Eurasian J. Bio. Chem. Sci. 2(1): 24-28

EJBCS

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: www.dergipark.org.tr/ejbcs

Alternanthera reineckii Briq.'nin doku kültürü çalışmaları için yüzey sterilizasyonunun optimizasyonu

Kübra Uğur, Muhammet Doğan*, Abdullah Kaya

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Karaman, Turkey

*Corresponding author : muhammetdogan01@gmail.com
Orcid No: 0000-0003-3138-5903

Received : 10/05/2019
Accepted : 02/07/2019

Özet: Yüzey sterlizasyonu doku kültürü çalışmalarında ilk aşamadır. Bu aşamadan geçtikten sonra bitkilerin çoklu üretimleri mümkün olabilmektedir. Mevcut çalışma, *Alternanthera reineckii* Briq.'nin doku kültürü ile üretimi için yüzey sterilizasyonu çalışmalarını sunmaktadır. Ön sterilizasyon işlemi için *A. reineckii* 20 dk boyunca akan çeşme suyunun altında bekletilmiştir. Yüzey sterilizasyonu için üst gövdeden 3-5 cm uzunluklarında kesilen parçalar farklı süre (15 ve 30 dk) ve konsantrasyonlarda (%10-30) hidrojen peroksit (H_2O_2) ile muamele edilmiştir. Boğum eksplantları izole edilerek bitki büyüme düzenleyici içermeyen Murashige ve Skoog (1962) besin ortamına aktarılmıştır. Kültür ortamlarda ilk kontaminasyonlar 6. günde gözlenmeye başlamıştır. Kültür ortamlarında daha çok bakteriyel kontaminasyonlar gözlenmiştir. Yüksek H_2O_2 maruziyetinde eksplantların rejenerasyon kapasiteleri oldukça düşmüştür. Bazı eksplantlarda beyazlaşma ve sararmalar tespit edilmiştir. Hidrojen peroksit ile muamele edilen eksplantlarda bulaşık oranları %20-100 arasında değişmiştir. Steril ve canlı eksplant değerleri kullanılan H_2O_2 ile farklılık göstermiştir. En yüksek steril ve sağlam eksplantlar (%60) %25'lik H_2O_2 ile 15 dk uygulanan eksplantlarda, ardından ise (%55) %15'lik H_2O_2 ile 30 dk uygulanan eksplantlarda tespit edilmiştir. Buradan elde edilen steril ve canlı eksplantlar bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamlarında aktarılmış ve çoğaltım çalışmaları için stoklar oluşturulmuştur. Bu çalışma, *A. reineckii*'nin *in vitro* üretimi için gerekli sterilizasyon işlemleri için araştırmacılara yardımcı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Boğum eksplantı, çoğaltım, H_2O_2, rejenerasyon, sterilizasyon

Optimization of surface sterilization of Alternanthera reineckii for tissue culture studies

Abstract: Surface sterilization is the first stage in tissue culture studies. After this stage, multiple productions of plants can possible. The present study presents surface sterilization studies for the production of *Alternanthera reineckii* Briq. by tissue culture. For the pre-sterilization process, *A. reineckii* was kept under the tap water flowing for 20 min. For surface sterilization, the parts cut at length 3-5 cm from the upper body were treated with hydrogen peroxide (H_2O_2) at different time (15 and 30 min) and concentrations (10-30%). The nodal explants were isolated and transferred to the nutrient medium of Murashige and Skoog (1962) which did not contain a plant growth regulator. The first contamination in the culture environment began to be observed on the 6th day. More bacterial contamination was observed in culture media. The regeneration capacity of the explants in highly H_2O_2 exposure decreased considerably. Whitening and yellowing were detected in some explants. Contamination rates in the explants treated with H_2O_2 ranged from 20 to 100%. The values of sterile and live explants were different with H_2O_2. The highest sterile and live explants (60%) were detected in explants with 25% H_2O_2 for 15 min followed by explants (30%) with 15% H_2O_2 for 30 min. The sterile and live explants obtained from this were transferred in non-plant growth media and stocked for propagation studies. This study may help researchers for the sterilization procedures required for *in vitro* production of *A. reineckii*.

Keywords: Nodal explant, propagation, H_2O_2, regeneration, sterilization

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

Doku ve hücre kültürü çalışmalarında bitki doku ve organları, aseptik ve kontrollü şartlarda yetiştirilir. Bu teknik, temel olarak bitki hücrelerinin totipotensi özelliğine dayanır. Totipotensi, tek bir hücrenin, hücre bölünmesiyle tam genomu oluşturma yeteneğini ifade eder. Bitki hücresinin totipotent potansiyeli ile birlikte hücrelerin metabolizmalarını, büyümelerini ve gelişimlerini değiştirme kapasiteleri de aynı derecede

önemlidir (Rani ve Kumar, 2017). Bitki doku kültürü ortamı, bitkilerin normal büyümesi ve gelişimi için gerekli tüm besin maddelerini içerir. Esas olarak makro besinler, mikro besinler, vitaminler, diğer organik bileşenler, bitki büyüme düzenleyicileri, karbon kaynağı ve katı ortam durumunda bazı jelleştirici maddelerden oluşur. Murashige ve Skoog besiyeri (MS besiyeri), birçok bitki türünün *in vitro* vejetatif üremesi için yaygın şekilde kullanılır. Ortamın pH'ı, hem bitki büyümesini hem de bitki büyüme düzenleyicilerinin aktivitesini etkileyen önemli bir faktördür. Ortamın pH'ı 5.4 - 5.8 arasındaki değere ayarlanır. Kültür için hem katı hem de sıvı ortam kullanılabilir (Hussain ve ark., 2012; Bridgen ve ark., 2018).

Mikroorganizmalar doku kültürü çalışmalarında bulaşık/kontaminasyon olarak kabul edilir. *İn vitro* ortamlardaki bitki kültüründe en önemli kayıplar kontaminasyon yüzünden oluşur. Bu tür kontaminasyonlara; virüs, bakteri, maya, mantar vb. mikroorganizmalar sayılabilir (Oyebanji ve ark., 2009). Yapılan sterilazasyon yetersiz ise mantar, maya ve bakteri oluşabilir. Bitkiden aldığımız eksplant parçasında toprağa maruz kalan bitki parçalarını, tarlada, tropik iklimlerde yetişen bitkiler ile sucul bitkileri sterilize etmek genellikle zordur (Leifert, 2009).

Bitki doku ve hücre kültüründe kullanılan ortamlar, çeşitli besin maddeleri, mineraller, bitki yetiştirme maddeleri, vitaminler ve şeker kombinasyonlarını içerir. Ne yazık ki, bu kültür ortamı ayrıca bakteri ve mantarların hızlı büyümesi için de uygundur. Bu kontaminasyonlar, bitki dokusunu veya hücre kültürünü istila ettikleri için hızlı bir şekilde büyürler ve besin ortamını tüketir ve kültürlenmiş bitki dokusunun büyümesini etkiler ve nihayetinde öldürebilecekleri toksinler üretebilirler. Bu nedenle, tüm *in vitro* bitki kültürü manipülasyonları için steril tekniklerin kullanılması zorunludur. Doku kültürü sisteminin hazırlanması ve korunması, kültür ortamının sterilizasyonunu, kültürlenecek tohum veya bitki dokusunun yüzey sterilizasyonunu ve kullanılan herhangi alet ve ekipmanların sterilizasyonunu gereklidir. Bitki dokusunun manipülasyonu çalışmaları tipik olarak steril bir odada veya laminer hava akış kabini gibi kabinlerde gerçekleştirilmelidir. Bakteriler ve mantarlar ile kontaminasyon, bitki doku kültürlerini sürekli olarak tehdit eden sık görülen bir sorundur (Misra ve Misra, 2012).
Bu çalışma, sucul bir bitki olan *Alternanthera reineckii* Briq.'nin farklı derişimlerde ve sürede hidrojen peroksit ile yüzey sterilizasyonunu sunmaktadır.

2. Materyal ve Metot

Bitki materyali olarak kullanılan *A. reineckii*, İstanbul (Türkiye)'da bulunan akvaryumculardan temin edilmiştir. Yüzey sterilizasyonu işlemi uygulanmadan önce *A. reineckii*, 20 dk akan çeşme suyunun altında bekletilmiştir. Hidrojen peroksit uygulamasında (%35 H_2O_2 - Merck) *A. reineckii*, yüzey sterilizasyonu için üst gövdeden 3-5 cm uzunluklarında kesilen parçalar farklı süre (15 ve 30 dk) ve konsantrasyonlarda (%10-30) H_2O_2 ile muamele edilmiştir. 5 dk süreyle 3 kez durulama işlemi uygulandıktan sonra boğum eksplantları izole edilerek, hormonsuz Murashige ve Skoog (1962) (MS) besin ortamına aktarılmış ve bulaşık oranları belirlenmiştir.
Kültür ortamlarının hazırlanmasında MS besin tuzları ve %3 sükroz (Duchefa) kullanılmış ve jelleştirme ajanı olarak %0,65'lik agar (Duchefa) ilave edilmiştir. 1N NaOH ve 1N HCl ile kültür ortamının pH'sı 5.7±0.1'e yapılmış ve otoklavda steril edilmiştir (1.2 basınç - 120 ºC'de 20 dk). Denemelerde eksplantlar, beyaz ışık yayan diyotlar (LED) 24±1ºC'de ve 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

Bitki doku kültüründe bakteriyel ve fungal kontaminasyonlar büyük bir tehdittir. Bitkiler dış kaynaklı olarak bakteri ve fungus barındırabilir. Bu dış kaynaklı kontaminasyonların uzaklaştırılması, doku kültürü çalışmalarının ilk ve en önemli aşamalarından biridir.
Bu çalışma, A. reineckii'nin yüzey sterilizasyonu için farklı süre ve konsantrasyonlarda H_2O_2 uygulamasını içermektedir. (Tablo 1). Daha sonra 5'er dk süre ile 3 defa durulama işlemi yapılmıştır. Bu durulama işlemleri H_2O_2'in zararını azaltmak için oldukça önemlidir. Bu üst gövde parçalarından izole edilen boğum eksplantları bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS besin ortamına aktarılmıştır. Kültür ortamlarına yerleştirilen bu eksplantlarda kontaminasyonlar ortalama 6. günde gözlenmeye başlamıştır. Besin ortamlarında daha çok bakteriyel kontaminasyonlar gözlenmiştir (Şekil 1a). Fungal kontaminasyonlar az görülmekle beraber, genellikle 9. günden sonra daha belirgin olarak tespit edilmiş ve üç hafta sonunda yoğun olarak tüm ortam yüzeyini sarmıştır (Şekil 1b). Yüksek H_2O_2 etkisi ile eksplantlarda yüzey sterilizasyon başarılmış olsa da bu eksplantların rejenerasyon kapasiteleri oldukça düşmüştür. Genellikle H_2O_2 etkisi ile eksplantlarda beyazlaşma ve sararmalar tespit edilmiştir (Şekil 1c). H_2O_2 yüzey sterilizasyonu çalışmalarında oldukça tercih edilmektedir. Benzer şekilde, *Stevia rebundiana* Bertoni (Halim ve ark., 2016), *Colocasia esculenta* (Akshatha ve ark.,2018), *Prunus armeniaca* (Ozdemir ve Gur, 2018), *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne (Dogan, 2017, 2019), bitkilerinin *in vitro* çoğaltımı için H_2O_2 kullanılmıştır.

Tablo 1. Farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 ile muamale edilen *A. reineckii*'nin boğum eksplanlarının yüzey sterilizasyonu verileri

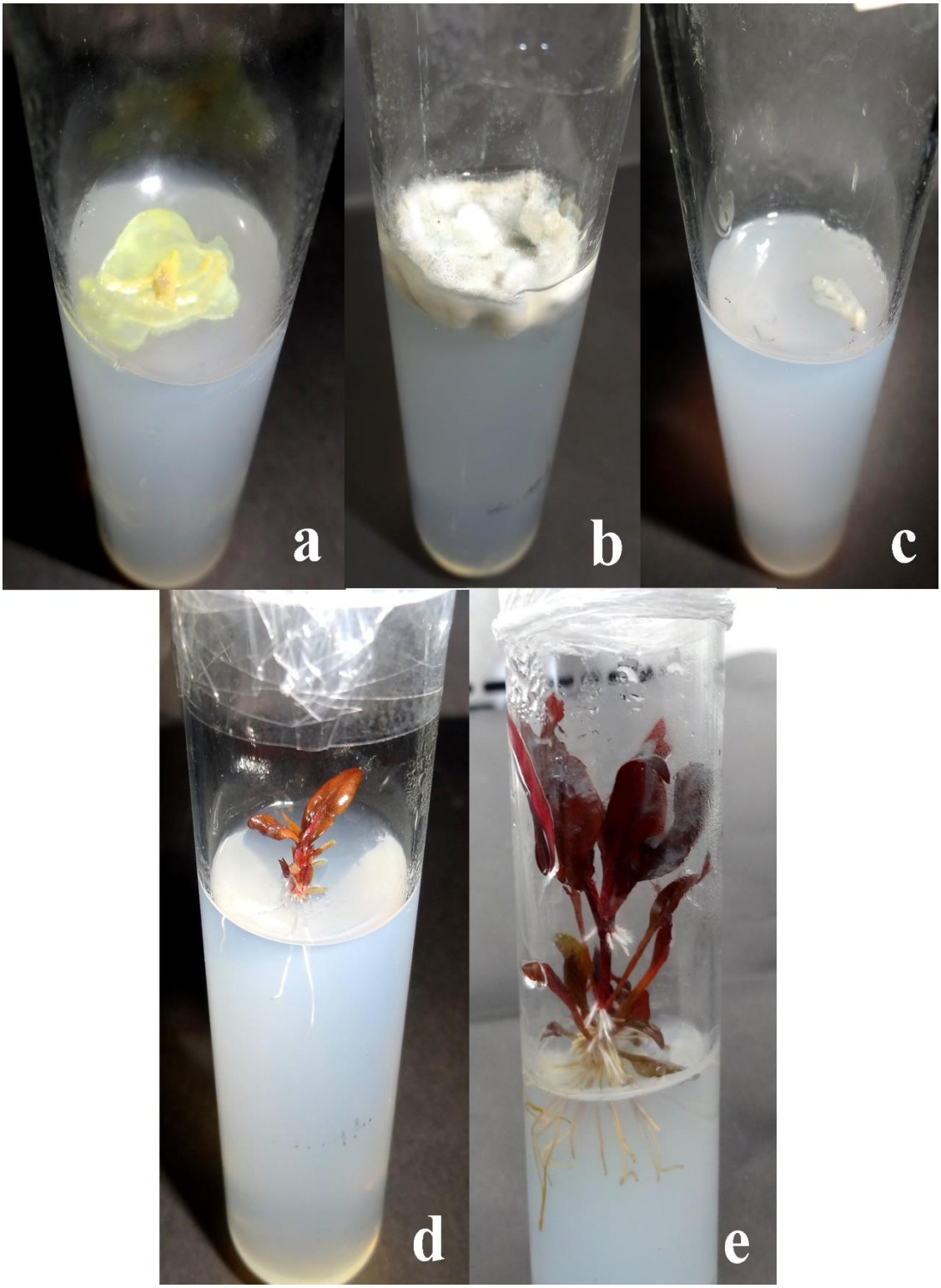
Hidrojen Peroksit (H_2O_2)		**Bulaşık Oranı (%)**	**Steril ve Ölen Eksplant Oranı (%)**	**Steril ve Canlı Eksplant Oranı (%)**
%	**Süre (dk)**			
10	15	100	-	-
15	15	100	-	-
20	15	70	10	20
25	15	30	10	60
30	15	30	25	50
10	30	40	20	40
15	30	25	30	55
30	30	20	80	-

Chalenko ve Cherednıchenko (2017) *A. reineckii*'nin yüzey sterilizasyonu için üç farklı dezentektan kullanmıştır. Bitki parçalarını % 0.1 civa (II) klorür çözeltisi (1, 2 ve 3 dk), % 10 H_2O_2 çözeltisi (1, 2 ve 3 dk), %5 sodyum hipoklorit çözeltisi (1, 2 ve 3 dk) bekleterek yüzey sterilizasyonunu başarmıştır. Bir diğer dezenfektan olan çamaşır suyu (NaCIO) da birçok sucul bitkinin yüzey sterilizasyonu için kullanılmıştır (Dogan 2018a, 2018b).

Kültür ortamında steril olan sürgünlerin bulunduğu bazı ortamlarda yaklaşık bir ay sonra bakteriyel kontaminasyonların çıktığı gözlenmiştir. Bu bakteriyel kontaminasyonlar bize eksplantların endojenik bakteri içerdiğini düşündürmüştür. Çünkü, bazı bitki türleri ile yapılan başarılı yüzey sterilizasyonu işlemlerinden sonra bile bakteriyel bulaşıkların çıktığı daha önce bildirilmiştir (Karaoğlu, 2010; Karaoğlu ve ark., 2006). Bitkilerin kökleri yaprak ve gövdeleri ile sürekli dış çevre ile etkileşim halindedir. Bu etkileşimler ile bazı bakteri türleri bitkilerin iç dokularında yaşayabilir veya bulanabilirler (Ryan ve ark., 2008; Sülü ve ark., 2016). Sterilizasyon denemeleri ikinci haftanın sonunda tamamlanmış ve bulaşık oranları (%), steril ve ölen eksplant oranı (%) ve steril ve sağlam eksplant oranı (%) verileri alınmıştır (Tablo 1).

Hidrojen peroksit ile muamele edilen eksplantlarda bulaşık oranları %20-100 arasında değişmiştir (Tablo 1). En yüksek bulaşık oranı (%100) %10 ve 15'lik H_2O_2 ile 15 dk muamele edilen eksplantlarda belirlenmiştir. Kullanılan H_2O_2 seviyesi ve süresi arttıkça ortamlardaki bulaşık yüzdesi düşüş göstermiştir. En düşük bulaşık yüzdesi (%20) %30'luk H_2O_2 ile 30 dk muamele edilen eksplantlarda gözlenmiştir. Ardından ise (%25) %15'lik H_2O_2 ile 25 dk muamele edilen eksplantlarda belirlenmiştir. Kullanılan H_2O_2 etkisi ile bazı eksplantlarda ölümler gözlenmiştir. Bunlar içerisinde steril olmasına rağmen ölen eksplantlar da tespit edilmiştir (Tablo 1). Steril ve ölen eksplant yüzdeleri %10-80 arasında değişmiştir. En yüksek steril ve ölü eksplant değeri (%80) %30'luk H_2O_2 ile 30 dk muamele edilen eksplantlarda belirlenmiştir. Bu karşın, %10 ve 15'lik H_2O_2 ile 15 dk uygulanan eksplantlarda herhangi bir ölü eksplant tespit edilmemiştir.

Steril ve canlı eksplant değerleri kullanılan H_2O_2 ile farklılık göstermiştir (Tablo 1). En yüksek steril ve sağlam eksplantlar (%60) %25'lik H_2O_2 ile 15 dk uygulanan eksplantlarda (Şekil 1d), ardından ise (%55) %15'lik H_2O_2 ile 30 dk uygulanan eksplantlarda kaydedilmiştir. Altı hafta sonunda steril ve sağlam eksplantlardan rejenere sürgünler elde edilmiştir (Şekil 1e). En düşük steril ve canlı eksplantlar ise (%20) %20'lik H_2O_2 ile 15 dk muamele edilen eksplantlarda tespit edilmiştir. Buradan elde edilen steril ve canlı eksplantlar bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamlarında aktarılmış ve çoğaltım çalışmaları için stoklar oluşturulmuştur. Dogan (2019) *R. rotundifolia*'nın yüzey sterilizasyonuna için ön işlem olarak 10 dk akan çeşme suyunda bekletilmiş ve ardından %20 oranında H_2O_2 ile 10 dk muamele ederek sterilizasyonu başarmıştır. Ghasheem ve ark. (2018) %5 ve 10'luk oranlarında H_2O_2 10 ve 20 dk süresince *Prunus persica* (L.) Batsch'nın sürgün ucu ve boğum eksplantlarının yüzey sterilizasyonu için denemeler kurmuştur. En yüksek steril ve sağlam eksplantları sürgün ucu için %10'luk H_2O_2 ile 20 dk muamelesi sonucu elde ederken (%25), boğum eksplatlarında %10'luk H_2O_2 ile 10 ve 20 dk muamelesi sonucu elde ettiğini (%20) bildirmiştir.



Şekil 1. Farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde H_2O_2 uygulanan *A. reineckii* eksplantları. (a) eksplant üzerinde bakteriyel bulaşık (b) fungal bulaşık, (c) H_2O_2 etkisinden dolayı beyazlaşan eksplant (d) üç hafta sonunda %25'lik H_2O_2 ile 15 dk muamale edilen eksplanttan çıkan steril-sağlam sürgün (e) altı hafta sonunda büyüyen ve gelişen sürgün

Sonuç

Doku kültürü çalışmalarının en zor aşamlarından biri bitki yüzey sterilizasyonu işlemleridir. Çoğaltımda kullanılacak bitki parçaları steril edilmeden üretim aşamasına geçilememektedir. Bu çalışmada, önemli sucul bitki *A. reineckii*'nin yüzey sterilizasyonu H_2O_2 ile başarılı şekilde sağlanmıştır. Ortamlarda genel olarak bakteriyel kontaminasyonlar gözlenmiştir. En yüksek kontaminasyon

oranı (%100) %10 ve 15'lik H_2O_2 ile 15 dk muamele edilen eksplantlarda tespit edilmiştir. En fazla steril ve sağlam bitkiler %25'lik H_2O_2 ile 15 dk bekletilen eksplantlarda kaydedilmiştir. Bu rapor, *A. reineckii*'nin sterilizasyonu işlemleri ve doku kültürü çalışmaları için yardımcı olabilir.

Kaynaklar

Akshatha MD, Kavadikeri S, Rao NN 2018. *In vitro* micropropagation and antioxidant assay in *Colocasia esculenta*. Plant Tissue Cult Biotechnol 28(2):183-190.

Chalenko YV, Cherednichenko MY 2017. *In vitro* introduction and cultivation of aquatic plant *Alternanthera reineckii* Briq. The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity, 05-08 July 2017, Minsk - Belarus.

Bridgen MP, Van Houtven W, Eeckhaut T, 2018. Plant Tissue Culture Techniques for Breeding. In: Van Huylenbroeck J. (eds) Ornamental Crops. Handbook of Plant Breeding, vol 11. Springer, Cham

Dogan M 2017. Multiple shoot regeneration from shoot tip and nodal explants of *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne. Ant J Bot 1(1,2): 4-8.

Dogan M 2018a. *In vitro* micropropagation from nodal explants of the medicinal plant *Lysimachia nummularia* L.. KSU J Agric Nat 21(6): 875-881.

Dogan M 2018b. *In vitro* shoot regeneration of *Limnophila aromatica* (lamk.) Merr. from nodal and internodal explants. Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech., 8(3): 77-84.

Dogan M 2019. Callus formation from full leaf and leaf parts of *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne. Acta Biologica Turcica 32(2): 78-83.

Ghasheem AL, Stănică N, Petıcılă FAG, Venat O, 2018. *In vitro* effect of various sterilization techniques on peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) explants. Scientific Papers, 227.

Halim MA, Alam MF, Rahman MH, Hossain MB, Uddin MB 2016. Sterilization process for *in vitro* regeneration of Stevia (*Stevia rebundiana* Bertoni). Int J Bus Soc Sci Res 4(4): 320-323.

Hussain A, Qarshi IA, Nazir H, Ullah I 2012. Plant Tissue Culture Current Status and Opportunities. In Recent advances in plant *in vitro* culture. IntechOpen.

Karaoğlu C 2010. Soğanlı bitkiler ve *in vitro* hızlı çoğaltım. Tarla Bitk Merk Araştırma Enstitüsü Derg 19 (1-2): 24-29.

Karaoğlu C, Çöçü S, İpek A, Parmaksız İ, Uranbey S, Sarıhan EO, Arslan N, Kaya MD, Sancak C, Özcan S, Gürbüz B, Mirici S, Er C, Khawar KM 2006. *In vitro* micropropagation of saffron. Proceedings of The 2nd International Symposium on Saffron Biology and Technology, Acta Horticulture, Number 739: 223-227.

Leifert C, Ritchie JY, Waites WM 1991. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. World J Microbiol Biotechnol 7: 452-469.

Misra AN, Misra M, 2012. Sterilisation techniques in plant tissue culture. Life Science Center, Fakir Mohan University, Balasore-756020.

Murashige T, Skoog F 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.

Oyebanji OB, Nweke O, Odebunmi O, Galadima NB, Idris MS, Nnodi UN, Afolabi AS, Ogbadu GH 2009. Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. Afr J Biotechnol 8(20): 5395-5399.

Ozdemir FA, Gur N 2018. *In vitro* propagation of cataloglu apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivar using apical node as explant. Prog Nutr 20(1-S) :176-181.

Rani A, Kumar S, 2017. Tissue culture as a plant production technique for medicinal plants: a review. International Conference on Innovative Research in Science, Technology and Management 6(1): 784-795.

Roberto T, Francesca M 2011. Sustainable sourcing of natural food ingredientsby plant cell cultures. Agro Food Industry Hi Tech, 22: 26-28.

Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiol Letts 278: 1-9.

Sharma S, Rathi N, Kamal B, Pundir D, Kaur B, Arya S 2010. Conservation of biodiversity of highly important medicinal plants of India through tissue culture technology- a review. Agric Biol J N Am 1(5): 827-833.

Sülü SM, Bozkurt İA, Soylu S, 2016. Bitki büyüme düzenleyici ve biyolojik mücadele etmeni olarak bakteriyel endofitler. MKU Ziraat Fakültesi Derg 21(1): 103-111.