

Ekinezyada (*Echinacea pallida*) Farklı Eksplant Tiplerinden İndirekt Sürgün Rejenerasyonu*

Münüre TANUR ERKOYUNCU*, Mustafa YORGANCILAR

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

*Sorumlu Yazar: mtanur@selcuk.edu.tr

Geliş Tarihi: 23.08.2020 Düzeltme Geliş Tarihi: 15.09.2020 Kabul Tarihi: 09.10.2020

Öz

Araştırmada, *Echinacea pallida* türünde yaprak, yaprak sapı, kotiledon ve kök eksplantlarından türetilmiş kalluslar aracılığıyla sürgün rejenerasyonu çalışılmıştır. Dört farklı eksplant tipinden türetilmiş kalluslar, sürgün gelişimini teşvik etmek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 veya 4.0 mg l⁻¹) ve çeşitte sitokinin (BAP, TDZ, KIN) içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyonu (sırasıyla %81 ve %59) 0.5 mg l⁻¹ BAP içeren ortamda kotiledon eksplantlarından türetilmiş kalluslar ile 1.0 mg l⁻¹ BAP içeren ortamda kök eksplantlarından türetilmiş kalluslardan elde edilmiştir. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (4.83 adet) 0.5 mg l⁻¹ BAP içeren besin ortamında kök eksplantlarından türetilmiş kalluslardan elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler, kök oluşumunu teşvik etmek ve rejenerasyon sürecini tamamlamak amacıyla farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1.0 veya 1.5 mg l⁻¹) ve tiplerde oksin (NAA, IBA, IAA) içeren ve içermeyen MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. En yüksek köklenme oranı (%6) büyüme düzenleyicisi içermeyen ve 0.5 mg l⁻¹ IBA içeren besin ortamından elde edilmiştir. Diğer oksin tipleri ve konsantrasyonlarında köklenme tespit edilmemiştir.

Anahtar kelimeler: *Echinacea*, eksplant tipi, köklenme, organogenesis, sürgün rejenerasyonu

Indirect Shoot Regeneration From Different Explant Types in *Echinacea (Echinacea pallida)*

Abstract

In the study, shoot regeneration was obtained by means of callus derived from leaves, petioles, cotyledons and root explants of *Echinacea pallida*. Callus derived from four different types of explants were cultured in MS containing different concentrations (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 or 4.0 mg l⁻¹) and variety of cytokine (BAP, TDZ, KIN) to promote shoot induction. The highest shoot-forming explant percentages (81% and 59%, respectively) were obtained in medium containing 0.5 mg l⁻¹ BAP and callus derived from cotyledon and root explants in medium containing 1.0 mg l⁻¹ BAP. The highest number of shoots per explant (4.83) was reached in callus obtained from root explants in MS containing 0.5 mg l⁻¹ BAP. The regenerated shoots obtained were cultured in MS with and without auxin (NAA, IBA, IAA) in different concentrations (0.5, 1.0 or 1.5 mg l⁻¹) in order to stimulate root induction and complete the regeneration process. The highest rooting rate (6%) was obtained in a media without growth regulator and containing 0.5 mg l⁻¹ IBA. Rooting was not detected in other auxin types and concentrations.

Key words: *Echinacea*, explant type, rooting, organogenesis, shoot regeneration

Giriş

Ekinezya türleri, Asteraceae familyasına ait, süs ve tıbbi değeri olan çok yıllık, otsu bitkilerdir (Barrett, 2003; Toselli ve ark., 2009). Dünyada

Black Sampson, Purple/Red Coneflower gibi farklı isimler verilen ekinezya türleri, ülkemizde ise yaygın olarak ekinezya, pembe/mor koni çiçeği veya kirpiotu gibi isimler ile bilinmektedir (Wichtl,

2004; Çelik ve Kan, 2019). Ekinezya cinsi, 9 tür altında toplanmış olup (McGregor, 1968), bunlardan özellikle üçü *Echinacea purpurea* (L.) Moench, *Echinacea angustifolia* DC. var. *angustifolia* ve *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. tıbbi bitki olarak bilinen ve ekonomik öneme sahip olan türleridir (Barnes ve ark., 2005). Bu türler arasında *E. pallida*, fenolik bileşiklerin birikimi ve alkalomitler açısından fitokimyasal olarak benzersiz olup, bu sayede bağışıklık sistemini uyarıcı/güçlendirici ve antioksidan (Mishima ve ark. 2004), antienflamatuvar ve yara iyileştirici (Speroni ve ark. 2002) ve antimikrobiyal (Jamshidi ve ark. 2014) başta olmak üzere önemli biyolojik aktivitelere sahiptir (Gao ve ark., 2018).

Tıbbi değeri ve çok yönlü kullanım alanları sayesinde popülerliği giderek artan Ekinezya, son yıllarda Avrupa ve Amerika'nın en çok satan tıbbi bitkisi haline gelmiştir (Smith ve ark., 2015). Ancak ekinezyanın ticari anlamda bitkisel üretimi, bitki materyalinin mikroorganizmalarla bulaşması, çevreden kaynaklanan kirlilik, aktif bileşenlerin değişkenliği ve biyokimyasal analizler için saf, standartlaştırılmış bitki materyalinin olmaması gibi çeşitli sebeplerden dolayı yetersiz düzeyde kalmaktadır (Raman ve ark., 2004). Bu sorunların önüne geçmek için ekinezya türlerinin üretiminde biyoteknolojik yöntemler, özellikle hücre ve doku kültürleri alternatif bir yöntem olarak görülmektedir. Hücre ve doku kültürleri yoluyla üretim sayesinde, bitkinin kültürü esnasında karşılaşılan çevresel etkenler (iklim, coğrafi zorluklar, mevsimsel kısıtlamalar) ortadan kaldırılmakta, daha az arazi kullanımı sağlanmakta, bitkinin doğadan toplanarak neslinin yok olması engellenmekte, ayrıca bitkilerde düşük miktarlarda bulunan ekonomik açıdan değerli metabolitlerin yeterli miktarda üretilebilmesi ve üretimde homojenite, standart kalite ve verimliliğin oluşturulması gibi avantajlar sağlanmaktadır (Rao ve Ravishankar, 2002).

Bitki hücre ve doku kültürleri yoluyla üretimin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle etkili ve tekrar edilebilen bir rejenerasyon sisteminin oluşturulması gerekmektedir. Güvenilir bir rejenerasyon sistemi aynı zamanda, somaklonal varyasyonların oluşturulması, *in vitro* mutantların seçimi ve gen aktarımı gibi genetik manipülasyonların oluşturulmasına da olanak sağlamaktadır. *E. pallida*'da yapılan önceki çalışmalarda, hipokotil eksplantlarından somatik embriyogenesis (Lakshmanan ve ark., 2002) ve yaprak eksplantlarından indirekt sürgün organogenesis (Koroch ve ark., 2003) aracılığıyla *in vitro* rejenerasyon sağlanmıştır. Ancak, farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarında, bitkinin farklı eksplant tiplerinin rejenerasyona tepkilerinin

belirlenmesi açısından yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızın temel amacı, farklı konsantrasyonlarda BAP, TDZ ve KIN büyüme düzenleyicilerinin, yaprak, yaprak sapı, kotiledon ve kök eksplantlarından türetilmiş kalluslarda sürgün rejenerasyonuna etkilerini belirlemek ve optimize edilmiş bir rejenerasyon protokolü geliştirmektir.

Materyal ve Metot

E. pallida tohumları başlangıç materyali olarak kullanılmış olup, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Tıbbi Bitkiler Uygulama Çiftliği'nde kültürü yapılan bitkilerden elde edilmiştir.

Tohumların sterilizasyonu, kültürü ve kallus eksplantlarının elde edilmesi

Başlangıç materyali olan tohumlar, %70'lik etanol (h/h) çözeltisinde 30 sn yıkandıktan sonra 1-2 damla Tween-20 ilave edilmiş %10'luk sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde 10 dk bekletilmiş, sürenin sonunda 3 kez steril saf su ile durularak yüzey sterilizasyona tabi tutulmuştur. Steril tohumlar, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamında kültüre alınmış ve 8 haftalık steril fidelerden alınan yaprak, yaprak sapı, kotiledon ve kök eksplantları NAA veya 2,4-D (0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg l⁻¹) ile BAP, TDZ veya KIN (0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg l⁻¹) kombinasyonlarında büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamlarında kültüre alınarak araştırmada kullanılacak kallus eksplantlarının uyarımı sağlanmıştır. Araştırma boyunca, tüm kültürler 24±2°C sıcaklık, %65 nem, 5 LS ışık şiddeti, 16/8 saat fotoperiyot süresi olacak şekilde büyütme dolabında (Sanyo: MLR-351H) tutulmuştur.

Sürgün uyarımı/ organogenesis

Dört haftalık kültür süresi sonunda, 130 farklı oksin ve sitokin kombinasyonunu içeren ortamlarda elde edilen kalluslar, türetildiği eksplant ve büyüme düzenleyicisi tipine göre gruplandırılarak, sürgün oluşumunu teşvik etmek ve indirekt organogenesis sağlayabilmek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 veya 4.0 mg l⁻¹) ve çeşitte sadece sitokin (BAP, TDZ, KIN) içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Denemeler, her bir petri kabına 5 eksplant ve 3 tekerrür olacak şekilde kurulmuştur. Dört haftalık kültür süresinin sonunda sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%) ve kallus başına sürgün sayısı (adet) değerleri tespit edilmiştir.

Sürgünlerin köklendirilmesi ve dış ortama aktarılması

İndirekt sürgün uyarımı ile elde edilen sürgünler, kök gelişimini teşvik etmek ve rejenerasyon sürecini tamamlamak amacıyla farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1.0 veya 1.5 mg l⁻¹) ve tiplerde oksin (NAA, IBA, IAA) içeren ve içermeyen MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Denemeler, her petri kabına 10 eksplant gelecek şekilde 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. 4 haftalık kültür süresinin sonunda, kök oluşturan sürgün yüzdesi (%), sürgün başına kök sayısı (adet) ve sürgün başına kök uzunluğu (cm) değerleri belirlenmiştir. *In vitro* koşullarda köklendirilen fideler, kültür kaplarından dışarı çıkarılarak önce musluk suyu altında 5-10 dakika daha sonra steril su içerisinde iyice yıkanarak besin ortamından tamamen arındırılmış ve steril torf+perlit karışımı (1:1) içeren küçük saksılara aktarılmıştır. Bu işlemden sonra, dış ortam koşullarına kademeli olarak alıştırmak amacıyla birkaç gün yüksek nemde (%90) tutulmuş, böylece fidenin kök sisteminin gelişmesi ve dış koşullara alışması sağlanmıştır.

İstatistiksel analiz

İndirekt sürgün uyarımı sonucu elde edilen verilere ait ortalamalar tesadüf parsellerinde faktöriyel; köklenme denemeleri sonucu elde edilen verilere ait ortalamalar ise tesadüf parselleri deneme desenine göre varyans analizine tabi tutulmuştur. Yüzde olarak hesaplanan veriler varyans analizi öncesinde arcsin transformasyonuna tabi tutulmuşlardır (Snedecor ve Cochran, 1967). Çizelgelerde arcsin transformasyonu sonucu dönüştürülmüş değerler verilmiştir. İndirekt sürgün kültürleri sonuçlarına ait veriler JMP 13.0 istatistik programında LSD çoklu karşılaştırma testi ile, köklenme kültürlerinden elde edilen sonuçlar ise SPSS 22.0 istatistik programında (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) Duncan çoklu karşılaştırma testi ile P<0.05 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

İndirekt sürgün uyarımı/organogenesis

Elde edilen kalluslar, sürgün oluşumunu teşvik etmek ve indirekt organogenesis sağlayabilmek amacıyla, elde edildiği eksplant türüne ve kallus uyarımının gerçekleştiği besin ortamındaki büyüme düzenleyicisi kombinasyonuna göre gruplandırılarak, farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 veya 4.0 mg l⁻¹) ve çeşitte sitokin (BAP, TDZ, KIN) içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır.

NAA'nın farklı konsantrasyonlarda BAP ile kombinasyonları sonucu elde edilen kalluslar, sürgün uyarımı için 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg l⁻¹ konsantrasyonlarında BAP içeren MS besin ortamına aktarılmıştır. Dört haftalık kültür süresi sonunda tespit edilen, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı verileri ayrı ayrı varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalama değerler Çizelge 1'de verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre, kallusların elde edildiği büyüme düzenleyici konsantrasyonları (0.2, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg l⁻¹ NAA), kallusların sürgün uyarımı için aktarıldığı sitokin konsantrasyonları (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg l⁻¹ BAP), kallusların türetildiği eksplant tipi uygulamalarının ayrı ayrı ve etkileşimleri olmak üzere sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%) üzerine etkileri istatistiki olarak %5 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 1).

Çizelge 1 incelendiğinde, en yüksek sürgün oluşturan eksplant yüzde değeri (%81) 1.0 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamında kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların aktarıldığı 0.5 mg l⁻¹ BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. İkinci en yüksek sonuç ise %51 ile 0.5 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamında kök eksplantlarından gelişen kallusların aktarıldığı 1.0 mg l⁻¹ BAP içeren ortamdan elde edilmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısına ait değerler incelendiğinde, varyans analiz sonuçlarına göre, kallusların elde edildiği besin ortamlarındaki büyüme düzenleyici konsantrasyonu ile eksplant tipi etkileşiminin eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi istatistiki olarak %5 seviyesinde önemli bulunurken, diğer parametrelerin etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek eksplant başına sürgün sayısı değerine (4.83 adet) 0.5 mg l⁻¹ BAP içeren besin ortamında kültüre alınan kök eksplantından elde edilen kalluslarda ulaşılmıştır (Çizelge 1).

NAA'nın farklı konsantrasyonlarda TDZ ile kombinasyonları sonucu elde edilen kalluslar, sürgün uyarımı için 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg l⁻¹ konsantrasyonlarında TDZ içeren MS besin ortamına aktarılmıştır. Dört haftalık kültür süresi sonunda tespit edilen sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı verileri ayrı ayrı varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalama değerler Çizelge 2'de verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre kallusların elde edildiği NAA konsantrasyonu ve sürgün uyarımı için aktarıldığı sitokin konsantrasyonu etkileşiminin sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%) ve eksplant başına sürgün sayısı (adet) üzerine etkileri istatistiki olarak %5 seviyesinde önemli bulunurken, diğer uygulamaların etkisi istatistiki olarak önemsiz

bulunmuştur. En yüksek sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%28) ve eksplant başına sürgün sayısı (1.28 adet) değeri 1.0 mg l⁻¹ NAA içeren ortamda elde edilip, 0.1 mg l⁻¹ TDZ içeren ortama aktarılan kalluslardan elde edilmiştir.

NAA'nın farklı konsantrasyonlarda KIN ile kombinasyonları sonucu elde edilen kalluslar, sürgün uyarımı için 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg l⁻¹ konsantrasyonlarında KIN içeren MS besin ortamlarına aktarılmıştır. Kültür süresi sonunda kalluslarda herhangi bir gelişmeye ve sürgün uyarımına rastlanmamış, kallusların kararıp öldüğü gözlemlenmiştir.

Kalluslar sürgün uyarımı için alt kültüre, kallus uyarımının gerçekleştiği besin ortamındaki büyüme düzenleyicisi kombinasyonuna göre gruplandırılarak aktarılmıştır. Böylece, NAA ve 2,4-D'nin farklı sitokinler ile kombinasyonları sonucu elde edilen kalluslar ayrı ayrı alt kültüre alınmış ve kallusların rejenerasyon yeteneklerinin belirlenmesinde, kallusun elde edildiği büyüme düzenleyicisinin de etkisi gözlemlenmiştir. 2,4-D'nin farklı sitokinler (BAP, TDZ ve KIN) ile kombinasyonlarını içeren ortamlarda edilen kalluslar, NAA'da olduğu gibi geldiği ortamdaki sitokinin tipini içeren ortamlara aktarılmış ve denemelerin sonucunda NAA'den farklı olarak 2,4-D içeren ortamlardan gelen kalluslarda sağlıklı sürgün gelişimi meydana gelmediği tespit edilmiştir. Aktarılan sitokin tiplerine göre BAP ve TDZ içeren ortamlardaki kallusların morfolojileri sağlıklı ve granuler yapıda iken KIN içeren ortamdaki kalluslarda kararmalar ve sağlıksız gelişim gözlemlenmiştir.

Hem direkt hem indirekt sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörlerin başında besin ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileri olduğu ve uygun büyüme düzenleyicisi tipi ve konsantrasyonu belirlendiğinde yüksek oranda sürgün uyarımı elde edilebileceği değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Uranbey ve ark., 2003; Mirici, 2004). Ayrıca bitki hücrelerinin farklılaşması, sadece ekzojen bitki büyüme düzenleyicileriyle değil aynı zamanda endojen hormonların içeriğinden de etkilenmektedir. Farklı dokular farklı endojen hormon seviyelerine sahip olabilmekte ve bu nedenle eksplant kaynağının tipi, sürgün rejenerasyonunda farklılaşma sürecinin düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadır (Kumar ve ark., 2005; Yucesan ve ark., 2007; Shen ve ark., 2008). Benzer şekilde, çalışmamızda da kallus dokularından sürgün uyarımında besin ortamında yer alan büyüme düzenleyicilerinin tipi ve konsantrasyonları arasında olduğu gibi eksplant tipleri arasında da farklılıklar belirlenmiştir (Şekil 1, Şekil 2). Eksplant tipleri arasında kotiledon ve kök

eksplantları diğer eksplant tiplerine kıyasla daha iyi sonuç verirken, sitokinin kaynakları arasında ise istatistiki değerlendirme yapılmamasına rağmen rakamsal olarak değerlendirildiğinde BAP, TDZ'ye oranla daha etkili bulunmuştur. Koroch ve ark. (2003), *E. pallida*'nın yaprak eksplantlarından indirekt sürgün uyarımını araştırdıkları çalışmada, BAP ve NAA kombinasyonlarını içeren ortamlarda en yüksek sürgün rejenerasyon yüzdesi (%63) ve eksplant başına sürgün sayısı (2 adet) değerlerine ulaşırken, TDZ içeren ortamlarda kalluslarda organogenik kallus oluşum sıklığının azaldığını belirtmişlerdir. Bizim bulgularımız bu sonuçları doğrular niteliktedir.

Çalışmamızda ayrıca kallusların elde edildiği ortamlardaki oksin tipi ve konsantrasyonları da dikkate alınmış ve kallus uyarım ortamındaki oksin tipinin kalluslardan sürgün uyarımında etkili olduğu gözlemlenmiştir. NAA'nın farklı sitokin kaynakları ile (BAP, TDZ, KIN) kombinasyonlarını içeren ortamlardan edilen kalluslarda sürgün uyarımı gerçekleşirken, 2,4-D'nin farklı sitokin kaynakları ile (BAP, TDZ, KIN) kombinasyonlarını içeren ortamlardan elde edilen kalluslarda sürgün uyarımında ciddi bir başarı sağlanamamıştır. Benzer amaçla yürütülen farklı bitki türlerinde de, indirekt sürgün uyarımında 2,4-D'nin NAA'ya göre etkinliğinin az olduğu belirlenmiştir (Türker ve ark., 2010; Kurmi ve ark., 2011).

Kallus dokularından indirekt sürgün uyarımı ile elde sürgünler büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besin ortamına aktarılmış, 4 haftalık kültür süresi sonunda 5-6 cm büyüklüğe gelmesi sağlanmıştır (Şekil 3). Uygun büyüklüğe gelen sürgünler köklenmeye alınmıştır.

Sürgünlerin köklendirilmesi

Elde edilen sürgünler, kök gelişimini teşvik etmek ve rejenerasyon sürecini tamamlamak amacıyla farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1.0 veya 1.5 mg l⁻¹) ve tiplerde oksin (NAA, IBA, IAA) içeren ve içermeyen besin ortamlarında kültüre alınmıştır. 4 haftalık kültür süresinin sonunda, kök oluşturan sürgün yüzdesi (%), sürgün başına kök sayısı (adet) ve sürgün başına kök uzunluğu (cm) değerleri gözlemlenmiştir.

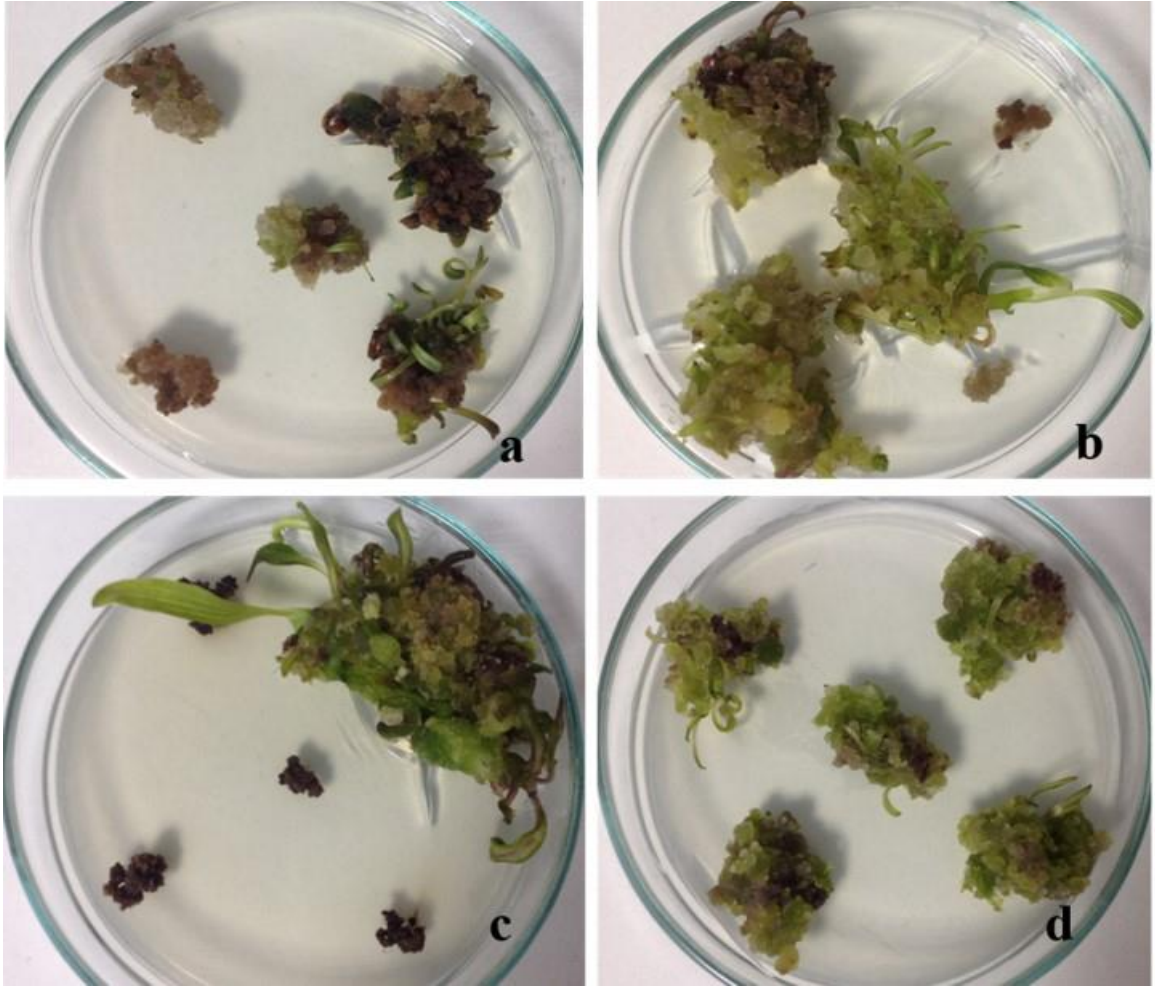
Kök oluşturan sürgün yüzdesi, sürgün başına kök sayısı ve kök uzunluğu verileri ayrı ayrı varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalama değerler Çizelge 3'de verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre, farklı tip ve konsantrasyonlarda oksinlerin, kök oluşturan sürgün yüzdesi (%), sürgün başına kök sayısı (adet) ve kök uzunluğu (cm) üzerine etkileri istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 1. *E. pallida* türünde kallus eksplantlarından farklı BAP konsantrasyonlarında indirekt sürgün uyarımı

Kallus uyarım ortamı NAA(mgl ⁻¹)	BAP (mgl ⁻¹)	Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)				Ort.	Genel Ort.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)				Ort.	Genel Ort.
		Kotiledon	Yaprak	Yaprak Sapı	Kök			Kotiledon	Yaprak	Yaprak Sapı	Kök		
0.2	0.1	0k	0k	0k	38bg	10fh	5b	0.00	0.00	0.00	1.33	0.33	0.19b
	0.5	0k	0k	0k	0k	0h		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	1.0	0k	0k	0k	30ej	8fh		0.00	0.00	0.00	1.08	0.27	
	2.0	0k	13ık	9jk	0k	5fh		0.00	1.17	0.17	0.00	0.33	
	4.0	0k	0k	0k	0k	0h		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Ort.	0h	3gh	2h	14ce			0.00f	0.23ef	0.03f	0.48df			
0.5	0.1	0	0k	0k	43be	11fg	15a	0.00	0.00	0.00	1.75	0.44	1.20a
	0.5	9jk	0k	0k	55bc	16df		1.33	0.00	0.00	4.83	1.54	
	1.0	18gk	13ık	9jk	59b	25bd		2.67	0.67	1.00	1.72	1.51	
	2.0	18gk	0k	9jk	33dı	15df		1.33	0.00	2.67	2.78	1.69	
	4.0	13ık	0k	0k	26ej	10fh		1.33	0.00	0.00	1.83	0.79	
Ort.	11dg	3gh	4fh	43a			1.33bd	0.13f	0.73cf	2.58a			
1.0	0.1	0k	9jk	0k	0k	2gh	17a	0.00	1.33	0.00	0.00	0.33	1.00a
	0.5	81a	18gk	9jk	34cı	35a		2.68	3.33	3.00	0.83	2.46	
	1.0	55bc	18gk	17hk	0k	23ce		2.42	2.33	0.56	0.00	1.33	
	2.0	60ab	13ık	0k	26ej	25bd		1.83	1.00	0.00	0.67	0.88	
	4.0	0k	0k	0k	0k	0h		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Ort.	39a	11dg	5eh	12dg			1.39bd	1.60bc	0.71cf	0.30ef			
2.0	0.1	0k	0k	18gk	0k	4gh	8b	0.00	0.00	0.67	0.00	0.17	0.52b
	0.5	35ch	0k	26ej	0k	15df		3.00	0.00	0.78	0.00	0.94	
	1.0	35ch	0k	0k	0k	9fh		3.00	0.00	0.00	0.00	0.75	
	2.0	27ej	0k	21fk	0k	12eg		2.00	0.00	1.00	0.00	0.75	
	4.0	0k	0k	0k	0k	0h		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Ort.	19bd	0h	13df	0h			1.60bc	0.00f	0.49df	0.00f			
4.0	0.1	0k	43be	22ej	22ej	22ce	17a	0.00	1.61	0.83	1.50	0.99	1.00a
	0.5	0k	43be	52bd	3bf	34ab		0.00	2.58	1.93	3.33	1.96	
	1.0	9jk	38bg	26ej	43be	29ac		1.33	1.50	1.33	2.17	1.58	
	2.0	0k	0k	0k	9jk	2gh		0.00	0.00	0.00	1.67	0.42	
	4.0	0k	0k	0k	0k	0h		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Ort.	2h	25b	20bd	23bc			0.27ef	1.14be	0.82bf	1.73ab			
Genel Ort.	14a	8b	9b	18a			0.92	0.62	0.56	1.02			
LSD 0.05 (oksin): 4.72 LSD 0.05 (eksplant tipi):4.23 LSD 0.05 (oksin x eksplant tipi): 9.45								LSD 0.05 (oksin): 0.45 LSD 0.05 (eksplant tipi):ö.d. LSD 0.05 (oksin x eksplant tipi): 0.90					
LSD 0.05 (oksin x sitokinin):10.57 LSD 0.05 (oksin x sitokininx eksplant tipi):21.17								LSD 0.05 (oksin x sitokinin):ö.d. LSD 0.05 (oksin x sitokininx eksplant tipi):ö.d.					

Çizelge 2. *E. pallida* türünde kallus eksplantlarından farklı TDZ konsantrasyonlarında indirekt sürgün uyarımı

Kallus uyarım ortamı NAA (mg ^l ⁻¹)	TDZ (mg ^l ⁻¹)	Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)				Ort.	Genel Ort.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)				Ort.	Genel Ort.
		Kotiledon	Yaprak	Yaprak Sapı	Kök			Kotiledon	Yaprak	Yaprak Sapı	Kök		
0.2	0.1	0	0	0	0	0c	0c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	0.00b
	0.5	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	1.0	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	2.0	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	4.0	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	Ort.	0	0	0	0			0.00	0.00	0.00	0		
0.5	0.1	0	0	0	17	4c	4ab	0.00	0.00	0.00	0.56	0.14c	0.09b
	0.5	0	0	0	21	5bc		0.00	0.00	0.00	0.33	0.08c	
	1.0	0	0	0	0	0		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	2.0	0	21	0	0	5bc		0.00	0.42	0.00	0.00	0.10c	
	4.0	0	21	0	0	5bc		0.00	0.42	0.00	0.00	0.10c	
	Ort.	0	8	0	8			0.00	0.17	0.00	0.18		
1.0	0.1	42	21	30	18	28a	7a	1.00	0.92	1.89	1.33	1.28a	0.38a
	0.5	0	0	9	13	5bc		0.00	0.00	0.67	1.83	0.63b	
	1.0	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	2.0	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	4.0	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	Ort.	8	4	8	6			0.20	0.18	0.51	0.63		
2.0	0.1	0	0	26	26	13b	3ac	0.00	0.00	1.00	1.50	0.63b	0.14b
	0.5	0	0	0	13	3c		0.00	0.00	0.00	0.33	0.08c	
	1.0	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	2.0	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	4.0	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	Ort.	0	0	5	8			0.00	0.00	0.20	0.37		
4.0	0.1	9	9	0	0	4c	1bc	0.67	0.33	0.00	0.00	0.25bc	0.05b
	0.5	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	1.0	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	2.0	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	4.0	0	0	0	0	0c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00c	
	Ort.	2	2	0	0			0.13	0.07	0.00	0.00		
Genel Ort.		2	3	3	4								
LSD _{0.05} (oksin): 3.80 LSD _{0.05} (eksplant tipi): ö.d. LSD _{0.05} (oksin x eksplant tipi): ö.d. LSD _{0.05} (oksin x sitokin): 8.53								LSD _{0.05} (oksin): 0.17 LSD _{0.05} (eksplant tipi): ö.d. LSD _{0.05} (oksin x eksplant tipi): ö.d.					
LSD _{0.05} (oksin x sitokin x eksplant tipi): ö.d.								LSD _{0.05} (oksin x sitokin): 0.41 LSD _{0.05} (oksin x sitokin x eksplant tipi): ö.d.					



Şekil 1. *E. pallida* türünde farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besin ortamlarında kallustan indirekt sürgün uyarımı **a)**Yaprak sapı kaynaklı kalluslar **b)** Kök kaynaklı kalluslar **c)** Yaprak kaynaklı kalluslar **d)** Kotiledon kaynaklı kalluslar

Çizelge 3. *E. pallida* türünde farklı oksin tip ve konsantrasyonlarının köklenmeye etkileri

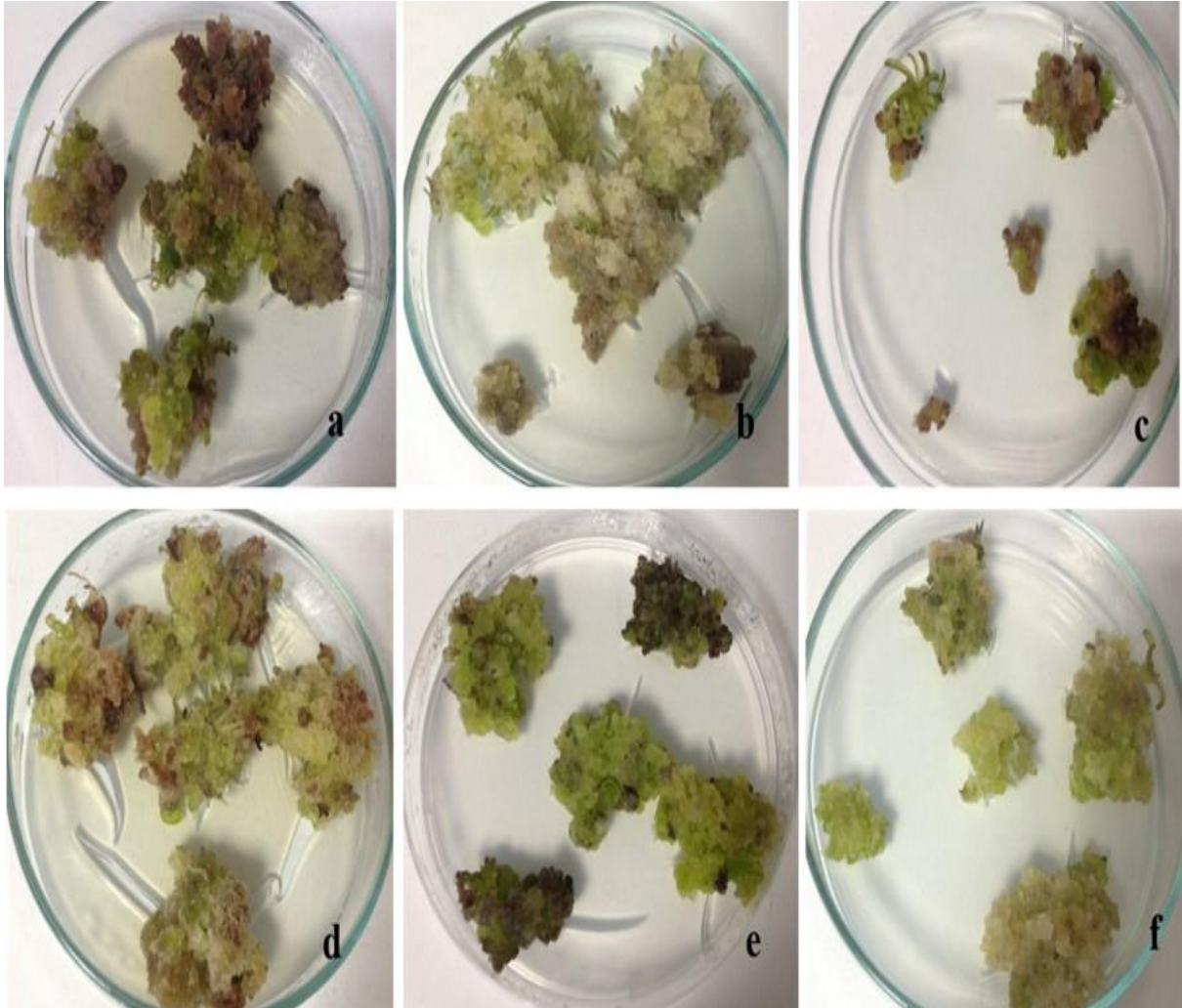
Büyüme Düzenleyicileri (mg l ⁻¹)	Kök Oluşturan Sürgün Yüzdesi (%)*	Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)*	Kök Uzunluğu (cm)*
K	6	0.67	0.03
IBA	0.5	6	1.29
	1.0	0	0.00
	1.5	0	0.00
NAA	0.5	0	0.00
	1.0	0	0.00
	1.5	0	0.00
IAA	0.5	0	0.00
	1.0	0	0.00
	1.5	0	0.00

* İstatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

Rejenere sürgünlerin köklendirilmesi ile ilgili denemelerde, aralarında istatistiki önemde fark bulunamayan köklenme yüzdesine ait değerler, rakamsal büyüklüklerine göre incelendiğinde en yüksek köklenme oranı (%6) büyüme düzenleyicisi içermeyen ve 0.5 mg l⁻¹ IBA içeren besin ortamında elde edilmiştir. Diğer oksin tipleri ve konsantrasyonlarında köklenme tespit edilmemiştir. Genel anlamda değerlendirildiğinde *E. pallida* türünde *in vitro* koşullarda köklenme oldukça düşük oranlarda meydana gelmektedir. Harbage (2001) üç farklı ekinezya türünde IBA içeren ortamda köklenme uyarımını araştırdıkları çalışmada, en düşük oranı (%3) *E. pallida* türünde elde etmişlerdir. Benzer şekilde, Koroch ve ark. (2003) köklenmeyi araştırdıkları çalışmada, farklı konsantrasyonlarda IBA içeren ve içermeyen ortamlarda köklenme oranı bakımından istatistiki anlamda bir fark elde edememişler ve çok düşük oranlarda köklenmeyi sağlamışlardır. Buna karşın, Lakshmanan ve ark. (2002) IBA içeren ve içermeyen

MS besin ortamında köklenmeye aldıkları *E. pallida* sürgünlerinde, her iki ortamda da (sırasıyla %29, %50) diğer çalışmalara kıyasla yüksek oranda köklenme elde etmişlerdir. Bu sonucun, tür içinde genetik varyasyonlara bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir. Wang ve ark., (2017) ise 0.2 mg l⁻¹ IBA ile 3.0 mg l⁻¹ GA3 içeren MS ortamında en yüksek köklenmeye ulaşmışlardır. Çalışmamızda elde ettiğimiz rejenere sürgünlerde öncelikle olarak tüm oksin tiplerinin köklenmeye etkisi belirlenmesi hedeflendiğinden, farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarının uygulanmamıştır. Araştırmamızın sonucunda, *E. pallida* türünün *in vitro* rejenerasyonunda kök organogenesi için tek başına oksin uygulamasının yeterli olmadığı belirlenmiştir.

Köklenmiş fide oranı çok düşük olduğundan aklimatizasyon işlemi sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilememiştir.



Şekil 2. *E.pallida* türünde farklı konsantrasyonlarda TDZ içeren besin ortamlarında kallustan indirekt sürgün uyarımı **a)**Yaprak sapı kaynaklı kalluslar **b)** ve **f)** Kök kaynaklı kalluslar **c)** Yaprak kaynaklı kalluslar **d)** Kotiledon kaynaklı kalluslar **e)** Sürgün uyarımı olmayan kalluslar

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışma ile *E. pallida*'da, farklı eksplant tiplerinden elde edilmiş olan kallusların, farklı büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonlarını içeren ortamlarda sürgün rejenerasyonu tepkileri belirlenmiştir. Kotiledon ve kök eksplantlarından elde edilmiş kallusların, rejenerasyon kabiliyeti diğer eksplant tiplerinden elde edilen kalluslara kıyasla daha yüksek tespit edilmiştir. Kallusların sürgün uyarımı için aktarıldığı sitokinler arasında BAP, TDZ ve KIN'e kıyasla daha etkili bulunmuştur. Özellikle KIN içeren ortamlarda sürgün uyarımı sağlanamamıştır. Ayrıca, çalışmamızda kallusların

elde edildiği ortamlardaki oksin tipi de dikkate alınmış ve kallus uyarım ortamındaki oksin tipinin, kalluslardan sürgün uyarımında etkili olduğu gözlemlenmiştir. NAA'nın farklı sitokin kaynakları ile (BAP, TDZ, KIN) kombinasyonlarını içeren ortamlarda elde edilen kalluslarda, indirekt sürgün uyarımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, elde edilen rejenere sürgünlerde düşük oranda köklenme gerçekleşmiş olup, aklimatizasyon tamamlanamamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda, *E.pallida*'da da *in vitro* kök organogenesisi ve aklimatizasyonu ile ilgili farklı uygulamalar araştırılmalıdır.



Şekil 3. MS (büyüme düzenleyicisi içermeyen) besin ortamına aktarılmış, indirekt organogenesis ile gelişen sürgünler

Araştırmanın sonucunda, *E.pallida*'nın farklı eksplant tiplerinden elde edilen kalluslarda indirekt sürgün rejenerasyonu için tekrar edilebilir bir yöntem belirlenmiştir. Bitkinin tıbbi ve ekonomik önemi dikkate alındığında, bu mevcut protokol, hızlı çoğalmanın yanı sıra germplazm koruması ve farklı biyoteknolojik çalışmalar için potansiyel bir sistem sunmaktadır.

Teşekkür: Bu çalışma Selçuk Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü tarafından 18101018 numaralı proje ile desteklenmiştir.

¥ Bu çalışma doktora tezinden üretilmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti:

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynaklar

- Barnes, J., Anderson, L. A., Gibbons, S. ve Phillipson, J. D. 2005. Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57 (8), 929-954.
- Barrett, B. 2003. Medicinal properties of Echinacea: a critical review. *Phytomedicine*, 10 (1), 66-86.
- Çelik, S. A. ve Kan, Y. 2019. Ekinezya Türlerinde Uçucu Yağ Verim ve Bileşenlerinin Belirlenmesi. *Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 2 (2), 7-14.
- Gao, Y., Wu, C.H., Wu., Piao, X.C., Han, L., Gao, R. ve Lian, M.L. 2018. Optimization of culture medium components and culture period for production of adventitious roots of *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 135:299–307.
- Harbage, J. F. 2001. Micropropagation of *Echinacea angustifolia*, *E. pallida*, and *E. purpurea* from stem and seed explants. *HortScience*, 36 (2), 360-364.
- Jamshidi, M., Barzegar, M. ve Sahari, M.A. 2014. Effect of gamma and microwave irradiation on antioxidant and antimicrobial activities of *Cinnamomum zeylanicum* and *Echinacea purpurea*. *Int Food Res J.*, 21:1289–1296.
- Koroch, A., Kapteyn, J., Juliani, H. ve Simon, J. 2003. In vitro regeneration of *Echinacea pallida* from leaf explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39 (4), 415-418.
- Kumar, V., Gururaj, H., Prasad, B. N., Giridhar, P. ve Ravishankar, G. 2005. Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annum* L. *Scientia Horticulturae*, 106 (2), 237-246.
- Kurmi, U.S., Sharma, D.K., Tripathi, M.K., Tiwari, R., Baghel, B.S.ve Tiwari, S. 2011. Plant regeneration of *Vitis vinifera* (L) via direct and indirect organogenesis from cultured nodal segments. *Journal of Agricultural Technology*, 7(3), 721-737.
- Lakshmanan, P., Danesh, M. ve Taji, A. 2002. Production of four commercially cultivated *Echinacea* species by different methods of in vitro regeneration. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77 (2), 158-163.
- McKeown, K. A. 1999. A review of the taxonomy of the genus *Echinacea*. *Perspectives on new crops and new uses*, 482-489.
- Mirici, S. 2004. Endemik Geven (*Astragalus polemoniicus* Bunge) Bitkisinin Yaprak Sapı ve Yaprak Eksplantlarından Yüksek Oranda Adventif Sürgün Rejenerasyonu. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 18 (34), 31-34.
- Mishima, S., Saito, K., Maruyama, H., Inoue, M., Yamashita, T., Ishida, T. ve Gu, Y. 2004. Antioxidant and immuno-enhancing effects of *Echinacea purpurea*. *Biol Pharm Bull*, 27:1004–1009.
- Murashige, T. ve Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.
- Raman, P., Patino, L. C. ve Nair, M. G. 2004. Evaluation of metal and microbial contamination in botanical supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (26), 7822-7827.
- Rao, S. R. ve Ravishankar, G. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20 (2), 101-153.
- Shen, X., Kane, M. E. ve Chen, J. 2008. Effects of genotype, explant source, and plant growth regulators on indirect shoot organogenesis in *Dieffenbachia* cultivars. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 44:282–288.
- Speroni, E., Govoni, P., Guizzardi, S., Renzulli, C. ve Guerra, M. 2002. Anti-inflammatory and cicatrizing activity of *Echinacea pallida* Nutt. root extract. *Journal of ethnopharmacology*, 79 (2), 265-272.
- Smith, T., Lynch, M., Johnson, J., Kawa, K., Bauman, H. ve Blumenthal, M. 2015. Herbal dietary supplement sales in US increase 6.8% in 2014. *HerbalGram*, 107, 52-59.
- Toselli, F., Matthias, A. ve Gillam, E. M. 2009. *Echinacea* metabolism and drug interactions: the case for standardization of a complementary medicine. *Life Sci*, 85 (3-4), 97-106.
- Türker, A. U., Yücesan, B. ve Gürel, E. 2010. Adventitious shoot regeneration from stem internode explants of *Verbena officinalis* L., a medicinal plant. *Turkish Journal of Biology*, 34 (3), 297-304.
- Uranbey, S., Çöçü, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Khawar, K., Mirici, S. ve Özcan, S. 2003. Efficient adventitious shoot regeneration in

- cicer milkvetch. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17 (1), 33-37.
- Wang, H.M., Jeng, S.T. ve To, K. Y. 2017. In vitro regeneration, Agrobacterium-mediated transformation, and genetic assay of chalcone synthase in the medicinal plant *Echinacea pallida*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 130:117–130.
- Wichtl, M. 2004. Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis. Ed. 3, Medpharm GmbH Scientific Publishers.
- Yucesan, B., Turker, A. U. ve Gurel, E. 2007. TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 91 (3), 243-250.