SARI ÇİÇEKLİ GAZAL BOYNUZU (*Lotus Corniculatus* L.) BİTKİSİNİN *IN VITRO* KOŞULLARDA HIZLI ÇOĞALTIMI

Murat AYDIN[1], Kamil HALİLOĞLU[1], Pınar UYSAL[2], Metin TOSUN[1], Esin ŞAHİN[1]

[*]Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 25240 ERZURUM

[2]Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü, 25090 ERZURUM

ÖZET

Sarıçiçekli gazal boynuzu (*Lotus Corniculatus* L.) kötü çevresel şartlara toleransının yüksek olması ve parazit bitki olan *Cuscuta ssp*. saldırılarına yüksek direncinden dolayı yoncaya tercih edilmektedir. Bu araştırmada gazal boynuzu bitkisinin *in vitro* koşullarda hızlı çoğaltımı amacıyla kotiledon yaprakları 3 farklı sitokinin tipinin (TDZ, BAP ve Kinetin) 3 farklı dozunu (0.5, 1.0 ve 1.5 mg/l) içeren Murashige ve Skoog (1962) ortamında kültüre alınmıştır. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (11.9 adet) ve rejenere olan eksplant başına sürgün sayısı (12.4 adet) 1.5 mg/l kinetin içeren MS ortamında meydana gelmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sarıçiçekli gazal boynuzu, kotiledon yaprak, sitokinin, hızlı çoğaltım

MİCPROPAGATİON OF BİRDS FOOT TREFOİL (*Lotus Corniculatus* L.) UNDER *IN VİTRO* CONDİTİONS

ABSTRACT

Birds foot trefoil (*Lotus Corniculatus* L.) is preferred to alfalfa for its higher tolerance to unsutitable environmental conditions and resistance to cuscuta attacks. In this study, cotyledons of birds foot trefoil were used to determine the effect of 3 different sitokinin types (TDZ, BAP and Kinetin) and their respective dosages (0.5, 1.0 and 1.5 mg/l) of 3 types in MS medium. According to the results, the highest number of shoot formation per explants and number of regenerates per shoot were found to be 11.9 and 12.4 respectively in MS with 1.5 mg/l kinetin.

Key words: Birds foot trefoil, cotyledon, sitocinin, micropropagation

GİRİŞ

Lotus corniculatus L. ekim alanları giderek artan, yüksek besleme değerine sahip, hayvanlarda şişme yapmayan çok yıllık baklagil yem bitkisidir. Ekstrem sıcaklığa, soğuğa, nemli koşullara, fakir ve asidik topraklara, eğimli alanlara yüksek tolerans gösterir. Kötü çevresel koşullara toleransının yüksek olması ve parazitik *Cuscuta* bitkilerinin saldırılarına yüksek direncinden dolayı pek çok alanda yoncaya tercih edilmektedir (Ahuja ve ark. 1983; Nicolic ve ark., 1997, 2006, 2007; Raikar et al. 2008;)

Gen aktarımı ve *in vitro* mutasyon çalışmalarında istenilen özelliğe sahip bireylerin elde edilebilmesi için öncelikle doku kültürü yöntemleriyle etkili bir bitki rejenerasyonunun temin edilmesi gerekmektedir.

Etkili bir bitki rejenerasyon sisteminin kurulması transformasyon ve *in vitro* çoğaltım için oldukça önemlidir. Pek çok araştırmacı, gazal boynuzunun doku kültürü tekniklerine uyumlu olduğunu bildirmiştir (Nicolic ve ark., 2006). Gazal boynuzu, baklagillerdeki transformasyon çalışmaları için model bitki olarak kullanılmaktadır (Akashi ve ark., 1998).

In vitro teknikler birçok bitki türünde hızlı çoğaltıma imkan sağlamaktadır. Hızlı çoğaltım tekniği ile istenen sağlıklı genotipler kısa sürede fazla miktarda üretilebilmektedir (Erdoğan ve ark., 2005). Birçok dikotiledonlu bitkiler yaprak materyalinden rejenere edilebilmektedir. Yaprak eksplantlarının filizlerden hızlı bir şekilde ve çok sayıda elde edilebilmesi ve çoklu seleksiyona imkan tanıması gibi avantaları nedeniyle transgenik çalışmalar için kaynak materyal olarak tercih edilmektedir (Ahmadabadi ve ark., 2007) .

Sitokininler, gazal boynuzunda bitki rejenerasyonu için gerekli olan ve dışarıdan uygulanması gereken bitki büyüme düzenleyicileridir. Vejatatif klonların tesisi için gerekli olan peryodun kısaltılma-

* * Bu araştırma TÜBİTAK-TOVAG tarafından desteklenmiştir.

sında ve *in vitro* rejenerantların eldesinde kullanılmaktadırlar (Nicolic ve ark., 2006). Sitokininler hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olup, antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirirler (Babaoğlu ve ark., 2001).

Bu araştırmada gazal boynuzu bitkisinin *in vitro* koşullarda hızlı çoğaltımı amacıyla kotiledon yaprakları 3 farklı sitokinin tipinin [1- Fenil-3-(1, 2, 3-thiadizaol-5yl) üre (Thidiazuran, TDZ), Kinetin ve 6-Benzil amino pürin (BAP)] 3 farklı dozunu (0.5, 1.0 ve 1.5 mg/l) içeren Murashige ve Skoog (1962) ortamında kültüre alınmış ve bitki rejenarasyonu üzerine etkileri belirlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırmada sarıçiçekli gazal boynuzu (*Lotus Corniculatus* L.) bitkisinin kotiledon yaprakları eksplant olarak kullanılmıştır. Yaprak eksplantlarının elde edilmesi için tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lik etil alkolde 5 dakika karıştırılarak 3 defa steril saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra birkaç damla Tween 20 (Sigma) içeren %1'lik sodyum hipokloritte 20 dakika karıştırılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar steril saf su ile yıkandıktan sonra her petride 20 adet tohum olacak şekilde MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak 20 g/l sakaroz, 1.95 g/l MES ve ^{0}2 g/l phytagel içeren besi ortamında 25±1°C'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperyotta çimlendirilmiştir.

Çimlenen tohumların kotiledon yaprakları 3 farklı sitokinin tipinin (TDZ, BAP ve Kinetin), 3 farklı dozunu (0.5; 1.0 ve 1.5mg/l) içeren MS ortamında 25±1^{0}C'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperyotta 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak 20 g sakkaroz, 2 g/l phytagel ve 1.95 g/l MES kullanılmıştır. Ortamın pH'sı NaOH ile 5.8'e ayarlanmıştır. Besi ortamları, sterilizasyon için otoklavda 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'de tutulmuştur. Sıcakta bozulan vitaminler ve sitokininler için 0.22 µm poroziteli selüloz nitrat filtreler (milipor) kullanılmıştır. Dört hafta sonunda Morfogenesis oranı (MO) (%), bitki rejenerasyon Oranı (RO) (%), Eksplant sayısına göre sürgün sayısı (ESS) ve sürgün oluşturan eksplant sayısına göre sürgün sayısı (SESS) (adet) aşağıdaki formüllere göre belirlenmiştir.

MO (%) = (Morfolojik olarak farklılaşan eksplant sayısı/Eksplant sayısı)x100

RO (%)= (Sürgün oluşturan eksplant sayısı/ Eksplant sayısı)x100

ESS (adet)= Meydana gelen sürgün sayısı/Eksplant sayısı

SESS (adet)= Meydana gelen sürgün sayısı/sürgün oluşturan eksplant sayısı

Çalışma tam şansa bağlı deneme planına göre 4 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Her petri bir tekerrür olarak kabul edilmiş ve her petri kabına 5 adet kotiledon yaprağı bırakılmıştır. Morfogenesis oranı (%), bitki rejenerasyon oranı (%), eksplant başına ve rejenere olan eksplant başına sürgün sayısına (adet) ait hesaplanan veriler 3x3 (3 sitokinin tipi x 3 sitokinin dozu) faktöriyel düzende varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Tüm konulara ait ortalamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Morfogenesis üzerine sitokinin tipinin etkisi önemli ($p<0.05$) olmuştur (Çizelge 1). En yüksek morfogenesis oranı kinetinde (%80.0) belirlenmiş, bunu azalan sıra ile BAP (%60.0) ve TDZ (%58.3) izlemiştir (Çizelge 3.2). Ancak, BAP ve TDZ arasındaki farklılık önemli olmamış ve aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 2).

Morfogenesis üzerine dozun etkisi önemli olmazken, sitokinin tiplerinin etkisi dozlara göre değiştiği için sitokinin tipi x doz interaksiyonu önemli ($p<0.05$) olmuştur (Çizelge 1). En yüksek morfogenesis oranı kinetinin 1.5 mg/l dozunda (%100) görülmüştür (Çizelge 2) (Şekil 1a).

Rejenerasyon oranı üzerine sitokinin tipinin etkisi çok önemli ($p<0.01$) olurken, dozun etkisi önemsiz olmuştur (Çizelge 1). En yüksek rejenerasyon oranı %70.0 ile kinetinde görülmüştür. Bu oran bakımından kinetini azalan sıra ile TDZ (%38.3) ve BAP (%30.0) izlemiştir. Ancak, TDZ ve BAP arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli olmamıştır (Çizelge 2).

Morfogenesis oranında olduğu gibi rejenerasyon oranı üzerine dozun etkisi önemli olmamıştır. Ancak, Sitokinin tiplerinin etkisi dozlara göre değiştiği için sitokinin tipi x doz interaksiyonu çok önemli (p<0, 01) olmuştur (Çizelge 1). En yüksek rejenerasyon oranı %95.0 ile Kinetinin 1.5 mg/l dozunda meydana gelmiştir (Çizelge 2; Şekil 1a).

Çizelge 1. Konulara ilişkin varyans analizi sonuçları.

Bağlı Değişken	Sitokinin Tipi (S)			Sitokinin Dozu (D)			S X D			Hata	
	SD	KO	F	SD	KO	F	SD	KO	F	SD	KO
MO (%)	2	1744.4	5.414*	2	877.8	2.724	4	1077.8	3.345*	27	322.2
RO (%)	2	5344.4	16.586**	2	544.4	1.690	4	3644.4	11.310**	27	322.2
ESSS	2	44.3	13.031**	2	33.9	10.00**	4	74.3	21.890**	27	3.4
SESSS	2	32.6	8.155**	2	18.8	4.713*	4	88.5	22.151**	27	3.9

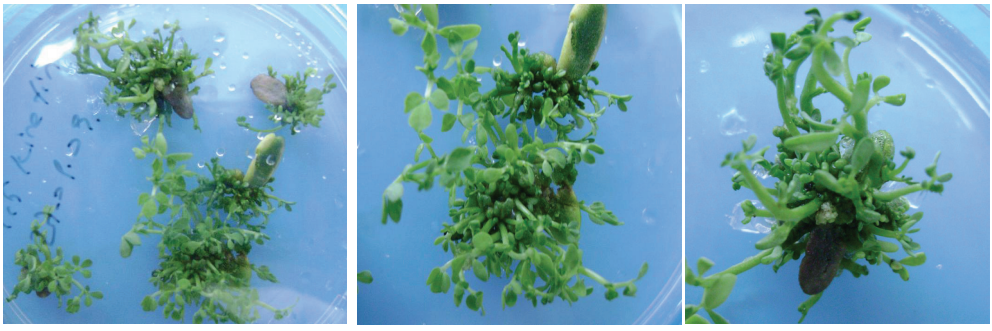
*: önemli (p<0.05)

**: Çok önemli (p<0.01)

Çizelge 2. Farklı sitokinin tipleri ve dozlarında konulara ait ortalamalar ($\overline{X} \mp S_{\overline{x}}$) ve Duncan çoklu karşılaştırma sonuçları.

Sitokinin Tipi	Dozu (mg/l)	MO	RO	ESSS	SESSS
BAP	**0.5**	60.0±8.2	60.0±8.2a	5. 50±1.9a	8.4±2.1a
	1.0	65.0±5.0	25.0±5.0b	0.7±.06b	3.1±0.5b
	1.5	55.0±9.6	5.0±5.0c	0.1±0.1b	0.5±0.1c
	Ort.	***60.0±4.3B***	***30.0±7.6B***	***2.1±0.9B***	***4.0±1.2B***
Kinetin	**0.5**	70.0±5.8b	40.0±0.0b	1.1±0.2b	2.6±0.3b
	1.0	70.0±5.8b	75.0±5.0ab	1.7±0.3b	2.3±0.3b
	1.5	100.0±0.0a	95.0±5.0a	11.9±1.7a	12.4±1.3a
	Ort.	***80.0±4.9A***	***70.0±7.2A***	***4.9±1.6A***	***5.7±1.4A***
TDZ	**0.5**	75.0±9.6a	20.0±8.2b	0.5±0.1	2.0±0.7
	1.0	35.0±12.6c	35.0±12.6ab	1.4±0.6	2.7±1.0
	1.5	65.0±15.0b	60.0±18.3a	1.7±0.6	2.6±0.2
	Ort.	***58.3±8.3B***	***38.3±8.7B***	***1.2±0.3B***	***2.4±0.4B***
Sitokinin Ortalaması	**0.5**	68.3±4.6	40.0±6.0	2.3±0.8B	4.3±1.1AB
	1.0	56.7±6.4	45.0±7.8	1.3±0.3B	2.7±0.4B
	1.5	73.3±7.9	53.3±12.6	4.6±1.7A	5.2±1.6A

Not: Aynı sütunda farklı harfle gösterilenler arasındaki fark önemlidir (p<0.05)



(a) **(b)** **(c)**

Şekil 1. *Sarı çiçekli gazal boynuzunda kotiledon yapraklardan sürgün oluşumu.* **a)** *1.5 mg/l kinetin içeren MS ortamında kotiledon yapraklardan sürgünlerin oluşumu* **b, c)** *İn vitro şartlarda kotiledon yaprakları üzerinde sürgünlerin görünümü*

Çizelge 1' incelendiğinde ESS ve SESS üzerine sitokinin tipinin etkisi çok önemli ($p<0.01$) olmuştur (Çizelge 1). Her ikisi için de en yüksek değer kinetinden elde edilmiştir (sırasıyla 4.9 ve 5.7) (Çizelge 2). Bu oran sırasıyla TDZ'de 1.2 ve 2.4, BAP'da 2.1 ve 4.0 olarak belirlenmiş ve her iki özellik içinde aralarındaki farklılık önemli olmamış ve aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 2).

ESS üzerine sitokinin dozunun etkisi çok önemli ($p<0.01$) olurken, SESS üzerine önemli ($p<0.05$) olmuştur (Çizelge 1). Her iki özellik için de en yüksek değer 1.5 mg/l dozundan (sırasıyla 4.6 ve 5.2) elde edilmiştir. ESS 0.5 mg/l'de 2.3, 1.0 mg/l'de 1.3 olarak belirlenirken, SESS 0.5 mg/l'de 4.3, 1.0 mg/l'de 2.7 olarak kaydedilmiştir. Hem ESS ve SESS için 0.5 ve 1.0 mg/l dozları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli olmamıştır (Çizelge 2). Ayrıca, ESS ve SESS üzerine sitokinin tipi x dozun etkisi çok önemli olmuştur (Çizelge 1). Diğer özelliklerde olduğu gibi en yüksek ESS ve SESS kinetinin 1.5 mg/l dozundan (sırasıyla 11.9 ve 12.4) elde edilmiştir (Çizelge 2; Şekil 1b, c).

Erdoğan ve ark (2005), TDZ'nin de *in vitro* kültürde sitokinin kaynağı olarak kullanılan ve sürgün rejenerasyonunu teşvik eden önemli bir büyümeyi düzenleyici olduğunu ve TDZ oranının uygun bir biçimde ayarlanması ile sürgün rejenerasyonunun 8-10 kat artırabileceğini değişik araştırıcıların kaydettiğini belirtmişlerdir. Yine aynı araştırıcı burçakta yaptığı çalışmada adventif sürgünleri BAP ile TDZ'yi NAA (naftalen asetik asit) ile birlikte kültüre almış ve en yüksek sürgün sayısını 7, 3 ile 2 mg/l BAP ve 0, 2 mg/l NAA içeren ortamdan elde etmiştir. Özgen ve ark. (1997), yoncada yaptıkları çalışmada en fazla sürgünü BAP ve NAA; Sancak (1999), korungada yaptığı çalışmada ise en fazla sürgünü BAP ve IBA (indol bütirik asit) içeren ortamlardan elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise kinetinin, BAP ve TDZ'ye göre kotiledon yapraklarından sürgün oluşumda daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Bu araştırma sonucunda sarı çiçekli gazal boynuzu bitkisinde kotiledon yaprakların *in vitro* hızlı çoğaltımda kullanılabileceği ve ortamda 1.5 mg/l kinetinin en uygun sitokin tipi ve dozu olduğu gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

Ahmadabadi, M., S. Ruf, R .Bock, 2007. A leaf _based regeneration and transformation system for maize (Zea mays L.). Transgenic Res, 16:437_448

Ahuja, P. S, S. Hadiuzzaman, M.R. Davey and E.C. Cocking, 1983. Profilic plant regeneration from protoplast_derived tissues of *Lotus Corniculatus L.*(Birdsfoot Trefoil). Plant Cell Reports, 2: 101-104

Akashi, R, S.S. Hoffmann, F. Hoffmann, 1998. Selection of a super_growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. Theor Appl Genet, 96: 758-764

Babaoğlu, M., E. Gürel, S. Özcan, 2001. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve uygulamaları. Doku Kültürü: Temel Laboratuar Teknikleri (Babaoğlu, M., Yorgancılar M. A., Akbudak, A.), S.Ü. Basım Evi, Türkiye, s:1-35.

Erdoğan, Y, S. Çöçü, İ. Parmaksız, C. Sancak, O. Arslan, 2005. Burçak (*Vicia ervilia* (L.) Wild.) bitkisinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve hızlı çoğaltımı. Tarım Bilimleri Dergisi, 11 (1): 60-64.

Murashige T and F. Skoog .1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15, 471–497.

Nicolic, R., N. Mitic, S. Ninkovic and M. Neskovic, 1997. Evaluation of agronomic traits in tissue culture_derived progeny of bird's _foot trefoil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 48: 67-69

Nikolic R, N Mitic, R Miletic and M Neskovic (2006). Effects of cytokinins on in vitro seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. *J Plant Growth Regul* 25(3): 187-194.

Nicolic R, N. Mitic, S.Ninkovic and M. Neskovic, 2007. Efficient Genetic Transformation Of *Lotus Corniculatus L.* Using A Direct Shoot Regeneration Protocol, Stepwise Hygromycin B Selection, And A Super_ Bınary *Agrobacterium Tumefacıens Vector.* Arch.Biol.Sci., Belgrade 59 (4), 311-317

Özgen, M., S. Altınok, S. Özcan, C. S. Sevimay and S. Cafer, 1997. İn vitro micropropogation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars, Tr. J. of Botany, 21 (1997), 275-278

Raikar S.V, R. H. Braun, C. Bryant, A.J. Conner., M.C. Christey, 2008. Efficient isolation, culture and regeneration of *Lotus corniculatus L* protoplasts Plant Biotechnol Rep. 2: 171-177

Sancak, C., 1999. *In vitro* micropropagation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). T. J. Of Botany, 23.133-136.