Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi, 25-27 Haziran 2007, Erzurum (Poster Bildiri)

BUĞDAYDA OLGUN EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE EKSPLANT KAYNAKLI KONTAMİNASYONUN AZALTILMASI

Kamil HALİLOĞLU Murat AYDIN Emre İLHAN Metin TOSUN

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Erzurum

ÖZET: *İn vitro* doku kültüründe kontaminasyonun ana sebeplerinden biri bitki materyalleriyle birlikte gelen patojenlerdir. Etkin bir yüzey sterilizasyonu *in vitro* bitki rejenerasyonundaki başarıyı artırmaktadır. Bu amaçla yapılan bu çalışmada buğday olgun embriyoları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Olgun embriyoların kaynağı olan tohumlara 8 farklı sterilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu sterilizasyon yöntemleri sterilizasyondan önce ve sonra ıslatılan tohumlara uygulanarak ıslatma işleminin uygulama döneminin kontaminasyon oluşumundaki etkisi de araştırılmıştır. Islatma işlemi sterilizasyondan önce yapıldığında tüm sterilizasyon yöntemlerinin uygulandığı kültürlerde fungus ve bakteri kaynaklı kontaminasyonlar gözlemlenmiş, buna karşın ıslatma uygulaması sterilizasyondan sonra yapıldığında tüm sterilizasyon yöntemlerinin uygulandığı kültürlerde kontaminasyon gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Buğday, olgun embriyo, kontaminasyon

REDUCED OF EXPLANT INDUCED CONTAMINATION IN MATURE EMBRYO CULTURE IN WHEAT

ABSTRACT: One of the main reasons of contamination in i*n vitro* tissue culture is pathogens which come with plant materials. An effective surface sterilization increases the success of *in vitro* plant regeneration. Wheat mature embryos were used as explant source in this study. Eight different sterilization methods were applied to seeds of wheat mature embryos and before and after seed imbibitions. The effect of imbibition duration on contamination was investigated by applying imbibition before and after sterilization. When sterilization was made before imbibitions process, fungus and bacteria contamination was observed in cultures applied all sterilization methods. Whereas, when imbibition of seeds was made after sterilization, no contamination was observed in any culture applied of all sterilization methods.

Keywords: Wheat, mature embryo, contamination

GİRİŞ

Dünyada ekilebilir alanların %17'sinde yetiştiriciliği yapılan buğday (Jones 2005), dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de insanların en önemli besin kaynaklarından birisidir. Buğdayda ıslah amacıyla kullanılan biyoteknolojik uygulamalardan iyi bir şekilde yararlanabilmek için doku ve hücre kültürlerinden etkili bir rejenerasyon yönteminin oluşturulması gerekmektedir.

Buğdayda kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon etkinliğini belirleyen en önemli faktörlerden biri eksplant kaynağıdır. Buğdayda olgunlaşmamış embriyolar kallus kültüründe etkili bir rejenerasyon için en iyi eksplant kaynağını oluştururlar (Redway ve ark. 1990; Özgen ve ark. 1996; Özgen ve ark. 1998; Mendoza ve Kaepler 2002; Patnaik ve Khurana 2003; Zale ve ark. 2004). Ancak, Olgunlaşmamış embriyoların eksplant kaynağı olarak kullanılabilmeleri için donor bitkinin belli dönemlerde eksplant kaynağı temin etmesi ve kışlık çeşitlerde vernalizasyon ihtiyacının karşılanması için seralara ve kontrollü koşullara gereksinim duyulmaktadır. Bu durumda daha uzun bir süre ve daha fazla finansman gerekmektedir. Buna karşın, olgun embriyoların kaynağı olan tohumlar kolaylıkla temin edilebildikleri ve depolanabildikleri için yılın her dönemin de çalışma olanağı sağlamaktadırlar. Ancak, olgun embriyoların rejenerasyon kapasitelerinin düşük olmasının yanında olgunlaşmamış embriyolara göre yüzeysel yapılarına bağlı olarak daha fazla mikroorganizma barındırmaktadırlar. Aseptik koşullar bitki hücre ve doku kültürleri yöntemlerinin başarılı bir şekilde yapılabilmesi ve devamlılığı için zorunludur. Bitki eksplantlarının kültüre alındığı *İn vitro* ortamlar fungusların ve bakterilerin gelişimi ve üremesi için optimum şartları sağlamaktadır (Anonim, 2007). Bu nedenle

kültüre başlamadan önce en önemli uygulama eksplantın sterilizasyonudur. Başarısız bir yüzey sterilizasyonu kültürün devamlılığını engellemektedir (Yıldız ve Er, 2002).

Yüzey sterilizasyonu için etil alkol, sodyum veya kalsiyum hipoklorit, hidrojen peroksit, gümüş nitrat, civa klorür kullanılmasına (Yıldız ve Er,2002) rağmen bu amaçla daha çok etil alkol ve sodyum hipoklorit kullanılmaktadır (Reissinger ve ark., 2000).

Bu araştırmada olgun embriyoların kaynağı olan tohumlara 8 farklı sterilizasyon yöntemi sterilizasyondan önce ve sonra ıslatılan tohumlara uygulanarak sterilizasyon yöntemlerinin ve ıslatma işleminin uygulama döneminin kontaminasyonu önlemedeki etkileri araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Kırik buğday genotipinin olgunlaşmış embriyoları eksplant olarak kullanılmıştır. Olgun embriyoların kaynağı olan tohumlara 8 farklı sterilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Aşağıda belirtilen işlemler sterilizasyondan önce ve sonra ıslatılan tohumlara uygulanmıştır.

I. Yöntem: % 70'lik Etil alkolde 5 dakika + %1'lik Sodyum hipokloritte 20 dakika
II. Yöntem: % 70'lik Etil alkolde 5 dakika + %1'lik Sodyum hipokloritte 30 dakika
III. Yöntem: % 70'lik Etil alkolde 5 dakika + %1,5'luk Sodyum hipokloritte 20 dakika
IV. Yöntem: % 70'lik Etil alkolde 5 dakika + %1,5'luk sodyum hipokloritte 30 dakika
V. Yöntem: % 70'lik Etil alkolde 10 dakika + %1'lik Sodyum hipokloritte 20dakika
VI. Yöntem: % 70'lik Etil alkolde 10 dakika + %1'lik Sodyum hipokloritte 30 dakika
VII. Yöntem: % 70'lik Etil alkolde 10 dakika + %1,5'luk Sodyum hipokloritte 20 dakika
VIII. Yöntem: % 70'lik Etil alkolde 10 dakika + %1,5'luk Sodyum hipokloritte 30 dakika

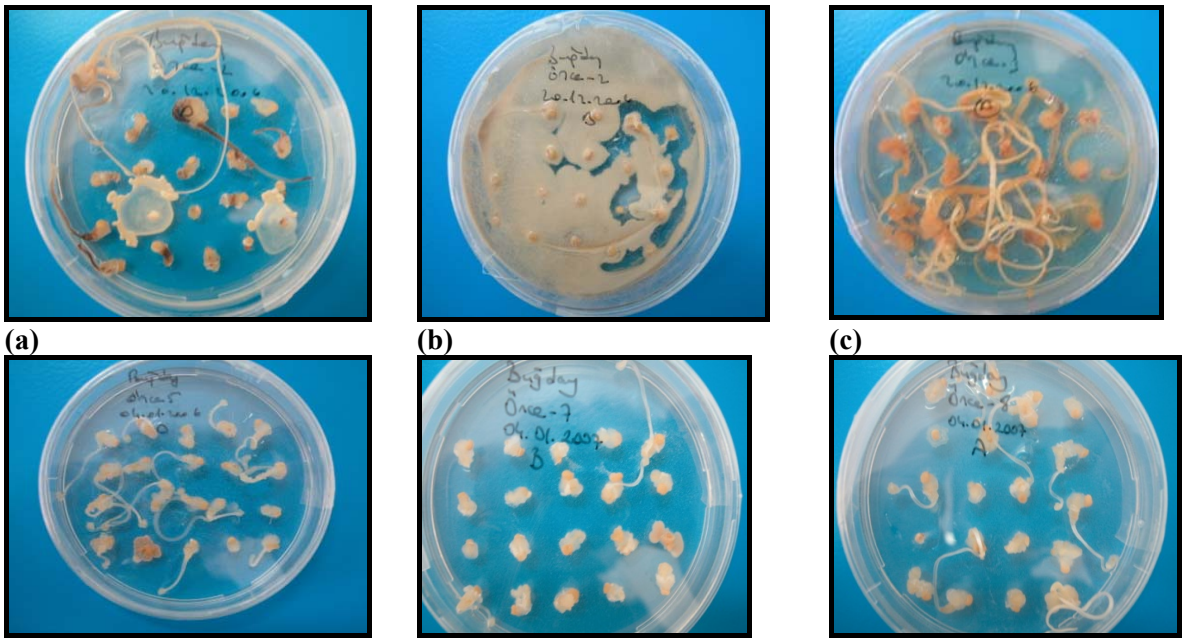
Kültür ortamı olarak Murashige ve Skoog (1962) tuzları [Sigma M5524] ve vitaminleri [Sigma M3900] kullanılmıştır. MS ortamına ilave olarak 20 g sakkaroz, 1,95 g MES, 0,75 g $MgCl_2$ kullanılmıştır. pH 5,8'e ayarlandıktan sonra jel yapıcı madde olarak phytagel (2 g/l) eklenmiş ve 121 °C' de 105 kPa basınçta 20 dakika otoklavlanmıştır. 1ml MS vitamin (1000X), 2 ml askorbik asit (50 mg/ml), 4 ml dikamba (1 mg/ml) ve ayrıca 5 mg/l glutamin, 1 mg/l Casein hydrolysate 0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtreler (Milipor) kullanılarak sterilize edildikten sonra ortama eklenmiştir. Her petri kutusuna 20 adet olgun embriyo bırakılmıştır ve çalışma tam şansa bağlı deneme desenine göre 4 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Kültürler 25 ± 1^0C'de karanlık ortamda 4 hafta süreyle bekletilmiştir. Kültürler 4 hafta süreyle her gün gözlemlenmiştir. Her hangi bir eksplantta meydana gelen kontaminasyon kültür ortamının her yerine dağılarak kültürün devamlılığını engellediği için kontaminasyonun görüldüğü petriler "kontamine" olarak, kontaminasyonun olmadığı petriler ise "kontamine değil" olarak değerlendirilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Olgun embriyoların kolay bir şekilde tohumlardan çıkarılması için gerekli olan ön ıslatma işleminin, yüzey sterilizasyonundan önce veya sonra yapılması kültürde kontaminasyon oluşmasında etkin rol oynamıştır. Islatma işlemi sterilizasyondan önce yapıldığında tüm sterilizasyon yöntemlerinin uygulandığı kültürlerde fungus ve bakteri kaynaklı kontaminasyonlar gözlemlenmiş, buna karşın ıslatma uygulaması sterilizasyondan sonra yapıldığında tüm sterilizasyon yöntemlerinin uygulandığı kültürlerde kontaminasyon gözlenmemiştir. Aynı şekilde, Bürün ve Çoban Poyrazoğlu (2001), arpada yaptıkları sterilizasyon çalışmasında ön ıslatma işleminin sterlizasyondan sonra yapıldığında, sterlizasyondan önce yapılan ıslatma işlemine göre daha az kontaminasyonun meydana geldiğini bildirmişlerdir. yapılan Islatma işlemi sterilizasyondan önce yapıldığında I. ve II. Sterilizasyon yönteminde kültürün 3. gününde, III., IV ve V. sterilizasyon yönteminde kültürün 6. gününde, VI. ve VII. sterilizasyon yönteminde kültürün 10. gününde, VIII. Sterilizasyon yönteminde ise kültürün 10.-12. günlerinde kontaminasyonlar görülmüştür. Bu uygulamada en az kontaminasyon VII ve VIII nolu sterilizasyon yöntemlerinde meydana gelmiş, en yüksek kontaminasyon ise I, II, III ve IV nolu sterilizasyon yöntemlerinde belirlenmiştir (Şekil 1).

Yüzey sterilizasyonunun temel amacı bütün mikroorganizmaları elemine etmektir. Ancak, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu için eksplantın canlılığı çok önemlidir. Yapılan bu çalışmada ön ıslatma uygulama zamanının önemli bir faktör olduğu belirlenmiştir. Ön ıslatma, tohumun çeşitli bölgelerinde bulunan fungus ve bakterilerin çoğalabilmesi ve gelişebilmesi için uygun bir ortam hazırlamaktadır. Bu nedenle, ön ıslatma süresince fungus ve bakterilerin konsantrasyonlarında meydana gelen artışa bağlı olarak, patojenler bütün tohum yüzeyini kaplamaktadırlar. Bu araştırmada ıslatma uygulamasının sterilizasyondan sonra yapıldığı ve 8 farklı sterilizasyon yöntemlerinin uygulandığı kültürlerdeki gözlemler sonucunda, en iyi kallus gelişimi I nolu sterilizasyon yönteminde

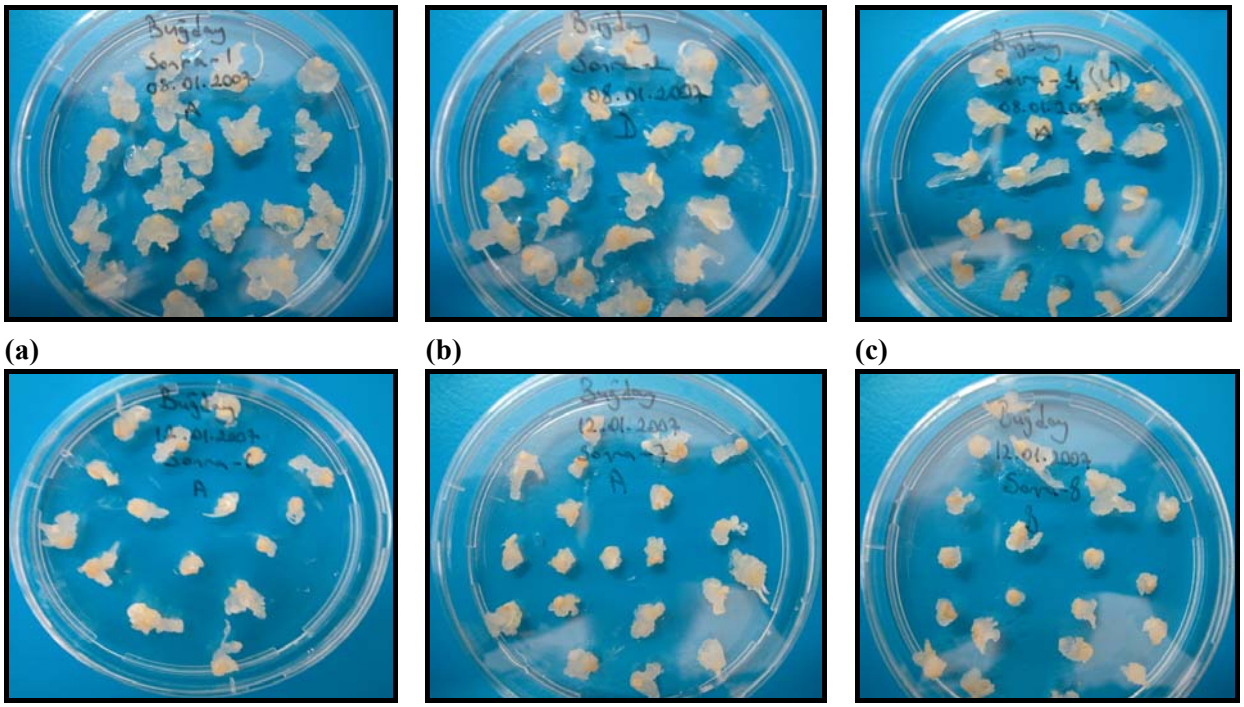
meydana gelmiştir. En az kallus gelişimi ise V, VI, VII ve VIII nolu sterilizasyon yöntemlerinde görülmüştür (Şekil 2). Yine, gözlemler sonucunda I. ve II. sterilizasyon yönteminde kültürün 3. gününde, III. sterilizasyon yönteminde kültürün 4. gününde, IV. ve V. sterilizasyon yönteminde kültürün 4.-6. gününde, diğer sterilizasyon yöntemlerinde ise kültürün 5.-7. günlerde kallus oluşumunun başladığı gözlenmiştir.



(a) **(b)** **(c)**

(d) **(e)** **(f)**

Şekil 1. Islatma işleminin sterilizasyondan önce yapılıp sterilizasyon yöntemlerinin uygulandığı kültürlerdeki kontaminasyonların görünümü. **(a)** I nolu sterilizasyon yöntemi **(b)** II nolu sterilizasyon yöntemi **(c)** III nolu sterilizasyon yöntemi **(d)** V nolu sterlilizasyon yöntemi **(e)** VII nolu sterilizasyon yöntemi **(f)** VIII nolu sterilizasyon yöntemi



(a) **(b)** **(c)**

(d) **(e)** **(f)**

Şekil 2 Islatma işleminin sterilizasyondan sonra yapılıp, sterilizasyon yöntemlerinin uygulandığı kültürlerdeki kallus gelişimine ait görünümler.**(a)** I nolu sterilizasyon yöntemi **(b)** II nolu sterilizasyon yöntemi **(c)** IV nolu sterilizasyon yöntemi **(d)** VI nolu sterlilizasyon yöntemi **(e)** VII nolu sterilizasyon yöntemi **(f)** VIII nolu sterilizasyon yöntemi.

Sterilizasyon yöntemi ile dezenfektanın konsantrasyonu ve uygulama süresi eksplant canlılığını etkileyen önemli faktörlerdir (Yıldız ve Er, 2002). Bu nedenle, bitki dokularının ölümünü en aza indirecek konsantrasyon ve uygulama süresi seçilmelidir (Bhojwani ve Razdan,1996). Dezenfektan konsantrasyonunun yüksek ya da uygulama süresinin uzun olması bitki dokularına zarar vermekte ve kültürün başarısını engellemektedir (Bürün ve Çoban Poyrazoğlu, 2002). Nitekim, Allan (1991) dezenfektanın yüksek konsantrasyonu ile uygulama süresinin uzun olmasının eksplantın rejenerasyon kapasitesini olumsuz yönde etkilediğini bildirmiştir. Bu nedenle sterlizasyonda düşük konsantrasyon ve kısa uygulama süresine sahip yöntemler tercih edilmelidir.

Bu araştırmanın sonuçlarına göre, buğday doku kültüründe eksplant olarak olgun embriyolar kullanıldığında, olgun embriyoların kolay bir şekilde tohumlardan çıkarılması için gerekli olan ön ıslatma işleminin bitki yüzey sterilizasyonundan sonra yapılması ve tohumların sterilizasyonunda %70'lik etil alkolde 5 dakika ve devamında %1'lik sodyum hipokloritte 20 dakika tutulmasının uygun olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

Allan, A.,1991. Plant cell culture In: Stafford A, Warren G (eds) Plant cell and tissue culture. Open University Press, Milton Keynes, UK

Anonim,2007.Sterile(Aseptic)Technique. www.hos.ufl.edu/mooreweb/TissueCulture/January%2011/Sterile%20Technique/Sterile%20Technique%202007.doc

Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K., 1996. Plant Tissue Culture: Theory And Practice, A Resived Edition. Laboratory Requriments And General Techniques. Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands, P: 26-28.

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

Jones, H. D., 2005. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. Journal of Cereal Science 41: 137–147.

Mendoza, M. G. and Kaeppler, H. F., 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of Wheat (*Triticum aestivum).* In vitro Cell. Dev. Biol.-plant, 38: 39-45.

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

Özgen, M., Türet, M., Altınok, S., Sancak, C., 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat genotypes. Plant Cell reports, 18: 331-335.

Patnaik, D. and Khurana P., 2003. Genetic transformation of indian bread (*Triticum aestivum)* and pasta (*Triticum durum)* wheat by particle bombardment of mature embryo-derived cali. BMC plant biology, 3(5): 1-11.

Redway, F. A., Vasil, V., Lu D. and Vasil, I. K., 1990. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet, 79: 609–617.

Reissinger, A., Vilich, V. and Sikora R.,A., 2001. Detection of fungi *in planta*: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol. Res*.,105 (5) : 563-566

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

Zale, M. J., Borchardt-Wier, H., Kidwell, K. K. and Steber C.M., 2004. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. Plant cell, Tissue organ culture, 76: 227-281.