



Farklı MS Dozlarının Buğdayda (*Triticum sp.*) Doku Kültürü Parametrelerine Etkileri

Nur KOYUNCU¹

Geliş Tarihi: 12.12.2007

Öz: Bitkisel üretimde verimin artırılması ve biyotik-abiyotik baskı etmenleri nedeniyle oluşan ürün kayıpları biyoteknoloji destekli ıslah çalışmalarına ilgiyi artırmaktadır. Ancak bu çalışmalarda doku kültürü ve genetik mühendisliği araştırmalarının maliyeti oldukça yüksek olmakta ve bunun en büyük kısmını kullanılan kimyasal maddeler oluşturmaktadır. *In vitro* çalışmalarda eksplantlara besin maddesi sağlayan MS besin ortamı en çok kullanılan kimyasallardan biridir. Bu çalışmada, kallus kültürü ile bitki elde edilmesinde gerekli olan en ekonomik MS besin maddesi miktarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Materyal olarak makarnalık Sarıçanak-98 ve ekmeleklik Pehlivan buğday çeşitleri kullanılmış, kallus oluşumu için uygun embriyolar tohumlardan gevşetilerek 8 mg/l 2,4-D içeren sıvı ortamlarda kültüre alınmıştır. Bunu izleyen alt kültürlerde gelişen kalluslar, tam (4,405 g/l), yarım (2,202 g/l) ve çeyrek (1,101 g/l) dozlarında MS besin ortamı içeren petrielerde kültüre alınmıştır. Oluşan kallusların ağırlıkları 11 gün sonra tartılarak belirlenmiş ve 7 hafta sonunda elde edilen bitki sayıları saptanmıştır. Yapılan istatistiksel incelemeler sonucunda, kullanılan farklı MS dozlarının rejenerasyon kapasitesi ve elde edilen bitki sayısına etkisi olmadığı saptanmıştır. Kallus oluşumu aşamasında sıvı ortam ve sonraki aşamalarda çeyrek MS dozu kullanarak rejenerasyon tam bitkiler elde edilebilmiştir. Buna göre, gen aktarım çalışmalarında sık aralıklarla yapılan alt kültürlerde MS besin ortamının % 75 oranında azaltılarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Doku kültürü parametreleri, MS besin ortamı, kallus, rejenerasyon, *Triticum*, buğday

The Effects of Different MS Doses on Tissue Culture Parameters in Wheat (*Triticum sp.*)

Abstract: Increasing crop production yield and crop losses caused by biotic-abiotic stress factors increased the attention to biotechnology-supported breeding studies. However, in these studies the cost of tissue culture and genetic engineering researches are considerably high and chemical substances constitute the major part of this cost. MS medium that provide *in vitro* nutrition to the explants in such studies is one of these frequently used chemicals. The purpose of this study is to determine the most economical MS medium dose that is necessary for obtaining plants through callus culture. Sarıçanak-98 durum wheat and Pehlivan common wheat cultivated varieties were used as plant material and mature embryos were moved slightly in the seeds for callus formation and were cultured in a solution containing 8 mg/l 2,4-D. Callus that developed in subsequent sub-cultures were cultured in Petri dishes containing MS medium in full (4,405 g/l), half (2,202 g/l) and quarter (1,101 g/l) doses. The weights of the calli were determined by measuring after 11 days and the number of plants obtained at the end of 7 weeks was recorded. After the statistical analysis it was found that different MS doses had no effect on the regeneration capacity and the number of plants obtained. During the formation of callus in solution and by using quarter MS dose in the following phase, it is possible to regenerate complete plants. By this way, MS medium used in sub-cultures which are common in gene transfer studies can be reduced by 75%.

Key Words: Tissue culture parameters, MS medium, callus, regeneration, *Triticum*, wheat

Giriş

Bilindiği gibi yerkürede yaşamın sürmesi ve besin döngüsünün (bitki-hayvan-insan) devamlılığı bitkisel üretime bağlıdır. Ekim alanlarının tarım dışı kullanımlara yönelik olarak değerlendirilmesi, erozyon, tuzlanma ve çölleşme yoluyla toprak verimliliğinin

azalması, üretim alanlarının daralmasına neden olmaktadır. Bu etmenler karşısında üretimin artırılarak sürdürülmesi yüksek verimli, biyotik (hastalık ve zararlı) ve abiyotik (kuraklık, soğuk, tuzluluk gibi) baskılara dayanıklı kaliteli çeşitlerin geliştirilmesi ile sağlanabilecektir.

¹Ankara Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Bölümü-Ankara

Son 50 yıldaki ürün artışında bitki ıslahı çalışmalarının önemli payı olmuştur. Klasik bitki ıslahı yöntemleri sayesinde, özellikle melez çeşitlerden yararlanarak elde edilen ürün miktar ve kalitesinde önemli artışlar sağlanmıştır. Bununla birlikte; hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık başta olmak üzere bitkinin diğer birçok tarımsal özelliklerini iyileştirmede önemli engellerle karşılaşmıştır. Örneğin, kısırılık ve uyumsuzluk nedeniyle türler arası melezlemenin yapılabildiği bitki sayısının azlığı, istenilen karakterlerin bu bitkiler arasında aktarılma başarısını da azaltmaktadır (Özgen 2005).

Günümüzde bitki ıslahı çalışmalarında klasik yöntemlerde karşılaşılan sorunların aşılmasında biyoteknolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Kısırılık, uyumsuzluk, bağlı genler gibi sorunları aşmak amacıyla geliştirilen biyoteknolojik yöntemler, bitki cins ve türleri arasında ya da tür ve cins içindeki bitkiler arasında da gen geçişlerine olasılık vermektedir. Laboratuvar koşullarında yürütülen çalışmalarda biyoteknolojik yöntemler klasik ıslah yöntemlerini tamamlayıcı olarak kullanılmakta ve istenen özelliklerdeki yeni bitkiler elde edilebilmektedir.

Biyotik (hastalık ve zararlılar) ve abiyotik (sıcak, soğuk, kuraklık ve tuzluluk) stres etmenlerinin oluşturduğu yıllık ortalama %25 ürün kaybı, bitkilerde biyoteknolojik yöntemlerle bu baskı unsurlarına karşı toleransı artırma ve dayanıklılık sağlama konularına önem kazandırmaktadır (Gill ve ark. 2004). Üzerinde en çok durulan herbisitlere ve böceklerle dayanıklılık konusunda geliştirilen genetiği değiştirilmiş bitkilerin üretim alanları 2006 yılı verilerine göre 102 milyon hektara ulaşmıştır (Anonim 2006). Kalite ve verim öğeleri ile uygun olmayan çevre koşullarına toleransın artırılması için daha kapsamlı araştırmalar yürütülmektedir. Ancak bu tür çalışmalar için gerekli pahalı cihazlar ve kimyasallar maliyeti oldukça artırmaktadır. *In vitro* çalışmalarda eksplantlardan kallus oluşturulması ve gen aktarım işleminden sonra bunların rejenerasyon edilmesinde aşamalarında her alt kültürde kullanılan MS besin ortamı (Murashige ve Skoog 1962) bu pahalı kimyasallar arasındadır. Besin ortamı, formülünde belirtilen organik, inorganik ve diğer maddelerden oluşan, bitkilere topraktan karşıladıkları her türlü besin maddesi ve su gereksinimlerini sağlayan karışımdır.

Doku kültürü yöntemleri gen aktarım çalışmaları yanında, genotiplerin kalıtsal özelliklerinin belirlenmesini de sağlamaktadır. F₁ melezlerinde heterosisin (Özgen 2004) ve resiprokal melezlerde sitoplazmanın etkisi (Özgen ve Arpacıoğlu 2003); genotiplerin çevresel baskılara (tuzluluk, kuraklık vb) toleransları (Arzani ve Mirodjağh 1999) doku kültürü parametreleri ile belirlenebilmektedir. Buğdayda doku kültürü ile yapılan çalışmalarda değişik eksplant

çeşitleri arasında en çok olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriyolar kullanılmaktadır. Olgunlaşmamış embriyoların daha yüksek oranda rejenerasyon olmalarına karşın yılın yalnızca belirli zamanlarında sağlanabilmeleri olumsuz yöneridir. Olgun embriyolar ise her dönemde bol miktarda sağlanabilmektedir.

Buğday ekonomik, stratejik ve besin değeri özellikleri ile üzerinde çok sayıda araştırma yapılmakta olan bitkilerden biridir (Vasil 2007). Bu çalışmada ise buğday kallus kültürlerinde kullanılan MS besin ortamı dozlarının bitki rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. Elde edilecek sonuçlara göre kimyasal madde harcamalarının azaltılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen bu çalışmada materyal olarak makarnalık Sarıçanak - 98 (*Triticum durum* Desf.) ve ekmeçlik Pehlivan (*Triticum aestivum* L.) buğday çeşitlerinin olgunlaşmış embriyoları kullanılmıştır.

Yüzey sterilizasyonu: Tohumlar yüzey sterilizasyonu için etil alkolde (% 70) 5 dakika bekletilip 3 kez steril saf su ile yıkandıktan sonra, 25 dakika ticari çamaşır suyunda (% 5 sodyum hipoklorit) çalkalanıp 7 kez steril saf su ile durulanmıştır. Daha sonra tohumların 2 saat süre ile steril suda (33 °C) bekletilerek şişmeleri sağlanmıştır (Özgen ve ark. 1998).

Besin ortamlarının sterilizasyonu: Kallus oluşumu ve rejenerasyon için hazırlanan ortamlar pH'sı 5,8'e ayarlanarak, 20 dakika 121 °C ve 1,1 kg/cm² basınçta otoklavlanarak steril edilmiştir.

Kallus oluşumu: Kallus oluşumu için, tohumların embriyoları steril kabin içerisinde bistüri ve pens yardımıyla endospermden gevşetilmiştir. Embriyosu gevşetilen tohumlar, içinde 7 ml sıvı ortam (8 mg/l 2,4-D) bulunan petrilere karın kısımları ortama degecek şekilde (20 embriyo/petri) yerleştirilmiştir. Petriler, kenarları sarılarak 11 gün süre ile inkübatörde (26 °C, karanlıkta) bekletilmiştir. Bu süre sonunda kalluslar tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir (Özgen ve ark. 1998).

Kallus gelişimi: Oluşan kalluslar, MS besin ortamı, glisin (2 mg/l), sukroz (20 g/l) ve agardan (6 mg/l) oluşan ortamlara yerleştirilmiştir. MS dozlarının kallus ve bitki gelişimine etkisinin araştırıldığı denemede tam (4,405 g/l), yarım (2,202 g/l) ve çeyrek (1,101 g/l) dozlarında MS besin ortamı

içeren petripler kullanılmıştır. Alt kültüre alınan kallusların 21 gün süre ile inkübatörde bekletilerek gelişmeleri sağlanmıştır.

Rejenerasyon: Aynı bileşimdeki ortamlarla yeni alt kültüre alınan kalluslar, kültür odasında 25 ± 1 °C sıcaklık ve 16 saat ışık-8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında bir ay süre ile tutularak rejenera edilmiştir. Rejenera kallus sayıları belirlenen petriplerde oluşan bitkicikler kavanozlara aktarılarak 4 hafta süreyle aynı koşullarda kültür odasında bekletilmiştir. Elde edilen bitki sayısı kaydedilmiştir.

Alıştırma (aklimatizasyon): Kültür odasında 10-15 cm yüksekliğe ulaşan bitkiler 1:1:3 oranında kum, perlit ve turba toprağı karışımından oluşan saksılara aktarılarak iklim odasında büyütülmüştür. Ortam nemi %90'la başlayarak düzenli bir şekilde azaltılmış ve bitkilerin dış ortama alışmaları sağlanmıştır.

Verilerin değerlendirilmesi: Çalışma 20 embriyo içeren petriplerde üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Elde edilen verilerin analizi SPSS istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır. MS besin ortamı dozları arasındaki farklılığın belirlenmesinde varyans analizinden yararlanılmıştır (Düzgüneş ve ark. 1983).

Bulgular ve Tartışma

Olgun embriyolardan kallus kültürü aracılığı ile bitki elde edilmesinde; kallus oluşumu için 2,4-D kullanılmış, kallus ve sürgün gelişimi ile bitkicik oluşumu aşamalarında herhangi bir büyüme düzenleyici kullanılmamıştır. Buna göre elde edilen bulgular ayrı başlıklar halinde aşağıda verilmiştir.

Kallus oluşumu: Buğday taneleri embriyoları gevşetilir sıvı ortama konulduktan 3-4 gün sonra kallus oluşturmaya başlamış ve kalluslar 11 gün sonra en büyük boyutlarına ulaşmıştır. Bu süre sonunda kalluslar endospermli boşalan tohumlardan ayrılarak katı ortamlara yerleştirilmişlerdir. Oluşan kallusların sayısı ve tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir. Kallus oluşumu aşamasında MS içermeyen 2,4-D'li sıvı ortam kullanılmıştır. Böylelikle embriyoların kallus oluşumu süresince MS besin ortamından sağlayacağı besin maddelerini kendi depoladığı besin maddelerinden karşılaması sağlanmıştır. Olgun embriyolardan bu yolla oluşan kalluslar daha yüksek oranda rejenera olmaktadır (Özgen ve ark. 1998). Kültürün MS'siz sıvı ortam kullanılan başlangıç aşamasında, ekmelek ve makarnalık buğday çeşitlerinin her ikisinde de kallus oluşumu ve kallus ağırlığı değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Buğday çeşitlerinin sıvı ortamda oluşturdukları kallus sayısı ve ağırlıkları

| Parametreler | Ç e ş i t l e r | |
|------------------|-----------------|------------|
| | Sarıçanak-98 | Pehlivan |
| Kallus Oluşturan | 20,0±0,0a* | 19,7±0,3a* |
| Embriyo Sayısı | 19,7±0,3a | 19,3±0,3a |
| | 19,7±0,3a | 19,3±0,3a |
| Kallus | 1,862±0,0a | 2,091±0,0a |
| Ağırlığı (g) | 1,834±0,1a | 1,959±0,0a |
| | 1,703±0,1a | 1,966±0,1a |

*Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasında 0.05 düzeyinde önemli farklılıklar bulunmamaktadır.

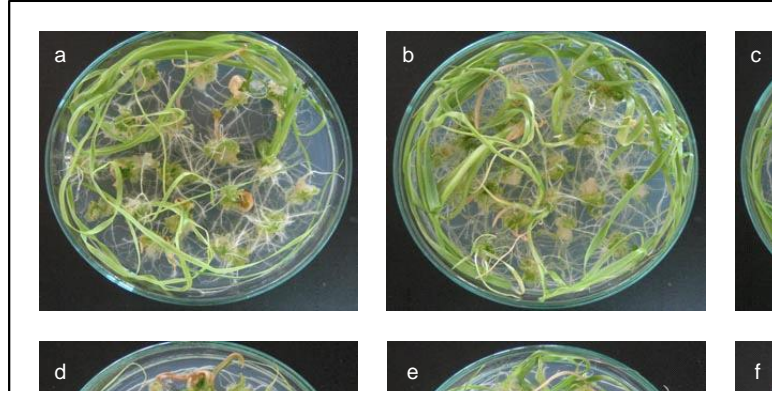
Gören (2007) ise çalışmasında kallus oluşumunu tohumlardan ayırdığı olgun embriyoları 2 mg/l 2,4-D içeren tam, yarım ve çeyrek dozdaki MS besin ortamlarında 14 gün kültüre alarak sağlamıştır. Bu süre sonunda oluşan kallusların sayı ve ağırlıklarını belirleyerek, petripleri rejenerasyon için kültür odasına aktarmıştır. Kullanılan MS dozlarında oluşan kallus sayıları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmazken ($P>0.05$), kallus ağırlığında tam ve çeyrek dozlar arasında önemli fark ($P<0.01$) bulunmuştur.

MS dozlarının etkisi kallus gelişmesi ve bitki rejenerasyonu aşamalarında irdelenmiştir. Kallusların 21 gün süre ile inkübatörde bekletildikleri alt kültür periyodunda üç farklı MS dozu kullanılmıştır.

Bitki rejenerasyonu: Üç hafta süresince inkübatörde tutulan kalluslar yeni ortamlara aktararak rejenerasyon için kültür odasına alınmışlardır. Petriplerde birkaç gün içinde yeşil noktacıklar ve daha sonra sürgünler görülmeye başlamıştır. Dört hafta sonunda, kullanılan üç MS besin ortamı dozunda oluşan bütün kallusların rejenera oldukları belirlenmiştir (Şekil 1).

Ortamları yenilenen bitkicikler boylarının uzaması için 4 hafta süre ile kavanozlarda bekletilmişlerdir. Elde edilen bitki sayısı bakımından dozlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır ($P>0.05$) (Çizelge 2).

Rejenerasyon ve kültür kapasitesi değerleri %96,7-100 arasında değişen genotiplerin doku kültürüne tepkilerinin yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Bu parametreler bakımından MS dozları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (Çizelge 2).



Şekil 1. Farklı MS dozlarının buğday çeşitlerinde rejenerasyona etkisi. a, b, c) Pehlivan çeşidinde, d, e, f) Sarıçanak-98 çeşidinde sırasıyla tam, yarım ve çeyrek dozlar.

Çizelge 2. Buğday çeşitlerinde MS dozlarının doku kültürü parametrelerine etkileri

| Parametreler | Çeşitler | | |
|--|------------|-------------------|-----------|
| | MS Dozları | Sarıçanak-98 | Pehlivan |
| Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%) | Tam | 100±0a* 100±0a* | |
| | Yarım | 100±0a | 100±0a |
| | Çeyrek | 100±0a | 100±0a |
| Kültür Kapasitesi ² (%) | Tam | 100±0a | 98,3±1,7a |
| | Yarım | 98,3±1,7a | 96,7±1,7a |
| | Çeyrek | 98,3±1,7a | 96,7±1,7a |
| Elde Edilen Bitki Sayısı | Tam | 15±1,5a 11,3±1,7a | |
| | Yarım | 16±0,0a 14,3±0,9a | |
| | Çeyrek | 11±2,1a 10,7±1,5a | |

¹ Rejenerasyon kapasitesi:
(Yeşil noktalı kallus sayısı / kallus oluşturan embriyo sayısı) x 100

² Kültür kapasitesi:
(Yeşil noktalı kallus sayısı / kültüre alınan embriyo sayısı) x 100

*Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasında 0.05 düzeyinde önemli farklılıklar bulunmamaktadır.

Çalışmasını katı MS ortamında yapan Gören (2007) de Çakmak-79 makarnalık buğday çeşidinde oluşan rejenerasyon kallus ve bitki sayısına MS dozlarının etki etmediğini bildirmiştir.

Bu durum, kallus oluşturma aşamasında sıvı ortamın kullanılmasıyla elde edilen kallus oluşumunun, katı ortamdaki kadar başarılı olduğunu ve sıvı ortamın kullanılmasıyla ayrıca MS ortamından başlangıçta da önemli ölçüde kazanç sağlanacağını göstermektedir.

Sıvı ortamda bulunan 2,4-D, tohumun endospermde bulunan besin maddeleri ile birlikte etkili olmaktadır.

Sonuç

Doku kültüründe değişik bitki cins ve türleri için rejenerasyon yöntemlerini belirlemek biyoteknolojik uygulamalar için önemli bir süreçtir. Bu sürecin her aşamasında tüketilen MS besin ortamı miktarı yapılan her yeni deneme ile artmaktadır.

Bu çalışmada, ekmelek ve makarnalık buğday çeşitlerinin rejenerasyon çalışmalarında kullanılacak MS dozunun elde edilen bitki sayısına etkisi olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca endosperm destekli yöntemde kallus oluşumunda sıvı ortam kullanılmasıyla diğer yöntemlerde başlangıçta kullanılan MS ortamına da gerek kalmamaktadır.

Araştırma bulgularından anlaşılacağı üzere besin ortamı miktarını çeyrek doza kadar azaltmanın kültürde kallus gelişimine ve elde edilecek bitki sayısı üzerine olumsuz bir etkisi bulunmamaktadır. Buna göre çalışmalarda başlangıçta sıvı ortam, daha sonraki aşamalarda 1/4 oranında MS besin ortamı kullanımı ile kimyasal madde harcamalarının önemli miktarda azaltılması sağlanacaktır.

Kaynaklar

- Anonim 2006. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006. <http://www.isaaa.org/Resources/Publications/briefs/35/executivesummary/default.html>. (14.02.2007)
- Arzani, A. and S-S. Mirodjagh. 1999. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 67-72.
- Düzgüneş, O., T. Kesici ve F. Gürbüz. 1983. İstatistik Metodları I. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları. 861. Ders Kitabı, 229, Ankara.
- Gill, B. S., R. Appels, A-M. Botha-Oberholster, C. R. Buell, J. L. Bennetzen, B. Chalhoub, F. Chumley, J. Dvorak, M. Iwanaga, B. Keller, W. Li, W. R. McCombie, Y. Ogihara, F. Quetier and T. Sasaki. 2004. A workshop report on wheat genome sequencing: International genome research on wheat consortium. *Genetics* 168: 1087-1096.
- Gören, E. 2007. Transgenik bitkilerin elde edilmesinde maliyeti azaltma üzerine bir araştırma. Ankara Üniv. Ziraat Fak. 3. Öğrenci Kongresi, Bildiriler: 94-99. 12 Nisan 2007, Ankara.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Özbay, A. 2004. Makarnalık buğdayda (*Triticum durum* Desf.) kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna melez gücünün etkisi. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Özgen, M., M. Türet, S. Altınok and C. Sancak. 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Reports* 118: 331-335.
- Özgen, M. and N. Arpacıoğlu. 2003. Cytoplasmic effects on the tissue culture response of winter durum wheat (*Triticum durum* Desf.) callus. *Korean Journal of Genetics*, 25(1); 9-13.
- Özgen, M. 2005. Gıda üretiminde yeni eğilimler: Genetiği değiştirilmiş organizmalar. Dünya Gıda Günü Sempozyumu. Bildiriler: 170-184. 14-15 Ekim 2005, Ankara.
- Vasil, I. K. 2007. Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat. <http://www.springerlink.com/content/b326421272852332/fulltext.pdf>. (16.07.2007)

İletişim adresi

Nur KOYUNCU
Ankara Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Bölümü-Ankara
Tel: 0 312 596 16 39
E-posta: nurkoyuncu@gmail.com