



Dokuda Su Eksikliğinin Neden Olduğu Stresin *In Vitro* Şartlar Altında Keten (*Linum usitatissimum* L.) Hipokotil Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi

Ebru DERELLİ¹ Parizad ALLAHVERDİKHAN VAZİRİ² Mohsen MIRZAPOUR³ Mustafa YILDIZ^{3*}

¹Çankırı Karatekin Üniversitesi, Kızılırmak Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Çankırı, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye

³Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Ankara, Türkiye

*Sorumlu Yazar:

E-mail: myildiz@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi: 30 Mart 2012

Kabul Tarihi: 15 Mayıs 2012

Özet

Araştırmada, A.B.D'nin Kuzey Dakota eyaletinde bulunan 'Northern Crop Science Laboratory'den getirilen 'Clarck' keten çeşidine ait tohumlar kullanılmıştır. Tohumlar, %5 NaOCl içeren ticari çamaşır suyunun %40'lık dozunda, manyetik karıştırıcı üzerinde 12 dakika tutularak steril edilmiş, daha sonra steril saf su ile 3-4 kez yıkanarak durulanmıştır. Steril edilen tohumlar çimlendirilmek için Magenta kapları içerisinde ekilerek 24±1°C sıcaklık ve 16 saat ışık/8 saat karanlık fotoperiyotta kültüre alınmıştır. 10 günlük steril fidelerin hipokotil kısımları 0.5 cm uzunluğunda parçalara ayrılarak farklı iki ön muamele uygulamasından sonra 1 mg l-1 6-benzylaminopurine (BAP) ve 0.02 mg l-1 naphthalene acetic acid (NAA) içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamında kültüre alınmıştır. Birinci uygulamada 0.5 cm uzunluğundaki hipokotil eksplantları doğrudan rejenerasyon ortamına aktırılırken, diğer uygulamada eksplantlar steril kabin içerisinde hava akımı altında 30 dak. bekletildikten sonra kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 4 hafta sonra eksplantlara uygulanan ön muameleler, rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, eksplant başına en uzun sürgün boyu, petride gelişen toplam sürgün sayısı, eksplant yaş ve kuru ağırlıkları, eksplant su ve kuru madde kapsamları bakımından karşılaştırılmıştır. Bu araştırma, steril kabin içerisinde oluşan hava akımının eksplantların rejenerasyon kapasitesi üzerine etkisini belirlemek için yapılmıştır. Araştırmamızda en yüksek sonuçlar, hipokotil eksplantlarının doğrudan rejenerasyon ortamına aktarıldığı uygulamadan elde edilmiştir. Diğer taraftan, eksplantların steril kabinde hava akımı altında tutulması, dokuda su kaybına neden olduğu için eksplantların rejenerasyon kapasitesini düşürmüştür. Bu nedenle, steril kabinde çalışılırken, ortamdaki hava akımının doku üzerinde olumsuz etki oluşturabileceği dikkate alınarak, rejenerasyon kapasitesinin korunması için eksplantların mümkün olan en kısa sürede izole edilerek, besin ortamına yerleştirilmesi gerekir.

Anahtar Kelimeler: *In vitro* sürgün rejenerasyonu, *Linum usitatissimum*, doku su eksikliği

The Effect of Water Deficiency Originated Stress in Tissue on Shoot Regeneration of Flax (*Linum usitatissimum* l.) Hypocotyl Explants

Abstract

Flax (*Linum usitatissimum* L.) cv. 'Clarck' seeds, obtained from 'Northern Crop Science Laboratories', in North Dakota, USA were used in the study. Seeds were surface sterilized with 40% commercial bleach containing 5% NaOCl with continuous stirring for 12 min. and then were washed 3-4 times with sterile distilled water. Sterilized seeds were sown in Magenta vessels to germinate and cultured at 24±1°C with a 16-h light/8-h dark photo-period. Hypocotyl segments of 10-day-old sterile seedlings were excised 0.5 cm in length and then cultured on Murashige and Skoog (MS) medium containing 1 mg l-1 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.02 mg l-1 naphthalene acetic acid (NAA) after two different pretreatment applications. In the first treatment, 0.5 cm hypocotyl explants were directly transferred to regeneration medium while in the other treatment, before culturing, explants were kept in sterile cabin under air flow for 30 min. Four weeks after culture initiation, pretreatments were compared with respect to regeneration percentage, shoot number per explant, the highest shoot length per explant, total shoot number per petri dish, explant fresh and dry weights, explant water and dry matter contents. This study was conducted to determine the effect of air flow in sterile cabin on explants' regeneration capacity. The highest results in our study were obtained from the treatment in which hypocotyl explants were directly transferred to regeneration medium. On the other hand, keeping explants under air flow in sterile cabin decreased the regeneration capacity of explants by causing water deficiency in tissue. That is why, when working in sterile cabin, in order to protect the regeneration capacity, explants are to be isolated and placed on growth medium as quickly as possible by considering that air flow in the environment may have negative effect on tissue.

Key Words: *In vitro* shoot regeneration, *Linum usitatissimum*, tissue water deficiency

GİRİŞ

Linaceae familyasında yer alan *Linum* L. cinsi daha çok Akdeniz havzası olmak üzere, Amerika'nın güneybatısı ve kuzeyinde, Asya'nın ılıman ve subtropikal bölgelerinde yayılış gösterir ve 200 kadar türü kapsamaktadır. Bu türe daha çok Anadolu ve Balkanlar'da rastlanmaktadır. *Linum* ekonomik açıdan önemli bir cinsdir. Özellikle *L. usitatissimum* L. türünün yaygın olarak ekimi yapılır ve gövdesinden elde edilen sklerankima lifleri tekstil sanayinde keten ipliği yapımında kullanılır. Tohumlarından elde edilen bezir yağı geçmişte sofralık yağ olarak ve günümüzde de boya sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Keten tohumu genel olarak Hindistan, Mısır, Brezilya, Kanada, Arjantin, Rusya, Amerika, Rusya, Hollanda ve Avrupa'nın çeşitli yerlerinde üretilmektedir. *Linum* türlerine çoğunlukla Balkanlar ve Anadolu'da rastlanmaktadır. *Linum* türleri bakımından Türkiye çok zengin bir ülkedir. Yurdumuzda son yıllarda bulunan bir türle beraber 39 türe rastlanmaktadır [1]. Türkiye'de de Karadeniz, Marmara, Ege ve İç Anadolu bölgelerinde kültürü yapılmaktadır. Bitkinin tıbbi amaçlarla kullanımına Eski Mısır'da rastlanmaktadır [2, 3].

Keten tohumu başlıca bileşen olarak lignanlar, özellikle de sekoizolarisirezinol diglukozit taşınmasına ilaveten α -linolenik asit ve lif açısından da zengindir. Lignanlar, antikarsinojenik aktiviteye sahip enterodiol ve enterolakton bileşiklerinin ön maddeleridir ve memeli lignanları olarak da bilinirler. Keten tohumu yiyecek olarak alındığında içindeki lignanlar insanlarda barsak florası tarafından enterodiol ve enterolaktona dönüştürülür. Keten tohumu lignan içeriğinden dolayı antikarsinojenik etkiye sahiptir ve besleyici özelliği vardır [4, 5].

Son zamanlarda, kanser kemoterapisinde podofilotoksin türeyen lignanlar kullanılmaktadır. Podofilotoksin bazıları tehlike altında olan ve doğal ortamından toplanarak elde edilen *Podophyllum* türlerinden izole edilmektedir. Podofilotoksin ve bundan türeyen lignanlar için alternatif kaynak, *Linum* ve *Podophyllum* türlerinin hücre kültürleri olabilir. Bu hücre kültürleri yüksek miktarda podofilotoksin ve 5-metoksi podofilotoksin üretmektedir. Lignanlar, çok geniş çeşitlilikte biyolojik aktiviteye sahiptir. Örneğin, buğday, çavdar veya keten tohumunda bulunan ve memeli lignanları olarak da adlandırılan enterolaktonlar hormon-bağımlı kanserlere karşı fitoöstrojenik aktiviteleri sayesinde koruyucu etki gösterirler. Podofilotoksin ve bunu türeyen lignanlar sitotoksik ve antiviral aktiviteye sahiptir. Podofilotoksin papilloma virüsünün sebep olduğu genital organ tümörlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Podofilotoksin mikrotübüllere bağlanarak hücre çoğalmasını inhibe ettiği için kanser tedavinde kullanılır. Podofilotoksinin yarı sentetik türeyen tenipozit etopozit ve ethopospos kanser tedavisinde kullanılmaktadır [6].

In vitro kültürde bitki rejenerasyonu gen aktarımının ilk koşuludur [7, 8]. Transgenik bitkilerin elde edilmesine bitki rejenerasyonu, rejenerasyon yeteneğine sahip eksplantların seçimi, kültür şartları ve gen aktarım yöntemi gibi birçok faktör etkilidir. Gen aktarımında yüksek başarı sağlanabilmesi için adventif sürgün sayısının yüksek olması gerekmektedir. Araştırma, steril kabin içerisinde oluşan hava akımının eksplantların rejenerasyon kapasitesi üzerine etkisini ortaya koymak için yapılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Araştırmada, A.B.D'nin Kuzey Dakota eyaletinde bulunan "Northern Crop Science Laboratory"den getirilen 'Clarck' keten çeşidine ait tohumlar kullanılmıştır.

Yöntem

Büyüme ortamı ve kültür koşulları

Denemelerde MS (Murashige ve Skoog) mineral tuz ve vitaminleri [9] ile %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar (Type A) ile katılaştırılan temel besin ortamı (MS0) kullanılmıştır. Ortam hazırlığında distile saf su kullanılmış, gerektiğinde besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilâve edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı ($27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) altında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de tutulmuştur.

Keten tohumlarının *in vitro* şartlarda çimlendirilmesi

Tohumlar yüzey sterilizasyonu için manyetik karıştırıcı üzerinde 10°C 'lik sıcaklığa sahip %40'lık ticari çamaşır suyu içerisinde 12' çalkalandıktan sonra, aynı sıcaklığa sahip steril saf su ile 3-4 kez durulanmıştır [10] (Yıldız ve Er 2002). Steril edilen tohumlar yine steril Magenta kapları içerisinde, %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar ile katılaştırılan MS besin ortamında, $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta çimlendirilmiştir.

Hipokotil eksplantlarının *in vitro* elde edilen steril fidelerden izolasyonu ve adventif sürgün rejenerasyonu

10 günlük steril fidelerin hipokotil kısımları 0.5 cm uzunluğunda parçalara ayrılarak farklı iki ön muamele uygulamasından sonra 1 mg l^{-1} 6-benzylaminopurine (BAP) ve 0.02 mg l^{-1} naphthalene acetic acid (NAA) içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamında kültüre alınmıştır.

Birinci uygulamada 0.5 cm uzunluğunda kesilen hipokotil eksplantları doğrudan rejenerasyon ortamına aktarılırken, diğer uygulamada eksplantlar steril kabin

içerisinde hava akımı altında 30 dakika bekletildikten sonra kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 4 hafta sonra eksplantlara uygulanan ön muameleler, rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, eksplant başına en uzun sürgün boyu, petride gelişen toplam sürgün sayısı, eksplant yaş ve kuru ağırlıkları, eksplant su ve kuru madde kapsamları bakımından karşılaştırılmıştır.

İstatistikî Değerlendirmeler

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş, her muamele içerisinde 10 adet eksplantın bulunduğu 4 tekerrürlü 100 x 10 mm'lik petri kaplarından oluşmuştur. Elde edilen veriler "SPSS for Windows" programı yardımıyla "Independent-Samples t

test" analizine tabi tutulmuştur. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce "arcsin" değerlerine çevrilmiştir [11].

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Ketenin *in vitro* kültüründe en uygun eksplantın hipokotil [8, 10, 12, 13, 14] ve en iyi bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonunun da 1 mg/l BAP ve 0.02 mg/l NAA [8, 10, 14] olduğu daha önce yapılan araştırmalarla vurgulanmıştır.

Bilindiği gibi tüm doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde gerçekleştirilir. Ancak, steril kabin içerisinde aseptik şartların sağlanması için kuvvetli bir hava akımı mevcuttur.

Çizelge 1. Keten 'Clarck' Çeşidinin Hipokotil Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Steril Kabindeki Hava Akımının Etkisi

	Rejenerasyon (%)		Eksplant başına sürgün sayısı		Eksplant başına en uzun sürgün boyu (cm)		Petride gelişen toplam sürgün sayısı		Eksplant yaş ağırlığı (g)		Eksplant kuru ağırlığı (g)		Eksplant Su kapsamı (%)		Eksplant kuru madde kapsamı (%)	
	Direk	30' Kur.	Direk	30' Kur.	Direk	30' Kur.	Direk	30' Kur.	Direk	30' Kur.	Direk	30' Kur.	Direk	30' Kur.	Direk	30' Kur.
	100	100	4.85	4.10	3.32	2.46	48.50	41.00	0.70	0.82	0.062	0.075	91.40	91.16	8.60	8.84
t değeri	0.000 ^{ns}		2.585*		2.296*		2.585*		1.577 ^{ns}		0.737 ^{ns}		0.165 ^{ns}		0.166 ^{ns}	

Direkt: Hipokotil eksplantlarının doğrudan rejenerasyon ortamına yerleştirilmesi

30' Kurutma: Hipokotil eksplantlarının steril kabinde hava akımı altında 30' tutulduktan sonra rejenerasyon ortamına yerleştirilmesi

ns : Önemli

* : 0.05 düzeyinde önemli

Doku su kapsamının artırılması, eksplantın su alma kapasitesini artırmış ve keten hipokotil eksplantlarının yaş ağırlık artışı yüksek doku su kapsamına bağlanmıştır [14]. Yaş ağırlık artışı, su alımı nedeniyle hücre genişlemesi sonucu ortaya çıkmaktadır [15]. Kuru ağırlık artışı, hücre bölünmesi ve yeni mayeryal sentezi sonucu ortaya çıkmaktadır [16]. Su kapsamı yüksek eksplantlardaki kuru ağırlık artışı, karbonhidrat metabolizmasındaki artış nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak, kültür öncesi eksplant su kapsamının artırılması, doku metabolik aktivitesini artırmaktadır. Ayrıca, doku su kapsamının artması, bitki büyüme düzenleyicilerinin dokuda daha kolay hareket edebilmesi nedeniyle sürgün rejenerasyon frekansını artırabilmektedir. Su stresi altında gelişimin durması, hücre bölünmesi ve hücre büyümesinin engellenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır [17]. Su stresinin bitkide hormon seviyesini değiştirdiği bildirilmiştir [18]. Stres şartları altında, sitokinin ve giberellik asit kapsamının azalması, absisik asit kapsamının artması [19-21]; büyümedeki gerilemenin, değişen hormon seviyesi nedeniyle membran geçirgenliği ve su alımındaki değişiklikler sonucu ortaya çıktığını akla getirmektedir [22, 23].

Bu araştırma, steril kabin içerisinde yapılan çalışmalarda hava akımının eksplantların rejenerasyon kapasitesi üzerine etkisini araştırmak için kurulmuştur. Araştırma sonuçları, eksplantların izole edildikten sonra fazla hava akımına maruz kalmadan derhal rejenerasyon ortamına yerleştirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

30 dakika boyunca steril kabin içerisinde hava akımına maruz bırakılan hipokotil eksplantlarının rejenerasyon kapasitesinin önemli derecede azaldığı belirlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı, eksplant başına en uzun sürgün boyu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı; hava akımına maruz bırakılan eksplantlarda sırasıyla 4.10, 2.46 cm ve 41.00 olarak ölçülmüştür. Rejenerasyon ortamına doğrudan yerleştirilen eksplantlarda ise eksplant başına sürgün sayısı 4.85, eksplant başına en uzun sürgün boyu 3.32 cm ve petride gelişen toplam sürgün sayısı 48.50 olarak gerçekleşmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Güner, A., Özatay, N. and Başer, K.H.C. 2000. Flora of Turkey and East Aegean Islands. Vol.11. Edinburg: University Pres, p:73.
- [2] Wallis, T.E. 1967. Textbook of Pharmacognosy. Londra: J. & A. Churchill Ltd., p.: 216.
- [3] Baytop, T. 1996. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, p.: 262-263.
- [4] Degenhardt, A., Habben S., Winterhalter P. 2002. Isolation of the lignan secoisolaricresinol diglucoside from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A 943: 299-302.
- [5] Raffaelli B., Holkkala A., Leppala E., Wahala K. 2002. Review Enterolignans. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 777(1): 29-43.

- [6] Petersen, M. and Alfermann, A.W. 2001. The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 135-142.
- [7] Jordan, M.C. and Mc Hughen, A. 1988. Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots. *Plant Cell Reports* 7: 285-287.
- [8] Dong, J.Z. and Mc Hughen, A. 1993. An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 88: 61-71.
- [9] Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- [10] Yıldız, M. and Er, C. 2002. The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften* 89: 259-261.
- [11] Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1967. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- [12] Millam, S., Davidson, D. And Powell, W. 1992. The use of flax (*Linum usitatissimum*) as a model system for studies on organogenesis *in vitro*: the effect of different carbohydrates. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28: 163-166.
- [13] Yıldız, M. 2000. Keten (*Linum usitatissimum* L.) bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- [14] Yıldız, M. and Özgen, M. 2004. The effect of a submersion pretreatment on *in vitro* explant growth and shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 111-115.
- [15] Dale, J.E. 1988. The control of leaf expansion. *Annual Review of Plant Physiology* 39: 267-295.
- [16] Sunderland, N. 1960. Cell division and expansion in the growth of the leaf. *Journal of Experimental Botany* 11: 68-80.
- [17] Hsiao, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24: 219-270.
- [18] Morgan, P.W. 1990. Effects of abiotic stresses on plant hormone systems. In: Koziowski TT (ed.) *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanism*, New York: Wiley-Liss.
- [19] Boucaud, J. and Unger, I.A. 1976. Hormonal control of germination under saline conditions of three halophyte taxa in genus Suaeda. *Physiologia Plantarum* 36: 197-200.
- [20] Itai, C., Richmond, A.E. and Vaadia, Y. 1968. The role of root cytokinins during water and salinity stress. *Israel Journal of Botany* 17: 187-195.
- [21] Mizrahi, Y., Blumofeld, A., Bittner, S. and Richmond, A.E. 1971. Abscisic acid and cytokinin content of leaves in relation to salinity and relative humidity. *Plant Physiology* 48: 752-755.
- [22] Ilan, I. 1971. Evidence for hormonal regulation of the selectivity of ion uptake by plant cells. *Physiologia Plantarum* 25: 230-233.
- [23] Karmoker, J.L. and Van Steveninck, F.M. 1979. The effect of abscisic acid on the uptake and distribution of ions in intact seedlings of *Phaseolus vulgaris* cv. Redland Pioneer. *Physiologia Plantarum* 45: 453-459.