

established in  
2016



# MAS JOURNAL of Applied Sciences

ISSN 2757-5675

DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.8009808>

Derleme Makalesi

## Ayçiçeğinde Embriyo Kurtarma Tekniği

Ayşe Nuran ÇİL<sup>1\*</sup>, Abdullah ÇİL<sup>1</sup>, Hacer Mendi BURUN<sup>1</sup>, Hatice HIZLI<sup>1</sup>, Uğur SEVİLMİŞ<sup>1</sup>, Rüştü HATİPOĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adana

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Adana

\*Sorumlu yazar: acil70@hotmail.com

**Geliş Tarihi:** 05.03.2021

**Kabul Tarihi:** 08.04.2021

### Özet

Ayçiçeği, yüksek düzeyde yabancı tozlanan bir tür olduğundan, homozigot hatların eldesi hem genetik çalışmalar hem de hibrit tohum üretimi için önemlidir. Geleneksel yöntemler, homozigot hatlar oluşturmak için en az 6 kuşak gerektirir. Embriyo kurtarma yöntemi ise hem embriyonun ölümünü önleyebilmekte hem de jenerasyon döngüsünü birkaç ay kısaltabilmektedir. Ayçiçeği embriyolarının embriyo kurtarma yöntemine verdiği yanıt ve yöntemin başarısı, bitkinin genotipine; embriyonun yaşına, hazırlanmasına, yaş homojenliğine ve sterilizasyon şekline; besi ortamının bileşimine (şeker, hormon, vitamin, diğer besin katkıları) ve çevresel ayarlamalara (nem, fotoperiyod ve sıcaklık); kültür süresine; kültür sonrası fidelerin alındığı ortama ve deneme desenine sıkı şekilde bağlıdır. Bu derlemede, ayçiçeğinin embriyo kurtarma tekniğine ve bahsedilen bu faktörlere tepkisinin araştırıldığı uluslararası çalışmalar bir araya getirilmiş ve incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ayçiçeği, embriyo kurtarma, doku kültürü

## Embryo Rescue Technique in Sunflower

### Abstract

Since sunflower is a highly open pollinated species, the production of homozygous lines is important for both genetic studies and hybrid seed production. Traditional methods require at least 6 generations to obtain homozygous lines. Embryo rescue method can both prevent embryo death and shorten the generation cycle by a few months. The response of the sunflower embryo rescue method, the method of embryo regeneration and the success of the method, the genotype of the plant; age, preparation, age homogeneity and sterilization of the embryo; the composition of the medium (sugar, hormone, vitamin, other nutrient additives) and environmental adjustments (moisture, photoperiod and temperature); culture time; After the culture, it is closely connected to the environment and trial pattern of the seedlings. In this review, international studies investigating the response of sunflower to the embryo rescue technique and these mentioned factors are gathered and examined.

**Keywords:** Sunflower, embryo culture, embryo age

## Giriş

Ayçiçeği yüksek düzeyde yabancı tozlaşan bir türdür ki homozigot hatların eldesi hem genetik çalışmalar hem de hibrit tohum üretimi için önemlidir. Geleneksel yöntemler, homozigot hatlar oluşturmak için en az 6 kuşak gerektirir. Bu nedenle ardışık birkaç neslin kısa bir süre içinde elde edilmesi, bitkilerdeki genetik iyileştirme faaliyetlerini kolaylaştırabilir (Williams ve Hill, 1986). Tarlada yetişen bir ayçiçeği, bir sonraki neslin tohumunu elde etmek için ekimden olgunluğa kadar en az 3-4 aya ihtiyaç duyar. Bu süre zarfında tozlaşmadan olgunluğa kadar tohum gelişimi yaşam döngüsü süresinin 2 ayını alır (Hahne, 2002). Ayçiçeği, çimlenme kapasitesini, tozlaşmadan yaklaşık 6 gün sonra elde eder, tozlaşmadan 16 gün sonra uyku durumuna geçer (Maiti ve ark. 2006), 45-60 gün boyunca uykuda kalır (Jambhulkar, 1995) ve ayçiçeğinin tohum olgunlaşma süresi yaşam döngüsü süresinin % 50-60'ını kapsar (Serieys, 1992). Embriyo kültürü kullanıldığında ayçiçeği üreme döngüsü birkaç ay kısalmaktadır (Torresan ve ark, 1996). Embriyo, yeni bir bitki oluşturma potansiyeli olan çok hücreli bir yapıdır. Yeni bir sporofitik neslin başlangıcını temsil eder. Embriyo, özelleşmiş bir hücreden, yani zigottan veya somatik bir hücreden ortaya çıkabilir. İlki zigotik embriyo olarak bilinir, ikincisi ise somatik veya aseksüel embriyo olarak adlandırılır. Bir embriyo esasen kök ve sürgün primordial yapıları olan bipolar bir yapıdır (Sharma ve diğerleri, 1996). Embriyo kurtarma olarak adlandırılan embriyo kültürü, yarım yüzyıldan fazla bir süredir, hibrit dölleme sonucu ortaya çıkan, dejenere olabilecek ürünleri korumak için kullanılan in vitro bir tekniktir (Bridgen, 1994). Embriyo kültürü, pratikte uygulanan en eski in vitro kültür metodolojilerinden biridir ve

islahçılar için kıymeti kanıtlamıştır (Bridgen, 1994). Ayçiçeği islahındaki ana uygulama alanı, türlerarası melezlemelerde uyumsuzluğun üstesinden gelmek olmuştur (Krauter ve ark, 1989; Sukno ve ark, 1999). Sonraları, olgunlaşmamış embriyo kültürü, ayçiçeğindeki üreme döngüsünü kısaltmak için yaygın olarak kullanılan ve yılda dört ila beş kuşak eldesi sağlayabilen bir teknik olmuştur (Plotnikov, 1983; Alissa ve ark, 1986; Jambhulkar, 1995). Buna karşın, steril olmayan çimlenme teknikleri olgunlaşmamış ayçiçeği embriyolarının in vitro kültürüne daha basit ve daha ucuz bir alternatiftir (Paul ve Barthou, 1994; Torresan ve ark, 1996). Kendilenmiş hatların hızlıca eldesi amacıyla yürütülen embriyo kültürü, ancak aynı anda seçim yapılabiliriyorsa ilgi çekici olmaktadır (Breccia et al, 2009). Embriyo kurtarma yöntemi embriyonun ölümünü önleyebilir ve jenerasyon döngüsünü hızlandırabilir (Sun ve ark, 1997). Somatik embriyolar veya sürgünler, kültür ortamının sakaroz konsantrasyonuna bağlı olarak, olgunlaşmamış zigotik ayçiçeği embriyolarından in vitro olarak indüklenebilir. % 3 sukroz içeren ortamda sadece sürgünler oluşturulurken, % 12 sukroz içeren bir ortamda somatik embriyolar oluşturulabilir. Bu iki farklı reaksiyon, dışarıdan tedarik edilen büyüme düzenleyicilerin konsantrasyonundaki değişikliklerle indüklenmese de, her iki morfojenik olayın indüklenmesi, muhtemelen kompozisyona yanıt olarak iç hormon düzenlemesine bağlıdır (Charriere ve Hahne, 1998). Olgunlaşmamış zigotik ayçiçeği embriyoları, tek bir anahtar faktördeki değişiminin (sükroz konsantrasyonu), in vitro morfogenez, organogenez (87 mM sukroz) veya somatik embriyogenez (350 mM sukroz) olarak şartlandırıldığı

deneysel bir sistemdir (Jeannin ve ark, 1995). Jeannin ve ark, (1993) yürüttükleri çalışmalarında, bir ayçiçeği inbred hattının olgunlaşmamış zigotik embriyolarını (6 mm) kullanmışlardır. İn vitro kültür ortamı, Gamborg B5 vitaminleri, kazein hidrolizat ve sadece tek bir hormon (1.5 mg / ml BAP) ile desteklenen MS ortamı olmuştur. Ortamda bulunan şeker sukroz olmuş ve bunun konsantrasyonu, indüklenen morfojeniz tipini belirleyen ana faktör olmuştur. Düşük sukroz konsantrasyonlu (% 3) bir indüksiyon ortamında organojenez; yüksek sukroz konsantrasyonlu (% 12) indüksiyon ortamında embriyojenezi indüklemiştir. Ayçiçeği embriyolarının doku kültürüne verdiği yanıtların, ortamın bileşimine ve bitkinin genotipine bağlı olduğu gösterilmiştir (Sukno ve diğ, 1999). Yinghong ve ark, (1998)'e göre, denemelerinde kullanılan MS, White, B5 ve Nitsch ortamları karşılaştırıldığında, olgunlaşmamış ayçiçeği embriyolarını büyütmek için en iyi ortam B5 temel ortamıdır. NAA, in vitro kültürlenen olgunlaşmamış ayçiçeği embriyolarında kullanıldığında, esas olarak olgunlaşmamış embriyoların embriyonik büyümesini destekler. IAA ve KT olgunlaşmamış embriyo kültüründe bir arada kullanıldığında, önemli ölçüde düzenleyici etkiye sahiptir; KT / IAA oranının düşük olması genç embriyonun köklerini büyütürken, yüksek oranı tomurcukları büyütür. (Antonova ve ark, 1990) kallusta morfogenezin tetiklenmesi için 5-7 günlük ayçiçeği embriyoları üzerinde bir çalışma yürütmüştür. Temel ortam olarak kullandığı MS ortamının beş farklı konsantrasyonuna ilave, beş farklı takviye yapmışlardır (sukroz, 6-benzilaminopurin [benziladenin], IAA, adenin ve mezo-inositol [miyo-inositol]). Morfogenez için optimum ortamın, 0,5 benziladenin, 1-2 IAA ve 50

mg/litre myo-inositol ilave 25 g / litre sukroz ve pH 5.8 olduğunu bildirmişlerdir. (Encheva ve ark, 1993), bitkilerin kendilendiği ve 4-17 gün sonra olgunlaşmamış embriyoların kotiledon aşamasında toplandığı bir çalışma yürütmüştür. Çoğunlukla, tozlaşmadan 7-13 gün sonraki olgunlaşmamış embriyoları kullanmışlardır. Olgunlaşmamış embriyolar, 1 dakika boyunca % 95 alkolde, daha sonra 15 dakika boyunca % 0,1 HgCl<sub>2</sub> çözeltisi içinde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş, daha sonra steril damıtılmış su içinde 3 kez çalkalanmıştır. Aseptik olarak parçalara ayrılmış olgunlaşmamış embriyolar, beş farklı indüksiyon ortamına yerleştirilmiş ve karanlıkta 25-26 ° C'de 2-3 hafta kültürlenmiştir. Freyssinet ve Freyssinet (1998) tarafından bildirilen iki indüksiyon ortamı olan AO ve A2'ye ilave olarak, değiştirilmiş üç ortam daha kullanmışlardır. 22 genotipin tümü için en yüksek rejenerasyon frekansının, 1 mg/l 6-benzilaminopurin (BAP) takviyesi içeren A2 ortamından elde ettiklerini bildirmişlerdir. (Yinghong ve ark, 1998), farklı ayçiçeği çeşitlerinde somatik embriyogenezin farklı şekilde gerçekleştirildiği bir çalışma yürütmüşlerdir. Sukrozun yüksek konsantrasyonu, ayçiçeği olgunlaşmamış embriyolarının somatik embriyojeneziyi iyileştirmiştir. Aynı koşulda, 2 mm uzunluğundaki olgunlaşmamış embriyolar, farklı uzunluklardaki embriyolar arasında en yüksek somatik embriyojenez yüzdesine sahip olmuştur. Nitsch ortamında % 17,5 sukroz ve 0,5-10,0 ppm zeatin ile olgunlaşmamış embriyo kültüründe somatik embriyogenez yüzdesi artmış ve artan zeatin ile başarı yüzdesi artmıştır. 2,4-D, embriyoların embriyonik hücre grupları haline gelmesini sağlamış, fakat onları farklılaştıramamıştır. (Kuo ve Wang, 1963) olgunlaşmamış ayçiçeği

embriyolarını in vitro kültürde kullandığı bir deneme yürütmüşlerdir. Temel ortam, tüm deneylerde 1 ppm tiamin, 1 ppm piridoksin, 1 ppm nikotinik asit, 0,5 ppm Ca-pantotenat, 3 ppm glisin, % 4 sukroz ve % 0,8 agar ile desteklenmiş modifiye White ortamından oluşmuştur. IAA ve hindistancevizi sütü (otoklavlanmış) farklı konsantrasyonlarda tek tek veya çeşitli kombinasyonlarda karıştırılarak embriyo büyümesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. İzole edilen embriyoların uzunluğu yaklaşık 5 mm olmuş ve kültür ortamında aşılındıklarında genellikle erken gelişerek çimlenmişlerdir. IAA ile (0,05 - 20 ppm) muamele edilen embriyoların taze ağırlığının artmasından, embriyo büyümesinde uyarıcı etkisi olduğu sonucuna varmışlardır. IAA, embriyo kallusunun indüklenmesinde etkili olmuştur. 1 ppm konsantrasyonunda, embriyoların dörtte biri kallus üretirken, 5 ppm'de embriyoların yaklaşık üçte ikisi ve 10 ppm'in üzerinde % 100'ü kallus üretmiştir. IAA, düşük konsantrasyonlarda (0,05-0,1 ppm) kök oluşumunda ve büyümesinde uyarıcı olmuş ancak, daha yüksek konsantrasyonlarda (10-20 ppm) kök büyümesinde inhibe edici etki göstermiştir. Hindistan cevizi sütü (otoklavlanmış) embriyonun sürgün büyümesi üzerinde belirgin bir olumlu etkiye sahip olmuş ve kök büyümesini engellemiştir. Her iki etki, iki haftalık kültür evresinde özellikle dikkat çekici olmuş, bu dönemden sonra kontrol ile muamele edilmiş embriyolar arasındaki fark giderek önemsiz hale gelmiştir. Hindistan cevizi sütü ayrıca embriyo kallusunun indüklenmesinde etkili olmuş ancak IAA kadar etkili olmamıştır. IAA ve hindistancevizi sütünün çeşitli kombinasyonlarda karıştırılması, embriyo kallusunun büyümesi ve indüklenmesi üzerindeki

daha belirgin etkiler göstermiştir. Hindistan cevizi sütünün etkisi ile IAA'nın etkisi arasında belirli benzerlikler tespit edilmiş, ancak hindistan cevizi sütündeki etkili maddenin sadece oksin olması olası bulunmamıştır. (Dagustu ve ark, 2010) tarafından, 15 ayçiçeği genotipinden (beş restoratör, beş sitoplazmik erkek steril ve beş maintaner'in olgunlaşmamış embriyoları), jenerasyon döngüsünü kısaltmak amacıyla incelenmiştir. Tozlaşmadan on gün sonra olgunlaşmamış embriyolar, tarla koşullarında yetiştirilen bitkilerin tohumlarından diseke edilmiş ve 5-10 gün boyunca filiz ve kök gelişimine izin verecek şekilde MS ortamına aktarılmıştır. (Jambhulkar, 1995) tarafından tarif edildiği gibi (Murashige ve Skoog, 1962) ortamına % 2 sukroz ve % 0.8 agar ile pH 5.6-5.7'de yerleştirilmişlerdir. Tüm çalışmalar steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Nem kaybını önlemek için parafilm ile kapatılmış olan petri kapları  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, 16 saat gündüz / 8 saat gece ışığında 4 hafta boyunca kültüre edilmişlerdir. MS ortamındaki iki haftalık kültür süresinde, gelişmekte olan embriyolar kuvvetli köklere (2-6 cm ve dallanma) ve 6-8 yapraklı (1 cm) bir gövdeye (3-5 cm) sahip bitkilere dönüşmüştür. Genç fideler toprağa transfer edilmiş, olgunluğa erişmiş, sonra kendi kendine tozlaşmış ve tohum vermişlerdir. Olgunlaşmamış embriyodan yetiştirilen bitkilerin ilk döngüsü elde edilmiştir. Bu bitkiler çiçeklenme aşamasındayken, 10 günlük embriyolar diseke edilmiş ve olgunlaşmamış embriyodan yetiştirilen bitkilerin ikinci döngüsü elde edilmiştir. Çiçeklenme aşamasında üçüncü döngüyü elde etmek için bitkiler büyüme odasında tutulmuştur. Kültürlenmiş embriyoların çoğu 3-6 yapraklı kuvvetli fideler halinde gelişmiştir. 1710

olgunlaşmamış embriyonun minimum %42,5 ve maksimum % 100'ü morfogenez göstermiş ve ortalama değer % 93,1 (1591 adet) olmuştur. Genel sonuç, her 100 olgunlaşmamış zigotik embriyo için ortalama 40-50 rejenere ve olgunlaşmış bitki olmuştur.

(Jeannin ve Hahne, 1991) 'in çalışmasında, bir ayçiçeği genotipinin tohumlarının olgunlaşmamış zigotik embriyoları 6-benziladenin ve yüksek oranda sakaroz içeren ortama ekilmiş ve doğrudan somatik embriyogenez yoluyla rejenere edilmiş fertil bitkiler elde edilmiştir. (Sujatha & Prabakaran, 2001) 'in araştırmasında, ayçiçeği zigotik embriyolarından yüksek oranda iyi oluşturulmuş somatik embriyoların indüklenmesi için besi ortamı gereksinimleri değerlendirilmiştir. Genotip, embriyo büyüklüğü (0,5–10 mm), sukroz konsantrasyonu (30-240 g/l), karbonhidrat kaynağı (sukroz, glikoz, maltoz), agar kuvveti (% 0,2-1,0), bazal ortam (MS, Gamborg, Nitsch, Beyaz), fotoperiyod (aydınlık / karanlık) ve sıcaklık (20–36°C) test edilmiştir. Fotoperiyod dışındaki tüm bu değişkenler embriyoenez sıklığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olmuştur. En yüksek embriyoenez sıklığı Gamborg bazal tuz ortamı, 120-210 g/l sukroz, % 0,8-1,0 agar, küçük boyutlu embriyolar (0,5-2 mm) ve 28-32°C inkübasyon sıcaklığı ile elde edilmiştir. Bunlara ek olarak, farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyici kombinasyonları (2,4-D, 2,4-D + kinetin, BA + NAA) denemişlerdir. 2,4-D ile desteklenen ortam direkt embriyogenezini artırmış, BA + NAA, tekli / çoklu sürgünlerin oluşumunu kolaylaştırmış, fakat 2,4-D + kinetin ile desteklenmiş ortamdan yanıt alamamıştır. İyi düzeyde farklılaştırılmış embriyolara sahip zigotik embriyolar, tam bitki gelişimi için büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı kuvvetli MS ortamına aktarılmıştır.

(Williams ve Hill, 1986) ve (Murashige ve Skoog ,1962) ortamında % 2 sukroz, % 0.8 agar ve pH 5.6-5.7'yi ortam olarak kullanmıştır. Emaskülasyon sabahın erken saatlerinde 2 ila 4 çiçek halkasının açtığı bir aşamada yapılmıştır. Tablanın ortasındaki tüm çiçek tomurcukları çıkarılmıştır. Embriyo yaşında homojenliğini sağlamak için tozlaşma ertesi gün yapılmıştır. Akenler tozlaşma sonrası 12. günde tabladan çıkarılmıştır. 5 dakika boyunca % 0,1 cıva klorür ve 10 dakika boyunca sodyum hipoklorit: su (1: 9) çözeltisi ile sterilize etmişlerdir. Daha sonra, steril damıtılmış su ile her biri 5 dakikalık 3 yıkama yapmışlardır. Embriyolar disseke edilmiş ve besi ortamına aktarılmıştır. Tüm işlemleri aseptik şartlar altında gerçekleştirmişlerdir. 3 gün sonra, yeni gelişen fideleri ortamdaki almışlardır. Kökleri sterilize edilmiş distile su içinde nazikçe ve iyice yıkamışlardır. Bitkileri steril olan bir kum: toprak: vermikülit (1: 1: 1 v/v) karışımına aktarmışlardır. Bitkileri sürekli aydınlatma altında 5 gün boyunca 25°C'de tuttuktan sonra toprakla doldurulmuş saksılara aktarmışlar ve saksı başına 2-3 bitki yerleştirmişlerdir. (Vasic ve Vasiljevic, 1994) ayçiçeği inbred'lerinin on yedi günlük embriyolarını, sterilizasyon sonrasında, 0,1 mg/l IAA, 0,1 mg/l BAP ve 500 mg/l kazein hidrolizat ile desteklenmiş MS ortamına yerleştirmişlerdir. Embriyolar filizlenmiş ve bitkilere dönüşmüştür. İyi gelişmiş kotiledonlara sahip olan fideler, Jiffy-7 küvetine aktarılmış ve başarılı bir ortama alıştırmaya işleminden sonra seraya dikilmiştir. Canlı bitki elde etme oranı yüksek olmuştur. (Breccia ve ark, 2009) olgunlaşmamış embriyolardan ayçiçeği bitkileri geliştirmek için biri in vitro ve ikisi steril olmayan üç farklı tekniği test etmişlerdir. Bunlar: 1) İn vitro çimlendirme: Olgunlaşmamış embriyoların in vitro çimlenmesi

(Zorzoli ve ark, 1994)'e göre yapılmıştır. Olgunlaşmamış akenler 1 saniye boyunca % 70 etanol ve 10 dakika boyunca % 3 sodyum hipoklorit çözeltisi içine daldırma ile yüzey sterilize edilmiş ve daha sonra üç kez steril damıtılmış su içinde durulanmıştır. Perikarplar steril koşullarda çıkarılmış ve embriyolar, pH 6,0'da 20 g/l sukroz, 9 g/l agar ile takviye edilmiş hormonsuz yarı kuvvetli (MS) ortamı üzerine çimlendirilmiştir. Embriyolar, 10 ml katı ortam içeren bir test tüpüne yerleştirilmiştir. İki embriyo manipülasyon tekniği değerlendirilmiştir: sağlam embriyolar ve kesilmiş embriyolar; ki ikincisi, distal üçüncü kotiledon ucundan ayrılmış embriyolardır. Kùltürler, bir büyüme odasında  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 12 saatlik bir fotoperiyod ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) koşullarında 15 gün boyunca inkübe edilmiştir. 2) Steril olmayan çimlenme teknikleri: Olgunlaşmamış akenler yukarıda tarif edildiği gibi yüzey sterilize edilmiş ve sonra üç kez damıtılmış su içinde durulanmıştır. Perikarplar ve seminal membranlar sağlam ve kesilmiş embriyolardan çıkarılmıştır. Her iki embriyo manipülasyonu, in vitro teknik için tarif edilen koşullar altında inkübe edilmiştir. İki steril olmayan deneme değerlendirilmiştir: petride çimlenme ve saksıda çimlenme tekniği. Bu çalışmada kullanılan petride çimlenme tekniği (Paul ve Barthou, 1994) aşağıdaki şekilde uyarlanmıştır: i) 10 cm'lik petri kabına filtre kağıdı üzerine embriyolar yerleştirilmiş ve pamukla besleyici çözeltiyle (% 25 MS) ıslatılmıştır, ii) Ekimden beş gün sonra çimlenmiş embriyolar kumla doldurulmuş plastik tepsilere aktarılmış ve besleyici çözelti ile sulanmıştır. Bitkiler, 10 gün boyunca büyüme odasında tutulmuştur. 3) Saksıda çimlenme tekniği, kum ile doldurulmuş plastik saksılara (4 cm çap x 5,5 cm boyunda) olgunlaşmamış

embriyoların ekiminden ibaret olmuştur. Saksılar plastik tavalara (tepsi başına 30 saksı) yerleştirilmiş ve kılcal borularla besleyici çözelti ile sulanmıştır. Embriyolar 15 gün boyunca inkübasyona yatırılmıştır. Denemeler sonucunda, olgunlaşmamış embriyoların çimlenmesi, hem in vitro kültür hem de saksıda çimlendirme tekniğinde başarılı ve aynı bulunmuştur. Çalışmada üç tekerrürlü, tamamen randomize bir tasarım kullanılmışlardır. İn vitro deneylerde, her bir tekerrür için on embriyoyu on test tüpüne (her tüpe bir embriyo) yerleştirmişlerdir. Petri kabı denemesinde her tekerrürde bir petri kabı yer almış ve her petri kabına on embriyo yerleştirmişlerdir. Saksı denemesinde her tekerrür 10 saksıdan oluşmuş ve her saksıya bir embriyo yerleştirmişlerdir. (Jach ve Przywara, 2000), ayçiçeği genotiplerinin olgunlaşmamış zigotik embriyolarında indüklenen somatik embriyogenez ve organogenez üzerine çalıştıkları bir deneme yürütmüşlerdir. Dört çeşidin olgunlaşmamış zigotik embriyoları, 350 mM'lik yüksek sakaroz konsantrasyonunu içeren JME ortamında kültürlendiğinde somatik embriyogenez ve organogenez gözlemişlerdir. (Torresán ve ark, 1996)'ya göre, ayçiçeğinde olgunlaşmamış tohumların çimlendirilmesi, steril olmayan koşullarda üretildiği için, in vitro embriyo kültürüne göre daha basit ve daha ucuz bir alternatiftir. Çimlenme yüzdesini maksimize etmek için farklı teknikler 15 günlük tohumlar üzerinde test edilmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki: 1) tohumların yüzeyini aşındırmak ve 2) 100 ppm gibberellik asit içerisinde 1 saat boyunca ıslatmak önemlidir. Bu tekniğin uygulanmasıyla tohumların % 94'ünden fazlası çimlendirilmiştir.

### Sonuç

Embriyo kültürü bitkilerde farklı amaçlarla kullanılan bir tekniktir.

Tohum dışında embriyonun gelişiminin incelenmesi, yaşama yeteneğine sahip olmayan embriyoları kurtarma ve haploid bitki geliştirme gibi amaçlar için kullanılabilir.

### Kaynaklar

- Alissa, A., Jonard, R., Serieys, H., Vincourt, P. 1986. culture d'embryons isoles in vitro dans un programme d'ameilioration du Tournesol. Comptes rendus del'Academie des Sciences. Serie III. Sciences de la Vie.
- Antonova, T.S., Borovkov, A.Y., Zezul, T.G., Sumkina, M.Y. 1990. Optimization of the conditions for inducing morphogenesis in primary callus from immature embryos of sunflower. Sel'skokhozyaïstvenn aya Biologiya, (3): 60-65.
- Breccia, G., Vega T, N. G., Mayor, M. L., Zorzoli, R., Picardi, L. 2009. Immature embryo culture for early screening of imidazolinone resistance in sunflower. International Journal of Plant Breeding, 3(1): 37-40.
- Bridgen, M.P. 1994. A review of plant embryoculture. Horticulture Science, 29(11): 1243-1246.
- Charriere, F., Hahne, G. 1998. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on in vitro cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. Plant Science, 137(1): 63-71.
- Dagustu, N., Sincik, M., Bayram, G., Bayraktaroglu, M. 2010. Regeneration of fertile plants from sunflower (*Helianthus annuus* L.)-Immature embryo. Helia, 33(52): 95-102.
- Encheva, J., Ivanov, P., Liu, G. 1993. Genotypic Responsiveness of Several Sunflower Lines, Hybrids and Open Pollinated Varieties to in Vitro Manipulation of Immature Embryos. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 7(4): 78-82.
- Hahne, G., 2002. Sunflower seed. In: Transgenic Plants and Crops. Eds., G.G. Khachatourians, A. McHughen, R. Scorza, W-K. Nip, Y. H. Hui, pgs: 813-830.
- Jach, M., Przywara, L. 2000. Somatic embryogenesis and organogenesis induced in immature zygotic embryos of selected sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes. Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica, 42(2): 83-86.
- Jambhulkar, S.J. 1995. Tmmature Embryo (*Helianthus annuus* L.). Helia, 8(22): 45-50.
- Jambhulkar, S.J. 1995. Rapid cycling through immature embryo culture in sunflower (*Helianthus annuus* L.).
- Jeannin, G., Hahne, G. 1991. Donor plant growth conditions and regeneration of fertile plants from somatic embryos induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Breeding, 107(4): 280-287.
- Jeannin, G., Bronner, R., Hahne, G. 1993. Early cytological discrimination between organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Biotechnology & Biotechnological Equipment, 7(4): 96-99.
- Jeannin, G., Bronner, R., Hahne, G. 1995. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on

- the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated in vitro: role of the sugar. *Plant Cell Reports*, 15(3-4): 200-204.
- Krauter, R., Friedt, W. 1989. Efficient interspecific hybridization in the genus *Helianthus* through embryo rescue. *Vortraege fuer Pflanzenzuechtung* (Germany).
- Kuo, J. S., Wang, F. H. (1963). The effect of IAA and coconut milk on the growth of immature sunflower embryos cultured in vitro. *植物学报 (英文版)*, 2: 003.
- Maiti, R.K., Vidyasagar, P., Shahapur, S. C., Ghosh, S.K., Seiler, G.J. 2006. Development and Standardization of a Simple Technique for Breaking Seed Dormancy in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia*, 29(45): 117-126.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3): 473-497.
- Plotnikov, V.A. 1983. Use of the method of culturing young embryos for accelerated development of sunflower cytoplasmic male sterility analogues. *Cytology and genetics* (USA).
- Serieys, H. 1992. Cytoplasmic effects on some agronomical characters in sunflower. In *Proceedings of the 13th International Sunflower Conference*, 2: 1245-1250.
- Sharma, D.R., Kaur, R., Kumar, K. (1996). Embryo rescue in plants—a review. *Euphytica*, 89(3): 325-337.
- Sujatha, M., Prabakaran, A.J. 2001. High frequency embryogenesis in immature zygotic embryos of sunflower. *Plant cell, tissue and organ culture*, 65(1): 23-29.
- Sukno, S., Ruso, J., Jan, C.C., Melero-Vara, J.M., Fernandez-Martinez, J.M. 1999. Interspecific hybridization between sunflower and wild perennial *Helianthus* species via embryo rescue. *Euphytica*, 106(1): 69-78.
- Sun, M., Llang, X., Li, H., Wang, T. 1997. The Application of Embryo Rescue in Sunflower Breeding [J]. *Jilin Agricultural Sciences*, 1: 003.
- Torresan, A., Kesteloot, J., Castaño, F., Rodríguez, R., Colabelli, M. 1996. Use of immature seed germination technique as an alternative to in vitro culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryos. *Euphytica*, 91(1): 1-3.
- Vasic, D., Vasiljevic, L. 1994. Possibility of shortening breeding cycle of sunflower via embryo culture. *Selekcija i semenarstvo* (Yugoslavia).
- Williams, P.H., Hill, C.B. 1986. Rapid-cycling populations of Brassica. *Science*, 232(4756): 1385-1389.
- Yinghong, L., Zhongshen, G., Fuhsiung, W. 1988. Immature embryo culture of sunflower. *Acta Botanica Yunnanica*, 1: 011.
- Yinghong, L., Zhongshen, G., Fuxiong, W. 1988. Observation on somatic embryogenesis in the immature embryo culture of sunflower. *Acta Botanica Yunnanica* (China).