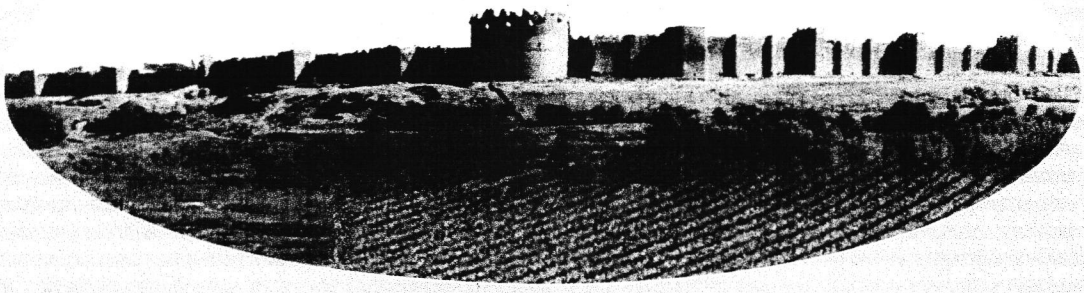
T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
ZİRAAT FAKÜLTESİ
TARLA BİTKİLERİ BÖLÜMÜ ve
TARLA BİTKİLERİ BİLİMİ DERNEĞİ

TÜRKİYE
5. TARLA BİTKİLERİ KONGRESİ



TARLA BİTKİLERİ ISLAHI

13 - 17 EKİM 2003
DİYARBAKIR

CİLT

BUĞDAYDA OLGUNLAŞMAMIŞ EMBRİYO KÜLTÜRÜNÜ ETKİLEYEN BAZI FAKTÖRLERİN İNCELENMESİ

Kamil HALİLOĞLU[1], Sevim SAĞSÖZ[1], Metin TOSUN[1], Mahmut S. TAŞPINAR[1], Murat AYDIN[1]

[1] kamilh@atauni.edu.tr *Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 25240 Erzurum*

ÖZET

Bu çalışmamızda, üç kışlık buğday genotipi (Alliance, 2137 ve NE92456), iki farklı bitki besi ortamında (CM4C ve MSB5) denemeye alınmıştır. Otuz günlük bir süre içerisinde oluşan kallusların, yaş (taze) ve kuru ağırlıkları tespit edilmiştir. Somatik embryogenesis sonucunda üç genotipin ve iki besi ortamının yeşil aksam, kök ve sürgün oluşumuna etkileri araştırılmıştır. CM4C yapay besi ortamı diğer ortama göre daha etkili bulunmuştur. NE92456 genotipi kallus oluşturma, somatik embryo sayısı ve yeni bitki rejenerasyonu açısından diğer genotiplere göre daha üstün bulunmuştur. Buna karşılık, Alliance genotipi oluşturduğu kallusların küçük ve içerdiği nem miktarının fazla olması bitki rejenerasyonu yönünden düşük performans göstermesine sebep olmuştur. Genotip x ortam intereaksiyonu yaş, kuru ve taşıdıkları nem miktarı açısından gözlenmiştir. Ayrıca *in vitro* şartlarda oluşan kallusların yaş, kuru ağırlıkları ve taşıdıkları nem miktarı ile rejenere olan yeni bitkicikler arasında negatif korelasyon bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Olgunlaşmamış embriyo, kallus oluşumu, in vitro rejenerasyon*

INVESTIGATION OF SOME FACTORS AFFECTING ON IMMATURE EMBRYO CULTURE IN WHEAT

ABSTRACT

Three winter genotypes (Alliance, 2137 and NE92456) and two different callus initiation media were used in this study. Fresh and dry weights of calli formed in 30 days were measured. Effects of three genotypes in two initiation media to formation of shoot, root and plantlets were determined. CM4C medium was more affected than the other medium. In addition, genotype NE92456 was found to be the best genotype in terms of callus induction, number of somatic embryos as well as the plant regeneration. Genotype Alliance demonstrated the poorest callus characters. Genotype x Media interactions were observed for fresh, dry and moisture content of callus. Moreover, there was a significant negative correlation between callus fresh, dry weights and number of plant regeneration.

Keywords: *Immature embryo, callus formation, in-vitro regeneration*

GİRİŞ

Buğday tartışmasız dünya ve ülkemiz için besin maddesi sağlayan en önemli bitkidir. Artan dünya nufusu, önümüzdeki 30-40 yıl içerisinde ikiye katlanacağı düşünülürse, dünya açlık probleminin çok yakın sürede kapımızı çalacağı bir gerçektir. Bu çerçeve içerisinde buğdayın, dünya nüfusunu beslemede çok önemli bir rol oynacağı kesindir.

Biyoteknolojinin (gen aktarılması) sunduğu imkanlarla klasik ıslahın birleştirildiğinde önemli katkılar buğday iyileştirilmesine yapılabilir. Gen aktarma ve klasik ıslah metodlarının birleştirilmesinde birinci basamak olarak, gen aktarmaya uygun ve ebeveyn olarak kullanılabilecek elit genotiplerin seçilmesidir. Gen aktarma, etkili bir kallus başlangıcı, rejenerasyon sistemi ve ideal olarakta buğday ıslahı için ebeveynlerin aynı büyüme alışkanlığına ve pazarlama sınıfına ayrıca benzer adaptasyon genlerine sahip olması gerekmektedir.

Başarılı bir *in vitro* gen aktarma sisteminin oluşturulabilmesindeki kritik noktalardan bir tanesi kullanılan eksplantin (başlangıç materyalinin) gen aktarmaya uygun bir doku oluşturabilme ve gen aktarılmış dokununda tüm bir bitki rejenere etme yeteneğidir. Bu açıdan buğday (*Triticum aestivum* L.) olgunlaşmamış embriyo kültürü büyük ölçekte tüm bir bitkiyi rejenere etme açısından (Ahloowalia, 1982; Sears ve Deckard, 1982; Ozias-Akins ve Vasil, 1982) ve buğday gen aktarma çalışmalarında yoğun bir şekilde kullanılmasından dolayı (Weeks ve ark., 1993; Cheng ve ark., 1997; ve Haliloglu ve Baenziger, 2003) önemli bir kaynak teşkil etmektedir. Birçok çalışmalarda (Sears ve Deckard, 1982; Mathias and Simpson, 1986; Fennel et al., 1995) kullanılan eksplantin genotipi, kallus oluşturma ve olgunlaşmış embriyolardan bitki rejenerasyonu açısından önemli bir rol oynamaktadır.

In vitro şartlarda yeni bitki rejenerasyonunun etkinliğini gösteren bir çok faktör bulunmaktadır. Bunlar arasında, oluşan kallusun, yaş ve kuru ağırlıkları bununla beraber aralarındaki farkın morfogenesis ve yeni bitki rejenerasyolarına etkisi bu araştırmanın kapsamı içerisindedir. Üç farklı kışlık buğdayın oluşturduğu kallus ve diğer in vitro parametreler arasındaki ilişkler araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM:

Bu araştırmada, üç farklı kışlık buğday genotipi (Alliance, 2137 ve NE92456) kullanılmıştır. Petri kaplarında çimlendirilmiş buğday tohumları, 6 hafta süreyle 4 ^{0}C'de iklimlerdirme odasında vernalize edilmiştir. Vernalize edilen bitkiler 2 toprak : 1 kum : 1 peat karışımı ile doldurulan saksılara şaşırtılarak büyüme odasına alınmıştır. Büyütme odasındaki çevre şartları, 18/13 ^{o}C gündüz ve gece sıcaklığı, 12 saat gün uzunluğu ve 350 µmol s^{-1} m^{-2} ışık siddetine ayarlanmıştır. Bu ortamda 4 hafta süreyle yetiştirilen bitkiler daha sonra aynı sıcaklık

rejimine sahip fakat 16 saat gün uzunluğu olan diğer iklimlerdirme odasına aktarılmıştır. Bitkiler etkin büyümenin devamı için haftalık olarak 20-4.4-16.6 (N-P-K) ile gübrelenmiştir.

Başaklar, çiçeklenmeden 14 gün sonra hasat edilmiş ve taneler, 2-3 dakika % 1.05 lik ticari sodyum hipoklorit (sodium hypo-chlorite (NaOCl) solusyonu içerisinde sterilize edilmiş ve 5 defa steril su (ddH_2O) ile yıkanmıştır. Olgunlaşmış embriyolar pens yardımı ile izole edilmiş ve petri kaplarında yapay besi ortamı içerisinde kültüre alınmıştır. Her bir genotipten 100 adet embriyo aseptik olarak çıkarılmış ve her bir petri kabında 25 adet embriyo olmak üzere 4 tekerrürlü olarak deneme kurulmuştur. Araştırmada, CM4C (Cheng et al. 1997) ve MSB5 yapay besi ortamı (tam güç MS tuzları, B5 vitaminleri; 100 mg L^{-1} myo-inositol, 1 mg L^{-1} nicotinic acid, pyrodoxie HCl, thiamine, and 2 mg L^{-1} 2,4-D, 30 gr L^{-1} sucrose, 6 gr L^{-1} agar at pH 5.8) ortamları kullanılmıştır. Olgunlaşmamış embriyolar bir ay süre ile kallus başlangıç ortamlarında tutulmuş ve oluşturdukları kallusların ağırlıkları yaş ve kuru olarak tayin edilmiştir. Ayrıca morfogenesis karakterlerin gözlemleri yapılmış, oluşturdukları kök, sürgün ve embriyogenik kallusların sayımları yapılmıştır.

Denemeler, faktoriyel deneme desenine göre kurulmuştur. Her bir petri kabı, deneme ünitesi olarak alınmıştır. Elde edilen sonuçlar SAS/PC istatistik programı kullanılarak, varyans analizi ve Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. (SAS Institute Inc., 1996). Ayrıca yaş ve kuru kallus ağırlıklarının diğer *in-vitro* karakterleri ile ilgileri Pearson Korelasyonu ile tespit edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Üç farklı genotipin oluşturduğu kallusların ağırlıkları yaş, kuru ve aralarındaki farklar (nem miktarı) istatiksel olarak önemli bulunmuştur. NE92456 genotipi, diğer genotiplere göre üç karakter açısından daha fazla kallus ağırlığı oluşturmuştur (Çizelge 1). Buna karşılık, Alliance genotipi ise, daha düşük bir performans göstermiştir. Bu sonuçlarda, kallus oluşumuna ve niteliği yüksek oranda genotipe bağlıdır. Buğday olgunlaşmamış embriyo kültürünün, kallus başlangıcı, devamlılığı ve yeni bitki rejenerasyonu geniş ölçüde kullanılan genotipe bağlıdır (He ve ark, 1988; Ahloowalia ve ark, 1982; Carman ve ark, 1988). Maddock ve ark. (1987) yaptığı araştırmada embriyo oluşumu ve sürgün rejenerasyonu kullanılan 25 çeşit üzerinde %12 ile %96 arasında değişmiştir. Doku kültürünü kontrol eden genleri bulmak için birçok araştırıcı bu konu üzerinde çalışmıştır. Sears ve Deckards (1982) 39 kışlık buğday genotipinde araştırma yapmışlar, ND7532 genotipini olgunlaşmış embriyo kültürüne en fazla cevap veren çeşit olarak bulmuşlardır. Bu genotipte, diğer gnotplerden farklı olarak yüksek oranda kallus oluşumu, yüksek *in-vitro* büyüme oranı ve totipotent kallus oluşumu bulmuştur. Çizelge 1'de görüldüğü gibi, Alliance genotipi en fazla nem miktarına sahip kallusları içermektedir (0,08537 gr).

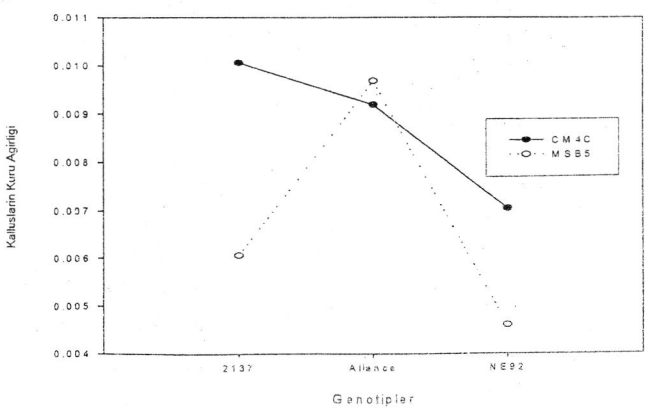
Çizelge 1. Üç farklı kışlık buğday genotipinin kallus ağırlıklarına verdikleri cevaplar

Genotipler	Kallusların Yaş Ağırlıkları (gr)	Kallusların Kuru Ağırlıkları (gr)	Nem Miktarı (Yaş ve Kuru Ağrılık Farkı -gr)
NE92456	0.065985 A	0.00583 A	.05842 A
2137	0.072132 A	0.00748 B	.06465 A
Alliance	0.094807 B	0.00943 C	.08537 B

Duncan Çoklu Karşılaştırma ($p \leq 0,05$)

Kallus içerisindeki nem miktarı, somatik embriyogenesisi ve yeşil bitki rejenerasyonunu etkilemektedir. Nem miktarına ters orantılı olarak somtaik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu meydana gelmektedir. Alliance genotipinin düşük somatik embriyo oluşturması ve buna bağlı olarakta düşük bitki rejenerasyonu, kalluslarının taşıdığı yüksek nem miktarından kaynaklandığı söylenebilir. Kallusların yaş ağırlıkları ve taşıdıkları nem miktarları açısından, NE92456 ve 2137 genotipleri aynı grup altında gözelenmelerine rağmen, kallusların kuru ağırlıkları açısından farklı grup altında gözlenmişlerdir. Buna karşılık, Alliance genotipi, her bir karakter açısından da ayrı bir grup meydana getirmilştir.

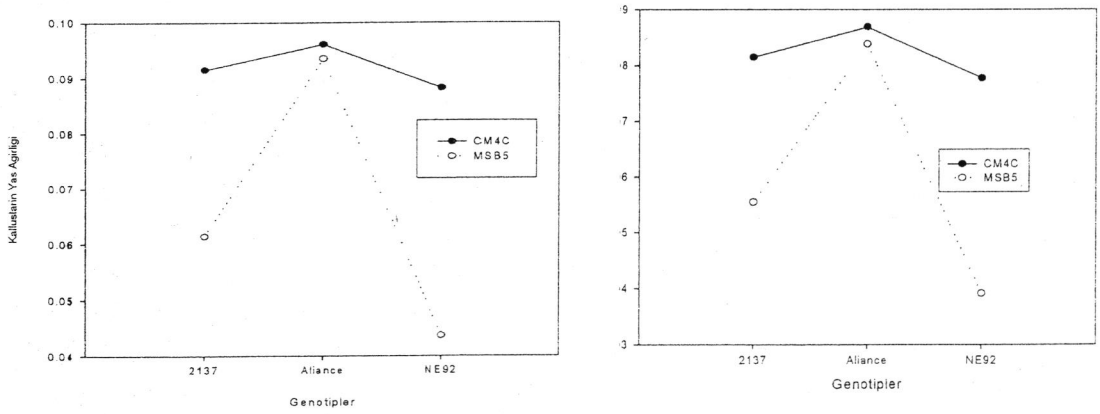
Ayrıca varyans analizleri kullanılan yapay besi ortamları arasındaki farklılığıda önemli göstermiştir. CM4C ortamı kallus oluşumuna MSB5 ortamına göre daha etkili olmuştur. Bir çok araştırıcı tarafından, besi ortamı ve kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri somatik embryogenesise ve bitki rejenerasyonuna etkili olduklarını bildirmişlerdir (Hunsiger et al., 1987). Özellikle, oksin kaynağı olarak 2,4-D kullanılmaktadır. Araştırmamızda MSB5 besi ortamında da 2 mg/L 2,4-D kullanılmıştır. Bunun yanında, son zamanlarda sentetik oksinlerde kullanılmaktadır ve buğday in-vitro kültürlerinde



en fazla kullanılanıda picloram (4-Amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) dır (Zhou et al., 1995; Cheng et al., 1997). Araştırmamızda da 2,2 mg.L picloram CM4C besi ortamında kullanılmıştır.

Bununla beraber, genotip x ortam interaksiyonları, kallusların yaş, kuru ve nem miktarları içinde önemli bulunmuştur. Şekil 1A, B ve C genotip x ortam interasiyonlarını göstermektedir. Bununla beraber, kallus oluşumu ile ilgili olan karakterler bitki rejenerasyonu için etkili faktörlerle olan ilişkisine bakılmış ve tüm kallus özellikleri ile oluşan bitkicik sayısı arasında önemli (negatif) korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu karakterler *in-vitro* şartlarda oluşacak bitki sayısını direk olarak etkilemektedir.

Şekil 1. A) Genotip x Ortam İlişkileri (YA) B) Genotip x Ortam İlişkileri (KA)



C) Genotip x Ortam İlişkileri (Nem Miktarı)

Çizelge 2 *in-vitro* olgunlaşmamış embriyo kültürü içerisindeki karakterlerin korelasyonunu göstermektedir. Ayrıca, kallusların yaş ağırlıkları ile kuru ağırlıkları ve içerdiği nem miktarı arasında da önemli pozitif korelasyonlar bulunmuştur. Buna karşılık, kallus başlangıç ve bitki rejenerasyonu biribrlerinden bağımsız olarak kontrol edildikleri bilinmektedir (Sears ve Deckards, 1982; Özgen ve ark., 1996). Önemli bir ilişkinin kallus başlangıcı ve bitki rejenerasyonu arasında olmaması, bu iki karakterin farklı genler tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Bu çalışmamızda, kallus oluştuktan sonraki özellikler, bitki rejenerasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir

Çizelge 2: Buğday olgunlaşmamış embriyo kültürümü etkileyen karakterler arasındaki ilişkiyi gösteren Pearson Korelasyonu

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Somatik Embriyo Sayısı	**Kök Sayısı**	**Sürgün Sayısı**	**Bitkicik Sayısı**	**Yeşil spotlar bulunduran somatik embriyo sayısı**	**YA**	**KA**	**Nem Miktarı**
1	1	.601	.396	-.335	-.146	.515	.452	.536
2		1	.589	.070	.116	.361	.170	.379
3			1	.682	-.130	-.127	-.234	-.122
4				1	.219	-.740*	-.763*	-.745*
5					1	-.609	-.510	-.584
6						1	.912**	.999**
7							1	.918**
8								1

** Korelasyon önemli (0.05)*
*** Korelasyon önemli (0.01)*

SONUÇ

Sonuç olarak, üç kışlık buğday genotipi olgunlaşmamış embriyo kültürüne farklı cevap vermiştir. Bu sonuçta olgunlaşmamış embriyo kültürü genotipe bağlıdır gerçeğini desteklemektedir. NE92456 genotipi in vitro şartlara daha iyi cevap vermiş ve daha fazla bitki rejenere olmuştur. Buna karşılık, Alliance genotipi oluşturduğu kallusların küçük ve içerdiği nem miktarının fazla olması bitki rejenerasyonu yönünden düşük performans göstermesine sebep olmuştur. Genotip x ortam intereaksiyonu yaş, kuru ve taşıdıkları nem miktarı açısından gözlenmiştir.Ayrıca *in vitro* şartlarda oluşan kallusların yaş, kuru ağırlıkları ve taşıdıkları nem miktarı ile rejenere olan yeni bitkicikler arasında negatif korelasyon bulunmuştur.

KAYNAKLAR

Ahloowalia, B.S. 1982. Plat regeneration from callus culture in wheat. Crop Sci. 22:405-410

Carman, J.G., Jefferson, N.E., and Campbell, W.F 1988. Induction of Embryogenic *Triticum aestivem* L. calli. I. Quantification of genotype and culture medium effects, Plant Cell Tiss. Organ Cult., 10:101.

Cheng, M, Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, W. and Wan, Y.C. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens.* Plant Physiology 115: 971-980.

Fennell, S., Bohorova, N., van Ginkel, M Crossa, J., and Hoisington, D. 1995. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. Theor Appl Genet 92:163-169.

Haliloglu, K., and Baenziger, P.S. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated wheat transformation Cereal Research Communications 31: 9-16

He, D. G., Yang, Y.M., and Scott, K.J. 1988. A comparison of scutellum callus and epiblast callus induction in wheat: the effect of genotype, embryo age and medium, Plant Sci., 57: 225.

Husinger, H. and Schauz, K., 1987. The influence of dicamba on somatic embryogenesis and frequency of plant regeneration from cultured embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) Plant Breed., 98:119

Maddock, S.E., Lancaster, V.A., Risiott, R., Franklin, J., 1987. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorences of 25 cultivars of wheat., Exp. Bot., 34:915.

Mathias, R.J., and Simpson, E.S. 1986. The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) callus. Plant Cell Tissue Org. Cult. 7:31-37.

Ozias_Akins, P., and Vasil, I.K. 1982. Plant regeneration from cultred immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat) evidence for somatic embryogenesis. Protoplasma 110:95-105.

Özgen, M., Turet, M., Ozcan, S., Sancak,C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. Plant Breed 115:455-458

SAS Institute Inc. 1996. SAS/STAT Software. Changes and Enhancements Through Release 6.11. SAS Institute, Cary, NC.

Sears, R.G., and Deckard, E.L. 1982. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. Crop Sci. 22:546-550.

Weeks, J.T, Anderson OD, Blechl A 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat *(Triticum aestivum* L). Plant Physiol 102: 1077-1084.

Zhou, H., Arrowsmith, J.W., Fromm, M.E., Hironaka, C.M., Taylor, M.L., Rodriguez, D., Pajeau, M.E., Brown, S.M., Santino, C.G., and Fry, J.E. 1995. Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. Plant Cell Rep. 15:159-163