MEYVE TÜRLERİNDE SOMATİK EMBRİYOGENESİS

Melekber SÜLÜŞOĞLU DURUL (Orcid ID: 0000-0002-6546-5891)
Kocaeli Üniversite, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Kocaeli, Türkiye.
E-mail: meleksl@kocaeli.edu.tr

Nuşin TEKİN
Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, Türkiye.
E-mail: tekinnusin@gmail.com

ÖZET

Somatik embriyogenesis uzun ömürlü odunsu meyve türlerinde ıslah çalışmalarında önemli ve tercih edilen doku kültürü tekniklerinden biri olarak ele alınmaktadır. Somatik embriyogenesis, somatik bir hücrenin in vitro embriyo oluşturma yeteneğine sahip bir hücreye farklılaşmasıdır. Somatik embriyoların temel avantajı, döllenme sonucu oluşan genetik açılımların bulunmamasıdır. Somatik embriyogenesis doku kültüründe bitki rejenerasyonunu sağlayan yöntemlerden biridir. Somatik embriyogenesis, direkt somatik embriyogenesis ve indirekt somatik embriyogenesis olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşebilmektedir. Yaprak ayası, yaprak sapı, olgunlaşmamış zigotik embriyolar, apomiktik ve nuseller embriyolar, in vitro kök ve sürgünler, kotiledonlar, hücre süspansiyon kültürleri, stil, stigma, petal gibi çiçek parçaları, meyve türlerinin somatik embriyogenesis kültürü için başlangıç materyali olarak kullanılabilir. Kültürün başarısında meyve genotipi, ana bitki, başlangıç materyali, kültür periyodu, uygun besin ortam bileşiminin belirlenmesi, hormon ve uygun doz seçimi, kültür koşulları (karanlık, aydınlık vb.) önemli rol oynamaktadır. Somatik embriyolarda kök ve sürgün gelişimi aynı anda gerçekleştiğinden, somatik embriyolar aracılığıyla doğrudan köklü bitkilerin üretilmesine olanak sağlar. Somatik embriyolar, farmasötik hammaddelerin (fenolik maddeler gibi) üretiminde kullanılabilir. Meyve ağaçlarında yapılan genetik rejenerasyon çalışmalarında somaklonal varyasyon ve protoplast füzyonu bitki kazanımını kolaylaştırır. Erken olgunlaşan birçok çeşitte, zigotik embriyo, embriyo aborsiyonundan dolayı gelişimini tamamlayamaz. Uyumsuz hibrit kombinasyonlarda da benzer bir durum gözlenmektedir. Bu türlerde, erken gelişim aşamasında in vitro kültür yoluyla kurtarılan zigotik embriyolardan oluşturulan somatik embriyolar, bitki elde etmek için kullanılmaktadır. Bu teknik, sentetik tohum üretiminde kullanılabildiğinden bitki üretiminde ve ıslah programlarında yüksek faydalara sahiptir. Burada sunulan bu çalışmada meyve türlerinde gerçekleştirilen somatik embriyogenez uygulaması tartışılmış, sonuçları ele alınarak, meyve üretim alanlarında kullanımları ve yeni meyve türlerinin ıslahındaki önemi değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Somatik embriyogenesis, meyve türleri, ıslah, yetiştiricilik

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN FRUIT CULTIVAR

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is one of the preferable tissue culture techniques in long-life woody fruit species. The main advantage of somatic embryos is that the genetic openings that occur because of fertilization are not present in this method. Somatic embryogenesis is the differentiation of a somatic cell into a cell with the ability to form an embryo in vitro. Somatic embryogenesis is one of the methods that provides plant regeneration in tissue culture. Somatic embryogenesis included two different techniques, direct somatic embryogenesis, and indirect somatic embryogenesis. Leaf explant, petiole, immature zygotic embryos, apomictic and nucellar embryos, in vitro roots and shoots, cotyledons, cell suspension cultures, flower parts, such as style, stigma, petal can be used as starting materials for somatic embryogenesis culture of fruit species. Fruit genotype, main explant source, culture initiation explant type, culture period, determination of appropriate nutrient medium composition, selection of hormones and appropriate doses, culture conditions (dark, light etc.) have an important role on success of culture. Since root and shoot development are occurred at the same time simultaneous in somatic embryos, it allows production of directly rooted plants via somatic embryos. Somatic embryos can be used in the production of pharmaceutical raw materials (such as phenolic substances). Soma clonal variation and protoplast fusion facilitate plant acquisition in genetic regeneration studies in fruit trees. In many early maturing cultivars, the zygotic embryo cannot complete its development due to embryo abortion. A similar situation is observed in incompatible hybrid combinations. In these species, somatic embryos formed from zygotic embryos rescued via in vitro cultured at an early developmental stage are used to obtain plants. This technique has high benefits in production of plants and breeding programs as they can be used as synthetic seeds. In this study presented here, somatic embryogenesis application carried out in fruit species discussed, the results were investigated and uses in fruit production area and importance for breeding of new fruit species was evaluated.

Keywords: Somatic embryogenesis, fruit species, fruit growing, breeding

1.GİRİŞ

Somatik embriyogenesis; somatik bir hücrenin in vitro bir embriyo oluşturabilme yeteneğinde totipotent embriyonik kök hücreye farklılaşmasıdır. Somatik embriyogenesis doku kültüründe bitki rejenerasyonunun elde edilmesini sağlayan önemli yöntemlerden birisidir. Doğrudan somatik embriyogenesde somatik embriyolar eksplant üzerinde bulunan tek bir hücre ya da hücre gruplarından arada kallus aşaması olmadan doğrudan meydana gelmektedir. Bu embriyolar doğrudan ana eksplant hücrelerinden oluştuğu için genetik özellikleri ana bitkinin tüm özelliklerini taşımaktadır. Dolaylı somatik embriyogenesisde eksplant yüksek dozda oksin içeren ortamlarda kültüre alınmakta; embriyogenik kallus elde edilmekte ve somatik embriyolar kallus dokusundan oluşmaktadır. Bu nedenle kallustan elde edilen somatik embriyolarda varyasyon olasılığı bulunmaktadır. Somatik embriyolar zigotik embriyolar gibi globular, kalp, torpido ve kotiledon oluşumu safhalarını geçirmektedir (Mordhorst et al., 1997). Gövde-kök ekseni embriyolarda aynı anda bulunduğundan doğrudan tam bir bitki üretilebilmektedir. Ayrıca, ana doku ile vasküler bir bağlantıları olmadığından, ana bitkiden kolaylıkla ayrılmaları mümkün olmaktadır. Somatik embriyo tek bir hücreden oluştuğundan, sonrasında kendilerinden üretilecek tüm bitkiler genetik olarak klon oluşturmaktadır.

2. SOMATİK EMBRİYOGENESİSİN MEYVE YETİŞTİRİCİLİĞİNDE KULLANIM ALANLARI

Somatik embriyogenesisden meyve yetiştiriciliğinde klonal çoğaltım, sentetik tohum üretimi, gen aktarımı ve genetik çalışmalarda yararlanılabilmektedir. Somatik embriyolar somatik hibridizasyon, mutasyon oluşturma, meyve türlerinin seleksiyon çalışmaları, meyve türlerinde çeşit tanısı, meyve genetik kaynaklarının korunması ve DNA transferi gibi moleküller çalışmalarda da büyük önem taşımaktadır (Guan ve diğ., 2016). Transgenik ve hibrit bitkilerin çoğaltılması, nesli tehlike altındaki genetik kaynakların saklanması ve tohumları kurumayan tropik türlerin üretimi ve saklanmasında öne çıkmaktadır (Erdem ve Uysal, 2021). Somatik embriyoların en büyük avantajı, döllenme sonucunda gerçekleşen genetik açılmaların bu yöntemde olmamasıdır. Bitkilerin somatik embriyogenez yolu ile çoğaltılması alternatif bir mikro çoğaltım yöntemidir. Prunuslarda erken olgunlaşan çeşitlerde embriyo aborsiyonu nedeniyle zigotik embriyo gelişimini tamamlayamamaktadır. Yine uyuşmaz melez kombinasyonlarda da embriyo gelişememektedir. Erken gelişim aşamasında tohumdan çıkarılarak in vitro kültüre alınan zigotik embriyolardan somatik embriyogenez yolu ile çok sayıda bitki elde edilebilmektedir. Somatik embriyogenez uzun bir yaşam döngüsüne sahip olan

odunsu meyve türlerinde zaman kazancı sağlayan doku kültürü tekniklerinden birisidir (Yıldırım 2012, Isah 2016).). Tek hücre kökenli çok sayıda embriyonun biyoreaktörlerde üretilmesine olanak sağlaması bakımından ıslah programlarında avantaj sağlamaktadır. Somatik embriyoların bipolar yapıları doğrudan köklü bitkiler eldesine olanak vermektedir (Kurt, 2015, Erdem ve Uysal, 2021). Somatik embriyogenesis çalışmaları kolaylaştırıcı ve zaman kazandıran uygulamalardır. Muz, Papaya, Turunçgiller, Mango, Guava, Antepfıstığı ve üzümde somatik embriyolar sentetik tohum üretimi için kullanılmaktadır (Korkmaz ve Çölgeçen, 2013). Somatik embriyolar üretilmekte, çoğaltılmakta, uygun materyallerle kaplanmakta ve kurutma işlemi yapılmaktadır.

3. SOMATİK EMBRİYOGENESİS İÇİN BAŞLANGIÇ MATERYALLERİ VE BAŞARIYI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Meyve türlerinde somatik embriyogenesis için başlangıç materyali olarak yaprak ayası eksplantları, yaprak sapı, olgunlaşmamış zigotik, apomiktik ve nuseller embriyolar, in vitro kök ve sürgünler, kotiledonlar kullanılabilmektedir. Somatik embriyogenesis gelişiminde başlangıç materyalinin yapısı çok etkilidir. Olgunlaşmamış zigotik embriyolar embriyojenik kallus gelişimi için önemli bir kaynaktır. Hipokotil parçalarının embriyojenik kallus üretme yeteneği kotiledon dokusundan daha yüksektir.

Meyve türleri çok yıllık odunsu bitkilerdir ve bitkilerin genetik özelliklerinden dolayı somatik embriyogenesis hattının elde edilmesinde birçok zorluk yaşanabilmektedir. Meyve türlerinde yapılan çalışmalarda somatik embriyogenesisin başarısını etkileyen faktörlerin başında bitkinin genotipi, eksplant kaynağı ve eksplantın alım zamanı yer almaktadır. Yine kullanılan besin ortamı, hormonlar ve uygun doz seçimi, karbonhidrat kaynağı, kültür koşulları diğer faktörlerdir (Erişen, 2005).

Embriyojenik kallus elde edildikten sonra, kallus dokusundan somatik embriyo gelişiminin sağlıklı şekilde başlatılması sonraki aşamalardaki başarıyı etkilemektedir. Embriyogenik kallus kararsız yapıdadır ve yapısının özelliğini hızlı yitirmektedir. Bu da sürecin tekrarlanmasını gerektirebilmektedir. Ayrıca somatik embriyoların bitkiciklere dönüşüm oranının düşük olması, oluşan embriyolarda morfolojik anormalliklerin görülmesi, elde edilen bitkilerin dış koşullara alınma aşamasında yaşanabilen sorunlar başarı oranını kısıtlamaktadır (Erdemel ve Aygün, 2016).

4. MEYVE TÜRLERİNDE SOMATİK EMBRİYOGENESİS UYGULAMALRI

4.1 YUMUŞAK ÇEKİRDEKLİ MEYVE TÜRLERİNDE SOMATİK EMBRİYOGENESİS

Elma'da geleneksel melezleme ve mutasyonlarla birçok yeni çeşit elde edilmiştir. Son yıllarda somatik embriyogenesis konusundaki gelişmeler bu tekniğin ıslah çalışmalarında kullanımını artırmıştır. Golden Delicious'ın olgunlaşmamış zigotik embriyolarının kotiledonlarından somatik embriyogenez yoluyla rejenerasyon araştırılmıştır. Embriyogenik kallus indüksiyonu için MS + 3.7 mg/L nicotinic acid+ 1.7 mg/L thiamine chlorhydrate + 10 mg/L adenine+ 20 mg/L glutamine+ 20 mg/L glycine+ 6 mg/L NAA içeren ortamda zigotik embriyolar kültüre alınmıştır. Elde edilen embriyogenik kalluslar somatik embriyo geliştirme ortamına alınmıştır. MS + 3.7 mg/L nicotinic acid + 1.7 mg/L thiamine chlorhydrate+0.5 mg/L BAP+0.05 mg/L NAA içeren ortamda somatik embriyo gelişimi gerçekleşmiştir. Somatik embriyo gelişimi genellikle kotiledonda petiolun alt kısmında oluşmuştur. Somatik embriyoların bitkiye dönüşümü 1/2 MS ortamında sağlanmıştır. Yeni bitki rejenerasyonu ise MS+0.1 mg/L BAP+0.1 mg/L KIN +0.1 mg/L IBA içeren ortamda başarı göstermiştir. Sonuç olarak kültüre alınan kotiledonlarda somatik embriyo, adventif kök, kallus ve iki farklı amorf yapıda embriyojenik yapı oluşumu gerçekleşmiştir. Başarı için en uygun kotiledon yaşı 60 günlük kotiledonlar olurken, eksplant yaşının artması somatik embriyo gelişimini olumsuz etkilenmiştir. 4-6 hafta içinde iyi gelişmiş bitkiler toprağa şaşırtılabilmiştir (Paul ve diğ. 1994). *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem., yabani elma ormanlarının yaklaşık %78'ini oluşturan bir elma genetik kaynağıdır. Bu türün in vitro sürgünlerinin yaprak ve gövde kısımları başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Kültürlerde kompakt yapıda kallus oluşmuş; kallusun yapısı ve rengi ortama eklenen TDZ, NAA, BA varlığı ile değişmiştir. Kültürlerde kallusun yüzeyinde bazı nodüler yapılar görülmüştür. Kompakt yeşil kallus'un kenarında sarımsı embriyogenik kallus oluşmuş ancak somatik embriyo indüksiyonu olmamıştır (Zhang ve diğ., 2020).

Dört armut çeşidinde (Natanzi, Ghosi, Williams ve Dar Gazi) verimli bir çoğaltma yolu olarak somatik embriyogenez çalışmaları iki amaç doğrultusunda yürütülmüştür. Birinci amaç, uygun eksplant tipinin belirlenmesi, diğeri ise stres istihdamıdır. Çeşitlerin cevapları genetik yapıdan kaynaklı farklılığı açıkça ortaya koymuştur. Bununla birlikte, en yüksek embriyojenik kallus indüksiyonu endosperm ve olgunlaşmamış kotiledonlardan 8.05 µM NAA, 13.32 µM BA içeren MS ortamında elde edilmiştir. 250 mg/L glutamin ve 30 g/L sakkaroz ile besin ortamı desteklenmiştir. Optimize edilen besin ortamı içerikleri çeşitlere göre farklılık göstermiştir.

Embriyojenik calluslar %1 PEG içeren ortamda veya soğukta bekletildiklerinde somatik embriyo gelişimi gerçekleşmiştir (Ameri ve diğ. 2018).

Ayvanın (*Cydonia vulgaris* pers.) farklı zamanlarda alınan olgunlaşmamış çenek yaprakları somatik embriyo oluşumu için BA +2,4-D ve BA +NAA kombinasyonlarını içeren kültür ortamına dikilmiştir. Elde edilen somatik embriyoların bitkiye dönüşümünün sağlanması için kültürler farklı sürelerde soğuk uygulamalarına maruz bırakılmıştır. İlk dört haftasını başlangıç ortamında geçiren çenek yapraklarda bu sürenin sonunda eksplant başına 1.07-2.53 adet somatik embriyo oluşumu gerçekleşmiştir. Somatik embriyogenesis ayvanın in vitro çoğaltımı için önemli bir potansiyele sahip olarak belirtilmiştir (Aygün ve Dumanoğlu, 1999).

Farklı makro element kombinasyonlarının ayvanın (*Cydonia oblonga* Mill.) yaprak dokusundan somatik embriyogenezisi üzerine etkileri incelenmiştir. Kallus gelişimi ortam içeriğine ve genotipe bağlı olarak değişim göstermiştir. Genotip ve makro besin elementi kombinasyonunun somatik embriyo ve kök rejenerasyonu üzerindeki etkileri önemli bulunmuştur. BA 29 klonu en yüksek embriyojenik özellik göstermiş, MS bazal ortamı somatik embriyo oluşumu için en uygun bulunmuştur. WPM ve Schenck and Hildebrandt besin ortamlarında eksplantlardan kök rejenerasyonu daha yüksek olmuştur. Tüm uygulamalarda erken somatik embriyogenesis aşaması gerçekleşmiş ancak bitkiye dönüşüm aşamasında başarı sağlanamamıştır. Farklı embriyo ve kök gelişimindeki en büyük etkenin ortamın azot içeriği, özellikle nitrat-amonyum oranının olabileceği belirtilmiştir (Fisichella 2000).

4.2. SERT ÇEKİRDEKLİ MEYVE TÜRLERİNDE SOMATİK EMBRİYOGENESİS

Şeftali *Prunus persica* (L.) embriyolarından kallus elde edilerek, sürekli olarak somatik embriyoların üretilebileceği hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması için yöntem geliştirilmesine çalışılmıştır. Somatik embriyolar doğrudan kotiledon dokuları üzerinde ve modifiye MS ortamında elde edilmiştir. Ardından sekonder embriyolar henüz olgunlaşmasını tamamlamadan alınarak embriyogenik kallus üretiminde kullanılmıştır. 1 g taze ağırlığa sahip kallus kümeleri alınarak agar içermeyen sıvı formda hücre süspansiyon kümeleri oluşturulmuştur. Hücre süspansiyon kültürlerinde tek tek veya 10-15 adet olarak küme halinde embriyo oluşumu gerçekleşmiştir. Embriyoların gelişmesinde 2,4 D ve BAP'ın kombinasyonlarının etkisi görülmüştür. Ayrıca, kültürlerin karanlık koşullarda geliştirilmesi etkili bulunmuştur. Yine kültür yaşı canlılığı etkilemiş, 60 günlük kültürlerde canlılık %50 olarak kaydedilmiştir. Kültürlerde elde edilmiş olan somatik embriyolar aydınlık koşullara alındıklarında, hemen klorofil üreterek, tomurcuklanma ile çoğalmaya başlamışlar, yumuşak dokulu embriyojenik kallus kümeleri sertleşmiş, yoğun küresel yapıdan kalp şekline değişen

embriyolar haline dönüşmüştür. Kültürlerde bipolar (kotiledon- radikül) yapılarına da rastlanmıştır (Bhansali ve diğ. 1991).

Farklı vişne (*P. cerasus* L.) çeşitlerinin serbest tozlanan meyvelerinden alınan olgunlaşmamış kotiledonlardan 2,4-D+kinetin içeren besin ortamında embriyogenesis elde edilirken, NAA veya BAP kullanıldığında somatik embriyo gelişimi gerilemiş, kotiledon benzeri yapılar, yaprak, sürgün ve kök gelişmiştir. Ortama 0.1 mg/L IBA eklendiğinde somatik embriyolar daha iyi gelişmiştir. Çeşitlerden somatik embriyo gelişimi farklı oranda gerçekleşmiştir. Kotiledonların embriyonik eksenle birlikte kültüre alınması 'Schattenmorele' çeşidinde başarı şansını azaltmıştır. Ortam içeriğine bağlı olarak kotiledonların farklı (alt, üst, dip) kısımlarından somatik embriyo gelişimi gerçekleşmiştir. Globüler ve kotiledon aşamasına dönüşmüştür.

Kirazlarda ideal bir bodur anaç elde etmek için geleneksel metotlarda elde edilen sonuçlar yeterli gelmeyince, transgenik bitkiler üzerinde çalışmalar artmıştır. Colt kiraz (*Prunus avium* X *P. pseudocerasus*) anacında *Agrobacterium rhizogenesis*'in pRi 1855 T-DNA'sı ile oluşturulan transgenik köklerinden somatik embriyogenesis elde edilmiş ve bitkiye dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Colt anacının sürgünlü kök kültürlerinden somatik embriyo gelişmiş, sonrasında çok sayıda ikincil embriyolar elde edilmiştir. Ancak bitkiye dönüşüm çok düşük oranda gerçekleşmiştir. Bu yöntemle genetik çalışmalar sonucunda elde edilebilecek olan transgenik bitkilerin etkin şekilde çoğaltılabilmesi amaçlanmıştır (Gutierrez-Pesce ve diğ., 1998).

Bir başka çalışmada ise kuş kirazının olgun zigotik embriyolarının kotiledonları kültüre alınarak adventif kökler geliştirilmiştir. Adventif köklerden protoplastlar izole edilerek hücre süspansiyon kültürleri oluşturulmuştur. Hormon olarak NAA+BA+Zeatin eklendiğinde embriyojenik kallus elde edilmiş ve hücre kümelerinde erken gelişim aşamasında somatik embriyolar oluşmuştur. Protoplastların izolasyonunu takip eden 15. haftalardan sonra somatik embriyo oluşumu azalmıştır. Kültür yaşı somatik embriyogenesis başarısını etkileyen bir faktör olarak belirtilmiştir (David ve diğ. 1992).

Süs kirazında somatik embriyogenesisin klonal çoğaltım amacıyla kullanıldığı çalışmada sürgün uçlarından in vitro kültürler oluşturulmuş, in vitro bitkilerin kökleri 2,4-D içeren somatik embriyogenesis indüksiyon ortamlarına yerleştirilmiştir. Çalışmada somatik embriyo gelişimi gerçekleşmiştir. Yarı şeffaf somatik embriyolar, beyaz somatik embriyolar (direkt somatik embriyogenesis) gözlenmiştir. Primer somatik embriyolardan oluşan kallus üzerinde sekonder somatik embriyolar oluşmuştur. Karanlıkta inkübasyon ışıklı ortama göre pozitif etki yapmıştır. Ortama eklenen karbonhidrat kaynağı somatik embriyogenesis gelişimini

etkilemiştir. Sakkaroz ve glikoz her ikisi de embriyo gelişimini artırmış, şeker alkolleri olan sorbitol ve mannitol ise engellemiştir. Şeker ve şeker alkolleri ortama birlikte eklendiğinde etkileri azalmıştır (Cheong ve Pooler, 2004).

Vişne (CAB 6P) ve süs kirazı (G131) klonlarında yürütülen bir çalışmada eksplant tipi, farklı ortamlar ve kültür koşullarının etkileri incelenmiştir. Çalışmada en iyi sonuçlar yaprak eksplantları karanlıkta MS ortamında picloram eklenerek kültüre alındığında sağlanmıştır. Embriyojenik kallus gelişimi aşamasından sonra kültürler 0.4 µM BAP +0.05 µM NAA içeren MS ortamında geliştirilmiştir. Süs kirazı yaprak eksplantlarında gelişebilen somatik embriyo elde edilememiştir. Yaprağın orta damarında şişme, yaprağın alt bölgesinde kallus oluşumu, anormal kallus gelişimi oluşmuştur. Vişne kültürlerinde somatik embriyo elde edilmiştir. Yine yaprağın orta damarında şişme oluşmuş, 15. günde yaprağın yaralı yerlerinde kallus gelişmiştir. Ardından kallusun farklılaşması ve proembriyoların gelişmesi gözlenmiştir. 4 µM picloram içeren ortamda 4 hafta sonra primer embriyolardan embriyojenik kallus üretilmiştir. Kalp şeklinden kotiledon aşamasına kadar somatik embriyolar gelişmiştir (Mahmoud ve diğ. 2017).

4.3. SERT KABUKLU MEYVE TÜRLERİNDE SOMATİK EMBRİYOGENESİS

Ceviz uzun ömürlü, gençlik kısırlığı uzun odunsu bir meyve türüdür. Islah çalışmaları zaman alıcıdır. *Juglans nigra* ve *J. Regia* melezleri genellikle anormal gelişim göstermekte, melez bitkilerde canlılık oranı düşmektedir. Melezlerin olgunlaşmamış embriyolarının kotiledonlarından elde edilen gelişmiş yapıda somatik embriyolar çoğaltılmış, bunlardan sağlıklı bitkiler elde edilerek, melezleme çalışmalarından çeşit adaylarının elde edilmesi sağlanmıştır. Bu sayede gerek materyal canlılığı korunmuş, gerekse zamandan kazanılmıştır (Cornu 1989).

Bazı ceviz (*Juglans regia* L.) genotiplerinde apomiktik ve açıkta tozlanan tohumların olgunlaşmamış kotiledonlarından somatik embriyogenesis oluşumu araştırılmıştır. Dördüncü alt kültürün sonunda apomiktik ve apomiktik olmayan tohumlardan kaynaklanan embriyojenik kallus oluşturan kotiledon yüzdesi %3.6 ile %25 arasında olmuş; kotiledon başına embriyo sayısı 1 ile 9.7 arasında değişmiştir. Tokat-1 ceviz genotipinin apomiktik tohumlarının olgunlaşmamış kotiledonlarından elde edilen embriyojenik bir embriyo hattı ile ikincil embriyogenez çalışmaları sürdürülmüştür. Serbest tozlanma ile oluşan tohumların kotiledonları daha iyi sonuç vermiş, apomiktik tohumlardan istenen sonuç alınamamıştır. Elde edilen embriyojenik embriyo hatları daha ileri biyoteknolojik çalışmalarda faydalı olabilecek özellikte bulunmuştur (Şan 2002).

Yine olgunlaşmamış ceviz (*Juglans nigra*) embriyoların kotiledonlarından üretilen primer somatik embriyolardan sekonder embriyolar oluşturularak gen transferi çalışmalarında başarı şansı artırılmıştır (Bosela ve diğ., 2004).

Çin kestanesinde (*Castanea mollissima* Blume) yürütülen bir çalışmada somatik embriyogenesisin mekanizmasının tanımlanması ve somatik embriyogenesis ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerinde çalışılmıştır. Embriyogenesisin başlatılmasında kilit role sahip sekiz gen tanımlanmıştır. Çalışma sonuçlarının somatik embriyogenesis sırasında etkin olan moleküler mekanizmanın aydınlatılmasında genetik çalışmalarda önemli bir temel oluşturacağı beliritilmiştir (Lu ve diğ., 2017).

4.4 TURUNÇGİL MEYVELERİNDE SOMATİK EMBRİYOGENESİS

On bir farklı turunçgil anacının *in vitro* koşullarda geliştirilen bitkilerinin kök, yaprak, kotiledon, epikotil ve hipokotil kısımlarından embriyogenik kallus oluşumu araştırılmıştır. Çalışmada farklı besin ortamlarında kültüre alınan embriyo eksplantları arasında en yüksek embryogenik kallus oluşum oranı (%80) 2,4-D (2 mg/l)+BAP (0.5 mg/l) içeren besi ortamında Troyer sitranjı (*Citrus sinensis* (l) *Osb*. X *Poncirus trifoliata* (L) *Raf*) anacında gözlenmiştir. Epikotil, yaprak ve kotiledon kültürlerinin her üçünde de en iyi besi ortamı 2,4-D (2 mg/l)+KİN (0.5 mg/l)+NAA (2 mg/l) içeren ortam olmuştur. Epikotil eksplantları ise üç yapraklı Rubidoux (*Poncirus trifoliata* (L) *Raf*.) genotipinde en etkili sonuçları oluşturmuştur. Çalışmada yaprak eksplantlarından en iyi sonuçlar *Severinia buxifolia* genotipinden sağlanırken, Troyer sitranjında kotiledonlar en iyi başarıyı vermiştir. Kök eksplantları arasında en iyi gelişim Gou Tou turuncu (*Citrus aurantium* L.) nda olmuştur (Şen 2010).

Turunçgil kaynaklarının güvenli bir şekilde değişimi ve korunması amacıyla yürütülen bir çalışmada, Kütdiken limon çeşidi hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlara Zagara Bianca limonu yapraklarından izole edilen protoplastların PEG aracılığı ile füzyonu sağlanmıştır. 0.6 M sakkaroz içeren MT ortamında kültüre alınan füzyon ürünü protoplastlardan oluşan globüler embriyolardan bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Genetik materyalin saklanmasında önemli bir gelişme olarak verilmiştir (D'Onghia ve Djelouah 2000).

Embriyonik kallus hatları genetik kaynakların *in vitro* koşullarda saklanmasına, *Citrus* ve *Citrus* akrabaları arasında somatik hibridizasyona olanak sağlamaktadır. Turunçgillerde tohumlar meyve etinden ayrıldıktan sonra özel koşullarda saklanması gereklidir. Somatik hibridizasyon ile bu süreç de kolaylaşacaktır (Ling ve Iwamasa, 1997).

Calixto ve ark (2004) *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ve *Citrus grandis* (L.) Osbeck (Hamlin+Indian Red ve hamlin+Singapura) arasında somatik hibridizasyon ile Tristeza virüsü

ve P*hytophthora* hastalığına tolerans anaçlar elde etmişlerdir. (Avenido ve diğ. ,2005) Şadok'ta somatik embriyoları olgunlaşmamış tohumların albedo dokularından MS (Murashige ve Skoog, 1962) ve BP ortamlarında (1mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D) elde etmişlerdir. Somatik embriyolardan regenerasyon sistemlerinin virüsten ari fidan üretimi için kullanılabileceği belirtilmiştir.

4.5. ÜZÜMSÜ MEYVELERDE SOMATİK EMBRİYOGENESİS

Çilekte somatik embriyogenesis ile elde edilen bitkilerin üretimde kullanılma potansiyeli önemlidir. Çilekte yürütülen bir çalışmada 1.0 mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l BAP+Prolin eklenen MS ortamında somatik embriyolar başarı ile üretilmiştir. Bitki rejerasyonu sağlanmış, oluşan bitkiler başarılı bir şekilde (%90-95) sera ve dış ortam koşullarına transfer edilmiştir. Küçük alanda çok sayıda bitki materyalinin üretimine olanak sağlayabilmesi bakımından tekniğin geliştirilmesinin gerektiği belirtilmiştir (Biswas 2007).

Camarosa Çilek çeşidinde 2,4-D ve BAP'ın farklı konsantrasyonları ve kombinasyonları ile desteklenmiş MS ortamında somatik embriyogenesis indüklenmesine çalışılmıştır. 2mg/Lit 2, 4-D ve 0.5 mg/L BAP eklenen ortamda %100 oranında cevap alınmış, kallus gelişimi ve somatik embriyoların erken gelişim aşaması gerçekleşmiştir. Embriyo gelişimi hormonsuz MS ortamında sağlanmış, Geliştirilen somatik embriyolar, %8 oranında 0.5mg/L GA3 eklenen MS ortamında çimlendirilmiştir (Waghmare ve diğ. 2017).

Fern çilek çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantları 2,4-D'nin farklı dozlarının ilave edildiği MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Yaprak sapında yaprak eksplantlarından daha fazla kallus oluşumu gerçekleşmiştir. En yüksek embriyonik kallus oluşumu (% 66.7) ise 2,4-D'nin 1 mg/l dozunda elde edilmiştir. Çalışmada sadece yaprak sapı eksplantlarında ve 1.0 mg/l TDZ eklenen ortamlarda bitki rejenerasyonu sağlanabilmiştir (Taştepe 2011).

4.6. TROPİK VE SUPTROPİK MEYVE TÜRLERİNDE SOMATİK EMBRİYOGENESİS

Sarılop incir çeşidinin in vitro yaprak segmentleri kullanılarak direkt ve indirekt somatik embriyogenesis yoluyla somatik embriyo oluşumu üzerine çalışılmıştır. Bu yapraklardan indirekt somatik embriyo gelişimi için 2 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L kinetin kombinasyonunda MS ortamında kültüre alınmış, % 66.66 oranında embriyojenik kallus oluşmasına rağmen, somatik embriyo gelişimi elde edilememiştir. Direkt somatik embriyo oluşumu için ise yaprak eksplantları TDZ (Thidiazuron) ve 2İP (N 6 -2-isopentenyladenine) kombinasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre alınmış; somatik embriyo, kallus ve kök gelişimi gerçekleşmiştir (Turan 2013).

Liçi suptropik iklim meyvesidir. Olgun dönemdeki ağaçlardan (>100 yaş) yeni üretim materyalinin oluşturulması için somatik embriyogenesis önemli bir yöntemdir. Yapılan çaluışmada embriyojenik kültürler yaprak eksplantlarından oluşturulmuştur. Kallus indüksiyonu B5 temel besin ortamında 400 mg/l glutamin+200 mg/l kasein hidralizat+30 g/l sakkaroz+4.52 µM 2,4-D+9.30 µM kinetin+3 g/l gelrite eklenerek sağlanmıştır. Karanlık ortam en uygun sonuçları vermiştir. Yarı kuvvetinde katı MS besin ortamında veya yarı kuvvetinde süspansiyon kültürlerinde 4.52 µM 2,4-D+0.91 µM zeatin eklendiğinde embriyojenik kallustan somatik embriyolar geliştirilmiştir. Embriyoların olgunlaşması yine Hindistan cevizi sütü içeren MS besin ortamında gerçekleştirilmiş, GA_3 ve aktif kömür ile desteklenen yarı kuvvetinde MS besin ortamında bitki oluşumu sağlanmıştır (Raharjo ve Litz, 2007).

Mango'da somatik embriyogenesis çalışmaları Kurakkan çeşidinde yürütülmüştür. 3.5 cm büyüklüğündeki meyvelerden alınan nuseller dokudan 4.52 µM 2,4-D+%0.05 malt ekstraktı+13.78 µM spermidin eklenen MS besin ortamında embriyojenik kallus elde edilmiştir. Somatik embriyo oluşumu yüksek oranda gerçekleşmiştir. Düşük dozda sakkaroz ve oksin içeren ortamda embriyolar kalp ve kotiledon aşamalarına dönüşüm sağlamıştır. ABA, IAA ve PEG içeren ortamda geliştirilen embriyolar, NAA, kinetin ve glutamin içeren MS temel besin ortamında %30 oranında çimlenme göstermiştir (Mishra ve diğ. 2010).

Kakaoda genetik açılım nedeniyle tohumlardan fidan üretimi yüksek oranda varyasyona neden olmaktadır. Bu nedenle somatik embriyogenesis minimal varyasyonla materyal eldesi için bir teknik olarak görülmekte, ancak birçok çeşitte başarı sağlanamamaktadır. IMCP 67 genotipinde somatik embriyogenesis oluşturulmasına yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmada somatik embriyogenesisin başlatılması, sürdürülmesi, primer ve sekonder kallus geliştirilmesi için uygun ortam ve kültür süreleri incelenmiştir. Primer ve sekonder embriyo gelişimleri sağlanarak, bitkiye dönüşüm yüksek oranda gerçekleştirilmiştir. Teknik fidanlıklarda üretim için önerilmiştir (Montoya, 2022).

KAYNAKLAR

Ameri A., Davarynejad G.H., Moshtaghi N., Tehranifar A. 2018. Polyethylene glycol and chilling overcome Somatic embryogenesis obstacle in Pyrus communis. Scientia Hort. 227:57-64.

Aygün A., Dumanoğlu H. 1999. Ayva'da olgunlaşmamış çenek yapraklardan somatik embriyo oluşumu. Journal of Agricultural Sci.,5(2):50-57.

Mahmoud B.K., Jedid E., Delporte F., Muhovski Y., Jemmali A., Druart P. 2017. Molecular investigations of the somatic embryogenesis recalcitrance in the cherry (Prunus cerasus L.) rootstock CAB 6P. Turk. J Biol. 41: 158-165.

Bhansali R.R., Driver J., Durzan D.J. 1991. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Prunus persica* (L.). J. Of Hort. Sci. 66(5): 601-605.

Biswas M.K., Islam R., Hossain M.2007. Somatic embryogenesis in strawberry (Fragaria sp.) through callus culture. Plant Cell Tiss Organ Cult, 90:49–54

Bosela MJ., Smagh GS., Michler CH. 2004. Genetic transformation of black walnut (*Juglans nigra*). In: Michler CH, Pijut PM, Van Sambeek J, Coggeshall M, Seifert J, Woeste K, Overton R (eds) Black Walnut in a New Century, Proc 6th Walnut Council Res Symp, Gen Tech Rep NC-243, US Dept Agric, For Serv, North Central Res Stn, pp 45–58.

Cheong E.J., Pooler M.R. 2004. Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink. Plant Cell Rep., 22:810–815.

Cornu D. 1988. Somatic embryogenesis in tissue cultures of walnut (*Juglans nigra*, *J. major* and hybrids *J. nigra* x *J. regia*). In: Somatic Cell Genetics of Woody Plants. (Ahuja M.R., ed.), Kluwer Academic Pubi., pp. 45-49.

David H., Domon JM., Savy C., Miannay N., Sulmont G., Dargent R., David A. 1992. Evidence for early stages of somatic embryo development in a protoplast-derived cell culture of *Prunus avium*. Physiol.Plantarum, 85:301-307.

D'Onghia AM, Carimi F, De Pasquale F, Djelouah K and Martelli GP. 2000. Somatic embryogenesis from style culture: a new technique for the sanitation, conservation, and safe exchange of citrus germplasm. Proc. Int. Soc. Citriculture.

Erdem M., Uysal H. 2021. Sentetik tohum. Frontiers in Life Sciences and Related Technologies, 2(2), 68-74.

Erdemel B.H., Aygün A. 2016Bazı *Prunus* spp türlerinin tohumlarından kallus kültürlerinin oluşturulması. Akademik Ziraat Dergisi 5(1):9-12.

Erişen S. 2005. Yonca (*Medicago sativa* L.)'da somatik embriyogenesis aracılığıyla bitki rejenerasyonu. Tarım Bilimleri Dergisi, 11 (3): 311-315.

Fisichella M., Silvi E., Morini S. 2000. Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on . media with different macroelement composition. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 101–107.

Guan Y, Li S-G, Fan X-F and Su Z-H (2016) Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Front. Plant Sci. 7:938. doi: 10.3389/fpls.2016.00938

Gutièrrez-Pesce P., Taylor K., Muleo R., Rugini E. 1998. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from transgenic roots of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium´P. pseudocerasus*) mediated by pRi 1855 T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Reports,17: 574–580.

Isah,T. 2016. Induction of somatic embryogenesis in Woody plants. Acta Physiol. Plant. 38:1–22.

Korkmaz Y., Çölgeçen H. 2013. Bitki Doku Kültürü Çalışmalarında Somaklonal Varyasyon. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 6(2):74-78.

Kurt, O. (2015). Bitki ıslahı. (pp. 1-326). Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.

Mishra M., Shree Y., Pati R., Seal S., Shukla N., Kamle M., Chandra R., Srivastava A. 2010.Micropropagation of *Mangifera indica* L. cv. Kurakkan through somatic

Embryogenesis. Indian J. Genet., 70(1): 85-90.

Lu D., Wei W:, Zhou W., McGuigan L.D., Ji FY., Li X., Xing Y., Zhang Q., Fang KF., Cao Q.,

Montoya T.O., Henao Ramírez A.M., de la Hoz Vasquez T., Urrea Trujillo A.I. 2022. Propagation of *IMC67* plants, universal cacao (*Theobroma Cacao* L.) rootstock via somatic embryogenesis International Journal of Fruit Science, 22 (1): 78–94.

Ling, J.T., Iwamasa, M., 1997. Plant regeneration from embryogenic callis of six *Citrus* related genera. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49: 145-148.

Mordhorst A.P., Toonen M.A., deVries S.C., dMeinke, D. 1997. Plant embryogenesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16, 535–576.

Paul H., Belaizi M., Sangwan-Norreel B.S. 1994. Somatic Embryogenesis in apple. J. Plant Physiol., 143:78-86.

Lu D., Wei W., Zhou W., McGuigan L.D., Ji FY, Li X., Xing Y., Zhang Q., Fang K., Cao Q.,

Qin L., 2017. Establishment of a somatic embryo regeneration system and expression analysis of somatic embryogenesis-related genes in Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume). Plant Cell Tiss Organ Cult., 130:601–616.

Raharjo S.H.T., Litz R.E. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) from leaves of mature phase trees. Plant Cell Tiss Organ Cult, 89:113–119

Şan B., Dumanoğlu H. 2006. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of apomictic and non-apomictic seeds in walnut (*Juglans regia* L.). Turk J Agric For 30:111-117.

Şen İ. 2010. Bazı turunçgil anaçlarında eksplant kaynağı ve büyüme düzenleyicilerin embriyogenik kallus eldesi üzerine etkileri. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana. 89 s.

Taştepe M.R. 2011. İn vitro koşullar altında çilekte (FragariaXAnanasa) rejenerasyon üzerine farklı uygulamaların etkisi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. Erzurum. 39 s.

Turan D. 2013. Sarılop incir (*Ficus carica* L.) çeşidi yaprak segmentlerinden somatik embriyogenesis. Adnan Menderes Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi-2013-YL-059, 41 s.

Waghmare S.G., Pawar K.R., Tabe R.H., Jamdade A.S. 2017. Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria ananassa*) var. Camarosa. G.J.B.B., VOL.6 (2) 2017: 309-313

Yıldırım H. 2012. Bazı yerli kaysı çeşitlerinin in vitro embriyo kültürleri üzerine besi ortamı ve genotip etkisi Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech. 2(2): 9-16.

Zhang Y., Bozorov T.A., D.X. Li, Zhou P., Wen X.J., Ding Y., Zhang D.Y. 2020. An efficient in vitro regeneration system from different wild apple (*Malus sieversii*). BMC, 16:56; 1-10.