

ENDOSPERM KÜLTÜRLERİNDE TRİPLOİD BİTKİCİKLERİN TEŞEKKÜLÜ

As Meral TÜZÜN

İstanbul Üniversitesi, Botanik ve Genetik Kürsüsü

Navashin tarafından 1898 de Angiospermlerde çift döllenmenin keşfinden sonra mühim problem, bu çift döllenmenin iki ürününün gelişim yollarını incelemek olmuştur. Birinci ürün zigot ve onun verdiği bipolarite gösteren embriyo, ikinci ürün primer endosperm nukleusu ve onun verdiği organize olmamış doku yani endosperma dır.

Embriyo döllenmenin diploid ürünüdür. Endosperma ekseriya triploiddir. Haploid kromozom taşıyan iki polar nukleusun birleşmesiyle embriyo kesesi sekonder nukleusu ve onun generatif nukleuslardan biri ile birleşmesiyle primer endosperm nukleusu (3n) meydana gelir. Primer endosperm nukleusunun birbirini takip eden mitoz bölünmeleri neticesinde endosperma teşekkül eder:

Endosperma genellikle kısa yaşamlı bir dokudur. Bezelye, fasulye gibi bitkilerin tohumlarının gelişimi esnasında tamamen harcanır. Diğer taraftan *Ricinus* gibi bitkilerin olgun tohumlarında devamlı olup embriyoyu çimlenme esnasında besler. Karbonhidrat, yağ, protein bakımından zengindir. Bol miktarda büyüme maddeleri ihtiva eder.

ENDOSPERMANIN İN VITRO KÜLTÜRLERİ

Kök, gövde, embriyo kültürleri doku kültürünün erken tarihlerinde yapılabildiği halde endospermin suni ortamlarda muhafazası ancak son zamanlarda başarılmıştır.

İlk olarak Lampe ve Mills 1933 de mısır endosperm dokusunun

genç mısır taneleri veya patates ekstraktı ilavelendirilmiş ortamda tomurcuklanarak çoğalmasını gözlemişlerdir. 1947 de LaRue tabiatta perikarpı çıkarılmış mısır tanelerinin beyaz bir kitle halinde geliştiğini görmüş ve birçok tecrübeden sonra mısır endosperm dokusunun nihayetsiz büyüme kabiliyetinde olduğunu göstermiştir. *Zea mays* (mısır) in inkişaf etmiş birçok örneğinden sadece birinde kök, kök-gövde ekseninin geliştiğini görmüştür. Daha sonra birçok araştırmacı in vitro olarak muhtelif spesiyeslerin olgunlaşmamış endosperm kültürlerinde başarılı deneyler yapmışlardır (Lampton, 1952; Straus ve LaRue, 1954; Sternheimer, 1954; Norstog, 1956; Tamaoki ve Ullstrup, 1958; Nakajima, 1962; Sehgal, 1969). Mamafih olgun endospermden tomurcuklanmada başarı elde edememişlerdir. Ancak son on seneki çalışmalarda olgun endospermden tomurcuklanma temininde sadece birkaç spesiyeste başarılı olunmuştur. Rangaswamy ve Rao (1963) *Santalum album*'un olgun endosperminden doku kültürü yaparak bu sahada öncü olmuşlardır. Daha sonra olgun endospermden doku kültürleri Euphorbiaceae, Loranthaceae ve Santalaceae'ye ait bitkilerde yapılmıştır. Nag (1970) parazitik bitkilerden *Dendrophthoe falcata*, *Taxillus cuneatus*, *T. vestitus* ve *Leptomeria acida*'nın olgun endospermelerini kültüre etmiştir. Angiospermelerin sadece autotropik dört örneğinde başarılı olgun endosperm kültürleri yapılabilmıştır: *Croton bonplandianum* (Bhojwani 1966); *Jatropha panduraefolia*, *Putranjiva roxburghii* ve *Ricinus communis* (Srivastava, 1971 c).

Kültürlerin yapılışına geçmeden önce büyümede etkili olan faktörlerden bahsedelim:

In vitro (= tecrübe tübünde) olarak çok az araştırmacı endosperm dokusunun büyümesinde fiziksel faktörlerin etkisini incelemiştir.

pH : Besleyici ortamın pP sı ekseriya 4,5 ve 6,3 arasında bulunmuştur. Lampton (1952) *Asimina*'da endospermanın en iyi büyümesinin pH 4.0 de, Straus ve LaRue (1954) mısırdaki pH 7 de olduğunu bulmuşlardır. Srivastava (1971, 1973) en iyi büyümenin *Jatropha* ve *Putranjiva*'da pH 5,6 da, *Ricinus*'da pH 5.0 de olduğunu kaydetmiştir.

ISI VE IŞIK: Straus ve LaRue (1954) mısır endosperminin büyümesi için 20-30°C arasını denemişlerdir. 30°C da büyümede en az %50 azalma ve 20°C deki ile 25°C deki mukayese edildiğinde 25°C dekinde 4 misli bir artış görülmüştür. *Jatropha* ve *Ricinus* endosperm kültürlerinde de 24-26°C ler kallusun en iyi büyümesini sağlamıştır (Johri, Srivastava 1973).

Mısır endospermi sadece karanlıkta bırakıldığı zaman memnuniyet verici bir büyüme göstermiştir (Straus ve LaRue 1954). *Lolium*'un bü-

yümesinde ışığın hiçbir etkisi yoktur (Norstog 1956). *Ricinus*'da en iyi büyüme devamlı ışık (1500 lüks) altında ortaya çıkmıştır (Johri ve Srivastava 1973).

Pigmentasyon :

Straus (1960) mısır endosperm kültürlerinde antokyan sentezini en iyi sağlayanların aspartik asit ve sistein olduğunu bulmuştur. Halbuki riboflavin, methionin, asparagin, glutamin ve valin pigmentasyonu inhibe ederler. Yukarıda bahsedilenlerin hepsi tecrübe edilmiş ve *Ricinus*'da pigment sentezinin başarısız olduğu gözlenmiştir (Johri ve Srivastava 1973).

Straus (1959) genellikle asidik ortamların pigment sentezinde hafif teşvik edici, alkali ortamların inhibe edici etkisi olduğunu bulmuştur. Fakat pH 4,5-5,0 olan asidik ortamda büyüyen *Ricinus*'un endosperm kallusu herhangi bir pigmentasyon göstermemiştir.

Organ teşekkülü :

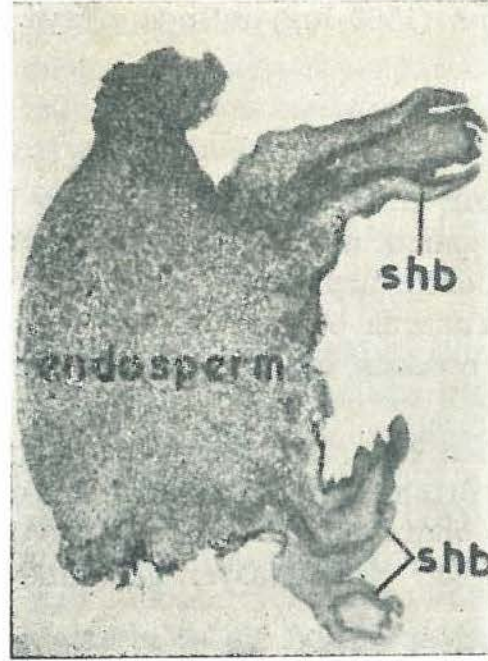
Organ teşekkülü parazitik angiospermelerin 6 spesiyesinde (*Exocarpus*, *Scurrula*, *Dendrophthoe*, *Leptomeria*, *Taxillus cuneatus*, *T. vesititus*) ve 3 autotropik spesiyeste (*Croton*, *Jatropha*, *Putranjiva*) görülmüştür.

Olgun endosperm daha ziyade ya bir sitokin veya sitokin+auxin ihtiva eden ortamda optimal büyüme gösterir. Mafih autotropik örneklerde sitokin ve auxinin yanında CH (Casein hydrolsate) veya YE (Bira mayası extractı) nında ilâvesine ihtiyaç olduğu görülmüştür.

Parazitik örneklerin hemen hemen hepsinin olgun endosperm dokularında kallus teşekkülü olmadan gövde tomurcuklarının meydana geldiği, halbuki autotropik örneklerde kallus teşekkülünden sonra tomurcuk teşekkülü olduğu deneyler sonunda kaydedilmiştir.

İlk olarak Johri ve Bhojwani (1965) *Exocarpus cupressiformis*'in olgun endospermde gövde tomurcuklarının farklılaşmasını IAA ve CH ilavelendirilmiş WM (White ortamı*) nda kaydetmişlerdir. Endosperm zayıf olarak tomurcuklanmıştır. Bu araştırmacılar ortamdan CH ın kaldırılmasıyla tomurcuk farklılaşması gösteren kültürlerin nisbetinde 13-26 arası bir artış olduğunu gözlemişlerdir. Bhojwani (1968) KN (Kinetin) in tek başına tomurcuk farklılaşmasına sebep olabildiğini bulmuştur (Şekil 1).

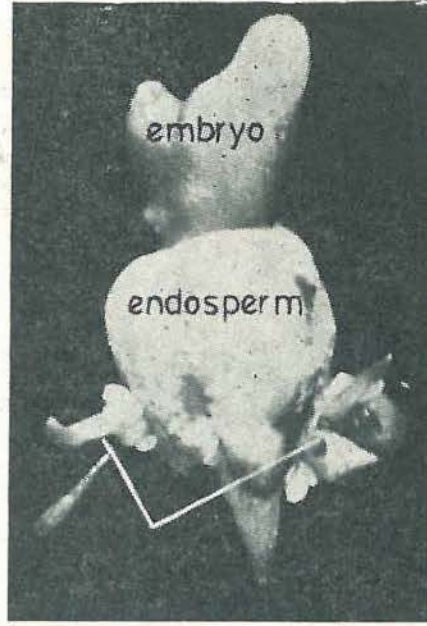
(*) White ortamı: Su: 1000 cm³, MgSO₄:0,360 g, Ca(NO₃)₂:0,200 g, Na₂SO₄:0,200 g, KNO₃:0,080 g, KCl:0,065 g, NaH₂PO₄: 0,0165 g.



Şekil: 1 — *Exocarpus cupressiformis*. WM + 1AA + KN + CH ortamında gövde tomurcuklarının (shb) farklılaşmasını gösteren endosperma kesiti (Johri ve Bhojwani, 1965).

Johri ve Bhojwani (1970 *Scurrula pulverulenta*'nın kültürlerinde olgun endospermden klorofilli tomurcukların geliştiğini görmüşlerdir. Taze ortamda tekrar kültürleri yapıldığında haustorium halinde farklılaşan tomurcuklar nadir görülen bir haldir. Bu spesiyeste dışardan bir sitokin verilmeden tomurcuk farklılaşması yoktur. ($1.3 \times 10^{-5}M$) SD8339 da tomurcuk farklılaşması kolaylaşmış fakat bu farklılaşma için 6-(γ , γ dimetilamino)-purin en çok, trikanthin en az etkili olanıdır (Şekil 2).

Nag (1970) *Taxillus vestitus* ve *T. cuneatus*'un olgun endosperminden gövde tomurcuklarının farklılaşmasını incelemiştir. *T. vestitus*'da agar ortamına bağlı endospermin orientasyonu çok mühim bir rol oynar. Şayet endospermin yarım parçası ortam ile kesik yüzü temas edecek şekilde dikilirse 10 hafta sonra kültürlerin % 100 ünde her kültür başına 12-18 gövde tomurcuğu meydana gelir. Bu netice ortama verilen sitokinine bağlıdır. Gövde tomurcuklarının farklılaşması için 10.0 ppm KN ye 6 hafta, 5.0 ppm KN ye 9 hafta ihtiyaç vardır. Tomurcukların WM + Adenin veya WM + 3 (γ , γ dimetilamino)-purin de farklılaşması zayıftı. Endospermin yarım parçası vertikal veya horizontal olarak dikildiği zaman önce 2 tomurcuk kesik kıs-

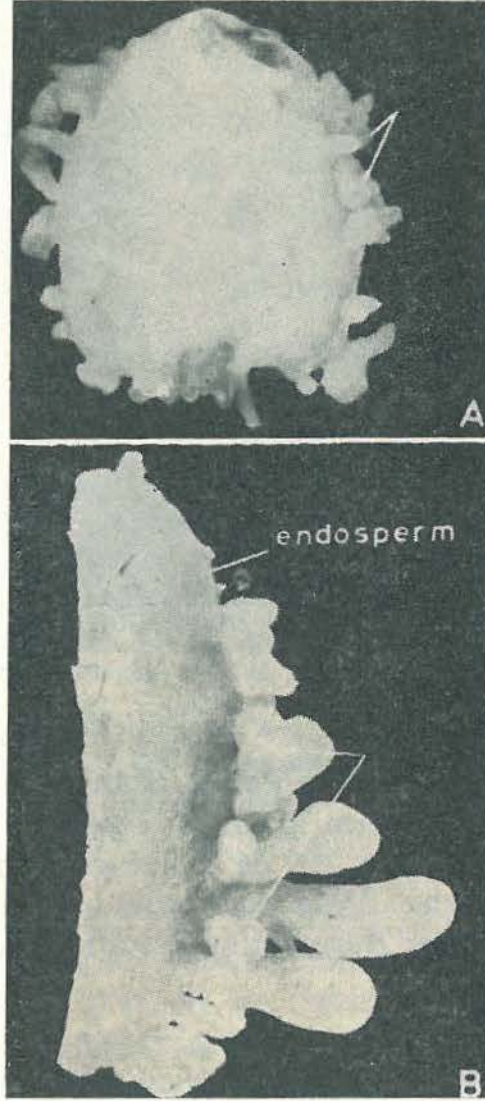


Şekil: 2 — *Scurrula pulverulenta*. WM + zeatin ortamında 16 haftalık kültür (Bhojwani ve Johri, 1970).

ma yakın epidermal hücrelerden gelişir. Tomurcukların çoğu ortam ile direk temasta olan endosperm kısmından gelişir. Tomurcuklar, yarım endosperm parçası 0.025 ppm KN de 4 saat emdirildikten sonra WM ye dikildiğinde dahi gelişirler. Böyle parçalarda tomurcuklara bütün yüzey boyunca rastlanır. Benzer durum Nag (1970) tarafından *T. cuneatus*' ta gözlenmiştir (Şekil 3).

Johri ve Nag (1968), Nag (1970) *Dendrophthoe falcata*'nın endosperm kültürlerinde çalışmışlardır. Şekillerden anlaşılacağı gibi *Dendrophthoe* de *Exocarpus*'a zıt olarak CH ile takviyelenmiş ortam, endospermden gövde tomurcuğu farklılaşması gösteren kültürlerin nisbetinde bir artmaya sebep olmuştur. Indol propionik asit (IPA) kültürlerin % 35 inde gövde tomurcuk teşekkülüne sebep olmasına rağmen, tomurcuklar daha sonra deforme olmuştur. NAA (Naftalen-asetik asit, 2,4-D (2,4 Diklorfenoksi asetik asit), 2,5,5-T (Triklorfenoksi asetik asit) gibi diğer auxinler denenmiş ve tomurcuk teşekkülüne sebep olmadıkları görülmüştür. Indol butirik asit tomurcuk teşekkülünden ziyade bol kalluslanmaya sebep olmuştur (Şekil 4).

Nag (1970) *Leptomeria acida*'nın endosperm kültürleri ile de çalışmıştır. WM+IAA veya WM+IBA+bir sitokin+CH ortamında gövde tomurcuğu gelişmesini gözlemiştir. IBA ile ilavelendirilmiş ortam endosperm kallusunun hızlı büyümesi için çok elverişlidir. Kallus IAA

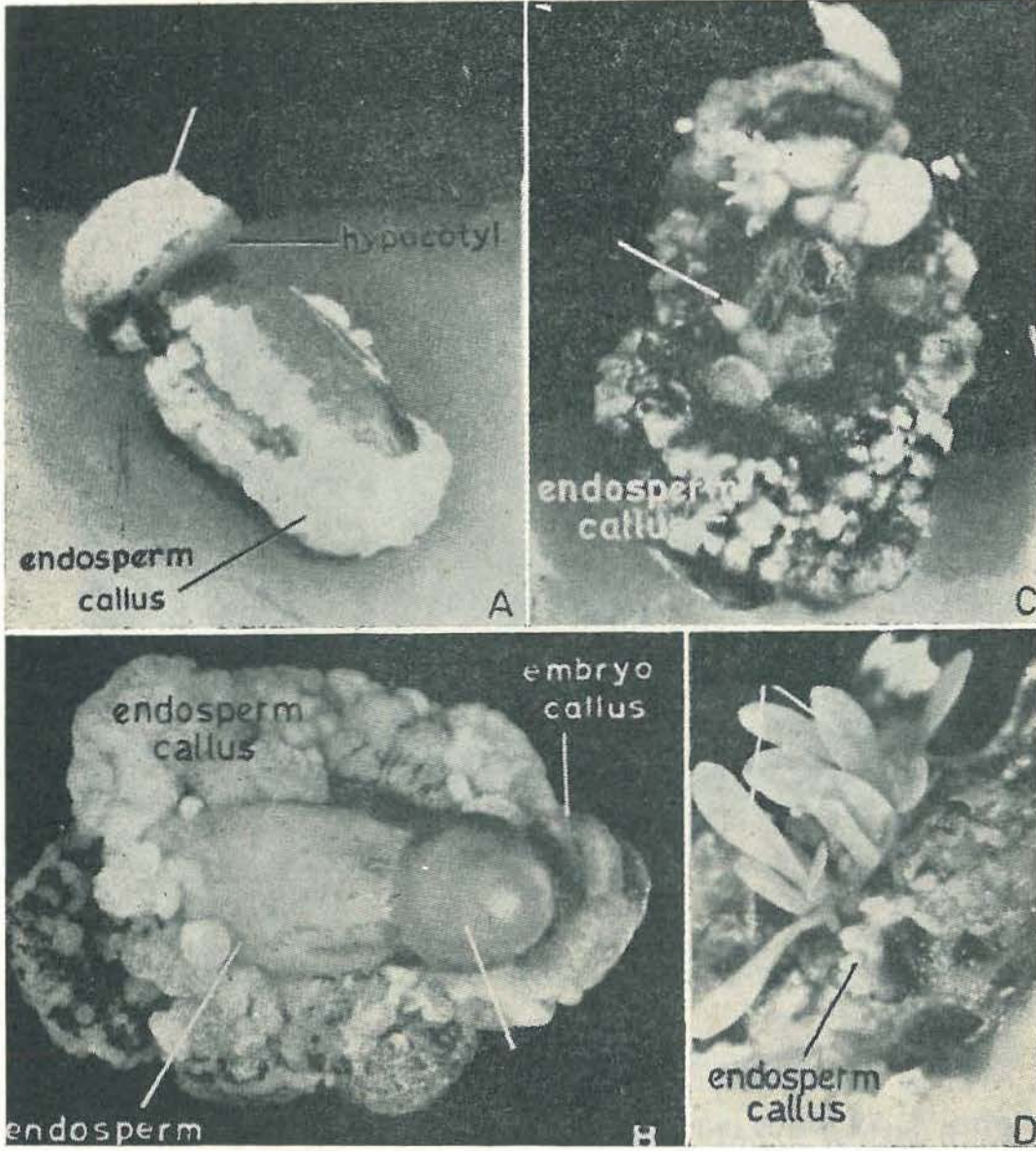


Şekil: 3 — *Taxillus vestitus*, WM + KN ortamında (A) Endosperm yarımının 10 haftalık (B) 16 haftalık kültürü (Johri ve Nag, 1970)

lı ortamda büyüdüğünde, kültürlerin hemen hemen hepsi 7 hafta sonra tomurcuk farklılaşması göstermiştir ve bu tomurcuklar diğer 3 hafta içinde gövdeler halinde gelişmişlerdir (Şekil 5).

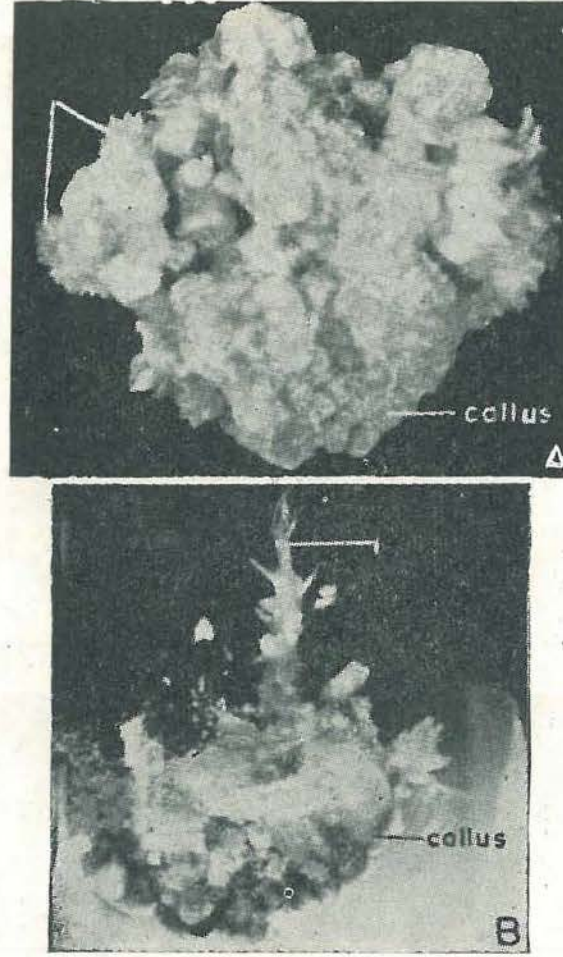
Parazitik angiospermlere ait bitkilerin kültürlerinden kısaca bahsettikten sonra Euphorbiaceae'ye ait autotropik bir bitkinin endosperm kültürüne değinelim :

Putranjiva roxburghii'nin olgun meyvaları ağaçlardan toplandıktan sonra perikarp ve tohum gömleği çıkarılmış sonra embrioyu çeviren endosperm sterilize edilmiş ve White'in % 4 sukrozla geliştiril-



Şekil: 4 — *Dendrophthoe falcata*. A) WM + 1BA + KN ortamında endospermin tomurcuklanmasını gösteren 3 haftalık kültür B) WM + 1BA + KN + CH ortamında endospermin kalluslanmasını gösteren 12 haftalık kültür, C) 7 haftalık kültürde endosperm yüzeyinden gövde tomurcuğunun farklılaşması, D) WM + 1AA + 6-benzilamino purin + CH ortamında 18 haftalık kültür (Johri ve Nag, 1968).

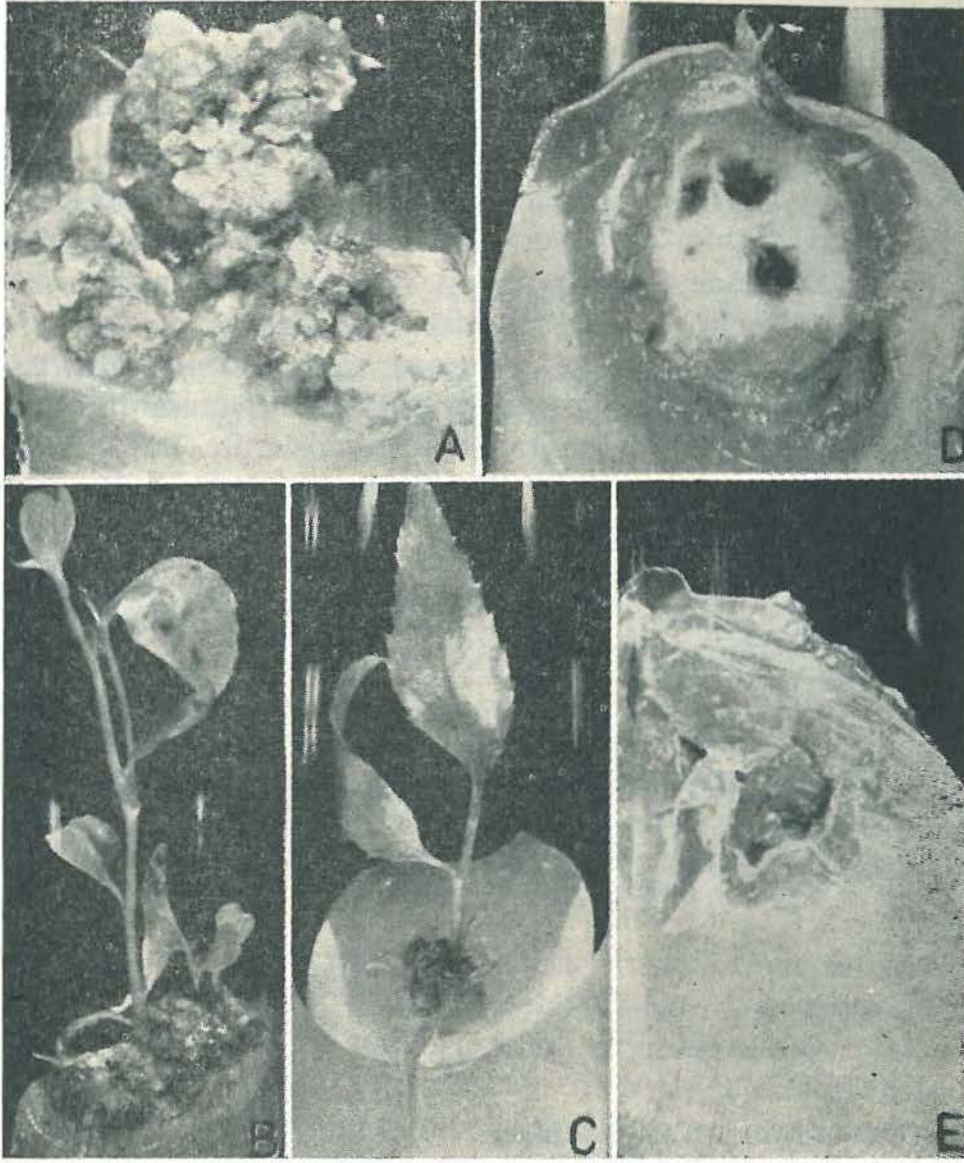
miş % 8 agar ortamına aseptik şartlarda dikilmiştir. WM ye bazı büyüme regülatörleri de ilâve edilmiştir. Kültürler $25 \pm 2^\circ\text{C}$ da hergün 10 saat 500-600 lux diffus ışığa maruz bırakılmışlardır. Bütün deneyler iki defa tekrarlanmış ve her muamele için 48 kültür yapılmıştır.



Şekil: 5 — *Leptomeria acida*. A) WM + 1BA + KN + CH ortamında çok sayıda küçük yapraklı gövdeleri gösteren 12 haftalık endosperm kültürü, B) WM + 1AA + KN + CH ortamına nakledildikten sonraki durum (Nag, 1970).

WM de embriyo normal bir fide gibi gelişir ve 30 gün içinde kültürlerin % 72 sinde endospermin tamamı harcanır. 2.4-D den gayri auxin ihtiva eden ortamda embriyo çimlenmiş fakat endosperm inaktif kalmıştır. Endosperm WM+2.4-D (10^{-5} M) ortamında çok az tomurcuklanma göstermiştir.

Ortamda (10^{-6} M \times 5.0) kinetin bulunursa endospermden yeşil nodüller gelişir. Histolojik çalışmalar bunların exogenik orjinli olduğunu göstermiştir. Endospermin 60 mg ağırlığında nodüllü kısımları WM+IAA ($1,2\times 10^{-5}$) +kinetin ($2,4\times 10^{-5}$) +CH(1000 ppm) ortamına nakledildiğinde bol bol tomurcuklanmıştır. 6 hafta sonra kallusun 90-100 mg lık parçası aynı ortamda tekrar kültüre edilmiştir. Herbiri 4 hafta olmak üzere 3-4 ekimden sonra kallus yoğun hale gelir ve kültürlerin % 85 inde birkaç gövde tomurcuğu teşekkül eder. Bunların herbiri 5-6



Şekil: 6 — *Putranjiva roxburghii*. A) WM + 1AA + kinetin + CH ortamında endosperm kallusu, B) Aynı ortamda 8 haftalık endosperm kallusu, C) Bitkicik gösteren bir kültür, D) Giberellin emdirilmiş endosperm parçasından direk olarak farklılaşan gövde tomurcuğu, E) 1PA ortamında gövde tomurcuğu farklılaşmasını gösteren 6 haftalık kültür (Srivastava, 1972).

iyi gelişmiş yaprak taşıyan 4 cm uzunluğunda gövdeler halinde gelişir ve kültürlerin % 21 inde köklerinde aynı kallustan farklılaştığı görülür. Böylece tüm bir bitkicik elde edilmiş olur. Şayet bu gövdeler kallustan kesilip taze ortama dikilirlerse, kesilmiş kısımlarından köklerin farklılaştığı görülür. Farklı inorganik maddelerle yapılan deneyler KNO_3 , $CaNO_3$ veya KH_2PO_4 ihtiva etmeyen ortamlarda kallus büyümesinin ve gövde tomurcuk farklılaşmasının zayıf olduğunu göstermiştir.

Olgun endospermin tomurcuklanması için embriyonun tümüne ihtiyaç vardır. Olgun endosperm dokusu eğer embriyosuz kültüre edilirse tomurcuklanma görülmez. Çimlenme esnasında giberellin gibi madde-lerin embriyodan salgılandığı (Paleg 1960, Ingle ve Hageman 1965) kaydedilmiştir.

Bhojwani (1968) *Croton*'da, Srivastava (1971 c) *Putranjiva* ve *Ricinus*'ta embriyo faktörünün yerini alıcı madde keşfi için çalışmalar yapmışlardır. Onlar, endosperm parçalarını ortama dikmeden önce 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 ppm GA₃ (giberellik asit) solüsyonunda, IAA veya KN solüsyonunda 12, 24, 36, 48, 72 saat iyice ıslatmışlardır. 2.0 ppm IAA de iyice ıslatılan kültür parçaları ekildikleri zaman dikkate değer şekilde genişlemişler fakat tomurcuk vermemişlerdir. Daha iyi bir durum *Putranjiva* ve *Ricinus*'da gözlenmiştir. *Putranjiva*'nın endosperm parçaları GA₃ (1.0 ve 2.0 ppm) de 36 saat ıslatıldıktan sonra WM+IAA+KN+CH veya WM+2.4-D+KN+YE ortamında kültüre edilirse kültür parçalarının kenarlarından kallus teşekkül ettiği ve 4 hafta sonra küçük yeşil tomurcukların geliştiği görülür.

Srivastava tarafından *Putranjiva*'nın endosperm kültürlerinde gövde tomurcuklarının farklılaşması için aynı konsantrasyonda farklı auxin ve sitokinlerin etkisi CH lı ortamlarda incelenmiş ve aşağıdaki tablo çıkarılmıştır :

		KONSANTRASYON (M)	Gövde to- murcukları gösteren kül- türlerin % si
AUXİNLER			
İndol asetik asit	(IAA)	1.2×10^{-5}	85
İndol propionik asit	(IPA)	1.2×10^{-5}	74
İndol-3-bütrik asit	(IBA)	1.2×10^{-5}	61
Nafthalen asetik asit	(NAA)	1.2×10^{-5}	43
2.4 Diklorfenoksi asetik asit (2.4-D)		1.2×10^{-5}	0
2.4 Diklorfenoksi asetik asit (2.4-D)		2.0×10^{-6}	7
SİTOKİNİNLER			
6-(γ , γ dimetil amino-purin)		$2,4 \times 10^{-5}$	87
Zeatin		$2,4 \times 10^{-5}$	84
Kinetin		$2,4 \times 10^{-5}$	83
Benzil adenin		$2,4 \times 10^{-5}$	51
SD 8339		$2,4 \times 10^{-5}$	39
Trikantin		$2,4 \times 10^{-5}$	9

Kalluslu endosperm dokusundan gövdelerin farklılaşması için IAA in en fazla etken, 2,4-D nin en az etken olduğu görülmüştür. IPA nın IAA yı hemen takip eden olduğu kaydedilmiştir.

Sitokininler arasında 6-(γ , γ -dimetil amino-purin) in en fazla, trikantinin en az etken olduğu bulunmuştur. Zeatin ilave edilen ortamda gövde tomurcukları hızla farklılaşmış ve 4 haftada 10 cm uzunluğa erişmiştir.

Exocarpus'un endosperm kültürlerinde gövde tomurcuğu teşekkülünde CH in inhibe edici etkisine karşılık *Putranjiva*'da CH çok önemlidir. Kallus büyümesi 2000 ppm CH da çok iyi, 3000 ppm de gövdeler 0,8 cm den fazla büyümemiş, 5000 ppm de ise bol kallus teşekkül etmiştir.

SONUÇ

Endosperm kültüre edildiğinde ekseriya organiza olmamış doku kitlesi halinde gelişir. Embriyo gibi endosperm hücrelerinden haustoriumlar, gövdeler, kökler yani tüm bitkiciklerin farklılaşması bize bu hücrelerin potansiyelini gösterir.

Endospermden sentetik ortamda organlaşmanın meydana gelebilmesi için genel bir formül bulunamamıştır. Formül her bitki için değişik olmaktadır. Farklı ortamlarda büyüme cevaplarında bazı benzerlikler varsa da büyüme maddelerinin etkisi çok değişiktir.

Görüldüğü gibi organlaşma parazitik angiospermlerde endosperm dokusundan direk olarak meydana geldiği halde autotroflarda kallus teşekkülünden sonra olmaktadır. Bunun sebepleri araştırmaya değerdir. Kallusta farklı ploidi derecelerinde hücreler görülmesine rağmen sadece triploid olanlardan organların farklılaşması anlaşılamamıştır.

Endospermden triploid bitkiciklerin teşekkülü çok enteresandır. Mamafih henüz sayılarını çoğaltmada ve onların toprağa naklinde fazla başarı elde edilememiştir. Daha ileriki çalışmalarda bu problemlerin halledileceği ümit edilmektedir. Endospermden triploid ve onlardan hexaploid bitkiciklerin elde edilmesi genetikçi ve bitki yetiştiricileri için çok mühim bir müjdedir.

BİBLİYOGRAFYA

- 1 — BHOJWANI, S.S. (1966) : Morphogenetic behaviour of mature endosperm of *Croton bonplandianum* in culture. *Phytomorphology* 16, 349-353.
- 2 — BHOJWANI, S.S ve B.M JOHRI (1970) : Cytokinin-induced shoot bud differentiation in mature endosperm of *Scurula pulverulenta*. *Z. Pflanzenphysiol.* 63, 269.275.

- 3 — JOHRI, B.M. ve S.S. BHOJWANI (1965) : Growth responses of mature endosperm in cultures. *Nature, Lond.* 208, 1345-1347.
- 4 — JOHRI, B.M. ve P.S. SRIVASTAVA (1973) : Morphogenesis in endosperm cultures. *Z. Pflanzenphysiol.* 70, 285-304.
- 5 — LAURE, C.D. (1944) : Regeneration of endosperm of gymnosperms and angiosperms (Abstr.). *Amer. J. Bot.* 31, 45.
— (1949) : Cultures of endosperm of maize (Abstr.). *Amer. J. Bot.* 36, 798.
- 7 — NAG, K.K. ve B.M. JOHRI (1971) : Morphogenic studies on endosperm of some parasitic angiosperms. *Phytomorphology* 21, 202-218.
- 8 — RANGASWAMY, N.S. ve P.S. RAO (1963) : Experimental studies on *Santalum album* : Establishment of tissue culture of endosperm. *Phytomorphology* 13, 450-454.
- 9 — SRIVASTAVA, P.S. (1971) : In vitro induction of triploid roots and shoots from mature endosperm of *Jatropha panduraefolia*. *Z. Pflanzenphysiol.* 66, 93-96.
(1973) : Formation of triploid plantlets in endosperm cultures of *Putranjiva roxburghii*. *Z. Pflanzenphysiol.* 69, 270-273.
- 10 — STRAUS, J. ve C.D. LARUE (1954) : Maize endosperm tissue grown in vitro. 1. Culture requirements. *Amer. J. Bot.* 41, 687-694.
- 11 — TÖREN, J. (1972) : Bitki embryolojisi ders notları.