

Araştırma Makalesi/Research Article (Original Paper)

Yabani Aspir'in (*Carthamus persicus* Wild) *in vitro* Çoğaltımında Farklı BAP-NAA Kombinasyonlarının Etkisi

Fethi Ahmet ÖZDEMİR^{1*} Musa TÜRKER²

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

²: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Van

*e-posta: ozdemirfethiahmet23@yahoo.com

Özet: Aspir, linoleik asit ve oleik asitce zengin; yenilebilir doymamış yağ asitlerinin elde edilmesinde kullanılması nedeniyle önemli bir endüstriyel bitkidir. Bu çalışmada aspirin *in vitro*'da çoğaltımı amacıyla sürgün ucu eksplantları 0.25- 0.50- 1- 2 mg/L BAP ve 0.25- 0.50-1 mg/L NAA'nın farklı kombinasyonlarını içeren, %3 sakkaroz ilave edilmiş ve % 0.8 agar ile katılaştırılmış MS ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma sonuçları kallus oluşumu, rejenerasyon sürgün yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, eksplant başına kök sayısı ve kök uzunluğu için BAP-NAA arasındaki kombinasyonların etkili olduğunu göstermiştir. Maksimum sürgün rejenerasyonu 0.50 mg/L BAP + 0.25 mg/L NAA içeren MS besin ortamında, maksimum kallus oluşumu ise 1 mg/L BAP + 1 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP + 1mg/L NAA içeren MS besin ortamında kaydedilmiştir. Rejenerasyon sürgünler 1 mg/L IBA içeren MS besin ortamında köklendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: BAP, NAA, Aspir, Mikroüretim

Effect of Different Combinations of BAP and NAA *in vitro* Propagation of Wild Safflower (*Carthamus persicus* Wild)

Abstract: Safflower (*Carthamus persicus* Wild), is rich in terms of linoleic acid and oleic acid and is used to obtain low saturated fatty acid. In order to propagate safflower *in vitro*, shoot tip explants were cultured in MS medium containing different combinations of BAP and NAA supplemented with 3% sucrose and solidified with 0.8% agar. The results showed a significant interaction between BAP and NAA combinations for callus formation, 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 + 0.25 mg/L NAA. Maximum callus formation was determined in MS medium supplemented with 1 mg/L BAP + 1 mg/L NAA and 2 mg/L BAP + 1mg/L NAA. The regenerated shoots were rooted on MS medium containing 1 mg/L IBA.

Key words: BAP, NAA, Safflower, Micropropagation

Giriş

Aspir (*Carthamus persicus* Wild) Compositae familyasına ait tek yıllık bir bitkidir (Mensink ve ark. 1994). Ana vatanı olan Arap yarımadasından İran, Pakistan, Hindistan ve diğer ülkelere dağılmıştır. Dünyada 60'ın üzerinde ülkede aspir tarımı yapılmaktadır (FAO 2013) ve bu ülkeler içerisinde ilk sırayı Hindistan almaktadır. Ülkemizde yalancı safran, Amerikan safranı ve boyacı safranı gibi isimlerle de bilinen aspir geniş yapraklı, sarı, kırmızı, turuncu, beyaz ve krem renklerinde çiçeklere sahip, dikenli ve dikensiz tipleri olan, kuraklığa dayanıklı ve ortalama yağ oranı % 30-45 arasında değişebilen bir yağ bitkisidir. Bazı Ortadoğu ve Asya ülkelerinde çiçekleri pilav, çorba, sos, ekmek ve turşulara katılarak bu gıdaların sarı ve parlak turuncu renk almasını sağlanmaktadır (Özdemir ve ark. 2011). Yağı alındıktan sonra geriye kalan küspe, içerdiği % 25'e varan ham protein oranı ile hayvancılıkta iyi bir yem kaynağıdır (Okamoto ve ark. 2005). Aspir tohumlarından elde edilen yağ, kaliteli yemeklik yağ olarak kullanılmaktadır. Aspir yağı özellikle oleik asit (omega-9) bakımından zengin olması ve insanlar açısından esansiyel yağ asidi olan linoleik asit (C 18:2) oranı %75'e kadar ulaşması nedeniyle önemli bir besin kaynağıdır. Aspir yağı, içerdiği bu yüksek orandaki linoleik asit (Omega-6) nedeniyle çabuk kuruyan yağlardan olduğu için, boya sanayinde kullanılmaktadır (Sales 2005; Vogel ve Browse 1996;

Konar ve ark. 2010). Ayrıca yabancı aspir bitkisinin çiçek, yaprak ve gövdesi; okside ve redükte glutatyon, A, C, E vitaminleri ile β -karoten açısından da zengindir (Özdemir ve ark. 2011).

Son 30 yıl içindeki çalışmalar incelendiğinde, aspirin mikro üretimi ve sürgün rejenerasyonunda bitkinin genotipinin, kullanılan hormon konsantrasyonlarının çok önemli olduğu görülmektedir. Başalma ve ark. (2007), Walia ve ark. (2007), Sujatha ve Dinesh (2007), Radhika ve ark. (2006), Talat ve Anwar (2010), Nikam ve Shitole (1998), farklı eksplantları kullanarak sürgün rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmaların tamamında sürgün rejenerasyonu, kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ve inkübasyon periyodu tarafından etkilenmiştir. Aspir tarımının ülkemizde gelişememe nedeni mevcut çeşitlerin kuru tarım alanlarında düşük tohum verimi ve düşük yağ oranı vermeleridir. Yürütülen aspir (*C. tinctorius* L.) ıslahı çalışmalarının ana amacı da bu olumsuzluğu ortadan kaldırmak için soğuğa ve kuraklığa toleranslı çeşitlerin geliştirilmesi yönündedir. Soğuğa ve kurağa toleranslı ıslahının temeli de bu özelliklere sahip kimi yabancı *Carthamus* türlerinden bu özellikleri doku kültürü tekniklerini kullanarak ya da melezleme ıslahı yoluyla, kültür türü olan *Carthamus tinctorius*'a aktarılmasıdır. Bu çalışmanın amacı; daha önce *in vitro* rejenerasyonu üzerine çalışmalar yürütülmemiş olan yabancı aspir türü olan *Carthamus persicus* Wild' de *in vitro* rejenerasyonu gerçekleştirerek kültür türlerinde yapılacak olacak melezleme ve ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere uygun rejenerasyon protokolünü geliştirmektir.

Materyal ve Metot

Bitki Materyali

Bu çalışmada doğal yetiştirme ortamından toplanmış olan aspir (*Carthamus persicus* Wild) bitkisi bitkisel materyal olarak kullanılmıştır. Bitkilerinin tür teşhisi Fırat Üniversitesi Fen 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. Aspir tohumlarının sterilizasyonu ise % 100 lük NaOCl (çamaşır suyu) içerisinde 20 dakika bekletilerek sağlanmıştır. Daha sonra aspir tohumları steril saf su ile 3 kez durulanmıştır. Sterilizasyonu tamamlanan aspir tohumları 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 (Murashige ve Skoog 1962) ortamı kullanılmıştır. Sürgün ucu eksplantlarının rejenerasyonu için MS besin ortamında farklı oranlarda naftalen asetik asit (NAA) ve 6-benzil amino pürin (BAP) kombinasyonları denenmiştir. Köklendirme ortamı olarak da 1 mg/L indol-3-bütirik asit (IBA) içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Bu ortamlar içerisine % 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, NAA ve IBA 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 15 günlük aspir fidelerinden alınan sürgün uçları, 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 odasında, 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 1 mg/L IBA içeren köklendirme ortamına aktarılmıştır. Köklenen sürgünler saksılara aktarıldıktan sonra iklim odasında çevre şartlarına uyumu sağlanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada yabani aspir (*Carthamus persicus* Wild) bitkisinin tohumları *in vitro* ortamda çimlendirilmiş, 15 günlük fidelerinden alınan sürgün ucu, eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Sürgün ucu eksplantları değişik konsantrasyonlarda BAP ve NAA 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 + 0.25 mg/L NAA içeren MS besin ortamı olduğu; bu ortamda % 100 oranında sürgün rejenerasyonunun gözlemlendiği tespit edilmiştir. Kallus oluşumunun en fazla 1 mg/L BAP + 1 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamında olduğu tespit edilmiştir. Eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, eksplant başına düşen ortalama kök sayısı ve ortalama kök uzunluğu açısından en verimli ortamın 0.50 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA içeren MS besin ortamının olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).

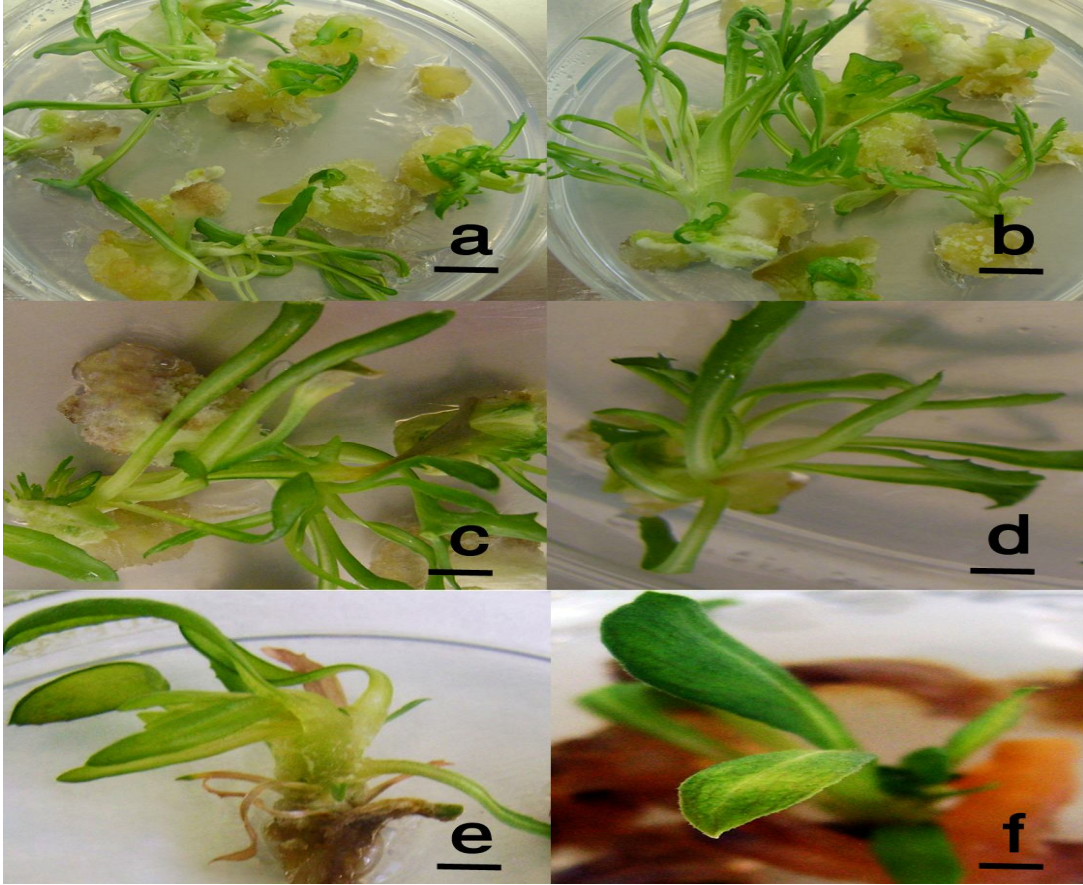
Çizelge 1. Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının sürgün ucu eksplantı üzerindeki etkileri

BAP (mg/L)	Hormonlar NAA (mg/L)	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)
0.25	0.25	10.00	30.00	3.22±1.60	5.15±0.79	0.33±0.73	0.20±0.50
0.50	0.25	0.00	100.00	6.96±3.46	5.73±1.46	1.66±0.33	0.97±0.37
1	0.25	40.00	60.00	2.70±1.73	2.97±0.78	0.66±0.21	0.50±0.29
2	0.25	60.00	40.00	2.51±1.24	2.30±1.83	0.33±0.06	0.83±0.34
0.25	0.50	50.00	50.00	2.60±1.02	4.10±2.34	1.00±1.03	0.23±0.09
0.50	0.50	70.00	30.00	2.29±1.15	4.12±3.09	0.00±0.00	0.00±0.00
1	0.50	80.00	20.00	1.85±0.10	3.73±1.27	0.33±0.35	0.41±0.96
2	0.50	90.00	10.00	1.73±0.57	2.51±0.78	0.33±0.20	0.56±0.74
0.25	1	90.00	10.00	1.54±1.38	1.34±0.09	0.33±0.17	0.72±0.18
0.50	1	70.00	30.00	1.81±1.52	0.97±1.45	0.66±0.24	0.31±0.46

± = 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 1mg/L IBA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Çalışma sonrasında köklenen bitkiler (Şekil 2), hormon içermeyen MS ortamına aktararak bitkilerin belirli bir büyüklüğe gelmeleri sağlanmıştır. Daha sonra bitkiler 3:1 oranında toprak: kum içeren saksılara aktararak dış ortama adaptasyonları gerçekleştirilmiştir.

Günümüzde insanların beslenmesi yönünden önem taşıyan bitkilerin, verimini, hastalık ve zararlılara karşı dirençlerini arttırmak amacı ile kullanılan klasik ıslah metotlarının 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.



Şekil 1: Sürgün ucu explantından adventif sürgün rejenerasyonu (a, b, c, d, e, f). 0.50 mg/L BAP + 0.25 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki maksimum sürgün rejenerasyonu (b, c, d).



Şekil 2: 1 mg /L IBA içeren MS besin ortamına aktarılan adventif sürgünlerden kök gelişimi.

Bu çalışmada daha önce aspirde yapılmış doku kültürü ve mikroüretim çalışmaları ışığı altında, BAP-NAA kombinasyonları ile güçlü bir rejenerasyon protokolü geliştirmek amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan BAP-NAA konsantrasyonlarının, çalışılan genotipde, kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu

için oldukça önemli olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde Başalma ve ark. (2007) Sujatha ve Dinesh (2007), aspirde kotiledon ve yaprağı, eksplant kaynağı olarak kullanıp, TDZ-NAA kombinasyonlarının adventif sürgün rejenerasyonu için kullanılabilir bir protokol olabileceğini önermişlerdir. Walia ve ark. (2007) aspirin HUS-305 çeşidinde yaptıkları çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda TDZ, 2,4-D ve NAA kullanarak zigotik embriyodan somatik embriyo üretimi çalışmaları yürütmüşlerdir. TDZ kullanarak somatik embriyo geliştirmişlerdir. Ancak bu çalışmalardaki kallus oluşumu ve sürgün sayısı; yapılan bu çalışma ile kıyaslandığında oldukça yetersiz kalmaktadır. Bu durum kullanılan genotip, farklı hormonların kullanımı ve hormon dozlarının farklı olması ile açıklanabilir. Bu çalışmada kullandığımız sentetik bir sitokinin olan BAP' in sürgün gelişimini teşvik etmesi de beklenen bir sonuçtur (Lincoln ve Eduardo 2008).

Sujatha ve Dinesh (2007) 10 yabancı aspir, 1 tanede kültür aspir türünün yaprak eksplantını kullanarak yaptıkları çalışmada, farklı konsantrasyonlarda TDZ-NAA kullanarak sürgün rejenerasyonu sağlamışlardır. *C. tinctorius* ve *C. arborescens*'in yaprak eksplantlarında kallus oluşmaksızın; TDZ-NAA hormon kombinasyonlarında adventif sürgün rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Radhika ve ark. (2006) aspir bitkisinde 0.5 mg/L NAA içeren MS besin ortamında sürgün üretememişlerdir. Her ne kadar bitkisel hormonlar farklılaşmış bölünme yeteneğini kaybetmiş hücrelere yeniden bölünme özelliği kazandırsa da, meristematik hücreler içermesi bakımından gövde ucu, sürgün ve kök gelişiminde en verimli eksplant olarak rapor edilmiştir (Özgen ve ark. 1998). Sürgün ucunun, eksplant kaynağı olarak kullanılması bu çalışmadan olumlu sonuçlar alınmasına neden olmuş olabilir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları ve kombinasyonları, fiziksel şartlar ve bitki genotipinin yanında eksplantların hasat edilip ana bitkiden ilişkisinin kesilmesi ve kültür ortamına alınması esnasında içerdikleri endojen hormon miktarının metabolizmadaki görevleri göz önünde bulundurulduğunda, özellikle sitokininlerin, kısmen oksinlerin ve bu iki büyüme düzenleyicisinin etkileşimlerinin adventif sürgün oluşumu üzerine en etkili maddeler oldukları görülmektedir (Mariashibu ve ark. 2013).

Araştırmada köklenme olmaksızın gelişen sürgünler köklendirilmek amacıyla 1 mg/L IBA içeren MS besin ortamına aktarılmış ve çok yüksek bir oranda (Çizelge 1) köklenme gerçekleştirilmiştir. Talat ve Anwar (2010) IBA içeren MS besin ortamında adventif sürgünleri köklendirmişlerdir. Bu bulgu sunulan bu çalışmadaki adventif sürgünlerin köklendirilmesi sonucunu desteklemektedir. Oksinlerin köklenmeyi teşvik ettiği de bilinen bir gerçektir (Kadioğlu 2004).

In vitro şartlarda geliştirilen bitkilerin toprağa şaşırtılması büyük bir problemdir. Bu işlem ilk günlerde dış koşullara adaptasyonun doğru şekilde yapılması gibi çeşitli nedenlerle bitkiler için öldürücü olabilmektedir. Çalışmamızda köklendirilen bütün bitkiler belirli bir büyüklüğe ulaştıktan sonra saksılara şaşırtılmış, % 85 gibi çok yüksek bir oranla bitkiler canlı kalmıştır. Talat ve Anwar (2010), Sujatha ve Dinesh (2007) ile Radhika ve ark. (2006) adventif sürgünleri köklendirip, köklenen bitkilerin toprağa uyumlarını gerçekleştirmişlerdir.

Çalışmadan elde edilen verilere dayanarak, adventif sürgün rejenerasyonu için en uygun ortamın 0.50 mg/L BAP + 0.25 mg/L NAA içeren MS besin ortamı olduğu, kallus oluşumu için en uygun ortamın 1mg/L BAP + 1 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. İleride yapılacak çalışmalarda yabancı asperde (*Carthamus persicus* Wild) sürgün rejenerasyonu üzerine daha etkili olabilecek farklı BAP ve NAA hormon kombinasyonları denenebilir. Farklı sitokinin ve oksin hormon tipleri ve kombinasyonları kullanılarak yeni denemeler planlanabilir. Bu çalışma soğuğa ve kuraklığa toleranslı kültür türlerinin geliştirilmesi için ıslah çalışmalarına ışık tutabilir. Çalışmada kullandığımız hormon kombinasyonları kullanılarak yabancı ve kültür türlerinin protoplast füzyonları gerçekleştirilebilir. Çalışmadan elde edilen yeni bulgular ışığında daha yeni uygulamalar yapılarak yabancı asperde (*Carthamus persicus* Wild) sürgün rejenerasyonu ve kök oluşumu esnasındaki fizyolojik ve moleküler olaylar aydınlatılabilir.

Kaynaklar

Başalma D, Uranbey S, Mirici S, Kolsarici O (2007). TDZ x IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and in vitro multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). African Journal of Biotechnology, 7: 960-966.

- FAO (2013). <http://faostat.fao.org>.
- Kadıoğlu A (2004). Bitki Fizyolojisi. Eser ofset matbacılık, 258-317, Trabzon.
- Konar V, Aşkın Y, Türkoğlu İ (2010). Yabani Aspir (*Carthamus persicus* Wild) Bitkisinin Yağ Asidi Bileşiminin İncelenmesi. Fırat Üniv. Fen Bilimleri Dergisi, 22: 29-36.
- Lincoln T, Eduardo Z (2008). Bitki fizyolojisi 3. Baskıdan tercüme. Palme yayıncılık, 493-515, Ankara.
- Mariashibu TS, Anbazhagan VR, Jiang SY, Ganapathi A, Ramachandan S (2013). In vitro regeneration and genetic transformation of soybean, edited by James E. Board, published: January 2.
- Mensink RP, Temme EHM, Hornstra G (1994). Dietary saturated and trans fatty acids and lipoprotein metabolism. Annals of Medicine, 26: 461-464.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Nikam TD, Shitole MG (1998). In vitro culture of safflower L. cv. Bhima: Initiation, growth optimization and organogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 55: 5-22.
- Okamoto K, Machida M, Yamauchi A, Arimoto-Kabayashi S (2005). Evolution of photo-mutagenicity and photo-cytotoxicity of food coloring agent. Mutagenesis, 20: 229-233.
- Özdemir FA, Aymelek F, Karataş F (2011). Aspir (*Carthamus persicus* Wild) bitkisinde redükte, okside glutatyon ile A, C, E vitamini ve β -karoten miktarlarının araştırılması. Fırat Üniv. Fen Bilimleri Dergisi, 23: 71-76.
- Özgen M, Özcan S, Sevimay CS, Sancak C, Yıldız M (1998). High frequency adventitious shoot regeneration in sainfoin. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 42: 205-208.
- Radhika K., Sujatha M, Nageshwar RT (2006). Thidiazuron stimulates adventitious shoot regeneration in different safflower explants. Biologia Plantarum, 50: 174-179.
- Sales RL (2005). The effects of peanut safflower and olive oil on body composition, energy metabolism, lipid profile and food intake of eutrophic, normolipidemic subjects. Revista Nutrican, 18: 499-511.
- Sujatha M, Dinesh KV (2007). In vitro bud regeneration of *Carthamus tinctorius* and wild *Carthamus* species from leaf explants and axillary buds. Biologia Plantarum, 51: 782-786.
- Talat K, Anwar SY (2010). High frequency somatic embryogenesis and plantlet regeneration via somatic embryos in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Biosciences Biotechnology Research Asia, 7: 239-249.
- Vogel G, Browse J (1996). Cholinephosphotransferase and diacylglycerolacyltransferase (substrate specificities at a key branch point in seed lipid metabolism). Plant Physiology, 110: 923-931.
- Walia N, Kaur A, Babbar SB (2007). Proliferation and differentiation from endosperms of *Carthamus tinctorius*. Biologia Plantarum, 51: 749-753.