

ENDEMİK GEVEN (*Astragalus polemoniicus* Bunge) BİTKİSİNİN YAPRAK SAPI VE YAPRAK EKSPLANTLARINDAN YÜKSEK ORANDA ADVENTİF SÜRGÜN REJENERASYONU

Semra MİRİCİ

Kırıkkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü-Kırıkkale

ÖZET

Endemik *Astragalus polemoniicus* Bunge'un yaprak sapı ve yaprak eksplantları kullanılarak yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Murashige and Skoog (MS) temel besin ortamına 6-benzilaminopurin (BAP), α -naftalenasetik asit (NAA) ve thidiazuron (TDZ) gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları ilave edilmiştir. En yüksek adventif sürgün rejenerasyon oranı (%100) ve eksplant başına sürgün sayısı (14.3 adet) yaprak sapı eksplantından 4 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir. *In vitro* da gelişen sürgünler büyüme düzenleyicisi içermeyen veya NAA (0.5, 1 ve 2 mg/l) içeren ortamlarda köklenmeye alınmıştır. En iyi köklenme 2 mg/l NAA içeren veya büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamdan elde edilmiştir. Köklenen fideler torf bulunan ve üzeri plastik torba ile kapatılan saksılarda dış koşullara alıştırılmıştır. Köklenen fidelerin kök uçlarında yapılan kromozom sayımlarında $2n=16$ normal kromozom sayısı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Astragalus polemoniicus* Bunge, organogenesis, yaprak sapı, yaprak.

HIGH FREQUENCY ADVENTITIOUS SHOOT REGENERATION FROM PETIOLE AND LEAF EXPLANTS OF ENDEMIC *Astragalus polemoniicus* Bunge

ABSTRACT

High frequency adventitious shoot regeneration was obtained by using petioles and leaves of endemic *Astragalus polemoniicus* Bunge. Various concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP), α -naphthaleneacetic acid (NAA) and thidiazuron (TDZ) were added to Murashige and Skoog (MS) medium. The highest frequency of adventitious shoot regeneration (100%) and the highest number of adventitious shoots per explant were obtained from petiole explants on a medium containing 4 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA. The shoots developed *in vitro* were transferred to hormone-free medium or media supplemented with 0.5, 1 and 2 mg/l NAA for rooting. The best root formation was observed in hormone-free or 2 mg/l NAA containing media. The rooted plantlets were acclimatized in pots covered with plastic bags. Normal chromosome number ($2n=16$) was noted in the root tips of the plantlets.

Key Words: *Astragalus polemoniicus* Bunge, organogenesis, petiole, leaf.

GİRİŞ

Yurdumuzda en çok taksona sahip olması ile önemli bir cins olan *Astragalus* (geven)'a ait 390'ın üzerinde türün 200'den fazlası endemiktir. *Astragalus* cinsine ait dikensiz türlerin hayvan yemi, süs bitkisi ve erozyon önleyici özellikleri vardır. *Astragalus polemoniicus* ($2n=16$) dar yayılışlı, endemik, dikensiz, çok yıllık ve ait olduğu seksiyonun tek türü olmasıyla da dikkat çekici bir türdür. Ayrıca, Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'na göre bu tür DD (Data Deficient= Veri Yetersiz) grubunda olup, türün yayılışı ve riskleri hakkında yeterli bilgi olmadığı bildirilmektedir (Ekim ve ark. 2000).

Somaklonal varyasyonların oluşturulması, *in vitro* da mutantların seçimi, somatik hibridizasyon, hızlı çoğaltım, germplazm muhafazası ve gen aktarımı gibi genetik manipulasyonlarda başarı sağlanması öncelikle doku kültürü teknikleri ile başarılı bir bitki rejenerasyon sisteminin geliştirilmesine bağlıdır. Daha önceki çalışmalarda *A. cicer*, *A. melilotoides*, *A. adsurgens* gibi türlerde somatik embriyogenesis ve organogenesis yoluyla sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir (Lou ve Jia 1998a, Uranbey ve ark. 2003, Hou ve Jia 2004). Ancak, *A. polemoniicus* türü ile ilgili daha önce doku kültürü ve kromozom çalışması yapılmamıştır. Bu çalışmada ilk defa *A. polemoniicus*'un yaprak sapı ve yaprak eksplantlarında farklı büyüme düzenleyicileri kullanarak yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonu tanımlanmıştır. Ayrıca, kromozom sayısı da ($2n=16$) olarak belirlenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Araştırmada materyal olarak, (B4) Kırıkkale Çerikli, Tatlıcak-Melamkar Köyleri arası, 700 m'den ($39^{\circ} 47.352$ N, $033^{\circ} 59.902$ E) Mayıs ayında E. Hamzaoğlu tarafından (2838) toplanan *Astragalus polemoniicus* 'un tohumları kullanılmıştır.

Tohumlar, yüzey sterilizasyonu için %50'lik çamaşır suyunda (ACE) 20 dakika tutulmuş ve daha sonra steril saf su ile 3 kez durulanmıştır. Sert tohumluluk özelliğinden dolayı çimlenmeyi sağlamak için tohum kabukları steril ortamda bistüri ile çizilmiştir. Çizimden sonra tohumlar MS (Murashige ve Skoog 1962) besin ortamı içeren petri kutularına (100x10) yerleştirilmiştir. Çimlenen fideler MS besin ortamında, koltukaltı meristem içeren parçalarından çoğaltılmıştır. Böylece, sınırlı sayıdaki tohumdan çok sayıda steril fide elde edilmiştir. Rejenerasyon çalışmalarında 3-4 cm büyüklüğe ulaşan fidelerden alınan 0.5 cm'lik yaprak sapı ve yaprak eksplantları kullanılmıştır. Çalışmada, 6-benzilaminopurin (BAP) (0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l), α -naftalenasetik asit (NAA) (0.1 ve 0.5 mg/l) ve thidiazuron (TDZ) (0.1, 0.2 ve 0.4mg/l) gibi büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonları denenmiştir (Tablo 1). Rejenerasyon olan sürgünler 1-2 cm uzunluğuna geldiklerinde kesilerek farklı oranlarda NAA içeren veya büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamında köklenmeye alınmıştır. Köklenen fideler 4 hafta sonra torf bulunan ve üzeri plastik torba ile kapatılan saksılara aktarılmıştır.

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962) ile %3 sukroz içeren ve %8'lik agar ile katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır. Besin ortamının pH'sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121°C'de 20 dakika otoklavda tutularak steril edilmiştir. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı altında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta 24 °C'de kültüre alınmıştır.

Rejenere olan sürgünlerin kromozom sayılarını belirlemek amacıyla 1-2 cm uzunluğundaki kökler bir pens yardımıyla kesilmiştir. Kesilen kök parçaları ilk önce kromozomların kısılması ve düzelmesi için α -bromonaftalin doymuş eriğinde 2 saat süreyle, +4 °C bekletmiş, daha sonra hücrenin sabitlenmesi için kök uçları bu çözeltiden çıkartılıp, 30 dakika glacial asetik asit içerisinde bekletilmiştir. Tespit işleminden sonra örnekler %70'lik alkolde +4 °C'de saklanmıştır. Daha sonra %70'lik alkol içinde depolanan kök uçları üçer defa beşer dakika damıtık su ile yıkanarak 60 °C'de 1 N HCl içinde 13 dakika süreyle hidroliz edilmiştir. Feulgen ile boyanıp ezme preparatı metoduna göre hazırlanan preparatlarda Olympus BH2 araştırma mikroskobu ile mitoz döneminde kromozom sayımları yapılmıştır (Aytaç 1997).

Rejenerasyon çalışmalarında denemeler 3 tekerürlü olarak kurulmuş olup, her tekerrürde de 10 eksplant kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 8 hafta sonra rejenere olan sürgünlerin sayımları yapılmıştır. Elde edilen veriler 'SPSS for Windows' programı ile tesadüf parselleri deneme desenine göre analiz edilmiştir. Köklendirme çalışmaları ise tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Muamele ortalamaları MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerleri istatistik analiz yapılmadan önce "arcsin transformasyon"una tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran 1967).

ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Kültüre alınan eksplantların kesilen uçlarında 1 hafta sonra kallus oluşumu başlamıştır. Her iki eksplant tipinde de çok yüksek oranda kallus gelişimi gözlenmiştir. Ancak, yaprak sapı eksplantında kallus gelişimi daha hızlı olmuştur. Kültür başlangıcından 4 hafta sonra kalluslar üzerinde sürgün uçları gözlenmiştir (Şekil 1a ve b). Sekiz hafta içinde sürgün uçlarının büyük bir kısmı 1-2 cm uzunluğunda genç sürgünleri oluşturmuştur (Şekil 1c ve d).

Kullanılan ortamlar ve eksplant tipinin sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısına etkisi ile ortam x eksplant interaksyonu etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunurken, kallus oluşturan eksplant yüzdesine etkisi önemsiz bulunmuştur. Tablo 1.'de farklı TDZ, BAP ve NAA konsantrasyonlarının *A. polemoniicus*'un yaprak sapı ve yaprak eksplantlarında kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sür-

gün sayısına ait değerler verilmiştir. Genel olarak, en fazla sürgün gelişimi BAP ve NAA'nın birlikte kullanıldığı besin ortamlarında elde edilmiştir. Ayrıca, TDZ'nin düşük dozları da sürgün gelişimini olumlu etkilemiştir. Yaprak sapı eksplantında en fazla sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%100) 4 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilirken, yaprak eksplantında (%76.6) 1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı her iki eksplantta da 4 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Genel olarak yaprak sapı eksplantının rejenerasyon kapasitesi, yaprak eksplantından yüksek bulunmuştur (Tablo 1). Daha önce somatik embriyogenezis ve organogenezis yoluyla *A. adsurgens*, *A. cicer* ve *A. melilotoides*'te protoplast, sap, yaprak, yaprak sapı ve kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir (Lou ve Jia 1998a, Lou ve Jia 1998b, Uranbey ve ark. 2003, Hou ve Jia 2004). Ancak, *A. polemoniicus* türünde adventif sürgün rejenerasyonu üzerine çalışmalar bulunmamaktadır. *In vitro* çalışmalarda, adventif sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörlerin başında besin ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileri olduğu ve besin ortamındaki oksin-sitokinin dengesinin iyi ayarlanması neticesinde yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonunun elde edilebileceği değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Özcan ve ark. 1993, Özcan ve ark. 1996, Sancak 1999, Uranbey ve ark. 2003). Genel olarak sitokinler sürgün oluşumunu oksinler ise kallus ve kök oluşumunu teşvik etmektedirler. Uygun bir oksin-sitokinin dengesi ile bitkilerde yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonu elde edilebilmektedir. Ancak, en uygun oksin-sitokinin dengesinin eksplantın tipine göre de değiştiği yine aynı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Benzer sonuçlar bu çalışmada da elde edilmiştir. Besin ortamına ilave edilen BAP ve NAA miktarlarına göre sürgün rejenerasyonunda önemli değişiklikler gözlenmiştir. Ayrıca, yaprak sapı eksplantında en fazla sürgün 4 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilirken, yaprak eksplantında 1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Uranbey ve ark. (2003), nohut geveninde yaptıkları araştırmada hipokotil eksplantından sap, yaprak sapı ve kotiledon eksplantlarına göre daha fazla rejenerasyon elde etmişlerdir.

Rejenere olan sürgünler 1-2 cm uzunluğuna geldiklerinde kesilerek 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l NAA ve hormonsuz MS besin ortamlarında köklendirilmeye alınmıştır. Kültür başlangıcından beş hafta sonra kök oluşturan sürgün oranı, sürgün başına kök sayısı ve kök uzunluğu kaydedilmiştir. Kök oluşturan sürgün oranı, sürgün başına kök sayısında ve kök uzunluğunda test edilen ortamlar arasında istatistiksel açıdan farklılık gözlenmiştir (Tablo 2; p<0.01).

Tablo 1. Farklı TDZ, BAP ve NAA konsantrasyonlarının *Astragalus polemoniicus*'un yaprak sapı ve yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

TDZ	Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)		Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) ¹	
	BAP	NAA	Y. sapı	Yaprak	Y. sapı	Yaprak	Y. sapı	Yaprak
0.1	-	-	80.0	90.0	80.0 ^{bc}	33.3 ^{cd}	7.7 ^c	3.3 ^{bc}
0.2	-	-	90.0	60.0	90.0 ^{ab}	36.6 ^{bcd}	12.6 ^b	3.0 ^c
0.4	-	-	93.3	93.3	73.3 ^{bc}	66.6 ^{abc}	4.6 ^e	2.8 ^c
0.1	-	0.1	66.6	66.6	6.6 ^f	30.0 ^{def}	0.3 ^g	0.9 ^d
0.2	-	0.1	100.0	100.0	33.3 ^{de}	6.6 ^{fg}	1.2 ^{fg}	0.6 ^d
0.4	-	0.1	96.6	93.3	33.3 ^{de}	3.3 ^g	1.2 ^{fg}	0.3 ^d
-	0.5	0.1	96.6	90.0	66.6 ^{bc}	63.3 ^{abcd}	6.3 ^{cd}	2.5 ^c
-	1.0	0.1	96.6	90.0	80.0 ^{bc}	76.6 ^a	7.1 ^c	4.1 ^{bc}
-	2.0	0.1	76.6	93.3	53.3 ^{cd}	66.6 ^{abc}	5.3 ^{de}	4.7 ^{ab}
-	4.0	0.1	100.0	70.0	100.0 ^a	70.0 ^{ab}	14.3 ^a	6.0 ^a
-	0.5	0.5	100.0	96.6	6.6 ^f	6.6 ^{fg}	0.6 ^{fg}	0.6 ^d
-	1.0	0.5	100.0	100.0	36.6 ^{de}	26.6 ^{ef}	1.9 ^f	3.1 ^{bc}
-	2.0	0.5	90.0	100.0	20.0 ^{def}	36.6 ^{bcd}	1.7 ^{fg}	3.2 ^{bc}
-	4.0	0.5	86.6	100.0	23.3 ^{ef}	20.0 ^{efg}	1.2 ^{fg}	1.0 ^d

¹Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Tablo 2. Farklı NAA konsantrasyonlarının *Astragalus polemoniicus*'dan elde edilen adventif sürgünlerin köklenmesi üzerine etkisi

Büyüme Düzenleyicileri (mg/l NAA)	Kök oluşturan sürgün oranı (%)	Sürgün başına kök sayısı (adet)	Kök uzunluğu (mm)
0.5	41.6 ^a	1.8 ^{bc}	1.7 ^b
1.0	0.0 ^b	0.0 ^c	0.0 ^b
2.0	41.6 ^a	6.3 ^a	4.1 ^a
0	58.3 ^a	3.8 ^b	4.9 ^a

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

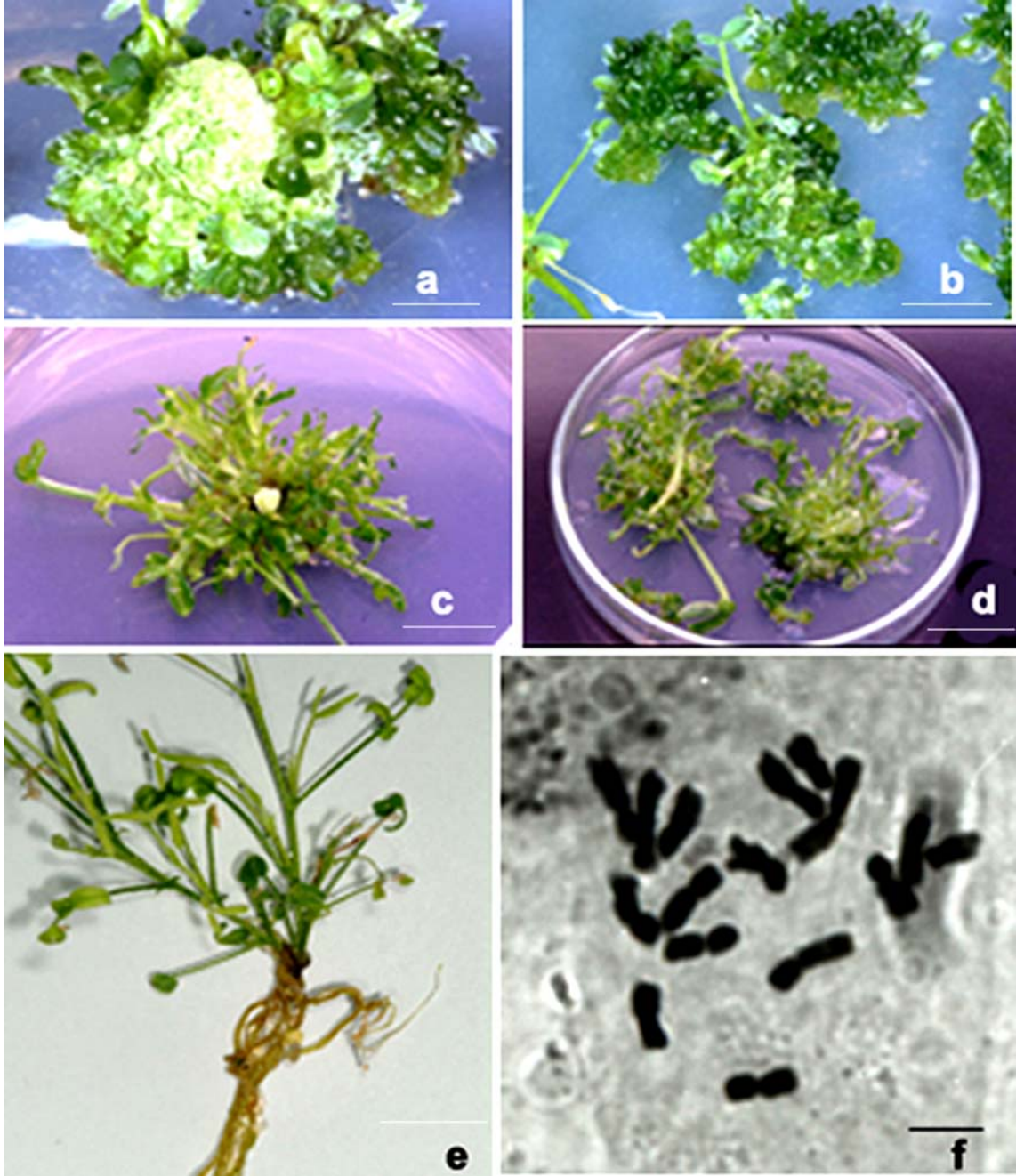
Farklı bitki türlerinin en iyi köklendiği büyüme düzenleyicisi farklı olabilmektedir. Önceki çalışmalarda mercimek 0.25 mg/l IBA (Khawar ve Özcan 2002), macar fiği 5 µM IBA (Sancak ve ark. 2000), korunga 1 mg/l IBA veya 1 mg/l NAA (Özcan ve ark. 1996), çilek üçgülü 1-4 mg/l IAA (Singha ve ark. 1988) içeren besin ortamlarında en iyi köklenme göstermiştir. Bu çalışmada ise en iyi köklenme hormonsuz veya 2 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir.

Bugün biyoteknolojisi klasik ıslah yöntemlerine ek olarak bitki ıslahına yeni ufuklar açmıştır. Bu tekniklerin bitki ıslahında kullanılabilmesi için öncelikle türlerin hatta çeşitlerin rejenere olabildiği en iyi büyümeyi düzenleyici kombinasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada da ilk defa *Astragalus polemoniicus* bitkisinde yaprak sapı ve yaprak eksplantlarında başarılı bir adventif sürgün rejenerasyonu için en uygun büyümeyi düzenleyici kombinasyonlar belirlenmiş ve elde edilen adventif sürgünler köklendirilerek diğ koşullara alıştırmıştır. Adventif sürgün rejenerasyonu ile elde edilen sürgünlerin kök uçlarında yapılan sitogenetik inceleme sonu-

cunda da kromozom sayılarında bir anormalliğin olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar endemik *A. polemoniicus* bitkisinin hızlı çoğaltımında ve bu bitkiye gen aktarımında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Aytaç, Z., 1997. The revision of the section *Dasyphyllium* Bunge of the genus *Astragalus* L. of Turkey. Tr J. of Botany, 21: 31-57.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., ve Adıgüzel, N., 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. Türk Tabiatını Koruma Derneği-Van 100. Yıl Üniversitesi, Ankara.
- Hou, S. W. ve Jia, J. F., 2004. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic calli of the forage legume *Astragalus melilotoides* Pall. Plant Cell. Rep., online.
- Khawar, M.K. ve Özcan S., 2002. Effect of Indole-3-Butyric Acid on *In Vitro* Root Development in Lentil (*Lens culinaris* Medik.), Turk J. Bot. 26: 109-111.
- Luo, J.P. ve Jia, J.F., 1998a. Callus induction and plant regeneration from hypocotyl explants of the forage legume *Astragalus adsurgens*. Plant Cell. Rep. 17: 567 – 570.
- Luo, J.P. ve Jia, J.F., 1998. Plant regeneration from callus protoplasts of the forage legume *Astragalus adsurgens* Pall. Plant Cell. Rep. 17: 313-317.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. - Physiol. Plantarum, 15, 473-497.
- Özcan, S., Barghchi M., Firek S. ve Draper J., 1993. Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embryogenesis in pea. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 11: 44-47.
- Özcan, S., Sevimay C. S., Yıldız, M., Sancak, C. ve Özgen, M., 1996. Prolific shoot regeneration from immature embryo explants of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.), Plant Cell Rep., 16: 200-203.



Şekil 1. *Astragalus polemoniicus* bitkisinin yaprak sapı eksplantından kallus oluşumu, adventif sürgün rejenerasyonu ve *in vitro* köklenme.

(a, b) Kültür başlangıcından 4 hafta sonra gelişen sürgün uçları (bar=0.5 cm, 0.65 cm).

(c, d) Kültür başlangıcından 8 hafta sonra gelişen genç sürgünler (bar=0.6 cm, 1.33 cm).

(e) Büyüme düzenleyicisi içermeyen MS) besin ortamında köklenen sürgünler (bar=0.8 cm).

(f) *In vitro* da gelişen sürgün uçlarında $2n=16$ normal kromozom sayısı (bar=1 mikron).

Sancak, C., 1999. Koca Fiğ (*Vicia narbonensis* L.)'in Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu, G. Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi 19: 25-33.

Sancak, C., Mirici, S. ve Özcan, S., 2000. High frequency shoot regeneration from immature embriyo explants of Hungarian vetch, Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 61: 231-235.

Singha, S., Baker, B. S. ve Bhatia, S. K., 1988. Tissue culture propagation of running buffalo clover (*Trifolium stoloniferum* Muhl. ex A. Eaton). Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 15: 9-11.

Uranbey, S., Çöçü, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Khawar, K.M., Mirici, S., ve Özcan, S. (2003) Adventitious shoot regeneration in cicer milkvetch. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 17: 33-37.