Bazı Mısır Genotiplerinin Olgun Embriyo Kültürüne Tepkilerinin Belirlenmesi

Esin Dadaşoğlu[1], Metin Tosun[1]

[1]Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 25240, Erzurum
Sorumlu Yazar: esinsahin@atauni.edu.tr

Özet

Araştırmada Erzurum'un Tortum, İspir ve Oltu ilçelerine ait yerel mısır çeşitleri ile Biotech tohumculuktan temin edilen ANT-90 hibrit mısır çeşidi olmak üzere 4 farklı mısır genotipi kullanılmıştır. Denemede olgun mısır tohumları eksplant olarak kullanılmak suretiyle, kallus oluşumu için en uygun ortam optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla 4 farklı çeşide ait 2 farklı embriyo tipi (endosperm destekli embriyo ve endosperm desteksiz embriyo), iki oksin tipi (2,4-D ve dikamba) ve her oksin tipinin 6 farklı dozu (2, 4, 6, 8, 10 ve 12 mg/l) ile bu oksin tiplerinin 6 farklı kombinasyonu (1+1, 2+2, 3+3, 4+4, 5+5, 6+6 mg/l) kullanılmış ve bunların kallus oluşumu üzerine olan etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda mısır bitkisine ait farklı genotip, eksplant, hormon ve dozlarının kallus oluşumu üzerine önemli derecede etki ettiği ayrıca genotip x eksplant, eksplant x hormon ve genotip x eksplant x doz interaksiyonu dışında diğer tüm interaksiyonların önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Mısır, doku kültürü, hormon, olgun embriyo

Effects of Some Maize Genotypes on Mature Embryo Culture

Abstract

Four different maize genotypes such as three native maize varieties of Erzurum (Tortum, Ispir and Oltu) and one hybrid maize type obtained from Seed Biotech were investigated in the study. In the experiment, the most suitable medium for callus formation was tried to optimize by using mature seed of maize as an explant. For this goal, 2 different embryo types belonging to 4 different species (endosperm supported and non-endosperm supported embryo), two auxin types (2,4-D and dicamba), and 6 different doses for each auxin types (2, 4, 6, 8, 10 and 12 mg/l) and 6 different combinations of these auxin types (1+1, 2+2, 3+3, 4+4, 5+5, 6 +6 mg /l) were used and investigated the their effects on the callus formation. As a result of the study, it is determined that different genotypes, explants, hormones and doses belonging to maize significantly effect on the callus formation and also all interactions were found to be important without genotype x explant, explant x hormone and genotype x explant x dose interaction.

Keywords: Maize, tissue culture, hormone, mature embryo

Giriş

Artan dünya nüfusunun besin maddesi ihtiyacını karşılamak, ancak birim alandan elde edilen verimin artırılmasına bağlıdır. Bilindiği gibi hem dünyada hem de ülkemizde insan beslenmesinde tahıllar ve bunlardan üretilen ürünler oldukça önem arz etmektedir. Dünyada başlıca temel ürünlerden birisi olan mısır, tahıllar grubu içerisinde üçüncü sırada yer almaktadır (Rafiq ve ark. 2006). Mısır, üretim bakımından dünyada buğdaydan sonra ikinci, Türkiye'de ise buğday ve arpadan sonra üçüncü sırada yer almaktadır (Tuik 2008). Ayrıca, birim alandan elde edilen verimin yüksek olması, silaj yapımına uygunluğu ve elde edilen silajın besleme değerinin yüksek olması mısır bitkisini tahıllar içerisinde önemli kılan özellikler arasında sayılabilir. Serin iklim tahılları içerisinde buğday ve arpadan sonra kültüre alınan bitkilerden birisi olan mısır, iklim istekleri, özellikle sıcaklık isteği bakımından tahıllar içerisinde seçiciliği fazla olan bitkidir.

Bitki doku kültürü, ana bitkiden izole edilen hücre, doku veya organların yapay besi ortamında yetiştirilmesi esasına dayanan bir uygulamadır (George ve ark. 2007). Yıllardan beri tahıllarda devam eden doku kültürü çalışmaları sonucunda doku kültürüne en uygun tahılların çeltik ve mısır olduğu sonucuna varılmıştır (Ganeshan ve ark. 2006). Olgunlaşmamış embriyolar *in vitro* koşullarda rejenerasyon yönünden en iyi eksplant kaynağı Akins ve Vasil, (1982) olmalarına karşın, olgunlaşmamış embriyoların yılın her döneminde temini zor olduğu için doku kültürü çalışmalarının yapılacağı dönem sınırlıdır. Bu nedenle, tahıllarda doku kültürü çalışmalarında eksplant kaynağı olarak olgun embriyolardan yararlanılma yoluna gidilmiştir. Olgun embriyoya sahip tohumların temininin kolay olması ve donör bitkiye gereksinim duyulmaması, nedeniyle tahıllarda doku kültürü çalışmalarında olgun embriyo kullanımı yönünde çalışmalar başlatılmıştır (Ganeshan ve ark. 2006). Ancak, olgun embriyoların eksplant kaynağı olarak kullanılmalarında karşılaşılan en büyük sorun düşük rejenerasyon yeteneğidir (Chen ve ark. 2006). Somaklonal varyasyon oluşturmak ve başarılı bir gen aktarım sisteminin uygulanabilirliği için ön koşul, bitki hücre ve dokularından güvenilir bir bitki rejenerasyon sisteminin geliştirilmesidir (Abumhadi ve ark. 2005).

Günümüze kadar uygulanan klasik ıslah yöntemleri sayesinde bitkisel ürünlerin kalite ve miktarında önemli artışlar sağlanmış olmasına rağmen, günümüzde özellikle hastalık ve zararlılara dayanıklılık başta olmak üzere kültür bitkilerinin diğer birçok tarımsal özelliklerinin iyileştirilmesinde klasik ıslah yöntemleri ya yetersiz kalmakta ya da oldukça uzun bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda moleküler genetik, doku kültürü ve rekombinant DNA teknolojisi gibi konuları kapsayan bitki biyoteknolojisi yöntemleri bitki ıslahında yeni olanaklar sağlamaktadır. Bitki biyoteknolojisi yöntemleri varyasyon yaratma, mevcut varyasyon kaynaklarından yararlanma ve arzu edilen karakterlerin farklı bitki türlerinden veya organizmalardan gen halinde izole edilerek bitkilere aktarılmasına olanak sağlayarak, klasik bitki ıslahı yöntemlerinin etkinliğini artırmaktadır. Bu çalışmanın amacı, mısırda olgun tohumlar eksplant olarak kullanılmak suretiyle, kallus oluşumu için en uygun ortam optimize etmektir. Bu amaçla 4 farklı çeşide ait, 2 farklı embriyo tipi ve iki oksin tipi her oksin tipinin 6 farklı dozu ve bu oksin tiplerinin 6 farklı kombinasyonu kullanılmış ve bunların kallus oluşumu üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Araştırma, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvarında yürütülmüştür. Araştırmada, Erzurum'un Tortum, İspir ve Oltu ilçelerine ait üç yerel mısır çeşidi ile Biotech tohumculuktan temin ettiğimiz ANT-90 kodlu hibrit mısır çeşidi olmak üzere 4 farklı mısır genotipi kullanılmıştır.

Mısır bitkisinin tohumları % 70'lik alkol ile (EtOH) 10 dakika ve % 20'lik çamaşır suyu ile 30 dakika yüzey sterilizasyonundan sonra steril saf su ile 3 kez durulama işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra ise tohumlar içerisinde steril su bulunan şişelerde 48 saat süre ile bekletilmiştir. Kallus oluşumu için embriyolar (endosperm destekli embriyo ve endosperm desteksiz embriyo) iki oksin tipi (2,4-D ve dikamba) ve her oksin tipinin 6 farklı dozu (2, 4, 6, 8, 10 ve 12 mg/l) ve bu oksin tiplerinin 6 farklı kombinasyonunu (1+1, 2+2, 3+3, 4+4, 5+5, 6+6 mg/l) içeren MS (Murashige ve Skoog 1962) ortamında denemeye alınmışlardır. Endosperm destekli embriyolar tohum üzerinde bistüri ile 6 parçaya bölünerek kültüre alınmıştır.

Ayrıca kullanılan ortama MES (1,95 g/l), askorbik asit (100 mg/l), karbonhidrat kaynağı olarak sukroz (30 g/l) ve jel yapıcı madde olarak phytagel (1,8 g/l) ilave edilmiştir. Ortamın pH'sı 5,8'e ayarlandıktan sonra 20 dakika süreyle 121 °C'de 105 kPa'da otoklavda sterilizasyon yapılmıştır. İşlem uygulanmış embriyolar MS besin ortamına aktarılmışlardır. Kallus oluşumu için 25±1^{0}C'de 3 hafta süreyle karanlık ortamda tutulmuş ve daha sonra

embriyogenik kallus oluşumunu artırmak için 2 mg/l 2,4-D içeren ortamda 2 hafta süre ile alt kültüre alınmıştır. Aydınlatma kaynağı olarak floresan lambası kullanılmış ve yoğunluğu 1500 lüks olarak ayarlanmıştır. Her petri bir tekerrür olarak kabul edilip, her petri kutusuna 9 adet olgun embriyo bırakılmış ve çalışma tam şansa bağlı deneme planına göre 4 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Kallus oluşum oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.
Kallus oluşum oranı (%)= Oluşan kallus sayısı / Kültüre alınan eksplant sayısı x 100

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Yapılan çalışma sonucunda mısır bitkisine ait farklı genotip, eksplant, hormon ve dozlarının kallus oluşumu üzerine önemli derecede etki ettiği ayrıca genotip x eksplant, eksplant x hormon ve genotip x eksplant x doz interaksiyonu dışında diğer tüm interaksiyonların önemli olduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 1).

Tüm uygulamaların ortalaması dikkate alındığında kallus oluşum oranı yönünden ilk sırayı %76.00'lık oran ile İspir almış, bunu Oltu (%56,79) ve Tortum (%55,49) yerel çeşitleri izlemiş, ANT-90 hibrit mısır çeşidi ise % 48,07'lik oran ile son sırada yer almıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Mısır bitkisinde kallus oluşum oranına (%) ait veriler.

Faktörler	Kallus oluşum oranı (%)	Varyasyon kaynakları	Önemlilik derecesi
Genotip			
Tortum	55,94b	G	**
İspir	76,00a	E	**
Oltu	56,79b	H	**
Ant-90	48,07c	D	**
Hormon		G*E	NS
2,4-D	53,58c	G*H	*
dikamba	66,67a	G*D	**
2,4-D +dikamba	57,35b	E*H	NS
Doz		E*D	**
2 mg/l	59,03a	H*D	**
4 mg/l	63,20a	G*E*H	**
6 mg/l	52,20b	G*E*D	NS
8 mg/l	62,73a	G*H*D	**
10 mg/l	63,20a	E*H*D	**
12 mg/l	54,86b	G*E*H*D	**
Eksplant			
Tam embriyo	54,89b		
Kesilmiş embriyo	63,53a		

Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir.
*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, NS: önemsiz.

Hormon tipleri yönünden değerlendirildiğinde, dikambanın (%66,67) hem 2,4-D'den (%53,58) hem de 2,4-D + dikamba kombinasyonundan (%57,35) daha etkili olduğu görülmektedir (Çizelge 1). Hormon dozları ortalamaları yönünden dikkate alındığında, kallus oluşum oranı üzerine hormonların 2, 4, 8 ve 10 mg/l'lik dozlarının en etkili dozlar oldukları ve bunların istatistiksel olarak aynı grupta yer aldıkları belirlenmiştir. Diğer taraftan, embriyodan kesimin yapıldığı (kesilmiş embriyo) eksplant tipinin (%63,53) kullanılması durumunda, tam embriyonun (%54,89) kullanılmasına göre kallus oluşum oranı daha yüksek olmuştur.

Bu araştırmada kallus oluşum oranı yönünde genotipler arasındaki farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde, mısırda olgunlaşmamış embriyolar kulanılarak daha önce yapılan çalışmalarda (Carvalho ve ark. 1997, Özcan, 2002, Ombori ve ark. 2008, Binott ve ark. 2008, Deng ve ark. 2009) farklı genotipler kullanılmış ve genotipler arasındaki farklılıkların önemli olduğu belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada 2,4-D ve dikamba olmak üzere iki farklı oksin tipi kullanılmış ve bunlardan dikambanın diğerinden daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak mısırda daha

önce yapılan çalışmaların çoğunda (Ombori ve ark. 2008, Abebe ve ark. 2008, Huang ve Wei, 2004, Jia ve ark. 2008) oksin tipi olarak yalnızca 2,4-D kullanılmıştır. Bu yönüyle değerlendirildiğinde, dikambanın iyi bir seçim olabileceği görülmektedir. Ancak kesin sonuca varabilmek için konu ile ilgili daha çok çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak mısırda yüksek oranda (%100) kallus oluşumunu temin edebilmek için genotip olarak İspir, eksplant tipi olarak endosperm destekli embriyo, hormon tipi ve dozu olarak dikambanın 2 mg/l'lik dozu önerilebilir.

Kaynaklar

Abebe, D.Z., Teffera, W. and Machuka, J.S. 2008. Regeneration of tropical maize lines (*Zea mays* L.) from mature zygotic embryo through callus initiation. African Journal of Biotechnology. 7(13):2181-2186.

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.), Biotechnol.& Biotechnol. Eq. 19/3.

Akins, P.O., Vasil, I.K., 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis, Journal Article, , Volume-110, Numbers: 2, pages: 95-105.

Binott, J.J., Songa, J.M., Ininda, J., Njagi, E.M. and Machuka, J. 2008. Plant regeneration from immature embryos of Kenyan maize inbred lines and their respective single cross hybrids through somatic embryogenesis. African Journal of Biotechnology. 7:981-987.

Carvalho, C.H.S., Bohorova, N., Bordallo, P.N., Abreu, L.L., Valicente, F.H., Bressan, W. and Paiva, E. 1997. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. Plant Cell Reports. 17:73-76.

Chen, J. Y., Yue, R.Q, Xu H.X. and Chen X.J., 2006. Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm- supported culture agricultural sciences in China, 5(8): 572-578.

Deng, S., Dong, Z., Zhan, K., Hu, Y., Yin, D. and Cui, D. 2009. Moderate desiccation dramatically improves shoot regeneration from maize (*Zea mays* L.) callus. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 45:99-103.

Ganeshan, S., Chodaparambil, S.V., Baga, M., Fowler.D.B., Hucl, P., Rossnagel, B.G.,and Chibbar, R.N. 2006. İn vitro regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to thidiazuron, (*Hordeum vulgare* L.),. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 85:63-73.

George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G-J. D., 2007. Plant propagation by tissue culture, Volume - 1.

Huang, X.Q. and Wei, Z.M. 2004. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (Zea mays L.). Plant Cell Report. 22:793-800.

Jia, X.X., Zhang, J.W., Wang, H.N. and Kong, W.P. 2008. Efficient maize (*Zea mays* L.) regeneration derived from mature embryos in vitro. Maydica. 53 (239-248).

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

Ombori, O., Gitonga, N.M. and Machuka, J. 2008. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines. Asian Network for Scientific Information. 7(2):224-232.

Özcan, S. 2002. Effect of different genotypes and auxins en efficient somatic embryogenesis from immature zygotic embryo explants of maize. Biotechnology& Biotechnological Equipment. 16:51-57.

Rafiq, M., Fatima, T., Husnain, T., Bashir, K., Khan, M.A. and Riazuddin, S. 2006. Regeneration and transformation of an elite inbred line of maize (*Zea mays* L.) with a gene from Bacillus thuringiensis. South African Journal of Botany. (72) 460-466.

Tuik, 2008, Türkiye İstatistik Kurumu**,** http://www.tuik.gov.tr (04.08.2009).