



Araştırma Makalesi

www.ziraat.selcuk.edu.tr/ojs
Selçuk Üniversitesi
Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi
25 (4): (2011) 58-66
ISSN:1309-0550



Astragalus schizopterus'da *In vitro* Rejenerasyon Sisteminin Araştırılması

Mustafa YORGANCILAR^{1,2}, Refik ERKOYUNCU¹

¹Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Konya/Türkiye

(Geliş Tarihi: 11.10.2011, Kabul Tarihi:29.12.2011)

Özet

Bu çalışmada, endemik *Astragalus schizopterus* Boiss. 'in çimlenme ve *in vitro* rejenerasyon yeteneği araştırılmıştır. Karşılaşılan çimlenme problemlerinden dolayı *A. schizopterus* bitkisinin tohumları, zımparalama, bisturi ile çizme ve hidroklorik (HCl) asit ile muamele gibi uygulamalara tabi tutulmuştur. En iyi çimlenme oranı (% 96.7) bisturi ile çizilen tohumlardan elde edilmiştir.

Aseptik şartlarda yetiştirilen fidelerden alınan yaprak ve yaprak sapı eksplantları 2.0, 4.0, 8.0 mg/l 2,4-Dx0.5 mg/l KIN içeren MS veya B₅ ortamları, 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/l 2,4-DxKIN içeren MS ortamları, 2.0, 4.0 mg/l IAAx0.5 mg/l ZEA ile 0.5 mg/l IAAx2.0, 4.0 mg/l ZEA içeren MS besin ortamlarında, hipokotil eksplantı 1.0, 2.0, 4.0 mg/l 2,4-Dx0.5 mg/l BAP veya KIN içeren MS ortamlarında, adventif sürgün rejenerasyonu veya somatik embriyo uyarımı için kültüre alınmıştır.

Sonuç olarak *A. schizopterus*'ta denemeye alınan eksplantlardan çoğunlukla yumuşak veya sert yapılı ve embriyogenik olmayan kalluslar elde edilmiştir. Rejenerasyon ortamına alınan kalluslarda herhangi bir sürgün rejenerasyonu görülmezken, bazı ortamlarda kök oluşumu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Astragalus*, Bitki Büyüme Düzenleyicileri(BBD), B₅, Çimlenme, Kallus, MS

The Investigation of In vitro Regeneration System of Astragalus schizopterus

Abstract

In this study, *in vitro* germination and regeneration ability of endemic *Astragalus schizopterus* Boiss. was investigated. As we encounter germination handicap, the seeds of *A. schizopterus* plant, were subjected to sandpaper, boot with a scalpel, or hydrochloric acid (HCl) treatments. The highest germination rate (96.7%) was obtained from seeds plotted with a scalpel.

Leaf and petiole explants taken from seedlings grown in aseptic conditions, were cultured in media supplemented with 2.0, 4.0, 8.0 mg/l 2,4-D x 0.5 mg/l KIN containing MS or B₅ media, 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/l 2,4-D x KIN containing MS media, 2.0, 4.0 mg/l IAAx0.5 mg/l and 0.5 mg/l ZEA, 1.0 IAAx2.0, 4.0 mg/l ZEA containing MS nutrient environments, hypocotyl explants were cultured in 1.0, 2.0, 4.0 mg/l 2,4-Dx0.5 mg/l BAP or KIN in MS containing environments, adventitious shoot regeneration or somatic embryos were cultured for stimulation.

As a result, mostly soft or hard bodied and non-embryogenic callus tissues were obtained from the explants taken from *A. schizopterus*. There was no shoot regeneration from the callus in any environment, although root formation was observed in some environments.

Key Words: *Astragalus*, B₅, Germination, Callus, MS, Plant Growth Regulators (PGR)

Giriş

Ülkemiz, üç farklı bitki coğrafya bölgesinin birleştiği yerde olması, özellikle bazı İran-Turan kökenli bitki cinslerinin gen merkezi olması gibi ekolojik ve floristik nedenlerle zengin bir flora ile çok değişik vejetasyon tiplerine sahiptir. Türkiye'nin bu biyolojik zenginliğin oluşmasında ekolojik, jeolojik ve topoğrafik yapıdaki çeşitliliğin de katkısı büyüktür.

Biyolojik zenginliklerin farkına varılması kadar, korunması ve zenginliklerden yararlanılması da önemlidir. Bilim dünyasına ilk kez ülkemizden betimlenerek tanımlanan türlerin, ekonomik değer taşıyan özellikleri-

nin belirlenmesi ve tarıma kazandırılması, ülkemizi daha da zenginleştirecektir. Bu bağlamda ülkemiz florasında bulunan ve bazı türleri endemik olan geveler (*Astragalus*), ülkemizde tarımı yapılmayan ancak mevcut yem bitkilerine ilave edilebilecek bir bitki grubu olarak önem kazanmaktadır.

Astragalus schizopterus, Türkiye'de geniş yayılış gösteren, adaptasyon yeteneği araştırmalara konu olan diğer türlere oranla daha yüksek olan endemik bir türdür. *Astragalus* türleri derin kök sistemine sahip olmaları nedeniyle de toprağı tutarak erozyonu önleyici özelliğe sahiptirler. Doğal vejetasyonunda hayvan-

²Sorumlu Yazar: myorg@selcuk.edu.tr

lar tarafından tüketilmektedir. Bu nedenle meraların ıslah edilmesinde kullanılabilir özelliklere sahiptirler.

Günden güne artan kuraklık nedeniyle dünyada ve Türkiye’de kuraklığa dayanıklı genotiplerin belirlenmesi ve bunların tarımsal üretimde değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Fakat bu bitkiler genellikle zor çoğalma özelliklerine sahip olmaları nedeniyle, nesilleri de tükenme tehlikesi altındadır. Bu nedenle gelecekte yem bitkisi olarak değerlendirilebilecek bu türlerin kuraklığa dayanıklılık genlerinin tespiti ve bunların doku kültürü ile çoğaltılabilme olanaklarının araştırılması, ayrıca bu türlerin *ex situ* korunması önem arz etmektedir.

Astragalus türlerinin genel olarak tohumla çoğalma yeteneklerinin sınırlı olması doku kültürü ile klonal çoğaltım yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Somatik embriyogenesis yoluyla rejenerasyonun başarılması sentetik (yapay) tohum üretimine imkân sunacağından meralarımızın zenginleştirilmesine önemli katkılar sağlayacaktır. Aynı zamanda doku kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlar genetik mühendisliği yöntemleriyle yapılacak ıslah çalışmalarına da temel teşkil edecektir. Çünkü moleküler seviyede yapılan ıslahın başarılı olabilmesi uygun rejenerasyon yönteminin varlığına bağlıdır.

Bu sebeplerden dolayı, bu çalışmada Türkiye Florası’nda bulunan ve çeşitli faktörlerin etkisiyle sayıları giderek azalma tehlikesinde olan acil koruma gerektiren endemik *Astragalus schizopterus* Boiss.’in doku kültürü yöntemleriyle rejenerasyon yeteneklerinin belirlenmesi ve bitkilerin *in vitro* koşullarda çoğaltılması amaçlanmıştır.

Astragalus ile yapılan çalışmalarda araştırmacılar, embriyogenik kallus oluşturmak için diğer baklagillerde olduğu gibi yüksek oranda 2,4-D ile düşük oranda BAP içeren ortamların iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Gelişen embriyogenik kallusları farklı konsantrasyonlara sahip BAP ve NAA içeren ortamlarda kültüre almışlar ve olgunlaşan embriyoları hormon içermeyen ortamlara aktararak bitkicik gelişimini sağladıklarını belirtmişlerdir (Luo ve ark. 1999, Hou ve Jia 2004a).

Mirici (2004), endemik *Astragalus polemoniicus* ile yaptığı çalışmada yaprak sapı eksplantından 4 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda ortalama 14 adet sürgün elde etmiştir. Çöcü ve ark. (2005), endemik *Astragalus duranii*’de en fazla sürgün gelişiminin TDZ içeren ortamda meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Astragalus melilotoides, *Astragalus adsurgens* gibi türlerde hipokotil, kotiledon, gövde ve protoplastlarından somatik embriyogenesis ve organogenesis yoluyla rejenerasyon olduğu bildirilmiştir (Luo ve Jia 1998; Luo ve ark. 1999; Hou ve Jia, 2004a; Hou ve Jia, 2004b). *Astragalus cicer*, *A. polemoniicus* ve *A.*

duranii ile yapılan çalışmalarda da hipokotil, kotiledon, yaprak, yaprak sapı, koltukaltı meristem eksplantları kullanılarak adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir (Uranbey ve ark. 2003; Mirici 2004; Çöcü ve ark. 2005). Luo ve ark. (1999), *Astragalus adsurgens*’in hipokotil eksplantlarından elde edilen embriyonik kallusların 1 gramında ortalama 280 embriyo oluştuğu bildirilmiştir.

Materyal ve Metot

Materyal

Araştırmada materyal olarak *Astragalus schizopterus* Boiss. türü kullanılmıştır. Bu tür endemik olup, türe ait olgun tohumlar, Burdur: Dirmil-Göhlhisar, 7. km, 1175 m, 25.07.2006, açık yerlerden S.Ü. Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyeleri Ahmet Duran 7334 ve Muhittin Dinç tarafından toplanmıştır.

Metot

Tüm doku kültürü işlemleri Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

Tüm sterilizasyon ve kültüre alma işlemleri laminar hava akışlı steril kabin içerisinde yapılmıştır. Kabin, alkol ile silinip U.V. açılarak 15 dakika çalıştırdıktan sonra sterilizasyon ve kültür işlemlerine geçilmiştir. Tüm kültürler 16 saat fotoperiyot, %62-64 oransal nem, 24±1°C ve 3000 lüks beyaz flüoresan ışık yoğunluğu koşullarında raflı kültür dolabında (Sanyo, MLR-351H) tutulmuştur. Besin ortamları pH’sı 1 N KOH yada 1 N HCl kullanılarak 5.8’e ayarlanmış sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121°C’de 20 dakika tutularak sterilize edilmiştir. Tüm Denemeler “Tesadüf Parselleri Deneme Deseni”ne göre tekerrürlü olarak kurulmuştur.

Tohumlarda yüzey sterilizasyonu ve çimlendirme

Aksenik fide elde etmek amacıyla kültüre alınan tohumlar %70’lik alkol içinde 30 saniye bekletildikten sonra 1-2 damla Tween-20 damlatılmış %20’lik ticari hipoklorit (%50 NaOCl içeren HES çamaşır suyu) çözeltisinde 10 dakika muamele edilmiş ve steril saf su ile 3-4 kez durulanarak sterilize edilmiştir.

A. schizopterus Boiss.’a ait bitki tohumlarında sert tohum kabuğundan kaynaklanan çimlenme problemi bulunmaktadır. Bu nedenle tohumlar farklı uygulamalara tabi tutulmuştur. Bunlar; tohum kabuğunun zımparalanması, tohum kabuğunun bistüri ile çizilmesi ve hidroklorik asit (HCl) uygulamasıdır. Kontrol grubuna ise hiçbir muamele yapılmamıştır. Sterilizasyon sonrası farklı muamelelere tabi tutulan tohumlar %3 sakkaroz ve %0.7 agar içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel besin ortamında kavanozlarda kültüre alınmıştır.

Doku kültürü çalışmaları

Aseptik şartlarda yetiştirilen fidelerden alınan yaprak ve yaprak sapı eksplantları 2.0, 4.0, 8.0 mg/l 2,4-Dx0.5 mg/l KIN içeren MS veya B₅ ortamları, 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/l 2,4-DxKIN içeren MS ortamları, 2.0, 4.0 mg/l IAAX0.5 mg/l ZEA ile 0.5 mg/l IAAX2.0, 4.0 mg/l ZEA içeren MS besin ortamlarında, hipokotil eksplantı 1.0, 2.0, 4.0 mg/l 2,4-Dx0.5 mg/l BAP veya KIN içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Ortamlara yarı-katılaştırıcı olarak agar (7 g/l), karbon kaynağı olarak sakkaroz (%3, a/h) ilave edilmiştir.

Bu ortamlardan elde edilen kalluslar adventif sürgün rejenerasyonu için büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besin ortamına alınmıştır.

Gözlem ve ölçümler

Çimlenme: Farklı uygulamalar yapılmış tohumlardaki çimlenme değerlerini belirlemek için, kültüre alınan tohumların çimlenme durumları 5, 10, 15 ve 20 gün sonra sayılarak belirlenmiş, çimlenme değeri yüzde (%) olarak hesaplanmıştır.

Doğrudan Bitki Rejenerasyonu: Farklı büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda kültüre alınan eksplantlarda kültür başlangıcından 6 hafta sonra bitki rejenerasyonu gözlemlenmiş, somatik dokulardaki değişiklikler kaydedilmiştir.

Dolaylı (Kallustan) Bitki Rejenerasyonu: Farklı büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda kültüre alınan eksplantlarda kallus oluşturma ve daha sonrasında rejenerasyon durumları tespit edilmiş, eksplantların kallus oluşturma potansiyelleri (%) ve kallus ağırlıkları (g) belirlenmiştir.

Deneme sonunda elde edilen veriler MSTAT-C paket programı ile istatistiksel analize alınmıştır.

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Çimlendirme Çalışmaları

Sert tohum kabuğundan kaynaklanan çimlenme probleminin aşılabilmesi için *A. schizopterus* Boiss.'e ait tohumlara yapılan uygulamalar ve farklı günlerde elde edilen çimlenme değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. *A. schizopterus* tohumlarının çimlenme durumları (%)

Uygulamalar	5. gün	10. gün	15. gün	20. gün
Kontrol	0.0	0.0	0.0	0.0
Çizme	46.7	86.7	96.7	96.7
Zımparalama	20.0	23.3	33.3	63.3
HCl muamelesi	0.0	0.0	0.0	0.0

Tablo 1'de görüldüğü gibi zımparalama ve bisturi ile tohum kabuğunun çizilmesi tohumların çimlenmesini teşvik etmiştir. Kontrolde ve HCl uygulamasında

herhangi bir çimlenme meydana gelmezken, en iyi çimlenme değerleri % 96.7 ile tohum kabuğunun çizilmesinden elde edilmiştir. Sonuç olarak bisturi ile tohum kabuğunun çizilmesi uygulaması, bu türde sert tohum kabuğundan kaynaklanan çimlenme probleminin aşılması için tavsiye edilebilir.

Doku Kültürü Çalışmaları

Genel olarak tohumla çoğalma yeteneklerinin ve tohum çimlenme kapasitelerinin düşük olması, *Astragalus* türlerinin doku kültürü ile klonal çoğaltım yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle türün doku kültürü yöntemleri ile çoğaltılması ve adventif sürgün rejenerasyon yeteneği belirlenmek amacıyla farklı büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında kültüre alınan yaprak, yaprak sapı ve hipokotil eksplantlarının ortamlara göre farklı tepkiler verdiği tespit edilmiştir.

MS ve B₅ Besin Ortamlarının Adventif Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

A. schizopterus'a ait yaprak ve yaprak sapı eksplantları 2,4-D (2.0, 4.0, 8.0 mg/l) ve KIN (0.5 mg/l) büyüme düzenleyicileri ilave edilmiş farklı besin ortamlarında (MS ve B₅) kültüre alınmıştır. Kültüre alınan eksplantların tümünde 5-6 gün sonra kallus oluşumu başlamıştır.

B₅ besin ortamında oluşan kallusların gevşek dokulu ve sarı renkli, MS besin ortamında gelişenlerin ise gevşek dokulu ve yeşil renkli oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 1). Ayrıca MS ortamında kallusların daha büyük oldukları ve bazı kalluslarda adventif köklerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Her iki ortamda da bazı kallusların üst kısımlarında beyazlaşmalar görülmüştür. Kültür başlangıcından 6 hafta sonra ilk ortamlarının ½ katı 2,4-D konsantrasyonu içeren ortamlarda alt kültüre alınan kalluslarda, büyümenin devam ettiği ancak herhangi bir embriyo veya sürgün gelişiminin olmadığı tespit edilmiştir. İkinci alt kültürden sonra bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına aktarılan kalluslarda da bir değişime rastlanmamıştır.

Tablo 2. MS ve B₅ besin ortamlarında *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından oluşan kallusların ağırlığı (g)

B.O.	Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)		Kallus Ağırlığı (g)		
	2,4-D	KIN	Yaprak	Y.sapı	Ort.
MS	2.0		0.44	0.36	0.40
	4.0	0.5	0.59	0.32	
	8.0		0.34	0.36	
B ₅	2.0		0.42	0.30	0.34
	4.0	0.5	0.41	0.26	
	8.0		0.46	0.16	
Ortalama			0.45 a	0.37 b	

Kallus ağırlıklarına ait varyans analizi sonucunda kallus ağırlığı bakımından sadece eksplantlar arasında

0.01 düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur. Diğer değişkenler ve değişkenler arası etkileşimler arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık yoktur (Tablo 2).

Kallus ağırlığı bakımından yaprak eksplantı (0.45 g) yaprak sapı eksplantından (0.37 g) daha iyi sonuç vermiştir. Yaprak eksplantlarında en yüksek kallus ağırlığı (0.59 g) 4.0 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Yaprak sapı eksplantında ise yine MS besin ortamında 2.0, 8.0 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN içeren ortamlarda en yüksek sonuç (0.36 g) alınmıştır. B5 besin ortamında

ise yaprak eksplantı 8.0 mg/l 2,4-D ve 0.5mg/l KIN içeren ortamda en yüksek (0.46 g) kallus ağırlığı oluştururken yaprak sapında 2.0 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN içeren ortam en yüksek sonucu vermiştir. Besin ortamları açısından kallus ağırlıkları incelendiğinde MS besin ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen ortalama kallus ağırlığı 0.40 g iken B₅ ortamında kültüre alınan eksplantlarda bu değer 0.34 g olmuştur. İkinci alt kültürde büyüme düzenleyici içermeyen MS'e aktarılan kalluslarda embriyo oluşumu veya adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir.



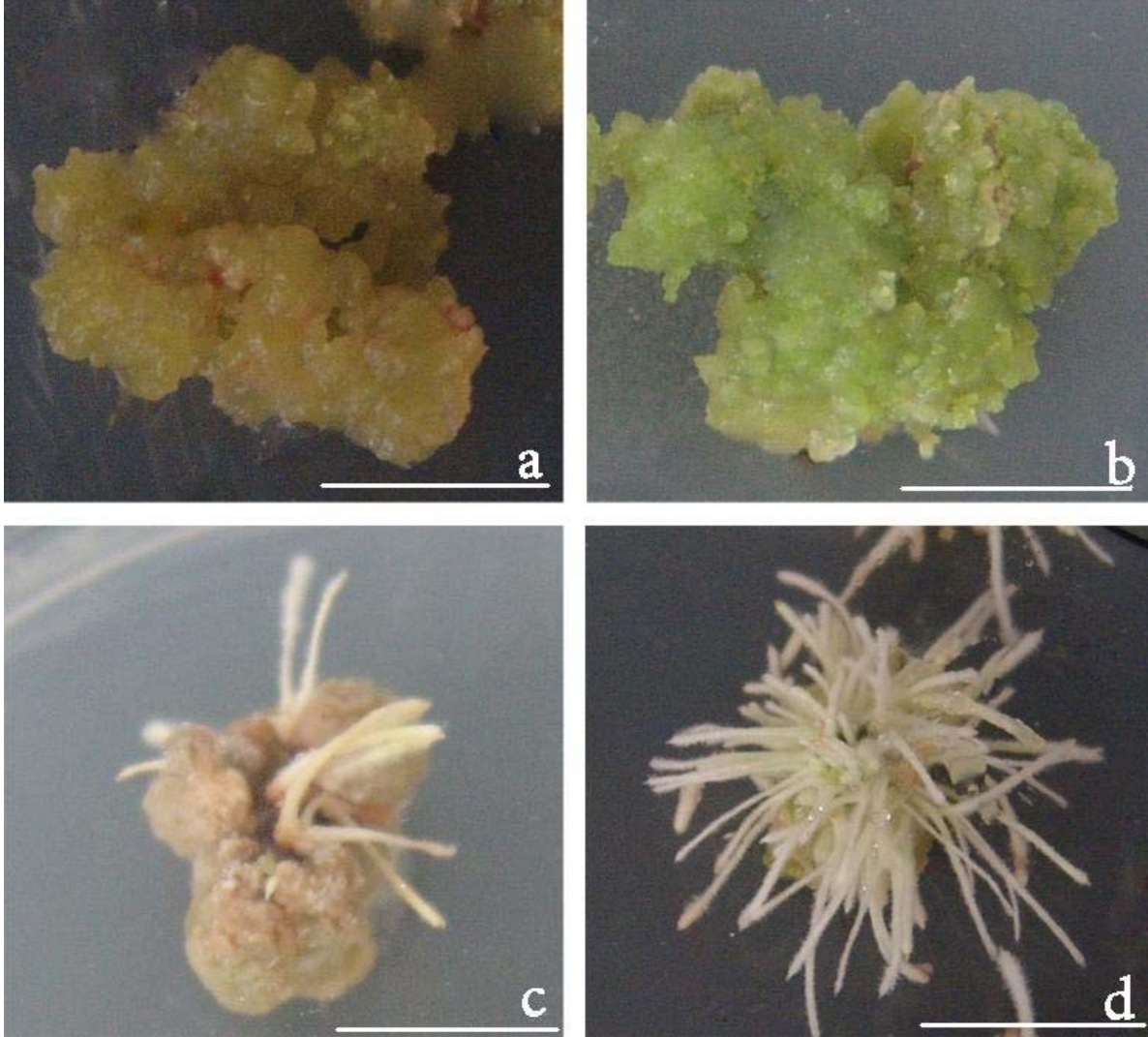
Şekil 1. *A. schizopterus* bitkisinde 2,4-D ve KIN içeren MS ve B₅ ortamlarında kallus oluşumu, a) MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından gelişen kalluslar b) MS besin ortamındaki yaprak sapı eksplantlarından gelişen kalluslar c) B5 besin ortamındaki yaprak eksplantlarından gelişen kalluslar d) B5 besin ortamındaki yaprak sapı eksplantlarından gelişen kalluslar

Yapılan literatür taramasında farklı mineral ve vitamin içeriğine sahip besin ortamlarında başarılı sonuçlar elde edildiği tespit edilmiştir (Atanassov ve Brown, 1984; Romagnoli, 1996). Bununla birlikte Sugino ve ark. (1991) yoncada MS ortamında B₅ ortamına

göre kallusların daha büyük olduğunu ama B₅ ortamıyla aralarında anlamlı bir farklılık bulunmadığını tespit etmişlerdir. En fazla somatik embriyoyu MS ortamından elde etmişlerdir. Bu çalışmada da somatik embriyo oluşumu elde edilmese de kallus ağırlığı

bakımından benzer sonuçlar elde edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmasa da MS ortamındaki kallusların B5 ortamındakilerden daha

yüksek ağırlığa sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu nedenle denemelerde MS temel ortam olarak kullanılmıştır.



Şekil 2. *A. schizopterus* bitkisinde 2,4-D ve KIN içeren ortamlarda kallus ve adventif kök oluşumu (a) Kültürden 6 hafta sonra yaprak eksplantında 5.0 mg/l 2,4-D içeren ortamda gelişen kalluslar (b) Yaprak eksplantında 5.0 mg/l 2,4-D ve 1.0 mg/l kinetin içeren ortamda gelişen kalluslar (c) Yaprak eksplantında 0.5 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l kinetin içeren ortamda gelişen kalluslar ve adventif kökler (d) Yaprak sapı eksplantında 0.5 mg/l 2,4-D ve 5.0 mg/l kinetin içeren ortamda gelişen kalluslar ve adventif kökler (bar=1 cm)

***A. schizopterus* Yaprak ve Yaprak Sapı Eksplantlarında 2,4-D ve KIN Büyüme Düzenleyicilerinin Adventif Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi**

Bu denemede türe ait yaprak ve yaprak sapı eksplantları 0.0-5.0 mg/l 2,4-D ve 0.0-5.0 mg/l KIN içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 1 hafta sonra eksplantların kesilen kısımlarında kallus oluşumu gözlenmiştir. 6 hafta sonunda ortamların çoğunda eksplantların tamamında kallus oluşumu gözlenmiştir. Gelişen kallusların farklı tiplerde olduğu

tespit edilmiştir. Bazı kallusların sarımtırak, gevşek dokulu, bazılarının yeşil, daha sıkı dokulu, bazı kallusların ise kahverengi ve sıkı dokulu oldukları gözlenirken bazı kalluslarda da adventif köklerin olduğu gözlenmiştir (Şekil 2). Kallus ağırlıkları alınan kalluslardan yeşil ve sarı renkli kalluslar büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamında alt kültüre alınmıştır. 8 hafta süre ile alt kültüre alınan kalluslarda embriyo ya da sürgün oluşumuna rastlanmamıştır. Kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ortamlar ve ortam x eksplant etkileşimi arasında 0.01 düzeyinde anlamlı

farklılık varken eksplantlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Kallus ağırlığı bakımından ise tüm varyasyon kaynakları arasında 0.01 düzeyinde anlamlı farklılık vardır (Tablo 3 ve 4).

Kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından her iki eksplantta da ortamların çoğunda %95-100 oranında

kallus meydana getirirken 2,4-D içermeyen ortamların tamamında kallus oluşumu gözlenmemiştir. İkinci en düşük değer (%75) ise 5.0 mg/l 2,4-D ve 5.0 mg/l KIN içeren ortamda kültüre alınan yaprak sapı eksplantından elde edilmiştir. Yaprak eksplantında ise ikinci en düşük değer %85 ile 2.0 mg/l 2,4-D içeren ortamdan elde edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Farklı 2,4-D ve KIN dozlarında *A. schizopterus* yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi

Büyüme Düzenleyiciler mg/l	KIN									
	0.0		0.5		1.0		2.0		5.0	
2,4-D	Y	Y.S	Y	Y.S	Y	Y.S	Y	Y.S	Y	Y.S
0.0	- d	- d	- d	- d	- d	- d	- d	- d	- d	- d
0.5	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
1.0	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	95 a	100 a	100 a	100 a
2.0	95 a	85 b	100 a	100 a	100 a	95 a	100 a	100 a	95 a	100 a
5.0	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	75 c

Y.: Yaprak, Y.S.: Yaprak sapı, $LSD_{0.01}:9.76$

Tablo 4. Farklı 2,4-D ve KIN dozlarında *A. schizopterus* yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus ağırlığı

Büyüme Düzenleyiciler mg/l	KIN									
	0.0		0.5		1.0		2.0		5.0	
2,4-D	Y	Y.S	Y	Y.S	Y	Y.S	Y	Y.S	Y	Y.S
0.0	- p	- p	- p	- p	- p	- p	- p	- p	- p	- p
0.5	0.39	0.40	0.63	0.36	1.32	1.37	0.33	0.44	0.49	0.66
1.0	0.94	0.46	1.92	1.47	1.59	1.15	0.62	0.48	0.84	0.51
2.0	0.62	0.27	0.58	0.75	0.98	1.37	0.67	0.59	1.79	1.59
5.0	1.00	0.49	0.50	0.43	1.13	0.40	0.73	0.40	1.41	1.21

$LSD_{0.01}:0.35$

Kallus ağırlığı bakımından ortam x eksplant etkileşimi arasında 0.01 düzeyindeki farklılık tespit edilmiştir. En yüksek kallus ağırlığı (1.92 g) 1.0 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN içeren ortamda kültüre alınan yaprak eksplantından elde edilmiştir. Yine yaprak eksplantında 1.0 mg/l 2,4-D ve 1.0 mg/l KIN ile 2.0 mg/l 2,4-D ve 5.0 mg/l KIN içeren ortamlardan elde edilen değerler (1.59 ve 1.79 g) istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. Yaprak sapı eksplantında da 2.0 mg/l 2,4-D ve 5.0 mg/l KIN içeren ortamdan elde edilen değer (1.59 g) aynı grupta yer almıştır. Kallus ağırlığı bakımından en düşük değerler 2,4-D içermeyen ortamlarda kallus oluşmadığı için 0.5-5.0 mg/l KIN içeren ve büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamlarından elde edilmiştir. 2.0 mg/l 2,4-D içeren ortamda kültüre alınan yaprak sapı eksplantlarından elde edilen sonuçta (0.27 g) istatistiksel olarak en düşük değeri gösteren grupta yer almıştır (Tablo 4).

A. adsurgens'in hipokotil eksplantları ile yapılan bir çalışmada 2.0 mg/l 2,4-D veya 2.0 mg/l 2,4-D ve 0.5,

1.0, 1.5, 2.0 mg/l BA içeren ortamlarda kültüre alınan eksplantların 4 farklı tipte kallus oluştuğunu rapor edilmiştir. Oluşan kallusların bir kısmı sarı gevşek dokulu, bir kısmı yeşil sıkı dokulu, bir kısmı yeşil-kahverengi sıkı dokulu ve kahverengi gevşek dokulu olduklarını bildirmişlerdir. Adventif sürgün rejenerasyonu bakımından en iyi sonucu sarı gevşek dokulu kallus tipinden aldıklarını diğer kallus tiplerinde çok düşük oranda sürgün rejenerasyonu gözlediklerini bildirmişlerdir (Luo ve Jia, 1998). Bu çalışmada da kallus morfolojisi bakımından benzer sonuçlar elde edilmiştir. Fakat farklı tiplerde kallusların oluştuğu gözlenmesine rağmen adventif sürgün rejenerasyonu veya somatik embriyo oluşumu tespit edilmemiştir.

A. schizopterus Hipokotil Eksplantında 2,4-D, KIN ve BAP Büyüme Düzenleyicilerinin Adventif Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

A. schizopterus'un 15 günlük steril fidelerinden izole edilen hipokotil eksplantları farklı konsantrasyonlarda (1.0, 2.0, 4.0 mg/l) 2,4-D ile 0.5 mg/l KIN veya BAP

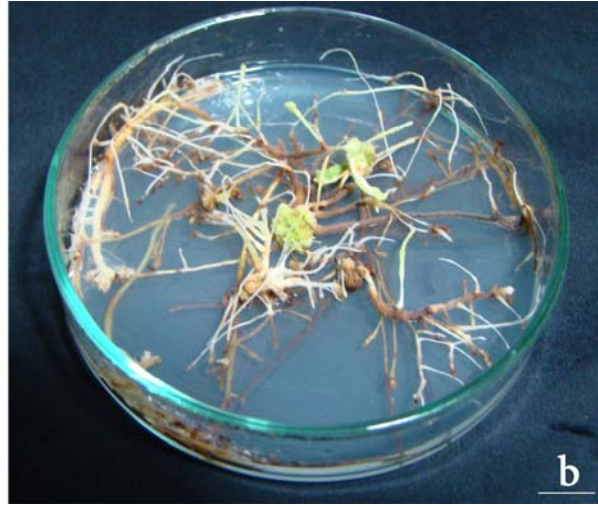
içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 6-7 gün sonra kallus oluşumu başlamış ve tüm ortamlarda eksplantların hepsi kallus oluşturmuştur. KIN içeren ortamlarda kalluslar gevşek dokulu ve sarı renkli, BAP içeren ortamlarda ise daha sıkı dokulu ve yeşil-sarı renkli olmuşlardır. 6 hafta sonra kallus ağırlıkları alınan kalluslar büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamında alt kültüre alınmışlardır. Bu ortamda kallus miktarında artış olduğu gözlenmiştir. Daha sonra 0.2 mg/l BAP içeren ortamlara aktarılan kallusların kararmaya başladıkları gözlenmiştir. Fakat herhangi bir rejenerasyon gözlenmemiştir.

Varyans analizi sonucunda hipokotil eksplantında kallus ağırlığı bakımında ortamlar ve ortam x büyüme düzenleyici çeşidi etkileşimi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Büyüme

düzenleyici çeşidi arasında ise 0.01 düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur (Tablo 5).

Tablo 5. Farklı 2,4-D, KIN ve BAP dozlarında *A. schizopterus*'un hipokotil eksplantında kallus ağırlığı (g)

Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)			Kallus Ağırlığı (g)	
2,4-D	KIN	BAP	Hipokotil	Ort.
1	0.5		0.13	
2	0.5		0.14	0.13 b
4	0.5		0.11	
1		0.5	0.27	
2		0.5	0.33	0.32 a
4		0.5	0.36	



Şekil 3. *A. schizopterus* bitkisinde IAA ve ZEA içeren ortamlarda kallus ve adventif kök oluşumu (a-b) Kültürden 6 hafta sonra 2.0 mg/l IAA ve 0.5 mg/l zeatin içeren ortamda yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında gelişen kallus ve adventif kökler (bar=1 cm)

A. schizopterus hipokotil eksplantında kallus ağırlığı bakımından KIN ve BAP büyüme düzenleyicilerinin etkisi incelendiğinde BAP içeren ortamlarda kallus ağırlığının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. BAP içeren ortamlarda kallus ağırlığı ortalaması 0.32 g iken KIN içeren ortamlarda 0.13 g olmuştur. Kallus ağırlığı bakımından en yüksek sonuç (0.36 g) 4.0 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. En düşük kallus ağırlığı ise 0.11 g ile 4.0 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN içeren ortamdan elde edilmiştir (Tablo 5).

Takamizo ve ark. (1991), 26 çeşit kullanarak yaptıkları somatik embriyo oluşumu denemelerinde yaptıkları çalışmada 2.0 mg/l 2,4 D içeren UM ortamında 4 sitokinin (BA, 2IP, KIN, ZEA) etkisine baktıklarında BA'nın hem kallus oluşumu hem de somatik embriyo oluşumunda çok daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar bu çalışmadan da elde edilmiştir. *A. schizopterus*'un

rejenerasyon yeteneğinin düşük olduğu söylenebilir. Bu denemede de kallus ağırlığı bakımından BAP içeren ortamlar daha iyi sonuç vermiştir. Kallus morfolojisi bakımından ise KIN içeren ortamlar BAP içeren ortamlara göre daha fazla embriyogenik kallus yapısı göstermektedir. Alt kültürlerde kalluslar üzerinde embriyo veya sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

IAA ve ZEA Büyüme Düzenleyicilerin Adventif Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

A. schizopterus'da IAA ve ZEA büyüme düzenleyicilerinin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi araştırmak için yaprak ve yaprak sapı eksplantları 2.0, 4.0 mg/l IAA ve 0.5 mg/l ZEA ile 2.0, 4.0 mg/l ZEA ve 0.5 mg/l IAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 2 hafta sonra bazı eksplantlarda kallus oluşumu başlamıştır. Kallusların sadece eksplantların kesilen

yüzeylerinde az miktarda geliştiği ve 2.0 mg/l IAA ve 0.5 mg/l ZEA içeren ortamda bazı kalluslarda adventif köklerin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 3). Kallusların çoğunun kısa sürede karardıkları görülmüştür. 6 hafta sonunda kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve gelişen kallusların kallus ağırlıkları belirlenerek kalluslar atılmıştır

Yapılan varyans analizine göre kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ortamlar arasında 0.01 düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuş, eksplantlar ve ortam x eksplant etkileşimi arasında ise anlamlı farklılık çıkmamıştır. Kallus ağırlığı bakımından ise varyasyon kaynakları arasında istatistiksel farklılığın olmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 6. Farklı IAA ve ZEA dozlarında *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve kallus ağırlığı

Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)		Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi(%)			Kallus Ağırlığı (g)		
IAA	ZEA	Yaprak	Y.sapı	Ort.	Yaprak	Y.sapı	Ort.
0.5	2	40.00	26.66	33.33 b	0.02	0.02	0.02
0.5	4	33.33	26.66	29.99 b	0.04	0.03	0.03
2	0.5	100.00	100.00	100.00 a	0.38	0.45	0.41
4	0.5	100.00	100.00	100.00 a	0.75	0.79	0.77
LSD0.01: 0.3955							

Tablo 6'da yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi ait değerlere bakıldığında kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en iyi ortamların (%100) 2.0, 4.0 mg/l IAA ve 0.5 mg/l ZEA içeren ortamlar olduğu görülmektedir. 0.5 mg/l IAA ve 4.0 mg/l ZEA içeren ortamda ise %29.99 ile kallus oluşturan eksplant yüzdesi en düşük seviyede olmuştur. Yaprak ve yaprak sapı eksplantlarının her ikisi de 2.0, 4.0 mg/l IAA ve 0.5 mg/l ZEA içeren ortamlarda %100 oranında kallus oluştururken, en düşük kallus oluşumu yaprak sapı eksplantından 2.0, 4.0 mg/l ZEA ve 0.5 mg/l IAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Kallus ağırlığı bakımından ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmasa da benzer sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek kallus ağırlığı (0.79 g) 4 mg/l IAA ve 0.5 mg/l ZEA içeren ortamda kültüre alınan yaprak sapı eksplantından elde edilirken en düşük değer (0.02 g) her iki eksplantta da 0.5 mg/l IAA ve 2 mg/l ZEA içeren ortamdan elde edilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında *Astragalus* türlerinde IAA ve ZEA'nın organogenesis veya embriyogenesisine etkisine ait çalışmaya rastlanılmamıştır. *A. schizopterus*'da yeşil-kahverenginde ve sıkı dokulu kalluslar elde edilmiş, ayrıca 2.0 mg/l IAA ve 0.5 mg/l ZEA içeren ortamda adventif kök oluşumu gözlenmiştir.

Sonuç ve Öneriler

A. schizopterus türünde yapılan denemelerde organogenesis veya embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir. Türlerin rejenerasyon yeteneğini etkileyen faktörlerden biri de bitkinin genotiptir. Soya (Parrott ve ark. 1989), mısır (Green ve Phillips, 1975; Beckert ve Qing, 1984), arpa (Hanzel ve ark., 1984), buğday (Sears ve Deckard, 1982) ve pamuk (Trolinder ve Xhixian, 1989) gibi bir çok kültür bitkisinde bireysel genotiplerin rejenerasyonu etkilediği belirlenmiştir. *A. schizopterus*'un genetik

olarak rejenerasyon yeteneği düşük olabileceğinden yapılan denemelerde sürgün rejenerasyonu elde edilememiş olabilir. Meristem bölgesi içermeyen kısımların eksplant olarak kullanıldığı denemelerde adventif sürgün rejenerasyonu elde edilemediğinden *A. schizopterus*'da sürgün rejenerasyonu elde etmek için koltukaltı meristem bölgeleriyle hızlı çoğaltım yapılabilir. Sıvı kültürler veya süspansiyon kültürleri ile farklı besin ortamları kullanarak yapılacak denemelerde sürgün rejenerasyonu elde edilebilir. Yapılacak denemelerde kallus oluşumu için oksin içeren ortamların ve eksplant olarak yaprak eksplantının kullanılması önerilebilir.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen "Bazı Endemik *Astragalus* L. (*Leguminosae*) Türlerinin Korunması ve Tarımda Kullanımı Amacıyla Doku Kültürü ve Sitogenetik Çalışmalar" isimli proje kapsamında yürütülmüş olan Refik Erkoyuncu'nun Yüksek Lisans Tezinden üretilmiştir. Proje yürütücüsü ve üyelerine yardım ve katkılarından dolayı teşekkür ederiz (Proje Numarası: TOVAG-106O136).

Kaynaklar

- Atanassov, A.I., Brown, D.C.W., 1984. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L., *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 3: 149-162.
- Beckert, M., Qing, C.M., 1984. Results of a diallel trial and a breeding experiment for *in vitro* aptitude in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 68, 247-251.
- Çöcü, S., Erişen, S. Duran, A., Hamzaoğlu, 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, Eskişehir.

- Green, C.E., Phillips, R.L., 1975. Plant regeneration from tissue cultures of maize, *Crop Science*, 15, 417-421.
- Hanzel, J.J., Miller, J.P., Brinkman, M.A., Endos, E., 1984. Genotype and media effects of callus formation and regeneration in barley, *Crop Science*, 25, 27-31.
- Hou, S.W., Jia, J.F. 2004a. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79: 95-100.
- Hou, S.W., Jia, J.F. 2004b. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic calli of the forage legume *Astragalus melilotoides* Pall. *Plant Cell. Rep.*, online.
- Luo, J.P., Jia, J.F. 1998. Callus induction and plant regeneration from hypocotyl explants of the forage legume *Astragalus adsurgens*. *Plant Cell. Rep.* 17: 567 – 570.
- Luo, J.P., Jia, J.F., Gu, Y.H., Liu, J. 1999. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* Pall. *Plant Science*, 143:1, 93-99.
- Mirici, S. 2004. Endemik geven (*Astragalus polemoniicus* Bunge) bitkisinin yaprak sapı ve yaprak eksplantlarından yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonu. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18 (34), 31-34.
- Murashige, T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Parrott, W.A., Williams, E.G., Hildebrand, D.F., Collins G.B. and Williams, E.G., 1989. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean plantcell. *Tissue and Organ Culture*, 16, 15-21.
- Romagnoli, M.V., Ortiz, J.P.A., Cervigni, G.D. 1996. High Frequency somatic embryogenesis with a pampeana-derived genotype of alfalfa. *Euphytica*, 90: 1, 89-93.
- Sears, R.G., Deckard, E.L., 1982. Tissue culture variability in wheat, callus induction and plant regeneration. *Crop Science*, 22, 546-550.
- Suginobu, Ki., Takamizo, T., Hayashi, H., Abe, S., 1991. Effects of genotype medium and nature of the eksplant on the formation of callus and somatic embryos in alfalfa. *Journal of Japanese Society of Grassland Science*, 36: 4, 390-403.
- Takamizo, T., Suginobu, K., Ohsugi, R., 1991. Somatic embryogenesis in a recalcitrant cultivar of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in an improved medium. *Bulletin of the National Grassland Research Institute*, 44, 15-22.
- Trolinder, N.L., Xhixian, C., 1989. Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton, *Plant Cell Reports*, 8, 133-136.
- Uranbey, S., Mirici, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Khawar, K.M., Mirici, S., Özcan, S. 2003. Adventitious shoot regeneration in cicer milkvetch. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17: 33-37.