Organogenesis ve Somatik Embriyogenesis

- Hücrelere ve dokulara baskı uygulayıp bazı değişikliklere sebep olarak sürgün veya kök taslağı diye adlandırılan tek kutuplu ve vasküler sistemi kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının meydana gelmesi işlemine **organogenesis** denir.

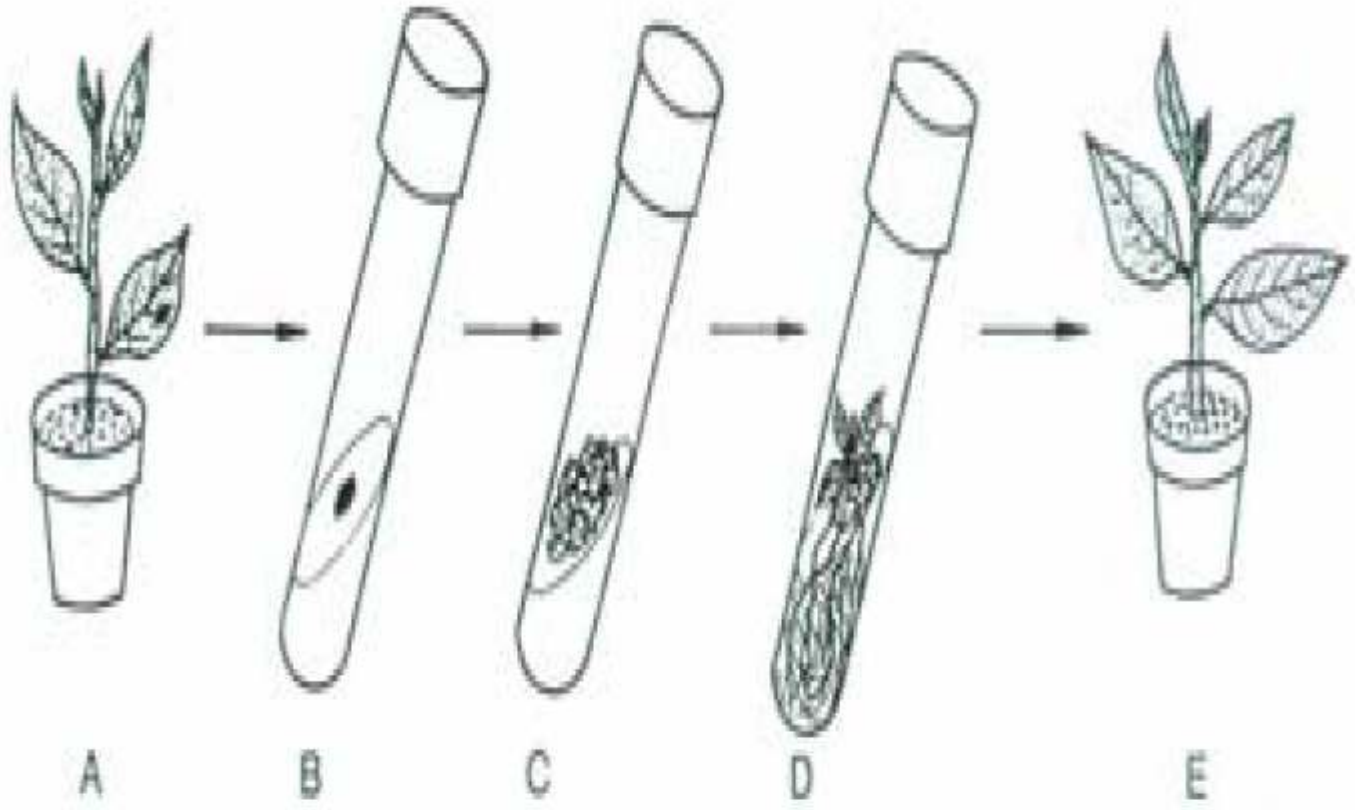


FIG. 8.1. In Vitro regeneration of plants through tissue culture. (A) Source of tissue explant. (B) Explant culture on agar medium. (C) Callus production. (D) Plantlet regenerated. (E) Plantlet transplanted into sterile soil.

Etkin bir organ oluşumunun yerine getirilebilmesi için gerekli olan şartlar;

- uygun eksplantın seçilmesi,
- büyümede aktif maddeleri içeren uygun bir besin ortamının seçilmesi ve
- fiziksel çevre koşullarının kontrolüdür.

Eksplant seçimi

Kültüre alınan eksplantın davranışını etkileyen faktörler;

- Başta genotipik varyasyon olmak üzere doku kaynağı olarak kullanılan organ,
- organın ontogenetik ve fizyolojik yaşı,
- eksplantın bitkiden alındığı dönem,
- ekplantın büyüklüğü ve
- eksplantın alındığı bitkinin diğer genel özellikleri

organogenesis çalışmalarında yaygın olarak kullanılan eksplantlar

- gövde,
- kök,
- yaprak,
- çiçek durumu,
- yumurtalık veya yumurta hücresi,
- kotiledon ve hipokotil gibi fide organları ve
- tohum embriyosu

Besin ortamların seçilmesi

besin ortamının temel içerikleri;

- inorganik maddeler,
- organik maddeler,
- bitki büyüme düzenleyicileri ve
- doğal kompleksler olmak üzere 4 ana grup altında incelenir.

İnorganik maddeler

1) Temel makro elementler
N,K,P,Ca,S,Mg

2)Temel mikro elementler
Fe,Mn,B,Cu,Zn,I,Mo,Co

Organik maddeler;

- Amino asitler;
  glutamin, asparagin
- Nükleotidler;
  adenin, guanin, sitozin, timin
- Organik asitler;
  sitrat, malat, fumarat, piruvat

Bitki büyüme düzenleyicileri

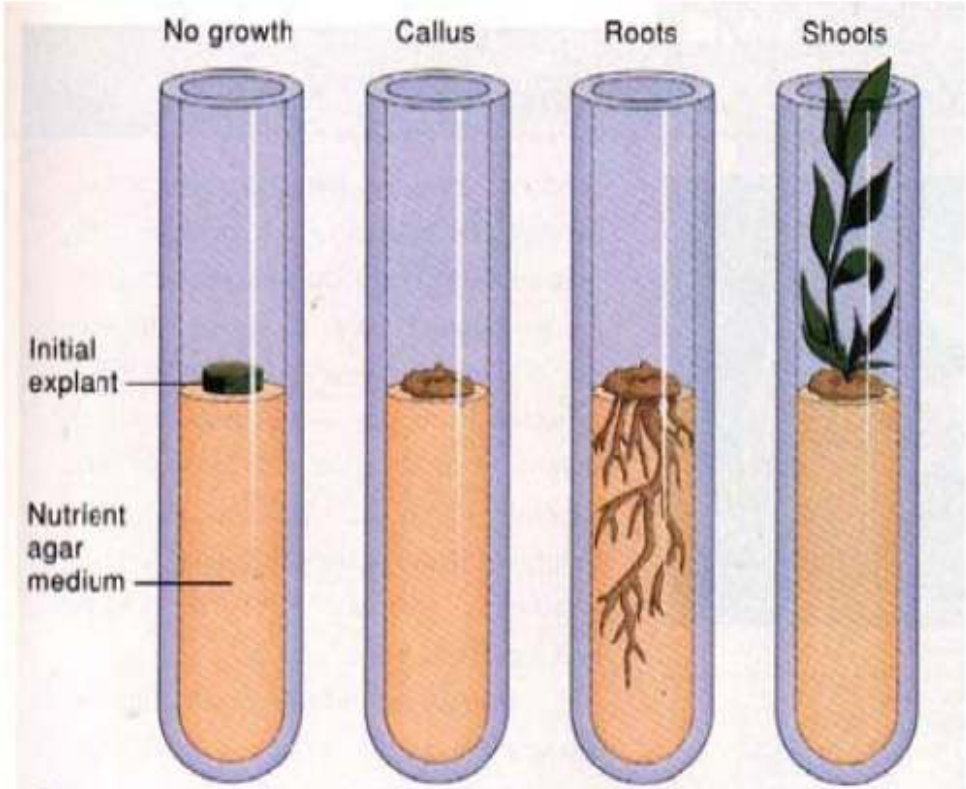
- oksin ve sitokinin *in vitro* kültürde en çok ihtiyaç duyulan bitki büyüme düzenleyicileridir.

- En fazla kullanılan oksinler;
  - 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D),
  - naftelen asetik asit (NAA),
  - indol asetik asit (IAA) ve
  - indol bütrik asit (IBA)'tir.

- En fazla kullanılan sitokininler ise;
  - kinetin ve
  - N^6-benziladenin/benzil amino pürin (BA/BAP)'dir.

- Bitki türlerinin büyük bir çoğunluğu uygun oksin/sitokinin oranına, sürgün ve kök oluşturarak cevap verir.

Organogenesis
– Hormonal control



		No growth	Callus	Roots	Shoots
Auxin:	IAA (mg per liter)	none	2	2 (high)	0.02 (low)
Cytokinin:	Kinetin (mg per liter)	0.2	0.2	0.02 (low)	1 (high)

Doğal kompleksler

- hidrolize olmuş protein preperasyonları,
- maya ürünleri,
- hindistan cevizi sütü

Kültür şartları

- kültür ortamının fiziksel hali,
- pH,
- nem,
- ışık,
- sıcaklık ve
- kültür kaplarında biriken gazların miktarı organogenesis başarısını etkilemektedir.

Ortamın fiziksel hali

- ortamın katı ya da sıvı olması organogenesiste önemli rol oynar.

- Agar ile katılaştırılmış ortamda büyütülen kallus yavaş büyür ve varolan kallus kümesinin çevresinde yeni hücreler gelişir.

- Fakat hücre süspansiyon kültürlerinde tek veya küme hücreler devamlı olarak besin ortamına maruz kaldığından daha fazla büyüme gösterirler.

- Genel olarak organogenesiste en çok başarı katı ortam üzerinde kallus veya yayılmış hücre süspansiyonları ile sağlanmıştır.

Ortamın pH değeri

- besin maddelerinin çökelmesi ile besin maddelerinin ve bitki büyüme düzenleyicilerinin alımını etkilemektedir. Besin ortamının pH'sı genellikle 5.0 ile 6.5 arasındadır.

Nem

- kültür çevresinin nem oranı genellikle %100'e yakındır.

- Bazı durumlarda nem oranının düzenlenmesi farklılaşmanın ne yönde olacağınnın belirlenmesi açısından önemlidir.

Işık

- farklılaşma için gerekli ışık bileşenleri;
  - ışığın şiddeti,
  - gün içinde uygulama periyodu ve
  - niteliğidir.

- Maksimum kallus büyümesi karanlıkta olmasına rağmen, düşük ışık şiddeti organogenesis ve embriyogenesisi arttırabilir.

Sıcaklık

- Genellikle kültürler 20 ile 30 °C arasındaki sabit sıcaklıklarda tutulurlar.
- Belli bir bitki türü için büyüme ve farklılaşmanın optimum düzeyde gerçekleştiği sıcaklık değerlerinin önceden belirlenmesi gerekir.

Kültür kaplarında biriken gazlar

- kültüre alınan eksplantların etrafındaki atmosferin gaz içeriği bitki kültür sistemlerinin performanısını etkiler.

- Atmosferin gaz içeriği etilen, oksijen, karbondioksit, etanol, ve asetaldehitten oluşur.

ORGANOGENESİS ÇEŞİTLERİ

İndirekt organogenesis

↓

Kallus

↓

Sürgün veya kök

↓

Bitki

Direkt organogenesis

↓

Sürgün veya kök

↓

Bitki

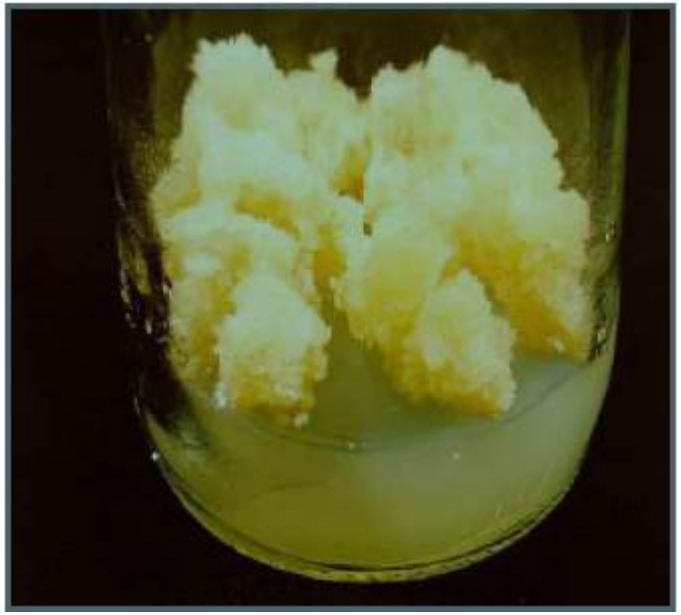
- Organogenesisteki anahtar morfolojik özellik meristematik merkezlerin oluşumudur.

- Direkt ve indirekt organogenesisin her ikiside de, meristematik merkezler vakuollü parenkima hücrelerinden oluşurlar.

- Bu hücreler yapı olarak küçük, izodiyametrik, ince duvarlı hücrelerdir ve yoğun bir şekilde boyanan belirgin çekirdeklere sahiptirler.

- Kallus organizasyon göstermemiş hücreler yığını olarak tanımlanmaktadır.

- Tipik kallus hücresi fazlaca vakuollü parenkima hücresidir ve çok ince çevresel bir sitoplazma katmanı ile hücre duvarına karşı baskılanmış bir çekirdeğe sahiptir.



- Aynı bitki türünden alınan eksplantlar organogenesis oluşturma kapasitesi bakımından büyük farklılıklar gösterebilir, bunun yanında kallus homojen değildir ve kültürde yaş ile birlikte çeşitli değişikliklere maruz kalmaktadır.

Kallus dokusundan sürgün gelişimi

- eksplantın çevresinde hücre dizileri oluşur
- hücre dizileri ve eksplant arasındaki bölgelerde trake elementleri ortaya çıkar
- Kültürden bir hafta sonra trake elementlerinin yanında hücre bölünme bölgeleri gözlenmeye başlar.

- Bu bölgenin içinde özellikle kallusun alt yarısında takip eden günlerde meristematik merkezler oluşur.
- Bu merkezler daha sonraki günlerde gözle görülebilir sürgün taslağını oluştururlar.
- En önce oluşan sürgünler ortama temas eden kallus yüzeylerinin geniş çıkıntıları üzerinde görülür.
- Tomurcuklar iki hafta sonra ortaya çıkar ve
- bariz yapraklı vejetatif sürgünler 18-21 günlük dokularda gözlenebilir.

ORGANOGENESİSTE MEYDANA GELEN ÖNEMLİ OLAYLAR

- **Hücresel yeterlilik ve kararlılık:**

  Organogenesiste önemli olan yaklaşımlardan biri esneklik (plastisise) teorisidir.

- Organ oluşumunun erken safhalarında gelişim süreci esnek bir yol izler.

- Gelişmenin belli bir kritik dönemine kadar, meristemi meydana getiren hücre veya hücreler tarafsız davranır, fakat daha sonra ortamdaki şartlara veya uyarıcılara göre ya sürgün meristemi ya da kök meristemi olarak şartlanırlar ve morfogenetik süreç sürgün veya kök olarak sonuçlanır.

- Eksplantın ortama konulmasından belirgin bir organın ortaya çıkmasına kadar geçen süre içinde, üç aşamada incelenebilecek bir dizi olaylar meydana gelmektedir.

1) yeterlilik (competence)

2) kararlılık (determination)

3) morfolojik farklılaşma.

- Yeterliliğin kazanıldığı birinci aşamada, ortama konulan eksplant dokusu, organogenik bir uyarım için belli bir yetenek, diğer bir ifadeyle yeterlilik kazanır ve bu aşamada öncelikle olgun eksplant dokusunun tersine-farklılaşması (dedifferentiation) gerçekleşir. Bu durumda yeterliliğin kazanılması herhangi bir ortamda (sürgün, kök veya kallus) gerçekleşebilir.

- Bu ilk aşamanın sonunda organ oluşturmak için yeterlilik kazanan hücre veya hücrelerin, belli bir gelişme tipi (sürgün, kök veya kallus oluşumu) için kararlı hale getirilmeleri gerekir.

- Bu işlemin gerçekleştirildiği süreç *in vitro* organogenesisteki kararlılık aşaması olarak adlandırılır ve söz konusu gelişme tipinin belirlenmesinde, ortamdaki bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyon ve kombinasyonları önemli olmaktadır.

- Üçüncü aşamada ise, morfolojik farklılşma ve gelişme tamamlanarak belirgin organlar gözükmeye başlar ve bu gelişmenin tamamlanması, yine herhangi bir ortamda gerçekleşebilir.

- İkinci aşama sonunda hücre veya hücreler hangi organogenik yol için kararlı hale gelmişlerse, artık onların meydana getireceği organ tipini değiştirmek mümkün değildir.

Fizyolojik, biyokimyasal ve metabolik olaylar

- Steward ve ark. (1964)'nın görüşüne göre; Hücrenin gelişme potansiyelinin ortaya çıkması için hücrenin fiziksel ve/veya fizyolojik olarak izolasyonunun gerekli olduğu düşünülmektedir.

- İzolasyon işlemi anne dokunun bağlantısını etkili bir şekilde yok eder ve hücreleri böylece fiziksel ve kimyasal kısıtlamalardan kurtarır.

- Hücreler kimyasal bir uyarıya maruz kaldıkları zaman sessiz durumlarından aktif büyüme için gerekli olan kapasiteye doğru geçiş yaparlar ve gerekli besinler ortamda varsa onların kalıtsal morfojenik potansiyelini açığa vururlar.

- Morfojenik hücre yığınlarında (mersitematik merkezler veya embriyogenik hücre kümeleri) bunları çevreleyen kalın bir hücre duvarı vardır ve bunların arasında veya bunları çevreleyen hücrelerde/dokularda plazmadezmata mevcut değildir.

- Fakat yığınların içinde daha ince hücre duvarları ve fazla miktarda plazmadezmata vardır ve bu da muhtemel hücrelerarası iletişimin var olduğunu göstermektedir.

- Organ oluşturan dokular üzerine yapılan biyokimyasal çalışmalara göre; meristematik merkez ve sürgün primordiyasının oluşmasından önce nişasta birikimi olmaktadır ve organogenesis için ortamdan devamlı serbest şekerin sağlanması gerekir.

- Sürgün oluşumuna yönelecek olan dokular, çok daha yüksek miktarda adenozin fosfataz ve NAD+ bulundururlar ve daha düşük enerji yükü içerirler.

Organogenesisin Avantajları

- Hücre veya dokulardan yeni bitki meydana getirmeye imkan tanıdığı için, generatif yoldan çoğaltılması zor olan bitkilerin üretimine olanak sağlamaktadır.

- Bitki transformasyon çalışmalarında oldukça önemlidir.

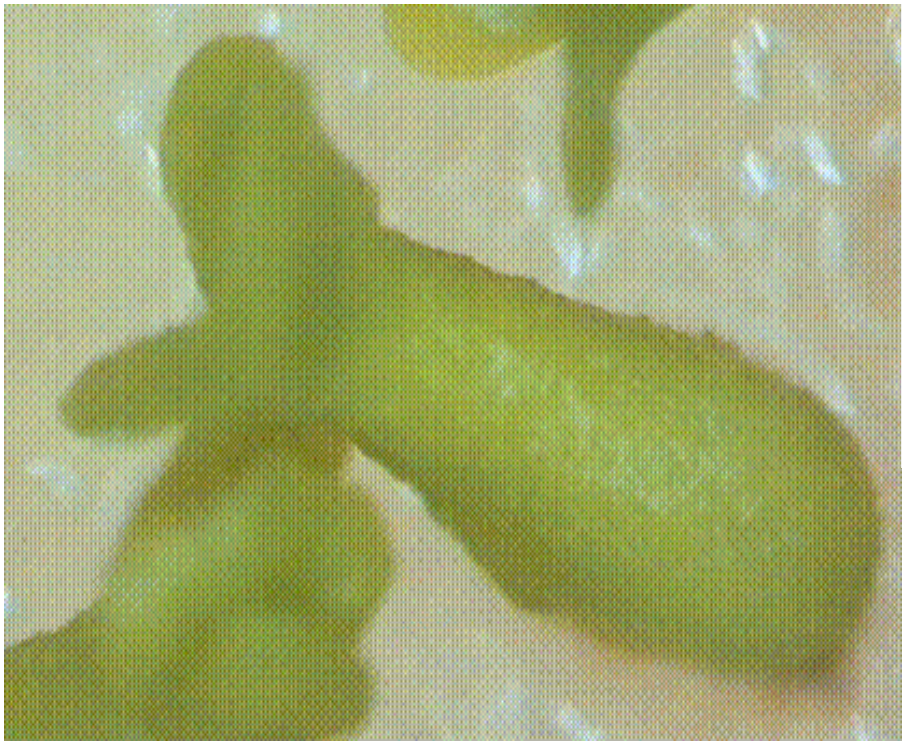
Organogenesisin Dezavantajları

- Bütün bitki türleri için evrensel bir rejenerasyon protokolü yoktur. Her bitki türü hatta her bitki çeşidi için spesifik bir sistemin optimize edilmesi gerekir.

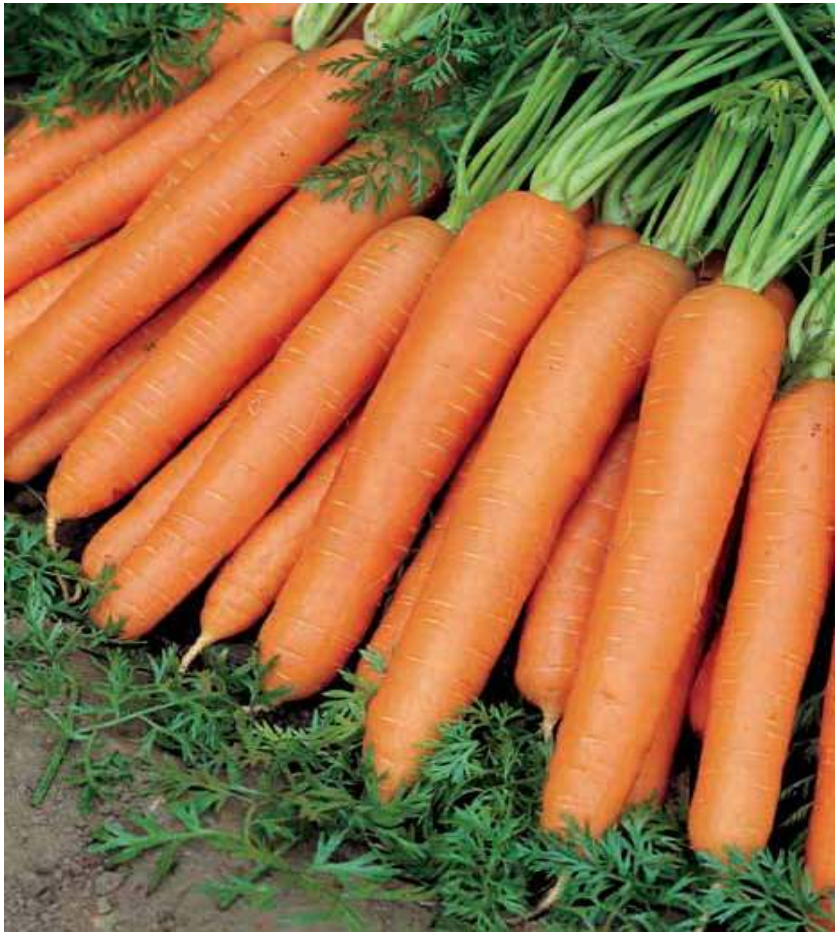
SOMATİK EMBRİYOGENESİS

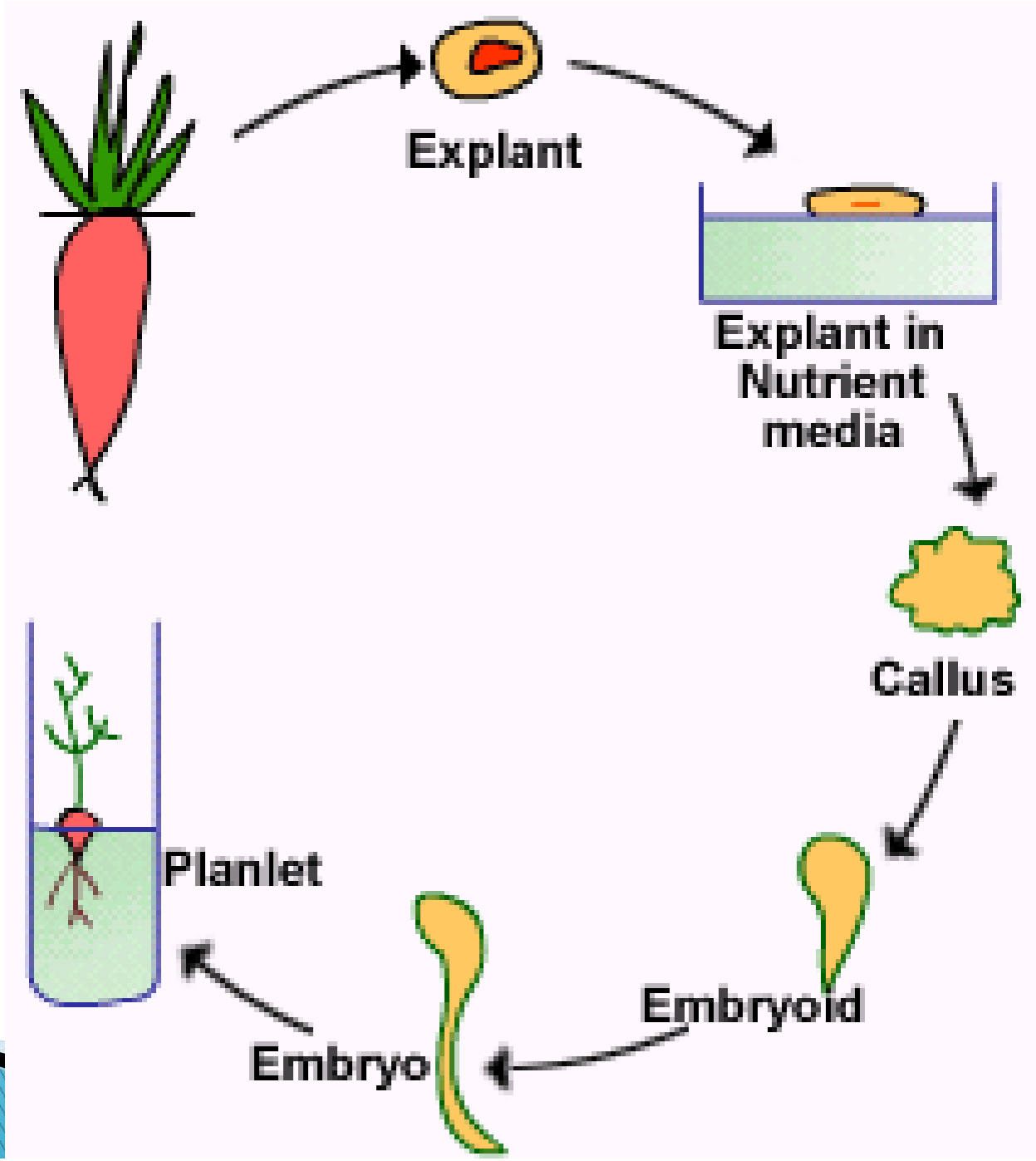
- Bitki hücrelerinden embriyo elde etmek için yumurta hücresini kullanabiliriz.
- Ancak embriyo elde edilmesi yumurta hücresiyle sınırlı değildir.
- İn vitro kültür şartlarını ve özellikle de bitki büyüme düzenleyicilerini ayarlayarak bir bitkinin herhangi bir somatik hücre, doku veya organından embriyo elde edebiliriz.

- Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar ***somatik embriyo*** olarak adlandırılmaktadır.



- Somatik embriyogenesis ilk defa havuç bitkisinin somatik dokularından elde edilmiştir.



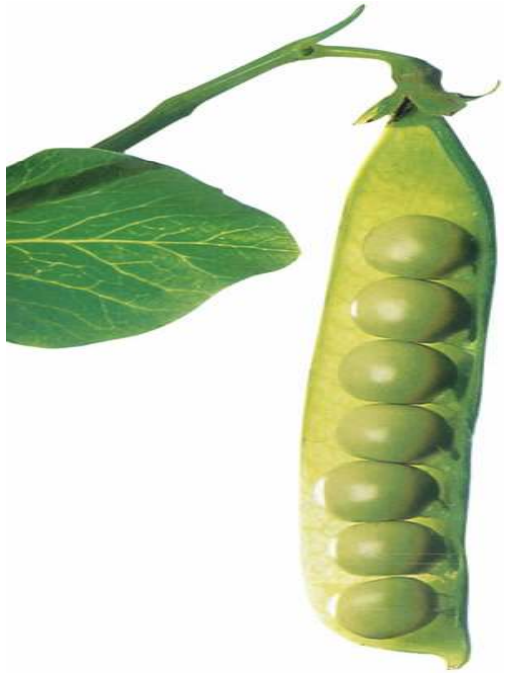

Explant
Explant in
Nutrient
media
Callus
Embryoid
Embryo
Planlet

- Genel olarak somatik embriyo üretimi için çok değişik bitki kısımları kullanılabilmektedir.

- Ancak, olgunlaşmamış zigotik embriyolar somatik embriyogenesis için önemli bir kaynak oluşturmaktadır.

- Bunun nedeni zigotik embriyoların embriyogenik gelişme için gerekli olan genleri aktif hale getirdiklerine inanılmaktadır.

- Günümüzde mısır, buğday, çeltik, soya, bezelye ve yonca gibi birçok önemli kültür bitkisinde yüksek oranda somatik embriyo üreten yöntemler geliştirilmiştir.



- Somatik embriyo elde etmek için somatik doku hücreleri öncelikle yüksek oranda oksin (genellikle 2,4-D) içeren ortamda kültüre alınır.

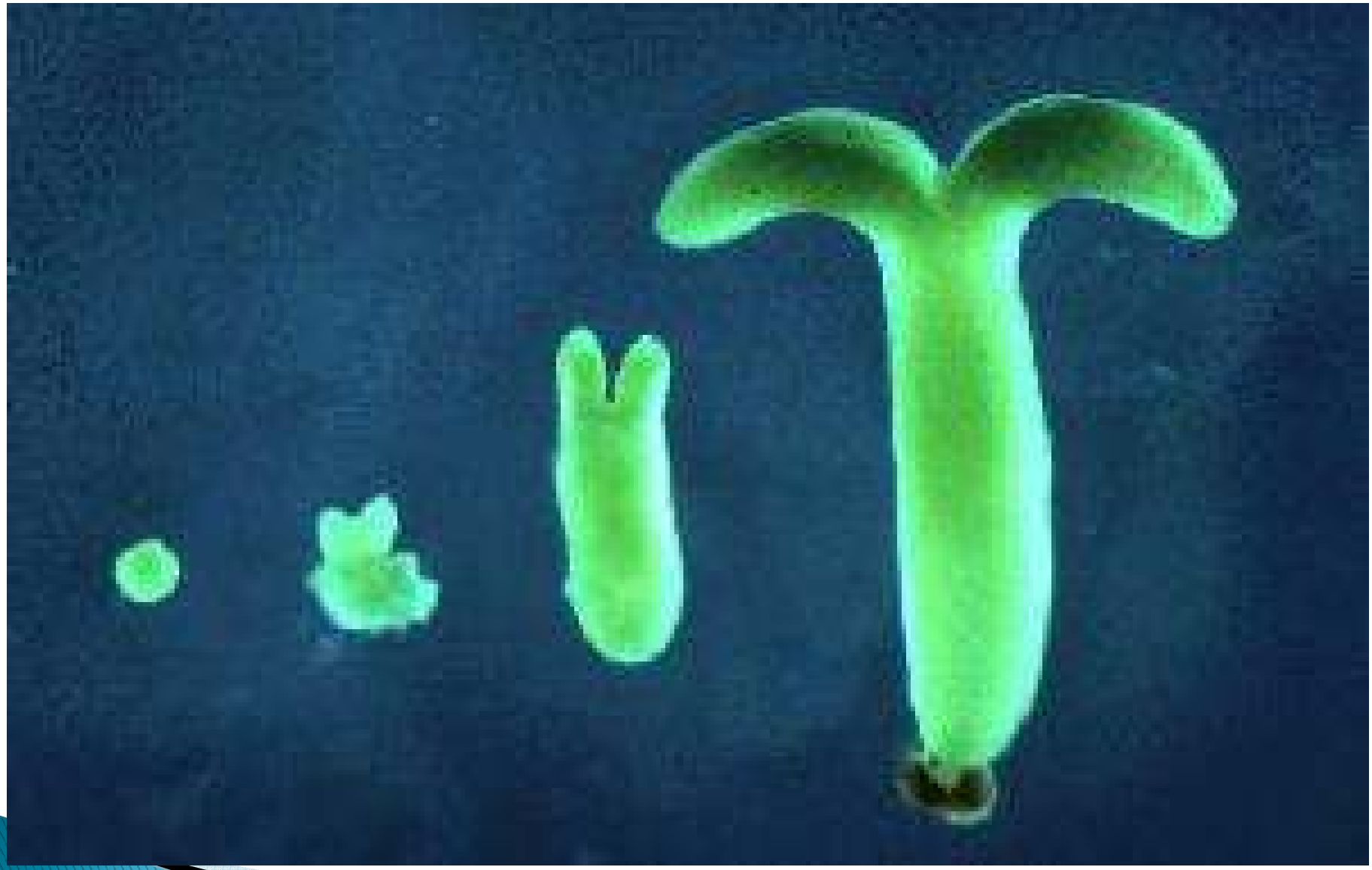
- Daha sonra da oksin içermeyen yeni ortama aktarılırsa embriyo üretme yeteneğini kazanmaktadırlar.

- Oksinlerin somatik bitki hücrelerine embriyo üretimi için yeniden zigotik bir kapasite kazandırdığı belirtilmektedir.

Somatik embriyolar oluşurken;

- *Globular*
- *Kalp*
- *Torpido*
- *Kotiledon*

oluşum safhalarını geçirirler.



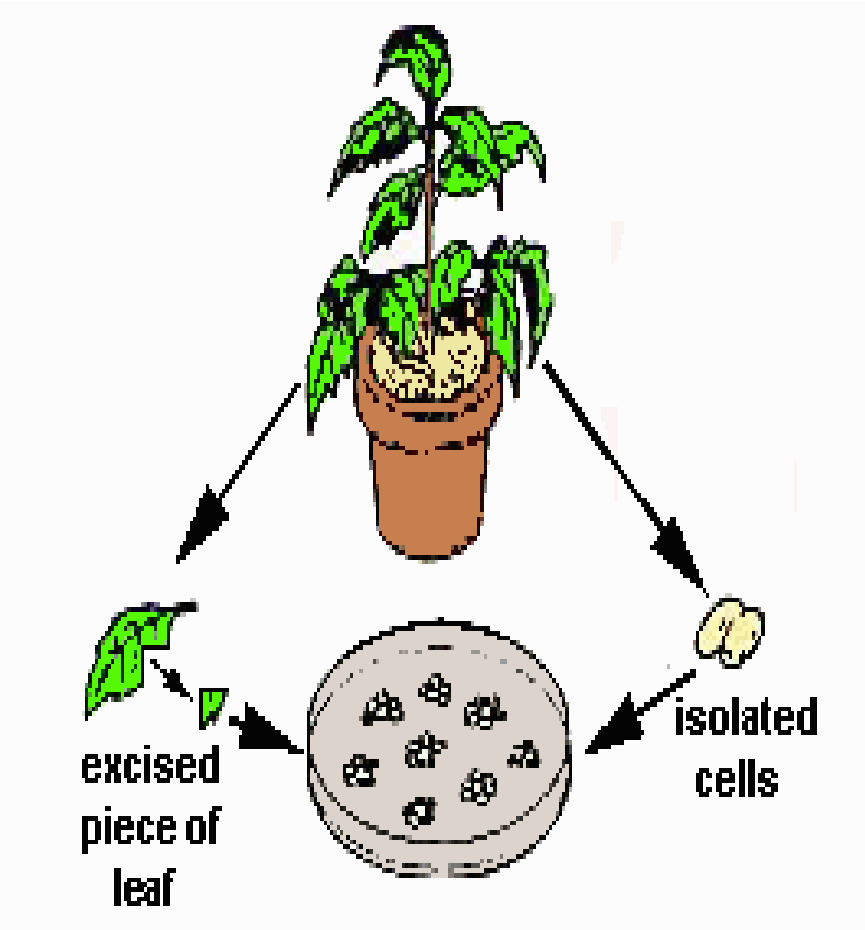
- Somatik embriyolar organogenesis yoluyla gelişen sürgünlerden farklılık gösterirler.

- Gövde-kök ekseninde aynı zamanda sahip olup, asıl doku ile vaskuler bağlantıları olmadığından dolayı dokudan kolaylıkla ayrılabilirler

Somatik embriyogenesisi etkileyen faktörler

1. Eksplant kaynağı:

- Somatik embriyogenesisin başarısında eksplant kaynağı son derece önemli olmaktadır.
- Yüksek oranda başarı için eksplantın hızlı hücre bölünmesine sahip iyi gelişen ve sağlıklı bitkilerden alınması gereklidir.



2. Genotip:

- Somatik embriyo oluşturma frekansı bakımından türler arasında önemli farklılıklar gözlendiği gibi, aynı tür içerisindeki farklı genotip ve çeşitlerin dahi embriyo oluşturma kabiliyetleri farklı olmaktadır.

- Örneğin patateste anter kültürü yoluyla somatik embriyo üretimi kalıtsal olup, düşük embriyogenesis kapasitesine sahip genotipler arasında yapılan melezlemeler sonucunda rejenerasyon kabiliyeti daha yüksek olan döller elde edilebilmiştir.

3. Besin ortamının içeriği:

- Besin ortamına ilave edilen büyüme düzenleyicilerinden ***oksinler*** somatik embriyo oluşumunu en fazla etkileyen bileşiklerdir.
- Embriyogenesis oluşumunu teşvik etmek için en fazla kullanılan oksin 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) olmasına rağmen, α-naftalenasetik asit (NAA), pikloram ve dikamba gibi oksinler de ya tek başlarına veya 2,4-D ile birlikte kullanılmaktadırlar.
- Genellikle 2,4-D besin ortamlarına 0.5-2 mg/l oranında katılmaktadır.
- Öte yandan oksinler somatik embriyogenesisi teşvik etmek için kullanılmalarına karşın, ortamda oksinin sürekli bulunması somatik embriyoların gelişimini engellemektedir.

- **Sitokininlerin** besin ortamına ilave edilmesi genellikle somatik embriyo oluşumunu engellemektedir.

- Ancak, tam bir embriyo olgunlaşması ve bitki gelişimi için içsel hormon seviyesine bağlı olarak çok düşük oranlarda sitokinin ve özellikle de BA gerekli olmaktadır.

- Bazı bitki türlerinde **gibberellik asit** de embriyoların bitkiye dönüşümünü teşvik etmektedir.

- Ortama **absisik asit** (ABA) ilave edilmesinin de anormal embriyo gelişimini engellediği belirtilmektedir.

- Murahige ve Skoog tarafından geliştirilen MS temel besin ortamı embriyogenesis çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

- İlave olarak , B_5, SH ve N_6 ortamları da birçok bitki türünde başarılı sonuçlar vermektedir.

- Yüksek oranda indirgen N formu somatik embriyo oluşumunu ve gelişimini teşvik etmektedir.

- Besin ortamına inositol ve sorbitol gibi şekerlerin katılması embriyo yapısını iyileştirirken, sakkaroz ise embriyogenesisi teşvik etmektedir.

4. Çevre Şartları:

- Işık kaynağı, yoğunluğu ve süresi ile sıcaklık somatik embriyo oluşumunda önemli rol oynamaktadır.

- Kallus oluşumu için eksplantlar önce karanlıkta veya 500-1000 lüks ışık altında 16 saatlik fotoperiyotta kültüre alınırlar daha sonra embriyo olgunlaşması ve bitkicik gelişimi için 5000-10000 lüks ışık şiddetine tabi tutulurlar.

- Bitki türüne bağlı olmakla beraber en yüksek oranda embriyo gelişimi 24-26 ^{o}C de gerçekleşmektedir.

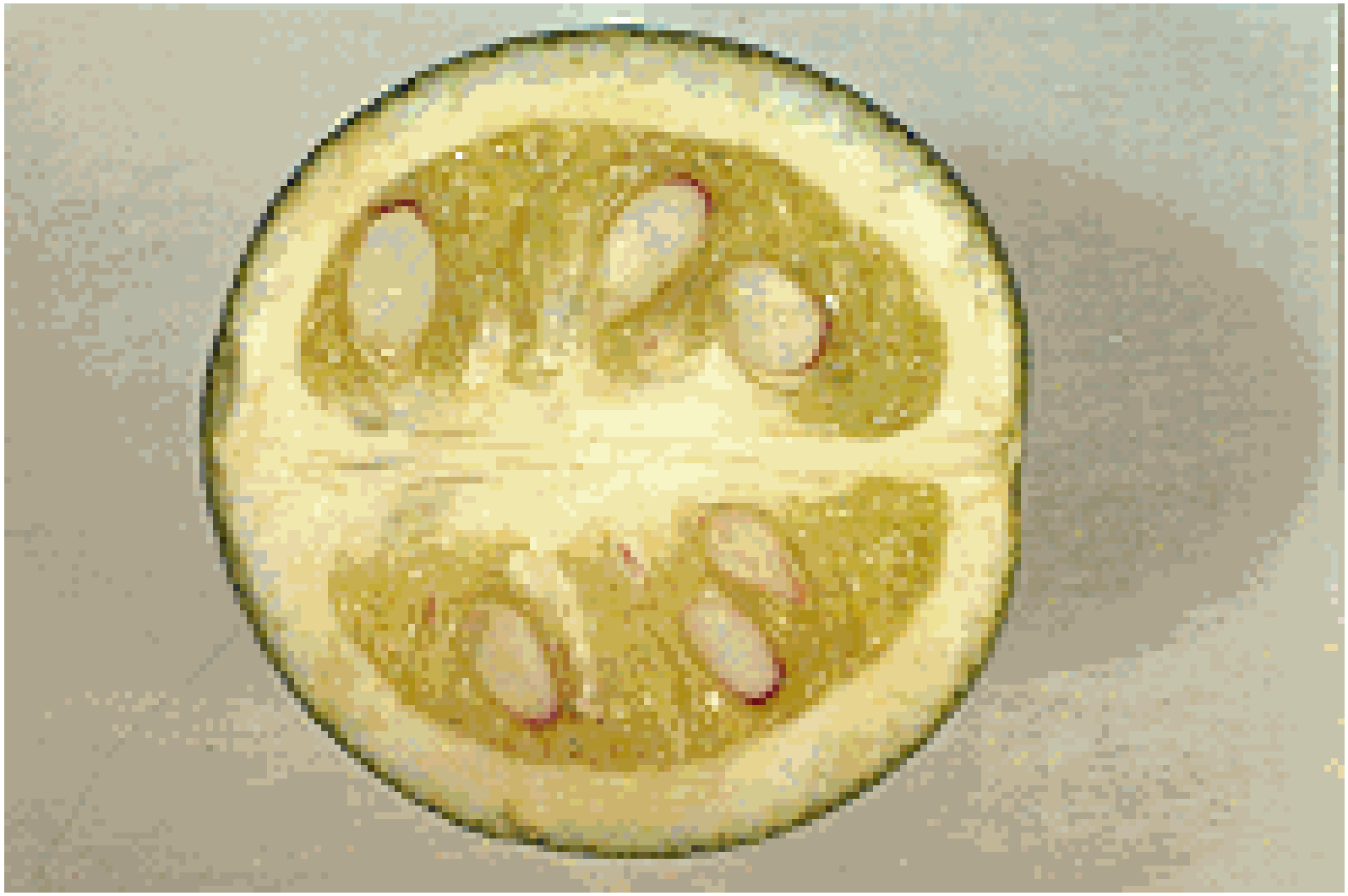
Somatik Embriyo Rejenerasyonu

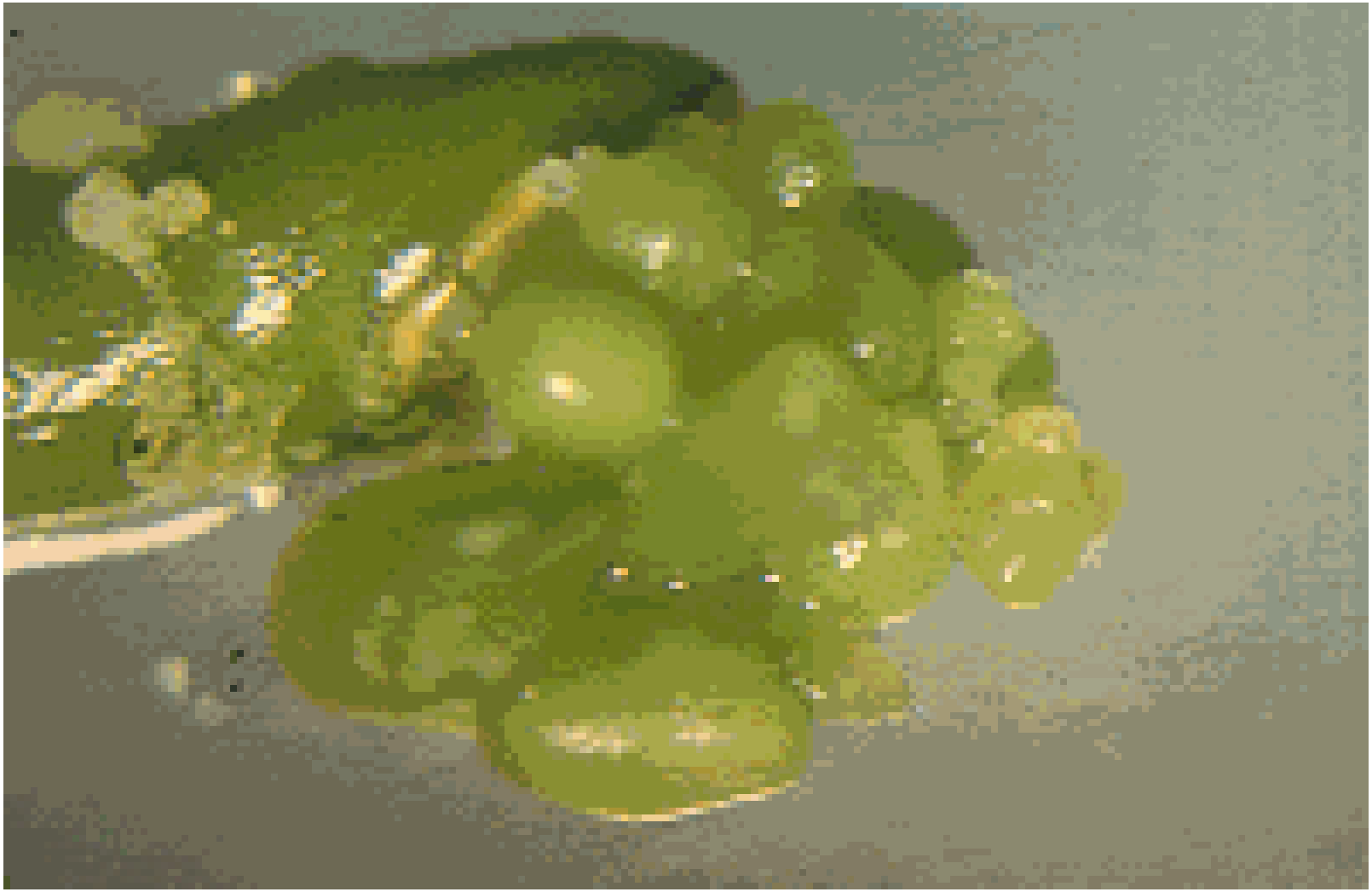
- Kültüre alınan eksplantlardan hızlı bölünen embriyonik hücreleri elde etmek için öncelikle yüksek konsantrasyonlarda oksine ihtiyaç duyulmaktadır.
- Oksin içeren besin ortamlarında embriyo oluşumu teşvik edildikten sonra kültürler oksin içermeyen ortama aktarılmalıdır. Bu safhadan sonra ortama oksin ilave edilmesi embriyo gelişimini engellemektedir.

- Bitki türü , kullanılan eksplant ve besin ortamının içeriğine bağlı olarak embriyogenesis *DİREKT* ve *İNDİREKT* olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir.

Direkt Embriyogenesis

- Bu yöntemde somatik embriyolar ara bir kallus safhası olmadan eksplant doku üzerinde bulunan tek bir hücre veya hücre gruplarından gelişirler.
- Direkt embriyogenesis için en fazla kullanılan eksplant olgunlaşmamış somatik embriyolardır.
- Bu eksplantlarda uygun bir fizyolojik gelişme safhasında olmalıdırlar. Genellikle tozlanmadan 14-15 gün sonra izole edilen zigotik embriyolar üzerinde en yüksek oranda somatik embriyo oluşumu gözlenmektedir.





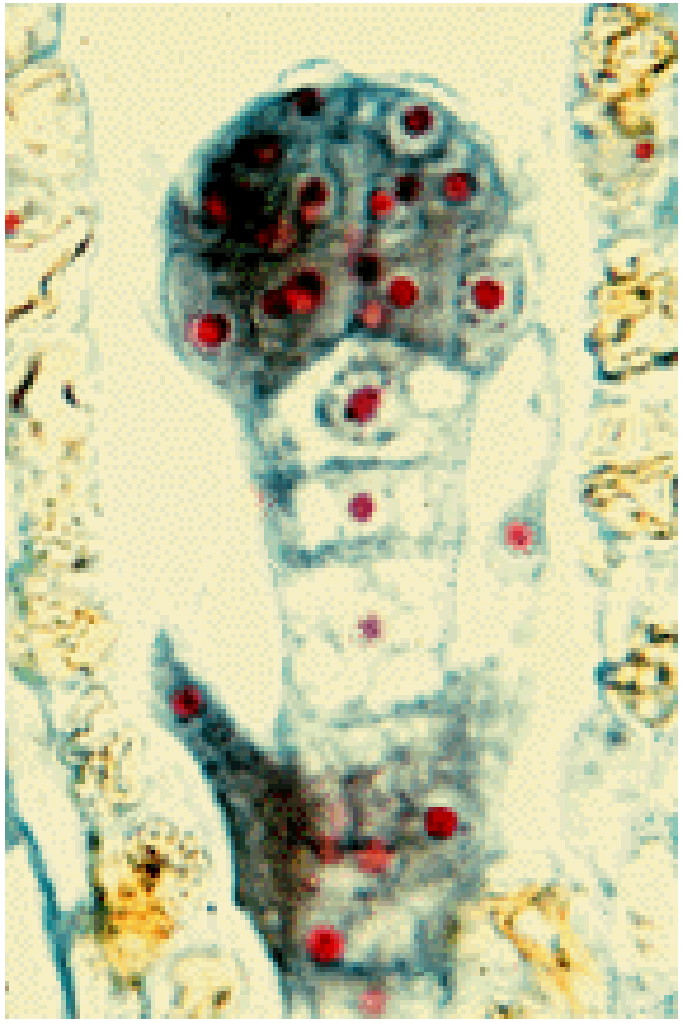
Olgunlaşmamış zigotik soya embriyolarından direkt embriyogenesis

- Çiçeklenmeden 10-21 gün sonra 2-6 mm büyüklükteki olgunlaşmamış tohumları taşıyan baklalar hasat edilir.
- Sterilizasyon gerçekleştirilir.
- Olgunlaşmamış kotiledonlar düz yüzeyleri yukarı gelecek şekilde embriyo teşvik ortamlarına yerleştirilir.
- Kültür başlangıcından 4-6 hafta sonra kotiledonlar üzerinde oluşan somatik embriyolar ve dokular kesilerek embriyo gelişme ortamına aktarılır.

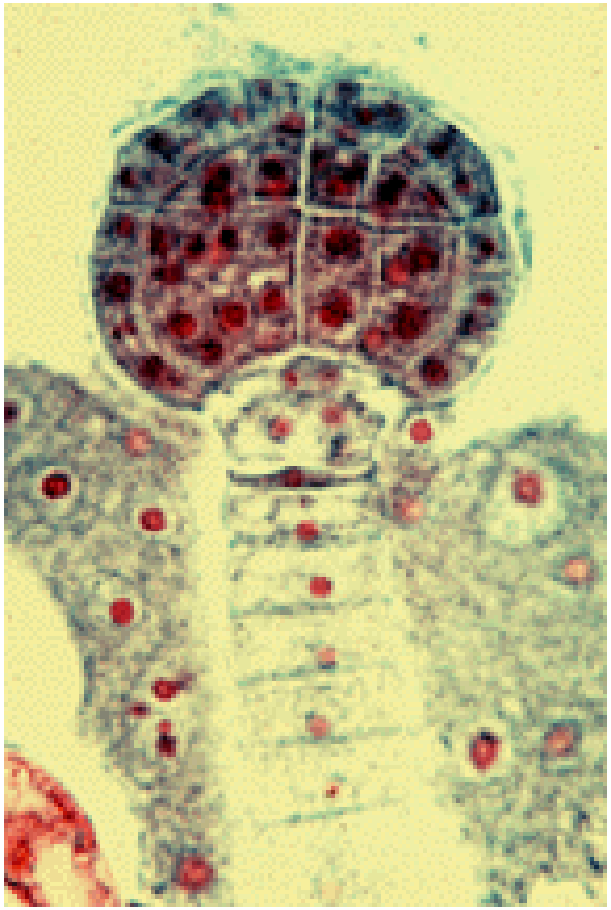
- Embriyo gelişme ortamında 4 hafta gelişen ve 5 mm den büyük olan embriyolar çimlenme ve gelişme için MS ortamına aktarılarak bitkicikler elde edilir.

2 cell proembryo

8 cell proembryo

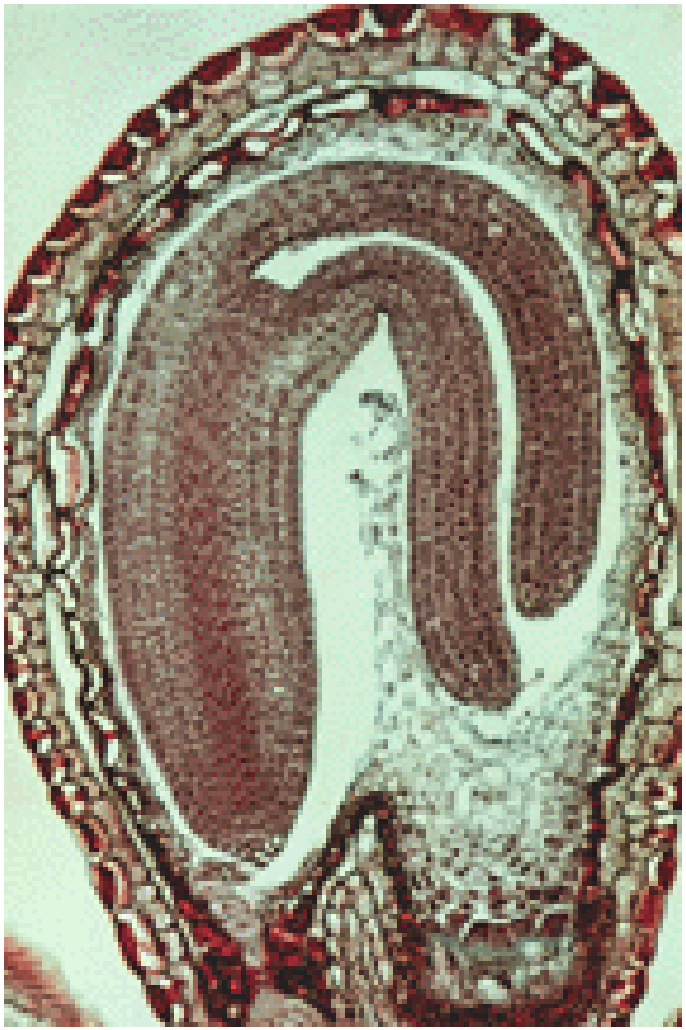


32 cell embryo



globular embryo

heart stage
embryo



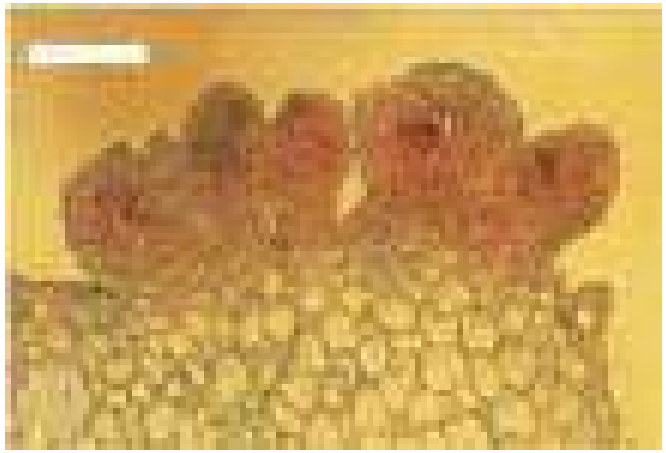
curled cotyledon embryo

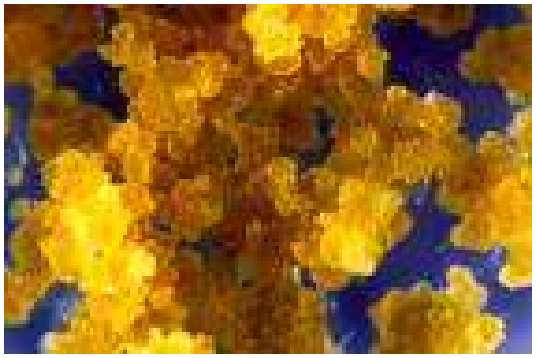
İndirekt embriyogenesis

- İndirekt embriyogenesiste eksplant yüksek oksin içeren besin ortamında kültüre alındığı zaman önce embriyonik kallus oluşumu daha sonra da bu kallus üzerinde pro-embriyoların oluştuğu gözlenir.
- Bu kallus oksin içermeyen besin ortamına aktarıldığı zaman da pro-embriyolardan bipolar (kök ve sürgün ucu meristemleri aynı anda oluşan sürgün ekseni) embriyolar oluşur ve şartlar uygun ise bu embriyolardan bitkicikler elde edilir.

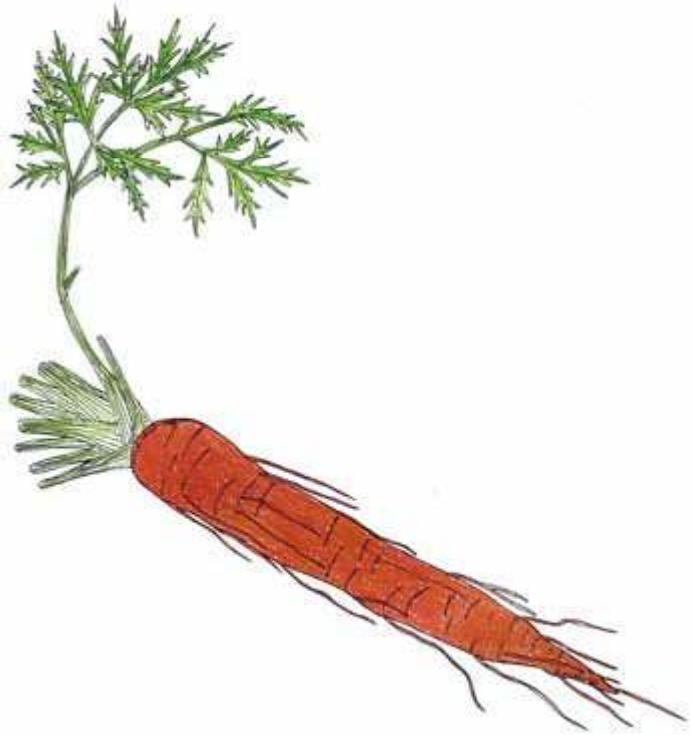
- Oksin içeren katı besin ortamında gelişen embriyonik kalluslar küçük parçalara ayrılarak yine oksin içeren sıvı besin ortamlarına alınarak süspansiyon kültürleri oluşturulabilir.
- Süspansiyon kültürlerinde önce hücreler kallus parçasından ayrılır daha sonra da tekrar hızlı bölünerek kallus yumaklarını oluştururlar.
- Bu kallus yumakları oksin içermeyen besin ortamına aktarıldığında ise somatik embriyolar gelişir.

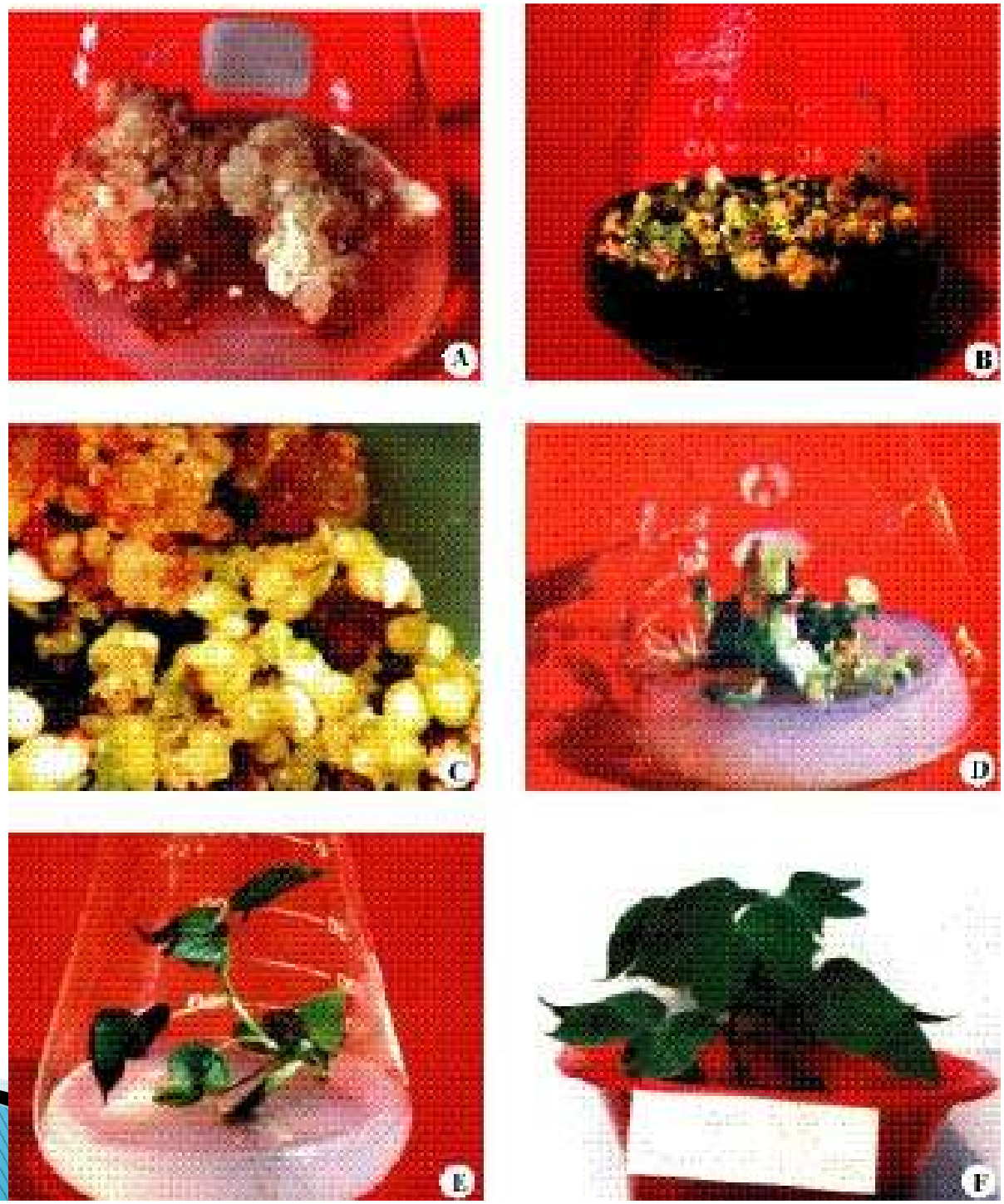
Kallus





- İndirekt embriyogenesise; olgunlaşmamış mısır zigotik embriyolarından ve havuç hipokotillerinden somatik embriyo üretimi örnek olarak verilebilir.




A
B
C
D
E
F

Somatik Embriyogenesisin Kullanım Alanları

KLONAL ÇOĞALTIM:

- Somatik embriyogenesis birçok bitki türünün, özellikle de orman ağaçlarının hızlı klonal çoğaltılmasında önemli bir potansiyele sahiptir.
- Teorik olarak tek bir eksplant sınırsız sayıda embriyo üretebilir.
- Hücre süspansiyon kültürlerinden sınırsız sayıda embriyo üretilebilmesi araştırıcıları ticari amaçla kullanılabilecek mekanik ve otomatik kültür sistemlerinin geliştirilmesine yöneltmiştir.
- Böyle bir sistemle çok az bir işçilikle çok sayıda embriyo üretimi sağlanarak, tohumla üretimle rekabet etme amaçlanmıştır.

SENTETİK TOHUM ÜRETİMİ:

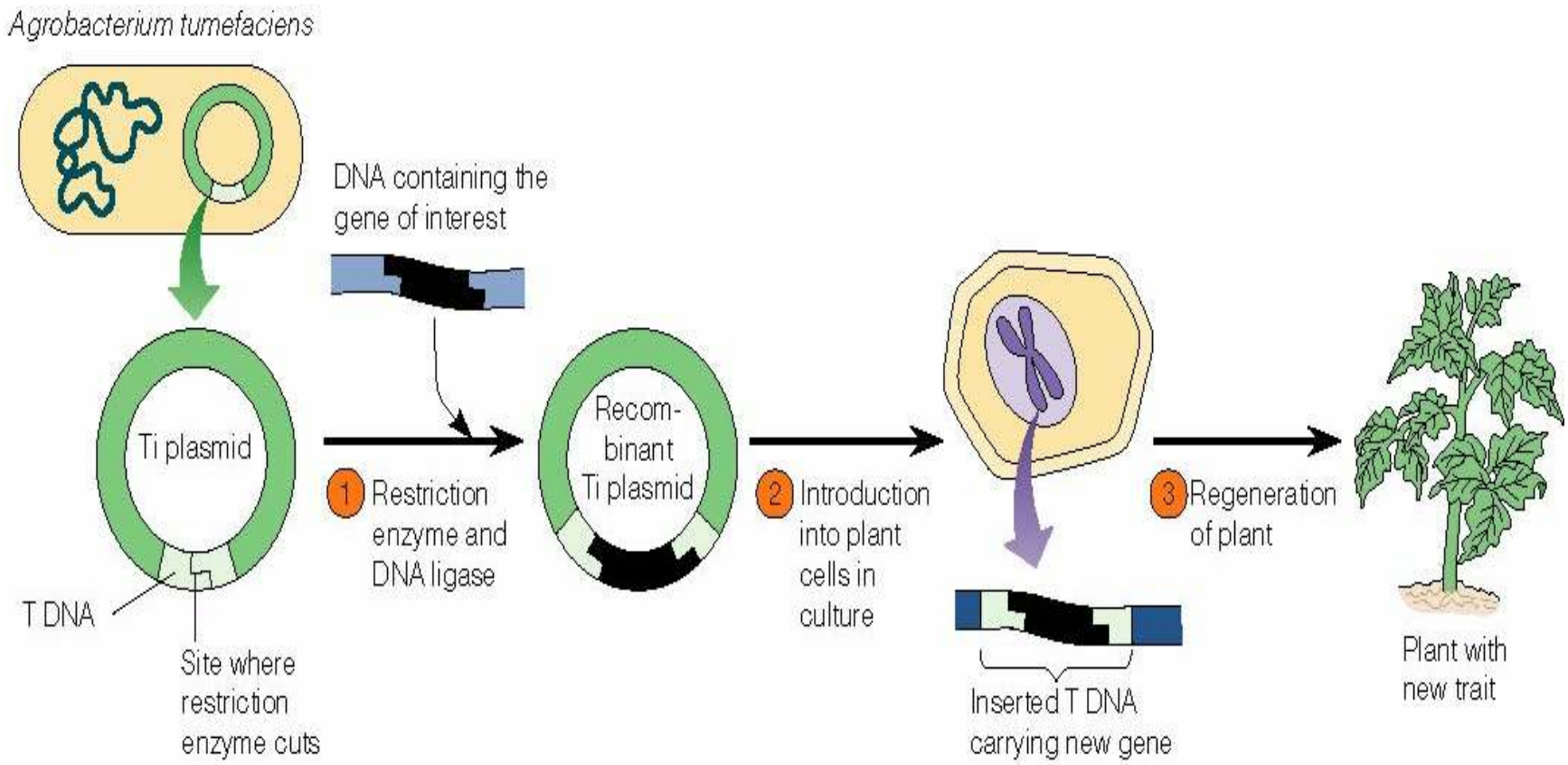
- Somatik embriyogenesis sonucunda oluşan ürün bir embriyo olup, tohum içerisinde bulunan embriyonun bir benzeridir.
- Daha da önemlisi somatik embriyolar tam bir bitki oluşturabilme programına da sahiptirler.
- Bu yüzden somatik embriyolar kaplanmış tohum olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptirler.
- Somatik embriyoların sentetik tohum olarak kullanımı büyük bir ekonomik öneme sahip olabilir.

Somatik embriyoların sentetik tohum olarak hızlı klonal çoğaltımda kullanılabilmesi için şu tekniklerin geliştirilmesi gerekmektedir:

1. Bitkiye dönüşebilme kabiliyeti yüksek olan embriyoların üretilmesi
2. İstenen miktarda embriyo üretimi sağlayacak kültür sisteminin geliştirilmesi
3. Kültür sistemi ile kaplama işleminin entegrasyonu

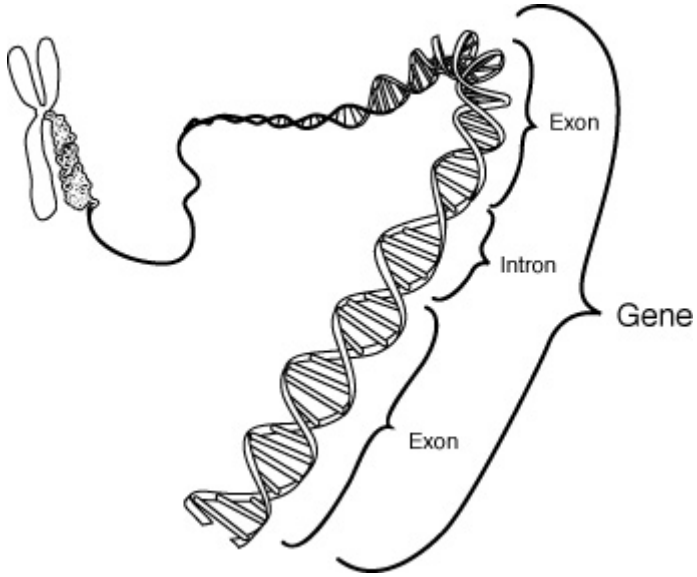
GEN AKTARIMI:

- Somatik embriyogenesisin belki de en önemli kullanım alanı bitkilere gen aktarımındadır.
- Bitkilere gen aktarımında değişik yöntemler geliştirilmiş olmakla birlikte, en yaygın olarak kullanılanı bitkilerin doğal genetik mühendisi olarak adlandırılan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir.



Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings

- Kullanılan tüm gen aktarım tekniklerinde, istenilen gen veya genleri taşıyan bir DNA parçasının bitki hücrelerinin kromozomlarına kalıcı olarak yerleştirilmesi ve bu bitki hücrelerinden embriyogenesis veya organogenesis aracılığıyla yeni bitkilerin elde edilmesi gerekmektedir.



Sunumun Eklendiği Siteler

www.bahcebitkileri.org
www.bahcebitkileri.org/bitkibiyoteknolojisi