rotundifolius* Pers. in mikro çoğaltımı konusunda yapılmış ilk çalışma olmakla birlikte etkili bir rejenerasyon protokolüdür de.

KAYNAKLAR

[1] Umay, A. Uğurlu, E., 2010, Beylikova (Eskişehir) ilçesinin florasına katkılar. Ot Sistematik Botanik Dergisi, 17 (1):133-150.

[2] Ekim, T. Koyuncu, M. Erik, S. İlarlan, R., 1989, Türkiye'nin tehlike altındaki nadir ve endemik bitki türleri. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği Yayını, Ankara, Seri No:18,5.

[3] Lawrence, G.M.H., 1963, Taxonomy of vascular plants, 8.Ed., The Macmillan Co., New York, 690.

[4] Bown, D., 1995, The herb society of America encyclopedia of herbs & Their uses, Dorling Kindersley, New York, 228.

[5] Davis, P.H. Leblebici, E., 1982, *Acinos*, Flora of Turkey and the east aegian Islands, Ed. University press, Edinburgh, 7:331-335.

[6] Davis, P. H. Mill, R.R. Tan, K., 1988, Flora of Turkey and the East aegian islands, University press, Edinburgh, 10: 207-208.

[7] Khawar, K.M. Özcan, S., 2002, High frequency shoot regeneration from cotyledonary node explants of different lentil (*Lens culinaris* Medik) genotypes and in vitro micrografting. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 16: 12-17.

[8] Dogan, D. Khawar, K.M. Özcan, S., 2005, Agrobacterium mediated tumor and hairy root formation from different explants of lentils derived from young seedlings. International Journal of Agriculture and Biology, 7: 1019-1025.

[9] Kendir, H. Sahin-Demirbag, N. Khawar, K.M. Aasim, M., 2008, *In vitro* plant regeneration from Narbon Vetch (*Vicia narbonensis* L.) using cotyledonary node explants. African Journal of Biotechnology, 7: 2491-2494.

[10] Kendir, H. Sahin-Demirbag, N. Aasim, M. Khawar, K.M., 2009, *In vitro* plant regeneration from Turkish narbon vetch (*Vicia narbonensis* L. var. narbonensis L.). African Journal of Biotechnology, 8: 614-618.

[11] Aasim, M. Özcan, S.F. Khawar, K.M. Özcan, S., 2012, Comparative studies on the competence of axillary shoot regeneration on unsliced and longitudinally sliced cotyledon nodes of vigna unguiculata. Turk J Bot., 36:281-287.

[12] Murashige, T. Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

[13] De Silva, T., 1997, Industrial utilization of medicinal plants in developing countries. In: Bodeder G, Bhat KKS, Burley J, and Vantomme P [Eds.], Medicinal Plants Forest Conservation and Healthcare. Non-Wood Forest Products No.11. FAO, Rome, Italy.

[14] He, T. Xu, J. Yang, L. Wang, H., 2012, An efficient method for plant regeneration from calli of

Swertia mussotii, an endangered medicinal herb. American Journal of Plant Sciences, 3:904-908.

[15] Sahoo, Y. Pattnaik, S.K. Chand, P.K., 1997, *In vitro* clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation. In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 33: 293–296.

[16] Liu, J. C. Chen, X. Y., 2003, Tissue culture and rapid propagation of *Swertia mussotii*. Plant Physiology Communications, 39, 237.

[17] Smolenskaya, S. E. Ibragimova, S. S., 2002, Restorative morphogenesis *in vitro* in the annual medic in the presence of benzylaminopurine. Russian Journal of Developmental Biology, 33 (6):349–354.

[18] Sivanesan, I. Hwang, S. J. Jeong, B. R., 2008, Influence of plant growth regulators on axillary shoot multiplication and iron source on growth of *Scrophularia takesimensis* Nakai - a rare endemic medicinal plant. African Journal of Biotechnology, 7 (24): 4484-4490.

[19] Safdari, Y. Kazemitabar, S. K., 2010, Direct shoot regeneration, callus induction and plant regeneration from callus tissue in Mose Rose (*Portulaca grandiflora* L.). Plant Omics Journal, 3(2):47-51.