

## SİTOKİNİNLER İÇİN BASİT EKSTRAKSİYON VE BİYOLOJİK TEST METODLARI

Dr. Şener BALTEPE

Ege Üniversitesi, Genel Botanik Kürsüsü

1955 te MILLER ve ar. tarafından kinetin izolasyonundan sonra bilim adamları yeni bir büyüme regülatörleri grubunun varlığından haberdar oldular. Fakat kinetin DNA'nın bir parçalanma ürünü olduğu için bitki biyosentezinin doğal bir ürünü sayılmamaktadır. Bitkisel materyalden ilk kez 1965 yılında LETHAM ve MILLER tarafından doğal bir sitokin elde edilebildi. Bu araştırmacılar olgunlaşmamış mısır tanelerinden kristal formda bir sitokin elde ettiler ve buna zeatin adını verdiler.

Bugün sentetik sitokinlerin en belli başlısı kinetin olup henüz bitkide doğal olarak bulunamamıştır. Buna karşılık zeatin ve bunun benzeri sitokinler serbest bazlar, ribotidler ve ribosidler halinde bitkisel dokularda bulunmaktadır.

Bu makalede henüz çok yeni bir alan olan bitkisel dokulardan sitokin ekstraksiyon metodlarına ve yine bazı basit ve kolay yapılabilir biyolojik test metodlarına değinmek ve olanakları sınırlı bir araştırma laboratuvarında bu konuda ilerde yapılacak çalışmalarda yardımcı olacağını umduğum bir ekstraksiyon modeli ve buna uygun biyolojik test yöntemleri önermek istiyorum.

1970 yılında bazı basit sitokin ekstraksiyon metodlarının uygulandığını görüyoruz. BURROWS ve CARR bezelye tohumlarını % 98 etanolle ekstre edip bunu buharlaştırdılar ve kalıntıyı su ile alıp su fazında sitokin aradılar. Aynı yıl karpuz tohumlarının içsel sitokinlerini araştıran PRAKASH ve MAHESHWARI ilk ekstraksiyonda metanol kullandılar; metanolün uçurulmasından sonra kalıntıyı su ile alıp bu fazı yağ ve renk maddelerinden temizlemek için petrol eteri ayrıştırmasına tabi tuttular.

Burada ikinci metodun daha iyi olduğu gör÷lmektedir. Çünkü biz de yaptığımız bir ön çalışmada petrol eteri ile saflaştırmadığımız su fazında mevcut diğer maddeler nedeni ile kısa bir süre sonunda mantar ürediğini görmüştük.

Yukarda çalışmalarını kısaca özetlemeye çalıştığımız iki grup araştırmacı da su ekstraktında bulunan auksin, inhibitörler ve gibberellinleri elimine etmeyi düşünmemişlerdir. Bu durumda sitokinlerin kantitatif tayinlerinde tütün öz dokusu ve soya fasulyesi kallus dokusu biyolojik testleri gibi çok yorucu yöntemlere başvurmak gerekir ki, bu testler ancak çok özelleşmiş araştırma laboratuvarlarında kullanılabilirler.

1971 yılında TEGLEY ve ark. kök boğaz kanseri doku kültürlerinden sitokinin ekstraksiyonu yaptılar. Bu araştırmacılar dokuyu önce etanolla ekstre ettiler, sonra süzdüler, süzüntüyü sulu faza kadar buharlaştırdılar, bu fazı su ilavesi ile aldılar ve su fazını eş hacimde n-butanol ile ekstre edip bu n-butanol fazını uçurarak kalanı kromatografiye uyguladılar. Aynı yıl KRASNUK ve ark. fasulye tohumlarından yaptıkları sitokinin ekstraksiyonunda benzer bir yol takip ettiler ve yine n-butanol fazını sitokinin tayininde kullandılar.

Bu araştırmacıların su-butanol ayrıştırmasında bütün sitokinlerin butanol fazına geçtiğini kabul ettikleri görülüyor. Oysa suda eriyen sitokinlerden sitokinin ribotidlerin butanolla alınabilmeleri için, önceden su fazının alkali fosfataz ile muamele edilmesi gerekir. Ayrıca bu ekstraktta su fazından gelen gibberellinlerin de bulunduğu bugün anlaşılmıştır.

Daha gelişmiş bir ekstraksiyon metodunu 1973 te BROWN ve ark. in kullandıkları görülüyor. Bu araştırmacılar, bazı bitki tohumlarının sitokinin muhtevaları üzerinde çalışmalarında suda eriyen sitokinin ribotidlerle butanolde eriyen sitokinleri ayırdılar. Ekstraksiyonda önce tohumu etanolla homogenize ettiler; 24 saat ekstraksiyondan sonra süzüp etanolü buharlaştırdılar ve kalıntıyı su ile aldılar. Su fazının pH ını 2,5 a ayarlayıp etil asetatla ayrıştırarak diğer büyüme maddelerini uzaklaştırdılar. Bundan sonra su fazının pH ını 7 ye ayarlayıp bunu n-butanolle ayrıştırdılar. Böylece sitokinleri su ve butanol fazlarında toplamış oldular. Her iki fazı da ayrı ayrı buharlaştırıp kromatografiye tatbik ettiler. Aynı yıl STADEN benzer şekilde ilk su fazını elde ettikten sonra iki yol takip etti:

a ) Su fazının direkt olarak uçurulup kalanın kromatografiye tatbiki,

b ) Su fazının alkali fosfatazla muamelesinden sonra n-butanolle ayrıştırılması ve n-butanol fazının uçurularak kalanın kromatografiye tatbiki.

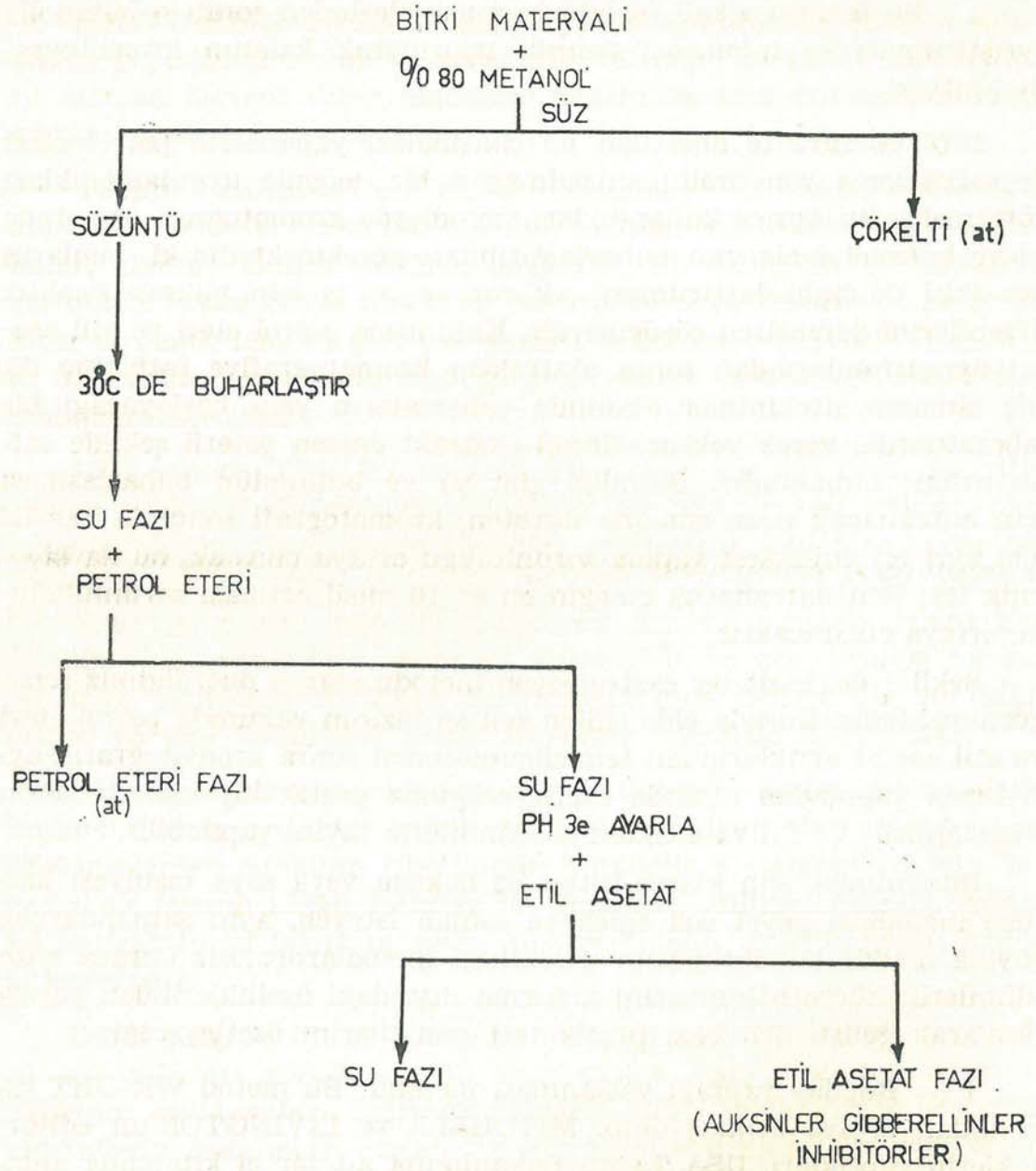
1971 ve 1973 te anlatılan bu çalışmaları yapanların petrol eteri ile saflaştırma yönetimini anlaşılmayan bir nedenle uygulamadıkları görülmektedir. Ayrıca kullandıkları metodlarda kromatografi öncesinde su ve butanol fazlarının buharlaştırılması gerekmektedir ki, bunların her ikisi de buharlaştırılması çok zor ve bu iş için yüksek sıcaklık derecelerini gerektiren çözücülerdir. Kanımızca petrol eteri ve etil asetat ayrıştırmalarından sonra ekstraktın kromatografiye tatbikine de, hiç olmazsa sitokinler alanında çalışmaların yeni başlayacağı bir laboratuarda, gerek yoktur. Çünkü ekstrakt esasen yeterli şekilde saflaştırılmış olmaktadır. Bilindiği gibi su ve butanolün buharlaşması için harcanacak uzun zamana ilaveten, kromatografi sonunda her Rf için ayrı biyolojik test yapma zorunluluğu ortaya çıkacak, bu da biyolojik test için harcanacak emeğin en az 10 misli artması zorunluluğunu ortaya çıkaracaktır.

Şekil 1 de, basit bir ekstraksiyon metodu olarak önerdiğimiz şema görülmektedir. Burada elde edilen son su fazının vakumda petrol eteri ve etil asetat artıklarından temizlenmesinden sonra kromatografik ayrıştırma yapmadan aşağıda özetleyeceğimiz pratik biyolojik testlerin uygulanması ile ihtiva ettikleri sitokinlerin tayini yapılabilir.

Sitokinler için klasik tütün öz dokusu veya soya fasulyesi kalusu metodları gayet çok emek ve zaman isteyen, aynı zamanda çok sayıda madde kullanılmasını gerektiren metodlardır. Biz burada sitokinlerin hücre bölünmesini arttırma dışındaki özelliklerinden yararlanılarak geliştirilen bazı pratik test metodlarını özetleyeceğiz :

1 — Buğday yaprağı yaşlanması metodu: Bu metod WRIGHT tarafından ortaya atılmış olup, MITCHELL ve LIVINGTON'un editörlüklerin yaptıkları, USA Tarım Bakanlığına ait bir el kitabında anlatılmaktadır (1968). Bunda esas, koparılmış buğday yapraklarının sararmalarının, artan sitokin konsantrasyonlarına paralel olarak gecikmesidir.

Buğday tohumları destile suda 2 saat ıslatılır, sonra vermikülite embriyo kısımları üste gelecek şekilde dizilir, yine vermikülite kapatılır ve 15 saat fotoperiyotta 23°C de 7 gün bırakılır. Bu sürenin sonunda yapraklar kesilir, yaprakların uçtan itibaren 7 cm lik kısmı alınarak 3 erli gruplar halinde tartılırlar. Her grup sitokin aktivitesi ölçülmek istenen solüsyonun (10 ml) bulunduğu petri kaplarına konulur. Bir grup yaprağın ekstraksiyonu da derhal aşağıda anlatılacağı



Şekil - 1 : İdeal bir sitokininin ekstraksiyon metodu olarak önerdiğimiz gidiş yolu.

şekilde yapılarak, yaprakların deney başında klorofil muhtevaları tayin edilir.

Yapraklar 25°C de karanlıkta 4 gün süreyle bırakılırlar. Bunun sonunda test, kontrol ve eğer varsa kalibrasyon solüsyonlarındaki yaprak grupları ayrı ayrı test tüplerine aktarılırlar, tüplere 10 ar ml % 80 etanol konulur. Tübün ağzı cam bilya ile kapatılıp dikey pozisyonda 80°C deki sıcak su banyosunda 10 dakika tutulur. Bundan sonra tüpler karanlıkta soğutulur ve 665 nm de optik yoğunluk tayin edilir.

Sonuç, 100 mg. yaprak ağırlığı başına optik yoğunluk olarak belirtilir. Bu metotta klorofil miktarının, artan sitokinin konsantrasyonuna paralel olarak arttığı görülmüştür.

Biz kürsümüzde bu metodu bazı değişikliklerle uyguladık. Buğdayı vermikülit yerine kumda yetiştirdik ve bir yerli kültür formu (Karakılçık) kullandık. Metod çok olumlu sonuç verdi, ancak bizim kullandığımız buğdayın muhtemelen genetik özelliklerinden dolayı yapraklar saf su solüsyonunda inkubasyona bırakıldıktan ancak 6-7 gün sonra renklerini kaybetmeğe başladılar. Belki de başka bir kültür formu kullanılarak inkubasyon müddetini kısaltmak gerekecektir. Bu metod daha basitleştirilmiş şekli ile kürsümüzde Bitki Büyüme Maddeleri Laboratuvar çalışmaları esnasında öğrencilere yaptırılmaktadır.

Yapılacak bir sitokinin ekstraksiyonunda son su fazı etil asetat ve petrol eteri kalıntılarında arandıktan sonra 10 ml replikatlar halinde birkaç petriye bölündükten sonra, saf su ile mukayeseli olarak, önceden bilinen sitokinin konsantrasyonları ile bir kalibrasyon eğrisi çizilmek şartı ile, her replikatın sitokinin muhtevası tayin edilebilir. Ayrıca önceden bütün solüsyonların pH ayarının yapılması, test, kontrol ve kalibrasyon eriyiklerinin aynı pH ta olmasının sağlanması gerekir.

2 — Antosiyan metodu: Son olarak Almanların 1966 da ortaya attıkları, tatbiki çok kolay, fakat nedense araştırmacıların pek gözüne çarpmamış bir biyolojik test metodundan bahsetmek istiyorum. KÖHLER ve CONRAD (1966)'a göre Tirozin ve sitokinin ile muamele edilen *Amaranthus caudatus* fideleri, belirli süre ışıklandırıldıklarında, meydana getirdikleri antosiyan miktarı ortamın sitokinin muhtevasına paralel olarak artmaktadır.

Metoda göre tohumlar sterilize edildikten sonra filtre kâğıdından ibaret çimlenme ortamına aktif kömür ilavesi ile ekilirler. 20°C sıcaklıkta 48 saat karanlıkta bırakıldıktan sonra fideler, 50 şer adet olmak üzere 10 ml hacimdeki şu maddelerden meydana gelen test ortamına konurlar: Sitokinin tayini yapılacak ekstrakt (bizim metodumuzda su fazı), % 0,1 L-tirozin, % 1 agar, litrede 1/75 Mo! Na-K-Fosfat tamponu (pH: 6,3).

Fideler bu ortama transplante edildikten sonra 3 gün daha karanlıkta bırakılırlar; bu periyodun 48. saatinde 4 saat süre ile ışıklandırılırlar. Işıklıandırmadan 24 saat sonra fideler alınır, yıkanır ve renk ekstraksiyonu için -20°C de 5 ml suda dondurulur. Sonra 20°C ye kadar ısıtılıp buzları çözülür ve çalkalanır. Üstte kalan ekstrakt kısmı alınarak 542 nm de absorpsiyon ölçülür. Burada betasiyanin

miktarı ile ortamın sitokin konsantrasyonu arasında bir paralelitede olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu testin IAA ve GA<sub>3</sub> e cevap vermediği, bu bakımdan da çok spesifik olduğu görülmüştür.

Yukarıda izaha çalıştığım bu iki testin klasik tütün öz ve soya fasulyesi kallusu testlerine üstünlükleri, ekstraktan direkt tayin yapabilmeye imkânı vermeleri ve kolay yapılabilirleridir. Biz kürsümüzde yapılacak çalışmalarda, yukarıda önerdiğimiz sitokin ekstraksiyon plânı sonunda elde edilen su fazını, açıklamaya çalıştığımız test metodlarından biriyle veya her ikisiyle biyolojik teste tabi tutarak sitokin tayinleri yapmak ve bu işi, olanaklarımız ölçüsünde rutin hale getirmek arzusundayız. Özellikle bitkilerde genç kalma amacına yönelik bir çalışmada kullanılmak üzere geliştirilecek böyle bir metodun oldukça fazla kullanılış alanı bulacağına inanıyoruz.

### ÖZET

Bitkilerde genç kalma fenomeni ile sitokinler arasındaki ilişkiler sorununu çözmeye yolunda atılması gereken adımların başında, bu büyüme maddeleri grubunu bitkisel dokulardan ekstre etme ve kantitatif tayinleri konusunda yeni yöntemlerin geliştirilmesi gelmektedir. Bu makalemizde sitokin ekstraksiyonu konusunda çeşitli yöntemler karşılaştırılarak bir ekstraksiyon modeli önerilmektedir. Ayrıca klasik biyolojik test metodları ile, çok daha basit olan iki yeni metod karşılaştırılmakta ve bu yeni test metodlarının bundan böyle yapılacak çalışmalarda güvenle kullanılabilecekleri savunulmaktadır.

### BİBLİYOGRAFYA

- BROWN, N.A.C. ve STADEN, J. (1973): The effect of stratification on the endogenous cytokinin levels of seeds of *Protea compacta* and *Leucadendron daphnoides*. *Physiol. Plant.* 28: 388.
- BURROWS, W.J. ve D.J. CARR (1970): Cytokinin content of Pea seeds during their growth and development. *Physiol. Plant.* 23: 1064.
- KÖHLER, K.H. ve K. CONRAD (1966): Ein quantitativer Phytokinin-test. *Biologische Rundschau* Bd. 4: 36.
- LETHAM, D.S. ve C.O. MILLER (1965): Identity of kinetin-like factors from *Zea mays*. *Plant Cell Physiol.* 6: 355.
- KRASNUK, M. F.H. WITHAM ve J.R. TEGLEY (1971): Cytokinins extracted from Pinto Bean fruit. *Plant Physiol.* 48: 320.

- MILLER, C.O., F. SKOOG, M.H. von SALTZA ve F.M. STRONG (1955): Kinetin: a cell division factor from deoxyribonucleic acid. J. Am. Chem. Soc. 77: 1392.
- MITCHELL, J.W. ve G.R. LIVINGSTON (1968): Methods of studying plant hormones and growth-regulating substances. Agriculture Handbook, No: 336, U.S. Dept. of Agriculture, Agricultural Res. Serv.: 46.
- PRAKASH, R. ve S.C. MAHESWARI (1970): Studies on cytokinins in watermelon seeds. Physiol. Plant. 23: 792.
- STADEN, J.V. (1973): Changes in endogenous cytokinins of lettuce seed during germination. Physiol. Plant. 28: 222.
- TEGLEY, J.R., F.H. WITHAM ve M. KRASNUK (1971): Chromatographic analysis of a cytokinin from tissue cultures of crown gall. Plant Physiol. 47: 581.