BİYOTEKNOLOJİ
(POSTER BİLDİRİLER)

ARPA OLGUN EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE STERİLİZASYON

Murat Aydın[1], Kamil Haliloğlu[1], Metin Tosun[1], Ulaş Çınar[1]

[1]Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 25240 Erzurum

Özet: *İn vitro* doku kültüründe kontaminasyonun en önemli sebeplerinden biri bitki materyali ile gelen patojenlerdir. Bu araştırmada, arpada olgun embriyo kültüründe kavuz soyma işleminin ve sodyum hipoklorit konsantrasyonunun kontaminasyona ve kallus oluşumuna etkisi belirlenmiştir. Her iki kavuz soyma yönteminden (elle veya sülfürik asitle) sonra %5'lik sodyum hipoklorit ile steril yapılan endosperm destekli olgun embriyo kültürlerinin hiçbirinde kontaminasyon meydana gelmediği ve aynı zamanda bu kültürlerde kallus oluşum oranının %100 olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kavuz soyma, kontaminasyon, sodyum hipoklorit, *Hordeum vulgare* L.

STERILIZATION IN MATURE EMBRYO CULTURE OF BARLEY

Abstract: One of the main reasons of contamination in in vitro cultures is the pathogens coming with explants. Effects of different dehuskings and concentration of sodium hypochlorite to mature embryo culture of barley were determined. No contamination was observed in mature embryos treated with both dehusking methods (hand and sulfuric acid application) coupled with 5% sodium hypochlorite treatment. In addition, 100% callus formation was observed in these treatments.

Key words: Dehusking, contamination, sodium hypochlorite, *Hordeum vulgare* L.

1. Giriş

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) taneleri malt ve yem olarak kullanılan önemli bir tahıl bitkisidir (Temel ve ark., 2008).

Biyoteknolojik yöntemlerin ilk uygulaması olan doku kültürü yöntemleriyle kültüre alınan bitki hücrelerine ya da dokularına gen aktarımı yapılabilmekte, daha sonra gen aktarılmış bitki kısımları uygun besin ortamında olgun bitki haline getirilerek, aktarılan geni taşıyan transgenik bitkiler elde edilebilmektedir (Aydın, 2010).

Arpada kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu için olgunlaşmamış embriyolar, olgunlaşmamış çiçekler, koleoptiller, olgun embriyolar ve sürgünler eksplant olarak kullanılmıştır (Yadav ve ark., 2011). Bu eksplantlar içersinde bitki rejenerasyonu (Bregitzer ve ark., 2000) ve transformasyon çalışmalarında (Tingay ve ark., 1997) olgunlaşmamış embriyolar en yaygın olarak kullanılan eksplant kaynağıdır. Ancak, son zamanlarda arpa olgun embriyo kültüründe yapılan çalışmalarda (Ganeshan ve ark, 2003; Gurel ve ark., 2009) önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Arpada endosperm destekli olgun embriyoların endosperm desteksiz olgun embriyolara göre bitki rejenerasyon kapasitelerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (He ve Jia 2008).

İn vitro doku kültüründe kontaminasyonun en önemli sebeplerinden biri bitki materyali ile gelen patojenlerdir. Özellikle arpada endosperm destekli olgun embriyo kültüründe bu eksplantın kaynağı olan tohumların kavuzlu olması kültür öncesi eksplant sterilizasyonunun önemini oldukça artırmaktadır.

Arpa olgun embriyo kültüründe gerek endosperm desteksiz olgun embriyo kültüründe (Akula ve ark., 1999; Abumhadi ve ark., 2005; He ve Jia 2008) ve gerekse

endosperm destekli olgun embriyo kültüründe kavuz soymadan yapılan kültürlerde sterilizasyonda genellikle cıva klorür kullanılırken, kavuz soyma yapılan eksplantların sterilizasyonunda ise kalsiyum hipoklorit (Taniguchi ve ark., 1991) veya sodyum hipoklorit (Yadav ve ark., 2011) kullanılmıştır. Bu maddelerden özellikle cıva klorür en toksik inorganik cıva bileşiklerindendir. Diğer taraftan, Bürün ve Çoban Poyrazoğlu (2001) arpa olgun embriyo kültüründe cıva klorürle yapılan sterilizasyonda, cıva klorürün embriyodan bitkicik gelişimi üzerine olumsuz etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, arpada olgun embriyo kültüründe etkili bir sterilizasyon yöntemi ve sterilizasyon yöntemlerinin kallus oluşumuna etkisi belirlenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

Araştırmada eksplant kaynağı olarak 2 sıralı Efes 98 arpa çeşidinin endosperm destekli olgun embriyoları kullanılmıştır. Araştırma tam şansa bağlı deneme planına göre 3 [Kavuz soyma yöntemi (Kavuzlu, elle kavuz soyma ve sülfürik asitle kavuz soyma)] x 3 [Sodyum hipoklorit konsantrasyonu (%1, 2.5 ve 5)] faktöriyel düzende 3 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Elle kavuz soyma işlemi, tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra 2 saat süreyle oda sıcaklığında steril su içersinde bekletildikten sonra yapılmıştır. Sülfürik asitle kavuz soyma işlemi için ise tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra %50'lik sülfürik asit içersinde 25 dakika süreyle karıştırılmış ve kavuzları soyulmuş tohumlar elde edilmiştir. Bu ön işlemlerden sonra tohumlar %70'lik etil alkolde 5 dakika karıştırılarak 3 defa steril saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra birkaç damla Tween 20 (Sigma) içeren yukarıda belirtilen sodyum hipoklorit solüsyonlarında 20 dakika karıştırılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar steril saf su ile yıkandıktan sonra bir gece steril saf su içersinde 4°C'de karanlıkta bekletilmiş ve olgun embriyolar endospermden ayrılmadan 6 eşit parçaya bölünmüştür. Daha sonra 12 mg/l dikamba + 0.5 mg/l IAA içeren MS ortamında 21 gün süreyle 25±1 °C'de kültüre alınmıştır. Ortamın pH'sı 1 N NaOH (Sodyum hidroksit) ile 5.8 ayarlanmıştır. Besi ortamları, sterilizasyon için otoklavda 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'de tutulmuştur. Sıcakta bozulan vitaminler ve bitki büyüme düzenleyicileri için 0.22 µm poroziteli selüloz nitrat filtreler (milipor) kullanılmıştır. 21 günlük kültür sürenin sonunda kallus oluşum oranı (%) [(Oluşan kallus sayısı/Kültüre alınan eksplant sayısı)x100] ve kontaminasyon oranı (%) [(Kontaminasyon görülen eksplant sayısı / Kültüre alınan eksplant sayısı) x100] belirlenmiştir. Kültür süresince gerek kallus oluşumu ve gerekse kontaminasyonlar günlük olarak gözlenmiş ve kontaminasyonun ve kallus oluşumunun ilk görüldüğü kültür zamanı kaydedilmiştir. Araştırmada her petri bir tekerrür olarak kabul edilmiş ve her petri kutusuna 10 adet olgun embriyo bırakılmıştır.

Araştırmadan elde edilen veriler deneme planına göre SPSS 18 bilgisayar programı kullanılarak varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Araştırmada incelen karakterlerde kavuz soyma işlemleri ve sodyum hipoklorit konsantrasyonlarına ait ortalamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Kavuz soyma yönteminin ve sodyum hipoklorit konsantrasyonunun kallus oluşumu ve kontaminasyon oranına olan etkilerinin araştırıldığı bu araştırmada tüm kavuz soyma yöntemlerinde ve sodyum hipoklorit konsantrasyonlarında kallus oluşum oranı %100 olarak gerçekleşmiştir. Kallus oluşumu, sodyum hipoklorit konsantrasyonunun tamamında, kavuzlu ve elle kavuz işleminin yapıldığı yöntemlerde kültürün 2. gününde, sülfürik asitle kavuz soyma işleminin yapıldığı kültürlerde ise 3.

günde görülmüştür.

Araştırmada, kontaminasyonun görüldüğü kültürlerde kontaminasyonların tamamının tohumla birlikte gelen fungus kaynaklı olduğu belirlenmiştir. Kontaminasyonun görüldüğü kültürlerden sülfürik asitle kavuz soyma işleminin yapıldığı ve devamında %1 ve 2.5 sodyum hipoklorit konsantrasyonlarında sterilizasyonun yapıldığı kültürlerde kültürün 7. gününde görülürken, diğerlerinde kültürün 4. gününde görülmüştür.

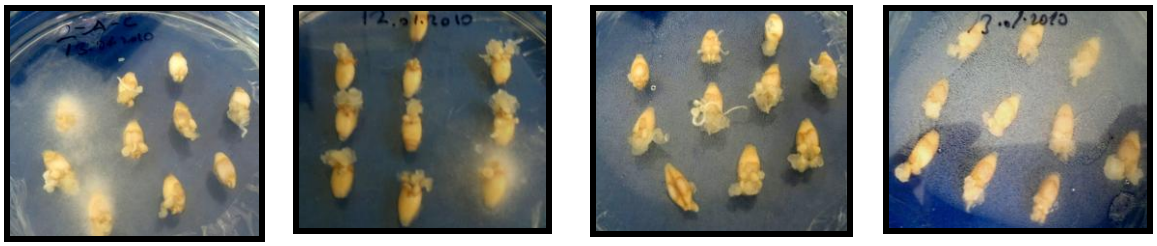
Kontaminasyon oranı üzerine kavuz soyma yönteminin ve sodyum hipoklorit konsantrasyonunun ana etkisi çok önemli (p=0.001) olurken, kavuz soyma yöntemi x sodyum hipoklorit konsatrasyonu interaksiyonun etkisi önemsiz (p=0.559) olmuştur. Kavuz soyma yöntemi bakımından kontaminasyon oranı karşılaştırıldığında en yüksek kontaminasyon oranı %32.2 ile kavuzlu olarak steril edilen ve daha sonra kültüre alınan tohumlarda meydana gelmiştir. En az kontaminasyon ise %7.8 ile sülfürik asitle kavuz soyma işleminin yapıldığı kültürlerde elde edilmiştir. Bu oran, elle kavuz soyma işleminde %14.4 olarak saptanmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Farklı kavuz soyma işlemleri ve sodyum hipoklorit konsantrasyonlarında kontaminasyon oranları ($\overline{X}+S_{\overline{x}}$) (%).

Kavuz Soyma İşlemi	**Sodyum hipoklorit konsantrasyonu (%)**			**Ortalama**
	1	**2.5**	**5.0**	
Kavuzlu	40.0±5.8	36.7±6.7	20.0±5.8	**32.2±4.3A***
Elle kavuz soyma	23.3±3.3	20.0±0.0	0.0±0.0	**14.4±3.8B**
Sülfürik asitle kavuz soyma	16.7±3.3	6.7±3.3	0.0±0.0	**7.8±2.8 B**
Ortalama	**26.7±4.1a***	**21.1±4.8a**	**6.7±3.7b**	

*:Aynı satırda aynı küçük harfle ve aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0.05)

Sodyum hipoklorit konsantrasyonuna göre kontaminasyon oranları karşılaştırıldığında ise sodyum hipoklorit konsantrasyonu artışı ile birlikte kontaminasyon oranında gözle görülür bir azalma meydana gelmiştir. En yüksek kontaminasyon oranı (%26.7) sodyum hipokloritin %1'lik konsantrasyonunda meydana gelirken (Şekil 1A), en az (%6.7) %5'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda belirlenmiştir (Şekil 1B). Bu oran %2.5 konsantrasyonda %21.1 olarak belirlenmiştir (Çizelge 1).



(A) **(B)** **(C)** **(D)**

Şekil 1. Farklı kavuz soyma yöntemlerinde ve sodyum hipoklorit konsantrasyonlarında kallus oluşumunun ve fungus kaynaklı kontaminasyonların görünümü. A) Kavuzlu ve % 1'lik sodyum hipokloritte sterilizasyon B) Kavuzlu ve % 5'lik sodyum hipokloritte sterilizasyon C) Sülfürik asitle kavuz soyma yöntemi ve % 5'lik sodyum hipokloritte sterilizasyon D) Elle kavuz soyma yöntemi ve % 5'lik sodyum hipokloritte sterilizasyon.

Kavuz soyma yöntemi ve sodyum hipoklorit konsantrasyonun kontaminasyon oranı üzerine olan etkileri birlikte incelendiğinde elle veya sülfürik asitle kavuz soyma işleminden sonra %5'lik sodyum hipoklorit ile steril yapılan endosperm destekli olgun embriyo kültürlerinde kontaminasyon meydana gelmediği saptanmıştır (Şekil 1 C, D) (Çizelge 1). Arpada endosperm destekli ve endosperm desteksiz olgun embriyo

kültüründe elle ya da sülfürik asitle kavuz soyma işleminin ve %15'lik ve %50'lik sodyum hipoklorit solüsyonunun kontaminasyon ve kallus oluşum oranı üzerine etkilerini çalışan Han ve ark. (2011), sadece elle kavuz soyma işleminin yapıldığı endosperm destekli olgun embriyolarda kontaminasyon meydana geldiğini (%35.5) bildirmişlerdir. Araştırmamızda ise gerek elle ve gerekse sülfürik asitle kavuz soyma işleminde kallus oluşum oranı %100 olmasına rağmen, arpada endosperm destekli olgun embriyo kültüründe kavuz soyma işleminin elle yapılması ve daha sonra %5'lik sodyum hipokloritle steril edilmesi önerilebilir. Nitekim Han ve ark. (2011), elle kavuz soyma işleminin yapıldığı kültürlerde (%41.7) sülfürik asitle kavuz soyulanlara (%26.1) göre daha yüksek kallus oluşumun olduğunu bildirmişlerdir.

Kaynaklar

Abumhadi, N., Kamenarova, K., Todorovska, E., Dimov, G., Trifonova, A., Gecheff, K., Atanassov, A., 2005. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos (Hordeum vulgare L.). Biotech Biotechnol Eq 19:32–38

Akula, C., Akula, A., Henry, R., 1999. Improved regeneration efficiency from mature embryos of barley cultivars. Biol Plant 42(4):505–513

Aydın, M., 2010. Bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlenmesi, Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Bregitzer, P., Campbell, R.D., Dahleen, L.S., Lemaux, P.G., Cho, M.J., 2000. Development of transformation systems for elite barley cultivars. Barley Genet Newslett 30:1–4

Bürün, B., Çoban Poyrazoğlu, E., 2002. Embryo Culture in Barley (*Hordeum vulgare* L.). Turk J Biol.26: 175-180

Ganeshan, S., Baga, M., Harvey, B.L., Rossnagel, B.G., Scoles, G.J., Chibbar, R.N., 2003. Production of multiple shoots from thidiazurontreated imature embryos and leaf-base / apical meristems of barley *(Hordeum vulgare)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 57–64

Gurel, F., Karakas, Ö., Albayrak, G., Ari, Ş., 2009. Regeneration capacity of mature embryo derived callus in barley *(Hordeum vulgare L.).* Acta Biol Hung 60:309–319.

Han, Y., Jin, X., Wu, F., Zhang, G., 2011. Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). J Zhejiang Univ-Sci (Biomed & Biotechnol) 12(5):399-407.

He,T., Jia, J.F., 2008. High frequency plant regeneration from mature embryo explants of highland barley (*Hordeum vulgare* L. nudum Hk.f.) under endosperm supported culture. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 95: 251-254.

Taniguchi, M., Enomoto, S., Komatsuda, T., Nakajima, K., Ohyama, K., 1991. Varietal differences in the ability of callus formation and plant regeneration from mature embryo in barley (Hordeum vulgare). Japan J. Breed., 41:571-579.

Temel, A., Kartal, G., Gözükırmızı, N., 2008. Genetic and Epigenetic Variations in Barley Calli Cultures. Biotechnology and Biotechnology Equipment 22 (4): 911–914.

Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S., Brettel, R.,1997. Agrobacterium tumefaciens mediated barley transformation. Plant J 11:1369–1376

Yadav ,T., Kothari, S. L., Kachhwaha S., 2011. Evaluation of regeneration potential of mature embryo derived callus in Indian cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). J. Plant Biochem. Biotechnol. DOI 10.1007/s13562-011-0042-9