

Buğdayda Embriyo Kültüründen Kallus Oluşumu

Öznur KARACA

İl Çevre Müdürlüğü, Aydın - TÜRKİYE

Betül BÜRÜN

Muğla Üniversitesi, Fen - Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 30.04.1997

Özet : Bu çalışmada, Doğu 88 buğday çeşidinin olgun ve olgun olmayan embriyoları farklı 4 madde katılmış MS ortamında kültüre alınmıştır. Deneme faktöriyel deneme desenine göre iki tekerrürlü olarak kurulmuş ve değerlendirilmiştir. Verilere karekök transformasyonu uygulanmıştır. Gözlemler 42 gün sürmüştür. Gözlemler sonunda, kallus sürgün ve kök oluşturan tüp sayıları belirlenmiştir.

Olgunlaşmamış embriyoların kültüründe en yüksek kallus oluşumu (Ort. % 94) 2 mg/l 2,4 D+ 1 mg/l kinetin katılmış MS ortamında elde edilmiştir. Olgun embriyoların kültüründe ise en yüksek kallus oluşumu (Ort. % 95) 2 mg/l 2,4 -D katılmış MS ortamında gözlenmiştir. Kallus ağırlıkları bakımından olgun embriyolar daha iyi sonuç vermiştir. En yüksek kallus ağırlığı ortalama 395.3 mg olarak 2 mg/l 2,4-D +1 mg/l kinetin içeren MS ortamında bulunmuştur.

Callus Development in Embryo Culture of Wheat

Abstract : In this study mature and immature embryos of Doğu-88 wheat variety was cultured for callus development on MS medium supplemented with 4 different substances. Experiment was planned and analysed as factorial design with two replication. Data has been converted with rootsquare transformation. Observations were continued during 42 days. Number oftubes in which callus, shoot and root formation occurred, were found after observation.

The immature embryos formed the highest callus (average 94 %) on medium MS containing 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin. The mature embryos formed the highest callus (average 95 %) on MS medium containing 2 mg/l 2,4-D. The mature embryos gave the best result with respect to callus weights. The highest callus weights were obtained (average 395.3 mg) on MS medium containing 2 mg/l =2,4-D + 1 mg/l kinetin.

Giriş

Bitki doku kültürleri yöntemlerinden biri olan embriyo kültürleri, temel araştırmalarda ve tohumdaki çimlenme durgunluğunu (dormancy) ortadan kaldırmak amacıyla uygulanmaktadır. Bunun yanısıra, türler arası ve cinsler arası melezlerin elde edilmesi bakımından büyük önem taşımaktadır (1). Kallus oluşturmada bitkinin değişik kısımlarından alınan parçaların yanında, olgunlaşmış ya da olgunlaşmamış embriyolar da materyal olarak kullanılmaktadır (2,3,4). Yapılan pek çok çalışmaya göre, farklı türlerden alınan bitki parçalarının kültürlerinde farklı besin isteklerinin karşılanması gerekliliği ortaya konmuştur (2).

Kallus oluşturmaın yararlarından biri de kallustan farklılaşan bitkiler arasında görülen somaklonal varyasyondan ıslah programlarında yararlanılmasıdır. Ayrıca in vitro ortamda kimyasal ve fiziksel mutagen uygulamalarıyla hastalıklara, antibiyotiklere, herbisitlere dayanıklılık ve yüksek tuz, düşük sıcaklık ve susuzluğa toleranslı mutant hücre seçimleri yapılabilmektedir (1,4,5).

Bu çalışmada, buğday embriyolarından kallus dokusunun elde edilmesi amacıyla, temel MS ortamına katılan bazı hormonlar ile amino asitin etkileri araştırılmıştır.

*Öznur KARACA'nın yüksek lisans tez çalışmasının bir bölümüdür.

Materyal ve Yöntem

Doğu-88 buğday çeşidinin olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriyoları kültüre alınmıştır. Olgunlaşmamış embriyolar, tozlanmadan 9-10 gün ve 15-16 gün sonra olmak üzere 1 hafta ara ile iki kez kültüre alınmıştır. İlk olarak, 9-10 günlük embriyoya sahip olan daneler ortadan ikiye bölünerek embriyoyu içeren kısımları, bir hafta sonra ise $2.43 \pm 0,08$ mm çapındaki biraz daha belirginleşmiş embriyolar 4 değişik madde eklenen MS (6) ortamında (Tablo 1) kültüre alınmıştır. Hasat olgunluğuna gelmiş buğdayların daneleri alınmış, bir toplu iğne yardımı ile embriyoları çıkarılarak olgun embriyo materyali elde edilmiştir. Her bir materyal için (9-10 günlük ve 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyolar) 4 ortamda, 2 tekerrürde toplam 480 tüp kullanılmıştır.

Tablo 1. MS ortamına eklenen maddeler ve miktarları

Ortam No:	Eklenen maddeler ve miktarları
I	MS + 2 mg/l 2,4-D * (2,4-diklorofenoksiasetik asit)
II	I + 1 mg/l kinetin **
III	II + 1 mg/l NAA * (Naftelenasetik asit)
IV	III + 150 mg/l asparajin***

*: Oksin **: Stokinin *** : Aminoasit

Ortam PH'sı 5.7'ye ayarlanan ve kültür tüplerine boşaltılan besin ortamının sterilizasyonu, 121 °C'de 1 atm basınçta 20 dakika süre ile otoklavda bırakma sureti ile yapılmıştır.

Embriyoların sterilizasyonu sodyumhipoklorit ve alkol ile yapılmış, olgun embriyolar ise sterilizasyondan sonra penisilin ve streptomisin içeren solüsyonda tutulmuştur (7). 25 ml besin ortamı içeren deney tüplerine yerleştirilen embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık sürede, 1500 lux ışıkta ve ortalama 23°C sıcaklıkta 42 gün bekletilmişlerdir.

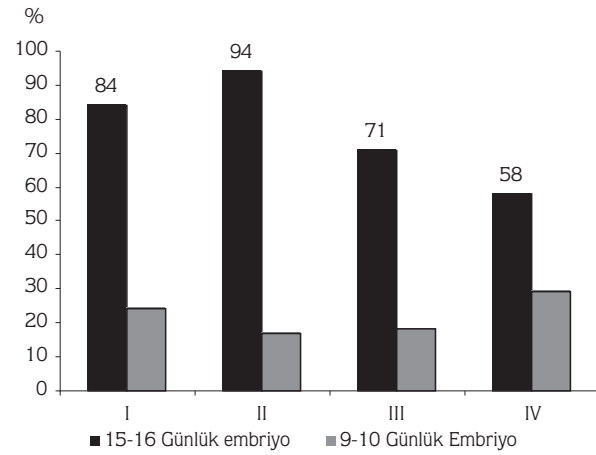
Kallus oluşumu gözlenen tüpler sayılarak ortamlardaki kallus oluşum oranları bulunmuş, 42 gün sonunda tüpler boşaltılarak kök ve sürgün ayrıldıktan sonra kallus ağırlıkları tartılmıştır.

Çalışma 2 tekrarlamalı olarak faktöriyel deneme desenine göre düzenlenmiş, elde edilen veriler transformasyonu yapıldıktan sonra değerlendirilmiştir (8). Verilerin istatistikî değerlendirilmesinde mini-tab paket programı kullanılmıştır.

Bulgular

Olgunlaşmamış Embriyoların Kültürü

Yarım dane olarak kültüre alınan olgunlaşmamış embriyolardan (9-10 günlük) kallus oluşum oranı Şekil 1'de gösterilmiş ve ortamlara göre ortalama kallus oluşum oranlarında istatistiksel önemde bir fark bulunmamıştır. 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyolardan ise 4 ortamda da daha yüksek kallus oluşum oranı saptanmış (Şekil 1), ortamlar arasındaki fark %5'e göre önemli bulunmuştur (Tablo 2).



Şekil 1. Olgunlaşmamış embriyo kültüründe ortamlara göre kallus oluşumu.

Tablo 2. 15-16 günlük embriyolardan elde edilen kallus oluşum oranlarının en küçük kareler ortalamalarına ilişkin çoklu karşılaştırma testi

Ortamlar	X	±	Sx
I	9.178	±	0.440 AB
II	9.695	±	0.440 A
III	8.428	±	0.440 AB
IV	7.613	±	0.440 B

(P < 0.05)

15-16 günlük olgunlaşmamış embriyoların kallus ağırlıkları bakımından ise ortamlar arasında önemli bir fark bulunmamıştır (Tablo 3 ve 4).

Tablo 3. 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyoların kültüründe saptanan kallus ağırlıkları

Ortamlar	Kallus ağırlıkları (mg)		
	Ort.	En düşük	En yüksek
I	67.0	10.0	136.0
II	60.0	9.0	114.0
III	45.0	5.0	156.0
IV	51.0	6.0	114.0

Tablo 4. 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyolardan oluşan kallus ağırlıklarının en küçük kareler ortalamalarına göre çoklu karşılaştırma testi

Ortamlar	x	±	Sx
I	0.0672	±	0.0083 A
II	0.0599	±	0.0083 A
III	0.0455	±	0.0083 A
V	0.0506	±	0.0083 A

(P>0.05)

9-10 günlük tam belirginleşmemiş embriyoların kültüründe kallus ile birlikte çok az sayıda tüpte sürgün gelişimi de gözlenmiş, kök oluşumuna raslanmamıştır (Tablo 5).

Tablo 5. 9-10 günlük olgunlaşmamış embriyoların kültüründe, sürgün ve kök oluşumu gözlenen tüp sayıları

Ortamlar	Kültürde Kullanılan Toplam Tüp sayısı	I.Tek		II.Tek	
		Sürgün Oluşumu gözlenen tüp sayısı	Kök Oluşumu gözlenen tüp sayısı	Sürgün Oluşumu gözlenen tüp sayısı	Kök Oluşumu gözlenen tüp sayısı
I	20	1	-	1	-
II	20	-	-	-	-
III	20	-	-	-	-
IV	20	3	-	-	-

15-16 günlük olgunlaşmamış embriyoların kültüre alındığı denemede daha fazla sayıda tüpte sürgün ve kök oluşumu gözlenmiştir. En fazla sürgün oluşumu 2 mg/l 2,4-D 1mg/l kinetin içeren ortam II'de (34 tüp) en az sürgün oluşumu ise 2 mg/l 2,4 D + 1 mg/l kinetin + 1 mg/l NAA içeren ortam III'de (17 tüp) gözlenmiştir (Tablo 6). Kök oluşumu bakımından ortamlar arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

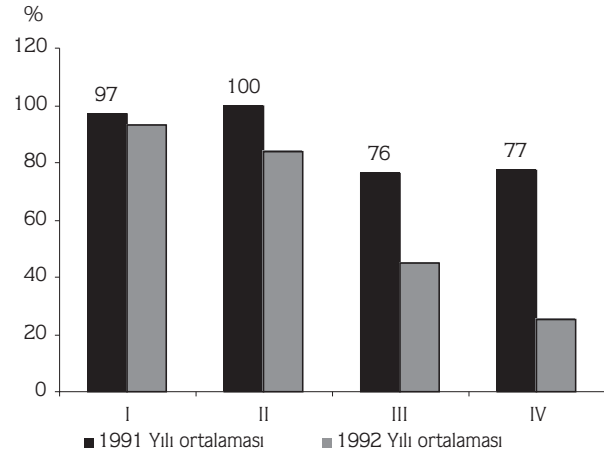
Tablo 6. 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyoların kültüründe, sürgün ve kök oluşumu gözlenen tüp sayıları

Ortamlar	Kültürde Kullanılan Toplam Tüp sayısı	I.Tek		II.Tek	
		Sürgün Oluşumu gözlenen tüp sayısı	Kök Oluşumu gözlenen tüp sayısı	Sürgün Oluşumu gözlenen tüp sayısı	Kök Oluşumu gözlenen tüp sayısı
I	20	13	4	8	4
II	20	18	-	16	1
III	20	12	4	5	-
IV	20	17	4	12	2

Olgun Embriyoların Kültürü

Olgun embriyolar 1991 ve 1992 yıllarında olmak üzere 2 kez kültürü alınmıştır. En iyi sonuç (%100 kallus oluşumu) 1991 yılında kurulan denemede ve ortam II'de elde edilmiştir (Şekil 2). İkinci yıl kurulan denemede de tüm ortamlarda kallus oluşum oranları yüksek bulunmuş ve en yüksek kallus oluşumu % 93 oranı ile ortam-I de gözlenmiştir. Yıllar arasındaki fark % 5 düzeyinde önemli bulunmuştur.

İki yılın ortalama kallus oluşum oranlarına göre, ortamlar arasındaki fark çok önemli ($F<0,01$) bulunmuştur.



Şekil 2. 1991 ve 1992 yıllarında ortamlara göre olgun embriyolardan ortalama kallus oluşum oranları

Ortamların kallus ağırlıklarında ortaya çıkan farklar %5 düzeyine göre önemli bulunmuş; ortam-II'de en ağır, ortam IV'de en hafif kalluslar elde edilmiştir (Tablo 7).

Sürgün ve kök gelişimi bakımından her iki yılda da elde edilen sonuçlar tümüyle benzerdir. Tablo 8'de iki yılda sürgün ve kök gelişimi gözlenen tüp sayıları verilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Olgunlaşmamış Embriyo Kültürü

15-16 günlük olgunlaşmamış embriyoların kullanıldığı denemede, farklı dört ortamda %58-94 oranları arasında kallus oluşumu saptanmıştır. Ahloowalia (9), olgunlaşmamış embriyoları, 2,4-D, IAA ve kinetin eklenmiş MS ortamında kültüre alınmış; %77 oranında kallus oluşumu bulmuştur. İki çalışmada da elde edilen oranların birbirine yakın olduğu görülmektedir. Değişik araştırmacılar yaptıkları olgunlaşmamış embriyo

kültürlerinde 12 günlük, 14-24 günlük embriyolar olmak üzere farklı büyüklükteki olgunlaşmamış embriyoları kültüre alarak başarılı sonuçlar elde etmişler, 1,0-1,5 mm. çapındaki embriyoların uygun olduğunu belirtmişlerdir (10,11,12,13,14). Bu çalışmada 15-16 günlük embriyolar kültüre alınmış, embriyonun yaşı ile kallus oluşum oranı arasında gözlenen ilişki öteki çalışmalarla benzerlik göstermiştir.

Yapılan istatistiksel değerlendirmede, olgunlaşmamış embriyoların kültüründe, dört kültür ortamının birbirinden farklı kallus ağırlıklarına yol açmadığı ortaya konmuştur (Tablo 4).

Bu konuda yapılan benzer çalışmalarda kallus oluşumu için MS kültür ortamına; 2,4-D, IAA, kinetin ve dicamba eklenmesinin olumlu olduğu, özellikle buğdaygillerde oksin grubu hormonlarda 2,4-D'nin bulunmasının önemi belirtilmiştir (9,10,11,12,15). Ayrıca, Papenfus ve Carman (11), MS kültür ortamına 2 mg/l dicamba eklemenin, 2 mg/l 2,4-D eklemekten daha iyi sonuç

Tablo 7. 1991 ve 1992 yılı olgun embriyo kültürlerinde ortamlara göre kallus ağırlıkları

Ortamlar	Ort.	Kallus ağırlıkları (mg)					
		1991 yılı		1992 yılı		İki yıl	
		En düşük	En yüksek	Ort.	En düşük	En yüksek	ortalaması
I	202.3	93.2	386.8	78.0	27.0	170.0	140.2
II	670.6	33.5	1608.7	120.0	42.0	161.0	395.3
III	374.0	35.8	1238.0	115.0	28.0	188.0	244.5
IV	376.9	73.3	1214.2	42.0	20.0	67.0	209.5

Tablo 8. Olgunlaşmış embriyoların kültüründe sürgün ve kök oluşumu gözlenen tüp sayıları

Ortamlar	Kültürde Kullanılan Toplam Tüp sayısı*	1991		1992	
		Sürgün Oluşumu gözlenen tüp sayısı	Kök Oluşumu gözlenen tüp sayısı	Sürgün Oluşumu gözlenen tüp sayısı	Kök Oluşumu gözlenen tüp sayısı
I	40	14+12 26	9+5 14	13+9 22	4+2 6
II	40	13+16 29	14+13 27	12+17 29	6+5 11
III	40	15+12 27	8+7 15	12+11 23	4+4 8
IV	40	11+14 25	6+13 19	13+9 22	8+6 14

* Tekrarlamalar birleştirilerek verilmiştir.

verdiğini belirtmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarından, MS ortamına katılan 2,4-D ve kinetinin, olgunlaşmamış embriyodan elde edilen kallus oluşumunda olumlu etki yaptığı (2,4-D eklenen ortamdan % 84; 2,4-D ile birlikte kinetin eklenen ortamdan da % 94 kallus oluşum oranı elde edilmiştir), bunun yanında NAA ve asparajinin de, öteki iki madde gibi olumlu etki gösterdiği söylenebilir.

Temel MS ortamına kinetin eklenen ortam II'nin, 2,4-D ve asparajin ilave edilen ortamlar ile sürgün oluşumu bakımından önemli bir fark göstermemesine karşın; NAA içeren ortama göre daha fazla sayıda sürgün oluşturduğu saptanmıştır (Tablo 6). Kök oluşumunda, NAA'nın belirgin bir etkisinin görülemediği belirtilebilir. Ahloowalia (9), MS ortamına 1 mg/l NAA eklemenin kök gelişimini artırdığı, Barabonova ve ark. (12)'da NAA gibi bir oksin olan IAA'nın kök ve sürgün gelişimini artırdığını belirtmişlerdir. Cai ve ark. (14) olgunlaşmamış embriyo kültüründe, kallus oluşum oranlarındaki değişiklikleri (%71-100) çevre koşulları ile deneme hatalarına, rejenerasyondaki değişiklikleri ise (% 0.60) genotipik farklılıklara bağlamışlardır. Bu çalışmada da benzer faktörlerin etkilerinin olduğu söylenebilir.

Olgunlaşmış Embriyo Kültürü

Olgunlaşmış embriyoların kullanıldığı iki yıl tekrarlanan denemelerde, kallus oranları yüksek (1. yıl % 76-100, 2. yıl % 25-93) olmuş; kallus oluşum oranları açısından yapılan istatistiksel analizlerde, iki yıl arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Aynı kültür ortamları kullanılmasına karşın, yıllar arasında ortaya çıkan farklılık;

birinci ve ikinci yıl olgunlaşmış embriyoların alındığı bitkilerin, yetiştirme koşullarındaki farklılıkların (yağış miktarı, sıcaklık, topraktaki besin maddelerinin) bitkilerde fizyolojik olarak ortaya çıkardığı değişikliklerden veya kültür odasındaki sıcaklık ve bağıl nemin kontrol edilmemesinden dolayı oda koşullarında meydana gelen değişikliklerden kaynaklanabileceği söylenebilir.

Olgunlaşmış embriyo kültüründe, kallus ağırlıklarına göre, temel MS ortamına, 2,4-D ve kinetin eklenen Ortam II'nin Öteki üç ortama göre daha uygun olduğu gözlenmiştir. Schaeffer ve ark.(7), olgunlaşmış embriyo kültüründe, 2-IP (sitokinin), 2,4-D, NAA ve glutamin (aminoasit) eklenmiş temel MS ortamın uygun olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacıların (7,16) kallus oranları bakımından elde ettikleri sonuçlarla, çalışmamızda elde edilen sonuçların benzerlik göstermesine karşın (her iki çalışma da % 50 ile % 100 arasında kallus oluşumları saptanmıştır); en fazla kallus oluşum oranı meydana getiren ortamlar farklıdır. Bu farkın, çeşitlerin genotiplerinden kaynaklanabileceği söylenebilir.

Elde edilen kallusların sulu ve az boğumlu oldukları ve yeşil büyüme merkezleri taşıdıkları gözlenmiştir.

Bu çalışmada temel MS ortamına katılan 3 hormon ile 1 amino asit ilavesinin, olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriyolarda kallus oluşumu bakımından etkileri araştırılmaya çalışılmış ve kallus oluşumunda ortam -1 ve ortam-2'nin, sürgün ve kök oluşumunda yine ortam 2'nin daha uygun olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak kallus oluşumunun teşvik edilmesi için ortama kinetin ilave edilmesinin yararlı olacağı söylenebilir.

Kaynaklar

1. Emiroğlu, Ü.; Gürel, A.. Bitki Islahında Modern Biyoteknoloji, The Biotechnology Revolution. S: 94-125, February 8-12, Bornova-İzmir, 1993
2. Gönülşen, N., Bitki Doku Kültürleri, Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müd. Yayınları. Yay. No: 78, Menemen, İzmir. 1987.
3. Sharma, G.C.; Bello, L.L.; Sapra, V.T. and Peterson, C.M., Callus Initiation and Plant Regeneration from Triticale Embryos, Crop Science, Vol. 21, P.11~118.
4. Er, C. ; Canpolat, N. Bitki Islahında Doku Kültürleri, A.Ü. Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü. S: 23-28, Ankara. 1992.
5. Çay, N.: Yürekli, K., Tütün Rejenerantların Su Stresine Dayanıklılığının in vitroda Araştırılması, Doğa, Baskıda.
6. Murashige, T. ; F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497, 1962.
7. Schaeffer, G.W., Baenziger, P.S., Warley, J., Haploid Plant Development From Anthers and in vitro Embryo Culture of Wheat. Crop Science, Vol. 19, 1979.
8. Steel, R.G.D., Torrie, J.H., Principles and Procedures of Statistics. A biometrical approach, (second Edition),. 1980.
9. Ahloowalia, B.S., Plant Regeneration from Callus Culture in Wheat. Crop Science, Vol. 22, Page: 405-410. 1982.
10. Sears, R.G., Deckard, E.L., Tissue Culture Variability in Wheat: Callus Induction and Plant Regeneration, Crop Science, Vo1.22. P. 546-550, 1992.

11. Papenfus, J.M. and Carman, J.G.. Enhanced Regeneration from Wheat Callus Cultures Using Dicamba and Kinetin. *Crop Science*. Vol. 27, P. 588-593, 1987.
12. Barabanova, E.A., Bannikova., V.P., Girko. V.S., Plant Regeneration from Cultured Embryos of Winter Wheat. fn *Biologiya Kul'tiviruemkh Kletok i Biotekhnologiya. I. Novosibirsk. USSR. 110 (Ru) Institut botaniki. An USRR, Kiev, Ukrainian SSR Plant Breeding Abstract, Vo1.60, No: 3. Abs.No: 2210 1990.*
13. Liang, Z.Q., Gao, M.W., Cheng, X.Y., Study on in vitro Technique for Immature Embryo Culture of Wheat Breeding. *Acta Agronomica Sinica. 14 (2). 137-142, China. 1988.*
14. Cai, T.S., Tian, H.Q., Lin, S.K., Li, J.m., Effect of Genotype and Embryo age on the Response of in vitro Cultured immature Embryos of Wheat. *Acta Genetica Sinica, 14 (2), 137-142, China. 1989.*
15. Batyrgozhin. B.A., Morphogenesis in Cell Suspension Culture of Wheat. In *Biologiya Kul'tiviruemkh Kletok i Biotekhnologiya. 1., 152-153. Novosibirsk. USSR. 152-153. Plant Breeding Abstract. Vo1.60. No:2. Abs. no: 1247, 1990.*