

4. DERS –SOMATİK EMBRİYOGENESİS, HAPLOİT BİTKİ ÜRETİMİ

SOMATİK EMBRİYOGENESİS

İn vitro koşullarda vejetatif hücrelerden embriyo oluşumu somatik embriyogenesis olarak tanımlanmaktadır.

Somatik embriyoların zigotik embriyolardan en önemli farkı, orijinleri somatik hücreler olduğu için elde edilen bitkilerde genetik açılımın meydana gelmemesi ve bir klon oluşturabilmeleridir. Oysa zigotik embriyolar döllenmiş yumurta hücrelerinden meydana geldiği için gelişen bitkilerde genetik açılım ortaya çıkmaktadır.

Dikotiledon bitkilerde zigotik embriyolar gibi somatik embriyolarda da;

- **Globular,**
- **Kalp,**
- **Torpedo,**
- **Kotiledon**

gelişim safhaları bulunmaktadır. Somatik embriyolarda da gövde-kök eksenini aynı anda bulunmaktadır.

Somatik embriyogenesis;

- **Direkt (doğrudan) somatik embriyogenesis,**
- **İndirekt (kallus dokusundan) somatik embriyogenesis**

olmak üzere iki şekilde meydana gelmektedir.

- 1) **Direkt somatik embriyogenesis:** Somatik embriyoların eksplant üzerinde bulunan tek bir hücre ya da hücre gruplarından arada kallus aşaması olmadan doğrudan meydana geldiği durumdur. Bu embriyolar kallustan değil doğrudan eksplant hücrelerinden oluştuğu için genetik özellikleri eksplantın özellikleri ile tamamen aynıdır.
- 2) **İndirekt somatik embriyogenesis:** Somatik embriyoların yüksek oksin içeren ortamlarda eksplanttan meydana gelen embriyogenik kallustan oluştuğu durumdur. Kallus aşaması nedeniyle oluşan somatik embriyolarda varyasyon ortaya çıkma olasılığı yüksektir.

Somatik Embriyogenesisin Kullanım Alanları:

- 1) **Klonal çoğaltım:** Farklı türlerde somatik embriyoların oluşum, çoğalma ve bitkiye dönüşüm protokollerinin geliştirilmesinden sonra somatik embriyogenesis hızlı, yoğun ve bir örnek bitki çoğaltımı için önemli bir kaynak durumuna gelmiştir. Bu tekniğin özellikle *Pinus* türlerindeki başarısı çoğaltımda büyük bir potansiyel sağlamıştır. Biyoreaktörlerin geliştirilmesi ile otomatik bir düzen içerisinde hızlı üretim ve çoğaltım çok az bir iş gücüyle gerçekleştirilebilmektedir.
- 2) **Sentetik tohum üretimi:** Somatik embriyolar, zigotik embriyolardan farklı olarak çimlenme sırasında besin kaynağı olarak kullanabilecekleri endosperm ya da depo kotiledonlarına ve bir tohum kabuğuna sahip değildir. Bu nedenle somatik embriyoların tohum olarak kullanılabilmesi için ekim sırasında onları koruyacak, çimlenme gerçekleşene kadar canlı tutacak ve bitkilerin ilk gelişmesi sırasında gerekli olan besin maddelerini sağlayacak bir duruma getirilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla geliştirilmiş 3 sistem bulunmaktadır;
 - a) Embriyoların kaplanması,
 - b) Embriyoların sıvı içerisinde ekimi,
 - c) Kurutulmuş ve kaplanmamış embriyoların ekimi.

Uygulamada en fazla somatik embriyoların kaplanması işlemi üzerinde durulmaktadır.

Embriyoların kaplanması: Somatik embriyolar hidrojel ile ve bu amaçla en yaygın olarak aljinat ile kaplanmaktadır. Aljinat uygun viskozite, düşük toksidite ve hızlı jelleşme özelliğine sahip bir maddedir. Embriyolar önce sodyum aljinat (%0.5-5) ile karıştırılmakta ve daha sonra içerisinde kalsiyum klorit ya da kalsiyum nitrat (30-100 mM) bulunan bir kaba yavaş yavaş boşaltılmaktadır. Böylece 4-6 mm çapında kalsiyum aljinat kapsülleri elde edilmektedir.

3) Gen aktarımı

4) Genetik materyalin muhafazası

Somatik Embriyogenesi Etkileyen Faktörler:

- **Genotip:** Somatik embriyo oluşturma oranı bitki türleri ve aynı türün çeşitleri arasında büyük farklılık gösterebilmektedir. Farklı genotiplerin embriyogenesisten sorumlu genleri genomlarında bulundurup bulundurmamalarına göre o tür için somatik embriyogenesinin başarısı ortaya çıkmaktadır. Somatik embriyo oluşturma oranı yüksek bir çeşidin, başarı oranı düşük bir çeşit ile melezlenmesi sonucu elde edilen dölde başarı oranı yükselebilmektedir.
- **Eksplant kaynağı:** Tüm bitki dokularının somatik embriyo oluşturma oranı aynı düzeyde değildir. Genel olarak genç ve rejenerasyon kabiliyeti yüksek dokulardan somatik embriyo oluşumu daha başarılıdır. Bu bakımdan olgunlaşmamış kotiledonlar çok iyi sonuç vermektedir. Bazı türlerde in vitro yaprak, gövde ve kök eksplantlarından da başarılı sonuçlar alınmıştır. Hücre süspansiyon kültürleri de bu bakımdan önemli bir kaynaktır. Nitekim somatik embriyolar ilk kez havuç bitkisinde hücre kültürlerinde elde edilmiştir.
- **Besin ortamının içeriği:** Somatik embriyogenesi için bitki türlerine göre farklı temel besin ortamları esas alınmaktadır. MS (Murashige ve Skoog), DKW (Driver ve Kuniyuki Walnut), WPM (Woody Plant Medium), B5 (Gamborg ve ark.), N6 (Chu ve ark.) gibi ortamlar en fazla kullanılanlardır. Somatik embriyogenesinin uyarılması için başlangıçta ortama oksinlerin ilave edilmesi gerekmektedir. 2,4-D ya da NAA 0.5-2 mg/l dozlarında en fazla kullanılan oksinlerdir. Daha sonra eksplantların somatik embriyo oluşumu için oksinsiz ortama alınması gerekmektedir. Temel besin ortamlarına kazein hidrolizat gibi ilave azot kaynaklarının katılması embriyogenesi için gerekli olabilmektedir.
- **İnkübasyon koşulları:** Özellikle karanlık uygulaması somatik embriyogenesi çoğu kez olumlu etkilemektedir. Burada en önemli faktör ışığın oksinleri parçalayıcı etkiye sahip olmasıdır. Bununla birlikte somatik embriyoların rejenerasyonu için ışık gereklidir. Embriyoların olgunlaşması ve bitkiye dönüşümlerinde 16 saat normal aydınlık (5000-10000 lüks ışık şiddetinde) 8 saat karanlık uygulaması önerilmektedir. Somatik embriyogenesi çalışmalarında kültür odasının sıcaklık düzeyi 25°C olmalıdır.

HAPLOİD BİTKİ ELDE EDİLMESİ

Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere **haploid bitkiler** denir.

Haploidler her bir lokustaki allellerden sadece bir seriyi içermektedir.

Haploid bitkilerin doğada kendiliğinden ortaya çıkma sıklığı genotiplere bağlı olarak %0.1-0.001 ve hatta bazı türlerde %0'dır.

Günümüzde haploid bitkilerin elde edilebilmesi için en etkin yöntem erkek veya dişi gametlerin başlangıç materyali olarak kullanıldığı in vitro tekniklerdir.

Bir türün normal kromozom sayısının yarısına sahip olan gametlerden yararlanarak, o türün gametik kromozom sayısını taşıyan bitkilerin elde edildiği teknik **haploidizasyon** olarak tanımlanmaktadır.

Haploid bitkiler gamet oluşturmamaları için kısır dırlar ve tohum bağlayamazlar.

Bu bitkilerin ıslah programlarında kullanılabilmesi için yeniden diploid bitkilere dönüştürülmesi gerekir.

Haploid bir bitkinin kromozomlarının bazı kimyasal maddeler yardımıyla ya da spontan olarak katlanması sonucunda ait olduğu türün kromozom sayısına (2n) yeniden kavuşturulması, böylece mutlak homozigot bitkilerin elde edilmesine **dihaploidizasyon** adı verilmektedir.

Haploidizasyon Tekniğinin Kullanım Alanları:

- 1- Haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanması yoluyla kısa zamanda %100 homozigot saf hatlar elde edilebilmektedir. Böylece dihaploidizasyon yöntemi ile homozigot hatlara bir generasyonda ulaşılabilir (klasik yöntem ile bu süre yabancı döllenen türlerde 10-12 generasyon; kendine döllenenlerde 5-7 generasyondur).
- 2- Klasik yöntemler ile homozigotiye ulaşmanın zor olduğu türlerde (dioik türler, kendileme depresyonu olan türler gibi) dihaploidizasyon yöntemi ile homozigotiye bir generasyonda ulaşılabilir.
- 3- Odunsu bitki türlerinde uzun gençlik kısırlığı nedeniyle klasik yöntemler ile homozigotinin elde edilmesi çok uzun zaman almaktadır. Dihaploidizasyon yöntemi ile bu süre kısalmaktadır.
- 4- Dihaploid bitkilerden elde edilen saf hatlar F₁ hibrit çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilir.
- 5- Arzu edilen özellikler melez bitkilerden F₁ kademesinde haploidizasyon tekniği ile elde edilerek kombinasyon ıslahında kullanılabilir.
- 6- Haploidizasyon ile resesif mutasyonlar açığa çıkarılabilir.
- 7- Haploid bitkilerin hücrelerinde somatik hibridizasyon daha kolay uygulanabilir.
- 8- Tetraploid türlerde haploidizasyon tekniği ile diploid bitkilerin üretimi mümkün olabilmektedir.
- 9- Bazı dioik türlerde haploidizasyon tekniği ile saf erkek bitkiler elde edilebilir.
- 10- Özellikle poligenik olarak kontrol edilen bir karakterin moleküler düzeyde tanımlanması dihaploid hatlarda daha kolay olmaktadır.
- 11- Sitolojik, fizyolojik, genetik çalışmalarda haploid ve dihaploidler önemli deneysel materyaldir.

Haploid Bitki Elde Edilme Yöntemleri:

A- Erkek Gametten Haploid Bitki Elde Eldesi (Androgenesis)

- 1- Anter Kültürü
- 2- Mikrospor Kültürü

B- Dişi Gametten Haploid Bitki Elde Edilmesi (Gynogenesis, partenogenesis)

- 1- Ovül Kültürü
- 2- Ovaryum Kültürü
- 3- Kromozom eliminasyonu (Bulbosum tekniği)
- 4- Eksik veya yetersiz polenler ile tozlama

ANTER KÜLTÜRÜ:

Haploid embriyo ve bitki oluşumu amacıyla olgunlaşmamış mikrosporları (polenleri) içeren anterlerin aseptik koşullarda çiçek tomurcuklarından çıkarılarak yapay besin ortamları üzerinde kültüre alındığı in vitro tekniktir.

Androgenesis Etkileyen Faktörler:

- 1- Donör Bitkiden Kaynaklanan Faktörler
 - a) Donör bitkinin genotipi
 - b) Yetiştirme koşulları
- 2- Anter Kültürü Tekniğinden Kaynaklanan Faktörler
 - a) Anterin gelişme dönemi
 - b) Anterlere yapılan ön uygulamalar
 - c) Besin ortamının bileşimi
 - d) İnkübasyon koşulları

Anterlerin Gelişme Dönemi:

- Anter kültüründe en uygun başlangıç materyali, tek çekirdekli ya da birinci polen mitozundan hemen önceki dönemde bulunan mikrosporları içeren anterlerdir.
- Mikrosporlar içerisinde nişasta depolanmaya başladıktan sonra başarılı sonuçlar alınmamaktadır.

Anterlere Yapılan Ön Uygulamalar:

- Tomurcuklara yapılan soğuk şokları (4-10 °C'de 4 gün-4 hafta)
- Tomurcuklara ethrel uygulaması
- Santrifüj etme

Besin Ortamının Bileşimi:

- Androgenesis için en fazla kullanılan temel besin ortamları MS (Murashige ve Skoog), White and Nitsch ve B5 (Gamborg ve ark.)'dir.
- İlk aşamada gametofitik gelişmeyi sporofitik gelişmeye dönüştürmek üzere ortama oksinler ilave edilirken; bitkiciklerin elde edilme aşamasında sitokininlere ihtiyaç duyulmaktadır. Anter kültüründe 2,4-D, NAA ya da IAA en fazla kullanılan oksinler; kinetin, benzil adenin ve zeatin en fazla kullanılan sitokininlerdir.
- Besin ortamlarına özellikle kültürün ilk aşamasında yüksek şeker dozlarının (%6-12) ilave edilmesi haploidlerin elde edilmesinde başarıyı artırmaktadır.
- Anter kültüründe besin ortamına serin, glutamin gibi aminoasitlerin, AgNO₃'ün ve aktif kömürün ilave edilmesi olumlu etki yapmaktadır.

İnkübasyon koşulları:

- Başlangıçta anterlerin karanlıkta ve 20-30°C sıcaklıkta; ilerleyen aşamalarda düşük ışık yoğunluğunda (2000 lüks) tutulması embriyo oluşumunu olumlu etkilemektedir. Rejenerasyon aşamasında daha yüksek ışık yoğunluğu gerekmektedir.
- Bazı türlerde başlangıç aşamasında anterlere 3-14 gün süreyle yüksek sıcaklık uygulaması (30-35°C) ve daha sonra 25°C'ye alınması embriyo oluşumunu artırmaktadır.

MİKROSPOR KÜLTÜRÜ:

Haploid embriyo ve bitki oluşumu amacıyla olgunlaşmamış mikrosporların (polenleri) aseptik koşullarda anter içerisinden izole edilerek yapay besin ortamları üzerinde kültüre alındığı in vitro tekniktir.

Polen kültürü olarak da isimlendirilir.

Anter kültürüne göre daha komplike bir tekniktir.

Mikrospor kültürünün avantajları:

- 1- Anter kültüründe anterlerin diploid yapıdaki dokularından da (anter duvarı, septum, tapetum gibi) embriyo (diploid yapıda) oluşabilmekte ve bu embriyolar haploid embriyolar ile rekabete girebilmektedir. Oysa mikrospor kültüründe oluşan embriyolar tamamen haploiddir.
- 2- Mikrospor kültüründe besin ortamı ile doğrudan temas halinde oldukları için mikrosporlar besin maddelerini daha iyi alabilmektedir.
- 3- Anter dokusunda bulunan engelleyici maddeler (ABA, toksik maddeler gibi) anterle birlikte uzaklaştırıldığından sorun olmaktan çıkmaktadır.
- 4- Tek bir mikrospordan embriyo oluşumu sağlandığı için genetik manüplasyonlar, mutasyon, biyolojik testler vb. çalışmalar için uygun bir tekniktir.
- 5- Kolzada olduğu gibi haploid embriyo verimi bu teknikte daha yüksektir.

OVÜL VE OVARYUM KÜLTÜRLERİ:

Haploid embriyo ve bitki oluşumu amacıyla döllenmemiş yumurta hücresinin ya da yumurtalığın aseptik koşullarda yapay besin ortamları üzerinde kültüre alındığı in vitro tekniktir.

Gynogenesisi Etkileyen Faktörler:

- 1- Genotip
- 2- Donör bitkilerin yetiştirildiği koşullar
- 3- Yumurtalığın gelişme dönemi
- 4- Çiçek tomurcuklarına yapılan ön uygulamalar
- 5- Besin ortamlarının bileşimi
- 6- İnkübasyon koşulları

HAPLOİD BİTKİLERDE KROMOZOM KATLAMA

- Günümüzde kromozom katlaması için en yaygın kullanılan kimyasal madde **kolhisin** ($C_{22}H_{25}O_6$)'dir.
- Bu madde Liliaceae familyasına ait *Colchicum autumnale* L. (güz çiğdemi) bitkisinin köklerinden elde edilir.
- Alkoloid yapısında kuvvetli bir zehirdir.
- Kolhisin, mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve böylece replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar.

PLOİDİ BELİRLEME

- Fenotipik gözlemler
- Kromozom sayımları
- Flow sitometri
- Stoma ve kloroplastların incelenmesi