

Bölüm 10

Vitis vinifera L.'de SOMATİK EMBRİYOGENESİS ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Ayşe YALÇIN ELİDEMİR

Bu çalışmanın amacı, çeşitli TDZ (Thidiazuron) ve sukroz konsantrasyonlarının *Vitis vinifera* L. (*Superior seedless* x *Superior seedless* melez üzüm genotipleri) için somatik embriyo oluşma potansiyeli üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Somatik embriyo eldesi amacı ile, yaprak ayası eksplantları (lamina), farklı konsantrasyonlarda TDZ ve sukroz katkılı MS (Murashige & Skoog) besi ortamında kültüre alınmıştır. Yaprak ayası eksplantları, *in vitro* koşullarda yetiştirilen bitkilerden (*Superior seedless* x *Superior seedless* melez genotipleri) alınmıştır. Eksplantlar, 6 hafta boyunca tam karanlıkta 25 ± 1 ° C'de kültüre alınmıştır. Daha sonra, 10^{-2} mg.l⁻¹ IAA (Indol asetik asit) ile desteklenmiş olan E20A besi ortamına transfer edilmiştir. Ve bu çalışma; bu genotip için somatik embriyo oluşumu için, düşük TDZ ve sukroz konsantrasyonlarının en iyi sonuçları verdiğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Vitisvinifera* L., TDZ (Thidiazuron), sukroz, MS, E20A, somatik embriyo

GİRİŞ

Üzüm, dünyada en çok yetiştirilen meyve ürünlerinden biridir. *Vitis vinifera* L. de somatik embriyoların oluşumu ve gelişimi için birçok literatür bulunmaktadır (Martinelli & Gribaudo, 2001). Üzümlerde somatik embriyolar ilk olarak 1970'li yıllarda elde edilmiştir (Mullins & Srinivasan, 1976). Bundan sonra, hem somatik dokulardan hem de vegetatif organlardan somatik embriyogenesi başlatmak için, değişik explantlar kullanılmıştır (Martinelli & Gribaudo, 2009; Prado & ark., 2010). Üzümlerde, uzun büyüme periyodu ve heterozigotik genetik yapı gibi nedenlerle yeni çeşitlerin elde edilmesi klasik ıslah yöntemleri ile oldukça zordur. Bu nedenle, biyoteknolojik teknikler üzüm ıslahı üzerine çalışanlara çok faydalı alternatifler sunar. Üzümlerin mikroçoğaltımı (micropropagation), onların baş-

langıçta mikro kesimi(microcutting) ile elde edilir. Mikroçoğaltım, organ oluşumu(organogenez) ve embriyo oluşumu(embriyogenez) yoluyla regenerasyon için uygun dokuların üretimidir (Stamp & Meredith, 1988).

Bitkilerde embriyo oluşumu ve gelişimi oldukça karmaşıktır. Bitkiler normal zigotik embriyo yada somatik veya androgenetik hücrelerle elde edilebilir (Dode-ma & ark., 1997). Somatik embriyolar yapı ve fizyolojik olarak zigotik embriyolara benzer, ancak tohum kabuğu ve besi doku(endosperm) üretiminde yetersizdir(G-ray, 1989; Gray & Purohit, 1991). Kültür ortamı, bitki dokusu ve organ oluşumu için en önemli faktörlerden bir tanesidir. Bu anlamda, karbon kaynağının tipi ve miktarı çok önemli bir rol oynamaktadır (Yancheva & Roichev, 2005). Organogenez ve embriyogenez, genotip, eksplant kaynağı, ortam bileşimi ve kültür koşullarından yüksek oranda etkilenir (Gürel & Türker, 2001; Jimenez, 2005; Yancheva & Roichev, 2005; Martinelli, 1996; Baydar, 2000 ; Gribaudo & ark., 2004).

Olah & ark (2009), yaptıkları çalışmada, *Vitis vinifera* L. ve melezlerinde, somatik embriyo eldesi amacıyla, TDZ katkılı besi ortamı kullanmışlar ve sonuçların çeşitlere göre değiştiğini bildirmişlerdir. Sentetik sitokininler arasında TDZ'nin BA'(Benzil adenin) dan daha etkili olduğu bildirmiştir (Hırabayashı, 1985). Kurmi & ark. (2011), kültür ortamında TDZ bulunuşunun, kallus oluşumunun başlamasını engellediğini bildirmişlerdir. TDZ nin düşük dozlardaki etkinliğinin, Murthy & ark.(1995)' nın da bildirdiği gibi içsel sitokinin birikimini uyarılması nedeniyle olduğunu belirtmişlerdir. TDZ'nin etkisinin, hipokotil dokularında oksin taşınımını etkilemesinden kaynaklandığını bildirilmiştir (Murch & Saxena, 2001).

Tapia & Read(1995), yaptıkları çalışmada, TDZ katkılı MS ortamında, kültürün birinci ayından itibaren organogenes olumu başladığının ve bunun hem kök hem sürgün birlikte senkronize olarak gerçekleştiğini ve TDZ nin düşük dozlarının (0.01 ve 0.05 mg/l) daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Farklı araştırmaların sonuçlarında da belirtildiği gibi, üzümelerde somatik embriyo oluşumunun, birçok fizyolojik ve genetik faktöre bağlı olan oldukça karmaşık bir yapı olduğu görülmektedir. Bu çalışmanın amacı, TDZ ve sukroz seviyelerinin üzümelerde somatik embriyo oluşumu üzerindeki etkilerinin incelenmesidir.

MATERIALS AND METHODS

Superior seedless L.x *Superior seedless* L. melez (hibrit) embriyoları 10^{-2} mg/l⁻¹ IAA (Indolasetik asit) ve %3 sukroz eklenmiş E20A (Tablo 1), büyüme ortamında kültüre alınmıştır. Genç ve geniş yapraklar explant olarak, *in vitro*'da büyütülmüş bitkilerden elde edilmiştir (Castillo & Smith, 1997).

Yapraklar 1.0 cm² lik kareler halinde, aseptik koşullarda kültüre alınmıştır. 5 adet explant , farklı oranlarda TDZ (0.1, 0.5 ve 1 mg/l)ve sukroz (10, 30 ve 50 gr/l)(Elidemir & ark., 2007) eklenmiş, 30 ml MS (Murashige & Skoog, 1962) besi ortamı içeren petri kaplarına yerleştirilmiştir(Castillo & Smith, 1997).

Kültüre alınan explantlar 6 hafta karanlıkta (Castillo & Smith, 1997; Kim & Kim, 2002), 25±1°C de inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda; 25±1°C de, 16 saat fotoperiyot da, 10⁻²mg/l⁻¹ IAA ve %2 sukroz katkılı E20A ortamına transfer edilmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, oluşan embriyolar (Şekil1) kayıt edilmiştir.



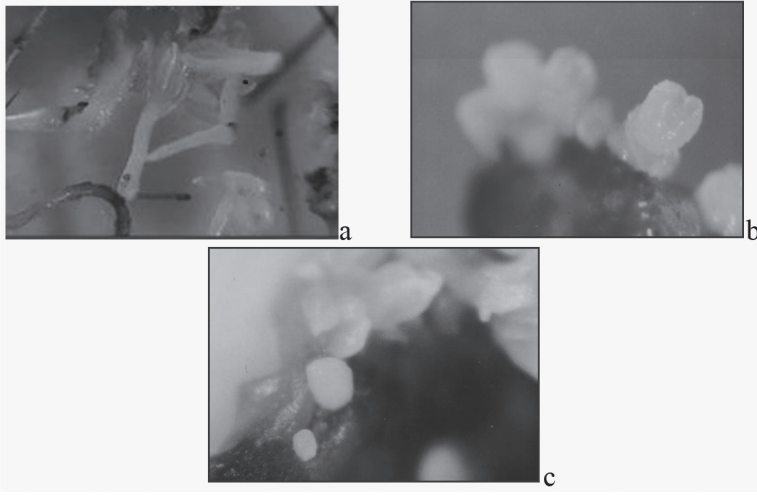
Şekil 1. Elde edilen embriyolar (10x2).

Tablo 1. E20A (Tangolar & ark., 1998) besi ortamı bileşimi (mg/l).

| E20A | | | | | |
|--|--------|--|--------|----------------------|--------|
| KNO ₃ | 1075.0 | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 1.812 | Folic acid | 0.5 |
| NH ₄ NO ₃ | 619.0 | H ₃ BO ₃ | 1.575 | Nicotinic acid | 0.700 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 206.0 | KI | 0.345 | Thiamine-HCl | 0.600 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 156.5 | NaMgO ₄ .2H ₂ O | 0.094 | Calcium Pantothenate | 0.500 |
| KH ₂ PO ₄ | 71.0 | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.008 | Biotine | 0.005 |
| Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O | 25.0 | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.008 | Glycine | 0.100 |
| NaH ₂ PO ₄ .4H ₂ O | 19.0 | Na ₂ EDTA.2H ₂ O | 37.300 | Vitamin B12 | - |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 17.0 | FeSO ₄ .7H ₂ O | 27.800 | Sakkaroz | 20 g/l |
| KCl | 3.5 | Myo-Inositol | 50.300 | Agar | 8 g/l |
| MnSO ₄ .7H ₂ O | 11.065 | Pyrodoxine-HCl | 5.500 | pH | 5.9 |

SONUÇ VE TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada, besi ortamına eklenen farklı TDZ (0.1, 0.5 ve 1 mg^l⁻¹) ve sukroz (10, 30 ve 50 gr^l⁻¹) konsantrasyonlarının, *Vitis vinifera* L. melez yaprak explantlarının somatik embriyo (Şekil 2) oluşumuna etkisi araştırılmıştır. Tablo 2’de de görüldüğü gibi, besi ortamına 10gr^l⁻¹ sukroz ilavesi en başarılı sonucu(%3) vermiştir. Aynı şekilde TDZ’ nin farklı miktarları denendiğinde, en başarılı sonuç (%2), 0.1 mg^l⁻¹ olarak gözlenmiştir. Araştırılan her iki parametre (sukroz ve TDZ) için de düşük dozlarda başarının arttığı gözlenmiştir.



Şekil 2. Elde edilen embriyolar (10x2). a-Torpedo, b-Heart, c-Globular safhaları.

Tablo 2. Somatik embriyo oluşumuna sukroz miktarlarının etkisi

| Sukroz (gr ^l -1) | Somatik embriyo (%) | Somatik embriyo (ort.) |
|-----------------------------|---------------------|------------------------|
| 10 | 3 | 0.2 |
| 30 | 2,5 | 0.1 |
| 50 | - | - |

Tablo 3. Somatik embriyo oluşumuna TDZ miktarlarının etkisi

| TDZ (mg ^l -1) | Somatik embriyo (%) | Somatik embriyo (ort.) |
|--------------------------|---------------------|------------------------|
| 0,1 | 2 | 0,1 |
| 0,5 | - | - |
| 1 | - | - |

Jimenez 2005, somatik embriyogenesinin iki ana evreye ayrıldığını, bu evrelerin induction (başlangıç) ve expression (ortaya çıkma, görünme) olarak adlandırıldığını bildirmiştir. İlkinde somatik hücreler embriyogenik karakter kazanır, bunun anlamı; fizyolojik, metabolik ve gen dizilimini içeren hücresel özelliklerin tümüyle tekrar organize edilmesidir (Feher & ark. 2002). Bundan sonra, bir veya daha fazla kültür koşulu değişimi (kültür ortamı, bitki büyüme düzenleyici kompozisyonu, karbon kaynağı, ozmotik basınç gibi) ile, başlangıç hücre veya hücreleri expression safhasına ulaşır. Bu hücrelerin embriyo yetilerine sahip ve ayırt edilebilir oldukları görülür (Jimenez, 2005).

Olah & ark (2009), yaptıkları çalışmada, *Vitis vinifera* L. ve melezlerinde, somatik embriyo eldesi amacıyla, TDZ katkılı besi ortamı kullanmışlar ve çeşitler göre değişmekle birlikte %6 ya kadar başarı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Mose & ark. (2017), *Phalaenopsis amabilis* L. de, yaprak explantlarında en fazla somatik embriyo eldesini %7 oranıyla, 3mg l^{-1} TDZ ilavesi ile elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sheibani & ark. (2007), bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları ne olursa olsun, kültür ortamındaki yüksek sukroz konsantrasyonunun hücre büyümesini azalttığını bildirmiştir ve bu çalışmadaki sonuçları desteklemektedir. Schalamann & ark. (1994), somatik embriyo oluşumunun, %3 sukroz konsantrasyonunda arttığını, %7 oranında sukroz ilavesinde ise azalma olduğunu belirtmişlerdir ve bu çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Baydar, N.G. (2000). Asmada (*Vitis* spp.) yapraklardan adventif sürgün oluşumu üzerine bir araştırma. Turkish Journal of Biology, 24: 645-656.
- Castillo M.A., and Smith M.A.L. (1997). Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. Plant Cell Reports 16: 385-388.
- Dodeman, V.L., Ducreux G., Kreis, M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. J. Exp. Bot., 48. 1493-1509.
- Elidemir A.Y., Uzun H.I., Bayir A. (2007). Effect of different medium and sucrose concentrations on germination of Somatic Embryos in grape. Acta horticulturae 754(754):117-122.
- Feher A., Pasternak T., Otvos K., Miskolczi P. and Dudits D. (2002). Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. Biologia (Bratislava) 57:5-12.
- Gray D.J. (1989) Effects of dehydration and exogenous growth regulators on dormancy, quiescence and germination of grape somatic embryos. In vitro cell. Dev. Biol., 25. 1173-1178.
- Gray D.J., Purohit A. ve Trigiano R.N. (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. Crit. Rev. Plant Sci., 10, 33-61.
- Gribaudo I, Gambino G, Vallania R (2004). Somatic embryogenesis from grapevine anthers: the optimal developmental stage for collecting explants, Am. J. Enol Vitic 55:427-430.
- Gürel E. and Turker A.U. (2001). Organogenesis. Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü Uygulamaları. S. Ü. Vakfı Yayınları, S.Ü. Basımevi, s. 36-70, Konya.
- Hırabayashi T. 1985. Somatic embryogenesis from leaf tissues of grape. In Colloque Amelioration de la vigne et culture in vitro Moët-Hennessy, Paris, 75-82.
- Jimenez V.M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. Plant Growth Regulation 47: 91-110.

- Kim S-H., Kim S-K.(2002). Effects of auxin and cytokinins on callus induction from leaf blade, petiol and stem segments of in vitro-grown "Sheridon" grape shoots. *J. Plant Biotechnology*, vol. 4(1). Pp:1721.
- Kurmi U.S., Sharma D.K., Tripathi M.K., Tiwari R., Baghel B.S. and Tiwari S. (2011). Plant regeneration of *Vitis vinifera* L. via direct and indirect organogenesis from cultured nodal segments. *Journal of Agricultural Technology* 2011 Vol. 7(3): 721-737.
- Martinelli L., Rugini E. Ve F. Saccardo (1996). Genetic transformation for biotic stress resistance in horticultural plants. *World Congress on In vitro Biology*, San Francisco, CA. In vitro: 3:69A
- Martinelli L., Gribaudo I., Bertoldi D., Candioli E. and Poletti (2001). High efficiency somatic embryogenesis and plant germination in grapevine cultivars Chardonnay and Brachetto a Grappolo Lungo. *Vitis* 40:111-115.
- Martinelli L., Gribaudo I. (2009). Strategies for effective somatic embryogenesis in grapevine: an appraisal. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed) *Grapevine molecular physiology and biotechnology*, 2nd edn. Springer, Dordrecht, pp461-493.
- Mose W., Indrianto A., Purwantoro A., Semiarti E. (2017). The influence of Thidiazuron on direct somatic embryo formation from various types of explant in *Phalaenopsis amabilis* L. *Blume Orchid. HAYATI Journal of Biosciences* V.24/4, p:201-205.
- Mullins MG. and Srinivasan C. (1976). Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of grapevine (cv. Cabernet Sauvignon) by apomixis in vitro. *J. Exp. Bot.* 27:1022-1030
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Murch S.j. and Saxena P.K. (2001). Molecular fate of TDZ and its effects on auxin transport in hypocotyls tissue of *Pelargonium x hortorum* Bailey. *Plant Growth Regul.* 35: 269-275
- Murthy B.N.S., Murch S. and Saxena P.K..(1995). TDZ-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut. Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiol Plant.* 94:268-276.
- Olah R., Zok A., Pedryc A., Howard S. and Kovacs L.G., (2009). Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes. *Scientia Horticulturae* 120: 134-137.
- Prado MJ., Grueiro MP., Gonzalez MV., Testillano PS., Domingues C., Lopez M., Rey M.(2010). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from anthers and ovaries of six autochthonous grapevine cultivars from Galicia (Spain). *Scia. Hortic.* 125:342-352.
- Schlattmann J.E., Fonck E., ten Hoopen H.J.G., Heijnen J.J. (1994). The negligible role of carbon dioxide and ethylene in ajmalicine production by *Catharanthus roseus* cell suspensions. *Plant Cell Report*, 14: 157-160.
- Sheibani M., Newati S.H., Davarinejad G.H., Azghandi A.V. and Habashi A.A. (2007). Induction of somatic embryogenesis in Saffron using TDZ. *ISHS Acta Horticulturae* 739:II International Symposium on Saffron Biology and Technology. DOI: 10.17660/ActaHortic.2007.739.32
- Stamp J.A. and Meredith C.P. (1988). Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevines. *Sci. Hortic.* 35: 235-250.
- Tangolar, S., Gök, S., Ergenoğlu, F.ve Çetiner, S. 1998. Bazı Çekirdeksiz Üzüm Çeşitlerinin Embriyo Kültüründen Yararlanılarak Çoğaltılması. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 22:87-92.
- Tapia M.I and Read P.E. (1995). Influence of the Genotype and TDZ on the in vitro Regeneration of Hybrid Grapes. *Hortscience* vol:30(4), 877.
- Yancheva S.D., Roichev V. (2005). Carbohydrate source can influence the efficiency of somatic embryogenesis in seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19:2, 62-66.