

BITKİ BİYOTEKNOLOJİSİ

Doku Kültürü ve Uygulamaları



Editörler

Mehmet Babaoğlu • Ekrem Gürel • Sebahattin Özcan





Bitki Biyoteknolojisi

- I -

Doku Kùltürü ve Uygulamaları

(Toplam 11 Bölüm, 17'si renkli 95 şekil)

2. Baskı

Editörler

Mehmet Babaoğlu, Ekrem Gürel, Sebahattin Özcan

2002

*17 Ağustos ve 12 Kasım depremlerinde
kaybettiklerimize...*

İçindekiler .	 i-vii
Önsözler . . .	. . viii-xiv

Bölüm 1.	Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri.....	1-35
	Mehmet Babaoğlu, Mustafa Yorgancılar, Mehmet Aydın	Akbudak

- 1.1. Giriş
- 1.2. Bitki Doku Kültürlerinin Tarihi Gelişimi ve Uygulama Alanları
- 1.2.1. Bitki doku kültürlerinin bitki ıslahındaki uygulama alanları
- 1.2.2. Bitki doku kültürünün ticari ve ıslah dışı uygulamaları
- 1.2.3. Bitki doku kültürlerinin temel araştırmalardaki uygulamaları
- 1.3. Temel Teknikler
- 1.3.1. Laboratuvar düzeni
- 1.3.2. Sterilizasyon teknikleri
- 1.3.2.1. Çalışma ortamının sterilizasyonu
- 1.3.2.2. Besin ortamlarının, alet ve ekipmanların sterilizasyonu
- 1.3.2.3. Bitki materyallerinin yüzey sterilizasyonu
- 1.4. Besin Ortamları
- 1.4.1. Stok solüsyonların hazırlanması ve saklanması
- 1.4.2. Bitki büyüme düzenleyicileri
- 1.5. Kültür Şartları
- 1.6. Denemelerin Planlanması ve Data Analizi
- 1.7. Mikroskopi ve Görüntüleme
- 1.8. Laboratuvar Güvenliği
- 1.9. Bitki Doku Kültürüne Yeni Başlayacaklar İçin Tavsiyeler
- 1.10. Türkiye'deki Mevcut Durum ve Sonuç
- Kaynaklar

Bölüm 2.	Organogenesis.....	36-70
	Ekrem Gürel, Arzu Uçar Türker	

- 2.1. Giriş
- 2.2. Tarihçesi
- 2.3. Organogenesis Tekniği
- 2.3.1. Eksplant seçimi
- 2.3.2. Besin ortamının seçilmesi
- 2.3.2.1. Besin ortamının temel içerikleri.
- 2.3.2.2. Kültür şartları
- 2.4. Organogenesis Çeşitleri
- 2.5. Organogenesisde Meydana Gelen Önemli Olaylar
- 2.5.1. Hücresel yeterlilik ve kararlılık
- 2.5.2. Fizyolojik, biyokimyasal ve metabolik olaylar
- 2.6. Organogenesisde Başarı Sağlanan Türler
- 2.7. Sonuç
- Kaynaklar

Bölüm 3. Somatik Embriyogenesis..... 71-88
Sebahattin Özcan, Mehmet Babaoğlu, Cengiz Sancak

- 3.1. Giriş
- 3.2. Somatik Embriyogenesisi Etkileyen Faktörler
 - 3.2.1. Eksplant kaynağı
 - 3.2.2. Genotip
 - 3.2.3. Besin ortamının içeriği
 - 3.2.4. Çevre şartları
- 3.3. Somatik Embriyo Re jenerasyonu
 - 3.3.1. Direkt embriyogenesis
 - 3.3.2. İndirek embriyogenesis
- 3.4. Somatik Embriyogenesisin Kullanım Alanları
 - 3.4.1. Klonal çoğal tim
 - 3.4.2. Sentetik tohum üretimi
 - 3.4.3. Gen aktarım
- Kaynaklar

Bölüm 4. Protoplast Kültürü ve Somatik Melezleme..... 89-136
Mehmet Babaoğlu, Sebahattin Özcan

- 4.1. Tarihçe
- 4.2. Totipotensi ve Tanımlamalar
- 4.3. Bitkilerde Hücre Duvan Kompozisyonu
- 4.4. Protoplast izolasyonu
 - 4.4.1. Eksplant kaynakları
 - 4.4.2. Donör bitki materyalinin ön muamelesi ve yetiştirme şartları
 - 4.4.3. Protoplast izolasyonunda kullanılan yıkama solüsyonları, enzimler ve enzim karışımları
 - 4.4.4. Ozmotik şartlar ve plazmolizasyon
 - 4.4.5. Enzim inkubasyonu
 - 4.4.6. Protoplastların yıkanması ve saflaştırılması
 - 4.4.7. İzolasyon sonrası uygulanan testler
- 4.5. Protoplast Kültürü

 - 4.5.1. Kültür ortamlarının özellikleri ve bitki büyüme düzenleyicileri
 - 4.5.2. Kültür yoğunluğu
 - 4.5.3. Kültür teknikleri
 - 4.5.4. Protoplastların kültür sonrası davranışları
- 4.6. Protoplastlardan Bitki Rejenerasyonu
- 4.7. Protoplast Füzyonu ve Somatik Melezleme
 - 4.7.1. Önemi
 - 4.7.2. Somatik hibrit ve sibirit
 - 4.7.3. Protoplast füzyonu işleminin aşamaları
- 4.8. Heterokaryonların Kültürü ve Seleksiyon
- 4.9. Somatik Hibrit Bitkilerin Analizi
- 4.10. Sonuç
- Kaynaklar
- EKİ. KM'ye dayak ortamlar

Bölüm 5. Haploid Bitki Üretimi..... 137-189
şebnem ünaitioğlu, Nebanat Sarı, Kazım Abak

5.1.	Giriş
5.2.	Erkek Gametten Haploid Uyartımı (Androgenesis)
5.2.1.	Anter kültürü
5.2.1.1.	Anter kültürünün yapılışı
5.2.1.2.	Mikrosporların sporofitik yönde gelişme için uyarılması
5.2.1.3.	Androgenesis etkileyen faktörler
5.2.1.3.1.	Anter verici (donör) bitkiden kaynaklanan faktörler
5.2.1.3.2.	Anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörler
5.2.2.	Mikrospor kültürü
5.2.3.	Androgenesis sonrasında albino bitki sorunu
5.3.	Dişi Gametten Haplidi Uyartımı (Ginogenesis ve Partenogenesis)
5.3.1.	Övül ve ovaryum kültürleri
5.3.2.	Kromozom eliminasyonu
5.3.3.	Eksik veya yetersiz polenler ile tozlama
5.3.4.	Ginogenesis etkileyen faktörler
5.4.	Haploid Bitkilerde Kromozom Kadama
5.5.	Ploidi Belirleme
5.5.1.	Fenotipik gözlemler
5.5.2.	Kromozom sayımları
5.5.3.	Flow sitometri
5.5.4.	Stomatal incelemeler
	Kaynaklar

Bölüm 6. Hastaliksız Bitki Üretimi..... 190-210
Be tül Bürün

6.1.	Giriş
6.2.	Meristem Kültürü
6.2.1.	Meristem kültüründe başanyı etkileyen faktörler
6.2.1.1.	Bitki materyali
6.2.1.2.	Kültür ortamı
6.2.1.3.	Kültür şartları (çevresel faktörler)
6.2.2.	Meristem ucu kültürü uygulaması
6.2.2.1.	Metodun uygulanması
6.2.2.2.	Meristem ucu kültürü çalışmaları dikkat edilecek noktalar
6.2.3.	Meristem ucu kültürünün yararları
6.2.4.	Meristem ucu kültürü tekniğinin sınırlamaları
6.3.	Virüsten Ari Bitkilerin Üretilmesi
6.3.1.	Meristem ucu kültürü
6.3.2.	Sıcaklık uygulaması (termoterapi)
6.3.3.	Meristem kültürü ile birlikte sıcaklık uygulaması
6.3.4.	Kimyasal madde kullanımı (kemoterapi)
6.3.5.	Soğuk uygulaması (kryoterapi)
6.3.6.	Mikroaşılama
6.3.7.	Virüsten ari bitkilerin kallus ve protoplasttan elde edilmesi
6.3.8.	Virüsten ari diğer eksplantlar

- 6.3.9. Virüslerin tanımlanması
- 6.4. Bakteri ve Mantarlardan Ari Bitkilerin Üretilmesi
- 6.5. Sonuç
- Kaynaklar

Bölüm 7. Sekonder Metabolit Üretimi..... . 211-261

Atalay Sökmen, Ekrem Gürel

- 7.1. Giriş
- 7.2. Sekonder Metabolitlerin Ekonomik Önemi
- 7.2.1. İlaç olarak kullanılan sekonder metabolitler
- 7.2.2. Besin katkı maddeleri olarak kullanılan sekonder metabolitler
- 7.2.3. Parfümeri ve zirai mücadelede kullanılan sekonder metabolitler
- 7.3. Sekonder Metabolitlerin Üretimi
- 7.4. Bitki Hücre Kültürleri ve Sekonder Metabolitler
- 7.5. Bitki Doku ve Hücre Kültürü ile Sekonder Ürünlerin Üretimi
- 7.5.1. Farklaşmış ve organize olmuş kültürler ile sekonder metabolitlerin üretimi
- 7.5.1.1. Kök kültürleri
- 7.5.1.2. Sürgün kültürleri
- 7.5.1.3. Embriyo kültürleri
- 7.5.2. Farklaşmamış ve organize olmamış kültürler ile sekonder metabolitlerin üretimi
- 7.5.2.1. Kallus kültürleri
- 7.5.2.2. Hücre süspansiyon kültürleri
- 7.6. Süspansiyon Kültürlerinde Büyüme ve Sekonder Metabolit Birikimi
- 7.7. Süspansiyon Kültürlerinde Sekonder Ürün Veriminin Artırılması
- 7.7.1. Bitkisel koşullar
- 7.7.2. Kültür ortamındaki kimyasal koşullar
- 7.7.2.1. Karbon kaynağı
- 7.7.2.2. Azot kaynağı
- 7.7.2.3. Fosfor kaynağı
- 7.7.2.4. Bitki büyüme düzenleyicileri
- 7.7.2.5. Diğer elementler
- 7.7.2.6. pH
- 7.7.2.7. Ozmotik basınç
- 7.7.3. Kültür ortamındaki fiziksel koşullar
- 7.7.3.1. Işık
- 7.7.3.2. Sıcaklık
- 7.7.3.3. Diğer fiziksel etmenler
- 7.7.4. Deneysel yaklaşımlar
- 7.7.4.1. Öncüller (precursors)
- 7.7.4.2. Elisitörler
- 7.7.4.3. Tutuklama (immobilizasyon)
- 7.7.4.4. Senkronize (eşzamanlı) kültürler
- 7.7.4.5. İki aşamalı kültürler
- 7.8. Biyodönüşüm (biyotransformasyon)
- 7.9. Biyoreaktörler (fermentörler)
- 7.10. Genel değerlendirme
- Kaynaklar

Bölüm 8. Mikroçoğaltım..... . 262-281

Kyfdtreu-oerjı, Tilcrein *Gurd*

- 8.1 *Giriş*
- 8.2 Mikroçoğaltım Aşamaları
 - 8.2.1. Hazırlık aşaması
 - 8.2.2. Kültür başlangıç aşaması
 - 8.2.2.1. Eksplant seçimi
 - 8.2.2.2. Sterilizasyon
 - 8.2.2.3. Başlangıç ortamları
 - 8.2.2.4. Çevresel faktörler
 - 8.2.3. Sürgün çoğaltım aşaması
 - 8.2.3.1. Besin ortamları
 - 8.2.3.2. Kallus oluşumu
 - 8.2.3.3. Adventif tomurcuk oluşumu
 - 8.2.3.4. Aksiller (koltuk altı) tomurcuk oluşumu
 - 8.2.4. Sürgün gelişimi ve köklendirme aşaması
 - 8.2.5. Dış ortama alıştırma (aklimatizasyon)aşaması
- 8.3. Mikroçoğaltımda Karşılaşılan Sorunlar
 - 8.3.1. Vitrifikasyon
 - 8.3.2. Toksik bileşiklerin ortamda birikmesi ve kararma
 - 8.3.3. Kontaminasyon
- 8.4. Bazı Süs Bitkilerinin Mikroçoğaltım Yöntemleri
- Kaynaklar

Bölüm 9. Germplasm Muhafazası..... . 282-323

Yavuz Emeklier

- 9.1. *Giriş*
- 9.2. Bitki Kültürlerinin *In Vitro* Muhafazası
 - 9.2.1. Yavaş (azaltılmış) büyütme ile muhafaza
 - 9.2.2. Soğukta muhafaza
 - 9.2.2.1. Dondurma işlemleri ve zararları
 - 9.2.2.2. Hücre içinde serbest suyun azalması
 - 9.2.2.3. Ondondurma yöntemi
 - 9.2.2.4. Vitrifikasyon (camlaştırma) yöntemi
 - 9.2.2.5. Hızlı soğutma ve hızlı çözündürmeyle ondondurma yönteminin kombinasyonu
 - 9.2.2.6. Hızlı ondondurma yöntemi
 - 9.2.2.7. Kurutma yöntemleri
 - 9.2.2.8. Absisik asitin fizyolojik tepkileri
 - 9.3. Kültüre Edilmiş Materyalin Soğukta Muhafazasında Örnek Kurallar
 - 9.3.1. Yavaş ondondurma kuralları
 - 9.3.2. Hızlı ondondurma kuralları
 - 9.3.3. Vitrifikasyon kuralları
 - 9.3.4. Kurutma kuralları (yapay tohumların soğukta muhafazası)
 - 9.4. Hücre Kültürlerinin Canlılığına Katkıda Bulunan Bazı Faktörler
 - 9.4.1. Gelişme dönemi
 - 9.4.2. Ötikültür
 - 9.4.3. Çözündürme sonrası işlemler ve iyileştirme
 - 9.4.4. Soğukta muhafazadan dolayı genetik değişimler ve seleksiyon
 - 9.4.5. Gelecekteki beklentiler
 - Kaynaklar

Bölüm 10. Embriyo Kültürü..... 324-344

Betül Bürün, Aynur Gürel

- 10.1. Giriş
- 10.2. Embriyo Kültürü İçin Gereksinimler
 - 10.2.1. Besin ortamı bileşimi
 - 10.2.1.1. Mineral maddeler
 - 10.2.1.2. Karbonhidrat ve osmotik basınç
 - 10.2.1.3. Aminoasit ve vitaminler
 - 10.2.1.4. Doğal bitki ekstraktları
 - 10.2.1.5. Bitki büyüme düzenleyicileri
 - 10.2.2. Kültür koşulları
- 10.3. Embriyo Kültürünün Uygulama Alanları
 - 10.3.1. Biyolojik temel çalışmalarda embriyo kültürü
 - 10.3.2. Tohumun çimlenmemesi durumunda embriyo kültürü
 - 10.3.3. İslah süresini kısaltmada embriyo kültürü
 - 10.3.4. Yaşamayan embriyoların kurtarılmasında embriyo kültürü
 - 10.3.5. Embriyo kültürü ile haploid bitkilerin üretilmesi
 - 10.3.6. Embriyo kültürü ile tohum canlılıklarının hızlı test edilmesi
 - 10.3.7. Embriyo kültürü ile ender bitkilerin çoğaltılması
- 10.4. Embriyo Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler
- 10.5. Embriyo Kültürünün Uygulanması
 - 10.5.1. Tohum dormansisinin giderilmesi
 - 10.5.2. Hibrit embriyo kurtarma
- 10.6. Embriyo Nörs Tekniği
- 10.7. Embriyo-Kallus Hibritleri
- 10.8. Sonuç
- Kaynaklar

Bölüm 11. Somaklonal Varyasyon..... 345-367

Betül Bürün

- 11.1. Giriş
- 11.2. *In Vitro* Doğal Varyasyonlar
 - 11.2.1. Somaklonal ve epigenetik varyasyon
- 11.3. Doku Kültürü Tekniklerinin Varyasyonda Etkileri
- 11.4. Somaklonal Varyasyonun Orijini
- 11.5. Somaklonal Varyasyonun Nedenleri
 - 11.5.1. Hücre organizasyonunun varyasyonda etkisi
 - 11.5.2. Doku kaynağındaki varyasyon
 - 11.5.3. DNA metilasyonu
 - 11.5.4. Nükleik asit öncüllerinin kaybı
 - 11.5.5. *In vitro* hücre bölünmesindeki anormallikler
 - 11.5.6. Bitki büyüme düzenleyicilerinin önemi
 - 11.5.7. Kültür ortamının bileşimi
 - 11.5.8. Kültürel koşullar
 - 11.5.9. Kültür süresi
 - 11.5.10. Genotipin etkisi
 - 11.5.11. Stres

11.6.	Somaklonal Varyasyonun Belirlenmesi	
31,7,	İ) Offla Wan Oİ Yajyasyondan Yararlanma „ v . y - y „ 1 Uullatututula.lci sorunlar	
11.7.2.	Bitki ıslahında somaklonal varyasyonun yararları	
11.8.	<i>In Vitro</i> Seleksiyon Uygulamaları	
11.9.	Sonuç	
	Kaynaklar	
Sözlük.. . . .		368-372
İndeks.. . . .		373-374

Önsöz (Editörler)

tarımsal üretimin tarım seyrine Dakilügmüa, *devrim* olarak adlandırılan iki önemli devre göze çarpmaktadır. Bunlardan ilki, üstün varyetelerin elde edilmesi, ticari gübreler ve ileri agronomik tekniklerin uygulanmasıyla ortaya çıkan *yeşil devrim* (green revolution), diğeri ise özellikle son 15 yılda etkisi gittikçe artan ve bitki biyoteknolojisinin uygulanmasıyla ortaya çıkan *gen devrimi* (gene revolution)'dir.

Dünya nüfusunun normal bir artış hızıyla 2000 yılında 6.2 milyara, 2025 yılında 8.3 milyara ve 2100 yılında ise 11 milyara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Yani 21. yüzyılın sonunda dünyadaki mevcut kaynakların, şu andakinin 2 katına yakın bir nüfusu beslemesi gerekecektir. Diğer taraftan, dünya genelinde kişi başına düşen tahıl ekim alanı 1950-1998 yılları arasında yaklaşık %50 oranında azalarak 2.3 dekardan 1.2 dekara düşmüştür. Birçok ülke açısından bu durum hiçbir sorun teşkil etmemiştir. Çünkü, verimdeki yeni artışlar tarım alanlarındaki azalmadan kaynaklanan açığı fazlasıyla kapatmıştır. Fakat verim artış hızında 1990 yılından bu yana azalma gözlenmektedir. Kişi başına düşen besin tüketimi sabit kalsa bile, 2025 yılına kadar dünya besin üretiminde en az %57'lik bir üretim artışı sağlanması zorunludur. İşte, bu nedenlerle verimdeki artışların tarım alanlarındaki azalmadan kaynaklanan verim kaybını karşılayıp karşılayamayacağı kuşku olduğundan, üstün teknolojilere duyulan ihtiyaç gittikçe daha çok önem kazanmaktadır.

Bitki biyoteknolojisi; çeşitli doku kültürü ve genetik mühendisliği tekniklerini kullanarak bitkilerin moleküler seviyede iyileştirilmesini amaçlamaktadır. Örneğin; bugün kültürü yapılan bir çok bitki türünün ürettiği etken maddeler laboratuvarda üretilmektedir. Yine, tarımsal önemi olan genler değişik organizmalardan izole edilerek kültür bitkilerine kolaylıkla aktarabilmektedir.

Bitkilerin, biyo teknolojik yöntemlerle iyileştirilmesinde doku kültürü yöntemlerine mutlak bir ihtiyaç vardır. Başka bir ifadeyle, doku kültürü teknikleri kullanılmadan bitkilerin genetik yolla iyileştirilmesi, an azından şimdilik, mümkün değildir. Bu nedenle, iki cilt olarak hazırlanan ve **doku kültürü ve uygulamalarının** işlendiği bu cildin; bitki ıslahçılarına, biyologlara, temel araştırmacılara, lisans ve lisansüstü öğrencilerine ve ticari olarak bitkilerin üretilmesi ile ilgili çalışanlara katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz. Ayrıca, dünyadaki büyük biyoteknoloji şirketlerinin geliştirdikleri yeni çeşit ve ürünlerin patentlerini yüksek fiyadlarla geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelere pazarladıkları bir ortamda, bu kitabın; Türkiye'de bu alandaki açığın kapatılmasına ve ileriye dönük olarak kendi bitkisel biyoteknolojimizin geliştirilmesine katkı sağlayacağı, ve **bitki genetik mühendisliği ve uygulamalarının** işlendiği ikinci cilde de bir basamak teşkil edeceği inancındayız.

Biz editörler; bu kitabın ortaya çıkmasındaki fedakarane katkılarından dolayı bütün katılımcı yazarlara, basılması için verdikleri destek ve yardımlarından dolayı Selçuk Üniversitesi Rektörü Sayın *Prof. Dr. Abdurrahman Kutlu?ya*, Rektör Yardımcısı Sayın

Prof. Dr. Behiş Coşkun'a ve Genel Sekreter Sayın Doğ Dr. Ahmet Pekeile, ve ayrıca katkılarından dolayı Monsanto Europe SA İstanbula teşekkürü bir borę biliriz.

Konja-Bolu-Ankara, Ocak 2001

***Mehmet Babaoğlu**, Selęuk Üniversitesi*

***Ekrem Gürel**, Abant İşşet Baysal Üniversitesi*

***Sebahattin Özcan**, Ankara Üniversitesi*

Önsöz (Prof. Dr. Celal ER)

İlhamıma ürim arianaan aana **yuKscK** verim ve üaüa **Kaliteli** ürün **elde** etmek fevkalade önemlidir. Bunu temin etmek için üzerinde önemle durulması gereken hususların başmda bitki ıslahı gelmektedir. Eğer bir tarif vermek gerekirse, bitki ıslahı “Bitkilerin biyolojik ve genetik açıdan disipline edilmesi ve mevcut genetik farklılıktan istifade edilerek, onları istenilen istikâmederde geliştirme sanat ve ilmidir” diyebiliriz. Bitki ıslahı sayesinde kültürü yapılan bitkilerin verim kabiliyetlerini artırmak, ürün kalitesini düzeltmek ve masrafları azaltmak için, yeni elde edilen biyolojik bilgilerin ışığı altında daima yeni yollar ve yöntemler ortaya koyma imkânı vardır. Başlangıcından günümüze kadar bitki ıslahı insanların en önemli meşguliyet ve başarı alanlarından bin olmuştur.

Bitki ıslahı konusunda uygulanan yöntemleri klâsik ve modern ıslah metodan olmak üzere ikiye ayırmak mümkündür. Klâsik ya da konvansiyonel ıslah metotlarının imkân verdiği ölçülerde bitki ıslahında ilerlemeler olmuş ve birçok üründe en üst şuurlara kadar varılmıştır. Ayrıca bu ıslah metodan ile yeni bir çeşit ortaya koymak için oldukça uzun zamana ihtiyaç vardır. Hatta bazen bu konularda başan kazanıp netice alabilmek için bir ömür boyu çalışmak gerekmektedir. Bütün bunların yanında çok büyük miktarlarda masraf yapmak da söz konusudur.

Modern ıslah metodan diye tavsif edebileceğimiz ve bu kitabın konulan olan bitki ıslahında doku kültürleri, organogenesis, somatik embriyogenesis, protoplast kültürü ve füzyonu, haploid bitki üretimi, hastalısız bitki üretimi, sekonder metabolit üretimi, mikro çoğaltma, germplazm depolanması, embriyo kültürü ve somaklonal varyasyon gibi yöntemlerin bitki ıslahında kullanılması hem zaman ve hem de uzun dönemde uygulandığı taktirde yapılacak masraflar açısmdan büyük kolaylıklar sağlayacaktır. Bu konuda pek çok araştıncı görüş birliği halindedir. Nitekim bu alanda bazı ciddi uygulamalar olmuş ve başardır neticeler alınmıştır.

Değişen çevre şardan ve hızla artan dünya nüfusu bitkisel üretimde yeni çeşit geliştirmenin ve dolayısıyla bitki ıslahı çalışmalarının önemini daha da artırmıştır. Bitki ıslahının başlangıcı insanlık tarihi kadar eskidir. İnsanoğlu yerleşik hayata geçip, kendisinin ve yakınlarının yiyecek, giyecek ve barınma ihtiyaçlarını karşıdayabilmek için yetiştirdiği ürünler arasından yüksek verime sahip olanları seçmekle bir tür ıslah yapmıştır. Ancak, dünyadaki insan nüfusu arttıkça bitkderden ve hayvanlardan daha yüksek verim almanın yolları bilimsel olarak araştırılmaya başlanmıştır. Nitekim, son 50 ydda ulaşıdan tarımsal verim artışı, modern ıslah yöntemlerinin uygun yetiştirme teknikleri de birlikte kullanılması sonucu elde edilmiştir. Buna rağmen, bir yandan dünya nüfusunun her geçen gün arttığı, öte yandan tarımda kullandan alanların son sınırına dayandığı düşünüldüğünde, verim artışlarının gelecekte de devam etmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır. Aslında yapdan araştırmalar, bugünkü verim düzeyinin hala daha potansiyel verimin altında olduğunu göstermektedir. O halde, potansiyel verim düzeyine ulaşabilmek için bitkderin genetik yapıdının değiştirilerek geliştirilmesi ve neticede iydeştirilmesi gerekmektedir. Ancak, bitkderin genetik yapıdının iydeştirilmesinde klâsik bitki ıslahı yöntemlerim kullanarak isteriden bütün özelliklerin bir genotipte toplanması son derece güçtür. Bugüne kadar uygulanan ıslah programlarında daha Çok ürün kalitesi ve miktarının artırılmasına çalışmış, kültür bitkderine hastalık ve zararlđar de olumsuz şartlara karşı dayanıklılık kazandırılması her zaman ikinci planda bırakılmıştır. Halbuki, tarımsal üretim artışım sınırlayan en önemli faktörlerden biri de hastalık ve zararlđar nedeniyle ortaya çıkan ürün kayıplarıdır. Kültür bitkileri hastalık ve zararlđara karşı

kimyasal ilaçlarla korunmaya çalışılmış, fakat kullanılan bu kimyasal ilaçların kalıntıları gerek üründe, gerekse toprak ve suda uzun süre ayrışmadan kalabildiğinden; insan, hayvan ve vre sağlığını önemli ölçüde tehdit eder konuma ulaşmıştır. Aynı zamanda, kimyasal ilaç kullanımı büyük masraflara da sebep olmaktadır. Bu nedenle, kültür bitkilerine başta hastalık ve zararlılara karşı olmak üzere, aynı zamanda uygun olamayan şartlara dayanıklılık kazandıracak yeni ışlah yöntemlerinin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Klâsik bitki ışlahının olumsuz olan bir diğer yönü de; oldukça zaman alıcı bir uğraş olmasıdır. Klâsik bitki ışlahında, doğada var olan genetik çeşitlilikten yararlanılmaktadır. Ancak, günümüzde özellikle insan beslenmesinde önemli yeri olan ürünlerde bu genetik çeşitliliğin sınırlarına yaklaşılmıştır. Klâsik bitki ışlahı yöntemlerinden beklenen başarı, üzerinde çalışılan popülasyondaki genetik çeşitlilik ile doğru orantılıdır. Dolayısıyla, popülasyonda var olan genetik çeşitliliğin ve farklılığın artırılması gerekmektedir. Bu ise, türler arasındaki uyumsuzluğın kaldırılması, bağlılık engelini açılarak yalnız istenilen genin aktarılması, mutasyonlar, protoplast füzyonu, haploid hücre ve haploid bitkilerle mümkündür. İşte, bitkilerin tarımsal özelliklerinin iyileştirilmesinde açıklamaya çalıştığımız klâsik bitki ışlahının doğasında var olan zorluklar, bitki doku kültürleri ve bitki genetik mühendisliği teknikleri kullanarak aşılabilecek durumdadır.

Ülkemiz için oldukça yeni olan ancak hızla gelişen bitki biyoteknolojisi alanında dünya ile btnleşebilmemiz için bu alanda gerekli teknik donanım ve kalifiye eleman açığının bir an önce kapatılması gerekmektedir. Ayrıca lke çapında bu konuda uzmanlaşmış insanların bir merkezden koordine edilmesiyle sonuçlan bakımından gerek ülke ve gerekse dünyaya faydalı olabilecek büyük çaplı projelerin ivedilikle hayata geçirilmesi büyük önem taşımaktadır. Konunun lkemiz için oldukça yeni olduğu dikkate alındığında, bu konuda Türkçe kaynak yetersizliği de karşımıza çıkan önemli sorunlardan biridir. Konuya olan ilgiyi artırabilmek ve geniş kitlelerin katılımlarını sağlayabilmek bakımından bu konudaki Türkçe yayın sayısının artırılması büyük bir önem arzetmektedir. Genç bilim adamlarımız tarafından büyük bir gayret ve vukfla hazırlanan bu eserin önemli bir boşluğu dolduracağı ortadadır. Bu sebeple, kitabın hazırlanmasına emek veren bilim adamlarım kutluyor ve tebrik ediyorum. Bu derecedeki olumlu bir organizasyonun, dayanışma ve yardımlaşmanın bir başlangıç olmasını ve daha sonra yapılacak büyük projelere öncülük etmesini diliyorum.

Bu kitabın, gerek lisans ve lisansüstü öğrenciler için; gerek canlı materyalle, özellikle bitki materyali ile uğraşanlara, ayrıca bütün tarım camiasına faydalı olacağına yürekte inaniyorum. Bu vesile ile bu kıymetli eseri hem edite edenleri, hem de yazarları tekrar tebrik ediyorum ve bundan sonrası için de üstün başarılar temenni ediyorum.

Ankara, Ocak 2001
Prof. Dr. Cell ER
Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi

Önsöz (Prof. Dr. Ka^im ABAK)

Türminci yüzyılın iKiinci yarısına üanıgasıı vuran ve Qala şımûüüen ftayatımıza girmeye başlayan biyoteknolojinin tıp, eczacılık, gıda, tarım, hayvancılık, veterinerlik, ormancılık, madencilik, şehircilik, su arıtımı vb gibi alanlarda yararlan ve yeni kullanım yerleri her gün artmaktadır.

Bilim ve mühendislik yöntemlerini kullanarak ve biyolojik ajanlardan yararlanarak maddelerden yeni ürünler elde etmek, ürünleri değıştirmek veya özel kullanım amaçlı mikroorganizmaları geliştirmek amacıyla kullanılan teknolojiler olarak tanımlanabilen biyoteknolojinin uygulama alanları içinde en hızlı gelişme potansiyeline sahip olanlarının başında bitki biyoteknolojisi gelmektedir. Bitkisel üretimde ve bitki kökenli değışik gıda, eczacılık ve kozmetik ürünlerinde biyoteknolojinin getirdiğı yeniliklerin Yirmibirinci Yüzyılın ilk 10 yıllık kısmında çok önemli sıçramalar yapması beklenmektedir. Şimdiden bitkisel üretimde biyoteknoloji ürünlerinin ve genetik mühendisliğı yoluyla elde edilmiş bitki çeşitlerinin alan denemeleri yapılmaya, bir kısmı da Amerika ve Avrupa ülkelerinde üretime alınmaya başlamıştır. Bu gerçeğı gören gelişmiş ülkelerde bitki biyoteknolojisi çalışmalarına büyük önem verilmekte, güçlü ekipler kurulmakta, yüksek bütçeler ayrılmakta ve konuya yönelik stratejiler ve politikalar belirlenip çalışmaların etkinliğı arttırılmaya çalışılmaktadır. Bitki biyoteknolojisi araştırmalarında özel sektör de oldukça dinamik biçimde yer almakta, hatta çoğı kez kamu kesiminden daha önde bulunabilmektedir.

Türkiye'de bitki biyoteknolojisi çalışmaları 1970'li yılların ikinci yansında başlamıştır. İlk yıllarda doğal ağırlıklı biçimde doku kültürleri üzerinde yoğunlaşmış, 1990'ların başından sonra da moleküler biyoloji ve moleküler genetik teknikleri devreye girmiştir. Başlangıçta Ankara, Çukurova ve Ege Üniversitesi Ziraat Fakülteleri ile Ortadoğı Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü, TÜBİTAK Gebze Marmara Araştırma Merkezi'nde yoğunlaşan çalışmalar daha sonra hızla genişlemiş ve yayılmıştır. Birbirinden kopuk ve bağımsız, hatta bazen habersiz de olsa yapılan bu çalışmalar en azından ülkemizde konunun altyapısının hazırlanmasına hizmet etmiştir. Bu çabalar sonucunda küçüklü büyüklü bazı laboratuvarlar kazanılmış, burada genç bilim insanları yetiştirmeye başlamış, öğrenciler eğitim almış ve bazı yayınlar yapılmıştır. Bunların ötesinde virüssüz meyve ve asma fidanı üretimi, dihaploid hatların kullanılmasıyla hastalıklara dayanımlı çeşitlerin geliştirilmesi gibi konularda biyoteknolojinin ürünleri çiftçi düzeyine de ulaşmıştır.

Son 5-6 yıl içinde TÜBİTAK, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı, Türkiye Tohum Endüstrisi Derneğı gibi kurum ve kuruluşlar, bir yandan biyoteknoloji konusunda öncelikleri belirlemek, politikaları ve stratejileri saptamak; diğeri yandan da mevcut mevzuatı biyoteknolojinin getirdiğı yeni duruma uyarlamak için çalışmalara başlamıştır.

Elimizdeki bu kitap, bitki biyoteknolojisi konusunda bulunan önemli bir açığı kapatacak niteliktedir. Gerçekten, araştırma raporları, makaleler, değeriendirme yazılan, araştırma ve inceleme bildirilerinin metinleri gibi yayınlar bulunmasma karşılık, Türkçe yazılmış kapsamlı bir bitki biyoteknolojisi kitabının yokluğu hissedilmektedir.

Bitki biyoteknolojisi ile ilgili teknikler ve çalışmalar iki ana başlık altında incelemek mümkündür: i. bitki doku kültürleri ve ii. rekombinant DNA teknikleri ya da genetik mühendisliğı. Bu kitapta da birinci ciltte bitki doku kültürleri ikinci ciltte de genetik mühendisliğı teknikleri incelenmiştir. Kitabın editörlüğünü üstlenen genç meslektaşlarımı

bu girişimleri ve gayretleri için, yazımına katılanlar da deneyimlerini böyle bir yayma aktardıkları için kutluyorum. Türkiye için bu konudaki ilk olma özelliği taşıyan kitabın, başta tarım, ormancılık ve biyoloji alanında eğitim görenler olmak üzere öğrencilere; mühendis, teknisyen, biyolog ve diğer teknik eleman meslektaşlara, konuyla ilgilenen diğer okuyuculara yararlı bir kaynak olacağına inanıyorum.

Adana, Ocak 2001

Prof. Dr. Kazım AB AK

Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi

(D^J. D T^ki YLJYYJl)*

Bitki biyoteknolojisi kısaca biyolojik bilimlerdeki gelişmelerin, teknolojiadaki gelişmeler yardımıyla uygulamaya ve ticari amaçlara yönelik olarak kullanılması şeklinde tanımlanabilir. Bitki biyoteknolojisi aslında yeni bir kavram değildir çünkü bu tanıma bakılırsa, biyo teknoloji 10 bin yıl önce yabani bitkilerin kültüre alınması ile başlamıştır. Bununla beraber, biyoteknoloji çağlar boyunca farklı şekilde uygulanmıştır. Örneğin, 1950'li yıllarda Hoagland ve Arnon "Hoagland Çözeltisini" geliştirerek bitkilerin topraksız ortamda da büyüyebileceğini göstermelerinden sonra, bu çözelti (aslında bitkiler için önemli olan 11 adet mineral tuz içermektedir) uzun yıllar su kültüründe (hidrofonik) sebze yetiştirmede kullanılmıştır. O yılların bitki biyoteknolojisi bu idi. Bugün ise, biyolojik bilimlerde ilerlemeler ve yeni buluşlar (hücre kültürü, hücre kaynaşması, genetik mühendisliği) biyoteknolojinin içeriğinin ve uygulanmasının değişmesine ve daha karmaşık bir hale gelmesine neden olmuştur. Bitki biyoteknolojisi artık farklı bilim dallarında uzmanlaşmış kişilerin ortak çalışmasını zorunlu kılan interdisipliner bir bilim dalı haline gelmiştir. Bu nedenle, ileride bitki biyoteknolojisinde uzmanlaşmayı planlayan üniversite öğrencilerinin, biyoteknolojinin çeşidi alanlarını kapsayan iyi bir temel eğitime sahip olmaları bir zorunluluktur. Bugün birçok üniversitemizde, bitki biyoteknolojisi lisans ve yüksek lisans düzeyinde açılan derslerle öğretilmektedir. Yalnız, bitki biyo teknolojisinin her alanını içeren uzmanlarca hazırlanmış bir Türkçe başvuru kitabı bulunmadığı için, yabancı dil bilmeyen öğrenciler bitki biyoteknolojisi alanında istedikleri bilgiye ulaşmakta zorluk çekmektedirler. "Bitki Biyoteknolojisi I" ve "Bitki Biyoteknolojisi II" şeklinde iki cilt olarak düzenlenen bu kitabın bu alandaki önemli bir boşluğu dolduracağına ve ilgili öğrenci ve bilim adamlarına yardımcı olacağına inanıyorum. Bu yüzden, kitabı hazırlayan ve yazılarıyla katkıda bulunan tüm meslektaşlarıma teşekkür eder, onları bu girişimlerinden dolayı kuduyorum.

Ankara, Ocak 2001

Prof. Dr. Zeki Kaya

Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Biyolojik Bilimler Bölümü

(1996 Yılı TÜBİTAK Bilim Teşvik Ödülü Sahibi)

Bölüm 1

Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri

Mehmet Babaoğlu, Mustafa Yorgancılar, Mehmet Aydın Akbudak

Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 42031 Kampüs, Konya
e-posta: mbabaoğlu@selcuk.edu.tr

1.1. Giriş

Dünya nüfusunun beslenmesinde en çok kullanılan yaklaşık 30 bitki grubu içinde en önemlileri tahıllar, baklagiller, endüstri bitkileri, sebzeler ve meyve ağaçlarıdır. Ancak buğday, çeltik, mısır ve patatesin üretim miktarlarının toplamı diğer ürünlerin toplamından daha fazladır. Bununla beraber dünya florasında yaklaşık 250 bin bitki türünün bulunduğu fakat bunlardan sadece 3000 adedinin besin değerine sahip olduğu bildirilmektedir (Babaoğlu, 1998).

Bitkilerin insan ve hayvan beslenmesinde kullanımı amacıyla iyileştirilmesi çalışmalarında iki önemli dönem göze çarpmaktadır. Bunlardan ilki 'Yeşil Devrim' (Green Revoludon) olarak adlandırılan, klasik bitki ıslahı, ticari gübreler ve diğer agronomik tekniklerin gelişiminin etkili olduğu dönemdir. Yeşil devrimde üretim, tohum-bitki-tohum döngüsünde gerçekleştirilir. İkinci dönem ise 'Gen Devrimi' (Gene Revoludon) olarak adlandırılmaktadır (Kung, 1993). DNA'nın yapısının anlaşılması (Tablo 1.1), bakteri genetiği, bitki doku kültürünün gelişimi ve bu tekniklerin birçok bitkiye uygulanabilir olması gen devrimi döneminin başlamasını hazırlamıştır. Yeşil devrim ile karşılaştırıldığında gen devriminde hedefe ulaşma bakımından bir tümevarım söz konusudur. Yani, baz - nükleotid - gen — kromozom (çekirdekte), ribozom — amino asit — protein — kloroplast — mitokondri (sitoplazmada), hücre — doku — organ — bitki ve tohum zincirinin her parçası

Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (2001) Bitki Biyoteknolojisi I - Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi

amaca ulaşmada ayrı ayrı veya birlikte değerlendirilerek üzerinde değişiklikler yapılabilmektedir. Bunlar arasında hücreye kadar olan konular genellikle bitki genetik mühendisliğinin, hücre-tohum arası konular ise bitki doku kültürünün ilgi alanlarıdır. Görüldüğü gibi bitki doku kültürü, bitki genetik mühendisliği ile birlikte bitki biyoteknolojisini oluşturan ana unsurlardan birisidir.

Bitki doku kültürü; aseptik şardarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=ekspant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolider gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır.

Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki re jenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibarıyla üç kısımda incelenebilir; 1) organize olmuş meristematik hücreleri ihtiva eden somatik dokulardan rejenerasyon, 2) meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon ve 3) mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon. Birinci tip rejenerasyonda uç ve yan meristemlerden bitkiler çoğaltılır. Buna meristem kültürü yoluyla klonal çoğaltım denilir. Elde edilen hücreler tamamen donör (verici) bitkiye benzerler. İkinci tip rejenerasyon; doğrudan bir bitki eksplantının kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının genellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin (özellikle oksin ve sitokinler) etkisi sonucu bölünerek ve organize olarak, organları ve daha sonra da bitkiyi (direkt organogenesis) veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyo ve daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturması (direkt somatik embriyogenesis) şeklinde olabilir. Ayrıca her iki durum, belirli bir kallus, proto-kallus veya hücre süspansiyonu oluşumu devresinden sonra da ortaya çıkabilir (indirekt rejenerasyon). Ortaya çıkan bitkilerde bazı kalıtsal veya geçici varyasyonlar oluşabilir. Son olarak normal kromozom sayısının yansıyı ihtiva eden hücrelerden de direkt veya dolaylı yollarla bitki rejenerasyonu olabilir. Bu durumda donör bitkinin kromozom sayısının yansıına sahip, genellikle steril olan haploid bitkiler elde edilebilir.

1.2. Bitki Doku Kültürlerinin Tarihi Gelişimi ve Uygulama Alanları

Bitki doku kültürlerinin gelişiminde etkili olan önemli çalışmalar Tablo 1.Tde verilmiştir. İlk topraksız üretim şekli olan hidrofoniğerler (sulu çözeltiler içinde bitkilerin topraksız ortamlarda yetiştirilmesi), tüm bir bitkinin laboratuvarıda tam olarak formüle edilmiş besin ortamlarında yetiştirilebilmesi düşüncesini ve daha sonra da bitki organlarının benzer şekilde kültüre alınabilmesi fikrini doğurmuştur (Chrispeels ve Sadava, 1994). Bu yolda en önemli adımlardan birisi besin

ortamlarının geliştirilmesi ve tamamen aseptik şartlarda doku kültüründe **Maltadır. Ayrıca zaman içinde organ ve doku gibi daha** büyük parçalardan tek nucle **Kültürüne** üoöru çalışmaların yoneldiği görölmektedir. Bunun sonucunda, 1983 yılında bitkilere ilk gen transferi gerçekteşmiştir (Tablo 1.1). Bu transferin gerçekteştirilmesinde doku kültürünün kullanılması gerekli olmuştur. Günümüzde bitki doku kültürleri bir çok alanda uygulanmaktadır. Bunlar maddeler halinde kısaca aşağıda verilmiştir.

Tablo 1.1. Bitki doku kültüründe önemli çalışmalar (Pierik, 1993; Kung, 1993; Endress, 1994).

Tarih	Çalışmalar	Araştırıcılar
1902	İlk izole edilmiş hücrelerin kültürü	Haberlandt
1904	Olgun embriyoların kültürü	Hanning
1917	Biyoteknoloji teriminin ilk defa kullanımı	Kari Ereky
1920	Oksinin tanımlanması	Went <i>ve ark.</i>
1922	Kök ve sürgün uçlarının laboratuvarıda çoğaltımı	Kotte ve Robbins
1924	İlk embriyo kurtarma tekniği (mısıır)	Dieterich
1934	İlk sürekli kök kültürleri (domates)	White
1934	İlk kallus kültürleri	Gautheret
1942	İlk kallus kültürlerinden sekonder metabolit eldesi	Gautheret
1946	Sürgün uçlarından (apikal meristem) ilk bitki eldesi	Ball
1953	DNA'nın yapısının belirlenmesi	Watson ve Crick
1954	Hücre süspansiyonlarından ilk bitki eldesi	Muir <i>ve ark.</i>
1957	İlk sitokininin tanımlanması ve organ oluşumunda sitokinin/oksin oranının öneminin ortaya konulması	Skoog ve Miller
1958	ilk somatik embriyogenesis (havuç)	Steward <i>ve ark.</i>
1960	Enzimler kullanılarak ilk canlı protoplast izolasyonu	Cocking
1962	MS besin ortamının geliştirilmesi	Murashige ve Skoog
1965	Tek hücrenden bitki rejenerasyonu	Vasil ve Hilderbrandt
1967	İlk haploid bitkinin üretimi (anter polen kültürü)	Bourgin ve Nitsch
1968	B5 ortamının geliştirilmesi	Gamborg <i>ve ark.</i>
1970	HEPA filtrelerin kullanılmaya başlanması	
1971	Protoplastlardan ilk bitki rejenerasyonu	Nagata ve Takabe
1978	Cinsler arası ilk somatik melezleme	Melchers <i>ve ark.</i>
1983	Transgenik ilk bitkinin elde edilmesi (tütün)	Murai <i>ve ark.</i>
1986	Transgenik ilk bitkinin tarla testleri (tütün)	
1990	Sentetik tohum geliştirme ve hızlı dondurma yoluyla germp plazm muhafazası çalışmalarının başlanması	-
1995	İlk rekombinant insan gıdası	(Flavr Savr, domates)

1.2.1. Bitki doku kültürlerinin bitki ıslahındaki uygulama alanları

Türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü: Zigot oluşumundan sonra ortaya çıkan (post-zigotik) uyuşmazlıklar *in vivo* melezlemelerde embriyo oluşumunu veya oluşan embriyoların yaşamalarını engellemektedir. Bu embriyolar özel besin ortamlarında doku kültürü ile geliştirilmekte ve yeni melez bitkiler elde edilebilmektedir. Bu tekniğe embriyo kurtarma tekniği denilmektedir (bkz. Bölüm 10).

Haploid bitki üretiminde anter (polen) ve yumurtalık (övül) kültürü: Özellikle kendine döllen bitkilerde yapılan klasik bitki ıslahı melezlemeleri sonrası, hatların saflaştırılması (homozigotlaşması) uzun zaman almaktadır. Mayoz bölünme geçirmiş haploid sayıda kromozoma sahip hücrelerde (polen/mikrospor veya megaspor) veya bu hücreleri ihtiva eden bitki kısımlarının (anter veya yumurtalık) doku kültürü yoluyla elde edilen hücrelerinde veya re j ener an darında yapılan kromozom katlanması sonucu %100 homozigot bitkiler elde edilebilmektedir. Bu tekniğe *in vitro* haploidi tekniği denir (Maheswari ve ark., 1995) (bkz. Bölüm 5).

Somaklonal varyasyon: Kallus oluşturan veya totipotent olup yeni bitkiler meydana getirebilen hücreler uzun süreli kültürlerde veya kısa süreli de olsa yüksek bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda bu yeteneklerini (kompotens) yitirebilmektedirler. Bu hücrelerden oluşan yeni bitkilerde gen veya kromozom bozuklukları sonucu kalıtsal ve fenotipik varyasyonlar (somaklonal varyasyon) ortaya çıkmaktadır. Bu varyasyonlar, yeni çeşit geliştirme ve iyileştirmelerde ıslahçılar tarafından kullanılmaktadır (Chrispeels ve Sadava, 1994). Somaklonal varyasyon sonucu ortaya çıkan değişiklikler arasında, bazı pigmentlerin yapısındaki farklılaşmalar sonucu çiçek renginin, yaprak ve çiçek morfolojisinin, tohum veriminin, bitki canlılığı ve iriliğinin, uçucu yağ kompozisyonu ve hastalıklara tolerans veya dayanıklılığın değişmesi sayılabilir (Brown ve Thorpe, 1995) (bkz. Bölüm 11).

In vitro seleksiyon: Tek hücre seviyesinde; tuz, herbisitler, patojenler vb. faktörlere karşı dayanıklılığa göre yapılan seleksiyonlar sonucu, bu hücrelerden elde edilen bitkilerde ilgili faktörlere dayanıklı veya toleranslı bitkiler ortaya çıkabilir. Bu tekniğe *in vitro* seleksiyon denilmektedir.

In vitro döllenme: Bazı durumlarda (özellikle dış ortama alış tınlamayan bitkilerden tohum almak için) doku kültürü ile elde edilen bitkiler laboratuvar şartlarında tozlaştırılmaktadır. Fakat bu uygulama çok sınırlı kalmıştır.

In vitro germplazm muhafazası: Totipotent hücrelerin *in vitro* kültürü, kallus veya süspansiyon hücreleri şeklinde uzun süreli olarak veya belirli aralıklarla yeniden oluşturularak saklanabilir ve ihtiyaç duyulduğunda bu hücrelerden yeni bitkiler oluşturulabilir. Alternatif olarak ilgili hücreler, meristemler veya elde edilen minyatür bitkiler düşük sıcaklıkta (4 °C), çok az besin maddesine ve alana ihtiyaç göstererek aseptik şartlarda saklanabilir (1-4 yıl). **Benzer şekilde çok düşük**

sıcaklıklarda —196 °C), sıvı azot içinde doku ve hücreler hızlı bir şekilde dondurulup naklmhilirler. Bu doku kùltürü teknikleri *in vitro* germplazm muhafazasında önemlidir ve gen ve tohum bankalarına alternatif oluşturmaktadır (Brown ve Thorpe, 1995) (bkz. Bölüm 9).

Somatik hücre melezlemesi (protoplast fùzyonu): Pro toplaş t fùzyonu ve somatik melezleme, pre-zigotik eşeysel uyumsuzluklar nedeniyle, klasik melezleme ile elde edilemeyen hibritlerin elde edilmesinde kimyasal ve fiziksel metotlar kullanılarak uygulanan bir tekniktir. Elde edilen somatik melez hücreden (heterokaryon), kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu yoluyla yeni bitkilerin elde edilmesi sistemin en önemli ve en gerekli parçasıdır. Bu işlem genel anlamda genetik kopyalamadır ve bitkilerde yaklaşık 30 yıldan beri uygulanmakta olup en başarılı örneği tütün bitkisinde gör÷lm÷ştür (Ochatt ve Power, 1992) (bkz. Bölüm 4).

Gen transferi: Doku kùltürlerinin bitkileri iyileştirmede en önemli ve yaygın olarak kullanılan uygulamalarından birisi de, gen veya genlerin bitkilere aktarılmasıdır. Bunun için mutlaka tekrarlanabilir bir hücre-bitki rejenerasyonu (organogenesis ve somatik embriyogenesis) sistemine ihtiyaç vardır (bkz. Bölüm 2, 3 ve 4).

1.2.2. Bitki doku kùltürünün ticari ve ıslah dışı uygulamaları

Hastahksız bitki elde edilmesinde meristem kùltürü: Tüm apikal meristem veya buradan alınan küçük embriyonik parçalar kùltüre alınarak uygulanan tekniğe meristem kùltürü denir. Çok az miktarlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edildiğinde uç ve yan meristemlerden birçok yeni bitkicikler elde edilebilmektedir. Bu metotla elde edilen bitkiler her bakımdan birbirinin benzeridirler (bkz. Bölüm 6).

Mikroçoğaltım: Organize meristemlerden, henüz olgunlaşmamış veya olgunlaşmasını tamamlamış somatik hücrelerden direkt (organogenesis veya somatik embriyogenesis) veya indirekt (kallus, protoplast vb.) yollarla bitkilerin çoğaltılması ve köklendirilmesi işlemine genel olarak mikroçoğaltım denilmektedir. ABD'de doku kùltürünün ticari uygulaması 1970' de başlamış (orkidelerde ve süs bitkilerinde) ve bu yolla elde edilen ürünlerin pazar değeri bu gün yılda 15 milyar dolara ulaşmıştır. Daha az sürgün elde edilmesine rağmen uç ve yan meristemlerden kitle çoğal tım ticari olarak diğerlerinden daha fazla kullanılan bir metottur (Brown ve Thorpe, 1995) (bkz. Bölüm 8).

Sentetik tohum üretimi (somatik embriyolar): Somatik embriyoların çeşitli metotlarla kaplanması sonucu sentetik (yapay) tohumlar elde edilmektedir¹. Sentetik tohumların, hibritlerin somatik çoğaltımında, erkısır ve ebeveyn hatların muhafazasında ve odunsu bitkilerin elit genotiplerinin elde tutulmasında kullanımı konusunda oldukça fazla çalışma yapılmaktadır (bkz. Bölüm 3).

Sekonder metabolit üretimi (kallus-hücre süspansiyonları): *In vitro* hücre kültürleri sekonder metabolit üretiminde de önemli bir kaynak olarak görülmektedir. Bitki sekonder metabolitleri, bitki büyüme ve gelişmesinde doğrudan kullanılmayan maddelerdir. Işık mikroskobu ile görülebilen sekonder metabolitlerin (tanenler, antosiyaninler, karetenoitler) yanında UV ışığı ile görülebilenleri (alkaloitler) de vardır. Son yıllarda sekonder metabolit üretimi için ot verimi yüksek, çok yıllık, geniş adaptasyon kabiliyetine sahip ve azotlu gübre kullanımı oldukça az olan yonca, alternatif bir bitki olarak gösterilmektedir. İlgili enzim alındıktan sonra yoncanın geriye kalan kısmı ot olarak kullanılabilir (Austin, 1997) (bkz. Bölüm 7).

Kimeralar: Doku kültüründe, özellikle süs bitkilerinde üzerinde önemle durulan konulardan birisi de kimeralardır. Kimerik bitkiler; farklı türlerin protoplastlarının karışık kültürü ve bitki rejenerasyonu, mutasyon uygulamaları sonucu bitki rejenerasyonu çalışmaları, apikal meristemle ilgili yapılan mikro-cerrahi çalışmaları ve gen transferi yapılması sırasında, bir bitkiyi oluşturan bütün hücrelerin ilgili gen veya genleri taşıması durumlarında (özellikle partikül bombardımanı metodu ve apikal meristemler kullanıldığında) elde edilebilmektedir.

1.2.3. Bitki doku kültürlerinin temel araştırmalardaki uygulamaları

Doku kültürü, protoplast izolasyonu ve füzyonu, hücre, doku ve bitki beslenmesi, sitogenetik çalışmalar, morfogenezis çalışmaları ve biyolojik azot fiksasyonu gibi temel araştırmalarda da kullanılmaktadır. Bu tür araştırmalar genellikle sistem geliştirmede faydalı olmaktadır.

1.3. Temel Teknikler

Doku kültürü işlemleri bir çok aşamadan oluşmaktadır. Bunlar: 1) Uygun bir laboratuvar düzeninin kurulması, 2) Kullanılacak bitki parçalarının (eksplant) ve besin ortamlarının seçimi, hazırlanması ve sterilizasyonu, 3) Kallus ve hücre süspansiyonlarının oluşturulması, 4) Kallus veya hücre süspansiyonlarından veya doğrudan somatik veya gametik hücrelerden bitki rejenerasyonunun uyarılması (organogenesis, somatik embriyogenesis veya meristem çoğaltımı yoluyla), 5) Oluşan sürgünlerin çoğaltılması ve boylarının uzatılması, somatik embriyoların olgunlaştırılması, 6) Uzayan sürgünlerin köklendirilmesi, 7) Köklenen bitkilerin dış ortama alıştırılması (aklimatizasyon). Bunlar arasında en önemlisi, uygun laboratuvar imkanlarının sağlanmasıdır. Aşağıda verilen bilgilere ilave olarak doku kültürü teknikleri ve uygulaması, besin ortamları gibi konularda detaylı bilgiler Smith (1992), George (1993), Gamborg ve Phillips (1995), Sigma Plant Culture (1994), Sigma Celi Culture (1995) ve Sigma (1998) kataloglarından elde edilebilir. Sigma Plant Culture Kataloğunda özel olarak, bir bitki doku kültürü laboratuvarında kullanılabilecek malzeme ve kimyasal maddeler verilmiştir.

1.3.1. Laboratuvar düzeni

Genel bir laboratuvar düzeni Şekil 1.1'de verilmiştir. Bu düzen farklı şartlara göre değıştirilebilir. Laboratuvarın büyüklüğü ve yeri konusunda yapılacak dikkatli ve özenli bir planlama, ileriki aşamalarda bir çok sorunu önceden çözmek demektir. Ayrıca kurulmuş diğeri laboratuvarları önceden incelemek çok faydalı olabilir. Düzenli olarak kurulan bir laboratuvar da hem aseptik şartlar sağlanabilecek hem de yüksek standartta bir çalışma yapılabilecektir.

Büyük bir doku kùltürü laboratuvarı öncelikle bağımsız bir binada kurulmalıdır. Çünkü bir laboratuvar da en önemli konu aseptik şartların sağlanmasıdır. Bu yolla çevre kaynaklı kirlenmeler ilk aşamada önlenir. Prefabrik binalar genellikle ucuz maliyetlidir. Aynı zamanda yapımı da çok pratiktir. Bununla beraber; kimyasal madde üreten tesisler, tersaneler, araba parkları, garajlar, toprak döküm ve açık toprak alanları (çim ve asfalt olmayan yerler) yakınına laboratuvar kurmak uygun değildir. Laboratuvarın çatısı sağlam olmalı ve duvarları betondan yapılmalıdır. Yine tavan ve duvarlar izole edilmelidir (sıcak-soğuk yalıtımlı, su geçirmez). Pencereler çift camlı olmalı ve laboratuvarın iç yüzeyi mümkünse fayans veya özel yanmaz materyalle kaplanmalıdır. Isıtma sistemi 20-30 °C arasında ayarlanabilir olmalıdır (klima sistemi). İyi bir temiz ve atık su tesisatı, lavabo sistemi olmalıdır. Elektrik tesisatı topraklı olmalı, kablolar duvara gömülmeli ve mümkün olduğunca fazla sayıda priz bulunmalıdır. Temizlik, bir laboratuvar da en önemli konudur. Bir çok laboratuvar da kontaminasyon kaynaklı doku kùltürleri kaybı %1-50 arasında değişmektedir. Rutin temizlik ve aseptik işlemler bu kayıpları minimuma indirebilir.

Şekil 1.1'de verilen 4 ve 5 no'lu birimler birleştirilebilir. Fakat 7 no'lu oda başarılı steril bir çalışma için ayrı olmalıdır. Ayrıca 8 ve 9 no'lu birimler de birlikte düşünülebilir. En önemli bölüm steril transfer işlemlerinin yapıldığı kısımdır.

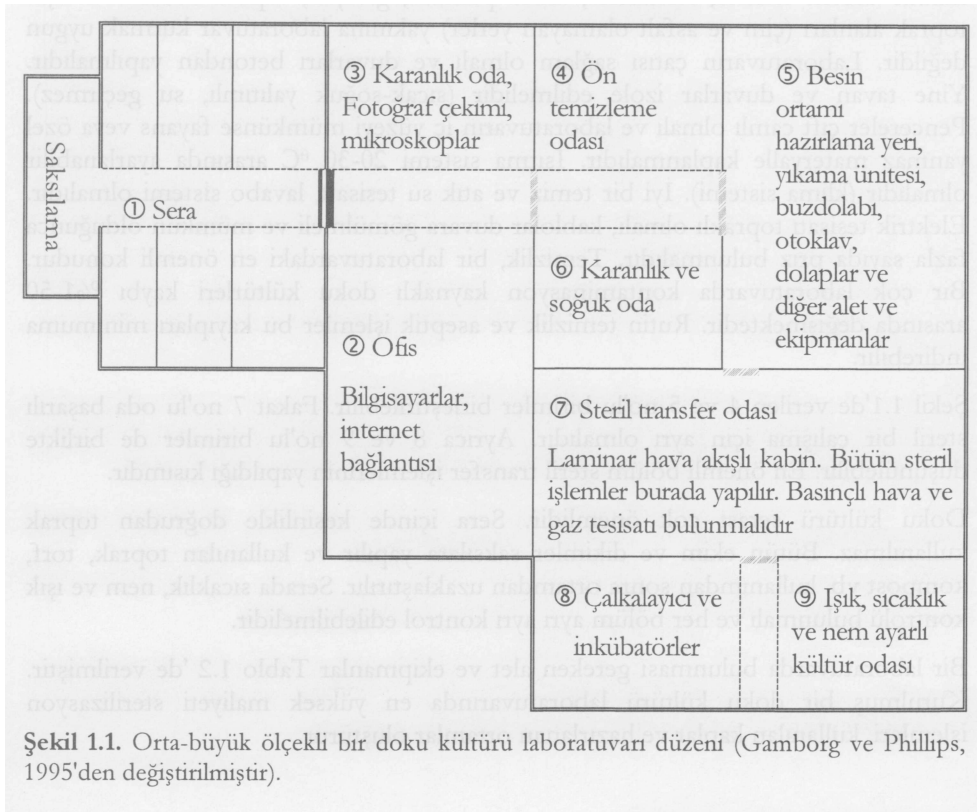
Doku kùltürü serası çok önemlidir. Sera içinde kesinlikle doğrudan toprak kullanılmaz. Bütün ekim ve dikimler saksılara yapılır ve kullanılan toprak, torf, kompost vb. kullanımdan sonra ortamdaki uzaklaştırılır. Serada sıcaklık, nem ve ışık kontrolü bulunmalı ve her bölüm ayrı ayrı kontrol edilebilmelidir.

Bir laboratuvar da bulunması gereken alet ve ekipmanlar Tablo 1.2 'de verilmiştir. Kurulmuş bir doku kùltürü laboratuvarında en yüksek maliyeti sterilizasyon işlemleri, kullanılan kaplar ve hazırlanan ortamlar oluşturur.

1.3.2. Sterilizasyon teknikleri

In vitro (laboratuvar da ve steril şartlarda) doku kùltüründe en önemli nokta sterilizasyon işlemleridir. Bakteriler en yaygın kontaminasyon kaynağıdır. En çok raslananlar, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterobacter* ve *Xanthomonas* bakterileridir. Bu tür mikroorganizmalar bitki

materyalleriyle gelirler ve iyi yüzey sterilizasyonu yapılmadığı müddetçe problem olurlar. Besin ortamının üzerinde veya içinde beyaz, krem, pembe veya sarı renkte genellikle şeffaf koloniler halinde ortaya çıkarlar. Ayrıca bakteri sporları %70-90 alkolde yaşamlarını sürdürebilirler. Funguslar, eksplantla gelebileceği gibi, kültür sonrası hava kaynaklı olabilirler veya afidler tarafından bulaştırılabilirler. Değişik renkte (beyaz, gri, mavi) ve lifli (misel) görünümde olup genellikle besin ortamının ve kültürlerin üzerini ağ gibi sararlar. Virüsler ve mikoplazma türü organizmalar kolaylıkla tespit edilemezler. Bu nedenle en tehlikeli olanlarıdır. Çünkü tespit edilemeden kültürden kültüre geçebilirler ve çok uzun süreli bir çalışma boşa gidebilir. Akut bakteriyel veya fungal kontaminandlar kültürden birkaç gün sonra ortaya çıkarlar. Bazıları kültürün daha sonraki aşamalarında da ortaya çıkabilir. Bu nedenle sterilizasyon işlemi bütün laboratuvar düzeyinde ele alınmalıdır.



Tablo 1.2. Bir laboratuvarda bulunması gerekli olan imkanlar (Smith, 1992; Gamburg ve ~"-I ' >

- Alev lambası
- Alüminyum folyo
- Ambalaj filmi (naylon)
- Analitik elektronik terazi
- Aspiratör
- Basınçlı hava kompresörü veya kaynağı
- Beherler (250 mİ, 500 mİ, 1 litre, 2 litre, 5 litre)
- Bisturi
- Buhar banyosu (100 °C ye kadar ayarlanabilen)
- Buzdolabı (derin donduruculu)
- Cam kavanozlar (cam şişe), muhtelif reçel ve konserve kavanozları (100, 150, 200, 500 mİ)
- Dereceli silindirler (20 mİ, 50 mİ, 100 mİ, 200 mİ, 500 mİ, 1 litre, 2 litre)
- Dolaplar
- Erlenler (100, 250 mİ, 1, 2, 4 litre kapasiteli en az bir tanesi ölçülü ağızlı)
- Etüv
- Fayanslar (10x10, 15x15 cm, en az 20 adet)
- Filtre sterilizasyonu için filtre üniteleri
- Flöre san ışığı (serin-beyaz) ile aydınlatılan ve sıcaklığı ayarlanabilen kültür odası
- Fotoğraf filmi (siyah-beyaz ve renkli, slayt »Çin)
- Gaz kaynağı (doğal gaz)
- Isıtıcı manyetik karıştırıcı
- Kağıt havlular
- Kauçuk eldivenler
- Laminar hava akışlı kabin (HEPA filtreli)
- Mikrodalga fırın
- Mikro pipetler (Gilson vb.) 1-5 JLÜ, 5-20 jul, 20-50 jul, 50-200 JLÜ, 200-1000 JLÜ arası ayarlanabilen çeşitli hassasiyette.
- Mikroskoplar (stereo; büyütme ve ışık kaynaklı)
- Otoklav, basınçlı pişirici ve otoklav eldivenleri
- Otomatik pipet
- Pastör pipetler (arkası pamuklu, 15-23 mm uzunluğunda)
- Pensler (4, 7, 8 inç) ikişer adet
- Petri kaplan (5, 7, 9, 14 cm cam veya tek kullanımlık plastik)
- pPI metre
- Pipet doldurucu
- Pipet memeleri
- Pipet pompası (20 mİ, mekanik veya otomatik)
- Pipet yıkayıcı
- Pipetler (1, 5, 10 mİ, tek kullanım için veya cam)
- Plastik fide dikim kaplan
- Raflar
- Raklar
- Saf alkol
- Saf su ünitesi (su demineralizasyon ünitesi tercih edilmelidir).
- Çalkalayıcı (yatay-horizantal)
- Santrifüj (makro-mikro)
- Sprey şişesi ve şişeler
- Test tüpleri (25 x 100 mm)
- Tripod
- Vaküm pompası

Sterilizasyon, sterilize edilecek yer ve materyale göre 3 kısımda değerlendirilebilir: 1) Çalışma alanının sterilizasyonu, 2) Kullanılacak alet, ekipman, kapların ve besin ortamlarının sterilizasyonu (ısı ile bozulabilenler, ısı ile bozulmayanlar) ve 3) Bitki materyallerinin sterilizasyonu.

I.3.2.1. Çalışma ortamının sterilizasyonu

Steril çalışma alanında kullanılacak yüzeyler (steril kabin içi) kullanımdan en az 10-15 dakika önce %10'luk ticari sodyum hipoklorit solüsyonu (%5 NaOCI içeren) veya %70'lik alkolle silinir. Maliyeti daha düşük olduğundan bu tür işlemlerde metil alkol kullanılabilir fakat zararlıdır. Eğer kabin içinde bir UV lambası varsa açılır. Fakat bu sırada kabin içinde hiçbir iş yapılmaz ve canlı bitki materyali bulundurulmaz. Kullanılacak aletler (bisturi, pens vb.) kullanımdan önce etil veya metil alkol içine batırıldıktan sonra alev lambasına tutularak alevle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulur. Bu durumda çok dikkatli olmak gerekir. Eksplantların kesiminin Petri kutuları içinde yapılması sağlıklı sonuçlar vermeyebilir. Bu iş için alüminyum folyo içine sarılarak otoklav edilmiş 10x10, 15x15 cm ebadındaki fayansların kullanılması daha sağlıklı sonuç verebilir. Fayanslar kabin içinde, yüzeyine dokunulmadan açılır ve aleve tutularak sterilize edilen aleülerle üzerine konulan eksplandlar kesilerek kültüre alınırlar. Geriye kalan parçalar tekrar folyo içine sarılarak uzaklaştırılır ve otoklavdan sonra fayanslar yıkanarak tekrar kullanılır. Fayanslar her bakımdan temizdir, sert bir destek verir ve daha az maliyetlidir. Kültür kapları (örnek: cam kavanozlar) açıldıktan sonra boğazları ve ağız kısımları aleve tutulmalıdır. Bu işlem kapların ağız kısımlarından kaynaklanabilecek kontaminasyonu engelleyecektir.

I.3.2.2. Besin ortamlarının, alet ve ekipmanların sterilizasyonu

Besin ortamları, alet ve ekipmanlar 3 şekilde sterilize edilebilirler: 1) Otoklav ve buhar (sıcak hava) sterilizasyonu, 2) Filtre sterilizasyonu, 3) Mikrodalga sterilizasyonu. Bir diğer yöntem ise etilen oksit ile yapılan gaz sterilizasyonudur. Bu yöntem otoklava alternatif olabilmekte, daha pahalıya mal olmakta fakat otoklav ile sterilize edilemeyen plastik kaplar ve santrifüj şişelerinin sterilizasyonu için uygulanabilmektedir.

Otoklav ve sıcak hava sterilizasyonu: Besin ortamlarının sterilizasyonu için standart bir işlem olarak otoklavda 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'de tutulması gerekmektedir (Hatipoğlu, 1993). Bununla birlikte bu değerler sabit bir hacim için yeterli olup değişik hacimlerdeki ortamların sterilizasyon süreleri Tablo 1.3* de verilmiştir. Bazı maddeleri içeren kapların sterilizasyonunda (örnek: glikoz) sıcaklık kademeli olarak artırılmalıdır. Bu durumlarda 116 °C'de 30 dakika başarılı **Sonuçlar** verir. 300 ml'den daha fazla **besin ortamı içeren şişelerin kapakları gevşek** tutulmalıdır. Otoklav sonrası kapaklar hemen sıkıştırılmalıdır. Butun oftamki⁴

otoklav edildikten sonra 1-2 saat dışarıda bekletilmeli ve soğutulduktan sonra (kap içinde yoğunlaşma önlenir) kullanılıncaya kadar kapalı (karanlık) dolaplarda saklanmalıdır.

Tablo 1.3. Çeşitli hacimlerde ortam içeren kapları otoklavda sterilize etmek için gerekli minimum süreler (George, 1993; Hatipoğlu, 1993).

Ortam hacmi (ml)	121 °C sıcaklığa ulaşma zamanı (dakika)	Minimum sterilizasyon süresi (dakika)
20-25	9	24
50	11	26
100	13.5	28.5
250	16.5	31.5
500	20	35
1000	25	40
2000	33	48
4000	48	63

Sterilize edilecek tüm ekipmanlar otoklav veya sıcak hava fırınında (etüv) sterilize edilebilirler. Aleder ve boş kaplar ise otoklava dayanıklı poşetler (otoklav poşeti) içine konulduktan ve ağızları kapatılıp, otoklav bandı ile yapıştırıldıktan sonra sterilize edilirler. Özel otoklav bantları sterilizasyon sonrası renk değiştirir. Bu, içerisinde bulunan kapların veya ortamın sterilize edilip edilmediğinin en iyi göstergesidir ve muhtemel karışıklıkları önler.

Hemen bozulabilen maddeleri (hormonlar, vitaminler vb.) içermeyen ortamlar en geç 3-4 ay içerisinde, diğerleri ise duruma göre en kısa zamanda kullanılmalıdır. Sterilitenin hala korunduğundan emin olmanın en pratik yolu, ortam kullanılacağı zaman kapak gevşetilirken basınçlı hava çıkışının hissedilmesiyle olur. Eğer kapaklar gevşek ise kullanımdan önce ağızları mutlaka aleve tutulmalıdır.

Erlenler, pipeder (cam) ve diğer kuru materyaller ağızları alüminyum folyo ile kapatılarak veya uygun metal konteynerler içine konularak bir sıcak hava fırınında (etüv) 1-4 saat süreyle 200 °C'de tutularak sterilize edilebilirler. Normal plastik malzemeler kesinlikle otoklavda veya fırında sterilize edilmezler.

Filtre sterilizasyonu: Filtre sterilizasyonu sıvı ortamlar ve ısı ile bozulabilen maddelerin stok solüsyonları için uygulanır. Genel olarak 0.22 µm poroziteli selüloz nitrat filtrelerden mikoplazma (en küçük bakteri) ve *Pseudomona diminuta* (0.1 µm) hariç hiçbir bakteri veya fungal sporların geçemeyeceği kabul edilmektedir. Fakat bu organizmalara diğerlerine göre çok daha az rasdanmaktadır.

Filtre sterilizasyonu için çeşitli sistemler kurulabilir. İki litre kapasiteli çelikten yapılmış silindirler, 250 mFlik plastik Sartorius filtreler ve tek kullanımlık selüloz nitrattan yapılmış membran filtreler (Whatmann, Millipore, Fisher, Titan)

kullanılabilir. İlk iki sistem basınçlı hava kullanılarak daha önceden sterilize edilmiş ve uygun membran takılmış filtre ile steril transfer kabini içinde besin ortamını süzme esasına dayalıdır. Son sistemde filtre, enjektör (5-50 mİ) ucuna takılır ve ortam steril plastik veya cam şişeler içine süzülür. Bazı durumlarda hindistan cevizi sütü de filtre ile sterilize edilebilir. Bu durumda sıvı önce 0.45 µm, daha sonra 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edilmelidir. Filtre ile sterilize edilen besin ortamlarını herhangi bir kontaminasyon riskinden korumak için bu ortamlar en az 4-5 gün dolapta tutulduktan sonra kullanılmalıdır. Filtre ile sterilize edilen ortamları kullanarak katı ortamlar yapılmak isteniyorsa, sıvı ortamlar çift yoğunlukta (double-strength) hazırlanırlar, yine çift yoğunlukta hazırlanmış ve otoklav edilmiş agar ile kabin içinde karıştırılarak normal yoğunluğa getirilebilirler.

Mikrodalga sterilizasyonu: Doku kültüründe kullanılacak malzemelerin ve besin ortamlarının sterilizasyonunda yoğun olarak kullanılan otoklav ve filtre sterilizasyonuna alternatif bir diğer yöntem de mikrodalga sterilizasyonudur (Tisserat ve ark., 1992). Çünkü özellikle filtre sterilizasyonu pahalı ve az miktarda ortam için uygun olmakta, otoklav ile sterilizasyon ise uzun zaman almakta ve sterilize edilecek malzemelere zarar verebilmektedir. Tisserat ve ark. (1992), 700 W gücünde bir ev mikrodalga fırını kullanarak %3 sakkaroz içeren 100 mİ besin ortamının 5 dakikada, 250 mİ ortamın 10 dakikada ve 1 litre ortamın da 15 dakikada başarıyla sterilize edilebileceğini bildirmişlerdir. Aynı şekilde 50 mİ agar içeren ortamlar da 15 dakikada başarıyla sterilize edilmiştir.

I.3.2.3. Bitki materyallerinin yüzey sterilizasyonu

Doku kültüründe en uygun eksplant kaynağını, daha önceden sterilize edilmiş tohumlardan elde edilen aseptik fideler oluşturur. Çünkü bu şekilde elde edilen fidelerin sterilizasyona ihtiyacı olmamakta ve yüzey sterilizasyonu işleminin zararlı etkilerinden sakınılmaktadır. Eğer böyle bir şans yoksa, dış şartlardan (tarla, sera vb.) alınan eksplantlar (tohum, yumru, yaprak, gövde, sürgün ucu vb.) öncelikle musluk suyu altında en az yarım saat tutulurlar. Tohum ve yumru gibi daha kaba parçalar 1-20 saniye alkol içinde tutulduktan sonra gerçek yüzey sterilizasyonu ortamına konulur. Yüzey sterilizasyonu doku kültürü işlemleri arasında en önemli aşamalardan biridir. Yüzey siterilizasyonu için en fazla kullanılan maddeler etil alkol, sodyum veya kalsiyum hipoklorit, civa klorür, gümüş nitrat ve hidrojen peroksittir. Kullanılacak bitki parçasına göre değişen çeşitli işlemler Tablo 1.4'te verilmiştir. Ayrıca siterilizasyon amacıyla biyosider de kullanılabilir.

Tablo 1.4. Kullanılan bitki parçalarına göre farklı yüzey siterilizasyonu şekilleri.

Eksplant	Ön sterilizasyon	Sterilizasyon
Tohum	10 saniye saf alkolde muamele ve steril su ile durulama	20-30 dakika %10-20'lık ticari sodyum hipoklorit solüsyonu içinde kaşıtararak tutulduktan sonra en az 3 defa steril su ile durulama. Steril filtre kağıdı üzerinde kurutma.
Meyve, bakla	Kısa süreli saf alkol ile muamele	10-15 dakika %10'luk ticari sodyum hipoklorit solüsyonu içinde kaşıtararak tutulduktan sonra en az 3 defa steril su ile durulama
Gövde, hipokotil, petiyol	Yarım saat musluk suyu altında tutma	10-20 dakika %15'lik ticari sodyum hipoklorit solüsyonu içinde kaşıtararak tutulduktan sonra en az 3 defa steril su ile durulama
Yaprak	Yarım saat musluk suyu altında tutma	15 dakika %10'luk ticari sodyum hipoklorit solüsyonu içinde kaşıtararak veya alternatif olarak %0.1-0.25 HgCb solüsyonunda 2-5 dakika çalkalandıktan sonra en az 3 defa steril su ile durulama.
Depo organları	Musluk suyu altında yıkama	20-30 dakika %15-20'lik ticari sodyum hipoklorit solüsyonu içinde kaşıtararak tutulduktan sonra en az 3 defa steril su ile durulama. Steril filtre kağıdı üzerinde kurutma.

Bitki parçalarının sterilizasyonu ile ilgili bazı önemli noktalar:

- Bütün durulama ve kurutma işlemleri steril kabin içinde yapılmalıdır.
- Ticari solüsyon (örnek: Axion, Domestos) en az %5 sodyum hipoklorit (NaOCl) içermeli ve yüksek saflıkta olmalıdır. Pratik olarak en fazla %20-30 (h/h) oranında ticari solüsyon içeren karışımlar kullanılmaktadır. Bütün sterilizasyon solüsyonlarında, özellikle yaprak ve gövde gibi kısımların sterilizasyonunda kullanılacak solüsyonlarda 100 ml solüsyon için yayıcı yapıştırıcı olarak 2 damla Tween-20 kullanılması tavsiye edilir.
- Çok küçük tohumların sterilizasyonu, sterilizasyon solüsyonu içine konulan bir filtre veya beyaz tülbent içinde yapılabilir.

- d) Tablo 1.4'te verilen sterilizasyon işlemleri sadece yüzeysel sterilizasyon sağlarlar. Bazı kalın kabuklu tohumlar, gövde parçaları veya yumrular endojen kontaminasyon etmenleri taşıyabilirler. Bu nedenle mutlaka sağlıklı başlangıç materyali kullanmak gerekir. Endojen kontaminasyonu elimine etmek için ise genellikle biyositler (örnek: PPM) kullanılmaktadır. Bunun için 8-12 saat 50 mg/1 magnezyum klorür ve %1-2'lik biyosit içeren solüsyonlarda tohumlar karıştırılarak tutulduktan sonra direkt olarak çimlendirme ortamına alınırlar. Çeşitli yeşil eksplantlar ise önce sodyum hipoklorit solüsyonunda ve durulama sonrası 8-12 saat boyunca %1-2'lik biyosit solüsyonunda karıştırılarak tutulur ve yine %0.05-0.1 oranında biyosit içeren besin ortamında kültüre alınırlar. Bu işlemler hem yüzey hem de endojen kontaminasyonu engelleyebilir.

1.4. Besin Ortamları

Kallus, hücre süspansiyonu, protoplast kültürleri ve bitki rejenerasyonu gibi doku kültürü işlemlerine başlarken verilecek en öncelikli kararlardan birisi kullanılacak besin ortamlarının seçimidir. Çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilen bir çok besin ortamı formülasyonu mevcut olmasına rağmen birkaç tanesi (örnek: MS, B5 ve LS) ve bunların çeşitli modifikasyonları (Tablo 1.5) çok yaygın olarak kullanılmaktadır. MS ortamı, Murashige ve Skoog (1962) tarafından tütün için geliştirilmiş yüksek tuz içerikli bir ortamdır. Özellikle düşük yoğunluklarda (1/4, 1/2) bir çok bitki türündeki köklendirme çalışmalarında başarıyla kullanılmaktadır. Gamborg *ve ark.* (1968)'nın B5 ortamı, soya kallus kültürleri için geliştirilmiş nitrat azotu yüksek bir ortamdır. LS ortamı (Linsmaier ve Skoog, 1965), MS ortamının organik bileşikler bakımından farklı bir versiyonudur. White (1963) ortamı (WH) düşük tuz formülasyonlu ve domates köklerinin kültürü için geliştirilmiş bir ortamdır. SH (Schenk ve Hilderbrandt, 1972) ortamı ise hem monokotiledon hem de dikotiledonlar için uygun olabilmektedir. NN (Nitsch ve Nitsch, 1969) ortamı an ter kültürü için geliştirilmiştir. Tuz içeriği MS ve WH arasındadır. Ayrıca çeşitli bitki türleri için geliştirilmiş çok özel ortamlar da vardır (bkz. Sigma Kataloğu, 1998).

Bir besin ortamında genelde 8-9 farklı gruptan 20-30 arasında farklı komponentin farklı doz ve kombinasyonları kullanılabilir. Bunlar arasında vazgeçilmez kullanıma sahip olanlar yanında, kullanımı daha olumlu sonuçlar verenler de vardır. Bazı bitki türlerinde ise çok özel karışımların kullanılması başarıda temel şart olabilmektedir.

Bitki besin ortamlarında yer alan komponentler kullanım sıklığına göre sırasıyla; su, makro elemender, mikro elemender, vitaminler, şekerler (karbon kaynağı), yarı-katılaştırıcılar (jel yapıcılar; agar, agaroz vb.), bitki büyüme düzenleyicileri, tamponlar, amino asider ve kimyasal olarak tanımlanamayanlardır (George, 1993; Franklin ve Dixon, 1994; Gamborg ve Phillips, 1995). Bu komponentlerin hepsi aynı anda her ortamda bulunmayabilir.

Genel olarak sıvı ortamlar için makro ve mikro elementler, bazı vitaminler ve karbon kaynağı (feakkaroz), yan-kau ortamlar için de ilave olarak agar veya agaroz içeren ortamlara temel besin ortamları denir. Temel besin ortamına bitki büyüme düzenleyicileri ilavesiyle her tür bitki, her bitki parçası, dokusu veya hücresi için farklı ve özel besin ortamları hazırlanabilir.

Su bir besin ortamının %90'dan fazlasını oluşturur. Ortam formülasyonunu tam olarak tutturabilmek için kullanılacak suyun deiyonize olmasına gayret göstermek çok önemlidir. Eğer bu imkan yoksa çift destile saf su kullanılmalıdır.

Makro elementler: Temel besin ortamı içindeki en önemli olan komponentlerden birisi azottur. Bazı besin ortamlarında yüksek oranda, değişik formlarda (NHA, NO₃ veya organik) azot bulunurken (örnek: MS) bazı ortamlarda çok düşük oranda azot bulunur veya hiç bulunmaz (örnek: *in vitro* nodülasyonda kullanılan ortamlar). Fakat azot besin ortamlarında NO₃⁻ formunda daha fazla bulunur. Bitki kültürleri ilk önce ortamdan genellikle NHA formunda azotu alırlar ve daha sonra pH düşüncü NO₃ formunu kullanmaya başlarlar (George, 1993). Besin ortamındaki inorganik azota ilave olarak, L-glutamin, L-prolin gibi organik azot kaynaklarının özellikle somatik embriyo uyarımında kullanıldığını gösteren çok sayıda çalışma vardır. Fakat amino asitler filtre ile sterilize edildikten sonra besin ortamına ilave edilmelidir. KNO₃ formunda azot ilavesi aynı zamanda potasyumun da ortama ilavesini sağlar (Franklin ve Dixon, 1994). Diğer makro elementler arasında ise fosfor, sodyum, magnezyum, kükürt ve kalsiyum sayılabilir.

Mikro elementler: En çok kullanılan mikro elementler sırasıyla demir, manganez, çinko, bor, bakır, molibden, kobalt ve iyottur. Bunlar arasında demirin bitki hücreleri tarafından daha iyi alınabilmesi için jdatanmış formda ortama ilave edilmesi gerekir. Demir elementinin ticari olarak kullanıma hazır olan Fe-EDTA formu mevcuttur. Bununla beraber Fe-EDTA şu şekilde de hazırlanabilir: 350 mİ su içinde 5.57 g FeSCAAPFO hafifçe ısıtılarak eritilir. Yine 7.45 g Na₂EDTA 350 mİ suda hafifçe ısıtılarak eritilir. Daha sonra her iki solüsyon karıştırılarak 1 litreye tamamlanarak otoklavda sterilize edilir. Otoklavda jelatlama işlemi hızlanarak tamamlanır. Son solüsyon rengi koyu altın sarısı olmalıdır. Bu çözeltiden MS ve B5 ortamları için genellikle 5 mİ kullanılması gerekir (Gamborg ve Phillips, 1995).

En fazla kullanılan besin ortamlarının molar içerikleri ve hazırlanma şekilleri arasında çeşitli yanlış kullanımlar bildirilmiştir (Owen ve Miller, 1992). Bu yanlışlıklar arasında en çok rastlananlar demir ve demir jelatlandırıcıları ile ilgili olanlardır. Ayrıca, ticari olarak satılan hazır ortamların katalogları veya paketleri üzerinde çoğu kez orijinal bildirimlerden sapmalar tespit edilmekte, bir bileşiğin sulu veya susuz formları farklı şekilde gösterilebilmektedir. Bu nedenle ticari formülasyonlar orijinal bildirimlerle karşılaştırılmalı ve mümkünse ortam hazırlamada laboratuvarda hazırlanan stok solüsyonlar kullanılmalıdır. Bu işlem bir çok bakımdan pratik sonuçlar verebilir. Öncelikle daha ekonomiktir, ikinci olarak hem araştırmacılara tecrübe kazandırır hem de özel ortam hazırlamaya veya bazı

ortam komponentlerinin istenilen oranda değiştirilerek etkilerini test etmeye imkan verir (örnek: **azotsuz** ortam yapımı, farklı demir oranlarının kültürler üzerine etkisinin araştırılması vb.). Bunun için çeşitli stok solüsyon hazırlama yöntemleri ve şekilleri geliştirilmiştir. Bazıları Tablo 1.6 ve 1.7’de verilmiştir. Hazırlanan stok solüsyonların da mümkün olduğunca en az sayıda bileşenden oluşması tavsiye edilir. Eğer başarı sağlanıyorsa sıvı ortamlarla çalışmak ağırla katılaştırılan ortamlara tercih edilmelidir. Böyle bir uygulama hem pratik hem de ucuzdur.

Vitaminler: Vitaminler enzim reaksiyonlarında katalitik etkiye sahiptirler. Bitki kültürleri için en gerekli vitaminler tiamin (B₁) ve daha sonra sırasıyla nikotinik asit (B₃, niasin) ve pridoksindir (B₆). Myo-inositol ve d-biotin (H)’de öncelikle gerekli vitaminler içerisinde değerlendirilmektedir. Diğer vitaminler arasında ise d-pantotenik asit (B₅), askorbik asit (C), a-tokoferol (E), folik asit (M), retinol (A), riboflavin (B₂) ve kolekalsiferol (D₃) zaman zaman özel uygulamalarda besin ortamlarına ilave edilmektedir. Vitaminler genellikle otoklavdan önce besin ortamına ilave edilirler.

Şekerler: Şekerler besin ortamının en önemli komponentleri arasındadır. Kültüre alınan bitki hücre ve dokuları yeterli miktarda karbonhidrat sentezi yapamadıklarından (yani heterotrof olduklarından) enerji kaynağı olarak çeşitli şekerler kullanılmalıdır. Bitkilerce kullanılabilen şekerler Tablo 1.8’de verilmiştir. Bunlar arasında en fazla kullanılanı sakkarozdur. Besin ortamlarında sıklıkla kullanılan diğer şekerler sırasıyla glikoz, maltoz, rafinoz ve fruktozdur (George, 1993). Glikoz bazı durumlarda rejenerasyonun uyarılmasında sakkarozdan daha etkili olabilmektedir. Çünkü sakkaroz bir disakkarittir ve hücreler tarafından glikoz ve fruktoza parçalandıktan sonra kullanılabilir. Bununla beraber bazı özel durumlarda da, örneğin rafinoz, daha etkili olabilmektedir. Yine bazı durumlarda da karışım (sakkaroz+glikoz) daha iyi sonuçlar verebilmektedir. Besin ortamına ilave edilecek %2 (a/h) şeker (20 g/l) köklendirme çalışmalarında ve mikroçoğaltımda yeterli olurken, rejenerasyon ortamlarında en çok kullanılan konsantrasyon %3 (a/h, 30 g/l) olmaktadır.

Şekerler uzun süreli otoklav sonucu karamelize olabilmekte ve hücreler üzerinde toksik etki yapan yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklere dönüşmektedirler (Tablo 1.8). Myo-inositol bir heksitol olmasına rağmen vitamin etkisi göstermektedir (Smith, 1992). Alkol şekerleri (manitol, sorbitol) bitki dokularınca metabolize edilemeyen şekerlerdir. Bunlar genellikle protoplast kültürlerinde ozmotik dengeleyici olarak kullanılmaktadır. Bununla beraber ortama ilave edilen manitol veya sorbitol bor alimini engellemektedir (George, 1993).

Tablo 1.5. Bitki doku kültüründe en çok kullanılan temel besin ortamları (George, 1993; Hivonn, 1994; AmKofe ve Phillips, 1995).

Komponentler	Kültür Ortamlarındaki Konsantrasyon (mg/l)									
	MS	B5	SH	LS	White S-3	NN	Nhsch's H	KM	LM	SI
KNO ₃	1900	2500	2500	1900	80.0	950	950	1900	1900	-
NH ₄ NO ₃	1650	-	-	1650	-	720	720	600	1650	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	300	-	-	-	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	400	370	720	185	185	300	1850	370
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150	200	440	-	220	166	600	22	440
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	-	-	300	-	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-	65	-	-	300	-	1400
KH ₂ PO ₄	170	-	-	170	68	68	68.0	170	340	170
NaH ₂ P0 ₄ ·H ₂ O	-	150	-	-	-	-	-	-	-	-
NaH ₂ P0 ₄	-	-	-	-	16.5	-	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-	200	-	-	-	-	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	10	10	16.89	-	-	-	10	21	-
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	-	-	-	7.0	25	25.0	-	-	22.3
KI	0.83	0.75	1.0	0.83	0.75	-	-	0.75	4.15	0.83
H ₃ BO ₃	6.2	3.0	5.0	6.2	1.5	10	10.0	3.0	31	6.2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	2.0	1.0	10.58	3.0	10	10.0	2.0	43	8.6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	0.2	0.025	-	0.025	0.025	0.025	0.50	0.025
Na ₂ Mo0 ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25	0.1	0.25	-	0.25	0.25	0.25	1.25	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	0.1	0.025	-	-	-	0.025	0.125	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	15.0	27.85	-	27.8	-	-	27.8	27.8
Fe ₂ (SO ₄)3	-	-	-	-	2.5	-	-	-	-	-
Sequestrene 330 Fe	-	-	-	-	-	-	-	28	-	-
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	20.0	-	-	37.3	-	-	37.3	37.3
Nikotinik asit	0.5	1.0	5.0	-	-	5	-	-	0.5	0.5
Pridoksin-HCl	0.5	1.0	0.5	-	-	0.5	-	1.0	0.1	0.5
Thiamin-HCl	0.1	10.0	5.0	0.4	-	0.5	-	1	0.1	0.1
Biotin	-	-	-	-	-	0.05	-	0.01	-	-
Folik asit	-	-	-	-	-	0.5	-	0.4	-	-
/^y^-inositol	100	100	1 000	-	-	100	-	100	100	100
l-inositol	-	-	-	100.0	-	-	-	-	-	-
Glisin	2.0	-	-	-	-	2.0	-	0.1	-	2.0
Glutamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1462
Sakkaroz	30 000	20 000	30 000	-	-	20 000	-	20 000	30 000	10 000

Jel yapıcı maddeler: Jel yapıcı maddeler besin ortamlarını yarı-katı hale getirmek için kullanılan komponentler arasındadırlar. Bunlar genellikle kırmızı deniz alglerinden çıkarılan çeşitli polisakkarit bileşimleridir. En çok kullanılanlar, agar (değişik tipleri), agaroz, Sea-Kem agaroz, aljinat, Phytigel (Gelrite), silikajel, jelatin ve nişastadır. Genellikle % 0.25-1.0 (a/h, 2.5-10 g/1) arasında kullanılırlar. Ortamda

kullanılan agar tipi ortaya çıkacak sonucu değiştirebilmektedir. Agar veya agaroz gibi maddeler 100 °C civarında su ile jel oluşturlar ve 45 °C civarında katılaşmaya başlarlar. Eritilirken mutlaka karıştırılmalı ve tamamen eritilmelidir. Ortaya çıkan jel bitki hücrelerince alınamaz ve besin ortamının diğer komponentleriyle reaksiyona girmez. Gellangum (Phytigel=Gelrite) dışındaki diğer jel yapıcı maddeler hariç katılaşma sonrası tekrar eritilebilirler. Ticari olarak satılan agarlar arasında saflık ve bu nedenle de fiyat bakımında farklar vardır. Difco ticari markalı agarların jel yapma kapasitesi saflıkları arttıkça artar. Bacto agar en az saf olanıdır (George, 1993). Mikroçoğaltım çalışmalarında yüksek saflıkta agar kullanmak gereksizdir. Son yıllarda kırmızı deniz alglerinin direkt olarak kurutularak öğütülmesiyle düşük saflıkta fakat çok ucuz maliyetli agar elde etme çalışmaları artmaktadır. Çünkü jel yapıcı maddeler besin ortamının en pahalı komponentleri arasındadır.

Bitki büyüme düzenleyicileri: Besin ortamlarının çoğu durumlarda vazgeçilmez komponentleri arasındadırlar. Daha geniş bilgi için bkz. Bölüm 1.4.2.

Amino asitler: Amino asitler, hücre kültürlerinin indirgen azot ihtiyacını hemen karşılamada çok önemli olabilmektedirler. Eğer ortamda nitrat ve amonyum miktarı dengeli ise bir çok ortamda kullanımları gereksiz olabilir. Glisin, arginin, glutamin, prolin aspartik asit en çok kullanılanlar arasındadır. Amino asitlerin sadece L-formları biyolojik olarak aktif olduklarından mutlaka L- formları kullanılmalıdır. Kazein ve diğer protein hidroliz ürünleri bol miktarda amino asit içermektedir.

Kimyasal olarak tanımlanamayanlar: Hindistan cevizi sütü, kazamino asit, maya özü (yeast extract) gibi kimyasal olarak tanımlanamayan komponender besin ortamlarında kullanılmakla birlikte, genellikle tam olarak tanımlanabilir maddelerin kullanılması tavsiye edilmektedir. Çünkü bir ortamdan diğerine oldukça farklı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Hindistan cevizi sütü kimyasal olarak tanımlanamayan, her hazırlamada farklı içeriğe sahip olabilen fakat çeşitli kültür ortamlarında (özellikle protoplast sistemlerinde) başarıyla kullanılan bir kaynaktır. Hazırlamada, hindistan cevizi delinir (en az 10 adet) ve süt bir kaba akıtılır. Süt 10 dakika kaynatılarak proteinler denature edilir. Whatmann 1 filtresinden süzülerek geçirilir ve filtre ile sterilize edildikten sonra 100 ml'lik uygun şişelerde -70 °C de saklanır. Kullanımdan önce kabin içinde eritilir ve genelde %10 (h/h) oranında besin ortamına ilave edilir. Hindistan cevizi sütü içerik bakımından çok zengindir. Tipik içeriği George (1993) tarafından verilmiştir. Hindistan cevizi sütünden başka kimyasal olarak tanımlanamayan maddelerden en fazla kullanılanları maya özü, kazein hidrolizat, kazamino asit ve patates özüdür.

Organik asitler: Besin ortamlarında kullanılan organik asider; fumarik asit, malik asit, sitrik asit ve sodyum piruvattır. Genellikle 10-40 mg/1 konsantrasyonda besin ortamına ilave edilirler.

Antibiyotikler ve biyositler: Antibiyotikler genellikle çok hassas ve çabuk bozulabilen maddelerdir ve otoklavdan sonra besin ortamına ilave edilmelidirler. Biyositlere nazaran daha kısa süreli koruma sağlarlar. Karbenisilin, sefotaksim

(klofuron), eritronisin, genetisin, higromisin, kanamisin, streptomisin ve
vii ötoii^ Oİrtarriinin imlenmesini uzun süreli
korumada kullanılan biyositler arasında en önemlisi son yıllarda kullanımı
yaygınlaşan PPM (bitki koruma solüsyonu) sayılabilir. Ortama ilave edilecek 0.2
(h/h) PPM'in hava kaynaklı kontaminasyonu engellediği bildirilmiştir (Niedz,
1998).

Diğer komponentler: Bazı özel durumlarda bitki hücrelerince salgılanan toksik
maddeleri (fenolikler) adsorbe etmek için besin ortamlarına (özellikle köklendirme
ortamlarına) aktif karbon ilave edilir. Fakat bazen aktif karbon besin maddelerini ve
büyüme düzenleyicilerini de adsorbe edebilmekte ve formülasyonu
değiştirebilmektedir. Bu nedenle kullanımda dikkatli olmak gerekmektedir. Besin
ortamını tamponlayıcı olarak ise en fazla kullanılan MES'tir. MES pH'yı 5.5-6.5
arasında sabit tutabilmektedir. Genellikle 1 g/1 olarak otoklav ve pH
ayarlamasından önce ilave edilir.

1.4.1. Stok solüsyonların hazırlanması ve saklanması

Stok solüsyonlar bir laboratuvarında en dikkatli şekilde hazırlanıp sürekli taze olarak
elde tutulması gereken besin ortamı unsurlarındandır. En çok hazırlanan stok
solüsyonlar, tuzlar, mikro elemender, bitki büyüme düzenleyicileri, vitaminler ve
antibiyotiklerdir. Bunları hazırladıktan sonra ambalaj üzerine kullanılan madde,
formülü, konsantrasyonu ve hazırlama tarihi mutlaka yazılmalıdır. Besin ortamlarını
oluşturan komponentlerin stokları farklı şekillerde yapılabilir. Bunlardan bazıları
Tablo 1.6 ve 1.7'de verilmiştir. Genellikle normal konsantrasyonun 10 veya 100
katında (x10 veya x100) hazırlanırlar.

Bitki doku kültürlerinde yaygın olarak kullanılan büyüme düzenleyicilerine ait çeşitli
bilgiler Tablo 1.9'da verilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonları
bir mİ sıvıda 0.1-5.0 mg etkili madde bulunacak şekilde hazırlanabilir. Örnek: 100
mİ son hacimde 1.0 mg/ml'lik bir NAA stok solüsyonu hazırlamak için, 100 mg
NAA tartılır, 70-80 mİ %96-99'luk etil alkol içinde eritilir ve deiyonize su ile 100
mlye tamamlandıktan sonra otoklav veya filtre ile sterilize edilip kullanılıncaya
kadar buzdolabında saklanır. Zeatin, IAA, GA3 ve vitaminlerin stok solüsyonları
mutlaka filtre ile sterilize edildikten sonra derin dondurucuda saklanmalıdır. Pahalı
olan ve kısa sürede kullanılması gereken kimyasallardan (örnek: zeatin, CPPU,
TDZ vb.) çok az miktarda (5-10 mİ) stok solüsyon hazırlanmalıdır.

Bu tür solüsyonlar sterilizasyondan sonra kabin içinde Efendorf tüplerine 1 mİ
olarak dağıtılıp ağzaları kapatıldıktan sonra başka bir kap içinde derin dondurucuda
kullanılıncaya kadar saklanır. Eğer laboratuvarında 5-10 mg'ı tartacak hassas terazi
bulunmazsa bu durum uygulanamaz. Hazırlanan solüsyon çok düşük hacimde bir
ortam kabına çok düşük bir konsantrasyonda ilave edilecekse; bu durumda mevcut
solüsyon 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra kullanılır.

TDZ ve CPPU solüsyonları en geç 15 gün içinde kullanılmalıdır. Dondurucuya konulan stok solüsyonların kapları $\frac{3}{4}$ oranında doldurulmalı, kullanımdan en az yarım saat önce çıkartılıp, oda sıcaklığında, içinde su bulunan bir kapta tutularak çözüldükten sonra ortama ilave edilmelidir. Bazı maddeler ışığa hassas olduklarından (örnek: IAA, CPPU, TDZ, antibiyotikler vb.) bunlardan hazırlanan stok solüsyonlar renkli şişelerde veya folyo ile kaplanmış şişelerde saklanmalıdır.

Tablo 1.6. Stok solüsyonlarla MS besin ortamının hazırlanması-1 (George, 1993).

Stok Solüsyonlar		İşlem Sırası
Solüsyon kodu ve bileşenleri g/l		
Stok Solüsyon A		1 litre ortam hazırlamak için: 2 litrelik bir kaba 500 ml bidistile su konulur. 30 g sakkaroz tartılıp eriyinceye kadar karıştırılır, myo inositol (100.0 mg), tiamin-HCl (0.1 mg), pridoksin-HCl (0.5 mg), glisin (2.0 mg), nikotinik asit (0.5 mg) eklenir. - A, B ve G stok solüsyonlarının her birinden 20 ml; C, D, E, F solüsyonlarının her birinden ise 5 ml eklenir. - Oksin yada sitokininler uygun konsantrasyonda ilave edilir. - Kaptaki sıvı 900 ml'ye tamamlanır ve pH 5.8'e ayalanır. - Sıvı dereceli silindire dökülür ve bir litreye tamamlanır (yada daha az). 2 litrelik Erlene dökülür ve ağar ilave edilir. 100 °C de buhar banyosunda eritildikten sonra uygun kaplara dağıtılır ve otoklav edilir (ısı ile bozulabilen maddeler otoklavdan sonra ilave edilmelidir).
NH ₄ NO ₃	82.5	
Stok Solüsyon B		
KNO ₃	95	
Stok Solüsyon G		
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	1.865	
FeSO ₄ .7H ₂ O	1.39	
Stok Solüsyon C		
CaCl ₂ .2H ₂ O	88	
Stok Solüsyon D		
KH ₂ PO ₄	34	
Stok Solüsyon E		
H ₃ BO ₃	1.24	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.05	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.005	
KI	0.166	
Stok Solüsyon F		
MnSO ₄ .H ₂ O	3.38	
MgSO ₄ .7H ₂ O	74.0	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.005	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.725	

Tablo 1.7. Stok solüsyonlarla MS besin ortamının hazırlanması-2 (George, 1993).

<i>oun. ouuouyuuia</i>		l^km Sırası	
Kalsiyum Klorit		1 litre ortam hazırlamak için	
CaCl ₂ .2H ₂ O	150 g/l	NH ₄ NO ₃	1650 mg
Mikro Elementler (x 100)	(100 ml için)	KNO ₃	1900 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	2230 mg	MgSO ₄ .7H ₂ O	370 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg	KH ₂ PO ₄	170 mg
H ₃ BO ₃	620 mg	Na ₂ FeEDTA.2H ₂ O	43 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg	Yukandaki bileşikler direkt olarak tartılır ve 400 ml bidistile su içinde eritilir. 30 g sakkaroz ilave edildikten sonra 2.9 ml kalsiyum klorid stok solüsyonundan, 1 ml mikro element solüsyonundan, 1 ml potasyum iyodür stok solüsyonundan eklenir. Sitokinin ve oksin stok solüsyonlarından gerekli miktarda eklenir. Vitamin stok solüsyonundan 1 ml eklendikten sonra 800 mlye tamamlanır ve pH 5.8'e ayarlandıktan sonra 1 litreye tamamlanır. 8 g ağırlık ilavesinden sonra ısıtılarak eritilip, soğutulduktan sonra kültür kaplarına dağıtılır ve otoklav edilir.	
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5 mg		
CoCl ₂ .6H ₂ O	2.5 mg		
Potasyum İyodür	(100 ml için)		
KI	83 mg		
Sitokinin ve Oksin	Gerektiği kadar ilave edilir.		
Vitamin Stok Solüsyonu	(100 ml için)		
(x 100)	200 mg		
Glisin	50 mg		
Nikodnik asit	50 mg		
Pridoksin-HCl	10 mg		
Tiamin-HCl	10000 mg		
myo-inositol			

Tablo 1.8. Bitkilerce alınabilir şekerler (George, 1993).

Şekerler	İndirgenme Kapasitesi	Hidrolik / Enzimatik Parçalanma Ürünleri
Monosakkaritler		
<i>Heksozlar</i>		
Glikoz	indirgen şeker	Yok
Fruktoz	indirgen şeker	Yok
Galaktoz	indirgen şeker	Yok
Manoz	indirgen şeker	Yok
<i>Pentozlar</i>		
Arabinoz	Az indirgen	Yok
Riboz	Az indirgen	Yok
Ksiloz	Az indirgen	Yok
Disakkaritler		
Sakkaroz	indirgen değil	Glikoz, Fruktoz
Maltoz	indirgen şeker	Glikoz
Selobioz	İndirgen şeker	Glikoz
Tsilhakü	İndirgen değil	Glikoz
Laktoz	İndirgen şeker	Glikoz, Galaktoz
Trisakkaritler		
Rafinoz	İndirgen değil	Glikoz, Galaktoz, Fruktoz

1.4.2. Bitki büyüme düzenleyicileri

Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) doku kültürü ortamlarının en önemli unsurudur (Tablo 1.9). Tür ve çeşitlere göre değişmekle birlikte uygun olmayan konsantrasyonda ortama ilave edildiklerinde genellikle hiçbir etki ortaya çıkmaz. Bitki hormonları, bir dokuda üretilip, büyüme ve gelişmenin olacağı diğer dokulara taşman ve çok düşük konsantrasyonlarda etkili olan endojen organik bileşiklerdir. İndol asetik asit, zeatin, zeatin ribozid, GA, absisik asit ve etilen bitkilerce üretilen hormonlardandır. Sentetik yollarla üretilenler de dahil olmak üzere genel olarak hepsine bitki büyüme düzenleyicileri adı verilmektedir. En çok kullanılanlar; 1) oksinler, 2) sitokininler, 3) gibberellinler, 4) absisik asit ve 5) etilendir. Etki tiplerine göre ise bitki büyüme düzenleyicileri Tablo 1.10* de gruplar halinde verilmiştir.

Oksinler; fotoperyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidirler. Oksinler, doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını, sitokininlerle birlikte yine kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu (organogenesis) ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlayabilirler. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde vazgeçilmez bir kullanıma sahiptirler. Temel hormon formu IAA (indol-3-asetik asit)'tir. Sentetik oksinler arasında NAA, IBA, 2,4-D, 2,4,5-T ve Pikloram sayılabilir. Sentetik oksinler ticari uygulamalarda meyve dökümünün engellenmesi ve çeliklerin köklendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

En çok kullanılan sitokininler adenin (aminopürin) türevleridir. Bunlar içinde de BAP en çok kullanılanıdır. Sitokininler, çoğunlukla kök ucu meristemi ve genç yapraklarda üretilir. Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma (re-differentiation), bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olup (Smith, 1992), antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirirler. Sürgünlerde köklenmeyi ve embriyogenesi engellerler. Özellikle son yıllarda çok sık kullanılan ve güçlü bir sitokinin aktivitesi gösteren TDZ ve CPPU'nun (Tablo 1.9) doku kültürlerinde kullanımı ile ilgili bir çok çalışma mevcuttur (Malik ve Saxena, 1992; Hosokawa *ve ark.*, 1996; Faure *ve ark.*, 1998; Magioli *ve ark.*, 1998). Fakat sentetik olarak elde edilen sitokinin benzeri bu iki maddenin kullanımı ile elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi oldukça zor olmaktadır. Doğal sitokinin formları, zeatin ve zeatin riboziddir. Fakat bunlar daha pahalıdır.

Gibberellinler; meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, sürgünlerin boylarının uzatılmasında, embriyo ve övül kültürlerinde kullanılmaktadır. Kallus gelişimini, organogenesisi ve adventif kök oluşumunu engellerler. Ayrıca bitkilerde gövdenin uzamasını ve çiçeklenmeyi artırır.

Absisik asit; strese maruz kalmış yapraklarda, dormant tomurcuklarda ve tohumlarda bulunur. Absisik asitin doku kültürlerindeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte halen somatik embriyoların olgunlaştırılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca yaprak ve meyve dökümü (absisyon) ve dormanside etkili

olup, stomaların kapanmasını düzenlemesi diğer etkileri arasında sayılabilir. Absisik asit ışığa Hassastır.

Bu tür maddelere ek olarak nadiren de olsa kullanılan ve spesifik uygulama alanları olan maddeler de (bitki büyüme düzenleyici, hormon, büyüme engelleyicisi ve büyüme durdurucusu) vardır (Tablo 1.10). Örnek: Roussy *ve ark.* (1996) bir oksin inhibitörü olan TIBA (2,3-5 triiodobenzoik asit)'nin 3 mg/1 konsantrasyonu ile serada yetiştirilen şeker pancarı bitkilerini muamele ettiklerinde, bu bitkilerden alınan yaprak eksplantlarından yüzlerce sürgün elde etmişlerdir. TIBA ile muamele edilmeyenlerden ise rejenerasyon sağlanamamıştır. Bu nedenle bir tür madde gerekli uyarımı sağlamıyorsa farklı alternatifler denenmelidir. Kullanılan bitki parçasının endojen hormon konsantrasyonu da bu bakımdan önemli olabilmektedir.

1.5. Kültür Şartları

Kültürler kontrollü şartlarda kültüre alınırlar. Çevre şartlarının kültürler üzerine olabilecek etkileri Tablo 1.1 T'de verilmiştir. Bitki rejenerasyonu için çalışılıyorsa, kültür şartlarının belirli bir aralıktaki değişiminin çok dramatik değişikliklere sebep olacağı beklenmemelidir. Bununla beraber kontrol edilmesi gereken en önemli kültür şartları sıcaklık, ışık ve nemdir. Sıcaklık kültür odalarında kullanım amacına göre 18 ± 2 , 22 ± 2 ve 25 ± 2 °C'ye ayarlanır. Işık genellikle beyaz serin floresan lambalarıyla sağlanır. Kültür ortamının aydınlanma durumu (fotosentetik olarak aktif radyasyon birimi= $\mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$) önceden belirlenmelidir. Çünkü ışığın özellikle bitki rejenerasyonu üzerine farklı etkileri vardır. Genellikle embriyogenik kallus oluşumu, hücre süspansiyonları ve özellikle fenolik bileşikler üreten kültürlerin ışıksız ortamda kültürü daha akılcı olurken, rejenerasyonun ortaya çıkabilmesi için ışık çoğunlukla gerekli olmaktadır. Tablo 1.12'de geçerli ışık birimleri ile ilgili yaklaşık çevirme oranları verilmiştir. Işık $25-100 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$ 'ye ayarlanabilir olmalıdır. Işıkla ilgili diğer önemli bir nokta da ışıklandırma süresi ve zamanlamasıdır (fotoperyot). Kültürler sürekli ışıktaki tutulabileceği gibi, 16 saat fotoperyot veya sürekli karanlıkta da tutulabilirler. Bunların hepsi ayrı ayrı denenmelidir.

Nem %50-70 arasında bir değere ayarlanır. Kültürlerin sürekli yüksek nemde tutulması sürgünlerin hiperhidrisite denilen çok sulu bir görünüm kazanmalarına sebep olur ve bu istenmeyen bir durumdur. Bu tür sürgünler genellikle köklendirilemez.

Işık birimleri ve çevirmeler:

Kültür odalarında en çok kullanılan 2 değişik floresan ışık kaynağının yaklaşık çevirme katsayıları Tablo 1.12'de verilmiştir. Bir mol foton 1 einstein (E)'ye eşit

olduğundan bir birim foton ışık yoğunluğu $\text{JJ}/\text{m}^2/\text{s}$ olarak ifade edilebilir (George, 1993; Gamborg ve Phillips, 1995). Örnek: 2000 lüks, serin beyaz ışıktaki $2000/80 = 25 \text{ jmol}/\text{m}^2/\text{s}$ ($\text{jj}/\text{m}^2/\text{s}$) değerine eşittir. Bilimsel yayınlarda en çok kullanılan ifade şekli budur. Birim kütleye düşen enerjinin ifadesi ise joule/kg (J/kg) olarak yapılabilir. Pascal, basıncı ifade etmede kullanılır. $1 \text{ J}/\text{kg}$, 1 kPa 'a eşittir. Ayrıca birim alanda ışık radyant enerjisi J/m^2 olarak ifade edilirken, irradians'ı ifade etmede W/m^2 kullanılabilir (Gamborg ve Phillips, 1995).

1.6. Denemelerin Planlanması ve Data Analizi

Denemelerin planlanması ve data analizi bitki doku kültürü denemelerinde genellikle en az dikkat edilen konulardır. Çoğu deneyde Tamamen Tesadüf Blokları deneme deseni uygulanır. Bunun nedeni ışık, sıcaklık ve nem gibi birçok kültür şartlarının hassas bir şekilde kontrol edilebilirliğidir. Desenin uygulaması ve analizi kolaydır. Uygulama sayısı ve uygulama başına tekerrür sayısı sınırlı değildir. Hatayı ölçmede serbestlik derecesi en yüksektir. Kayıp dataya müsaade edilebilir. Analiz için ANOVA (varyans analizi) uygulanır. Tek faktörlü Tamamen Tesadüf Blokları Deneme Deseni ise her deneme birimi sayısı başına çoklu gözlem yapmaya izin verir. Daha etkindir. Hassas istatistiksel sonuç sağlar.

Tesadüf Blokları Deneme Deseni uygulanacak bir başka desendir. Farklı deneme birimleri kullanılacağına, her birim kendi arasında gruplandırılarak uygulanır. Her grup içinde uygulamalar tesadüfen yerleştirilir. Diğer uygulanabilecek testler arasında Bölünmüş Bloklar (Split Plots) deneme deseni ve Faktöriyel Deneme Desenleri sayılabilir. Bu durumda bir çok faktörün etkisi ve birbirleriyle ilişkileri değerlendirilebilir.

Uygulama ortalamalarını karşılaştırmada Ortalamanın Standart Hatası (SE), Standart Sapma (SD), T-Testi (iki gurubun ortalamalarını karşılaştırmada) kullanılabilir. T-testi matematik olarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) eşittir.

Çoklu karşılaştırma tesleri (LSD, Duncan vb. multiple range tests) sadece varyans analizinin önemli çıkması ve uygulamaların birbirlerine benzemediği durumlarda uygulanırlar. Daha az sayıda muamele için LSD, fazla sayıda muamele için Duncan testi en çok uygulanmaktadır (örnek: Farklı hormonların değişik genotipler üzerine etkisinin test edilmesinde).

Tablo 1.9. Bitki doku kültüründe en çok kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri (Smith, 1992; Franklin ve Dixon, 1994; Gamborg ve Phillipi 1995; George, 1993).

Adı	Kısa Adı	Mol. Ağırlığı	Erime durumu	Toz halde saklama sıcaklığı (°C)	Stok solüsyon saklama sıcaklığı (°C)	Etkili Kons. aralığı (mg/L)	Otoklav (121°C - 15 dakika) - Filtre (F)te Sterilizasyon
Oksinler							
2,4,5-Triklorofenoksi asetik asit	2,4,5-T	255.5	EtOH	OS*	0-5	0.01-5	O
2,4-Diklorofenoksi asetik asit	2,4-D	221.0	EtOH	OS	0-5	0.01-5	O
İndol-3-asetik asit	IAA	175.2	EtOH	-0	-0	0.01-3	O/F
İndol-3-bütirik asit	IBA	203.2	EtOH	0-5	-0	0.1-10	O/F
İndol-3-propiyonik asit	IPA	189.2	NaOH	-0	-0	0.1-10	O/F
Naftalen asetik asit	NAA	186.2	NaOH	OS	0-5	0.1-10	O
Naftiloksi asetik asit	NO A	202.2	NaOH	OS	0-5	0.1-10	O
p-klorofenoksi asetik asit	4-CPA	186.6	EtOH	OS	0-5	0.1-10	O
Fenil asetik asit	PAA	136.2	EtOH	OS	0-5	0.1-50	O/F
4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit	Picloram	241.5	DMSO	OS	0-5	0.01-10	O
Sitokininler							
Adenin sülfat		184.2	Su	OS	0-5	50-250	O
6-Benzil amitio pürin	BAP	225.3	NaOH	OS	0-5	0.1-5.0	O
N-(2-Choloro-4-pyridyl)-N"-Fenil üre	CPPU	247.7	DMSO	0-5	0-5	0.001-1.0	F
İzopentil adenin	2IP	203.2	NaOH	-0	-0	1.0-30.0	O/F
Kinetin	K	215.2	NaOH	-0	-0	0.1-5.0	O/F
1-Fenil-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) üre	Thidiazuran (TDZ)	220.2	DMSO, KOH	OS	0-5	0.001-0.05	O/F
Adenin sülfat		368.34	HCl	OS	0-5	50-250	O
Zeatin	ZEA	219.25	NaOH	-0	-0	0.1-5.0	F
Zeatin ribozid	ZR	363.4	NaOH	-0	-0	0.05-5.0	F
Gibberellik asit	GA ₃	346.4	Su	0-5	-0	0.05-5.0	F
Absisik asit	ABA	264	Su	0-5	-0	0.1-5.0	F

*OS: Oda sıcaklığı. Not: Bütün stok solüsyonlarda, özellikle filtre ile sterilize edilenlerde, pH dikkatli bir şekilde 5.0'e ayarlanmalıdır.

Tablo 1.10. Uygulama alanları ve etki şekillerine göre bitki büyüme düzenleyici, engelleyici ve hormon grupları.

Oksinler: 4-CPA (p-CPA), 2,4-D, 2,4-DB, 2,4-DEP, 2,4,5-T, 1AA, IBA, naftalenasetamid, oc-naftalenasetik asit (NAA), l-naftol, naftoksiasetik asit (NAO), potasyum naftenat, sodium naftenat, dikloroprop, fenoprop, sodium naftenat

Sitokininler: 2iP, benzil amino pürin (BAP), kinetin, zeatin, CPPU

Gibberellinler: Gibberellin, gibberellik asit

Anti-oksiner: Klorfibril asit, TIBA

Büyüme uyandırıcılar: Brasinolid, himeksazol

Büyüme engelleyiciler: Absisik asit, ansimidol, butralin, karbaril, klorofonyum, klorprofam, flumetralin, floridamid, fosamin, glifosin, izopirimol, jasmonik asit, maleik hidrazit, mepiquat

Büyüme gerileticiler: Klomequat, daminozid, flurprimidol, paclobutrazol, tetsiklasis, unikonazol

Morfaktinler: Klorfluren, klorflurenol, dikloroflurenol, flurenol

Defolyantlar: Kalsiyum siyanamid, dimethipin, endotal, etefon, metokzuron, pentaklorofenol, thidiazuron (TDZ), tribufos

Etilen sensajlayıcılar: ACC, AVG, etefon

Diğer sınıflandırılmayan bitki büyüme düzenleyicileri: Benzofluor, buminafos, karvon, siyobutit, sikloheksimid, etiklozot, fenridazon, forklorofenuron, karetazan, metasülfokarb, sintofen, triptenol

Tablo 1.11. Farklı kültür şartlarının sürgün çoğaltımı, köklenme ve dış şartlara alıştırma devrelerinde kültürler üzerine etkileri (Kozai, 1991'den değiştirilmiştir).

Çevre şartları	Etkileri (<i>in vitro</i>)	Etkileri (<i>ex vitro</i>)
Sabit hava sıcaklığı	Karanlıkta yüksek solunum	Çevresel strese hassaslık
Düşük-yüksek sıcaklık	Yavaş-aşırı gelişme	Yavaş-aşırı gelişme
Düşük ışık yoğunluğu	Yaprak çıkışında azalma, kültürlerde beyazlaşma	Fotosentezin azalması, büyüme ve gelişmenin yavaşlaması
Düşük hava girişi-yüksek nem	Düşük transpirasyon oranı, stomalarda düzensizlik, köklenme ve besin alımında zorluklar, vitrifikasyon.	Aşırı transpirasyon, su ve besin maddesi alım zorluğu.
Ortamda düşük erimiş O ₂	Köldenmede zorluk, kültürlerde kahverengileşme, hücre ve dokuların ölümü	Kök çürümesi, yavaş gelişme
Ortamda yüksek inorganik iyon konsantrasyonu	Ortamda yüksek ozmotik basınç, yüksek etilen üretimi	Büyümede gerileme
Ortamda yüksek şeker konsantrasyonu	Vitrifikasyon ve diğer bazı düzensizlikler, bakteriyel ve fungal kontaminasyon, bitki ölümü	-
BBD ve vitamin içeren ortamlar	Aşırı konsantrasyonlarda mutasyon ihtimali, somaklonal varyasyon.	■
Uygun olmayan büyüme düzenleyicileri	Kallus gelişimi, köklenme ve büyüme bozuldukları	■
Yüksek konsantrasyonda ağarla katılaştırılmış ortamlar	Düşük oksijen alımı, köklenmede bozukluk	~

Tablo 1.12. Lüks değerinden en çok kullanılan diğer değerlere yaklaşık çevirme değerleri (George, 1993).

Birim	Sıcak, beyaz ışık (warm, white)	Serin, beyaz ışık (cool, white)
Wm^{-2} (W/m^2)	390	370
$erg\ mm^{-2}\ s^{-1}$ ($erg/mm^2/s$)	39	37
$erg\ cm^{-2}\ s^{-1}$ ($erg/cm^2/s$)	0.39	3.7
$pmol\ m^{-2}\ s^{-1}$ ($pmol/m^2/s$) ($pE\ m^{-2}\ s^{-1}$)	83	80
$pmol\ cm^{-2}\ s^{-1}$ ($pmol/cm^2/s$) ($pE\ cm^{-2}\ s^{-1}$)	8.3×10^5	8.0×10^5

Not: Lüksten diğer birimlere çevirmek için ölçülen lüks değeri farklı ışık kaynaklarına göre yukarıda verilen değerlere bölünür. Lükse çevirmek için ise ilgili değerle çarpılır.

1.7. Mikroskopi ve Görüntüleme

Bitki doku kültürleri ile çalışırken üzerinde özenle durulması gereken konulardan birisi kültürlerin gelişiminin incelenmesi ve fotoğraflarının çekimidir. Bu nedenle bir doku kültürü laboratuvarında hem binoküler ışık mikroskobu hem de özellikle stereo mikroskop bulunmalıdır. Kallus kültürleri ve rejenerasyonla ilgili gözlemler en iyi steryo mikroskopla yapılır ($\times 4$, $\times 10$, $\times 40$ objektif). Bu mikroskoplar küçük tohumlu bitkilerle çalışırken yada embriyo ayırma işlemlerinde kullanılabilir. Fotoğraf makinesi monte edilebilen bir steryo mikroskopta küçük boyutta kültürlerin fotoğrafları gayet net olarak çekilebilir. Protoplast çalışmaları ve hücre süspansiyonları en iyi alttan objektifli ışık mikroskobu ile gözlemlenebilir. Çünkü hücreler kültür kaplarındaki solüsyon içinde tabana çökecekleri için aşağıdan objektifle daha net gözlemlenebilirler. Bununla beraber aşağıdan objektifli binoküler mikroskoplar sitolojik çalışmalara uygun değildir. Canlılık testleri yapabilmek için mikroskoba monte edilebilen fotoğraf makinesi yanında bir UV ışık kaynağı da olmalıdır. Canlı kültürlerin steril şartlarda manipulasyonunu sağlamak için mikroskoplar steril kabin içine monte edilebilir.

1. 8. Laboratuvar Güvenlik

Laboratuvarda mudaka sürekli kapalı ayakkabılar giyilmelidir. Yemek ve içmek yasak olmalıdır. Pipeder kesinlikle ağızla çekilmemelidir. Kırılmış camlar özel bir yerde depolanmalı ve kontrollü olarak atılmalıdır. Tehlikeli kimyasallar mudaka aspiratörlü kabin içinde tartılmalıdır. Besin ortamlarının kapları ve diğer malzeme kapları mudaka okunabilir bir şekilde etiketlenmeli, etiket tarihi mutlaka yazılmalıdır.

1.9. Bitki Doku Kültürüne Yeni Başlayacaklar için Tavsiyeler

Düşük maliyetli bir doku kültürü laboratuvarı kurmak için ekipmanların ve sarf malzemelerinin temini imkanlarının iyi araştırılması gerekir. Örnek: Aynı aseptik şartları temin eden fakat daha az konforlu olan laminar hava akışlı iki kabin arasında 5 kat fiyat farkı olabilmektedir. Aynı şekilde cam eşya satıcılarından elde edilecek şişe veya kavanozlar ithal olanlarıyla aynı dayanıklılığa sahip olabilir (Babaoğlu, 1998).

Doku kültürünün uygulanabilmesi için bazı temel tekniklerin iyi bilinmesi ve kullanılacak alet ve ekipmanların temin edilmesi gerekmektedir. Bu teknikler laboratuvar düzeni, besin ortamlarının hazırlanması, sterilizasyon ve doku kültürü teknikleridir. Detaylı bilgiler George *ve ark.* (1987), Gamborg ve Phillips (1995), ve George (1993, 1996)'dan sağlanabilir. Bitki doku kültüründe 1991-1997 yılları arasında üzerinde çalışılan bazı konular, uygulanan teknikler ve sistemler Tablo 1.13'te verilmiştir (Herman, 1995, 1997). Burada amaç, doku kültüründe mevcut çalışma alanlarını ve doku kültürünün farklı uygulamalarını ortaya koyarak araştırmacılara ışık tutmaktır.

Dünyada şu ana kadar 2500 bitki türünün doku kültürünün yapıldığı tahmin edilmektedir. Daha önce yapılan çalışmaların tekrarı olmasını önlemek için üzerinde çalışılacak bitki türü ile ilgili çok iyi bir literatür taraması yapıldıktan sonra çalışmaya başlanması tavsiye edilir. Türkiye'ye has ekotipler üzerinde durmak araştırmanın ayrıcalıklı olmasını sağlayacaktır. Çalışılacak bitki materyalinin seçimi de bu bakımdan çok önemlidir. Bazı bitki türleri diğerlerinden daha iyi bir cevap verme kabiliyetine sahiptirler. Bazı bitkiler ise henüz hiç denenmemiştir.

Eksplant seçimi de dikkat edilecek en öncelikli konular arasındadır. Toprak üstü parçalar toprak altı parçalardan daha az kontaminasyona uğramıştır. Yine bir bitkide iç dokular dış dokulardan daha az kirlilik unsuru taşırlar (eksplant ne kadar küçük olursa kontaminasyon riski o kadar fazladır). Eksplant yaşı, rejenerasyon kapasitesi ile ters orantılıdır. Yani genç dokular daha başarılı sonuçlar verir. Çiçeklenme dönemi ve sonrası bitkilerden alınan eksplandlar doku kültürü için hiç uygun değildirler. *In vitro* fidelerden elde edilen eksplandlar en uygun kaynak materyalidirler (Werbrouck ve Debergh, 1994).

Eğer çalışılacak çeşidin ait olduğu türdeki başka bir çeşide ilgili protokoller geliştirilmişse öncelikle benzer protokoller tatbik edilmeli, sonuç alınmazsa bunlar değiştirilerek uygulanmalıdır. Eğer çalışılacak tür ile ilgili hiçbir çalışmaya rasdanamazsa o türün ait olduğu cinsteki diğer türlerle ilgili protokollerin denenmesi yine sonuç alınmazsa, hormon grid metodunun (Franklin ve Dixon, 1994) uygulanması zaman ve besin ortamı kazancı sağlayacaktır. Genel olarak bu metot ile kullanılan temel besin ortamlarından birisi (örnek: MS), sakkaroz (%3, a/h), agar (%0.8, a/h) ve en çok uyum gösteren oksin x sitokininlerden (Örnek: 2,4-D x KIN veya NAA x BAP) birisi seçilir. Sadece bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları değiş tirilefek hâZii'kftâfl 25 fülflll

kombinasyondaki besin ortamları 25 bölme (5x5) Petri kutularına (Sterilin Ltd., LCJL—, UIQ, L L.İ4Î UU^ 2 *vd olacak doldurulmuş ve eksptktır bu bölmelerde kùltüre alınır. Bu metodun bir çok avantajı vardır. Eğer araştırmacı şanslı ise aynı Petri kutusunda kallus oluşumunu, somatik embriyo oluşumunu (genelde yüksek oksinli besin ortamı içeren bölmelerde), kök oluşumunu (nözogenesis, yaklaşık oksin ve sitokinin içeren bölmelerde) ve organogenesis yoluyla bitki re jenerasyonunu (yüksek sitokinin içeren bölmelerde) aynı anda görebilir veya bunlardan sadece birisini gözleyebilir. Uygun gelişmenin görüldüğü bölmelerdeki ortam ve komponentleri daha dar aralıkta bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarında yeniden denir ve deney optimize edilir (Babaoğlu, 1998).

Besin ortamı hazırlama doku kùltüründe en önemli konulardan biridir. Isı ile bozulabilen maddeler (IAA, zeatin, vitaminler, antibiyotikler vb.) mutlaka filtre (0.22 µm porozitede) ile sterilize edilmelidir. Otoklavda uzun süre kalan yarı-kati besin ortamlarında pH'nın düşmesinden dolayı ağar katılaşmayabilir.

Bir türde doku kùltürüne başlamadan önce çalışmaya etkili olan faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekir. Bunlar genotip (tür veya çeşit), eksplant kaynağı, özellikleri, ontogenetik devresi ve kùltür şekli ile besin ortamları, bitki büyüme düzenleyicileri, nem, sıcaklık, ışık gibi kùltür şartlarıdır. Genotipik etki monokotiledonlarda dikotiledonlara göre daha belirgindir ve henüz olgunlaşmamış dokuların eksplant kaynağı olarak (örnek: embriyo) kullanılması tavsiye edilmektedir (Henry *ve ark.*, 1994; Maheswari *ve ark.*, 1995). Kùltürlerin alt kùltürlere alınma zamanının iyi tespit edilmesi, her alt kùltürde mutlaka çok sayıda (en az 3-4) tekrür yapılması, mümkünse ayrı kùltür odalarında saklanması ve canlılık testlerinin yapılması gerekir. Uzun süreli kùltürlerde arada bir rejenerasyon kabiliyeti, somaklonal varyasyon ve kontaminasyon olup olmadığının kontrolü materyalin korunması açısından önemlidir.

Gözlemlerin gerçeğe dayalı olarak (yorum yapmadan) bir deftere ve bilgisayar disketine kaydedilerek kopyasının ayrı bir yerde saklanması ve önemli kùltürlerin mudaka resimlerinin çekilmesi gerekmektedir. Rejenerasyon mekanizmasının sitolojik tekniklerle belirlenmesi ve resimlerinin çekilmesi sonuçların yayınlanmasında avantajlar sağlar (Babaoğlu, 1998).

Sadece canlı ve normal görünümde olan bitkiciklerin (rej en er an darın) seraya şaşırtılmasına, şeffaf, sulu görüntüde (camlaşmış, vitrifiye olmuş) ve yeterince köklenmemiş olanların ise kullanılmamasına dikkat edilmelidir. Seraya şaşırtıldıktan sonra saksıların şeffaf plastik torbalarla kapatılması ve çok nemli bir ortam sağlanması canlılığın korunmasında önemlidir. Yine rejenerasyon yoluyla elde edilen ve köklendirilen bitkilerde döl kontrolü (progeny testi) yapılmalıdır.

Doku Mtümnûe çalışanların yurt İÇİ ve yurt dışı eğitim, konferans ve seminerlere katılması, yurtdışı ortak projelerin yapılması, klasik ıslah çalışmalarıyla paralel çalışılması, özel sektör-üniversite işbirliği sonucu projelerin yapılması (Gözen *ve ark.*, 1995) diğer tavsiye edilen konulardır.

Kullanılan birim ve terimler.

Bazı birimler;

1 pg— 1 mikrogram, 1 mg= 1 miligram (1000 pg), 1 g= 1 gram (1000 mg), 1 kg= 1 kilogram (1000 g), 1 pl= 1 mikrolitre, 1 ml= 1 mililitre (1000 pl), 1 l= 1 litre (1000 ml), 1 cc (cubic centimetre) = 1 ml

Bilimsel yayınlarda besin ortamı komponentleri ve bitki büyüme düzenleyicilerinin miktarı mg/l (mg l⁻¹) ve özellikle molar seviyede (M, mM veya μ M) ifade edilir. Şekerler, katı formda ilave edilenler ve jel yapıcı maddeler ise % (a/h) olarak ifade edilmektedir.

mg/l (mg F)

mg/l = 1 litre sıvı içinde mg olarak ilgili madde miktarı

1 ppm (milyonda bir) = 1 mg/l (özgül ağırlık 1 alındığında)

Molar (M)

1 Molar (M) bir litrede ilgili maddenin gram olarak moleküler ağırlığı kadar, milimolar (mM) miligram olarak, mikromolar (μ M) ise mikrogram olarak bulunmasıdır. Örnek: 1 M KNO₃ = 101.1 g KNO₃/litre; 1 mM KNO₃ = 101.1 mg KNO₃/litre; 1 μ M KNO₃ = 101.1 μ g KNO₃/litre'dir.

Yüzde (%) karışımlar

v/v (völüm/völüm) = hacim/hacim (h/h) = Sıvı içinde sıvı yüzdesi

w/v (weight/volume) = ağırlık/hacim (a/h) = Sıvı içinde çözünmüş katı yüzdesi

w/w (weight/weight) = ağırlık/ağırlık (a/a) = Katı içinde katı yüzdesi

Bir bileşiğin %10 (a/h)'luk konsantre solüsyonu; 100 ml çözücü içinde 10 g madde var anlamına gelir. Benzer şekilde %10 (h/h) konsantre solüsyonu 100 ml çözücü içinde 10 ml sıvı konulmuş demektir.

Not: Çevirmeler 1 g = 1 ml = 1 cm³ eşit olarak kabul edildikten sonra yapılmalıdır.

Tablo 1.13. Bitki doku kültüründe 1991-1997 yılları arasında üzerinde çalışılan bazı konular, UYMİmn icitnik ve sistemler (Herman, 1995, 1997).

- Besin ortamlarındaki farklı karbon kaynaklarının (şekerler) doku kültüründe etkileri
- Besin ortamlarının mikrodalga, otoklav, filtre veya alkolle sterilizasyonu
- Laboratuvar da ve kültür odalarında kontaminasyon problemleri ve çözüm yolları
- Doku kültüründe kullanılan malzemelerin çevreye, doku ve hücrelere zararları
- Hormonlar ve bitki büyüme düzenleyicilerinin doku kültürlerinde etkileri
- Kimyasal olarak tanımlanamayan maddelerin doku kültüründe kullanımı
- Kültür kaplarının izolasyonu için kullanılan malzemeler
- pH, fitotoksite ve nörs kültürlerinin doku kültüründe etkileri
- Sitokinin ve oksinlerin köklenmeye etkisi ve mikroçoğaltımda kullanımı
- Ucuz alet, ekipman ve besin ortam kaynaklarının bulunması
- Yeni bitki büyüme düzenleyicilerinin doku kültürlerinde kullanımı
- Eksplantların besin ortamında farklı kültür pozisyon ve şekilleri
- Mikorizal funguslar ve besin ortamlarında kullanımı
- Dayanıklı (hastalık ve strese) hücrelerin *in vitro* seleksiyonu
- Rejenerasyon (direkt veya indirekt) mekanizmasının genetik kontrolü
- Doku kültürüne uygunluk genlerini aktarmak için *in vitro* melezlemeler yapılması
- Etilenin doku kültürlerinde etkileri
- Etiyolasyon ve doku kültüründe etkisi
- Hiperhidrisite (aşırı sulanma) ve aklimatizasyon
- Kallus ve süspansiyon hücrelerinin özellikleri
- Kimeralar ve süs bitkilerinde uygulanması
- Kromozom katlanması ve doku kültüründe kullanımı
- Rejenerasyon kabiliyeti iyi olan hücre ve dokuların tespiti ve seçilmesi
- Sentetik tohum üretimi ve kaplama sistemleri
- Somatik embriyo uyarılması, değişimi, olgunlaşması ve saflaştırma
- Uzun süreli hücre kültürlerinde ortaya çıkan varyasyonlar ve bunun nedenleri
- Hücre bölünmesi ve organ oluşumunun vb. görüntülü analizi
- Bitki doku kültürlerinde havalandırma, ışıklandırma ve yoğunlaşmanın önlenmesi
- Elektrik şoku ile hücrelerin bölünmesinin ve bitki rejenerasyonunun uyarılması
- Biyoreaktörlerde otomasyonla hücre kültürlerinin çoğaltılması
- Mikroçoğaltımda problemler (sürgün uzaması, köklendirme)
- Apikal meristem hücrelerinin özellikleri ve virüsten ari bitki eldesi
- Besin ortamın yarı-katı hale getirici (jel yapıcı) maddelerin etkileri
- Hücre duvarı rejenerasyonu ve mitotik bölünmenin başlamasında etkili faktörler
- Protoplast füzyonunda elektrik ve kimyasalların kullanımı ve karşılaştırılmalan
- Protoplast izolasyonunda kullanılan enzimlerin hazırlanması ve saflaştırılması
- Protoplastların farklı şekillerde kültürü (katı-katı, sıvı, şeffaf membranlar üzerinde veya yüzen kültürler)
- Protoplastların yıkanması, osmotik basıncın düzenlenmesi
- Transgenik organ kültürleri (tüylü kökler) ile sekonder metabolit üretimi
- Asimbiyotik *in vitro* çimlendirme (endosperm oluşturmamayan türlerde)
- *In vitro* azot fiksasyonu ve baklagil olmayan bitkilere uygulanması

1.10. Türkiye’deki Mevcut Durum ve Sonuç

Genetik olarak değiştirilmiş 70’den fazla bitki türünün hepsinde bir takım doku kültürü teknikleri uygulanmıştır (Brown ve Thorpe, 1995). Genetik mühendisliğinin gelişmesinde doku kültürleri etkili olmaya devam edecektir. Modern tarımda en fazla 150 bitki türünün tarımının yapıldığı ve bunların iyileştirilmesinde klasik yöntemlerin sınırına gelindiği düşünülürse bitki doku kültürü tekniklerinin süratle geliştirilmesinin ve uygulanmasının önemi daha iyi anlaşılır. Bitki doku kültürünün en önemli etkisi ve uygulama alanı, mikro çoğal tımda ve bundan daha önemlisi bitkilerin hücre seviyesinde kontrollü manipülasyonunda olacaktır. Bunlar; soğuğa, kurağa, tuza, ağır metallere, herbisitlere, hastalık ve zararlılara dayanıklılıktır.

Benzer şekilde uzun raf ömrü ve depolamaya dayanıklılık, kesme çiçeklerde vazo ömrünün uzatılması, patojensiz bitki elde etmede meristematik hücrelerin kullanımı ve bu hücrelerin özellikleri, somatik melezlemeler yoluyla a) sitoplazmik er kısırlığın aktarılması ve hibrit ıslahında kullanımı, b) farklı çiçek renklerinin elde edilmesi c) azot fiksasyonu özelliğinin baklagil olmayanlara aktarılması (özellikle tahıllar ve çok yıllıklar), d) kombine bitkilerin eldesi (Pomato veya Tomapo^ domates patates melezi) ve e) triploid bitki eldesi, bitkilerde yağ ve şeker oranının artırılması çalışmaları, doku kültürüne uygun olmayan fakat ekonomik değeri yüksek olan tür, çeşit veya biyotiplerde doku kültürüne uygunluğu sağlayan genlerin klasik ıslah metotları ile aktarılması ve daha sonra doku kültürü tekniklerini uygulayarak *in vitro* genetik manipülasyon yapılması, hücre kültürleri veya transgenik bitkiler ile çeşitli endüstriyel enzimlerin üretimi, somatik embriyogenesis yoluyla sentetik tohum üretimi, özellikle çayır-mera alanlarında kuraklığa dayanıklı bitki tohumlarının çoğaltılması, asimbiyotik *in vitro* çimlendirme, tohum ve fide üretimi (patateste minitüber eldesi vb.), hibrit tohumlarda genotip bozulmadan vejetatif yollarla fide eldesi, yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olan bitki türlerinin doku kültürü ile korunarak çoğaltılması ve Türkiye’de hücre ve doku bankalarının kurulması, ev imkanları ile ‘evde doku kültürü’ çalışmalarının yapılmaya başlanması ve bunu takiben süper marketlerde hücre kültürlerinin ve bunlara uygun kültür ekipmanlarının satılması gibi konuların hepsi doku kültürünün gelecekte etkili olacağı alanlar olarak gözükmektedir.

1995 yılı itibariyle bitki biyoteknolojisi ile ilgili araştırma yapan (tekniker, lisansüstü öğrencisi, araştırmacı vb.) 200 civarında kişinin yarıya yakın bir kısmı doku kültürü ile uğraşmaktadır. Bugün bu sayının en az ikiye katlandığı söylenebilir. Üzerinde çalışılan bitkiler sırasıyla tahıl, baklagil, sebze, meyve, çiçek, odunsu bitki ve yağlı tohum türleridir.

Gözen *ve ark.* (1995) tarafından yapılan bir araştırmada ekonomik önem ve teknik uygunluk (uygulamada kolaylık), çalışılacak bitki türünün seçiminde en önemli kriterler olarak tespit edilmiştir. Yine aynı araştırmaya göre ortaya çıkan ve dünyadaki genel durumla da paralellik gösteren sonuç sosyo-ekonomik değeri yüksek olan türlerin doku kültürünün daha zor olması nedeniyle bu türlerdeki

gelişmenin daha yavaş olduğu (örnek: buğday, şeker pancarı, pamuk, mısır) ve **urmalaıvıla ıraDıyl» yag bukiıcn, endüstri bitkileri, sebzeler, meyveler ve tahıllara** öncelik verilmesi gerektiğidir. Ayrıca, üzerinde hiç doku kùltürü çalışılması yapılmamış bitkiler de tercih edilen bitkiler olmuştur.

Türkiye’de 25 yıl önce başlayan bitki biyoteknolojisi çalışmaları, başlangıçta doku kùltürleri üzerinde yoğunlaşmış, son 10 yılda da moleküler biyoloji ve moleküler genetik teknikleri ile bütünleşmeye başlamıştır. Şu anda küçükü büyüü bir çok laboratuvar da araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalarda virüssüz meyve ve asma fidanı üretimi, dihaploid hadarın üretimi ile ıslah süresinin kısaltılması (örnek: buğday) ve hastalıklara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi gibi konularda pratik sonuçlar elde edilmiştir.

TÜBİTAK, Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı, Türkiye Tohum Endüstrisi Demeğı, üniversite ve diğr araştırma kuruluşlarından katılımcılar Türkiye’de bitki biyo teknolojinin durumunu, önceliklerini ve stratejilerini belirlemek, ve bu konuda yasal düzenlemeleri oluşturmak için çaba harcamaktadırlar. Bu konuda en önemli adımlardan birisi üniversitelerden gelmiştir. Bir çok üniversitenin çeşitli anabilim dallarında bitki biyoteknolojisi ile ilgili dersler uygulamalı olarak okutulmaya başlanmıştır.

Kaynaklar

- Austin S (1997) Production of industrial enzymes in transgenic alfalfa. In: Plant Biotechnology Laboratory. UWBC, USA.
- Babaoğlu M (1998) Bitki doku kùltürleri ve geleceğı. Tarımda Yeni Ufuklar Sempozyumu. Türk Ziraat Yüksek Müh. Bir. Vakfı, s. 142-148. Ankara.
- Brown DCW, Thorpe TA (1995) Crop improvement through tissue culture. World J. Microb. Biotech., 11: 409-415.
- Chrispeels MJ, Sadava DE (1994) Plants, Genes and Agriculture., pp. 58-81, Jones and Barlett Publishers, London, UK.
- Endress HR (1994) Basic techniques. In: Plant Celi Biotechnologies, pp. 16-17, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Faure O, Diemer F, Moja S, Jullien F (1998) Mannitol and thidiazuron improve *in vitro* shoot regeneradon from spearmint and peppermint leaf disks. Plant Celi. Tis. Org. Cult., 52:209-212.
- Franklin CI, Dixon RA (1994) Initiaodon and maintenance of callus and celi suspension cultures. In: Dixon RA, Gonzales RA (eds), Plant Celi Culture - A Practical Approach, Second Edidon, pp. 1-27, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutntion requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Celi Res., 50:151-159.

M. Babaoğlu, M. Yorgancılar, M.A. Akbudak

Gamborg OL, Phillips GC (1995) Laboratory facilities, operation, and management. In: Gamborg OL, Phillips GC. (eds), Plant Celi, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

George EF, David JM, Puttock BS, George HJ (1987) Plant Culture Media: Formulations and Uses. Volume 1, 567 sayfa, Exegetics Ltd, England.

George EF (1993) Plant Propagation by Tissue Culture. Part I. The Technology, Second Edition, 574 sayfa, Exegetics Ltd., England.

George EF (1996) Plant Propagation by Tissue Culture. Part 2. In practice., 799 sayfa, Exegetics Ltd., England.

Gözen A, Abak K, Kasnaoğlu H, Çetiner S, Güzel A (1995) Türkiye’de Bitki Biyoteknolojisi Öncelikleri. Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı, Yay. No: 2, s. 227-229, Ankara,

Hatipoğlu R (1993) Bitki Biyoteknolojisine Giriş. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Notu No: 129, Adana.

Henry Y, Vain P, De Buyser J (1994) Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. Euphytica, 79: 45-58.

Herman EB (1995) Regeneration and micropropagation: Techniques, systems and media 1991-1995. In: Herman EB (ed), Recent Advances in Plant Tissue Culture, Vol. 3., Agricell Report.

Herman EB (1997) New techniques and systems for growth, regeneration and micropropagation 1995-1997. In: Herman EB (ed), Recent Advances in Plant Tissue Culture, Vol. 3., Agricell Report.

Hosokawa K, Nakano M, Oikawa Y, Yamamura S (1996) Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars of *Gentiana*. Plant Celi Rep., 15(8): 578-581

Kozai T (1991) Acclimatization of micropropagated plants. In: Bajaj YPS (ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17, High-Tech and Micropropagation I, pp. 127-141, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Kung S-D (1993) Introduction: From green revolution to gene revolution. Transgenic Plants Vol. 2. Present Status and Social and Economic Impacts, pp. 146-177, Academic Press.

Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 18: 100-127.

Magioli C, Rocha APM, de Oliveira DE, Mansur E (1998) Efficient shoot regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. Plant Celi Rep., 17(8): 661-663.

Maheswari N, Rajyalahmi K, Baneja K, Dhir SK, Chowdry CN, Maheswari SC (1995) *In vitro* culture of wheat and genetic transformation. Retrospect and prospect. Critic. Rev. Plant Sci., 14(2): 149-178.

- Malik AK, Saxena PK (1992) Thidiazuron induces high-frequency shoot regeneration in *limct* scedlines of *DC2 C PİSUMsativum*). chickpea and lenti] Aust. J. Plant Physiol., 19: 731-40.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- Nitsch JP, Nitsch C (1969) Haploid plants from pollen grains. Science, 163: 85-87.
- Ochatt SJ, Power JB (1992) Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: MW Fowler, GS Warren, M Moo-Young (eds) Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology, Second supplement, pp. 99-127, Pergamon Press.
- Owen HR, Miller AR (1992) An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations. Plant Celi Tis. Org. Cult., 28: 147-150.
- Pierik RLM (1993) Micropropagation: Technology and opportunities. In: Prakash J, Pierik RLM (eds), Plant Biotechnology. Commercial Prospects and Problems. p. 9, Intercept Ltd. UK.
- Niedz RP (1998) Using izothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue culture. HorTechnolgy, 8(4): 598-601.
- Roussy I, Dubois F, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS (1996) In planta 2,3,5 triiodobenzoic acid treatment promotes high frequency and routine *in vitro* regeneration of sugarbeet (*Beta vulgaris*L) plants. Plant Celi Rep., 16: 142-146
- Schenk RU, Plildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant celi cultures. Can. J. Bot., 50: 199-204.
- Sigma Kataloğu (1998) Biochemicals, organic compounds and diagnostic reagents. Sigma Corporation, USA.
- Sigma Celi Culture (1995) Catalogue & Price List, Sigma Corporation, USA.
- Sigma Plant Celi Culture (1994) Sigma Corporation, USA.
- Smith R (1992) Plant Tissue Culture Techniques and Experiments. pp. 1-27, Academic Press Inc., UK.
- Tisserat B, Jones D, Gailletta PD (1992) Microwave sterilisadon of plant tissue culture media. HortScience, 27(4): 358-361.
- Werbrouck PO, Debergh PC (1994) Applied aspects of plant regeneration. 6A. Micropropagation. In: Dixon RA, Gonzales RA (eds), Plant Celi Culture. A Pracdcial Approach. Second Edition, pp. 127-135, Oxford Press, UK.
- White FF (1993) Vectors for gene transfer in higher plants. In: Kung SD, Wu R (eds), Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, pp. 15-48, Academic Press.

Bölüm 2

Organogenesis

Ekrem Gürel, Arzu Uçar Türker

*Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 14280 Bolu
e-posta: ekrem@ibu.edu.tr*

2.1. Giriş

Farklı iki gametin füzyonla bir araya gelerek, zigot denilen tek hücreli bir yapıyı meydana getirmesi olarak tanımlayabileceğimiz döllenme, aslında eşeyli üreyen bir bitkinin hayat döngüsündeki en önemli biyolojik olaylardan birisidir. Döllenmeyi takiben, hızlı bir mitotik döngüye giren zigot, sonuçta yüksek yapıli bir bitkinin çok-hücreli (doku) ve çok-organlı (organizma) bünyesini meydana getirir. Bunlar arasında; meristem (sürgün ucu, kök ucu, vasküler kambiyum), iletim (ksilem ve floem), epidermis (stoma, trikoma, kök tüyü), parenkima, kollenkima ve sklerenkima (lifler, sklereidler) gibi farklı dokular ile kök, sürgün, yaprak ve çiçek gibi farklı organları sayabiliriz (Yentür, 1995). Tek hücreli bir yapı olan zigotun milyonlarca mi toz bölünme geçirdiği dikkate alındığında, bitkinin bünyesini oluşturan bütün bu hücrelerin; ister çiçeğin, ister iletim dokusunun veya isterse kök veya gövdenin yapısına katılsın, teorik olarak zigotta varolan genetik materyalin aynısına sahip olmasını bekleriz. Dolayısı ile, genetik olarak bir birinin aynısı olan bu hücrelerin göstermiş olduğu geniş yapısal varyasyon şunu göstermektedir ki bu hücreler üzerinde genetik faktörlerden ziyade başka faktörler de etkili olmaktadır. Söz konusu bu varyasyonların, diğeri bir ifadeyle farklı doku ve organların, meydana geldiği bu süreç bitki büyüme ve gelişme fizyolojisinde farklılaşma (differentiation) olarak adlandırılmaktadır (Bozcuk, 1997; Kadioğlu, 1999). Burada sorulması gereken temel soru, acaba farklı hücre tiplerinin ortaya çıkmasına yol açan bu değişiklikler kalıcı ve geriye dönüşümü olmayan bir süreç midir yoksa organ veya organizmanın içinde bulunduğu şartlardan dolayı ortaya çıkabilecek bazı

fonksiyonel ihtiyaçlara göre, halihazırda farklılaşmasını tamamlamış olan bu **yeniden hasla bir hücre veya doku tipine dönüşebilirler** *Aslında bir* bitkinin normal hayat döngüsüne baktığımızda, mezofil veya epidermis hücresi olarak farklılaşan bir hücre yine bir mezofil veya epidermis hücresi olarak yaşamını tamamlar ve bu hücreler her hangi bir meristemaük özellik göstermezler. Bu bize, ilk etapta farklılaşmanın kalıcı bir süreç olduğunu gösterebilir fakat son yüz yılı aşkın bir süredir yapılan çalışmalar göstermiştir ki tamamen farklılaşan hücreler, bozulmamış bir hücre zarı sistemi ile canlı bir çekirdeğe sahip olduğu sürece, tekrar meristematik bir özellik kazanarak mitotik bölünme gösterebilirler. Bu bölünmeler sonucunda, ya doğrudan adventif sürgün veya kök (direkt organogenesis) yahutta önce organize olmamış bir hücreler yığını olan kallus ve daha sonrada bu kallustan sürgün veya kök meydana gelir (indirekt organogenesis) (Gürel, 1997c). Tamamen farklılaşmış bitki dokusunun bu şekilde organize olmamış hücreler yığına dönüşmesine tersine-farklılaşma (de-differentiation), böyle bir yığından sürgün veya kök şeklinde tekrar bir morfolojik farklılaşmaya gidilmesine ise yeniden-farklılaşma (re-differentiation) denilmektedir. Böylece, bitkiyi meydana getiren ve nihai farklılaşmasını tamamlamış olan canlı hücrelerden herhangi birisi tekrar bölünerek ve farklılaşarak yeni bir bitki meydana getirebilme kapasitesine her zaman sahiptir. Hayvansal organizmalardan farklı olarak bitkisel dokularda gözlenen bu özel yetenek *totipotensi* olarak adlandırılmaktadır. İşte doku kültürünün gücü de burada yatmakta ve bu kapasite kullanılarak protoplastların, hücrelerin, dokuların ve organların kültürleri yapılarak *in vitro* bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmektedir. Ayrıca doku kültürü tekniklerinden sitolojik, histolojik ve organogenik farklılaşmayı kontrol eden faktörlerin belirlenmesinde de yararlanılmaktadır.

2.2. Tarihçesi

Organogenesis, hücelere ve dokulara baskı uygulanıp bazı değişikliklere sebep olunarak sürgün veya kök primordiyumu (taslağı) diye isimlendirilen tek kutuplu ve vasküler sistemi kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının meydana gelmesine yol açan bir işlemdir. Somatik embriyogenesis ise, bağımsız vasküler sistemi olan ve kök ile sürgün aksisini içeren iki kutuplu bir yapının oluşmasına yol açan bir süreçtir. Gerek organogenesis ve gerekse somatik embriyogenesis birçok türde doğal olarak meydana gelmektedir. Dolayısı ile, aslında doku kültürü yaklaşımı ile bu tür gelişmelerin oluşturulabileceği bitki türlerinin sayısının ve üretim miktarının artırılması mümkündür.

Yukarıda da açıklandığı gibi, *in vitro* olarak yetiştirilen bitki dokuları farklılaşabilmekte ve yeni organlar oluşturabilmektedir. Bu tür organlara örnek olarak kök, sürgün ve çiçekler verilebilir. *In vitro* kontrollü sürgün gelişiminin ilk kayıdı White (1939) tarafından yapılmıştır. Bu araştırmacı, sıvı besin ortamına gömülmüş *Nicotiana glauca* x *Nicotiana langsdorffii* melezlerinden elde edilen kallus

üzerinde sürgünlerin oluştuğunu gözlemiştir. Fakat bunu ağar ile katılaştırılmış besin ortamında yetiştirilen kallusta gözleyememiştir. Aynı yıl, kallustan kök oluşumunun ilk gözlemleri Nobecourt (1939) tarafından havuç kalkışları kullanılarak yapılmıştır. Takip eden yıllarda White (1939)'m gözlemleri Skoog (1944) tarafından da doğrulanmış ve geliştirilmiştir. Bu araştırmacı, oksinin kök oluşumunu uyardığını ve sürgün oluşumunu engellediğini göstermiştir. Bunun yanında, Skoog (1944) oksinin sürgün oluşumundaki engelleyici etkisinin, ortamdaki sakkaroz ve inorganik fosfatların miktarını artırarak kısmen de olsa ortadan kaldırılabileceğini göstermiştir. Skoog ve Tsui (1948), adenin sülfatın sürgün oluşumunu ilerletmekte ve oksinin engelleyici etkisini yok etmekte aktif olduğunu göstermiştir. Aynı araştırmacılar, bu sonuca ek olarak organ oluşumunun ilerlemesinin bu eklenen maddelerin konsantrasyonu ve oranı ile ilgili olduğunu kaydetmişlerdir. Benzer sonuçlar diğer laboratuvarlarda da kaydedilmiş ve takip eden yıllarda *in vitro* koşullarda organ oluşturan türlerin sayısının hızla artmasına yol açmıştır. 1956 yılında Miller *ve ark.* tarafından kinetinin keşfedilmesi, Skoog ve Miller (1957)'in bildiğimiz klasik buluşunu ortaya çıkarmıştır. Tütün kallusu ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki oksinin, sitokinine göre ortamda yüksek olan oranı kök oluşumunu, tersi ise sürgün oluşumunu ve arada olan oranlar ise kallus gelişimini desteklemektedir. Bu yaklaşım sonucunda *in vitro* sürgünler ve/veya kökler oluşturan yüzlerce bitki türü kaydedilmiştir (Gürel, 1998b).

2.3. Organogenesis Tekniği

In vitro organogenesis üzerine yapılan araştırmaların büyük bir kısmında, etkin bir organ oluşumunun yerine getirilebilmesi için gerekli olan şartlardan en önemli olanları arasında; 1) uygun eksplantın seçilmesi, 2) büyümede aktif maddeleri içeren uygun bir besin ortamının seçilmesi ve 3) fiziksel çevre koşullarının kontrolü sayılabilir (Murashige, 1974; Evans *ve ark.*, 1981; Ammirato, 1983).

2.3.1. Eksplant seçimi

Organogenesisde başarı elde etmenin en önemli koşullarından birisi, uygun bir eksplant kaynağının seçilmesidir. Başta genotipik varyasyon olmak üzere (Gürel ve Wren, 1995b), çeşitli faktörler kültüre alınan eksplantın davranışını etkileyebilir. Bunlar; (a) doku kaynağı olarak kullanılan organ (Gürel, 1997b), (b) organın ontogenetik ve fizyolojik yaşı (Gürel, 1993), (c) eksplantın bitkiden alındığı dönem, (d) eksplantın büyüklüğü ve (e) eksplantın alındığı bitkinin diğer genel özellikleridir. Bu faktörler, Narayanaswamy (1977) ve Murashige (1979) tarafından daha önce detaylı bir şekilde tartışılmıştır. Bu faktörlerin bazıları kolay bir şekilde kontrol edilebilirken, bazılarının kontrolü fevkalade zor olmakta ve böylece üretilebilir benzer materyallerin seçimi daha problemlili hale gelmektedir. Normal şartlarda, herhangi bir bitki parçası organogenesis çalışmalarında eksplant olarak kullanılabilir

fakat yaygın olarak kullanılanlar şunlardır; gövde (Skoog ve Tsui, 1948), kök (Earle > ^ İQİİ), (Cü*H, 100L), lumm (Kaul ve Sabhanval, 1972), yumurtalık veya yumurta hücresi (Gürel ve ark., 1998), kotiledon ve hipokotil gibi fide organları (Gürel ve Kazan, 1998) ve tohum embriyosu (Sommer ve ark., 1975). Bu tür eksplantlar direkt olarak veya kallus üzerinden indirekt olarak organ ve embriyo oluştururlar. Bazı türlerde kullanılabilir diğer bir eksplant kaynağı da ince hücre katmanlarıdır (thin celi layers), örneğin 3-5 hücre içeren epidermal ve subepidermal katmanlar (Tran Thanh Van, 1981). Bu hücre katmanlarından direkt olarak çiçek tomurcuğu, vejetatif tomurcuk, kök ve kallus oluşturmak mümkündür. Fakat herhangi bir tür veya çeşidin başarılı bir rejenerasyonu için özel bir eksplant gerekli olabilir, örneğin bazı tahıllarda embriyonik doku başarılı sonuçlar vermektedir. Bunun yanında, sürgün uçları veya mitotik olarak aktif hücreleri içeren izole edilmiş meristemler, kallus oluşumunu başlatmada ve sonraki sürgün oluşumunu gerçekleştirmede daha başarılı sonuçlar verebilir (Vasil and Vasil, 1986).

Kallus, aseptik ortamlar altında düzenli zaman aralıkları ile altkültür yapıp yeni ortamlara (yarı-katı ve/veya sıvı) aktarılacak uzun bir süre korunabilir. Fakat, dış görüntüsüne rağmen, kallus tekdüze (değişmez) bir doku değildir. Hücre büyüklüğü ve şekli, vakuolleşme oranı, sitoplazmik içeriği ve hücre duvarının yapısı bakımından çeşitli farklılıklar gösterebilir. Bunun yanında, kültürleri yapılan dokularda fizyolojik ve biyokimyasal farklılıklar da vardır. Fakat tipik kallus hücresi fazlaca vakuollü parenkima hücresidir ve çok ince çevresel bir sitoplazma katmanı ile hücre duvarına karşı baskılanmış bir çekirdeğe sahiptir. Ayrıca, altkültür yapılmış kalkışlarda trakeri elemanlarına da rastlamak mümkündür. Bu nedenle, askıda kallus hücrelerini farklılaşmamış hücreler yığını olarak değil, herhangi bir organizasyon göstermemiş hücreler yığını olarak tanımlamak daha doğrudur.

Kallusun uzun süre altkültüre akması bazı yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Bunlardan en sık olarak görülenler şunlardır: (a) büyüme ve gelişme için gerekli olan eksojen (dışarıdan verilen) hormon gereksiniminin ortadan kalkması, diğer bir ifadeyle kallus hücrelerinin bölünme ve gelişme için artık eksojen bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duymamaları ve neticede 'hormon-otonom' bir kallusun meydana gelmesi (habituation), (b) organogenik potansiyel yani yeni adventif sürgün veya kök meydana getirme yeteneğinin azalması veya tamamen ortadan kalkması, (c) kallus dokusunun yapısında bazı değişikliklerin kendikğinden ortaya çıkması, örneğin nispeten daha küçük hücrelerden meydana gelmiş sık yapık (compact) bir kallus veya daha büyük ve şeffaf hücrelerden meydana gelmiş gevşek yapık (friable) bir kallusun meydana gelmesi (Gürel, 1997a). Genel olarak, bu değişiklikler kallus dokusunun organize olma kapasitesini azaltırken bazı avantajlar da sağlayabilir. Örneğin, gevşek yapık kallus kullanıldığında, hücre süspansiyonlarının başlatılması daha kolay gerçekleşir. Sadece ortamdaki oksijen konsantrasyonunu artırarak (Torrey ve Reinert, 1961) veya ortama giberelk asit

(GA₃) ekleyerek, veya eklemeyen sadece sitokinin konsantrasyonunu düşürerek (Lance *ve ark.*, 1976) bu tür dokulardan süspansiyon kültürleri kolayca başlatılabilir.

Aynı bitki türünden alınan eksplantlar organogenesis oluşturma kapasitesi bakımından büyük farklılıklar gösterebilirler. Bunun yanında kallus homojen değildir ve kültürde yaş ile birlikte çeşitli değişikliklere maruz kalmaktadır. Bu nedenle, organogenesis çalışmalarında eksplant kaynağı seçilirken, söz konusu bu faktörlerin dikkate alınması gerekir. Bu husus, sitolojik bakımdan benzer olan hücrelerin biyokimyasal yeterliliklerinde büyük farklar olduğu anlaşıldığı zaman daha da önemli bir hale gelmektedir.

2.3.2. Besin ortamının seçilmesi

2.3.2.1. Besin ortamının temel içerikleri

Besin ortamının temel içerikleri 4 sınıf altında toplanabilir; inorganik maddeler, organik maddeler, bitki büyüme düzenleyicileri ve doğal kompleksler.

İnorganik maddeler: İlk kullanılan inorganik tuz formülleri White (1943) ve Heller (1953) tarafından geliştirilmiştir. White'in mineral tuz ortamı dünya çapında kullanılmasına rağmen, Heller'in formülü sadece Avrupa kıtası içerisinde sınırlı kalmıştır. 1960'ların başlangıcından itibaren çok daha fazla sayıda araştırmacı, Murashige ve Skoog (1962)'un yüksek tuz formülasyonlarını veya bunların türevlerini kullanmışlardır (Erikson, 1965; Gamborg *ve ark.*, 1968; Schenk ve Hildebrandt, 1972). Bu yüksek tuz ortamları arasındaki en önemli farklar, azot miktarı ve şekli ile bazı mikroelementlerin nisbi miktarlarıdır.

Organik maddeler: Besin ortamındaki enerji gereksinimleri genellikle sakkaroz (%2-4, a/h) ile karşılanır fakat bazen glikoz sakkarozun yerine geçebilir. Bunun yanında, karbonhidratların organogenesis de ozmotik bir role de sahip olduğu gösterilmiştir (Brown *ve ark.*, 1979). Besin ortamına vitamin veya amino asit ilave edilmesi kallus büyümesini ve organ farklılaşmasını önemli ölçüde teşvik edebilir (Freytag *ve ark.*, 1988). En çok eklenen vitamin thiamindir. Bunu nikotinik asit ve pridoksin takip eder. İnositol ise, bir çok dokunun büyüme ve farklılaşmasına yardım eder.

Organik azot eklenmesi kallus başlatılması esnasında çok sık kullanılır fakat alt kültür ve organogenesis esnasında da yararlı olabilir. Kazein hidrolizat (%0.02-0.1 a/h) çok bilinen bir organik azot kaynağıdır (Gürel ve Kazan, 1999). Glutamat, asparjin, tirozin ve adenin gibi bileşikler de en fazla kullanılan indirgenmiş azot kaynaklarıdır. Bu organik maddelerin gerek miktarları gerekse nitelikleri, sürgün veya kök organogenesisi üzerinde etkili olmaktadır.

Bitki büyüme düzenleyicileri: Oksin ve sitokinin, *in vitro* kültürde en sık ihtiyaç duyulan iki bitki büyüme düzenleyicisidir. Ortamda bulunan sitokinin ve oksinin konsantrasyonu ve oranı, *in vitro* büyümenin miktar ve çeşidini kontrol eder. Doğal

olarak sentezlenen veya sentetik olarak elde edilen oksin ve sitokininler kullanılmaktadır. 2,4-dikloro;ofenoksi asetik asit (2,4-D), naftelen asetik asit (NAA), indol asetik asit (IAA) ve indol bütirik asit (IBA)'tır. Kinetin ve N⁶-benziladenin/benzil amino pürin (BA/BAP) en çok kullanılan, izopentenil adenin (Zip) ve zeatin ise daha nadir kullanılan sitokininlerdir. Besin ortamına dahil edilen, başta bitki büyüme düzenleyicileri olmak üzere, büyümede aktif olan çeşitli maddeler *in vitro* organogenesisin düzenlenmesinde önemli etkilere sahiptirler (Chandler ve Thorpe, 1986). Yukarıda da belirtildiği gibi, bitki türlerinin büyük bir çoğunluğu uygun oksin/sitokinin oranına, sürgün veya kök oluşturarak cevap verir. Evans *ve ark.* (1981), kinetin ve BAP'nin konsantrasyon olarak 0.05-46 pM (0.01-10.0 mg/1) arasında kullanıldığı zaman türlerin %75'inin sürgün oluşturduğunu belirtmişlerdir. Oksinler ise, örneğin IAA ve NAA, 0.06-27 pM (0.01-5.0 mg/1) arasında değişen konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Tahıl türlerinin sürgün oluşumu için diğer türlerden daha az sitokinine gereksinimleri vardır. IBA ve NAA, köklenme için en yaygın kullanılan oksinlerdir. Bazı durumlarda iki farklı sitokinin veya iki farklı oksin karışımının yalnızca tek oksin veya sitokinininden daha iyi sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır. Fakat bir çok durumda uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerinin seviyesi yalnızca organogenik doku oluşumunun uyarılmasına sebep olur. Daha sonra ortamdaki hormonal denge değiştirilerek organların oluşumu sağlanır (Gürel ve Gürel, 1996).

Eksojen oksin veya sitokinininden bir tanesi bazı durumlarda organogenesis için yeterli olabilir. Bu kural daha çok çam türlerinde daha çok ortaya çıkmakta olup sitokinin tek başına sürgün tomurcuklarının gelişmesi için yeterli olabilmektedir (Thorpe *ve ark.*, 1991). Bununla beraber bazı anormal durumlarla da karşılaşmıştır, örneğin Walker *ve ark.* (1978) yüksek miktarda 2,4-D'nin ve düşük miktarda kinetin yonca kalkışlarında sürgün oluşumunu sağladığını, bunun tersi durumda ise kök oluşumunun gerçekleşmediğini gözlemişlerdir. Fakat organogenesisin başlaması için endojen (hücrenin kendisine ait) oksin/sitokinin dengesinin, eksojen oksin/sitokinin dengesinden daha önemli olduğu anlaşıncıca bu tür anormal bulgular da açıklığa kavuşmuştur (Thorpe, 1980).

Organogenesis için sitokinin yerine çok çeşitli pürin, pirimidin ve ürealar başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Benzer şekilde, çeşitli oksin benzeri bütirikler de *in vitro* oksin gereksinimini karşılamaktadır. Giberellin ve absisik asit gibi ortama eklenen öteki bitki büyüme düzenleyicilerinin de organogenesisde rol oynadığı gözlenmiştir. Sürgün ve kök organogenesisi için bu maddelerin etkileri konusunda bir genelleme yapılamaz çünkü bu maddeler farklı bitki türlerinde sürgün ve kök oluşumunu engelleyebilir, teşvik edebilir veya herhangi bir etkisi olmayabilir. Bitki büyüme düzenleyicilerine ek olarak, adenin, guanin, urasü, üridin, aminoasitler, çeşitli fenolik asitler, nikotin ve anti-oksiner gibi çeşitli metabolitlerin farklı türlerde organogenesisi uyardığı gösterilmiştir. Bu metabolitlerin bir çoğunun endojen bitki büyüme düzenleyicilerinin düzeyini değiştirmesi mümkün olabilir. Son olarak poliaminler (Torrighiani *ve ark.*, 1987), oligosakkaritler (Tran Thanh Van *ve ark.*,

1985) ve kendi başına primer hücre duvarının da organogenesis ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Fry, 1990).

Doğal kt mpleksler: Doğal kompleksler doğada bulunurlar ve genelde bilinmeyen çeşitli içeriklere sahiptirler. Bunlara örnek olarak hidrolize olmuş protein preparasyonlarını, maya ürünlerini (brewer's by- products), endosperm sıvısını, meyve posası ve meyve suyu ile hayvan ürünlerini verebiliriz. Bu kompleksler içerisinde en çok kullanılanı hindistan cevizi sütüdür (%2-15, h/h).

2.3.2.2. Kültür şartları

Kültür ortamının birçok özelliği organogenesisin başarısını etkilemekte olup, bunlardan başlıcaları; ortamın fiziksel hali, pH, nem, ışık, sıcaklık ve kültür kaplarında biriken gazların miktarıdır.

Ortamın fiziksel hali. Ortamın fiziksel hali, yani katı veya sıvı olması, organogenesis de önemli bir rol oynayabilir. Ağar ve Gelrite'in her ikisi de kompleks bir polisakarittir ve en yaygın kullanılan jelleştirme (katılaştırma) maddeleridirler. Ağar (%0.6-1.0, a/h) ile katılaştırılmış ortamda büyütülen kallus yavaş büyür ve varolan kallus kümesinin çevresinde yeni hücreler gelişir. Bunun yanında, ortamdan dokuya doğru bir besin gradiyenti oluşur. Fakat hücre süspansiyon kültürlerinde tek veya küme hücreler devamlı olarak besin ortamına maruz kaldığından daha fazla büyüme gösterirler. Bu tür hücre kültürleri genelde gerçek sigmoidal büyüme eğrisi gösterirler. Genel olarak organogenesisde en çok başarı katı ortam üzerinde kallus veya yayılmış (plated) hücre süspansiyonları ile başarılmıştır. Bununla beraber, White (1939) tütün kalkışlarını yarı katı ortamdan sıvı ortama geçirince de sürgün oluştuğunu gözlemiştir. Ortamın fiziksel hali farklılaşmanın çeşidinde önemli bir rol oynayabilir. Margara ve Bouniols (1967), sıvı besin ortamında büyüyen ve filtre kağıdı köprüsü ile desteklenen *Chichorium intybus* kök eksplan darının vejetatif tomurcuklar ürettiğini gözlemiş fakat eksplantlar ağar ile jelleştirilmiş katı besin ortamına yerleştirildiğinde ise çiçek tomurcuklarının oluştuğunu gözlemişler ve %2.4 ağar konsantrasyonunun en fazla çiçek tomurcuğu oluşumuna sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bu göstermiştir ki, çiçek tomurcuklarının oluşumu stres ile ilgili de olabilir.

Ortamın pH değeri: Bir çok türde organogenesis için en uygun pH düzeyi karşılaştırılmak olarak değerlendirilmiştir. Besin ortamının pH'sı genellikle 5.0 ile 6.5 arasında behrlenir. Fakat inkübasyon esnasında pH sapması olmaktadır (Minocha, 1987). Söz konusu pH sapmaları dokuya özeldir ve karark bir hale gelmesi için geçmesi gereken süre değişmektedir. Ortamın pFI düzeyi, besin maddelerinin çökmesi ile besin maddelerinin ve bitki büyüme düzenleyicilerinin alimini etkilemektedir (Shang ve ark., 1991). Fakat buna rağmen *in vitro* organogenesisde ortamın gerçek pH değerinin etkisi hakkında çok az şey bknmektedir. Ancak ortamın pH değeri 5.0'in üzerinde tutulduğu zaman hücre

kültürlerinin NH_4^+ 'u yegane N kaynağı olarak kullanma kapasitesinin arttığı

İr (D <=> ^»gçvll -vç V 1 0 7 6) . Bvvtvuri yanında düşük pFPlarda 4) havucun proembriyonik hücre kümeleri, oksinsiz ortamlarda canlılıklarını sürdürmelerine karşın normal bir gelişme gözlenebilmesi için pH'nın 6-7 arasında olması gerekmektedir (Smith ve Krikorian, 1990).

Nem: Şimdiye kadar, değişik nem düzeylerinin organogenesis üzerine etkisi hakkında bir çalışma yapılmamıştır. Bunun bir sebebi de kültür çevresinin nem oranının genellikle %100'e yakın olmasıdır. Fakat yine de, kültür ortamını çevreleyen atmosferin nem oranının organogenesisdeki gelişimin modeli üzerine etkili olduğu gözlenmiştir. Nitekim ağarla katılaştırılmış ortam üzerindeki atmosferin nem oranı %45'den %98'e yükseltildiğinde, endive (hindiba) kök parçalarından çiçek tomurcuklarının oluşumu engellenmiş fakat buna karşın vejetatif tomurcuk oluşumu teşvik edilmiştir (Margara ve Bouniols, 1967). Böylece bazı durumlarda nem oranının düzenlenmesi farklılaşmanın ne yönde olacağının belirlenmesi açısından önemli olabilir.

Işık: Işık kültür ortamının önemli faktörlerinden birisidir ve *in vitro* organogenesisde etkili olduğu kesin olarak gösterilmiştir. Farklılaşma için gerekli olan ışık bir kaç bileşenden oluşmuştur. Bunlar; ışığın şiddeti, gün içinde uygulama periyodu ve niteliğidir. Doku kültürü için gerekli olan güneş enerjisi ototrofik bitkilerden farklıdır. Çünkü doku kültüründe zaten ortam içersinde yeterli karbonhidrat (genelde sakkaroz) hazır bulunur. Fakat bunun yanında bazı fotomorfojenik olaylar için ışık gerekli olabilir (Murashige, 1974). Maksimum kallus büyümesi karanlıkta olmasına rağmen, düşük ışık şiddeti ($90 \text{ } \mu\text{E cm}^{-2} \text{ sn}^{-1}$) organogenesis ve embriyogenesisi artırabilir. Örneğin çam türlerinin *in vitro* kültürlerinde, morfogenez için genellikle ışığa ihtiyaç duyulduğu ve ışık-sitokinin etkileşiminin tomurcuk oluşumunu etkilediği gözlenmiştir (Villalobos ve ark., 1984). Bunun yanında, fotoperiyod-şiddet etkileşimi de olmakta ve bu da toplam güneş enerjisinin niteliğinin önemli olduğunu göstermektedir.

Sıcaklık: Bitkilerin gerek *in vivo* gerekse *in vitro* büyüme ve gelişmesini yakından kontrol etmesine rağmen sıcaklığın rejenerasyona etkileri üzerinde fazla durulmamıştır. Genellikle kültürler 20 ila 30 °C arasındaki sabit sıcaklıklarda tutulurlar fakat yine de belli bir bitki türü için büyüme ve farklılaşmanın optimum düzeyde gerçekleştiği sıcaklık değerlerinin önceden belirlenmesi gerekir. Çünkü farklı bitki türlerinin optimum sıcaklık istekleri farklı olabilir (Chalupa, 1987). Örneğin, *Pinus contorta* embriyo kültüründe 20 °C'ye oranla 27 °C'de daha erken ve daha çok sayıda tomurcuk elde edilmiştir (Patel ve Thorpe, 1984). Ayrıca kültür öncesi yapılan düşük sıcaklık uygulamasında morfogenezisi etkilediği bilinmektedir. Flatta aynı bitki dokusu içinde bile sürgün oluşumu ve köklenme için farklı sıcaklık optimumlarına rastlamak mümkündür (Rumary ve Thorpe, 1984). Sıcaklığın bir diğer önemli rolü de, ortamdaki su miktarına bağlı olarak, vitrifikasyonu (camlaşmayı) etkilemesidir. Vitrifiye olmuş kültürler bir süre (5-7

gün) düşük sıcaklıkta (4 °C) tutulduktan sonra tekrar normal inkübasyon ortamına geri konulduğunda vitrifikasyon düzeyinde önemli ölçüde bir azalma gözlemek mümkündür (Gürel ve Gürel, 1998).

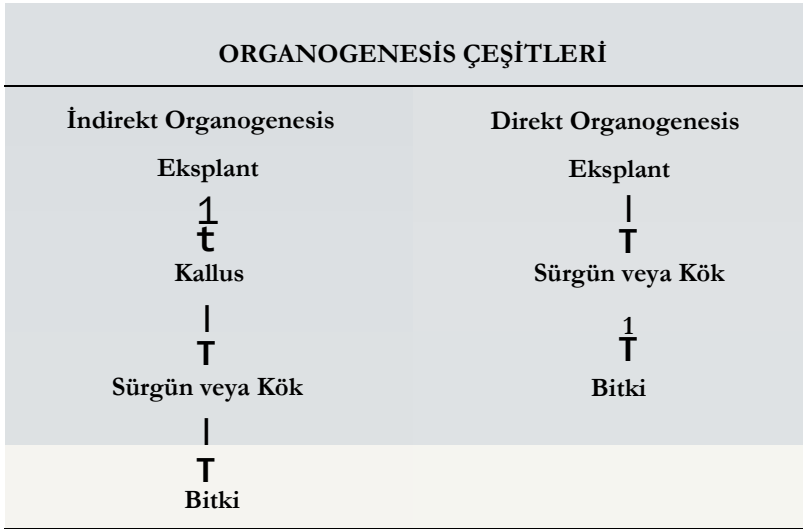
Kültür kaplarında biriken gazlar: Bitki kültür sistemlerinin performansını etkileyen diğer bir faktör de, kültüre alınan eksplantların etrafındaki atmosferin gaz içeriğidir. Böylesi bir gaz atmosfer; etilen, oksijen, karbondioksit, etanol ve asetaldehitlen oluşur. Aynı zamanda bir bitki büyüme düzenleyicisi olan etilen, kültürleri yapılan dokular tarafından üretilir ve farklı morfojenik etkilere sahiptir. Kültür sistemine ve kullanılan kültür kapaklarının niteliğine bağlı olarak etilen, organogenesi uyartabilir veya bastırabilir (Huxter ve ark., 1981; Kumar ve ark., 1987; Righetti ve Facini, 1992). Bu bakımdan bazı aşırı kentleşmiş bölgelerde, kültür odasına giren havanın filtre edilmesi gerekli olabilir. Bu şekilde uygulanacak bir filtrasyon, böylece toz ve sporların da kültür ortamına girmesini engellemiş olur.

2.4. Organogenesis Çeşitleri

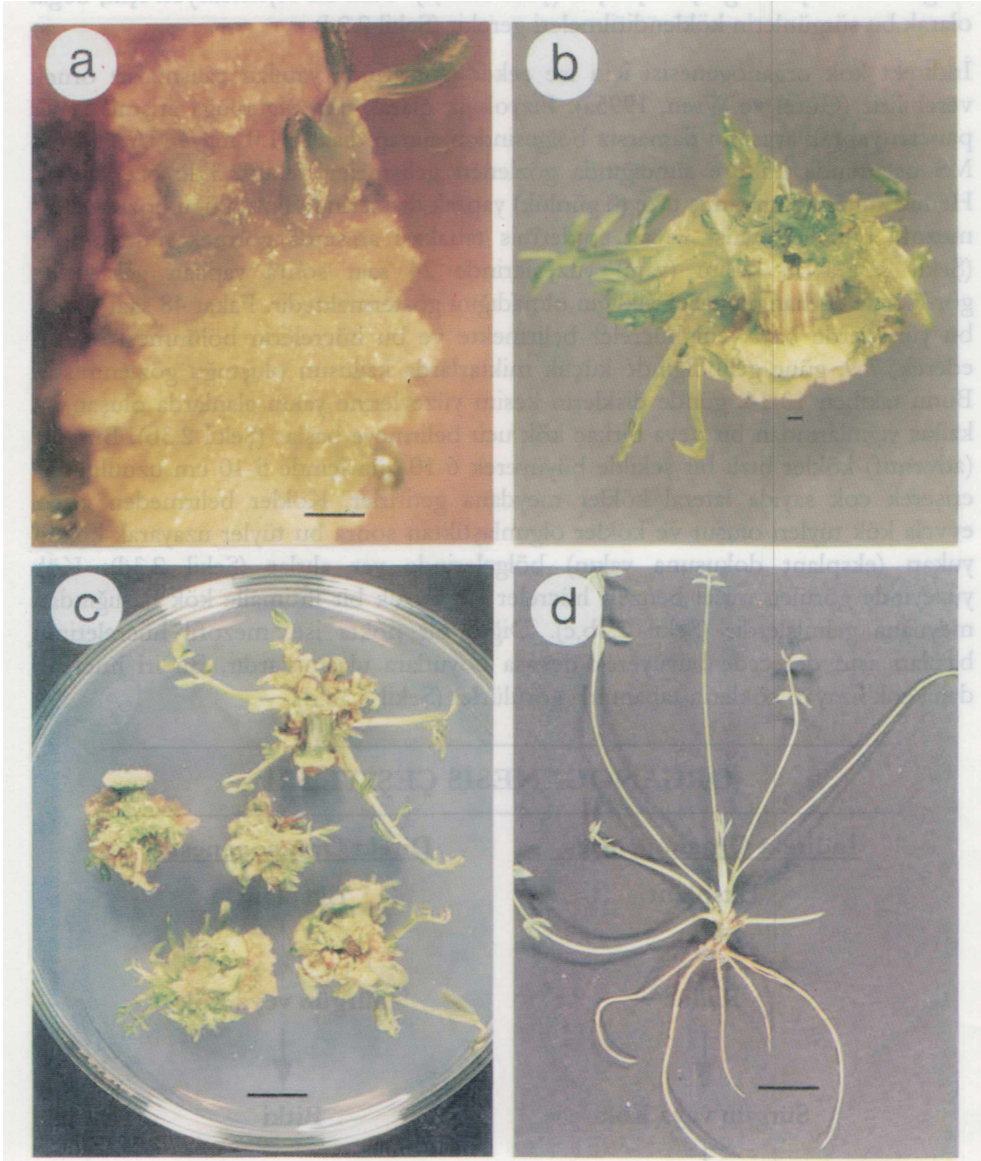
In vitro organ gelişiminin, indirekt organogenesis ve direkt organogenesis olmak üzere iki modeli vardır (Hicks, 1980; Gürel, 1997c). İndirekt organogenesis de; meristematik bir merkezin oluşumundan ve takip eden sürgün veya kök oluşumundan önce, alınan eksplant dokusu organize olmamış kallus kümesinin oluşturulması için uyarılır. Direkt organogenesis de ise kallus gelişimi hiç görülmez (Şekil 2.1). Kallus dokusundan sürgün gelişimini özedemek gerekirse (Maeda ve Thorpe, 1979), işlem eksplantın çevresinde hücre dizilerinin oluşması ile başlar, hücre dizileri ve eksplant arasındaki bölgelerde ise bazı 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 primordiyasını (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. İşlem tamamen eşzamanlı (senkronize) olmamasına rağmen, sürgün oluşumuna sebep olacak temel olaylar 6-14 günlük kültür periyodu içinde olur. Burada anahtar olay, çok fazla vakuollü parenkima hücrelerinin bölünmeye başlaması ve meristematik hücreleri oluşturmasıdır. Histokimyasal olarak, her hücrenin DNA içeriğinde bir değişiklik gözlenmez. Fakat meristematik merkezlerin ve sürgün primordiyalarının oluşması esnasında ve öncesinde sürgün oluşma bölgelerinde, RNA ve protein için daha yoğun boyanma bölgeleri gözlenmiştir (Thorpe ve Murashige, 1970). Şekil 2.2'de, korunga (*Onobrychis vicifolia*) gövde eksplantlarından elde edilen indirekt sürgün oluşumu özetlenmiştir (Özcan ve ark., 1996; Özgen ve ark., 1998). Görüldüğü gibi, önce yara yüzeyinde kallus oluşmuş (Şekil 2.2a) ve bu kalkıştan da daha sonra

sürgün farklılaşması gerçekleşmiştir (Şekil 2.2b,c). Tam bir rejenerasyon için, doğal olarak bu sürgünlerin köklendirilmeleri gerekir (Şekil 2.2d).

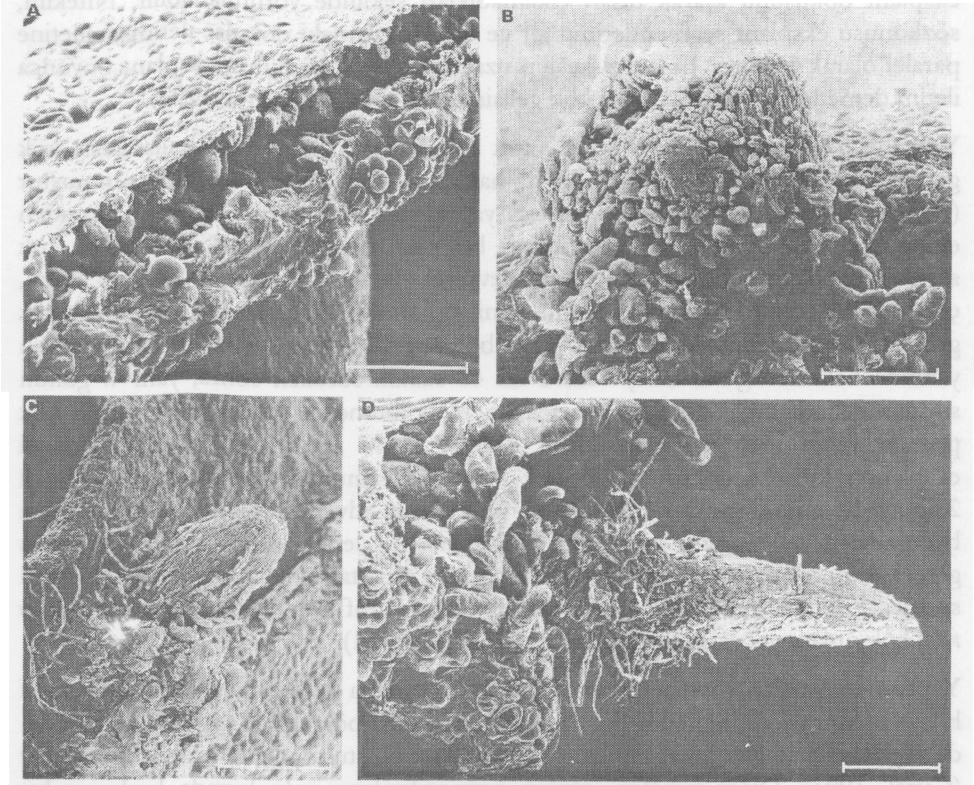
İndirekt kök organogenesisi için ise şeker pancarında yapılan çalışmaları örnek verebiliriz (Gürel ve Wren, 1995a). Fizyolojik olarak tam olgunluğa erişmiş şeker pancarı yaprak ayasının damarsız bölgesinden alınan diskler 1.0 mg/1 NAA içeren MS ortamında kültüre alındığında gözlenen gelişmeler Şekil 2.3'de özetlenmiştir. Henüz kültüre alınmamış taze (0 günlük) yaprak disklerinde bütünlüğü bozulmamış mezofil hücrelerini üst ve alt epidermis tabakası arasında görmek mümkündür (Şekil 2.3a). Bu kesim (yara) yüzeylerinde 24 saat sonra yapılan gözlemler, görünürde herhangi bir değişikliğin olmadığını göstermektedir. Fakat 48 saat sonra, bu yüzeylerde bazı yeni hücreler belirmekte ve bu hücrelerin bölünmesi devam ederek, 7-9. güne gelindiğinde küçük miktarlarda kallusun oluştuğu gözlenmiştir. Bunu takiben 13-14. günde disklerin kesim yüzeylerine yakın alanlarda oluşan bu kallus yığınlarından bir veya birkaç kök ucu belirmeye başlar (Şekil 2.3b). Bu yeni (adventif) kökler hızlı bir şekilde büyüyerek 6-10 gün içinde 5-10 cm uzunluğuna erişerek çok sayıda lateral kökler meydana getirirler. Kökler belirmeden önce, evvela kök tüyleri oluşur ve kökler olgunlaştıktan sonra bu tüyler uzayarak kökün yukarı (eksplant dokusuna yakın) bölgelerinde yer alırlar (Şekil 2.3d). Kök yüzeyinde görülen misel benzeri hücreler ise büyük bir ihtimalle kök başlığından meydana gelmişlerdir (Şekil 2.3b,c). Diğer bir nokta ise, mezofil hücrelerinin bazıları aşırı derecede büyüyerek devasa boyudara ulaşmışlardır. Bu iri hücreler daha çok uzayan köklerin tabanında görülürler (Şekil 2.3b,d).



Şekil 2.1. *İn vitro* bitki rejenerasyonunda görülen organogenesis çeşitleri. Direkt organogenesisde, sürgün veya kök direkt olarak eksplant dokusunu meydana getiren hücrelerden gelişirken indirekt organogenesisde, önce eksplant dokusundan kallus meydana gelir ve daha sonra da bu kalkıştan sürgün veya kök gelişir.



Şekil 2.2. Steril korunga (*Onobrychis viciifolia*) fidelerinden alınan gövde eksplantlarından adventif sürgün ve kök oluşumu (Özgen ve ark., 1998). **a)** 3 haftalık inkübasyon döneminden sonra kallus oluşumu ve sürgün oluşumu başlangıcı. **b-c)** 6 hafta sonra iyice gelişmiş sürgünler. **d)** Oluşan sürgünlerde 4 haftalık bir inkübasyon sonunda kök oluşumu. Barlar= a ve b'de 1 mm, c ve d'de 1 cm.



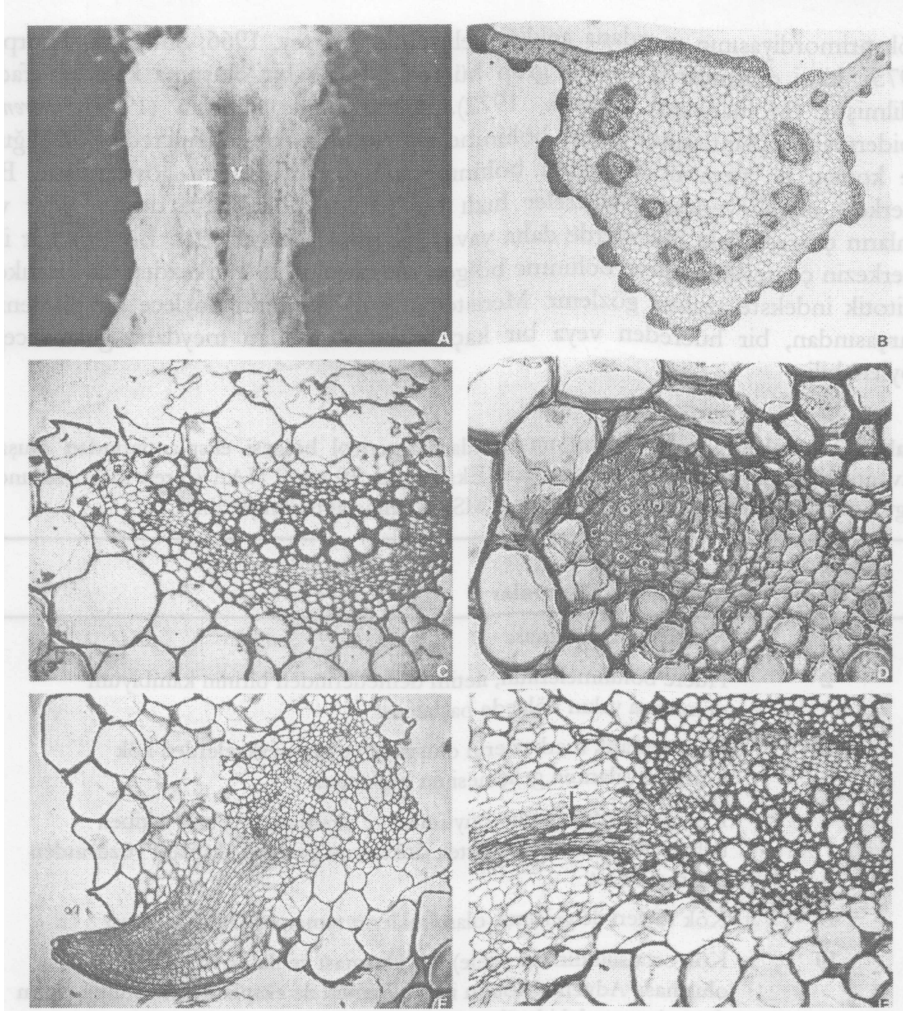
Şekil 2.3. Şeker pancarı yaprak disklerinden elde edilen *in vitro* köklere ait SEM fotoğrafları (Gürel ve Wren, 1995a). **A)** Yeni kesilmiş taze (0 günlük) yaprak ayası disk. Alt ve üst epidermis arasında görülen bütün haldeki mezofil hücreleri. **B)** 14. günün sonunda NAA içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak diskinin kesim yüzeyi. Büyük bir kök ucu doku yığını içerisinde dışarı çıkmıştır. **C)** İyice gelişmiş bir kök ucu. **D)** Kök tüylerine sahip uzamış bir adventif kök. Büyük mezofil hücreleri kökün tabanında görülmektedir.

Şeker pancarı yapraklarının, orta damar (midrib) ile yaprak sapının (petiyol) kesiştiği bölgeden alınan segmentler yüksek NAA (30 mg/1) içeren MS ortamında 5 gün inkübe edildikten sonra hormonsuz (temel) MS ortamında 10 gün tutulduklarında, aseto-karmin boyaması ile yapılan çalışma göstermiştir ki yoğun olarak boyanan hücrelerden meydana gelen bölgeler hemen iletim demetinin yanında yer almışlardır (Şekil 2.4a). Bu da hücre bölünmelerinin ve nihayetinde yeni adventif kökleri oluşturacak olan meristematik merkezlerin iletim demeti boyunca, bu dokuyla yakından ilgili olan hücrelerden meydana geldiklerini ortaya koymaktadır. Fakat ne ilginçtir ki bu meristematik merkezlerden sadece, çoğunlukla eksplantın bazal (alt) tarafında olmak üzere, kesim yüzeyine yakın bölgelerde olanlar kök meydana getirirler. Bu durum, iç bölgelerdeki meristematik merkezlerin

eksplant dokusunu aşarak dışarı çıkamadıkları şeklinde yorumlanabilir. Nitekim, sözkonusu eksplant segmentlerinin alt ve üst yüzeyindeki dokular iletim demetine paralel olarak eksplant boyunca kesilip uzaklaştırıldığında, bütün eksplant boyunca iletim demelerine paralel olarak kök gelişimi gözlenmiştir (Gürel, 1993).

Yukarıdaki gözlemlere ilave olarak, ışık mikroskobu ile yapılan çalışmalar, kök gelişmesine katılan hücrelerin kökeni hakkında daha detaylı bilgiler sunmuştur (Gürel ve Wren, 1995a). Şeker pancarı yaprağının ortadamar-petiyol bölgesinden enine kesit alındığında, üçgeni andıran bir şekil ortaya çıkar (Şekil 2.4b). Çok sayıdaki iletim demeti, üst yüzey hariç, çevresel olarak dizilmişlerdir. 48 saat sonra, çekirdek ve çekirdekçikleri belirgin yeni bölünmüş hücrelerden oluşan küçük gruplar, büyük iletim demetlerine yakın bölgede ve hemen vasküler kambiumun yanında belirirler (Şekil 2.4c). İlave bir 48 saatlik süreden sonra, yani 4. günün sonuna gelindiğinde, daha çok sayıda hücre bölünmeleri gerçekleşerek genç kök primordiyaları meydana gelir (Şekil 2.4d). Bunu takiben kök uçları, orijinal eksplantın korteks dokusunu geçerek 8. günün sonunda dışarıya çıkarlar (Şekil 2.4e) ve 10. günün sonuna gelindiğinde yeni oluşan adventif kökün iletim demetleri belirginleşmeye ve ana dokunun (eksplantın) iletim dokusu ile bağlantısı gerçekleşmeye başlar (Şekil 2.4f). Böylece yapraktan alınan ortadamar-petiyol segmenti hücrelerinin bölünmesi ile başlayan adventif kök oluşumu süreci, yani *in vitro* kök organogenesi, tamamlanmış olur (Tablo 2.1).

Yapılan çalışmalar, meristematik bölgelerin meydana gelmesine yol açan benzeri hücre bölünmelerinin, iletim dokusunun uzağındaki bölgelerde (korteks içerisinde) de meydana geldiğini fakat bunların sonuçta kök oluşturmadığını ortaya koymuştur (Gürel, 1993). Diğer taraftan, oluşan primordiyaların yakınlarında herhangi bir kallus gelişmesi gözlenmediği için oluşan bu köklerin direkt organogenesis yoluyla meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Buna karşın, kök primordiyasını oluşturan başlangıç hücrelerinin, kambium hücreleri mi yoksa kambiumun çok yakınında bulunan korteks parenkima hücreleri mi olduğu kesinlik kazanmamıştır. Benzer zorluklarla, *Griselinia littoralis* ve *G. lucida* üzerinde yapılan çalışmalarda da karşılaşılmıştır (White ve Lovell, 1984). *Brassica juncea* ve *Pereskia grandifolia* liri dan alınan petiyol segmentlerinde, kök oluşumunu başlatan hücrelerin, iletim dokusu yakınlarındaki vasküler parenkima veya korteks hücreleri olduğu belirtilmiştir (Sharma ve Bhojwani, 1990; Carvalho ve ark., 1989). *Phaseolus vulgaris* ise, meristematik merkezlerin ksilem ile floem arasındaki bölgede bulunan hücrelerden meydana geldiği ama bunların kambium hücreleri mi yoksa başka hücreler mi olduğu kesinlik kazanmamıştır (Gramberg, 1971). Benzer şekilde, kökü meydana getiren primordiyaların tek bir hücreden mi yoksa bir hücre grubundan mı kökenlendiği bilinmemektedir. Bazı durumlarda, tek bir hücrenin aktive olması ile



Şekil 2.4. Şeker pancarında *in vitro* kök gelişmesine katılan hücrelerin gözlendiği ışık mikroskobu çalışmalarına ait fotoğraflar (Gürel ve Wren, 1995a). **A)** Ortadamar-petiyol bölgesi segmentlerinde meristematik aktivite gösteren hücreler. Aseto-karmin ile boyanmış hücreler (ok işareti) iletim demeti (V) boyunca sıralanmıştır (x10). **B)** Ortadamar-petiyol bölgesi segmentinin enine kesiti (x15). **C)** Büyük bir iletim demetinin kambiyum bölgesi yakınındaki bölünen hücrelerin 48 saat sonraki durumu. Çekirdekleri belirgin hücreler (ok işareti) daha sonra bölünmeye devam ederek meristematik bir merkez oluşturacaklardır (x25). **D)** 4. günün sonunda gelişen bir kök primordiyasının enine kesiti (x100). **E)** 8. günün sonunda iyice gelişmiş ve korteks dokusunu geçerek dışarı çıkmış bir kökün boyuna kesiti (x25). **F)** Adventif bir kökün dip kısmının enine kesiti. 10. günün sonunda görülen bu gelişimde yeni kökün kendi iletim demeti (ok işareti) oluşmuş ve ana dokunun iletim demeti ile bağlantı kurulmuştur (x40).

kök primordiyasının meydana geldiği belirtilmiş (Torrey, 1966; Smith ve Thorpe, 1975), kimi durumlarda ise bir grup hücrenin böyle bir oluşuma katıldığı ifade edilmiştir (Molnar and Lacroix, 1972). Aynı şekilde, Chlyah (1974), *Torenia* epidermal eksplantlarında hücre bölünme aktivitesinin tek bir hücrede başladığını ve komşu iki veya üç hücrenin bölünmesiyle devam ettiğini göstermiştir. Bu merkezi olarak yerleşmiş hücreler hızlı bir şekilde bölünmeye devam eder ve onların çevresindeki hücrelerde daha yavaş bir şekilde bölünürler. Böylece her ilk merkezin çevresinde hücre bölünme bölgesi oluşturulur ve merkezden uzaklaştıkça mitotik indekste azalma gözlenir. Meris tema tik merkezlerin böylece bir hücrenin parçasından, bir hücreden veya bir kaç hücre tarafından meydana gelebileceği söylenebilir.

Tablo 2.1. Şeker pancarı yaprağının ortadamar-petiyol bölgesi eksplantlarından oluşan adventif köklerin morfojenetik aşamaları. Eksplantlar 30 mg/1 NAA içeren MS ortamında 4 gün tutulduktan sonra hormonsuz temel MS ortamına aktarılmışlardır.

Zaman (Gün)	Morfojenik Aşamalar
0	Kültürün başlatılması
2	Hücre bölünmelerinin, iletim demetlerinden birinin kambiyum dokusuna yakın bölgede başlaması
4	Meristematik merkezlerin oluşması ve bu merkezlerden kök primordiyalarının gelişmesinin başlangıcı
6	Kök primordiyalarının büyümesi ve uzaması, ve bunu takiben belirginleşen köklerin kortek dokusunu geçerek eksplant yüzeyinden dışarı çıkması
8	Kök tüyleri de gelişmiş olan köklerin tamamen dışarı çıkması
10	Kök orta silindirin (stele) farklılaşması ve iletim demetlerinin oluşması. Adventif kökün iletim demeti ile eksplant dokusunun iletim demeti arasındaki bağlantının oluşması.

Organogenesisdeki anahtar morfolojik özellik meristematik merkezlerin oluşumudur. Direkt ve in direkt organogenesisin her ikisinde de, meristematik merkezler vakuollü parenkima hücrelerinden oluşmuşlardır (Ross ve ark., 1973; Villalobos ve ark., 1985). Bu hücreler yapı olarak küçük, izodiyametik, ince duvarlı hücrelerdir ve yoğun bir şekilde boyanan belirgin çekirdeklere sahiptirler. Tütün hücrelerinde yoğun plazmalı ve mikro-vakuollü, çamda ise hücreler ışık mikroskobu düzeyinde vakuollüdür ve yoğun sitoplazmik basamak daha sonra ortaya çıkar. Her iki dokuda da, aynı meristematik hücrelerin arasında plasmodesmata belirgindir fakat farklı meristematik hücrelerde ve dokudaki öteki hücrelerde plasmodesmata oluşmazlar. Bütün bu çalışmalar göz önüne

alındığında, meristematik merkezi oluşturan bölgesel aktif hücre bölünmesi organogenesisin genel histolojik özelliğidir denilebilir.

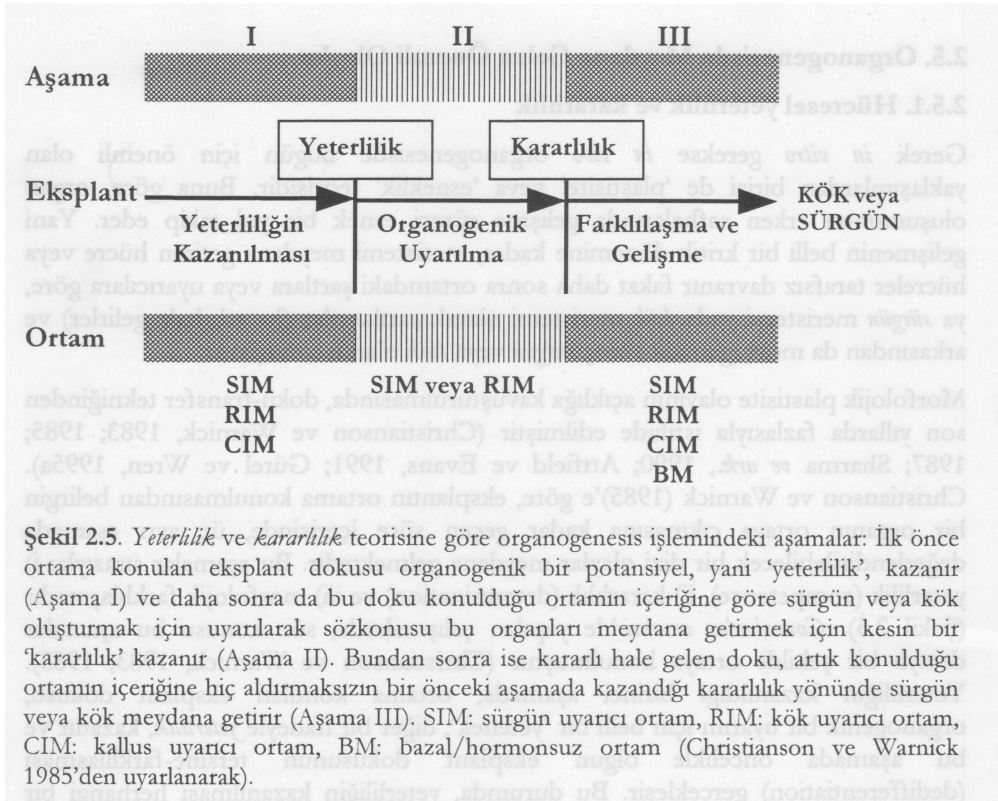
2.5. Organogenesisde Meydana Gelen Önemli Olaylar

2.5.1. Hücresel yeterlilik ve kararlılık

Gerek *in vitro* gerekse *in vivo* organogenesisde bugün için önemli olan yaklaşımlardan birisi de ‘plastisite’ veya ‘esneklik’ teorisidir. Buna göre, organ oluşumunun erken safhalarında gelişme süreci esnek bir yol takip eder. Yani gelişmenin belli bir kritik dönemine kadar, meristemi meydana getiren hücre veya hücreler tarafsız davranır fakat daha sonra ortamdaki şardara veya uyarıcılara göre, ya *sürgün* meristemi yada *kök* meristemi olarak şardanırlar (kararlı hale gelirler) ve arkasından da morfogenedk süreç *sürgün* veya *kök* olarak sonuçlanır.

Morfolojik plastisite olayının açıldığı kavuşturulmasında, doku-trans fer tekniğinden son yıllarda fazlasıyla isdfade edilmiştir (Christianson ve Warnick, 1983; 1985; 1987; Sharma *ve ark.*, 1990; Attfield ve Evans, 1991; Gürel ve Wren, 1995a). Chrisdanson ve Warnick (1985)’e göre, eksplantın ortama konulmasından belirgin bir organın ortaya çıkmasına kadar geçen süre içerisinde, üç ayrı aşamada değerlendirilebilecek bir dizi olaylar meydana gelmektedir. Bu aşamalar sırasıyla; i) yeterlilik (competence), ii) kararlılık (determination) ve iii) morfolojik farklılaşmadır (Şekil 2.5). *Convolvulus arvensis*’e yapılan çalışmalarda, söz konusu bu aşamalar detaylı bir şekilde ortaya konulmuştur (Christianson ve Warnick, 1983; 1985). 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 (dedifferendation) gerçekleşir. Bu durumda, yeterliliğin kazanılması herhangi bir ortamda (sürgün, kök veya kallus ortamında) gerçekleşebilir. Bu ilk aşamanın sonunda organ oluşturmak için yeterlilik kazanan hücre veya hücrelerin, belli bir gelişme tipi (sürgün, kök veya kallus oluşumu) için şartlandırılmaları yani kararlı bir hale getirilmeleri gerekir. Bu işlemin gerçekleştirildiği süreç, *in vitro* organogenesis deki ikinci aşama (*kararlılık*) olarak adlandırılır ve söz konusu gelişme tipinin belirlenmesinde, ortamdaki bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyon ve kombinasyonları önemli olmaktadır. Üçüncü ve son aşamada ise, morfolojik farklılaşma ve gelişme tamamlanarak belirgin organlar gözükmeye başlar ve bu gelişmenin tamamlanması, yine *herhangi* bir ortamda gerçekleşebilir. Yani, ikinci aşama sonunda hücre veya hücreler herhangi bir organogenik yol için bir kere kararlı hale gelmişlerse, artık onların meydana getireceği organ tipini değiştirmek mümkün değildir. Örnek verecek olursak, ikinci aşamada sadece kök oluşumu için kararlı hale gelen hücre veya hücreler, bu aşamadan sonra gerekirse kök oluşumunu engelleyen bir ortama konulsa bile yinede bu hücreler kök olarak gelişmelerini tamamlayacaklardır. Yukarıda özetlenen bu görüş, yakın zamanda diğer bazı bitki

türlerinde yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir (Sharma ve ark., 1990; Attfield ve Evans, 1991).



Bütün bunlara rağmen, kararlılığın tek kademeli bir işlem olup olmadığı henüz kesinlik kazanmamıştır. Yani hücre veya hücreler, yeterlilik ve kararlılık süreçlerinin en başından itibaren sadece sürgün veya kök primordiyası olarak mı şardanıyorlar yoksa önce 'plastik/esnek' bir primordiya meydana geliyor ve daha sonrada kültür ortamındaki şardara göre 'tarafsız' olan bu primordiya gelişmesini sürgün veya kök olarak mı tamamlıyor? Christianson ve Warnick (1983, 1985) daha çok birinci ihtimali destekleyen yani organogenesisin tek kademeli bir işlem olduğunu ortaya koyan sonuçlar bulmuşlardır ve en azından *Convolvulus arvensis*'e "sürgün oluşumu için yeterlilik" ve "kök oluşumu için yeterlilik" olmak üzere iki farklı gelişmenin meydana geldiğini öne sürmüşlerdir.

Tütün ince hücre katmanı (thin celi layer) eksplantlarında yapılan çalışmalarda da sürgün ve kökler elde edilmiş fakat bir tip primordiyanın diğer bir tipe (sürgünün köke veya kökün sürgüne) dönüştüğüne dair kesin bir kanıt bulunamamıştır. Aksine, ortam şardarının bir tip primordiyanın gelişimini baskımlarken diğer bir tipin gelişmesine imkan tanıdığı sonucuna varılmıştır (Tran Thanh Van, 1981). Diğer

tarafından, öteki türlerde yapılan çalışmalar, genç primordiyaların başlangıçta 'karasız' olduğu ve bunların ya sürgün yada kök oluşturabilecek yeteneğe sahip olabildiği sonucunu ortaya koymaktadır.

Bonnet ve Torrey (1965), kültüre alınan *Corvolvulus arvensis* köklerinde gözlenen genç tomurcuk ve kök primordiyalarının histolojik olarak birbirlerinden ayırt edilemediğini ve uygun kültür şartları sağlandığında, kök vermesi beklenen yerlerden tomurcuk elde etmenin mümkün olabildiğini belirtmişlerdir. Bunu sağlamak için, kök ucu segmenderi önce yüksek oksin içeren ortamda kültüre alınmış ve bunu takiben de oksin içermeyen ortama aktarılmışlardır. Böylece yüksek oksin şartlarında çok sayıda primordiyanın meydana geldiğini ve arkasından da aktarıldıkları ortamdaki hormonal şartlara göre bu primordiyaların sürgün veya kök olarak gelişmelerine devam ettiklerini ileri sürmüşlerdir. Benzeri sonuçlar, *Neottia nidus-avis*, *Selaginella* ve *Vanillaplanifolia* kök ucu kültürlerinde de elde edilmiş ve oksin taşınımını engelleyen bileşiklerin ortama katılması veya oksinin tamamen ortamdaki uzaklaştırılması durumunda, kök ucundan direkt olarak sürgünler elde edilmiştir (Peterson, 1975; Wochok ve Sussex, 1975; Phillips ve Padikkala, 1989). Bütün bu deneysel desteklere rağmen, ne yazık ki henüz bu tür değişimlerin detaylarını anatomik olarak açıklayan fazla bir bulgu mevcut değildir.

2.5.2. Fizyolojik, biyokimyasal ve metabolik olaylar

Steward ve ark. (1964), hücrenin gelişme potansiyelinin ortaya çıkması için, hücrenin fiziksel ve/veya fizyolojik olarak izolasyonunun gerekli olduğunu önermişlerdir, izolasyon işlemi anne dokunun bağlantısını etkili bir şekilde yok eder ve hücreleri böylece kimyasal ve fiziksel kısıtlamalardan kurtarır. Hücreler kimyasal bir uyarıya maruz kaldıkları zaman sessiz durumlarından aktif büyüme için gerekli olan kapasiteye doğru geçiş yaparlar ve şayet gerekli besinler ortamda varsa onların kalıtsal morfojenik potansiyelini dışa vururlar. Fiziksel izolasyon için detaylı anatomik çalışmalara dayanan bir kanıt olmamasına karşın fizyolojik izolasyon mümkündür (Halperin ve Wetherell, 1964). Morfojenik hücre yığınlarında (meris tema tik merkezler veya embriyogenik hücre kümeleri) bunları çevreleyen kalın bir hücre duvarı vardır (Kohlenbach, 1977) ve bunların arasında veya bunları çevreleyen hücrelerde/dokularda gerçekten de plazmodezmata mevcut değildir. Fakat yığınların içinde daha ince hücre duvarları ve fazla miktarda plazmodezmata vardır ve bu da muhtemel hücrelerarası iletişimin var olduğunu göstermektedir.

Alternatif bir görüş ise Skoog ve Tsui (1948)'nin çalışmalarından sonra ortaya çıkmıştır. Bu araştırmacılar, organ oluşumu ve gelişmenin büyüme faktörleri ve besinler arasındaki etkileşim ve bunların miktarlarındaki farklılıklara bağlı olduğunu önermişlerdir. Böylece gelişme modeli bitkinin belli bir bölgesinde bu maddelerin sağlanması ile belirlenmektedir. Sterling (1951), adenin uygulamasına cevap olarak tütün sürgün parçalarının kültürlerinde özellikle kambiyum, dış floem, iç floem ve tabandaki kallus dokularında tomurcuk oluşumunu kaydetmiştir ve böylece bu

görüşü destekleyecek histolojik bir kanıt sağlamıştır. Daha sonra yapılan anatomik çalışmalarda (Earle ve Torrey, 1965; Bonnet ve Torrey, 1966) sürgün oluşumunun başlatılmasına sebep olacak ilk histolojik olayların, halihazırda farklılaşmış olan iletim dokusunun civarında veya eksplantı destekleyen ortamın yüzeyinden belli bir uzaklıkta gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

Organ oluşturan dokular üzerine çok az biyokimyasal çalışmalar yapılmıştır. Meristematik merkez ve sürgün primordiyasının oluşmasından önce nişasta birikimi olmaktadır (Thorpe ve Murashige, 1970) ve organogenesis için ortamdan devamlı serbest şekerin sağlanması gerekmektedir (Thorpe, 1974). Bu tür çalışmaların sonucunda karbonhidratların organogenik işlemler için kolayca bulunabilen bir enerji kaynağı olduğu bulunmuştur. Sürgün oluşturan dokulardaki yüksek solunum oranı, glikolitik ve pentoz fosfat yolundaki artan aktiviter ve sürgün oluşturmeyen dokulara kıyasla, sürgün oluşturan dokularda [¹⁴C] glikoz katabolizmasının artması bu görüşü doğrulamıştır (Thorpe ve Laishley, 1973).

Sürgün oluşumuna yönelecek olan dokuların çok daha yüksek miktarda adenozin fosfataz ve NAD⁺ bulundurduğu ve daha düşük enerji yükü içerdiği gösterilmiştir (Brown ve Thorpe, 1980b). Bunun yanında, sürgün oluşturan dokulardan mitokondri izole edilmiş ve deneysel olarak hazırlanan ozmotik şardar altında değerlendirilmiştir. Bu mitokondrilerin daha yüksek ve daha verimli solunum yapma eğilimleri olduğu bulunmuştur (Brown ve Thorpe, 1982). Sürgün organogenesisi esnasında malat miktarında geçici olan bir artış vardır ve NADPH düzeyinde hızlı bir düşüş, bunun yanında NADP⁺ düzeyinde de daha büyük bir artış kaydedilmektedir. Bu çalışmalarda indirgeyici güç (NADPH) için artan ihtiyacın organogenesis için önemli bir gereksinim olduğunu göstermiştir.

Karbonhidradar sürgün oluşumunda bariz bir şekilde fiziksel ve kimyasal rollere sahiptirler (Brown ve Thorpe, 1980a). Tütün kalkışlarında sürgün oluşumunu başlatmak için gerekli olan ortamın üçte birini sağlayan sakkarozun, ozmotik gereksinimi yerine getirdiği görülmektedir. Sürgün oluşumu esnasında doku daha fazla su, ozmotik ve basınç potansiyellerini korur ve bunu da; (1) kültürün başlangıcında mala tın biriktirilmesi, (2) kültür periyodu esnasında ortamdan serbest şekerin biriktirilmesi veya (3) meristematik merkez ve primordiyum oluşumu esnasında depolanan nişastanın parçalanarak ürünleri ile prolin ve serin birikimi ile sağlar. Sürgün oluşturan dokulardaki artan ozmotik potansiyel sonucunda enerji üretimi için mitokondri aktivitesinin artması mümkün olabilir.

2.6. Organogenesisde Başarı Sağlanan Türler

Solanacea türleri *in vitro* çalışmalarda model olarak kullanılmaktadır. Totipotensi ilk olarak *Nicotiana tabacum* türünde tek hücrelerden olgun bitkilerin elde edilmesi ile gösterilmiştir (Vasil ve Hildebrandt, 1966). Kesilen anterlerin *in vitro* kültürü ile haploid bitkilerin ilk başarılı üretimi *Datura innoxia* (Guha ve Maheshwari, 1964)'da

gerçekleştirilmiştir. İzole edilen pro toplaş dardan ilk bitki rejenerasyonu *N. tabacum* ile gerçekleşmiş (Takebe ve ark., 1971) ve ilk somatik melezleme iki *Nicotiana* türü (*N. glauca* ve *N. Langsdorffii*) arasında yapılmıştır (Carlson ve ark., 1972). Kalkıştan sürgün oluşumu ise yine bazı *Nicotiana* türlerinde kaydedilmiştir (Tablo 2.2). Başarı sağlanan bazı *Solanacea* türleri için gerekli olan bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyon ve kombinasyonları, ve eksplant kaynakları Tablo 2.3'te verilmiştir. Diğer bazı ikiçenekli ve tekçenekli bitkilerdeki rejenerasyon şartları ise Tablo 2.4 ve Tablo 2.5'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Murashige ve Skoog (1962) ortamında *Nicotiana* türlerinin sürgün oluşumu için kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonları ve konsantrasyonları.

Türler	Eksplant	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (gM)	Kaynaklar
<i>N. acuminata</i>	Gövde	10.0 2iP + 1.0 IAA	Helgeson, 1979
<i>N. alata</i>	Çiçek sapı	10.0 KIN + 1.0 IBA	Tran Thanh Van ve Trinh, 1978
<i>N. glauca</i>	Gövde	10.0 2iP + 1.0 IAA	Helgeson, 1979
<i>N. longiflora</i>	Gövde	1.0 KIN + 0.06 IAA	Ahuja ve Hagen, 1966
<i>N. megalosiphon</i>	Gövde	10.0 2iP + 1.0 IAA	Helgeson, 1979
<i>N. otophora</i>	Çiçek sapı	10.0 KIN + 1.0 IBA	Tran Thanh Van ve Trinh, 1978
<i>N. plumbaginifolia</i>	Çiçek sapı	10.0 KIN + 1.0 IBA	Tran Thanh Van ve Trinh, 1978
<i>N. rustica</i>	Sürgün	45.7 IAA + 11.9 KIN	Walkey ve Woolfitt, 1968
<i>N. suaveolens</i>	Gövde	10.0 2iP + 1.0 IAA	Helgeson, 1979
<i>N. sylvestris</i>	Yaprak	17.1 IAA + 0.9 KIN	Ogura ve Tsuji, 1977
<i>N. tabacum</i>	Yaprak	1.0 BA	Gamborg ve ark., 1979
<i>N. tomentosiformis</i>	Çiçek sapı	10.0 KIN + 1.0 IBA	Tran Thanh Van ve Trinh, 1978

2.7. Sonuç

Bitki doku kültürü teknikleri günümüzde bitki biyoteknolojisinin en önemli entegre dallarından birisi olarak bitki bilimlerinin birçok alanında gittikçe artan bir hızla kullanılmaktadır. Buradaki temel güç, bu tekniklerin tek bir hücreye müdahale etme veya kontrol altına alma imkanı tanımasıdır. Bu nedenle, doku kültürleri; bitki fizyolojisi, biyokimya ve moleküler biyolojide en çok başvurulan yöntem ve araçlar arasında yer almaktadır. Organogenesis ise, hücre veya dokulardan yeni bitki bireyleri meydana getirmeye imkan tanıdığı için, generatif yoldan çoğaltılması zor olan bitki türlerinin üretiminde büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Bu grup bitkiler arasında, süs bitkilerini en başta sayabiliriz. Organogenesisin belirtilmesi gereken diğer bir önemi de bitki transformasyon çalışmalarının başarısını yakından etkilemesidir. Çünkü optimize edilmiş bir rejenerasyon sistemine sahip olmayan bir türde transformasyon yapmanın fazla bir anlamı yoktur. Diğer taraftan, organogenesisin kendine has bazı önemli dezavantajları vardır. Bunlardan en önemlisi bütün bitki türleri için evrensel bir rejenerasyon protokolünün olmayışıdır. Bu nedenle, her bitki türü, hatta her bitki çeşidi için spesifik bir sistemin optimize edilmesi gerekir. Benzer şekilde, her bitki türünde aynı oranda

E. Gürel, A.U. Türker

başarı elde etmek mümkün olmadığı gibi bazı türlerde *in vitro* rejenerasyon tamamen imkansızdır. Fakat bütün bunlara rağmen, gelişen teknolojiler ve uygulamalara bağlı olarak organogenesisde başarılı olan türlere her geçen gün yenileri eklenmektedir. Hatta bazı araştırmacılar “*in vitro* kültür teknikleriyle rejenerasyonu yapılamayacak bitki materyali yoktur, yeter ki ihtiyaç duyulan uygun şartlar belirlenebilsin !” diye iddia etmektedirler. Ancak öyle anlaşıyor ki esas mesele de işte o “uygun” şartların bir çok bitki türü için, en azından şimdilik, belirlenememiş olmasıdır.

Tablo 2.3. *Solanaceae* familyasındaki bazı türlerde kallus ve sürgün oluşumu için başarılı olarak kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyon ve konsantrasyonları, besin ortamı ve eksplant çeşitleri.

Türler	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (gM)		Eksplant	Kaynaklar
	Kallus Oluşumu	Sürgün Oluşumu		
<i>Solanum dulcamara</i>	-	4.7 KIN + 5.7 IAA	Yaprak	Zenkter, 1972
<i>Solanum melongena</i>	4.2 NAA	1.0 BA	Hipokotil	Matsuoka ve Hinata, 1979
<i>Solanum nigrum</i>	10.0 IAA + 1.0-10.0 BA	10.0 IAA + 10.0 BA	Yaprak	Bhatt <i>ve ark.</i> , 1979
<i>Solanum tuberosum</i>	2.28 IAA + 1.04 GA + 3.73 KIN	1.8 BA	Yumru	Lam, 1975
<i>Solanum tuberosum</i>	9.0 2,4-D	4.7-46.5 KIN	Sürgün, Gövde	Wang ve Huang, 1975
<i>Solanum xanthocarpum</i>	27.2 2,4-D	0.09 2,4-D	Sürgün	Rao ve Narayanaswamy, 1968
<i>Lycopersicon esculentum</i>	0.5-2.5 IAA + 1-20.0 BA	10.0 BA + 0.5 NAA	Yaprak	Ohki <i>ve ark.</i> , 1978
<i>Lycopersicon esculentum</i>	2.8 IAA	9.0 BA + 2.8 IAA	Kotiledon	Gunay ve Rao, 1978
<i>Lycopersicon peruvianum</i>	0-27.9 KIN + 10.7-32.2 NAA	8.9 BA + 0.0-11.4 IAA	Yaprak	Tal <i>ve ark.</i> , 1977
<i>Solanum pennellii</i>	27.9 KIN + 2.9 NAA	8.9 BA + 0.0-0.1 IAA	Yaprak	Tal <i>ve ark.</i> , 1977
<i>Datura innoxia</i>	1.0 2,4-D veya 10.0 NAA	1.0 BA	Gövde	Engvild, 1973
<i>Datura innoxia</i>	1.0 2,4-D	100.0 KIN	Yaprak	Hiraoka ve Tabata, 1974
<i>Petunia hybrida</i>	22.6 2,4-D	11.9 KIN	Yaprak	Frearson <i>ve ark.</i> , 1973
<i>Petunia inflata</i>	4.5 2,4-D	2.3 BA	Yaprak	Hayward ve Power, 1975
<i>Petunia pendula</i>	-	8.9 BA + 5.4 NAA	Çiçek sapı	Pelletier ve Delise, 1969
<i>Brovallia viscosa</i>	10.7 NAA + 6.0 BA	4.6 ZEA	Yaprak	Power ve Berry, 1979

Tablo 2.4. Bazı çiftçenekli bitkilerdeki kallus ve sürgün oluşumu için kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyon ve konsantrasyonları, besin ortamı ve eksplant çeşitlen.

Türler	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (gM)		Eksplant	Kaynaklar
	Kallus Oluşumu	Sürgün Oluşumu		
<i>Cruciferae</i>				
<i>Brassica napus</i>	4.5 2,4-D	5.0 BA + 0.1-0.4 GA	Yaprak	Stringham, 1979
<i>Brassica oleracea</i>	5.7-11.4 IAA + 4.7 KIN	46.0-51.0 IAA + 14.0-28.0 KIN	Yaprak	Johnson ve Mitchell, 1978
<i>Brassica oleracea</i>	0.9 2,4-D + 14.0 KIN	23.2 KIN	Yaprak, Petal	Baroncelli <i>ve ark.</i> , 1972
<i>Brassica oleracea</i>	4.5 2,4-D + 0.5 KIN	11.4 IAA + 9.3 KIN	Kotiledon	Bajaj ve Nietsch, 1975
<i>Sinapis alba</i>	4.5 2,4-D	0.9 2,4-D + 9.3 KIN	Hipokotil	Bajaj ve Bopp, 1972
<i>Leguminosae</i>				
<i>Albizzia lebbek</i>		10.7 NAA	Hipokotil	Gharyal ve Maheswari, 1981
<i>Arachis hypogaea</i>	4.5 2,4-D + 9.3 KIN	22.0 IAA	Embriyo	Bajaj <i>ve ark.</i> , 1981
<i>Medicago sativa</i>	9.0 2,4-D + 9.3 KIN	2 g/1 maya özü	Yaprak ayası	Bingham <i>ve ark.</i> , 1975
<i>Phaseolus vulgaris</i>	18.6 KIN + 5.7 IAA	11.4 IAA + 5.4 NAA + 0.9 KIN	Yaprak	Crocomo <i>ve ark.</i> , 1976
<i>Pisum sativum</i>	10.7 NAA + 4.7 BA	22.2 BA + 1.1 IAA	Epikotil	Malmberg, 1979
<i>Trifolium pratense</i>	0.5 BA + 0.25 picloram	0.05-44.4 BA + 0.03 picloram	Kotiledon	Phillips ve Collins, 1979
<i>Compositae</i>				
<i>Chrysanthemum morjolum</i>	46.5 KIN + 5.4 NAA	9.3 KIN + 0.11 NAA + 29.0 GA	Sürgün, Petal	Bush <i>ve ark.</i> , 1976
<i>Cichorium endiva</i>	27.0 2,4-D	0.19 KIN	Embriyo	Vasil ve Hildebrandt, 1966
<i>Lactuca sativa</i>	28.5 IAA + 2.3 KIN	2.3-4.6 KIN	Fide	Doerschug ve Miller, 1967
<i>Chenopodiaceae</i>				
<i>Beta vulgaris</i>	5.7 IAA + 0.5 KIN	4.7 KIN + 0.5 GA	Yaprak	DeGreef ve Jacobs, 1979
<i>Corylaceae</i>				
<i>Betula pendula</i>	11.0 IAA + 23.0 KIN	11.0 IAA + 23.0 KIN	Çiçek kümesi	Srivastava ve Steinhauer, 1981

Tablo 2.4'ün devamı...

Türler	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (gM)			Kaynaklar
	Kallus Oluşumu	Sürgün Oluşumu	Eksplant	
<i>Euphorbiaceae</i>				
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	20.0 NAA 4- 2.0 KIN	10.0-50.0 2İP + 0.5 NAA	Petiyol	DeLanghe <i>ve ark.</i> , 1974
<i>Geraniaceae</i>				
<i>Pelargonium spp.</i>	5.4 NAA	0.5 NAA	Petiyol, Kök	Skirvin ve Janick, 1976
<i>Labiatae</i>				
<i>Petilla frutescens</i>	0.45 2,4-D	4.4 BA + 0.54 NAA	Yaprak	Tanimoto ve Harada, 1980
<i>Primulaceae</i>				
<i>Anagallis arvensis</i>	4.5 2,4-D + 0.5 KIN	2.9 IAA + 4.9 2iP	Hipokotil	Bajaj ve Mader, 1974
<i>Rosaceae</i>				
<i>Ma/us pumila</i>	22.0 NAA 4- 9.3 KIN	13.5 2,4-D + 13.8 KIN	Kotiledon	Mehra ve Sachdeva, 1979
<i>Prunus amygdalis</i>	29.6 NAA	29.6 NAA + 2.3-4.7 KIN	Kotiledon	Mehra ve Mehra, 1972
<i>Rosa hybrida</i>	-	8.9 BA 4- 0.5 NAA	Sürgün ucu	Skirvin ve Chu, 1979
<i>Rubus spp.</i>	-	0.4 BA 4- 0.3 GA + 4.9 IBA	Sürgün ucu	Broome ve Zimmerman, 1978
<i>Salicaceae</i>				
<i>Populus tremuloides</i>	0.9-9.1 2,4-D	0.4-1.3 6BA	Gövde	Wolter, 1968
<i>Scrophulariaceae</i>				
<i>Verbascum thapsus</i>	.		Gövde	Caruso, 1971

Tablo 2.5. Bazı tekçenekli bitkilerdeki kallus ve sürgün oluşumu için kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyon ve konsantrasyonları, besin ortamı ve eksplant çeşitleri.

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (gM)				
Türler	Kallus Oluşumu	Sürgün Oluşumu	Eksplant	Kaynaklar
<i>Graminaceae</i>				
<i>Avena sativa</i>	2.3-13.6 2,4-D		Embriyo	Cummings <i>ve ark.</i> , 1976
<i>Hordeum vulgare</i>	10.0 IAA + 1.5 2,4-D + 1.5 2İP	-	Apikal meristem	Cheng ve Smith, 1975
<i>Olyga sativa</i>	10.0 2,4-D	-	Kök	Nishi <i>ve ark.</i> , 1968
<i>Panicum miliaceum</i>	45.2 2,4-D	-	Yaprak	Rangan, 1974
<i>Triticum aestivum</i>	10.0 Dicamba	1.0 IAA + 0.1 BA	Çiçek sapı	Dudits <i>ve ark.</i> , 1975
<i>Triticum durum</i>	27.0 NAA	27.0 NAA	Yaprak	Bennici ve D'Amato, 1978
<i>Zea mays</i>	9.0 2,4-D	-	Embriyo	Green ve Phillips, 1975
<i>Liliaceae</i>				
<i>A. ili um cepa</i>	5.0 2,4-D	5.0 2iP	Yumru	Fridborg, 1971
<i>Allium porrum</i>	-	20-29 2iP + 5.4-11 NAA	Yaprak tabam	Dunstan ve Short, 1979
<i>Allium sativum</i>	10.0 CPA + 2.0 2,4-D + 0.5 KIN	10.0 IAA + 10.0 KIN	Gövde, Yaprak	Abo El-Nil, 1977
<i>Hyacinthus orientalis</i>	0.44-1.3 BA + 0.54-1.6 NAA	13.0 BA + 1.6 NAA	Çiçek tomurcuğu	Kim <i>ve ark.</i> , 1981
<i>Muscari botryoides</i>	11.4-45.6 IAA + 0.69-43.0 NAA	11.4 IAA + 0.14 2,4-D	Yumru, Gövde	Hussey, 1975
<i>Pinaceae</i>				
<i>Cupressus sempervirens</i>		2.2 BA	Kotiledon	Thomas <i>ve ark.</i> , 1977
<i>Picea abies</i>	5.0 BA + 5.0 NAA	5.0 BA + 5.0 NAA	Yaprak	Jansom ve Bornman, 1980
<i>Pinus sylvestris</i>	30.0 IBA + 5.0 BA	20.0 BA	Yaprak, Sürgün	Bornman ve Janson, 1980

Kaynaklar

- Abo El-Nil MM (1977) Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum*C). Plant Sci. Lett., 9: 259-264.
- Ahuja MR, Hagen GL (1966) Morphogenesis in *Nicotiana debneyitabacum* and *Nicotiana longiflora*, and their tumor-forming hybrid derivatives. Dev. Biol, 13: 408-423.
- Ammirato PV (1983) Embryogenesis. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamado Y (eds), Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1., pp. 82-123, Macmillan, New York.
- Attfield EM, Evans PK (1991) Developmental pattern of root and shoot organogenesis in cultured leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. J. Exp. Bot., 42: 51-57.
- Bajaj YPS, Bopp M (1972) Growth and organ formation in *Sinapis alba* tissue culture. Z. Pflanzenphysiol., 66: 378-381.
- Bajaj YPS, Mader M (1974) Growth and morphogenesis in tissue cultures of *Anagallis arvensis*. Physiol. Plant., 32: 43-48.
- Bajaj YPS, Nietsch P (1975) *In vitro* propagation of red cabbage {*Brassica oleracea* L. var. *capitata*}. J. Exp. Bot., 26: 883-890.
- Bajaj YPS, Sidhu BS, Dubey VK (1981) Regeneration of genetically diverse plants from tissue cultures of forage grass-*Panicum* spp. Euphytica, 30: 135-140.
- Baroncelli S, Buiatti M, Bennici A (1973) Genetics of growth and differentiation *in vitro* of *Brassica oleracea* var. *botrytis*. Z. Pflanzenzüchtg., 70: 99-107.
- Bennici A, D'Amato F (1978) *In vitro* regeneration of Durum wheat plants. I. Chromosome numbers of regenerated plantlets. Z. Pflanzenzüchtg., 81: 305-311.
- Bhatt PN, Bhatt DP, Sussex IM (1979) Organ regeneration from leaf disks of *Solanum nigrum*, *S. dulcamara*, and *S. khasianum*. Z. Pflanzenphysiol., 95: 355-362.
- Bingham ET, Hurley LV, Kaatz DM, Saunders JW (1975) Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. Crop Sci., 15: 719-721.
- Bonnet HT, Torrey JG (1965) Chemical control of organ formation in root segments of *Convolvulus arvensis* cultured *in vitro*. Am. J. Bot., 53: 496-508.
- Bonnet HT, Torrey JG (1966) Comparative anatomy of endogenous bud and lateral root formation in *Convolvulus arvensis* roots *in vitro*. Am. J. Bot., 53: 496-508.
- Bornman CH, Jansson E (1980) Organogenesis in cultured *Pinus sylvestris* tissue . Z. Pflanzenphysiol., 96: 1-6.
- Bozcuk S (1997) Bitki Fizyolojisi, 223 sayfa, Hatiboğlu Yayınlan, Ankara.
- Broome OC, Zimmerman RH (1978) *In vitro* propagation of blackberry. HortScience, 13: 151-153.
- Brown DCW, Leung DWM, Thorpe TA (1979) Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. Physiol. Plant., 46: 36-41.

- Brown DCW, Thorpe TA (1980a) Changes in water potential and its components during shoot initiation in tobacco callus. *Physiol. Plant*, 49: 83-87.
- Brown DCW, Thorpe TA (1980b) Adenosine phosphate and nicotinamide adenine nucleotide pool sizes during shoot initiation in tobacco callus. *Plant Physiol.*, 65: 587-590.
- Brown DCW, Thorpe TA (1982) Mitochondrial activity during shoot formation and growth in tobacco callus. *Physiol. Plant.*, 54: 125-130.
- Bush SR, Earle ED, Langhans RW (1976) Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* "Indianapolis." *Am. T. Bot*, 63: 729-737.
- Carlson PS, Smith HH, Dearing RD (1972) Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69: 2292-2294.
- Caruso JL (1971) Bud formation in excised stem segments of *Verbascum thapsus*. *Am. J. Bot*, 58: 429-431.
- Carvalho MAM, Monteiro WR, Dietrich SMC (1989) Histological aspects of root formation in petioles of detached leaves of *Pereskia grandifolia* (Cactaceae): Natural conditions and effects of GA₃ and dark. *Ann. Bot*, 63: 505-514.
- Chalupa V (1987) Temperature. In: Bonga JM, Durzan DJ (eds), *Celi and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 1, pp. 142-151, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Chandler SF, Thorpe TA (1986) Hormonal regulation of organogenesis *in vitro*. In: Purohit SS (ed), *Hormonal Regulation of Plant Growth and Development*, Vol. 3, s. 1-27, Agro Botanical Publishers, India.
- Cheng TY, Smith HH (1975) Organogenesis from callus culture of *Hordeum vulgare*. *Planta*, 123: 307-310.
- Chlyah H (1974) Formation and propagation of celi division centres in the epidermal layer of internodal segments of *Torenia fourieri* Lind. grown *in vitro*. Simultaneous surface observations of all the epidermal cells. *Can. J. Bot*, 52: 867-872.
- Christianson ML, Warnick DA (1983) Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Dev. Biol*, 95: 288-293.
- Christianson ML, Warnick DA (1985) Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. *Dev. Biol*, 112: 494-497.
- Christianson ML (1987) Causal events in morphogenesis. In: Green CE, Somers DA, Hackett WP, Biesboes DO (eds), *Plant Tissue and Celi Culture*, pp. 45-55, Liss, New York.
- Crocama OJ, Sharp WR, Peters JE (1976) Plantlet morphogenesis and the control of callus growth and root induction of *Phaseolus vulgaris* with the addition of a bean seed extract. *Z. Pflanzenphysiol*, 78: 456-460.
- Cummings DP, Green CE, Stuthman DD (1976) Callus induction and regeneration in oats. *Crop Sci*, 16: 465-470.
- DeGreef W, Jacobs (1979) *In vitro* culture of the sugarbeet: description of a celi line with high regeneration capacity. *Plant Sci. Lett*, 17: 55-61.

- DeLanghe E, Debergh P, Van Rijk R (1974) *In vitro* culture as a method for vegetative propagation of *Euphorbia pulcherrima* Z. Pflanzenphysiol., 71: 271-274.
- Dougall DK, Verma DC (1978) Growth and embryo formation in wild-carrot suspension cultures with ammonium ion as a sole nitrogen source. In Vitro, 14: 180-182. *
- Dudits D, Nemet G, Haydu Z (1975) Study of callus growth and organ formation in wheat (*Triticum aestivum*) tissue cultures. Can. J. Bot., 53: 957-963.
- Dunstan DJ, Short KC (1979) Shoot production from cultured *Allium porum* tissues. Hort. Sri., 11: 37-43.
- Earle ED, Torrey JG (1965) Morphogenesis in celi colonies grown from *Convolvulus* celi suspensions plated on synthetic media. Am. J. Bot., 52: 891-899.
- Engvild KC (1973) Shoot differentiation in callus cultures of *Datura innoxia*. Physiol. Plant., 28: 155-159.
- Erikson T (1965) Studies on growth requirements and growth measurements of celi cultures of *Haplopappus gracilis*. Physiol. Plant., 18: 976-993.
- Evans DA, Sharp WR, Flick CE (1981) Growth and behavior of celi cultures. In: Thorpe TA (ed), Plant Tissue Culture - Methods and Applications in Agriculture, pp. 45-113, Academic Press, New York.
- Frearson F M, Power JB, Cocking EC (1973) The isolation, culture and regeneration of *Petunia* protoplasts. Dev. Biol., 33: 130-137.
- Freytag AH, Anand SC, Rao-Arelli AP, Owens LD (1988) An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. *in vitro*. Plant Celi Rep., 7: 30-34.
- Fridborg G (1971) Growth and organogenesis in tissue cultures of *Allium cepa* var. *proliferum*. Physiol. Plant., 25: 436-440.
- Fry SC (1990) Roles of the primary celi wall in morphogenesis. In: Nijkomp HJJ, Van Der Plas LHW, Van Aartrijk J (eds), Progress in Plant Cellular and Molecular Biology, pp. 504-512, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Celi Res., 50: 151-158.
- Gamborg OL, Murashige T, Thorpe TA, Vasil IK (1976) Plant tissue culture media. In Vitro, 12: 473-478.
- Gamborg OL, Shyluk JP, Fowke LC, Wetter LR, Evans DA (1979) Plant regeneration from protoplasts and celi cultures of *N. tabacum* sulfür mutant (Su/Su). Z. Pflanzenphysiol., 95: 255-264.
- Gharyal PK, Maheshwari SC (1981) *In vitro* differentiation of somatic embryoids in a leguminous trze-*Albisia lebeck* L. Natunvissen, 68: 379-380.
- Gramberg JJ (1971) The first stages of the formation of adventitious roots in petioles L *Phaseolus vulgaris*. Proc. Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen, 74: 42-45.

- Green CE, Phillips RL (1975) Plant regeneration from tissue cultures of maize. Crop Sci., 15: 417-421.
- Guha S, Maheshwari SC (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature, 204: 497.
- Gunay AL, Rao PS (1978) *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). Plant Sci. Lett., 11: 365-372.
- Gürel E (1993) Callus development and organogenesis in cultured leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Proceedings of the Second Arab Conference on Perspectives of Modern Biotechnology, pp. 314-330, 24-28 Nisan 1993, Amman, Ürdün.
- Gürel E, Wren MJ (1995a) *In vitro* development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Rhizogenesis and the effect of sequential exposure to auxin and cytokinin. Ann. Bot., 75: 31-38.
- Gürel E, Wren MJ (1995b) Measuring polyphenol oxidase activity in small leaf discs of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Turkish J. Bot., 19: 497-502.
- Gürel E, Gürel S (1996) Plant regeneration from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured *in vitro*. Kükem Dergisi, 19: 29-37.
- Gürel E (1997a) Callus and root development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Variability at variety, plant and organ level. Turkish J. Bot., 21: 131-136.
- Gürel E (1997b) Plant tissue culture studies in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Kükem Dergisi, 20: 1-13.
- Gürel E (1997c) Plant tissue culture techniques and types of *in vitro* development occurring in cultures. I. Kızıllmak Fen Bilimleri Kongresi, Kırıkkale Üniversitesi, 14-16 Mayıs 1997, s. 25-36, Kırıkkale.
- Gürel E (1998a) Transferring an antimicrobial gene into *Agrobacterium* and tobacco. II. Uluslararası Kızıllmak Fen Bilimleri Kongresi, Kırıkkale Üniversitesi, 20-22 Mayıs 1998, s. 183-191, Kırıkkale.
- Gürel E (1998b) Bitki hücre ve doku kültürlerinin güncel uygulama alanları. Kükem Dergisi, 21: 17-24.
- Gürel E, Gürel S (1998) Plant regeneration from unfertilized ovaries of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured *in vitro*. Turkish J. Bot., 22: 233-238.
- Gürel E, Kazan K (1998) Development of an efficient plant regeneration system in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Turkish J. Bot., 22: 381-387.
- Gürel S, Gürel E, Kaya Z (1998) Ovule culture in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines. II. Uluslararası Kızıllmak Fen Bilimleri Kongresi, Kırıkkale Üniversitesi, 20-22 Mayıs 1998, s. 236-251, Kırıkkale.
- Gürel E, Kazan K (1999) Evaluation of various sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes for *Agrobacterium tumefaciens-mediated* gene transfer. Turkish J. Bot., 23: 171-177.
- Halperin W, Wetherell DF (1964) Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. Am. J. Bot., 51: 274-283.

- Hayward C, Power JB (1975) Plant production from leaf protoplasts of *Petunia parodii*. Plant Sci. Lett, 4: 407-410.
- Helgeson JP (1979) Tissue and cell-suspension culture. In: Durbin RD (ed), *Nicotiana* Procedures for Experimental Use, pp. 52-59, USDA, Washington.
- Heller R (1953) Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives *in vitro*. Ann. Sci. Natl. Biol. Veg., 14: 1-223.
- Hicks GS (1980) Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. Bot. Rev., 46: 1-23.
- Hiraoka N, Tabata M (1974) Alkaloid production by plants regeneradon from cultured cells of *Datura innoxia*. Phytochem., 13: 1671-1675.
- Hussey G (1975) Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Uliaceae*, *Iridaceae*, and *Amaryllidaceae*. J. Exp. Bot., 26: 253-262.
- Huxter TJ, Thorpe TA, Reid DM (1981) Shoot inidation in light and dark-grown tobacco callus: The role of ethylene. Physiol. Plant., 53: 319-326.
- Janson E, Bornman CH (1980) *In vitro* phyllomorphic regeneradon of shoot buds and shoots in *Picea abies*. Physiol. Plant., 49: 105-111.
- Johnson BB, Mitchell ED (1978) *In vitro* propagation of broccoli from stem, leaf, and leaf rib explants. HortScience, 13: 246-247.
- Kadıoğlu A (1999) Bitki Fizyolojisi, 377 sayfa, Eser Ofset, Trabzon.
- Kaul K, Sabharwal PS (1972) Morphogenetic studies on Haworthia: Establishment of tissue culture and control of differentiation . Am. J. Bot., 59: 377-385.
- Kim YJ, Hasegawa PM, Bressan RA (1981) *In vitro* propagation of hyacinth. Hortscience, 16:645-647.
- Kohlenbach HW (1977) Basic aspects of differentiation and plant regeneration from celi and tissue cultures. In: Barz W, Reinhard E, Zenk EH (eds), Plant Tissue Culture and its Biochemical Application, pp. 355-366, Springer-Verlag, Berlin.
- Kumar PP, Reid DM, Thorpe TA (1987) The role of ethylene and carbon dioxide in differentiation of shoot buds in excised cotyledons of *Pinus radiata in vitro*. Physiol. Plant., 69: 244-252.
- Lam SL (1975) Shoot formation in potato tuber discs in tissue culture. Am. Pot. J., 52: 103-106.
- Lance B, Reid DM, Thorpe TA (1976) Endogenous gibberellins and growth of tobacco callus cultures. Physiol. Plant., 36: 287-292.
- Maeda E, Thorpe TA (1979) Shoot histogenesis in tobacco callus cultures. In Vitro, 15: 415-424.
- Malmberg RL (1979) Regeneration of whole plants from callus cultures of diverse genetic lines of *Pisum sativum* L. Planta, 146: 243-244.

- Margara J, Bouniols A (1967) Comparison *in vitro* de l'influence due milieu liquide ougelese, sur l'initiation florale chez *Cichorium intybus* L. C.R. Acad. Sci. Ser. D., 264: 1166-1168.
- Matsuoka H, Hinata K (1979) NAA-induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyl callus of *Solanum melongena* L. J. Exp. Bot, 30: 363-370.
- Mehra A, Mehra PN (1972) Organogenesis and plantlet formation *in vitro* in almond. Bot. Gaz, 135: 61-73.
- Mehra PN, Sachdeva S (1979) Callus cultures and organogenesis in apple. Phytomorph, 29: 310-324.
- Miller CO, Skoog F, Okumura FS, Von Saltza MH, Strong FM (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting celi division. J. Am. Chem. Soc, 78: 1375-1380.
- Minocha SC (1987) pH of the medium and the growth and metabolism of cells in culture. In: Bonga JM, Durzan DJ (eds), Celi and Tissue Culture in Forestry, Vol. 1, pp. 3-224, Mardnus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Molnar JM, Lacroix J (1972) Studies of the rooting of cuttings of *Hydrangea macrophylla* L. DNA and protein changes. Can. J. Bot, 50: 387-392.
- Murashige T (1974) Plant propagation through tissue culture. Annu. Rev. Plant Physiol, 25: 135-166.
- Murashige T (1979) Principles of rapid propagation . In: Hughes KW, Henke R, Constantun M (eds), Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture: A Bridge Between Research and Application, pp. 14-24, Springfield, Washington.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473-497.
- Narayanaswamy S (1977) Regeneration of plants from tissue cultures. In: Reinert J, Bajaj YPS (eds), Applied and Fundamental Aspects of Plant Celi, Tissue and Organ Culture, pp. 179-248, Spnnger-Verlag, Berlin.
- Nishi T, Yamada Y, Takahashi E (1968) Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. Nature, 219: 508-509.
- Nobecourt P (1939) Sur les radicles naissant des cultures de tissus vegetaux. C.r. Seanc. Soc. Biol, 130: 1271-1272.
- Ogura H, Tsuji S (1977) Differential responses of *Nicotiana tabacum* L. and its putative progenitors to de-and redifferentiation . Z. Pflanzenphysiol, 83: 419-426.
- Ohki S, Bigot C, Mousseau J (1978) Analysis of shoot-forming capacity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mili) and their hybrids. Plant Celi Physiol, 19: 27-42.
- Özcan S, Sevimay CS, Yıldız M, Sancak C, Özgen M (1998) Prolific shoot regeneration from immature embryo explants of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Plant Celi Rep, 16: 200-203.
- Özgen M, Özcan S, Sevimay CS, Sancak C, Yıldız M (1998) High frequency adventitious shoot regeneration in sainfoin. Plant Celi Tiss. Org. Cult, 52: 205-208.

- Patel KR, Thorpe TA (1984) *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. Ex Loud). Plant Cell Tiss. Org. Cult., 3: 31-142.
- Pelletier G, Delise B (1969) Sur la faculte de regeneration des plantes entieres par culture *in vitro* du pedoncule floral de *Petuniapendula*. Ann. Amelior. Plantes, 19: 353-355.
- Peterson RL (1975) The initiation and development of root buds. In: Torrey JG, Clarkson DT (eds), The Development and Functions of Roots, pp. 125-162, Academic Press, London.
- Phillips GC, Collins GB (1979) *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Sci., 19: 59-64.
- Philp VJ, Padikkala J (1989) The role of indoleacetic acid in the conversion of root meristems to shoot meristems in *Vanillaplanifolia*. J. Plant Physiol., 135: 233-236.
- Power JB, Berry SF (1979) Plant regeneration from protoplasts of *Broussaisia viscosa*. Z. Pflanzenphysiol., 94: 469-471.
- Rangan TS (1974) Morphogenic investigations on tissue cultures of *Panicum miliaceum*. Z. Pflanzenphysiol., 72: 456-459.
- Rao PS, Narayanaswamy S (1968) Induced morphogenesis in tissue cultures of *Solanum xanthocarpum*. Plant ta, 81: 372-375.
- Righetti B, Facini O (1992) Headspace gas composition in four *Prunus avium* cultivars with differing photosynthetic capabilities. In Vitro Cell. Dev. Biol., 28: 179-182.
- Ross MK, Thorpe TA (1973) Physiological gradients and shoot initiation in tobacco callus. Plant Cell Physiol., 14: 473-480.
- Ross MK, Thorpe TA, Costerton JW (1973) Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. Amer. J. Bot., 60: 788-795.
- Rumary C, Thorpe TA (1984) Plantlet formation in black and white spruce, I: *In vitro* techniques. Can. J. For. Res., 14: 10-16.
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot., 50: 199-204.
- Shang XM, Huang JY, Haigler CH, Trohnder NL (1991) Buffer capacity of cotton cells and effects of extracellular pH on growth and somatic embryogenesis in cotton cell suspensions. In Vitro Cell. Dev. Biol., 27: 147-152.
- Sharma KK, Bhojwani SS (1990) Histological aspects of *in vitro* root and shoot differentiation from cotyledon explants of *Brassicajunceae* (L.) Czern. Plant Sci., 69: 207-214.
- Sharma KK, Bhojwani SS, Thorpe TA (1990) Factors affecting high frequency differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. Plant Sci., 66: 247-253.
- Skirvin RM, Chu MC (1979) *In vitro* propagation of "Forever Yours" rose. Hortsci., 14: 608-610.

- Skirvin RM, Janick J (1976) Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. J. Am. Soc. Hort Sci., 101: 281-290.
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol., 11: 118-130.
- Skoog F, Tsui C (1948) Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. Am. J. Bot., 35: 782-787.
- Skoog F (1944) Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. Am. J. Bot., 31: 19-24.
- Smith DL, Krikorian AD (1990) Somatic embryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: Evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. Plant Celi. Rep., 9: 34-37.
- Smith DR, Thorpe TA (1975) Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings. I. Developmental sequence. J. Exp. Bot., 26:184-191.
- Sommer HE, Brown CK, Kormanik PP (1975) Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mili.) tissue cultured *in vitro*. Botan. Gaz., 136: 196-200.
- Srivastava PS, Steinhauer A (1981) Regeneration of birch plants from catkin tissue cultures. Plant Sci. Lett., 22: 379-386.
- Sterling C (1951) Origin of buds in tobacco stem segments cultured *in vitro*. Am. J. Bot., 38: 761-767.
- Steward FC, Mapes MO, Kent AE, Holslen RD (1964) Growth and development of cultured plant cells. Science, 143: 20-27.
- Stringham GR (1979) Regeneration in leaf-callus of haploid rapeseed (*Brassica napush.*). Z. Pflanzenphysiol., 92: 459-462.
- Takebe I, Labib G, Melchers G (1971) Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissen., 58: 318-329.
- Tal M, Dehan K, Heikin H (1977) Morphogenetic potential of cultured leaf sections of cultivated and wild species of tomato. Ann. Bot., 41: 937-941.
- Tanimoto S, Harada H (1980) Hormonal control of morphogenesis in leaf explants of *Perilla frutescens* Bntton var. *crispa* Decaisne f. *Virida-crispa* Makino. Ann. Bot., 45: 321-327.
- Thomas MJ, Duhoux E, Vazart J (1977) *In vitro* organ initiation in tissue cultures of *Biota orientalis* and other species of the *Cupressaceae*. Plant Sci. Lett., 8: 395-400.
- Thorpe TA (1974) Carbohydrate availability and shoot formation in tobacco callus cultures. Physiol. Plant., 30: 77-81.
- Thorpe TA (1980) Organogenesis *in vitro*. Structural, physiological and biochemical aspects. In: Vasil IK (ed), Perspectives in Plant Celi and Tissue Culture, Int. Rev. Cytol. Suppl., 11 A: 71-111.
- Thorpe TA (1994) Morphogenesis and regeneration. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds), Plant Celi and Tissue Culture, pp. 17-36, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

- Thorpe TA, Laishley EU (1973) Glucose oxidation during shoot initiation in tobacco callus cultures. *J. Exp. Bot.* 24: 1082-1089.
- Thorpe TA, Murashige T (1970) Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. *Can. J. Bot.*, 48: 277-285.
- Thorpe TA, Harry IS, Kumar PP (1991) Application of micropropagation to forestry. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds), *Micropropagation*, pp. 311-336, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Torrey JG, Reinert J (1961) Suspension cultures of higher plant cells in synthetic medium. *Plant Physiol.*, 36: 483-491.
- Torrey JG (1966) The initiation of organized development in plants. *Adv. Morph.*, 5: 39-91.
- Torrigiani P, Altamura MM, Pasqua G, Monacelli B, Serafini-Fracassini D, Bagni N (1987) Free and conjugated polyamines during *de novo* floral and vegetative bud formation in thin celi layers of tobacco. *Physiol. Plant.*, 70: 453-460.
- Tran Thanh Van K (1981) Control of morphogenesis in *in vitro* cultures. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 32: 291-311.
- Tran Thanh Van K, Trinh H (1978) Morphogenesis in thin celi layers: Concept, methodology and results. In: Thorpe TA (ed), *Frontiers of Plant Tissue Culture*, pp. 37-48, University of Calgary Press, Calgary.
- Tran Than Van K, Toubart P, Cousson A, Darvill AJ, Golün DG, Chelf P, Albersheim P (1985) Manipulation of morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. *Nature*, 314: 615-617.
- Vasil IK, Vasil V (1986) Regeneration in cereal and other grass species. In: *Celi Culture and Somatic Celi Genetics of Plants*, Vol. 3, pp. 121-150, Academic Press, New York.
- Vasil IK, Flildebrant AC (1966) Variation of morphogenetic behaviour in plant tissue cultures. I. *Cichorium endivia*. *Am. J. Bot.* 53: 860-869.
- Villalobos VM, Leung DWM, Thorpe TA (1984) Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. *Physiol. Plant.* 61: 497-504.
- Villalobos WM, Yeung EC, Thorpe TA (1985) Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. *Can. J. Bot.* 63: 2172-2176.
- Walker KA, Yu PC, Sato SJ, Jawarski EG (1978) The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa* L. cultured *in vitro*. *Am. J. Bot.* 65: 654-659.
- Walkey DGA, Woolfitt JMG (1968) Clonal multiplication of *Nicotiana rustica* L. from shoot meristems in culture. *Nature*, 220: 1346-1347.
- Wang PJ, Huang LC (1975) Callus cultures from potato tissue and the exclusion of potato virus X from plants regenerated from stem tips. *Can. J. Bot.* 53: 2565-2567.
- White J, Lovell PH (1984) The anatomy of root initiation in cuttings of *Griselinia littoralis* and *Griselinia lucida*. *Ann. Bot.* 54: 7-20.

E. Gürel, A.U. Türker

White PR (1939) Controlled differentiation in a plant tissue culture. Bull. Torrey Bot. Club, 66: 507-513.

White PR (1943) Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. Growth, 7: 53-65.

Wolter KE (1968) Root and shoot initiation in aspen callus culture. Nature, 219: 509-510.

Wochok ZS, Sussex IM (1975) Morphogenesis in *Selaginella*. III. Meristem determination and celi differentiation. Develop. Biol., 47: 376-383.

Yentür S (1995) Bitki Anatomisi, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No: 227, 560 sayfa, İstanbul.

Bölüm 3

Somatik Embriyogenesis

Sebahattin Özcan¹, Mehmet Babaoğlu², Cengiz Sancak³

¹Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 06110 Dışkapı, Ankara

²Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 42031 Kampüs, Konya

e-posta: ozcan@agri.ankara.edu.tr⁴

3.1. Giriş

Bitki hücrelerinden embriyo elde edilmesi döllenmiş 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 etmek mümkün olabilmektedir. Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak adlandırılmaktadır. Somatik doku hücreleri öncelikle yüksek oranda oksin (genellikle 2,4-D) içeren ortamda kültüre alınır, daha sonra da oksin içermeyen yeni ortama aktarırsa embriyo üretme yeteneğini kazanmaktadırlar. Oksinlerin somatik bitki hücrelerine embriyo üretimi için yeniden zigotik bir kapasite kazandırdığı belirlenmektedir (Monnier, 1990).

Somatik ve zigotik embriyogenesis arasındaki asıl önemli fark elde edilmiş yöntemlerinden kaynaklanmaktadır. Zigotik embriyo döllenmiş bir zigottan geliştiğinden dolayı, elde edilen bitkiler potansiyel olarak açılma gösterirler. Öte yandan, bireysel bitkilerin hücrelerinden geliştikleri için somatik embriyolardan elde edilen bitkiler genetik olarak klon oluşturmurlar (Bourman, 1994). Döllenmiş yumurtadan gelişen embriyoda olduğu gibi, iki çenekli bitkilerde somatik embriyolar da “globular”, kalp, torpido ve kotiledon oluşum safhalarını geçirirler (De Jong *ve ark.*, 1993). Öte yandan, somatik embriyolar organogenesis yoluyla gelişen sürgünlerden farklılık gösterirler. Gövde-kök eksenine aynı zamanda sahip

olup, asıl doku ile vaskular bağlantıları olmadığından dolayı dokudan kolaylıkla ayrılabilirler (De Jong *ve ark.*, 1993).

Somatik embriyogenesis ilk defa havuç bitkisinin somatik dokularından elde edilmiştir. Genel olarak somatik embriyo üretimi için çok değişik bitki kısımları kullanılabilir. Ancak, olgunlaşmamış zigotik embriyolar somatik embriyogenesis için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Bunun nedeni ise, zigotik embriyoların embriyogenik gelişme için gerekli olan genleri aktif hale getirdiklerine inanılmaktadır (De Jong *ve ark.*, 1993; Parrott *ve ark.*, 1993). Günümüzde buğday (Maes *ve ark.*, 1996), mısır (Bronsema 1997; Emeklier *ve ark.*, 1999), çeltik (Ozawa ve Komamine, 1989), soya (Hartweck *ve ark.*, 1988), bezelye (Özcan *ve ark.*, 1993) ve yonca (Lai ve McKersie, 1994) gibi birçok önemli kültür bitkisinde yüksek oranda somatik embriyo üreten yöntemler geliştirilmiştir.

Somatik embriyogenesis hızlı çoğaltmada, sentetik tohum üretiminde ve gen aktarımında önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak, eksplant kaynağı, genotip, bitki büyüme düzenleyicileri, azot kaynağı ve çevre şartları gibi etmenler somatik embriyogenesisi önemli ölçüde etkileyen faktörlerdir

3.2. Somatik Embriyogenesisi Etkileyen Faktörler

3.2.1. Eksplant kaynağı

In vitro çalışmalarda kullanılan başlangıç bitki parçası eksplant olarak adlandırılmaktadır. Somatik embriyogenesisin başarısında eksplant seçimi son derece önemli olmaktadır (Tisserat, 1985). Yüksek oranda başarı için eksplantın hızlı hücre bölünmesine sahip iyi gelişen ve sağlıklı bitkilerden alınması gereklidir. Öte yandan, olgun ve yüksek oranda organize olmuş dokuların embriyogenesis kapasiteleri son derece düşük olmaktadır. Eksplant uygun gelişme fizyolojisindeki bitkilerden alındığı takdirde birçok bitki kısmı somatik embriyogenesis için kullanılabilir. Ancak, genç doku ve organlar genellikle yaşlı doku ve organlardan daha başarılı olmaktadır. Odunsu bitkileri ve buğdaygilleri de içine alan birçok bitki türünde somatik embriyogenesis için en uygun eksplantın olgunlaşmamış zigotik embriyoların olduğu belirlenmiştir. Baklagillerde ise olgunlaşmamış kotiledonlardan yüksek oranlarda somatik embriyo oluşumu gözlenebilmektedir.

Eksplant alınacak olan bitkilerin yetiştirme şartları da embriyogenesisin başarısında önemli rol oynamaktadır. Işık, nem, toprağın besin durumu ve mevsimsel faktörler etkili olmaktadır (Warren, 1991) Genellikle sera şartlarında gelişen bitkiler tarlada yetişen bitkilerden daha iyi sonuç vermektedir. Ayrıca, tüm gelişme şartları optimum düzeyde olduğundan dolayı, *in vitro* gelişen bitkiciklerden alınan eksplantlardan da yüksek oranlarda başarı sağlanabilmektedir.

3.2.2. Genotip

Genel olarak, otsu bitkiler ağaç ve çalılara göre daha kolay rejenerasyon sağlamaktadır (Pierik, 1987). Somatik embriyo oluşturma frekansı bakımından türler arasında önemli farklılıklar gözlemlendiği gibi, aynı tür içerisindeki farklı genotip ve çeşitlerin dahi embriyo oluşturma kabiliyetleri farklı olmaktadır (Parrott *ve ark.*, 1993). 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 (Sonnino *ve ark.*, 1989; Parrott *ve ark.*, 1993). Yine, mısır ve yonca başta olmak üzere birçok bitki türünde melezleme ve seleksiyon neticesinde yüksek somatik embriyogenesis kabiliyetine sahip çeşitler geliştirilmiştir. Maes *ve ark.* (1996), 4 ekmeklik ve 3 makarnalık buğdayla yaptıkları çalışmada embriyo oluşturma bakımından çeşitler arasında önemli farklılıklar gözlemişlerdir. En yüksek embriyo oluşturma oranı % 89.3 ile “Felder” çeşidinden elde edilirken, en düşük değer %2.3 ise “makva” çeşidinden alınmıştır. Yine, Emeklier *ve ark.* (1999), kültüre aldıkları 14 farklı mısır genotipinin somatik embriyogenesis kabiliyetlerinin %0.0-77.5 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Reisch ve Bingham (1980) tarafından yapılan bir çalışmada yoncada *Rn1* ve *Kn2* olarak isimlendirilen iki genin yüksek oranda rejenerasyon için gerekli olduğunu belirtilmiştir. Yonca “Rangelander” çeşidinden elde edilen ve RL34 adı verilen bir bitkinin yüksek embriyogenesis kabiliyetine sahip olduğu ve *in vitro* çalışmalarında genetik olarak s tabii olduğu gözlenmiş olup (McKersie *ve ark.*, 1989), embriyogenesisden sorumlu olan genler melezleme ile diğer çeşitlere de aktarılabilmektedir. Hıyarda ise orta seviyede bir somatik embriyogenesis için iki dominant gen gerekli iken, üçüncü bir dominant genin bulunması yüksek oranda bir embriyo oluşumu sağlamaktadır (Parrott *ve ark.*, 1993). Farklı buğday genotipleri ile yapılan çalışmalarda 4B kromozomu üzerinde bulunan genlerin rejenerasyonda önemli oldukları belirtilirken (Higgins ve Mathias, 1987), sitoplazmanın (Ou *ve ark.*, 1989) ve mitokondriyal genomun (Rode *ve ark.*, 1988) da etkisinin olabileceği bildirilmektedir. Ayrıca, çayır üçgülü (Keyes *ve ark.*, 1980), mısır (Willman *ve ark.*, 1989) ve çeltik (Peng ve Hodges, 1989) bitkileriyle yapılan çalışmalarda eklemeli (additive) genetik etkinin de somatik embriyogenesis üzerine etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır.

3.2.3. Besin ortamının içeriği

Besin ortamına ilave edilen büyüme düzenleyicilerden 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, a-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/1 oranında katılmaktadır. Öte yandan, oksinler somatik

embriyogenesi teşvik etmek için kuHanılmalarına karşın, ortamda oksinin sürekli bulunması somatik embriyoların gelişimini engellemektedir (Parrott *ve ark.*, 1993). Eksplantın önce kısa bir süre oksin içeren ortamda kültüre alınması daha sonra da oksin içermeyen ortama aktarılmasıyla birçok bitki türünde yüksek oranlarda somatik embriyo oluşumu teşvik edilmiştir.

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. Aynı şekilde, bazı bitki türlerinde gibberellik asit de embriyoların bitkiye dönüşümünü teşvik etmektedir. Ortama absisik asit (ABA) ilave edilmesinin de anormal embriyo gelişimini engellediği belirtilmektedir (Endress, 1994).

Somatik embriyogenesis için besin ortamında bulunan mineral maddeler ve vitaminler bir diğer önemli parametredir. Murashige ve Skoog (1962) tarafından geliştirilen MS temel besin ortamı embriyogenesis çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. İlave olarak, Bs (Gamborg *ve ark.*, 1968), SH (Schenk ve Hildebrandt, 1972) ve Nr, (Chu *ve ark.*, 1975) ortamları da birçok bitki türünde başarılı sonuçlar vermektedir. Yüksek oranda indirgen N formu somatik embriyo oluşumunu ve gelişmesini teşvik etmektedir. Halperin ve Wetherell (1965) tarafından yapılan bir çalışmada besin ortamına sadece KNO₃ ilave edildiğinde embriyo oluşmazken, NH₄CI ilave edildiğinde embriyo oluşumu gözlenmiştir. Belirli amino asider, kazein hidrolizat, potasyum sitrat ve potasyum malat gibi bileşikler de NHA yerine kullanılabilir.

Besin ortamına inositol ve sorbitol gibi şekerlerin katılması embriyo yapısını iyileştirirken, sakkaroz ise embriyogenesi teşvik etmektedir. Ancak, sakkaroz oksin sentezini engelleyici etkiye sahip olduğu da göz ardı edilmemelidir (Endress, 1994). Bu yüzden, birçok embriyogenesis protokolünde embriyo teşvik aşamasında sakkaroz düşük oranlarda (% 10-20) kullanılırken, embriyo olgunlaştırma aşamasında yüksek oranlarda (%50-60) kullanılmaktadır.

3.2.4. Çevre şartları

Işık kaynağı, yoğunluğu ve süresi ile sıcaklık somatik embriyo oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, kültür kaplarındaki oksijen/karbondioksit ve diğer gazların yoğunluğu da başarıda etkili olmaktadır. Işık, oksinleri parçalayıcı bir etkiye sahip olduğundan dolayı embriyogenik kallus gelişimini engellemektedir. Ancak, embriyogenik kallus oluşumundan sonra ışık embriyo gelişimini teşvik etmektedir. Bu yüzden, genellikle 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

(Endress, 1994). Bitki türüne bağlı olmakla beraber en yüksek oranda embriyo gelişimi 24-26 °C'de gerçekleşmektedir.

3.3. Somatik Embriyo Rejenerasyonu

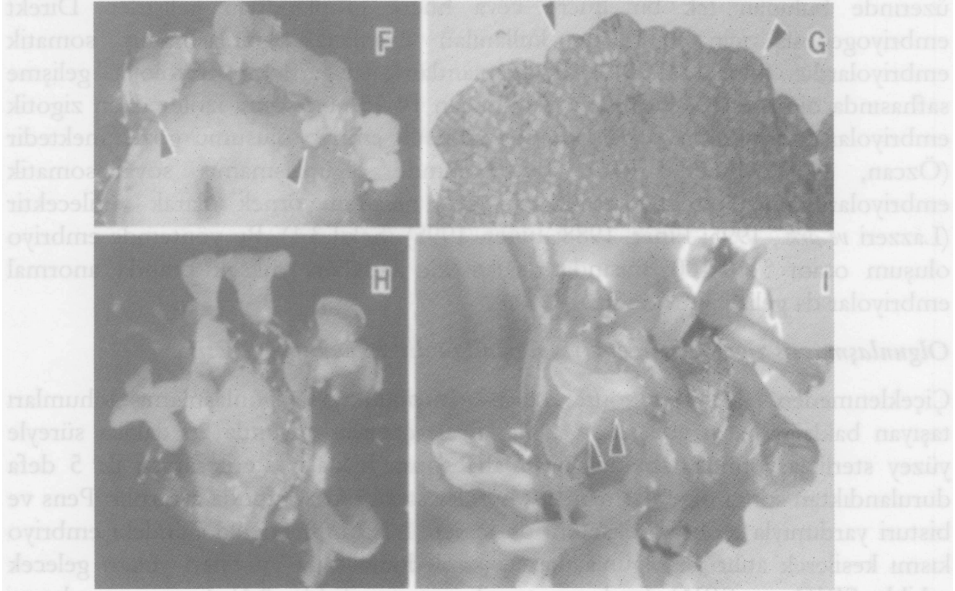
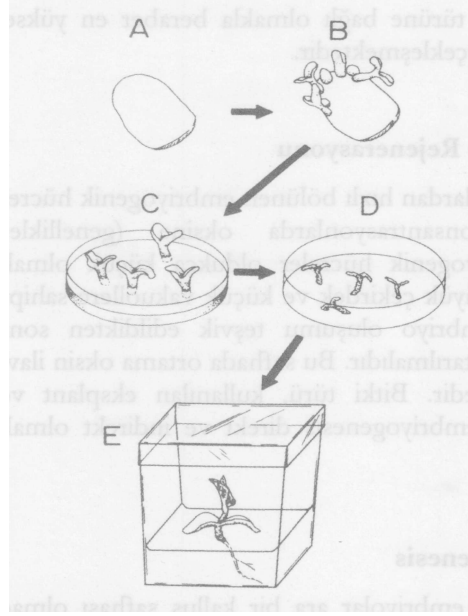
Kültüre alınan eksplantlardan hızlı bölünen embriyogenik hücreleri elde etmek için öncelikle yüksek konsantrasyonlarda oksine (genellikle 2,4-D) ihtiyaç duyulmaktadır. Embriyogenik hücreler oldukça küçük olmakla birlikte, yoğun sitoplazma içeriğine, büyük çekirdek ve küçük vakuollere sahiptirler. Oksin içeren besin ortamlarında embriyo oluşumu teşvik edildikten sonra kültürler oksin içermeyen ortamlara aktarılmalıdır. Bu safhada ortama oksin ilave edilmesi embriyo gelişimini engellemektedir. Bitki türü, kullanılan eksplant ve besin ortamının içeriğine bağlı olarak embriyogenesis direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir.

3.3.1 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 (Finer, 1995). Bu eksplantlarda uygun bir fizyolojik gelişme safhasında olmalıdır. Genellikle tozlanmadan 14-15 gün sonra izole edilen zigotik embriyolar üzerinde en yüksek oranda somatik embriyo oluşumu gözlenmektedir (Özcan, 1992; Finer, 1995). Bu bölümde olgunlaşmamış soya somatik embriyolarından indirekt somatik embriyo oluşumu örnek olarak verilecektir (Lazzeri ve ark., 1995; Finer, 1988; Finer, 1995) (Şekil 3.1). Bu yöntemde embriyo oluşum oranı %10-100 arasında değişmekle beraber, yüksek oranda anormal embriyolar da gelişebilmektedir.

Olgunlaşmamış zigotik soya embriyolarından direkt embriyogenesis:

Çiçeklenmeden 10-21 gün sonra 2-6 mm büyüklükteki olgunlaşmamış tohumları taşıyan baklalar hasat edilerek, %20'lik ticari çamaşır suyunda 20 dakika süreyle yüzey sterilize edilerek suyunu atıp tutulur. Daha sonra baklalar steril saf su ile 5 defa durulandıktan sonra olgunlaşmamış tohumlar steril şartlar altında çıkartılır. Pens ve bisturi yardımıyla embriyo eksenini de içeren 1-1.5 mm büyüklüğündeki embriyo kısmı kesilerek atılır ve olgunlaşmamış kotiledonlar düz yüzeyleri yukarı gelecek şekilde SBID ve SBIN (embriyo teşvik ortamı; Tablo 3.1) besin ortamlarına yerleştirilir. Kültür başlangıcından 4-6 hafta sonra kotiledonlar üzerinde oluşan somatik embriyolar ve dokular kesilerek SBD (embriyo gelişme) ortamına aktarılır. SBD ortamında 4 hafta sonra gelişen ve 5 mm' den büyük olan embriyolar çimlenme ve gelişme için MS ortamına aktarılarak bitkicikler elde edilir.



Şekil 3.1. Olgunlaşmamış soya kotiledonlarından direkt somatik embriyogenesis. (A) Embriyo eksenini çıkartılarak 10 mg/l NAA içeren ortamda 7-10 gün süreyle kültüre alınan olgunlaşmamış kotiledon eksplantı. (B,F,G,H ve I) NAA içermeyen besin ortamına aktarıldıktan sonra kotiledonlar üzerinde somatik embriyo gelişimi. (D) Somatik embriyoların desikasyona tabi tutulması. (E) Somatik embriyoların çimlendirilmesi ve bitki elde edilmesi (Parrott *ve ark.*, 1993 ile Finer, 1995'ten kullanım izni alınmıştır).

Tablo 3.1. Olgunlaşmamış zigotik soya embriyolarından direkt somatik embriyo oluşumu için gerekli olan besin ortamları (Finer, 1995).

MS ortamı	SBID ortamı	SBIN ortamı	SBD ortamı
MS mineralleri	MS mineralleri	MS mineralleri	MS mineralleri
Demir EDTA	Demir EDTA	Demir EDTA	Demir EDTA
B ₅ vitaminleri	B ₅ vitaminleri	B ₅ vitaminleri	B ₅ vitaminleri
%3 Sakkaroz	%6 Sakkaroz	%6 Sakkaroz	%6 Maltoz
-	40 mg/1 2,4-D	10 mg/1 NAA	-
%0.8 Noble veya Phytagar	% 0.8 Noble veya Phytagar	%0.8 Noble veya Phytagar	%0.2 Gelrite
pH 5.7	pH 7.0	pH 7.0	PH 5.7

3.3.2. Indirekt embriyogenesis

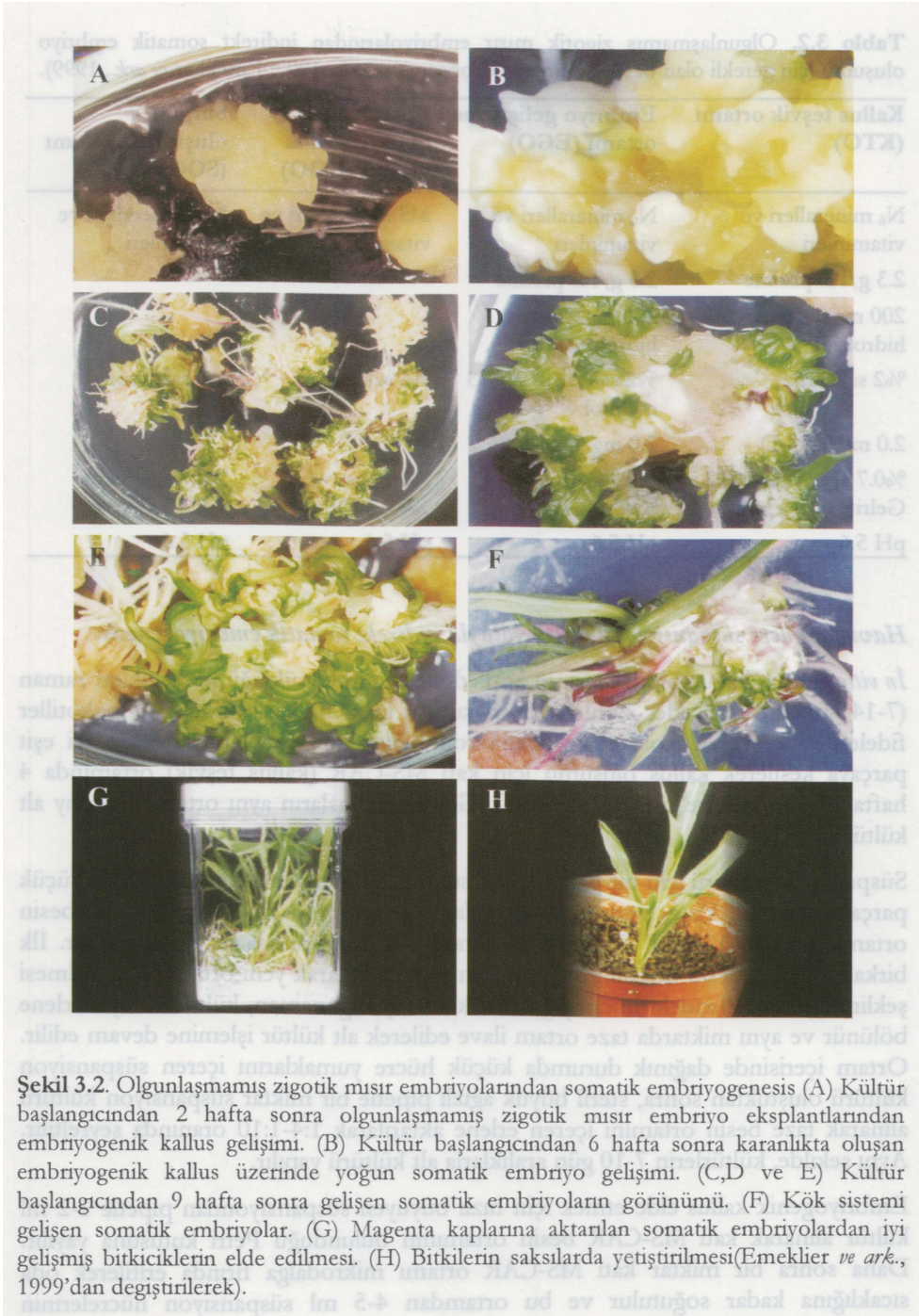
İndirekt embriyogenesis te eksplant yüksek oksin (genellikle 2,4-D) içeren besin ortamında kültüre alındığı zaman önce embriyogenik kallus oluşumu daha sonra da bu kallus üzerinde pro-embriyoların oluştuğu gözlenir. Bu kallus, oksin içermeyen besin ortamına aktarıldığı zaman da pro-embriyolardan bipolar (kök ve sürgün ucu meristemleri aynı anda oluşan sürgün eksen) embriyolar oluşur ve şardar uygun ise bu embriyolardan bitkicikler elde edilir (Tisserat, 1991). Genellikle eksplant üzerindeki hücrelerin çok az bir yüzdesi kallus oluşturur. Bu hücreler genellikle eksplantın yüzey katmanlarında olup, besin ortamıyla doğrudan temas halindedir. Pro-embriyolar tek bir hücreden geliştiği gibi hücre gruplarından da gelişebilmektedir (Tisserat, 1991).

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

İndirekt somatik embriyogenesis; olgunlaşmamış mısır zigotik embriyolarından (Bronsema ve ark., 1997; Emekker ve ark., 1999) ve havuç hipokodilerinden (Philphs ve ark., 1995) somatik embriyo üretimi örnek olarak verilebilir.

Olgunlaşmamış zigotik mısır embriyolarından indirekt embriyogenesis:

Embriyogenesis kabiliyeti yüksek olan mısır çeşidine ait tohumlar tarlaya ekilerek, mısır yetiştirme tekniğinin gerektirdiği ekim ve bakım koşulları yerine getirilir. Çeşit safiyetini devam ettirmek için kontrollü tozlama yapılır. Bunun için, koçan ve tepe püskülleri kese kağıdıyla kapatılarak, sabahın erken saatlerinde, her çeşide ait bitkilerin tepe püsküllerinden alınan polenler ile koçan püskülleri tozlanır. Tozlanmadan 11-12 gün sonra hasat edilen ve yaprakları soyulan mısır koçanları, steril kabinde % 25'lik Axion (%Tlik sodyum hipoklorit) bulunan cam beherlerde 20 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulur. Sterilizasyonu takiben, koçanlar steril su ile 3 defa durulanır. Daha sonra, karyopsisin üst kısmı kesilmek suretiyle olgunlaşmamış zigotik embriyolar izole edilerek, kök-sürgün eksenine aşağı gelecek şekilde kallus teşvik ortamına (KTO) yerleştirilir (Tablo 3.2). Bu şekilde, her Petri kutusunda 10 adet zarar görmemiş zigotik embriyo (1-2 mm büyüklüğünde) kültüre alınır. KTO ortamında, zigotik embriyolar 25 ± 1 °C' de karanlıkta 2 hafta süreyle inkübe edildikten sonra, gelişen kalluslar embriyo geliştirme ortamına (EGO) aktarılır. Bu ortamda 2 hafta aralıklarla alt kültür işlemi yapılır. Oluşan globular somatik embriyoları taşıyan kalluslar daha sonra embriyo olgunlaştırma ortamına (EOO) aktarılarak, kültürler aynı zamanda yavaş yavaş ışıklı ortama alıştırılırlar. Bunun için, kültürler EOO ortamına aktarıldıktan sonra ilk üç gün ışıklı ortamda havlu kağıdı ile sarılır, daha sonra havlu kağıdı alınır. Bu ortamda yeşil renkli embriyolar gelişmeye başlar. Gelişen embriyolar daha sonra, sürgün oluşturma ortamı (SOO) içeren Magenta kaplarına aktarılır. Magenta kaplarında kök sistemini geliştiren bitkiler son olarak saksılara şaşırtılarak, serada büyütülür. Işıklı ortamda, bütün kültürler 25 ± 1 °C de ve 16 saatlik fotoperiyot ile floresan altında inkübe edilir. Olgunlaşmamış zigotik mısır embriyolarından indirekt somatik embriyogenesis ile bitki elde edilmesinin aşamaları Şekil 3.2'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Tablo 3.2. Olgunlaşmamış zigotik mısır embriyolarından indirekt somatik embriyo oluşumu için gerekli olan besin ortamları (Bronsema *ve ark.*, 1997; Emekler *ve ark.*, 1999).

Kallus teşvik ortamı (KTO)	Embriyo geliştirme ortamı (EGO)	Embriyo olgunlaştırma ortamı (EOO)	Sürgün oluşturma ortamı (SOO)
No mineralleri ve vitaminlen	No mineralleri ve vitaminleri	MS mineralleri ve vitaminleri	MS mineralleri ve vitaminleri
2.3 g/1 L-proline	2.3 g/1 L-proline	-	-
200 mg/1 kazein hidrolizat	200 mg/1 kazein hidrolizat	-	-
%2 sakkaroz	%2 sakkaroz ve %3 manitol	%6 sakkaroz	%2 sakkaroz
2.0 mg/1 2,4-D	2.0 mg/1 2,4-D	-	-
%0.7 ağar veya %0.2.5 Gelrite	%0.7 ağar veya %0.2.5 Gelrite	%0.7 ağar veya %0.2.5 Gelrite	%0.7 ağar veya %0.2.5 Gelrite
pH 5.6	pH 5.6	pH 5.6	pH 5.6

Havuçta hücre süspansiyon kültürü yoluyla indirekt somatik embriyogenesis:

In vitro gelişen havuç bitkiciklerinin kotiledonları tam büyüklüğüne eriştikleri zaman (7-14 günlük) bitkicikler steril bir Petri kutusu içerisine yerleştirilir ve hipokotiller fidelerden kesilerek izole edilir. Daha sonra hipokotil eksplandarı enine iki eşit parçaya kesilerek kallus oluşumu için katı MS-CAR (kallus teşvik) ortamında 4 hafta süreyle kültüre alınır (Tablo 3.3). Gelişen kalkışların aynı ortamda her ay alt kültürü yapılır.

Süspansiyon kültürü için bir parça kallus steril Petri kutusuna konarak pensle küçük parçalara ayrılır. Yine, pensle bu parçalar içerisinde 15 ml sıvı MS-CAR besin ortamı bulunan 125 ml' lik erlenlere aktarılır ve haftada bir alt kültür yapılır. İlk birkaç alt kültür eski ortamın bir kısmının pipede atılarak yeni ortam ilave edilmesi şeklinde olur. Erlenlerdeki hücre yığını iki katına çıktığı zaman, kültür iki ayrı erlene bölünür ve aynı miktarda taze ortam ilave edilerek alt kültür işlemine devam edilir. Ortam içerisinde dağınık durumda küçük hücre yumaklarını içeren süspansiyon kültürü oluştuktan sonra, steril büyük ağızlı pipede bir miktar süspansiyon kültürü alınarak taze besin ortamını içeren erlene aktararak 1:4-1:10 oranında seyreltilir. Aynı şekilde, kültürlerin 7-10 gün aralıklarla alt kültürü yapılır.

Embriyogenik kallus elde etmek için hızlı büyüyen süspansiyondan pipede 1-2 ml kültür alınarak katı MS-CAR besin ortamının bulunduğu Petri kutusuna yayılır. Daha sonra bir miktar katı MS-CAR ortamı mikrodalga fırında eritilerek oda sıcaklığına kadar soğutulur ve bu ortamdan 4-5 ml süspansiyon hücrelerinin

bulunduğu Petri kutusu üzerine yayılır. Gelişen kalluslar aykık olarak alt kültüre aktarılır. Bu ortamda gelişen embriyolar akılarak büyüme için BSG ortamına yerleştirilir. Köklenen bitkicikler daha sonra toprağa aktarılır.

Tablo 3.3. Havuç hipokotil eksplantlarından hücre süspansiyon kültürü yoluyla somatik embriyogenesis için gerekli olan besin ortamları (PhiUips *ve ark.*, 1995)

MS ortamı	MS-CAR ortamı	BSG ortamı
MS mineralleri	MS mineralleri	MS mineralleri
Demir EDTA	Demir EDTA	Demir EDTA
MS vitaminleri	MS vitaminleri	B ₅ vitaminleri
%3 Sakkaroz	%3 Sakkaroz	%0.3 Sakkaroz
-	2 mg/1 2,4-D	-
%0.8 Phytagar	% 0.8 Phytagar (sıvı ortamda bulunmamaktadır)	%0.6 Phytagar

3.4. Somatik Embriyogenesisin Kullanım Alanları

3.4.1. Klonal çoğaltım

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. Bu sınırsız üretim, anaç bitkiden akan kısıtlı miktardaki materyale bağlı olan çekirdek çoğaltım karşısında çok büyük bir avantaja sahip olmaktadır. Özellikle, birçok bitki türü için geliştirilen hücre süspansiyon teknikleriyle az bir işçilikle, çok kısa bir sürede çok sayıda iyi gelişmiş embriyo elde etmek mümkün olmaktadır (Parrott *ve ark.*, 1993). Örneğin, Drew (1980)'in tahminlerine göre bir Htre embriyogenik havuç süspansiyon kültürü 1.35 milyon somatik embriyo içermekte olup, bu kapasite otomatik ve devamlı sıvı kültürlerle birleştirilebildiği takdirde ekonomik potansiyelinin çok daha büyük olacağı belirtilmektedir (Parrott *ve ark.*, 1993).

Somatik embriyoların döllenme sonucunda gelişen zigotik embriyolara göre en önemli üstünlükleri genetik açılmaların olmamasıdır. Somatik embriyolar, kültüre akan eksplantın somatik hücrelerinden gelişirler ve eksplantın akladığı bitkinin genotipini muhafaza ettirdiklerinden dolayı klon oluştururlar (Parrott *ve ark.*, 1993). Öte yandan, somatik embriyolar organize olmamış bir büyüme neticesinde geliştiklerinden dolayı *in vitro* mutasyonlar oluşabilmektedir (Warren, 1991). Ancak, embriyogenesis yoluyla elde edilen bitkilerdeki mutasyon oranı organogenesis ile elde edilenlerden daha düşük olduğu belirtilmektedir (Ozias-Akins ve Vasil, 1988).

Somatik embriyogenesis yağ palmyesini de içine alan bazı bitki türlerinde ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yağ palmyesi tohumla çoğaltılmakta olup, bitkiler yüksek oranda heterozigot olduğundan dolayı elde edilen döllerde büyük varyasyon gözlenmektedir. Ayrıca, bu bitkinin tek bir meristemi bulunmakta ve çelikle klonal çoğaltımı da mümkün olmamaktadır (Warren, 1991). Ivory sahillerinde 1983'ten sonraki 10 yıllık sürede somatik embriyolardan elde edilen bitkilerden 280 hektarlık yağ palmyesi plantasyonu kurulmuştur. Bu bitkilerin bazılarının çiçek yapılarında anormallikler gözlenmiş olsa bile, yağ oranı bakımından önemli bir homojenite sağlamışlardır (Parrott *ve ark.*, 1993).

Hücre süspansiyon kültürlerinden sınırsız sayıda embriyo üretilebilmesi araştırmacıları 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. Geniş anlamda ticari üretim için biyoreaktör ile birleştirilen otomatik bir sistem Plant Biotech Industries Ltd. tarafından geliştirilmiştir. Biyoreaktör içinde çok sayıda embriyonun otomatik olarak üretimi sağlanmakta ve bir biyoişlemci embriyoların ayırımını ve kültür kaplarına dağıtımını yapmaktadır. Bu sisteme bağlanan otomatik bir dikim makinesiyle da sera şardarında kompost ortamına saatte 8000 adet bitkiciğin dikimi yapılabilmektedir (Levin ve Vasil, 1989).

Somatik embriyo kültürleri, bitkilerin hızlı çoğaltılması yanında diğer bazı önemli özellikleri de taşımaktadırlar (Parrott *ve ark.*, 1993). 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 kullanılabilmek potansiyeline sahiptirler.

3.4.2. Sentetik tohum üretimi

Somatik embriyoların sentetik tohum olarak kullanımı büyük bir ekonomik öneme sahip olabilir. Somatik embriyolar bitkinin somatik hücrelerinden geliştikleri için zigotik embriyolardaki açılmalar olmamakta ve somatik embriyolardan elde edilen sentetik tohumlardan çoğaltma, klonal çoğaltım şeklinde olmaktadır. Yonca (Fujii *ve ark.*, 1989), havuç (Molle *ve ark.*, 1993), kereviz (Janick *ve ark.*, 1993) ve ladin (Roberts *ve ark.*, 1993) türlerinin somatik embriyolardan sentetik tohum üretimine yönelik başarılı çalışmalar yapılmıştır. Somatik embriyoların sentetik tohum olarak hızlı klonal çoğal tımda kullanılabilmesi için şu tekniklerin geliştirilmesi gerekmektedir (Onishi *ve ark.*, 1994):

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

Somatik embriyolarla zigotik embriyolar arasındaki en önemli fark, somatik embriyoların çimlenme sırasında besin kaynağı olarak kullanılan endosperm veya depo kotiledonları ile tohum kabuğuna sahip olmamalarıdır (Parrott *ve ark.*, 1993). Dolayısıyla, somatik embriyoların tohum olarak kullanılabilmesi için; embriyoların uygun ekim derinliğine ekilmesi sırasında onları koruyacak, çimlenme için uygun şardar oluşana kadar canlı tutacak ve bitkilerin ilk gelişmesi sırasında gerekli olan besin maddelerini sağlayacak bir sisteme ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, son yıllarda üç farklı sistem geliştirilmiştir (Parrott *ve ark.*, 1993): 1) embriyoların kaplanması, 2) embriyoların sıvı içerisinde ekimi ve, 3) kurutulmuş ve kaplanmamış embriyoların ekimidir.

Embriyoların kaplanmasında kullanılan materyalin öncelikle, taşıma ve ekim sırasında embriyoyu koruyacak nitelikte olmalı ve çimlenme ve bitki gelişimine engellememelidir. Ayrıca, kaplama materyali besin maddelerini ve diğer kimyasalları tutma ve gerektiği zaman bırakma özelliğine de sahip olmalıdır (Redenbaugh *ve ark.*, 1986). Kaplanmış tohum, embriyoların hidrojenlerle kaplanması ve desikasyon olmak üzere iki farklı yöntemle elde edilebilmektedir. Somatik embriyoların kaplanmasında en yaygın kullanılan hidrojen el ise aljinattır. Aljinat uygun viskozite, düşük toksidite ve hızlı jelleşme özelliklerine sahiptir (Onishi *ve ark.*, 1994). Uygun gelişme aşamasındaki embriyolar önce sodyum aljinat (% 0.5-5 w/v) ile karıştırılır, daha sonra yavaş yavaş içerisinde kalsiyum klorid (30-100 mM) bulunan kaba boşaltılarak 4-6 mm çapında kalsiyum aljinat kapsülleri elde edilir (Onishi *ve ark.*, 1994; Bornman, 1994). Öte yandan, aljinat kapsüllerinin elastik olmaması, sertleşmesi ve oksijen yetersizliği gibi nedenlerden dolayı embriyoların çimlenemediği gözlenmiştir. Bu sorunu gidermek için Sakamoto *ve ark.* (1992) tarafından uygun bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde, aljinat kapsülleri sertleşmeyi takiben musluk suyunda durularak monovalent pozitif yüklü iyon (örneğin potasyum nitrat) solüsyonuna batırılmıştır. Son olarak kapsüller musluk suyuyla tekrar durulanmış tır. Ekimden sonra, uygun nem ortamında kapsüllerin şişerek gevreklediği ve parçalandığı gözlenmiştir (Onishi *ve ark.*, 1994).

Desikasyon yönteminde ise somatik embriyolar, ya eriyebilir reçine ve polietilen glikol ile kaplanarak veya kaplanmadan kurutulur. Ancak, desikasyon işlemi embriyolara zarar verebilir. Embriyoların erken kotiledon gelişme safhasında absisik asit veya sakkaroz ile muamele edilmesi desikasyona toleransı artırmaktadır. Yonca somatik embriyoları %15'ten daha az nem içerecek şekilde kurutulduğunda, oda sıcaklığı ve nem şartlarında canlılıklarını kaybetmeden depolanabilmektedir (Bornman, 1994).

Embriyoların sıvı içerisinde ekim işleminde, embriyolar yapışkan bir jel ile karıştırıldıktan sonra toprağa püskürtülür. Bu yöntemde bitki gelişimini artırmak için jel içerisine sakkaroz da ilave edilmektedir. Bu yöntemin en önemli dezavantajı embriyoların çimlenme ve bitkiye dönüşüm oranlarının düşük olmasıdır.

3.4.3. Gen aktarımı

Somatik embriyogenesinin belki de en önemli kullanım alanı bitkilere gen aktarımındadır. Bitkilere gen aktarımında değişik yöntemler geliştirilmiş olmakla birlikte, en yaygın olarak kullanılan bitkilerin doğal genetik mühendisi olarak adlandırılan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. Bu bakteri aracılığıyla tarımsal öneme sahip birçok gen, iki çenekli bitkilere kolaylıkla aktarılabilmektedir. Son yıllarda süper binary vektörlerin kullanılmasıyla *A. tumefaciens*'m tek çenekli bitkilere de gen aktarım yeteneğine sahip olduğu anlaşılmış olup, bu bakteri aracılığıyla transgenik arpa (Tingay ve ark., 1997), mısır (Ishida ve ark., 1996) ve çeltik (Hiei ve ark., 1997) bitkileri elde edilmiştir. *A. tumefaciens* bakterisine ilave olarak, birçok doğrudan gen aktarım teknikleri de geliştirilmiştir. Bunlardan partikül tabancası, elektroporasyon ve mikroenjeksiyon en yaygın kullanılan yöntemlerdir (Özcan ve Özgen, 1996). Bu yöntemler kullanılarak hem tek çenekli, hem de iki çenekli bitkilerde oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır.

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 (Özcan ve Özgen, 1996). Hem *A. tumefaciens* hem de doğrudan gen aktarım teknikleriyle gen aktarımı yapılan hücrelerden embriyogenesis aracılığıyla bitki rejenerasyonu yaygın olarak kullanılmaktadır. *A. tumefaciens* ile gen aktarımında iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Birinci yöntemde bitki doku, organ veya protoplastları *A. tumefaciens* ile inoküle edildikten sonra oksin içeren seçici besin ortamlarında kültüre alınarak somatik embriyogenesis aracılığıyla gen aktarımı yapılan (transgenik) bitkiler kolaylıkla üretilabilmektedir. Bu yöntemle ekonomik önemi yüksek olan pamuk (Firoozabady ve ark., 1987), havuç (Thomas ve ark., 1989), yonca (Desgagnes ve ark., 1995), mısır (Ishida ve ark., 1996), arpa (Tingay ve ark., 1997) ve çeltik (Hiei ve ark., 1997) gibi türlerde çok sayıda transgenik bitki üretilmiştir. Diğer yöntemde ise, embriyogenik süspansiyon kültürlerinin *A. tumefaciens* ile inoküle edildikten sonra seçici sıvı veya katı besin ortamlarına aktararak transgenik embriyolar ve sonuçta transgenik bitkiler elde edilebilmektedir. Embriyogenik havuç (Scott ve Draper, 1987) ve ceviz (McGranahan ve ark., 1990) süspansiyon kültürlerinin *A. tumefaciens* ile inokülasyonundan elde edilen transgenik bitkiler bu yöntemin ilk örnekleridir.

Partikül tabancası ile gen aktarımında bitki doku ve organları ile embriyogenik kalkışlar eksplant olarak kullanılabilmektedir. Bu yöntemde eksplantlar, bitkilere aktarılması istenen gen veya genleri taşıyan plazmid DNA ile kaplanmış tungsten veya altın partikülleri ile bombardıman edilir. Partiküller hücre içerisine girdikten sonra plazmid DNA partiküllerden ayrılarak bitki hücrelerinin kromozomlarıyla birleşir. Bombardıman edilen eksplantlar daha sonra oksin içeren seçici besin ortamlarına aktararak gen aktarımı yapılan hücrelerden embriyogenesis yoluyla transgenik bitkiler elde edilir. Bu yöntemle buğday (Weeks ve ark., 1993), çeltik (Christou ve ark., 1991) ve mısır (Gordon-Kamm ve ark., 1990) gibi ekonomik

önemi yüksek olan buğdaygillere başarılı gen aktarımı yapılabilmektedir. Yine, *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımının çok zor olduğu birçok iki çenekli bitki türünde de bu yolla transgenik bitkiler üretilebilmiştir. *A. tumefaciens* ile gen aktarımında olduğu gibi bu sistemin başarısı da büyük oranda, gen aktarımının yapıldığı doku ve hücrelerden organogenesis veya embriyogenesis aracılığıyla tam bitkilerin elde edilmesine bağlıdır.

Kaynaklar

Bornman CH (1994) Micropropagation and somatic embriyogenesis. In: Hayward MD, Bosermark NO and Romagosa I (Eds), Plant Breeding: Principles and Prospects, pp. 246-260, Chapman & Hall, London.

Bronsema FBF, Van Oostveen WJF, Van Lammeren AAM (1997). Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines Al88 and A632. Plant Celi. Tiss. Org. Cult., 50: 47-65.

Christou P, Ford TL, Kofron M (1991) Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos, Bio/Technology, 9: 957-962.

Chu CC, Wang CC, Sun CS (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sin 18: 659-668.

De Jong AJ, Schmidt EDL, De Vries SC (1993) Early events in higher-plant embriyogenesis, Plant Mol. Biol., 22: 367-377.

Desgagnes R, Laberge S, Allard, G, Khoudi H, Castonguay Y, Lapointe J, Michaud R, Vezina, LP (1995) Genetic transformation of commercial breeding lines of alfalfa (*Medicago sativa*). Plant Celi. Tiss. Org. Cult., 42: 129-140.

Drew RLK (1980) A cheap, simple apparatus for growing large batches of plant tissue in submerged liquid culture. Plant Sci. Lett., 17: 227-236.

Emeklier Y, Özcan S, Avcı-Birsin M, Mirici S, Uranbey S (1999) Mısırdaki *in vitro* somatik embriyogenesis üzerinde araştırmalar. A.Ü. Araştırma Fonu Projesi (No: 97110901), Ankara.

Endress R (1994) Plant Celi Biotechnology. pp. 99-120, Springer-Verlag, New York.

Finer JJ (1988) Apical proliferation of embriyogenic tissue of soybean. Plant Celi. Rep., 7: 238-241.

Finer JJ (1995) Direct somatic embriyogenesis. In: Gamborg OL, Philips GC (eds), Plant Celi, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods, pp. 92-102, Springer, Berlin.

Firoozabady E, DeBoer DL, Merlo DJ, Halk EL, Amerson LN, Raska KE, Murray EE (1987) Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *A. tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. Plant Mol. Biol., 10: 105-106.

- Fujii JA, Slade DT, Redenbaugh K (1989) Maturation and greenhouse planting of alfalfa artificial seed. In *Vitro Cell.Dev.Biol.*, 25: 1179-1182.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Celi Res.*, 50: 151-158.
- Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O'Brien JV, Chambers SA, Adams WR, Willetts NG, Rice TB, Mackey CJ, Krueger RW, Kausch AP, Lemaux PG (1990) Transformadon of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants, *Plant Celi*, 2: 603-618.
- Halperin W, Wetherell DF (1965) Ontogeny of adventive embriyos in wild carrot. *Science*, 147: 756-758.
- Hartweck LM, Lazzeri PA, Cui D, Collins GB, Williams EG (1988) Auxin-orientation effects on somatic embriyogenesis from immature soybean cotyledons. In *Vitro Cen.Dev.Biol.*, 24: 821-828.
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformadon of nce mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 35: 205-218.
- Higgins P, Mathias RJ (1987) The effect of the 4B choromosomes of hexaploid wheat on the gro\vth and regeneration of caHus cultures. *Theor. Appl. Genet.*, 74: 439-444.
- Ishida Y, Saito H, Ohto S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996) High efficiency transformadon of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotech.*, 14: 745-750.
- Janick J, Kim YH, Kitto S, Saranga Y (1993) Production of Synthetic Seed. In: Radenbaugh K (ed), *Synseeds*, pp 11-33, CRC Press, Boca Raton.
- Keyes GJ, Collins GB, Taylor NL (1980) Genetic variation in tissue cultures of red clover. *Theor. Appl. Genet.*, 58: 265-271.
- Lai FM, McKersie BD (1994) Scale-up somatic embriyogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.) I subculture and mdirect secondary somatic embriyogenesis. *Plant CeH. Tiss. Org. Cult.*, 37: 151-158.
- Lazzeri PA, Fhldebrand DF, Collins GB (1985) A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 3: 160-167.
- Levin R, Vasil IK (1989) An integrated and automated tissue culture system for mass propagation of plants. In *vitro Celi. Dev. Biol.*, 25: 21 A.
- Maes OC, Chibbar RN, Caswell K, Leung N, Kartha KK (1996) Somatic embriyogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors. *Plant Sci*, 121: 75-84.
- McKersie BD, Senaratna T, Bowley SR, Brown DCW, Krochko JE, Bewley JD (1989) Apphcation of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa. In *Vitro Celi. Dev. Biol.*, 25: 1183-1188.

McGranahan GH, Leslie CA, Uratsu S, Dandekar AM (1988) Improved efficiency of the walnut somatic embryo gene transfer system. *Plant Celi Rep.*, 8: 512-516.

Molle F, Dupuis JM, Ducos JP, Anselm A, Crolus-Savidan I, Petiard V, Fereyssinet G (1993) Carrot somatic embriyogenesis and its applications to synthetic seeds. In: Radenbaugh K (ed), *Synseeds*, pp 11-33, CRC Press, Boca Raton.

Monnier M (1990) Induction of embriyogenesis in callus culture. In: Pollard JW, Walker JM (Eds), *Plant Celi and Tissue Culture*, pp. 141-148, Humana Press, Newjersey.

Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

Onishi N, Sakamoto Y, Hirosawa T (1994) Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embriyos. *Plant Celi. Tiss. Org. Cult.*, 39: 137-145.

Ou G, Wang WC, Nguyen HT (1989) Inheritance of somatic embriyogenesis and organ regeneration from immature cultures of winter wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 78: 137-142.

Ozawa K, Komamine A (1989) Establishment of a system of high-frequency embriyogenesis from long-term celi suspensions cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 77: 205-211.

Ozias-Akins P, Vasil IK (1988) *In vitro* regeneration and genetic manipulation of grasses. *Physiol. Plant.*, 73: 565-569.

Özcan S, Barghchi M, Firek S, Draper J (1993) Efficient advenütious shoot regeneration and somatic embriyogenesis in pea. *Plant Celi Tiss. Org. Cult.* 34: 271-277.

Özcan S, Özgen M (1996) Bitki genetik mühendisliği. *Kükem*, 1: 69-95.

Parrott WA, Merkle SA, Williams EG (1993) Somatic embriyogenesis: Potential for use in propagation and gene transfer systems. In: Murray DR (ed), *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, pp. 158-200, C.A.B International, UK.

Peng J, Hodges TK (1989) Genetic analysis of plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). In *Vitro Celi. Dev. Biol.* 25: 91-94.

Phillips GC, Hubstenberger JF, Hansen EE (1995) Plant regeneration from callus and celi suspension cultures by somatic embriyogenesis. In: Gamborg OL, Philips GC (eds), *Plant Celi, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*, pp. 92-102, Springer, Berlin.

Pierik RLM (1987) *In vitro* Culture of Higher Plants. pp 183-230, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Radenbaugh K, Paasch B, Nichol J, Kossler M, Viss P, Walker K (1986) Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embriyos. *Bio/Technology*, 4: 797-801.

Reish B, Bingham ET (1980) The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. *Plant Sci. Lett.*, 20: 71-77.

Roberts DR, Webster FB, Flinn BS, Lazaroff WR, Cyr DR (1993) Somatic embriyogenesis of sprucu. In: Radenbaugh K (ed), *Synseeds*, pp. 11-33, CRC Press, Boca Raton.

- Rode A, Hartman C, De Buyser J, Henry Y (1988) Evidence for a direct relationship between mitochondrial genome organization and regeneration ability in hexaploid wheat somatic tissue cultures. *Curr. Genet.*, 14: 387-394.
- Sakamoto Y, Mashiko T, Suzuki A, Kawata H, Iwasaki A (1992) Development of encapsulation technology for synthetic seeds. *Açta Hort.*, 319: 71-76.
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50: 199-204.
- Scott RJ, Draper J (1987) Transformation of carrot tissues derived from proembryogenic suspension cells: a useful model system for gene expression studies in plants. *Plant Mol. Biol.*, 8: 265-274.
- Sonnino A, Tanaka S, Iwanaga, M, Schilde-Rentscheler L (1989) Genetic control of embryo formation in anther culture of diploid potatoes. *Plant Cell Rep.*, 8: 105-107.
- Thomas JC, Guiltinam MJ, Bustos S, Thomas T, Nessler C (1989) Carrot (*Daucus carota*) hypocotyl transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, 8: 354-357.
- Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thornton S, Brettell R (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.*, 11: 1369-1376.
- Tisserat B (1991) Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: Dixon RA (ed), *Plant Cell Culture: A Practical Approach*, pp. 79-105, IRL Press, Oxford.
- Warren G (1991) The regeneration of plants from cultured cells and tissues. In: Stafford A, Warren G (eds), *Plant Cell and Tissue Culture*, pp 83-100, Open University Press, Milton Keynes.
- Weeks JT, Anderson OD, Blechi AE (1993) Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.*, 102, 1077-1084.
- Willman MR, Scroll SM, Hodges TK (1989) Inheritance of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from primary (Type 1) callus in maize. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 25: 95-100.

Bölüm 4

Protoplast Kültürü ve Somatik Melezleme

Mehmet Babaoğlu¹, Sebahattin Özcan²

Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 42031 Kamp üs, Konya

²Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Ankara

e-posta: mbabaogl@selcuk.edu.tr

4.1. Tarihçe

Çok hücreli dokularda bitki hücreleri birbirlerine hücreler arası bağlarla bağlanırlar. Bir hücrenin duvarı uzaklaştırıldığında geriye kalan kısmına protoplast denir. Protoplasdar izotonik ortamlarda canlılığını sürdürüp, yeni duvar oluşturup, mitozla bölünebilir, yeni hücre grupları (mikrokallus) ve daha sonra da yeni bitkiler oluşturabilirler. İzole edilen protoplasdar yüksek bitkilerde elde edilebilen yegane tekli hücre kaynağını oluştururlar.

Başlangıçta protoplasdar mekanik yollarla izole edilmiş fakat denemelerin tekrarlanamaması ve düşük protoplast verimi, bir dokunun hücrelerini birbirinden ayıran ve hücre duvarını eriten enzimlerin keşfedilmesini ve kullanılmasını sağlamıştır (Cocking, 1960). Ancak 1970'li yıllara kadar protoplastlardan bitki elde edilememiştir (Takabe *ve ark.*, 1971). Bir yü sonra ise protoplast füzyonu sonucu ilk somatik melez tütün bitkisi elde edilmiştir (Carlson *ve ark.*, 1972). Daha sonra çok sayıda araştırma sonucu yayınlanmıştır.

Bitkilerde protoplast izolasyonu, kültürü, bitki rejenerasyonu ve somatik melezleme konularında yapılan derlemeler arasında Evans ve Bravo (1983), Bravo ve Evans (1985), Roest ve Gilissen (1989, 1993), Ochatt ve Power (1992), Feher ve Dudits (1994) ve Gledlie (1995) sayılabilir. Ayrıca *Biotechnology in Agriculture and Forestry* serisi içerisinde yayınlanan bazı çalışmalar (Bajaj, 1989a,b), (Bajaj, 1993a,b), (Bajaj, 1994a,b), (Bajaj, 1995) ve (Bajaj, 1996) protoplast teknolojisinin özel olarak çeşitli

bitki türlerinde uygulanması ile ilgili derleme ve araştırma sonuçlarını ihtiva etmektedir.

Pro toplaş t izolasyonunda iki önemli nokta olan, kullanılan enzimin saflığı ve kültür ortamının ozmotik basıncı, pro toplaş darın canlılığı üzerine büyük etki yapmaktadır. Halen üzerinde çalışılan hemen hemen bütün bitki türlerinde yeterli sayıda protoplast elde edilebilmesine rağmen, izolasyondan sonra hücre duvarı rejenerasyonu, mitotik bölünmenin başlaması, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu sadece bazı bitki türlerinde sınırlı kalmıştır.

Protoplast çalışmalarının temel amacı bir adet hücreden bitki elde edebilmektir. Teorik olarak her bitki türünden ve bir türün her dokusundan protoplast elde etmek mümkündür. Fakat izole edilen her pro toplaş ttan bitki elde etmek mümkün olmamakla birlikte (Ochatt ve Power, 1992) bu konudaki bildirimler gün geçtikçe artmaktadır.

Temel araştırma materyali olarak protoplastların kullanılması bir çok türdeki genetik iyileştirmelerde çok faydalı sonuçlar ortaya koymuştur. Protoplastların kullanımında en önemli fayda somatik melezlemedir. Eşeyssel melezlemede çeşitli nedenlerle ortaya çıkan uyumsuzlukların aşılarda türler arası gen akışının sağlanması protoplast teknolojisinin en önemli avantajıdır (Babaoğlu, 2000). Fakat amaca ulaşılabilmesi için temel şart bir adet protoplasttan yeni bir bitki elde edilebilmesidir. Protoplastlar doğrudan bitki gen transformasyonuna da imkan sağlamaktadırlar. Ayrıca protoplastlar, mutant izolasyonu, hücre zarından besin maddesi girişi ve taşınması, hücre organellerinin (nükleus, kromozomlar, kloroplast, mitokondri ve vakuol) izolasyonu ve hücre klonlaması ile ilgili çalışmalarda da kullanılabilirler (Feher ve Dudits, 1994).

4.2. Totipotensi ve Tanımlamalar

Bir bitkinin hücre, doku, organ, meristem veya embriyo gibi çeşitli parçalarından (eksplant) yeni bitki veya bitkiler elde edilmesine bitki rejenerasyonu denilmektedir (Gamborg ve Phillips, 1995). Haberlandt (1902) çekirdekli tek bir hücrenin doğrudan veya bir kallus devresinden sonra dolaylı olarak tam bir bitkiye dönüşebileceğini ortaya koymuş, Steward *ve ark.* (1958) ise *in vitro* şartlarda havuç hücrelerini kültüre alarak tek hücreden yeni bir bitki yetiştirmeyi başarmışlardır. Bu olaya totipotensi, böyle bir hücreye de totipotent bir hücre denilmiştir. Teorik olarak bütün hücreler totipotenttir. Fakat uygulamada bu durumun ortaya çıkmasında büyük varyasyonlar görülmektedir. Bir hücrenin değişime uğramasında genotip, alındığı dokunun gelişme durumu, kültüre alındığı besin ortamı ve yetiştirme şartları etkilidir. Bu nedenle bir hücrenin totipotent olup olmadığını en sağlıklı bir şekilde anlamak için hücrenin izole edilmesi, hücre duvarının uzaklaştırılması (protoplast) ve daha sonra da bu tek hücreden yeni bir bitkinin meydana getirilmesi gerekmektedir. Çünkü eşeyssel yolla üreyen bir bitki n sayıda

kromozoma sahip iki hücrenin (mayoz bölünme sonucu oluşan sperm ve yumurta hücresi) birleşerek tek bir hücre oluşturması ($n+n=2n$, zigot) ve bu hücrenin de bölünerek embriyoyu oluşturmasıyla elde edilmektedir. Embriyo yeni oluşan tohum içinde yer almakta ve çimlenme ile yeni bitki oluşmaktadır. Bu nedenle füzyonla tek bir hücre haline gelen zigot ardı ardına bir çok bölünme sonucu organize olarak tohum embriyosunu oluşturmaktadır. Mayoz bölünme geçirmiş hücreler (polen tetrad) hariç bütün somatik (vücut) hücrelerin protoplastları $2n$ sayıda kromozoma sahiptir ve mitoz bölünme ile bölünerek çoğalırlar. Mitoz bölünme sayesinde genetik materyalin yeni oluşan bireyin bütün hücrelerine eşit miktarda ve çok büyük bir hassasiyede dağılması teorik olarak somatik bir hücrenin bölünerek ve yeniden organize olarak ana bitkiye benzer bir bitki meydana getirebilmesinin mümkün olacağını göstermektedir. Gen transferleri, mikroçoğaltım vb. konularda başarılı olabilmek için tek hücre seviyesinde bu tekniklerin uygulanması ve sonuçta bu hücre veya hücrelerden yeni bitki veya bitkilerin elde edilebilmesi gerekir. Bunun için de ilgili türde tekrarlanabilir bir protoplast-bitki rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi çok büyük öneme sahiptir.

4.3. Bitkilerde Hücre Duvarı Kompozisyonu

Bitkilerde hücre duvarı hücre için fizyolojik bir engel değil daha çok mekanik bir sınır ve destek olarak görev yapmakta, ozmotik değişiklikler sonucu hücrenin patlamasını ve mikroorganizmaların hücreyi enfekte etmesini engellemektedir. Hücre duvarı hücrenin büyüklüğünü, şeklini ve dengesini belirler. Bitki hücre duvarının 3 ana unsuru selüloz, hemiselüloz ve pektik maddelerdir. Tablo 4. Ede hücre duvarının yapısı bakımından tek çenekli bitkiler (monokotiledon) ile çift çenekli bitkiler (dikotiledon) arasındaki farklılıklar verilmiştir. Protoplast izolasyonu yapılırken monokotiledonlarda sadece selüloz grubu enzimlerin kullanılması genellikle yeterli olurken, pektik polisakaritlerin hücre duvarının büyük kısmını (%35, Tablo 4.1) oluşturduğu dikotiledonlarda ilave olarak pektinaz grubu enzimlerin de kullanılması çoğu durumda mutlaka gereklidir.

4.4. Protoplast izolasyonu

Pro toplaş darla çalışılırken başlangıçtan sona kadar dikkat edilmesi gereken önemli aşamalar toplu olarak Tablo 4.2'de, işlemleri gerçekleştirebilmek için gerekli alet, ekipman ve imkanlar da Tablo 4.3'te verilmiştir.

4.4.1. Eksplant kaynakları

izolasyon öncesi yapılacak en önemli uygulama uygun bir eksplant (bitki parçası) kaynağının bulunmasıdır. Protoplast izolasyonunda kullanılacak 1 aynak dokuların tekrarlanabilir olarak standart kültür ortamlarında yetiştirilebilmesi ve sürekli olarak

aynı kalitede materyal üretilmesi gerekir. *İn vitro* şartlarda yetiştirilen aksenik sürgün kültürleri (steril şartlarda, besin ortamı ihtiva eden 150-200 mFlik kavanozlarda fideletin yetiştirilmesi ve bu fidelerden sürekli olarak büyüyen sürgünlerin kesilerek yeni bir ortamda köklendirilmesi yoluyla yeni materyal üretimi), bu bakımdan uygun bir başlangıç materyali oluştururlar. Benzer şekilde tohumdan *in vitro* fideletin elde edilmesi de çoğu durumda diğer kaynaklardan daha başarılı sonuçlar verir. Bu durum hem bitki materyalinin yüzey sterilizasyonu sırasında zarar görüp, strese maruz kalmamasını, hem de yüzey sterilizasyonda kullanılan Na^+ , Ca^{++} gibi maddelerin kalıntı etkisinden korunmayı temin eder.

Tablo 4.1. Hücre duvan içeriği bakımından tek çenekli bitkilerle çift çenekli bitkiler arasındaki farklar (Mohr ve Schopfer, 1995).

Hücre duvanını oluşturan maddeler	Tek Çenekliler	Çift çenekliler
	Hücre duvanının kuru maddesinde yaklaşık oran (%)	
Selüloz	20-30	20-30
Hemiselüloz	37-65	27-30
Xyloglukan	2-5	25
Heteroxylan	20-30	2-5
B-glukan	15-30	0
Pektinler	5	35
Homogalakturnan	-	15
Ramnogalaktronan I	-	15
Ramnogalaktronan II	-	5

Protoplast izolasyonunun her devresinde verim, canlılık ve rejenerasyon kapasitesi bakımından anaç bitkinin genotipi çok önemlidir. Hücrenin plazmolitik davranışı ile hücre duvarı kompozisyonu, izolasyon işlemi sırasında türlerin davranışını etkileyebilir. Ayrıca izolasyonun daha zor olduğu türlere göre, kolay protoplast izole edilebilen türlerin hücre duvarlarının yoğun tuz solüsyonlarında plazma zarından daha kolay ayrılarak plazmolize oldukları bildirilmiştir.

Bazı türlerde pr o toplaş darın kültüre almabilirliği belirli kromozomlar üzerinde bulunan gen blokları veya kromozom kolları tarafından kontrol edilmektedir (örnek: *Solanum phureja* iki bağımsız lokus ve tam dominans; Roest ve Güssen, 1993). Genellikle hızlı büyüyen, genç, sağlıklı doku veya hücreler yüksek kalite ve canlılıkta protoplast verirler.

En çok kullanılan protoplast kaynağı yaprak mezofil hücreleridir. Monokotiledonlara göre (örnek: buğdaygiller) dikotiledonlarda (örnek: baklagiller) mezofil hücrelerini içeren yapraklar genellikle daha uygun bir izolasyon materyali verirler.

Tablo 4.2. Protoplast izolasyonu, kültürü ve rejenerasyonunda önemli devreler.

- Başlangıç materyali seçimi ve özellikleri**
 - a. Bitki türü/genotip
 - b. Yaş, hücre hayat döngüsü, fizyolojik durum
 - c. Eksplant ve donör materyal seçimi
- Bitki materyali ve enzim karışımlarının hazırlanması**
 - a. Yüzey sterilizasyonu
 - b. Enzim karışından ve özellikleri
 - c. Yıkama solüsyonları
 - d. Pre-plazmolizasyon
 - e. Ozmotik basınç
- Protoplast izolasyonu, saflaştırılması ve testler**
 - a. Inkübasyon metodu
 - b. Saflaştırma yöntemleri
 - c. Hücre duvan kalıntısı, canlılık ve verim testleri
 - d. Diğer metotlar
- Protoplast kültürü**
 - a. Besin ortamlarının özellikleri ve bitki büyüme düzenleyicileri
 - b. Kültür yoğunluğu
 - c. Kültür sistemleri
 - 1. Katı kültürler
 - 2. Sıvı kültürler
 - 3. Karma kültürler
 - 4. Nörs ve besleyici hücre kültürlerinin kullanımı
 - 5. Ozmotik basıncın düşürülmesi
- Protoplastlardan kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu**
 - a. Besin ortamları ve yapılacak değişiklikler
 - b. Ozmotik basıncın azaltılması
 - c. Kallusun rejenerasyon ortamına transferi ve sürgün oluşumu

Yaprak mezofil hücreleri:

Yaprak mezofil hücreleri klorofil içeren hücrelerdir ve genellikle homojen büyüklükte dirler. Klorofil içerdiklerinden somatik melezlemede yapılan renksel ayırimda avantajlıdır lar. Buna karşın albino bitkilerden elde edilen yaprak protoplasları da klorofil içermediklerinden benzer şekilde protoplast füzyonunda renk ayırım kolaylığı sağlar lar.

Yapraklardan en genç ve tamamen açılmış olanlar en uygundur. Yaşlı yapraklarda hücre hayat döngüsü tam olmadığından (mitotik bölünme durmuş olduğundan) protoplast canlılığı ve verim düşük olmakta ve daha fazla pektik madde birikimi olmaktadır. Çiçekleri açılmış durumdaki bitkilerden alınan eksplantlar uygun değildir, izolasyon öncesinde alt epidermis genellikle soyularak uzaklaştırılır. Bu işlem epidermis tabakası enzimlerin etki derecesini azaltır ve izolasyon sırasında ortaya çıkan epidermal hücreler protoplastların saflığını bozarak uygun olmayan

protoplast verip ölmeleri sonucu kültür ortamını kirletirler. Alt epidermisi kolayca soyulamayan yapraklarda epidermis yumuşak bir fırça ile parçalanmalıdır. Yaprak ana damarları izolasyon öncesi mudaka kesilerek uzaklaştırılmalıdır. Aksi takdirde yıkama ve saflaştırma sırasında problemler ortaya çıkar.

Tablo 4.3. Protoplast izolasyonu ve kültürü için gereksinimler (Evans ve Bravo, 1983; Power ve ark., 1989; Ochatt ve Power, 1992; Gleddie, 1995).

- Laminar hava akışlı kabin (en az 0.5 m sn⁻¹ yatay hava akışı)
- Otoklav veya buhar sterilizasyon sistemi, filtre sterilizasyonu için Sartorius filtreler
- 0.2 µm porozitede nitroselüloz filtreler (Whatman veya Millipore)
- Basıncı hava kompresörü
- Ağar eritmek için buhar banyosu ve 30-100 °C ayarlanabilen su banyosu
- Mikroskop (normal ve aşağıdan objektifi, UV filtreli, fotoğraf çekebilen)
- Yatay hareketli çalkalayıcı (20-80 devir/dakika)
- Santrifüj (50-200 x g) ve inkübatör (15-30 °C ayarlanabilen)
- Kültür odası (sıcaklık, ışık ve nem kontrollü)
- Hemositometre (tek veya çift odak)
- Petri kutulan (5.5, 9,14 cm plastik veya cam, steril) ve steril 10 ml plastik pipetler
- Geniş ağızlı 150 mm cam Pastör pipetler (pamuk tıpalı) ve pipet memeleri
- 20 ml otoklava dayanıklı Üniversal cam veya plastik şişeler
- Plastik huniler ve naylon filtreler (80, 64, 55 veya 30 µm poroziteli, 2'şer adet)
- Erlenler, 125-250 ml (bir tanesi dereceli), Kaseroller
- Bistüri ve pensler
- Bitki parçalarının üzerinde kesmek için steril fayanslar (15x15 cm)
- 20 ml cam veya plastik vidalı kapaklı konik tabanlı santrifüj ve Marker (1 ml dereceli) tüpleri
- Steril musluk suyu (6x500 ml) ve deiyonize su (6x500 ml)
- Sodyum hipoklorit ve Tween 20
- Kültür ortamları ve izolasyon için gerekli yıkama solüsyonları (bakınız 4.4.3).
- Canlılık, hücre duvan kalıntısı tespiti için kimyasallar (FDA, Calcoflour Beyazı)
- Enzimler (pektinazlar ve selülozlar, bakınız Tablo 4.4)
- MS, B5, KM hazır besin ortamları ve diğer kimyasallar
- Manitol, sorbitol, glikoz, sakkaroz
- Vitamin stok solüsyonları ve antibiyotikler
- Bitki büyüme düzenleyicileri (oksinler, sitokininler, ABA, gibberellinler)
- Ağar, agaroz, Sea-Kem agaroz, Gelrite (Phytigel)
- MES tamponu ve PVP-10

Protoplast büyüklüğü bitki türüne göre değişir. Protoplastlar izolasyon ve kültür şardlarına çok hassastırlar. Yaprak mezofil hücreleri ozmodk şoka karşı daha duyarlıdır. Yıkanma sırasında yüksek santrifüj hızı uygun değildir.

Embriyogenik hücreler:

Embriyogenik kallus ve hücre süspansiyonları, monokotiledonlarda, özellikle de tahıllarda, en fazla kullanılan protoplast kaynaklarıdır. Sürekli olarak homojen ve stabil protoplast verirler ve diğer kaynaklardan elde edilenlere göre daha hızlı gelişme ve bölünme gösterebilirler. Bu nedenle protoplast izolasyonunda yapraklardan sonra en fazla bu materyaller kaynak eksplant olarak kullanılırlar. Çünkü bu kültürler daha önce *in vitro* şardarda kültüre alındıklarından uygulanan yeni stres şardlarına daha kolay adapte olabilmektedirler. Ayrıca hücre süspansiyonu pro toplaş darı daha üniformdur. Genellikle daha az klorofil içerirler, beyaz, sarı veya krem renklidirler. Protoplast füzyonunda yaprak mezofil hücreleri ile birlikte kullanılırlar ve renksel olarak ayırmda çok avantajlıdırlar.

Hücre süspansiyonlarının protoplast izolasyonunda kullanılması durumunda en uygun materyal alınma devresi ekponensiyal gelişme devresidir (genellikle alt kültürden 3-4 gün sonra). Çünkü bu devrede hücrelerin bölünme hızı en yüksek ve hücre duvarı çok ince bir durumdadır. Bu devrede alınan materyal düşük enzim konsantrasyonlarının kullanımına da izin verir. İzolasyon öncesi alt kültür sırasında süspansiyon ortamının oksin oranının artırılması (hücrelerin birbirinden ayrılmasını sağlar) veya besin ortamının şeker oranının azaltılması da benzer sonuçlar sağlayabilir.

Donör materyal embriyogenik kallus da olabilir. Bu durumda yine ekponensiyal gelişme devresindeki hücreler kullanılmalıdır. Kallusun sık sık (2-4 gün arayla) alt kültüre alınması gerekir. Besin ortamında kullanılan sakkaroz oranı 2-3 gün önce azaltılırsa yine fazla sayıda canlı protoplast elde edilebilmektedir.

Fakat uzun süreli kültürlerde (hücre süspansiyonları ve kallus) genellikle genetik dengesizlikler ve varyasyonlar ortaya çıkabilir.

Bu kaynaklar kullanılarak izole edilen protoplastlardan olumlu sonuç alınamazsa meristemler veya genç fide dokuları (kotiledon, hipokotil vb.) alternatif protoplast kaynağı olarak değerlendirilmelidir.

Genç bitki dokuları:

Hipokotil, kotiledon, gövde parçaları, boğum arası ve etiole edilmiş hipokotiller gibi genç bitki dokuları genellikle düşük sayıda protoplast verirler. Çok değişik şekil, büyüklük ve renkte (heterojen) hücrelerden oluşurlar. Bazı türlerde özellikle benzer dokular daha iyi bir protoplast kaynağı olabilirler.

M. Babaoğlu, S. Özcan

Henüz olgunlaşmamış bitki doku ve organları:

Embriyo, kotiledon, meyve kabuğu gibi henüz olgunlaşmasını tamamlamamış bitki doku ve organları çoğunlukla yüksek canlılıkta ve hızlı bölünebilen protoplaz t verirler. Ayrıca bu tür dokulardan elde edilen pro toplaz dardan bitki rejenerasyonu çoğu durumda daha başarılıdır.

Meristematik hücreleri içeren dokular:

Gövde apikal meristemi, yan ve kök ucu meristemleri gibi dokular küçük büyüde, çok sayıda ve yüksek canlılıkta protoplast verirler. Hızlı bir bölünme seyri gösterirler. Hücre büyüklüğü bakımından büyük varyasyon gösterirler (15-80 pm). Kültür sırasında daha hassas davranışlar gösterirler.

Özel protoplast kaynakları:

Polen tanesi ve polen tetrad pro toplaz darı, skutellum, sepal, petal, aleuron, stoma hücreleri ve yumru dokular tek tip protoplast elde etmeye genellikle daha uygundur. Fakat daha yüksek enzim konsantrasyonu veya daha uzun inkübasyon süresine ihtiyaç gösterebilmektedirler (Evans ve Bravo, 1983). Kullanımları çok sınırlı ve çok özel durumlarda olmaktadır. Bazı türlerde kullanılabilecek tek protoplast kaynağıdır.

4.4.2. Donör bitki materyalinin ön muamelesi ve yetiştirme şartları

Protoplastların izole edildiği dokunun yetiştirme şartları başarıda en önemli kriterdir. Bunlar arasında; eksplantın alındığı bitkinin gelişme devresi ve şartları, kültür ortamı komponentleri, sıcaklık ve ışık rejimleri sayılabilir. İzolasyon öncesi uygulanan yüzey sterilizasyonu metodu da oldukça önemlidir.

Optimum şartlar her bitki türü ve parçası için deneme yanılma usulü ile belirlenmelidir. Hızlı hücre bölünmesi döneminde alınan eksplantlar için daha düşük enzim konsantrasyonu yeterli olurken bu tür protoplastlar daha hızlı bölünmeye başlayabilmektedirler. Donör bitkileri daha az karbonhidrat içeren ortamlarda yetiştirmek de benzer sonuçlar verir.

Donör bitkinin, eksplant alınmadan önce 24-48 saat boyunca karanlıkta kültüre alınması, hücre turgor basıncını düşürmekte (depo nişastaları tüketilmekte) ve izolasyon daha kolay olabilmektedir. Gün içerisinde eksplantın alınma zamanı da izolasyonda önemlidir.

Enzim inkübasyonu öncesi izolasyonda kullanılacak dokuya uygulanan çeşitli işlemler özellikle hassas sistemlerde hem canlılığı hem de protoplastların kültür

ortamına tepkisini artırabilir. Bu işlemler aşağıda verilmiştir (Ochatt ve Power, 1992):

- a. Eksplant daha önceden çeşitli besin maddeleri ve büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda 2-7 gün süreyle kültüre alındıktan sonra izolasyon yapılır. Burada amaç hücre hayat döngüsünü tekrar harekete geçirmektir. Serada yetiştirilen bitkilerin sık sık gübrenmesi de izolasyonda yardımcı olabilir. Ayrıca kesilen eksplandar özel besin ortamında ön kültüre alınabilir, belirli bir alıştırma ve ön hazırlamadan sonra izolasyonda kullanılabilir.
- b. Sıcaklık, ışık ve nem gibi çeşitli kültür şartları değiştirilebilir. Donör bitkinin düşük ışık yoğunluğu (intentsite) ve fotoperyotta (4-10 gün, 12 saat/gün, 10000-15000 lüks) veya karanlıkta ön kültüre alınması yüksek verim ve canlılıkta protoplast vermesini sağlayabilir (örnek: patates ve domates). Düşük ışık yoğunluğunda veya karanlıkta daha az pektatlı, daha ince hücre duvarı s en tezlenir ve hücre turgor basıncı düşerek alt epidermis daha kolay soyulur. Soğuk uygulaması (4-10 °C, 4-48 saat) veya soğuk/karanlık muamelesi ile birlikte plazma zarının lipid kompozisyonunu değiştirebilir. Oksidasyondan sorumlu zararlı enzim konsantrasyonunu azaltabilir.
- c. Plazmolizasyon süresi: Hücre çok yoğun bir tuz ortamına konulduğunda plazma zarı hücre duvarından ayrılır ve hücre büzülür. Bu olaya plazmolizasyon denir (Feher ve Dudits, 1994). Plazmolizasyon, izolasyon sırasında elektroliderin hücre içine sızmasını, enzimlerin sitoplazma içine girmesini ve ozmodk şoku engelleyebilir. Enzimlerin zararlı etkisini azaltmak için enzim inkübasyonu öncesi genellikle yaprak dokuları 0.5-1 saat plazmolize edilir. Enzim solüsyonu ilave edilmeden önce en az bir saat denge sağlanmalıdır. Plazmolizasyon solüsyonu, enzim solüsyonu ile aynı ozmodk basınca sahip olmalıdır.
- d. Kullanılacak dokuların kesilip parçalanması: Bu işlem enzimlerin etkinliğini artırır. Yaprak ve petal dokuları doğrudan tüm olarak veya 1-2 mm küçük parçalara ayrılabilirdiği gibi alt epidermisler hassas bir şekilde soyulduktan sonra da parçalara ayrılabilir. Fakat bazı türlerin alt epidermisleri kolayca soyulmaz. Bu durumlarda orta sert steril bir fırça ile alt epidermis tabakası parçalanır. Ayrıca ana bitki, yapraklar alınmadan önce, 12-24 saat boyunca karanlıkta tutulursa yapraklarda turgor basıncı düşer ve alt epidermis kolayca soyulur.

4.4.3. Protoplast izolasyonunda kullanılan yıkama solüsyonları, enzimler ve enzim karışımları

Pro topların darın enzim uygulaması öncesi plazmolizasyonu, izolasyon için kullanılan enzim karışımlarının hazırlanması ve izolasyon sonrası yıkama ve saflaştırılmasında bazı temel solüsyonlar kullanılmaktadır.

Plazmolizasyon ve yıkama solüsyonları:

Genellikle yıkama solüsyonu ile enzim karışımının hazırlandığı solüsyon aynıdır. Bu solüsyonların ortak noktaları çeşitli makro tuzlar ile manitol, sorbitol veya sakkaroz içermeleridir. Amaç izole edilen pro topların hücre duvarının görevini yapmaktır. Bu solüsyonlarda en fazla kullanılanlar CaCl_2 ve manitoldür. Hazır solüsyon olarak ise en fazla CPW (Frearson *ve ark.*, 1978) ve bunun çeşitli modifikasyonları kullanılmaktadır.

CPW tuzlarının içeriği (Frearson *ve ark.*, 1978):

CPW tuzları:	KH_2PO_4	27.20 mg/1
	KNO_3	101.00mg/1
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1480.00mg/1
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.00mg/1
	KI	0.16mg/1
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025mg/1
	pH: 5.8 (hepsinde)	
CPW13M:	CPW tuzları + %13 Manitol	
CPW9M:	CPW tuzları + %9 Manitol	
CPW21S:	CPW tuzları + %21 Sakkaroz	
CPW9SO:	CPW tuzları + %9 Sorbitol	
CPW0M:	Sadece CPW tuzları	

Enzimler ve enzim karışımlarının hazırlanması:

Tablo 4.4'de protoplast izolasyonunda kullanılan enzimler, elde edildikleri mikroorganizmalar ve ticari üreticileri verilmiştir. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler hücre duvarında farklı etkiye sahiptirler. Bu nedenle her tür veya çeşitte farklı doku ve hücreler için uygun enzim tipi ve konsantrasyonu deneylerle tespit edilmelidir.

Selülozlar sadece selülozu karbon kaynağı olarak tüketen (eriten) mikroorganizmaların teşhisinden sonra bulunmuştur. Selülozlar ve/veya hemiselülozlar pektinazlarla birlikte protoplast izolasyonunda kullanılırlar. Pektinazlar daha çok izolasyonda kullanılan dokunun parçalanması ve eritilmesinde, selülozlar ise bir birinden ayrılan hücrelerin çeperlerini eritmede etkindirler. Bu enzimler iki aşamalı (önce pektinazlar sonra selülozlar) veya tek aşamalı olarak (her gruptan enzimlerin karıştırılarak tek izolasyon solüsyonunun hazırlanması) uygulanabilir. Fakat tek aşamalı yöntem daha avantajlı olup elde edilen pro toplaş darın canlılığı daha fazladır.

Enzimlerin içinde bulunan nükleaz, proteaz, lipaz ve peroksidazlar gibi kirletici maddeler (hidrolitik enzimler) protoplast canlılığını azaltabilirler. Hassas protoplast sistemlerinde yüksek saflıkta enzim kullanımı tavsiye edilir. Fakat bazı durumlarda daha az saf olan enzimler izolasyonda daha etkili olabilmektedir. Tablo 4.4'teki enzimlere ek olarak nadir de olsa kullanılan ve pektinaz aktivitesi gösteren helikaz (salyangozdan elde edilir), kolonaz ve zimolaz (*Arthrobacter luteus*) gibi enzimler de vardır (Evans ve Bravo, 1983).

Aşağıda CPW (Frearson ve ark., 1978) tuzlarından elde edilen solüsyon kullanılarak hazırlanan tipik bir enzim karışımı hazırlama protokolü verilmiştir. Enzim karışımları genellikle plazmolizasyon ve yıkama solüsyonları kullanılarak hazırlanır. Enzim karışımlarının çoğunda pH 5.5-6.0 arasına ayarlanır ve inkübasyon süresince pH'yı sabit tutabilmek (aside kaymasını engellemek) için MES [1 g/1, 2-(N-morfolino) etanosülfonik asit] kullanılır.

Bir Enzim Karışımı Hazırlama Protokolü (100 mİ):

200 ml'lik bir behere 9 g manitol konulduktan sonra 60 mİ CPW solüsyonu ilave edilerek kanştınır. Kullanılacak enzimler istenilen oranda tartılır [örnek: %0.2 (a/h) selüloz (200 mg) ve %2 (a/h) maserozim (2 g)] eritilinceye kadar kanştınır. Antibiyotik ilave edilir [örnek: Sefotaksim, 250 [ag/100 mİ]]. pH ayarlanır (5.6-5.8). Sartorius filtrede (0.22 pm poroziteli Millipore membranlı) kanşım süzülerek saflaştırılır. Laminar steril kabin içinde steril şartlarda filtre ile tekrar süzülerek sterilize edilir, cam veya plastik şişelere (10-20 mİ/şişe) doldurulur (çok fazla doldurulmamalıdır) ve -20 °C' de kullanılıncaya kadar saklanır. Kullanmadan 30 dakika önce çıkarılır ve kabin içinde normal seyirde eritildikten sonra kullanılır (Gleddie, 1995). En iyi eritme normal çeşme suyu içeren bir başka kap içinde şişenin ağzı kapalı olarak tutulması yoluyla yapılabilir. Bu enzim kanşımı CPW tuzlarını ve enzimlerle birlikte ozmotik dengeleyici olarak %9 (a/h) manitol içerir. Fakat her protoplast sistemi için en uygun karışım deneylerle tespit edilmelidir.

Tablo 4.4. Protoplast izolasyonunda kullanılan enzimler ve üretici firmalar (Ishi, 1989; Ochatt ve Power, 1992).

Enzimler	Elde edilen organizma	Üretici Firma
Dokuyu parçalayan enzimler (pektinazlar)		
Macerozyme R-10	<i>Rhizopus spp. (arhizus)</i>	Yakult Honsha Co. Ltd., Japan.
Pectolyase Y-23*	<i>Aspergillus japonicus</i>	Seishin Pharmaceuticals Co. Ltd., Japan
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	Sigma Chemical Co. Ltd., Poole, UK.
Pectinol AC	<i>Aspergillus niger</i>	Corning Glass, USA
Macerase	<i>Rhizopus spp.</i>	Calbiochem, USA
PATE	<i>Bacillus polymxa</i>	Hoescht, Germany
Hücre duvarını eriten enzimler (selülazlar)		
Cellulase R-10	<i>Aspergillus niger</i>	Sigma Chemical Co. Ltd., UK.
Cellulase Onozuka RS	<i>Trichoderma viride</i>	Yakult Honsha Co. Ltd., Japan.
Cellulase YC*	<i>Trichoderma viride</i>	Seishin Pharmaceuticals Co. Ltd., Japan
Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	Sigma Chemical Co. Ltd., UK.
Cellulysin	<i>Trichoderma viride</i>	Calbiochem, USA
Driselase	<i>Ipex lacteus</i>	Kyowa Hakko Kogyo Co., Japan.
	Basidiomycetes	
Meicelase CESB	<i>Trichoderma viride</i>	Meiji Seika Kaisha Ltd. Japan.
Hemiselülazlar		
Helicase	<i>Helix pomatia</i>	Industrie Biologie Francaise, France.
Rhozyme HP-150	<i>Aspergillus niger</i>	Rohm and Hass Co., USA (Üretimi durduruldu).
Hemicellulase	<i>Aspergillus niger</i>	Sigma Chemical Co. Ltd., UK.

*Yüksek saflıkta olanlardır. Ticari olarak daha pahalıya satılırlar fakat daha az miktarda kullanılırlar.

İnkübasyon sırasında parçalanan hücrelerden açığa çıkan hidrolitik enzimlerin olumsuz etkilerini azaltmak için potasyum dekstran sülfat [%0.5, a/h (=ağırlık/hacim)] kullanılabilir. Bazı durumlarda, özellikle meyve ağaçlarında izolasyon, PVP-10 (pohvinilpirolidon, %1.0 a/h, MA: 10 000) başarı sonuçlar vermiştir. Ayrıca C vitamini de (askorbik asit ve/veya sitrik asit) kullanılmıştır (Ochatt ve Power, 1992).

4.4.4. Ozmotik şartlar ve plazmolizasyon

Eğer protoplastlar direkt olarak sıvı kültür ortamında (örnek: MS) izole edilirlse patlarlar. Bu nedenle hücre duvarı tarafından sağlanan mekanik destek yerine uygun bir ozmotik dengeleyici kullanılmalı, hücre içi ve dışı arasında denge sağlanmalıdır. Ozmotik basınç, ozmosu durdurmak için gerekli hidrostatik basınç veya daha az yoğun bir ortamdan moleküllerin yarı geçirgen bir zardan daha konsantre bir ortama difüzyonunun önlenmesidir.

Sağlanan ozmotik basınç çok yüksek olursa hücre metabolizması ve gelişimi genellikle durmakta ve plazma zarından daha az amino asit girişi olmaktadır. Aynı şekilde yeni oluşacak hücre zarında ozmotik basıncın hem tipi hem konsantrasyonu etkili olmaktadır. Bu nedenle izolasyon sırasında protoplastlar hafif şekilde plazmolize edilmelidir. Kültür ortamının ozmotik basıncı 400-800 mOsm/kg arasında ayarlanır. Ozmotik basıncı ayarlamak için hem izolasyon hem de kültür solüsyonuna çeşitli şekerler veya alkol şekerleri ilave edilir. En fazla kullanılanları sırasıyla; manitol, sorbitol, glikoz ve sakkaroz ile bunların çeşitli karışımlarıdır. Ayrıca dengeleyici olarak KC1, CaCl₂ ve çeşitli tuzlarda kullanılabilir. Manitol ve sorbitol metabolize olmayan ozmotik dengeleyicilerdir. Hücreler tarafından doğrudan kullanılmazlar ve genellikle 0.23-0.90 M (%4-16, a/h) aralığında kullanılabilirler. Kullanılacak ozmotik dengeleyici konsantrasyonu izolasyonda kullanılacak bitki materyalindeki hücrelerin izolasyon sırasındaki ozmotik basıncına, bu da çevre şartlarına bağlı olarak değişebilir. Bu durum genç bitki kısımlarının kullanılması ve izolasyon öncesi karanlık uygulaması ile ayarlanabilir.

izolasyon sırasında metabolize olunmayan ozmotik dengeleyici kullanılması uygun olurken, kültür ortamında hem metabolik olarak aktif (örnek: sakkaroz) hem de invert bir şeker (örnek: manitol) kullanılmalıdır. Uzun süreli yüksek ozmotik basınç kültüre alınmış pro toplaş darda kararmalara yol açar ve kallus oluşumu engellenir. Aktif maddeler hücre duvarı sentezi ile ilk hücre gelişmesi devresinde yavaş yavaş metabolize olurlar ve ortamın ozmotik basıncı zamanla düşer. Bu durum faydalı sonuçlar doğurabilir.

4.4.5. Enzim inkübasyonu

Protoplast izolasyonunda en önemli hedef canlı protoplast elde etmek olduğu için pH, ışık yoğunluğu, sıcaklık, inkübasyon süresi, ozmotik dengeleyicinin tipi ve konsantrasyonu, koruyucu kimyasallar (antibiyotik, MES tamponu, PVP-10 gibi), enzim tipi ve konsantrasyonu, enzimin saflık durumu ve izolasyon solüsyonunu oluşturan tuzlar vb. izolasyonu etkileyen oldukça önemli şardardır. Ticari olarak satılan enzimler hücre canlılığını olumsuz etkilemektedir. Bunun için inkübasyon süresi kısa tutulmalıdır. Çoğu izolasyon işlemleri 25±1 °C'de karanlıkta, sabit ve düşük ışık yoğunluğunda (100-500 lüks), 3-20 saatte yapılabilir, inkübasyon karışımı

çoğu kez 30-60 devir/dakika'da bir çalkalayıcı üzerinde bırakılır. Sıcaklık arttıkça inkübasyon süresi kısılır. İzolasyon sırasında çalkalama veya sabit tutma yapılabilir.

4.4.6. Protoplastların yıkanması ve saflaştırılması

Enzim inkübasyonu sonucu ortaya çıkan karışımda, hücre duvarı erimemiş, parçalanmış veya patlamış hücreler ile normal canlılıkta pro toplar elde edilir. Bu karışımın saflaştırılması gerekir. En çok kullanılan saflaştırma metodları; 1) filtrasyon, 2) santrifüj, 3) karışık metod ve 4) daha yoğun bir çözelti üzerinde yüzdürmedir.

Filtrasyon metodunda ortalama pro toplar t çapına göre değişen ve azalan porozitede bir seri filtreden (yukarıdan aşağıya 100-80-64-53-45-30 pm) pro toplar dar geçirilir ve daha sonra mümkün olduğunca az sayıda santrifüj işlemi uygulanır. Mezofil protoplasları gibi nazik pro toplar darda çelik filtre yerine naylon filtreler ile santrifüj birlikte kullanılmalıdır. Bu yöntem hem nazik hem de kolayca yüzmeyen protoplast sistemlerinde uygulanabilir. Fakat tam bir saflaştırma sağlamaz (Ochatt ve Power, 1992).

En çok kullanılan teknik filtrasyon ve santrifüj işleminin birlikte uygulanmasıdır (karışık metod). İlk önce protoplast karışımı bir filtreden (30-100 pm poroziteli, naylon veya çelik) geçirilir ve parçalanmış dokular ile iletim demetleri uzaklaştırılır. Filtre altına geçen pro toplar darın ortalama çapları bulunur (bkz: 4.4.7, Protoplast büyüklüğünün tespiti). Daha sonraki izolasyon işlemleri için optimum filtre porozitesi buna göre tespit edilir. Ayrılan karışımda pro toplar darla birlikte özgül ağırlıkça daha az yoğun olan parçalar uygun bir santrifüj hızı ve kuvveti (100xg) [(g için kullandığınız santrifüyün teknik özelliğine bakınız). Santrifüjde Rölatif Santrifüj Gücü (RCF) $g=118 \times 10^{-7} \times r \times n^2$ formülüyle hesaplanabilir. Burada g (RFC), r (inç olarak dönme yarıçapı=tüp santrifüj merkezi arası mesafe), n (dakikada devir sayısı)'dır (Power ve ark., 1989)] ile 5-10 dakika santrifüj edilir ve tüpün tabanında toplanan karışım, sulandırılarak tekrar santrifüj edilir. Flücrenin çeşitli parçaları (normal hücrelerden daha az yoğun olanlar) santrifüj tüpünün üst kısmında kalırlar. İşlem gerekirse birkaç defa tekrar edilir. Bu sistem hücre süspansiyonları ve kalkıştan protoplast elde etmede çok başarılıdır (Ochatt ve Power, 1992).

Bazı durumlarda protoplaslar sakkaroz çözeltisinde (0.3-0.6 M, %10-21, a/h) düşük bir santrifüj hızında çevrilir. Sakkaroz çözeltisi protoplaslardan daha fazla, diğer organel veya hücre duvarı ihtiva eden komponentlerden daha az yoğun olduğu için protoplaslar çözelti üzerinde toplanırlar ve buradan pipede çekilerek uzaklaştırılırlar. Buna yüzdürme metodu denir. Sakkaroz konsantrasyonu ve santrifüj hızı çok önemlidir. Bu metod daha az zarardır fakat protoplaslar ozmotik şoka girebilirler (Evans ve Bravo, 1983).

Benzer şekilde Ficoll ve Percoll gibi yüksek moleküler ağırlığa sahip ve farklı konsantrasyon seviyelerinde poksakkarozlar da kullanılabilir. Örneğin, önce %9

(a/h)'luk, sonra üzerine %6 (a/h)'lık çözelti konulur ve santrifüjle farklı yoğunlukta hücre ve pro toplaş dar ayrılabilir veya pro toplaş dar arada toplanabilirler. Ficoll ve Percoll ozmotik olarak invert olduklarından sakkarozaya göre daha avantajlı olabilirler (Evans ve Bravo, 1983).

4.4.7. izolasyon sonrası uygulanan testler

Hücre duvarı kalıntısının tespiti:

Başarılı bir enzim karışımı hücre duvarını tamamen eriten fakat hücreyi padatmadan plazma zarını koruyan bir karışımdır. Boyama yapmadan sadece ışık mikroskobu ile pro toplaş darın şekline bakarak genel bir yargıya varılabilir. Bunun için en uygun mikroskop sistemi aşağıdan objektifli (inverted), fotoğraf çekebilme özelliğine sahip, binoküler bir mikroskop olup bir UV ışık kaynağı da bulunmalıdır.

Hücre duvarı tamamen erimiş hücreler (protoplast) tam yuvarlak görünümde olmalarına rağmen hücre duvarı mevcut veya tam erimemiş hücreler eliptik veya değişik şekildedirler (Şekil 4.1, 4.3) (Gahan, 1989). En sağlıklı hücre duvarı kalıntısı testi Calcoflour Beyazı (CFW, % 0.1, a/h) ile yapılandır. Hem izolasyon hem de kültür sırasında veya sonrasında uygulanabilir. 100 pl protoplast süspansiyonu 5.0 fil CFW solüsyonu ile karıştırılır. Hücre duvarı mevcutsa veya kalıntıları varsa hücre mavi bir çember içinde görülür.

Canlılık testleri:

Fenol safranin, Evans mavisi ve Flourescein diacetate (FDA) gibi boyalar kullanılır. Fenol safranin ölü pro toplaş darı belirlemede kullanılır. FDA floresans vermeyen bir bileşiktir. Plazma membranından FDA molekülleri serbestçe geçerler ve estera larca sadece canlı hücrelerde parçalanırlar. Bu parçalanma ile fluorescein açığa çıkar. FDA canlı plazma zarına sahip pro topla s darca tutulduğu için canlı protoplastlar yeşil, yeşil-san renkte görülürler. Biriken fluorescein UV ışığı ile gözlemlenir. Metodu uygulamak için aşağıdaki yol izlenir (Power *ve ark.*, 1989):

- a. Aseton ile 1-2 mg/ml FDA stok solüsyonu hazırlanır ve kullanılıncaya kadar 0 °C de karanlıkta saklanır.
- b. 10 ml yıkama solüsyonuna stok solüsyondan bir damla damlatılır (ikinci solüsyon).
- c. Pastör pipetle, protoplast karışımına, hazırlanan ikinci solüsyondan bir damla damlatılır.
- d. Karışım beş dakika sonra UV mikroskop altında incelenir.
- e. Yüzde (%) protoplast canlılığı^ Floresans veren protoplast sayısı/toplam protoplast sayısı x 100 olarak hesap edilir.

Sağlıklı bir sonuç için bütün ölçümlerde en az 500 protoplast sayılmalıdır. İyi sistemlerde canlılık %50-60'm altına düşmemelidir. Protoplast canlılığı ve bitki rejenerasyonunda en fazla; kullanılan enzimlerin saflığı, konsantrasyonu ve tipi, kültür ortamının ozmotik basıncı, besin ortamı ve komponentleri, ana bitkinin yetiştirme şartları, çevre (kültür) şartları ve kültüre alınan protoplas dar tarafından salgılanan bazı metabolik atıkların canlılık üzerine etkileri etkili olmaktadır.

Protoplast canlılığının artırmada dikkat edilmesi gereken bazı önemli noktalar vardır (Evans ve Bravo, 1983, Ochatt ve Power, 1992):

1. Sterilizasyon metodu: Mümkün olan en düşük konsantrasyonda ve en kısa sürede yapılmalıdır. *In vitro* Edelerden veya aks enik sürgün kültürlerinden elde edilen dokuların kullanımı canlılığı artırır, sterilizasyona gerek yoktur.
2. Yaprak mezofil pro toplas darında yaprak alt epidermisinin soyulması, epidermal hücrelerden kaynaklanan kirlenmeyi azaltabilir, enzim karışımının etkisini artırabilir. İzolasyon öncesi donör bitkinin 12-24 saat karanlıkta tutulması epidermisin kolay soyulmasını sağlar. Alt epidermis kolay soyulmuyorsa yumuşak bir fırça da aynı işi görebilir.
3. Karanlıkta, düşük ışık yoğunluğunda veya düşük konsantrasyonda enzim ile inkübasyon yapılır.
- f. Düşük çalkalama oranında (30-80 devir/dakika) enzim inkübe edilir.
- g. Hücre süspansiyonları, kallus veya donör bitkinin izolasyon öncesi (3-4 gün) düşük sakkaroz oranına sahip ve zayıf besin ortamlarında kültürü yapılır.

Protoplast büyüklüğü ve verim tespiti:

Pro toplas darın büyüklüklerinin tespiti somatik füzyon öncesi ve sonrası heterokaryonların ayrılmasında önemlidir. Ayrıca bazı türlerin pro toplas darında büyüklük kültüre almabilirlikte önemli olmaktadır. Küçük pro toplas dar yarı-katı (agaroz) ortamda, daha büyük çaptakiler ise sıvı ortamlarda kültüre alınmaları durumunda en iyi sonuç alınmaktadır. Ölçümler en az 200 protoplastta mikroskopun okülerine yerleştirilen mikrometre kullanılarak yapılır. Dikotiledonlarda yaprak mezofil pro toplas darının boyları 10-60 pm arasında değişmekte olup, monokotiledonlarda ise daha küçük olmaktadır (30 pm).

Protoplast veriminin hesaplanmasında 1 g yeşil dokudan harekede elde edilen protoplasdarın sağıştırılıp, 10 ml kültür ortamında karıştırıldıktan sonra aşağıdaki yol izlenir:

1. Yaklaşık 2.5×10^5 protoplast/ml bir süspansiyon hazırlanır.
2. Bir hemositometrenin üzerine lam kapatılır ve kapillar hareketle sayım haznesine (bölme) 100-200 pl protoplast karışımı Pastör pipetle taşırmadan doldurulur.
3. Mikroskop altında önce orta kare, daha sonra köşelerdeki 4 kare (Şekil 4.2a) sayılır (her karede üst ve ortadan çizginin ortasına dokunanlar da dahil olmak üzere sayılır. Sağ kenar ve alt çizgilere dokunanlar ise sayılmaz (Şekil 4.2b). Eğer hemositometre 2 odalı (bölmeli) ise diğer oda için de aynı işlemler tekrar edilir. Protoplastların gruplar halinde yapışarak kümeler oluşturması oranı %10'u geçerse işlem tekrar edilmelidir. Eğer herhangi bir karede sayı 20'den az veya 50'den fazla ise süspansiyon yoğunluğu yeniden ayarlanarak sayım yapılmalıdır.
4. Hücre sayımı: Bir hemositometrede her bir kare 0.1 mm^3 veya 10^{-4} cm^3 hacime ve 1 mm^2 alana sahiptir. $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$ olduğuna göre bir ml'de protoplast konsantrasyonu şu şekilde hesaplanır: $\text{protoplast t/ml} = \text{kare başına ortalama protoplast sayısı} \times \text{sulandırma faktörü} \times 10^4$. Örnek: Eğer kare başına ortalama protoplast sayısı 28 ise; $28 \times 10^4 = 2.8 \times 10^5$ protoplast/ml olur. Toplam verim ise $\text{protoplast/ml} \times \text{orijinal hacim}$ (örnek 10 ml) olarak yani $2.8 \times 10^5 \times 10 = 2.8 \times 10^6$ olur.

Verim protoplast/ml süspansiyon olarak ifade edilir. Verim belirlendikten sonra uygun kültür yoğunluğu ayarlanır. Fakat toplam verim başlangıçtaki 1 g materyalden elde edilen protoplast sayısı olarak ifade edilir (Power ve ark1989).

Eğer istenilen son kültür yoğunluğu 1×10^5 protoplast/ml ise 10 ml içinde bulunan protoplast miktarı istenilen kültür yoğunluğuna bölünür ve ilave edilmesi veya çıkarılması gereken besin ortamı (ml) miktarı belirlenir. Örnek: $2.8 \times 10^6 / 1 \times 10^5 = 28 \text{ ml}$. Sonuç olarak mevcut 10 ml protoplast karışımına 18 ml kültür ortamı daha ilave edilirse elde edilen karışımda 1×10^5 protoplast /ml var demektir. Düşük yoğunlukta bir protoplast süspansiyonu olması durumunda ise istenilen kültür ortamı yoğunluğuna göre belirli bir miktar kültür ortamının santrifüjle uzaklaştırılması gerekir.

4.5. Protoplast Kültürü

izolasyon sonrasında hücre duvarının erimesi ve ozmotik şok nedeniyle protoplasmlar bir şekilde strese girerler ve tamir mekanizması çalışmaya başlar. İlk kültür işleminden sonra çok hızlı bir protein sentezi başlayarak önce zarar gören proteinler ve daha sonra hücre zarı yapımaya başlanır. Hücre duvarı sentezi ile hücre bölünmesi arasında herhangi bir ilişki bulunmamasına rağmen hücre duvarı sentezi olmadan bölünme ortaya çıkmamaktadır.

4.5.1. Kültür ortamlarının özellikleri ve bitki büyüme düzenleyicileri

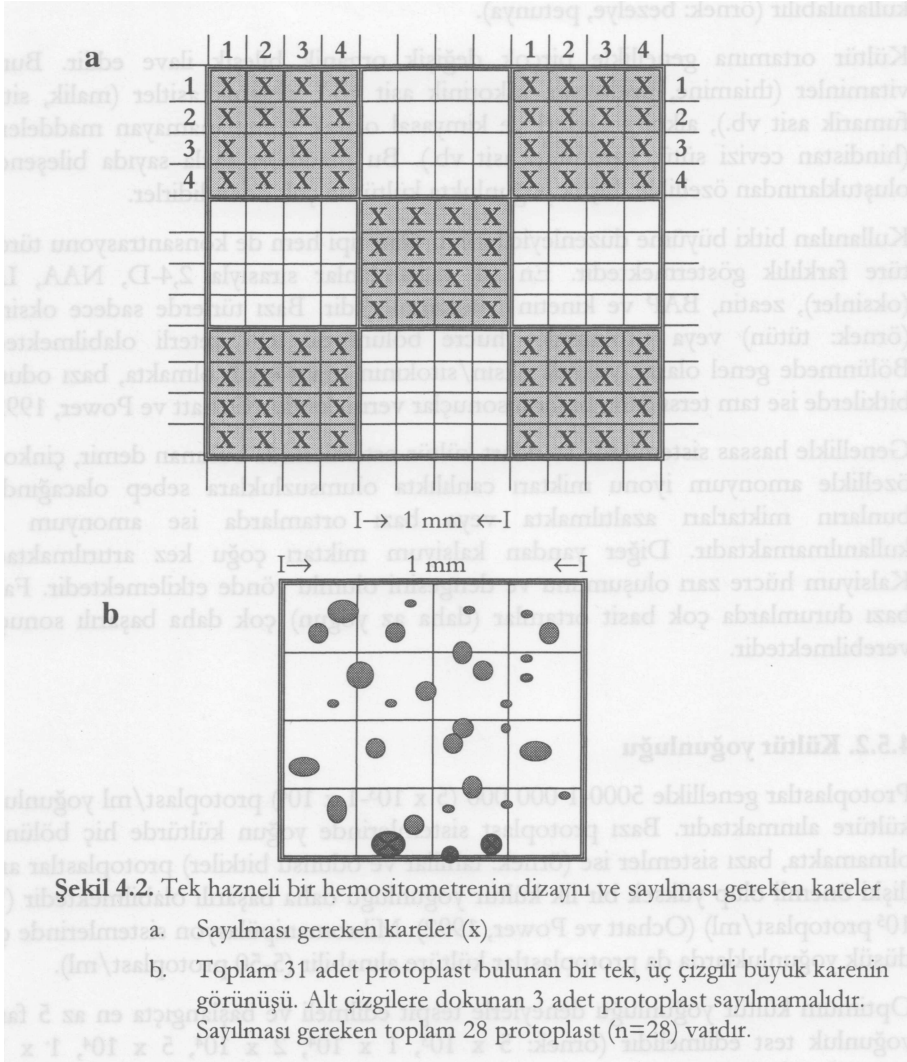
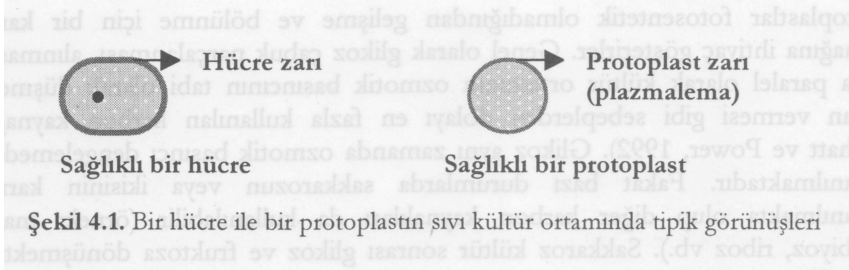
Protoplast kültürü ve bitki rejenerasyonu için ortam seçimi çok önemlidir. Bütün ortamlar deiyonize veya çift destile su ile hazırlanmalıdır. pH ayarlanır, agar ilave edilir ve ortam sterilize edildikten sonra uygun kaplara dağıtılır. Tablo 4.5'te çeşitli kültür türlerine ait uygun ortamlar verilmiştir ve ilk defa kültüre alınan türlerde bu ortamların başlangıçta denenmesi pratik olabilir.

Protoplast kültür ortamları normal doku kültürlerinde (kallus, hücre süspansiyonu, bitki rejenerasyonu) kullanılan ortamlara benzerlik gösterir. En çok kullanılan temel ortamlar MS (Murashige ve Skoog, 1962), B5 (Gamborg *ve ark.*, 1968) ve KM (Kao ve Michayluk, 1975; Kao, 1977) olup bitki türü ve protoplast elde edilen dokuya göre değiştirilerek optimize edilebilir. KM besin ortamının çeşitli türevleri (Ek 1) tahıllar, baklagiller ve meyve ağaçları gibi geniş bir tür aralığında başarıyla kullanılmaktadır.

Tablo 4.5. İlk defa protoplast kültürü yapılacak türlerde derlenebilecek bazı kültür ortamları (Power *ve ark.*, 1989).

Ortam komponentleri	Büyüme düzenleyicileri (mg/1)	Kullanım amacı (Beklenen sonuç)	Kısa adı
MS+%3 sakkaroz	NAA 2.0, BAP 0.5	Kallus oluşumu	MSP1 OM
MS+%3 sakkaroz+ %9 manitol (M)	NAA 2.0, BAP 0.5	Protoplast kültürü	MSP1 9M
MS+%3 sakkaroz	2.0 IAA, 1.0 BAP	Sürgün oluşumu	MSD3
MS+%3 sakkaroz	1.0 Zeatin	Sürgün oluşumu	MSZ
MS+%3 sakkaroz+ %0.5 agar	0.1 NAA	Yeni sürgünlerin köklendirilme si	MSP2
MS+%3 sakkaroz+ 0.001 mg/1 folik asit	0.009 IAA, 0.3 KIN	Aksenik sürgün kültürü	BGS

pH bütün ortamlarda 5.8'e ayarlanır.



Protoplasdar fotosentetik olmadığından gelişme ve bölünme için bir karbon kaynağına ihtiyaç gösterirler. Genel olarak glikoz çabuk parçalanması, alınması ve buna paralel olarak kültür ortamının ozmotik basıncının tabi olarak düşmesine imkan vermesi gibi sebeplerden dolayı en fazla kullanılan karbon kaynağıdır (Ochatt ve Power, 1992). Glikoz aynı zamanda ozmotik basıncı dengelemede de kullanılmaktadır. Fakat bazı durumlarda sakkarozun veya ikisinin karışımı kullanılmakta olup diğer karbon kaynakları da kullanılabilir (örnek: manoz, selobiyoz, riboz vb.). Sakkaroz kültür sonrası glikoz ve fruktoza dönüşmektedir. Mezofil protoplasdarı için çoğu kez manitol ve sorbitol ozmotik dengeleyici olarak kullanılabilir (örnek: bezelye, petunya).

Kültür ortamına genellikle birçok değişik organik bileşik ilave edilir. Bunlar vitaminler (thiamine, pridoksin, nikotinik asit vb.), organik asider (malik, sitrik, fumarik asit vb.), alkol şekerleri ve kimyasal olarak tanımlanamayan maddelerdir (hindistan cevizi sütü, kazamino asit vb.). Bu maddeler fazla sayıda bileşenden oluştuklarından özellikle düşük yoğunlukta kültürde çok önemlidirler.

Kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin hem tipi hem de konsantrasyonu türden türe farklılık göstermektedir. En sık kullanılanlar sırasıyla 2,4-D, NAA, IAA (oksinler), zeatin, BAP ve kinetin (sitokininler)'dir. Bazı türlerde sadece oksinler (örnek: tütün) veya sitokininler hücre bölünmesi için yeterli olabilmektedir. Bölünmede genel olarak yüksek oksin/sitokinin oranı etkili olmakta, bazı odunsu bitkilerde ise tam tersi daha başarılı sonuçlar vermektedir (Ochatt ve Power, 1992).

Genellikle hassas sistemlerde standart kültür ortamlarında bulunan demir, çinko ve özellikle amonyum iyonu miktarı canlılıkta olumsuzluklara sebep olacağından, bunların miktarları azaltılmakta veya bazı ortamlarda ise amonyum hiç kullanılmamaktadır. Diğer yandan kalsiyum miktarı çoğu kez artırılmaktadır. Kalsiyum hücre zarı oluşumunu ve dengesini olumlu yönde etkilemektedir. Fakat bazı durumlarda çok basit ortamlar (daha az yoğun) çok daha başarılı sonuçlar verebilmektedir.

4.5.2. Kültür yoğunluğu

Protoplasdar genellikle 5000-1 000 000 (5×10^3 - 1×10^6) protoplast/ml yoğunlukta kültüre alınmaktadır. Bazı protoplast sistemlerinde yoğun kültürde hiç bölünme olmamakta, bazı sistemler ise (örnek: tahıllar ve odunsu bitkiler) protoplasdar arası ilişki önemli olup yüksek bir ilk kültür yoğunluğu daha başarılı olabilmektedir (1×10^5 protoplast/ml) (Ochatt ve Power, 1992). Mikromanipülasyon sistemlerinde çok düşük yoğunluklarda da protoplasdar kültüre alınabilir (5-50 protoplast/ml).

Optimum kültür yoğunluğu deneylerle tespit edilmeli ve başlangıçta en az 5 farklı yoğunluk test edilmelidir (örnek: 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 protoplast/ml). Bunu yapmak için ilk önce protoplast verimi hesaplanır (örnek: 1×10^6 protoplast/ml) ve s adas tırmalar dan sonra 1 ml kültür ortamı içinde karıştırılır.

Daha sonra uygun kültür metodu seçilir (örnek: sıvı damla kültürü). Önce aşağıdaki şekilde şişelere dağıtılır ve daha sonra Petri kutularına mikropipetle damlalar halinde damlatılarak kültüre alınır (1 ml = 1000 pl):

1. 5 pl+995 pl= 5×10^3 (5000) protoplast/ml
2. 10 pl+990 pl= 1×10^4 (10 000) protoplast/ml
3. 20 pl+980 pl= 2×10^4 (20 000) protoplast/ml
4. 50 pl+950 pl= 5×10^4 (50 000) protoplast/ml
5. 100 pl+900 pl= 1×10^5 (100 000) protoplast/ml

Bir ml karışım 5.5 cm'lik Petri kutularına her kutuya 5 adet olmak üzere 50-100 pl damlalar halinde yavaşça damlatılır. Her bir yoğunluk için 2 veya 4 tekerrürlü olarak deneme planlanabilir. Tekerrür miktarı artırılmak istenirse daha fazla protoplast izole etmek (en az 2 g yeşil doku ile) ve ona göre denemeyi planlamak gerekir.

4.5.3. Kültür teknikleri

Bazı hassas protoplasdar hangi ortamda kültüre alınırsa alınsınlar kültür sonrası canlılık hızlı bir şekilde düşmektedir. Bu nedenle zamana göre canlılıkta azalma yüzdesi tespit edilmelidir. Bunun için protoplasdar sadece yıkama solüsyonunda ve karanlıkta 4 °C de bekletilir ve her 48 saatte canlılık testi yapılarak bu oran hesap edilir. Bundan sonraki kültür yoğunluğu bu orana göre hesap edilir (Ochatt ve Power, 1992). izolasyon ve kültürden sonra en çok karşılaşılan problemler, yetersiz hücre duvarı rejenerasyonu, mitotik bölünmenin gecikmesi, pro toplaş darın balon yapması (balonlama) ve ilk bölünmeden sonra mitotik bölünmenin durmasıdır.

Pro toplaş darın kültüre alınabilme etkinliği (KAE) ilk kültür yoğunluğuna göre bölünen protoplast yüzdesi ile hesaplanır ve 3 kısımda değerlendirilir:

1. İlk kültüre alınabilirlik etkinliği (İKAE): Kültüre alınan pro toplaş darın hücre duvarı oluşturup, en az bir mitoz bölünme geçirenlerinin yüzdesidir.
2. Ara kültüre alınabilirlik etkinliği (AKAE): Kültür sonrası 10 hücre/koloni oluşturanların yüzdesidir.
3. Son kültüre alınabilirlik etkinliği (SKAE): Kültür sonrası 1-2 mm çapında mikrokallus oluşturanların yüzdesidir.

Protoplast kültüründe en çok kullanılan metotlar aşağıda verilmiştir. Bütün türlere uygulanabilen standart bir metot yoktur. Protoplast kaynağı olarak her bitki türü ve parçası için farklı bir metot daha başarılı sonuçlar verebilir.

a. Sıvı damla kültürleri tekniği: Protoplasdar sıvı kültür ortamı ile karıştırılır ve karışımdan pipetle 100-200 pllik damlalar Petri kutularına

- (55-90 mm çaplı) damlatılır. Petriler Nescofilm, Parafilm veya diğer uygun filmler ile sarılır ve kültüre alınır. Alttan objektifli bir mikroskopla gelişim izlenir. Protoplastlar damla tabanında toplanıp kümeler oluştururlar. Seyreltme yapmak kolaydır (Evans ve Bravo, 1983).
- b. **Sıvı kültür tekniği:** Protoplastlar uygun yoğunlukta sıvı ortam içinde Petri kutularına dağıtılırlar (örnek: 4 ml/5.5 cm Petri kutusu).
- c. **Ağar içinde kültür tekniği:** Pro toplaş t yoğunluğu istenen kültür yoğunluğunun iki katına ayarlanır (örnek: 10 ml). Eşit miktarda ve yine iki katı yoğunlukta eritilmiş ağar (% 1.2 a/h, 45 °C) ile 1/1 oranında karıştırılır ve Petri kutularına uygun şekilde dağıtılarak, ters çevrilmiş olarak kültüre alınır (Ochatt ve Power, 1992).
- d. **Ağar üzerinde sıvı kültür tekniği:** Bir miktar ağar Petri kutusunun tabanına yayılır, üzerine çift yoğunlukta aynı miktarda pro toplaş t süspansiyonu ilave edildikten sonra kültüre alınır.
- e. **Agaroz ortamı kültürü tekniği:** Otoklav edilmiş 4 kat yoğunlukta (%2.4-4.0, a/h) düşük erime noktasına sahip distile sudaki agaroz, çift yoğunlukta pro toplaş t ortamı ile 1/1 oranında karıştırılır. Bu karışım daha sonra içinde istenilen kültüre alınma yoğunluğunun iki katı yoğunlukta protoplast içeren ortam ile 1/1 oranında karıştırılır ve ince bir tabaka halinde Petri kutularına yayılarak kültüre alınır.
- f. **Agaroz blokları kültürü tekniği:** Eritilmiş agaroz (45 °C) içindeki protoplasdar 4.0 ml/3.5-5.0 cm Petri kutusu olmak üzere dağıtılır ve katılaşması beklenir. Katılaşan agaroz bloklar halinde (4 eşit parça) kesilir, daha geniş bir Petriye (9 cm) transfer edilir ve aynı ortamın sıvısı ilave edilerek kültüre alınır.
- g. **Agaroz damla kültürü:** Eritilmiş agaroz ortamı içinde bulunan protoplasdar damlalar halinde (50-150 pl) Petri kutusunun tabanına mikro pipede konulur ve üzerine sıvı ortam ilave edilir. Ozmotik değişmelere hassas bazı sistemlerde veya kademeli olarak ozmotik basıncın düşürülmesinin zorunlu olduğu durumlarda agaroz damlalarının üzerine ozmotik düzenleyici ihtiva etmeyen sıvı bir ortam ilk günden itibaren ilave edilebilir.
- h. **Asılı veya oturan damla kültürü:** Sıvı kültür ortamındaki protoplast damlaları (20-40 pl) Petri kutusunun kapağının içine (asılı) veya tabanına (oturan) damlatılarak kültüre alınır.
- i. **Protoplastların tutuklanması (immobilizasyon):** Hassas protoplast sistemlerinde jel matrisi mekanik bir destek sağlayarak başarıyı artırır. Bu metoda arpa, buğday ve ayçiçeğinde başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu sistemde ölü hücrelerden açığa çıkan zararlı maddelerin sağlıklı hücreleri etkilemesi ve agregatlaşma engellenir. Sistem hücreklonlama

çalışmalarına uygundur ve seyreltme daha kolay olur. Çoğunlukla agaroz veya aljinat kullanılır (%0.6, a/h). Aljinat agarozdan daha avantajlıdır. Eritmede sıcaklığa ihtiyaç göstermez. Sitrata ve fosfatla eritilebilir (Feher ve Dudits, 1994).

j. Nörs kültürleri ve besleyici hücreler:

4. Agaroz kültürü+besleyici protoplastlar: X ışınlarına maruz bırakılmış ve yeni izole edilmiş protoplastlar %0.6 (a/h)'lık agaroz içine karıştırılır. Agaroz katılaştıktan sonra üzerine yine %0.6 (a/h)'lık agaroz içeren ortam ile karıştırılmış normal protoplastlar yayılır.
5. Nörs kültürleri olarak başka hücreler kullanılır. Hücreler agaroz veya ağar ortamında karıştırılarak Petri kabının tabanına yayılır. Ağarın katılaşmasından sonra üzerine selüloz nitrattan yapılmış membranlar konulur ve onun üzerine de protoplastlar damlalar halinde ilave edilir.
6. Kültürü zor olan bir türün protoplastları kültürü kolay olan bir türün protoplastları ile karıştırılarak kültüre alınır. Kolay kültürün protoplastları bazı büyüme faktörleri ve tanımlanamayan difüze olabilir kimyasalları ortama vererek diğer çeşidin pro toplaş darının bölünmesini uyarabilir.

4.5.4. Protoplastların kültür sonrası davranışları

Protoplast izolasyonundan sonra ortaya çıkabilecek davranışlar 5 kategoride değerlendirilebilir (Roest ve Gilissen, 1993). Bunlar sırasıyla:

- a. **Strese tepki:** Enzim etkisi sonucu bitki hücresinin kendi savunma mekanizmasını geliştirmesi,
- b. **Tamir mekanizması:** Hücre zarında ve zar proteinlerinde oluşan zararın giderilmesi, yeni zarın oluşturulması,
- c. **Adaptasyon:** Organellerin ve sitoplazmanın morfolojik ve fonksiyonel olarak adaptasyonu,
- d. **Hücre bölünmesi:** Hücre hayat döngüsünün yeniden başlaması, hücre bölünmesi ve kallus oluşumu,
- e. **Morfogenesis:** Organize hücre gelişmesi, bölünmenin uyarılması ve değişimin başlayarak organize doku ve daha sonra bitkilerin oluşturulmasıdır.

Hücre bölünmesi, mikrokoloni oluşumu ve ozmotik basıncın düşürülmesi:

Bir protoplastın izole edilmesinden sonra göstereceği davranışlar ve gelişim seyri Şekil 4.3'te verilmiştir, Şekil 4.4 ve 4.5'te ise sırasıyla *Passiflora edulis* fv. *Flavicarpa* ve *Passiflora gibbert?* nin yaprak ve süspansiyon hücrelerinden elde edilen pro toplaş dardan bitki rejenerasyonuna kadar değişik devreler verilmiştir.

Pro toplaş darın kültürü sonrası en önemli devre hücre duvarı oluşumudur (hücre duvarı rejenerasyonu). Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar selüloz mikrofibrillerin kültürden 24-48 saat sonra oluşmaya başladığını ve hücre duvarı civarına taşındığını göstermiştir. Kültür sırasında tam yuvarlak olan pro toplaş dar 24 saat sonra eliptik bir şekil almaya başlarlar. Bu durum hücre duvarı oluşumunun başladığını ve bölünmenin olabileceğini gösterir. Bazı bitki türlerinde bu süreç 4-5 gün hatta 10 gün olabilir. Bazı türlerde ise hücre duvarı sentezi ötesine geçmeden canlılık kaybolur (Evans ve Bravo, 1983, Ochatt ve Power, 1992).

Eksik hücre duvarı rejenerasyonu sonucu, zayıf alanlarda balonlama (tomurcuklaşma) olabilir (Şekil 4.3). Bu durum pekdnin hücre duvarında oluşmaması sonucu ortaya çıkar. Zayıf hücre duvarı sentezinde genetik faktörlerin yanı sıra besin ortamı özellikleri, hormonlar, uygun olmayan ozmotik dengeleyici konsantrasyonları ve karbon kaynağı etkili olabilir. En az balonlama, kültür ortamında 2,4-D ve zeatin kullanıldığında ortaya çıkmaktadır. İlk hücre bölünmesi hücre duvarı sentezine bağlıdır. Hücre bölünmesinde etkili en önemli faktörler donör bitkinin genotipi, kültür ortamı ve şartları ile donör bitkinin fizyolojik gelişme şartlarıdır.

Hızlı gelişen hücre kültürlerinden izole edilen protoplastlar yaprak mezofil pro toplaş darından daha erken bölünmeye başlarlar (Ochatt ve Power, 1992). Bazı bitkilerde bölünme öncesi bir durgunluk dönemi geçmesi gerekmektedir (örnek: pamukta 3-4 hafta).

Bazı durumlarda sitokinez (sitoplazmanın bölünmesi) olmayabilir ve tesadüfen çok çekirdekli protoplastlar oluşur. Bu durum daha çok normal ihtiyacın üzerinde büyüme düzenleyicileri verilmişse ortaya çıkar. Fakat daha sonra genellikle bölünme olmaz, ikinci bölünme ve sonraki bölünmeler daha hızlı olmakta ve çok hücreli gruplar oluşmaktadır (mikro koloni) (Şekil 4.3). İlk mitotik bölünmeden genellikle 2-4 hafta sonra görülebilir seviyede mikro koloniler oluşur. Kültür ortamına her 1-2 haftada bir kez taze kültür ortamı ilave edilmelidir. Ozmotik dengeleyici konsantrasyonu da yavaş yavaş düşürülmelidir. Yarı katı kültür ortamlarında kesilen bloklar ozmotik basıncı daha düşük bir ortama alınırlar. Agaroz damlalar kültüründeki protoplasların etrafındaki ortam pipetle çekilir ve ozmotik basıncı daha düşük bir ortam ilave edilir.

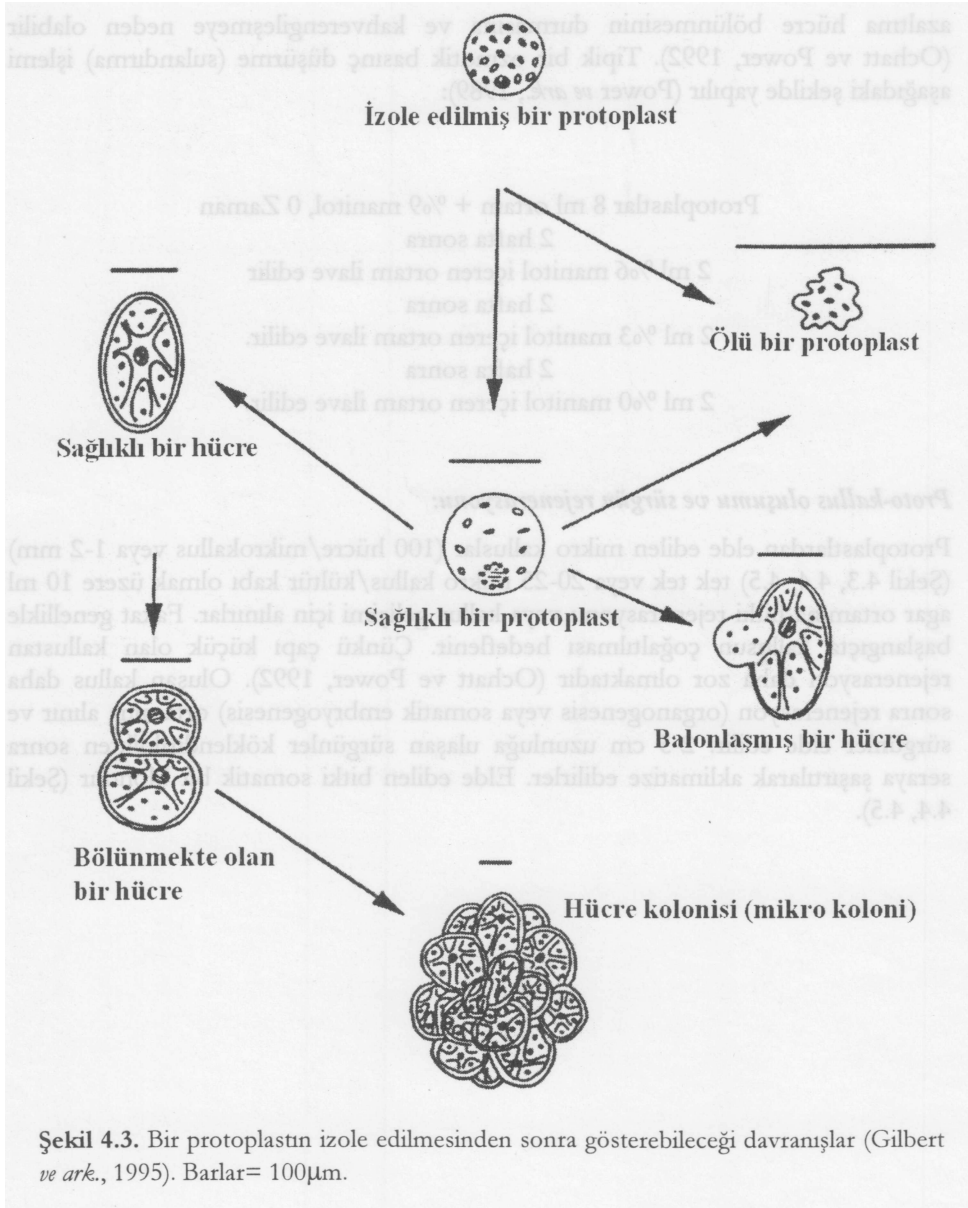
Çoğu sistemlerde ozmotik basıncın düşürülmesine ilk hücre bölünmesinden hemen sonra başlanır ve 10, 20, 30, ve 50 hücre/koloni oluncaya kadar tekrar edilir. İlk seyreltme ortamında ozmotik dengeleyici konsantrasyonu %25-30 oranında azaltılmasına rağmen en uygun şekil deneyle tespit edilmelidir. Hızlı ve sık bir

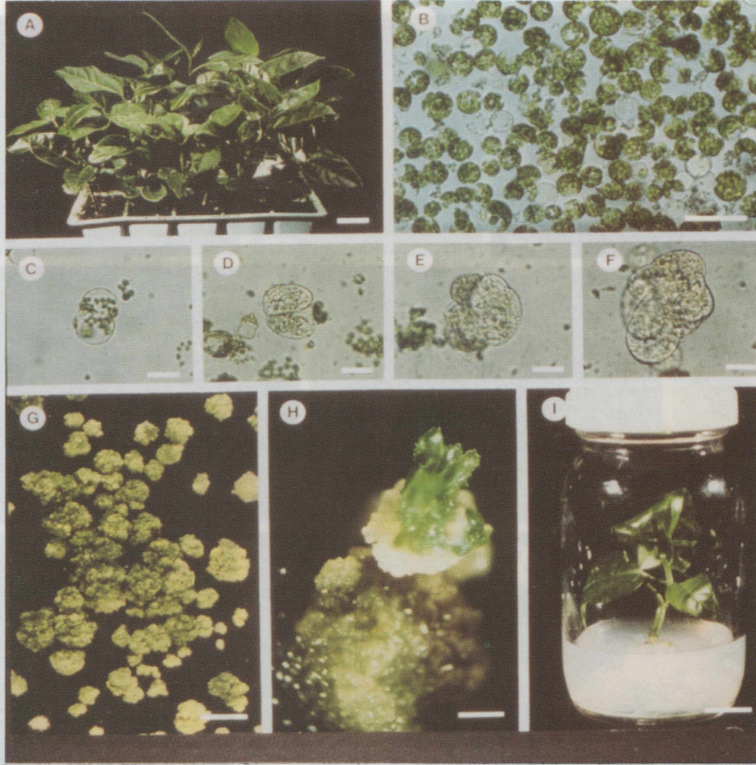
azaltma hücre bölünmesinin durmasına ve kahverengileşmeye neden olabilir (Ochatt ve Power, 1992). Tipik bir ozmotik basınç düşürme (sulandırma) işlemi aşağıdaki şekilde yapılır (Power *ve ark.*, 1989):

Pro toplaş dar 8 mİ ortam + %9 manitol, 0 Zaman
2 hafta sonra
2 mİ %6 manitol içeren ortam ilave edilir
2 hafta sonra
2 mİ %3 manitol içeren ortam ilave edilir.
2 hafta sonra
2 mİ %0 manitol içeren ortam ilave edilir.

Proto-kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu:

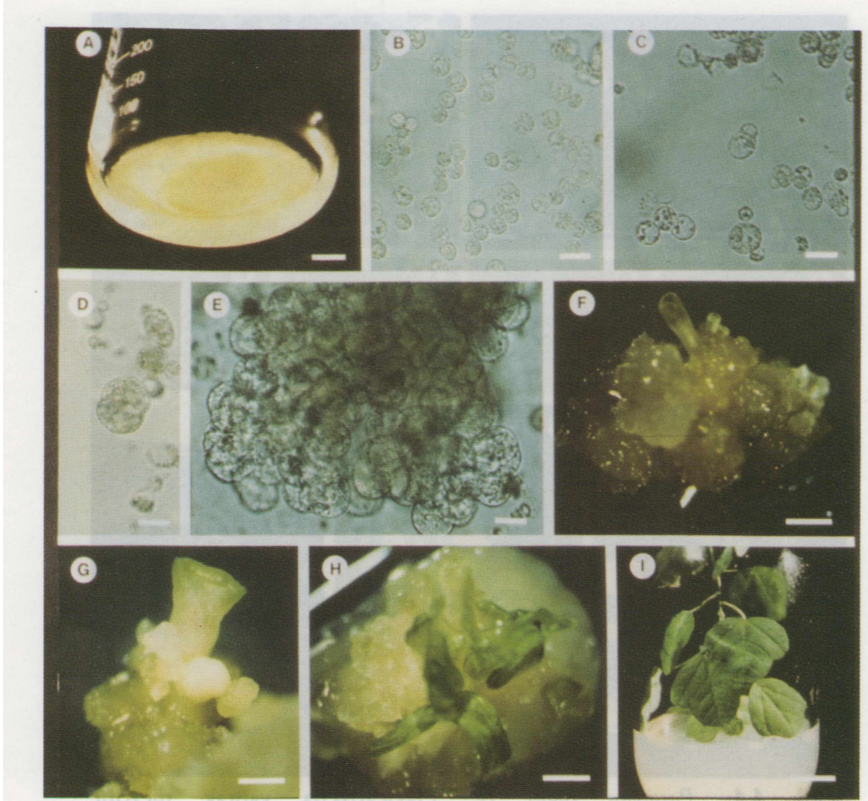
Pro toplaş dardan elde edilen mikro kalkışlar (100 hücre/mikrokallus veya 1-2 mm) (Şekil 4.3, 4.4, 4.5) tek tek veya 20-25 mikro kallus/kültür kabı olmak üzere 10 mİ ağar ortamına bitki rejenerasyonu veya kallus gekşimi için akınırlar. Fakat genellikle başlangıçta kallusun çoğaltılması hedeflenir. Çünkü çapı küçük olan kallus tan rejenerasyon daha zor olmaktadır (Ochatt ve Power, 1992). Oluşan kallus daha sonra rejenerasyon (organogenesis veya somatik embryogenesis) ortamına akınır ve sürgünler elde edilir. 2-5 cm uzunluğa ulaşan sürgünler köklendirildikten sonra seraya şaşırtılarak akimatize edilirler. Elde edilen bitki somatik bir klondur (Şekil 4.4, 4.5).





Şekil 4.4. *Passiflora edulis* fv. Flavicarpa'da yaprak mezofil protoplastlarının izolasyonu, kültürü ve bitki rejenerasyonu (fotoğraflar Nottingham Üniversitesi'nden Dr. M. Davey ve Dr. J.B. Power'dan temin edilmiştir).

- A) Eksplant kaynağı olarak kullanılan 45 günlük serada yetiştirilen fideler (Bar: 2.6 cm).
- B) Yeni izole edilmiş yaprak protoplastları (Bar: 100 μ m).
- C), D), E) Sırasıyla kültürden 8, 10, 12 gün sonra mitotik bölünme gösteren protoplastlar (Bar: 75 μ m).
- F) Kültürden 15 gün sonra protoplastlardan elde edilen koloniler (Bar: 75 μ m).
- G) Protoplastlardan elde edilen dokular (Bar: 5 mm).
- H) Protoplastlardan elde edilen ve sürgün rejenerasyonu başlayan kallus (Bar: 1.5 mm).
- I) Protoplasttan elde edilen ve köklendirilmiş bir bitki (Bar: 1.5 cm).

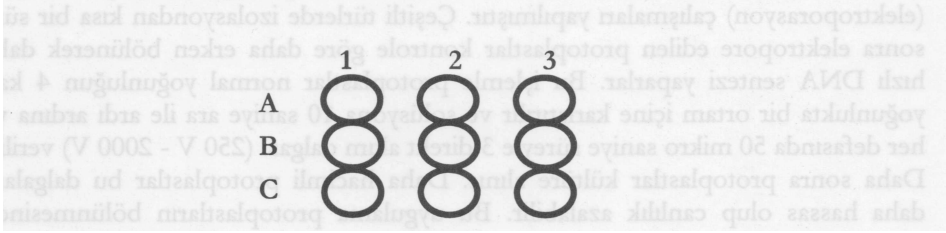


Şekil 4.5. *Passiflora giberti*'de süspansiyon hücreleri protoplastlarının izolasyonu, kültürü ve bitki rejenerasyonu (fotoğraflar Nottingham Üniversitesi'nden Dr. M. Davey ve Dr. J.B. Power'dan temin edilmiştir).

- A) Protoplast izolasyonuna uygun embryogenic hücre süspansiyonu (Bar: 1 cm).
- B) Yeni izole edilmiş hücre süspansiyonu protoplastları (Bar: 50 μ m).
- C) 5 gün kültürden sonra protoplastlar. Protoplastların şekilleri mitotik bölünme öncesi yuvarlaktan oval duruma dönüşmektedir (Bar: 50 μ m).
- D) İki yavru hücre oluşturmak için mitotik bölünme geçirmiş bir protoplast (Bar: 50 μ m).
- E) Kültürden 28 gün sonra protoplasttan elde edilmiş bir hücre kolonisi (Bar: 50 μ m).
- F), G) Proto-kallustan gelişen somatik embriyolar (Bar: 5 mm).
- H) Somatik embriyodan elde edilmiş sürgünler (Bar: 1.5 m).
- I) Protoplasttan elde edilmiş köklendirilmiş bir bitki (bar: 1.5 cm).

Pro toplaş dardan elde edilmiş kallus kullanılarak en uygun bitki rejenerasyonu ortamının belirlenmesi için 9 cm'lik Petri kutuları kullanılır. Bu metoda mikro damla metodu denilir ve protoplasların tepkileri 2 faktörün (örnek: oksin ve sitokinin) 3 değişik konsantrasyonu ile test edilir. Örnek olarak metot şu şekilde uygulanır (Power *ve ark.*, 1989):

1. Faktörler olarak NAA (oksin) ve BAP (sitokinin) 1.0, 2.0, 4.0 mg/1 NAA ve 0.5, 1.0, 2.0 mg/1 BAP seviyelerinde hazırlanır.
2. Protoplaslar standart teknikle izole edilirler ve normal kültür yoğunluğunun 3 katı oranında besin ortamı içine karıştırılırlar (örnek: 5×10^4 ml son yoğunluk isteniyorsa 1.5×10^5 protoplast/ml).
3. NAA. ve BAP' nin normalin 3 katı konsantrasyonda stok solüsyonu hazırlanarak kodlanır. Her NAA x BAP kombinasyonu pro toplaş darla birlikte bir mikro test kabının bölmelerine karıştırılır.



4. 100 pl'ye ayarlı bir mikro pipet kullanılarak kabın her hücreğine 100 pl NAA, 100 pl 6-BAP stok solüsyonu ve 100 pl protoplast ilave edilir. Kabin kenarına hafifçe vurularak protoplaslar ortam ile karıştırılır.
5. Daha sonra 5 cm'lik Petri kutuları (her uygulama için 5 tekerrür) alınır ve kapakları aşağıdaki şekilde çizilir.

	1	2	3
A			
B			
C			

6. Her petri kutusunun kapağı ters çevrilir ve daha önce hazırlanan karışımdan her kombinasyon için 20 pil damlalar halinde mikropipede konulur. Her defasında pipet ucu değiştirilir; A1, A2, A3.....için. Kapak

dikkatlice Petri kutusunun üzerine kapatılır. Protoplasdar asılı damlalar halindedirler. Nemliliği korumak için Petri kutuları 14 cm'lik nemli filtre kağıdı içeren Petri kutusuna yerleştirilebilir.

7. Bu metot üçüncü bir faktörü (örnek: 2,4-D) içerecek şekilde genişletilebilir. Üçüncü faktör asılı damlalara eklenir. Bu faktörü yerleştirmek için protoplasdarın orijinal yoğunlukları ve ilk iki faktörün konsantrasyonu son konsantrasyonunun 6 katına ayarlanmalıdır. Üçüncü faktörün stokları istenen konsantrasyonunun 2 katı olmalıdır. Bir çok bitki türü için kültürde normal ışık şardan aralığı 0-2000 lüks; sıcaklık aralığı ise 15-30 °C'dir.

Bazı zor sistemlerde (tahıllar, çiçekler ve odunsu bitkiler) kültürden ilk bölünmenin başlamasına kadar geçen uzun durgunluk süresinin azaltılması arzu edilmektedir. Kısa süreli yüksek voltajlı direkt elektrik akımı verilerek protoplaslarda porlar açma (elektroporasyon) çalışmaları yapılmıştır. Çeşitli türlerde izolasyondan kısa bir süre sonra elektropore edilen protoplasdar kontrole göre daha erken bölünerek daha hızlı DNA sentezi yaparlar. Bu işlemle protoplasdar normal yoğunluğun 4 katı yoğunlukta bir ortam içine karıştırılır ve solüsyona 10 saniye ara ile ardı ardına ve her defasında 50 mikro saniye süreyle 3 direkt akım dalgası (250 V - 2000 V) verilir. Daha sonra protoplasdar kültüre alınır. Daha hacimli protoplasdar bu dalgalara daha hassas olup canlılık azalabilir. Bu uygulama protoplasdarın bölünmesinde uyarıcı olabilmektedir (Ochatt ve Power, 1992).

4.6. Protoplastlardan Bitki Rejenerasyonu

Bir çok bitki türünde protoplasttan bitki rejenerasyonu öncelikle çok yüksek oranda genotipe daha sonra donör doku ve hücrelerin dp ve özelliklerine bağlıdır (Roest ve Gilissen, 1993). *Solaniaceae* familyası protoplas dardan bitki rejenerasyonunda en başarılı olanıdır. Son yıllarda tahıllar ve odunsu bitkilerde başarılı sonuçlar alınmıştır. Fakat özellikle dane baklagillerde protoplas dardan bitki rejenerasyonunda hala zorluklar vardır.

Protoplas dardan bitki rejenerasyonu ile ilgili olarak sebzeler, tahıllar, çayırlar, dane ve yemlik baklagiller, endüstri bitkileri, süs bitkileri ve meyveler gibi bitki gruplarında kategorize edilmiş derlemeler veya bir bitki türüne ait yazılmış özel bölümler vardır. Bunlar arasında Evans ve Bravo (1983), Bravo ve Evans (1985), Roest ve Gilissen (1989, 1993), Ochatt ve Power (1992), Feher ve Dudits (1994), Bajaj (1989a, b), Bajaj (1993a, b), Bajaj (1994a, b), Bajaj (1995) ve Bajaj (1996) sayılabilir.

Bütün türler için uygun tek bir sistem yoktur ve her tür, hatta her çeşit veya genotip için optimum sistem ayrı ayrı deneylerle tespit edilmelidir. Eğer üzerinde daha önce çalışılmamış bir türde protoplas t izole etmek ve uygun kültür ve rejenerasyon

şartları tespit edilmek isteniyorsa öncelikle en çok kullanılan metotlar ve besin ortamları denenmelidir. Çoğu durumda ortaya çıkan eğilime göre, içerisinde bir oksin (sitokinininden daha yüksek oranda) ve bir sitokinin bulunan temel besin ortamlarında (KM, K, MS, B5), karanlıkta, kültürden 24 saat-3 gün sonra ilk hücre bölünmesinin başlaması gerekmektedir. Bu durumda eğer bölünme yüzdesi yeterli değilse kültür ortamı veya içeriği değiştirilerek deney optimize edilir. Fakat hiçbir bölünmeye rasdanmazsa bu durumda donör bitki materyali, besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri, izolasyon ve kültür sırasındaki ozmoik şartlar ile kültür metodu gözden geçirilmelidir. Bazı durumlarda bu şardan hepsinin farklı kombinasyonlarda denenmesi de amaca ulaşmada yeterli olmayabilir. Bu durumda tesadüfen veya sıra dışı olarak uygulanmış bazı metodlar başarılı sonuçlar verebilir. Örnek olarak, şeker pancarında sadece stoma gard hücrelerinin protoplast kaynağı olarak kullanılması halinde başarı elde edilebilmektedir (Hail *ve ark.*, 1996). Yine havuç yaprak sapı protoplasları (Dirks *ve ark.*, 1996) veya *Vida faba* sürgün ucu pro toplas darı (Tegeder *ve ark.*, 1995) ancak ajinat içinde gömülerek kültürü yapıldığında sonuç başarılı olmaktadır. Benzer şekilde tütün mezofil protoplasları yeni bir teknik olarak ince aljinat tabakalarında kültüre alındıklarında sürgünlerin elde edilmesine kadar geçen süre 5-6 haftadan 2 haftaya düşürülebilmektedir (Dovzhenko *ve ark.*, 1998). Diğer yandan ayçiçeği hipokotil protoplasları çok düşük yoğunlukta kültüre alındığında (4-20 protoplast/ml) ve alternatif elektrik akımı (AC) uygulandığında, elektrik akımı uygulanmayanlara göre bölünmenin başlaması ve bölünme oranı %30 oranında artmıştır (VonKeller *ve ark.*, 1997).

4.7. Protoplast Füzyonu ve Somatik Melezleme

4.7.1. Önemi

Protoplast teknolojisi ile en küçük canlı üniteye ulaşılabilen, hücre füzyonu, seleksiyonu ve klonlaması ile genetik transformasyona imkan sağlanmaktadır. 1978 yılında Melchers *ve ark.*, polietilen-glikol (PEG) denilen etkin bir birleştiricinin kullanılması sonucu ilk somatik hibrit ve sibrit bitkiler elde etmişlerdir. Daha sonra Senda *ve ark.* (1979), elektrik uyarıları ile pro toplas darın füzyonunu başarmışlardır. Bunu pro toplas darın elektroporasyonu sonucu gen transferi yoluyla transgenik bitkilerin elde edilmesi izlemiştir.

Protoplast kültürü ve somatik melezleme bitki ıslahında daralan genetik varyabiliteyi genişletmede en ümitli metotlardan birisi olarak görülmektedir. Özellikle yabancı türlerde raslanan hastalık ve zararlılara dayanıklılık genlerinin füzyon yoluyla kültür bitkilerine aktarılması çok büyük avantajlar ortaya koyabilir. Buna ilave olarak son yıllarda bakteriler veya diğer yollarla aktarılan kimerik genleri taşıyan transgenik türlere karşı büyük bir reaksiyonun ortaya çıkması bu çalışmaların önemini daha da artırmaktadır.

Protoplast kültürü ve füzyonu potansiyel olarak klasik ıslah yöntemleriyle gerçekleştirilemeyen ve çeşitli uyumsuzluklar gösteren cins ve türler arası melezleme,

yeni çeşit ve hatta yeni türlerin elde edilmesinde de bir araç olabilir. Somatik melezleme özellikle pre-zigotik uyumsuzluk gösteren türlerin melezlenmesinde daha başarılı olabilmektedir (Bravo ve Evans, 1985). Somatik melezleme çevre şartlarına bağlı olmadan kısa sürede gerçekleştirilebilmekte ve laboratuvar ortamında hibrit bitkilerin seçilmesi daha kolay olmaktadır.

Pro toplaş t füzyonu ve bu yolla bitki rejenerasyonu aynı zamanda cins ve türler arası mitokondriyel DNA (sitoplazmik erkek kısırlığı), kloroplast ve sitoplazma gibi çekirdek dışı genetik elementlerin transferine de imkan sağlayabilir. Bu nedenle protoplast füzyonu bitki ıslahı ve geliştirilmesi için büyük öneme sahip bir metottur.

Protoplast füzyonu çalışmaları sonucu günümüze kadar bir çok pratik başarılar elde edilmiştir. Örneğin, yüksek yumru verimli patates (*Solanum tuberosum*) bir çok hastalığa karşı hassastır. Yabani bir patates türü olan *S. brevidens* ise yumru oluşturmamasına rağmen bir çok hastalığa karşı dayanıklıdır. Somatik melezleme yoluyla bu iki türün pro toplaş darının füzyonu sağlanarak hem hastalıklara dayanıklı, hem de yumru oluşturan melez patates bitkileri elde etmek mümkün olmuştur. Bu yolla kültür patatesine hastalıklara dayanıklılık genleri aktarılmıştır.

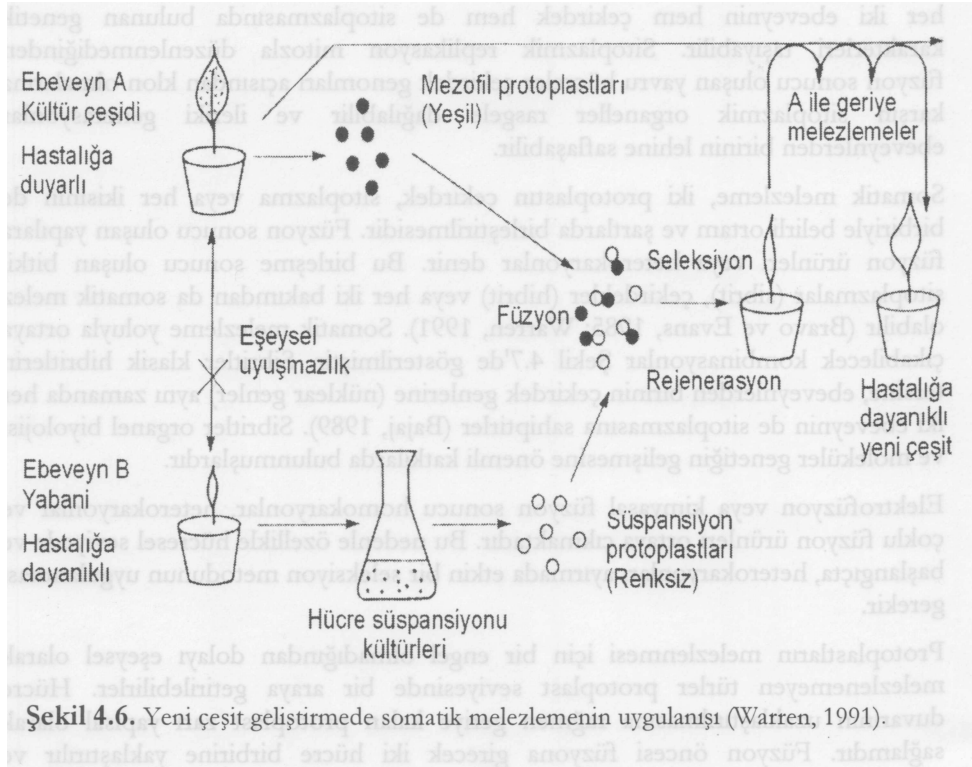
Ayçiçeğinde türler arası melezleme klasik ıslahta önemli bir problem olmasına rağmen Hen ve ark. (1998), *Helianthus annuus* (hipokotil) x *H. giganteus* (yaprak mezofil) arasında kimyasal füzyon yoluyla fertil somatik melezler elde etmeyi başarmışlardır. Yine, somatik melezleme yoluyla soğuğa toleranslı sitoplazmik erkısır brüksel lahanası sitoplazması lahanaya aktarılabilmektedir (Sigareva ve Earle, 1997). Kisaka ve ark. (1997) havuç süspansiyon pr o toplaş darı ile arpa yaprak mezofil pro toplaş darını elektrofüzyon metodu ile melezlemiş ve heterokaryonlardan rejenerasyon yoluyla 3 adet bitki elde edilmiştir. Bu bitkilerin sitolojik ve genomik analizi sonucu melezlerin havuca daha çok benzediği, kromozom sayılarının her iki ebeveynin toplam kromozom sayısından ($2n=32$) daha az olduğu ($2n=24$) ve hem kloroplast genomu hem de mitokondriyel genomlar açısından bu bitkilerin somatik melez olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde çeltik x arpa somatik melezi elde edilmiş ve bu melez hem çeltiğin küçük kromozomlarını hem de arpanın büyük kromozomlarına sahip olup, aynı zamanda çok yeni mitokondriyel ve sitoplazmik kombinasyonlar ortaya çıkmıştır (Kisaka ve ark., 1998). Yine pırasa ve soğan arasında intergenerik melezler elde edilmiştir. Melezlerde toplam olması gereken kromozom sayısından daha az sayıda kromozom olduğu tespit edilmiştir. Morfolojik olarak melezler iki ebeveyn arasında bir durum sergilemişlerdir (Buiteveld ve ark., 1998).

Somatik melezleme ile doğrudan yeni çeşit geliştirme de mümkün olabilmektedir. Bu amaçla Grosser ve ark. (1996), turuncgillerde 4 u eşeysel uyumsuzluk gösteren birbirine yakın 7 cinsten melezlemeler sonucu 18 yeni allotetraploid melez elde etmişler ve bu melezlerden bazılarının direkt çeşit olarak kullanılabileceğini savunmuşlardır.

Hızlı ve olumlu gelişmelere rağmen tahıllar, baklagiller ve ağaçlar ile iğne yapraklıların da içinde bulunduğu önemli bitki grupları protoplast izolasyonu, kültürü ve somatik melezlemeler bakımından geri kalmış olup bu bitki grupları üzerinde daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Özellikle uzak akraba türlerin melezlenmesinde pratikte bazı problemler ortaya çıkmaktadır.

4.7.2. Somatik hibrit ve sibrit

Şekil 4.6'da yeni bir çeşit geliştirmede bir somatik melezleme programının uygulanması gösterilmiştir. Somatik melezleme başlangıçta iki türün bütün karakterlerinin yeni bir bitkide toplanması amacıyla yapılmaya başlanmıştır. Fakat daha sonra konunun bu kadar basit olmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 4.6. Yeni çeşit geliştirmede somatik melezlemenin uygulaması (Warren, 1991).

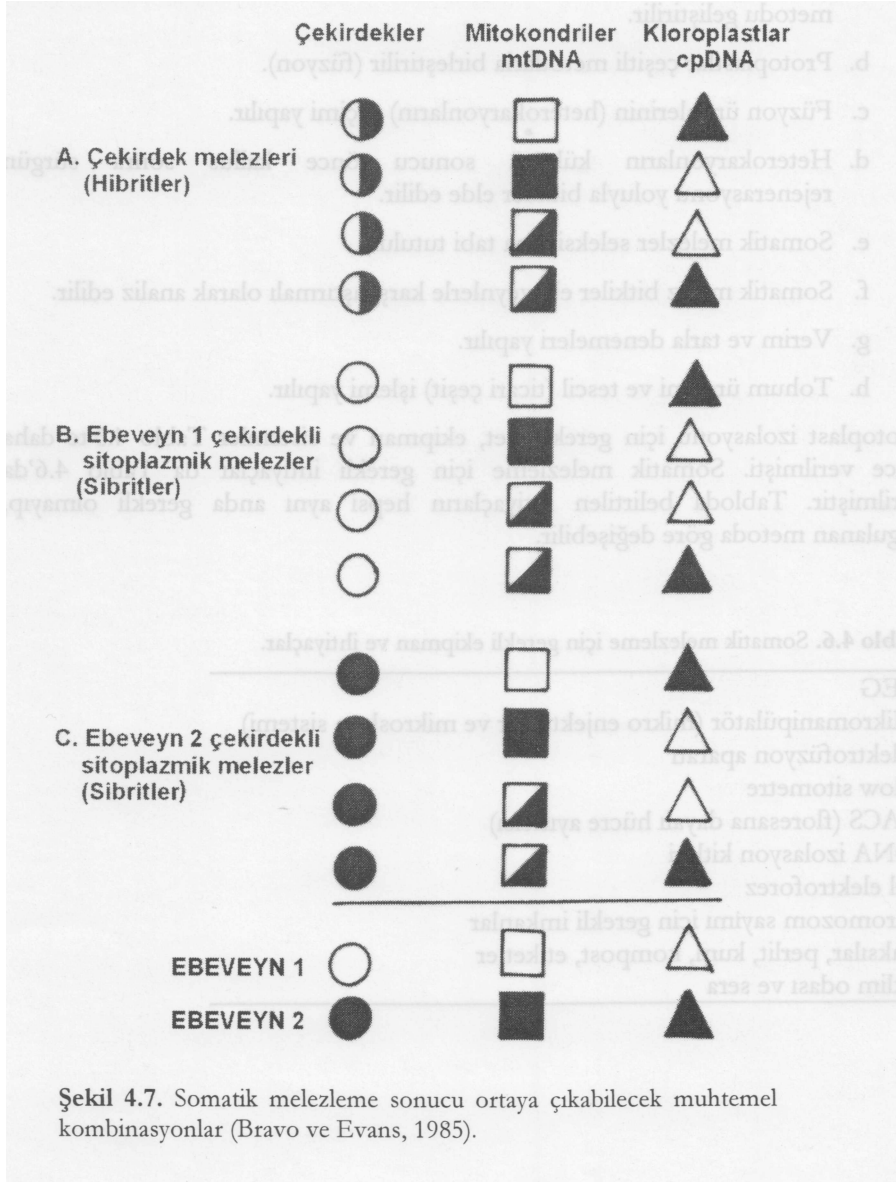
Eşeyssel melezleme ile ebeveynler arasında çekirdek genlerinin tam bir karışımı olmakta ve çoğu durumda oluşan melezde her ebeveynin çekirdek genlerinin bir kopyası bulunmaktadır. Bununla beraber eşeyssel melezleme sonucu plastid ve mitokondri gibi genom taşıyan organellerde bulunan genler eşit olarak dağılmaz ve genellikle babanın organelleri fonksiyonlarını kaybederler. Bitkilerde diğer organizmalardan farklı olarak 3 yerde genom bulunur. Bunlar çekirdek, plastid (kloroplast DNA=cpDNA) ve mitokondride (mitokondriyel DNA=mtDNA) bulunur. Kloroplast genomu tek bir dairesel DNA molekülünden oluşmakta, hacmi ve organizasyonu çok sıkı bir şekilde korunmaktadır. Fotosentezle ilgili genlerin bu genomdaki genlerce idare edildiği belirtilmektedir. Mitokondriyel DNA'nın ise çok değişik formlarının olduğu, sitoplazmik erkek kısırlığının (cms) buradaki genlerce idare edildiği konusunda bildirimler vardır. Protoplast füzyonu sonucu donör hücrelerdeki bütün genetik materyal bir araya gelerek, 2 plastomlu (cpDNA üniteleri) ve 2 kondriomlu (mtDNA üniteleri) melez hücreler veya heterokaryonlar oluşur (Bravo ve Evans, 1985). Bu nedenle somatik melezlemede yeni oluşan melez her iki ebeveynin hem çekirdek hem de sitoplazmasında bulunan genetik karakterleri taşıyabilir. Sitoplazmik replikasyon mitozla düzenlenmediğinden füzyon sonucu oluşan yavru hücreler çekirdek genomları açısından klon olmalarına karşın sitoplazmik organeller rasgele dağılabilir ve ileriki generasyonlar ebeveynlerden birinin lehine saflaşabilir.

Somatik melezleme, iki protoplaz tın çekirdek, sitoplazma veya her ikisinin de birbiriyle belirli ortam ve şardarda birleştirilmesidir. Füzyon sonucu oluşan yapılara füzyon ürünleri veya heterokaryonlar denir. Bu birleşme sonucu oluşan bitki, sitoplazmalar (sibrit), çekirdekler (hibrit) veya her iki bakımdan da somatik melez olabilir (Bravo ve Evans, 1985; Warren, 1991). Somatik melezleme yoluyla ortaya çıkabilecek kombinasyonlar Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Sibritler klasik hibritlerin tersine, ebeveynlerden birinin çekirdek genlerine (nüklear genler) aynı zamanda her iki ebeveynin de sitoplazmasına sahiptirler (Bajaj, 1989). Sibritler organel biyolojisi ve moleküler genetiğin gelişmesine önemli katkılarda bulunmuşlardır.

Elektrofüzyon veya kimyasal füzyon sonucu homokaryonlar, heterokaryonlar ve çoklu füzyon ürünleri ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle özellikle hücresel seviyede ve başlangıçta, heterokaryonları ayırmada etkin bir seleksiyon metodunun uygulanması gerekir.

Pro toplaz darın melezlenmesi için bir engel olmadığından dolayı eşeyssel olarak melezlenemeyen türler protoplast seviyesinde bir araya getirilebilirler. Hücre duvarının uzaklaştırılmasına rağmen geriye kalan protoplast zarı yapısal olarak sağlamdır. Füzyon öncesi füzyona girecek iki hücre birbirine yaklaştırılır ve kimyasal veya elektrik akımıyla uyardarak birleştirilir. Füzyondan sonra her iki türün çekirdeğini de bir sitoplazma içinde içeren heterokaryonlar yeni hücre duvarı oluşturarak bölünmeye başlarlar ve sonuçta somatik melez bir hücre oluşur (Şekil 4.8).

Teorikte normal bir bitki hücresi gibi, somatik hibrit hücre de totipotentir. Bu nedenle embriyogenesis veya organogenesis yoluyla olgun (melez) bir bitkiye dönüşebilir. Somatik melezleme yalnızca seksüel olarak uyuşmayan türlerin melezlenmesinde değil, vegetatif olarak üreyen bitkilerin genetik modifikasyonunda da kullanılabilir.



4.7.3. Protoplast füzyonu işleminin aşamaları

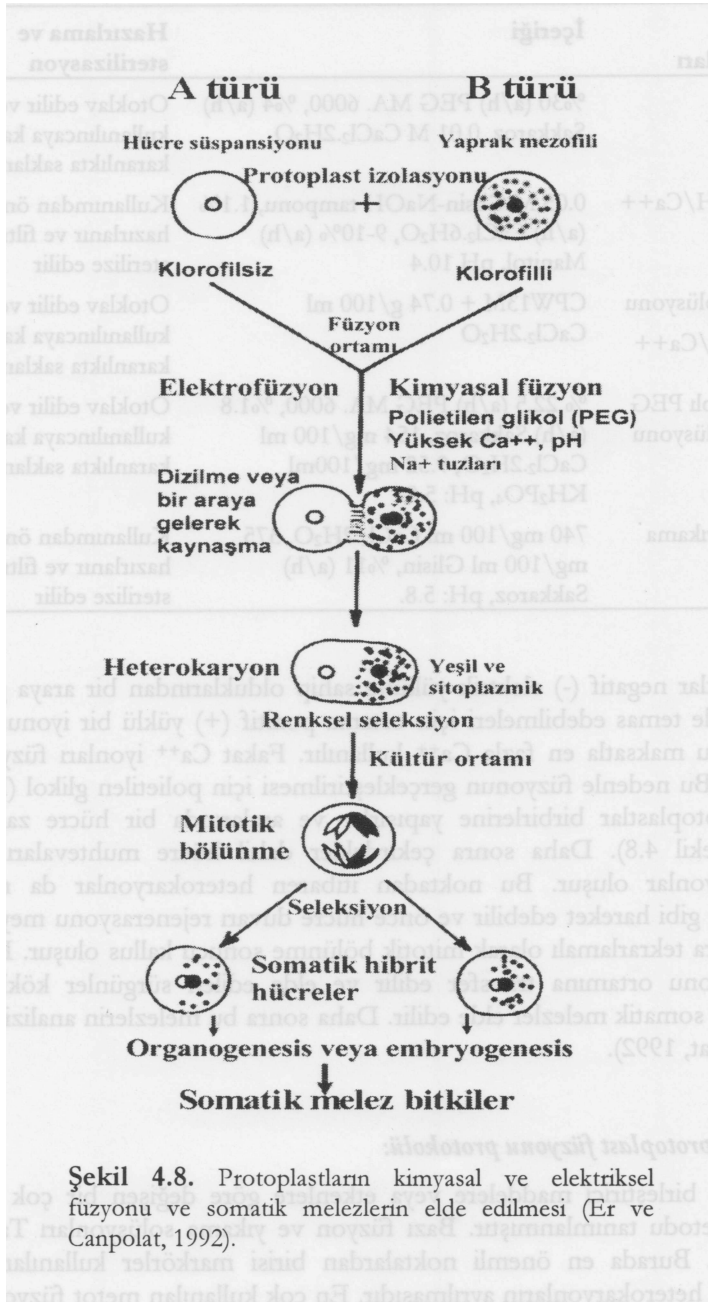
Genel olarak somatik bir melezlemede sırasıyla aşağıdaki işlemler (Şekil 4.8) uygulanır (Er ve Canpolat, 1992):

- a. Füzyonu olacak her iki cins veya türden tekrarlanabilir bir şekilde protoplasdar izole edilir ve optimum bir protoplaşt-bitki rejenerasyonu metodu geliştirilir.
- b. Protoplasdar çeşitli metotlarla birleştirilir (füzyon).
- c. Füzyon ürünlerinin (heterokaryonların) seçimi yapılır.
- d. Heterokaryonların kültürü sonucu önce kallus sonra sürgün rejenerasyonu yoluyla bitkiler elde edilir.
- e. Somatik melezler seleksiyona tabi tutulur.
- f. Somatik melez bitkiler ebeveynlerle karşılaştırmalı olarak analiz edilir.
- g. Verim ve tarla denemeleri yapılır.
- h. Tohum üretimi ve tescil (ticari çeşit) işlemi yapılır.

Protoplast izolasyonu için gerekli alet, ekipman ve sistemler Tablo 4.3'te daha önce verilmişti. Somatik melezleme için gerekli ihtiyaçlar da Tablo 4.6'da verilmiştir. Tabloda belirtilen ihtiyaçların hepsi aynı anda gerekli olmayıp, uygulanan metoda göre değişebilir.

Tablo 4.6. Somatik melezleme için gerekli ekipman ve ihtiyaçlar.

PEG
Mikromanipülatör (mikro enjektörler ve mikroskop sistemi)
Elektrofüzyon aparatı
Flow sitometre
FACS (floresana dayalı hücre ayırıcısı)
DNA izolasyon kideri
Jel elektro forez
Kromozom sayımı için gerekli imkanlar
Saksılar, perlit, kum, kompost, etikeder
İklim odası ve sera



Şekil 4.8. Protoplastların kimyasal ve elektriksel füzyonu ve somatik melezlerin elde edilmesi (Er ve Canpolat, 1992).

Tablo 4.7. Füzyon ve yıkama solüsyonlarının kompozisyonu (Power *ve ark.*, 1989).

Füzyon solüsyonları	İçeriği	Hazırlama ve sterilizasyon
PEG	%30 (a/h) PEG MA. 6000, %4 (a/h) Sakkaroz, 0.01 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Otoklav edilir ve kullanılıncaya kadar 4 °C'de karanlıkta saklanır.
Yüksek pH/ Ca^{++}	0.05 M Glisin-NaOH tamponu, 1.1% (a/h) $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 9-10% (a/h) Manitol, pH 10.4	Kullanımdan önce hazırlanır ve filtre ile sterilize edilir
Yıkama solüsyonu CPW13M/ Ca^{++}	CPW13M + 0.74 g/100 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Otoklav edilir ve kullanılıncaya kadar 4 °C'de karanlıkta saklanır.
Küçük çaplı PEG füzyon solüsyonu	% 22.5 (a/h) PEG MA. 6000, %1.8 (a/h) Sakkaroz, 154 mg/100 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9.52 mg/100ml KH_2PO_4 , pH: 5.8.	Otoklav edilir ve kullanılıncaya kadar 4 °C karanlıkta saklanır
Tipik bir yıkama solüsyonu	740 mg/100 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 375 mg/100 ml Glisin, %11 (a/h) Sakkaroz, pH: 5.8.	Kullanımdan önce hazırlanır ve filtre ile sterilize edilir

Pro toplar dar negatif (-) elektrik yüküne sahip olduklarından bir araya gelemezler. Birbirleriyle temas edebilmeleri için ortama pozitif (+) yüklü bir iyonun verilmesi gerekir. Bu maksatla en fazla Ca^{++} kullanılır. Fakat Ca^{++} iyonları füzyona sebep olmazlar. Bu nedenle füzyonun gerçekleştirilmesi için polietilen glikol (PEG) ilave edilir. Pro toplar dar birbirlerine yapışır ve aralarında bir hücre zarı köprüsü oluşur (Şekil 4.8). Daha sonra çekirdekler dahil hücre muhtevaları birleşerek heterokaryonlar oluşur. Bu noktadan itibaren heterokaryonlar da normal bir pro toplar t gibi hareket edebilir ve önce hücre duvarı rejenerasyonu meydana gelir. Daha sonra tekrarlamak olarak mitotik bölünme sonucu kallus oluşur. Kallus bitki rejenerasyonu ortamına transfer edilir ve elde edilen sürgünler köklendirilerek potansiyel somatik melezler elde edilir. Daha sonra bu melezlerin anakizi yapılır (Er ve Canpolat, 1992).

Genel bir protoplast füzyonu protokolü:

Kullanılan birleştirici maddelere veya etkenlere göre değişen bir çok protoplast füzyon metodu tanımlanmıştır. Bazı füzyon ve yıkama solüsyonları Tablo 4.7'de verilmiştir. Burada en önemli noktalardan birisi markörler kullanılarak füzyon sonrası bu heterokaryonların ayrılmasıdır. En çok kullanılan metod füzyondan önce farklı renkte (klorofil ve klorofilsiz) hücrelerin kullanılmasıdır (Şekil 4.8).

Aşağıda *Petunia parodii* yaprak mezofil protoplasları ile *Petunia hybrida* hücre süspansiyonu pr o toplaş darının (renksiz=albino) füzyonu için bir protokol verilmiştir (Power ve ark., 1989):

1. *P. parodii* ve renksiz (albino) *P. hybrida* protoplasları MSP19M ortamında 2×10^5 protoplas t/ml yoğunlukta ayarlanır.
2. Her füzyon uygulaması için 7 tane santrifüj tüpü 4 ve 8 mİ seviyelerinde işaretenir.
3. Protoplaslar aşağıdaki gibi tüplere dağıtılır.
 - Bir tüp 4 mİ *P. Parodii* - canlılık kontrolü için işaretenir.
 - Bir tüp 4 mİ *P. hybrida* - canlılık kontrolü için işaretenir
 - Bir tüp 8 mİ *P. Parodii* - *P. parodii* kendileme testi için işaretenir.
 - Bir tüp 8 mİ *P. Hybrida* - *P. hybrida* kendileme testi için işaretenir.
 - Üç tüp 4 mİ *P. parodii* + 4 mİ *P. hybrida* - füzyon için etiketlenir.
4. Canlılık kontrolü için kullanılacak tüpler hariç diğer tüpler santrifujlenir, protoplaslar dibe çökeltilir ve ortam sıvısı pipetle 0.5 mİ ortam kalana kadar uzaklaştırılır.
5. Füzyon solüsyonu ilave edilir (örnek: PEG veya yüksek pH/Ca⁺⁺)-
6. Sonra yine santrifüjle füzyon solüsyonu uzaklaştırılır.
7. Füzyon edilmiş protoplaslar 16 mİ MSP19M ortamı içinde karıştırılır.
8. Her biri 8 mİ MSP19M agar ortamı içeren 12 adet 9 cm'lik Petri kutusu hazırlanır.
9. Her iki canlılık kontrolü tüpü MSP19M ile 8 mİ' ye tamamlanır.
10. Daha sonra protoplaslar aşağıdaki şekilde dağıtılır:
 - a. *P. parodii* canlılık kontrolü - 8 ml/kutu (1 adet),
 - b. Albino *P. hybrida* canlılık kontrolü - 8 ml/kutu (1 adet),
 - c. 3 füzyon tüpünü her biri iki Petri kutusuna - 8 ml/kutu (6 adet),
 - d. *P. parodii* kendilenmiş - 8 mİ sadece bir petri kutusuna,
 - e. *P. hybrida* albino kendilenmiş, sadece 8 mİ olarak bir Petri kutusuna dağıtılır,
 - f. Kalan kendilenmiş iki adet 8 mİ karıştırılır ve 8 mİ olarak tekrar iki adet Petri kutusuna dağıtılır.
 - g. Son deneme deseni şu şekilde olur:

Uygulamalar	Son yoğunluk $5 \times 10^{4-5}$ protoplast/ml
	Petri kutusu sayısı
<i>P. parodii</i> canlılık kontrolü	1
Albino <i>P. hybrida</i> canlılık kontrolü	1
<i>P. parodii</i> kendilenmiş	1
Albino <i>P. hybrida</i> kendilenmiş	1
Füzyon sonrası kanşım kontrolü	2
Füzyon edilmiş	6

Bütün Petri kutuları Nesco film veya Parafil ile sarılır ve 25 °C'de sürekli aydınlanma (700 lüks) altında kültüre alınır.

Polietilen glikol (PEG) ile füzyon:

PEG (Tablo 4.7) yoluyla (kimyasal) füzyon elektriksel füzyondan daha fazla kullanılmaktadır. Genellikle % 10-50 PEG konsantrasyonu pro toplaş darın birleşmesini sağlar. PEG ile füzyon yapılırken füzyon ortamına %5-10 arasında gliserol ilave edilmesi farklı hücre kaynaklarının daha fazla melezlenmesini sağlayabilmektedir (Xu ve Jia, 1997). Bununla beraber PEG toksiktir, kültüre almabilirlik yüzdesini ve rejenerasyon oranını düşürmektedir. PEG metodu genelde çoklu hücre füzyonuna da sebep olabilir. Ama amaç sadece farklı iki hücrenin melezlenmesidir (Warren, 1991). PEG ile füzyonun uyarılmasına aşağıda bir örnek verilmiştir (Power ve ark., 1989):

PEG ile füzyon uygulaması:

1. Yukarıdaki işlemlerden 1-5 uygulanır.
2. Canlılık kontrolü hariç her tüpe 2 ml PEG (Tablo 4.7) ilave edilir ve 10 dakika bekletilir.
3. Beş dakika arayla her tüpe sırasıyla 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 ml MSP19M ilave edilerek PEG solüsyonunu sulandırılır ve her sulandırmada tüpün içindekiler karıştırılır.
4. Protoplastlar 10 dakika süreyle santrifüjlenir (100 x g) ve yüzeyde kalanlar uzaklaştırılır.
5. Aynı işlem MSP19M kullanılarak tekrarlanır.
6. Genel yöntemin 7-1 Elik kısımları uygulanır.

Yüksek pH/Ca⁺⁺ ile füzyon:

1. Genel yöntem l'den 5'e kadar takip edilir.
2. Her tüpe 4 ml yüksek pH/Ca⁺⁺ füzyon solüsyonu ilave edilir (canlılık testi kontrolleri hariç). Tüpler 30 °C'deki su banyosunda 10 dakika süreyle tutulur.
3. Tüpler santrifüjlenir (50 x g, 3-4 dakika) ve üstte kalan kısımlar uzaklaştırılır.
4. Protoplastlar tekrar karıştırılıp santrifüjlenerek iki defa CPW13M/Ca⁺⁺ solüsyonu ile yıkanır.
5. Genel yöntemin 7-11 kısımları uygulanır.

Elektrofüzyon:

Kimyasal füzyona alternatif olarak protoplastlar elektriksel yollarla da melezlenebilir. Kimyasal metoda karşılaştırıldığında elektrofüzyon toksik değildir, daha fazla frekansta füzyon gerçekleşir ve tekrar edilebilmesi daha kolaydır (Jones, 1991). Elektriksel füzyon hücre membranının geriye dönüşümlü -olarak parçalanmasına ve membranın geçirgenlik ve iletkenliğinin artmasına sebep olur.

İlk önce protoplasdar elektrolitsiz bir solüsyonda karıştırılır ve birbirine yakın dokunmalarını sağlayacak değişken (AC, alternatif akım) bir elektrik akımı verilir. Her iki yönden protoplasdar birbirine yapışarak kısa zincirler oluştururlar. Daha sonra solüsyona çok kısa aralıklarla (milisaniye) direkt elektrik akımı (DC) verilir. Bu işlem sonucu birbirine bitişik yerlerde plazma membranları parçalanır ve protoplasdar birbiri içine girerler (Şekil 4.8).

Elektriksel füzyonda önemli noktalar şunlardır:

1. Protoplast elektrolitsiz bir ortamda karıştırılarak tutulmalıdır. Bu ortam genellikle %9-11 (a/h) arasında manitol ve 0.5 mM CaCl₂.H₂O içerir, izolasyondan sonra protoplasdar en az üç defa elektrofüzyon solüsyonunda yıkanmalıdırlar.
2. Yıkamadan sonra füzyon için protoplasdar istenilen yoğunluğa getirilir (1 x 10⁵/ml-5 x 10⁴/ml) ve 5x5 lik bir Petri kutusunun (Sterilin Ltd., UK) ortadaki 9 bölmesine 1-3 ml olarak konulur.
3. Protoplasdar AC verilerek sıralanırlar. Bu dizilmeden sonra DC uygulanır. Bu akımdan sonra bir değişken akım (AC) verilebilir. Bu işlem pro toplas darın yakın membran bağımlı tekrar sağlar.
4. Füzyondan sonra protoplasdarın çökeltmeleri beklenir. Daha sonra yavaş yavaş füzyon solüsyonu çekilerek protoplast kültür ortamı ilave edilir. Bu işlem elektrofüzyon solüsyonun konsantrasyonunun minimuma inmesine kadar tekrar edilir.

4.8. Heterokaryonların Kültürü ve Seleksiyon

Somatik melez hücrelerin kültürü de normal protoplastların kültürüne benzer. Başarılı bir kültür için uygun ortamlar geliştirilmelidir. Heterokaryonların başarılı bir kültürü için genellikle KM (Kao ve Mickhayluk, 1975; Kao, 1977) gibi zengin içerikli ortamlar kullanılır. İlk olarak KM8p gibi yoğun bir ortamla başlanır, daha sonra KP8, KM8 ve K8 (EKİ) gibi daha düşük ozmotik basınca sahip ortamlarla sulandırılır.

Değişik bitkilerden elde edilen pro toplaş tlar farklı füzyon solüsyonlarına farklı tepki verirler. Füzyon oranı ve protoplast canlılığı arasında iyi bir denge kurulmalıdır. Genel olarak monokotiledon bitkilerin pro toplaş tları dikotiledonlara göre daha kolay füzyona uğramaktadırlar.

Somatik melezlemeden sonra en önemli konu somatik melez pro toplaş tların seçilmesi ve bunlardan bitki elde edilmesidir. Çünkü füzyon ortamında iki türün protoplasları (Pl, P2) bir arada bulunmakta ve füzyon işlemi sonucu değişik melezlerin ortaya çıkması yanında melezlemeye girmeyen pro toplaş dar da bulunmaktadır (PlxP2, PlxPl, P2xP2, Pl ve P2). Burada arzu edilen sadece PlxP2 kombinasyonudur (heterokaryon). Homokaryonlar (PlxPl veya P2xP2) ve diğer ebeveyn protoplasları aşağıdaki metotlarla ayrılmalıdır (Er ve Canpolat, 1992).

- a) Mikro seleksiyon: Füzyon sonrası heterokaryonların füzyona uğramayan pro toplaş dardan kolayca ayırt edilebilmesi için gözle ayırt edilebilen markörler kullanılması şartıyla (mezofil hücreleri x hücre süspansiyonu hücreleri melez), steril şartlar altında alttan objektifli (objektifli ters çevrilmiş) bir mikroskop ve mikro enjektör kullanılarak heterokaryonlar tek tek ayrılabilir. Bu yöntemde, klorofil içermeyen beyaz veya sarı renkte bir protoplast (süspansiyon hücrelerinden elde edilir), kloroplast içeren ve yeşil renkte pro toplaş darla (yaprak mezofil protoplasları) füzyona uğradığında melez pro toplaş tin kloroplast içermesi ve tipik sitoplazmik kenara sahip olması ile ayırt edilebilmektedir.
- b) Pro toplaş darın boyanması: Bu yöntemde iki türün protoplasları farklı boya ile boyanmaktadır. Protoplast füzyonundan sonra elde edilen protoplast popülasyonu hücre ayırt edici olarak adlandırılan bir düzenekten geçirilir (FACS=Fluorescent Activated Celi Sorter; Işık Yansımasına Dayalı Hücre Ayırıcısı; EPICS cihazı). Bu düzenekte protoplaslar lazer ışınından geçer. Bu geçiş sırasında hücreler ışık enerjisini absorbe ederler. Bu enerjinin bir kısmı farklı renklerdeki floresans ışığı olarak etrafa saçılır. Etrafa saçılan bu ışığın rengine göre melez protoplaslar ayırt edilir.

EPICS cihazının kullanımına geçmeden önce aşağıdaki işlemlerin dikkate alınması gerekir:

1. İzolasyon: Yeterli sayıda ebeveyn ve heterokaryonlara ait protoplast elde edilmelidir. Her faktörden (ebeveynler, heterokaryonlar ve canlılık testi için) en az toplam 2×10^6 protoplast/ml olması gerekir.
 2. Canlılığın devamı: Ayrımında kullanılacak kimyasal madde ve ortamlardan dolayı protoplas fiziksel zarara uğrayabilir. Genel olarak kullanılan kaplama solüsyonu CPW13M'dir. Bu nedenle protoplastların en az 1 saat solüsyon içinde kalabilmeleri gerekir. Kullanılan boyaların (FDA=Fluoresceindiacetate) da canlılık üzerine etkileri önceden belirlenmelidir.
 3. Füzyon: Protoplastların birleşerek gruplar oluşturmasını sağlayan ve tekrarlamak füzyonu önleyici metotlar geliştirilmektedir. Çünkü bu durum ayırım etkinliğini azaltır.
 4. Ayırma: Ayırım etkinliği ayırıcının ebeveynlerle heterokaryonları tanıma yeteneğine göre değişir.
 5. Protoplastların büyüklüğü: Protoplast hacmi canlılığın devamında önemli bir faktördür. Ayırımı yapılabilen maksimum hücre büyüklüğü yaklaşık 80 μm^2 'dir.
 6. Canlılık: Ayırım sonucu heterokaryon canlılığı belirlenmektedir. Ayrıca kontrol protoplastlarının da canlılığı karşılaştırmak olarak kontrol edilmektedir.
- c) Fiziksel olarak ayırma: Melez protoplastlarla füzyona girmemiş protoplastlar arasındaki elektrik yükü farklılığı veya ağırlık farkına göre melez protoplastlar seçilebilir.
- d) Genetiksel olarak seleksiyon: Örnek olarak herhangi bir kimyasala karşı dayanıklı olan bir türden elde edilen protoplastlar başka bir kimyasala dayanıklı olan türün protoplastları ile birleştirilir ve elde edilen popülasyonu her iki kimyasal da içeren bir besin ortamında kültüre alındığında sadece melez protoplastlar yaşamlarını devam ettirebileceklerinden bunlar kolaylıkla ayırt edilebilir.
- e) Albino hücreler ve iodoasetamid (IOA) veya X ışınları ile inaktive edilen protoplastların füzyonda kullanılması da seleksiyonda önemli kolaylıklar sağlamaktadır.

4.9. Somatik Hibrit Bitkilerin Analizi

Muhtemel somatik melezlerin anakizi RAPD profilleri, kromozom sayımı, Southern anakizi, Flow Sitometri, RFLP, *in situ* genomik melezleme gibi

biyokimyasal ve sitolojik metotlar kullanılarak yapılabilmektedir. Ebeveynlerle, F₁ hibrit ve somatik hibrit bitkiler karşılaştırılır. Şu analizler yapılabilir:

1. Fraksiyon I protein analizi
2. Kromozom sayısı ve karyotipi
3. İzozimler
4. Mitokondriyel DNA miktarının tespiti
5. Kloroplast DNA miktarının tespiti
6. Nükleer DNA miktarının tespiti
7. Genel morfoloji (somaklonal varyasyon)

Değişik türlerin protoplasdan melezlendiğinde, nükleusların durumu ne olursa olsun organel transferi kaçınılmazdır. Sitoplazma veya organel transferi bazı durumlarda bitki rejenerasyonu sonrası ortaya çıkar. Mitokondriyel DNA tarafından kontrol edilen sitoplazmik erkek kısırlığı buna bir örnektir ve bir çok melezlemede ortaya çıkmıştır (Power ve ark., 1989). Çoğu durumlarda çekirdekleri radyasyonla inaküve edilmiş pro toplaş dar en uygun organel vericileri oluşturur. Ayrıca izole edilen organ eller de aktarılabilirler.

4.10. Sonuç

Her bitki türü için tekrarlanabilir bir şekilde protoplasttan bitki elde etme metodu geliş tirilebilmiş değildir. Heterokaryonların etkin bir şekilde ayırımı yapılamamaktadır. Ayrıca somatik melez bitkiler genellikle steril olmakta, döl vermemekte veya fertil olması durumunda çok geniş bir somaklonal varyasyon göstermektedir.

Bu bölümde belirli bitki türlerinde özel olarak protoplast kültürü ve somatik melezleme ile ilgili çalışmaları vermek yerine protoplast teknolojisinin genel prensipleri ve metodarı üzerinde durulmuştur. Bitki ıslahında protoplast füzyonunun gerçek potansiyeline henüz ulaşılmış değildir. Araştırmalar ilerledikçe bu konuda başarılar ve yeni ufuklar açılacaktır. Türkiye'de protoplast sistemleri konusunda çalışma yapacak araştırmacılar çalışacakları bitki türü üzerinde iyi bir literatür taraması yapmadan işe başlamak ve daha çok üzerinde çalışılmamış türlere ve ekotiplere yönelmekdirler.

Kaynaklar

Babaoğlu M (2000) Protoplast isolation in lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet.): Determination of optimum explant sources and isolation conditions. Turkish J. of Bot, 24: 177-185.

Bajaj YPS (1989a) Plant Protoplasts and Genetic Engineering I. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cilt 8, Springer-Verlag, Berkn Heidelberg.

Bajaj YPS (1989b) Plant Protoplasts and Genetic Engineering II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cilt 9, Springer-Verlag, Berkn Heidelberg.

- Bajaj YPS (1993a) Plant Protoplasts and Genetic Engineering III. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cilt 22, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Bajaj YPS (1993b) Plant Protoplasts and Genetic Engineering IV. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cilt 23, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Bajaj YPS (1994a) Somatic Hybridisation in Crop Improvement I. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cilt 27, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Bajaj YPS (1994b) Plant Protoplasts and Genetic Engineering V. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cilt 29, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Bajaj YPS (1995) Plant Protoplasts and Genetic Engineering VI. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cilt 34, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Bajaj YPS (1996) Plant Protoplasts and Genetic Engineering VII. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cilt 38, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Bajaj YPS (1989) Genetic engineering and *in vitro* manipulation of plant cells- technical advances. In: YPS Bajaj (ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 9, Plant Protoplasts and Genetic Engineering II, pp. 1-22, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bravo JE, Evans DA (1985) Protoplast fusion for crop improvement. Plant Breeding Reviews. Vol. 3, p. 193-218.
- Buiteveld J, Suo Y, Campagne MMV, Creemers Molenaar J (1998) Production and characterisation of somatic hybrid plants between leek (*Allium ampeloprasum* L.) and onion (*Allium cepa* L.). Theor. Appl. Genet., 96(6-7): 765-775.
- Carlson PS, Smith HH, Dearing RD (1972) Parasexual interspecific plant hybridisation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2292-2294.
- Dirks R, Sidorov V, Tulmans C (1996) A new protoplast culture system in *Daucus carota* L. and its applications for mutant selection and transformation. Theor. Appl. Gen, 93(5-6): 809-815.
- Dons JJM, Colijn-Hooymans CM (1989) Agarose plating of protoplasts and its implications. In: YPS Bajaj (ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 8, Plant Protoplasts and Genetic Engineering I, pp. 50-62, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Dovzhenko A, Bergen U, Koop HU (1998) Thin-alginate-layer technique for protoplast culture of tobacco leaf protoplasts: shoot formation in less than two weeks. Protoplasma, 204(1-2): 114-118.
- Er C, Canpolat N (1992) Bitki Islahında Doku Kültürleri, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayınları, Ankara,, s. 9
- Evans DA, Bravo JE (1983) Protoplast isolation and culture In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (eds), Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 1, Techniques for Propagation and Breeding, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company.
- Fehér A, Dudits D (1994) Plant protoplasts for cell fusion and direct DNA uptake: culture and regeneration systems. In: Vasil K, Thorpe TA (eds), Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, pp. 71-118, Dordrecht, Netherlands.

- Gahan PB (1989) Viability of plant protoplasts. In: YPS Bajaj (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 8, Plant Protoplasts and Genetic Engineering I*, pp. 34-49, Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrition requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50: 151-159.
- Gledhill SC (1995) Protoplast isolation and culture. In: Gamborg OL, Phillips GC (eds), *Plant Cell Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods*, pp. 167-180, Springer-Verlag.
- Grosser JW, Maurao-Fo FAA, Gmitter FG, Louzada ES, Jiang J, Baergen K, Quiros A, Cabasson C, Schell JL, Chandler JL (1996) Allotetraploid hybrids between citrus and seven related genera produced by somatic hybridisation. *Theor. Appl. Gen.*, 92(5): 577-582.
- Hail RD, Riksen-Bruinsma T, Weyens GJ, Rosquin IJ, Denys PN., Evans IJ, Lathouwers JE, Lefebvre MP, Krens FA (1996) A high efficiency technique for the regeneration of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. *Nature Biotech.*, 14(9): 1133-1138.
- Hen HJ, Wingender R, Schnabl H (1998) Regeneration of fertile interspecific hybrids from protoplast fusion between *Helianthus annuus* L. and wild *Helianthus species*. *Plant Cell Rep.*, 18(3-4): 220-224.
- Ishi S (1989) Enzymes for the isolation of protoplasts. In: YPS Bajaj (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 8, Plant Protoplasts and Genetic Engineering I*, pp. 23-33, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Jones MGK (1991) Electrical fusion of protoplasts. *Plant Tissue Culture Manual*, D3: 1-11. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Gilbert EJ, Shohet S, Caligari PDS (1995) Studies on the effect of protoplast density and genotype mixing on cell regeneration. *Ann. Appl. Biol.*, 126: 379-393.
- Kao KN, Michayluk MR (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*, 126: 105-110.
- Kisaka H, Kisaka M, Kanno A, Kameya T (1997) Production and analysis of plants that are somatic hybrids of barley (*Hordeum vulgare* L.) and carrot (*Daucus carota* L.). *Theor. Appl. Gen.*, 94(2): 221-226.
- Kisaka H, Kisaka M, Kanno A, Kameya T (1998) Intergeneric somatic hybridisation of rice (*Oryza sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) by protoplast fusion. *Plant Cell Rep.*, 17(5): 362-367.
- Mohr H, Schopfer P (1995) *Plant Physiology*. Lawlor G, Lawlor DW (Çeviren), s. 21-30, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Ochatt SJ, Power JB (1992) Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: MW Fowler, GS Warren, M Moo-Young (eds), *Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology, Second Supplement*, pp. 99-127, Pergamon Press.

- Power JB, Davey MR, McLellan M, Wilson D (1989) Laboratory Manual Plant Tissue Culture (Revised), Plant Genetic Manipulation Group, Department of Life Science, University of Nottingham, UK.
- Roest S, Gilissen LJW (1989) Plant regeneration from protoplasts - a literature review. *Açta Bot Neerl.*, 38(1): 1-23.
- Roest S, Gilissen LJW (1993) Plant regeneration from protoplasts - a supplementary literature review. *Açta Bot. Neerl.*, 42(1): 1-23.
- Sigareva MA, Earle ED (1997) Direct transfer of a cold-tolerant *Ogura* male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* ssp. capitata) via protoplast fusion. *Theor. Appl. Gen.*, 94(2): 213-220.
- Takabe I, Labib G, Melchers G (1971) Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturewissenschaften*, 58: 318-320.
- Tegeder M, Schieder O, Pickardt T (1995) Breakthrough in the plant regeneration from protoplasts (*Vicia faba* and *V. narbonensis*). In: Terzi M (ed), *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, pp. 85-80, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- VonKelle A, Coster HGL, Schnabl H, Mahaworasilpa TL (1997) Influence of electrical treatment and cell fusion on the cell proliferation capacity of sunflower protoplasts in very low density culture. *Plant Sci.*, 126(1): 79-86.
- Wardrop J, Lowe K, Power JB, Davey MR (1996) Perfluorochemicals and plant biotechnology. An improved protocol for protoplast culture and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Biotechnol.*, 50(1): 47-54.
- Warren G (1991) Protoplast isolation and fusion. In: Stafford A, Warren G (eds), *Plant Tissue Culture*, pp. 62-81, Open University Press, Milton Keynes, UK.
- Xu ZQ, Jia JF (1997) Regeneration of intergeneric somatic hybrids by protoplast fusion between *Onobrychis viciifolia* and *Medicago sativa*. *Science in China Series C-Life Sciences*, 40(4): 363-370.

EK 1. KM'ye dayalı ortamlar [KM ve K, sırasıyla Kao ve Michayluk (1975); Kao (1977)'den modifiye edilmiştir].

Komponent		Konsantrasyon (mg/1)	
		KM	K
Makro besinler	NH ₄ NO ₃	600.0	600.0
	KNO ₃	1900.0	1900.0
	CaCl ₂ .2H ₂ O	600.0	600.0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	300.0	300.0
	KH ₂ PO ₄	170.0	170.0
	KCl	300.0	300.0
	Sequestrene 330 Fe	28.0	28.0
B5 mikro besinleri	KI	0.75	0.75
	H ₃ BO ₃	3.0	3.0
	MnSO ₄ .4H ₂ O	10.0	10.0
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.0	2.0
	NaMoO ₄	0.25	0.25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025
İlave vitaminler	Myo-inositol	100.0	100.0
	Nikotinamid	1.0	1.0
	Pridoksin-HCL	1.0	1.0
	Thiamine-HCL	1.0	1.0
	Ca pantotenat	1.0	0.5
	Folik asit	0.4	0.2
	p-ABA	0.02	0.01
	Biotin	0.01	0.005
	Kolin klorit	1.0	0.5
	Riboflavin	0.2	0.1
	Askorbik asit	2.0	1.0
	Vitamin A	0.01	0.005
	Vitamin D ₃	0.01	0.005
	Vitamin B ₁₂	0.02	0.01
	Vitamin E	-	-
Organik asitler	Na piruvat	20.0	5.0
	Sitrik asit	40.0	10.0
	Malik asit	40.0	10.0
	Fumarik asit	40.0	10.0
Şekerler	Fmktoz	250.0	125.0
	Riboz	250.0	125.0
	Ksiloz	250.0	125.0
	Manoz	250.0	125.0
	Ramnoz	250.0	125.0
	Selobiyoz	250.0	125.0
	Sorbitol	250.0	125.0
	Manitol	250.0	125.0
Serbest amino asitler L-glutamin		-	-
	L-serin	-	-
	L-asparagin	-	-
T ammlanamayan komponentler	Kazamino asit	250.0	125.0
	Hindistan cevizi sütü	20.0 ml	10.0 ml

Not: KM8P= KM + (mg/1) 0.2 2,4-D, 1.0 NAA, 0.5 zeatin, 250 sakkaroz ve 100000 glikoz, K8P= K + (mg/1) 0.2 2,4-D, 1.0 NAA, 0.5 zeatin, 250 sakkaroz ve 100000 glikoz, KM8= KM + (mg/1) 0.1 2,4-D, 1.0 NAA, 0.2 zeatin, 20000 sakkaroz ve 10000 glikoz, K8= K + (mg/1) 0.1 2,4-D, 1.0 NAA, 0.2 zeatin, 20000 sakkaroz ve 10000 glikoz.

Bölüm 5

Haploid Bitki Üretimi

Şebnem Ellialtıoğlu¹, Nebahat Sarı², Kazım Abak²

¹ *Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 06110 Dışkapı, Ankara*

² *Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana*

e-posta: ellialti@agri.ankara.edu.tr¹

5.1.Giriş

Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitkiler adı verilmektedir. Haploidler, her bir lokustaki ailelerden sadece bir seriyi içermekte ve bu özellikleri ile ıslah çalışmalarında önemli yer tutmaktadırlar. Haploid bitkilerin homolog kromozomlardan sadece bir takımını içermesi, resesif mutasyonların açığa çıkartılmasına olanak tanımaktadır. Bunun yanısıra haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanması sayesinde %100 homozigot saf hadar elde edilebilmektedir. Böylece uzun yıllara gereksinim duyan saflaştırma işlemi, birkaç ay gibi kısa bir sürede yapılabilmekte; kombinasyon ıslahı ve F₁ hibrit çeşit ıslahı programlarında zaman yönünden önemli düzeyde kazanç sağlanabilmektedir.

Haploid bitkilerin; genetik, moleküler biyoloji, fizyoloji gibi temel bilimler veya bitki yetiştirme ve ıslahı gibi uygulamalı bilimlerle ilgili konularda sağlamış oldukları avantajları, aşağıdaki gibi gruplandırarak sıralamak mümkündür:

- a. Haploidleri kullanmanın en başta gelen avantajı, tam bir homozigotiyi çok kısa bir sürede elde etme olanağını sunmasıdır. Dihaploid hatların kullanılmasıyla genetik ve ıslah çalışmalarını yapmak kolaylaşmakta ve sonuca daha çabuk ulaşılabilmektedir. Yabancı döllen türlerde

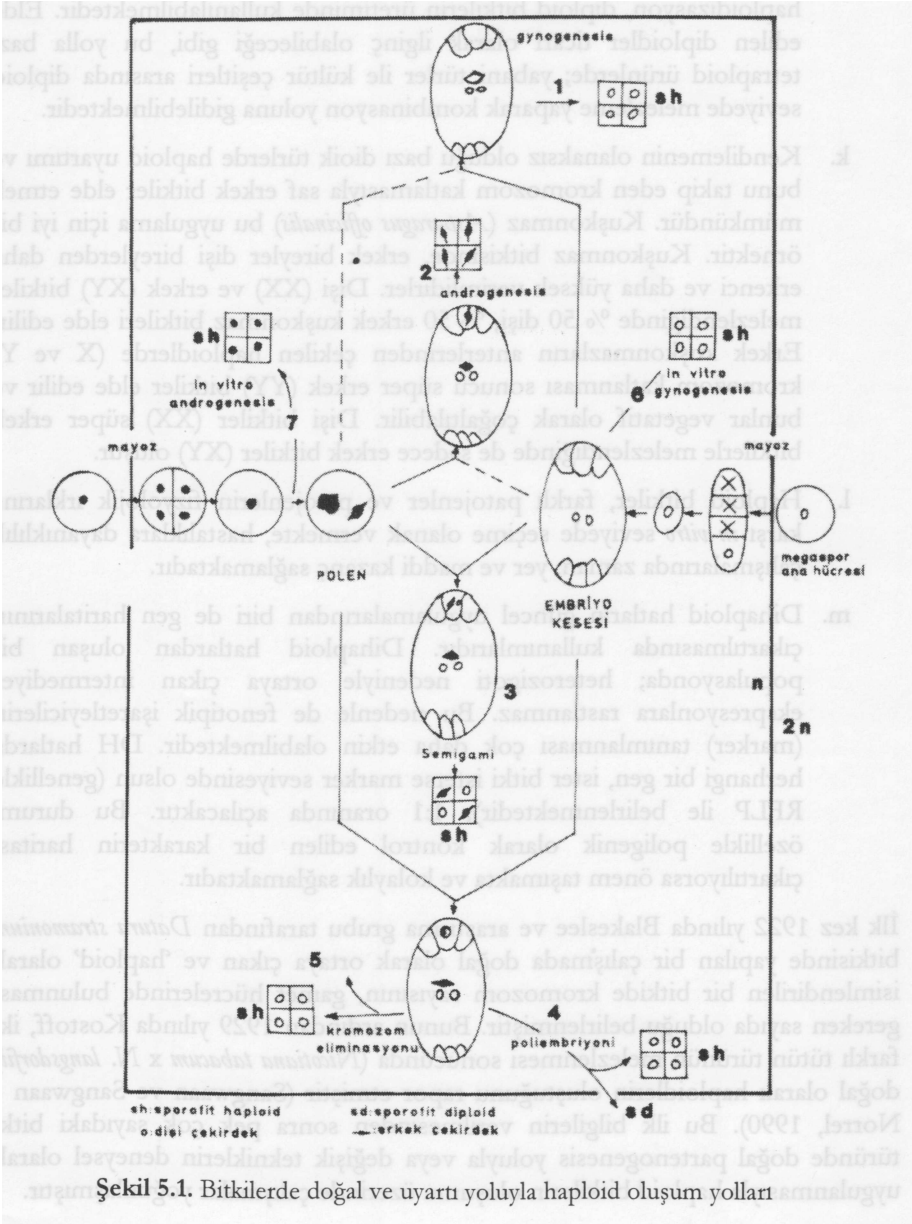
heterozigoti oranı çok yüksek olduğundan bunlarda homozigot hadarın elde edilmesi için 10-12 generasyon boyunca kendilemeler yapmak gerekmekte; kendine döllen türlerde bile aynı amaçla 5-7 generasyon kendileme işlemine gereksinim duyulmaktadır. Dihaploidizasyon yöntemi devreye girdiğinde homozigot hadara bir generasyonda ulaşmak olasıdır.

- b. Dioik türlerde veya kendileme depresyonu nedeniyle klasik yöntemlerle homozigodnye ulaşmanın zor olduğu lahana ve çilek gibi türlerde, dihaploidizasyon yöntemi kullanılarak bu sorun bir generasyonda çözülebilir.
- c. Çok yıllık meyve ağaçları ve orman bitkileri gibi tohumdan çiçeklenmeye kadar oldukça uzun bir gençlik kısırlığı olan türlerde de haploidizasyon önem kazanmaktadır. Bu türlerde kendilemeler mümkün olsa bile, homozigodnin elde edilmesi oldukça uzun bir sürede gerçekleşmektedir.
- d. F₁ hibrit çeşitlerin geliştirilmesinde homozigot hatlar arasında üstün kombinasyon yeteneği verenlerinin belirlenmesi yöntemi kullanıldığından, haploidinin hibrit çeşit ıslahında özel bir önemi bulunmaktadır. Dihaploid bitkilerden elde edilen safhatlar F₁ hibrit çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilirler.
- e. Kombinasyon ıslahında da sonuca çok kısa sürede ulaşmayı sağlayan haploidi sayesinde, F₁ kademesindeki melez bitkilerden haploid çekerek; farklı genotiplerde bulunan ve tek bir genotipte toplanması arzu edilen özelliklere sahip bitkiler kazanmak mümkündür.
- f. Haploidizasyon, resesif mutasyonların açığa çıkartılmasında başvurulan en etkin yöntemdir. Haploid bitkilerde resesif genler, dominant genler tarafından örtülemeyeceğinden, mutlak homozigotiye sahip olan dihaploid (DH) hatlarda genetik açılımı izlemek basit bir işlem haline gelmektedir.
- g. Haploid bitkiler, somatik hibridizasyon işleminin diploid protoplastlara göre daha kolay yapılabilmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca iki haploid protoplastın birleşmesinin sonucu 'diploid' olacağından; protoplast kültürü kullanılarak yapılan somatik hibridizasyon tekniğinin bilinen dezavantajlarının büyük bir kısmı böylece ortadan kalkacaktır.
- h. Haploidler ve bunların katlanması ile geliştirilen dihaploidler sitolojik, fizyolojik ve genetik açıdan önemli deneysel materyallerdir.
- i. Islah etkinliğinin artırılması, haploidizasyonun sağladığı en önemli avantajlar arasındadır (Gallais, 1978; Demarly ve Sibi, 1989). Bu etkinlik artışı iki şekilde açıklanmaktadır:

- Dihaploid bitkilerin döllerinde bir açılım olmadığı için genotipler arasında çok iyi bir eliminasyonun yapılması,
 - Dominansi etkisinin kalkması ve eklemeli gen etkisinin ikiye katlanması.
- j. Yonca ve patates gibi tetraploidlerin bulunduğu türlerde haploidizasyon, diploid bitkilerin üretiminde kullanılabilir. Elde edilen diploidler ticari olarak ilginç olabileceği gibi, bu yolla bazı tetraploid ürünlerde; yabancı türler ile kültür çeşideri arasında diploid seviyede melezleme yaparak kombinasyon yoluna gidilebilir.
- k. Kendilemenin olanaksız olduğu bazı dioik türlerde haploid uyartımı ve bunu takip eden kromozom kadamasıyla saf erkek bitkiler elde etmek mümkündür. Kuşkonmaz (*Asparagus officinalis*) bu uygulama için iyi bir örnektir. Kuşkonmaz bitkisinde, erkek bireyler dişi bireylerden daha erkenci ve daha yüksek verimlidirler. Dişi (XX) ve erkek (XY) bitkiler melezlendiğinde % 50 dişi, % 50 erkek kuşkonmaz bitkileri elde edilir. Erkek kuşkonmazların anterlerinden çekilen haploidlerde (X ve Y) kromozom katlanması sonucu süper erkek (YY) bitkiler elde edilir ve bunlar vegetatif olarak çoğaltılabilir. Dişi bitkiler (XX) süper erkek bitkilerle melezlendiğinde de sadece erkek bitkiler (XY) oluşur.
- l. Haploid bitkiler, farklı patojenler ve patojenlerin fizyolojik ırklarına karşı *in vitro* seviyede seçime olanak vermekte, hastalıklara dayanıklılık çalışmalarında zaman, yer ve maddi kazanç sağlamaktadır.
- m. Dihaploid hatların güncel uygulamalarından biri de gen haritalarının çıkartılmasında kullanımlardır. Dihaploid hadardan oluşan bir popülasyonda; heterozigoti nedeniyle ortaya çıkan intermediyer ekspresyonlara rastlanmaz. Bu nedenle de fenotipik işaretleyicilerin (marker) tanımlanması çok daha etkin olabilmektedir. DH hadarda herhangi bir gen, ister bitki isterse marker seviyesinde olsun (genellikle RFLP ile belirlenmektedir); 1:1 oranında açılacaktır. Bu durum, özellikle poligenik olarak kontrol edilen bir karakterin haritası çıkartılıyor s a önem taşımakta ve kolaylık sağlamaktadır.

ilk kez 1922 yılında Blakeslee ve araştırma grubu tarafından *Datura stramonium* bitkisinde yapılan bir çalışmada doğal olarak ortaya çıkan ve 'haploid' olarak isimlendirilen bir bitkide kromozom sayısının, gamet hücrelerinde bulunması gereken sayıda olduğu belirlenmiştir. Bunun ardından 1929 yılında Kostoff, iki farklı tütün türünün melezlenmesi sonucunda (*Nicotiana tabacum* x *N. langsdorfii*) doğal olarak haploidlerin oluştuğunu rapor etmiştir (Sangwaan ve Sangwaan - Norrel, 1990). Bu ilk bilgilerin verilmesinden sonra pek çok sayıda bitki türünde doğal partenogenesis yoluyla veya değişik tekniklerin deneysel olarak uygulanmasıyla haploid bitkilerin oluşumu üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Haploid bitkiler, bazı bitki türlerinde çeşitli doğal yollarla kendiliğinden oluşabilmektedir. Doğada haploidlerin oluşum yolları beş ana grupta özetlenebilir (Şekil 5.1). Bunlardan ilki 'ginogenesis' olarak adlandırılmaktadır. Bu durumda yumurta hücresi döllenme olmaksızın zigot gibi bölünmeye başlayarak haploid yapıda bir embriyo oluşturur. Dişi eşey hücresi ile erkek eşey hücresi birleşmediği halde; embriyo kesesi sekonder çekirdekleri ile polen



Şekil 5.1. Bitkilerde doğal ve uyartı yoluyla haploid oluşum yolları

generatif çekirdeği birleşerek embriyonun gelişip çimlenebilmesi için gereksinim duyacağı endospermi oluştururlar (Sauton, 1987).

Haploidlerin oluştuğu bir diğer yolda ise yumurta hücresinin döllenmesinden önce, dişi eşey hücresinin çekirdeği kaybolur veya inaktif hale geçer. Bu yolla oluşan haploidler, hücrelerinde yalnızca erkek gametin kromozom takımını içerdiklerinden bu olaya 'androgenesis' adı verilmektedir (Goodsell, 1961).

Erkek ve dişi eşey hücrelerinin birleşerek embriyo oluşumuna katılmasının söz konusu olduğu, fakat çekirdeksel erimenin gerçekleşmediği 'semigami' durumunda ise ana ve babaya ait sektörlerin bulunduğu kimeralı haploid bitkiler oluşmaktadır (Turcotte ve Feaster, 1969).

Dördüncü yol olan 'poliembriyoni' durumunda, normal döllenme sonucu zigot bölünmeye başlar. Ancak döllenmiş yumurta hücresinin yanındaki sinerjit hücrelerinden biri de bölünerek gelişir ve haploid embriyo haline geçer. Böylece yeni oluşan tohum içinde biri diploid, diğeri haploid olan iki embriyo bulunur (Lacadena, 1974). Biberde ve şeftalide poliembriyoni yolu ile haploid bitkiler oluşabilmektedir.

Beşinci haploid oluşum yolunda, yumurta hücresi ile polen generatif çekirdeği birleşirler ve döllenme olur. Ancak embriyo gelişmesinin ilk devrelerinde ebeveynlerden birine, genellikle babaya ait kromozomlar elimine olur ve gelişen embriyo n sayıda kromozom içerir. Bu şekildeki haploid oluşumuna da 'kromozom eliminasyonu' adı verilir (Subrahmanyam ve Kasha, 1973).

Haploid bitkilerin çeşitli yollardan doğada kendiliğinden ortaya çıkma sıklığı türlere ve hatta tür içerisinde genotiplere bağlı olarak değişmekte, çoğunlukla %0.1 — 0.001 gibi çok düşük seviyelerde kalmakta; birçok türde ise doğal haploid oluşumuna hiç rasdanmamaktadır (Pocard ve Dumas de Vault, 1971). Yetersiz ve düzensiz çıkışları nedeniyle doğal haploid oluşumunu esas alarak ıslah programlarını planlamak ve gerçekleştirmek mümkün görünmemektedir. Islah programlarında kullanılabilecek sayıda ve düzenli olarak haploidlerin elde edilmesi, bitki ıslahçıların özlemi olmuş ve değişik araştırmacılar tarafından türler arası melezlemeler, tozlamaların geciktirilmesi, sıcaklık şokları, ışınlanmış polenlerle tozlama, X ve UV ışınları uygulaması (Yeung ve Thorpe, 1981; Bajaj, 1983; Pierik, 1989), çiçek tozlarına veya bitkilere toluidin mavisi, maleik hidrazid, azotoksit, kolhisin, kloramfenikol ve paraflor fenilalanin gibi kimyasallar veya bazı büyüme düzenleyici maddelerin (2-kloro etik fosfonik asit, 2,4-D) uygulanması (Bajaj, 1983; Hosemans ve Bossoutrot, 1983; Pierik, 1989) gibi değişik yollara başvurulmuştur. Tüm bu girişimlere karşın, günümüzde haploid bitkilerin elde edilebilmesi için en etkin ve verimli yöntemler; erkek veya dişi gametlerin başlangıç materyali olarak kullanıldığı *in vitro* tekniklerle sınırlı kalmaktadır. Bir türün normal kromozom sayısının yarısına (n) sahip olan eşey hücreleri yani gametlerden yararlanılarak; o türün gametik kromozom sayısını taşıyan bitkilerin elde edilmesine 'haploidizasyon' adı verilmektedir.

Haploid bitkiler, morfolojik görünüşleri bakımından diploidlere göre daha küçük yapıdadırlar. Normal bir bitkide bulunan tüm organlara sahip oldukları halde, diploidlere oranla hücreleri daha küçük olan haploid bitkilerin boyları daha kısa, yaprakları dar ve küçüktür. Çiçekleri de diploidlere oranla küçük olan haploidler, hücrelerinde taşıdıkları kromozom sayısı bakımından indirgenmiş gametlerin yapısını gösteren bitkilerdir. Bu bitkiler gamet oluşturamadıkları için kısırdırlar ve tohum bağlayamazlar.

Haploid bitkilerin ıslah programlarında kullanılabilmesi için yeniden verimli diploid bitkilere dönüştürülmesi gerekmektedir. Haploid bir bitkinin kromozomlarının bazı kimyasal maddeler yardımıyla veya spontan olarak katlanması sonucunda ait olduğu türün kromozom sayısına (2n) yeniden kavuşturulması, böylece mutlak homozigot bitkilerin elde edilmesine yaygın olarak 'dihaploidizasyon' adı verilmektedir. Haploidlerin kromozom sayılarının katlanmasıyla elde edilen bitkilere, değişik dillerde farklı isimler verilmektedir. Örneğin İngilizcede 'dihaploid' veya 'doubled haploid' hatta son zamanlarda sadece 'DH', fransızcada 'haplodiploid' veya 'haploide double', türkçede ise 'katlanmış haploid' terimleri kullanılmaktadır.

Dihaploidizasyon yoluyla bir bitki materyalinin kısa bir süre içerisinde durağan hale getirilerek ıslah programlarında kullanılması günümüzde arpa, buğday, mısır, çeltik, kolza, biber, patlıcan, kavun, hıyar, gerbera gibi birçok bitki türünde başarıyla uygulanan bir olgu haline gelmiştir.

5.2. Erkek Gametten Haploid Uyartımı (Androgenesis)

5.2.1. Anter kültürü

İlk kez 1953 yılında Tulecke, *Ginkgo biloba* bitkisine ait olgun polenlerin kültür koşullarında haploid kallus oluşturmak üzere uyarılabileceğini gözlemlemiştir. 1964 yılında ilk önemli gelişmeyi Guha ve Maheshwari gerçekleştirmiş, *Datura innoxia* bitkisinin kültüre alınan anterlerinde mikro sporlardan haploid embriyo oluşumu sağlanmıştır (Guha ve Maheshwari, 1966). Sonraki yıllarda Bourgin ve Nitsch (1967), *Nicotiana tabacum* türünde anter kültürü yoluyla tam bir haploid bitkiyi elde etmeyi başarmışlardır. Bu aşamadan sonra birçok bitki türünde erkek gametten haploid bitki elde etme amacıyla çalışmalar yapılmış, günümüze değin yaklaşık 250 farklı bitki türünde *in vitro* androgenesis tekniğinden başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Bajaj, 1983; George ve Sherrington, 1984; Pierik, 1989).

Anter kültürü esas olarak; içerisinde olgunlaşmamış polenleri (mikrosporları) bulunduran anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilmesi olayına verilen isimdir. Anter kültürü yapılarak, normal koşullarda iki çekirdekli yapıya dönüşecek olan polen tanesinin gametik gelişme yönü; henüz tek çekirdekli dönemdeyken somatik gelişme yönüne doğru

çevrilmekte ve böylece 'mikrospor androgenesi' veya sadece 'androgenesi' olarak adlandırılan oluşum gerçekleşmektedir.

Anter kültürü, özellikle *Solanaceae* familyası üyelerinin çoğunda başarılı sonuçlar vermektedir. *Cruciferae*, *Gramineae* ve *Kanunculaceae* familyalarına ait değişik türlerden haploid bitkiler elde edilebilmektedir (Bajaj, 1983; Rashid, 1983). Bunlardan başka çeltik ve mısır türlerinde de başarılı sonuçlar rapor edilmektedir (Tsai ve ark., 1986).

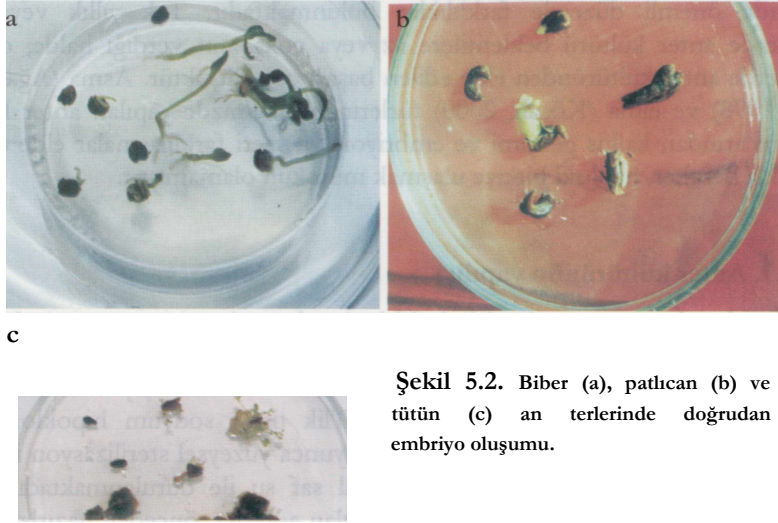
Bugüne dek Angiospermelerde haploid uyartımının 37 familya, 88 cins ve 247 türde gerçekleştirilebildiği bildirilmektedir (Pierik, 1989). Ancak haploid üretiminin sağlanabildiği bitki cins ve türlerini kesin ifadelerle sınıflandırmak mümkün görülmemektedir. Çünkü bir cins içerisinde bile haploid oluşumu, 'çok kolay' diye tanımlanabilecek bir düzey ile 'olanaksız' olarak nitelendirilebilecek bir durum arasında değişebilmektedir. *Oryza*, *Lycopersicon*, *Arabidopsis*, *Solanum*, *Triticum* ve *Nicotiana* cinslerinde, haploid oluşturma özelliği bakımından türler arasında önemli düzeyde farklılıklar bulunmaktadır. Tek yıllık veya otsu bitkilerde anter kültürü beklentilere az veya çok yanıt verdiği halde, odunsu bitkilerde anter kültüründen elde edilen başarı çok düşüktür. Asma (Ağaoğlu ve ark., 1998) ve elma (Kösali, 2000) türlerinde ülkemizde yapılan anter kültürü çalışmalarından kallus gelişimi ve embriyoid benzeri farklılaşmalar elde edilmiş olmakla beraber, haploid bitkiye ulaşmak mümkün olamamıştır.

5.2.1.1. Anter kültürünün yapılışı

Henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler, anter kültürü için uygun başlangıç materyalidir. Belirlenen aşamadaki anterleri bulunduran çiçek tomurcukları, birkaç damla Tween-20 damlatılmış %20'lik ticari sodyum hipoklorit veya kalsiyum hipoklorit içerisinde 15 dakika boyunca yüzeysel sterilizasyon işlemine tabi tutulduktan sonra en az 3 kez steril saf su ile durulanmaktadır. Steril koşullarda tomurcukların içerisinden çıkartılan anterler, önceden hazırlanmış ve otoklavlanarak sterilize hale getirilmiş besin ortamlarının üzerine yerleştirilmektedir. An terlerin tomurcuk içerisinden çıkarılması sırasında ezilmemesine ve filamenderinin, anterle birleştiği noktadan kesilerek uzaklaştırılmasına dikkat edilmelidir. Çoğunlukla petri kutularına, ağarla katılaştırılmış besin ortamlarına yerleştirilen anterlerin dikim işlemi tamamlandıktan sonra petri kutularının kenarları bir film şeritle kapatılarak herhangi bir enfeksiyona karşı, dış ortamdaki atmosferle olan ilişki kesilmektedir. Normal olarak 7 cm çapındaki bir petri kutusu içerisine türlere ve anter büyüklüğüne göre değişmekle birlikte 5-15 adet anter yerleştirilebilmektedir. Petri kutuları içerisindeki anterler inkübasyon için değişik koşullara alınabilmekte, bütün gibi anter kültürüne son derece olumlu yanıt veren bitkilerde 24-28 °C sıcaklıkta ve fotoperiyodik bir düzende aydınlatılan bir

iklim dolabında yapılan inkübasyon yeterli olurken; patlıcan, biber, lahana grubu sebzelerde kültürün ilk günlerinde yüksek sıcaklık şoklarına gereksinim duyulabilmektedir.

Anterler normal koşullarda ilk iki hafta içerisinde polen embriyogenesi yönünde gelişmeye başlamaktadır. Bu aşamadan sonra gelişme iki farklı doğrultuda seyredebilmektedir; ya doğrudan embriyo oluşumu gerçekleşmekte ve 6-8 hafta içerisinde toprağa transfer edilebilecek gelişme düzeyine ulaşmış bitkiler elde edilebilmekte; ya da haploid kallus dokusu oluşmakta ve kalkıştan bitki rejenerasyonu yoluna gidilmektedir. Bunlardan ilkinde direkt androgenesis, İkincisine indirekt androgenesis adı verilmektedir. Şekil 5.2'de doğrudan embriyo oluşumunun görüldüğü bazı bitkilerin anterlerinden embriyo çıkışları; Şekil 5.3'te ise patkanda anter kültürü yoluyla doğrudan embriyo oluşumu ve haploid bitki elde edilmesine ait farklı aşamalar gösterilmiştir.



Şekil 5.2. Biber (a), patlıcan (b) ve tütün (c) an terlerinde doğrudan embriyo oluşumu.

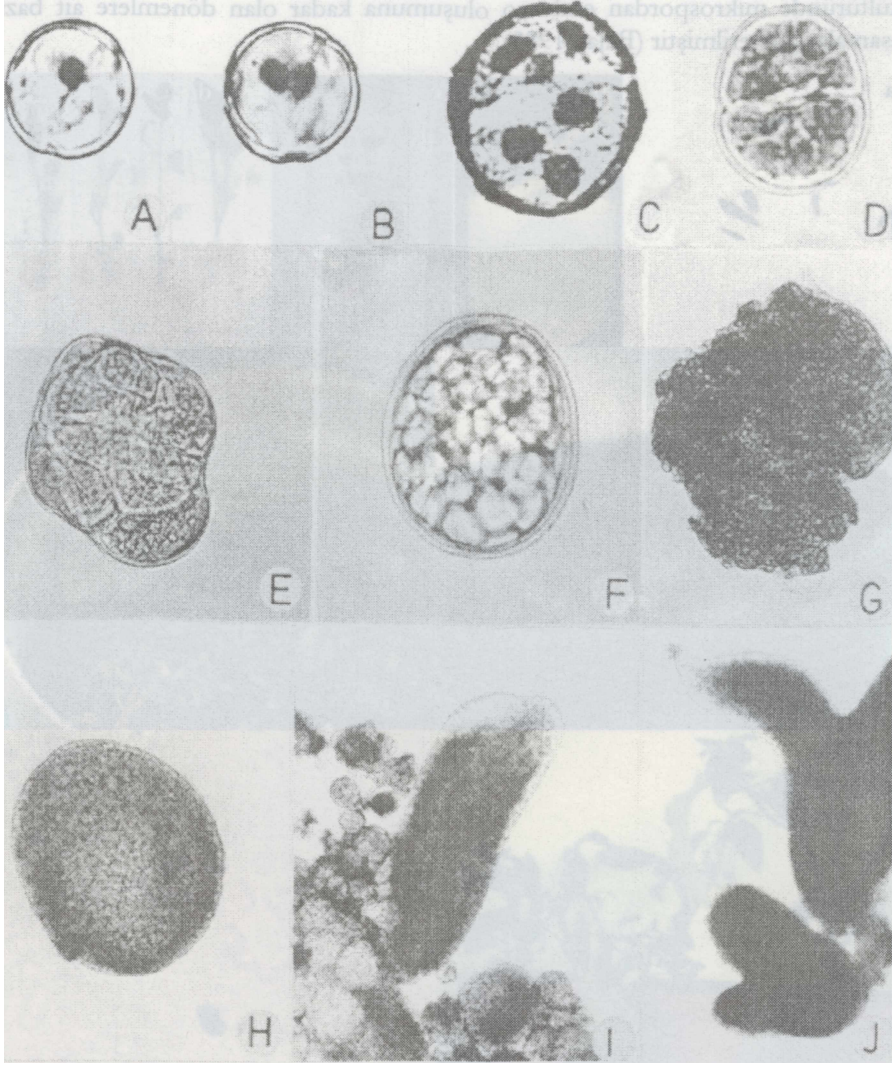
5.2.1.2. Mikrosporların sporofitik yönde gelişme için uyarılması

Mikrosporların, kültür koşulları ve yapılan uygulamaların etkisiyle; normal ve sağlıklı bir çiçek tozu oluşumuyla sona eren gametofitik doğrultudaki gelişme yerine, haploid embriyo oluşumuyla sona eren sporofitik yöndeki gelişmeye doğru yönlendirilebilmesi için mudaka buna uygun gelişme döneminde bulunması gerekmektedir. Bu dönem, tek çekirdekli (uninucleate) mikrospor gelişme dönemi veya birinci polen mitozundan hemen önceki dönemdir (Şekil 5.4a). Embriyoların oluşumu için gerekli süre, türlere bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte; anterlerin dışına çıkıp çıplak gözle görülebilecek aşamaya gelinceye kadar yaklaşık 3-5 haftalık bir zaman geçmektedir. Şekil 5.4'te anter

kültüründe mikrospondan embriyo oluşumuna kadar olan dönemlere ait bazı aşamalar gösterilmiştir (Bajaj, 1983).

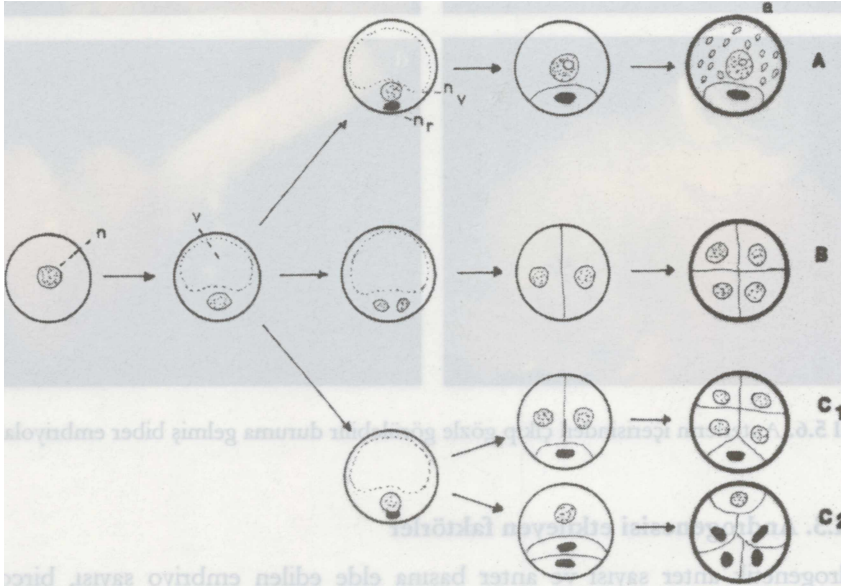


Şekil 5.3. Patlıcanda anter kültürünün aşamaları (a) Anterlerden embriyo çıkışı, (b) Embriyoların hormonsuz ortamlarda bitkiye dönüştürülmeleri, (c) Taze ortama transfer edilmiş iki haftalık tam bir patlıcan bitkiciği, (d) Toprağa aktarma aşamasına ulaşmış *in vitro* patlıcan fideleri, (e) Serada şişleme sisteminin altında dış koşullara alıştırılan patlıcan fidesi, (f) Sağlıklı yeni yapraklar geliştiren anter kökenli bir patlıcan bitkisi, (g) Anter kültürü yoluyla elde edilmiş patlıcan bitkileri (soldaki diploid, ortadaki ve sağdaki bitkiler haploid yapıdadır), (h) Haploid yapıdaki bir bitkinin kök uçlarında sayılan kromozomlar ($n=12$).



Şekil 5.4. (a) Tütün bitkisine ait tek çekirdekli mikrospor (kültüre başlandığı aşamada), (b) Bir haftalık inkübasyon süresi sonunda mitoz bölünme geçirmiş ve birbirine benzer yapıdaki iki çekirdeğe sahip mikrospor, (c) İki haftalık kültürlerde oluşan çok çekirdekli mikrospor, (d) Embriyo gelişme yönünde bölünen bir mikrospor, (e) Mikrokallus görünümüne dönüşen çok hücreli bir mikrospor, (f) Çok hücreli bir mikrospor (embrioid), (g) Küçük ölçekli bir haploid kallus, (h-j) Tütün an terlerinde polen embriyogenesisinin değişik aşamaları (Bajaj 1983'den alınmıştır).

Kültüre alınan anterlerin içerisindeki mikrosporlar değişik gelişme modellerine sahip olabilmektedir. Mikrospor çekirdeği doğal koşullarda normal bir mitoz geçirerek vegetatif ve generatif çekirdeği oluşturmaktadır (Şekil 5.5A). *In vitro* koşullarda mikrospor çekirdeği geçirdiği mitoz sonucunda benzer görünümlü iki çekirdeğe sahip olabileceği gibi (Şekil 5.5B); bazı polenlerde vegetatif çekirdek bölünerek benzer görünümlü iki çekirdek oluşturabilmekte (Şekil 5.5C₁) ve bölünmenin devam etmesi sonucunda çok çekirdekli polen şekli ortaya çıkmaktadır. Generatif çekirdek de ardarda birkaç kez bölünebilmekte, ancak *Yiyasçyamus niger* (Raghavan, 1978) gibi literatürde verilen bazı özel örneklerin dışında androgenesis tamamlayamadığından aborsiyona uğramaktadır. Hücre duvarları oluşmaksızın çekirdek bölünmeleri olması halinde bir polen tanesinin içerisinde bölünmeler sonucunda 30'a yakın çekirdek meydana gelebilmekte, ancak gelişmesine devam edemeyen bu tip polenlerin androgenesis olayında herhangi bir önemi bulunmamaktadır (Bajaj, 1983).

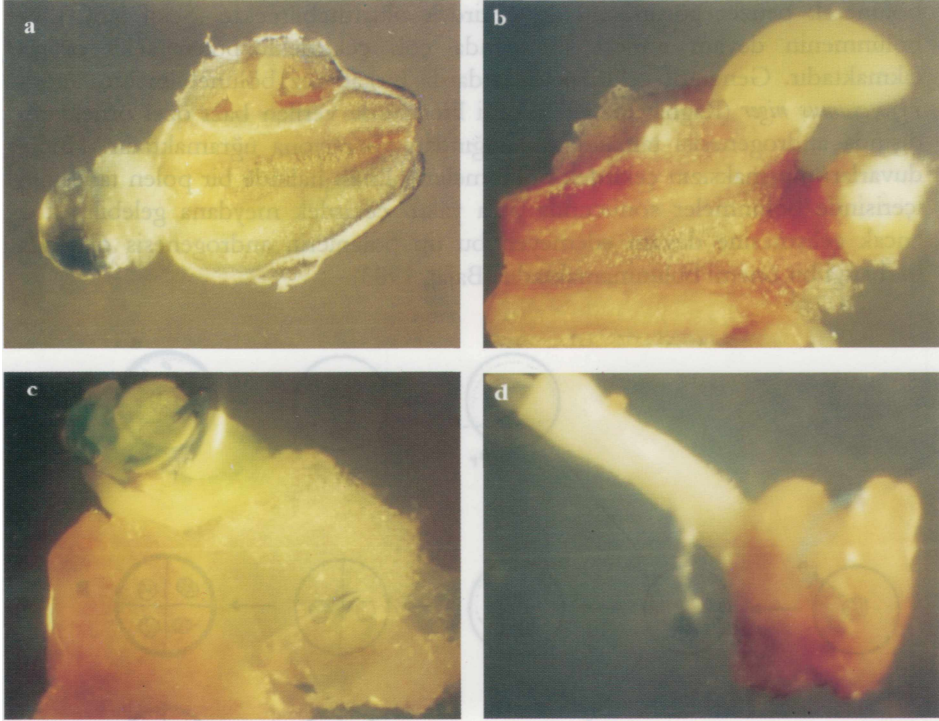


Şekil 5.5. Mikrosporların *in vivo* (A) ve *in vitro* (B, C₁, C₂) koşullarda göstermiş oldukları değişik gelişme modellerinin şematik olarak anlatımı (a: nişasta, n: çekirdek (nucleus), nv: vegetatif çekirdek, nr: generatif çekirdek, v: vakuol) (Bajaj, 1983'ten alınmıştır).

Çok çekirdekli mikrosporların tersine bazı mikrosporlar birkaç çekirdek bölünmesinin ardından ayrılmaya başlamakta ve tam bir hücre bölünmesi geçirmekte, böylece 40-50 hücreli birer proembriyoya dönüşmektedir (Şekil

Ş. Ellialtınoğlu, N. San, i.ç.

5.4d). Globular aşamaya gelen embriyo polenin ekzin (exine) tabakasından dışarı çıkarak şekillenmeye başlamakta ve zigodk embriyoya benzer bir biçimde değişik gelişme aşamalarını tamamlamaktadır (Şekil 5.4h-j). Kotiledon yaprak taslakları belirlemeye başlayan embriyo, 5-6 hafta içerisinde anterlerin içerisinde çıkarak gözle görünme aşamasına ulaşabilmektedir (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. Anterlerin içerisinde çıkıp gözle görülebilir duruma gelmiş biber embriyoları.

5.2.1.3. Androgenesi etkileyen faktörler

Androgenetik anter sayısı ve anter başına elde edilen embriyo sayısı, birçok faktörün etkisi altında bulunmaktadır. Anter kültüründen elde edilecek başarıyı etkileyen faktörlerin bir bölümü, anterlerin alındığı donör bitkiden kaynaklanmakta olup diğer bir bölümü de anter kültürü tekniğinin uygulanması sırasındaki koşullarla ilişkilidir. Bir mikrosporu, normal gelişme yönünden çevirerek sporofitik yönde gelişmeye teşvik eden mekanizma hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Ancak, anter kültüründen elde edilen haploid bitki sayısı üzerinde etkisi bulunan faktörlerle ilgili çok sayıda araştırma yapılmış ve önemli bilgilere ulaşılmıştır. Bu faktörlerden önemlileri aşağıda ana başlıklar altında incelenmiştir:

5.2.1.3.1. Anter verici (donör) bitkiden kaynaklanan faktörler

a) Genotip

Anter kültüründe başarı, çok büyük bir oranda anterlerin alındığı bitkilerin genotipine bağlıdır. Şimdiye dek çalışılmış olan tüm bitki türlerinde; aynı kültür koşulları altında, anter yanıtları bakımından genotipler arasında büyük farklılıklar bulunmuştur. Nitsch (1969), 12 tütün türünden 5 tanesinin; Gresshof ve Doy (1972a) 18 farklı *Arabidopsis* hattından 3 tanesinin, Irikura (1975) 118 farklı *Solanum* genotipi içerisinde sadece 19'unun polen embriyogenesi oluşturduğunu belirtmektedir. Gresshof ve Doy (1972b) ayrıca, *Vitis vinifera* türüne ait 27 bitki klonunda anter kültürü yapmışlar, bunlardan sadece 3 tanesinin anter kültürüne elverişli olduğunu bildirmişlerdir. Abak (1983) tarafından biberde, Karakullukçu ve Abak (1992) tarafından patlıcanda yapılan anter kültürlerinde, değişik genotiplerden embriyo elde etme başarısının önemli düzeyde farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Haploid bitki vermesi istenen genotipten yüksek düzeyde androjenetik yanıt alabilmek için başvurulacak iki yol bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, Dunwell (1981)'in de önerdiği gibi, her genotip için kültür koşullarını optimize etmektir, ikinci seçenek ise anter kültüründe embriyo oluşturma başarısı yüksek genotiplerle embriyo oluşturma kapasitesi düşük olan genotipleri melezleyerek, melez döllerden az veya çok embriyo elde etmeyi sağlamaktır, ikinci yolu seçerek çalışmalar yapan Jacobsen ve Sopory (1978), anter kültürü yoluyla yüksek oranda embriyo oluşturan patates klonlarını belirleyerek bunları birbiriyle melezlemiş; elde ettikleri melez genotiplerin, ebeveynlere oranla daha fazla sayıda embriyo oluşturdıklarını belirlemişlerdir. Mısır bitkisinde de melezleme, anter kültüründeki başarısı düşük olan genotiplerin embriyo oluşturma kapasitesini artırmak için bir yöntem olarak kullanılmıştır. An terden gelişen iki adet kadanmış haploid bitki melezlenip F₁'ler elde edilmiş, bu F₁'lerin anter kültüründeki embriyo verimleri, başlangıç bitkilerinkinden 8 kez daha fazla olmuştur. Petolino ve ark. (1988), ticari olarak önemli gen kaynaklarının anter kültürü için elverişli duruma getirilmesi için bu yöntemin kullanılmasını önermektedir. Benzer biçimde arpa ve patateste, anter kültüründe başarı oranı yüksek genotiplerle agronomik olarak önemli çeşitler arasında melezleme yapılmıştır. F₁ generasyonundaki bitkiler, haploid embriyo oluşturma özelliği bakımından ebeveynlerin arasında bir durum sergilemiştir (Wenzel ve Foroughi-Wehr, 1984). Bu durum, anter kültürüne yanıt verme özelliğinin kalıtsal olduğunu göstermektedir.

Tuberosa ve ark. (1987), değişik ülkelerden toplanan sekiz farklı patlıcan çeşidi ve bunların arasında yapılan melezlemelerden elde edilen 16 melez genotipte anter kültürü yapmış ve embriyo oluşum oranlarını belirlemiştir. Ebeveynlerde en yüksek 17.3 embriyo/100 anter oranında başarı elde eden araştırmacılar, bazı melez genotiplerde 42 embriyo/100 anter sayısına ulaşmışlardır. Buğdayda anter

kültürü yoluyla embriyo oluşturma yeteneği bulunmayan bir seri çeşit; iyi bir rejenerasyon kapasitesine sahip olan “Centurk” çeşidi ile melezlendikten sonra; bu olumlu özelliğin F₁ döllerine aktarılabilirdiği görülmüştür. Resiprokal melezlemelerden alınan sonuçlar da, kültüre alınan anterlerin embriyo oluşturma özelliğinin, sitoplazmik etkilerin kontrolü altında olduğunu göstermiştir (Bullock *ve ark.*, 1982).

Bir bitkinin anter kültürü yoluyla haploid embriyo oluşturma yeteneğinin genetik esaslara dayandığı anlaşılmış olmakla birlikte; bu özelliğin kalıtımı ve genetik analizi konusunda yapılmış araştırmaların sayısı çok azdır. Anter kültürünün genetik mekanizmasını açıklamaya yönelik olarak yapılan araştırmaların buğday bitkisinde yoğunlaştığı görülmektedir. Bu araştırmalardan birinde 45 değişik buğday çeşidinin anter kültüründeki rejenerasyon yeteneğinin, 1BL-1RS translokasyonuna bağlı olduğunu belirlenmiş (Müller *ve ark.*, 1985); bir başkasında, bu lokasyona ek olarak buğdayda mikrospor rejenerasyonunu etkileyen başka bazı genetik sistemlerin varlığından söz edilmiştir (Foroughi-Wehr *ve* Zeller, 1990). Henry *ve* de Buyser (1985) ise, buğdayda haploid üretiminin en azından üç değişik ve birbirinden bağımsız öge tarafından kontrol edildiğini; bunların ‘embriyo uyartımı, rejenerasyon yeteneği ve yeşil bitkilerin albino bitkilere oranı’ olarak sıralanabileceğini ifade etmektedir. Tüm bu bilgiler, polen embriyogenesisine yatkınlık özelliğinin genetik olarak kontrol altında bulunduğunu kanıdamakta, ancak mekanizmanın işleyişi hakkında daha fazla bilgiye ulaşılması ve genetik tanımlamaların yapılması için yeni araştırmalara gereksinim duyulduğunu da göstermektedir.

b) Donör bitkinin yetiştirme koşulları

Donör bitkinin genotipi son derece elverişli olsa bile, mikro sporlardan *in vitro* koşullarda haploid embriyo uyartımını başarabilmek, bu bitkilerin yetiştirildiği koşullara da bağlıdır. Bitkilerin yetiştirildiği dönemdeki sıcaklık, ışık yoğunluğu ve günlük ışıklandırma süresi, havadaki CO₂ konsantrasyonu, bitkinin beslenme koşulları başta olmak üzere tüm çevresel faktörler, o bitkilerden alınan anterlerden elde edilecek başarı üzerinde etkili olabilmektedir. İlk kez Dunwell *ve* Perry (1973), bitkilerin yetiştirildiği ortamdaki ışıklandırma süresinin; bütün anter kültüründe haploid embriyo oluşturma oranı üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur.

Buğday, arpa, çeltik ve çavdar gibi tarla bitkilerinde, donör bitkinin yetiştirme koşullarının anter kültüründeki başarı üzerinde çok etkili olduğu bilinmektedir. Hatta donör bitkinin yetiştirilmesi aşamasında uygun yetiştirme koşulları sağlanamadığında, anter kültüründeki başarı yüksek ‘İgri’ buğday çeşidi bile sadece albino embriyolar oluşturabilmekte, tek bir yeşil normal haploid bitki elde etmek mümkün olamamaktadır (Foroughi-Wehr *ve* Wenzel, 1993).

Bundan başka literatürde aynı bitki türü ve hatta çeşitlerle yapılan çalışmalardan değişik sonuçların alınması da, genotip aynı olsa bile donör bitkinin yetiştirme

koşullarının anter kültüründen elde edilecek başarı üzerinde önemli düzeyde etki ettiğini göstermektedir. Örneğin Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982), beyaz renkli meyveleriyle tanınan 'Dourga' adlı bir Fransız patlıcan çeşidinin, anter kültüründe yüksek oranda haploid embriyo oluşturduğunu ifade ettikleri halde; aynı çeşit, *Tuberosa ve ark.* (1987) ile *Rotino ve ark.* (1987b)'nın yaptıkları anter kültürlerinde embriyo oluşturma yeteneği çok düşük bir çeşit olarak görünmüş; çok sayıda patlıcan genotipi ile bizim yapmış olduğumuz çalışmalarda ise hiç embriyo oluşturamamıştır (Karakullukçu, 1991).

Bitkideki androgenetik potansiyel ile ilgili bir parametre de anterlerdeki mikrosporların yapıları ve kaliteleridir. Buna yönelik ilk araştırmaları yapan Sunderland (1971), kültüre alınan tütün an terlerinin içerisinde sitolojik gözlemlerde daha açık renkte boyanan ve büyüklük bakımından da farklılık gösteren polenlerin varlığından bahsetmiştir. Daha sonra çavdar (Wenzel ve Thomas, 1974) ve arpada (Dale, 1975) polenlerin tümünün aynı morfolojiye sahip olmadıkları, aralarında farklı yapıda olanların bulunduğu belirlenmiştir. Polen dimorfizmi olarak adlandırılan bu durumdaki polenlerin bir bölümü gametofitik yönde gelişmesini sürdürerek normal polenleri oluştururken, diğer bir bölümü ise sporofitik gelişme yönüne kayarak embriyo oluşturma yeteneği kazanmaktadır. Anter kültürü çalışmalarında model bitki olarak kullanılacak kadar yüksek bir androgenetik potansiyel sergileyen tütün bitkisinin anterlerinde farklı yapılara sahip polenlerin bulunduğu, yani polen dimorfizminin bulunduğu belirlenmiş, embriyo oluşturma yeteneğine sahip olduğu düşünülen sporofitik polen tanelerinin (P-poleni) oranı ile kültüre alınan anterlerden elde edilen embriyo sayısı karşılaştırılmıştır. P-poleni sayısı ile oluşan haploid embriyo sayısı arasında gerçekten de çok yüksek bir korelasyon bulunmuştur (Horner ve Mott, 1979). Başka bir araştırmada, normal polenlere göre daha ince bir ekzin tabakasına ve daha az sayıda mitokondriye sahip, daha az miktarda nişasta içeren ve daha küçük yapılı P-polenleri oluşumunun bitkideki cinsiyet dengesi ile ilişkili olduğu, yetiştirme koşullarının dişilik yönünde gelişmeyi artırması halinde P-polenleri sayısının da arttığı, böylece anter kültüründe daha fazla embriyo oluşumunun sağlanabildiği ortaya konmuştur. Örneğin serin koşullarda ve nitrojen açlığı olarak tanımlanan azot içermeyen bir besleme programı kullanıldığında, tütün anterlerinde çimlenme ve dölleme yeteneğindeki normal polen oluşumu azalmakta ve bunun yerine embriyo oluşturma kapasitesindeki P-polenlerinin oluşumu artmaktadır. Böyle anterler kültüre alındığında ise elde edilen embriyo sayısı yükselmektedir (Heberle-Bors ve Reinert, 1979).

Sonuç olarak bir grup araştırmacı, donör bitkilerin yetiştirildiği koşulların anter kültürü üzerindeki etkisini, anterlerin içerisinde oluşan embriyogenik polenlerin oranına bağlamaktadır. Bununla birlikte donör bitki yetiştirme koşullarının etkisi, yalnızca polen morfolojisi üzerinde değil, aynı zamanda bitkideki fizyolojik ve biyokimyasal olaylar üzerindedir. Yetiştirildiği çevre koşullarının etkisi altında, aminoasitler ve büyüme düzenleyiciler gibi içsel maddeler

bakımından farklı kompozisyonlara sahip anterler kültüre alındıklarında, bunların androgenetik verimlilik bakımından farklılık göstermeleri doğaldır. Genel olarak pek çok bitki türünde normal yetiştirme sezonunda ve açıkta yetiştirilen bitkiler; normal yetiştirme döneminin dışında sera veya iklim odası koşullarında yetiştirilen materyale göre, an ter kültüründe göstermiş oldukları performans bakımından daha üstündür.

5.2.1.3.2. Anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörler

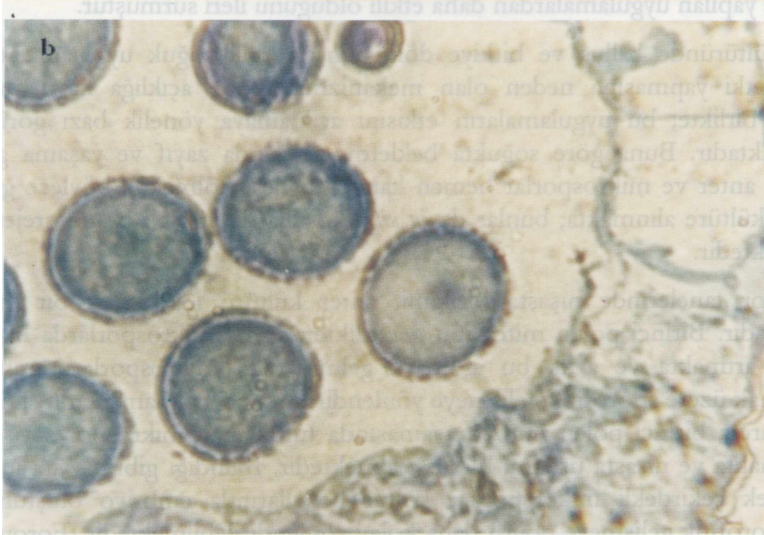
a) *Amerlerin gelişme dönemi*

in vitro androgenesisin başarıyla uyartılmasında etkili olan en önemli faktörlerden birisi, anterlerin donör bitkiden izole edildiği anda mikrosporların içinde bulundukları gelişme dönemidir. Çoğu bitki türünün anter kültürlerinde en iyi sonuçlar, tek çekirdekli mikrospor döneminin erken veya geç aşamasındaki mikrosporları içeren anterlerden alınmaktadır. Mikrosporlar içerisinde nişasta depolanmaya başladıktan sonra, gelişmeyi sporofitik yöne kaydırmak ve haploid embriyo elde etmek için yapılacak uyarılar etkili olamamaktadır.

Anterlerdeki polenlerin hangi gelişme döneminde bulunduğunu belirlemek için sitolojik gözlemler yapmak gerekmektedir. Mikrospor gelişme aşaması, asetokarmin ile hızlı boyama yapılarak saptanabileceği gibi (Şekil 5.7 a), patates ve kolzada olduğu gibi kalın bir polen dış tabakası söz konusuysa, bir gece tespit çözeltisinde bekletmenin ardından asetokarmin ile boyama yöntemi kullanılarak da belirlenebilir. Ayrıca flouresans mikroskopu ve preparat hazırlanmasında buna uygun merkürük asit, DAPI gibi boyaların kullanılması ile, çok çabuk ve mikrospor çekirdeklerinin çok net biçimde görülebilmesi olasıdır. Mikrosporogenesis aşamalarını net biçimde izleyebilmek ve tomurcuk morfolojisi ile mikrospor gelişme dönemi arasında bir ilişki kurabilmek amacıyla uygulanabilecek bir başka yöntem de; parafine gömerek kesit alma ve bunun ardından preparadanı hematoksilin veya metilen mavisi (Şekil 5.7b) gibi değişik boyalarla boyamadır. Bu yolla elde edilen görüntüler net ve güvenilir olmakla birlikte; yöntemin uzun süre alması en büyük dezavantajıdır. Bu nedenle herhangi bir bitki türü ile anter kültürü yapılması planlandığında parafin yöntemi kullanılarak mikrosporogenesis aşamalarının belirlenmesi; laboratuvar çalışmaları sırasında ise taze anter materyalinin kontrol edilmesi amacıyla asetokarmin ile boyayarak ezme preparat yapılması daha pratik bir yoldur. Flouresans boyalarla yapılan boyama, hem mikrosporogenesis aşamalarının tam olarak ortaya konması ve hem de laboratuvarda iş akışı içerisinde hızla gözlem yapabilmeyi sağlar. Ancak gerekli mikroskop düzeneği ve boyaların pahalı oluşu, bu yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca çekirdeksel DNA materyalini boyayan flouresans boyaların, insan sağlığı açısından dikkade kullanılması gereken maddeler olduğu unutulmamalıdır.

Doğru aşamadaki mikrosporları bulunduran anterlerin ve tomurcukların morfolojik özellikleri tanımlandığında, an ter kültürü için tomurcuk toplama, basit bir işlem haline gelmektedir. Bununla birlikte, doğru aşamadaki anterlerin bulunduğu çiçek tomurcuğunun büyüklüğünün; genotipe, tomurcuğun bitki üzerinde bulunduğu yere ve bitki yaşına bağlı olduğunu unutmamak gerekmektedir.

a



Şekil 5.7. (a) Asetokarmin ile boyanarak hazırlanmış bir preparatta tek çekirdekli dönemde kabak mikrosporları (Kurtar, 1999), (b) Parafin yöntemiyle hazırlanmış ve metilen mavisi ile boyanmış bir preparatta tek çekirdekli dönemde asma mikrosporları (Ağaoğlu *ve ark.*, 1998).

Patlıcanda değişik gelişme aşamalarına sahip tomurcuklardaki anterlerde parafin yöntemi ile yapılan kesit alma işleminden sonra yapılan mikroskopik gözlemlerde, mikrospor gelişim aşamaları ortaya konmuş; an ter kültürü için en uygun olduğu belirlenen tek çekirdekli mikrospor aşamasının, taç yaprakları çanak yaprakların ayırım noktasına ulaşmış ancak henüz açılmamış tomurcuklarda bulunduğu, anterlerin ise yeşilimsi açık sarı renkte oldukları belirlenmiştir (Karakullukçu, 1991). Şekil 5.8’de büyüklüklerine göre gruplandırılan patlıcan tomurcuklarının içerisindeki anterlerdeki mikrospor gelişme aşamaları gösterilmiştir. Böyle bir ön çalışmanın yeni çalışılacak her bitki ve hatta genotip grubu için yapılması yararlı, hatta gereklidir.

b) Anterlere yapılan ön uygulamalar

Çiçek tomurcuklarına yapılan bazı ön uygulamalar, mikrosporların kültür sırasındaki gelişmesi üzerinde olumlu etki yapmaktadır. Anter kültüründe en etkili ön uygulama, tomurcuklara yapılan soğuk şoklarıdır. 4-10 °C’ler arasında, 72 saat ile 4 haftaya kadar tutulan tomurcuklar, polen rejenerasyonu bakımından olumlu yanılar vermiştir (arpa: Sunderland *ve ark.*, 1981; patates: Wenzel ve Uhrig, 1981; mısır: Genovesi ve Collins, 1982; buğday: Lazar *ve ark.*, 1985; biber: Morrison *ve ark.*, 1986).

Sunderland ve Roberts (1979), soğuk şoku uygulamasında sıcaklık derecesi ve süresinin önemli olduğunu vurgulamış; çok soğuk olmayan +7 ila +15 °C gibi sıcaklıklarda uzun süre (7-14 gün) yapılan şoklamanın, daha düşük derecelerde kısa süre yapılan uygulamalardan daha etkili olduğunu ileri sürmüştür.

Anter kültüründe kallus ve bitkiye dönüşüm üzerine soğuk uygulamalarının olumlu etki yapmasına neden olan mekanizma henüz açıklığa kavuşmamış olmakla birlikte; bu uygulamaların etkisini açıklamaya yönelik bazı görüşler bulunmaktadır. Buna göre soğukta bekletme sırasında zayıf ve yaşama gücü olmayan anter ve mikrosporlar hemen kahverengileşip ölmekte, böylece güçlü anterler kültüre alınmakta; bunlar da *in vitro* koşullarda yüksek oranda rejenerasyon olabilmektedir.

Mikrospor tanelerinde nişasta birikimi, anter kültürü için kritik bir önem taşımaktadır. Birinci polen mitozunu geçirdikten sonra mikrosporlarda nişasta birikimi artmakta ve artık bu aşamaya gelmiş olan mikrosporları embriyo oluşturmak üzere sporofitik gelişmeye yönlendirme şansı kalmamaktadır. Düşük sıcaklıklarda; birinci polen mitozu aşamasında tutuklanan mikrospor sayısında artış olmakta ve nişasta üretimi bloke edilmektedir. Bilindiği gibi nişasta içeriği düşük tek çekirdekli mikrosporlar, kültür koşullarında embriyo oluşturmak üzere sporofitik gelişmeye doğru daha kolay yönlendirilebilmektedir (Foroughi-Wehr ve Wenzel, 1993).

Tomurcuklara uygulanan soğuk şokları anter duvarı üzerinde de etkili olabilmektedir. Kültürlerin inkübasyonu süresince kahverengine dönüşen ve

yaşlanarak toksik maddeler s algılayabilen anter duvarı, kültür öncesi uygulanan soğuk şokları sayesinde daha geç yaşlanmakta ve olumsuz etkileri önemli düzeyde engellenebilmektedir. Biber ve patıcanda soğuk uygulanan tomurcuklardan izole edilen anterlerin kültüre alınması halinde, anterlerin inokulasyon süresi boyunca soğuk uygulanmayan kontrol grubu anterlerinden daha açık renkte kaldıkları; kontrol anterleri koyu kahverengi-siyah renk alırken özellikle patıcanda soğuk uygulanan anterlerin sarımsı kahverengi görünümelerini uzun süre korudukları, bizim çalışmalarımızda da belirlediğimiz bir gözlemdir.

Soğuk uygulamaları ile anterlerde bulunan absizik asit miktarının azaltıldığını bildiren Johansson ve Eriksson (1977), tomurcuklara soğuk uygulayarak engelleyici bir hormon olan absizik asitin bu olumsuz etkisinin ortadan kaldırılabilceğini ileri sürmektedir. Anterlerde bulunan ve embriyo oluşumunu engelleyebileceği ileri sürülen absizik asitin soğuk uygulamaları ile etkisini azaltmayı amaçlayarak yaptığımız çalışmalarda, gerçekten de soğuk uygulamalarının biber ve patıcan anterlerindeki absizik asit miktarını azaltıcı etki yaptığı ortaya konmuştur. Bununla beraber, anterlerdeki absizik asit miktarının azaltılmasının oluşan embriyo sayısını artırma yönünde olumlu bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir (Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz, 1997; Özkum *ve ark.*, 2000). Bu durumda, biber ve patıcan anterlerinde bulunan ABA miktarının, androgenesi engelleyebilecek düzeyde olmadığı ve bu türlerde soğuk şoklarının ABA miktarını azaltarak embriyo oluşumunu artırma çerçevesinde bir etkisinin bulunmadığı anlaşılmıştır. Ancak yine de, tür özelliği bakımından anterlerindeki ABA miktarı yüksek olan bitkilerde soğuk uygulamaları yapılarak bu engelleyici hormonun etkisini azaltmak olasıdır.

Soğuk şoklarının yanısıra; tomurcuklara ethrel uygulaması, santrifüj etme (Nitsch, 1974) gibi ön uygulamalar yapıldığında da, bunların anterlerden embriyo oluşturma özelliğine olumlu etki yaptığı literatürde yer almaktadır. Diğer yandan, bazen bir türde olumlu etki yaptığı belirtilen bir uygulama, çeşitler bazında önemli farklılıklar göstererek olumsuz etki de yaratabilmektedir. Nitekim ‘Emerald Giant’ biber çeşidine ait tomurcukların +4 °C’de 100 saat tutulması, anter kültürü yoluyla çok başarılı bir şekilde haploid embriyo oluşumuna neden olduğu halde (Morrison *ve ark.*, 1986); aynı uygulama T1 B 14’ ve ‘Demre Sivrisi’ yerli biber çeşitlerimizde yapılan anter kültürlerinde hiçbir olumlu etki göstermemiştir (Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz, 1997).

c) Besin ortamının bileşimi ve yapısı

Bitki türlerinin çoğuna cevap verebilecek bir anter kültürü ortamı bulmak kolay değildir. Anter yanıtının aynı türdeki farklı genotipler arasında bile farklılık gösterdiği bir olayda, ortak bir besin ortamı önermek olası görünmemektedir. Anter kültüründe genel olarak ilk aşamada gametofitik dokuları sporofitik gelişmeye dönüştürme yönünde uyaracak oksinler gerekli iken; bitkiciğe

dönüşüm aşamasında sitokininlerin varlığına gereksinim duyulur. 2,4-D ve NAA'ın sıklıkla kullanıldığı anter kültürlerinde oksin kaynağı olarak IAA'nın de çalışmalarda yer aldığı görülmektedir. Sitokinin olarak da çoğunlukla kinetin, bunun ardından BA ve zeatin kullanımı yaygındır.

Günümüzde her türde ve hatta çeşit bazında önerilen sayısız besin ortamı kompozisyonu bulunmaktadır. Tütün anter kültüründe yalnızca su-agar üzerinde bile androgenetik gelişme sağlanabilirken (Kandeler, 1987), daha zengin besin ortamlarına gereksinim duyan türlerin sayısı çok daha fazladır. Temel besin ortamı olarak, anter kültüründe en fazla Murashige ve Skoog, White ve Nitsch ortamları kullanılmaktadır (Sink ve Padmanabhan, 1977). B5 ortamının kullanımı da bazı türlerde, özellikle *Brassica* cinsinde başarılı sonuçlar vermektedir (Keller ve Armstrong, 1979).

Karbon kaynağı olarak anter kültürlerinde büyük bir çoğunlukla sakkaroz kullanılmaktadır. Bunun yanısıra glukoz, glukoz ve sakkaroz karışımı gibi uygulamalar da bulunmakla birlikte, Dolcet-Sanjuan ve ark., (2000)'nın biber anter kültüründe maltoz kullanmaları ve bunun da embriyo oluşumunu önemli düzeyde artırdığını belirtmeleri, anter kültürlerinde karbon kaynağı olarak farklı şekerler denenmesinin yararlı olabileceğini göstermektedir.

Besin ortamına özellikle kültürün ilk günlerinde ilave edilen yüksek şeker dozları (%6-12), patates (Sopory ve ark., 1978), biber (Dumas de Vault ve ark., 1981), patlıcan (Dumas de Vault ve Chambonnet, 1982) türlerinde anter kültüründen haploidlerin elde edilmesinde olumlu etki yapmaktadır. Şekerin besin ortamlarında ozmotik basıncı ayarlayıcı bir etkisinin bulunması (Reinert ve Bajaj, 1977), bunun yanında yüksek düzeydeki şekerin, enerji kaynağı olarak solunumu ve metabolik aktiviteyi artırarak hücre bölünmesi ve embriyoid oluşumunu artırması (Kandeler, 1987), yüksek şeker içeriğinin anter kültüründe diploid hücrelerin bölünmesini engellerken haploid hücrelerin bölünmesini teşvik etmesi (Vidalie, 1984), anter kültüründe yüksek dozda şeker kullanımının gerekçeleri olarak görülmektedir.

Besin ortamına katılan serin, glutamin gibi aminoasider, AgNCb gibi etilen biyosentezini inhibe edici maddeler (Paksoy ve ark., 1995) veya aktif kömür gibi katkı maddeleri de anter kültüründen elde edilecek başarıyı artırma yönünde kullanılan çeşitli kimyasal maddeler arasında yer almaktadır. Ortama katılan aktif kömür, sakkaroz içeren besin ortamlarının otoklavda sterilizasyonu sırasında ortaya çıkan 5-hidroksimetilfurfural (HMF) maddesini adsorbe etmekte ve ortamın yapısını hafif asidik bir karaktere dönüştüren bu maddenin olumsuz etkisini ortadan kaldırmaktadır (Fridborg ve ark., 1978). Aktif kömürün, aynı zamanda anterlerdeki absizik asit ve diğer olumsuz etkilere sahip olabilecek toksik maddeleri tuttuğu da bilinmektedir. Ortamlara aktif kömür ilavesinin anter kültüründen elde edilecek başarıyı artırma yönündeki görüşlerle yapılan bir çalışmada biberde aktif kömür katkılı ortamlar denemelerde kullanılmış, ancak

bu ortamlarda embriyoya dönüşümün tamamlanamadığı ve sadece tüylü kök oluşumunun görüldüğü rapor edilmiştir (Şekil 5.9). Bu noktada, aktif kömürün besin ortamındaki oksinleri de adsorbe etme özelliğinin dikkate alınarak, aktif kömür katkısı yapıldığında ortamdaki büyüme düzenleyici dengesinin de ayarlanması gerektiği sonucuna varılmıştır (Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz, 1997).

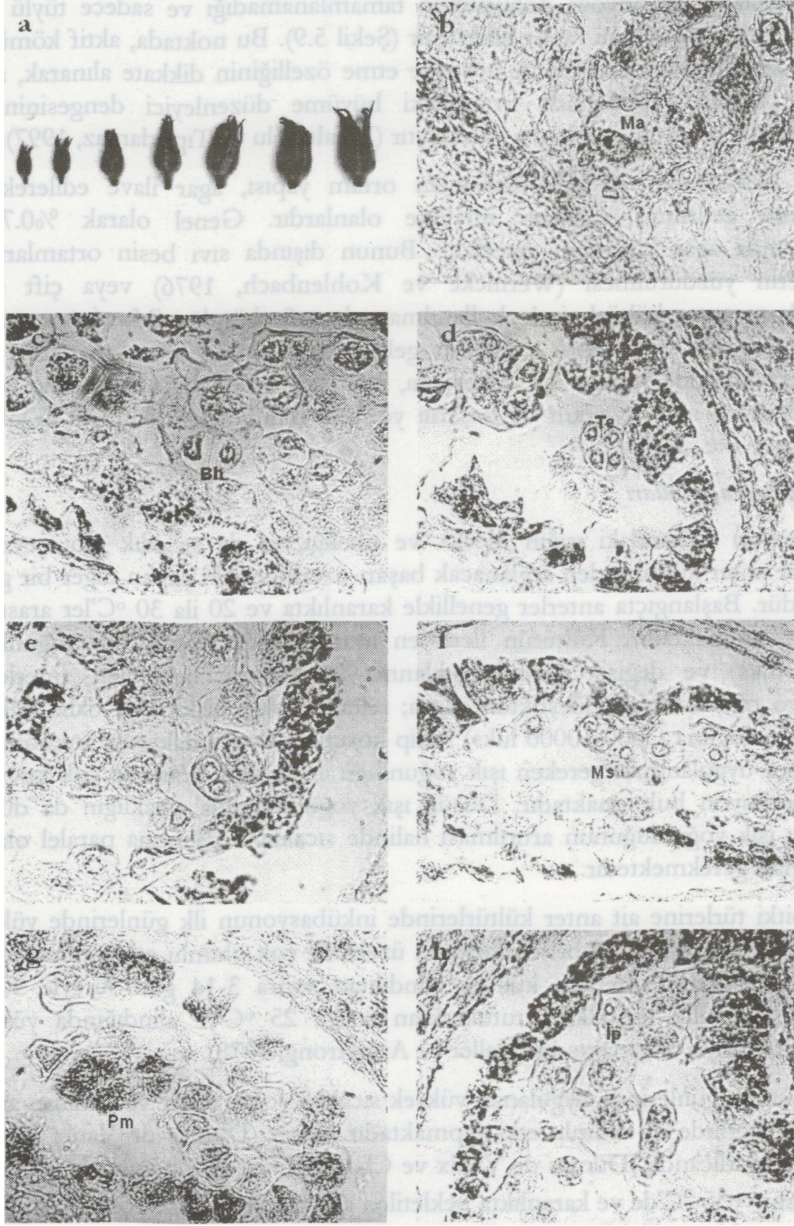
Anter kültüründe en fazla kullanılan ortam yapısı, agar ilave edilerek jel kıvamına getirilmiş yarı-katı nitelikte olanlardır. Genel olarak %0.7-0.8 oranlarında agar kullanımı yeterlidir. Bunun dışında sıvı besin ortamlarında anterlerin yüzdürülmesi (Wernicke ve Kohlenbach, 1976) veya çift fazlı ortamların anter kültürlerinde kullanılması da mümkündür (Morrison *ve ark.*, 1986). Biberde yeni hibrit çeşitlerin geliştirilmesi amacıyla saf hadarın elde edilmesi üzerinde yapılan bir çalışmada, çift fazlı ortam kullanılmasının biber anter kültürü için en etkin ve başarılı yöntem olduğu belirlenmiştir (Dolcet-Sanjuan *ve ark.*, 2000).

d) İnkübasyon koşulları

İnkübasyon sırasındaki ışığın nicelik ve niteliği, ya da sıcaklık gibi çevresel koşullar anter kültüründen sağlanacak başarı üzerinde etki yapan diğer bir grup faktördür. Başlangıçta anterler genellikle karanlıkta ve 20 ila 30 °C'ler arasında kültüre alınmaktadır. Kültürün ilerleyen aşamalarında düşük ışık yoğunluğu (2000 lüks) ve değişik günlük ışıklanma sürelerinde bekletilen anterlerde embriyo oluşumu gerçekleştikten sonra; rejenere olan bitkicikler daha yüksek ışık yoğunluğuna (3000-10000 lüks) sahip koşullara aktarılmaktadır. İnkübasyon süresince uygulanması gereken ışık yoğunluğu ile sıcaklık arasında çok kuvvetli bir korelasyon bulunmaktadır. Düşük ışık yoğunluğunda sıcaklığın da düşük olması; ışık yoğunluğunun artırılması halinde sıcaklığın da buna paralel olarak artırılması gerekmektedir.

Bazı bitki türlerine ait anter kültürlerinde inkübasyonun ilk günlerinde yüksek sıcaklık uygulamaları, embriyo oluşumu üzerinde çok olumlu etki yapmaktadır. *Brassica* türlerinin an terleri, kültüre alındıktan sonra 3-14 gün süreyle 30-35 °C'lerde karanlık koşullarda tutulduktan sonra 25 °C'ye alındığında yüksek oranda embriyo oluşmaktadır (Keller ve Armstrong, 1978).

Kültürün ilk günlerinde uygulanan yüksek sıcaklık şoku, biber ve patlıcan anter kültürü üzerinde de olumlu etki yapmaktadır. Biber (Dumas de Vault *ve ark.*, 1981) ve patlıcanda (Dumas de Vault ve Chambonnet, 1982) anter kültürünün ilk 8 günü +35 °C'de ve karanlıkta bekletilen anterlerden yüksek oranda haploid embriyo elde edilebileceğini ilk kez bildiren Fransız araştırmacıların bu buluşlarının ardından pek çok araştırmacı kültürün ilk günlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarını kullanmışlardır (*Tuberosa ve ark.*, 1987; Morrison *ve ark.*, 1986; Rotino *ve ark.*, 1987a; Qin ve Rotino, 1993).



Şekil 5.8. (a) Patlıcanda an ter kültürü için en uygun anter gelişme döneminin belirlenmesi için büyüklüklerine göre gruplandırılmış çiçek tomurcukları, (b) Mikrospor ana hücresi [Ma], (c). Bölünen hücre [Bh], (d) Tetrat dönemindeki mikrosporlar [Te], (e) Birbirinden ayrılmaya başlayan tetratlar, (f) Tek çekirdekli (uninucleate) mikrosporlar [Ms], (g) Polen mitozu [Pm], (h) İki çekirdekli genç polen [Ip].



Şekil 5.9. %1 oranında aktif kömür içeren besin ortamında kültüre alınan biber anterlerinde büyüme ucu olmayan tüylü kök oluşumları.

Munyon *ve ark.* (1989) ise biber anterlerinden *in vitro* koşullarda haploid embriyo elde edebilmek için inkübasyon süresinin başlangıcında +35 °C uygulamak yerine, kültürleri sürekli olarak 29 °C'de ve devamlı ışıklandırılan iklim dolaplarında tutmuştur. Başarı üzerinde çok olumlu etkisinin bulunduğu bildirilen bu uygulama, biber anter kültüründe bizim koşullarımızda da denenmiş ve bazı genotiplerde, oldukça umutvar sonuçlar elde edilmiştir (Terzioğlu *ve ark.*, 2000).

Anter kültüründen elde edilecek başarıyı etkileyen çok sayıdaki faktör bir arada değerlendirildiğinde temel faktör olarak genotip ve donör bitki yetiştirme koşullarının, tüm etkilerin başında geldiği görülmektedir. Genetik olarak anter kültürüne yatkınlığı olan bir bitki ile çalışılıyor ve bitki uygun koşullarda yetiştiriliyorsa, önemli düzeyde yüksek bir başarı potansiyeli ile işe başlanıyor demektir. Bundan sonra uygulanacak anter kültürü teknikleri, elde edilecek haploid embriyo sayısını artırmaya yönelik uyarıları yapmakta ve var olan kapasiteyi harekete geçirmektedir. Sonuç olarak, tüm faktörlerin tek başına ve/veya etkileşimli olarak etkili olduğu anter kültürü yoluyla haploid elde edilmesi konusunda, her bitki türü ve hatta aym tür içerisindeki farklı genotipler için en uygun koşulların optimize edilmesi gerektiği gözden uzak tutulmamalıdır.

5.2.2. Mikrospor kültürü

Erkek gametten haploid embriyo elde etmek amacıyla anter kültürü kullanılabildiği gibi, anterlerin içerisinde bulunan (izole edilen) mikro sporların

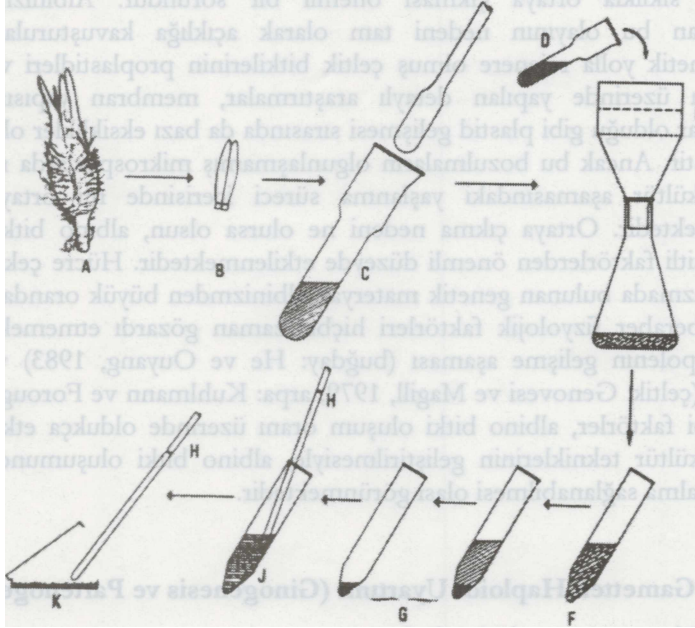
da kültürü yapılabilir. Olgunlaşmamış mikrosporların, anter içerisinden izole edilerek *in vitro* koşullarda özel hazırlanmış besin ortamlarında geliştirilmesi ve bunlardan haploid embriyoların elde edilmesi işlemine ‘mikrospor kültürü’ adı verilmektedir. Dünya literatüründe bu teknik, ‘isolated microspor culture’ veya ‘pollen culture’ biçiminde de adlandırılmaktadır.

Mikrospor kültürü, anter kültürünün bazı olumsuz özelliklerini ortadan kaldırmak ve böylece elde edilecek haploid embriyo sayısını artırmak amacıyla geliştirilmiş bir yöntemdir. Mikrospor kültürünün avantajlarını şöylece sıralamak mümkündür (Pierik, 1989; Foroughi-Wehr ve Wenzel, 1993; Hess, 1992):

- i. Anter kültüründe, mikrosporlardan başka anter duvarı, septum veya tapetum gibi diploid yapıya sahip anter dokulardan da embriyo oluşması durumuyla karşılaşılabilir. Oluşan diploid embriyoların yaşama kuvvederi, her zaman haploidlere oranla daha fazla olmakta ve haploid embriyolarla istenmeyen bir rekabete girmektedirler. Mikrospor kültürü yapılarak, diploid yapıya sahip anter dokuları ortamdaki uzaklaştırılmak ta ve böylece donör bitkinin yapısına sahip embriyo rejenerasyonu olasılığı tamamen ortadan kaldırılmaktadır.
- ii. Anter kültüründe mikrosporlar, besin ortamındaki maddeleri anter duvarından geçtikten sonra alabilir. Mikrospor kültüründe ise besin maddelerinin polen taneciklerine taşınmasında engel olarak görülebilecek anter dokusu uzaklaştırıldığından, polenlerin besin ortamıyla doğrudan teması sağlanmış olmaktadır.
- iii. Anter dokusunda bulunan bazı engelleyici maddeler (ABA veya toksik maddeler), anterle birlikte ortamdaki uzaklaştırıldığından sorun olmaktan çıkarlar.
- iv. Tek bir polen tanesinden doğrudan embriyoya dönüşüm sağlanabildiğinden gen transferi çalışmaları için çok uygun bir kültür şeklidir. *Agrobacterium* aracılığı ile genetik transformasyon çalışmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır.
- v. Biyotik veya abiyotik kökenli stres koşullarına dayanıklılık amaçlandığında *in vitro* seleksiyon için çok uygun bir yöntemdir.
- vi. Polen taneleri, mutasyon araştırmaları ve genetik manüplasyonlar için anterlere göre daha uygun bir başlangıç materyalidir.
- vii. Kültür koşullarında embriyo oluşumunu izlemek, anter kültürüne göre daha kolay olmaktadır.
- viii. Daha fazla sayıda homojen materyal ile çalışma olanağı sağlar ve sayısal olarak haploid embriyo verimi, anter kültürüne oranla daha yüksektir. Örneğin, mikrospor kültürü kolzada embriyo üretimi bakımından anter kültürüne göre çok daha verimlidir.

Mikrospor kültürü yoluyla haploid bitkilerin elde edilmesi ilk kez Nitsch (1974) tarafından bildirilmiştir. İlk mikrospor kültürü çalışmaları tütün (*Nicotiana tabacurri*) ve mısır (*Zea mays*) (Pesticelli ve ark., 1989) bitkilerinde gerçekleştirilmiştir. Günümüzde ise anterlerden izole edilen mikrosporların kültüre alınmasıyla birçok bitki türünde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Patates (Uhrig, 1985), kolza (Lichter, 1982), Datura (Nitsch ve Norreel, 1973), arpa (Sunderland ve Xu, 1982), buğday (Datta ve Wenzel, 1987), çeltik (Chen ve ark., 1981) ve patlıcan (Miyoshi, 1996) türlerinde mikrospor kültürü yoluyla elde edilmiş haploid bitkiler rapor edilmiştir.

Mikrosporların kültüre alınabilmesi için öncelikle anter dokusundan izole edilmeleri gereklidir. Tek çekirdekli dönemde oldukları belirlenen mikrosporlar, anterlerden ya mekanik olarak ayrılırlar; ya da başlangıçta bir süre sıvı besin ortamlarının içerisinde bekletilen anterlerden ortamın içerisine dökülmeleri sağlanır. Mikrospor kültürü tekniğinin uygulanışı şematik olarak Şekil 5.10'da gösterilmiştir.



Şekil 5.10. Mikrospor kültürünün uygulanışı: Genç bir çiçek tomurcuğundan (A) çıkartılan olgunlaşmamış anterler (B), Potter homojenizörünü kullanarak homojenize edilir (C). Bu yolla elde edilen, anter dokularıyla karışık polen süspansiyonu (D), filtre edilerek istenmeyen dokulardan arındırılır (E). Süspansiyon, süzme işleminden sonra santnfüj edilerek (F) mikrospordan oluşan çökelti elde edilir ve üzerindeki sıvı boşaltılır (G). Mikrosporlar besin ortamıyla yeniden süspansiyon haline getirilerek pipet yardımıyla (H) petri kutularındaki kültür ortamının üzerine inoküle edilirler (K) (Pierik, 1989'dan alınmıştır).

Mikrospor kültürünün yukarıda açıklanan avantajlarına rağmen, bu yolla polenlerden haploid bitki rejenerasyonu günümüzde de hala zordur ve polenin *in vitro* koşullarda gelişerek farklılaşması, çok özelleşmiş tekniklere gereksinim duyar. Anter kültürüne göre çok daha fazla komplike besin ortamlarının kullanılması gereklidir. Polen kültürü, *Petunia hybrida*, *Ijycopersicon esculentum*, *Brassica oleraceae*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum* ve *Datura innoxia* türlerinde başarılı sonuçlar verdiği ve haploid embriyoların elde edilmesi için elverişli olduğu halde; bitki türlerinin büyük çoğunluğunda başarısız bir yöntemdir.

5.2.3. Androgenesis sonrasında albino bitki sorunu

Çift çenekli bitki türlerinin anter kültürlerinden elde edilen bitkiler veya dişi gamet kökenli bitkiler arasında çok nadir olarak ortaya çıkmasına karşın; tek çenekli bitkilerde zaman zaman albino bitkiler oluşabilmektedir. Tahıllarda anter kültürü yoluyla elde edilen bitkilerde klorofil içermeyen beyaz renkli albino bitkilerin sıklıkla ortaya çıkması önemli bir sorundur. Albinizm olarak adlandırılan bu olayının nedeni tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Androjenetik yolla rejenere olmuş çeltik bitkilerinin proplastidleri ve plastid genomları üzerinde yapılan detaylı araştırmalar, membran yapısında bazı bozulmalar olduğu gibi plastid gelişmesi sırasında da bazı eksiklikler oluştuğunu göstermiştir. Ancak bu bozulmaların olgunlaşmamış mikrosporlarda mı, yoksa *in vitro* kültür aşamasındaki yaşlanma süreci içerisinde mi ortaya çıktığı bilinmemektedir. Ortaya çıkma nedeni ne olursa olsun, albino bitki oluşma oram, çeşitli faktörlerden önemli düzeyde etkilenmektedir. Hücre çekirdeğinde ve sitoplazmada bulunan genetik materyal, albinizmden büyük oranda sorumlu olmakla beraber fizyolojik faktörleri hiçbir zaman gözardı etmemek gerekir. Nitekim polenin gelişme aşaması (buğday: He ve Ouyang, 1983) ve kültür koşulları (çeltik: Genovesi ve Magill, 1979; arpa: Kuhlmann ve Foroughi-Wehr, 1989) gibi faktörler, albino bitki oluşum oranı üzerinde oldukça etkilidir. Bu nedenle kültür tekniklerinin geliştirilmesiyle, albino bitki oluşumunda büyük ölçüde azalma sağlanabilmesi olası görünmektedir.

5.3. Dişi Gametten Haploidi Uyartımı (Ginogenesis ve Partenogenesis)

5.3.1. Övül ve ovaryum kültürleri

Döllenmemiş yumurtalığın ya da yumurta hücrelerinin kültüre alınmasıyla haploid embriyo ve bitki oluşumuna 'ovaryum' veya 'övül kültürleri' adı verilmektedir. Dişi gametten harekede haploid bitki elde etme çalışmaları 1950'li yılların sonunda hıyarda spontan partenogenetik haploid bitki elde edilmesine yönelik çalışmalarla başlamıştır (Aalders, 1958). Bu ilk uygulamalarda tam olgun olmayan hıyar meyveleri hasat edilmiş, su üzerinde yüzdürme yoluyla hafif

oldukları belirlenen tohumlardan embriyo kültürleri yapılmış ve 13 adet ilk hıyar haploid bitkileri elde edilmiştir.

1980'li yıllarda ovul ve ovaryum kültürlerine olan ilgi yoğunlaşmış ve Tablo 5.1'den de görüleceği gibi değişik familyalardan birçok bitki türünde haploid embriyo uyartımına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Övül veya ovaryum kültürlerinden başarı elde edebilmek için dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardan birisi, yumurtalığın alındığı çiçeğin büyüklüğü, yani yumurtalığın fizyolojik olarak içinde bulunduğu gelişme dönemidir. Yumurtalığın gelişme dönemini pratik olarak belirleyebilmek için kullanılabilecek en etkili yol, aynı çiçek içerisinde bulunan anterlerdeki mikrospor gelişme dönemlerini izlemektir. Arpada yapılan bir çalışmada; antesisten önceki dönemde, polenlerin tek çekirdekli, iki çekirdekli ve üç çekirdekli olduğu aşamalarda aym çiçekte bulunan yumurtalıklar kültüre alınmıştır. Haploid embriyo uyartımı için en elverişli dönemin, iki veya üç çekirdekli polenlere sahip çiçeklerden izole edilen yumurtalıkların içinde bulunduğu dönem olduğu belirlenmiştir (San Noeum, 1976). Buna karşılık, buğday ve tütünde aym çiçeğin polenlerinin tek çekirdekli olduğu dönemde alınan yumurtalıkların haploid bitkiler oluşturduğu belirlenmiştir (Zhu ve Wu, 1979).

5.3.2. Kromozom eliminasyonu

Dişi gametten harekede haploid bitki elde edilmesi kapsamında yer alan bir başka teknik, kromozom eliminasyonundan yararlanmaktır. *Bulbosum* tekniği olarak da adlandırılan bu yöntem; *Hordeum* cinsi içerisinde yapılan türler arası melezlemeler sonucunda oluşan embriyoda, ebeveynlerden birine ait kromozomların kaybolması esasına dayanmaktadır. İlk kez 1969 yılında uygulanan bu teknik, arpada haploid bitkilerin kidesel üretimi için etkili bir biçimde kullanılabilmektedir (Kasha ve Kao, 1970).

Bulbosum tekniği, iki aşamada uygulanmaktadır. Bunlardan birincisi ana ebeveyn olan *Horduem vulgare* ($2n=14$) ile baba ebeveyn olan *H. bulbosum'un* ($2n=14$) melezlenmesidir. Bu aşamada normal olarak bir zigot oluşur ve tozlanmadan itibaren 10 gün süreyle melez embriyo normal bir gelişimi gösterir. Ancak daha sonra embriyodaki *bulbosum* kromozomları yok olmaya başlar ve yaklaşık iki hafta içerisinde geriye sadece *H. vulgarinin* kromozomlarına sahip olan haploid bir embriyo kalır. Bundan sonra *bulbosum* tekniğinin *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen ikinci aşaması başlar. Normal şartlarda aborsiyona uğrayacak olan haploid yapıdaki olgunlaşmamış embriyo, kültüre alınarak kurtarılır ve tam bir arpa bitkisine dönüştürülür. Bu yolla elde edilen arpa bitkilerinin hemen hemen tamamı haploid ($n=7$) kromozom sayısına sahip olmaktadır (Bajaj, 1990; Hess, 1992).

Tablo 5. 1. Övül ve ovaryum kültürleri ile haploid embriyo uyartımı yapılan bitkilerden bazı örnekler.

Bitki Türü	Kültüre Alınan Kısım	Kaynaklar
<i>Allium cepa</i>	Övül	Keller, 1990
<i>Allium porrum</i>	Ovaryum	Özzambak, 1992
<i>Beta vulgaris</i>	Övül	Hossemans ve Bossoutrot, 1983; Bornman, 1985; Doctrinal ve ark., 1989
<i>Cucumis melo</i>	Övül	Dryanovska ve Ilieva, 1983
<i>Cucurbita pepo</i>	Övül	Metwally ve ark, 1998
<i>Gerberajamesonii</i>	Övül	Sitbon, 1981; Meynet ve Sibi, 1984
<i>Helianthus annuus</i>	Ovaryum	Cagnet ve Sitbon, 1981; Cai ve Zhou, 1984 Mix, 1985; Ahmim ve Vieth, 1986; Gelebarth ve San, 1987; Cappadocia ve ark., 1988
<i>Hordeum vulgare</i>	Ovaryum	San Noeum, 1976; Wang ve Kuang, 1981; Huang ve ark., 1982; Gu ve Cheng, 1984
<i>Ullium davidii</i>	Ovaryum	Gu ve Cheng, 1983
<i>Nicotiana rustica</i>	Ovaryum	Zhu ve Wu, 1979
<i>Nicotiana tabacum</i>	Ovaryum	Wu ve Cheng, 1982
<i>Ory'a sativa</i>	Ovaryum	Asselin de Beauville, 1980; Zhou ve Yang, 1980; Kuo, 1982; He ve Yang, 1987 ve 1988
<i>Petunia axillaris</i>	Övül	De Verna ve Collins, 1984
<i>Triticum aestivum</i>	Ovaryum	Zhu ve Wu, 1979; Gussakovskaya ve Najar, 1990
<i>Zea mays</i>	Ovaryum	Ao ve ark., 1982; Truong-Andre ve Demarlv, 1983

5.3.3. Eksik veya yetersiz polenler ile tozlama

Övül ve ovaryum kültürleri üzerinde yapılan çalışmalar arttıkça, çoğu bitki türünde dişi gametlerin *in vitro* koşullarda kültüre alınması yoluyla sadece düşük frekansta haploid embriyoların elde edilebileceği anlaşılmıştır. Bu nedenle, polenlere yapılacak bazı uygulamalarla partenogenetik embriyo oluşumunu uyatarak haploidlerin elde edilme oranını artıracak çalışmalar gündeme gelmiştir. Eksik veya yetersiz polenler kullanılarak partenogenetik embriyo elde etme ve bunları bitkiye dönüştürme çalışmaları 1965’li yıllarda başlamıştır.

Partenogenetik embriyo oluşumunu uyarmak üzere kullanılacak eksik veya yetersiz polenleri elde etmek için, değişik kimyasal maddeler ile radyoaktif ışın uygulamalarından yararlanılmaktadır. Ayrıca, uzak akrabalar arası melezlemeler, tozlamaların geciktirilmesi, sıcaklık şokları da uygulanan diğer tekniklerdir.

Polenlere yapılan bu uygulamalar sayesinde polen generatif çekirdeği inaküf hale getirilmekte, bununla birlikte çimlenme yeteneğini koruyan polenler dışıcık tepesi üzerinde çimlendiklerinde oluşturdıkları uyartım sonucunda, partenogenetik olarak haploid embriyolar meydana gelmektedir.

Çeşitli kimyasallar yardımıyla da tozlamada kullanılacak inaktif hale getirilmiş polenler elde edilebilmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan maddeler kolhisin ve toluidine mavisidir. Yapılan bazı çalışmalarda (Rogers ve Ellis, 1966; Montelongo-Escobedo ve Rowe, 1969) kimyasal madde uygulamalarıyla haploid bitki uyartımı sağlanmış olmakla birlikte, bu yöntemin başarısı oldukça sınırlı kalmıştır. Nitekim bazı kabakgıl türlerinde yapılan çalışmalarda polenlere değişik kimyasal maddelerin ve dozlarının uygulanmasının haploidi uy artımına hiçbir olumlu etkisi saptanmamıştır (Sarı ve ark., 1995; Kurtar, 1999).

Bitki türlerinin, aynı ya da farklı kromozom sayısına sahip olan yakın ya da uzak akraba türlerle tozlanması (interspesifik tozlama) da haploidi uyartımını sağlayabilmektedir. Kavun türünün ilk haploid bitkileri bu yolla elde edilmiş, $2n=24$ kromozom sayısına sahip olan kavunun (*Cucumis melo* L.), $2n=48$ kromozomlu *Cucumis ficifolius* ile tozlanmasından çok düşük oranlarda (ilkbahar aylarında %0.284, sonbahar aylarında %0.070) haploid bitkiler elde edilebilmiştir (Dumas de Vaulx, 1979). Benzer şekilde domateste yapılan ve sonuçları henüz yayınlanmayan bir çalışmaya göre de domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.)'ın yabani bir domates olan *Solanum sisymbriifolium* ile tozlanmasından haploid bitkilerin geliştirildiği ifade edilmektedir (D. Chambonnet, kişisel görüşme).

Polen ışınlaması ve ışınlanmış polenlerle dişi çiçeklerin tozlanması yoluyla haploid embriyoların elde edilmesi 1980'li yıllardan itibaren başlamış ve bu teknikle çok sayıda bitki türünde oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Polen ışınlamasında esas olarak kullanılan ışın türü, Co^{60} kaynağından elde edilen gama ışıdır. Işın görmüş polenlerle tozlama yapıldığında, sıigma üzerinde çimlenmeye başlayan polenin çekirdekleri (genellikle vegetatif çekirdek) bölünmeye başlamaktadır. Polenin bu aktivitesi, embriyo kesesi içerisinde bir uyartıma neden olmakta; ya yumurta hücresi ya da sinerjit veya antipot hücrelerinden biri bölünmeye başlamaktadır. Bu bölünmelerin sonucu olarak düzensiz hücre yığınları (kallus) veya doğrudan embriyolar oluşmaktadır. Polenin, embriyo kesesi içerisinde oluşan bu bölünme uyartımını sağlayabilmesi için canlılığını ve çimlenme yeteneğini kaybetmemiş; ancak aynı zamanda normal dölleme yapamayacak durumda olması gerekmektedir. İşte bu noktada kullanılacak ışın dozu büyük önem taşımaktadır. Türler göre değişmekle birlikte örneğin *Cucurbitaceae* familyası bitkileri için gama ışınının 200—600 Gray'lik dozları haploid embriyo oluşumunu başarıyla uyartabilmektedir.

İşinlanılmış polenlerle yapılan tozlama yoluyla partenogenetik embriyo uyartımı, başta *Cucurbitaceae* familyasına ait türler olmak üzere, şeker pancarı, çilek, kivi, petunya, havuç ve lahana gibi bitki türlerinde başarılı sonuçlar vermiştir. Tablo

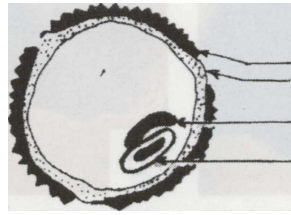
5. *T* de türlerarası tozlama, ışınlanmış veya kimyasal madde uygulanmış polenler ile tozlama sonucu haploid bitki uyartımı gerçekleşen türler ve Şekil 5.11’de kabakgıl sebzelerinde ışınlanmış polenlerle haploid embriyo uyartımının işleyişi gösterilmiştir.

Tablo 5. 2. Eksik polenler ile tozlama ile haploid embriyo uyartımlarına bazı örnekler.

Bitki Türü	Uygulama	Kaynaklar
<i>Actinidia deliciosa</i>	İşinlanmış polen	Pandey ve ark., 1990
<i>Brassica oleracea</i>	İşinlanmış polen	Dore, 1989
<i>Cichorium intybus</i>	Türlerarası tozlama	Dore ve ark., 1996
<i>Citrullus lanatus</i>	İşinlanmış polen	Gürsöz ve ark., 1991 San ve ark., 1994
<i>Cucumisficifolius</i>	Türlerarası tozlama	Zagorcheva ve ark., 1987
<i>Cucumis sativus</i>	İşinlanmış polen	Sauton, 1989 Niemirowicz-Szczytt ve Dumas de Vaulx, 1989 Çağlar ve Abak, 1995
<i>Cucumis melo</i>	Türlerarası tozlama	Dumas de Vaulx, 1979
	İşinlanmış polen	Sauton, 1987
	İşinlanmış polen	San ve ark., 1992a
<i>Daucus carota</i>	İşinlanmış polen	Rode ve Dumas de Vaulx, 1987
<i>Fragaria ananassa</i>	İşinlanmış polen	Caranta, 1992
<i>Malus x domestica</i>	İşinlanmış polen	Zhang ve Lespinasse, 1991
<i>Petunia hybrida</i>	Polen ışınlama	Raquine, 1985
<i>Solanum tuberosum</i>	Kolhisin	Montelongo-Escobedo ve Rowe, 1969

İşinlanmış polen tekniği ile embriyo elde edilmesinden sonra, bu embriyoların bitkiye dönüşümünün sağlanması gerekmektedir. Embriyo kesesi içerisinde gelişen haploid embriyo, normal bir döllenme sonucu oluşmadığı için, endospermden de yoksundur. Dolayısıyla canlılığını uzun süre koruması ve normal bir tohum gibi çimlenerek bitkiye dönüşümü söz konusu değildir. Uyartım sonucu oluşan haploid embriyoların bitkiye dönüştürülebilmesi için embriyo kültürü yapılması gerekmektedir. Oluştugu tohumun içerisinde kurtarılarak *in vitro* koşullarda kültüre alınan embriyoların bitkiye dönüşümleri, birkaç gün gibi oldukça kısa sürede gerçekleşmektedir. Şekil 5.12’de ışınlanmış polenlerle tozlanmanın sağladığı uyartım sonucunda oluşan farklı gelişme

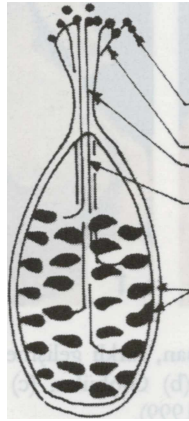
aşamalarında bulunan haploid kabak embriyoları; Şekil 5.13'te yine aynı yöntemle elde edilmiş olan haploid bir kavun embriyosu, Şekil 5.14'te ise tüplere aktarılmış haploid kavun bitkicikleri gösterilmiştir.



POLEN

GAMA IŞINLARIYLA IŞINLAMA

Erkek çiçekler
anthesisten 1 gün
önce alınır



DİŞİ ÇİÇEK

TOZLAMA

İşinlanmış polen

Dişicik tepesi

Çim borusu

Tohum taslakları

Tohum taslakları

**HAPLOİD EMBRİYO
UYARTIMI**

Polen çim burusunun embriyo kesesine
ulaşması tozlamadan 21 saat sonra
gerçekleşir

MEYVE BAĞLAMA



YÜREK ŞEKLİNDEKİ
EMBRİYO



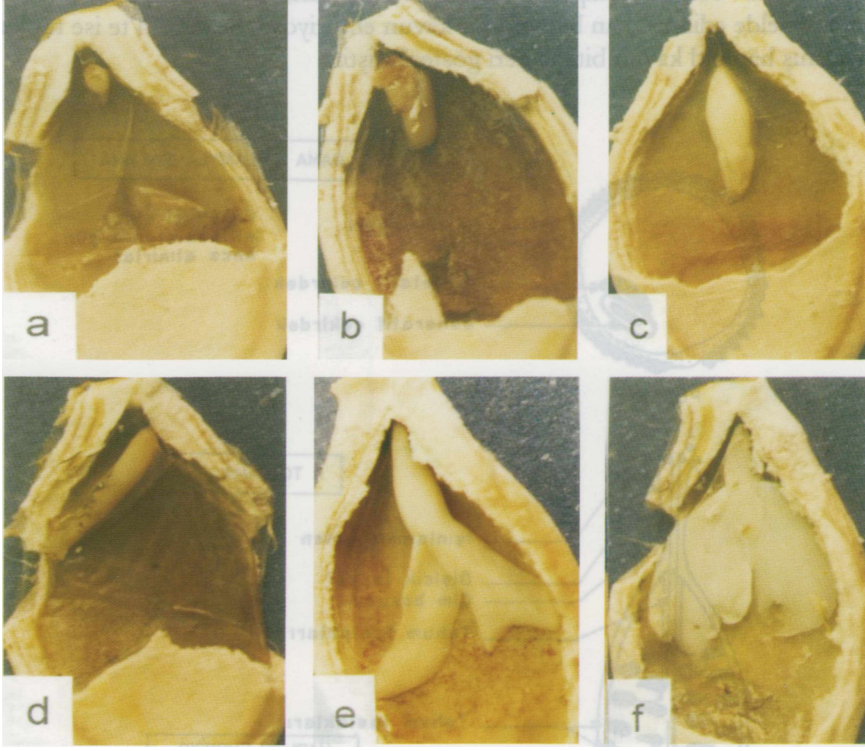
GLOBÜLER AŞAMADA
KALMIŞ EMBRİYO

**HAPLOİD EMBRİYOLARIN
KURTARILMASI**

Tozlamadan 3 hafta sonra iki tane
elde edilir

k

Şekil 5.11. Kabakgıl sebzelerinde işinlanmış polenle haploid embriyo uyartımının işleyişi (Cuny, 1992).



Şekil 5.12. Işınlanmış polenlerle tozlama sonucu oluşan, farklı gelişme dönemlerine sahip partenogenedk kabak embriyoları, (a) Nokta, (b) Globüler, (c) Ok ucu, (d) Çubuk, (e) Torpido, (f) Yürek şekilli embriyo (Kurtar, 1999).

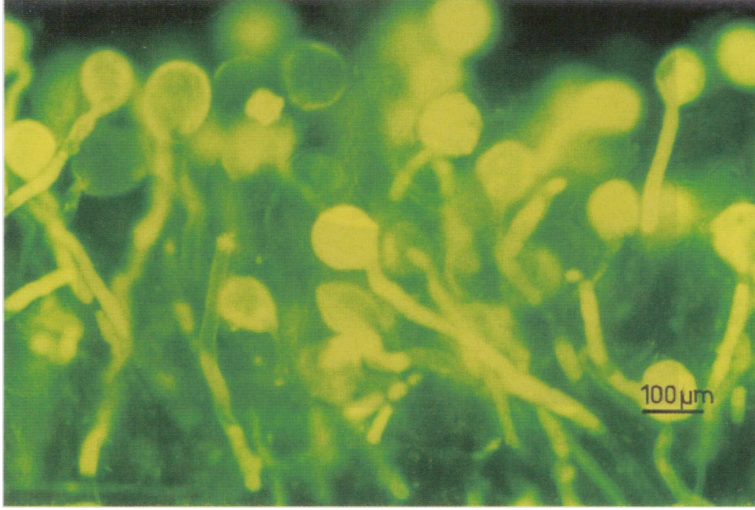
Haploid bitki elde etmek amacıyla ışınlanmış polen yönteminin kullanılmasını sınırlandıran en önemli etken, sürekli ışınlama kaynağına olan gereksinimdir. Işınlanmış polenlerin fazla uzun süre bekletilmeden hemen tozlamalarda kullanılması, elde edilen başarıyı artırmaktadır. Her ne kadar ışın görmüş polenler, ışınlamayı takip eden en fazla 15 gün boyunca canlılıklarını koruyabilmekteyse de, yeterli meyve tutumunun gerçekleşebilmesi için 3 günden daha yaşlı polenlerin kullanılmaması gerekmektedir (Sarı ve ark., 1992b). An tesis günündeki çiçeklerden alınarak ışınlanan polenler, uygun ışın dozu seçilerek ışındığında, bu polenlerin miktar olarak çok büyük bir kısmı stigma üzerinde çimlenebilmekte ve embriyo kesesine kadar ulaşmaktadır. Şekil 5.15'te 1 gün yaşlı ışınlanmış polenlerle tozlanan karpuz stıgması üzerinde çimlenme görülmektedir. Şekil 5.16'da ise ışınlama yapılan ve kontrol amacıyla ışınlanmayan polenlerin +4 °C'de muhafaza edilmesi sonrasında çimlenme oranlarında meydana gelen değışimler gösterilmiştir.



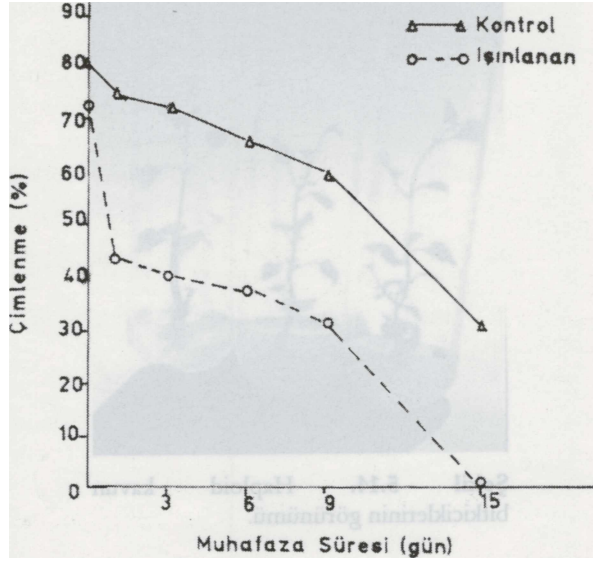
Şekil 5.13. Işınlanmış polen tekniği ile elde edilmiş haploid bir kavun embriyosu



Şekil 5.14. Haploid kavun bitkiciklerinin görünümü.



Şekil 5.15. Işınlanmış karpuz polenlerinin tozlama sonrasında sugma üzerinde çimlenmesi.



Şekil 5.16. +4 °C'de muhafaza edilen, ışınlanmış ve ışınlanmamış kavun polenlerinde çimlenme oranının günlere göre değişimi.

5.3.4. Ginogenesisi etkileyen faktörler

Dişi gametten haploid embriyo elde etmeye yönelik çalışmalardan gerek ovül-ovaryum kültürleri, gerekse uyartılı haploidi olarak adlandırılan eksik polenler ile tozlama yöntemlerinde başarıyı etkileyen çok sayıda faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin en önde gelenleri, genotip, ana bitkilerin yetiştirildiği koşullar, kültür ortamının bileşimi ve inkübasyon koşullarıdır.

Anter kültürlerinde olduğu gibi genotip, haploid embriyo oluşumunu ve frekansını yakından etkileyen bir öğedir. Çok sayıda bitki türünde yapılan ovül-ovaryum kültürü çakışmalarında genotiplere bağk olarak haploid bitki oluşum oranlarının da değiştiği bildirilmektedir (Truong-Andre ve Demarly, 1983; Keller, 1990; Özzambak, 1992). Benzer şekilde uyartık haploidi oluşumunda da genotip önemk bir faktördür. Örneğin Sarı *ve ark.* (1992a)'nın kavunda ısınlanmış polen tekniği ile yaptıkları bir çalışmada *Cucumis melo Y^r.inodorus* grubuna giren kışlık kavunlardan, *Cucumis melo* var. *cantalupensis*'z giren kantalo kavunlarına göre daha yüksek oranda haploid embriyolar elde edilmiştir.

Ovül-ovaryum kültürlerinde kültür ortamı da başarıyı etkileyen faktörler arasındadır. Çeltikte yapılan bir çalışmaya göre, pH'nın 6.4, sakkarozun %6 olduğu ve 2 g/1 maya özü katılan ortam en yüksek haploidi oluşum oranını sağlamıştır (Asselin de Beauville, 1980). Gerbera bitkisinde ise yapılan bir ortam çalışmasında en elverişli ortamın MS temel ortamı + 2 mg/1 BAP veya kine tin + 0.5 mg/1 IAA olduğu kaydedilmiştir (Sitbon, 1981). Şeker pancarında ise temel besi ortamına 2 mg/1 oksin ve 80 g/1 sakkaroz katılmasının haploid bitki oranını % 4.4'e kadar çıkardığı saptanmıştır (Bossoutrot ve Hosemans, 1985). Övül kültürü ile şeker pancarında haploid embriyolar elde eden Gürel *ve ark.* (2000), besin ortamına aktif kömür ilave edilmesinin embriyo üretimini artırdığını; buna karşılık gümüş nitrat ilave edilen ortamlarda embriyo oluşumunun azaldığını veya tamamen engellendiğini belirlemiştir.

Haploid oluşum oranını etkileyen faktörlerden bir diğeri, bitkilerin yetiştirme koşulları, özellikle de yetiştirme dönemindeki sıcaklık ve günlük ışıklanma süresidir. Örneğin gerberada yapılan bir çalışmada (Meynet ve Sibi, 1984) haploid bitki eldesinin mevsimden etkilendiği; haziran ayı başında bu oranın %4.64 olduğu, eylül ayında ise %7.47'ye yükseldiği bildirilmektedir. Kavunda ısınlanmış polen tekniği kullanılarak Fransa'da yapılan çalışmalarda da mevsimin haploid embriyo uyartımı için önemli bir etken olduğu, güneşlenme periyodunun 10 saatin ve global radyasyonun 15 mj nr²'nin üzerinde seyrettiği 15 Haziran-15 Eylül tarihleri arası yapılan tozlamaların en başarılı sonuçları verdiği bildirilmiştir (Sauton, 1988).

Çiçek tomurcuklarına uygulanan +4 °C'deki soğuk şokları, anter kültüründe olduğu gibi övül kültüründe de olumlu etki yapabilmektedir. Nitekim Gürel *ve ark.* (2000), şeker pancarında çiçek tomurcuklarının değişik sürelerde soğuk

uygulamalarından geçirildikten sonra övül kültüründe kullanılması halinde embriyo oluşum oranının arttığını rapor etmiştir.

5.4. Haploid Bitkilerde Kromozom Katlama

Haploid bitkilerin elde edilmesindeki temel yaklaşım kuşkusuz bu bitkilerin kromozom setlerinin iki katına çıkartılması (katlanması) ve %100 homozigot safhadarın hızla geliştirilmesidir. Kromozom kadanması bazı bitki türlerinde kendiliğinden meydana gelmekle birlikte, pratikte çoğunlukla kimyasal madde uygulamalarıyla gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla azot protoksit, kafein, kloral hidrat, asenaften, sulfinilamid, etil merkuriklorid, heksaklorosikloheksan ya da kolhisin gibi an timi to tik özellik gösteren kimyasallardan yararlanılmaktadır. Yine bu amaçla 2,4 D ve NAA gibi hormonlar (Changdeng *ve ark.*, 1998) ve trifluralin ve orizalin gibi bazı herbisitler (Bouvier *ve ark.*, 1994; Hansen ve Andersen, 1998) de kullanılabilir. Günümüzde kromozom katlaması için bitki ıslahçıları tarafından en yaygın kullanılan kimyasal madde, kolhisindir. Bu madde *Uliaceae* familyasına ait *Colchicum autumnale* L. (güz çiğdemi) bitkisinin köklerinden elde edilen, alkaloid yapısında kuvvetli bir zehir olup; alkol, kloroform ve soğuk suda eriyen, buna karşılık sıcak suda ve eterde erimeyen bir maddedir. Kimyasal formülü $C_{22}H_{25}O_6$ olarak gösterilen 'kolhisin', değişik kaynaklarda 'kolkisin', 'kolşisin' veya 'kolçisin' olarak da ifade edilebilmektedir. Kolhisin, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve dolayısı ile replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar.

Dihaploidizasyon için değişik bitki türlerinde farklı yöntemler uygulanmıştır. Bunlar aşağıda özetlenmiştir:

- Mısır (Wan *ve ark.*, 1989) ve güzelavrat otu (Rashid ve Street, 1974)'nda olduğu gibi kallus dokusu veya hücre süspansiyonuna kimyasal madde uygulamaları,
- Kuşkonmaz (Dore, 1976), gerbera (Honkanen *ve ark.*, 1991) ve buğday (Navaroo-Alvarez *ve ark.*, 1994)'da olduğu gibi kolhisinin kültür ortamına katılması,
- Buğday, arpa ve çim türlerinde olduğu gibi haploid bitkilerin köklerine kolhisin uygulaması,
- Şeker pancarı (Bossoutrot ve Hosemans, 1985), pamuk (Luckett, 1989), patlıcan (Dumas de Vault, 1992) ve biber (Abak, 1993)'de olduğu gibi haploid bitkilerin aksiller tomurcuklarına kolhisin uygulaması,

Kavun (Sauton, 1987), karpuz (San ve Abak, 1996) ve hıyar (Çağlar ve Abak, 1997)'da olduğu gibi *in vitro* bitkiciklerin veya bunların çeliklerinin belli bir süre kolhisin çözeltisi içinde bekletilmesi (Şekil 5.17),

Kavunda (Sarı ve ark., 1999a) olduğu gibi tepe tomurcuklarının kolhisin çözeltisi içerisinde *in vivo* koşullarda bandırılması (Şekil 5.18).



Şekil 5.17. Haploid kavun bitkilerine *in vitro* koşullarda kolhisin uygulanması



Şekil 5.18. Haploid kavun bitkilerine *in vivo* koşullarda kolhisin uygulanması

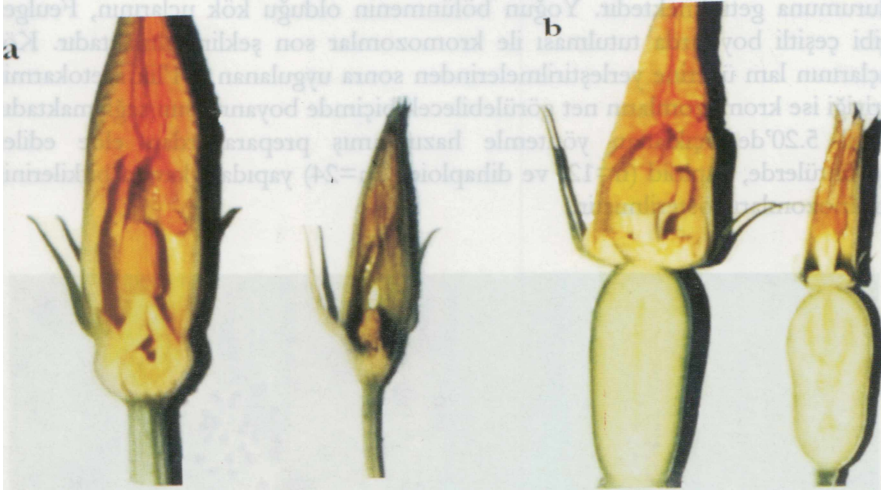
5.5. Ploidi Belirleme

Bitkilerde ploidi düzeyinin belirlenebilmesi için değişik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bitkinin fenotipe göre yapılan ayrımlar kromozom sayısı bakımından bir fikir verse de, kuşkusuz ploidi belirlemede kullanılan en eski ve en güvenilir yöntem, hızlı büyüyen doku ve organlarda (özellikle kök uçlarında) yapılan kromozom sayımlarıdır. Ancak son yıllarda kromozom sayımlarına alternatif yöntemler de geliştirilmiş ve değişik bitki türlerinde uygulama alanı bulmuştur. Flow sitometri ve stoma hücrelerinde yapılan gözlemlere dayanarak geliştirilen yöntemler, günümüzde ploidi düzeyinin belirlenmesinde kromozom sayımlarının yanısıra rutin olarak kullanılabilir aşamaya gelmiş yeni tekniklerdir.

5.5.1. Fenotipik gözlemler

Bitkilerin kromozom sayısı arttıkça, yani poliploidi oluşması halinde bitkinin tüm organlarında bir irileşme meydana gelmekte; buna karşılık haploid bitkilerin elde edilmesi halinde bitkinin organları tam olarak oluştuğu halde diploidlere göre daha küçük olmaktadır. Gerçekten de ister androgenetik, isterse gynogenetik yolla elde edilmiş olsun; haploid bitkiler, diploid bitkilerle karşılaştırıldıklarında tüm organlarının daha küçük yapıldıkları görülmektedir. Kurtar (1999), Urfa Yerli kabak çeşidinin diploid bitkilerinde büyüme ucundan itibaren 7. yaprağı ölçtüğünde yaprak eninin 34.6 cm, yaprak boyunun ise 40.8 cm olduğunu; aynı çeşitten elde edilen haploid bir bitkide yaprak eninin 19.5 cm, yaprak boyunun 22.3 cm olarak ölçüldüğünü belirtmiştir. Aynı çalışmada haploid bitkilerin, normal yetiştirme koşullarında diploidler gibi çiçek açtıklarını, fakat çiçeklerin morfolojik ve biyolojik olarak farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur. Haploid bitkilerde hem erkek, hem de dişi çiçekler, diploidlere göre daha küçük yapıldıkları olmuş (Şekil 5.19 a ve b); erkek çiçeklerin polen taşımadıkları ve açmadan kuruyup döküldükleri, dişi çiçeklerin çok küçük bir stigma ve yumurtalığa sahip olduğu, ancak normal polenlerle tozlandığında hiçbir şekilde meyve bağlamadıkları belirlenmiştir. Tüm bunlar, diğer bitki türlerinde elde edilen haploid bitkilerde de bildirilen ortak bulgulardır (Karakullukçu, 1991; Çağlar ve Abak, 1996; Sarı ve ark., 1996b).

Fenotipik olarak haploid bitkilerin ayrımının yapılması hızlı ve masrafsız bir yöntem olmasına karşın, güvenilirliği azdır. Bitkilerin fenotipik olarak görünüşlerine bakarak, erkek ve dişi organların gelişmesini, polen oluşup oluşmadığını veya meyve tutup tutmadığını belirleyerek, sadece o bitkinin haploid olma olasılığının yüksek olduğu yönünde bir görüş bildirmek mümkündür. Bu görüşü kanıdamak için mudaka diğer yöntemlerden biri ile desteklemek gerekmektedir.



Şekil 5.19. Diploid (solda) ve haploid (sağda) kabak bitkilerine ait, anthesis'ten bir gün önceki aşamada (a) erkek çiçekler, (b) dişi çiçekler (Kurtar, 1999).

5.5.2. Kromozom sayımları

Bitkilerin genellikle kök uçlarında yapılan kromozom sayımları, deneyimli elemana gereksinim göstermesi ve preparat hazırlama sırasında yapılan hidroliz, boyama gibi işlemlerin uzun süre alması gibi dezavantajlarının yanında güvenilirliği en fazla olan yöntemdir. Sağlıklı ve güçlü bir gelişme gösteren taze kök uçlarından, bölünmenin en hızlı olduğu sabah saaderinde alınan örnekler, kromozom sayımları için en uygun materyaldir. Kromozom sayımlarında ilk işlem, mitoz bölünmenin metafaz aşamasında iğ iplikçiklerinin yapısını bozarak iğ oluşumunu engellemek, kromozomların ekvatorial tablada toplanmasını sağlayarak, hücre içinde dağılmasının önüne geçmektir. Bu amaçla OC-monobromonaftalin kullanılmaktadır. Bu madde, iğ ipliklerinin oluşumunu durdurmakta, kromozomların kısalmasını ve düzelmesini sağlamaktadır (Elçi, 1982). Değişik bitki köklerinde kromozom sayımları için doymuş OC-monobromonaftalin içerisinde kalma süresi farklı olmakla birlikte bu süre genellikle 3-4 saattir. Daha sonra çözeltinin köklerden süzülmesi ve uzaklaştırılması için de köklerin birkaç kez su ile yıkanması gerekmektedir. Bu uygulamaların ardından yapılan, glacial asetik asit içerisinde tespit işlemi ile hücrelerin hayat seyrinin birdenbire sona erdirilmesi ve mümkün olduğunca hayattaki durumunu bozmadan gözlenmesi amaçlanır. Hücrelerin birbirinden ayrılması ve daha iyi gözlenmesi için yapılan hidroliz işlemi, iyi bir preparat yapılabilmesi için en önemli aşamalardan birisidir. Genellikle 1 N HCl içerisinde 60° C'de 10-20 dakika sürelerle yapılan hidroliz işlemiyle hücreler, aralarında

birleştirici bir kuvvet bulunmayan serbest hücrelerden oluşan bir yığın durumuna getirilmektedir. Yoğun bölünmenin olduğu kök uçlarının, Feulgen gibi çeşitli boyalarda tutulması ile kromozomlar son şeklini almaktadır. Kök uçlarının lam üzerine yerleştirilmelerinden sonra uygulanan %1'lik asetokarmin eriyiği ise kromozomların net görülebilecek biçimde boyanmasını sağlamaktadır. Şekil 5.20'de açıklanan yöntemle hazırlanmış preparatlardan elde edilen görüntülerde, haploid ($n=12$) ve dihaploid ($2n=24$) yapıdaki kavun bitkilerinin kromozomları gösterilmiştir.



Şekil 5.20. Haploid (solda) ve dihaploid (sağda) kavun bitkilerinin kromozomları.

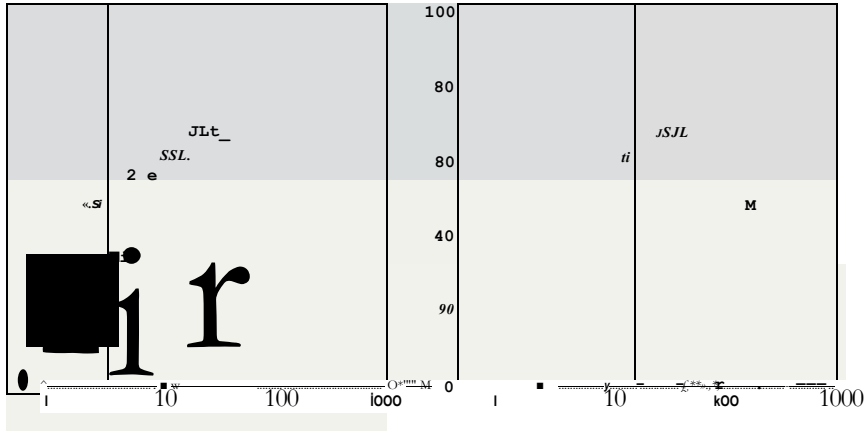
5.5.3. Flow sitometri

Otomatik floresan yönteminin bulunmasının ardından hücrelerde kromozom sayılarının belirlendiği ploidi ölçümleri, insan onkolojisinde çok geniş bir uygulama alanı bulmuştur (Göhde *ve ark.*, 1979). Daha sonra bazı bitki bilimciler yöntemi 'flow sitometri' olarak adlandırmışlar ve pekçok bitki türüne giren çok sayıda genotipte bitki hücrelerindeki çekirdekse DNA ölçümlerinde kullanmışlardır (Galbraith *ve ark.*, 1983; Ulrich *ve Ulrich*, 1986).

Ploidi belirlemesi için klasik kromozom sayımları iyi bir laboratuvar altyapısı ve deneyimli elemana ihtiyaç göstermekte; bu koşullar sağlansa bile bazı bitki türlerinde kromozom sayımlarının çok güç olması nedeniyle bazen olanaksız olabilmektedir. Diğer yöntemlerin de etkili olarak çalışmadığı durumlarda flow sitometri, güvenilir ve geçerli sonuçlar sunmaktadır. Flow sitometri (Flow cytophotometric, FCM), hücrelerin tek tek floresans dedektörden geçerken emdiklerin ışının analizine dayanan bir yöntemdir. Bunun için enzimatik olarak parçalanmış yaprak örneklerinde hücre çekirdekleri serbest bırakılmakta, H 33258 veya DAPI gibi floresans boyalarla boyanan hücre çekirdeklerinde, çekirdekse DNA miktarı belirlenmektedir. Her bitki türü için yöntemin optimize edilme gereksinimi, bu yöntemin dezavantajlarından biri olsa da;

mikso-ploid hücrelerin varlığının ortaya çıkartılması, bir kişinin günde 100'den fazla bitkide analiz yapabilme olanağını sunması gibi avantajları, flow sitometrinin günümüzde kromozom sayımlarının yapılması için en fazla tercih edilen yöntem haline gelmesine neden olmuştur.

Flow sitometri yöntemiyle, şeker pancarı (De Laat *ve ark.*, 1987), buğday (Löchenberg *ve ark.*, 1990), patates ve portakal (Lucretti *ve ark.*, 1990), karpuz (Gürsöz *ve ark.*, 1991, Sarı *ve ark.*, 1999b) (Şekü 5.21), kavun (Borgel *ve ark.*, 1990), kivi (Ollitrault-Sammarcelli *ve ark.*, 1994), hıyar (Kubalakova *ve ark.*, 1996), biber ve patıcanda (Dolcet-Sanjuan *ve ark.*, 2000) ploidi seviyeleri belirlenmiş ve gerekli işlem akışı ortaya konmuştur.



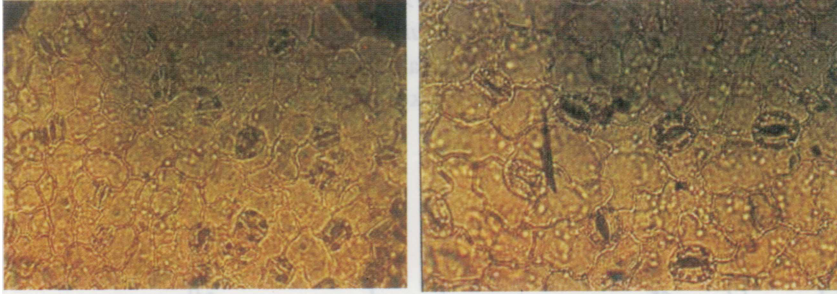
Şekil 5.21. Karpuzda haploid ve dihaploid bitkilerde flow sitometre sonuçları.

5.5.4. Stomatal incelemeler

Bilindiği gibi stomalar, yaprak epidermisinde gömülü olarak bulunan, havadaki karbondioksitin yaprağa girmesini, su ve oksijenin ise yapraktan çıkmasını sağlayan açıklıklardır. Değişik bitki türlerinde stomaların iriliği, dolayısıyla birim alanda bulunan s torna sayısı ile ploidi düzeyi arasında güvenilir ilişkiler saptanmıştır. Örneğin kereviz (Şalk, 1979), tütün (Emiroğlu, 1980), brüksel lahanası (Dore, 1986), havuç (Rode ve Dumas de Vaulx, 1987), karpuz (Sarı *ve ark.*, 1999b), kavun (Abak *ve ark.*, 1996), hıyar (Çağlar ve Abak, 1996), kahve (Mishra, 1997), biber (Abak *ve ark.*, 1998) ve kabak (Kurtar, 1999)'ta haploid bitkilerin s tornalarının diploidlerine göre daha küçük olduğu, dolayısıyla birim alanda daha fazla stoma bulunduğu saptanmıştır.

Stomalar içerisinde bulunan kloroplasların sayısı da bazı bitki türlerinde (şeker pancarı: Doctrinal *ve ark.*, 1989; karpuz: Sarı *ve ark.*, 1999b; kavun: Abak *ve ark.*, 1996; hıyar: Çağlar ve Abak, 1996; biber: Abak *ve ark.*, 1998; kabak: Kurtar, 1999) ploidi ayırıcı, güvenilir bir yöntem olarak dünya literatüründe yer

almaktadır. Buna rağmen, çilek (Quarto ve ark., 1991) gibi poliploidi olgusu yaygın olan bitkilerde kloroplast sayıların ploid belirlmek için yeterli olmadığı, mudaka kromozom sayılarıyla desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır. Şekil 5.22'de haploid ve dihaploid karpuz bitkilerine ait stomata ve kloronl astlar gösterilmiştir



Şekil 5.22. Dihaploid (solda) ve haploid (sağda) karpuz bitkilerine ait stomata ve içerisindeki kloroplastlar.

Kaynaklar

- Aalders KEO (1958) Monoploidy in cucumbers. J. Hered.,49: 41-44.
- Abak K (1983) Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerinde araştırma. A.Ü.Ziraat Fakültesi Yıllığı, Cilt 33, Fas.1-2-3-4'den ayn basım.
- Abak K (1993) Biber ıslahında anter kültüründen yararlanma. Bitki Islahı Simp. Bild., TÜBİTAK TOAG Yay.: 59-66.
- Abak K, San N, Paksoy M, Yılmaz H, Aktaş H, Tunalı C (1996) Kavunda ışınlanmış polen tozlamaları ile haploid embriyo uyarımında genotip etkisi, dihaploid hatların oluşturulması, haploid ve diploid bitkilerin değişik yöntemlerle ayrımı. Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi, 20: 425-430.
- Abak K, Çömlekçioglu N, Büyükcalacı S, San N (1998) Use of stomatal characteristics to estimate ploidy level of haploid and dihaploid pepper plants. Xth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, 1998, Avignon-France, 179-182.
- Ağaoğlu YS, Ellialtıoğlu Ş, Maraslı B, Kalyon D (1998) Asmada (*Vitis vinifera* L.) androgenetik kallus oluşumu üzerine araştırmalar. II. Uluslararası Kızıllırmak Fen Bilimleri Kongresi, s. 89-99, 20-22 Mayıs 1998, Kırıkkale.
- Ahmim M, Vieth J (1986) Production de plantes haploides de *Gerbera jamesonii* par culture d'ovules. Can. J. Bot., 64: 2355-2357.
- Ao GM, Zhao SX, Li GH (1982) *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of corn (*Zea mays* L.). Ağa Gen Sin., 9: 281-283.

- Asselin de Beauville M (1980) Obtention d'haploïdes *in vitro* a partir d'ovaires non fécondes de Riz, *Oryza sativa* L., C.R. Acad. Sci. Paris, 290: 489-492.
- Bajaj YPS (1983) *In vitro* production of haploids. In: Evans DA, Sharp VR, Ammirato PV, Yamada Y (eds), Handbook of Plant Cell Culture, Mc Millan Publ. Co. Vol.I Chapter 6, pp. 228-287.
- Bajaj YPS (1990) Haploids in Crop Improvement I. Springer-Verlag Berlin, 549 p.
- Blakeslee AF, Belling J, Farnham ME, Bergner AD (1922) A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. Science, 55: 646-647.
- Borgel A, Favier F, Bergounioux C (1990) Mixoploidy in plants obtained by haplomethod, cytometric DNA quantitative analysis. VII. Int. Cong. on Plant Tissue and Cell Culture, 24-29 June 1990, Amsterdam, 174.
- Bornman CH (1985) Haploidization of sugarbeet (*Beta vulgaris*) via gynogenesis. In Vitro, 21: 36A.
- Bossoutrot D, Hosemans D (1985) Gynogenesis in *Beta vulgaris* L. from *in vitro* culture of unpollinated ovules to the production of doubled haploid plants in soil. Plant Cell Rep., 4: 300-303.
- Bourgin JP, Nitsch JP (1967) Obtention de *Nicotiana* haploïdes a partir d'étamines cultivées *in vitro*. Ann. Pysiol. Veget., 9: 377-382.
- Bouvier L, Fillon FR, Lespinasse Y (1994) Oryzalin as an efficient agent for chromosome doubling of haploid apple shoots *in vitro*. Plant Breed., 113: 343-346.
- Bullock WP, Baenziger PS, Schaffer GW, Bottino PJ (1982) Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) Ffs and their reciprocal crosses. Theor. Appl. Genet., 62: 155-159.
- Cagnet Sitbon M (1981) Production of haploid *Gerbera jamesonii* by culture of unfertilized ovules. Agronomie, 1: 807 -812.
- Cai DT, Zhou C (1984) *In vitro* induction of haploid embryoids and plantlets from unpollinated young florets and ovules of *Helianthus annuus* L. Kexue Tonbao, 29: 680 - 682.
- Cappadocia M, Chretien L, Laublin C (1988) Production of haploids in *Gerbera jamesonii* H.Bolus ex Hook via ovule culture: Influence of fall and spring sampling on callus formation and shoot regeneration. Can. J. Bot., 66: 1107 -1110.
- Caranta C (1992) Essai d'induction de la parthenogenese haploïde par du pollen irradié chez le fraisier cultivé (*Fragaria ananassa* Duch.) et étude du gametophyte femelle. Memoire (D.E.A.) option Sciences Agronomiques: Amelioration des Plantes, Faculte des Sciences de Luminy, Marseille, 15 p.
- Changdeng Y, Lianbin W, Chengzhang Z (1998) *In vitro* regulation of haploid somaclonal micro-buds in indica rice. Chinese J. Rice Sci., 12, 4: 219-222.
- Chen Y, Zuo Q, Li S, Lu D, Zheng S (1981) Green plant regenerated from isolated rice pollen grains *in vitro* and the induction factors. Acta Genet. Sin., 8: 158-163.

Cuny F (1992) Processus d'induction d'embryons haploides par du pollen irradie chez le melon (*Cucumis melo* L.). Response du pollen a l'irradiation gamma. These de Docteur, Specialite: Biologie et Cytologie Vegetales, Univ. D'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon, 139 p.

Çağlar G, Abak K (1995) Farklı hıyar genotiplerinde ışınlanmış polenlerle uyartım yoluyla haploid embriyo ve bitki eldesi. Türkiye II.Ulusal Bahçe Bitkileri Kong. Cilt II, 159-162.

Çağlar G, Abak K (1996) Hıyarda ploidı düzeyının belirlenmesinde bazı morfolojik özelliklerin sitolojik yöntemlere alternatif olarak kullanılabilirliğı üzerinde bir araştırma. GAP 1, Sebze Tarımı Simp., 7-10 Mayıs 1996, Şanlıurfa, 357-366.

Çağlar G, Abak K (1997) *In vitro* colchicine application of haploid cucumber plants. Cucurbit Genetics Coop., 20: 21-23.

Dale PJ (1975) Pollen dimorphism and anther culture in barley. Planta (Berlin), 127: 213-220.

Datta SK, Wenzel G (1987) Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. Plant Sci., 48: 49-54.

De Laat AMM, Göhde W, Vogelzang MJ (1987) Determination of ploidy of single plants and plants populations by flow cytometry. Flow Cytometry, 99: 303-307.

Demarly Y, Sibi M (1989) Amelioration des Plantes et Biotechnologies. John Libbey and Company Ltd., Paris.

De Varna JW, Collins GB (1984) Maternal haploids of *Petunia axillaris* (Lam) BSP via culture of placenta attached ovules. Theor Appl. Genet., 69: 187-192.

Doctrinal M, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS (1989) *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.; Effects of plant regulators, temperature, genotypes and season. Plant Celi Tiss. Org. Cult, 17: 1-12.

Dolcet-Sanjuan R, Claveria E (2000) Androgenesis in sweet beli pepper (*Capsicum annuum* L.) and eggplant (*Solanum melongena* L.) used for the production of commercial hybrid varieties. 4th Int. Symp. on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding, 2-7 July 2000, Tampere, Finland, Abstracts: 58.

Dore C (1976) Doublement du stock chromosomique d'haploides d'asperge (*Asparagus officinalis* L.) par culture *in vitro* des meristemes en presence de colchisine. Ann. Amelior. Plantes, 26, 4 : 647-653.

Dore C (1986) Evaluation du niveau de ploidie des plantes d'une population de choux de bruxelles (*Brassica oleracea* Vsspigenmijferd) d'origine polnıque. Agronomie, 9: 797-801.

Dore C (1989) Obtention de plantes haploides de chou cabus (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata*) apres culture *in vitro* d'ovules pollinises par du pollen irradie, C.R. Acad. Sci. Paris, 309, Serie III, 729-734.

Dore C, Prigent J, Desprez B (1996) *In situ* gynogenetic haploid plants of chicory (*Cichorium intybus* L.) after intergenic hybridisation with *Cicerbita alpina* Walbr. Plant Celi Rep, 15: 758-761.

- Dryanovska OA, Ilieva IN (1983) *In vitro* anther and ovule cultures in muskmelon. R. Acad. Bulgar. Sci, 36, 8: 1107-1110.
- Dumas de Vault R (1979) Obtention de plantes haloides chez le melon (*Cucumis melo* L.) apres pollinisation par *Cucumis ficifolius* A.Rich. Acad. Sci., Paris, Serie D, 289: 875-878.
- Dumas de Vault R (1992) Polyploidisation In: J. Jahier (ed.). Techniques de Cytogenetique Vegetale, INRA, Paris pp. 149-165.
- Dumas de Vault R, Chambonnet D (1982) Culture *in vitro* d'antheres d'aubergine (*S. melongena* L.); Sdmulation de la production de plantes qu moyen de traitements a +35 °C associes a de faibles teneurs en substances de croissance. Agronomie, 2, 10: 983-988.
- Dumas de Vault R, Chambonnet D, Pochard E (1981) Culture *in vitro* de antheres de piment (*Capsicum annuum* L.): Amelioration des taux de obtention de plantes chez differents genotypes par des traitements a +35 °C . Agronomie. 1,10: 859-864.
- Dunwell JM (1981) Influence of genotype and environment on growth of barley embryos *in vitro*. Ann. Bot., 48: 535-542.
- Dunwell JM, Perry E (1973) The influence of *in vivo* growth conditions of *N. tabacum* plants on the *in vitro* embryogenetic potential of their anthers. John Innes Inst. Rep., 64: 69-70.
- Elçi Ş (1982) Sitogenedkte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri. F.Ü.Yay., Elazığ, 159 s.
- Ellialtıoğlu Ş, Tıprıdamaz R (1997) Soğuk uygulamaları ve aktif kömürün patlıcan ve biberde *in vitro* androgenezis üzerine etkileri. TÜBİTAK - TOGTAG 87 No'lu proje Sonuç Raporu, 70 s. Ankara.
- Emiroğlu Ü (1980) Türk tütün çeşitlerinde anter kültürü. Bitki Islahı Simp., 22-25 Mayıs 1979, Ege Bölge Zir. Müc. Araş. Enst., No: 17/41, 12-18.
- Foroughi-Wehr B, Wenzel G (1993) Andro- and parthenogenesis. In: Hayvard MD, Bosemark NO, Ramagosa I (eds), Plant Breeding: Principles and Prospects. Chapman & Hail, London, pp. 261-277.
- Foroughi-Wehr B, Zeller FJ (1990) Recurrent selection alternating with haploid steps a rapid breeding procedure for combining agronomie traits in inbreeders. Theor. Appl. Genet., 80: 564-568.
- Fridborg G, Pedersen M, Landström LE, Eriksson T (1978) The effect of activated charcoal on tissue cultures adsorbition of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiol. Plant, 43: 104-106.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NA, Sharma DP, Firoozabady E (1983) A rapid flow cytometric analysis of the celi cycle in intact plant tissues. Science, 220 : 1049-1051.
- Gallais A (1978) Place de l'haploidie dans un schema de selection. Le Selectionneur Français, 26 : 39-49.

- Gelebarth P, San LH (1987) Obtention de plantes haploids par culture *in vitro* d'ovaires et d'ovules non fécondes de tournesol (*Helianthus annuus* L.). *Agronomie*, 7: 81-86.
- Genovesi AD, Collins GB (1982) *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.*, 22: 1137-1144.
- Genovesi AD, Magill CW (1979) Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. *Crop Sci.*, 19: 662-664.
- George EF, Sherrington PD (1984) Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Eastern Press, Reading, Berks, 314-324.
- Goodsell SR (1961) Male sterility in corn by androgenesis. *Crop. Sci.*, 1: 227-228.
- Göhde W, Schumann J, Buchner TH, Otte F, Barlogie B (1979) Pulse cytophotometry application in tumor celi biology and clinical oncology. In: Melamed MR, Mullaney PF, Mendelsohn ML (eds.), Flow Cytometry and Sorting. John Wiley and Sons, New York, 599 p.
- Gresshof PM, Doy CH (1972a) Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. *Aust. J. Biol. Sci.*, 25: 259-264.
- Gresshof PM, Doy CH (1972b) Development and differentiation of haploid *hycopersicon esculentum* MsA. (Tomato). *Planta (Berlin)*, 107: 161-170.
- Guha S, Maheshvvari SC (1966) Celi division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 212: 97.
- Gu ZP, Cheng KC (1983) *In vitro* inducdon of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of lily and its embryological observations. *Açta Bot Sin.*, 25: 24-28.
- Gu ZP, Cheng KC (1984) *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of highland barley. *Açta Bot. Sin.*, 26: 549-551.
- Gussakovskaya MA, Najar MA (1990) induction of haploid plandets from unfertilized ovaries and ovules of wheat cultured *in vitro*. VHth Int. Cong. On Plant Tissue and Celi Culture, 24-29 June 1990, Amsterdam, Abstr., 186.
- Gürel S, Gürel E, Kaya Z (2000) Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Celi Rep.*, 19(12): 1155-1159.
- Gürsüz N, Abak K, Pitrat M, Rode JC, Dumas De Vaulx R (1991) Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Cucurbit Genetics Coop.*, 14: 109-110.
- Hansen NJP, Andersen SB (1998) Efficient production of doubled haploid wheat plants by *in vitro* treatment of microspores with trifluralin or APM. *Plant Breed.*, 117, 5: 401-405.
- He DG, Ouyang JW (1983) Response of wheat anthers at different development stages to *in vitro* cultures. *Ann. Rep. Inst. Genet.Acad. Sinica, Peking*, 1982, p.30.
- He CP, Yang HY (1987) Picloram as an exogenous hormone promotes embryoid differentiation in rice ovary culture. *Açta Biol Exp Sin.*, 20: 283-291.

- He CP, Yang HY (1988) An investigation on the satibility of synergid apogamy and its conditions in rice ovary culture. J. Wuhan Bot. Res., 6.
- Heberle-Bors E, Reinert J (1979) Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tabacum* dependence upon pollen development. Protoplasma, 9: 237-245.
- Henry Y, de Buyser J (1985) Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Rep., 4: 307-310.
- Hess D (1992) Biotechnologie der Pflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, p.173
- Honkanen J, Aapola H, Seppä'nen P, Törma'la T, De Wit JC, Esendam HF, Straveis LJM (1991) Production of doubled haploid gerbera clones. Ağa Hort., 300: 341-346.
- Horner M, Mott RL (1979) The frequency of embryogenic pollen grains is not increased by *in vitro* anther culture in *N. tabacum* L. Planta, 147: 156-158.
- Hosemans D, Bossoutrot D (1983) Induction of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated beet ovules (*Beta vulgaris*L.) Z. Pflanz., 91: 74-77.
- Huang OF, Yang HY, Zhou C (1982) Embryological observations on ovary culture of unpollinated young flowers in *Hordeum vulgare* L. Ağa Bot Sin., 24: 295 -300.
- Irikura Y (1975) Induction haploid plants by anther culture in tuber-bearing species and interspecific hybrids of *Solanum*. Potato Res., 18: 133-140.
- Jacobsen E, Sopory SK (1978) The influence and possible recombination of genotypes on the production of microspore embryoids in anther cultures of *Solanum tuberosum* and dihaploid hybrids. Theor. Appl. Genet., 52: 119-123.
- Johansson L, Eriksson T (1977) Induced embryo formation in anther culture of several *Anemone* species. Physiol. Plant., 40: 172-174.
- Karakullukçu Ş (1991) Değişik Patlıcan Genotiplerinde *in vitro* Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerinde Araştırmalar. A.Ü. Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi, Ankara, 131 s.
- Karakullukçu Ş, Abak K (1992) Bazı patlıcan çeşitlerinin anter kültürüne tepkileri. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı, Cilt:42, Fas.:1-2-3-4, s:7-12.
- Kandeler R (1987) Die Gewebekulturtechnik. Univ. Für Bodenkultur, Insdtut für Botanik, Wien-Österreich, Ders Notlan.
- Kasha KJ, Kao KN (1970) High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature (Lond), 225: 874-876.
- Keller J (1990) Culture of unpollinated ovules, ovaries and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion. Euphytica, 47: 241-247.
- Keller WA, Armstrong KC (1978) High frequency production of microspore - derived plants from *Brassica napus* anther cultures. Z. Pflanz., 80: 100-108.

- Keller WA, Armstrong KC (1979) Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. Theor. Appl. Genet., 55: 65-67.
- Kösali N (2000) Stark Spur Golden Delicious Elma Çeşidinde Şeker, Aktif Kömür ve Işığın *in vitro* Androgenezis Üzerine Etkileri. A.Ü.Fen Bil. Enst. Yüksek Lisans Tezi, 47s.
- Kubalakova M, Dolezel J, Lebeda A (1996) Ploidy instability of embryogenic cucumber (*Cucumis sativus*L.). Biol. Plant., 38, 3: 475-480.
- Kuhlmann U, Foroughi-Wehr B (1989) Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. Plant Cell Rep., 8: 78-81.
- Kurtar ES (1999) Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Haploid Embriyo Uyarımı ve Bitki Oluşturma Üzerinde Araştırmalar. Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Adana, 203 s.
- Kuo CS (1982) The preliminary studies on culture of unfertilised ovary of rice *in vitro*. Ağa Bot. Sin., 24: 33-38.
- Lacadena JR (1974) Spontaneous and induced parthenogenesis and androgenesis . In: Kasha KJ, Haploids in higher plants advances and potential. Proceeding of the 1st International Symposium, University of Guelph, 13-32.
- Lazar MD, Schaeffer GW, Baenziger PS (1985) The physical environment in relation to high frequency callus and plantlet development in anther culture of wheat (*Triticum aestivum*T) cv. "Chris". J. Plant Physiol., 121: 103-109.
- Lichter R (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol., 105: 427-434.
- Löschnerberger E, Pfosser M, Bois EH (1990) Anther culture of wheat (*Triticum aestivum*) and high efficiency ploidy determination by flow cytometry. VIIth Int. Cong. on Plant Tissue and Cell Culture, 24-29 June 1990, Amsterdam, No: 198.
- Luckett DJ (1989) Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. Euphytica, 42: 177-182.
- Lucretti S, Lister A, Chapman JV, Moret F, De Giacometti F, Palarchio H (1990) Flow cytometric assesment of viability and differentiation in potato and orange cell suspension protoplasts. Ağa Hort., 280: 277-280.
- Metwally El, Haroun SA, El-Fadly GA, Shalaby TA (1998) Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. Plant Cell Tiss. Org. Cult, 52,117-121.
- Meynet J, Sibi M (1984) Haploid plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules in *Gerbera jamesonii*. Z. für Pflanzenzüchtg., 93: 78-85.
- Mishra MK (1997) Stomatal characteristics at different ploidy levels in coffee. Ann. Bot, 80, 5: 689-692.

- Mix G (1985) Antheren und Ovarienkultur von Sonnenblumen (*Helianthus annuus* L.). Landbauforsch Völkenrode., 35: 153-156.
- Miyoshi K (1996) Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena*) Plant Cell Rep., 15, 6: 391-395.
- Montelongo-Escobedo H, Rowe PR (1969) Haploid induction in potato: Cytological basis for the pollinator effect. Euphytica, 18: 116-123.
- Morrison RA, Köning RE, Evans DA (1986) Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. J. Plant Physiol., 126, 1: 1-9.
- Munyon IP, Hübstenberger JF, Phillips GC (1989) Origin of plantlets and callus obtained from chile pepper anther cultures. In Vitro Cell. Dev. Biol., 25, 3: 293-296.
- Müller G, Borschel H, Vahi U, Wilberg A, Haertel H, Damish W (1989) Die Nutzung der Antherenkulturmethode im Zuchtprozess von Winterweizen. I. Zur Androgenesefähigkeit von IB-IR-Weizen-Roggen-Translokationsformen. Plant Breed, 102: 196-207.
- Navarro-Alvarez W, Baenziger PS, Eskridge KM, Hugo M, Gustafson VD (1994) Addition of colchicine to wheat anther culture media to increase doubled haploid plant production. Plant Breed. Abs., 112: 192-198.
- Niemirowicz-Szytt K, Dumas de Vaulx R (1989) Preliminary data on haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction. Cucurbit Genet. Coop., 12: 24-24.
- Nitsch C (1974) La culture de pollen isole sur milieu synthetique. C. R. Acad. Sci., 278 D: 1031-1034.
- Nitsch JP (1969) Experimental androgenesis in *Nicotiana*. Phytomorphology, 19: 389-404.
- Nitsch C, Norreel K (1973) Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultive dans l'anthere ou isole de l'anthere. C. R. Acad. Sci., 276 D, 303-306.
- Ollitrault-Sammarcelli F, Legave JM, Michaux-Ferriere N, Flirsch AM (1994) Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*. Sci. Hort., 57: 303-313.
- Özkum D, Tıpırdamaz R, Ellialtıoğlu Ş (2000) Relationship between endogenous abscisic acid content of anthers and *in vitro* androgenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.) 4th Int. Symp. on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding, 2-7 July 2000, Tampere, Finland, Abstracts (Late arrivals):8.
- Özzambak E (1992) Pırasada ovaryum ve polen kültürü. Türkiye 1.Ulusal Bahçe Bitk. Kong. Bild. 13-16 Ekim 1992, İzmir. Doğruluk Mat., Cilt II, 233-236.
- Pandey KK, Przywara L, Sanders PM (1990) Induced parthenogenesis in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) through the use of lethally irradiated pollen. Euphytica, 51: 1-9.
- Paksoy M, Ellialtıoğlu Ş, San N, Abak K (1995) Bazı *Brassica* sp. türlerinde anter kültürüne etki eden faktörler üzerinde araştırmalar. DOĞA T. Botanik, 19: 281-286.

Ş. Ellialtıoğlu, N. San, K. Abak

Pesticelli SM, Mitchell JC, Jones AM, Pareddy DR, Petolini JF (1989) High frequency androgenesis from isolated microspore of maize. *Plant Cell Rep.*, 7: 6773-6776.

Petolino JF, Jones AM, Thompson SA (1988) Selection for increased anther culture response in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 157-159.

Pierik RLM (1989) *In vitro* Culture of Higher Plants. Marthinus Nijhoff Publ. Dordrecht, Boston, Lancaster, 344pp.

Pochard E, Dumas de Vaulx R (1971) La monoploidie chez le piment (*Capsicum annuum*). *Z. für Pflanzenzüchtg.*, 65: 23-46.

Quarto R, Nati D, Paoloni FM (1991) Strawberry anther culture. *Açta Hort.*, 300-337.

Qin X, Rotino GL (1993) Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. *capsicum and eggplant Newsletter*, 12: 59-62.

Raghavan V (1978) Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger* (Henbane). *Am. J. Bot.*, 65: 982-1002.

Rashid A (1983) Pollen dimorphism in relation to pollen plant formation. *Physiol. Plant*, 58: 544-548.

Rashid A, Street HE (1974) Growth embryogenic potential and stability of a haploid cell culture of *Atropa belladonna*. *Plant Sci. Lett.*, 2: 89-94.

Raquin C (1985) Induction of haploid plants by *in vitro* culture of *Petunia* ovaries pollinated with irradiated pollen. *Z. Pflanzen*, 94: 166-169.

Reinert J, Bajaj YPS (1977) Anther culture: Haploid production and its significance. In: Reinert J, Bajaj YPS (eds), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Verlag, New York, p: 251-264.

Rode JC, Dumas de Vaulx R (1987) Obtention de plantes haploides de carotte (*Daucus carota* L.) issues de parthenogenese induite in situ par du pollen irradie et culture *in vitro* de graines immatures. *Acad. Sci, Paris, Serie III*, 305, 225-229.

Rogers OM, Ellis JH (1966) Pollen nuclear division prevented with toluidine blue in *Vinca rosea*. *HortScience*, 1, 2: 62-63.

Rotino G, Falavigna A, Restaino F (1987a) Production of anther-derived plantlets of eggplant. *Capsicum Newsletter*, 6: 89-90.

Rotino G, Falavigna A, Fiume F, Nervo G, Restaino F (1987b) Possibility of eggplant (*Solanum melongena* L.) improvement through *in vitro* techniques. *Genetica Agraria*, Vol:XLI, N:3, 314-315, Roma.

San Noeum LH (1976) Haploides d *Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovaries non fecondes. *Ann. Amelior. Plantes*, 26, 4: 751-754.

Sangwan RS, Sangwan-Norrel BS (1990) Anther and pollen culture. In: Bhojwani SS (ed), *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, pp. 220-242, Elsevier Science Publ. Amsterdam.

- San N, Abak K, Pitrat M, Dumas de Vaulx R (1992a) Kavunlarda (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naud ve *C.melo* L. var. *reticulatus* Naud.) partenogenetik haploid embriyo uyartımı ve bitki eldesi. Doğa Tr. J. Agric. Forest., 16: 302-314.
- San N, Abak K, Pitrat M, Rode JC, Dumas de Vaulx R (1992b) Karpuzda (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) ışınlanmış polenle haploid bitki elde edilmesi: Işınlanmış polenlerde çimlenme yeteneğinin değişimi, KÜKEM Dergisi, 15, 2: 15-21.
- San N, Abak K, Pitrat M, Dumas de Vaulx R (1994) Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon. HortScience, 29, 10: 1189-1190.
- San N, Abak K (1995) Farklı ışın dozlarının ve ışınlamaya alternatif uygulamaların karpuzda haploid embriyo uyartımına etkileri. Türkiye II.Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Cilt II, 212-215.
- San N, Abak K (1996) Haploid karpuzda *in vitro* kromozom katlanması amacıyla değişik doz ve sürelerde uygulanan kolhisinin etkisi. Tr. J. Agric. Forest., 20: 555-559.
- San N, Ekiz H, Yücel S, Yetişir H, Ekbiç E, Abak K (1999a) Kavunda dihaploidizasyon yöntemi ile örtüaltı tarımına uygun ve *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonifae* dayanımlı hatların geliştirilmesi. III.Ulusal Bahçe Bitk. Kongresi, 14-17 Eylül 1999, Ankara, 498-503.
- San N, Abak K, Pitrat M (1999b) Comparison of ploidy level screening methods in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai). Scientia Hort., 82, 3-4: 265-277.
- Sauton A (1987) Recherche d'haploides chez le melon (*C.melo* L.): étude et applicadon a la selection de la parthenogenese induite par du pollen irradie. These (Docteur nouveau regime), sepicialite.: Biologie et Physiologie Vegetales, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 123 p.
- Sauton A (1988) Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon, *Cucumis melo* L. Scientia Hort., 35: 71-75.
- Sauton A (1989) Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. Cucurbit Genedcs Coop., 12: 22-23.
- Sink KC, Padmanabhan V (1977) Anther and pollen culture to produce haploids: Progress and applicadon for the plant breeder. HortScience, 12: 143-148.
- Sitbon M (1981) Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by *in vitro* culture of unfertilized ovules. Agronomie, 1: 807-812.
- Sopory SK, Jacobsen E, Wenzel G (1978) Production monohaploid embryoids and plantlets in cultured anthers of *Solanum tuberosum*. Plant Sci. Lett., 12: 47-54.
- Subrahmanyam NC, Kasha KJ (1973) Selective chorosomal eliminatinon during haploid formation in barley following interspecific hybridization. Chromosoma, 42: 111-125.
- Sunderland N (1971) Anther culture: a progress report. Sci. Prog. Oxf., 59: 527-549.

- Sunderland N, Roberts M (1979) Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anther. *Ann. Bot.*, 43: 405-414.
- Sunderland N, Xu ZH (1982) Shed pollen culture in *Hordeum vulgare*. *J. Exp. Bot.*, 33: 1086-1095.
- Sunderland N, Xu ZH, Huang B (1981) Recent advances in barley anther culture. In: Barley Genetics IV. Proc. 4th Int. Barley Genetics Symp., Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, pp. 699-703.
- Şalk A (1979) Kerevizlede tetraploidinin kök ve yaprak sapı iriliği ile meiotic bölünmeye etkisi ve kerevizlerin karyotipi üzerinde araştırmalar. *E.Ü.Z.F.Yay.*, No:344, İzmir, 159 s.
- Terzioğlu Ş, Ellialtıoğlu Ş, Abak K (2000) İnkübasyon koşullarının biber an ter kültüründe embriyo oluşumu üzerine etkisi. III. Sebze Tarımı Simpozyumu, 11-13 Eylül 2000, İsparta, s: 233-238.
- Truong-Andre I, Demarly A (1983) Obtaining plants by *in vitro* culture of unfertilized maize ovaries (*Z&z mays* L.) and preliminary studies on the progeny of a gynogenetic plant. *Z. für Pflanzenzücht.*, 92: 309-320.
- Tsay HS, Miano SH, Widholm JM (1986) Factors affecting haploid plant regeneration from maize anther culture. *J. Plant Physiol.*, 126: 33-40.
- Tuberosa R, Sanguinetti MC, Cond S (1987) Anther culture of Eggplant (*Solanum melongena*L). *Lines and Hybrids Genetica Agraria*, 41: 267-274.
- Tulecke W (1953) A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba*. *Science*, 117: 599-600.
- Turcotte EL, Feaster CV (1969) Semigametic production of haploids in Pima cotton. *Crop. Sci.*, 9: 653-655.
- Uhrig H (1985) Genetic selection and liquid medium conditions improve the yield of androgenetic plants from diploid potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 71: 455-460.
- Ulrich I, UlrichW (1986) Flow cytometric DNA-analysis of plant protoplasts stained with DAPI. *Naturforschung*, 41 C: 1052-1056.
- Vidalie H (1984) La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Tech. Docum. Lavoisier, Paris, 151p.
- Wan Y, Petolino JF, Widholm JM (1989) Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.*, 72: 889-892.
- Wang CC, Kuang BJ (1981) Induction of haploid plants from the female gametophyte of *Hordeum vulgare* L. *Açta Bot. Sin.*, 23: 329-330.
- Wang C, Sun CS, Chu CC, Wu SC (1978) Studies on the albino pollen plantlets of rice. In: Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press, Peking, pp. 149-159.
- Wernicke W, Kohlenbach F1W (1976) Investigations on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. *Z. Pflanzenphysiol.* 79: 189-198.

- Wenzel G, Foroughi-Wehr B (1984) Anther culture in cereal and grasses. In: Celi Culture and Somad Celi Genetics of Plants. Vasil IK (ed) Academic Press Inc. pp. 311-327.
- Wenzel G, Thomas E (1974) Observations on growth in culture of anthers of *Secale cereale*. Z. Pflanzenzücht., 72: 89-94.
- Wenzel G, Uhrig H (1981) Breeding for nematode and virüs resistance in potato via anther culture. Theor. Appl. Genet., 59: 333-340.
- Wu BJ, Cheng KC (1982) Cytological and embryological studies on haploid plants production from cultured unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* L. Ağa Bot. Sin., 24: 125-129.
- Yeung EC, Thorpe AT (1981) *In vitro* fertilisation and embryo culture. In: Thorpe AT (ed) Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Academic Press Inc, New York, 253-271.
- Zagorcheva L, Alexandrova M, Kichukova C (1987) Pollen mother celi meiosis in the haploid of *Cucumisficifo lius ARich.*. Cucurbit Genet. Coop. 10: 37-38.
- Zhang YX, Lespinasse Y (1991) Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. Euphydca 54: 101-109.
- Zhou C, Yang HY (1990) *In vitro* production of haploids in rice through ovary culture. In: Bajaj YPS (ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.14, Rice, Springer, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo.
- Zhu Z, Wu H (1979) *In vitro* production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum*. Ağa Genet. Sin. 6: 181-183.

Bölüm 6

Hastalıksız Bitki Üretimi

Betül Bürün

Muğla Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla
e-posta: bbetul@mu.edu.tr

6.1. Giriş

In vivo yetiştirilen bitkiler fungal, bakteriyal ve viral hastalıklar ile bulaşık olabilir, zararlı böcek ve nematodlardan zarar görebilirler. Söz konusu bu mikroorganizmalar (virüs, bakteri ve mantarlar) vegetatif çoğal tim yoluyla taşınmaktadır. Bu nedenle, vegetatif çoğaltmada temiz bir başlangıç materyalinin kullanımı son derece önemlidir. Temiz materyallerin elde edilmesi amacıyla da bazı doku kültürü tekniklerinden yararlanılmaktadır. Doku kültürü teknikleri hastalıklara dayanıklılığı artırmak, dayanıklı bitki genotiplerini korumak, bitki hastalıklarına karşı somaklonal dayanıklılık meydana getirmek, dayanıklı bireyleri seçmek veya dayanıklılığa cevap veren genlerin aktarılmasını kolaylaştırmak ve bitkileri hastalıklardan arındırmak için kullanılmaktadır. Genellikle *in vitro* çoğaltılan bitkiler hastalıklardan arı olarak kabul edilmektedir fakat mantar ve bakteri enfeksiyonları bazen kültüre alınan bitkilerde büyük kayıplara neden olabilmektedirler. Bu durum *in vitro* kültür laboratuvarlarında karşılaşılan önemli bir problemdir. Kontaminasyon yapan bu mikroorganizmaları belirlemek, onları ilk kültürde ve alt kültürler boyunca elimine etmek çok önemlidir. Bu durum genellikle yüzeysel sterilizasyonla önlenmeye çalışılır. Ancak basit bir yüzeysel sterilizasyon bakteri, mantar, maya, virüs, viroid veya mikoplazma kontaminasyonunu her zaman ortadan kaldırmaz. Bitki doku kültürlerindeki kontaminasyon üç türlü olabilir. Birincisi etkisiz yüzeysel sterilizasyonun neden olduğu akut kontaminasyondur. İkincisi eksplant içinde gizli olan mikroorganizmaların veya alt kültür sırasında yerleşen mikroorganizmaların neden olduğu kontaminasyondur. Üçüncüsü ise uzun bir steril kültür döneminden sonra doğal olarak meydana gelen kronik kontaminasyondur. Bahsedilen ikinci ve üçüncü tip kontaminasyondan sorumlu organizmaları saptamak çok güçtür. Bu

bakımdan farkında olmadan bir mikroorganizma ile bulaşık bitki materyalleri kültüre alınabilir ve çoğaltılabilir. Ancak bu mikroorganizma kültür sırasında sorun olabilir veya üretilen bitkiciklere aktarılabilir. Bu yüzden mikroçoğaltılan bütün bitkiler hastalıktan ari değildir (George, 1993). Hastaliksız bitkileri elde etmek üzere özel *in vitro* kültür teknikleri geliştirilmiştir ve meristem kültürü bu amaçla kullanılan bir tekniktir.

Meristematik hücreleri kullanarak gerçekleştirilen doku kültürü özellikle virüsten ari bitkilerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir bitkinin hücrelerinde virüs konsantrasyonu hücreden hücreye farklıdır ve özellikle apikal sürgün ve kök meristemi hücrelerinin virüs içermesi ihtimali çok düşüktür. Bu nedenle meristem kültürlerinden virüsten ari bitkilerin elde edilmesi mümkün olmaktadır. Bununla beraber meristemlerin her zaman virüsten ari olmadığı da unutulmamalıdır. Günümüzde meristem kültürü virüs eliminasyonu için rutin olarak uygulanan bir yöntemdir. Ama farklı bitkilerden farklı virüsleri arındırmaya göre de özel yöntemlerle birlikte ele alınmaktadır (Sherwood, 1993). Ayrıca, meristem kültürü yoluyla bakteri ve mantarlardan ari bitkilerin elde edilmesi de mümkün olmaktadır (George, 1993).

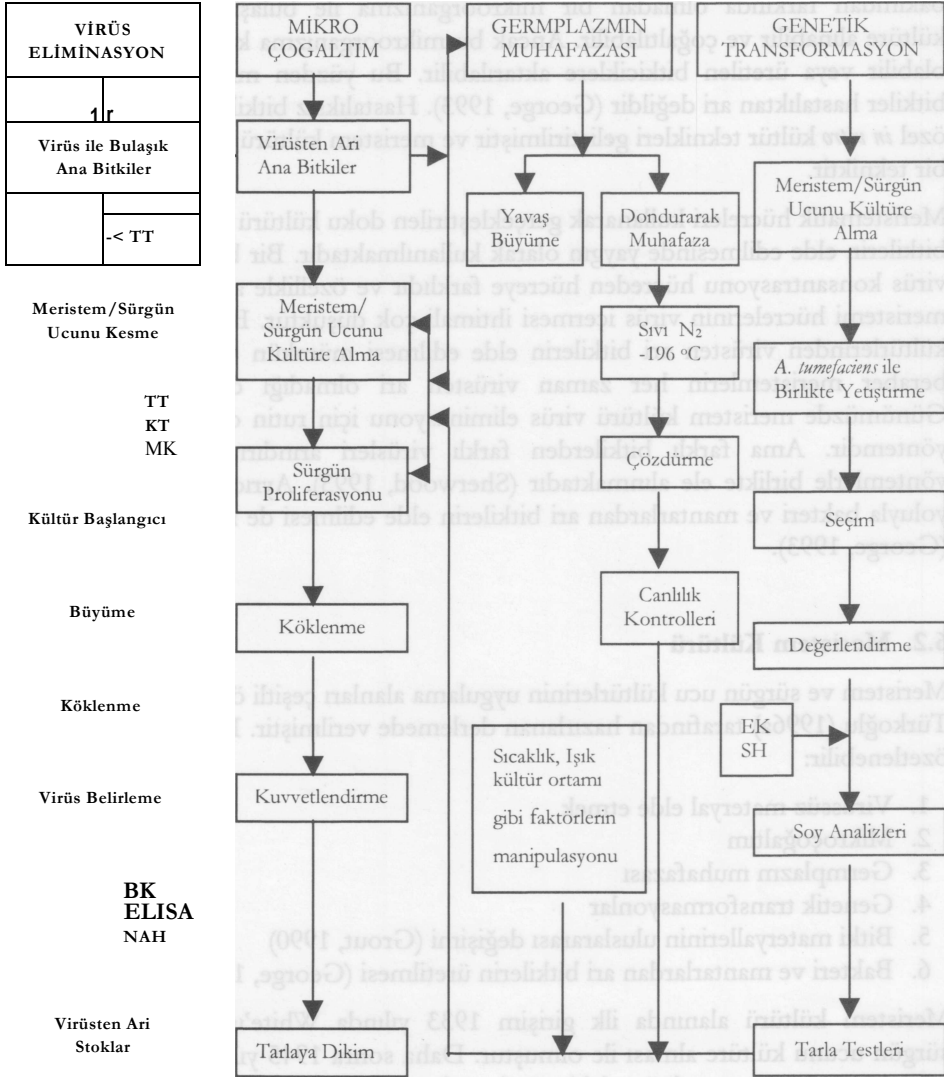
6.2. Meristem Kültürü

Meristem ve sürgün ucu kültürlerinin uygulama alanları çeşitli örnekler ile Bürün ve Türkoğlu (1996a) tarafından hazırlanan derlemede verilmiştir. Bunlar aşağıdaki gibi özedenebilir:

1. Virüssüz materyal elde etmek
2. Mikroçoğaltım
3. Germplazm muhafazası
4. Genetik transformasyonlar
5. Bitki materyallerinin uluslararası değişimi (Grout, 1990)
6. Bakteri ve mantarlardan ari bitkilerin üretilmesi (George, 1993)

Meristem kültürü alanında ilk girişim 1933 yılında White'm *Stellaria medictum* sürgün ucunu kültüre alması ile olmuştur. Daha sonra 1945 yılında Loo, *Asparagus ojjicinalii*'va 5 mm uzunluğundaki gövde uçlarını kültüre almayı başarmıştır. Esas olarak meristem kültürünün başlangıcı *Tropaeolum majus*'da.n başarılı bir meristem ucu kültürü ve sonuçta köklü bitkilerin elde edilmesi ile olmuştur. Daha sonra meristem ucu kültürlerinin virüsten ari bitkileri üretmedeki potansiyeli büyük ilgi görmüş, 1952 yılında Morel ve Martin tarafından *Dahlia*'da ve 1955 yılında da 6 patates çeşidinde virüsten ari bitkiler elde edilmiştir (Dodds ve Roberts, 1986; Nehra ve Kartha, 1994).

B. Bütün



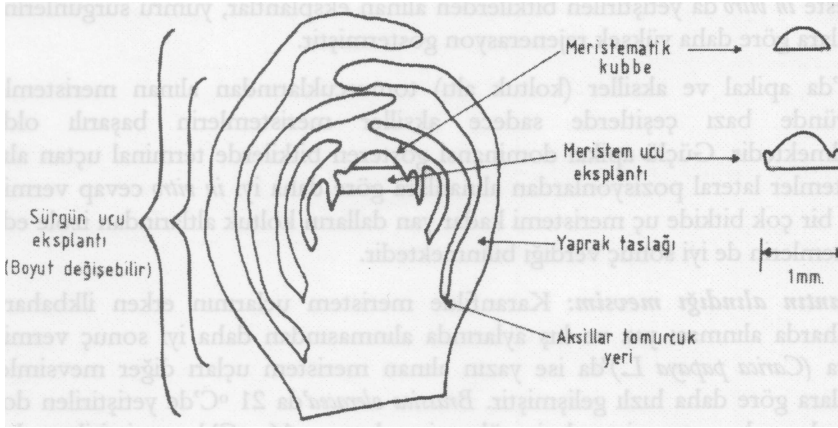
Şekil 6.1. Meristem ve sürgün ucu kültürlerinin uygulama alanları (Nehra ve Kartha, 1994). TT: Termoterapi, KT: Kemoterapi, MK: Meristem ucu kültürü, BK: Biyolojik kontrol, NAH: Nükleik asit hibridizasyonu, EK: Enzim kontrolleri, SH: Southern hibridizasyonu

Bitkisel üretimde etkili olan doku kültürü tekniklerinden meristem ve sürgün ucu kültürleri günümüzde yaygın bir uygulama alanı bulmuştur. Bu kültürler önce vegetatif olarak çoğaltılan bitkilerin hızlı klonal çoğaltımı, virüs süz materyal elde etme ve hem vegetatif hem de tohumla üretilen bitkilerin germplazmalarının

muhafazası gibi alanlarda kullanılmış, daha sonra bitki ıslahında gen transferleri ile genetik transformasyonları gerçekleştirmede kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 6.1) (Nehra ve Kartha, 1994). Ayrıca, vegetatif bitki materyallerinin uluslararası değişiminde ve patojenlerden arındırmada da kullanılmaktadır (Grout, 1990).

Virüsten arı bitkileri elde etmek için çoğunlukla kullanılan kültür “meristem kültürü” veya “meristem ucu kültürü” olarak belirtilmektedir. Gerek meristem kültürü gerekse meristem ucu kültürü ifadeleri mikroçoğaltım amacı ile değil virüsü elimine etme amacı ile başlatılan kültürleri ifade etmektedir. Kültürlerde virüs eliminasyonu için kullanılan eksplandarı tanımlamada ise “meristem ucu” terimi daha doğru olurken büyük eksplandar kullanıldığında (genellikle 1 mm’den büyük) “sürgün ucu” şeklinde ifade etmek doğru olmaktadır (Şekil 6.2) (George, 1993).

Meristem ucunun kültür ortamına yerleştirilmesinden sonra canlılıklarını devam ettirmeleri, farklılaşarak yeni sürgünler oluşturup köklenmeleri ve tam teşekküllü bitki meydana getirmelerinde bir takım faktörlerin etkisi söz konusudur. Bu faktörler aşağıda başlıklar altında verilmiştir.



Şekil 6.2. Meristemadk kubbe, meristem ucu ve sürgün ucu eksplantları (George, 1993).

6.2.1. Meristem ucu kültürlerinde başarıyı etkileyen faktörler

Meristem ucu kültürlerinde başarıyı etkileyen faktörler bitki materyali ile ilgili bazı özellikler, kültür ortamının bileşimi ve kültür koşulları olmak üzere üç grup altında toplanarak aşağıdaki gibi ele alınabilir (Bürün ve Türkoğlu 1996b).

6.2.I.I. Bitki materyali

Eksplantın büyüklüğü: Bir çok araştırmada eksplant boyutunun önemi üzerinde durulmuş ve büyük eksplantların daha yüksek canlılık ve rejenerasyon kapasitesine sahip olmasına karşın, küçük eksplantların virüs eliminasyonunda daha avantajlı olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle eksplant boyutu çalışmanın amacına ve türe göre deneysel olarak belirlenmelidir. Eğer amaç mikroçoğaltım ise kültüre daha büyük eksplantlarla başlama fakat amaç virüs eliminasyonu ise mümkün olan en küçük eksplantları kullanma daha uygun olmaktadır.

Donör bitkinin fizyolojik durumu: Meristem ucu eksplantları bitkide vegetatif büyümenin aktif olduğu bir dönemde alınırsa kültürde başarı oranı artmaktadır. Örneğin, elma sürgün ucu eksplantlarının olgun meyve bahçesinden alınması yerine yeni aşılanmış sürgünlerden alınmasının daha başarılı sonuç verdiği belirtilmektedir. Benzer şekilde armutta olgun ağaçlardan alınan meristemlerin gelişme oranının fidanlardan alınanlara göre düşük olduğu ve yavaş gelişim gösterdikleri gözlenmiştir. Bunlara ilaveten donör bitkilerin yetiştirildiği çevre koşulları ile eksplantın bitki üzerindeki pozisyonu da başarıda etkili faktörlerdendir. Örneğin, patatesten *in vitro*da yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantlar, yumru sürgünlerinden alınanlara göre daha yüksek rejenerasyon göstermiştir.

Asma'da apikal ve aksiller (koltuk altı) tomurcuklarından alınan meristemlerin kültüründe bazı çeşitlerde sadece aksiller meristemlerin başarılı olduğu belirtilmektedir. Güçlü apikal dominansı gösteren bitkilerde terminal uçtan alınan meristemler lateral pozisyonlardan alınanlara göre daha iyi *in vitro* cevap vermiştir. Oysa, bir çok bitkide uç meristemi kadar yan dalların koltuk aldarından izole edilen meristemlerin de iyi sonuç verdiği bilinmektedir.

Eksplantın alındığı mevsim: Karanfilde meristem uçlarının erken ilkbahar ve sonbaharda alınması yaz ve kış aylarında alınmasından daha iyi sonuç vermiştir. Papaya (*Carica papaya* JL/da ise yazın alınan meristem uçları diğer mevsimlerde alınanlara göre daha hızlı gelişmiştir. *Brassica oleracea*'de 21 °C'de yetiştirilen donör bitkilerden alınan meristemlerin ölmesine karşın 16 °C'de yetiştirilen donör bitkilerden alınan eksplantlar daha başarılı bulunmuştur.

Çeşit: Bitki doku kültürlerinde iki genotipin aynı kültür koşulları altında her zaman benzer şekilde cevap vermediği bilinmektedir. Çalışmalar, *in vitro* kültürde farklı genotipler arasındaki bu önemli farklılığı fizyolojik ve epigenetik faktörlerin de etkilediğini ortaya koymuştur. Örneğin, farklı *Vicia faba* genotiplerinin meristem kültürlerindeki rejenerasyon yetenekleri araştırılmış ve düşük tannin içeren genotiplerin *in vitro* cevabının daha yüksek olduğu bulunmuştur.

6.2.1.2. Kültür ortamı

Meristem kültürünün ilk uygulandığı yıllarda White (1943) ortamı kullanılmış sonra Murashige ve Skoog (1962) ortamının (MS) daha uygun olduğu bulunmuştur. MS ortamı ve bazı modifikasyonları halen en fazla kullanılan ve en başarılı sonuç veren ortamdır. Meristem ucu kültürlerinde her zaman MS ortamı kullanılmakla beraber bazı türlerde diğer ortamlar daha başarılı olabilmektedir. Örneğin, Ericaceae familyası ve çoğu odunsu bitki türleri için alternatif ortamlar (odunsu bitkiler ortamı veya Lepoivre ortamı) önerilmektedir.

Mineral tuzlar: Eksplantlar genç fidanlardan alındığı zaman MS ortamının uygun olduğu ancak olgun ağaçlardan alınan eksplandar için bu ortamın toksik olduğu ve bu eksplandar için düşük tuz oranına sahip ortamların (Heller, 1953 gibi) daha elverişli olduğu belirtilmektedir. Kültür ortamındaki azot oranı meristem kültürünün başarısında kritik bir etkiye sahiptir. Örneğin, altı böğürden genotipinin meristem kültüründe MS ortamında NH_4NO_3 ve KNO_3 konsantrasyonlarının yarıya indirilmesinin kültürü iyileştirdiği rapor edilmiştir.

Şekerler: Karbon kaynağı, meristem ucu kültürü için kullanılan kültür ortamının önemli bir unsurudur. Genel olarak tüm ortamlar bir karbon kaynağı olarak %1-3 sakkaroz içerir. Bununla beraber alternatif enerji kaynaklarının da kullanılması söz konusudur.

Ağar: Çoğunlukla eksplandar yarı-katı ortamda kültüre alınmakta ve kültür ortamında ortamı katılaştırmak için de ağar kullanılmaktadır. Fakat bazı bitki türlerinde sıvı ortam daha başarılı bulunmuştur. Örneğin, patates meristem kültüründe sıvı ortamın katı ortama üstün olduğu, ayrıca, ağarın köklenme oranına etkili olmadığı da belirtilmektedir.

Büyüme düzenleyicileri: Meristem ucu kültürleri için gerekli bitki büyüme düzenleyicileri bitki türüne ve kültür safhasına bağlıdır. *Yjeginosea* ve *Solanaceae* familyasına ait bitki türleri *Brassicaceae* ve *Compositae* familyasına ait türlerden daha düşük konsantrasyonlarda eksojen bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duymaktadır. Besin ortamındaki büyüme düzenleyicileri ile materyalin taşıdığı hormon dengesi önemli olmaktadır.

Meristem ucu kültürlerinin değişik safhalarında kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri incelenmiştir. Bazı türlerin kültürü hiç büyüme düzenleyicisi kullanılmadan başlatılabilmektedir. Ancak çoğu türlerde büyümeyi ve meristemin gelişimini destekleyen düşük bir sitokinin düzeyi genellikle uygun olmaktadır. Oksinler kültürü başlatmak için mutlaka gerekli olmamasına karşın, düşük konsantrasyonlarda ilave edilmesi faydalı bulunmuştur. Bununla beraber yüksek oksin konsantrasyonları kallus oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu durum genetik s tabili teyi sürdürebilmek için istenmez. Gibberelinler sürgün gelişimini ve çoklu sürgün oluşumunu teşvik etmesi nedeniyle kültür ortamına ilave edilebilir.

B. Bütün

Bitki tür ve çeşitlerinin büyüme düzenleyicilerine çok farklı tepki göstermeleri, kültür için gerekli büyüme düzenleyicileri miktarlarının üzerinde çalışılan çeşide göre belirlenmesi gerektiği sonucunu ortaya koymaktadır.

6.2.1.3. Kültür şartları (çevresel faktörler)

Işık, sıcaklık ve fotoperiyot gibi çevre şartlarının *in vitro* dğ, farklılaşmayı etkilediği bilinmektedir. Meristem ucu kültürlerinin çeşitli dönemleri için kültür çevresi koşulları araştırmalarla belirlenmeye çalışılmaktadır. Örneğin, Cambridge Favorite çilek çeşidinin *in vitro* üretiminde 28 °C'nin optimum sıcaklık olduğu ve ışık yoğunluğu ihtiyacının farklı meristem kültürü safhalarında değiştiği belirtilerek meristem ucunu kültüre almada 4000 lüks, sürgün çoğal tmi için 6000 lüks, köklenmede 7000 lüks ışık uygun bulunmuştur.

Patates meristem uçlarının *in vitro* kültüründe ışık spektrumu ve yoğunluğunun köklenme ve bitki canlılığı bakımından büyük önem taşıdığı sonucuna varılarak floresan lambalar ile 4000 lüks ışık uygun bulunmuştur. Bu nedenle optimal koşulları her genotip için belirlemek gerekmektedir. Ayrıca, kültür çevresi koşulları ile beraber kültür ortamı, bitki büyüme düzenleyicilerinin kompozisyonu gibi farklı unsurları da bir arada incelemek gerekir.

6.2.2. Meristem ucu kültürü uygulaması

Çoğu meristem ucu kültürü uygulamalarında kullanılan kültür ortamı bileşimi, yüzeysel sterilizasyon yöntemi ve kültür odası koşulları aşağıda verilmiştir (Grout, 1990):

Ortam: Meristem kültürü çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan ortam Murashige ve Skoog (1962) ortamıdır. Ortamda büyüme düzenleyicileri çeşit ve konsantrasyonları türlere göre değişmektedir. Ayrıca organik ve inorganik maddeler de türlere özel olabilir. Türe göre uygun büyüme ortamının seçimi geniş referans kaynaklarına dayanarak belirlenmelidir.

Meristem kültürü için agarlı ortam veya sıvı ortamlar kullanılmaktadır. Yarı-katı ortamlar genellikle %0.8-1.0 (a/h) agar içermektedir. Sıvı ortamlar kültür kaplarında kağıt köprüler veya lif destekler ile birlikte kullanılmaktadır. Ortamda enerji kaynağı genellikle %1-3 (a/h) düzeyinde sakkarozdur. Genel olarak ortam pH'sı 5.5-5.8'e ayarlanmaktadır.

Yüzeysel sterilizasyon: Bitki materyalinin sterilizasyonu için uygun olan birçok sterilant madde vardır. Ön sterilizasyon genellikle %70-90'lık etil alkol ile yapılmaktadır. Bunu sodyum hipoklorit ile sterilizasyon izlemektedir. Burada ısıtma ajanı olarak deterjan [Örnek: Tween-80 %1 (h/h)] kullanılmaktadır. Genellikle sterilizasyon %90'lık etil alkole batırma (10-30 saniye) sonra %0.5-10

sodyum hipoklorit solüsyonunda 15 dakika bekletme ile yapılmakta ve bunu steril distile su ile birkaç kez çalkalama izlemektedir.

Kültür odası koşulları: Büyüme odasının sıcaklığı genellikle 25 ± 1 °C'ye, aydınlatma 4000 lüks'e ayarlanır. Fakat koşullar türlere göre değişmektedir. Bu nedenle sıcaklık ve ışık yoğunluğu türlere ve kültür safhasına göre araştırma sonuçları ile belirlenmelidir.

6.2.2.1. Metodun uygulanması

Genel olarak meristem ucu kültürü metodunun uygulanması aşağıdaki gibidir (Grout, 1990):

1. Öncelikle meristem eksplandarmın alınacağı uygun bir bitki (donör) seçilir. Bu bitkiden en az bir boğum (nod) içeren sap parçaları kesilir.
2. Donör bitkiye uygun olarak belirlenen sterilizasyon yöntemi kesilen sap parçalarına uygulanır. Sterilizasyon da deneysel olarak belirlenen konsantrasyon ve süreler kullanılır. Doku yüzeyleri mumsu tabaka ile veya epidermal tüyler ile kaplı ise Tween-80 gibi bir deterjanın hipoklorit solüsyonuna ilave edilmesi faydalı olmaktadır.
3. Meristem ucu çıkarılacak bitki materyali binoküler stereomikroskop tablasına yerleştirilir. En az 15x büyütmede tomurcuğun apikal meristemini görmek için öncelikle yapraklar temizlenir sonra genç yaprak taslakları ile apikal kubbe kesilir (Şekil 6.2).
4. Ayrılan eksplant (meristem ucu) kültür ortamına yerleştirilir ve ortamın su kaybını önlemek için kültür kapları parafilm ile kapatılır.
5. Kültür kapları kültür odasına yerleştirilir ve genellikle 25 °C'de 4000 lüks ışıktaki 12-16 saat fotoperiyotta bırakılır. Optimal koşullar bitki türüne göre ayarlanmalıdır.
6. Eğer eksplant canlılığını devam ettirirse 7-14 gün içerisinde eksplantta bir uzama ve bitkicik gelişimi görülür.
7. Gelişen bitkicikler çoğaltım için boğumlarının ayrılabilceği büyüklüğe ulaşıncaya kadar *in vitro*da gelişmeye bırakılır.
8. *In vitro*da gelişen bitkicikler steril koşullar altında kültür kaplarından çıkarılır ve boğumlarına (aksiller tomurcuğun bulunduğu her bir parça) ayrılır. Her bir parça, aksiller tomurcuğun büyümesini sağlayacak taze ortama aktarılır. Böylece orijinal bitki virüsten ari olarak çoğaltılabilir (çoğaltma öncesi bitkicikğin virüsten ari olup olmadığı virüs tesleri ile belirlenir).

B. Bürün

6.2.2.2. Meristem ucu kültürü çalışmalarında dikkat edilecek noktalar

1. Donör dokular genç kısımlardan ve bitkinin aktif olarak büyüyen bölgelerinden alınmalıdır. Dormant durumdaki bitkilerden sakınılmalıdır. Örneğin, patates tohumluk yumruları yaklaşık 1 yıl 4  C'de depolanabilmektedir. Çoğu patates k ltivarları hasattan sonra belirli bir süre dormanttir ve bu nedenle en az 2 ay depolanmalıdır. Ayrıca, yumrular *in vitro*  alışmada kullanılmadan önce 2 ay boyunca oda sıcaklığında tutulmalıdır (Slack ve Tufford, 1995).
2. Donör bitkilerin damlama sulama ile sulanması enfeksiyon problemlerini azaltmada yardımcı olabilir (Grout, 1993).
3. Meristem bölgesi etil alkol ile silinmiş binoküler stereomikroskobu altında yatay hava akışlı kabinde çalışarak meristem bölgesi izole edilmelidir. Meristemi ayırmak için kullanılan kesicilerin keskin olmasını sağlamak bakımından sık sık değiştirilmesi ve sterilize edildikten sonra kullanılması uygun olmaktadır. Öncelikle dış yapraklar ve yaprak taslakları temizlenir ve sonra meristematik bölge alınır. Meristematik bölge çabuk kuruyabilir ve zarar görebilir. Kurumayı önlemek için sterilize edilen alederin sıcak olmamasına dikkat edilmeli ve çalışma bölgesinin aydınlatılmasında ısınmaya meydan verilmemelidir (Sherwood, 1993).
4. Çok küçük bir eksplantın (sadece meristematik kubbenin) kültüre alınması durumunda gelişme şansı düşük olmaktadır ve kültürde başarayı sınırlayabilir. Bu nedenle, meristemin yaprak taslakları ile birlikte kültüre alınması başarılı bir kültür için gerekli olmaktadır ve bu "meristem ucu kültürü" olarak tanınlanmaktadır (Grout, 1993).
5. Kesmenin bir sonucu olarak ortaya çıkan fenolik oksidasyon toksik etki yapabilir. Bu duruma odunsu türlerin kültüründe daha sık rasBanmaktadır. Toksik etki nedeniyle ortamın kararması söz konusu olursa meristemin derhal taze ortama aktarılması ile bu durum  nlenebilir. Ayrıca, düşük ışık yoğunluğu uygulaması veya kültür ortamına andoksidanların (askorbik asit, dithiothereital ve polyvinyil pyrrolidone) ilavesi ile bu fenolik bileşiklerin oksidasyonunun azaltılabileceği de bildirilmiştir (Grout, 1993).

6.2.3. Meristem ucu kültürünün yararları

Meristem ucu kültürünün yararları aşağdaki gibi özetlenebilir (Grout, 1990):

1. En yüksek genetik kararlılık *in vitro* klonal çoğaltımda elde edilmektedir.
2. Meristem ucu kültürü ile bulaşık olan bir donör bitkiden viral, bakteriyel ve fungal patojenler uzaklaştırılabilmektedir.

3. Meristem ucu, soğukta muhafaza ve diğer kültür muhafaza teknikleri için homojen bir doku tipi olması ve küçük olması bakımından çok uygundur.
4. Kimera olan bir materyalin aynen çoğal timi için meristem ucu kültürü çok uygun bir tekniktir.
5. Meristem ucu kültürleri, karantina uygulamalarına göre uluslararası taşımada çoğunlukla kabul edilen kültürlerdendir.

6.2.4. Meristem ucu kültürü tekniğinin sınırlamaları

Deberg ve ark (1990) tarafından meristem ucu kültürü tekniğinin bazı sınırlamaları da vurgulanmıştır. Bunlar:

1. Virüsten arındırmada eksplant boyutu ile kontaminasyon derecesi arasında negatif bir ilişki vardır. Penazzro ve Redolfi (1973,) *Cymbidium/rf*da bunu gözlemiştir. 600 pm'lik eksplant ile çoğaltılan tüm bitkiler bulaşık bulunurken, eksplant boyutu 270 |Um olduğunda bulaşık bitkilerin oranı %87'ye, boyut 120 |Llm olduğunda %52'ye düşmüştür. Eksplant boyutunun küçülmesi ile virüs eliminasyonu oranı artmakta ancak *in vitro* gelişme ve başarı şansı azalmaktadır.
2. Virüsten ari bitkilerin elde edilmesinde stok bitkinin fizyolojik durumu etkili olmaktadır. Bu nedenle virüsten arındırma sezon ile değişmektedir ve her mevsim virüsten ari bitkileri elde etme şansı mümkün olmamaktadır.
3. Meristem kültürünün virüs eliminasyonunda etkili bir yöntem olarak tanımlanması meristemin virüsleri içermediği tezine dayanmaktadır. Oysa virüsleri içeren meristemlerden de söz edilmektedir (karanfilde Carnation Motde Virüsü, krizantemde Chrysanthemum Stunt Virüsü, *Cymbidium*da Odontoglossum Ringspot Virüsü). Bu nedenle meristemlerin her zaman virüsten ari olmadığı da unutulmamalıdır.

Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı, meristem ucu kültürü virüs probleminin üstesinden gelebilen tek yöntem değildir. Meristem ucu kültürünün tek başına başarısız olduğu durumlarda, termoterapi (sıcaklıkla tedavi), kemoterapi (kimyasal yolla tedavi) ve krayoterapi (soğukla tedavi) yöntemleri ile birlikte uygulanmasının daha elverişli olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur.

6.3. Virüsten Ari Bitkilerin Üretilmesi

Virüsten ari bitkilerin elde edilmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Debergh ve ark., 1990; George, 1993; Sherwood, 1993; Nehra ve Kartha, 1994):

1. Meristem ucu kültürü

B. Bürün

2. Sıcaklık uygulaması (termoterapi)
3. Meristem kültürü ile birlikte sıcaklık uygulaması
4. Kimyasal madde kullanımı (kemoterapi)
5. Soğuk uygulaması (krayoterapi)
6. Mikroaşılama
7. Virüsten ari bitkilerin kallus ve protoplasttan elde edilmesi
8. Virüsten ari diğ r eksplandarın kullanılması

6.3.1. Meristem ucu kültürü

Birkaç yaprak taslağı ile beraber 1 mm'den küçük eksplandarın kültürü ‘‘meristem ucu kültürü’’ olarak ifade edilmektedir ( ekil 6.2) (George, 1993). Sadece meristemadk kubbeden meristem kültürü başlatılabilmektedir. Ancak bu işlem son derece zordur ve izole edilen apikal meristemin büyümesi başlangıçta çok yavaş olmaktadır. Bu nedenle genellikle yapılan uygulama birkaç gelişmemiş yaprak taslağı ile beraber apikal meristemadk kubbenin kültüre alınmasıdır. Bazı kaynaklarda meristem ucu 0.1-0.5 mm olarak belirtilmekte ve uç 0.5 mm'den büyük olduğunda sürgün ucu (0.5-5.0 mm) olarak tanımlanmaktadır (Nehra ve Kartha, 1994). Ancak genellikle 1 mm'den küçük eksplandar virüsten ari bitkileri elde etmek amacı ile kullanılmaktadır ve meristem ucu eksplandarının optimal büyüklüğü 0.2-1.0 mm arasındadır (George, 1993).

Genellikle virüsten arındırma amacıyla 0.5+0.2 mm'lik bir ucun yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Sherwood, 1993). Örneğın, ayır   l nde 0.1-0.4 mm (Phillips ve Collins, 1979), ilekte 0.2-0.4 mm (Gönülşen ve ark., 1992), şbetiotunda 0.1-0.3 mm (Eppler, 1990) boyutundaki eksplandar bazı virüslerin eliminasyonunda başarılı bulunmuştur.

6.3.2. Sıcaklık uygulaması (termoterapi)

Artan sıcaklıkların virüs inaktivasyonundaki etkisi ortaya konmuştur. Sıcak uygulaması aktif olarak büyüyen vegetatif materyal üzerinde etkili olmaktadır. Sıcaklık uygulaması ile çoğu virüslerin ve bazı sistemik bakteriyel hastalıkların eliminasyonu gözlenmiştir. Fakat bazı bitki viroidlerinin uzaklaştırılmasında bu uygulama etkisiz olmuştur. Sıcaklık uygulamasında büyüme için gerekli optimum sıcaklığın üzerinde bir sıcaklık seçmek gereklidir. Fakat aynı zamanda bu sıcaklığın bitki yada bitki materyali için öldürücü olmayan bir sıcaklık uygulaması olması da gerekir. Sıcaklık uygulamasında bitki kısımları (elikler veya soğanlar, yumrular) sıcak suda veya sıcak havada (50-52  C) belirli sürelerde (10-30 dakika) bırakılmaktadır. Eğer tüm bitki sıcak uygulamasına tabi tutulursa bu belirtilen sıcaklıklardan daha düşük sıcaklıklar dikkate alınmalıdır (türlere göre uzun

aralıklarla 4-30 hafta, 32-40 °C gibi). Günlük sıcaklık rejimi (36 °C gündüz / 32 °C gece) de sık sık kullanılmaktadır. Sıcağa toleranslı olmayan türler söz konusu olduğunda bunlar optimal sıcaklıklarda daha uzun süre tutulmaktadır (örneğin, 6 hafta için günlük 40 °C'de 4 saat, 16-20 °C'de 20 saat gibi) (George, 1993).

Vegetatif olarak çoğaltılan bitki türlerine bulaştığı bilinen virüslerin yaklaşık yarısının sıcaklık uygulaması ile elimine edildiği belirtilmektedir (George, 1993). Sıcaklık uygulaması günümüzde meristem ucu kültürü ile birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekü 6.3).

6.3.3. Meristem kültürü ile birlikte sıcaklık uygulaması

Sıcaklık uygulaması, çoğunlukla sadece meristem ucu kültürü ile uzaklaştırılması zor olan virüslerin eliminasyonu için kullanılmaktadır. Sıcaklık uygulaması 3 farklı şekilde yapılabilmektedir (George, 1993):

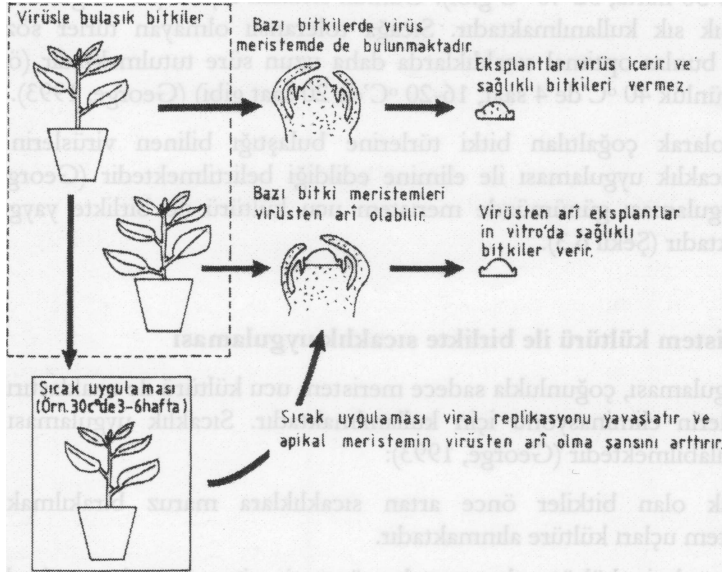
1. Bulaşık olan bitkiler önce artan sıcaklıklara maruz bırakılmakta sonra meristem uçları kültüre alınmaktadır.
2. Meristemlerin kültüre alınmasından önce *in vitro* sürgünlere yüksek sıcaklık uygulaması yapılmaktadır.
3. Kültüre alınan meristemlere sıcaklık uygulaması yapılmaktadır.

Sıcaklık uygulaması ile birlikte uygulanan meristem ucu kültürünün büyük bir avantajı, virüs süz materyal elde etmede kullanılması gerekli çok küçük eksplant boyutuna göre bu durumda daha büyük eksplandardan da aynı amaç için kullanılabilmesidir. Sıcak uygulamak bitkilerden, uygulamasız bitkilere göre daha büyük eksplandar güvenilir olarak kültüre alınabilir ve böylece küçük eksplanta göre bu eksplantın *in vitro'da* gelişme şansı da artırılmış olur.

Sıcaklık uygulaması (gündüz 38 °C ve gece 25-30 °C) ile birlikte meristem ucu kültüründe elma klonlarından apple chlorotic leaf virüs (ACLSV), apple stem grooving capillovirus ve kiraz klonlarından prunus necrotic ringspotlar virüs (PNRV) elimine edilmiştir. Ancak PNRV'nü elimine etmek için 4 hafta sıcaklık uygulaması yeterk olurken ACLSV için uygulamanın en az 6 hafta olması gerektiği belirtilmiştir (Hanke *ve ark.* 1988).

Çilekte mild yekow edge virüsü eliminasyonunda 38 °C'de 15 gün uygulama yapılan bitkilerden akan meristemlerden elde edilen bitkilerin %50'sinde, aynı sıcaklıkta 48 gün bırakılan bitkilerden akan meristemlerden elde edilen bitkilerin %100'ünde virüs elimine edilmiştir (Nehra ve Kartha, 1994).

Şerbetçi otunda American hop latent virüs (AHLV)'ünü elimine etmede 30 °C sıcaklık uygulamasının 20 °C'ye göre önemk ölçüde daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır (Eppler, 1990). Uygulanan sıcaklık derecesi ve uygulama süresinin her bir genotip ve virüs için deneysel olarak belirlenmesi gerekmektedir.



Şekil 6.3. Meristem ucu kültürü ile virüsten arı bitkilerin elde edilmesi (George, 1993).

6.3.4. Kimyasal madde kullanımı (kemoterapi)

Eğer virüsün replikasyonunu engelleyen veya virüs hareketini önleyen bir bileşik (antiviral bileşik) uygulanabilirse, kültüre alınan doku ve organlardan virüsü arındırma çok basit olacaktır. Böylece ana bitkiye sıcak uygulaması için harcanan zaman ve meristem kültürünün zorluğu da aşılmış olacaktır. Ancak bu konuda sadece birkaç bileşik bulunmuştur. Kemoterapinin meristem ucu kültürü ile kombinasyonunun virüs eliminasyonuna etkisi üzerindeki araştırmalar halen devam etmektedir.

En yaygın ve başarılı bir şekilde ribavirin (virazole-1.p-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) kullanılmaktadır. Bu madde şu ana kadar uygulanan en başarılı antiviral ajandır. Fakat, virüs eliminasyonu için tek başına diğer tekniklerin yerine kullanılması yeterli etkinlikte değildir (George, 1993).

Patates M virüsü (PVM)'ünün eliminasyonunda 1-2 yaprak taslağı bulunan meristem ucu kültüründen elde edilen soylar %59 oranında virüsten arı bulunurken 205 |LİM konsantrasyonda ribavirin (virazole) varlığında bunun %100'e ulaştığı belirtilmiştir (Cassells ve Long,1981).

Ribavirin dışında diğer bazı antiviral bileşiklerin de yararlı etkilerinden söz edilmektedir. Diğer bir ajan 2-thiouracil'in kültür ortamına eklenmesinin bütün kalkışlarından patates virüsünü elimine etmeye yardım ettiği, malachite green

(diaminotriphenylmethane)'nın ise düşük konsantrasyonlar da patates sürgün uçlarından virüsü elimine etmede etkili olduğu belirtilmektedir. Ancak ne 2-thiouracil, ne de malachite green *in vitro*'da güvenilir ajanlar değildir (George, 1993).

Meristem kültürü ile virüsten ari patates tohumluğu üretiminde bulaşık yumrulardan meristem ucunu (0.5 mm'lik) almadan 4 hafta önce yumruların 36 °C'de bırakılmasının ve besin ortamında Ter mg/1 2,4 D ve 2-thiouraci'nin birlikte bulunmasının virüsten ari bitkicik oranını arttırdığı belirtilmiştir (Allam *ve ark.* 1984). Antiviral ajan vidarabine (adenine arabinoside)'nin de virüsten ari bitkicikleri elde etme şansını arttırdığı belirtilmektedir. Kemoterapi ile meristem kültürünün kombine edilmesi konusunda yapılan çalışmada patates X ve S virüsleri (PVX ve PVS) ile %100 bulaşık Rosa patates çeşidinde 5 antifitoviral bileşiğin etkisi araştırılmıştır. Virüs teslerinde kontrol bitkilerinin tamamı bulaşık bulunurken, 2,4-dioxohexahydro-1,3,5-triazine (DHT) ile bitkilerin %72'si, 2-thiouracil ile %46.6'sı, eyanoguanidin ile %28.8'i, imanın ile %43'ü, novoimanin ile %21.6'sı virüsten ari bulunmuştur (Borissenko *ve ark.*, 1985).

Genellikle ribavirin konsantrasyonunun ve kültürde uygulama zamanının artması ile virüs eliminasyonu oranının arttığı belirtilmekle beraber, 20-50 mg/T'nin üzerindeki konsantrasyonların bitki büyüme oranını azalttığı ve fitotoksik olduğu da belirtilmektedir (Sherwood, 1993). Söz konusu antiviral bileşiklere, türlerin reaksiyonu ve bileşiklerin virüsten ari bitkilerin elde edilmesindeki etkisi aynı değildir. Bu nedenle uygulanacak konsantrasyon ve kültürde uygulama süresi araştırılmalıdır. Ayrıca, antiviral ajanların fitotoksik etkileri de dikkate alınarak ayrıntılı olarak incelenmesi gereklidir.

6.3.5. Soğuk uygulama (kryoterapi)

Yüksek sıcaklık uygulamaları ile meristem ucu kültürünün kombinasyonuna benzer şekilde meristem ucu kültürü ile birlikte düşük sıcaklık uygulamalarının da virüs eliminasyonu konusunda süs bitkilerinde başarılı örnekleri vardır. *Chrysanthemum morifolium*'un kültüre alınan meristem dokularından CSV ve CCMV (*Chrysanthemum chlorotic motde virüs*) virüslerini elimine etmek için soğuk uygulaması elverişli bir yöntem olarak ispadanmıştır. 5 °C'de 4 ay bırakılan *Chrysanthemum morifo Hum' dän* alman meristem uçlarının *in vitro* kültürü ile CSV %67, CCMV ise %22 oranında elimine edilmiştir. Süre 7.5 aya çıkartıldığında ise eliminasyon oranı CSV'de %73'e, CCMV'de ise %49'a yükselmiştir (Debergh *ve ark.*, 1990).

6.3.6. Mikroaşılama

Mikroaşılama, virüsten ari anaçların (çöğür) üzerine meristemlerin aşılması tekniğidir. Virüsle bulaşık olmayan tohumlar kök stokları olarak kullanılmaktadır.

B. Bürün

Eğer meristem *in vitro*'da gelişmiyorsa veya meristemden gelişen sürgünler k klenmiyorsa bunların *in vitro*'da,  oğaltılmış anaçlar üzerine aşılanması yapılmaktadır. Ya virüsle bulaşık ana bitkiden direkt olarak aseptik  n işlemler ile ayrılan meristem ucu ya da meristem ucunun *in vitro* kültüründen sonuçlanan küçük bir sürgün ucu virüsten ari anaca aşılanmaktadır. Bu tür mikroaşılama meristem ucu kültürünün başarısız olduğu türlerde virüsten ari stokları üretmek için kullanılmaktadır.

Meyve ağaçlarından virüs eliminasyonu genellikle termoterapi ile meristem ucu kültürlerinden gelişen köklü sürgünlere mikroaşılama ile başarılıdır (Zimmerman ve Swartz, 1994). *In vitro* sürgün ucu aşılama tekniği *Citrus* türlerinde %60-70 oranındaki aşı başarısı ve %90 toprağa şaşırtmadaki başarısı ile ticari üretimde önemli bir uygulama alanı bulmuştur (Grosser, 1994). Bu şekilde sürgün ucu aşılama metotları virüsten ari klonlar elde etmek için başarıyla kullanılmaktadır.

6.3.7. Virüsten ari bitkilerin kallus ve protoplasttan elde edilmesi

Virüsten ari bitki rejenerasyonunun kallus tan ve pro toplaş dardan başlatılan kültürlerle de elde edilebileceğini belirten raporlar bulunmaktadır. Ancak, kallus kaynaklı bitkiler kesin olarak virüsten ari olmayıp orijinal bitkiye genetik olarak benzemeyebilir. Bu da kallus kültürlerinin virüs eliminasyonunda kullanımının çok uygun olmadığını ortaya koymaktadır (George, 1993). Adventif tomurcuk veya somatik embriyogenesis yoluyla nusellustan kaynaklanan kalkıştan rejenere olan bitkicikler yüksek derecede virüsten aridir. Fakat, somatik embriyogenesis virüsten ari klonları elde etmenin pratik bir yolu olarak görülmemektedir (George, 1993).

6.3.8. Virüsten ari diğer eksplantlar

Virüsle bulaşık olan bitkilerin yaprakları patojenin penetrasyon yapamadığı yerlerde koyu yeşil alanlara sahiptir. Böyle bölgelerden akan eksplantlardan elde edilen rejenerandan çoğu virüsten ari bulunmuştur (George, 1993).

6.3.9. Virüslerin tanımlanması

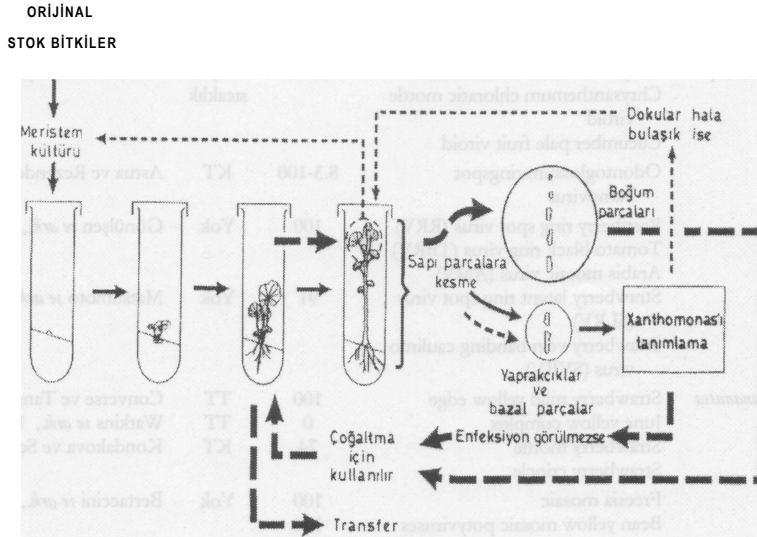
Virüsten ari (virus-free) sözcüğü, teşhis edilebilen virüslerden arındırılmış anlamında kullanılır ve bu virüsler virüs anakzleri ile teşhis edilir. Günümüzde virüsleri tanımlamada kullanılan teknikler aşağıdaki başkklar altında toplanabilir (George, 1993):

1. İndikatör bitkiler kullanarak yapılan testler
2. Elektron mikroskobu ile virüs partiküllerinin varlığını araştırma

3. Serolojik testler: Çeşitli metotlar geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan ELISA (Enzyme Liked Immunosorbent Assay) testidir.
4. Nükleik asit analizleri.

6.4. Bakteri ve Mantarlardan Ari Bitkilerin Üretilmesi

Bitki doku kültürlerinde görülen üç çeşit kontaminasyondan biri olan akut kontaminasyonun giderilmesinde yüzeysel sterilizasyonun önemi bilinmektedir. Eksplant içerisinde gizli bulunan (endojen) mikroorganizmaların sebep olduğu diğer kontaminasyonlarda ise mikroorganizmaların belirlenmesi ve giderilmesinin de güç olduğu bilinmektedir. İşte meristem kültürü tekniği virüsten ari bitkilerin elde edilmesi amacıyla yanı sıra donör bitkinin bakteriyal ve fungal patojenler ile enfekte olduğu durumlarda da avantaj sağlamaktadır. Çünkü bitkide terminal bölgenin vasküler farklılaşma bölgesinin üst kısmı patojenik partikülleri pek içermez. Bu nedenle, eğer bulaşık olan bir bitkiden, söz konusu bu bölgeden küçük bir eksplant alınıp *in vitro* ortamda başarılı olarak geliştirilirse patojensiz bitki elde edilmesi mümkün olmaktadır (George, 1993). Örneğin *Pelargonium*'da ve diğer bazı bitkilerde iç kontaminandan sapın alt kısımlarında yoğunlaşma eğilimindedir. 1 mm'lik apikal sürgün uçları (yalnız lateral tomurcuklardan değil) hemen hemen kontaminandardan tamamen aridir. Bu nedenle bir veya birden fazla meristem ucu veya sürgün ucu kültürü uygulamasından sonra sürgünler mikroorganizmalardan arındırılmış olmaktadır (George, 1993). Örnek olarak, *Pelargonium*'u *Xanthomonas pelargonii*'den arındırmada meristem ucu kültürü etkili olmuştur (Şekil 6.4).



Şekil 6.4. *Xanthomonas pelargonii*'den ari *Pelargonium*'u çoğaltma metodu (George, 1993).

B. Bürün

6.5. Sonuç

Meristem ucu kültürü gerek mikroçoğaltım amacı ile gerekse virüsten ari bitkileri elde etme amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle meristem ucu kültürleri s s bitkilerinden krizantem, karanfil, tarla bitkilerinden patates, bahçe bitkilerinden ilek ve narenciyede rutin olarak uygulanmaktadır. Özellikle narenciyede mikroaşılama tekniği ile virüs eliminasyonu başarıyla kullanılmaktadır. Meristem ucu kültürü ile virüs hastalıklarından arındırılan bitkilerin bazılarının listesi Tablo 6.1'de verilmiştir.

Tablo 6.1. Meristem ucu kültürü ile termoterapi (TT), kemoterapi (KT), soğuk uygulamaları ve mikroaşılama ile virüs eliminasyonu konusunda yapılan bazı alışmalar.

Bitki Türü	Virüs/Viroid	Başarı Oranı (%)	TT/KT	Kaynaklar
<i>Aeschynanthus bildebrandii</i>	Tobacco mosaic virüs	-	TT+KT	Paludan, 1985a
<i>Allium sativum</i> L.	Onion yellow dwarf	85	TT	Walkey ve ark., 1987*
<i>Allium sativum</i> L.	Onion yellow dwarf potyvirus	90-100	TT	Uçman ve ark., 1998
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic common latent carlavirus (GCLV)	62		Verbeek ve ark., 1995
	Leek yellow stripe potyvirus (LYSV-G)	100		
	Onion yellow dwarf potyvirus (OYDV-G)	92		
	Onion mite-borne latent rymovirus (OmbLV-G)	<54		
<i>Citrus</i> sp.	Citrus tristeza	-	KT	Greno ve ark., 1990*
	Citrus infectious variegation			
	Exocortis viroid			
<i>Chrysanthemum</i> sp.	Chrysanthemum stunt viroid	18-80	Düşük sıcaklık	Cichal ve Kryczyhski, 1987*
	Chrysanthemum chlorotic mottle viroid			
	Cucumber pale fruit viroid			
<i>Cymbidium</i>	Odontoglossum ringspot barmovirus	8.3-100	KT	Astua ve Rezende, 1998
<i>Fragaria</i> sp.	Raspberry ring spot virüs (RRV)	100	Yok	Gönülşen w ark., 1992
	Tomato black ring virüs (TBRV)			
	Arabid mosaic virüs (AMV)			
	Strawberry latent ring spot virüs (SLRV)	91	Yok	Matsumoto ve ark., 1989
	Strawberry vein banding caulimovir�s (SVBV)			
<i>Fragaria x ananassa</i>	Strawberry mild yellow edge	100	TT	Converse ve Tanne, 1984*
	June yellow complex	0	TT	Watkins ve ark., 1990*
	Strawberry mottle	74	KT	Kondakova ve Schuste, 1991*
	Strawberry erine			
<i>Freesia</i> sp.	Freesia mosaic	100	Yok	Bertaccini ve ark., 1989
	Bean yellow mosaic potyviruses	100		
	Cucumber mosaic cucumovirus	70		

*Nehra ve Kartha, 1994

Tablo 6.1'in devamı...

Bitki Türü	Virüs/Viroid	Başan Oram (%>	TT/KT	Kaynaklar
<i>Ipomoea batatas</i> L.	Sweet potato yellow chvarf	100	TT	Green ve Lo, 1989*
<i>Kalanchoe</i> sp.	Kalanchoe Latent Virüs (KLV-1)	-	TT	Paludan, 1985b
<i>Malus</i> sp.	Apple stem grooving capillovirus	-	TT+KT	Yamağa ve Munakata, 1991*
<i>Manihot esculenta</i>	Cassava latent	100	TT	Adejare ve Coutts, 1981*
	Cassava mosaic	100	TT	Kartha ve Gamborg, 1975*
<i>Medicago</i> sp.	Alfalfa mosaic virüs	34.4	Yok	Konecna ve ark., 1985
<i>Musa</i> sp.	Cucumber mosaic cucumovims	100	KT	Bondok ve ark., 1987
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Tobacco mosaic	0	TT	Saldana ve Dawson, 1982*
<i>Pisum sativum</i> L.	Pea seedborne mosaic	90-100	Yok	Kartha ve Gamborg, 1978*
<i>Pogostemon cablin</i> L.	Patchouli mosaic	100	Yok	Kukreja ve ark., 1990*
<i>Prunus cerasus</i> L.	Prunus chvarf	29	Yok	Baumann ve ark., 1984*
<i>Ribes rubrum</i> L.	Raspberry ring spot	100	Yok	Krogstrup ve Thomsen, 1985*
<i>Rubus ideaus</i> L.	Nine sap transmissible	-	TT	Janeckova, 1988*
	Apple mosaic	85-100	Yok	Hedtrich ve Baumann, 1989*
	Raspberry bushy dwarf	100	KT	Kudell ve Buchenaur, 1989*
<i>S olan um tuberosum</i> L.	Potato virüs X (PVX)	32	TT	Saldana ve Lara, 1984*
	PVX	15-40	TT	Saldana ve Vargas, 1985*
	Potato leaf roll virüs (PLRV)	100	Yok	Kayım ve Koç, 1992
	Potato S carlavirus (PSV)	90	Yok	Matsumoto ve ark., 1989
	Potato Y potyvirus (PYV-T)	96	Yok	
	Potato latent carlavirus (PSLV)	94	Yok	
	Potato vims M	58	KT	Cassells ve Long, 1981
	Potato viruses X ve S (PVX, PVS)	21.6-72	KT	Borissenko ve ark., 1985
<i>Solanum tuberosum</i> L.>	Potato X potexvirus (PXV)	54	rr	Lazic, 1997
	Potato Y potyvirus (PYV)	100	TT	
	Potato M carlavirus (PMV)	94	İT	
	Potato A potyvirus (PAV)	97	TT	
	Potato S carlavirus (PSV)	59	TT	
	Potato leaf roll luteovims (PLRV)	100	TT	
Şeker kamışı	Ratoon stunting (RSD)	-	KT	Delgado ve ark., 1992
	(Clavibacter xyli subsp-xyli)		ve/veya TT	
Şerbetçi otu	Apple mosaic ilarvirus		TT	Hesse ve Maier, 1994
	Arabis mosaic nepovirus			
	Hop mosaic carlavirus			
	Prunus necrotic ringspot ilarvims			
	Hop latent carlavirus			
	American hop latent virüs			
<i>Trifolium pratense</i> L.	Alfalfa mozaic virüsü (AMV)	50.6	Yok	Serritova ve Pokomy, 1987
	Bean yelow mozaic virüs (BYMV)	76.3	Yok	
<i>Vitis vinifera</i> L.	Grapevine fan leaf	-	TT	Monette, 1986*

*Nehra ve Kartha, 1994

Kaynaklar

- Allam EK, El-Amrety A, El-Afifi SI, Eid SA, Abou-Zeid AA (1984) Production of virus-free potato seed tubers in Egypt by meristem culture. *Annals of Agricultural Science*, Ain. Shams University, 29(2):1079-1089.
- Bertaccini A, Belardi MG, Rustignoli E (1989) Virus-free *Freesia* corms produced by meristem tip culture. *Advances in Horticultural Science*, 3(3): 133-137.
- Bondok A, El-Din TMN, Gabr MF, Tadros M (1987) Production of virüs free “Hindi” banana plants utilizing, meristem culture and thiouracil treatments. *Assiut Journal of Agricultural Sciences*, 18(4): 167-185.
- Borissenko S, Schuster G, Schmygla W (1985)S Obtaining a high percentage of explants with negative serological reactions against viruses by combining potato meristem culture with antiphytoviral chemotherapy. *Phytopathologische-Zeitschrift*, 114(2): 185-188.
- Bürün B, Türkoğlu G (1996a) Meristem ve sürgün ucu kültürleri (II) Meristem ve sürgün ucu kültürü uygulamaları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6(3): 169-187.
- Bürün B, Türkoğlu G (1996b) Meristem ve sürgün ucu kültürleri (I) Meristem ve sürgün ucu kültürlerine etki eden faktörler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6(3): 103-111.
- Cassells AC, Long RD (1981) The elimination of potato viruses X,Y,S and M in meristem and explant cultures of potato in the presence of Virazole. *Potato Res.*, 29: 165-173.
- Debergh P, Roggemans J, Metsenaere RS (1990). Tissue culture in relation to ornamental plants. In: Bhojwani SS (ed), *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, Volume 19, Chapter 7, pp. 161-190, The Netherlands.
- Dodds JH, Roberts LW (1986) *Experiments in Plant Tissue Culture*, pp. 113-121, USA.
- Eppler A (1990) Elimination of american hop latent virüs (AHLV) from hops. *Mededelingen Van de Faculteit Landbouwweten Schappen, Rijksuniversiteit Gent.*, 55(3a): 1055-1057.
- Astua FJ, Rezende JAM (1998) Odontoglossum ringspot virus-free *Cymbidium* obtained through meristem tip chemotherapy. *Fitopatologia-Brasileira*, 23(2): 158-160.
- George EF (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1, The Technology*. Exegetic Ltd. Edington, Wilts, England.
- Grosser JW (1994) *In vitro* culture of tropical fruits. In: Vasil IK and Thorpe TA (eds), *Plant Celi and Tissue Culture*, pp. 475-496. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Grout BWW (1990) Meristem-tip culture. In: Pollard JW and Walker JM (eds), *Plant Celi and Tissue Culture - Methods in Molecular Biology*, Vol. 6, pp. 81-91. The Humana Press, USA.
- Gönülşen N, Önal MK, Özsezgin E, Tannsever A, Erkan S (1992) Çileklerin hızlı üretimi ve virüslerden arındırılması “bitki doku kültürleri” yöntemlerinden yararlanma imkanları. *Türkiye Birinci Bahçe Bitkileri Kongresi, Ege Üniv. Zir. Fak.*, s. 333-336, İzmir.

Hanke V, Fischer C, Wolfram B (1988) Production of virus-free plant material for fruit breeding by in vitro methods. *Gartenbau*, 35(6): 176-178.

Hannweg K (1998) Virus-free granadilla cultivars. *Neltropika Bulletin*, No. 304: 7-8.

Hesse H, Maier J (1994) An improved method for the production of virus-free hops-Gesunde-Pflanzen, 46(8): 274-276.

Kayım M, Koç NK (1992) Obtaining of virus-free potato (*Solanum tuberosum* L.) planting stock material through meristem culture. *Doğa Tarım ve Ormancılık Derg.*, 16(2): 380-391.

Konecna D, Nedbalkova B, Smrz J (1985) Use of meristem cultures for the recovery of virus-infected lucerne. *Sbornik Vedeccych Praci Vyzkumny a Slectitelsky Ustay Picninarsky Troubsko u Brna*, 9: 123-127.

Lazic B (1997) Health status and recovery of potato cv. Early Rose. *Acta-Hordculturae*, 462: 357-362.

Matsumoto T, Namba I, Watanabe Y (1989) Eliminadon of viruses by meristem culture (1) production of virus-free potato and strawberry. *Research Bulletin of the Plant Protection Service (Japan)*, 25: 31-34.

Nehra NS, Kartha KK (1994) Meristem and shoot tip culture: Requirements and applications. In: Vasil IK and Thorpe TA (eds), *Plant Celi and Tissue Culture*, pp. 37-70. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Paludan N (1985a) Inactivation of tobacco mosaic virüs in *Aeschjnanthus hildebrandii* by means of heat treatment chemotherapy and meristem tip culture. *Tidsskrift for Planteavl*, 89(3): 273-278.

Paludan N (1985b) Inactivation of Kalanchoe latent virüs strain 1 in Kalanchoe using heat and meristem-tip culture. *Tidsskrift for Planteavli*, 89(2): 191-195.

Delgado PB, Gonzalez-Arno T, Orta-Villavicencio C, Lagomasino I, Maribona R (1992) Elimination of RSD from plants by meristem tip culture. *Revista-de-Proteccion-Vegetal*, 7(2-3): 97-101.

Phillips GC, Collins GB (1979) Virüs symptom-free plants of red clover using meristem culture. *Crop Science*, 19: 213-218.

Raemakers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF (1997) Micropropagation of *Manihot esculenta* Crantz (Cassava), (In: Bajaj YPS (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 39, High-Tech and Micropropagation, pp. 78-102, Springer Verlag, Berlin.

Serritova J, Pokorny R (1987) Obtaining virüs free red clover by meristem culture. *Sbornik Veeckych Praci OSEVA. Vyzkumny a Selechtitelsky Ustay Picninarsky, Traubsko u Brna*, 10: 143-148.

Shervwood JL (1993) Aplied aspects of plant regeneration. In: Dixon DA and Gonzales RA (eds), *Plant Celi Culture - A Pratical Approach*, pp. 135-138, Newyork.

Slack SA, Tufford LA (1995) Meristem culture for virüs elimination. In: Gamborg OL and Phillips GC (eds), *Plant Celi, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods*, pp. 117-128, Springer-Verlag, Berlin.

B. Buriin

Uçman R, Zel J, Ravnikar M (1998) Thermotherapy in virüs elimation from garlic: influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation *in vitro*. Scientia-Horticulturae, 73(4): 193-202.

Wiedemann W, Dertel C (1988) Pelargonium flower break virüs on pelargoniums occurence, importance and treatment. Nachrichtenblatt fur den pflanzens chutz in der DDR, 42(12): 240-242.

Verbeek M, Dijk P, Well PMA (1995) Efficiency of eradicadon of four viruses from garlic (*Allium sativum*) by meristem-tip culture. European Journal of Plant Pathology, 101(3): 231-239.

Zimmerman RH, Swartz HJ (1994) *In vitro* culture of temperate fruits. In: Vasil IK and Thorpe TA (eds), Plant Celi and Tissue Culture, pp. 457-474, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Bölüm 7

Sekonder Metabolit Üretimi

Atalay Sökmen¹, Ekrem Gürel²

¹ Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 58140 Kampüs, Sivas

² Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 14280 Bolu

e-posta: asokmen@cumhuriyet.edu.tr

7.1. Giriş

insanoğlu yaşamını sürdürebilmesi için gereksindiği besinleri bitkilerden karşılar. Çünkü bitkiler, temel besin gereksinimlerini gidermek için gereken karbohidrat, protein ve yağların, yani primer metabolitlerin kaynağını oluşturmaktadır. Besinsel önemi çok büyük olan bu bileşiklerden başka odun, selüloz, zambak ve lastik gibi diğer yararlı maddeler de bitkilerden sağlanmaktadır. Besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal değer taşımamakla beraber, başta ilaç sanayi olmak üzere; kimya, besin, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz bazı kimyasallar da yine bitkilerden elde edilmektedir. Bu kimyasallara genel olarak “sekonder (ikincil) metabolitler” adı verilmekte ve genel anlamda bitkisel ürünler bu başlık altında değerlendirilmektedir.

Sekonder metabolitlerin, diğer bir deyişle doğal ürünlerin, sayı ve yapı itibarı ile çok büyük çeşitlilikte üretilmeleri yüksek bitkilere has özelliklerden birisidir. Önceleri bu ürünler, bitkiler tarafından oluşturulan ve hiç bir işlevi olmayan atık maddeler olarak kabul edilmekteydi. Ancak daha sonra bu metabolitlerin; savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini sürdürmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleri olduğu anlaşılmıştır.

Sekonder metabolitlerin bitkilerdeki önemli işlevleri şu şekilde **özetlenebilir**:

- Kuraklık, tuzluluk, UV ışınları vs. gibi değişik çevresel etkenlerin oluşturduğu stres ortamına karşı koyma,

Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (2001) Bitki Biyoteknolojisi 1 - Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi

- Herbivorlara (böcekler, sürüngenler vb.) karşı savunma,
- Mikroorganizmalara (bakteriler, viruslar, mantarlar vb.) karşı savunma,
- Bazı metabolik ve daha gelişmiş ekolojik işlevler (polinasyonu ve tohum dağılımını sağlamak için hayvanları ve diğer taşıyıcıları cezbettirme gibi).

Bütün bu mekanizmaların yanı sıra bitkiler, fiziksel etkenlerin veya mikrobiyal enfeksiyonların sonucunda oluşan hasar ve yaralanmalar esnasında, aktif savunma mekanizmalarını devreye sokarak fitoaleksinler adı verilen düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal kimyasallar üretirler. Fitoaleksinlerin bitki doku kültürlerinde sekonder metaboliderin oluşturulmasındaki rolü, bu bölümde daha sonra tartışılacaktır.

7.2. Sekonder Metaboliderin Ekonomik Önemi

Enerjinin, güneş ışınlarından fotosentez yoluyla bitkilere akışının dünya ekonomisi üzerindeki önemi buradaki tartışma konusunun çok ötesindedir. Bu bölümün asıl konusu olan bitkisel doğal ürünler; birçok ilaç ham maddesi gibi saf ürünlerden, besin katkı maddeleri ve kozmetikler gibi karışımlara kadar değişkenlik göstermektedir. Bitkisel ürünlerin yapılarının böylesine karmaşık oluşu, bu metaboliderin kimya sanayinde ham madde kaynağı olarak kullanılmasını sağlamıştır. Sonuç olarak bir çok bitkisel ürün kimya endüstrisinde kullanılmaktadır. Kullanım amacı bakımından bu ürünler, aşağıdaki başlıklar altında toplanmıştır.

7.2.1. ilaç olarak kullanılan sekonder metabolitler

Tarihle ilgili erişilebilen yazılı kaynaklarda, ilk insanların çeşitli hastalıkların tedavisi için bitkilerden yararlandıkları belirtilmektedir. Elbette bu kullanım biçimi etken madde olan sekonder üründen çok, bitkinin kendisine veya değişik yollarla elde edilen özülerine dayanmaktadır. Bugün bile dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler ilaçların ham maddesi olarak kullanılmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80'i sağlık gereksinimlerini ilk etapta geleneksel tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Dünya nüfusunun %80'inin gelişmekte olan ülkelerde yaşadığı düşünülürse, toplam dünya nüfusunun %64'ü bitkileri tedavi amaçlı kullanmaktadır (Farnsworth, 1985). Gelişmiş ülkelerde ise reçete ile satılan ilaçların yaklaşık %25'i bitkisel kökenli kimyasallardır (Principe, 1989). Şüphesiz, bu ilaçların keşfedilmesinde halk arasında değişik hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkilerin, yani kocakarı ilaçlarının, araştırılması ve değerlendirilmesi büyük katkı sağlamıştır. Vinkristin, vinblastin, rezerpin, kinin ve hatta aspirin bugünkü ekonomik ve sağlık açısından önemlerini bu araştırmalara borçludurlar (Cox, 1990). Sağlık açısından çok önemli bazı bitkisel kaynaklı ilaç etken maddeleri, elde edildiği bitkiler ve tedavi işlevleri ile birlikte bitkisel kökenli ilaçlar sınıfına dahil edilebilir. Ancak bu maddeler kontrollü ve yasal sınırlar dahilinde kullanıldığında ilaç olarak adlandırılabilir. Örneğin, *ELrytroxylum coca* dan elde edilen kokain, lokal anestezi

için kullanılmakla beraber aynı zamanda yasa dışı olarak uyuşturucu ticaretinde de önemli yer tutmaktadır. Aynı durum yüksek derişimleri alışkanlık yapıcı ve sonunda öldürücü olan morfin ve eroin için de geçerlidir. Uyarıcılar ise uyuşturucular kadar zararlı etki yapmasa bile aşırı kullanımları sağlık açısından zararlı olabilir. Tütünden (*Nicotiana tabacum*) elde edilen ve insektisit (böcek öldürücü) olarak da kullanılan nikotin ile kahve (*Cajfeea arabica*) veya çaydan (*Camellia sirsensis*) elde edilen ve merkezi sinir sistemini uyarıcı olarak kullanılan kafein bu gruba örnek olarak verilebilir. Günümüzde ilaç sanayinde kullanılan bazı önemli bitkisel kökenli maddeler (droglar), elde edildiğı kaynaklar ve işlevleri Tablo 7.1’de verilmektedir.

Tablo 7.1. İlaç sanayisinde kullanılan bazı önemli bitkisel kökenli maddeler (Fowler, 1982).

ilaç Etken Maddesi	Elde Edildiğı Bitki	Tedavi işlevi
Atropin	<i>Atropa belladonna</i>	Antikolinerjik
Digoksin	<i>Digitalis lanata</i>	Kardiatonik
Digitoksin	<i>Digitalis purpurea</i>	Kardiovasküler
Emetin	<i>Cephaelis spp.</i>	Ampiil dizanteri tedavisi
Efedrin	<i>Ephedra sinica</i>	Bronş açıcı
Filokarpin	<i>Pilocarpusjaborandi</i>	Kolinerjik
Hiyosiyamin	<i>Hyoscyamus niger</i>	Antikolinerjik
Kinin, Kinidin	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Sıtma tedavisi
Kodein	<i>Papaver somniferum</i>	Öksürük kesici, analjezik
Reserpin	<i>Pummlia serpentina</i>	Antihipertansif
Vinkristin, Vinblastin, Aymalisin	<i>Catharanthus roseus</i>	Kanser tedavisi

1920’li yıllarda başlayan ve 1950’li yıllarda doruk noktasına ulaşan sentetik ilaçların geliştirilmesi ve mikroorganizmalar kullanılarak özellikle antibiyotiklerin fermentasyon yoluyla üretimi, tıbbi bitkilerin dünya ticaret hacmindeki payını önemli ölçüde azaltmıştır. Bununla beraber, 1980 verilerine göre tıbbi bitkilerin dünya ticaret hacmi 551 milyon doları aşmaktadır. Bu rakamın sadece 20 000 bitki türü için geçerli olduğu düşünüldüğünde, gerek sağlık ve gerekse ekonomik açıdan bitkiler aleminin ne derece önemli kaynak olduğu açığa çıkacaktır.

7.2.2. Besin katkı maddeleri olarak kullanılan sekonder metabolitler

insanoğlu için yaşamsal değeri tartışılmaz olan bitki primer metabolitlerinin yanı sıra, tat ve koku verici maddeler de besin endüstrisinde önemli yer tutmaktadır. *Sentetik* katkı maddelerinin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilerinin ortaya çıkışı ile birlikte; et, süt, meyve, sebze, deniz ürünleri ve meşrubat sektörlerinde *doğal* ürünlere duyulan talep giderek artırmaktadır. Tat ve koku vericiler tek bir kimyasal olabildiğı gibi, bir çok kimyasalın karışımı da olabilmektedir. Örneğin,

Thaumatococcus daniellii'den elde edilen tatlandırıcı, thaumatin, bir tek kimyasaldan ibarettir. *Zingiber officinale**den elde edilen zencefilde ise gingeroller adı verilen aromatik bileşikler ve geranial ve neral gibi uçucu bileşikler için içine girmektedir. Thaumatin'ın hem düşük kalorili olması hem de sakkarozdan 2000 kat daha tatlı olması nedeniyle, bu tatlandırıcıya olan ilgi giderek artmaktadır. Bitkisel kökenli tat ve koku verici maddelere örnekler Tablo 7.2'de sunulmaktadır.

7.2.3. Parfümeri ve zirai mücadelede kullanılan sekonder metabolitler

Bitkisel kökenli ürünlerden özellikle parfüm olarak yararlanılması da çok eski tarihlere kadar dayanmaktadır. Örneğin, *Koşa* (gül) bitkisi türlerinden gül yağı, *Kavandula* bitkisinden lavanta ve *jasminum* türlerinden yasemin ilk çağlardan beri bilinen ve bugün bile parfüm ve kozmetik sanayinde önemli yeri olan bitkisel ürünlerdir. Son yıllarda bitkisel kökenli doğal ürünler zirai mücadele amacıyla da kullanılmaktadır. Bunların en ilgi çekici olanları *Chrysanthemum cinerariaefolium* çiçeklerinden elde edilen ve insektisit olarak kullanılan piretrinlerdir (Tablo 7.2).

Tablo 7.2. Endüstride kullanılan bitkisel kökenli diğer doğal ürünler (Stafford, 1991).

Ürün	işlevi	Elde Edildiği Bitki
Besin		
Kinin	Acılaştırıcı	<i>Cinchona ledgeriana</i>
Monellin	Tatlandırıcı	<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i>
Mirakulin	Tatlandırıcı	<i>Sinsepalum dulcifolium</i>
Glisirrizin (Meyan)	Tatlandırıcı	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
Krosetin	Renklendirici	<i>Crocus sativa</i>
Betalain	Reklendirici	<i>Beta vulgaris</i>
Likopein	Renklendirici	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Humulon, Lupulon	Acı ve koku verici	<i>Humulus lupulus</i>
Vanillin	Koku verici	<i>Vanilla planifolia</i>
Parfüm ve kozmetik		
Yasemin yağı	Parfüm	<i>jasminum spp.</i>
Gül yağı	Parfüm	<i>Koşa damascena</i>
Lavanta yağı	Parfüm ve kozmetik	<i>Kavandula officinalis</i>
Zirai Mücadele		
Piretrin, Sinerin, Yasmolin	İnsektisit	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>
Nikotin	İnsektisit	<i>Nicotiana tabacum</i>
Anakardik asit	Molluskusit	<i>Anacardium occidentale</i>

Sentetik piretrinlere karşı böceklerde artan dirençlilik ve toksik etkileri nedeniyle doğal piretrinlerin kullanımı artmaktadır. Şüphesiz gerek parfüm ve kozmetik ve gerekse zirai mücadele amacıyla kullanılan bitkisel kökenli kimyasalların sentetik

olanlara göre, daha önce de belirtildiği gibi, bazı avantajları vardır. Sentetik ürünlerin kullanımında çok sık karşılaşılan yan etkiler, bozunma veya parçalanma sürelerinin uzun olması, ortaya çıkan bozunma ürünlerinin de çevre kirleticisi veya halk sağlığı açısından potansiyel tehlike oluşturması, detoksifikasyonlarında karşılaşılan güçlükler bu alanda da bitkisel kökenli ürünlerin tercih edilmesini sağlamaktadır.

7.3. Sekonder Metaboliderin Üretimi

Bu yüzyılın başında, Haberlandt (1902) adlı araştırmacının deneyleri ile birlikte bitki doku ve hücre kültürü tekniğinin başlangıcı olarak kabul edilir. Gerek sağlık ve gerekse ekonomik açıdan çok değerli bitkisel doğal ürünlerin bu teknikten yararlanılarak üretilmesi fikri ancak 1950'li yıllarda gerçekleşmiştir. Doğal ürünlerin sentezi konusunda bitki hücre kültürlerinin alternatif bir yol olarak gösterilmesi, 1956'da Routier ve Nickel'in ABD'de patent başvurusu ile başlamıştır. Sonraki yıllarda, bu ürünlerin bitki hücre kültürleri ile üretimine dair çabalar çoğu kez hayal kırıklığı ile sonuçlanmıştır. Birçok durumda, istisnalar hariç, bitki hücre kültürleri tarafından üretilmesi istenen ürünler ya hiç üretilmemiş ya da üretim olsa bile çok düşük düzeyde kalmıştır. Ancak, 1970'li yıllardan itibaren bitki doku ve hücre kültürleri ile sekonder metaboliderin biyosentezi araştırmaları dünya çapında hız kazanmıştır. Bunun iki önemli nedeni vardır: Birincisi, son yıllara kadar 2000'den fazla bitki türünün organ, doku ve hücre kültürlerinin gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Bu kültürlerin her biri için uygun besi ortamlarının seçilerek veya besi ortamı bileşenleri düzenlenerek arzu edilen kimyasalın üretilebileceği düşünülmektedir, ikinci ve çok daha önemli olan bir gelişme ise, bitki hücre kültürlerinin çeşitli kimyasalları üretebileceğine dair çok sayıda çalışmanın ortaya çıkmasıdır (Tablo 7.3).

Tablo 7.3. Bitki hücre kültürleri tarafından üretilen bazı doğal bileşikler.

Alkaloidler	Flavonoidler	Lignin	Steroidler ve türevleri
Antrakınonlar	Kalkonlar	Naftokinonlar	Taninler
Benzokinonlar	Kinonlar	Nükleik asitler	Terpenler
Diantronlar	Ksantonlar	Organik asitler	Terpenoidler
Fenoller	Lateks	Peptidler	Vitaminler

Bu ürünler arasında, özellikle ilaç yapımında kullanılan kimyasalların bulunması, bazı drogların ana bitkiden ziyade bu bitkinin hücre kültürleri tarafından üretimini ekonomik açıdan cazip kılmaktadır. Doğal bileşiklerin bu alternatif yöntem ile üretimi bazı büyük avantajlar sağlamaktadır. Bunlar şu şekilde özetlenebilir:

- Ana bitkinin kültürü veya toplanması esnasında karşılaşılan çevresel etkenlerin (iklim, coğrafi zorluklar, ulaşım güçlükleri, mevsimsel kısıtlamalar vs.) ortadan kaldırılması,
- Arz-talep dengeleri göz önüne alınarak gerektiği zaman, yeterli üretimin sağlanabilmesi ve böylece piyasanın düzenli bir şekilde kontrolü,
- Daha sabit kalitede ve verimlilikte üretim,
- Kültürü yapılan bitkiler için daha az arazi kullanımı,
- Polidk baskılardan uzak, daha serbest bir üretim.

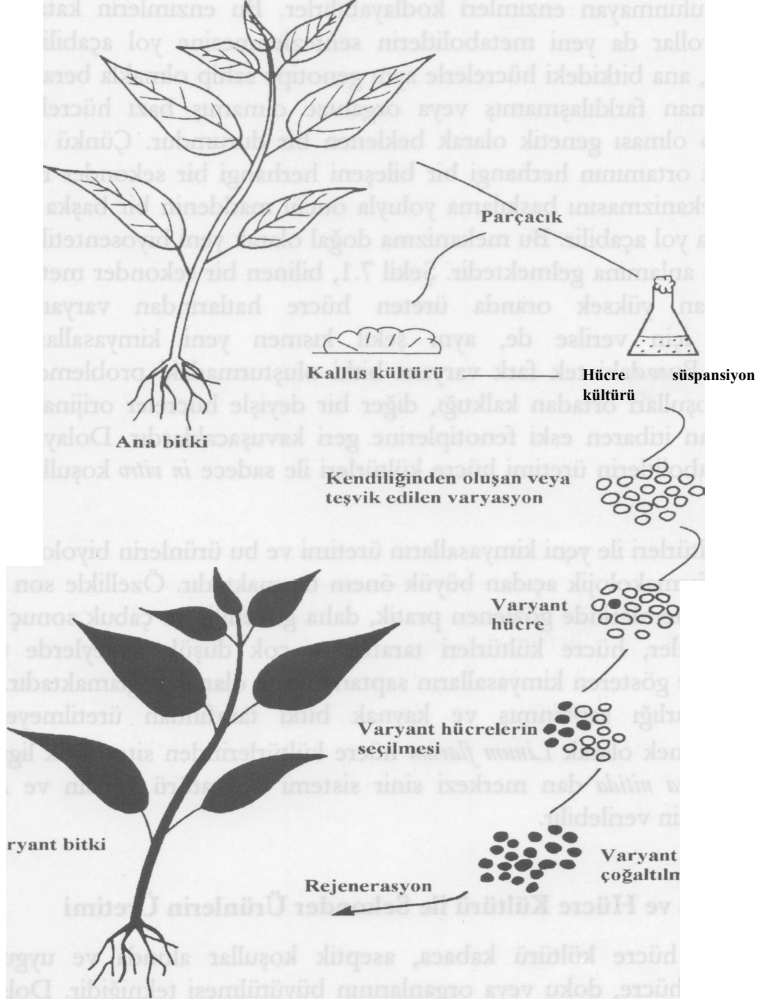
Bitki hücre kültürleri tarafından üretildiği bildirilen ve ekonomik değeri olan bazı sekonder metabolitler Tablo 7.4'de verilmektedir. Bitki hücre kültürleri elbette sekonder ürünlerin doğrudan üretimi konusunda bir seçenek sunmakla kalmamakta, aynı zamanda bu ürünlerin biyosentez mekanizmalarının anlaşılmasında da model olarak yararlanılmaktadır. Örneğin, Biber (*Capsicum frutescens*) hücre kültürlerinde kapsaisinin ve üzerlik otu (*Pegarium harmald*) hücre kültürlerinde (3-karbolin alkaloidlerinin ve anason (*Vimpinella anisum*) bitkisinin doku kültürlerinde pseudoisoeugenollerin biyosentez mekanizmalarına dair araştırmalar diğer sekonder metabolitler için model teşkil etmektedir.

Tablo 7.4. Bitki hücre kültürleri tarafından üretilen ve ekonomik değeri yüksek bazı sekonder metabolitler (Fowler, 1982).

Kimyasal Sınıfı	Metabolitin Adı	Elde Edildiği Bitki
<i>Trop an alkaloidleri</i>	Atropin	<i>Atropa belladonna</i>
	Hyosiyamin, Skopolamin	<i>Datura spp.</i> , <i>Hyoscyamus spp.</i> , <i>A. belladonna</i>
	Nikotin	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>İndol alkaloidleri</i>	Aymalisin, Vinblastin	<i>Catharanthus roseus</i>
<i>Kinolin alkaloidleri</i>	Kinin, Kinidin, Kinkonidin	<i>Cinchona ledgeriana</i>
<i>İzokinolin alkaloidleri</i>	Tebain	<i>Papaver bracteatum</i>
	Kodein, Morfin	<i>Papaver somniferum</i>
	Emerin	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>
<i>Fenilpropanoidler</i>	Antosiyantinler	<i>Daucus carota</i>
	Antrakınonlar	<i>Gallium mullago</i>
	Kapsaisin	<i>Capsicum anuum</i>
<i>İzopirenoidler</i>	Piretrin, Yasmolin	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>
<i>Steroidler</i>	Digoksin, Digitoksin	<i>Digitalis lanata</i> ve <i>D. purpurea</i>
	Kolesterol, Diosgenin	<i>Dioscorea deltoidea</i>
<i>Terpenoidler</i>	Saponinler	<i>Ginseng panax</i>

Hücre hadarının (vary an darının), arzu edilen kimyasalı yüksek oranda üreten kültürlerden seçimi ve bu hatlardan, özellikle tek hücre kültürleri yapılarak bitkilerin re jenerasyonu, bitki hücre kültürü tekniklerinin sunduğu bir başka uygulama

alanıdır. Genotip ve fenotip olarak ana bitkiden farklı bir varyant bitki oluşturma mekanizması Şekil 7.1’de gösterilmektedir.



Şekil 7.1. Hedeflenen kimyasal maddeyi yüksek düzeyde üretecek olan varyant bir bitkinin hücre kültürleriyle elde edilmesi (Creswell, 1991).

7.4. Bitki Hücre Kültürleri ve Sekonder Metabolitler

Kültür ortamı ana bitkiden alınan doku, hücre veya hücre grupları için tamamen yeni bir çevre oluşturmaktadır. Bir bitkinin hücre kültürü o bitkide normal şartlar da

bulunmayan yeni kimyasalları üretebilir. Bunu başlıca iki nedeni olabilir. Birincisi, bitki hücreleri normal işlevleri için gereken DNA miktarından çok daha fazlasını genetik materyal olarak yapısında taşımaktadır. Bu fazla DNA içerisinde doğada sadece “y^aP^{lsa}F işlev gören gen ve gen grupları bulunabilir ve bu genler normalde ana bitkide bulunmayan enzimleri kodlayabilirler. Bu enzimlerin katalizleyeceği biyosentetik yollar da yeni metaboliderin sentezlenmesine yol açabilir (Fowler, 1982). İkincisi, ana bitkideki hücrelerle aynı genodpe sahip olmakla beraber, kültür ortamda bulunan farklılaşmamış veya organize olmamış bazı hücrelerin farklı fenotipe sahip olması genedk olarak beklenen bir durumdur. Çünkü kültür için kullanılan besi ortamının herhangi bir bileşeni herhangi bir sekonder metabolidn biyosentez mekanizmasını baskılama yoluyla öncül maddenin bir başka metabolik yola kaymasına yol açabilir. Bu mekanizma doğal olarak yeni biyosentetik ürünlerin ortaya çıkması anlamına gelmektedir. Şekil 7.1, bilinen bir sekonder metaboliti ana bitkiye nazaran yüksek oranda üreten hücre hadarından varyant bitkiler oluşturulması için verilse de, aynı şekil kısmen yeni kimyasallar için de düşünülebilir. Buradaki tek fark varyant bitki oluşturmadaki problemdir. Çünkü farklı çevre koşulları ortadan kalktığı, diğer bir deyişle hücreler orijinal ortamına döndüğü andan itibaren eski fenotiplerine geri kavuşacaklardır. Dolayısı ile yeni sekonder metaboliderin üretimi hücre kültürleri ile sadece *in vitro* koşullarda sınırlı kalacaktır.

Bitki hücre kültürleri ile yeni kimyasalların üretimi ve bu ürünlerin biyolojik aktivite göstermeleri, farmakolojik açıdan büyük önem taşımaktadır. Özellikle son yıllarda biyolojik test sistemlerinde gözlenen pratik, daha güvenilir ve çabuk sonuç almaya yönelik iyileşmeler, hücre kültürleri tarafından çok düşük düzeylerde üretilen biyolojik aktivite gösteren kimyasalların saptanmasına olanak sağlamaktadır. Hücre kültürlerinde varlığı saptanmış ve kaynak bitki tarafından üretilmeyen bazı metabolidere örnek olarak *Unum flavum* hücre kültürlerinden sitotoksik ligan, (3-peltatin, *Vicralima nitida* dan merkezi sinir sistemi aktivatörü perisin ve *Morinda citrifolida* dan lusedin verilebilir.

7.5. Bitki Doku ve Hücre Kültürü ile Sekonder Ürünlerin Üretimi

Bitki doku ve hücre kültürü kabaca, aseptik koşullar altında ve uygun besi yerlerinde bitki hücre, doku veya organlarının büyütülmesi tekniğidir. Dolayısı ile sekonder metaboliderin üretiminde her tekniğin kendine has özellikleri ve üretimde sorunları vardır. Genel olarak tüm tekniklerde karşılaşılan sorun, bazı özgün sekonder metaboliderin üretimindeki düşük verimliliklerdir. Bu durum hücre kültürleri ile doğal ürünlerin üretimini ekonomik olmaktan uzak sadece akademik bir ilgi kaynağı gibi göstermekle beraber, son yıllarda yapılan ilerlemeler bu teknikle arzu edilen kimyasalların üretimini yeniden çekici hale getirmektedir. Kaynak bitkiye nazaran çok düşük düzeyde metabolit üretimi sorunuyla en sık farklılaşmamış ve organize olmamış kültürlerde, özellikle hücre süspansiyon kültürlerinde

ras banmaktadır. Hücre süspansiyon kültürü ile verim artırıcı yöntemler ayrıntılı olarak daha sonra verilecektir.

7.5.1. Farklılaşmış ve organize olmuş kültürler ile metabolit üretimi

Bitkilerde sekonder metabolizmanın büyümenin belirli safhalarında özgün doku ve hücrelerde ifade edildiği bilinen bir olgudur. Bu durum aynı zamanda hücrelerdeki büyüme ve morfolojik farklılaşma ile sekonder metabolizma arasındaki yakın ilişkiyi ifade etmektedir. Aynı durum kültürü yapılan hücre, doku ve organ kültürleri için de geçerlidir. Morfolojik olarak farklılaşma eğilimindeki hücre veya hücre gruplarında potansiyel olarak sekonder metabolit üretim olanağı daha fazla olmaktadır.

7.5.1.1. Kök kültürleri

Bitki tarafından üretilen metabolitin sentez yerinin köklerde bulunduğu durumlarda, bu organdan alınan parçaların, teorik olarak, ana bitkideki kök hücreleri kadar veya daha yüksek düzeyde olması beklenir. Ancak çok az bitki hücre kültüründe sınırsız büyüme ile birlikte metabolit üretiminin sağlandığı bildirilmiştir. Son yıllarda, bir bitki patojeni olan *Agrobacterium rhizogenes* ile yapılan çalışmalar bu kültürlerinde köklü değişiklik sağlamıştır. Toprak grubu bakterisi olan bu patojen Rİ-DNA adı verilen küçük DNA parçasını bitki genomuna aktararak “tüylü” kök fenotipinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. *Solanaceae* familyası üyelerinde ve özellikle *Datura* ve *Nicotiana* türlerinde tüylü kök kültürleri ile piridin (nikotin, anatabin) ve tropan (atropin, skopolamin, hiyosiyamin) alkaloidlerinin yüksek oranda üretimi sağlanmıştır (Yamada ve ark., 1990). Tropan alkaloidlerinin asıl sentez yerlerinin kökler olduğu ve sadece *Solanaceae* türlerinde (*Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*) bulunduğu da hatırla tutulmalıdır. Transformasyonla elde edilen “tüylü” kök kültürleri ile metabolitlerin, özellikle de alkaloidlerin, üretimi sadece *Solanaceae* türleri ile sınırlı kalmamaktadır. *Veganum harmala* (üzerlik otu) bitkisinin doku, transforme olmamış kök ve hücre süspansiyon kültürlerinde (3-karbolin alkaloidlerinin (harmin, harmol, harmaline ve harmalol) üretimi çok düşük düzeyde kalırken, transforme olmuş kök hücrelerinde bu metabolitlerin miktarı yüksek bulunmuştur (Berlin ve ark., 1991). Şeker pancarından (*Beta vulgaris*) betalainler, *S. ene cio* türlerinden pirolizidin alkaloidleri, *Cinchona ledgeriana*’ın kinin ve kinidin, transforme olmuş kök hücre kültürleri ile üretilen sekonder metabolidire örnek olarak verilebilir. Transforme olmuş kök hücre kültürlerinin genetik ve biyokimyasal kararlılığı, hızlı büyümesi, bitkiye eşit oranda metabolit üretim potansiyeli, genetik manuplasyonlara açıklığı gibi bazı özellikleri sayesinde sekonder metabolit üretimi konusunda diğer kültür sistemlerine göre daha avantajlı konuma gelmektedir.

Normal (transforme olmamış) kök kültürlerinden metabolit üretimine dair çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, *Catharanthus roseus* kök parçaları, karanlıkta ve yüksek konsantrasyonda indolbutirik asit (IBA) içeren ortamda kültürü yapıldığında katharantin ve aymalisin gibi indol alkaloidlerini ana bitkidekine eşit miktarda üretmiştir (Miura ve ark., 1987). Yine *Senecio* türlerinin kök kültürlerinin pirolizidin alkaloidleri için yüksek biyosentetik kapasiteye sahip oldukları gözlenmiştir (Hartmann ve Toppel, 1987). Bunun dışında *Panax ginseng* ginsenoizid steroidleri, *Zingiber officinale*'den terpenoidler, *Anethum graveolens** ten fenolik bileşikler normal kök kültürleri ile üretilen metabolitlerdir. Ancak bu metabolitlerin üretim oranı ana bitkilere göre daha düşük düzeyde kalmaktadır.

7.5.1.2. Sürgün kültürleri

Bitkilerde sekonder metabolit birikimi ile sürgün primordiumlarının oluşumu arasındaki ilişkiden yola çıkarak, sürgün kültürleri ile madde üretimi ayrıntılı olarak irdelenmiştir (Lindsey ve Yeoman, 1985). Bu tip kültürler koltuk altı veya sürgün ucundaki meristem dokusundan alınan parçaların uygun besi ortamında büyütülmeleri ile gerçekleşmektedir. Sürgün ucu kültürleri, farklılaşmamış kültürler, yani kallus ve hücre süspansiyon kültürlerine, nazaran daha yüksek düzeyde metabolit üretmektedir. Hatta bazen üretilen madde miktarı ana bitkidekinden de yüksek olabilmektedir. Örneğin, *Catharanthus roseus* bitkisinden elde edilen çoklu sürgün kültürleri indol alkaloidlerini (katharantin ve vindolin) ana bitkidekinden daha yüksek oranda üretmektedir (Hirata ve ark., 1987).

Atropa belladonna'nın koltuk altı tomurcuklarından, sürgün ucundan veya yaprak disklerinden başlatılan multiple (çoklu) sürgün kültürlerinde tropan alkaloidlerinin sentezlendiği gözlenmiştir. Ancak bu maddelerin sürgün ucundan elde edilen verim oranı ana bitkidekinin %7'si kadar olmuştur (Benjamin ve ark., 1987). Sürgün ucu kültürleri ile üretilen sekonder metabolitlere örnek olarak *Digitalis* türlerinden elde edilen steroidler- de verilebilir. Bu maddelerin üretim potansiyeli ana bitkiye nazaran çok düşüktür. Ancak burada olgun bitkide saptanmayan ve hücre kültürleri tarafından oluşturulan odorsit H, stropsit gibi metabolitlerin varlığı tespit edilmiştir (Seidel ve Reinhard, 1987). Sürgün ucu kültürleri bir başka yolla, kallus kültürlerinde organogenezin teşvik edilmesiyle de oluşabilmektedir. Bu tip kültürlerle sekonder metabolit üretimi kallus kültürleri kısmında tartışılacaktır.

7.5.1.3. Embriyo kültürleri

Şayet bir metabolit embriyoda üretiliyor veya birikiyorsa, bu metabolitin üretimi embriyo kültürleri ile gerçekleştirilebilir. Ancak burada kastedilen kaynak bitkiden çıkarılıp kültürü yapılan embriyodan ziyade, somatik embriyo kültürleridir. Bu kültürler ya doğrudan somatik embriyogenezle yani kaynak bitki dokularından (zigotik embriyo, kotiledon, yaprak ve hatta gövde dokuları) aseksüel embriyoların

oluşturulmasıyla ya da dolaylı somatik embriyogenezle yani kallus veya hücre süspansiyon kültürlerinde farklılaşma teşvik edilerek embriyoların oluşturulmasıyla elde edilir.

Somatik embriyo kültürleri özellikle lipidler gibi depo maddelerinin üretimi veya araştırılmasında faydalı kaynaklardır. *Papaver somniferum* (haşhaş) bitkisinin embriyo kültürlerinde 45 gün sonra depo lipidi, triaçil gliserol birikimi olduğu gözlenmiştir (Stafford, 1991). Doymamış yağ asidi γ -linoleik asidin bazı tedavi edici işlevlerinden dolayı (migren, yüksek tansiyon gibi) özellikle *Boraginaceae* familyası üyelerinin somatik embriyo kültürleri ile bu maddenin üretimi hedeflenmektedir. Aynı şekilde *Theobroma cacao* (kakao) bitkisinin embriyo kültürlerinden kakao yağının üretimi de bu kültürlerle yapılan ve ekonomik açıdan yüksek değeri olan araştırmalardır (Janik ve ark., 1982).

7.5.2. Farklılaşmamış ve organize olmamış kültürler ile metabolit üretimi

Kallus ve hücre süspansiyon kültürleri bu grupta verilecek bitki doku ve hücre kültürü teknikleridir. Tek hücre kültürleri de bu gruba dahil edilebilir. Ancak bu kültürler doğrudan sekonder metabolitlerin üretiminden ziyade, yüksek verimli bitki varyantlarının rej enere edilmesinde yararlanılmaktadır.

7.5.2.1. Kallus kültürleri

Kallus kültürleri ana bitkiden kesilip çıkartılan ve bölünme özelliğini yitirmemiş organ veya doku parçalarının karbon kaynağı (genellikle sakkaroz) ve bitki büyüme düzenleyicileri (genellikle bir oksin ve bir sitokinin) içeren yarı katı besi ortamında büyütülmesi sonucu oluşan morfolojik düzensizliğe sahip küdeler olarak tarif edilebilir. Dolayısı ile kallus kültürünün başlatıldığı doku parçasının orijini sekonder metabolitlerin üretiminde önem kazanmaktadır. Örneğin, tropan alkaloidlerinin üretimi hedefleniyorsa, *Solanaceae* familyası üyelerinin kök dokularında bu maddelerin biriktiği bölgeler seçilmelidir.

Daha sonra bir model olarak incelenecek olan hücre süspansiyon kültürleri gibi kallus kültürleri de morfolojik olarak farklılaşmamış düzensiz hücre küdelerinden ibaret olması tercih edilir. Kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin uzun süre sürdürülebilmesi alt kültürlerini yapma potansiyeline bağlıdır. Kültürler morfolojik olarak ne kadar uniform hücreler içeriyorsa, o kültürlerin alt kültürleri de o denli stabil olacaktır. Bu stabilite ile başlangıç kültüründen farklı alt kültürler ortaya çıkması önlenemez. Ancak gerek kallus kültürleri arasında gerekse kallus içinde homojenite sağlamak çok güçtür. Dolayısı ile alt kültür sayısındaki artışa paralel olarak heterojenite ve buna bağlı olarak varyasyonda artış görülebilmektedir.

Farklılaşma ve organizasyon, büyüme ortamı bileşenlerinde özellikle oksin/sitokinin oranında değişiklik yapılarak da gerçekleştirilebilir. Kültürde bazı hücrelerin veya hücre gruplarının farklılaşması, kök veya sürgün oluşumu ile sonuçlanmaktadır. *In*

vitro kültürü yapılan hücrelerden bazılarının özgün bir işlevi yerine getirmek veya bir doku ya da organı oluşturmak üzere farklılaşmaları genelde sekonder metabolitlerin birikiminde bir artış meydana getirmektedir. Özellikle, belli bir organ (kök, sürgün veya embriyo benzeri yapılar) oluşturmak üzere farklılaşan kallus kültürlerinde sekonder metabolit birikiminin daha fazla olduğu gözlenmektedir. Bu olguyu destekleyen çok sayıda çalışma yayınlanmıştır (Tablo 7.5). Buna verilebilecek ilk tipik örnek, kök oluşturmak üzere farklılaşmış *Scopolia parviplordn*'nin kallus kültürleridir. Bu kültürlerde kök farklılaşması ile beraber tropan alkaloidlerinin birikiminde 12 katlık bir artış olmuştur (Tabata ve ark., 1972). Aynı şekilde *Duboisia* türlerinin farklılaşmamış kallus ve sürgün kültürlerinde tropan alkaloidleri çok düşük oranda bulunurken, kök oluşturmak üzere farklılaşmış kallus kültürlerinde bu maddelerin yüksek oranda biriktiği saptanmıştır (Deno ve ark., 1987). *Datura* ve *Atropa* türleri gibi diğer *Solanaceae* familyası üyelerinde kök oluşturmak üzere farklılaşmış kallus kültürlerindeki alkaloid birikiminde gözlenen artış ayrıntıları ile verilmektedir (Yamada ve ark., 1990).

Sürgün oluşturmak üzere farklılaşmış kallus kültürlerinde sekonder metabolit birikimi ile ilgili bir çok örnek literatürde mevcuttur (Tablo 7.5). Ancak bu örneklerdeki sekonder metabolit birikimi kök oluşturan kallus kültürlerindeki kadar yüksek değildir. İndol alkaloidlerinin *Rauwolfia serpentina* sürgün oluşturmak üzere farklılaşmış kültürlerinden elde edilmesi bir istisna olarak değerlendirilebilir. Bu kültürlerde indol alkaloidlerinin seviyesi genç sürgünlerden biraz daha yüksektir. Ancak aynı bitkinin köklerinde rezepin gibi biyolojik aktivite gösteren alkaloidler saptanırken, sürgün kültürlerinde aynı maddeler iz miktarda bulunmuştur (Roja ve ark., 1987).

Ana bitkiden alınan ve *in vitro* kültürü yapılan dokularda farklılaşmanın ortadan kalkması sekonder metabolitlerin belirgin bir biçimde birikim kaybını da beraberinde getirmektedir. Birikimdeki bu kaybın nedenleri; •

- Her hangi bir biyosentez yolunun önemli basamaklarını kontrol eden genlerin, özgün bir işlevi yerine getirmek üzere farklılaşmayan dokularda ifade edilmemesi,
- Sekonder metabolitin üretimi için gereken substratın başka biyosentez mekanizmalarına kayması,
- Biyosentez yerlerinde biriken toksik ürünler aracılığı ile taşıma mekanizmasının engellenmesi,
- Sekonder metabolitlerin biriktiği depo bölgelerinden yoksunluk,
- Sen tezlenen metabolitlerin hızlı yıkımı olabilir (Charhwood ve ark., 1990).

Yukarıda sıralanan faktörler sekonder metabolit üretiminde kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinden yararlanılmasında dezavantaj sağlamaktadır. Bu engellen ortadan kaldırmak için önerilen çeşitli yaklaşımlar hücre süspansiyon kültürü ile metabolit üretimi kısmında tartışılacaktır. Her ne kadar birikim seviyeleri düşük olsa

da, kallus kültürlerinde varlığı saptanan metabolitler hakkında literatürde çok sayıda rapor bulunmaktadır. Örneğin, *Solaniaceae* familyası türlerinin kallus kültürlerinde tropan alkaloidleri çok düşük miktarlarda birikmektedir. Hiyosiyamin metabolitini ana bitkideki kadar üreten *Hyoscyamus niger* kallus dokusundan elde edilen bir hücre hattı burada bir istisna olarak verilebilir.

Tablo 7.5. Kök ve sürgün oluşturmak üzere farklılaşan kallus kültürlerinde biriken bazı sekonder metabolitler.

Bitki Türü	Sekonder Metabolit	Kaynaklar
<i>Kök oluşturan kallus kültürleri</i>		
<i>Atropa belladonna</i>	Tropan alkaloidleri	Hartmann <i>ve ark.</i> , 1986
<i>Calystegia sepium</i>	Tropan alkaloidleri	Jung ve Tepfer, 1987
<i>Dubosia spp.</i>	Tropan alkaloidleri	Deno <i>ve ark.</i> , 1987
<i>Hyoscyamus spp.</i>	Tropan alkaloidleri	Hashimoto <i>ve ark.</i> , 1982
<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Izokinoline alkaloidleri	Teshima <i>ve ark.</i> , 1988
<i>Papaver bracteatum</i>	İzokinoline alkaloidleri	Zito ve Staba, 1987
<i>Valeriana officinalis</i>	Terpenoidler	Violon <i>ve ark.</i> , 1984
<i>Solanum spp.</i>	Steroid alkaloidler	Kokata ve Radwan, 1979
<i>Urtica flavum</i>	Fenolik bileşikler	Berlin <i>ve ark.</i> , 1986
<i>Sürgün oluşturan kallus kültürleri</i>		
<i>Atropa belladonna</i>	Tropan alkaloidleri	I lraoka ve Tabata, 1974
<i>Papaver somniferum</i>	Izokinolin alkaloidleri	Yoshikawa ve Furuya, 1985
<i>Cinchona ledgeriana</i>	Kinolin alkaloidleri	Anderson <i>ve ark.</i> , 1982
<i>Digitalis purpurea</i>	Steroidler	Hagimori <i>ve ark.</i> , 1984
<i>Citrus paradisi</i>	Fenilpropanoidler	Barthe <i>ve ark.</i> , 1987

7.5.2.2. Hücre süspansiyon kültürleri

Hücre süspansiyon kültürleri tek hücrelerin veya küçük çapta hücre gruplarının sıvı büyüme ortamında dağılım gösterdiği bitki hücre kültürü teknikleridir. Hücrelerin sıvı kültür ortamına düzenli olarak dağılımını sağlamak için çalkalama işlemi yapılır. Bu aynı zamanda, hücre gruplarından ziyade tek hücrelerin yer aldığı ideal bir hücre süspansiyon kültürü için gereklidir. Bu kültürler doğrudan ana bitkiden alınan uygun doku parçası ile başlatılabilir. Herhangi bir sekonder ürün söz konusu ise, o metabolitin yüksek oranda bulunduğu bitkiden alınan uygun doku parçası ile hücre süspansiyon kültürü başlatılabilir.

Kallus kültürleri de hücre süspansiyon kültürleri için başlangıç materyali olabilir. Bu durum teknik açıdan daha avantajlıdır. Çünkü *in vitro* ortama uyum sağlamış, belli bir büyüme oranı sabitesine sahip kallus kültüründen alınan parçalar, ana bitkiden alınan parçalara göre sıvı ortama daha çabuk adapte olmaktadır. Kallus tan alınan parçaların kolayca ayrılıp sıvı ortam boyunca daha homojen dağılım göstermesi ise süspansiyon kültürüne başlamada avantaj sağlamaktadır.

Sekonder metaboliderin üretilmesi konusunda hücre süspansiyon kültürleri diğer hücre kültürü tekniklerine ve özellikle kallus kültürlerine göre daha avantajlı sistemlerdir. Bu avantajlardan en önemlisi, bu sistemlerin kallus kültürlerine göre daha çabuk büyümesidir. Mikrobiyal sistemlere benzerlik göstermesi büyük ölçekli kültür sistemlerinin (örneğin 10 litrelik kültürler), yani biyoreaktörlerin, oluşumunu sağlamaktadır. Bu küde olarak daha yüksek hücre verimliliğinin sağlanması anlamına gelmektedir. İkinci olarak, hücre süspansiyon kültürleri, kallus kültürlerine nazaran morfolojik olarak daha homojendir. Bu durum alt kültür yapıldıkça zamanla başlangıç kültüründen farklılaşma riskini ortadan kaldırır. Son olarak araştırma konusuna uygun olarak istenen hücre hatlarının oluşturulması ve seçimi de bu kültür sisteminin diğer bir avantajıdır. Hücre süspansiyon kültürlerinin sahip olduğu bu avantajlar, sekonder metaboliderin bitki hücre kültürleri ile üretiminde bu tekniği diğer kültür tekniklerine göre daha üstün duruma getirmektedir.

Hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metaboliderin üretiminde karşılaşılan en belirgin sorun bir çok metabolitin istenen düzeyde üretilmemesidir. *In vitro* ortamda doku veya hücrelerde farklılaşmanın ortadan kalkması bu sorunun temelini oluşturmaktadır. Sonuçta, kallus kültürleri kısmında değinilen bazı eksiklik veya yetersizliklerin ortaya çıkışı ile hücre kültürlerinde metabolit birikiminin orijinal doku ve hücrelere göre çok daha düşük düzeyde kalmaktadır. Hücre süspansiyon kültürlerinde ortaya çıkan bu sorunların yanı sıra ürün verimini artırıcı diğer etmenler ve ürün artırmaya yönelik teknik yaklaşımlar daha sonra tartışılacaktır.

Diğer taraftan hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metaboliderin kaynak bitkidekilere yakın ve hatta daha yüksek oranda üretimine dair istisnalar da mevcuttur. Buna örnek olarak *C. roseus* hücre kültürlerinde aymalisin ve serpendin birikimidir (Zenk ve ark., 1977). Bu bitkinin hücre kültürleri için en yüksek hücre veriminin alındığı kültürlerin aynı zamanda bu alkaloidler için de verimli olduğu gözlenmiştir. Bazı sekonder metaboliderin bitki hücre süspansiyon kültürleri ile ana bitkideki birikim oranları Tablo 7.6'da verilmektedir.

7.6. Süspansiyon Kültürlerinde Büyüme ve Sekonder Metabolit Birikimi

Bitki hücrelerinde büyüme olayı iki ana safhaya ayrılabilir; hücre sayısında artış ve hücre hacminde artış. Bu parametrelerden birisi göz önüne alınarak bitki hücre kültürlerinde büyüme olayı zamana karşı grafiğe alındığında, tıpkı mikroorganizmalarda olduğu gibi, sigmoidal bir eğri ile karşılaşılır (Şekil 7.2). Bakteri kültürlerinde olduğu gibi, hücre sayısı esas alındığında bitki hücre kültürlerinde de dört ana safha göze çarpar: 1) lag (gecikme ve uyum), 2) exponential veya log (üssel), 3) linear (doğrusal) ve 4) stationer (durağan) safhalardır. Gerek büyüme modeli ve gerekse her safhanın uzunluğu alt kültür süresine ve alt kültür için kullanılan ekim miktarına bağlıdır. Örneğin, ekim için kullanılan hücreler durağan safhada ise alt kültür lag, log ve linear safhalardan geçerek durağan safhaya ulaşır.

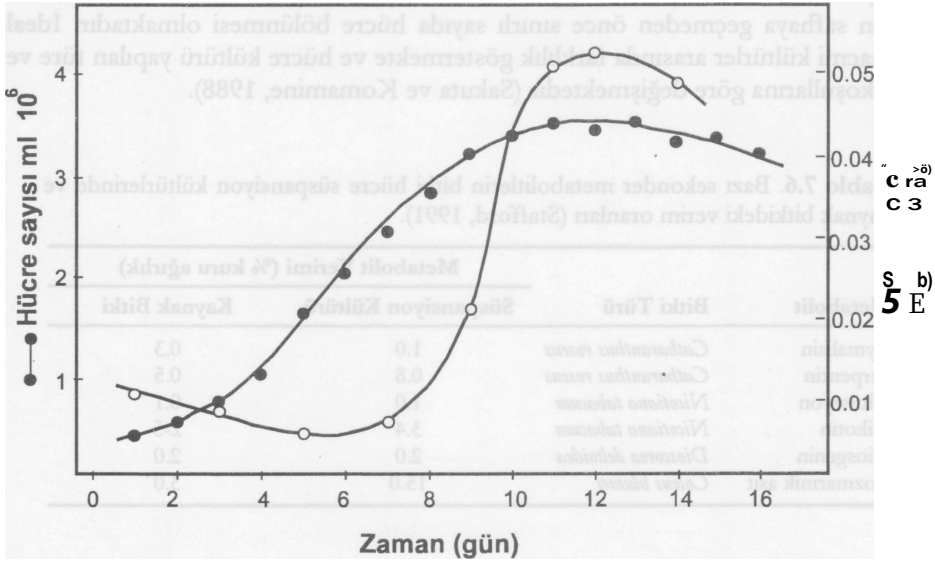
Log safhasında yeni ortama alınan (alt kültürü yapılan) hücrelerde lag safhası gözlenmemektedir. Yine ekim miktarı da bitki hücre süspansiyon kültürlerinin büyümesinde etkili bir faktördür. Az sayıda hücre ile ekim yapılırsa alt kültür ortamında lag safhası çok uzun olmakta ve sonuçta eğrideki logaritmik safhaya ait açığı küçülmektedir. Buna karşılık, yüksek hücre yoğunluğuna sahip alt kültürlerde durağan safhaya geçmeden önce sınırlı sayıda hücre bölünmesi olmaktadır. İdeal ekim hacmi kültürler arasında farklılık göstermekte ve hücre kültürü yapılan türe ve kültür koşullarına göre değişmektedir (Sakuta ve Komamine, 1988).

Tablo 7.6. Bazı sekonder metabolitlerin bitki hücre süspansiyon kültürlerinde ve kaynak bitkideki verim oranları (Stafford, 1991).

Metabolit	Bitki Türü	Metabolit Verimi (% kuru ağırlık)	
		Süspansiyon Kültürü	Kaynak Bitki
Aymalisin	<i>Catharanthus roseus</i>	1.0	0.3
Serpentin	<i>Catharanthus roseus</i>	0.8	0.5
Glutasyon	<i>Nicotiana tabacum</i>	1.0	0.1
Nikotin	<i>Nicotiana tabacum</i>	3.4	2-5
Diosgenin	<i>Dioscorea deltoidea</i>	2.0	2.0
Rozmarinik asit	<i>Coleus blumei</i>	15.0	3.0

Indol alkaloidleri ile büyüme arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu *Catharanthus roseus*'un özgün hücre süspansiyon kültürü bir istisna olarak daha önce verilmişti. Hücre kültürlerinde sekonder metabolit birikimi ile büyüme arasındaki ilişki değerlendirilerek iki ana model oluşturulabilir. Birinci model (*antosiyanın tip*) pek çok hücre kültürü için geçerlidir. Burada büyüme ile metabolit birikimi arasında zıt ilişki bulunmaktadır. Örnek olarak Şekil 7.2 de verilen *Daucus carota* (havuç) hücre süspansiyon kültürlerinde büyüme kinetiği ve metabolit (antosiyanın) birikimi incelendiğinde, lag (gecikme) ve log (üssel artış) safhalarında antosiyanın birikimi söz konusu olmamaktadır. Birikim ancak doğrusal artış safhasının sonlarına doğru artmakta ve durağan safhada en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Bu durum pek çok sekonder metabolitin (diosgenin, fenolik bileşikler, berberin vb.) üretimi için geçerlidir. Antosiyanın tip birikimi açıklayabilecek değişik görüşler bulunmaktadır. Gerek öncül maddelerin birikimindeki artış veya azalış ve gerekse biyosentez mekanizmalarında işlev gören enzimlerin seviyelerine paralel olarak sekonder metabolit birikimi değişmektedir. Örneğin, *Dioscorea deltoidea* hücre süspansiyon kültürlerinde diosgenin biyosentezi için gerekli olan ara ürünler büyümenin log safhasında şekillenirken, diosgenine dönüşüm durağan safhada oluşmaktadır (Tal ve ark., 1984). Diğer taraftan, berberin biyosentezi için gereken enzimler log safhasının sonlarında artmakta ve durağan safhada en yüksek düzeye ulaşmaktadır (Steffens ve ark., 1985). Hızlı büyüyen hücrelerde alkaloid birikiminin az olduğu, buna karşılık yavaş büyüyenlerde ise daha yüksek düzeylerde alkaloid birikiminin

gözlenmesi, büyüme ile alkaloid birikimi arasında zıt ilişkiyi göstermektedir (Lindsey ve Yeoman, 1983). Pek çok bitki hücre kültüründe farklılaşma ile metabolit üretimi arasında doğru orantı vardır.

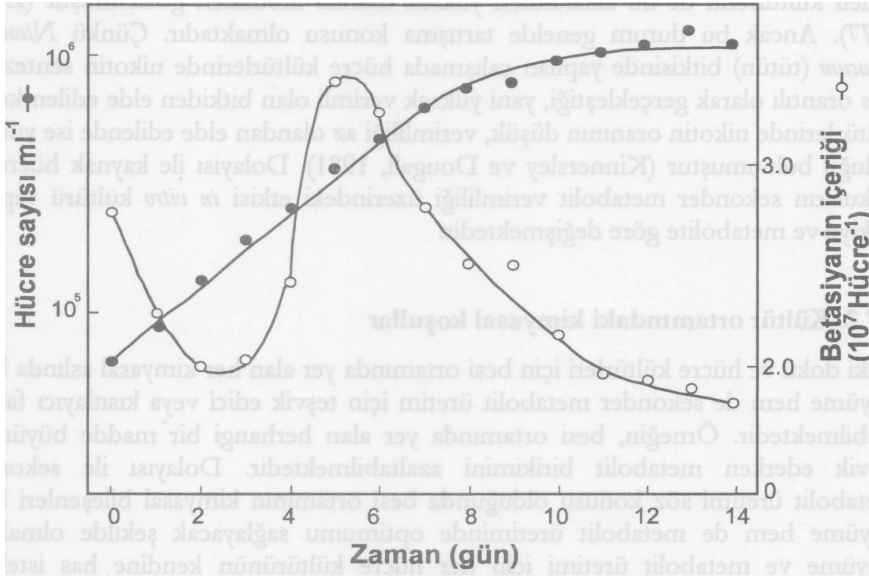


Şekil 7.2. Büyüme ve metabolit birikiminde antosiyanin tipi ilişki. Havuç (*Daucus carota*) hücre süspansiyon kültürlerinde büyüme kinetiği ve antosiyanin pigmenti birikimi (Noe ve ark., 1980).

Büyümeyle ilişkili pek çok sekonder metabolite model teşkil edecek antosiyanin tip birikimin aksine “betasiyanin tip” birikimde metabolit seviyesi hücre bölünmesi ile doğru orantılı olarak artış göstermektedir. Şekil 7.3’de görüldüğü gibi bu artış hücre bölünmesinin en yoğun olduğu log safhasında maksimum düzeye çıkmakta ve daha sonraki safhalarda düşüşe geçmektedir. *Phytolacta americana* hücre süspansiyon kültürlerinde büyüme ile betasiyanin pigmenti birikimi arasındaki ilişki buna örnek olarak verilebilir. Bu pigmentin üretimi ve birikiminin hücre bölünmesiyle ilişkisi olabilir (Sakuta ve ark., 1986). Ayrıca diğer metabolitlerden farklı olarak bu pigment birikim için özel dokulara, örneğin pancar köklerinde, gereksinim duymamaktadır (Sakuta ve Komamine, 1988). Betasiyanin tip birikime *Kuta graveolens* hücre kültürlerinde uçucu yağların birikimi de örnek olarak verilebilir.

Tüm bu bilgilerin ışığı altında sekonder metabolitlerin birikimi ile büyüme ve primer metabolizma arasında şu ilişki kurulabilir: Primer metabolizmanın akışı belli bir noktada yol ayrımına gelmektedir. Bu yol ayrımında, birinci yol farklılaşmamış büyümede rol oynamakta, İkincisi ise farklılaşmayı sağlamaktadır. Böylece

betasiyanin tip birikim birinci yol sonunda, pek çok metabolitin yer aldığı antosiyanin tip birikim ise ikinci yol sonunda oluşmaktadır.



Şekil 7.3. Büyüme ve metabolit birikiminde betasiyanin tip ilişkisi. *Phytolacta americana* hücre süspansiyon kültürlerinde büyüme kinetiği ve betasiyanin pigmenti birikimi (Sakuta ve ark., 1986).

7.7. Süspansiyon Kültürlerinde Sekonder Ürün Veriminin Artırılması

Bitkilerde sekonder metabolizmanın çevresel faktörlerden büyük ölçüde etkilendiği bilinmektedir. Benzer şekilde bitki doku ve hücre kültürlerinde kültür ortamında yer alan beslenme faktörleri; yani karbon, fosfor, azot kaynakları ve diğer makro elementler ile bitki büyüme düzenleyicileri; yani oksinler ve sitokininler hem büyümeye hem de metabolit oluşumuna etki etmektedir. Kimyasal etkenlerin yanı sıra, ortamdaki çevresel (fiziksel) faktörler de *in vitro* sekonder metabolit üretimine doğrudan veya dolaylı etkide bulunabilmektedir. Elbette bu faktörlerin her biri kültürü yapılan bitkiye, kültür tipine, hücre hattına ve hatta kültürün yaşına göre etkide bulunmaktadır (Tablo 7.7).

7.7.1. Bitkisel koşullar

Bitki hücrelerinin yapısal olarak totitopent birimler olduğu düşünüldüğünde, hücre kültürlerinin başlatılmasına kaynak teşkil eden hücre veya dokuların, sekonder metabolit üretimi üzerinde önemli bir faktör olduğu ortaya çıkar. Böylelikle kuramsal olarak herhangi bir metabolit açısından verimi yüksek bitkinin uygun

kısından başlatılan doku veya hücre kültürlerinden *in vitro* şardarda da yüksek verim beklenir. Nitekim *Catharanthus roseus**un yüksek verimli varyantlarından elde edilen kültürlerin de bu alkaloidleri yüksek oranda ürettikleri gözlenmiştir (Zenk, 1977). Ancak bu durum genelde tartışma konusu olmaktadır. Çünkü *Nicotiana tabacum* (tütün) bitkisinde yapılan çalışmada hücre kültürlerinde nikotin sentezinin ters orantılı olarak gerçekleştiği, yani yüksek verimli olan bitkiden elde edilen kallus kültürlerinde nikotin oranının düşük, verimliliği az olandan elde edilende ise yüksek olduğu bulunmuştur (Kinnersley ve Dougall, 1981). Dolayısı ile kaynak hücre ve dokuların sekonder metabolit verimliliği üzerindeki etkisi *in vitro* kültürü yapılan bitkiye ve metabolite göre değişmektedir.

7.7.2. Kültür ortamındaki kimyasal koşullar

Bitki doku ve hücre kültürleri için besi ortamında yer alan her kimyasal aslında hem büyüme hem de sekonder metabolit üretim için teşvik edici veya kısıtlayıcı faktör olabilmektedir. Örneğin, besi ortamında yer alan herhangi bir madde büyümeyi teşvik ederken metabolit birikimini azaltabilmektedir. Dolayısı ile sekonder metabolit üretimi söz konusu olduğunda besi ortamının kimyasal bileşenleri hem büyüme hem de metabolit üretiminde optimumu sağlayacak şekilde olmalıdır. Büyüme ve metabolit üretimi için her hücre kültürünün kendine has istekleri olduğu da hatırla tutulmalıdır.

7.7.2.I. Karbon kaynağı

Bir kaç istisna hariç, bitki hücre kültürlerinin pek çoğu heterotrofik (dışbeslek) olarak büyümektedir. Bir başka deyişle, özellikle hücre süspansiyon kültürlerinin büyük çoğunluğu fotosentez yapamaz. Dolayısı ile kültürlerin gereksinim duydukları karbon kaynağının kültür ortamına verilmesi gerekmektedir.

Sakkaroz bitki hücre kültürlerinin çoğunda karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Genellikle kültürün başlangıcında besi yerindeki sakkaroz derişimi %2-3 (w/v) civarındadır. Sakkarozun sekonder metabolitlerin oluşumunda diğer karbohidratlardan daha kullanışlı olduğuna dair bir çok rapor literatürde mevcuttur (Fowler, 1982; Fowler, 1983; Man teli ve Smith 1983; Suzuki ve ark., 1984). Sakkarozun bu avantajı gerek yavaş metabolize olması ve gerekse hücre kültürlerinin durağan safhasında bizzat kendisinin büyümeyi kısıtlayıcı bir faktör olarak ortaya çıkmasından kaynaklanabilir (Sakuta ve Komamine, 1987).

Diğer taraftan glikoz ve fruktozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı ve yüksek oranda metabolit veriminin sağlandığı örnekler de mevcuttur. Özellikle *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum*, *Papaver somniferum* ve *Cinchona ledgeriana* hücre süspansiyon kültürlerinde glikozun sekonder metabolitlerin üretiminde en etkili karbohidrat

olduğu gözlenmiştir (Fowler, 1983). Glikozun bu özelliği üç ana faktörden kaynaklanabilmektedir; yüksek büyüme oranı, %60'ın üzerinde karbon dönüşümü ve küdesel hücre verimi. Glikoz, fruktoz ve sakkarozdan başka galaktoz ve laktoz gibi monosakkarider ve disakkarider, melas ve nişasta gibi rafine olmamış karbon kaynaklarının da büyüme ve metabolit üretimi açısından etkileri incelenmiştir (Fowler, 1982).

Tablo 7.7. Hücre süspansiyon kültürlerinde metabolit üretimini etkileyen faktörler.

Faktörler	Açıklamalar
Bitkisel Koşullar	Kaynak hücre ve dokulann sekonder metabolit verimi üzerindeki etkisi <i>in vitro</i> kültürü yapılan bitkiye ve metabolite göre değişmektedir.
Kimyasal Kültür Koşulları	
Karbon Kaynağı	Karbohidratların (genellikle sakkaroz) yüksek derişimleri ürün artıdır.
A^ot Kaynağı	Amonyum/nitrat oram, organik ve inorganik kaynak ve derişimi önemlidir.
Fosfor Kaynağı	Yüksek derişimde fosfat kullanılması bazen üretimi azaltmaktadır.
Büyüme Düzenleyicileri	Kültürde kullanılan oksin veya sitokininlerin tipi, derişimi, özellikle oksin/sitokinin oram çok önemli olabilmektedir.
Diğer Elementler	Kültür ortamında bulunan bazı makro (S, Ca, Mg, K) ve mikro (Cu, Mo, Mn) elementler de sekonder metabolit üretimi üzerine azda olsa etkili olabilirler.
pH	Kültür ortamının pH'sının değışmesi hem büyüme hem de sekonder metabolit üretimini etkileyebilir.
Ozmotik Basınç	Yüksek şeker ve tuz derişimi genelde ürün verimini artırmakta, ancak büyümeye olumsuz etki yapmaktadır.
Fiziksel Kültür Koşulları	
Işık	Özellikle pigment sentezi için önemlidir.
Sıcaklık	Sıcaklığın azaltılması ürün verimini artırmakta, ancak büyümeyi yavaşlatmaktadır.
Diğer	Havalandırma ve sıvı kültür ortamının çalkalanması gibi diğer fiziksel etmenler de büyüme ve sekonder metabolit birikimi üzerinde etkili olabilmektedir.
Deneyisel Yaklaşımlar	
Öncüller (Precursors)	Kültür ortamına öncüllerin ilavesi üretim için olumlu etki yapabilir.
Elisitörler	Fitoaleksinin adı verilen savunma mekanizması kimyasalların üretilmesinde önemli rol oynarlar.
Tutuklama (Immobilizasyon)	Büyümenin baskılanması ile metabolit üretimi artırılabilir.
Senkronizm (Eşzamanlı)	Hücre kültürlerinde eşzamanlı bölünme homojen hücre kültürleri sağlayacağından metabolit üretimi daha kolay izlenebilir.
Kültürler	
İki Aşamalı Kültürler	Hücre kültürleri ile metabolit üretiminin ayrı ortamlarında gerçekleşmesi ürün artırıcı olabilir.

Karbon kaynağının niteliğinin yanı sıra besi yerindeki derişimi de metabolit üretimi açısından önemli bir faktör olmaktadır. Özellikle yüksek derişimde karbon kaynağı kullanıldığında, kültürü yapılan hücre veya dokular ozmotik strese uğramakta ve böylece hücre büyümesi ve bölünme baskılanmaktadır. Böylece kültür, sekonder metabolitlerin üretimine doğru bir eğilim göstermektedir. Sakkarozun başlangıçta %7-14 arasındaki bir derişimde yer aldığı ortamda bir çok fenolik bileşiğin yüksek oranda üretildiği gözlenmiştir (İbrahim, 1987). Ancak diğer taraftan *N. tabacum* hücre kültürlerinde düşük sakkaroz düzeylerinin, kumarin üretimi için optimum olduğu da rapor edilmektedir (Okazaki ve ark., 1982). Yüksek sakkaroz derişiminin (%3'den fazla) fenolik bileşiklerin üretimini artırdığına dair yaygın bir görüş vardır. Benzer durum *Croesus* hücre kültürlerinde alkaloid üretimi için de geçerlidir (Zenk, 1977). Fenolik bileşiklerin bitki hücre kültürleri ile üretimi model olarak değerlendirildiğinde, kültürdeki hücrelerin nitrat ve fosfatı kullanımı da göz önüne alınmalıdır. Mikroorganizmalardan farklı olarak, karbon kaynağının yıkımında işlev gören mekanizmaların (pentoz fosfat, glikoliz, krebs döngüsü) ve bu mekanizmaların fenolik bileşiklerin sentezi ile ilişkisinin kesin olarak aydınlatılması gerekmektedir.

7.7.2.2. Azot kaynağı

Bitki doku ve hücre kültürlerinde kullanılan pek çok besi yerinde nitrat (NO₃) ve/veya amonyum (NHA) azot kaynağı olarak işlev görmektedir. Tek başına kullanıldıklarında amonyum nitrata göre daha zayıf büyüme sağlamaktadır (Dougall, 1980). Dolayısı ile hücre süspansiyon kültürlerinde genelde nitrat azot kaynağı olarak tercih edilmekle beraber her ikisinin kullanıldığı kültürlerde küdesel hücre verimi çok daha yüksek olmaktadır. Genellikle nitrat/amonyum oranı 1:1 olmakla beraber, bu oranın değiştirilmesi ile bir çok sekonder metabolitin *in vitro* üretilmesinde azalış veya artışa raslanmaktadır. Örneğin, *Thalictrum minnus* hücre süspansiyon kültürlerinde berberin miktarı nitrat/amonyum oranı 1:2 olduğu zaman en yüksek düzeye ulaşmakta iken, maksimum büyüme 5:1 oranında sağlanmaktadır (Tal ve Goldberg, 1982).

Kullanılan azot kaynağının niteliği ve miktarı *in vitro* sekonder metabolit üretiminde etkili olabilmektedir. Örneğin, *Uthospermum erythrorhizon* bitkisine ait hücre kültürlerinde fenolik şikoininler sadece nitratin bulunduğu ortamlarda sentezlendiği, buna karşılık amonyum kullanıldığında bu kimyasalların üretiminin engellendiği gözlenmiştir (Fujita ve ark., 1981). Bununla beraber, pek çok araştırma, besi yerindeki azot kaynağı miktarındaki azalışın, fenolik bileşiklerin üretiminde artışa yol açtığını göstermiştir (İbrahim, 1987). Son olarak, karbon/azot oranının da metabolit üretiminde etkili olduğu akılda tutulmalıdır. Örneğin, *Dioscorea deltoidea* hücre kültürlerinde diosgenin birikiminin karbon/azot oranındaki artışla doğrusal bir ilişki gösterdiği belirtilmektedir (Tal ve ark., 1982).

7.7.2.3. Fosfor kaynağı

Bitki hücre kültürlerinde fosfor kaynağı olarak fosfat (PO_4^{3-}) kullanılmaktadır. Gerek nükleik asit ve gerekse enerji metabolizmalarında gerekli olduğundan, fosfor bitki hücreleri için çok önemli bir elementtir. Fosfor hücre miktarında artış sağlamakta ve fosfat miktarı arttıkça biyomas verimi artmaktadır. Dolayısı ile fosfat sekonder metabolitlerin *in vitro* üretiminde önemli bir etken olmaktadır. Çünkü daha önce de belirtildiği gibi, büyüme ile sekonder metabolit üretimi arasındaki zıt ilişki göz önüne alındığında, fosfatın büyümeyi sınırlandırıcı bir faktör olarak hücre kültürlerinin başlangıcında düşük miktarda yer alması genellikle metabolit üretimini artırmakta, büyümeyi ise baskılamaktadır. Gerek alkaloidlerin ve gerekse fenolik bileşiklerin fosfat içermeyen, büyümeyi sınırlayıcı kültür ortamlarında daha fazla biriktiği gözlenmiştir (Knobloch ve Berlin, 1983). Buna karşılık, *Digitalis purpurea* hücre kültürlerinde fosfat miktarındaki artış ile digitoksin birikimi arasında doğrusal bir artışın varlığı da söz konusudur (Hagimori ve ark., 1982). Aynı durum hücre sel büyüme ile doğru orantılı olan betasiyaninler için de geçerlidir (Sakuta ve ark., 1986).

7.7.2.4. Bitki büyüme düzenleyicileri

Bitki büyüme düzenleyicileri bitkilerde (*in vivo*) sekonder metabolizmanın ifade edilmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Böhm, 1980). Pek çok araştırmaya konu olduklarından, bu maddelerin bitki hücre kültürlerinde gerek büyüme ve gerekse *in vitro* sekonder metabolit biyosentezi üzerine etkilerine dair yeterli kanıt mevcuttur. Bazı onkojenik ve alışkan (habituated) kültürler bir tarafa bırakılırsa, bitki hücre kültürleri büyüme düzenleyicilerine, oksin ve sitokininlere gereksinim duymaktadırlar. Gerek kullanılan oksin ve sitokininlerin niteliği ve miktarı, gerekse oksin/sitokinin oranı büyümeyi ve doğrudan sekonder metabolit birikimini etkilemektedir. Bitki hücre kültürleri için en çok kullanılan oksinler 2,4-dikloroasetik asit (2,4-D) ve naftalenasetik asiti (NAA). Her iki sentetik oksin, doğal oksin indolasetik asitten (IAA) daha kararlı yapıda olduğu için bitki doku kültürlerinde tercih edilmektedir. İndolbutirik asit (IBA) da bazı hücre kültürlerinde oksin olarak kullanılabilir. Dış kaynaklı sitokininin desteği ise kültürü yapılan bitkiye göre değişmektedir. En çok kullanılan sitokininler kinetin, 6-benziladenindir (BA). Oksin ve sitokininlerin yanı sıra giberellin ve absisik asitin bazı hücre kültürlerinde dış kaynaklı büyüme düzenleyicileri olarak kullanıldıkları bilinmektedir.

Oksinlerden 2,4-D'nin genel olarak bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolizmayı baskılayıcı etkide bulunduğu gözlenmektedir. Bu baskılamaya örnek olarak, *Nicotiana tabacum*'un hücre kültürlerinde nikotin, *Morinda citrifolia*'da antrakınonların ve *Acer pseudoplatanus*'da fenolik bileşiklerin birikimindeki hızlı düşüşü veya tamamen inhibe oluşu örnek olarak verilebilir (Furuya ve ark., 1971; Tabata ve ark., 1971; Phillips ve Henshaw, 1977). 2,4-D'nin genel olarak sekonder metabolizma üzerindeki olumsuz etkisi muhtemelen hücre sel büyümeyi teşvik

ederek farklılaşmayı engellemesi şeklinde olabilir. Hücrelerin hacimce büyümesi ile 2,4-D ve sekonder metabolit metabolizması arasındaki ilişki için *Daucus carota* (havuç) kültürü örnek verilebilir. Havuç hücre süspansiyon kültürlerinde, ortamda 2,4-D'nin varlığı antosiyanin üretimini azaltmaktadır. Bu kültürlerden küçük hücreler veya hücre grupları (31-81 μ m), 2,4-D içermeyen ortama alındığında hücre bölünmesi ve hücresel büyüme baskılanmakta ve sonuçta kültürde belirgin bir antosiyanin birikimi gözlenmektedir. Ortama tekrar 2,4-D ilave edildiğinde ise antosiyanin üretimi kaybolmaktadır. Bu gözlem büyüme ve hücre morfolojisi ile antosiyanin oluşumu arasındaki zıt ilişkiyi göstermektedir (Ozeki ve Komamine, 1981). Buna karşılık, 2,4-D'nin aynı hücre kültürlerinde karotenoid sentezini, *Thalictrum minus*'da ise berberin üretimini artırdığı gözlenmiştir (Nakagawa ve ark., 1986).

Diğer oksinlerin (IAA, NAA ve IBA), sekonder metabolitlerin *in vitro* üretimi üzerindeki olumsuz etkisi 2,4-D'ye nazaran daha azdır (Mantell ve Smith, 1983). Bazı durumlarda doğal oksin IAA ve sentetik oksin NAA'nın, 2,4-D'nin negatif etki gösterdiği durumlarda sekonder metabolizma üzerinde olumlu veya olumsuz etkisinin olmadığı bilinmektedir.

Sitokininlerin sekonder metabolitler üzerindeki etkisi metabolit çeşidine ve ilgili bitki türüne göre değişmektedir. Örneğin, kinetin *Thalictrum minus*'da berberin üretimini (Nakagawa ve ark., 1984) ve kinetin ile birlikte BA'nin ise *Haplopappus gracilis*'te antosiyanin birikimini artırdığı gözlenmiştir.

Giberellik ve absisik asitin *Daucus carota* hücre süspansiyon kültürlerinde antosiyanin üretimini, *Phytolacca americana* hücre süspansiyon kültürlerinde ise betasiyanin birikimini azalttığı gözlenmiştir. Her iki kültürde giberellik asit büyümeye olumsuz etki yapmazken, absisik asit büyümeyi engellemektedir (Sakuta ve Komamine, 1987).

Yukarıda verilen örnekler değerlendirildiğinde bitki büyüme düzenleyicilerinin *in vitro* sekonder metabolit üretimindeki etkilerinin oldukça karmaşık ve çelişkili olduğu görülecektir. Örneğin, daha önce de belirtildiği gibi kinetin *Daucus carota* hücre süspansiyon kültürlerinde antosiyanin üretimini teşvik ederken, *Topulus* hücre kültürlerinde aynı maddenin üretimini baskılamaktadır. Bu zıt etkileri açıklamada zorluk çekilebilir. Ancak kültür ortamındaki hücrelerin içerdikleri büyüme düzenleyicilerinin içsel düzeyleri göz önünde bulundurulmalıdır. Hücre ve hücre gruplarının boyutu; hücreler arası ilişkiler, büyüme, morfolojik farklılaşma ve dolayısı ile sekonder metabolit mekanizması üzerinde doğrudan etkili olmaktadır.

7.7.2.5. Diğer elementler

Kültür ortamında sülfat (SO_4^{2-}) tuzları şeklinde bulunan sülfür ile kalsiyum, magnezyum, potasyum gibi makro elementler ve bakır, molibden, mangan gibi mikro elementlerin özellikle sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkisine dair

çok az çalışma mevcuttur. Kalsiyumun lignin ve rosmarinik asit, bakır ve sülfatın naftokinonlar ve mikro elementlerin ise antrakinonların *in vitro* üretimi üzerindeki etkisi istisna olarak verilebilecek gözlemlerdir (Zenk *ve ark.*, 1975; Fujita *ve ark.*, 1981; De-Eknamkul ve Ellis, 1985; İbrahim, 1987).

7.7.2.6. pH

Bitki doku ve hücre kültürlerinin pH'sı çoğu kez kültür oluşturulmadan önce pH 5-6 arasında ayarlanmakta ve bu pH derecesinde en yüksek büyüme sağlanmaktadır. Ayrıca kültür ortamı yeterince tamponlandığı için, kültürün gelişimi esnasında ortamın pH'sında büyük değişiklikler olmamaktadır. Ancak kültürün gidişatı esnasında pH'daki değişiklikler büyüme kadar sekonder metabolit üretimini de etkileyebilmektedir. Örneğin, *Ipomea* hücre kültürlerinde triptofanm, triptofol gibi indol metaboliderine dönüşümü pH 6.3'de iki katma çıkmakta, pH 4.8'de ise bu dönüşüm tamamen baskılanmaktadır (Veliky, 1977).

7.7.2.7. Ozmotik basınç

Bitki doku ve hücre kültürlerinde kullanılan besi ortamında özellikle karbon kaynağı (genellikle sakkaroz) ve makro bileşenlerin derişiminin artırılması, kültürde ozmotik basıncın artmasına ve böylece kültürü yapılan hücrelerde strese yol açmaktadır. Sonuçta sekonder metabolitlerin üretiminde bir artış gözlenmektedir. Bununla ilgili örnekler kültür ortamındaki kimyasal koşullar kısmında verilmiştir (bkz. Bölüm 7.7.2.1).

7.7.3. Kültür ortamındaki fiziksel koşullar

Bitki doku ve hücre kültürleri yapılırken, kültür ortamının dışındaki bazı fiziksel etkenler de belirleyici parametreler olmaktadır. Işık ve sıcaklık ile hücre süspansiyon kültürleri için çalkalama ve havalandırma bunlar arasında sayılabilir.

7.7.3.1. Işık

Işığın *in vivo* şartlarda bitkilerin gelişimi ve gerekse sekonder metabolit birikimi üzerindeki etkisi bilinmektedir. Birkaç istisna hariç, bitki doku ve hücre kültürleri foto-ototrof olarak büyümediğinden, pek çok kültür düşük ışık şiddetinde ve geniş bir ışık spektrumunda yapılmaktadır. Ancak sekonder metabolitlerin ve özellikle fenolik bileşiklerin üretimi söz konusu olduğunda ışık, doku ve hücrelerde metabolit birikimini etkilemekte ve fotoperiyod, ışık kalitesi ve şiddeti önemli parametreler olmaktadır. Hücre kültürlerinde fenolik bileşiklerin üretiminin hem ışık kalitesinden hem de ışık şiddetinden etkilenmesine neden olarak, fenil propanoid metabolik yolunda işlev gören enzimlerin düzenlenmesi üzerinde ışığın önemli etkisi gösterilebilir (Hahlbrock, 1977). Işık fitokrom sisteminde yer alan diğer enzimleri benzer şekilde de etkilemektedir (Schopfer, 1977). Antosiyanin pigmentlerini sürekli karanlık ortamda üreten havuç hücre kültür hatları hariç,

beyaz ışığın flavon ve flavon türevlerinin ve antosiyaninlerin oluşumunu artırdığı, buna karşılık polifenol ve antrakinonların üretimini ise baskıladığı gözlenmiştir (Ozeki ve Komamine, 1981; Konbloch *ve ark.*, 1982; Suzuki *ve ark.*, 1984). Mavi ışığın ise polifenollerin oluşumunu artırırken, naftokinonların üretimini baskıladığı gözlenmiştir (Tabata *ve ark.*, 1974; Kadkade, 1982). Ultraviyole (UV) ışınlarına maruz bırakılan *Eetroselinum kortense* hücre kültürlerinde flavon ve flavonol glikozitlerinin birikiminde bir artış gözlenmektedir (Hahlbrock *ve ark.*, 1980). UV ve kızılötesi (IR) ışınlar, aynı zamanda abiyotik elisitörler olarak da değerlendirilebilir (bkz. Bölüm 7.7.4.2). Tütün hücre kültürlerinde ışığın alkaloid (nikotin) üretimini baskıladığı, ancak düşük ışık şiddetinin ne kültürün büyümesine ne de alkaloid birikimine engel olmadığı ve nikotin birikiminin karanlık ortamda bırakılan hücre kültürlerinde en yüksek düzeye ulaştığı gözlenmiştir. Bu duruma nikotinin fotodegragasyonunun (ışıkta parçalanmasının) neden olduğu öne sürülmüştür (Manteli ve Smith, 1983).

7.7.3.2. Sıcaklık

Sıcaklığın bitki doku ve hücre kültürlerinde sekonder metabolit oluşumu üzerine etkisi bir yana, doğrudan kültürlerin büyüme veya gelişmesine olan etkisine dair çok az gözlem vardır. Bu, büyük bir ihtimalle bitki hücre kültürlerinin geleneksel olarak 25 °C civarında gerçekleştirilmesinden kaynaklanabilir. Yine de sıcaklığın hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimi ve birikimine dair bilgiler literatürde mevcuttur. Örneğin, *Veganum harmala* (üzerlik otu) kallus kültürlerinde (3-indol alkaloidlerinin birikiminin 25 °C'de maksimuma ulaştığı ve kültürlerde en iyi büyüme 30 °C'de gerçekleştiği bildirilmektedir. Ancak sıcaklık 25 °C'den fazla olduğunda alkaloid birikimi hemen düşmektedir (Nettleship ve Slaytor, 1974). Kültürdeki hücrelerin metabolizmasında sıcaklığa bağlı olarak değişim bu tip bulguların temelini oluşturabilir. Örneğin, *Ipomea* hücre süspansiyon kültürlerinde sakkaroz ve amino azotların kullanımı 30-32 °C'de maksimuma ulaşırken, tekrar 25 °C'ye geri getirilen kültürlerde bu maddelerin yıkım oranında %25'lik bir azalma olmakta, ancak büyüme oranında çok az değişim olmaktadır (Rose ve Martin, 1975). Normalden daha düşük sıcaklıkta, örneğin 15 °C'de, kültürü yapılan hücrelerde yağ asitleri oranında bir artış olduğu gözlenmektedir.

7.7.3.3. Diğer fiziksel etmenler

Havalandırma ve özellikle kültür ortamının çalkalanması gibi fiziksel etmenler de bitki hücre kültürlerinde büyüme ve sekonder metabolit birikimi üzerinde önemli etkide bulunmaktadır. Normalde 90-120 r/dakika olan çalkalama hızı 150 r/dakika¹'ya çıkarıldığında, tütün hücre süspansiyon kültürlerinde hem büyüme hem de nikotin birikimi artmaktadır (Pearson, 1978).

7.7.4. Deneysel yaklaşımlar

Bitki doku ve hücre kültürlerinde gerek optimum büyüme ve gerekse üretimi arzu edilen sekonder metabolitin maksimum birikimini sağlamak için bazı teknikler geliştirilmiştir. Bu yöntemler ve sağladığı avantajlar aşağıdaki başlıklar altında özetlenmiştir.

7.7.4.1. Öncüller (precursors)

Bitki doku ve hücre kültürlerinde üretilmesi istenen bir metabolitin biyosentez mekanizması biliniyorsa ve bu metabolik yolda yer alan başlangıç maddesi ve/veya ara ürünler saptanmış ise, kültürleri bu maddelerle besleyerek enzimatik yollar uyarılabilir ve böylelikle hedef metabolitin üretimi artırılabilir. Bu yaklaşıma *Capsicum frutescens* (biber) kallus kültürlerinde kapsaisin üretimi örnek olarak verilebilir. Hücreler, karbon kaynağının (sakkarozun) bulunmadığı, düşük miktarda azot içeren ve radyoaktif işaretli fenilalanin ile valin ilave edilen ortamda kültürü yapıldığında, radyoaktif işaretin kapsaisine katıldığı gözlenmiştir. Kapsaisin üretimi, vanilamine ve izokaprik asit gibi çabuk dönüşüm sağlayan öncüllerle daha da artırılabilir (Lindsey ve Yeoman 1983). Bitki doku ve hücre kültürlerine öncül ve/veya ara maddeler ekleyerek sekonder metabolit üretiminde artış sağlamaya yönelik diğer örnekler Tablo 7.8'de özetlenmektedir.

Bitki hücre kültürlerine öncüller ilave ederek hedef sekonder metabolitin üretimini artırma yönteminde göz önünde bulundurulması gereken bir takım ön koşullar bulunmaktadır. Öncelikle bu maddelerin toksik olmayan derişimlerininin saptanması, kültür ortamına ilave etmek için en uygun zamanın belirlenmesi, hücre içine alınma ve birikim mekanizmalarının ortaya çıkarılması ve bu maddelerin kullanımını sağlayan enzimlerle ilişkilerinin bilinmesi gerekmektedir. Ayrıca bitki hücre kültürlerinde metabolit miktarında gözlenen artışın nedeni öncül maddelerden mi yoksa ortamdaki diğer fiziksel veya diğer faktörlerden mi kaynaklandığı belirlenmelidir. Bu bakımdan, radyoaktif işaretli öncüllerle yapılan deneysel çalışmalar bu yaklaşım için çok önemlidir.

Tablo 7.8. Öncül madde ilavesiyle bitki hücre kültürlerinde üretimi artırılan metabolitler.

Öncül Madde	Metabolit	Bitki Türü	Kaynaklar
Fenilalanin, Tirozin	Rozmarinik asit	<i>Coleus blumei</i>	Zenk <i>ve ark.</i> , 1977
Fenilalanin	Polifenoller	<i>Nicotiana tabacum</i>	Sahai ve Schuler, 1984
Fenilalanin	Naftokinonlar	<i>Uthospermum spp.</i>	Mizukami <i>ve ark.</i> , 1977
Naringenin, Eriyodiktiyol, Dihidrokuersetin	Antosiyanin	<i>Daucus carota</i>	Fritsch ve Grisebach, 1975
o-süksinil benzoik asit	Antrakınonlar	<i>Gallium mollugo</i>	Bauch ve Leistner, 1978
Kolesterol	Diosgenin	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Chowdhury ve Chaturvedi, 1979
Ornitin	Nikotin	<i>Nicotiana tabacum</i>	Ohta <i>ve ark.</i> , 1978

7.7.4.2. Elisitörler

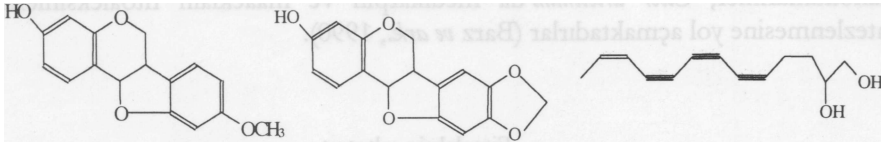
Bu bölümün başında, bitkilerin mikroorganizmalara karşı bir çeşit savunma mekanizması olarak geliştirdikleri, fitoaleksinler adı verilen düşük moleküler ağırlıklı antimikrobiyal bileşiklerin varlığından söz edilmişti. Bitki hücrelerinde varlığı saptanan fitoaleksinler; polias etilenler, thiopenler, seskiterpenler, diterpenler, kumarin ve izokumarinler, kalkonlar, izoflavonoidler, stilbenler ve alkaloidler gibi farklı kimyasal sınıflarda olabilirler (Barz *ve ark.*, 1990). Kimyasal yapıları ele alındığında bu maddelerin çoğunun lipofilik olması, bunların hücresel düzeyde oluşum ve birikim mekanizmalarına özellikle dikkat edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Bu maddelerin bir başka ilgi çekici özelliği ise hem bitkide (*in vivo*) hem de bitkinin hücre veya doku kültürlerinde (*in vitro*) farklı bir metabolik yolla açığa çıkmalarıdır. Bu aynı zamanda biyolojik sinyal olabilecek maddelerin çalışılmasına da katkıda bulunmaktadır.

Fitoaleksin sentezine yol açan elisitörler, biyolojik olmayan (abiyotik) (UV, ağır metal iyonları, deterjanlar vb.) veya biyolojik kökenli veya biyotik (polisakkarider, proteinler, glikoproteinler, bakteri, mantar ve hatta bitkisel kaynaklı hücre duvarı parçalanma ürünleri vb.) olmak üzere başlıca iki gruba ayrılırlar. Biyotik elisitörler ise oluşum ve birikim durumlarına göre 4 ana başlıkta toplanabilir (Becker ve Sauerwein, 1990):

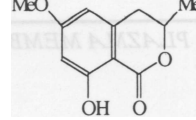
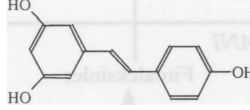
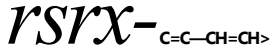
- i) Doğrudan mikroorganizmalar tarafından salınan ve bitki hücrelerince tanınanlar,
- ii) Mikroorganizmaların bitki hücre duvarlarındaki işlevi sonucu oluşanlar,
- iii) Mikroorganizma üzerinde bitki enzimlerinin işlev görmesi ile oluşanlar,
- iv) Çeşitli uyarıcı etkenlere yanıt olarak bitki hücreleri tarafından oluşturulan ve ortama salınan endojen ve her zaman doğada mevcut olan bileşikler.

Bitki hücre süspansiyon kültürleri, bitkilerin mikroorganizmalara karşı savunma mekanizmalarını araştırmak için kullanılan çok elverişli deneysel sistemlerdir. Bu sistemlerde konakçı-konak ilişkisi araştırılabilir. Ayrıca biyotik ve abiyotik elisitörlerin uygulanmasından hemen sonra ortaya çıkan fitoaleksinlerin oluşum mekanizmaları aydınlatılabilir.

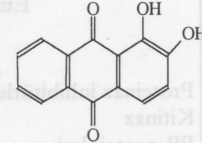
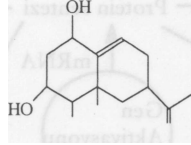
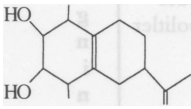
Biyotik ve abiyotik elisitörler, fitoaleksinlerin doza bağlı olarak teşvik edilmesinde önemli farklılıklar gösterirler. Örneğin, *Cicer arietinum* (nohut) hücre süspansiyon kültürlerinde pterokarpan fitoaleksinleri medikarpin ve maackiaın (Şekil 7.4) elisitörlerinin doza bağlı olarak teşvik ettikleri fitoaleksin üretimi bir doygunluk eğrisi ile sınırlanırken, abiyotik elisitörler (bakır, civa, mangan gibi ağır metaller) yüksek derişimlerde toksik etkiler gösteren bir optimum eğri ile sınırlanmışlardır (Barz *ve ark.*, 1990).



a) Medicarpin (*Cicer arietinum*) b) Maackiain (*Cicer arietinum*) c) Safinol (*Carthamus tinctorius*)



d) Bitenilbütün (*Tagetes* türleri) e) Resveratrol (*Arachis hypogaea*) f) 6-Metoksimellein (*Daucus carota*)



g) Risitin (*Solanum tuberosum*) h) Kapsidol (*Nicotiana tabacum*) i) Antrakınon (Alizarin) (*Cinchon ledgerian*)

Şekil 7.4. Bitki hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilen farklı kimyasal sınıflara ait bazı fitoaleksinler (Barz ve ark., 1988; 1990).

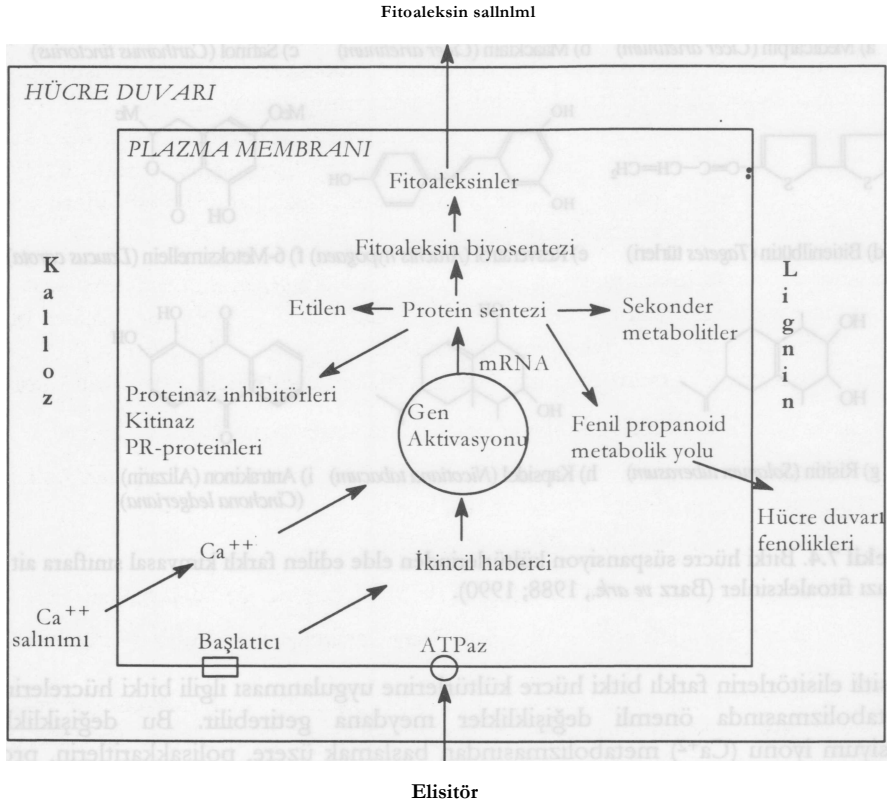
Çeşitli elisitörlerin farklı bitki hücre kültürlerine uygulanması ilgili bitki hücrelerinin metabolizmasında önemli değişiklikler meydana getirebilir. Bu değişiklikler; kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) metabolizmasından başlamak üzere, polisakariderin, prolil hidroksilazın teşviki ile hücre duvarlarında hidroksiprolince zengin glikoproteinlerin, lignin ve polifenollerin, kitinazların, proteinaz inhibitörlerinin, patojenez ile ilgili (PR - pathogen related) proteinlerin ve fitoaleksinlerin oluşumunda rol oynayan enzimlerin yeniden sentezlenmesine yol açan bir dizi reaksiyonları içermektedir (Şekil 7.5).

Bitkilerden ve bitki hücre kültürlerinden çok sayıda fitoaleksinler izole edilmiştir. Bu bileşiklerin kimyasal yapıları büyük çeşitlilik gösterse de, karbon iskelelerinin belli bir tür veya familya için karakteristik olması, fitoaleksinlerin kemotaksonomide kullanışlı işaretler olmasını gündeme getirmektedir. Bitki hücre kültürlerinde fitoaleksin oluşumuna yol açan elisitörlere şu örnekler verilebilir:

Biyolojik olmayan (abiyotik) elisitörlerden sodyum aljinat ile *Glycyrrhiza glabra* hücre kültürlerinde ekinatin adlı fitoaleksin üretimi sağlanmıştır. Benzere şekilde biyolojik (biyotik) elisitörler *Papaver somniferum*'da sanguinarin, *Petroselinum hortense*'de

A. Sökmen, E. Gürel

füranokumarinler, *Cicer arietinum*'da medikarpin ve maackiain fitoaleksinlerinin sentezlenmesine yol açmaktadırlar (Barz ve ark., 1990).



Şekil 7.5. Elisitörlerin teşvik etmesi sonucu bitki hücre metabolizmasında meydana gelen değişiklikler (Barz ve ark., 1988).

Sonuç olarak elisitörlerin varlığında bitki hücreleri tarafından sentezlenen fitoaleksinler daha önce kimyasal yapısı bilinmeyen yeni bileşiklerin de ortaya çıkmasına yol açmaktadırlar. Bu maddelerin biyoaktif özelliklerinden dolayı ilaç sanayinde kullanılabilirlikleri de ayrı bir araştırma konusudur

7.7.4.3. Tutuklama (immobilizasyon)

Tutuklama, katalitik olarak aktif enzimin veya hücrenin bir reaktör sistem içinde tutularak, substrat veya ürünü taşıyan hareketli faz'a geçişlerinin engellendiği bir

teknik olarak tanımlanmaktadır (Scragg, 1991). Aslında tutuklama, mikroorganizmalarda uzun zamandan beri uygulanan bir tekniktir. *Acetobacter* hücrelerinin tutuklandığı geleneksel sirke üretme yöntemi tipik bir tutuklama tekniğidir. Hücrelerin bütünüyle tutuklanmasına dair ilk rapor 1960'lı yıllara dayanmaktadır. Bu raporda, bir liken olan *Umbilicaria pustulata* hücrelerinin poliakrilamid jel içinde tutuklandığı belirtilmiştir (Mosbach ve Mosbach, 1966). Bir sonraki yıl, embriyonik hayvan hücrelerinin tutuklanması da gerçekleştirilmiştir (Wezel, 1967). Sonraki yıllarda, çoğunlukla mikroorganizmaların yer aldığı, çeşitli mikroorganizmaların, bitki ve hayvan hücreleri ile organellerin değişik matrisler kullanılarak tutuklandığına dair bir çok rapor literatürde yerini almıştır. Tutuklamanın gerçekleştirildiği hücreler ve tutuklama görevi yapan inert yatak (substrat) Tablo 7.9'da verilmektedir.

Bitki hücrelerinin tutuklanması nispeten yeni bir düşüncedir. *Catharanthus roseus* ve *Daucus carota* hücrelerinin aljinat yatakta tutuklanması, ilk rapor edilen bitki hücrelerinin tutuklanması tekniğidir (Bordeliue ve ark., 1979). Ancak tekniğin temeli, enzim ve/veya mikroorganizmaların tutuklanması temeline dayanmaktadır.

Tutuklama işlemi, izlenecek tekniğe göre dört ana sınıfa ayrılabilir:

- i) Hücrelerin (enzimlerin veya organellerin); aljinat, ağar, poliakrilamid, kollajen vb. gibi inert (tepkisiz) bir yatakta tutuklanmaları,
- ii) Hücrelerin inert yatağa tutunmaları (adsorpsiyon),
- iii) Hücrelerin biyolojik makro moleküllerle (lektinler) yatağa bağlanması,
- iv) Hücrelerin karboksimetil selüloz gibi inert bir yatağa kovalent bağlanması.

Bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit birikimi ile farklılaşma arasında görülen doğrusal ilişkiyi gösteren çok sayıda çalışmadan daha önce söz edilmişti. Özellikle hücre veya küçük hücre gruplarının sıvı ortamda herhangi bir farklılaşma olmaksızın büyütüldükleri hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit birikimi, az veya çok, durağan safhada maksimum düzeye çıkmaktadır. Bu kültürlerin aksine hücrelerin inert bir matris (substratta) tutuklandığı tutuklama yöntemi ile hücreler çok hücreli ortamda ve kısmen organize olarak birlikte büyümeye teşvik edilmektedir. Süspansiyon kültürlerinde hücreler genellikle serbest halde bulunmakta ve çalkalama sonucu hücreler arası temas tamamen veya kısmen ortadan kalkarken, tutuklamada hücreler fiziksel olarak durağandır ve bu durum hücreler arası temas sağlayarak bir takım fiziko-kimyasal etkileşimleri başlatmaktadır. Ayrıca ortamda fiziksel ve kimyasal gradientlerin sağlanması sonucu hücreler ana bitkideki durumlarına çok benzerlik gösteren bir çevreye kavuşmaktadır. Bu koşullar tutuklanmış hücrelerde bazı yapısal ve biyokimyasal farklılaşmaları da beraberinde getirmekte ve sonuç olarak sekonder metabolizma uyarılmaktadır.

Tablo 7.9. Değişik hücrelerin tutuklanmasına bazı örnekler (Lindsey ve Yeoman, 1983).

Kaynak Hücre	Tutuklayıcı Madde	Kaynak Hücre	Tutuklayıcı Madde
Mikroorganizmalar		Bitki Hücreleri	
<i>Saccharomyces ovarum</i>	Aljinat	<i>Cannabis sativa</i>	Aljinat
<i>Saccharomyces cereviae</i>		<i>Catharanthus roseus</i>	
<i>Arthrobacter simplex</i>		<i>Coffea arabica</i>	
<i>Candida tropicalis</i>	Alj inat, Pols tiren	<i>Daucus carota</i>	
<i>Escherichia coli</i>	Poliakrilamid	<i>Digitalis lanata</i>	
<i>Corynebacterium simplex</i>		<i>Glycine max</i>	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		<i>Tavandula vera</i>	
<i>Saccharomyces lactis</i>		<i>Morinda citrifolia</i>	
<i>Streptomyces venetiae</i>	Kollajen	<i>Nicotiana tabacum</i>	
<i>Acetobacter spp.</i>	Metal hidroksit presipitatlan	<i>Tagetes minuta</i>	
<i>Micrococcus denitrijicans</i>	Sıvı-sülfektan membranlar	<i>Catharanthus roseus</i>	Agaroz
Filamentöz funguslar	Metal disk	<i>Daucus carota</i>	
<i>Micrococcus luteus</i>	Karboksimetil selüloz	<i>Datura innoxia</i>	
Hayvan Hücreleri		<i>Glycine max</i>	
HeLa, K562	Aljinat, Agaroz	<i>Thalictrum rugosum</i>	
İnsan deri fibroblastlan		<i>Catharanthus roseus</i>	Ağar
İnsan böbrek karsinoması		<i>Daucus carota</i>	
Sığan kolon karsinoması		<i>Glycine max</i>	
İnsan fibroblastlan	Dekstran mikro yataklar	<i>Catharanthus roseus</i>	k-karrajinan
İnsan hücre hatlan	Protein kaplı agaroz	<i>Daucus carota</i>	
Koyun eritrositleri		<i>Tagetes minuta</i>	
		<i>Amaranthus tricolor</i>	Çitosan
		<i>Asclepias syriaca</i>	
		<i>Apium graveolens</i>	
		<i>Capsicum frutescens</i>	Poliakrilamid

Tutuklanmış bitki hücre kültürleri ile sekonder metabolit üretimi başlıca üç ana grupta toplanabilir. Bunlar; i) biyotrans formasyon, ii) öncüllerden biyosentez ve iii) bileşiklerin *de novo* sentezi (Scragg, 1991). Biyotransformasyonla metabolit üretim tekniğinden daha sonra kısaca bahsedilecektir. Diğer iki teknik ise daha önce incelenmişti.

Bitki hücrelerinin tutuklanması tekniği ile sekonder metabolit üretimi başlıca şu avantajları sağlamaktadır:

- 1) Tutuklanmış hücrelerde büyüme doğal olarak sıvı ortamdaki hücrelere göre daha yavaş gerçekleşir. Bu durum biyomassın daha uzun süre alıkonmasını sağlayacak, metabolit hücrelerden salındığı ve ortamdan kazanıldığı sürece sistem sürekli olarak çalışabilecektir. Halbuki sıvı hücre kültürlerinde bir süre sonra alt kültür (pasaj) yapma gereği duyulmaktadır. Burada sistemin verimli olması için yavaş büyüyen veya bölünmeyen hücrelerin ortamda alıkonması kilit rol oynamaktadır. Ayrıca yavaş büyüme, hızlı büyüme için gerekli olan ‘primer’ metabolizmanın baskılanması veya hizmet dışına itilmesi anlamına da gelmektedir. Bu da sekonder metabolizmanın ön plana çıkması demektir (Lindsey ve Yeoman, 1983).

- 2) Tutuklanmış hücrelerin bulunduğu ortamda çabuk ve etkin düzenlemelere gidilebilir. Örneğin, ortama öncül maddeler, büyüme düzenleyicileri ve besin maddeleri çabucak ve kolaylıkla eklenebilir.
- 3) Daha çok biyomas verimi elde edilebilir. Ayrıca ortama ‘genç’ hücrelerin ekimi ve ‘yaşlı’ hücrelerin çıkarılması ile sistemin ‘gençleştirilmesi’ sağlanabilir.
- 4) Tutuklamada hücreler besin ortamından matrisle ayrıldığı için salman ürün kolaylıkla kültürden ‘hasat’ edilmektedir.
- 5) Sistemin sürekli ve kararlı doğası, oluşabilecek bazı biyokimyasal değişiklikleri ve yan ürün tepkimelerini ortadan kaldırmaktadır.
- 6) Büyüme ve ürün oluşumu arasında kesin bir ayırım yapılabilmektedir. Böylelikle ürün optimizasyonu büyümeyi engellememektedir. Örneğin, sekonder metabolit üretimini destekleyen fakat büyümeyi baskılayan bir büyüme düzenleyicisi ortama verildiğinde, zaten tutuklanmış ve büyümesi yavaşlamış (hatta bazen tamamen durmuş) hücrelerde büyümede olumsuz etkide bulunmamakta, buna karşılık metabolit üretiminde artışa yol açmaktadır.
- 7) Agregat oluşumu ve mekanik hasarlara duyarlılık gibi büyümeye bağlı olarak ortaya çıkan, bazı sorunlar tutuklanmış hücreleri etkilememektedir.

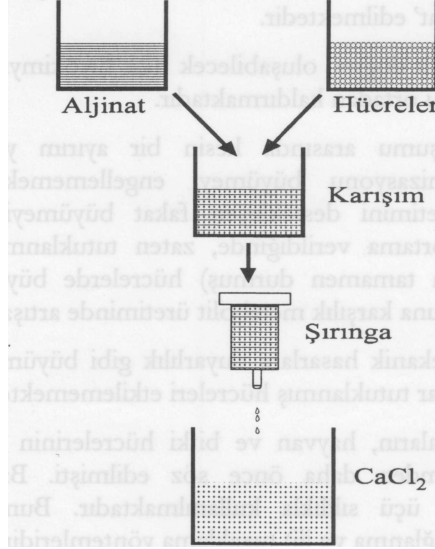
Enzimlerin, mikroorganizmaların, hayvan ve bitki hücrelerinin tutuklanmasında kullanılan dört ana yöntemden daha önce söz edilmişti. Bitki hücrelerinin tutuklanmasında bunlardan üçü sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar, i) tutunma (adsorpsiyon), ii) kovalent bağlanma ve iii) tuzaklama yöntemleridir.

Tutunma: Bitki hücrelerinin jelatin, ağar, aljinat, polipropilen, polis tiren ve cam gibi katı desteklere tutundurulmasıdır. Katı destek üzerine ince film halinde tutundurulmuş hücrelerin büyüme ortamı ile doğrudan teması, beslenme ile ilgili sınırlamaları ortadan kaldırmaktadır. Bu durum tutunma yöntemine avantaj sağlamaktadır. *Catbarantus roseus* hücrelerinin kalsiyum aljinada kolon reaktöre tutundurulması örnek olarak verilebilir.

Kovalent Bağlanma: Glutar aldehit ve karbodiimidler gibi bağlayıcı maddeler ile mikroorganizmaların cam gibi katı desteklere bağlanması yöntemi uzun zamandan beri uygulanmaktadır. Ancak, bu maddelerin bitki hücreleri için oldukça reaktif olması bu yöntemin bitki hücrelerine uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Yine de *Solanum avicu larinin* glutar aldehit ile polifenilen oksite bağlanarak gliko alkaloidlerin üretimi örnek olarak verilebilir.

Tuzaklama: Bitki hücrelerinin tutuklanmasında en sık kullanılan yöntemdir. Tuzaklamada çeşitli alt yöntemler uygulanmaktadır. Bunlar arasında polimer oluşturulması, gözenekli yapıların kullanılması ve kuşatma (confinement) en çok kullanılan yöntemleridir. Polimer oluşturmada aljinat, ağar, karrajean gibi doğal polimerlerin yanı sıra poliakrilamid gibi sentetik polimerler de kullanılabilir. Polimerleşme koşullarının diğerlerine göre daha yumuşak olması nedeniyle aljinat

en yaygın kullanılan polimerdir. Aljinat, gulunorik asit ve mannuronik asitten ibaret bir polis akkarittir. Kalsiyum iyonlarının gulunorik asit birimleri arasında oluşturduğu köprüler sayesinde jel oda sıcaklığında çabucak oluşmakta, fosfat iyonları eklendiğinde ise ayrılmaktadır. Şekil 7.6'da kalsiyum aljinatta polimerleşme ile bitki hücrelerinin tutuklanması basitleştirilmiş diyagram halinde verilmektedir.



Şekil 7.6. Kalsiyum aljinatta bitki hücrelerinin tutuklanması (Scragg, 1991a).

Diğer bir yöntemde ise, poliüretan köpüklerle çeşitli bitki hücreleri polisakkarit tabanlı musilaj vasıtasıyla gözenekli yapılara bağlanmaktadır.

İçi boş elyafların oluşturduğu birimlerde olduğu gibi bitki hücreleri yarı geçirgen zarla büyüme ortamından ayrılabilir. Bu sistemde besin maddeleri yarı geçirgen zar vasıtasıyla bitki hücrelerinin tutuklandığı ortama geçmekte, aynı şekilde hücrelerin sentezlediği metabolitler de elyaf boşluğuna yayılmaktadır (Şekil 7.7).

Bitki hücrelerinin tutuklanmasının nispeten yeni bir yöntem olmasından dolayı sekonder metabolitlerin üretimi konusunda bazı sorunlar yaşanabilmektedir. Bu sorunların arasında kullanılacak besi ortamının seçimi, ürün oluşumu ve salınımı ile destek maddesinin doğası ve bitki hücrelerine uygun olup olmayışı sayılabilir. Ancak, bu sorunlar giderilemeyecek kadar büyük değildir. Sonuç olarak tutuklama yönteminin, sekonder metabolitlerin bitki hücreleri tarafından üretilmesi konusunda bazı pratik ve ekonomik yararlar sağladığı açıktır.

1.1 AA. Senkronize (eşzamanlı) kültürler

Hücre süspansiyon kültürlerinde karşılaşılan başlıca sorunlardan biri de hücrelerin eş zamanlı olarak bölünmemesidir. Bu durum kültürlerde sıklıkla karşılaşılan heterojen hücre popülasyonuna neden olmaktadır. Heterojen yapı da doğrudan veya dolaylı olarak metabolit üretimi konusunda bazı dezavantajları gündeme getirmektedir. Eşzamanlı büyüme sistemleri gerek hücre bölünmesinde ve gerekse metabolik süreçlerin aydınlatılmasında da kullanışlı araçlardır. Eşzamanlılık; DNA sentezi inhibitörlerinin (örneğin afidikolinin) kültür ortamına ilavesiyle, büyüme düzenleyicilerinin ortama yeniden eklenmesi veya uzaklaştırılması ile ya da fosfat gibi büyümeyi düzenleyen bazı besin faktörlerinden mahrum ortamda bitki hücrelerinin kültürü ile gerçekleştirilebilir (Nagata *ve ark.*, 1982; Everett *ve ark.*, 1981; Gould *ve ark.*, 1981). Senkronize (eşzamanlı) hücre kültürleri sekonder metabolit üretimi ve birikimi ile ilgili mekanizmaların hücre büyümesi ile olan ilişkisini araştırmada kullanışlı sistemlerdir.

7.7.4.5. İki aşamalı kültürler

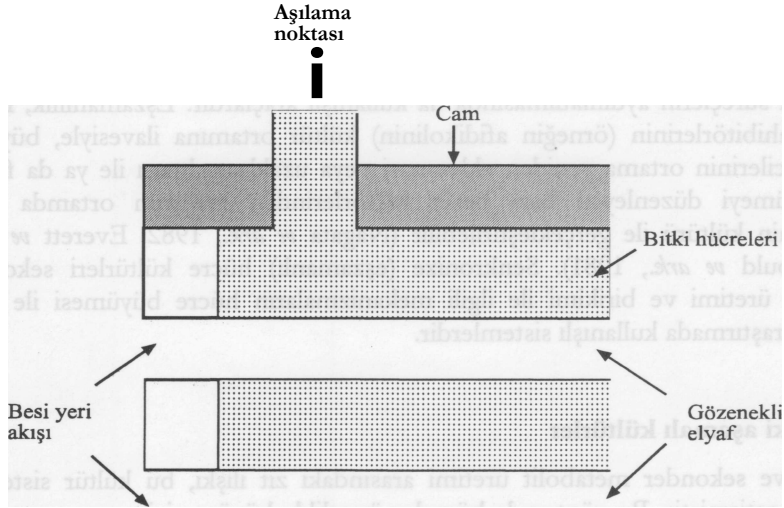
Büyüme ve sekonder metabolit üretimi arasındaki zıt ilişki, bu kültür sistemini gündeme getirmiştir. Bu yöntemde hücreler öncelikle büyüme için uygun ortamda kültüre alınmakta ve daha sonra sekonder metabolit üretimi için uygun olan ortama aktarılmaktadır. Örneğin, *Uthospermum erythrorhizon* hücre süspansiyon kültürleri büyümenin sağlandığı ortamdan alınıp, amonyumun bulunmadığı ve nitrat, fosfat, sülfat, bakır ve sakkaroz derişimlerinin yeniden düzenlendiği ortama aktarıldığında şikonin türevlerinin miktarı 1400 mg/l'ye ulaşmaktadır (Fujita *ve ark.*, 1981). İki aşamalı kültür sistemleri, özellikle ekonomik değeri yüksek olan bazı metabolitlerin üretiminde önemlidir.

7.8. Biyodönüşüm (biyotransformasyon)

Bitki biyoteknolojisinin en ilgi çekici konularından birisi de biyodönüşümdür. Biyodönüşüm aynı zamanda bitki doku ve hücre kültürleri ile sekonder metabolitlerin üretiminin önemli bir ögesidir. Metabolit üretimi konusunda diğer yöntemlerde olduğu gibi, biyodönüşümün temeli de ilk kez mikroorganizmalarla yapılan araştırma ve uygulamalara dayanmaktadır. Mikroorganizmaların rol oynadığı fermentasyon olayları da aslında temel olarak biyodönüşüm olayından başka bir şey değildir. Örneğin, üzüm suyundan şarap veya sirke üretimi biyodönüşüm ile gerçekleştirilen ve insanlık tarihi kadar eski bir yöntemdir.

Sözcük anlamı olarak biyodönüşüm, organik bileşiklerin işlevsel gruplarının canlı hücreler veya bu hücrelerden izole edilen enzimler tarafından değiştirilerek farklı kimyasal yapıya sahip ürüne dönüştürülmesi olayıdır. Biyodönüşümü

gerçekleştirecek hücrelerde yer alan enzimler ortama ilave edilen öncül (veya substrat) üzerinde bir takım kimyasal tepkimelerin gerçekleşmesinde rol oynarlar.



Şekil 7.7. Bitki hücrelerinin içi boş elyafli sistemle kuşatılması (Scragg, 1991a).

Daha önce öncüller kısmında belirtildiği gibi hücre kültürlerinin büyüdüğü ortama bir öncül madde (substrat) ilave edildiğinde, hücreler öncelikle bu maddeleri bünyesine alacak ve daha sonraki basamakta son ürünü oluşturmak için substratta bir takım dönüşüm mekanizmaları meydana gelecektir. Bir çok bitki doku ve hücre kültür sistemlerinde (organ, kallus, süspansiyon, protoplast ve tutuklanmış hücre kültürleri gibi) biyodönüşümün, çoğu kez, bir tek enzimin rol oynadığı tek basamaklı mekanizmadan ibaret olduğu bilinmektedir. Yine de bir çok enzimin rol oynadığı çok basamaklı biyodönüşüm olayları da rapor edilmiştir (Yeoman *ve ark.*, 1990). Bitki hücre kültürlerinde biyodönüşümü sağlayan enzimlerin rol oynadığı dönüşüm tepkimeleri Tablo 7.10'da gösterilmektedir.

Bitki hücre kültürlerinin bulunduğu ortama ilave edilen substrat doğal veya sentetik olabilir. Biyodönüşüm sonucu oluşan ürün de kimyasal yapı olarak daha önce yapısı bilinen veya yeni bir bileşik olabilir. Asıl önemli olan elde edilen ürünün niteliğidir. Bir başka deyişle elde edilen ürünün substrattan gerek ekonomik ve gerekse işlevsel

açından daha değerli olması gerekir. Bu biyodönüşümde karşılaşılan en önemli sorundur. Diğer bir önemli sorun ise ürünün daha az değer taşıyan maddelere yıkımıdır. Bitki hücre kültürleri ile gerçekleştirilen tek basamaklı biyodönüşüm araştırmalarının çoğu farmakolojik değer taşıyan maddeler üzerindir. Bu araştırmalar arasında en ilgi çekici olanı *Digitalis* türlerine (özellikle *D. lanata* ve *D. purpurea*) ait hücre kültürlerinde kalp glikoziderinin biyodönüşümüdür (Alfermann ve ark., 1977; Alfermann ve ark., 1980). Bunlar arasında, tıpta kalp hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılanları digoksin ve digitoksindir. Her iki bileşik de

Digitalis lanata bitkisinden izole edilmektedir. Günümüzde digitoksin tedavide digokine göre daha az tercih edilmektedir. Buna karşılık, digitoksinin bitkilerdeki miktarı digoksine nazaran çok daha fazladır. Digoksinin, digitoksinin farkı 12. karbon atomunda bir hidroksillenmenin oluşudur. Digitoksinin, digoksine biyodönüşümü Şekil 7.8'de gösterilmektedir. Digitoksine önce kimyasal yollarla metil grubu eklenerek p-metildiği toksin substratı oluşturulmakta ve daha sonra *Digitalis* kültürlerine ilave edilen substrat P-metildigoksine dönüştürülmektedir. Metil grubunun uzaklaştırılmasıyla digoksin elde edilmektedir (Alfermann ve ark., 1983). Şekil 7.8'de görüldüğü gibi oluşan asıl ana ürün purpurea glikozit A'dır. Ancak bu maddenin de hidroksillenmesi sonucu hem ekonomik hem de işlevsel açıdan önemli olan digoksin oluşmaktadır. Bu durum arzu edilen biyodönüşümün sağlandığını göstermektedir.

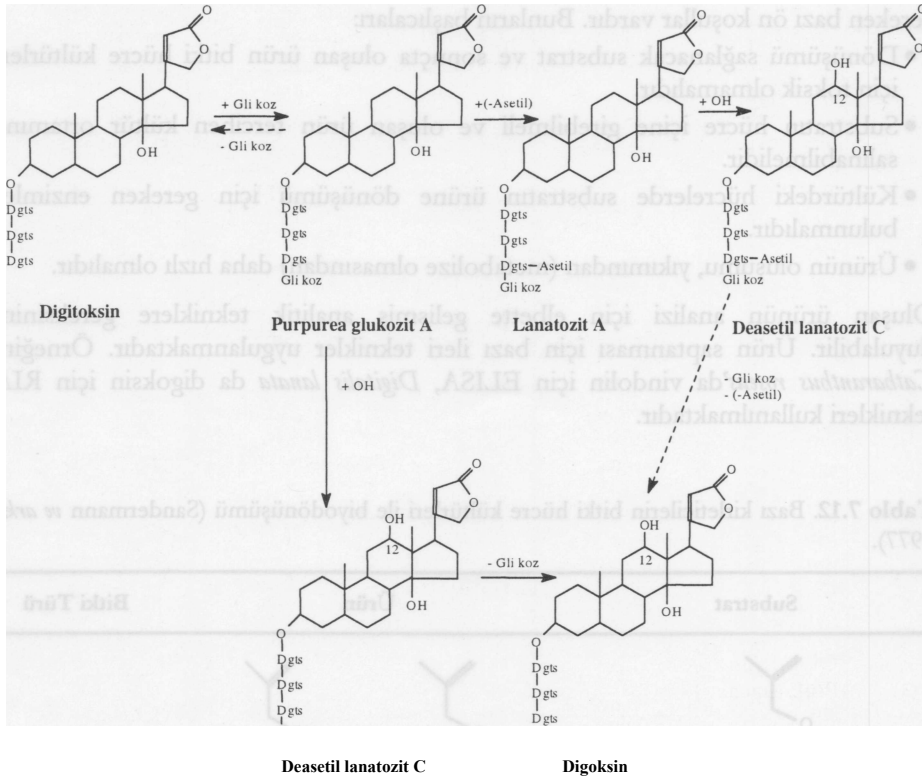
İlaç sanayinde hammadde olarak kullanılan bitkisel kökenli kimyasalların yanı sıra besin ve kozmetik sanayinde ekonomik ve işlevsel değerleri tartışılmaz bazı sekonder ürünlerinde biyodönüşüm ile elde edilmesi üzerine bazı çalışmalar yapılmıştır. Bunlar arasında terpenoidler ve diterpenoidler verilebilir (Butcher, 1977).

Bitki hücre kültürlerinde biyodönüşüm hakkında literatürde çok sayıda rapor bulunmaktadır. Ekonomik değeri olan bazı metaboliderin bitki hücre kültürleri ile biyodönüşümü Tablo 7.11'de verilmektedir.

Son yıllarda senobiyotiklerin (kirleticilerin) yıkım mekanizmalarının bitki hücre süspansiyon kültürlerinde araştırılması gündeme gelmiştir. Pestisitler, polisiklik ve polihidroklorlu bileşiklerin bulunduğu bu kimyasallar her yıl giderek artan oranda çevreye salınmakta ve doğada kirlenmelere yol açmaktadır. Bu kirleticilerin yıkım mekanizmalarının bitkiler tarafından nasıl gerçekleştirildiğine dair bir araştırmayı doğrudan doğada bitkiler üzerinde yapmak oldukça zordur. Senobiyotiklerin yıkım metabolizmasını ve oluşan parçalanma ürünlerinin özelliklerini araştırmada bitki hücre kültürleri pratik ve avantajlı sistem olabilir. Bu maddelerin yıkımı ve oluşan parçalanma ürünleri hakkında örnekler Tablo 7.12'de verilmektedir.

Tablo 7.10. Bitki hücre kültürlerinde biyodönüşümü gerçekleştiren enzimlerce katalizlenen başlıca kimyasal tepkimeler (Kurz ve Constabel, 1979).

Tepkime	Substrat	Ürün
Redüksiyon (indirgenme)	$\begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagdown \diagup \end{array}$ Alken	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{-----}$ Alkan
	$\begin{array}{c} & \text{H} & \text{O} \\ & & \\ > & \text{C} & \text{C} \\ & & \\ & \text{H} & \text{O} \end{array}$ a, 3-Doymamış karbonil	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{-----}$ Karbonil veya Alkol
	$\begin{array}{c} & \text{H} & \text{O} \\ & & \\ > & \text{C} & \text{C} \\ & & \\ & \text{H} & \text{O} \end{array}$ Karbonil	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ Alkol
	$\begin{array}{c} & \text{H} & \text{O} \\ & & \\ > & \text{C} & \text{C} \\ & & \\ & \text{H} & \text{O} \end{array}$ Karbonil	$-\text{CH}_2-\text{OH}$ Alkol
Oksidasyon (Yükseltgenme)	$-\text{CH}_3$ Metil	$-\text{COOH}$ Karboksilik asit
	$-\text{CH}_2\text{OH}$ Alkol	$-\text{CHO}$ Aldehit
Hidroliz	$\begin{array}{c} \text{C}^{\text{O}} \\ \\ \text{O}-\text{R} \end{array}$ Ester	$\begin{array}{c} \text{C}^{\text{O}} \\ \\ \text{O}-\text{H} \end{array}$ Karboksilik asit
Epoksidasyon	$-\text{CH}=\text{CH}-$ Alken	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{C} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \end{array}$ Epoksit
Glikozilasyon	$-\text{OH}$ Hidroksil	O-glikoz
Esterleştirme	$-\text{COOH}$ Karboksilik asit	$-\text{COO}-\text{malat}$
Metilleştirme	$-\text{OH}$ Hidroksil	$\text{O}-\text{CH}_3$ Metoksi



Şekil 7.8. *Digitalis* hücre kültürlerinde digitoksinin digoksinine dönüşümü (dgts= digitoksoz molekülü) (Alfermann ve ark., 1983).

Tablo 7.11. Bitki hücre kültürlerinde biyodönüşüme dair bazı örnekler (Yeoman ve ark., 1990).

Bitki Türü	Substrat	Ürün
<i>Cannabis sativa</i>	Kannabidiol	Kannabielsionlar
<i>Catharanthus roseus</i>	Anhidrovinblastin	Vinblastin
<i>Datura innoxia</i>	Hidrokinon	Arbutin
<i>Digitalis lanata</i>	Digitoksin	Digoksin
<i>Daucus dula angustifolia</i>	Monoterpenoid aldehitler	Alkoller
<i>Mentha spp.</i>	Menton	Neomenton
<i>Mentha spp.</i>	Menton	Izomenton
<i>Mucuna pruriens</i>	Tirozin	L-DOPA
<i>Papaver somniferum</i>	Kodeion	Kodein
<i>Papaver somniferum</i>	Tebain	Neopin
<i>Peganum harmala</i>	Triptamin	Seratonin
<i>Salix alba</i>	Şahsilik alkol	Şahsin

Bitki hücre kültürleriyle başarılı ve etkin bir biyodönüşüm için yerine getirilmesi gereken bazı ön koşullar vardır. Bunların başlıcaları:

- Dönüşümü sağlayacak substrat ve sonuçta oluşan ürün bitki hücre kültürleri için toksik olmamalıdır.
- Substratın hücre içine girebilmeli ve oluşan ürün tercihen kültür ortamına salınabilmelidir.
- Kültürdeki hücrelerde substratın ürüne dönüşümü için gereken enzimler bulunmalıdır.
- Ürünün oluşumu, yıkımından (metabolize olmasından) daha hızlı olmalıdır.

Oluşan ürünün analizi için elbette gelişmiş analitik tekniklere gereksinim duyulabilir. Ürün saptanması için bazı ileri teknikler uygulanmaktadır. Örneğin, *Catharanthus roseus*'de vindolin için ELISA, *Digitalis lanata* da digoksin için RIA teknikleri kullanılmaktadır.

Tablo 7.12. Bazı kirleticilerin bitki hücre kültürleri ile biyodönüşümü (Sandermann ve ark., 1977).

Substrat	Ürün	Bitki Türü
		<i>Zea mays</i> <i>Daucus caota</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Glycine max</i>
2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit	a) 2,5-dikloro-4-hidroksi-fenoksiasetik asit b) 2,3-dikloro-4-hidroksi-fenoksiasetik asit	
		<i>Nicotiana tabacum</i>
Florodifen	4-nitrofenol	
		<i>Oryza sativa</i>
Propanilin	3,4-dikloroanilin	

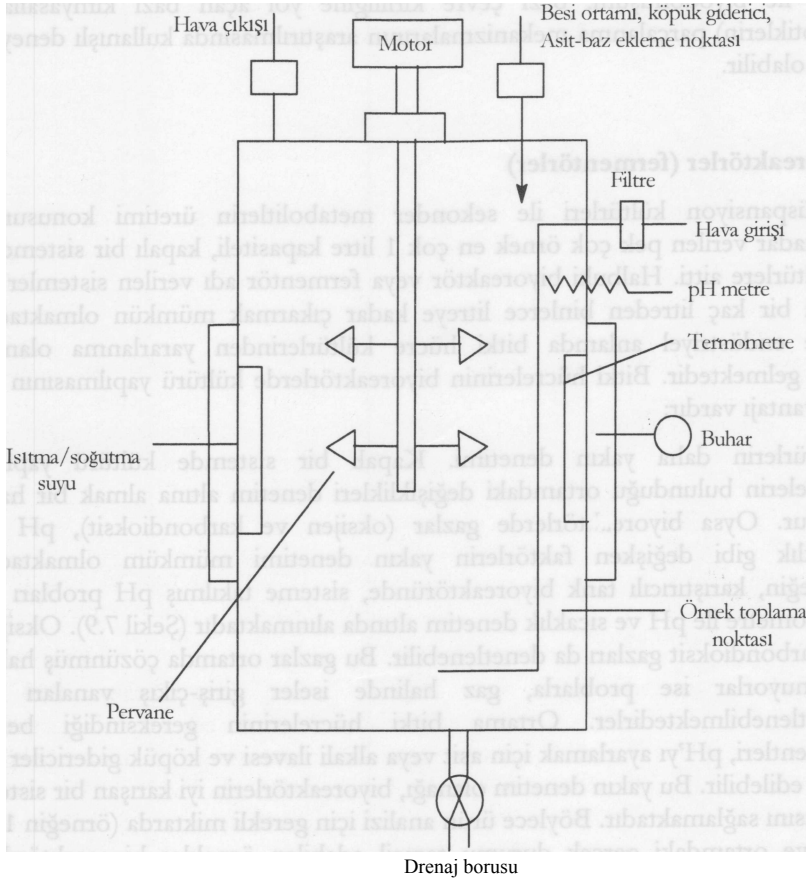
Özetle bitki hücre kültürleri ile biyodönüşüm, tıpkı mikroorganizmalarda fermentasyon tekniğinde olduğu gibi endüstriyel açıdan yararlı bir sistem olabilir. Biyodönüşüm sadece bilinen metabolitlerin hızlı ve etkin bir şekilde sentezlenmesi için değil aynı zamanda daha önce bitkilerde varlığı bilinmeyen yeni kimyasalların ortaya çıkmasında da katkıda bulunabilir. Yine yukarıda belirtildiği gibi bitki hücre kültürleri ile biyodönüşüm, bazı çevre kirliliğine yol açan bazı kimyasalların (senobiyotiklerin) parçalanma mekanizmalarının araştırılmasında kullanışlı deneysel sistemler olabilir.

7.9. Biyoreaktörler (fermentörler)

Hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolitlerin üretimi konusunda şimdiye kadar verilen pek çok örnek en çok 1 litre kapasiteli, kapalı bir sistemden ibaret kültürlere aittir. Halbuki biyoreaktör veya fermentör adı verilen sistemler ile kapasiteyi bir kaç litreden binlerce litreye kadar çıkarmak mümkün olmaktadır. Böylelikle endüstriyel anlamda bitki hücre kültürlerinden yararlanma olanağı gündeme gelmektedir. Bitki hücrelerinin biyoreaktörlerde kültürü yapılmasının iki önemli avantajı vardır:

- i) Kültürlerin daha yakın denetimi. Kapalı bir sistemde kültürü yapılan hücrelerin bulunduğu ortamdaki değişiklikleri denetim altına almak bir hayli zordur. Oysa biyoreaktörlerde gazlar (oksijen ve karbondioksit), pH ve sıcaklık gibi değişken faktörlerin yakın denetimi mümkün olmaktadır. Örneğin, karıştırıcı tank biyoreaktöründe, sisteme takılmış pH problemleri ve termometre ile pH ve sıcaklık denetim altında alınmaktadır (Şekil 7.9). Oksijen ve karbondioksit gazları da denetlenebilir. Bu gazlar ortamda çözünmüş halde bulunuyorlar ise problemlerle, gaz halinde iseler giriş-çıkış vanaları ile denetlenebilmektedirler. Ortama bitki hücrelerinin gereksindiği besin elemenden, pH'yı ayarlamak için asit veya alkali ilavesi ve köpük gidericiler de ilave edilebilir. Bu yakın denetim olanağı, biyoreaktörlerin iyi karışan bir sistem olmasını sağlamaktadır. Böylece ürün analizi için gerekli miktarda (örneğin 100 ml) ve ortamdaki gerçek durumu temsil edebilen örnekler biyoreaktörden alınabilmektedir.
- ii) Bitki hücre kültürlerinin endüstriyel amaçlı kullanılması için (özellikle ekonomik açıdan önemli metabolitlerin üretiminde) büyük ölçekli kültürler gerekmektedir. Bu kültürler için gerekli ön bilgiler biyoreaktörler ile sağlamaktadır. Gerek büyüme ve gerekse ürün oluşumu bakımından en yüksek verimin alındığı hücre süspansiyon kültürlerinden büyük ölçekli kültürlerin başlatılması durumunda, kültüre ait pek çok özelliğin değiştiği görülmektedir. Örneğin, kültürün kuru ağırlık miktarı kültür hacminin kübüyle orantılı olarak değişirken, ürün verimindeki değişim kültür hacminin karesiyle orantılı olmaktadır. Dolayısı ile büyük ölçekli kültürler başlatılmadan önce, gerek

büyüme ve gerekse ürün oluşumu için önemli olan parametreler uygun biyoreaktörlerde gözden geçirilmelidir.



Şekil 7.9. Bir kaşınıcı tank biyoreaktörünün şematik görünüşü (Scragg, 1991b).

Bitki hücrelerinin biyoreaktörlerde yüksek hacimde kültürü, özellikle ekonomik değeri yüksek, ancak bitkiden izole edilen miktarı düşük kimyasallar için tasarlanmıştır. Örneğin, *C. roseus* bitkisinden elde edilen ve dolaşım hastalıklarının tedavisinde kullanılan aymalisin ile *P. somniferum* bitkisinden elde edilen ve yatıştırıcı olarak kullanılan kodein ekonomik değeri yüksek maddelerdir. Ancak bu maddelerin yukarıda adı geçen bitkilerden elde edilmiş miktarları çok düşüktür. Endüstriyel açıdan diğer bazı bitki hücre kültürü ürünleri üe ilgili bir çok örnek daha önce verilmişti. Ancak tüm örneklerin biyoreaktörler ile üretiminde esas hedef

maliyet değerlerinin düşürülmesidir. Bir başka deyişle, biyoreaktörde üretilen ürünün maliyeti asıl bitkide çok az miktarda bulunan ürüne nazaran daha düşük olmalıdır ve üretim piyasa değeri üzerinde etkili olmamalıdır. Örneğin, şikonin, kinonlar sınıfına giren bir kimyasal olup hem antimikrobiyal özelliğinden dolayı ilaç sanayinde, hem de boyar madde olmasından dolayı boya sanayinde kullanılmaktadır. Şikonin, Mitsui Petrokimya Endüstrisi (Japonya) tarafından *Uthospermum erythrorhizon* hücreleri ile biyoreaktörlerde üretilen ve günümüze kadar yukarıda belirtilen kriterlere uyan tek örnektir (Curtin, 1983).

Aşağıda *Catharan bus roseus* hücre kültürlerinin biyoreaktörde serpentin üretiminde ortaya çıkan maliyet değeri örnek olarak verilmektedir. Serpentin *C. roseus* bitkisinden elde edilen ve yüksek tansiyona karşı kullanılan bir indol alkaloididir. 1983 verileri ile serpentinin piyasa değeri yaklaşık kilogram başına 80 000 A.B.D. doları (Sigma Ltd.), yıllık satış kapasitesi ise yaklaşık 3 500 kg'dır. Kapasitesi 25 ton (25 000 litre) olan iki biyoreaktörün ardışık olarak *C. roseus* hücre kültürlerinden serpentin üretimi için kullanıldığını varsayalım:

1. Gerçekte biyoreaktörlerin yıllık toplam kapasiteleri 25 ton'dur. Çünkü kültürlerin başlatılması için 2, büyüme için 2 ve ürün elde etmek için 2 ay olmak üzere toplam 6 aylık bir bekleme süresi gerekmektedir. Bu da kapasitenin yarıya düşmesi anlamına gelmektedir. Biyoreaktörlerin bir yıl boyunca kesintisiz çalışması gereği göz önünde tutulmalıdır. Bir başka deyişle kültürler kesikli olmamalıdır.
2. 25 ton kapasiteli biyoreaktörden elde edilecek biyomasın reaktör hacminin ancak %40'ı civarında olabileceği düşünülürse, kültürden elde edilecek yaş ağırlık yılda 10 000 kg'dır.
3. Kuru ağırlık, yaş ağırlığın %10'u ise elde edilecek kuru ağırlık 1 000 kg civarındadır. *C. roseus* hücre kültürlerinin biyoreaktörde serpentin biyosentez kapasitesinin ana bitkidekine eşit oranda olduğu varsayıldığında (kuru ağırlığın %10'u), saf olarak elde edilecek serpentin miktarı 100 kg olacaktır. Bu rakam, piyasaya sunuş değeri olan 80 000 \$ ile çarpıldığında 8 milyon \$'lık bir gelir elde edilmesi anlamına gelir.
4. Halbuki her iki biyoreaktörün çalışması için harcanan para yaklaşık 14 milyon \$ civarındadır (1 ton biyomass için 3.5 ton besiyeri kullanmak gerektiği hatırla tutulmalıdır). Dolayısı ile serpentinin bu sistem ile maliyeti 14 000 000/100 : 140 000 \$/kg olacaktır.

Yukarıda örnek olarak verilen ekonomik sebepler yüzünden biyoreaktörlerle sekonder metabolitlerin üretimi şimdilik başta şikonin olmak üzere birkaç kimyasalla sınırlı kalmaktadır. Endüstride kullanıma potansiyeli olan bazı bitki hücre kültürü ürünleri Tablo 7.13'de verilmektedir.

Tablo 7.13. Endüstride kullanıma potansiyeli olan bazı bitki hücre kültürü ürünleri (Scragg, 1991).

Metabolit	Kültürü Yapılan Bitki	Kullanım Alanı	Maliyet (\$/kg)
Aymalisin	<i>Catharanthus roseus</i>	İlaç sanayi	1500
Kodein	<i>Papaver somniferum</i>	İlaç sanayi	650
Digoksin	<i>Digitalis lanata</i>	İlaç sanayi	3000
Yasemin	<i>Jasminum türleri</i>	Parfümeri	5000
Kanin	<i>Cinchona ledgeriana</i>	İlaç ve gıda sanayileri	100
Gül yağı	<i>Rosa spp.</i>	Kozmetik	300
Şikonin	<i>Uthospermum erythrorhizon</i>	İlaç ve boya sanayileri	4500

Hücre kültürleri ile biyoreaktörlerde metabolit üretimi düşüncesi de, diğer pek çok hücre kültürü sistemlerinde olduğu gibi, mikroorganizmalarla yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Biyoreaktörlerin bitki hücre kültürleri için kullanımı ilk kez 1959 yılında gerçekleşmiştir (Tulecke ve Nickell, 1959). Bitki hücre hatları için düzenlenmiş ilk biyoreaktör 10 litre kapasiteli basit cam balondan (karboydan) ibaretti. Bir sonraki yıl, bu sistemin yerini, kapasitesi 30-130 litre arasında değişen paslanmaz çelik tanklar almıştır (Tulecke ve Nickell, 1960). İki yıl sonra, mikroorganizmalar için kullanılan 15 litre kapasiteli karıştırıcılı tank biyoreaktörleri ilk kez *Daucus carota* hücre kültürleri için kullanılmıştır (Byrnie ve Koch, 1962). Bu sistem ile *Nicotiana tabacum* hücre kültürlerinde 15 500 litrelik bir kapasiteye ulaşılmıştır (Noguchi ve ark., 1977). *M. citrifolia* ve *C. roseus* hücre kültürlerinde hava kaldıraçlı (air-lift) biyoreaktörlerin kullanılması ise varılan en son aşamayı göstermektedir.

Ancak bitki hücrelerinin kültürü için tasarlanan biyoreaktörlerin hiçbirine günümüzde ideal bir sistem olarak bakılmamaktadır. Biyoreaktör tasarımı bir bitki hücre kültüründen diğerine farklılık göstermekte ve aynı tasarım farklı kültürlerde değişik sonuçlar vermektedir. Ancak genel anlamda verimli bir biyoreaktör kurmak için aşağıdaki gereksinimlerin yerine getirilmesi gerekmektedir:

- Mikroptan arındırılmış (steril) bir ortam,
- pH, oksijen, karbondioksit ve sıcaklık gibi çevresel etmenlerin denetimi için giriş noktası,
- Ürün oluşumunu değerlendirmek için örnek toplama noktaları,
- Taze besi ortamı, köpük giderici maddeler, pH'nın düzenlenmesi için gereken asit veya baz ilavesi için giriş noktası,
- Hava girişi (sterilite için filtre sistemli)
- Karıştırma (karıştırıcılı tank sisteminde pervane, hava kaldıraçlı sistemlerde ise doğrudan havanın kendisi).
- Sıcaklık denetimi için soğutma-ısıtma devresi (içinden soğutma suyu ve buhar geçen borular).

Biyoreaktörlerde kültürü yapılan hücrelerin özellikleri:

Bitki hücre kültür sistemlerinin çoğu mikrobiyal uygulama ve araştırmalardan yola çıkılarak tasarlanmıştır. Bu yüzden süspansiyon kültürlerindeki bitki hücreleri mikrobiyal hücreler gibi işlem görürler. Ancak bitki hücrelerinin özellikleri mikroorganizmalardan çok farklıdır. Bu farklılıklar şu şekilde özetlenebilir:

Boyut ve Şekil: Süspansiyon kültürlerinde kullanılan bitki hücreleri 40-200 μm uzunluğunda ve 10-40 μm genişliğindedirler. Mikroorganizmaların boyutu ise 1-10 μm arasındadır. Bitki hücreleri sert selüloz duvarla çevrilidir ve bir süspansiyon kültüründe bile boyut ve şekil açısından farklılıklar gösteren çok değişik hücreler yer almaktadır. Kültürü yapılan mikroorganizmalar ise hem boyut hem de şekil açısından tekdüzedirler.

Kümelenme (Agregasyon): Mikroorganizmalar kültür ortamında bireysel olarak dağılım gösterirken, bitki hücre süspansiyon kültürlerinde tek hücreler çok düşük sıklıkta bulunmaktadır. Kümelenme bölünen hücrelerin birbirlerinden ayrılmamasından kaynaklanmaktadır. Biyoreaktörlerde kümelenme sonucu büyük hücre yığınları oluşturması halinde sistemdeki hava giriş ve çıkış boruları ile besisi ortamı ilave ve örnek toplama noktaları tıkanabilmektedir. Bunu önlemek için sistemin çok iyi karıştırılması gerekmektedir.

Büyüme Oranları: Biyoreaktörde kültürü yapılan mikroorganizmalar ile bitki hücreleri arasındaki en dikkat çekici farklılık büyüme oranlarında görülmektedir. Biyoreaktörlerde kültürü yapılan mikroorganizmaların sayısının iki katına artış süresi (doubling time, td) 1-2 saat iken, bitki hücreleri için bu değer 2-3 gün hatta yeni oluşturulmuş olanlar için 5-6 günü bulmaktadır. Elbette prokaryot ve ökaryot organizmaların yaşam döngüsündeki farklılık bu duruma etki eden ana etmendir.

Aşılama Yoğunluğu: Biyoreaktörlerde hücre kültürlerinin başlatılması veya mevcut kültürün ölçeğinin artırılması için başlangıç kültüründen en az %10'luk bir hacime gerek duyulmaktadır. Bu gerek başlangıç kültüründe hızlı bölünme kapasitesi düşük hücrelerden hem de kültür ortamının aşılama yoğunluğunu seyreltmesinden kaynaklanmaktadır. Halbuki mikroorganizmalarda kültürün başlatılması için çok düşük miktarda hücrelerin ilavesi yeterli olmaktadır.

Havalandırma: Yavaş büyüme nedeniyle bitki hücre kültürlerinin oksijen gereksimi mikroorganizmalara göre daha azdır.

Yüzey Gerilim Kırılmalarına Duyarlılık: Hücrelerin kümeler halinde bulunması ve sistemin tıkanmasını önlemek için karıştırıcıya ihtiyaç duyulmaktadır. Karıştırma esnasında meydana gelen santrifüj gücü sonucu oluşan yüzey gerilim kırılmalarına bitki hücreleri oldukça duyarlıdır. Çünkü yukarıda bahsedildiği gibi, bitki hücrelerinin sert hücre duvarı ile kuşatılmış olması, esnek olmalarını

engellemektedir. Mikroorganizmalar ise yüzey gerilim kırılmalarına oldukça dirençlidirler.

Kararlılık: Bitki hücre kültürleri biyoreaktörlerde de zamana bağlı olarak değişken bir yapı sergilemektedirler. Zamanla başlangıç kültürlerinden daha farklı davranan kültürler meydana gelmektedir. Başta bitki büyüme düzenleyicileri olmak üzere bir çok fiziksel ve kimyasal etmenlerin neden olduğu genetik değişiklikler (örneğin kromozom hasarları) hem kültürdeki hücreler arasında çeşitliliğe hem de ürün oluşumunda değişikliklere yol açabilmektedir.

Köpüklenme: Köpüklenme bitki hücreleri tarafından üretilen ve hücre dışına salınan polisakkarit yapıdaki maddelerin oluşturduğu beze (meringue) veya kabuk benzeri yapılardır. Benzer yapılar mikroorganizmaların biyoreaktördeki kültürlerinde de görülmektedir. Ancak bu sistemlerde köpüklenmenin nedeni kültürdeki mikroorganizmaların ürettiği proteinlerdir. Köpüklenme zamanla tüm biyoreaktörü kaplayabilir ve sonuçta oksijensizlikten dolayı ölü hücrelerin yer aldığı bölgeler meydana gelebilir. Daha ileri aşamalarda ise biyoreaktörün, tümüyle ölü hücrelerden ibaret bir sistem olması kaçınılmazdır. Köpüklenmeyi önleyici çeşitli maddeler biyoreaktöre ilave edilebilir. Silikon bazlı polietilen glikolün (PEG) köpüklenmeyi önlediği ve büyümeyi engellemediği gözlenmiştir (Scragg, 1990).

Ürün: Bitki hücre kültürleriyle üretilmesi hedeflenen kimyasallar sekonder metabolitlerdir. Bu maddelerin bitki hücre kültürlerinde büyüme için gerekli olmadığından, büyüme dursa bile metabolit üretimi devam edebilir.

Özetle, hangi .sistem uygulanırsa uygulansın, bitki hücrelerinin biyoreaktörlerde kültürü günümüzde zor ve ekonomik olmayan bir teknik olarak kalmaktadır. Biyoreaktörlerde ürün oluşumu için gerekli optimum koşulların belirlenmesi ve korunması çözüm bekleyen esas sorundur. Her bitki hücre kültürü için uygun biyoreaktör tasarımları, değişken olabilecek bu parametrelerin saptanması ile gerçekleş tirilebilir.

7.10. Genel Değerlendirme

Bitkiler alemi pek çok organik bileşik için kaynak oluşturmaktadır. Günümüzde sentetik maddelerin kullanımının bir takım yan etkiler yapması, özellikle ilaç ve besin sanayinde, doğal ürünlere karşı talebin giderek artmasına yol açmaktadır. Bu durum bitkisel kökenli ürünlerin ya kültür bitkilerinin daha fazla ekimini ya da doğal olarak yetişen bitkilerin doğadan daha çok toplanması anlamına gelmektedir. Birinci durumda daha çok arazi tarım amaçlı kullanıma açılmak zorunda kalınırken, ikinci durumda bitkinin neslinin tükenmesine yol açabilmektedir. Her iki durumda da şayet elde edilecek ürün ekonomik açıdan çok değerli, yani piyasa değeri yüksek, buna karşılık bitkiden elde edilen miktarı çok düşük ise hem üretim maliyeti yükselmekte, hem de zaman ve emek kaybı artmaktadır. Bu nedenle, bitkisel kökenli doğal ürünlerin elde edilmesinde zaman ve emek kaybının önlenmesi,

maliyetin düşürülmesi ve doğa tahribatının önlenmesi bakımından, doku ve hücre kültürleri ile üretimin makul bir seçenek olduğu görülmektedir. Ayrıca, bu sistemler ile ürünün piyasa değerini etkilemeden, istendiği anda gereken miktarda üretim mümkün olabilmektedir. Ancak burada her hangi bir ürün için biyosentetik kapasitesi yüksek hücre kültür hatlarının elde edilmesi ve bu hatların uzun süre kültürü yapıldığında aynı kararlılık ve verimde tutulması güncel sorunlardan biridir. Özellikle hücre süspansiyon kültürlerinde gözlenen büyüme ve metabolit birikimi arasındaki ters bağıntı bu sistemler ile doğal ürünlerin üretilmesinde karşılaşılan en büyük sorunu oluşturmaktadır. Yine de yapılan araştırmalar ile bu sorunun üstesinden gelebilecek bir takım alternatifler sunulmaktadır.

Laboratuvar koşullarında veya uzun zaman ve emek gerektiren bitkisel kökenli kimyasalların dönüşümü bitki hücre kültürleri ile mümkün olmaktadır. Böylece hem işlevsel hem de ekonomik yönden artı değerlere sahip bir başka ürün elde edilebilmektedir. Digitoksinin digoksine dönüştürülmesi bunun en çarpıcı örneğidir. Yine son yıllarda çevre kirleticilerinin detoksifikasyonu ile ilgili mekanizmaların aydınlatılmasında hücre kültürleri ile biyodönüşüm tekniğinden yararlanılmaktadır. Günümüzde bitki hücre kültürleri ile doğal ürünlerin üretimi artık akademik bir ilgi odağı olmaktan çıkmış, endüstriye hitap etmeye başlamıştır. Buna paralel olarak hücre kültürü teknolojisinde yeni tekniklerin ortaya çıkması ve genetik mühendisliği gibi diğer disiplinlerin bu alanda uygulanabilirliği gelecek için ümit vericidir.

Son olarak, bitki hücre kültürlerinin köken aldığı bitkide varlığı saptanmayan yeni kimyasalları üretebileceği olgusuna da dikkat edilmelidir. Çünkü bu yeni ürünler pek çok hastalığın tedavisinde etkin bir şekilde kullanılabilir.

Kaynaklar

Alfermann AW, Boy HM, Döller PC, Hagedorn W, Heins M, Wahl J, Reinhard E (1977) Biotransformation of cardiac glycosides by plant cell cultures. In: Barz W, Reinhard E, Zenk MH (eds), Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application, pp. 125-141, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Alfermann AW, Schuller L, Reinhard E (1980) Biotransformation of cardiac glycosides by immobilized cells *Digitalis lanata*. Planta Medica, 40: 218-223.

Alfermann AW, Bergmann W, Figür C, Helmbold U, Schwantag D, Schuller L, Reinhard E (1983) Biotransformation of P-methyldigitoxin to p-methyldigoxin by cell cultures of *Digitalis lanata*. In: Mantell SH, Smith H (eds), Plant Biotechnology, pp. 67-74, Cambridge University Press, Cambridge.

Anderson C, Le Grys GA, Solomons GL (1982) Concepts in the design of large-scale fermenters for viscous culture broths. Biochem. Eng., 2: 43-49.

- Barthe GA, Jourdan PS, McIntosh CA, Mantell RL (1987) Naringin and limonin production in callus cultures and regenerated shoots from *Citrus* sp. J. Plant Physiol, 127: 55-65.
- Barz W, Daniel S, Hinderer W, Jaques U, Kessmann H, Koster J, Otto C, Tiemann K (1988) Elicitation and metabolism of phytoalexins in plant celi cultures. In: Applications of Plant Celi and Tissue Culture, CIBA Foundation Symposium 137, pp. 178-198, John Wiley & Sons, Chichester, New York Brisbane, Toronto, Singapore.
- Barz W, Beimen A, Drager B, Jaques U, Otto CH, Süper E, Upmeier B (1990) Turnover and storage of secondary products in celi cultures. In: Charhwood BV, Rhodes MJC (eds), Secondary Products from Plant Celi Culture, pp. 79-102, Clarendon Press, Oxford.
- Bauch H, Leistner E (1978) Aromatic metabolites in celi suspension cultures of *Galium mollugo*. Plan ta Medica, 33: 105-123.
- Becker H, Sauerwein M (1990) Manipulating the biosynthetic capacity of plant celi cultures. In: Charhwood BV, Rhodes MJC (eds), Secondary Products from Plant Celi Culture, pp. 43-57, Clarendon Press, Oxford.
- Benjamin BD, Roja PC, Heble MR, Chadha MS (1987) Multiple shoot cultures of *Atropa belladonna*: effect of physico-chemical factors on growth and alkaloid formation. J. Plant Physiol., 129: 129-135.
- Berlin J, Wray V, Mollenschott C, Sasse F (1986) Formation of (3-peltatin-A methyl ether and coniferin by root cultures of *Unum flavum*. J. Nat. Products, 49: 435-439.
- Berlin J, Kuzovkina IN, Rugenhagen C, Fecker L, Commandeur U, Wray V (1992) Hairy root cultures of *Peganum harmala*. II. Characterisation of celi lines and effect of culture condidon on the accumulation of (3-carboline alkaloids and serotonin. Z. Naturforschung, 47: 222-230.
- Böhm H (1980) The formation of secondary metabolites in plant tissue and celi cultures. Int. Rev. Cytol., 11: 183-208.
- Butcher DN (1977) Secondary products in tissue cultures. In: Reinert J, Bajaj YPS (eds), Plant Celi Tissue and Organ Cultures, pp. 668-693, Spnnger-Verlag, Berlin.
- Byrine AF, Koch MB (1962) Food production by submerged cultures of plant tissue cells. Science, 135: 215-226.
- Charhwood BV, Charhwood KA, Molina-Torres J (1990) Accumulation of secondary compounds by organized plant cultures. In: Charhwood BV, Rhodes MJC (eds), Secondary Products from Plant Celi Culture, pp. 167-200, Clarendon Press, Oxford.
- Chowdhury AR, Chaturvedi HC (1979) Cholesterol and biosynthesis of diosgenin by tuber callus of *Dioscorea deltoidea*. Curr. Sci., 49: 237-238.
- Cox PA (1990) Ethnopharmacology and the search for new drugs. In: Bioactive Compounds from Plants, CIBA Foundation Symposium 154., pp. 40-55, John Wiley & Sons, Chichester, New York Brisbane, Toronto, Singapore.
- Creswell R (1991) Improvement of plants via plant celi culture. In: Stafford A, Warren G (eds), Plant Celi and Tissue Culture, pp. 101-122, Öpen University Press, Milton Keynes.

- Curtin ME (1983) Harvesting profitable products from plant tissue culture. *Biotech.*, 1: 644-657.
- De-Eknamkul W, Ellis B (1985) Effects of macronutrients on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. *Plant Cell Rep.*, 4: 46-49.
- Deno H, Yagamata H, Emoto T, Yoshioka T, Yamada Y, Fujita Y (1987) Scopolamine production by root cultures of *Duboisia myoporoides*. II. Establishment of a hairy root cultures by infection with *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Plant Physiol.*, 131: 315-323.
- Dougall DK (1980) Nutrition and metabolism. In: Staba EJ (ed), *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*, pp. 21-58, CRC Press, Florida.
- Everett NP, Wang TL, Gould AR, Street HE (1981) Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. II. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Protoplasma*, 106: 15-22.
- Farnsworth NR (1990) The role of ethnopharmacology in drug development. In: *Bioactive Compounds from Plants*, CIBA Foundation Symposium 154, pp. 2-21, John Wiley & Sons, Chichester, New York Brisbane, Toronto, Singapore.
- Fowler MW (1982) Substrate utilisation by plant cell cultures. *J. Chem. Tech. Biotech.*, 32: 338-346.
- Fowler MW (1983) Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture. In: Mantell SH, Smith H (eds), *Plant Biotechnology*, pp. 3-37, Cambridge University Press, Cambridge.
- Fujita J, Hara Y, Suga C (1981) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Uthospermum erythrorhizon*. I. Effects of nitrogen sources on production of shikonin derivatives. *Plant Cell Rep.*, 1: 59-60.
- Furuya T, Kojima H, Syono K (1971) Regulation of nicotine biosynthesis by auxins in tobacco callus tissues. *Phytochemistry*, 10: 1529-1532.
- Gould AR, Everett NP, Wang TL, Street HE (1981) Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. I. Effects of nutrient limitation and nutrient starvation. *Protoplasma*, 106: 1-13.
- Haberlandt G (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzellen. *Sber. Acad.Wiss. Wien*, 111: 69-92.
- Hagimori M, Matsumoto T, Obi Y (1982) Studies on the production of *Digitalis cardenolides* by plant tissue cultures. III. Effects of nutrients on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. Grown in liquid media. *Plant Cell Physiol.*, 23: 1205-1211.
- Hagimori M, Matsumoto T, Mikami Y (1984) Photoautotrophic culture of undifferentiated cells and shoot forming cultures of *Digitalis purpurea* L. *Plant Cell Physiol.*, 23: 1205-1211.
- Hahlbrock K (1977) Regulatory aspects of phenylpropanoid biosynthesis in cell cultures. In: Barz W, Reinhard E, Zenk MH (eds), *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application*, pp. 95-11, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- Hartmann T, Witte L, Oprach F, Toppel G (1986) Reinvestigation of the alkaloid composition of *Atropa belladonna* plants, root cultures, and cell suspension cultures. *Planta Medica*, 52: 390-395.
- Hartmann T, Toppel G (1987) Senecionine N-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry*, 26: 1639-1643.
- Hashimoto T, Yukimura Y, Yamada Y (1983) Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* root cultures. *J. Plant Physiol.*, 124: 61-75.
- Hiraoka N, Tabata M (1974) Alkaloid production by plants regenerated from cultured cells of *Datura innoxia*. *Phytochemistry*, 13: 1671-1675.
- Hirata K, Yamanaka A, Kurano N, Miyamoto K, Miura Y (1987) Production of indol alkaloids in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Agri. Biol. Chem.*, 51: 1311-1317.
- İbrahim RK (1987) Regulation of synthesis of phenolics. In: Constabel F, Vasil IK (eds), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol 4, pp. 77-95, Academic Press, San Diego, New York.
- Janik J, Wright DC, Hagesawa PM (1982) *In vitro* production of cacao seed lipids. *J. Amer. Hort. Soc.*, 107: 919-922.
- Jung G, Tepfer D (1987) Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* roots grown *in vitro*. *Plant Sci.*, 50: 145-151.
- Kadkade P (1982) Growth and podophyllotoxin production in callus tissues of *Podophyllum peltatum*. *Plant Sci. Lett.*, 25: 107-115.
- Kinnersley A, Dougall D (1981) Increase in anthocyanin yield from wild carrot cell cultures by a selection method based on cell-aggregate size. *Planta*, 149: 200-204.
- Knobloch K, Berlin J (1981) Phosphate-mediated regulation of cinnamoyl putrescine biosynthesis in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta Medica*, 42: 167-172.
- Knobloch K, Bast G, Berlin J (1982) Medium-induced and light-induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, 21: 591-594.
- Kokate CK, Radwan SS (1979) Enrichment of *Solanum khasianum* callus generating rootlets with steroidal glycoalkaloids. *Z. Naturforschung*, 34: 634-636.
- Kurz WGW, Constabel F (1991) Plant cell cultures, a potential source of pharmaceuticals. *Adv. Appl. Microbiol.*, 25, 209-240.
- Lindsey K, Yeoman MM (1983) Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. In: Mantell SH, Smith H (eds), *Plant Biotechnology*, pp. 39-66, Cambridge University Press, Cambridge.
- Mantell SH, Smith H (1983) Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue cultures. In: Mantell SH, Smith H (eds), *Plant Biotechnology*, pp. 75-108, Cambridge University Press, Cambridge.

- Miura Y, Hirata K, Kurano N (1987) Isolation of vinblastine in callus culture with differentiated roots of *Catharanthus roseus* (L.). G. Don. Agri. Biol. Chem., 51: 611-614.
- Mizukami H, Konoshima M, Tabata M (1977) Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Uthospermum* callus cultures. Phytochemistry, 16: 1183-1186.
- Mosbach K, Mosbach R (1966) Entrapment of enzymes and microorganisms in synthetic cross-linked polymers and their application in column techniques. Ağa Chem. Scand., 20: 2807-2810.
- Nakagawa K, Konagai A, Fukui H, Tabata M (1984) Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* celi suspension cultures. Plant Celi Rep., 3: 254-257.
- Nakagawa K, Fukui H, Tabata M (1986) Hormonal regulation of berberine production in celi suspension cultures of *Thalictrum minus*. Plant Celi Rep., 5: 69-71.
- Nettleship L, Slaytor M (1974) Adaptation of *Veganum harmala* callus to alkaloid production. J. Exp. Bot, 25: 114-123.
- Noe W, Langerbartels C, Seitz HU (1980) Anthocyanin accumulation and PAL activity in a suspension culture of *Daucus carota* L. Planta, 149: 283-287.
- Noguchi M, Matsumoto T, Hirata Y, Yamamoto K, Katsuyama A, Kato A, Azechi S, Kato K (1977) Improvement of growth rates of plant celi cultures. In: Barz W, Reinhard E, Zenk MH (eds), Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application, pp. 85-94, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Ohta S, Matsui O, Yatazawa M (1978) Culture condidons for nicodn production in tobacco tissue culture. Agri. Biol. Chem, 42: 1245-1251.
- Okazaki M, Hino F, Nagasawa K, Miura Y (1982) Effects of nutritional factors on formation of scopoletin and scopolin in tobacco tissue cultures. Agri. Biol. Chem, 46: 601-607.
- Ozeki Y, Komamine A (1981) Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture. Physiol. Plant, 53: 570-577.
- Phillips R, Henshaw GG (1977) The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase celi cultures of *Acerpseudoplatanus*T. J. Exp. Bot, 28: 785-794.
- Principe PP (1991) Valuing the biodiversity of medicinal plants. In: Akerele O, Heywood V, Synge H (eds), Conservation of Medicinal Plants, pp. 79-124, Cambridge University Press, Cambridge.
- Roja PC, Sipahimalani AT, Heble MR, Chadha MS (1987) Multiple shoot cultures of *Rauwolfia serpentina* \ Growth and alkaloid production. J. Nat. Products, 50: 872-875.
- Rose D, Martin SM (1975) Growth of suspension cultures of plant cells (*Ipomea* sp.) at various temperatures. Can. J. Bot, 53: 315-320.
- Sahai O, Schuler M (1984) Environmental parameters influencing phenolic production by batch cultures of *Nicotiana glauca*. Biotech. Bioengin, 26: 111-120.

- Sakuta M, Takagi T, Komamine A (1986) Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. J. Plant Physiol, 125: 337-343.
- Sakuta M, Komamine A (1987) Celi growth and accumulation of secondary metabolites. In: Constabel F, Vasil IK (eds), Celi Culture and Somatic Celi Genetics of Plants, Vol 4, pp. 97-113, Academic Press, San Diego, New York.
- Sandermann HJ, Diesperger H, Scheel D (1977) Metabolism of xenobiotics by plant celi cultures. In: Barz W, Reinhard E, Zenk MH (eds), Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application, pp. 178-196, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Schopfer P (1977) Phytochrome control of enzymes. Ann. Rev. Plant Physiol, 28: 233-252.
- Scragg AH (1990) Fermentation systems for plant cells. In: Charkwood BV, Rhodes MJC (eds), Secondary Products from Plant Celi Culture, pp. 243-263, Clarendon Press, Oxford.
- Scragg AH (1991a) The immobilization of plant cells. In: Stafford A, Warren G (eds), Plant Celi and Tissue Culture, pp. 205-219, Open University Press, Milton Keynes.
- Scragg AH (1991b) Plant celi bioreactors. In: Stafford A, Warren G (eds), Plant Celi and Tissue Culture, pp. 220-239, Open University Press, Milton Keynes.
- Seidel S, Reinhard E (1987) Majör cardenolide glycosides in embryogenic suspension cultures of *Digitalis lanata*. Planta Medica, 153: 308-309.
- Stafford A (1991) Natural products and metabolites from plants and plant tissue cultures. In: Stafford A, Warren G (eds), Plant Celi and Tissue Culture, pp. 124-162, Open University Press, Milton Keynes.
- Steffens P, Nakakura N, Zenk MH (1985) Purification and characterization of the berberine bridge enzyme from *Berberis beaniana* celi cultures. Phytochemistry, 24: 2577-2583.
- Suzuki H, Matsumoto T, Mikami Y (1984) Effects of nutritional factors on the formation of anthraquinones by *Rubia cordifolia* cells in suspension culture. Agri. Biol. Chem., 45: 1067-1077.
- Tabata M, Yamamoto H, Hiraoka N, Matsumoto Y, Konoshima M (1971) Regulation of nicotin production in tobacco tissue culture by plant growth regulator s. Phytochemistry, 10: 723-729.
- Tabata M, Yamamoto H, Hiraoka N, Konoshima M (1972) Organization and alkaloid production in tissue cultures of *Scopolia pinnatifida*. Phytochemistry, 11: 949-955.
- Tabata M, Mizukami H, Hiraoka N, Konoshima M (1974) Pigment formation in callus cultures of *Urtica dioica*. Phytochemistry, 13: 927-932.
- Tal B, Goldberg I (1982) Growth and diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* cells in batch and continuous cultures. Planta Medica, 44: 107-110.
- Tal B, Gressel J, Goldberg I (1982) The effect of medium constituents on growth and diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* cells grown in batch cultures. Planta Medica, 44: 111-115.
- Tal B, Rokem JS, Goldberg I (1984) Timing of diosgenin appearance in suspension cultures of *Dioscorea deltoidea*. Planta Medica, 50: 239-241.

- Teshima D, Ikeda K, Satake M, Aoyama T, Shimomura K (1988) Production of emetic alkaloid by *in vitro* culture *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. Plant Cell Rep., 6: 466-469.
- Tulecke W, Nickell LG (1959) Production of large amounts of plant tissue by submerged culture. Science, 130: 863-864.
- Tulecke W, Nickell LG (1960) Methods, problems and results of growing plant cells under submerged culture. Trans. New York Acad. Sci., 22: 196-204.
- Veliky LA (1977) Effect of pH on tryptophol formation by cultured *Ipomea* sp. plant cells. Lloydia, 40: 482.
- Violon C, Dekegel D, Vercruysse A (1984) Relation between valeportriate content and differentiation level in various tissues from *Valerianaceae*. J. Nat. Products, 47: 934-940.
- Van Wezel AL (1967) Growth of celi strains and primary cells in homogeneous culture. Nature, 216: 64-65.
- Yamada Y, Hashimoto T, Endo T, Yukimune Y, Kohno J, Hamaguchi N, Drager B (1990) Biochemistry of alkaloid production *in vitro*. In: Charlwood BV, Rhodes MJC (eds), Secondary Products from Plant Celi Culture, pp. 227-242, Clarendon Press, Oxford.
- Yeoman MM, Holden MA, Corchet P, Holden PR, Goy JG, Hobbs MC (1990) Exploitation of disorganized plant cultures for the production of secondary metabolites. In: Charlwood BV, Rhodes MJC (eds), Secondary Products from Plant Celi Culture, pp. 139-166, Clarendon Press, Oxford.
- Yoshikawa T, Furuya T (1985) Morphinan alkaloid production by tissues differentiated from cultured cells of *Papaver somniferum*. Planta Medica, 51: 100-113.
- Zenk M, El-Shagi H, Schulte U (1975) Anthraquinone production by celi suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Planta Medica Suppl., 79-101.
- Zenk M, El-Shagi H, Ulbrich B (1977) Production of rosmarinic acid by celi suspension cultures of *Coleus blumei*. Naturwissenschaften, 64: 585-586.
- Zito SW, Staba EJ (1987) Thebaine from root cultures of *Papaver bracteatum*. Planta Medica, 45: 53-54.

Bölüm 8

Mikroçoğaltım

Sibel Mansuroğlu¹, Ekrem Gürel²

Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Peyzaj Mimarlığı Bölümü, Antalya

²Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 14280 Bolu

*e-posta: smansur@agric.akdeniz.edu.tr**

8.1. Giriş

Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanabilir. Eğer bitkilerin uygun besin maddeleri ihtiyacı, hormon ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Hartman ve Kester, 1975). Bitkilerin *in vitro* üretimi, kullanılan eksplantm özelliğine göre (embriyo, meristem, anter, hücre veya protoplast kültürü vb.) adlandırılır. Ancak çoğunlukla üretimde tek-boğum yöntemi, aksiller dallanma, adventif sürgün ya da tomurcukların rejenerasyonu, kallus, hücre ve pro toplaş dardan bitki rejenerasyonu gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Klonal çoğaltım olarak da bilinen mikroçoğaltım konusundaki ilk çalışma 1902 yılında, tek bir hücreden tekrar tam bir canlının yaratılabileceğini kanıtlamaya çalışan botanikçi Haberlandt tarafından yapılmıştır. Haberlandt, izole ettiği bitki hücrelerini besin ortamına yerleştirmiştir. Besin ortamındaki canlı hücreler hacimlerini 11 kat artırmalarına karşın çoğalamamışlardır. Haberlandt'ı izleyen çalışmalar bu başarısızlığın nedenini hücre bölünmesi, gelişmesi ve farklılaşması için gerekli olan hormonların o yıllarda bilinmeyişiine bağlamışlardır.

1934 yılında White, *in vitro* koşullarda B vitaminlerini içeren maya özü (yeast extract) içerisinde domates köklerini geliştirmeyi başarmıştır. 1939 yılında Fransa'da Nobecourt ve Gautheret, Amerika'da ise White birbirlerinden bağımsız olarak kallus dokusunun sürekli olarak kültür ortamında üretilebileceğini göstermişlerdir (Flartman ve Kes ter, 1975).

Morel ve Martin (1952), dalya, orkide ve patates bitkileri ile yaptıkları çalışmalarla meristemlerin virüs taşımadığını kanıdamışlardır. Bunun ardından, Morel (1960) bir orkide türü olan *Oymbidium*ün meristeminden çok fazla sayıda bitki üretmeyi başarmıştır. Böylece bitkilerin *in vitro* kültür yoluyla üretilebileceği düşüncesi yaygınlaşmış ve diğer bitkilerle de çalışmalar yoğun bir şekilde yapılmaya başlanmıştır. *In vitro* kültür yoluyla yapılan tarımsal üretim, günümüzde sağlıklı karanfil, gerbera, krizantem ve gül gibi süs bitkilerinin aseksüel klonal üretiminde etkin olarak kullanılmaktadır (Waithaka, 1987).

Mikroçoğaltımın genel olarak bitki yetiştiriciliği ve genetiği yönünden önemi ve avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- a. Hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi
- b. Kidesel üretimde aşağıdaki yararların sağlanması:
 - üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerlik (homojenite)
 - alışılagelen yöntemlerden daha kısa kültür süresi
 - zor üretilen türlerin daha kolay üretimi
 - seçilen belirli/üstün genotiplerin hızlı üretimi
 - üretimde daha az anaç kullanılması
- c. Somaklonal varyasyondan dolayı yeni çeşitlerin/genotiplerin elde edilmesi

Yukarda sayılan yararlarına karşın mikroçoğaltım eğitilmiş personel, özel laboratuvar koşulları ve sürekli araştırmaya gereksinim duymaktadır. Bu nedenle, yapılan uygulamaların başarısı ekonomik faktörlerle büyük ölçüde sınırlanmaktadır. Fakat süs bitkileri ile yapılan çalışmalar, kimi zaman geleneksel yöntemlerden daha üstün sonuçlar vermekte (eğreltiler ve *Kalanchoe*'de olduğu gibi) kimi zaman da rekabet edebilecek düzeyde olmaktadır (*Saintpaulia* ve *Streptocarpus*de olduğu gibi). *Gerbera* L.'nın farklı çeşitlerinde *in vitro* ve diğer üretim yöntemleri (vegetatif ve generatif) karşılaştırıldığında, *in vitro* bitkilerin daha fazla sürgün ve daha uzun çiçek sapından dolayı fazla sayıda çiçek üretmesinin yanında 2-4 hafta daha erkenci, ticari anlamda tekdüze ve daha iyi genotipler olduğu ortaya çıkmıştır (Buisman, 1985; Lisecka, 1988; Osiecki, 1988; Nienhuis, 1989).

Doku kültürü ile bitkilerin çoğaltılması pahalı olmasına karşın, iş gücünü azaltan otomasyon ve robotizasyon teknikleri kullanıldığında, kısa sürede fazla sayıda bitki ekonomik olarak elde edilebilmektedir. 1991 yılı verilerine göre dünyada saksılı bitkiler, kesme çiçekler, meyve ağaçları ve geofiderde mikroçoğaltım yöntemleri kullanılarak yaklaşık 600 milyon bitki elde edilmiştir (Werbrout ve Debergh, 1994). Batı Avrupa'da sadece 1988 yılında, 248 adet ticari doku kültürü laboratuvarında yaklaşık 215 milyon adet bitki üretilmiştir. En sık üretilen bitkiler

Ficus, *Syngonium*, *Spathiphyllum*, *Gerbera*, patates ve çilektir. Hollanda, Fransa ve İtalya Batı Avrupa'daki üretimin %62'sini gerçekleştirmektedir (Pierik, 1993).

Mutasyonlar, organ ve somatik embriyo oluşumu, organ ve somatik embriyoların rejenerasyon yeteneklerini kaybetmesi, köklenme problemleri (çalı ve odunsu bitkilerde), toksik bileşiklerin besin ortamında birikmesi, kontaminasyon ve bitkilerin kültür tüplerinden toprağa aktarılmasında karşılaşılan zorluklar, ticari olarak yapılan mikroçoğaltımda ortaya çıkan başlıca sorunlardır. Tüm bunların ortadan kaldırılması ya da en aza indirilmesi için, mikroçoğaltıma geçilmeden önce bu temel sorunların titizlikle değerlendirilmesi gerekmektedir.

8.2. Mikroçoğaltım Aşamaları

Mikroçoğaltım yöntemi ile bitkilerin çoğaltılması için ilk olarak Murashige (1974) tarafından üç aşamalı bir protokol önerilmesine karşın, son dönemdeki gelişmelerle birlikte başarılı bir mikroçoğaltımın beş aşamada gerçekleşebileceği belirtilmektedir (Debergh ve Read, 1993). Bunlar; 1) hazırlık aşaması, 2) kültür başlangıç aşaması, 3) sürgün çoğaltım aşaması, 4) sürgün gelişimi ve köklendirme aşaması, ve 5) dış ortama alıştırma aşamasıdır.

8.2.1. Hazırlık aşaması

Mikroçoğaltımın başarısı eksplantların alındığı anaç bitkinin genotipi, sağlık durumu ve yetiştirme koşulları (beslenme, ışık, sıcaklık, bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulanması, yetiştirme mevsimi) ile doğrudan ilişkilidir. Bu aşama, esas olarak kontaminasyon problemlerinin (özellikle funguslar) en aza indirilmesi amacıyla, anaç bitkilerin hijyenik koşullar altında yetiştirilmesini kapsamaktadır. Fakat endojen (doku içine yerleşmiş) ve eksojen (doku yüzeyinde bulunan) bakteriler ayırt edilemediğinden çoğunlukla bakteriyel kontaminasyonla ilgili sorunlar oluşmaktadır (Debergh ve Read, 1993). Bu nedenle, anaç bitkiler kontrollü koşullara sahip seralarda yetiştirilmeli, damlama sulama ya da ortamın nemlendirilmesi ile sulama yapılmalı, üstten yapılan sulamadan (örnek: yağmurlama) kaçınılmalı, en yüksek sıcaklık 25 °C ve en düşük oransal nem %70 olmalı, saksı toprağı steril edilmiş ortamla değiştirilmeli ve virüslerin ortadan kaldırılması için sıcaklık uygulaması (termoterapi) yapılmalıdır (Werbrouck ve Debergh, 1994; Read, 1988). Sıcaklık uygulamasına tüm virüsler ve bitkiler aynı şekilde tepki vermezler. Termoterapide, maksimum virüs eliminasyonu ile bitki gelişimi arasında bir denge kurulmalıdır. Sıcaklık (36-37 °C) uygulaması gelişmekte olan bitkilere uzun süreli olarak uygulanmakla birlikte kültür ortamına alınmış bitki materyaline de uygulanabilmektedir (Sherwood, 1994).

Sağlıklı anaç bitkilerin mikroçoğaltımında her tür için minimum süre belirlenmelidir. Örneğin, *Cordyline terminalis*, *Dracaena* spp., *Ficus* spp. ve *Araceae*

familyasına ait bazı bitkilerde bu süre üç aydır (Debergh ve Read, 1993). Anaç bitkilerin fizyolojik durumlarını etkileyen faktörlerin en önemlileri ışık, sıcaklık ve hormonlardır (Read, 1988). Tüm yıl boyunca standart eksplantların eldesi için seralardaki fotoperiyot kontrol edilmelidir. Bazı anaç bitkilere uygulanacak uzun ve kısa gün uygulamaları eksplantlar üzerinde etkili olmaktadır. Anaç bitkiler *Begonia tuberhybrida*da 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyodunda ve 18-25 °C sıcaklıkta (Nakano ve ark., 1999), *Ficus lyrata'dü* ise aynı fotoperiyotta fakat 22 °C sıcaklıkta yetiştirildikten sonra kültüre alınmıştır (Jona ve Gribaudo, 1988). Eksplant kaynağı olan bitkinin yetiştirildiği ortamın ışık kalitesi de mikroçoğaltımdaki başarıyı etkilemektedir. Petunya ve açelyalarda anaç bitkilere uygulanan kırmızı ışık, sitokinin üretimini destekleyerek sürgün oluşumunu artırmaktadır (Read, 1988).

Soğan, yumru, rizom ve diğer organlar düşük ya da yüksek sıcaklık yanında dormansiyi kıracak özel bir uygulamaya ihtiyaç duyarlar. Seabrook ve ark. (1976)'na göre, *Narcissus* da 11 °C'de 6-8 hafta soğuk uygulanan soğanlardan alınan sürgün uçları, bu uygulama yapılmayan eksplantlardan-daha iyi ve hızlı gelişmiştir.

Eksplantların rejenerasyonu bir sonraki aşamada (kültür başlangıç aşaması) anaç bitkilere, eksplantın alındığı dokulara ya da direk olarak eksplantların kendisine belirli miktarlarda hormon uygulanmasıyla kontrol edilebilir. *Magnolia soulangeana* dz anaç bitkilerin gövdesinden içeriye BA solüsyonunun enjekte edilmesi, kültür başlangıç aşamasındaki başarıyı artırmıştır (Debergh ve Read, 1993). Diğer taraftan, kültür öncesi sitokinin uygulandıktan sonra sitokininsiz ortamda kültüre alınan petunya yaprak parçaları, sitokinin uygulanmadan optimum sitokinin içeren ortamdakilerle benzer oranda sürgün oluşumu göstermiştir (Read, 1988).

Anaç bitkinin vejetatif gelişme evresinde olması mikroçoğaltımda başarıyı etkileyen etkenlerden bir diğeridir. Yukarda belirtilen çevresel faktörlerin etkileri nedeniyle, yılın belirli dönemlerinde eksplantların kalitesinde değişimler olmaktadır. Bu nedenle kültür için, sürgün gelişiminin hızlı olduğu ve aktif büyümenin bulunduğu dönemler seçilmelidir.

8.2.2. Kültür başlangıç aşaması

8.2.2.1. Eksplant seçimi

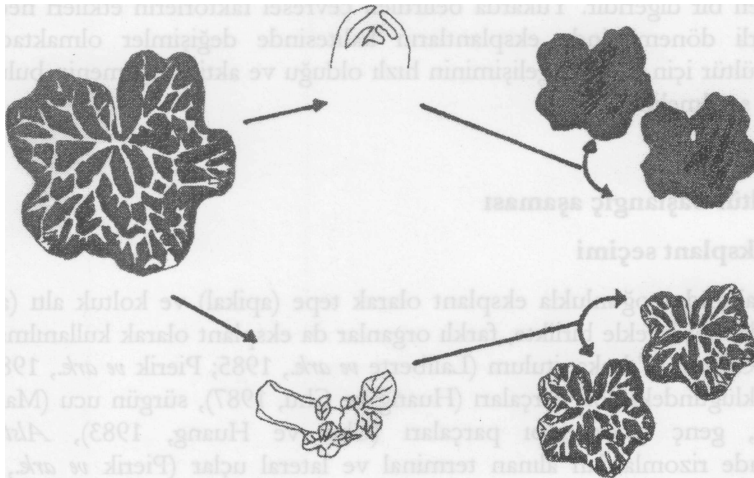
Mikroçoğaltımda çoğunlukla eksplant olarak tepe (apikal) ve koltuk altı (aksiller) tomurcuklar seçilmekle birlikte, farklı organlar da eksplant olarak kullanılmaktadır. Örneğin, *Gerbera* L.'de kapitulum (Laliberte ve ark., 1985; Pierik ve ark., 1980), 2-3 mm büyüklüğündeki kök parçaları (Huang ve Chu, 1987), sürgün ucu (Mariska ve ark., 1991), genç çiçek sapı parçaları (Chu ve Huang, 1983), *Alstroemeria* hibridlerinde rizomlardan alınan terminal ve lateral uçlar (Pierik ve ark., 1988), *Begonia*da yaprak ve gövde eksplantları (Nakano ve ark., 1999), *Saintpaulia ionantha'dü* orta yaşlı yapraklar (Schulze, 1988), *Kalanchoe*'da sürgün uçları (Horn ve ark., 1988), *Oyclamen persicurridü* yaprak, yaprak sapı ve çiçek sapı parçaları

(Schwenkel ve Grunewaldt, 1988) , *Ulium* türlerinde soğan pulları ve yapraklar (Pelkonnen ve Kauppi, 1999) başarıyla kullanılmıştır.

Eksplant seçiminde dikkat edilmesi gereken bazı özellikler aşağıda sıralanmıştır (Werbrouck ve Debergh, (1994):

- Bitkilerin toprak üstü organları toprak altı organlarından, bitki içi parçalar bitki dışındaki parçalardan daha az kontamine dir.
- Eksplant ne kadar küçük ise o kadar az kontaminasyon riski taşımaktadır.
- Eksplantın regenerasyon yeteneği büyüklüğüne ve yaşma bağlıdır.
- Eksplandar gelişme mevsiminin başlangıcında aktif büyüyen sürgünlerden alındığında başarılı sonuçlar elde edilmektedir.
- Anaç bitkinin yetiştirme koşullarındaki ışık ve sıcaklık koşulları, beslenme durumu ve yaşı eksplantın büyüme ve gelişme başarısını etkilemektedir.

Sürgün ucundan alınan eksplant virüsten ari olacak kadar büyük, rejenerasyon yeteneğini yitirmeyecek kadar da küçük olmalıdır. Terminal çelikler ve bütün tomurcuk, 0.5-1 mm'lik sürgün uçlarına nazaran daha yüksek oranda kontamine olmaktadır. Küçük sürgün ucu eksplandar düşük canlılık oranına ve başlangıçta yavaş gelişme özelliğine sahiptir. Buna karşın meristem kültürü, virüslerle kontrol edilen bazı karakterleri yok etmektedir, örneğin *Geranium* cv. *Crocodile*'deki açık damar karakteri gibi (Şekil 8.1). Sterilizasyonda kullanılan maddelerin toksik etkilerine karşı, terminal ucun alt bölgesindeki daha yaşlı segmentler terminal çeliklerden daha az duyarlıdır. Ancak, Miller ve Murashige (1976), *Cordylone termirialis* ve *Dracaena godseffiene*'de lateral tomurcuklar tekrar kültüre alınabilen sürgünler üretmediğinden terminal tomurcukları kullanmışlardır.



Şekil 8.1. Geranyum (cv. Crocodile)'da sürgün-ucu (üste) ve yaprak sapı (altta) kültürü (Bhojwani ve Razdan, 1983).

8.2.2.2. Sterilizasyon

Mikroçoğaltımda kullanılan eksplantlar aseptik koşullara konulmadan önce tam anlamıyla sterilize edilmelidir. Sterilizasyon yöntemleri anaç bitkinin yetiştiği ortamın özelliklerine ve eksplantın alındığı organa göre farklılık göstermektedir. Kullanılacak dezenfektan maddenin cinsi, konsantrasyonu ve uygulama süresi s t eriliz a sy onun başarısını etkilemektedir. Ayrıca bitki dokularının zarar görmemesine dikkat edilmelidir. Sterilizasyon genel olarak 4 aşamalı bir süreçtir:

1. On yıkamada, bitki materyali sadece musluk suyu ile yıkanır ya da gerektiğinde az sabunlu su ile yıkanıp ardından musluk suyu ile durulanır.
2. Etil alkol içerisinde (%70-95) birkaç saniye tutulur.
3. Birkaç damla deterjan, çoğunlukla Tween-20, içeren %7-15'lik NaOCI (sodyum hipoklorit) içerisinde 10-30 dakika bekletilir.
4. En az 3-4 kez steril su ile çalkalanarak durulanır.

Bu işlemlere, eksplantın özelliğine göre ilave uygulamalar yapılabilir ve dezenfektan maddenin konsantrasyonu ile uygulama süresi değiştirilebilir. Son iki aşamanın, steril kabin içerisinde yapılması önemlidir.

iris hollandica soğanları üzerindeki kuru kabuklar ve tam gelişmemiş kökler temizlendikten sonra, boyuna iki parçaya bölünmüş ve ardından %1'lik NaOCI içerisinde 30 dakika bekletilerek üç kez steril su ile çalkalanmış tır (Van der Linde *ve ark.*, 1988). *Alstroemeria* spp. rizomları ise musluk suyu altında toprakları temizlenerek, %70'lik alkolde 2-3 saniye, %1,5'lik NaOCI ve birkaç damla Tween 20'de 20 dakika bekletildikten sonra sırasıyla 5, 10 ve 20 dakikalık sürelerde steril su ile çalkalanmış, eksplantlar alındıktan sonra ise 10 dakika %0,05'lik NaOCl'de bekletilerek ve aynı sürelerde yine üç kez steril su ile çalkalanarak sterilize edilmiştir (Pierik *ve ark.*, 1988).

8.2.2.3. Başlangıç ortamları

Her bitki türü için kullanılan besin ortamları benzer maddeleri içermektedir. Bunlar, inorganik maddeler (makro ve mikro besin elementleri), organik maddeler (myo-inositol, tiamin-HCl, adenin sülfat, pridoksin-HCl, nikotinik asit), bitki büyüme düzenleyicileri (sitokininler, oksinler, gibberellinler) ve diğer (şeker, ağar) maddelerdir. Fakat kültür amacına ve bitki özelliğine bağlı olarak ortam bileşimi ve konsantrasyonlarında değişiklik olabilmektedir (Tablo 8.1).

Çok sayıdaki bitki türünün mikroçoğaltımında 170 mg/1 $\text{NaH}_2\text{P}_4\text{H}_{20}$, 80 mg/1 adenin sülfat dihidrat, 0.4 mg/1 tiamin-HCl, 100 mg/1 myo-inositol ve %3 sakkaroz ile Murashige ve Skoog (MS) inorganik tuzlarını içeren ortam kullanmıştır.

Besin ortamlarının katılaştırılması için kullanılan ağarın özellikleri ile bitki türü ve gelişme süreci arasında bir ilişki bulunmaktadır. Ağar kalitesi tüm kültür süreçlerinde (adventif sürgün ve kök oluşumu) çok etkilidir. Ağardan kaynaklanan sorunların belirtileri kloroz, nekroz ve camlaşma olup, ağar tipi ve miktarının değiştirilmesi ile bu sorunlar ortadan kaldırılabilmektedir (Scholten ve Pierik, 1998).

MS ortamının çoğu bitkiler için hem kültür başlangıcında hem de sürgün çoğaltımında kullanılmasında iyi sonuçlar elde edilmesine karşın, bu ortamdaki tuzların oranı bazı bitkiler için toksik ya da fazla gelebilir. Bu bitkiler ve odunsular için Woody Plant Medium (WPM) ya da Lepoivre ortamı alternatif olabilir (Werbrouck ve Debergh, 1994).

İjoricera perichlymenum L'nin mikroçoğaltımında farklı BA konsantrasyonları içeren MS ve WPM ortamları karşılaştırıldığında, başlangıç eksplantları ve sürgün ucundan alınan boğum çelikleri 0.1 mg/1 BA içeren WPM ortamında sürgün uzunluğu ve boğum sayısı açısından, MS ortamına göre daha iyi sonuçlar vermiştir (Boonnour ve ark., 1988).

Tablo 8.1. Başlangıç ortamlarında kullanılan maddeler (Werbrouck ve Debergh, 1994).

Tuzlar : Murashige ve Skoog (MS)
Woody Plant Medium (WPM)
Lepoivre
Vitaminler : Thiamin-HCl (0.4 mg/1)
Myo-inositol: 100 mg/1
Sakkaroz : %2 (a/h)
Katılaştırma Maddesi : Ağar (%0.6, a/h)
Gelrite (%0.1, a/h)
pH : 5.8
Bitki Büyüme Düzenleyicileri: <i>Sitokininler</i> : 2-ip, BAP, Kinetin, Zea, TDZ (0-10 mg/1), konsantrasyonlar aksiller ya da adventif tomurcuk oluşturma isteğine bağlıdır.
<i>Oksinler</i> : 0-1 mg/1 düzeyinde ve aksiller tomurcuklar için IAA, adventif tomurcuklar için ise NAA veya IBA.
<i>Gibberellinler</i> : 0-1 mg/1 düzeyinde ve filtrasyon ile steril edilmiş GA ₃ , meristem kültüründe gerekli olabilir.

8.2.2.4. Çevresel faktörler

Kültür odasındaki ışık, sıcaklık ve nem bitki türlerinin isteğine bağlı olarak sürekli kontrol altında tutulmaktadır (Tablo 8.2). *Ficus lyrata*'da 1800 lux (22 |LIE nr² s') ve

5600 lux (67 pE nr² s¹) ışık yoğunluklarının çoğalmaya, kırmızı ve beyaz ışığın ise adventif tomurcuk oluşumuna etkilerinde farklılık bulunmamıştır (Jona ve Gribaudo, 1988).

Tablo 8.2. Kültür odasındaki çevre koşulları ve optimal düzeyleri (Werbrouck ve Debergh, 1994'dan değiştirilmiştir).

Sıcaklık : 18-28 °C arasında fakat çoğunlukla 23 °C (gece sıcaklığı 1-2 °C düşük olabilir)

Işık : *Fotoperiyot* Meristem kültürü başladıktan sonraki ilk günler 0 saat ışık (yani 24 saat karanlık) olabilir, diğer durumlarda 16 saattir.

Işık miktarı: Genellikle 30 pE m⁻² s⁻¹

Işık spektrumu | Çoğunlukla beyaz floresan lambalar

8.2.3. Sürgün çoğaltım aşaması

8.2.3.1. Besin ortamları

Genel olarak başlangıç için kullanılan ortamlar çoğaltım aşamasında da kullanılmakla birlikte, bazı durumlarda değişiklik yapılabilmektedir. Bitki dokularından organ farklılaşmasında oksin ve sitokininler önemli rol oynamaktadır. Sitokinin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin/sitokinin oranının yüksek olması kök oluşumunu, oksin ve sitokinin oranlarının eşit olması ise kallus oluşumunu desteklemektedir. BAP çok sık kullanılan ve genellikle olumlu sonuçlar veren bir sitokininidir. Genel olarak 1-2 mg/1 sitokinin çoğu sistemde yeterlidir. Yüksek düzeyler, adventif sürgün oluşumunu artırma eğilimindedir. Thidiazuron (TDZ) düşük konsantrasyonlarda (0.05-1.0 mg/1) etkili olduğu için umut veren bir sitokininidir. IAA ortamda çok az stabü olduğundan, sentetik oksinlerden NAA ve IBA tercih edilmektedir. Bunların sürgün çoğaltım aşamasında kullanılan oranları 0.1-1.0 mg/l'dır. Kakus oluşumunu artırma eğiliminde olan 2,4-D'nin kullanımından ise kaçınılmaktır (Werbrouck ve Debergh, 1994).

8.2.3.2. Kallus oluşumu

Bitkilerin çok hızlı çoğaltılması onların totipotensi (tek hücreden yeni bir birey oluşturma) özeliğine bağlıdır. Kültüre aknan hücrelerden bitkilerin farklılaşması sürgün-kök oluşumu ya da somatik embriyogenesis de meydana gelir. Kakus tan sürgün çoğaltılmasının en hızlı yöntem olmasına karşın bitkilerin klonlanmasında bazı çekinceler içermektedir. Bunun en önemli nedeni hücrelerin stabü olmamasıdır. Örneğin, *Asparagus officinalis* hücre ve kakus kültürleri de çoğaltıldığında poliploid ve aneuploid bitkiler meydana gelmektedir. Oysa ki

tomurcuk kültüründe, tek düze (homojen) bir şekilde diploid bitkiler elde edilir. Kallus evresini içeren sürgün çoğal timinin bir diğer olumsuz yanı ise bir çok tür için uygulanamaz oluşudur. Dokunun başlangıçtaki bitki rejenerasyon kapasitesi zamanla alt kültürlerde azalmakta ve sonunda yok olmaktadır. Tüm bunlara rağmen palmye ve frezya gibi bazı önemli bitkilerin *in vitro* vejetatif üretimi yalnız bu yöntemle yapılmaktadır (Bhojwani ve Razdan, 1983).

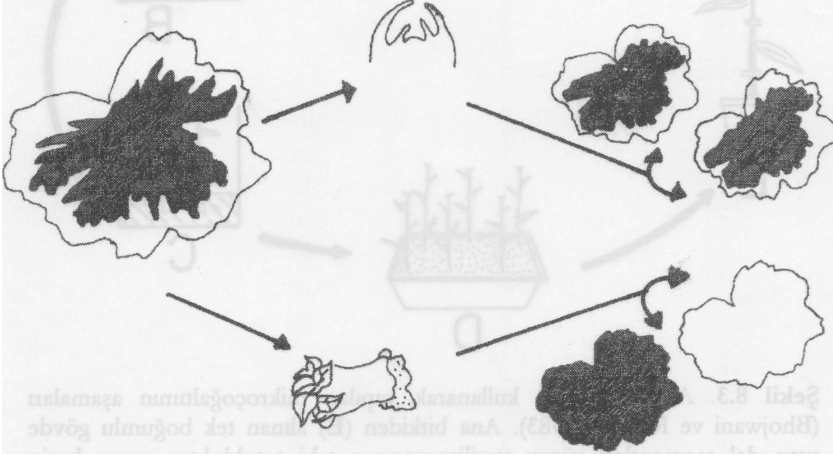
8.2.3.3. Adventif tomurcuk oluşumu

Yaprak koltuk altı (aksiller) ya da sürgün tepelerinin (apikal) dışında herhangi bir yerde oluşan tomurcuklar adventif tomurcuk olarak adlandırılır. Kalkışlardan sürgün farklılaşması da adventif tomurcuk olarak ele alınmasına rağmen, bu tomurcuklar kallus evresine gerek kalmadan doğrudan bir organ ya da organ parçasından da oluşabilmektedir. Bitkilerin bir çoğu değişik organlardan *in vinda* adventif sürgünler oluşturmakta (*Phlox* köklerden, *Alstroemeria* rizomlardan, *Hjdnthus* ve *iris* soğanlardan, *Begonia*, *Velargonium*, *Saintpaulia* ve *Streprocarpus* yapraklardan) ve bu özelliklerinden yararlanılarak vejetatif olarak üretilmektedir. Kültür koşulları altında adventif tomurcuk gelişimi artırılabilir. Örneğin, Takayama ve Misawa (1982) *Begonia x hiemalis*'ın yoğun üretiminde *in vitro* yöntemin, 7 mm x 7 mm'lik bir yaprak segmentinden bir yıl içerisinde 10^{14} 'ün üzerinde bitki üretimine izin verdiğini saptamışlardır. *Chrysanthemum cinerariaefolium* gibi normalde vejetatif olarak çoğal tıkmayan bitkilerin kültürlerinde uygun konsantrasyonlardaki hormon kombinasyonu yaprak ve gövde çeliklerinden adventif tomurcuk oluşumunu desteklemektedir. Monokotiledonlardan *Hjdnthus* ise değişik organlarından (yaprak, soğan gibi) adventif sürgün geliştirme kapasitesine sahiptir (Bach ve Cecot, 1988).

Kallus hücrelerinin sitolojik olarak stabil olduğunu belirten Sheridan (1975), *Hlium longiporum*'un kallus kültürleri aracılığı ile çoğaltılabileceğini açıklamıştır. Fakat bu hücrelerin karyolojik olarak stabilitesinin sürekli olmadığı bilindiğinden, *Hlium* çeşitleri kallus yöntemi ile güvenli çoğaltılamamaktadır. Alternatif olarak soğan pulu segmentlerinin aseptik kültüründen doğrudan adventif soğancık (bulblet) oluştuğu Hackett (1969) tarafından belirtilmiştir. Tüm soğan pulundan 15 gün içerisinde 10 adet soğancık oluşmaktadır. Her soğan pulundan oluşan soğancıkların sayısı pulların küçük parçalarının kültürü ile artırılabilir. Soğanın dış kısmındaki pulların rejenerasyon kapasitesi en üst düzeyde olup, iç kısma doğru bu kapasite azalmaktadır.

Bitki türlerinin klonal üretiminde organlardan doğrudan adventif sürgün oluşumu kallus yönteminden daha iyi sonuçlar vermektedir. Kalluslar sitolojik olarak anormal bitkiler üretirken, adventif tomurcuklar tek düze diploid bireyler oluşturmaktadır. Ancak bu adventif tomurcukların her zaman doğru tip olduğunu göstermemektedir. Adventif tomurcukların gelişimi yoluyla yapılan vejetatif üretimde karşılaşılan en ciddi problem genetik kimelardır. *Geranium*'da Mme

Salleron çeşidinin alacalı yaprakları bir genetik kimeradır. Yaprak sapı parçaları üzerinde doğrudan (kallus aşaması olmaksızın) gelişen adventif tomurcuklardan türeyen bitkiler asla varyasyon göstermemekte, ya albino ya da yeşil olmaktadır. Buna karşın sürgün ucu kültürlerden elde edilen tüm bitkilerde tipik varyasyon görülmektedir (Şekil 8.2) (Bhojwani ve Razdan, 1983).

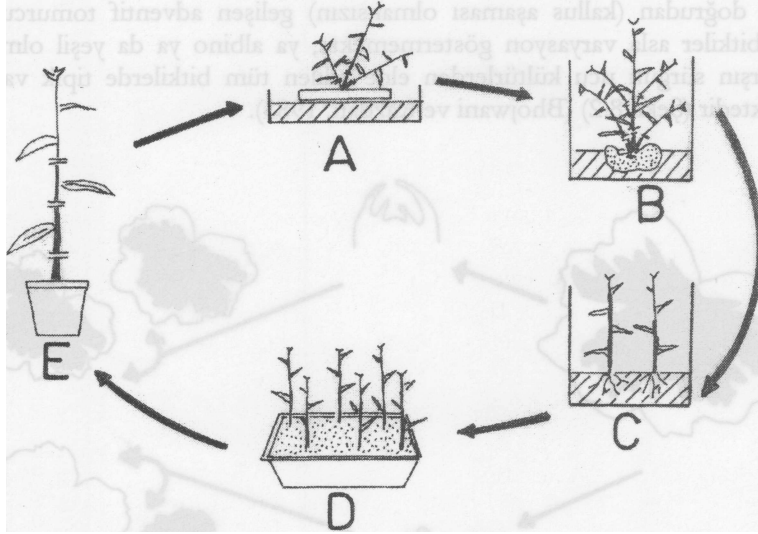


Şekil 8.2. Geranyum (cv. Mme Salleron)'un varyegat yapraklarından alınan sürgün-ucu (üste) ve yaprak sapı (altta) kültürü (Bhojwani ve Razdan, 1983).

8.2.3.4. Aksiller (koltuk altı) tomurcuk oluşumu

Aksiller tomurcuklar genellikle yaprak koltuklarında bulunur ve her tomurcuk bir sürgün geliştirme potansiyeline sahiptir. Doğal olarak bu tomurcuklar bitkilerin gelişme dönemlerine bağlı olarak dinlenme halindedir. Terminal tomurcuğun zarar görmesi ya da ortadan kaldırılması ile aksiller tomurcuk oluşumu desteklenir. Mikroçoğaltımda, aksiller dallanmayla sürgün çoğalmasının artırılması uygun konsantrasyonda ve tipte bir sitokin içeren (oksinli ya da oksinsiz) besin ortamında yapılır. *In vitro* şardarda oluşan sürgünler taze ortamlara aktararak aksiller dallanma ile sürgün çoğalması sürdürülebilir. Böylece bir adet anaç bitkiden, örneğin çilek ve karanfilden, bir yıl içerisinde milyonlarca bitki elde edilebilir (Şekil 8.3) (Bhojwani ve Razdan, 1983).

Aksiller dallanma ile sürgün çoğaltımı yukarıda açıklanan diğer iki yönteme göre başlangıçta daha yavaştır. Fakat her alt kültürde sürgün sayısı logaritmik olarak artarak bir yıl içerisinde astronomik rakamlara ulaşmaktadır. Bu yöntemin klonal çoğaltmada ticari olarak yaygınlaşmasının bir diğer nedeni ise sürgün ucu hücrelerinin çok düze diploid olması ve kültür koşulları altında genotipik değişikliklere çok az yatkın olmasıdır.



Şekil 8.3. Aksiller dallan kullanarak yapılan mikroçoğaltımın aşamaları (Bhojwani ve Razdan, 1983). Ana bitkiden (E) alınan tek boğumlu gövde veya dal segmentleri yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra besin ortamında kültüre alınır. Ortamdaki bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisiyle, aksiller tomurcuklar bir veya birden fazla sürgün (A) meydana getirir. Daha sonra tekli sürgünler ayrılarak taze sürgün çoğaltım ortamına aktarılır ve burada 3-6 hafta içerisinde birçok yeni sürgün elde edilir (B). Yeterli sayıda sürgün elde edildikten sonra bunların bir kısmı ile çoğaltım işlemi devam ettirilirken diğer bir kısmı köklendirme ortamına aktarılır (C). Yeterli bir kök sistemi geliştikten sonra, bitkiler iyi drene olan saksı toprağına aktarılır (D) ve ilk 10-15 gün boyunca yüksek nem altında tutulur.

8.2.4. Sürgün gelişimi ve köklendirme aşaması

Adventif ve aksiller sürgün gelişimi ortamlarında sitokininin varlığı köklenmeyi engellemektedir. Tam bir bitki oluşturmak için sürgünler, sürgün oluşturma ortamından farklı bir hormonal kompozisyona sahip olan yeni bir ortama aktarılmaktadır. Sürgünler belirli bir uzunluğa eriştikten sonra köklenmeleri amacıyla köklenme ortamına alınır. *Gerbera jamesonii* Bolus.'da sürgün ucu örnekleri, 5.0 mg/1 kinetin ve 0.5 mg/1 IAA içeren standart MS ortamında en yüksek sürgün oluşumunu, kinetin bulunmayan 0.1 mg/1 IAA içeren aynı ortamda ise en yüksek köklenme oranını vermektedir (Mariska ve ark., 1991).

İn vitro şartlarda çoğaltılan bitki sürgünlerinin bazdan *in vitro*'a bazdan da *in vivo*'da iyi sonuçlar vermekte, bazı durumlarda ise her iki koşulda da eşit sonuçlar elde edilmektedir. Bazı bitkilerde ise sürgünlere standart köklenme tozları ya da toz IBA

uygulandıktan sonra toprağa dikilerek köklendirilebilmektedir. KYTE ve Briggs (1979)'e göre *Khododenrodun in vitro*da geliştirilen sürgünleri, *in vivo* ve *in vitro* şardarda yapılan köklendirmede benzer sonuçlar vermektedir. Feijoa sürgünleri ise, *in vivo* şartlarda *in vitro* şardara göre daha iyi köklenmektedir. Krizantem sürgünleri ise mikrobiyal enfeksiyonlar nedeniyle *in vivo* şardardaki köklendirmede başarısız sonuçlar vermektedir.

In vitro köklendirmede uygulanan bir diğer yöntem ise sürgünlerin taze ortama aktarılmaı, sıvı besin ortamının mevcut kültürler üzerine dökülmesidir (çift tabaka tekniğı - double layer technique). Türlerin çoğunda köklenmenin desteklenmesi için NAA ya da IBA (0.1-1 mg/l)'ya gereksinim duyulur. Makro ve mikro tuzların konsantrasyonu ve uygulama zamanı bu yöntemin başarısını belirler. Çoğunlukla Knop ortamı gibi düşük tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyulur. Sıvı ortama aktif karbon eklenerek sitokinin artıklarının etkileri adsorbe edilir. Yüksek şeker konsantrasyonları (%3-4) köklenmeyi ve bitkilerin kalitesini artırır. Sürgün büyümesi ve kök oluşumu tek bir sıvı ortamda başarılabılır. Tablo 8.3'de *Cordyline fruticosa* çeşitleri için kültür başlangıç (2.), sürgün çoğal tım (3.), sürgün gelişimi ve köklendirme (4.) aşamalarına ait ortam içeriğı ve kültür koşulları verilmiştir (Werbrouck ve Debergh, 1994).

Ticari olarak üretim yapan doku kültürü laboratuvarlarının bir çoğunda yoğun iş gücü gereksinimi ve pahalı olması nedeniyle mikro çelikler *in vitro*da köklendirilmemektedir. *In vitro* köklendirme süreci toplam mikroçoğaltım masraflarının %35-75'ini oluşturmaktadır. Ancak bazı türlerin dış ortamda köklendirilmesinde kayıplar arttığından, bu türlerin *in vitro*da köklendirildikten sonra dış ortama aktarılması daha ekonomik olmaktadır (Preece ve Sutter, 1993). (Şekil 8.4).

8.2.5. Dış ortama alıştırma (aklimatizasyon) aşaması

Steril koşullarda, düşük ışık yoğunluğunda, yüksek nem içeren ve tüm besin maddelerinin bulunduğu bir ortamda geliştirilen bitkilerin, daha düşük nem, daha yüksek ışık düzeyi ve steril olmayan koşullara sahip dış ortama aktarılması çok dikkat isteyen bir işlem olup, bunun aşamalı olarak yapılması gerekmektedir (Preece ve Sutter, 1993). Alıştırma işlemi bitkiler *in vitro*da iken, üstten soğutma ile kültür kaplarının üzerindeki nemin azaltılması ile başlatılabilir. Besin ortamından çıkarılmadan önce bitkiler serada kültür kapları içerisinde tutulabilir. Kapların ağzı açık olarak bir haftadan fazla kalmadıkça ortamın kontaminasyonu sorun yaratmamaktadır (Sherwood, 1994).

*In vitro*da gelişen bitkiciklerin anatomik ve fizyolojik durumlarından dolayı dış ortama aktarıldıktan sonraki birkaç gün içerisinde yüksek nem içeren bir ortamda tutulmaları hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle ticari üretim yapan büyük işletmeler otomatik çiselemeninin yerine, daha pahalı olmasına rağmen şişlemeyi

kullanılmaktadırlar. Çünkü çiseleme bazı mantar ve bakteriler ile alglerin gelişimi için uygun ortam yaratmaktadır. Bitkiciklerin su kaybını azaltmak için uygulanan diğer yöntemler ise nemlendirici (humidifier) kullanımı ve su buharını tutacak kapalı mekanlara yerleştirmedir.

Tablo 8.3. *Cordyline fruticosa* çeşitleri için kültür başlangıç, sürgün çoğaltım, sürgün gelişimi ve köklendirme aşamalarına ait ortam içeriği ve kültür koşulları (Werbrouck ve Debergh, 1994).

AŞAMALAR	2	3	4a	4b
Amaç	başlangıç	çoğaltma	büyütme	köklendirme
Süre (hafta)	5-8	6	6	1
Işık^a (j/E m² s⁴)	30	30	30 (3 hafta) 100 (3 hafta)	100
Kültür kabı	tüp	Tüp	tüp	tüp
Ortam miktarı (ml)	20	100	+20 ^b	+20 ^b
Ortam içeriği:				
- makro elementler	MS	MS	MS	%10 MS
- mikro elementler	NN ^c	NN ^c	NN ^c	NN ^c
- NaFeEDTA (mg/1)	33	33	33	33
- tiamin-HCl (mg/1)	0.4	0.4	0.4	0.4
- inositol (mg/1)	100	100	100	100
- adenin sülfat (mg/1)	80	80	80	80
- NaH ₂ P0 ₄ (mg/1)	170	170	170	170
- sakkaroz (%)	2	2	4	2
- agar (%)	0.6	0.6	0	0
- NOA ^d (mg/1)	0.1	0.1	0	0
- IBA (mg/1)	0	0	0	0.5
- kinetin (mg/1)	1-10	1-10	0.25	0

^a Beyaz renkli ve serin floresan ışık (16 saat ışık / 8 saat karanlık)

^b Çift tabakalı uygulama (double layer application)

^c Debergh ve Maene (1983)

^d Naftoksi asetik asit

Dış ortama alıştırma sırasındaki su kaybını azaltmak için kullanılan antitranspirantların (bitkilerde su buharı kaybını, yani transpirasyonu, engelleyen bileşikler) transpirasyonu azaltılmasının yanında fitotoksik etkilere sahip olması bazı sorunlara da yol açmaktadır. Hastalıklara neden olan mikroorganizmalar için uygun bir ortam sağlamasından dolayı, agarlı besin ortamı iyice yıkanarak tamamen bitkilerden uzaklaştırılmalıdır. Sürgünler *in vitro**da köklenmiş ise yaralanma riskini azaltmak için aktarma işi dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. Kökler yeni oluşmaya başladığından sürgünlere çelik muamelesi yapılarak doğrudan dikilmelidir. Kökler henüz oluşmamış ise dikim öncesi köklenmeyi destekleyen toz ya da solüsyona daldırmak etkili olabilir.

Proiiferasyon Gösteren Kültürler

I

Mikrosürgünlerin Hasadı
(uzunlukları önemli olabilir)

İn Vitro

i

In Vitro da Uygun Bir Köklendirme
Ortamına Yerleştirme

Yeterli Köklenme Oluncaya
Kadar Beklemek

Ex Vitro

i

Köklendirici Bileşiklerin
Uygulanması

- A. 3-7 gün *in vitro* a karanlıkta
B. Sıvı ya da toz bileşiklere kısa süreli daldırma
C. Tüm türlere uygulama gerekemeyebilir

Kültür Kaplarının
Kapaklarının
Aralanması

Köklenen Mikro
Sürgünlerin Kültürden
Çıkarılması

Köklerdeki Ağarların
Fungusit Solüsyonu veya
Ilık Suda Temizlenmesi

Uygun Bir Serada
"► Köklenme Ortamı veya
Küçük Kaplara Yerleştirme

Koşullar:

1. Yüksek Nısbı Nem (Sis, lüksek nem daları, mist)
2. Gölge (Mevsimlere göre değişir)
3. Fotoperiyodun Ayarlanması (Mevsimlere ve türlere göre değişir)
4. Altan Isıtma

1

Yem Yapraklar Oluşurken:

1. Altan Isıtmanın Kapatılması
2. Nısbı Nemin Kademeli Olarak Seradaki Düzeye Düşürülmesi

Kademeli Olarak Şiddetli Işığa Maruz Bırakma

Normal Sera Koşullarına Yerleştirme

Gölge Koşullarında Dış Ortama Aktarma
(Seradaki türlere bağlı olarak tercih edilebilir)

Tam Güneş Işığı Altına Yerleştirme

Şekil 8.4. Mikroçoğaltımla elde edilen bitkiciklerin köklendirilme si ve dış ortama alıştınması (Preece ve Sutter, 1993).

Bitkilerin dış ortama aktarılmasında dikkat edilmesi gereken en önemli gereksinim yüksek nemdir (%90-100). Bu nedenle ilk 10-15 gün bitkiler temiz plastik ile kaplanmalı ya da çisdenmelidir. Ardından, aşamalı olarak plastiklerde küçük delikler açılarak hava sirkülasyonu sağlanmalı, daha sonra ise seralardaki özel alanlara taşınan bitkiler birkaç gün gölge altında tutulmalıdır. Yaklaşık 4-6 hafta süren bu çalışmalardan sonra bitkiler normal sera koşullarında yetiştirilmeye hazır duruma gelmektedir (Preece ve Sutter, 1993).

8.3. Mikroçoğaltımda Karşılaşılan Sorunlar

8.3.1. Vitrifikasyon

Elde edilen sürgünlerin sayısının artırılması için alt kültürler yapılmaktadır. Her bitki türü için kabul edilebilir bir alt kültür sayısı vardır. Alt kültürlerin sayısına ya da kültür süresine bağlı olarak eksplant özelliğini kaybeder. Vitrifikasyon (camlaşma), bu aşamada karşılaşılan en önemli fizyolojik sorunlardan birisidir. Besin ortamındaki oksin, sitokinin, mineral madde, şeker ve ağar miktarı vitrifikasyonun nedenlerini oluşturmaktadır (Hempel, 1985). Dokuların ölmesi ve vitrifikasyon, ağar tipi ile ilişkili genel bir sorundur. Ağarın etkileri (jelleşme gücü, mineral kompozisyonu, mineral içeriği, inhibitör bileşikler) ile ilgili değişik görüşler bulunmaktadır. Bunların dışında kültürde kullanılan ağarların özellikleri ile rejenerasyon süreçleri arasında interaksiyonlar bulunmaktadır. Ağarın kalitesi adventif sürgün ve kök rejenerasyonunun tüm süreçlerinde etkili olabilmektedir (Scholten ve Pierik, 1998). Pasqualetto (1992) ise vitrifikasyonun bazı morfolojik (hücrenin aşırı su alması, hücre duvarının yıkılması, klorofil eksikliği, yaprak yapısı ve besin kompozisyonu) ve ekolojik (ağarın niteliği ve konsantrasyonu, BAP konsantrasyonu, ortamdaki K ve Mg bileşikleri ve kültür kabı içerisindeki atmosferin durumu) etmenlere bağlı olduğunu bildirmiştir.

8.3.2. Toksik bileşiklerin ortamda birikmesi ve kararma

Mekanik yaralanma gibi stres durumları ortaya çıktığında, bitki dokularında fenolik bileşiklerin metabolizması uyarılmaktadır. Eksplantların kesim yüzeyinden çıkan fenolik bileşiklerin oksidasyonu bazı bitki türlerinin kültüründe ciddi bir sorundur. Bu durum besin ortamının kararmasına ve dokularda toksik etkiye yol açarak, eksplantların gelişme ile farklılaşma yeteneklerini ciddi olarak sınırlandırmaktadır. Kararma sorunu daha çok odunsu türlerden alınan olgun dokularda yaygındır. Bu toksik bileşiklerin bitkiler tarafından engellenmesi oldukça zordur. George ve Sherrington (1984)'a göre ortam ve dokuların kararmasını engellemek için alınması gereken önlemler şunlardır; i) fenolik bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması (aktif karbon veya polivinilpiroliden, PVP, gibi fenolik adsorbantlar aracılığı ile), ii)

redoks potansiyelinin azaltılması ve iii) fenolaz enziminin inaktive edilmesi (Debergh ve Read, 1993).

Askorbik asit ve sitrik asit gibi fenolik oksidasyonu engelleyici antioksidanların kullanımı, karanlıkta kültür ve sıvı ortam gibi uygulamalar, toksik bileşiklerin ortadan kaldırılmasında genellikle başarılı olmamaktadır. Besin ortamındaki toksik bileşikler yok etmenin en etkin ve kolay yolu aktif karbon kullanmaktır. Ancak aktif karbon toksik bileşiklerle birlikte ortamdaki oksin ve sitokin gibi organik bileşikler ile diğer bir çok bileşiği de adsorbe etmektedir. Bir çok açıdan PVP toksik bileşiklerin adsorbsiyonunda başarılı sonuçlar vermektedir (Pierik, 1988). Bu tür problemlerin ortaya çıktığı türlerin mikroçoğaltımında besin ortamını tamponlayıcı (pH) maddelerin kullanımı (örnek: 1 g/1 MES) da yardımcı olabilir.

8.3.3 Kontaminasyon

Doku kültüründe kontaminasyon, ekplantların dokularında ya da yüzeylerinde bulunan organizmalar ve laboratuvar koşullarındaki hatalardan kaynaklanmaktadır. Bitki yüzeyleri mikroorganizmaların doğal yaşam alanlarıdır. Bunlar bazı doğal olaylar, yaralanmalar gibi nedenlerle bitki dokularından içeriye girer ve yerleşirler. Böylece bitkilerde, hücre içi ve hücreler arasında virüsler, viroidler, prokaryotlar ve mantarlardan oluşan bir flora gelişir. Doku kültürlerinde kullanılan eksplanta bağlı olarak mikroorganizmalar kültür içerisine taşınır. Meristem kültüründe kullanılan eksplantın büyüklüğüne bağlı olarak bir çok organizma ortadan kaldırılabilirken, yaprak, yaprak sapı ve gövdelerden alınan ekplantlarda mikroorganizmalar dokulardan uzaklaştırılamazlar. Bu gibi durumlarda eksplandadaki mikrobiyal kontaminasyon, hazırlık aşamasında bitki materyalinden yüzeysel dokuların çıkarılması ile azaltılabilmektedir (Cassels, 1993).

Mikroçoğaltım tek başına hastalıklardan arındırılmış bitki üretimini garanti etmemektedir. Bunun için fungal, bakteriyel, viral ve subviral patojenlerin belirlenmesi amacıyla karmaşık ve hassas teknikler kullanılmalıdır. Belirlenen bu patojenler, meristem kültürü ile birlikte yapılan termo ve kemoterapi ile ortadan kaldırabilmektedir. Mikroçoğaltımda virüslerin belirlenmesinde, geleneksel yöntemlere göre hızlılık, standardizasyon, hassasiyet ve otomasyon sağlayan ELISA testi rutin olarak kullanılmaktadır. Ticari olarak önemli süs bitkilerinin kültüründe viroidler PAGE yöntemi ile, fungus ve bakteriler spesifik besin ortamında kültüre alınmak suretiyle, mikoplazma benzeri organizmalar ise çok ince doku kesitleri (ultra thin sectioning), floresan ışık mikroskobu, elektron mikroskobu ve tetrasiklen testieri gibi yöntemler ile belirlenebilmektedir. Kültüre alınan eksplandarda belirlenen patojenlerin ortadan kaldırılması için meristem kültürü kullanılmaktadır. Bunun nedenleri; meristemlerin virüs ve bakterilerden daha hızlı çoğalması ve bu patojenlerin kendilerini inaktive edecek bazı metabolitlerin konsantrasyonunu artırmasıdır (Prakash, 1988).

8.4. Bazı Süs Bitkileri için Mikroçoğaltım Yöntemleri

Bitki Adı: *Astrocnemia* spp. (Pierik *ve ark.*, 1988)

Eksplant: Apikal ve aksiller rizom uçları

Sterilizasyon Yöntemi: Musluk suyu altında toprakların temizlenmesi, %70'lik alkolde 2-3 sn, %1,5'lik NaOCl ve birkaç damla Tween 20'de 20 dk, steril su ile 5, 10 ve 20 dk'lık sürelerde çalkalama, eksplantlar alındıktan sonra 10 dk. %0,05'lik NaOCl'de bekletme ve yine üç kez steril su ile çalkalama

Besin Ortamları ve Hormonlar : MS (1962) tam doz makro ve mikro elementleri (Fe dışında), 25 mg/1 NaFeEDTA, %3 sakkaroz, 2-4 mg/1 BA, 0,4 mg/1 B₁ vitamini, %0,7 agar ve disid su (pH 6.0), köklenme için 0,5 mg/1 NAA eklenerek BA çıkarılır

Kültür Koşulları: Kültürler başlangıçta 21 °C'de, 8 saat floresan ışık ve 16 saat karanlık, köklenme sırasında 21 °C'de, 16 saat floresan ışık altında ve 8 saat karanlık

Bitki Adı: *iris hollandica* Tub. (Van der Linde ve Klerk, 1988)

Eksplant: Soğan pulları

Sterilizasyon Yöntemi: Soğanlar üzerindeki kuru kabuklar ve tam gelişmemiş kökler temizlendikten sonra soğanlar boyuna iki parçaya bölünür. Bu yarım soğanların yüzey sterilizasyonu %1'lik NaOCl içinde 30 dk bekletildikten sonra üç kez steril su ile çalkalanarak yapılır.

Besin Ortamları ve Hormonlar : MS (1962) yarım doz makro ve mikro, 0,4 mg/1 thiamine, 100 mg/1 myo-inositol, 30 g/1 sakkaroz, 10 g/1 agar, (pH 6.0), köklenme için 0,5 mg/1 NAA eklenerek BA çıkarılır.

Kültür Koşulları: Eksplantlar 20 °C'de, karanlıkta kültüre alınır.

Kaynaklar

- Bach A, Cecot A (1988) Micropropagation of *Hyacinthus orientalis* cv. Carnegie in a double-phase culture medium. I. Effect of cytokinins on growth and development. *Açta Hort*, 226 (2): 607-611.
- Bhojwani SS, Razdan MK (1983) Plant Tissue Culture: Theory and Pratic. Amsterdam, Elsevier.
- Boonnour K, Wainwright H, Hicks RGT (1988) The micropropagation of *Lonicera perichlymentum* F. (Honeysuckle). *Açta Hort.*, 226 (1): 183-190.
- Buisman J (1985) Interim results of a trial with Gerberas. The c.v. Appel-bloesem from tissue culture a better yield. *Hort. Abst.*, 55 (5): 372.
- Cassels AC (1993) Problems in tissue culture: Culture contamination. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds), *Micropropagation - Technology and Application.*, pp. 15-31, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Hollanda.
- Chu CY, Huang MC (1983) *In vitro* formation of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) plantlets through excised scape culture. *Hort. Abst.*, 53 (11): 779. .
- Debergh PC, Read PE (1993) Micropropagation. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds), *Micropropagation - Technology and Application.*, pp. 1-15, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Hollanda.
- George EF, Scherrington PD (1984) Plant Propagation by Tissue Culture, Exegetics Ltd, Basingstoke.
- Hackett WP (1969) Control of bulblet formation on bulb scale of *Ullium longiflorum*. *HortScience*, 4: 171.
- Hartman HT, Kester DE (1975) Plant propagation - Principles and Practices. Prentice-Hall. Inc., New Jersey.
- Hempel M (1985). The influence of micropropagation on progeny plants. *Açta Hort.*, 226 (2): 615-630.
- Horn W, Schlegel G, Hauft B (1988) *In vitro* stock plant culture of Kalanchoe hybrids. *Açta Hort*, 226 (2): 627-631.
- Huang MC, Chu CY (1987) A scheme for commercial multiplication of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) through shoot tip culture. *Hort. Abst*, 57 (5): 374.
- Jona R, Gribaudo I (1988) Environmental factors affecting *in vitro* propagation of *Ficus lyrata*. *Açta Hort*, 226 (1): 59-64.
- Kyte L, Briggs B (1979) A simplified entry into tissue culture production. *Proc. Int. Plant Prop. Soc*, 29: 90-95.
- Laliberte S, Chretien L, Vieth J (1985) *In vitro* plantlet production from young capitulum explant of *Gerberajamesonii*. *Hortscience*, 20 (1): 137-139.
- Lisiecka A (1988) The influence of vegetative propagation methods on the flower yield of gerbera. *Açta Hort*, 226 (2): 717-720.

- Mariska I, Gati E, Sukmadjaja D (1991) *In vitro* clonal propagation of gerbera. Plant Breed. Abst, 61 (4): 499.
- Miller LR, Murashige T (1976) Tissue culture propagation of tropical foliage plants. In Vitro, 12: 797-813.
- Morel G, Martin C (1952) Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. C.R. Acad. Sci. Paris, 253: 1324-1325.
- Morel G (1960) Producing virus-free cymbidium. Am. Orchid. Soc. Bull., 29: 495-497.
- Murashige T (1974) Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol., 25: 135-166.
- Nienhuis B (1989) Pot gerberas. Ağa Hort., 252: 201-204.
- Nakano M, Niimi Y, Kobayashi D, Watanabe A (1999) Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous begonia (*Begonia* × *tuberhybrida* Noss). Sci. Hort., 79 (3-4): 245-251
- Osiecki M (1988) Effect of propagation method on the greenhouse performance of gerbera cultivars (*Gerbera jamesonii*). Ağa Hort., 226 (2): 499-502
- Pasqualetto PL (1992) Vitrication in plant tissue culture. Plant Breed. Abst., 62 (5): 477.
- Pelkonen VP, Kauppi A (1999) The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis. Int. J. Plant Sci., 160 (3): 483-490.
- Pierik RLM, Steegmans HHM, Wouters AN, Verhagegh J (1980) New developments in the vegetative propagation of gerberas in test tubes. Hort. Abst., 50 (1): 43.
- Pierik RLM (1988) *In vitro* culture of higher plants as a tool in propagation of horticultural crops. Ağa Hort., 226 (1): 25-41.
- Pierik RLM, Voorst A, Booy G, Acker CAM, Lelivelt CLC, Wit JC (1988) Vegetative propagation of *Alstroemeria* hybrids *in vitro*. Ağa Hort., 226 (1): 81-91.
- Pierik RLM (1993) Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds), Micropropagation Technology and Application, pp. 155-167, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Prakash J (1988) Plant health a useful service for large scale propagation of ornamental plants through micropropagation. Ağa Hort., 226 (1): 115-120.
- Preece JE, Sutter EG (1993) Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds), Micropropagation Technology and Application, pp. 71-95, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Read PE (1988) Stock plants influence micropropagation success. Ağa Hort., 226 (1): 41-53.
- Seabrook JEA, Cumming BG, Dionne LA (1976) The *in vitro* induction of adventitious shoot and root apices on *Narcissus* (daffodil and narcissus) cultivar tissue. Can. J. Bot., 54: 814-819.

- Scholten HJ, Pierik RLM (1998) Ağar as a gelling agent: Differential biological effects *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 77 (1-2): 109-116.
- Scheridan WF (1975) Plant regeneration and chromosome stability in tissue cultures. In: Ledoux L (ed), *Genetic Manipulations with Plant Material*, pp. 263-295, Plenum Press, New York.
- Sherwood JL (1994) Applied aspects of plant regeneration (Virus-free plants). In: Dixon RA, Gonzales RA (eds), *Plant Cell Culture - A Practical Approach*, pp. 135-138, Oxford Uni. Press., New York.
- Schulze D (1988) *Saintpaulia ionantha* H.Wendl. *In vitro* propagation and acclimatization in a commercial laboratory. *Açta Hort.*, 226 (2): 619-623.
- Schwenkel HG, Grunewaldt J (1988) *In vitro* propagation of *Cyclamen persicum* Mili. *Açta Hort*, 226 (2): 659-663.
- Takayama S, Misawa M (1982) Factors affecting differentiation and growth *in vitro* and mass-propagation scheme for *Begonia x hiemalis*. *Sci. Hort*, 16: 65-75.
- Van der Linde PCG, de Klerk GM (1988) *In vitro* propagation *iris hollandica* Tub. cv. Prof. Blaauw. I. regeneration on bulb-scale explants. *Açta Hort*, 226 (1): 121-129.
- Waithaka K (1987) Application of plant tissue culture in horticultural production. *Açta Hort*, 218 : 131-139.
- Werbrouck SPO, Debergh PC (1994) Applied aspects of plant regeneration (micropropagation). In: Dixon RA, Gonzales RA (eds), *Plant Cell Culture - A Practical Approach*, pp. 127-135, Oxford Uni. Press, New York.

Bölüm 9

Germplazm Muhafazası

H. Yavuz Emeklier

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Dışkapı, Ankara
e-posta: emeklier@agri.ankara.edu.tr

9.1. Giriş

Tarımın başlangıcından beri, tohumların ya da bitkisel materyalin (çelik, yumru, soğan) korunması veya saklanması yaygın bir uygulama olmuştur. Kültürü yapılan bitkinin geliştirilebilmesi için çeşitli kaynakların ve tohumların elde bulundurulması veya muhafazası son yıllarda gıda güvenliği bakımından da önem kazanmıştır. Çünkü bazı çeşiderin üretim alanlarında monokültür olarak artışı ve hızla çoğalmasından dolayı, kültürü yapılan bazı bitki türleri, onların yabani akrabaları ve köy çeşideri kaybolma tehlikesi (genetik erozyon) ile yüz yüzedir. Bu yüzden uzun yıllar tohumların canlılıklarını ve genetik yapılarını bozmadan muhafaza edilmeleri (germplazm muhafazası) her zaman önemli olmuştur.

Muhafaza şekilleri çeşitli yöntemlere sahiptir. Bunlar muhafaza etme ve kullanım amacına uygun olarak; muhafaza yerine, bitki çeşidine, materyalin yapısına ve genetik kompozisyonuna (saf hat, karışık hat, popülasyon vs.) uyan en geçerli yöntem olarak seçilirler. Örneğin tohumların, vejetatif organların ve bitki dokularının muhafazası farklı olmaktadır. Çeşitli bitki gen kaynaklarının başlıca muhafaza yöntemleri Tablo 9.1'de verilmiştir.

9.2. Bitki Kùltürlerinin *in Vitro* Muhafazası

Yüksek verimli bitkilerin ve değerli bitki materyalinin muhafazası, bunların arzu edilen bitkisel özellikleriyle ve sürekli *in vitro* üretimleriyle yakından ilişkilidir. Stok kùltürler aşağı yukarı optimal koşullarda sürekli altkùltür yapılarak uzun süre muhafaza edilebilmektedir. Ancak, büyüme ortamının değıştirilmesi ile (büyümenin hızlandırılması ya da yavaşlatılması suretiyle) yapılan altkùltür çalışmalarında, ortam değıştirme aralıklarının uzatılması bazı riskler taşımaktadır. Bunlardan önemli olanlar şunlardır:

- 1) Somaklonal varyasyonların (kimera gibi) ortaya çıkması,
- 2) Tüm ebeveyn kùltürünün mikroorganizmalar tarafından toplu istilası,
- 3) Altkùltür süresince verimliliğin azalması.

Germplazm muhafazasında bugün iki temel yöntem uygulanmaktadır:

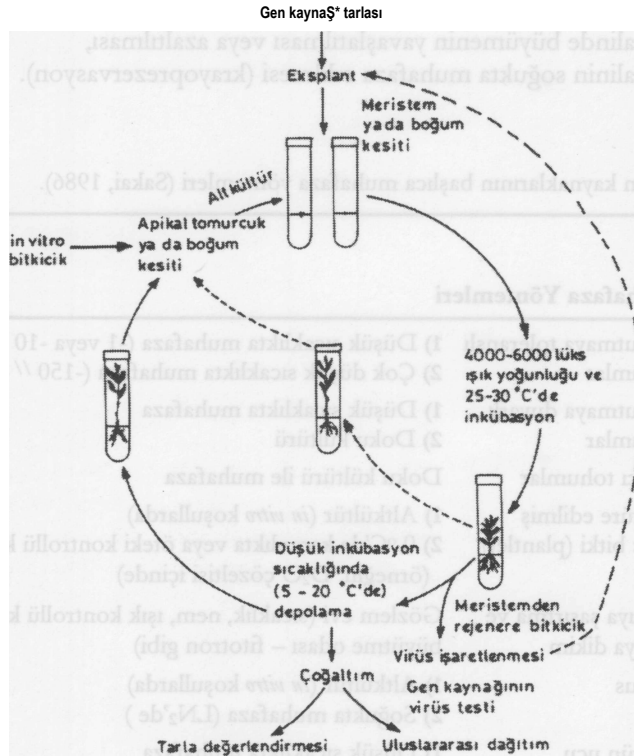
- 1) Bitki materyalinde büyümenin yavaşlatılması veya azaltılması,
- 2) Bitki materyalinin soğukta muhafaza edilmesi (kryoprezervasyon).

Tablo 9.1. Bitki gen kaynaklarının başlıca muhafaza yöntemleri (Sakai, 1986).

Muhafaza Edilen Materyal Muhafaza Yöntemleri		
<i>Tohum</i>	Kurutmaya toleranslı tohumlar	1) Düşük sıcaklıkta muhafaza (-1 veya -10 °C) 2) Çok düşük sıcaklıkta muhafaza (-150 " -196 °C)
	Kurutmaya duyarlı tohumlar	1) Düşük sıcaklıkta muhafaza 2) Doku kùltürü
	İnatçı tohumlar	Doku kùltürü ile muhafaza
<i>Bitki</i>	Kùltüre edilmiş genç bitki (plantlet)	1) Altkùltür (<i>in vitro</i> koşullarda) 2) 0 °C'de karanlıkta veya öteki kontrollü koşullarda (örneğin: D ₂ O çözeltisi içinde)
	Saksıya şaşırtma ve tarlaya dikim	Gözlem evi (sıcaklık, nem, ışık kontrollü koşullarda, büyütme odası — fitotron gibi)
<i>Organ</i>	Kallus	1) Altkùltür (<i>in vitro</i> koşullarda) 2) Soğukta muhafaza (LN ₂ 'de)
<i>Doku</i>	Sürgün ucu	1) Düşük sıcaklıkta muhafaza 2) Soğukta muhafaza (USB'de)
<i>Hücre</i>	Hücre kùltürü	1) Altkùltür (<i>in vitro</i> koşullarda) 2) Soğukta muhafaza (ITÜ'de)
	Protoplast kùltürü	Soğukta muhafaza (LN ₂ 'de)

9.2.1. Yavaş (azaltılmış) büyütme ile muhafaza

Yavaş ya da azaltılmış büyütme ile muhafazanın esası, bitki kültürlerinin canlı kalabilmelerinin izin verdiği oranda, kültür ortamının ve kültür koşullarının değiştirilmesine dayanır. Değiştirilmiş koşullarda büyüme oranı, oldukça düşük olmaktadır. Böyle bir uygulamanın başlıca avantajı ise görünebilir kültür bozulmasının kolayca fark edilebilmesidir. Bu sayede canlılık kaybından kaçılabilir, çeşidire patojen testi uygulanabilir (Şekil 9.1), ve dolayısı ile materyal uluslararası değişime açılabilir. Germplazm materyali doğal felaket ve zararlılardan kaçabildiği için çoğalma oranı çok fazladır. Tarla ya da bahçe gen bankalarında muhafaza edilen kültürlere göre, *in vitro* materyalin muhafazası için gerekli alan oldukça küçüktür.



Şekil 9.1. Gen kaynaklarının yavaş büyütme ile *in vitro* muhafazası (Ng and Ng, 1991).

Tomes (1979) sarı çiçekli gazal boynuzunun (*Lotus corniculatus*) 100 genotipi ile yaptığı çalışmada, materyalin 0.24 m² raf alanında muhafaza edilebildiğini, buna karşın aynı sayıda bitkinin büyütme odasında 0.18 m², tarla koşullarında ise 400 m²lük bir alana gereksinim olduğunu bildirmiştir. Araştırmacı bir kış dönemi

boyunca, bahçede muhafaza edilen 100 gözlem materyalinden 34'nün kaybedildiğini, oysa *in vitro* koşullarda muhafaza edilen 100 materyalin hiçbirinin kaybedilmediğini gözlemiştir. Yavaş büyütme yöntemini kullanan Uluslararası Tropikal Tarım Enstitüsü (UTA), 1500'den fazla tatlı patates, yam ve kokoyam gen kaynağı koleksiyonunu muhafaza etmektedir. Hesaplamalara göre 3500 germplazm örneği (herbiri 10 bitkicik örneği bulunduran tüplerde), kültür odasındaki 22,27 m³lük bir hacimde muhafaza edilebilmektedir. Hücrelerin veya dokuların büyümeleri, çeşitli şekillerde yavaşlatılabilir (Tablo 9.2). Yavaş büyütme ile muhafaza; farklılaşan kültürler, bitkicik ya da bitki sürgünlerinde yaygın olarak uygulanırken, farklılaşmayan kültürler, kallus ve süspansiyon kültürlerinde nadiren uygulanmaktadır. Kullanılan yöntemler dört ana başlık altında toplanmaktadır (Tablo 9.3):

- 1) İnkübasyon sıcaklığının azaltılması,
- 2) Kültür ortamının değiştirilmesi,
- 3) Sıcaklık ve kültür ortamının birlikte değiştirilmesi,
- 4) Gaz alışveriş ortamının değiştirilmesi.

Kültür sıcaklığının azaltılması (Tablo 9.3a), hormonal ya da ozmotik olarak büyüme düzenleyicilerin ortamda kullanılması (Tablo 9.3b) veya bunların birlikte uygulanması (Tablo 9.3c) en çok kullanılan yöntemlerdir. Mutlak gerekli besin maddelerinin azaltılması olumlu olmamaktadır.

Tablo 9.2. Kültüre edilmiş hücrelerde büyüme oranlarını azaltıcı işlemler

Uygulama	Etkinliği
Mineral (madeni) yağ ile kaplama	Solunumu engelleme
Düşük basınç ve düşük oksijen	Solunumu azaltma
Sakkarozsuz besin ortamı	Metabolik faaliyetin azaltılması
Suyun azaltılması (dehidrasyon)	Metabolik faaliyetin azaltılması
Besi ortamına absisik asit ilavesi (5-10 mg/1)	Metabolik faaliyetin azaltılması
Manitol ilavesi (%3-5, a/h)	Metabolik faaliyetin azaltılması
N-dimethyl succinic asit ilavesi (50 mg/1)	Metabolik faaliyetin azaltılması
Düşük sıcaklıkta depolama	Metabolik faaliyetin yavaşlatılması

Dondurmaksızın depolama: Bu tip depolamada, uygulanan normal kültür sıcaklığı ile muhafaza sıcaklığı arasında bir ilişki vardır. Kültür sıcaklığı 20-25 °C arasında ise muhafaza sıcaklığı 4-10 °C arasında olmalıdır. Buna karşın, kültür sıcaklığı 30 °C olursa, muhafaza sıcaklığının 15-20 °C arasında olması gerekir. Genellikle kültür sıcaklıkları, donma sıcaklıklarının üstünde tutulur. Bu arada 16/8 saat fotoperiyot (ışık/karanlık) uygulaması ve yoğunluğu 50 lükse kadar azaltılmış ışık ile doku kültürlerinin muhafazası desteklenmektedir.

Büyüme engelleyiciler: Büyüme kontrol edici olarak, absisik asit, N-dimethyl suksinik asit ve manitol kullanımı yaygın hale gelmiştir. Birkaç yöntem birlikte uygulanabilir. Öte yandan başka faktörler önem sırasına göre uygulanabilir. Bu

faktörler tek başına kullanıldığında hücreyi öldürmeseler bile, bunlar zarara neden olabilirler. Örneğin, absisik asidin mevcudiyetinde patates sürgünlerinin depolama sıcaklığı 25 °C'den 6 °C'ye düşürülebilmüş, buna karşılık N-dimetil suksinik asidin varlığında kültür işlemi 10 °C'de mümkün olabilmıştır.

Tablo 9.3. Bitki doku kültürlerinin yavaş büyütülmesi ile uygulanan muhafaza yöntemleri (Ng and Ng 1991).

a) inkübasyon sıcaklığının azaltılması				
Türler	Eksplant	Kültür Tipi	Depolama Yöntemi	Depolama Süresi
<i>Vitis rupestris</i>	Sürgün	Sürgün	9 °C	10 ay
<i>Fragaria ananatus</i>	Meristem	Bitkicik	1-4 °C'de karanlıkta ve gerektiğinde 1—2 damla sıvı ortam ilave edilerek	6 yıl
<i>Solanum spp.</i>	Boğum kesiti	Sürgün	%3 sakkaroz katkılı MS ortam ve 6 °C sıcaklıkta	12-24 ay
<i>Beta vulgaris</i>	AksiUer sürgün (5 mm), Bitkicik yaprak (10-15 mm)	Bitkicik	12 °C	18 haftadan fazla
<i>Ipomea domestica</i>	Boğum	Bitkicik	%3 sakkaroz katkılı MS ortam ve 22 °C sıcaklıkta	55 hafta
<i>Malus domestica</i>	Sürgün ucu	Sürgün	1-4 °C	12 ay
<i>Lotus corniculatus</i>	Boğum/sürgün ucu	Bitkicik	2-4 °C	1 ay
<i>Trifolium spp.</i>	Sürgün ucu	Bitkicik	2-6 °C'de, 300 lüks ışık yoğunluğu ve 8 h fotoperyot ya da 4-6 °C'de tam karanlıkta	15-18 ay
<i>Medicago sativa</i>	Sürgün ucu	Bitkicik	2-6 °C'de, 300 lüks ışık yoğunluğu ve 8 h fotoperyot ya da 4-6 °C'de tam karanlıkta	15-18 ay
<i>Lolium spp.</i>	Meristem	Bitkicik	2-4 °C'de, 300 lüks ışık yoğunluğu ve 8 h fotoperyot	12 ay
<i>Dactylis glomerata</i>	Meristem	Bitkicik	2-4 °C'de, 300 lüks ışık yoğunluğu ve 8 h fotoperyot	12 ay
<i>Festuca spp.</i>	Meristem	Bitkicik	2-4 °C'de, 300 lüks ışık yoğunluğu ve 8 h fotoperyot	12 ay
<i>Phleum pratense</i>	Meristem	Bitkicik	2-4 °C'de, 300 lüks ışık yoğunluğu ve 8 h fotoperyot	12 ay
<i>Manihot esculenta</i>	Boğum	Bitkicik	20 °C	18-24 ay
<i>Beta vulgaris</i>	Sürgün	Bitkicik	5-10 °C, düşük ışık yoğunluğu	12 ay
<i>Beta vulgaris</i>	Çiçek Tomurcuklan	Sürgün	5 °C, düşük ışık yoğunluğu	13 ay
<i>Citrus spp.</i>	-	Kallus	4-5 °C	18 hafta
<i>Ficus spp.</i>	-	Kallus	15 °C	-
<i>Phoenix dactylifera</i>	-	Kallus	5°C	12-18 hafta

Tablo 9.3'ün devamı ...

<i>Saccharum spp.</i>	Yaprak kımı dokusu - 0-4 °C	6 ay
<i>Atropa belladonna</i>	Yaprak Kallus 4 °C	3-5 ay
<i>Datura innoxia</i>	Hipokotil, Kök, Sap Kallus 4 °C	3-5 ay
<i>Musa spp.</i>	Meristem Sürgün 15 °C'de, 1000 lüks ışık yoğunluğu	13-17 ay
<i>Prunus spp.</i>	Sürgün Bitkicik 3 °C sıcaklık ve karanlık	En az 10 ay

b) Kültür ortamının değiştirilmesi

Türler	Eksplant	Kültür Tipi	Depolama Yöntemi	Depolama Süresi
<i>Secale cereale</i>	Kök	Kök	30 mg/1 maya ekstraktında, her 14 günde bir alt kültür	74 hafta
<i>Daucus carota</i>	Kök kesiti	Kallus	White ortamında kültür muhafazası	116 hafta
<i>Ipomoea batatas</i>	Boğum	Bitkicik	%3 sakkarozlu Heller ortamı, MS veya %1 sakkarozlu Nitsch ortamı	89 hafta
<i>Coffea arabica</i> L.	Meristem	Bitkicik	1 M IBA katkılı sakkarozsuz yanm dozdaki MS ortamında ve 26 °C'de, 7500 lüks ışık şiddetinde 16 h fotoperyot	2 yıldan fazla
<i>Passiflora caerulea</i>	Sürgün ucu	-	Azaltılmış ortam	5 hafta
<i>Vitis spp</i>	-	Sürgün/ Bitkicik	Düşük şekerli veya şekersiz ortam	-
<i>Vanilla planifolia</i>	Sürgün ucu	Bitkicik	0,5 ppm BAP katkılı MS ortamında önbüyütme, sonra hormonsuz MS ortamına transfer	10 ay
<i>Pibus idacus</i>	Kök sürgün ucu	Kök	0,5 mg/1 IBA ve vitamin içerikli Anderson sıvı ortamı	4-6 hafta
<i>Lycopersicon esculenta</i>	Aksiller sürgün	Bitkicik	%5 sakkarozlu ve %75 MS katkılı ortamın 30/20 °C'de (gündüz/gece) kültürü	Bitkide büyümenin azaltılması

c) Sıcaklık ve kültür ortamının birlikte değiştirilmesi

<i>Solanum spp.</i>	Boğum kesiti	Bitkicik	MS + %2 sakkaroz + 50 mg/1 N-dimetil suksinamik asit, 20-22 °C'de önbüyütme, 4000 lüks ışık yoğunluğunda 16 h fotoperyot ve sonra 10 °C'de depolama, 2000 lüks ışık yoğunluğunda 16 h fotoperyot	2 yıl
<i>Solanum spp.</i>	Boğum	Bitkicik	%4'lük manitol katkılı MS ortam ve sonra 8°C'de depolama	2-3 yıl
<i>Ipomoea batatas</i>	Boğum	Bitkicik	%3'lük manitol katkılı ve %3 sakkarozlu MS ortamda 18/22 °C'de (gece/gündüz) depolama	1-2 yıl

Tablo 9.3'ün devamı ...

<i>Beta vulgaris</i>	Meristem	Sürgün	%10 sakkarozlu ortamda 4-5 °C'de depolama	2 yıl
d) Gaz ortamının değiştirilmesi				
Türler	Eksplant	Kültür Tipi	Depolama Yöntemi	Depolama Süresi
<i>Vitis spp.</i>		Kallus	Ağar ortamında maksimum 33 mm derinliğe kadar mineral yağ ilavesi ve sonra düşük ışık koşullarında depolama	120 gün
<i>Daucus carota</i>	Floem	Kallus	Ağar ortamında maksimum 33 mm derinliğe kadar mineral yağ ilavesi ve sonra düşük ışık koşullarında depolama	120 gün
<i>Nicotiana tabacum</i>	Kallus, Sürgün	Kallus, Bitkicik	Oksijen basıncı 50 mm Hg altında depolamayla büyüme oranının azaltılması	
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Sürgün	Bitkicik	Oksijen basıncı 50 mmHg altında depolamayla büyüme oranının azaltılması	

Sıvı/katı ortam: Depolama sırasında, sabit çevre sıcaklığında bile buharlaşma nedeniyle sıvı ortamın bileşimi yavaş yavaş değişir. Bitki kültürü tarafından tüketilen besin maddesinin sıvı besin ortama yeniden ilavesi oldukça kolaydır. Katı ortamda, altkültür çalışmalarında birçok stres faktörü olmasına rağmen, katılaştırılmış ortamların daha uygun olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir. Besin maddeleri fakirleşmesini sınırlandırmak için, ortam hacminin olabildiğince büyük tutulmasında yarar vardır.

9.2.2. Soğukta muhafaza

Soğukta muhafaza terimi, bitki örneklerinin dakikada birkaç °C, kademe kademe soğutularak muhafazasını ifade eder. Genellikle örnekler dakikada 30 ila 40 °C soğutulur ve sonra sıvılaştırılmış gazlara (çoğunlukla sıvı azota - LN₂'e) daldırılarak depolanırlar. Büyüme ve biyosentetik güçler bu işlemlerden etkilenmezler. Üretim işlemlerinde kullanılmadan önce örnekler, uygun birr çözündürme işleminden geçirilmelidir. Bu aşamada, dondurmanın olabilecek olumsuz etkisine rağmen, hücreler güçlü donanımlarıyla ve çözündürme işlemleriyle muhafaza edilirler. Çok düşük sıcaklıkta muhafaza biliminin temelleri, araştırmacı Quatrano (1968) tarafından, keten (*Jjnum usitatisimum*) hücre süspansiyon kültürünün, -50 °C'de başarılı bir şekilde muhafaza edilmesiyle atılmıştır. Bitki doku kültürü bilim

alanında son yıllarda kayda değer önemli gelişmeler sağlanmıştır. Çok sayıda bitki kültüründe izole edilmiş hücrelerden, protoplastlardan, meristem ve organlarından yeni bitkilerin elde edilmesi başarılmıştır.

Bitki türlerinde somatik embriyolar, embriyogenik kültürler ve kültüre alınmış sürgün ucu yaprakçıkları bu alanda başarılı bir şekilde teşvik edilmişlerdir. Öte yandan, birçok önemli bitki hücre kültürleri, deneysel olarak başarılmıştır. Örneğin, senkronize kültürler, eş zamanlı büyümeleri sağlanan hücre kültürleridir. Normalde hücre bölünmesi, şansa bağlı olarak meydana gelmektedir. Böyle hücrelerden oluşan kültürler farklı gelişme devrelerindedir. Oysa, senkronize bitki kültürlerinde artan üretim, basit olarak eş zamanlı hücrelerin gelişimiyle gerçekleştirilmektedir. Bu işlemler, periyodik uygulamalarla kimyasal olarak durağan kültürlerin temsili büyümeleri, N₂ ve etilen (C₂H₂) gazları ile eş zamanlı yapılmaktadır. Aynı işlemler bazı kimyasal maddelerle hücre bölünmesinin engellenmesi şeklinde de yapılmaktadır.

Günümüzde yaygın olarak uygulanan bitki kültürleri şunlardır (Ishikawa, 1992):

- Hücre kültürleri
- Protoplast kültürü
- Senkronize kültürler
- Meristemler kültürleri (vejetatif üretilen bitkilerde)
- Embriyonik kültürler (somatik embriyolar)
- Sürgün (yaprakçık) kültürü
- Transgenik kültürler

Bu kültürler, bitki rejenerasyonu için gerekli araçlarla, kontaminasyondan uzak deneysel yöntemlerle ve yoğun iş gücü ile *in vitro* olarak muhafaza edilirler. Bunlarda yaşamın sürdürülmesi;

- a) Altkültürlerin tekrarı ile (aktif koleksiyonlar için),
- b) Büyümenin sınırlandırıldığı koşullarda, yavaş büyütme ile (aktif koleksiyonlar için)
- c) Soğukta muhafaza ile (temel koleksiyonlar için) sağlanmaktadır.

Soğuktan korunacak hücre ve meristemler önce altkültür işlemlerinden geçirilir. Bu uygulama ile;

- a) Kurutmaya ve donmaya toleransın teşvik edilmesi (amaca uygun genlerin ekspresyonu ile),
- b) Hücre içi boşlukların (vakuollerin) azaltılması ya da hücrede su oranının düşürülmesi,
- c) Hücre zarı geçirgenliğinin artırılması,
- d) Sakkaroz ve öteki şekerlerin hücre içinde artırılması sağlanır.

Ayrıca bu fenomenler, krayoprotektantların (antifrizlerin) etkisiyle de teşvik edilmektedir. Örneğin, bu kimyasallardan dimetilsülfoksit (DMSO, -20 °C'de

yüksek koruma sağlar) hücrede dondurulamayan suyun artışı sağlar, hücre zarının geçirgenliğini artırır, şeker ve suyun tutulmasını kolaylaştırır. Şeker (sakkaroz) ise -20 °C'de koruma sağlar, hücre içi buzlanmaya izin vermez, hücre dışı buzlanmadan dolayı büzülme azalır, bu da istenmedik etkiye yol açan stres miktarını azaltır. Şeker aynı zamanda hücre zarını da koruyarak, hücre içi öğelerin suyla atılmasından (kaybedilmesinden) korur.

Canlılıklarının sürdürülmesi bir problem olan bu kültürlerin en önemli özelliği, uzun süreli altkültürlerde embriyogenik özelliklerinin kaybolma eğiliminde olmasıdır. Sürekli tekrar edilen altkültürler bulaşma (kontaminasyon) tehlikesiyle karşı karşıya kalırlar. Ayrıca, bu iş fazla zaman ve işçilik gerektirir. İşte bundan dolayı soğukta muhafaza bu tip problemlere dikkatleri çekerek, önemli hücre kültürlerinin güvenle muhafaza edilebileceği ve gerekli olduğu zaman istenen genetik materyalin sağlanması amacıyla geliştirilmişlerdir. Günümüzde 70'den fazla tür ya da çeşide ait kültüre edilmiş hücre ve meristem, sıvı nitrojenle depolanmayı takiben, yeniden hayata kavuş turulduğunda yeni bitkicikleri (plan te t) oluşturmuşlardır. Soğukta muhafaza ile ilgili temel kavramlar aşağıda özetlenmiştir.

9.2.2.I. Dondurma işlemleri ve zararları

Sıvılaştırılmış gaz (nitrojen vb.) sıcaklığına soğutulmuş (dondurulmuş) hücrelerin canlılığı üzerine dondurma işleminin önemli etkisi vardır. Bitkisel hücrelerde donmanın iki tipi vardır:

- a) Hücre dışı (ekstraselüler) donma
- b) Hücre içi (intraselüler) donma

Hücre dışı buz oluşumu: Sitoplazma ve vakuoller yüksek oranda suya sahiptir. Sitoplazmanın donma noktası -1 °C civarındadır. Ortama ilave edilen maddeler (Tablo 9.4) vakuol ve sitoplazmanın donma noktasını değiştirir ve bunu -10 °C'ye kadar düşürürler. Bitki hücreleri yavaş soğutulduğu zaman buz kristalleri genellikle hücre duvarının dışında oluşur (Şekil 9.2). Sıcaklık, suyun donma noktasının altına düştüğünde buz kristalleri hücreler arası ortam boşluğunda oluşur, bunun sonucunda hücre kültürü materyalinde %9—10 oranında hacim artışı olur.

Hücre dışı donmuş hücrelerde, hücre suyu ve hücre dışındaki buz arasında buhar basıncından dolayı, hücre suyu yavaş yavaş dışarıya hareket eder (Şekil 9.2). Hücrenin iç kısımları yalnızca soğuk altındadır, ancak donmamıştır. İki alan arasında buhar basıncı bakımından bir fark vardır, hücrenin iç kısımlarındaki donmamış suyun buhar basıncı belirgin olarak buzunkinden daha yüksektir. Böylece ekstraselüler olarak dondurulmuş hücrelerde, sıcaklığın düşmesine bağlı olarak yavaş dondurma sırasında hücre donar ve su kaybıyla büzülür, çekilir (Şekil 9.3 ve Şekil 9.4).

Tablo 9.4. Soğukta muhafaza proseslerinde krayoprotektant (antifriz) olarak kullanılan kimyasal bileşikler (Endreb, 1994).

Alkoller	Kükürt Bileşikleri	Polimerler
Etilen glikol	Amino asitler	Hidroksietil amidon
Gliserol	Dimetil sülfoksit (DMSO)	Polietilen glikol (PEG)
Propilen glikol	Şeker (Glikoz, Trehaloz, Sakkaroz)	Polivinil piroolidon (PVP)
Sorbitol		
Manitol (mannit)		

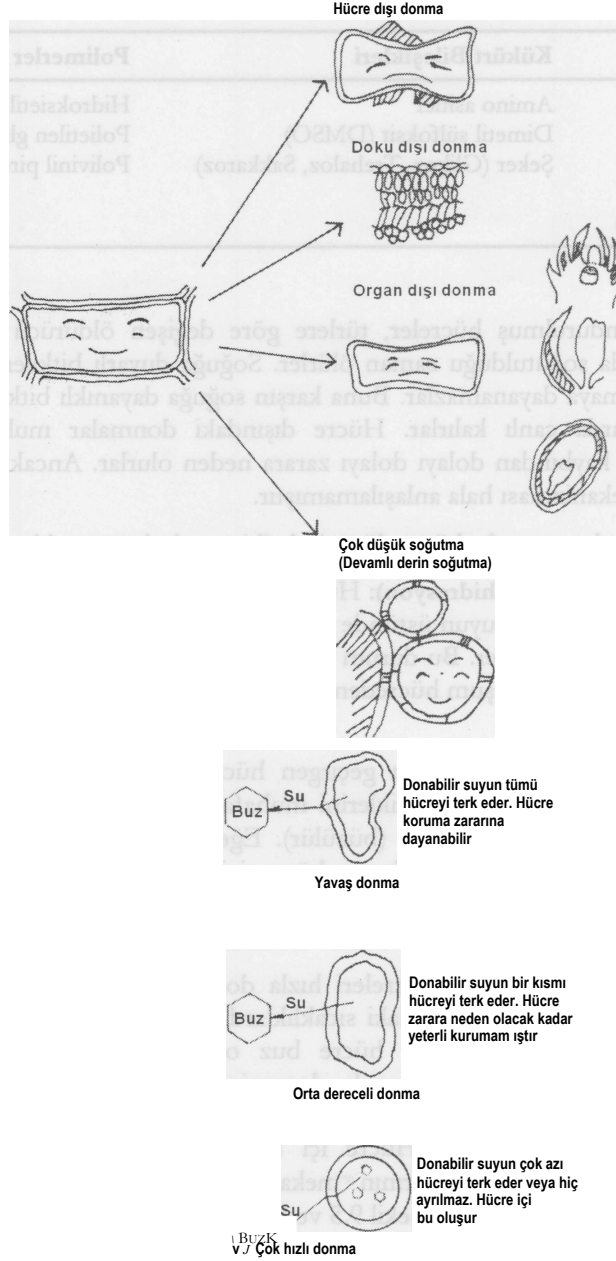
Hücre dışı dondurulmuş hücreler, türlere göre değişen öldürücü (lethal) kritik sıcaklığın altında soğutulduğu zaman ölürler. Soğuğa duyarlı bitkiler -5 °C'de bile hücre dışı donmaya dayanamazlar. Buna karşın soğuğa dayanırlı bitkiler -70 °C'nin altındaki donlarda canlı kalırlar. Hücre dışındaki donmalar muhtemelen aşırı büzülme ve su kaybından dolayı zararlıdır. Ancak, bunun hücre düzeyindeki mekanizması hala anlaşılamamıştır.

Hücre dışı buz oluşumunda, hücre düzeyinde iki temel olay gerçekleşir:

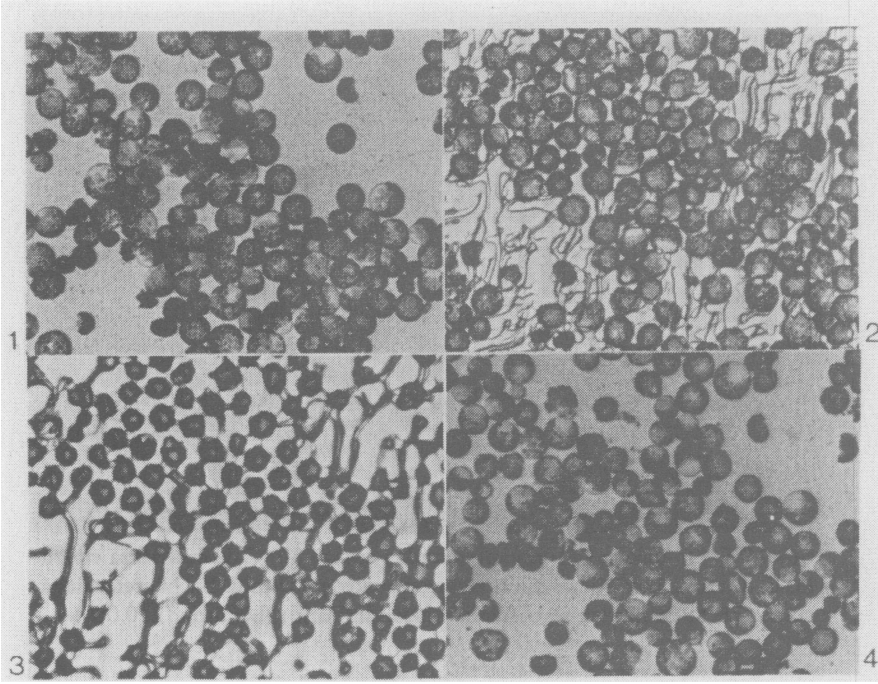
a) Suyun çıkarılması (dehidrasyon): Hücre içi ve hücre dışı boşluk arasında buhar basıncındaki bu farklılık, suyun üstünde (buhar alanında) buhar basıncı doymuş hale gelinceye kadar devam eder. Bu durum hücre dışı buzun doymuş buhar basıncının arttığını ifade eder. Bu oluşum hücreden sürekli olarak suyun çıkışını sağlar, böylece hücre yavaşça kurur.

b) Hücre zarının açılması: Yarı geçirgen hücre zarı, hücre içinde çözünmüş unsurları, yoğunlaşmış hücre bileşiklerini muhafaza eder. Donma/çözülme işlemi sırasında hücrenin hacmi küçülür (büzülür). Eğer yüzey hacmindeki bu değişim %2-3 sınırlarını aşarsa, hücreler bunu hücre içi kabarcıkların ayrı ayrı açılması suretiyle plazma zarının basıncını telafi ederler. Zarın açılması, bu tür küresel cisimlerin tekrar eski hale gelinceye kadar devam eder.

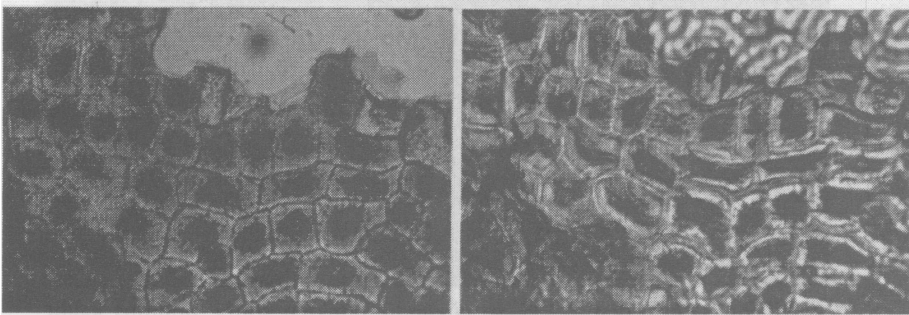
Hücre içi buz oluşumu: Bitki hücreleri hızla dondurulursa ya da soğuğa duyarlı hücreler donma sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda soğuğa maruz bırakılırsa, hücre içi donma meydana gelir. Eğer hücre buz oluşumu için kendi karakteristik sıcaklığına ulaşmadan önce ozmotik dengesini oluşturamazsa hücre içi buz oluşumu meydana gelir. Öte yandan hücre dışı buz kristallerinin inokülasyonu da buz oluşumunu gerçekleştirir. Hücre içi buz oluşumu, soğuğa çok dayanıklı hücrelerde bile canlı hücre zarının mekanik olarak parçalanmasından dolayı hücrelerin ölümüne neden olur (Şekil 9.5 ve Şekil 9.6).



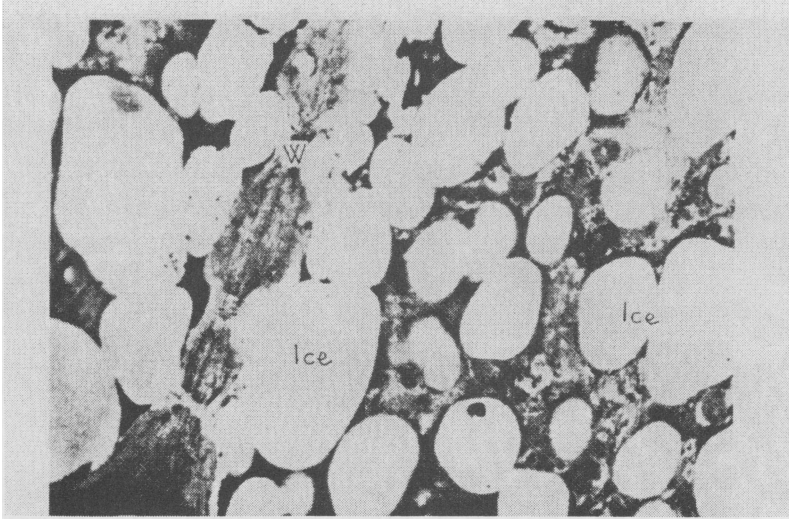
Şekil 9.2. Bitki kısımlarının donma davranışları (Ishikawa, 1992).



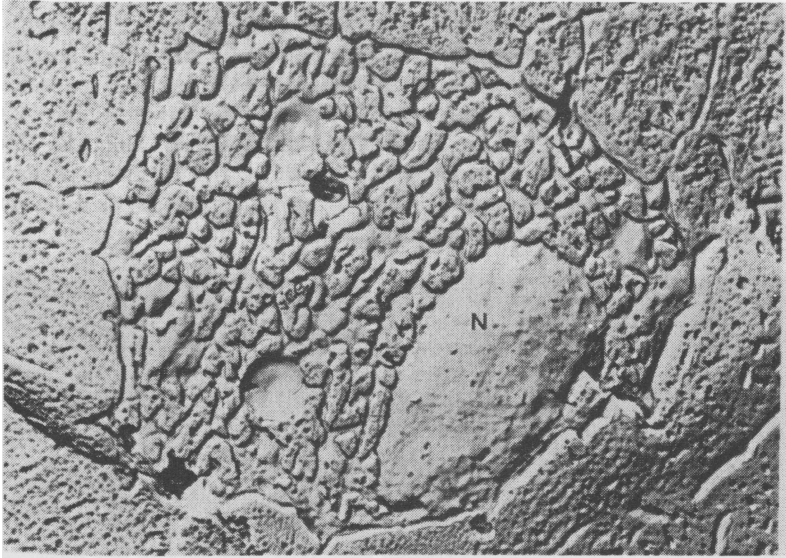
Şekil 9.3. Yabani defnenin (*Daphne pseudo-Metereum ssp. Je^oensis*) yaprak protoplastlarının hücre dışı donması. Protoplast kültürü 0,7 M sorbitol çözeltisi içinde bazı kimyasallar (20 mM fosfat tamponu, 5 mM MgSCb ve %0,5 fenosafranin) ile süspanse edilmiştir. Ortalama hücre çapı 28,8+4,4 p'dur. 1: 0 °C'den -2,4 °C'ye dondurmadan önce, 2: -3,3 °C'de buz aşılmasından hemen sonra, 3: Hücre dışı donmadan dolayı protoplastların birçoğu büzülmüştür, 4: -1,9 °C'de buz çözündüğünde protoplastların çoğu canlı bulunmuştur. Bu türün yaprakları soğuğa çok dayanıklıdır ve -40 °C'ye tolerans göstermektedir (büyütme: x220).



Şekil 9.4. Mürver bitkisinin (*Sambucus sp.*) kabuk dokularında hücre dışı donma. Solda donmadan önce fındık kırmızısı ile boyanmış canlı doku kesiti, sağda ise donma sırasındaki hücreler görülmektedir.



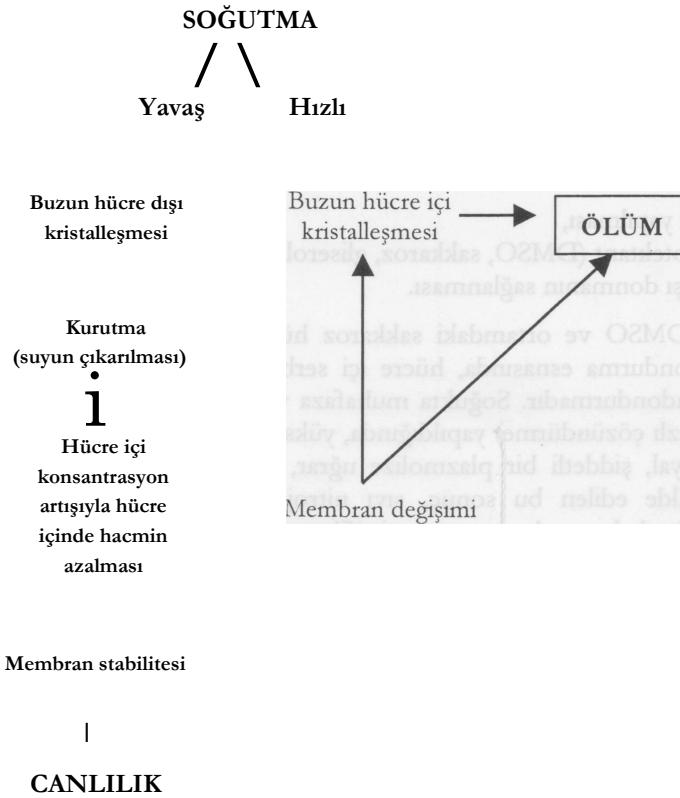
Şekil 9.5. On dakika LN₂ muamelesinden sonra -30 °C'de muhafaza edilen kışlık dutun kabuk hücrelerinin elektron mikrograf kesiti. Bu hücreler daha sonra -78 °C'de mutlak alkol içinde buzlandırılmıştır (büyütme: x10 000).



Şekil 9.6. -27 °C'den -17 °C'ye çözündürüldükten sonra, donmuş kalıbı çıkarılan tümör hücresinin elektron mikrograf kesiti (büyütme: x7 500).

Hücre içi buz kristallerinin olabilecek küçük zararlarına meydan vermemek ve daha sonra da buz kristalleri zarar verici boyutlara ulaşmadan önce erimek şartıyla, bitki hücreleri hücre içi donma olayında canlı kalabilirler. Eğer soğutma oldukça hızlı yapılırsa sadece zararsız hücre içi donma meydana gelir. Bunda en önemli rolü hücre zarı oynar.

Hücre zarı geçirgenliği: Bitki hücre zarları geçirgen olmasının yanında, buz kristalleri için geçilemez engellerdir. Düşük sıcaklığa adapte edilemeyen Puma çavdar çeşidinde yaprak pro toplaş darının mikroskop incelemeleri, hücre içi buz oluşumunun gerçekte hücre zarlarının mekanik zararından önce meydana geldiğini göstermiştir. Bu yüzden hücre içi buz oluşumu, plazma zarlarının her zaman tam kararlı olmadığını göstermektedir (Şekil 9.7) (Grout ve Morris, 1981).



Şekil 9.7. Donma oranlarına göre, bitki hücrelerinin donmayla ilişkili farklı işlemleri (Gazeau ve Dereuddre, 1986).

Bu çalışmada ayrıca hücre içi buz oluşumunun, meydana gelme derecesinin soğutma oranına ve materyalin bulunduğu muhafaza soğukluğunun minimum derecesine kuvvetle bağlı olduğu belirlenmiştir. Kritik soğutma derecesinin tedricen dakikada 3 °C olarak uygulandığı çalışmada, soğutma derecesi dakikada 5 °C ve daha fazla olduğunda, -3 ila -20 °C arasında minimum sıcaklık aşırı derecede azaldığından, hücre içi buz oluşumunun büyük oranda arttığı saptanmıştır (Steponkus, 1985).

9.2.2.2. Hücre içinde serbest suyun azalması

Aşırı düşük sıcaklıklarda bitki hücresinin canlı kalabilmesi için önemli faktör muhtemelen serbest sudur. Dondurucu (donma noktası altındaki) sıcaklıklarda hücrelerin hayatta kalması için serbest suyun azaltılması mudak gereklidir. Bu nedenle çoğu altkültürün (kültür ortamında 0,5 M sorbitol, 10 ppm ABA ya da %5 DMSO varlığında) soğukta muhafazadan önce hücrelerde serbest suyun azaltılması ve hücrelerin daha az vakuol ihtiva eder duruma sahip olması istenir.

Hücrede serbest suyu azaltmak için sakkaroz (0,3, 0,5 ve 1 M) ve ABA kullanılmaktadır. Bu iş için yapılan işlemlerin sırası şöyledir:

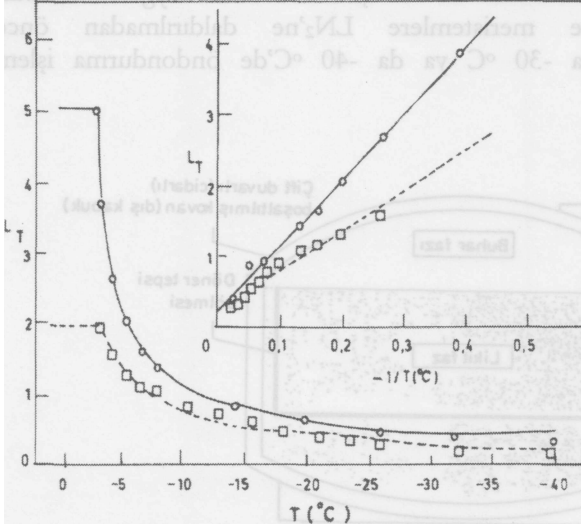
- 1) Alt kültür yapılması,
- 2) Krayoprotektant (DMSO, sakkaroz, gliserol, etilen glikol) ilavesi,
- 3) Hücre dışı donmanın sağlanması.

İlave edilen DMSO ve ortamdaki sakkaroz hücre içindeki serbest suyu azaltır. Hücre dışı dondurma esnasında, hücre içi serbest suyu azaltmak için bir başka yöntem de öndondurmadır. Soğukta muhafaza vitrifikasyon yöntemiyle (çok hızlı soğutma ve hızlı çözündürme) yapıldığında, yüksek ozmotik değere sahip çözeltide ıslanan materyal, şiddetli bir plazmolize uğrar, bu da serbest suyun azalmasıyla sonuçlanır. Elde edilen bu sonuç, sıvı nitrojene doğrudan daldırma ve hızlı çözündürmeyle, kalan serbest suyun vitrifikasyonunu kolaylaştırır. Eğer dokular, tohumlar gibi kurutulmuş halde ise, aynı şekilde dokuların basit olarak kurutulmasıyla da serbest suyun azaltılması başarılabılır. Dolayısıyla tohumlar gibi kurutulmuş durumdaki dokular soğukta muhafazaya dayanabilirler.

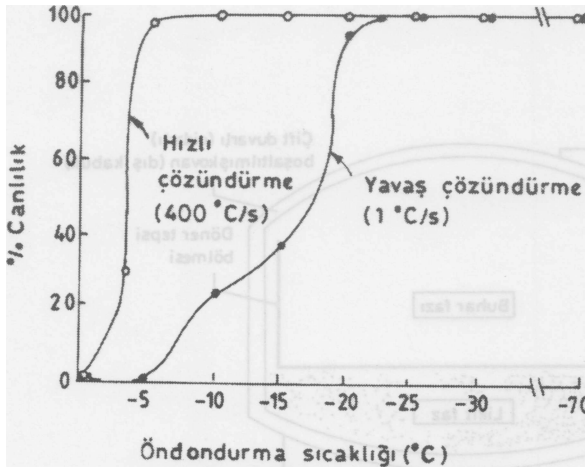
9.2.2.3. Öndondurma yöntemi

Daha önce açıklandığı gibi, hücre dışı olarak donmuş hücreler sıcaklığın düşmesiyle tedricen kururlar (Şekil 9.8). Bu yüzden soğuğa dayanıklı hücrelerin kurutulmasında, hücre dışı dondurma en etkili yöntem olarak kabul edilir. Farklı derecelerde kurutup dondurmada; kısa dayanıklı dokular LNa'ne daldırılmadan önce farklı sıcaklıklarda dondurulup sonra 0 °C'lik hava içinde yavaşça çözündürüldüklerinde (Şekil 9.9), -25 °C'nin altında ön dondurulmuş hücreler canlı kalmışlardır. Buna karşın -15 °C'nin üstünde ön dondurulmuş çoğu hücreler

ölmüşlerdir. Bu araştırma göstermiştir ki, -25°C 'nin altındaki öndondurmayla hücrelerdeki donabilir su kurutulmuştur.

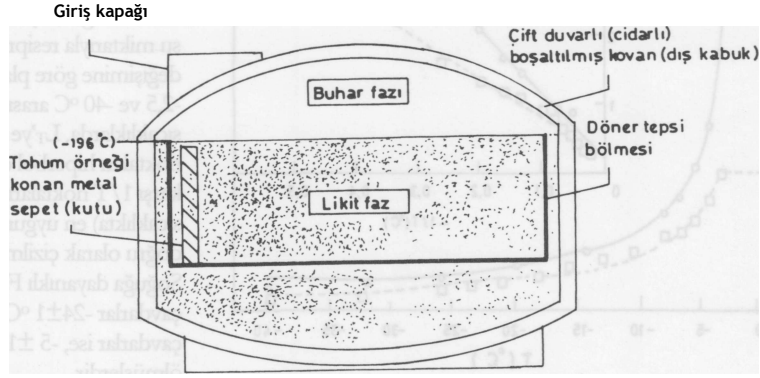


Şekil 9.8. Frontier çavdar çeşidinde soğuğa dayanıklı (□) ve duyarlı (o) bitkilerde donma eğrisi. Sıvı nem içeriği (a), kum örneğin birim gramında suyun ağırlığı olarak verilmiştir. Bu sıcaklığa karşı ve sıcaklığın su miktarıyla resiprok değişimine göre planlanmıştır. $-2,5$ ve -40°C arasındaki sıcaklıklarda, L_r 'ye karşı T noktaları hiperbol olarak; L_j ye karşı $1/T$ noktalarında ($0,1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta) en uygun hat ise bir doğru olarak çizilmiştir. Soğuğa dayanıklı Frontier çavdarlar $-24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de, duyarlı çavdarlar ise, $-5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ölmüşlerdir.

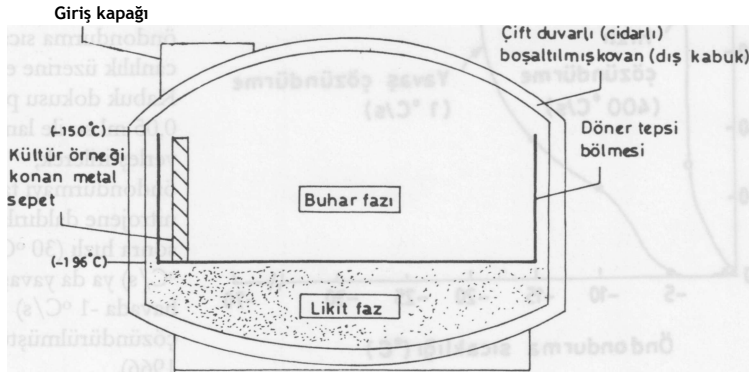


Şekil 9.9. Yavaş ve hızlı çözündürmede, öndondurma sıcaklığının canlılık üzerine etkisi. Kabuk dokusu parçalan $0,05 \text{ m}^3$ su ile lamel araştırma yerleştirilerek, öndondurmayı takiben sıvı nitrojene daldırılmış ve sonra hızlı (30°C suda -400°C/s) ya da yavaş (0°C havada -1°C/s) çözündürülmüştür (Sakai, 1966).

Sıvı nitrojene daldırıldıktan sonra (Stanwood, 1985; Şekil 9.10, Şekil 9.11), hücrelerin canlılığını muhafaza etmek için gerekli öndondurma sıcaklığı, soğuğa dayanıklılıkla yakından ilişkilidir. Soğuğa dayanıklı örnekler daha az öndondurma isterler. Soğuğa dayanıklı olmayan materyallerde öndondurma, daha az (hafif düşük sıcaklıklarda) ya da krayoprotektandar ile ön işlemden sonra uygulanmaktadır. Kültüre edilmiş hücre ve meristemlere LNa'ne daldırılmadan önce, krayoprotektantların varlığında -30°C ya da -40°C 'de öndondurma işlemi uygulanır.



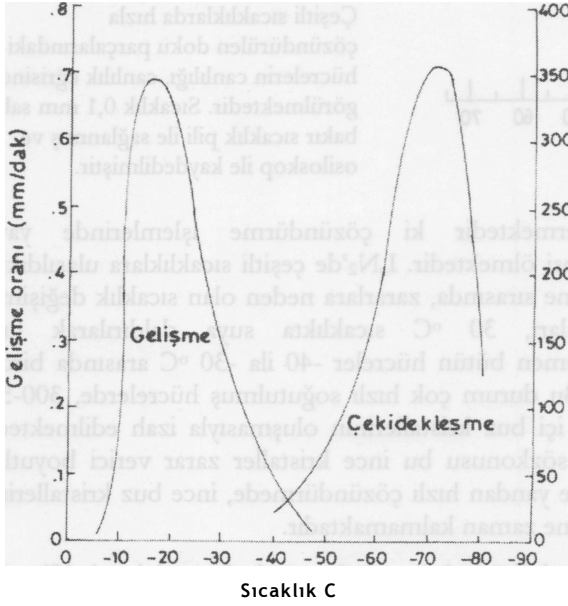
Şekil 9.10. Likit nitrojen depolama tankı (sıvı fazda bitki kültürlerinin depolanması).



Şekil 9.11. Likit nitrojen depolama tankı (buhar fazda bitki kültürlerinin depolanması).

9.2.2.4. Vitrifikasyon (camlaştırma) yöntemi

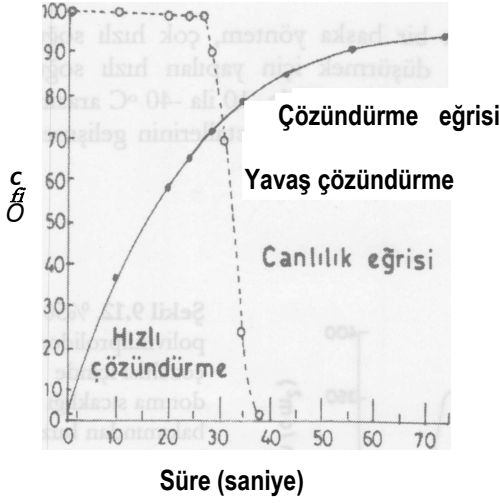
LN₂ sıcaklığında canlılığın muhafazasında bir başka yöntem, çok hızlı soğutma yöntemidir. Bu yöntem, LN₂ sıcaklığına düşürmek için yapılan hızlı soğutma sırasında buz kristallerinin gelişme sıcaklığından (genellikle -10 ila -40 °C arasındaki sıcaklık zonundan) hızla geçilirken oluşan hücre içi buz kristallerinin gelişmesinin engellenmesinden ibarettir (Şekil 9.12).



1

Şekil 9.12. %50 polivinilprolidon çözeltisi içinde donma sıcaklığı bakımından buz kristalinin gelişme ve çekirdeklenme oramı. Sol kenardaki eğri buz kristalinin gelişme oranını, sağdaki ise buz kristalinin çekirdeklenme (nükleasyon) oranını göstermektedir. Sol ordinatta buzun radyal gelişme oramı (mm/dak), sağda ise çekirdeklenme oramı (nükleasyon, cm²/s) verilmiştir.

Soğuğa çok dayanıklı dut ağacının (*Morus sp.*) kabuk hücreleri, oda sıcaklığından doğrudan LN₂'ne daldırılıp sonra 0 °C hava içinde yavaşça ya da 30 °C sıcaklıktaki suda hızla çözündürüldüklerinde, hızla çözündürülen hücrelerin hepsi canlı kaldığı halde, yavaş çözündürülen hücrelerin hepsinin öldüğü saptanmıştır (Şekil 9.13).



Şekil 9.13. Sıvı azottan çıkarıldıktan sonra, çözündürme işlemlerinde sıcaklık değişiminin hücre yaralanmalarına etkisi. Dut kabuk hücreleri -10 °C'de öndondurularak LN₂'ye daldırılıp, hava içinde (0 °C) yavaşça (2,6 °C/s oranında) çözündürülmüşüm L''den çıkarıldıktan sonra doku parçaları 30 °C'de suya daldırılarak çeşitli sıcaklıklarda hızla çözündürülmüşüm Çeşitli sıcaklıklarda hızla çözündürülen doku parçalarındaki hücrelerin canlılığı, canlılık eğrisinde görülmektedir. Sıcaklık 0,1 mm sabit bakır sıcaklık pili ile sağlanmış ve osiloskop ile kaydedilmiştir.

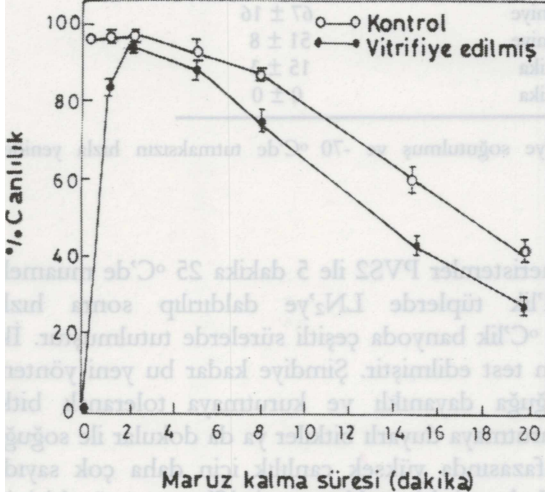
Bu sonuçlar açıkça göstermektedir ki çözündürme işlemlerinde yavaş çözündürülmüş hücrelerin hepsi ölmektedir. LN₂'de çeşitli sıcaklıklara ulaşıldıktan hemen sonra yavaş çözündürme sırasında, zararlara neden olan sıcaklık değişimini saptamak için doku parçaları, 30 °C sıcaklıkta suya daldırılarak hızla çözündürülmektedir. Hemen hemen bütün hücreler -40 ila -30 °C arasında birden bire ölmektedir (Şekil 9.13). Bu durum çok hızlı soğutulmuş hücrelerde, 300-500 A°den küçük, zararsız hücre içi buz kristallerinin oluşmasıyla izah edilmektedir. Yavaş çözündürme sırasında söz konusu bu ince kristaller zarar verici boyutlara ulaşır ve hücreleri öldürür. Öte yandan hızlı çözündürmede, ince buz kristallerinin zarar verici ölçülerde gelişmesine zaman kalmamaktadır.

Soğuğa toleransı az olan hücre kültürlerinin soğukta muhafazası için vitrifikasyon yöntemi son zamanlarda sıklıkla kullanılmıştır (Uragami *ve ark.*, 1989; Langis ve Steponkus, 1990; Sakai *ve ark.*, 1991a,b; Yamada *ve ark.*, 1991).

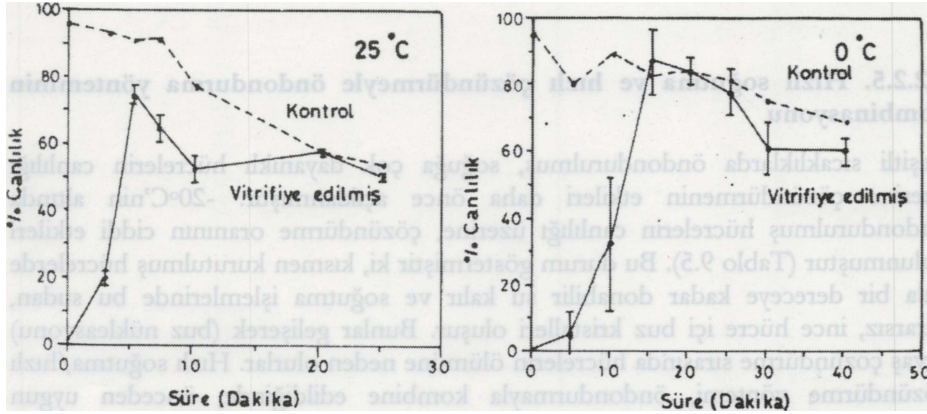
Kültüre edilmiş hücreler ve somatik embriyolar, krayoprotektantlar [örneğin 2 no'lu bitki vitrifikasyon çözeltisi (PVS2) = %30 gliserol, %15 etilen glikol, 0.4 M sakkaroz içinde %15 DMSO] ile zenginleştirilmiş yüksek ozmotik değere sahip çözelti içinde plazmatize edilerek kurutulup, doğrudan LN₂'ne daldırmayı takiben hızla çözündürüldüklerinde canlı kalabilmişlerdir. Bu yöntemin bir problemi, vitrifikasyon çözeltisinin toksik etki göstermesidir.

Vitrifikasyon çözeltisi içinde uzun süreli inkübasyon (zarar verici toksik bileşiklerin ortaya çıkması suretiyle) hücrelere zararlı olmaktadır (Şekil 9.13). Bu yüzden en uygun inkübasyon süresinin bulunması gereklidir. Çünkü bu süre dokulara, türlere ve inkübasyon sıcaklığına göre 3-20 dakika arasında değişmektedir (Şekil 9.14, Şekil 9.15). Vitrifiye edilmiş materyalin LN₂'ne doğrudan daldırmadan sonra, daima

UNb'de depolanması zorunludur. Aşırı düşük sıcaklıklara kısa süre maruz kalmak bile canlılık oranını azaltmaktadır (Tablo 9.5).



Şekil 9.14. PVS2'ye 25 °C'de maruz bırakılıp vitrifiye edilmiş hücrelere uygulama süresinin canlılık üzerine etkisi. Hücreler 25 °C'de PVS2'nin yer aldığı 1,8 ml plastik tüp içinde farklı sürelerde tutulup sonradan 30 dakika için doğrudan LN₂ içine daldırılmıştır. Hızlı çözündürmeden sonra hücre süspansiyonu 1,2 M sakkaroz içeren 2 ml'lik MT ortam üzerine yayılmıştır. Kontrol uygulaması ise -196 °C'ye soğutmaksızın vitrifiye edilmiş hücrelerdir. Düşey bar standart hatayı (S_x) göstermektedir (n=2).



Şekil 9.15. 25 ya da 0 °C'de PVS2'ye maruz bırakma ve vitrifikasyonla -196 °C'ye soğutmada, uygulama süresinin meristemlerin canlılığı üzerine etkisi. Apikal meristemler altkültürü takiben 25 °C veya 0 °C'de farklı sürelerde PVS2 ile muamele edilip, sonra 30 dakika için doğrudan LN₂'ye daldırılmıştır. Her birinde yaklaşık 20 meristem olan 2 tekrarlı test edilmiştir. Düşey bar standart hatayı (S_x) göstermektedir (n=2). Kontrol uygulaması bir önceki gibi -196 °C'ye soğutmaksızın vitrifiye edilmiş meristemlerdir. Kontrolde tekrarlama yapılmamıştır.

Tablo 9.5. Vitrifikasyonla -196 °C'ye soğutulup hızlı çözündürmeden önce tutulan sıcaklığın apikal meristemlerin canlılığı üzerine etkisi.

Tutulan Sıcaklık ve Süre % Canlılık $\pm S_x$

Kontrol ³	75 + 3
-70 °C'de 15 saniye	67 + 16
-70 °C'de 30 saniye	51 + 8
-70 °C'de 1 dakika	15 $\pm$ 3
-70 °C'de 5 dakika	0 + 0

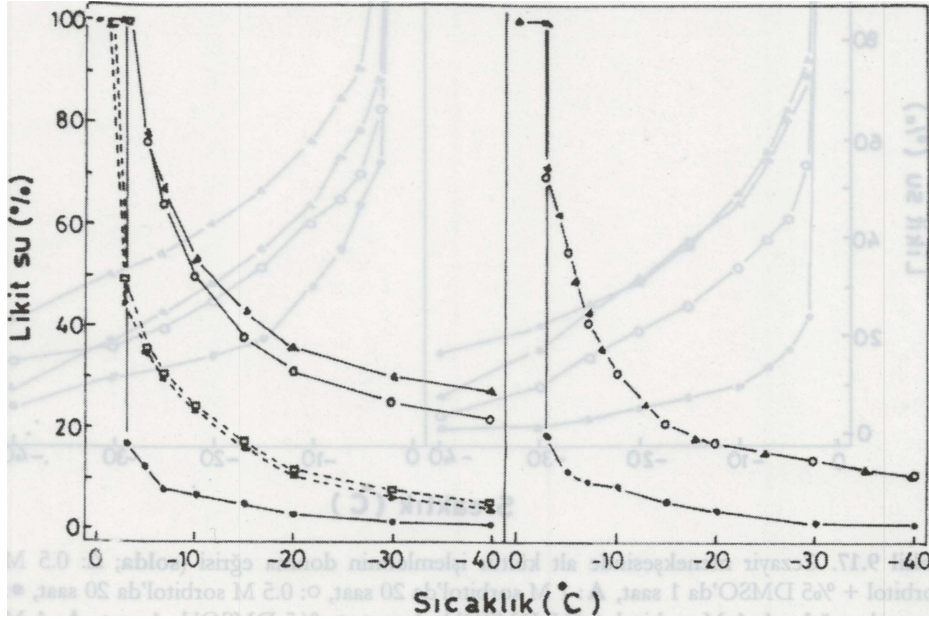
“Vitrifiye edilmiş meristemler -196 °C'ye soğutulmuş ve -70 °C'de tutmaksızın hızla yeniden çözündürülmüştür.

Bu çalışmada altkültüre edilmiş meristemler PVS2 ile 5 dakika 25 °C'de muamele edilmiştir. Meristemler 1,8 mFlik tüplerde LN₂'ye daldırılıp sonra hızla çözündürmeden önce, derhal -70 °C'lik banyoda çeşidi sürelerde tutulmuştur. İki tekrarlama da yaklaşık 20 meristem test edilmiştir. Şimdiye kadar bu yeni yöntem yalnızca birkaç derece (°C) soğuğa dayanıldı ve kurutmaya toleranslı bitki kültürlerinde başarı olmuştur. Kurutmaya duyarlı bitkiler ya da dokular da soğuğa duyarlı kültürlerin soğukta muhafazasında yüksek canlılık için daha çok sayıda araştırmaya gereksinim vardır. Herhangi bir yaklaşım vitrifikasyon çözeltisinin toksik etkisini azaltabilir.

9.2.2.5. Hızlı soğutma ve hızlı çözündürmeyle öndondurma yönteminin kombinasyonu

Çeşidi sıcaklıklarda öndondurulmuş, soğuğa çok dayanıldı hücrelerin canlılığı üzerine çözündürmenin etkileri daha önce açıklanmıştır. -20°C'nin altında öndondurulmuş hücrelerin canlılığı üzerine, çözündürme oranının ciddi etkileri bulunmuştur (Tablo 9.5). Bu durum göstermiştir ki, kısmen kurutulmuş hücrelerde hala bir dereceye kadar donabilir su kalır ve soğutma işlemlerinde bu sudan, zararsız, ince hücre içi buz kristalleri oluşur. Bunlar gelişerek (buz nükleasyonu) yavaş çözündürme sırasında hücrelerin ölümüne neden olurlar. Hızlı soğutma/hızlı çözündürme yöntemi, öndondurma ile kombine edildiğinde, önceden uygun krayoprotektant uygulanmış soğuğa az dayanıldı veya duyarlı örneklerin soğukta muhafazasında çok yararlı bulunmuştur. Hücreler donma sıcaklığına konulduklarında, DMSO gibi krayoprotektant maddeler hücre içinde kalan sıvı su miktarını artırır (Şekil 9.16). Bu maddeler uygulanan sıcaklıkta aşırı su kaybını engellemektedir. DMSO yardımıyla hücre içinde kalan sıvı suyun çoğu, donmaz karakterde olabilmektedir. Eğer bunlar şekerle kombine edilerek kullanılırsa, DMSO hücre zarının geçirgenliğini artırarak hücre içine şeker girişine yardımcı olur (Şekil 9.17). Cezayir menekşesi 200 no'lu hücre hattı, 1 M'dan yüksek sorbitol arhar

ve agarsız, çeşitli krayoprotektantlar ile 4 gün yapılan alt kültür işlemlerinin donma eğrisi çizilmiştir. Sorbitol, *Rosaseae* fam. bitkilerinde çok kullanılan bir şekerdir.

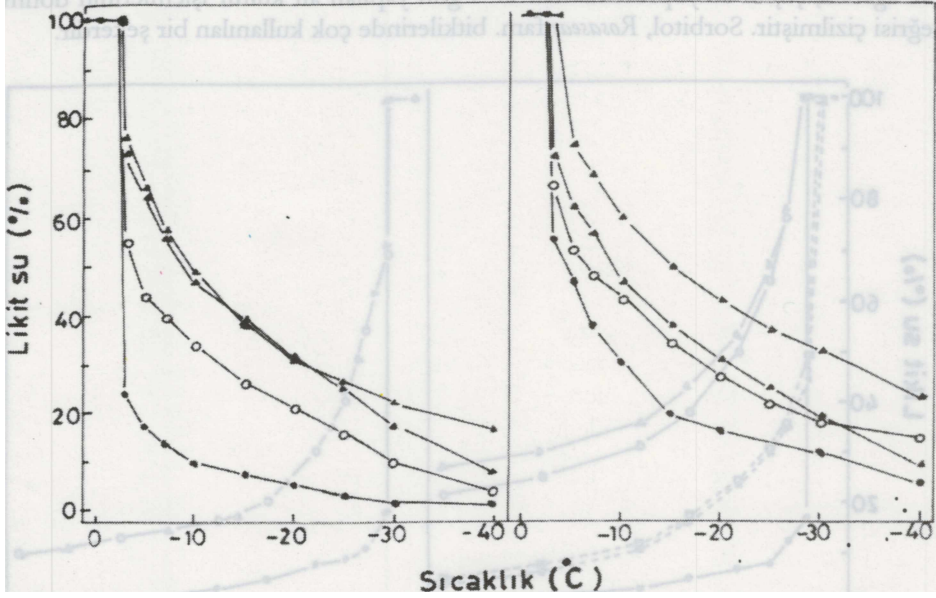


Şekil 9.16. B5 ortamı içinde DMSO, CaCl_2 ve KCl'le 1 saat altkültür yapılan 916 (soldaki) ve 200 (sağdaki) no'lu Cezayir menekşesinde (*Vincetoxicum*) donmayan suyun eğrisi (A: %10 DMSO'da 1 saat, O: %5DMSO'da 1 saat, *: kontrol, A: 0.64 osmolar CaCl_2 'de 1 saat, □: 0.64 osmolar KCl'de 1 saat).

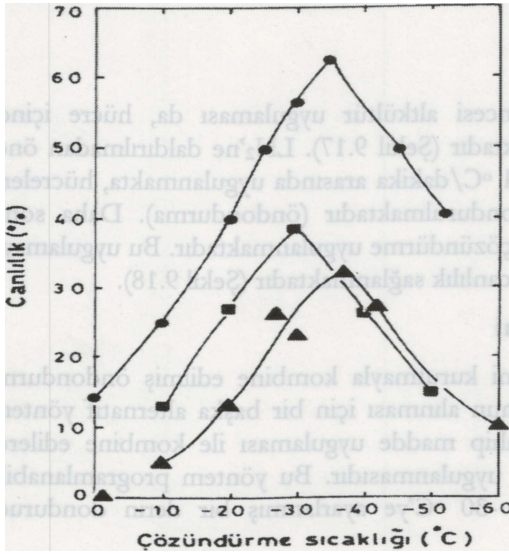
Aym şekilde soğukta muhafaza öncesi altkültür uygulaması da, hücre içinde donmayan likit su miktarını artırmaktadır (Şekil 9.17). LNı'ne daldırılmadan önce soğutma oranları çoğunlukla 0.3 ve 1 °C/dakika arasında uygulanmakta, hücreler -30 °C ya da -40 °C'ye yavaşça dondurulmaktadır (öndondurma). Daha sonra hücreler rej enere edildiklerinde hızlı çözündürme uygulanmaktadır. Bu uygulamayla bir çok meristem ve hücrede yüksek canlılık sağlanmaktadır (Şekil 9.18).

9.2.2.6. Hızlı öndondurma yöntemi

Bu yöntem, plazmolize ederek kısmi kurutmayla kombine edilmiş öndondurma yöntemidir. Dokuların serbest suyunun alınması için bir başka alternatif yöntem, bunların yüksek ozmotik değere sahip madde uygulaması ile kombine edilerek kurutulması, sonra öndondurmanın uygulanmasıdır. Bu yöntem programlanabilir bir dondurucu gerektirmez ancak, -30 °C'ye ayarlanmış bir derin dondurucu gerektirir.



Şekil 9.17. Cezayir menekşesinde alt kültür işlemlerinin donma eğrisi (solda; A: 0.5 M sorbitol + %5 DMSO'da 1 saat, A: 1 M sorbitol'da 20 saat, O: 0.5 M sorbitol'da 20 saat, •: kontrol, sağda; A: 1 M sorbitol + %5 DMSO'da 1 saat, O: %5 DMSO'da 1 saat, A: 1 M sorbitol'da 20 saat, •: kontrol).



Şekil 9.18. LN₂ içine daldırma ve sonra hızla çözündürme işlemleri öncesi çeşitli sıcaklıklarda yapılan yavaş dondurma işleminde havaç (A), kuzuyosunu (■) ve soya (•) protoplazma darının canlılık oranları. Canlılığın tahmini diasetik asit tuzu ile çeşitli renklerde boyanma ile yapılmıştır.

Yüksek ozmotik değere sahip maddeler aynen krayoprotektandlar gibi çalışırlar. Gliserol (%18-30, a/h) ve sakkaroz (%5-13, a/h) kombinasyonu çok etkilidir (Tablo 9.6). Materyaller tamamen protektant (koruyucu) içine batırılmak ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonu sağlanmaktadır. Sonra bunlar hemen -30 °C'lık buhar fazına taşınmaktadır. Bir saatlik inkübasyondan sonra, materyal doğrudan LN₂ içine daldırılmaktadır. Bu yöntem buz aşlamayı ve öndondurmayı gerektirmez. Bu çakışmada, MT ortam içinde 0.4 M sakkarozla desteklenmiş (25 °C'de 10 dakika inkübasyon) yumurta hücrelerinin soğukta muhafazasında ortamda çözündürülmüş çeşitli krayoprotektandlar karşılaş tırılmış tır. LİSE'ye konmadan önce küçük (0,5 ml) kamışlara konulan hücreler -30 °C'de 30 dakika dondurucuya yerleştirilmiştir. 40 °C suda hızla çözündürmeden sonra, hücreler 1.2 M sakkaroz içeren 2 ml MT ortama yayılmışlardır. Her uygulamada, her birinde 100 hücre kümesi bulunan 2 kamış kullanılmış ve bunlardaki hücrelerin canlılığı incelenmiştir. Hızlı öndondurma, yavaş öndondurma yönteminden daha basit olmakla birlikte, boşluklu dokuların azaltılmasında oldukça sınırlı sonuç vermektedir. Bu yüzden bazen olumlu sonuç alınması zordur. Boşluklu dokuların azaltılması için sık sık altkültür yapılmalıdır.

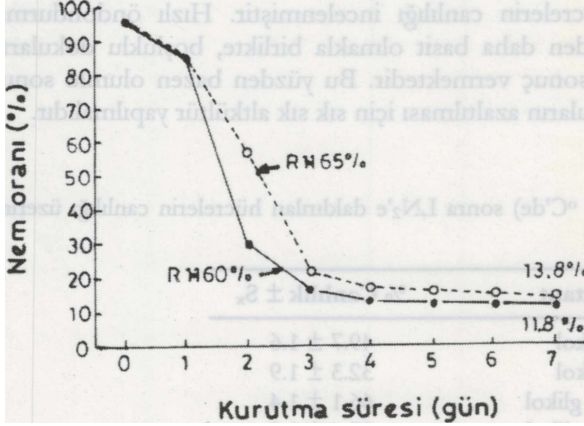
Tablo 9.6. Öndondurmadan (30 °C'de) sonra LN₂'e daldırılan hücrelerin canlılığı üzerine krayoprotektantların etkisi.

Krayoprotektant	% Canlılık $\pm S_x$
2 M etilen glikol	49.7 $\pm$ 1.6
3 M etilen glikol	32.3 $\pm$ 1.9
2 M propilen glikol	66.1 $\pm$ 1.4
3 M propilen glikol	35.6 $\pm$ 1.8
2 M gliserol	91.2 $\pm$ 1.4
3 M gliserol	80.4 $\pm$ 1.5
2 M DMSO	63.4 $\pm$ 1.8
3 M DMSO	52.5 $\pm$ 1.6

9.2.2.7. Kurutma yöntemleri

Bitkiler gelişmelerinin belirli dönemlerinde, tohum ve çiçek tozu oluşturma dönemlerinde kurutmaya oldukça toleranslıdır. Bu şunu ifade eder, bitkilerin bir çoğu kurumayı tolere edecek sorumlu genlere sahiptir. Ancak bunlar birkaç özel doku ya da organın gelişme dönemi hariç, mudak gönüllü olarak kendilerini belli etmezler. Kurutma yönteminde hormon uygulaması (genellikle ABA), ya da yüksek dozda ozmotikum uygulaması ile potansiyel kurumaya (doku ve organların kendi genetik yapılarında mevcut) toleransın kontrolü amaçlanır. Eğer doku kurutmaya bir dereceye kadar tolerans gösterirse, ki bu dönemde hücrelerde serbest su yoktur ve bunlar tohumlara uygulandığı gibi, oldukça düşük sıcaklıklarda kolaylıkla canlı kalabilirler.

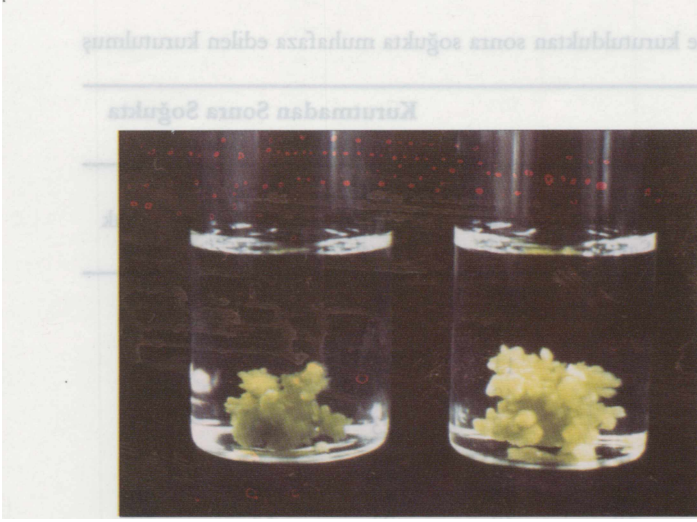
Dışarıdan verilen (eksojen) ABA ya da yüksek ozmotik değere sahip maddelerle yapılan ön uygulamayla, doku ve organlarda oluşturulan ABA düzeyi artırılır. Bu artışla bitkilerde kuraklığa toleransı sağlayan genlerin sorumluluğu teşvik edilir ya da dokular ABA'ye toleransa ya da uyuma sahip olurlar. Uyarılmış genler hücrelerin kuraklığa alışmasını, muhtemelen hücre içi bileşiklerin ve hücre zarının geçirgenlik özelliklerinin değişmesini sağlamaktadır. Ortama dışarıdan verilen sakkaroz, bu alışmaya yardım etmektedir. Yavaş ya da hızlı kurutmayla uygun su oranına ulaşılır, bu esnada hiç ya da çok az su serbest kalır. Böylece hücreler LN₂ sıcaklığına soğutulabilir, sonrada çözündürülebilirler (Şekil 9.19).



Şekil 9.19. Farklı nispi nemde kurutma sırasında somatik embriyoların nem oranının değişimi. Yapılan kurutma işlemi sonucunda, %60 nispi nemde embriyolar daha hızlı kurutulmuş ve final nem oram %65 nispi nem oranına göre daha düşük bulunmuştur

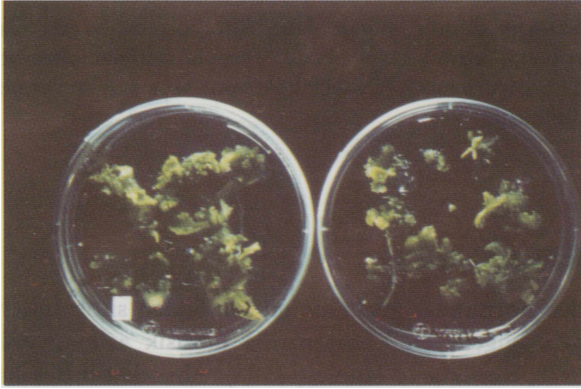
Shimonoshi ve ark. (1990), kavun somatik embriyolarında daha büyük ya da daha olgun embriyoların (2-3 mm), küçüklere göre kurutmaya daha yüksek tolerans gösterdiğini saptamıştır (Tablo 9.7). Kurutmaya tolerans içinde bir dönem vardır ki, bu başka bir nedene bağlı olarak değişir gibi görünmektedir (Şekil 9.20, Şekil 9.21)

Ancak dokuların kurutulmasında çözümlenememiş bazı problemler vardır. Örneğin, bazı dokular ABA'ye karşılık verebilir ya da bazı dokular veya bitkiler yüksek derecedeki sıcaklığa toleransı göstermeyebilir. Tolerans içinde dokuların kendine has yapıları ve bitki çeşitlerinin farklılığı ile ABA'ye duyarlılık ya da yüksek ozmotik değere sahip maddeler kurutmanın birçok bitki ya da dokuya uygulanabilirliğini azaltmaktadır. Kurutmada bir başka problemde kültüre edilmiş materyalin, tohum içindeki zigotik embriyodan farklı olarak (somatik embriyo ya da anterik embriyo gibi) uzun süreli kurumaya karşılık muhakkak korunamaz olmasıdır. Çünkü tohumlar koruyucu tabaka (bariyer) olarak, tohum kabuğuna sahiptir. Bir çok türde de tohum kabuk hücreleri farklı özelliklere sahiptir.

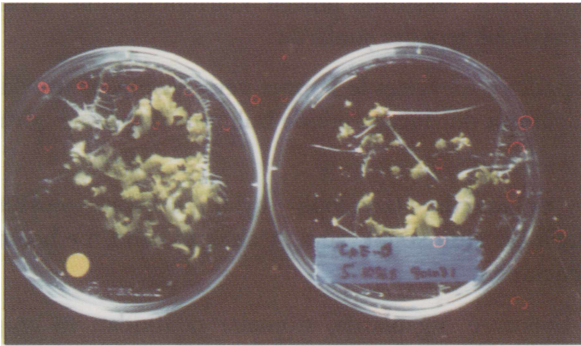


Şekil 9.20. Kültür edilmiş kavun sürgün yaprakçıklarının yavaş öndondurma yöntemiyle soğukta muhafazası.

Üstte, kavunun kültüre edilmiş sürgün yaprakçıkları, **altta sağda** kültüre edilmiş kavun sürgün yaprakçıklarının yavaş öndondurma yöntemiyle soğukta muhafazasından rejenere edilen bitkiler, **altta solda** öndondurma yapılmamış kontrol bitkileri görülmektedir.



Şekil 9.21. Sağda kültüre edilmiş kavun somatik embriyolarının yavaş öndondurma yöntemiyle soğukta muhafazasından rejenere edilen bitkiler, **solda** öndondurma yapılmamış kontrol bitkileri.



Tablo 9.7. Farklı nispi nemlerde kurutulduktan sonra soğukta muhafaza edilen kurutulmuş embriyoların canlılık oranları.

Nispi Nem (%>>>)	Boyut ²	Kurutulmuş			Kurutmadan Sonra Soğukta Muhafaza Edilmiş		
		Test Edilen Embriyo Sayısı	Canlı Embriyo Sayısı	Canlılık ³ (%)	Test Edilen Embriyo Sayısı	Canlı Embriyo Sayısı	Canlılık (%)
50	S	34	9	26	36	5	14
50	M	46	18	39	42	16	38
60	S	35	4	11	35	5	14
60	M	45	19	42	40	22	55
60	L	24	14	58	23	15	65
65	S	36	7	19	34	7	21
65	M	44	21	48	42	19	45
65	L	25	10	40	' 23	13	57

[^]Kurutma süreleri %50 ve %60 nispi nemde 4 gün, , %65 nispi nemde 5 gün olarak uygulanmıştır, ²Embriyo ölçüleri uzunluklarına bağlı olarak 3 grupta sınıflandırılmıştır, S: küçük (1 mm), M: orta (2 mm), L: büyük (3 mm), ³Canlılık köklenme veya sürgün vermenin yeşil rengi baz alınarak değerlendirilmiştir.

9.2.2.8. Absisik asitin fizyolojik tepkileri

Bitkilerde büyümeyi teşvik eden hormonlar (oksinler, gibberellinler, sitokininler ve poliaminler) yanında, büyümeyi engelleyen hormonlarda (absisik asit ve etilen) vardır (Wareing ve Phillips, 1978; Roberts ve Hooley, 1988). Absisik asit bitkilerde doğal olarak büyümeyi engeller. Bu engelleme bitkilerde ksantoksin (sarı renk pigmentlerinin oluşturduğu madde) oluşumuyla yakından ilişkilidir. Henüz ticari uygulaması olmamakla birlikte, ABA araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Absisik asidin bitkilerde oluşturduğu fizyolojik tepkiler şunlardır:

- 1) *Absisyon*: Absisik asit yaprak ve meyvelerde kopma veya düşmenin teşviki ile yaprak sapı tabanında büyümeyi durdurucu etkiye bulunur. Bitkilerde görülen bu olaya absisyon denir.
- 2) *Dormansi*: Doku ve organlarda fizyolojik uyku devresi oluşturur. Dormansinin kırılması belli bir süre soğuk veya sıcaklık uyarımı, ve hormon uygulaması ile sağlanabilmektedir.
- 3) *Gaz girişinin kontrolü*: Doku ve organlarda, stomalar tarafından su ve gaz (CO₂ ve O₂) girişinin kontrol edilmesini sağlar.

- 4) **Büyümenin engellenmesi:** Büyümeyi teşvik eden uyarıcıların aksine, büyümeyi engeller.
- 5) **Hücre etkilenmesi:** Hücre zarının geçirgenliği üzerine etkin olur. Hücreye daha fazla madde giriş çıkışı olur.
- 6) **Stres koşullarında adaptasyon:** Hücrelerin çeşitli olumsuz koşullara uyumunu sağlar. Bunlar, donmaya, üşümeye, kurağa, sıcaklığa, mekanik uyarılara ve tuzluluğa uyum olarak sayılabilir.

9.3. Kültüre Edilmiş Materyalin Soğukta Muhafazasında Örnek Kurallar

Kültüre edilmiş hücrelerin ve meristemlerin soğukta muhafazasında günümüzde dört yöntem ya da strateji uygulanmaktadır. Bunlardan üçü yavaş öndondurma yöntemine göre daha yeni olup, birçok yaklaşım çeşitli materyale uygulanmaktadır. Bu yöntemlere ilişkin kurallar şunlardır:

- 1) Yavaş öndondurma kuralları,
- 2) Hızlı öndondurma kuralları,
- 3) Vitrifikasyon kuralları,
- 4) Kurutma kurallarıdır.

9.3.1. Yavaş ön dondurma kuralları

Kültüre edilmiş hücreler ve meristemlerin çoğu dondurulmaya duyarlıdır. Bu yüzden hücre ve meristemlerin başarılı bir şekilde soğukta muhafazası için en önemli şey, soğuğa az ya da hiç dayanıklı olmayan materyalin canlılığını sürdürmek için LN₂ içine daldırmadan önce yaklaşık -30 ila -40 °C arasında bunların öndondurulmasıdır. Şekerler, sorbitol, etilen, glikol, gliserol, prolin ve DMSO, donma zararını önlemede etkili bulunmuş kimyasallardır. Bu kimyasallar içinde DMSO ve etilen glikol hariç diğerlerinde soğuğa az dayanan ya da hiç dayanamayan hücrelerde soğukta muhafazada alman sonuçlar, muhafaza bakımından çok azdır ya da yetersizdir. Buna karşın bu iki krayoprotektantın bitki hücrelerine yayılımı ya da nüfuz etmesi çok kolaydır.

Yüksek molekül ağırlıklı öteki koruyucu maddelerin DMSO ile kombine edilip kullanılması, bunların hücre içine nüfuz etmelerine yardımcı olur. DMSO hücre ve hücre duvarının geçirgenliğini artırmaktadır. Bireysel materyale (tür, çeşit, doku, organ) uygun değişiklikler yapılmak kaydıyla, yavaş öndondurma için temel protokol aşağıdaki adımları içerir (Sakai, 1985; Şekil 9.22): ¹

- 1) Hücre kültürünün hasadı ya da apikal meristemin izalasyonu yapılır.

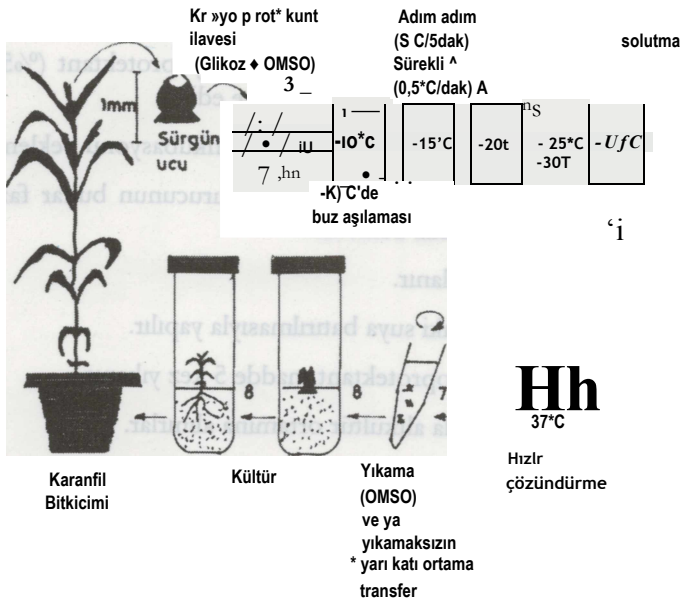
2) Materyale uygun ön işlem ya da önkültür yapılır. Bu işlem iki şekilde uygulanır:

i. kültüre edilmiş hücrelerde:

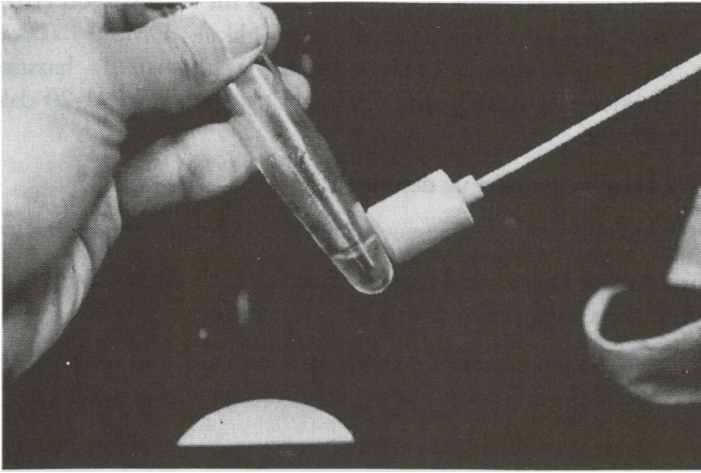
- a) 0.5-1.0 M sorbitol ya da sakkaroz ilave edilmiş kültür ortamında 16-48 saat önkültür yapılarak,
- b) 10-20 ppm ABA varlığında 2-7 gün önkültür yapılarak,
- c) %5'lik DMSO ile 1-2 gün önkültür yapılarak,

ii. apikal meristemlerde:

- a) Ağar kültür ortamında, ışık altında 2 gün önkültür yapılarak (örnek: patates),
 - b) %5'lik DMSO'nun ilave edildiği kültür ortamında 2 gün ya da 0.5-1.0 M sorbitol veya sakkaroz ile 1-2 gün önkültür yapılarak
- 3) Öndondurma öncesi krayoprotektandarin ilavesi damla damla yavaşça ya da seri halde damlatılarak hızla doğrudan yapılabilir. Krayoprotektandann, protoplastlara ilavesi genellikle yavaşça ya da damıtılarak yapılmaktadır.
- 4) Materyalde donmayı başlatmak için -7 ila -10 °C'de buz aşılması yapılır. Donmadı başlatmak için tüpün alt kısmı sıvı azotta soğutulmuş çelik çubuğa dokundurulur (Şekil 9.23). Dondan koruyucu maddelerin alımından sonra tüp bu sıcaklıkta 30 dakika kadar tutulur. Programlanabilir dondurucu ile -30 ya da -40 °C'ye yavaşça (0.3—1.0 °C/dakika) ya da soğuk banyosu ile dikkatli adımlarla soğutulur (Şekil 9.22). Final öndondurma sıcaklığında (-30 ya da -40 °C'de) 10-20 dakika bekletilir.
- 5) Örnek materyal LN₂ içine daldırılır ve orada depolanır. Depolama LN₂'nin buhar ya da likid fazında yapılır.
- 6) Hızlı çözündürme yaklaşık 37 °C sıcaklıkta su banyosunda yapılır.
- 7) Krayoprotektandann materyalden uzaklaştırılması aşağıdaki yöntemlerden biri ile gerçekleştirilir:
- a) Sulandırma ile krayoprotektant madde (örneğin DMSO) yıkanır, damlatma yoluyla kültür ortamı ya da %3 sakkaroz ilave edilir, sonra taze kültür ortamına alınır.
 - b) Krayoprotektant maddeyle bulaşık örnek doğrudan filtre kağıdının üzerine, bir tabaka halinde alınır ve filtre kağıdının en üst tabakası yıkanmaksızın ağar ortamın üzerine transfer edilir. Birkaç saat veya bir gün sonra filtre kağıdıyla birlikte örnek, bir başka taze ortama transfer edilir.
- 8) Kültüre edilmiş materyalin yeniden kültüre alınarak canlılık kontrolü yapılır.



Şekil 9.22.
Apikal
meristemlerin
soğukta
muhafazasında
rutin yöntem.



Şekil 9.23.
LN₂'de -7 ila -8
°C'ye
soğutulmuş
çelik çubuk ile
krayoprotektant
çözeltisinde
donmanın
başlangıcında
aseptik buz
aşılması

9.3.2. Hızlı öndondurma kuralları

- 1) Uygun dönemde kültürlerin seçimi önemlidir. Genellikle büyümenin hızlandığı dönem başından, büyümenin orta hızda sürdüğü döneme kadar olan zaman uygundur. Bu yüzden kültürün yaşlanması uygun değildir.

Y. Emeklier

- 2) Yüksek ozmotikum ortamında (0.3-1.0 M sakkaroz), 1-3 gün kadar önkültür yapılır ancak, mudak gerekli değildir.
- 3) Ufak şişeler ya da tüpler içindeki hücrelere 0.5-1 mİ krayoprotektant (%5-30, a/h, oranında sakkaroz ve/veya gliserol) doğrudan ilave edilir.
- 4) Oda sıcaklığında 5-10 dakika krayoprotektant maddenin inkübasyonu beklenir.
- 5) Tüpler -30 °C'ye hazırlanmış (buz aşılması yok) dondurucunun buhar fazına, doğrudan transfer edilir, bir saat burada bekletilir.
- 6) Sonra derhal USU'ne batılır ve depolanır.
- 7) Çözündürme tüplerin 40 °C sıcaklıktaki suya batırılmasıyla yapılır.
- 8) 1 M sakkaroz ilave edilmiş suyla krayoprotektant madde 5 kez yıkanır.
- 9) Kültürler doğrudan rejenerasyon ya da altkültür ortamına alınırlar.

9.3.3. Vitrifikasyon kuralları

- 1) Uygun dönemde kültür ya da uygun boyu darda materyal seçimi yapılır.
- 2) 0.3-1 M sakkaroz içeren ortamda (yüksek ozmotikum) önkültür yapılır ancak bu işlem mudak gerekli değildir.
- 3) Ufak şişe veya tüp içindeki materyale doğrudan 0.3-0.5 mİ vitrifikasyon çözeltisi ilave edilir. Bu çözelti oransal olarak gliserol : etilen glükol : DMSO : sakkaroz (%30 : %15 : %15 : %5 veya %15'lik sakkaroz, a/h) şeklinde hazırlanır. Materyale göre örnekler oda sıcaklığında (20-25 °C) veya 0 °C'de 1-20 dakika inkübasyon için bekletilir.
- 4) Tüpler doğrudan LN₂ içine batılır ve depolanır.
- 5) Tüplerin 40 °C sıcaklıktaki suya batırılmasıyla hızlı çözündürme yapılır.
- 6) Buzlar çözündürüldükten sonra vitrifikasyon çözeltisi 1.2-1 M sakkaroz (buzda soğutulmuş) içeren suyla sulandırılıp doğrudan 5 kez yıkanır.
- 7) Filtre kağıdı üzerine toplanan materyal çıkarılır ve filtre kağıdının üzerinden yarı kati ortam üzerine alınarak yeniden kültür yapılır veya rejenerasyon sağlanır.

9.3.4 Kurutma kuralları (yapay tohumların soğukta muhafazası)

Kurutma yöntemi, somatik embriyoların, embriyogenik kallus ve belirli türlerin meristemlerinin soğukta muhafazasında kullanılabilir. Bu yöntem en basit yöntemlerden biri olup, programlanabilir dondurucu gerektirmez. Çünkü, örnekler kurutulmuştur ve bunlar tohumlar gibi ele alınabilir ya da onlar gibi muamele edilebilir. Ancak, bitki dokularının tümü kolayca kurutmaya tolerans gösteremezler.

- 1) Somatik embriyoların (genellikle 2-3 mm boyutunda) ve embriyogenik kalkışların uygun gelişme döneminde seçilmesi gerekir. Uygun meristem boyudannın seçimi, i) apikal ya da lateral olarak, ii) primordiyal yaprakçık sayısı olarak ve iii) tüm tohumcuk olarak düşünülür.
- 2) 10 ppm ABA ihtiva eden ortamda 2-3 gün önkültür ya da seri halde artan yüksek ozmotik değere sahip ortamda ikiye gün bekletilerek önkültür yapılır. Materyal 0.3 M sakkarozdan 1 M sakkaroz ortamına kademeli transfer edilir (0.3 —► 0.5 —► 0.7 —► 0.9 —► 1 M). Her ortamda 2'şer gün tutulmak suretiyle 1 M sakkarozda 8. günde ulaşılır (Şekil 9.24).
- 3) Kurutma iki şekilde uygulanmaktadır:
 - a) *Hızlı kurutma:* Yan katı ortam (%3 sakkaroz ve 10 ppm ABA ilave edilmiş) üzerinde doku kültürü bulunan petri kabının kapağı steril kabin veya steril tezgah içinde açılarak, birkaç saat ya da bir gün kadar kurutma şeklinde yapılır.
 - b) *Yavaş kurutma:* Filtre kağıdı üzerine çıkarılmış materyal, 0.5 mİ MS sıvı ortamlar (%3 sakkaroz ve 10 ppm ABA ilave edilmiş) özel kültür kabı içine konur. Bu kabın kapağında bulunan 2 delik geçirgen zarla kaplıdır. Sonra özel kap, 25 °C ya da 7 °C'de %60-65 nispi nem düzeyine ayarlanmış sabit nem ortamına (özel kapta, %37.6-35.6'lık H₂SO₄ çözeltisi bulunan kap içine) konur. Burada dengeli nem düzeyine düşünceye kadar, H₂SO₄ çözeltisinin kurutucu etkisinden yararlanarak 4-5 gün kurutma işlemi sürdürülür (Şekil 9.25).

Kurutma işlemi sentetik tohumların ya da yapay tohumların üretiminde son derece önemlidir. Embriyogenik kallus kültürü parçaları (1 mm boyutunda somatik embriyolar) bir pens yardımıyla aseptik koşullarda %3 sodyum aljinat içeren ortamda süspanse. Süspanse halindeki bu materyal daha sonra geniş ağızlı pipet yardımı ile toplanarak iyice karıştırılmış kalsiyum klorür (CaCl₂) içeren NÖ kültür ortamına küçük damlacıklar (çözeltinin küçük bir parçası) halinde damlatılır. Bunların etrafı kapsül ile çevrilerek (enkapsülasyon) yaklaşık 4 mm çapında yapay boncuklar (tohumlar) yapılır. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözelti iyice karıştırılır. Enkapsülasyon yoluyla embriyogenik (somatik) kallus materyalini içeren yapay boncuklar (sentetik tohumlar), küçük bir elek ve pens yardımıyla sıvı kültür ortamında toplanır. Sonra boncukların etrafındaki ortam fazlası bir filtre kağıdı üzerinde uzaklaştırılır ve 0.3 M sakkaroz içeren yüksek ozmotikli ortamda (NÖ), karanlıkta 2 gün önkültür yapılır ve yapay tohumlar ikiye gün ara ile 0.5 ve 0.7 M sakkaroz içeren NÖ ortamlarına yine karanlıkta önkültüre edilir. Bu işlemler ya da ABA içeren ortamda 2-3 gün önkültür yapılabilir. Bundan sonra steril kabin içinde ya da petri kabının ağzı açık bırakılarak ya da filtre kağıdı üzerinde birkaç saat (0-12 saat) hızla kurutulur. Yavaş kurutma ise, %70-80 sabit nem içeren soğuk odada (ortam sıcaklığı 7 °C) birkaç günde yapılır. Bunun için yavaş kurutulacak

Y. Emeklier

tohumlar, özellikle kurutma için dizayn edilmiş 200 ml'lik polikarbonatdan yapılmış ve kapağında filtre edici zar bulunan iki delikli kültür kaplarına alınır ve havalandırma (ventilasyona) izin veren aseptik koşullarda sabit nem içeriğine kadar kurutulurlar.

- 4) Uygun nem oranına kadar kurutulan örnekler daha sonra tüplere veya şişelere transfer edilir.
- 5) Tüp ya da şişeler doğrudan LN₂'nin buhar veya likit fazına maruz bırakılır ya da -80 °C'deki derin dondurucuya konur ve soğukta muhafaza edilirler (Şekil 9.26, Şekil 9.27).
- 6) Çözündürme işlemleri tüplerin 40 °C sıcaklıktaki suya daldırılmasıyla hızlı ya da oda sıcaklığında (20-25 °C) tutulmasıyla yavaş olarak yapılır.
- 7) Kültürler bundan sonra yeniden kültür işlemine tabi tutularak (25 °C sıcaklık ve karanlıkta 2-3 hafta), kültürlerin rejenere olmaları ya da altkültür ortamında yeniden kullanılmaları sağlanır.

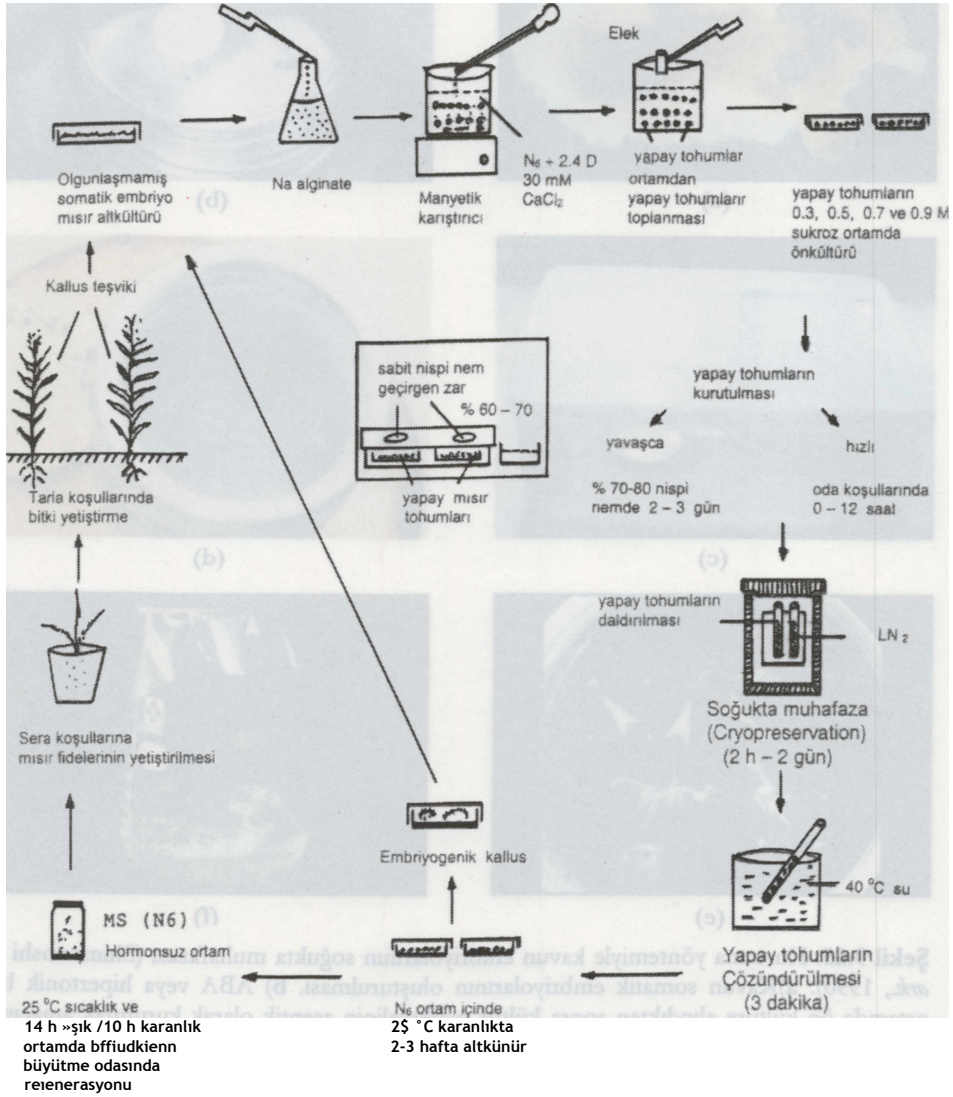
9.4. Hücre Kültürlerinin Canlılığına Katkıda Bulunan Bazı Faktörler

9.4.1. Gelişme dönemi

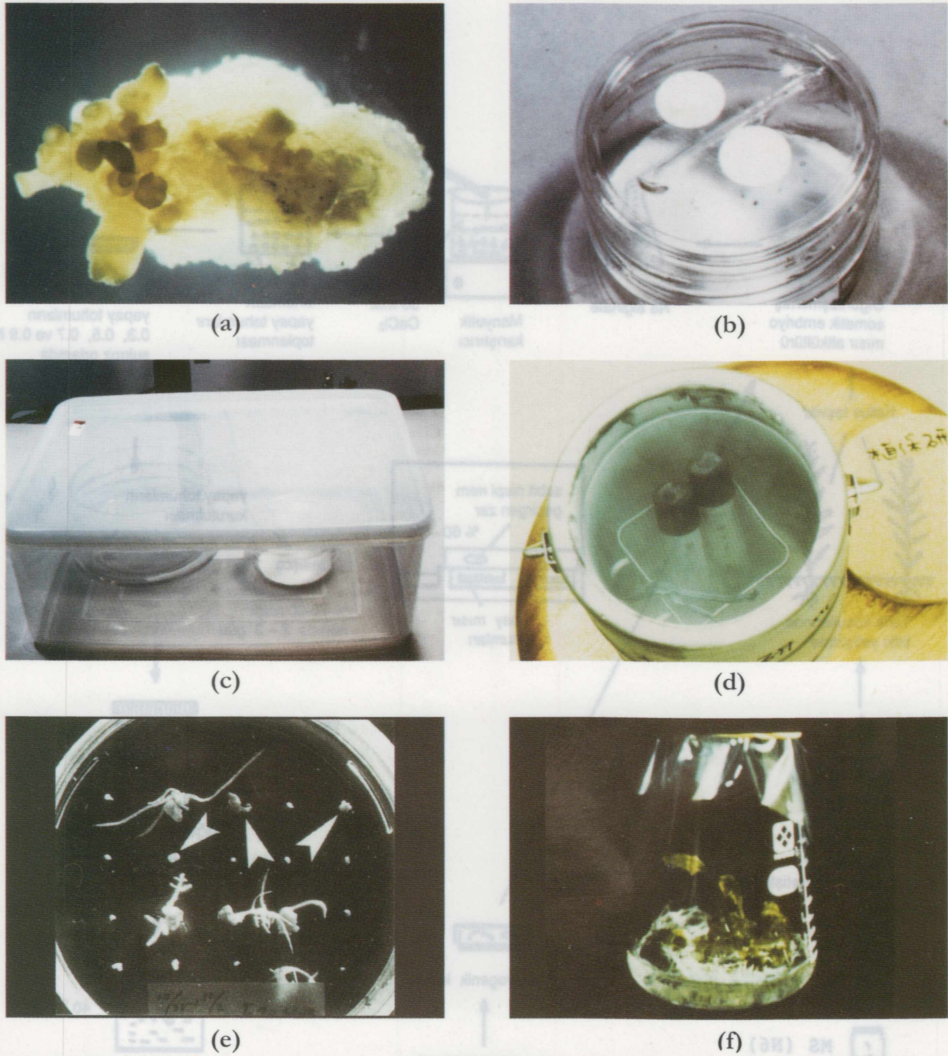
Hücre süspansiyonu üzerine yapılan çalışmalar, gelişme dönemi içinde belli bir dönemin, başarılı bir soğukta muhafaza için önemli olduğunu işaret etmiştir. Gerileme döneminin başında ve durağan dönemde, çözündürme sonrası canlılık düzeyi düşüktür. Gerilemenin sonuna doğru ve büyümenin çok hızlı olduğu dönemde, krayoprotektandarin varlığında, donmaya tolerans bakımından önemli bir hoşgörü vardır. En yüksek canlılık büyüme döneminin ortasında elde edilmiş, bu dönemin ikinci yarısında kapasite azalmış ve durgun dönemde canlılık oram 0'a yaklaşmıştır (Şekil 9.28). Yüksek canlılığın nedeni tamamen açık olmamakla birlikte, küçülmüş hücre hacmi, daha az boşluklu olma, oldukça yoğun sitoplazma ve metabolik faktörlerle ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Durağan dönemde olan hücreler genellikle büyük merkezi vakuole sahiptir ki, bu vakuol serbest suya çok zengin olup, soğukta muhafazası oldukça zordur.

9.4.2. Önkültür

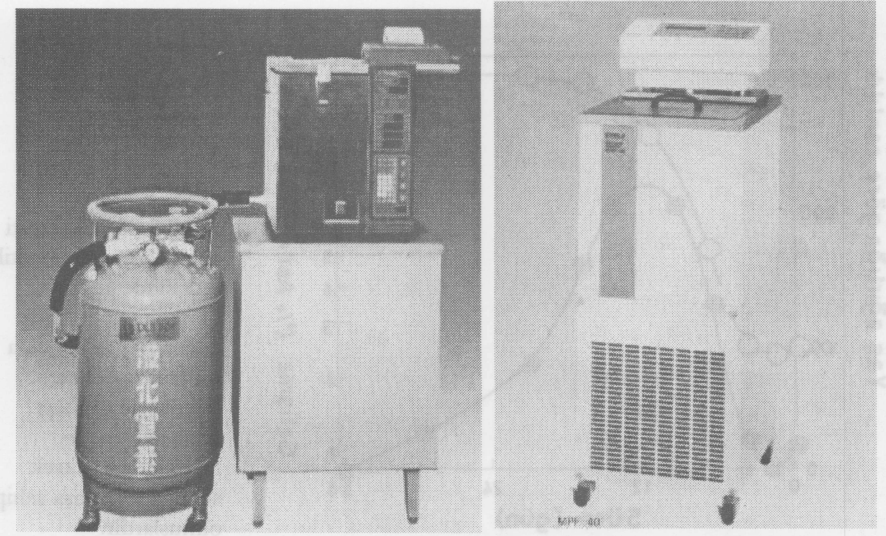
Hücre kültürlerinin, sorbitol çözeltisi (0.5-1.0 M) ya da çok yüksek kuvvedendirici sakkarozun ilave edildiği kültür ortamlarında, donma öncesi 16-48 saat için önkültüre edilmesi, donma-çözünme sonrası iyileştirmenin geliştirilmesi açısından etkili bir yöntem olarak bulunmuştur (Chen *ve. ark.*, 1984). Kültür ortamında 10-20 ppm ABA'nın varlığında 2-7 gün önkültür yapılması bir alternatiftir (Ishikawa *ve ark.*, 1990; Shimonishi *ve ark.*, 1990).



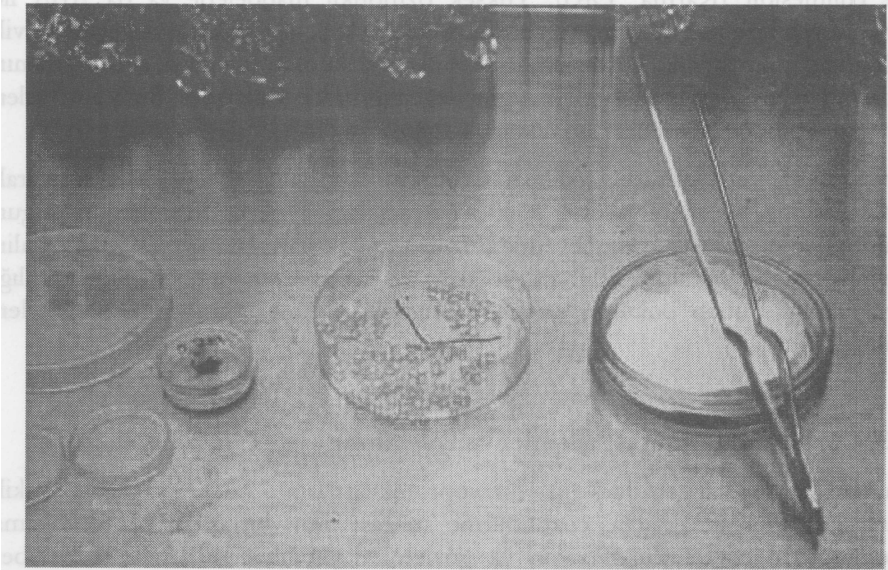
Şekil 9.24. Olgunlaşmamış somatik embriyodan yapay tohum elde edilmesinde kurutma yönteminin kullanılması.



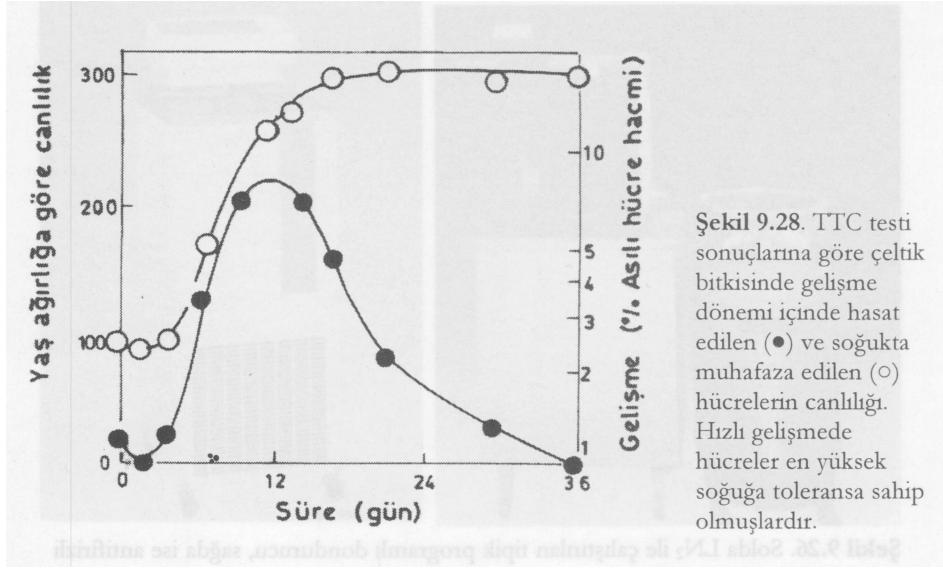
Şekil 9.25. Kurutma yöntemiyle kavun embriyolarının soğukta muhafazası (Shimonoshi ve ark., 1990). a) Kavun somatik embriyolarının oluşturulması. b) ABA veya hipertonik bir ortamda ön kültüre alındıktan sonra kültür materyalinin aseptik olarak kurutmak amacıyla somatik embriyoların bulunduğu özel kap. Kapın kapağında havalandırma için geçirgen iki delik bulunmaktadır. c) Somatik embriyoların sülfirik asitle sağlanan sabit nispi nem ortamı kap içinde kurutulması. d) Ufak şişeler içinde somatik embriyoların LN₂ içine daldırılması e) %65 nispi nemde kurutmayı takiben soğukta muhafaza edilen embriyoların rejenerasyon ortamında yeniden çimlendirilmesi (5 embriyo çimlenmiştir). Okla gösterilen bazı embriyolar genişlemiş, yeşil ve canlı olmakla birlikte çimlenmemiştir. f) Kurutulup soğukta muhafaza edilen kavun somatik embriyolarından rejenere edilmiş bitkicikler.



Şekil 9.26. Solda LN₂ ile çalıştırılan tipik programlı dondurucu, sağda ise antifrizli ve elektrikle çalışan dondurucu.



Şekil 9.27. Aljinat ile kaplanmış mısır somatik embriyolarının laminar kabin içinde kurutulması.



Önkültür yapımında başka bir alternatif, kültür ortamına 1-2 gün %5 DMSO'nun ilave edilmesidir (Kartha, 1985). Yüksek ozmotikli maddelerle ya da ABA ile önkültür yapılmasının kurumaya ve donmaya dayanıklılığı yüksek düzeyde teşvik ettiği ileri sürülmektedir. Bu durum muhtemelen vakuolün azalması, sitoplazmanın artmasından ve membran özelliklerinin değişmesinden dolayıdır. Bu işlemlerden herhangi biri hücrede serbest su miktarını azaltmaktadır.

Meristemler ve kültüre edilmiş sürgün yaprakçıklarının dondurularak muhafazasında bu materyallerin küçük parçacıklara ayrılmış kısımlarının uygun boyutlarda olması kaçınılmazdır. Altkültür için küçük parçalara ayrılmış materyalin sade bir ortamda önkültüre edilmesi, soğukta muhafazadan sonra genellikle canlılığı artırmaktadır. Bunun önkültür sırasında yaranın iyileşme etkisinden olduğu ileri sürülmektedir.

9.4.3. Çözündürme sonrası işlemler ve iyileştirme

Soğuktan koruyucu maddelerin (krayoprotektandarin) hücre sağlığına etkili zararlarından kaçınmak için, çözündürme sonrası rutin bir işlem olarak yıkama döneminde soğuktan muhafazanın ilk gözlemleri yapılmalıdır. Bununla beraber yıkamadan sonra yapılan çok sayıda araştırma göstermiştir ki, uzun süre krayoprotektant muamelesine maruz bırakılmaya göre, yıkamanın kendisi genellikle daha zararlı olmaktadır. Çözündürme sonrası krayoprotektandarin uzaklaştırılması, standart kültür ortamlarının kullanılmasıyla yapılmaktadır. Yıkama işlemleri

deplazmoliz zararlarına yol açabilir. Özellikle yıkama krayoprotektandarin hızlı sulandırılmasıyla, canlı hücrelerin oranını azaltabilir.

Başka bir alternatif yöntem de deplazmolizin ve krayoprotektandarin toksik etkisinden kaçınılması için, çözündürme sonrası hızlı iyileştirmenin başarılmasıdır (Chen *ve ark.*, 1984). Çözündürülmüş hücreler, yıkama işlemi yapılmaksızın filtre kağıdı üzerinde 4-5 saat agar ortam üzerine yerleştirildiğinde, krayoprotektandarin agar ortam içine yavaş yavaş sızdırılması olanağı vardır. Günümüzde bu yöntem krayoprotektandarin yavaş damlatma yoluyla sulandırılmasına (yıkınmasına) alternatif bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak materyale göre değişmekle birlikte, canlılık ve yeniden büyüme için yıkama yöntemi daha iyi sonuç vermektedir. Bazı durumlarda damlatma yoluyla yıkama (sulandırma) daha iyi sonuç vermiştir (Niwata *ve ark.*, 1991; Ogawa *ve ark.*, 1991).

9.4.4. Soğukta muhafazadan dolayı genetik değişimler ve seleksiyon

Soğuga dayanıklı hücrelerin seçilmesinde, tekrarlanan soğukta muhafaza işlemlerinin uygun olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte bu problem, eğer canlılık oranı oldukça yüksek ise (%70'in üzerinde) çözümlenebilir. Rejenerasyon kapasitesi, izoenzim modelleri, sekonder metabolit verimliliği gibi öteki özelliklerin, soğukta muhafazadan sınırlı olarak etkilendiği görülmüştür (Nag ve Street, 1973; Ulrich *ve ark.*, 1982; Chen *ve ark.*, 1984). Soğukta muhafaza edilen kallus dokusundan rejenera edilen bitkilerde fenotipik değişiminin, bu işlemi görmeyen kallus bitkilerine göre daha farklı olduğu ortaya çıkmıştır (Fujii *ve ark.*, 1991).

Soğukta muhafazanın genetik değişimi teşvik edip etmediği mikroorganizmalarda ve memeli hücrelerinde araştırılmıştır. Ancak hem olumlu sonuçlar (Ashwood-Smith ve Grant, 1976; Banno *ve ark.*, 1978) ve hem de olumsuz sonuçlar (Ashwood-Smith ve Friedman, 1979; Ashwood-Smith, 1985) elde edilmiştir. Son zamanlardaki iki araştırma, bitki materyalinde kromozom sayılarındaki değişimleri bildirmektedir (Charne *ve ark.*, 1988). Ancak, fenotipik özellikler ve belirli özellikler üzerine yapılan birçok araştırma bir önceki paragrafta soğukta muhafazanın özel genetik değişimler gösterdiğini bildiren sonuçları kabul etmemektedir.

Soğukta muhafazanın teşvik ettiği muhtemel genetik değişimler hakkında kromozomların ve DNA düzeyinde elektroforetik yöntemlerle DNA protein bantlarının izlenmesi gereklidir. Kültüre edilmiş hücrelerde altkültür farklılıkları, seleksiyon olayını epeyce teşvik etmektedir. Yapılan araştırmalar (Yamada *ve ark.*, 1991), vitrifikasyon yöntemiyle IJNb'ne maruz bırakılan bütün meristem kolonisinin canlı kaldığını göstermiştir. Eğer tüm rejenera edilebilen dokular canlı kalabilirse, teşvik edilen farklı hücrelerden herhangi biri rejenerasyon sırasında ayrılacak ve rejenerantlar içinde az da olsa bir genetik değişim şansı olabilecektir.

9.4.5. Gelecekteki beklentiler

Günümüze kadar birkaç soğukta muhafaza yöntemi geliştirilmiştir. Yetmişten fazla bitki türünün kültüre edilmiş materyali (embriyogenik kültürler, somatik embriyolar ve protoplast kültürü) ve meristemleri başarıyla soğukta muhafaza edilmektedir (Tablo 9.8). Soğukta muhafazadan zarar görüp canlılık oranı düşen materyalde, iyileştirme çalışmaları başlanmalıdır.

Tablo 9.8. Soğukta muhafaza edilen hücre, kallus ve protoplast kültürlerinin listesi (Kantha 1987).

Hücre Süspansiyon Kültürleri	Kallus Kültürleri	Protoplast Kültürleri
<i>Acer pseudoplatanus</i>	<i>Yavan dula vena</i>	<i>Bromus inermis</i>
<i>Atropa belladonna</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Datura innoxia</i>
<i>Brassica napus</i>	<i>Phoenix dactylifera</i>	<i>Daucus carota</i>
<i>Capsicum annuum</i>	<i>Populus sp.</i>	<i>Giy cine max</i>
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Saccharum sp.</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>Datura innoxia</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Mercurialis perennis</i>
<i>Datura stramonium</i>	<i>Ulmus americana</i>	<i>Triticum aestivum</i>
<i>Dioscorea deltoidea</i>		<i>Zea mays</i>
<i>Digitalis lanata</i>		
<i>Daucus carota</i>		
<i>Giy cine max</i>		
<i>Hordeum vulgare</i>		
<i>Hyosyamus muticus</i>		
<i>Malus domestica</i>		
<i>Medicago sativa</i>		
<i>Nicotiana glauca</i>		
<i>Nicotiana glauca</i>		
<i>Nicotiana glauca</i>		
<i>Oryza sativa</i>		
<i>Panax ginseng</i>		
<i>Populus sp.</i>		
<i>Pseudotsuga menziesii</i>		
<i>Rosa Paul's scarlet rose</i>		
<i>Saccharum sp.</i>		
<i>Sorghum bicolor</i>		
<i>Zea mays</i>		

Soğukta muhafazadan sonra, meristemlerde yeniden büyüme sırasında kallus oluşumundan kaçınmak önemlidir. Böylece daha önce bildirildiği gibi, tüm meristem ya da koninin (sürgün ucunun) canlı kalabilmesi sağlanabilecektir. Bu çalışmalarda bir başka yön, yöntemlerin basitleştirilmesi, daha az karmaşık olmaları

ve çok daha standart olmaları sağlanacaktır. Bununla birlikte, bazı bitki materyallerinin halen bu yöntemlerin hiçbirisiyle soğukta muhafaza edilemediğinin bilinmesi gerekir. Bu yüzden çok sayıda araştırma, özellikle soğuğa ve kurağa duyarlı bitkilerde, daha çok ta subtropik bitkilerde yoğunlaşabilecektir.

Çok sayıda bitki türünde genetik kaynakların ve hücre hadarının muhafazasında;

- Bilim adamlarının ve ıslahçıların bir merkezde toplanması,
- Soğukta muhafaza tekniklerinin geliştirilmesi için bir merkezin kurulması,
- Bu merkezin eğitim kursları sağlaması,
- Büyük bir merkezi gen bankasında, büyük LN₂ tanklarında çalışmaların yürütülmesi,
- Çok sayıda hücre hattının ve genetik kaynağın burada depolanması gereklidir.

Kaynaklar

- Ashwood-Smith MJ, Grant E (1976) Mutation induction in bacteria by freeze drying. *Cryobiol.*, 13: 206-213.
- Ashwood-Smith MJ, Friedmann GB (1979) Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time and X-irradiation of mammalian cells preserved at -196°C in dimethyl sulfoxide. *Cryobiol.*, 16: 132-140.
- Ashwood-Smith MJ (1985) Genetic damage is not produced by normal cryopreservation procedures involving either glycerol or dimethyl sulfoxide: A cautionary note, however, on possible effects on dimethyl sulfoxide. *Cryobiol.*, 22: 427-433.
- Banno I, Sakane T, Iijima T (1978) Mutational problem in preservation of bacteria (*E. coli*) by L-drying. *Cryobiol.*, 15: 693.
- Charne DG, Pukacki P, Kott LS, Beversdorf WD (1988) Embryogenesis following cryopreservation in isolated microspores of rapeseed (*Brassica napus* L.), *Plant Cell Rep.*, 7: 407-409.
- Chen THH, Kartha KK, Constabel F, Gusta LV (1984) Freezing characteristics of cultured *Catharanthus roseus* (L). G.Don cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. *Plant Physiol.*, 75: 720-725.
- Endreb R (1994) *Plant Cell Biotechnology*, p. 353, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Fujii T, Fujisaki M, Kuraoka Y, Klikuchi S, Ono K (1991) Regeneration of plants from rice callus frozen by liquid nitrogen (II). *Japan. J. Breed.*, 41 (suppl. 1): 192-193.
- Gazeau C, Dereuddre J (1986) Effects des substances cryoprotectrices au niveau cellulaire. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 133 Actual Bot., 3: 41.
- Grout B, Morris GJ (1981) Membranes as a factor in cryoinjury. In: *Proc. 4th Symp. on Problems of Low Temperature Preservation of Cells, Tissues and Organs*, p. 63, May 20-23, Humboldt Universität Berlin, DDR.

Y. Emeklier

Ishikawa M, Robertson AJ, Gusta LV (1990) Effect of temperature, light, nutrients and dehardening on abscisic acid and induced cold hardiness in *Bromus inermis* Leyss suspension cultured cells. *Plant Cell Physiol.*, 31(1): 51-59.

Ishikawa M (1992) Cryopreservation of Plant Genetic Resources. NIAR, p. 70, Japan.

Kartha KK (1985) Meristem culture and germplasm preservation. 115—133. In: Kartha KK (ed), *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, p. 276, CRC Press, Florida.

Kartha KK (1987) Advances in the cryopreservation technology of plant cells and organs. In: Green CE, Somers DA, Hackett WP, Biesboer DD (eds), *Plant Tissue and Cell Culture*. *Plant Biology* 3, p. 447, Liss, New York.

Langis R, Steponkus PL (1990) Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification. *Plant Physiol*, 92: 666-671.

Nag KK, Street HE (1973) Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature*, 245: 270-272.

Ng SYC, Ng NQ (1991) Reduced-growth storage of germplasm. In: JH Dodds (ed), *in Vitro Methods for Conservation of Plant Genetic Resources*, p. 247, Chapman and Hall, The University Press, Cambridge.

Niwata E, Ogawa R, Ishikawa M, Oosawa K (1991) Cropreservation by prefreezing method for somatic embryos of melon. *Japan. J. Breed*, 41 (suppl. 1): 188-189.

Ogawa R, E Niwata, M Ishikawa, K Oosawa (1991) Cropreservation by prefreezing method for shoot primordium of melon. *Japan. J. Breeding*, 41 (suppl. 1) .190—191.

Roberts JA, Hooley R (1988) *Plant Growth Regulators*, Blackie and Son Limited, London, Great Britain.

Quatrano RS (1968) Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing dimethyl sulfoxide. *Plant Physiol*, 43: 2057

Sakai A (1966) Survival of plant tissue at super-low temperatures. IV. Cell survival with rapid cooling and rewarming. *Plant Physiol*, 41: 1050-1054.

Sakai A (1985) Cropreservation of shoot-tips of fruit trees and herbaceous plants. In: Kartha KK (ed), *Cropreservation of Plant Cells and Organs*, pp. 135-158, CRC Press, Florida.

Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1991a) Cropreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by a simple freezing method. *Plant Sci*, 74: 243-248.

Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1991b) Survival by vitrification of nuclear cells of orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196 °C. *Plant Sci*, 74: 249-254.

Shimonishi K, Ishikawa M, Suzuki S, Oosawa K (1990) Cropreservation of melon somatic embryos by desiccation method. *Japan. J. Breed*, 41: 347-351.

Stanwood P (1985) Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: Kartha KK (ed), *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, pp. 199-226, CRC Press, Florida.

- Steponkus PL (1985) Cryobiology of isolated protoplasts: Applications to plant cell cryopreservation. In: Kartha KK (ed), Cryopreservation of Plant Cells and Organs, pp. 49-60, CRC Press, Florida.
- Tomes DT (1979) A tissue culture procedure for propagation and maintenance of *Lotus corniculatus* genotypes. Can. J. Bot., 57: 137-140.
- Ulrich JM, Finkle BJ, Tisserat BH (1982) Effects of cryogenic treatment on plantlet production from frozen and unfrozen date palm callus. Plant Physiol., 69: 624-627.
- Uragami A, Sakai A, Nagai M, Takahashi T (1989) Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. Plant Cell Rep., 9: 328-331.
- Wareing PF, Phillips IDJ (1978) The Control of Growth and Differentiation in Plants, Second Edition, Pergamon Press, William Clowes & Sons Limited, London, Great Britain.
- Yamada T, Sakai A, Matsumura T, Higuchi S (1991) Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens*) by vitrification. Plant Sci., 78: 81-87.

Bölüm 10

Embriyo Kültürü

Betül Bürün¹, Aynur Gürel²

¹ Muğla Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla

²Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bornova, /z/wir

e-posta: bbetul@mu.edu.tr¹

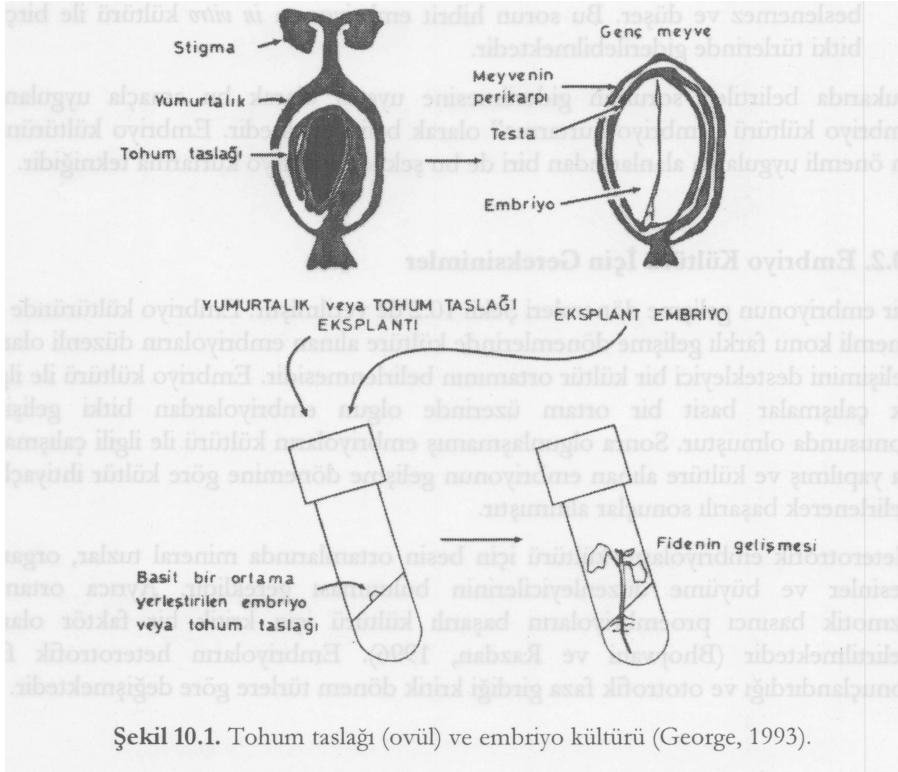
10.1. Giriş

Yüksek bitkilerin tohumlarından ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek belli ortamlarda kültüre alınması embriyo kültürü olarak tanımlanmaktadır. Bitki embriyolarının kültürü ile ilgili ilk çalışma Hanning (1904) tarafından *Raphanus* ve *Cochlearia*'nın tohumlarından olgun embriyoların (2 mm) mineral tuz ve şeker içeren basit bir ortamda kültüre alınması ve bitkicik geliştirilmesidir. Bundan sonra çok değişik bitki türlerinin embriyoları kontrollü koşullarda geliştirilmiştir. Bu çalışmalarla embriyoların besin ihtiyaçları, büyüme ve farklılaşmaları vb. konular incelenmiş ve embriyo kültürüne ilişkin bazı metotlar ortaya konmuştur (Raghavan, 1980; Monnier, 1990a).

İki tip embriyo kültüründen sözedilmektedir (Raghavan, 1980):

1. Olgun tohum embriyolarının kültürü: Bu kültür oldukça kolaydır ve basit bir kültür ortamı ile başarılı sonuç alınmaktadır. Böylece embriyonik büyümeyi incelemek ve büyüme dönemlerini ortaya koymak, dormansi ve çimlenmenin metabolik ve biyokimyasal ayrıntılarını analiz etmek mümkün olmaktadır.
2. Olgunlaşmamış erken bölünme fazındaki proembriyoların kültürü: Bu tip kültür erken embriyo dönemlerinden itibaren embriyoların besin ihtiyaçlarının ortaya konulmasını ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Embriyonun izolasyonu oldukça zor bir iştir bu nedenle güç olan bir kültür yöntemidir.

Embriyo izolasyonunun zor olması nedeniyle embriyo kültürüne bir alternatif olarak tozlaşmış yumurtalık (ovary) kültürü ve olgunlaşmamış tohum taslağı (övil) kültürü de kullanılmaktadır (Şekil 10.1) (George, 1993).



Şekil 10.1. Tohum taslağı (övil) ve embriyo kültürü (George, 1993).

Embriyo kültüründe, gelişen tohumdan veya tohum taslağından olgun döneme yakın bir dönemdeki embriyolar izole edilirse bu embriyolar ototroftir ve enerji kaynağı içeren basit bir inorganik ortamda gelişebilir. Olgunlaşmamış embriyoları kültüre almada ise onların büyüme ve gelişmesine destek olabilecek bir kültür ortamı belirlemek çok önemli olmaktadır (Hu ve Zanettini, 1995).

Zigotik embriyolar bitki doku kültürlerinde eksplant olarak sık sık kullanılmaktadır. Örneğin, kallus kültürlerini başlatmada embriyolar çok yoğun olarak kullanılmakta ve bazı melezlerde uyumsuzluk engelini aşmak için de embriyo kültürü uygulanmaktadır. Doğada eşeysel melezlerin elde edilmesini sınırlandıran ve kısırlıkla sonuçlanan uyumsuzluklar söz konusudur (George, 1993):

1. Pre-zigotik uyumsuzluk: Polen çimlenmesi ve/veya polen tüpü büyümesi önlenir. Bu durumda zigot asla meydana gelmez. Bu uyumsuzluk laboratuvarla

in vitro tozlaşma (*in vitro* dölleme) olarak isimlendirilen tekniğin kullanılması ile aşılabilmektedir.

2. Post-zigotik uyumsuzluk: Zigotun meydana gelmesi fakat endosperm tarafından kabul edilmemesi durumudur. Böyle bir durumda embriyo beslenemez ve düşer. Bu sorun hibrit embriyonun *in vitro* kültürü ile birçok bitki türlerinde giderilebilmektedir.

Yukarıda belirtilen sorunun giderilmesine uygun olarak bu amaçla uygulanan embriyo kültürü “embriyo kurtarma” olarak belirtilmektedir. Embriyo kültürünün en önemli uygulama alanlarından biri de bu şekilde embriyo kurtarma tekniğidir.

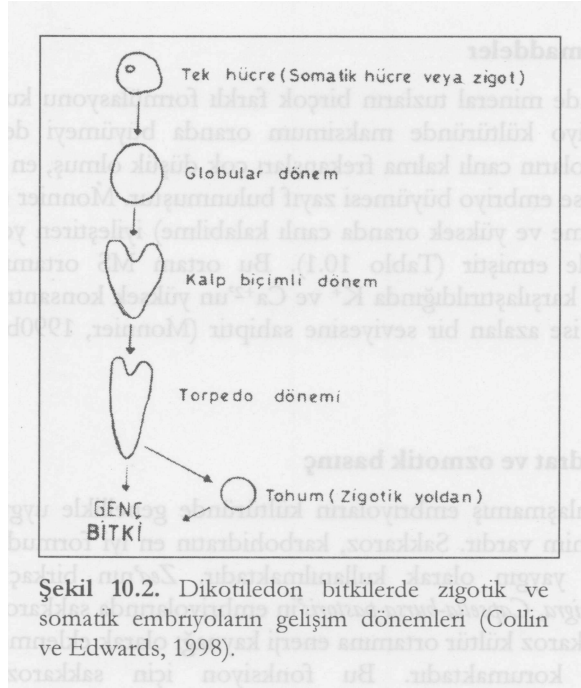
10.2. Embriyo Kültürü için Gereksinimler

Bir embriyonun gelişme dönemleri Şekil 10.2’de verilmiştir. Embriyo kültüründe en önemli konu farklı gelişme dönemlerinde kültüre alınan embriyoların düzenli olarak gelişimini destekleyici bir kültür ortamının belirlenmesidir. Embriyo kültürü ile ilgili ilk çalışmalar basit bir ortam üzerinde olgun embriyolardan bitki gelişimi konusunda olmuştur. Sonra olgunlaşmamış embriyoların kültürü ile ilgili çalışmalar da yapılmış ve kültüre alınan embriyonun gelişme dönemine göre kültür ihtiyaçları belirlenerek başarılı sonuçlar alınmıştır.

Heterotrofik embriyoların kültürü için besin ortamlarında mineral tuzlar, organik besinler ve büyüme düzenleyicilerinin bulunması gereklidir. Ayrıca ortamın ozmotik basıncı proembriyoların başarılı kültürü için kritik bir faktör olarak belirtilmektedir (Bhojwani ve Razdan, 1996). Embriyoların heterotrofik fazı sonuçlandırdığı ve ototrofik faza girdiği kritik dönem türlere göre değişmektedir.

10.2.1. Besin ortamı bileşimi

Embriyoların büyümesi üzerine farklı solüsyonların etkisi araştırılmış ve genellikle en iyi gelişmenin Murashige ve Skoog (MS) (1962) ve B₅ (Gamborg *ve ark.*, 1965) ortamlarında olduğu gözlenmiştir. Ancak, MS solüsyonunun küçük boyuttaki embriyolar için toksik etkisi de gözlenmiştir. Tablo 10.1’deki ortam bileşiminin embriyoların canlılığı üzerine çok iyi sonuç verdiği belirtilmektedir (Monnier, 1990b). Bürün ve Korkmaz (1999), olgun arpa embriyolarının kültüründe MS, V₂ MS, Randolph and Cox (RC) ve B₅ ortamlarını kullanmış ve embriyodan bitkicik gelişim yüzdelere göre RC (% 92.1), MS (% 91.3), V₂ MS (%87.7) ve B₅ (% 85.7) ortamları olarak sıralanmıştır.



Şekil 10.2. Dikotiledon bitkilerde zigotik ve somatik embriyoların gelişim dönemleri (Collin ve Edwards, 1998).

Tablo 10.1. *Capsella* embriyo kültürü için Monier (1990b) tarafından geliştirilen besin ortamı.

Kimyasal Madde	Miktar(mg/1)
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	880
NH ₄ NO ₃	825
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KCl	350
KH ₂ PO ₄	170
Na ₂ EDTA	14.9
FeSO ₄ .7H ₂ O	11.1
H ₃ BO ₃	12.4
MnSO ₄ .H ₂ O	33.6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	21.0
KI	1.66
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.5
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.05
Sakkaroz	120 000
Glutamine	400
Vitamin B ₁	1
Vitamin B ₂	1
Difco agar	7000

10.2.1.1. Mineral maddeler

Embriyo kültüründe mineral tuzların birçok farklı formülasyonu kullanılmaktadır. *Capsella*   n  n embriyo kültüründe maksimum oranda büyümeyi destekleyen MS ortamında embriyoların canlı kalma frekansları çok düşük olmuş, en az toksik olan Knop ortamında ise embriyo büyümesi zayıf bulunmuştur. Monnier (1990b) her iki durumu da (büyüme ve yüksek oranda canlı kalabilme) iyileştiren yeni bir mineral solüsyonu formüle etmiştir (Tablo 10.1). Bu ortam MS ortamının inorganik kompozisyonu ile karşılaştırıldığında K⁺ ve Ca²⁺'un yüksek konsantrasyonlarına ve NHE iyonlarının ise azalan bir seviyesine sahiptir (Monnier, 1990b; Bhojwani ve Razdan, 1996).

10.2.1.2. Karbohidrat ve ozmotik basınc

Olgun veya olgunlaşmamış embriyoların kültüründe genellikle uygun bir karbon kaynağına gereksinim vardır. Sakkaroz, karbohidratın en iyi formudur ve embriyo kültürü için çok yaygın olarak kullanılmaktadır. *Zea* n  n birkaç türü, *Datura stramonium*, *Pinus nigra*, *Capsella-bursa-pastoris*'m embriyolarında sakkarozun üstünlüğü belirlenmiştir. Sakkaroz kültür ortamına enerji kaynağı olarak eklenmesinin yanı sıra ozmolariteyi de korumaktadır. Bu fonksiyon için sakkarozun optimum konsantrasyonu embriyo gelişme dönemine göre değişmektedir. Olgun embriyolar %2 sakkarozda oldu  ka iyi büyüme gösterirler fakat daha genç embriyolar daha yüksek karbohidrata ihtiyaç duyarlar. Bu *in vitro* pr o embriyoların- yüksek ozmolaritedeki bir sıvıyla   vrelenmesi ile ilgili gözlemlerle de uyum i  erisindeidir. Embriyolar için kültür ortamı bitki doku kültürlerinde kullanılan genel ortamlardakilerden daha yüksek bir sakkaroz konsantrasyonu içerir. Kültürün sonunda bu konsantrasyonun azalması gerekir. Ayrıca sakkaroz konsantrasyonu embriyo yaşına göre belirlenmelidir. Pr o embriyoların kültürü için genellikle % 8-12 arasındaki sakkaroz uygun bulunmuştur (Bhojwani ve Razdan, 1996).

10.2.1.3. Aminoasit ve vitaminler

Embriyo kültürü ortamlarında azotun nitrat, nitrit veya amonyum formunda ilavesine rağmen değişik aminoasitlerin ortama ilave edilmesi de kültüre alman embriyoların büyüme ve gelişmesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Raghavan, 1980).

Aminoasiderin tek başına veya kombinasyon halinde kültür ortamına eklenmesi embriyo büyümesini uyarabilmektedir. Örneğin, glutamin   i  ekli bitkilerin dokuz farklı familyasına ait embriyoların büyümesini teşvik etmiştir. *Cruciferae* (*Capsella bursapastoris*, *Arabidopsis thaliana*, *Sisymbrium orientale*), *Resedaceae* (*Keseda odorata*), *Jeguminosae* (*Medicago tribuloides*, *Medicago orbicularis*), *Primulaceae* (*Anagallis arvensis*), *Solanaceae* (*Datura stramonium*), *Capparidaceae* (*Cleome viscosa*), *Chenopodiaceae*

(*Chenopodium albi*), *Graminae* (*Hordeum vulgare*) ve *Uliaceae* (*Allium cepa*) gibi familyalardan izole edilen embriyoların kültüründe glutamin büyüme asparagine göre önemli ölçüde ilerletmiştir. Hatta *C. bursa-pastoris*, *A. thaliana* ve *R. odorata*'ya ait embriyoların büyümesi üzerine asparajin engelleyici olmuştur (Raghavan 1980, Bhojwani ve Razdan, 1996). Genellikle glutamin embriyoların büyümesi için en uygun aminoasit olarak belirtilmektedir (Bhojwani ve Razdan, 1996). *Oryza sativa*'da proembriyoların *in vitro* gelişimi için ortama 14 aminoasitin ve hindistan cevizi sütünün ilavesinin vazgeçilmez olduğu belirtilmektedir (Zhao ve ark., 1998).

Yine bir aminoasit kompleksi olan kazein hidrolizat (CH), embriyo kültürü ortamlarında geniş çapta kullanılmakta ve embriyoların CH konsantrasyonlarına olan duyarlılığı türlere göre değişmektedir. Kazein hidrolizattaki büyüme teşvik edici faktörlerin tanımlanması için yapılan bir çalışmada 20 aminoasidin karışımı denenmiştir. Ayrıca buna ilaveten daha önceden bitki büyümesi için yararlı olduğu tespit edilen bu aminoasitlerin 10'u (alanin, arginin, aspartik asit, sistein, glutamik asit, glisin, lisin, fenilalanin, prolin, tyrosin) hem tek başlarına hem de birlikte denenmiştir. 20 aminoasit karışımının embriyo büyüme ve gelişiminde CH kadar etkili olduğu gösterilmiştir. Bu aminoasitlerin hiçbirisi bireysel olarak CH'a ya da benzer etkideki 20 aminoasit karışımına uygunluk göstermemiştir. Bu gözlemler aminoasitler arasında bir sinergistik interaksiyon olduğunu ortaya koymaktadır (Raghavan, 1980).

Vitaminler embriyo kültürü ortamlarında da kullanılmaktadır. Ancak bunlar her zaman gerekli değildir. Ototrofik olan tohum embriyoları hücrel biyosentez ile vitamin ihtiyaçlarını karşılayabilmektedir (Raghavan, 1980).

10.2.1.4. Doğal bitki ekstraktları

Farklı bitki embriyoları farklı besin ihtiyaçlarına sahiptir. Ayrıca, embriyo büyüklüğü ve gelişme dönemi arasındaki ilişki türlere göre değişmektedir. Örneğin; büyük tohumlu bir bitki de 500 µm uzunluğundaki embriyolar oldukça gençken, daha küçük tohumlu bir bitkide bu büyüklük karşılaştırmak olarak daha yaşlı bir dönemi göstermektedir.

Datura'nın post-torpedo şekilli embriyolarının %1 dekstrozu, %1 ağırlıkta, mineral tuz, gliko, tiamin, askorbik asit, nikotinik asit, B6 vitamini, adenin, suksinik asit ve pantotenik asit içeren bir ortamda normal fideler oluşturdukları gözlenmiştir. Tohum taslağındaki olgunlaşmamış embriyoların endosperm ile çevrelenmesinden dolayı daha genç embriyoları kültüre almak için yukarıda bahsedilen ortama otoklavlanmamış hindistan cevizi sütü eklenmiştir. Bu modifiye ortam üzerinde kültüre akınan 150-200 µm (kalp şekilli) çapında ve tozlaşmadan 10 gün sonraki genç embriyolardan gelişme gözlenmiştir. Hindistan cevizi sütü *Brassica juncea*'nın 35-80 µm uzunluktaki proembriyolarının kültürü için gerekli bulunmuştur (Bhojwani ve Razdan, 1996).

Tohum embriyolarının kültüründe hin distan cevizi sütünün kültüre alınan embriyolardan k  k, sürgün veya yaprak gibi özel organların büyümesini teşvik etd  gi gösterilmiştir. Diğer bitkilerin endosperm ekstraktları embriyo kültürü ortamlarına nadiren ilave edilmektedir. Bunların uyarıcı veya engelleyici etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Raghavan, 1980).

Hejazi ve ark. (1998) tarafından ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*, 2n= 6x=42) ve mısır (*Zea mays*, 2n=2x=20) ile melezlenerek haploid bitki üretimi imkanı araştırılmıştır. 100 mg/1 maya ekstraktı ilave edilen yarı kuvvetinde MS ortamı haploid bitki oluşumunda diğer ortamlardan üstün bulunmuştur.

Embriyo kültürü ortamlarında kullanılan diğer bir madde aktif karbondur. Kültüre alman organ tarafından salınan toksik maddeler veya ortamda iz miktarda mevcut olan engelleyici maddeleri absorbe etme yoluyla aktif karbonun embriyo büyümesini teşvik ettiği düşülmektedir (Raghavan, 1980).

Taxus chinensis olgun tohum embriyoları en iyi olarak B₅ ortamında ve litrede 500 mg NH₄NO₃, 250 mg KNO₃, 500 mg Ca (NO₃)₂.4H₂O, 200 mg KCl, 250 mg MgSO₄.VEEO, 550 mg KH₂PO₄, 1.0 g laktoalb  min hidrolizat, 100 mg vc içeren ortamda çimlenmiştir. % 20 şeker ve % 80 aktif karbon olumlu sonuçlar vermiştir (Chen ve ark. 1998).

10.2.1.5. Bitki büyüme düzenleyicileri

Oksin, gibberellin ve sitokinin gibi eksojen büyüme düzenleyicilerinin ayrı ayrı yada kombinasyon halinde uygulanması ile primordiyal k  k ve sürgünlerin gelişmesi ve morfogenesiste görülen modifikasyonlar araştırıcıları embriyo büyümesinde hormonların rolü üzerindeki araştırmalara sevk etmiştir (Raghavan, 1980).

Embriyo ve embriyo segmenderinin kallus oluşturması için genellikle bir oksin veya sitokinin, ya da her ikisine ihtiyaç duyulabilir. Bununla birlikte bazı bitkilerdeki dormansinin kırılması amacı dışındaki çalışmalarda kültüre alınmış olan olgun veya olgunlaşmamış embriyoların normal gelişimi için eksojen büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duyulduğu konusunda yeterli kanıt bulunmamaktadır (Bhojwani ve Razdan, 1996).

Oksinler: Oksin genellikle embriyo büyümesi için bir engelleyicidir. *Datura stramonium* embriyolarının büyümeleri   zerine IAA'nın bir dizi konsantrasyonlarının etkisinin incelendiği bir çalışma, oksinin genel engelleyici etkisine rağmen ekstrem olarak düşük konsantrasyonlardaki uygulamasının k  k primordium büyümesinin artmasını sağladığını ortaya koymuştur. Çeşitli bitki embriyolarından kallus üretimi için ortamda oksinin nisbeten yüksek konsantrasyonlarda olmasının önemi de bilinmektedir. Ortamın hormonal bileşiminin kontrolü ile kallus süresiz kültüre alınabilir veya kök, sürgün tomurcuğu ve yaprakları farklılaşmaya teşvik edilebilir (Raghavan, 1980).

Giberellinler: Kùltüre alınan embriyoların gelişme ve morfogenezis üzerine giberellinlerin etkilerine de dikkat çekilmektedir. Örneğın, pamuk embriyolarında (*Gossypium hirsutum*) giberellik asitin hücre bölünmesi ve gelişmesi ile kotiledonların büyümesini ilerlettiğı belirtilmiştir. Giberellik asit (GA) muamelesinin embriyoların karbohidrat ve azot içeriğini azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca, GA'nın IAA ve kinetin gibi diğer hormonlarla intereaksiyonu arpa embriyolarında koleorhizanın büyümesini teşvik etmiştir (Raghavan, 1980). Dormant tohumlardan alınan embriyolar üzerinde GA'in etkisi araştırılmış ve kimyasal inhibitörlerin çimlenmeyi engellediğı, *Protea compacta* ve *Comptonica peregrina* tohumlarında ise ortama GA eklenmesinin kùltürdeki embriyoların normal büyümelerini ve farklılaşmasını teşvik ettiğı belirlenmiştir (Raghavan, 1980).

S ito kininler: Embriyo morfogenezisi ve tohumlardaki embriyo dormansisinin üstesinden gelmek için sitokinin grubu hormonlar üzerinde de durulmuştur. Örneğın, *Capsella-bursa-pastoris*'m torpedo biçimli embriyolarının sıvı ortamlarda gelişmeleri üzerine, bir dizi kinetin konsantrasyonlarının etkilerinin incelendiğı bir çalışmada embriyoların kùltüre alınmasından 7 gün sonra embriyo uzunluğunun ölçülmesi sonucu 10 mg/1 kinetin ilavesinin kotiledon ve hipokotil büyümesini engellediğı ve kök taslaklarında nekroza yol açtığı belirlenmiştir (Raghavan, 1980). Tohum dormansisini kırmak üzere eklenen bileşikler için yapılan araştırmalar embriyo kùltüründe sitokininlerin kullanılmasına öncülük etmiştir. Araştırmacılar, soğuklama süresince tohumların sitokinin düzeylerindeki değişimlerini analiz ederek sitokininlerin diğer hormonal maddelerle birlikte embriyonun olgunlaşma sonrası dönemi boyunca metabolik olaylarda önemli bir rolü olduğı sonucuna varmışlardır (Raghavan, 1980).

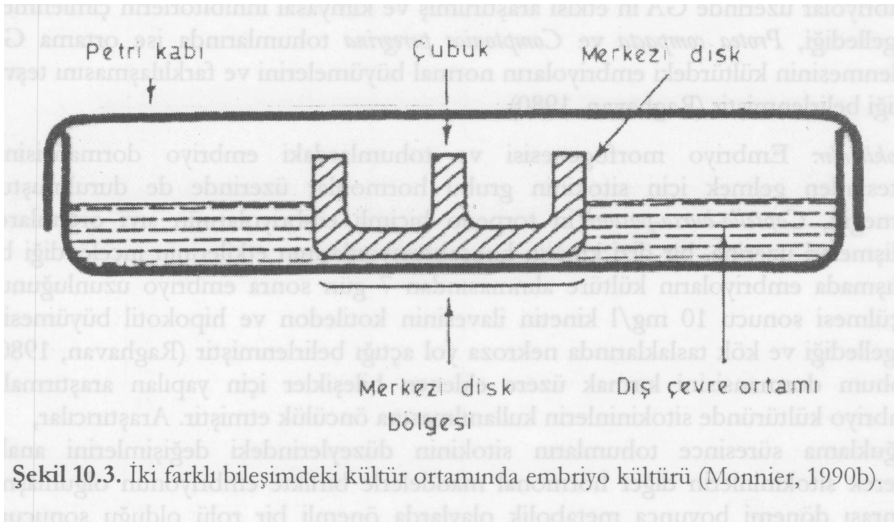
Diğer Maddeler: Embriyoların büyüme ve morfogenezisinde diğer hormonların etkileri üzerinde genellikle daha az araştırma vardır. Tohum dormansisini kırmada etilenin rolü geniş olarak bilinmektedir. Örneğın, olgunlaşma sonrasındaki *Malus domestica* tohumlarından alınan embriyoların kùltüründe % 0.01-0.1 etilen gazı büyümeyi ilerletmiştir (Raghavan, 1980).

ABA'nın bitki hücrelerindeki etkisi büyümeyi engelleyici yöndedir. Bu engelleyici etki hormonun RNA sentezi üzerindeki etkisinden ileri gelebilir.

Ortamda embriyoların gelişmesi sırasında kùltür ihtiyaçlarında devamlı bir değişim vardır. Örneğın Şekil 10.3'de gösterilen alet ile kùltür boyunca ortam kompozisyonun değişimi sağlanabilir. Bu alette embriyoları kùltüre almada 2 ortam kullanılabilir. Biri (merkezi disk ortamı) çok küçük embriyoların gelişimine izin veren bir solüsyonun bileşimi, diğeri (dış çevre ortamı) iyi gelişen embriyoların hızlı büyümesini sağlayan bir ortamdır (Tablo 10.1). Bu iki ortam arasında devamlı olarak bir difüzyon söz konusudur.

Ortamı petri kabına dökmeyden önce ağır bir cam kap petri kabının merkezine yerleştirilir (merkezi disk). Bunun çapı 30 mm'dir ve elle kolaylıkla tutabilmek için merkezinde bir çubuk vardır. Dış çevre ortamı sterilizasyon sonrası sıvı halde iken

merkezdeki kabın çevresine olmak üzere petri kabına dökülür. Agarlı ortamın soğuma ve katılaşmasından sonra merkezdeki kap (disk) kaldırılır ve bu şekilde elde edilen merkezdeki boşluk içerisine farklı kompozisyonlu ikinci ortam (merkezi disk ortamı) dökülür. Embriyolar merkezi disk ortamında kültüre alınır ve difüzyon sonucu zaman içerisinde değişik ortamların etkisi söz konusu olur (Şekil 10.3) (Monnier, 1990b).



Şekil 10.3. İki farklı bileşimdeki kültür ortamında embriyo kültürü (Monnier, 1990b).

10.2.2. Kültür koşulları

Embriyo kültüründe genel olarak ihtiyaç duyulan kültür koşulları aşağıda belirtilmiştir (Monnier, 1990b):

1. Büyüme odası sıcaklığı ve aydınlanması seçilen bitki türüne göre değişmektedir. Örneğin, *Capsella bursa-pastoris* için bitkiler 18 °C bir büyüme odasında devamlı aydınlıkta yetiştirilmiştir. Embriyo kültürü ise 25 °C kültür odasında Grolux floresan tüpler ile devamlı ışıktaki yapılmıştır. Bazı türlerin önce karanlıkta sonra aydınlıkta inkübe edilmesi daha uygun olmaktadır.
2. Kültür kabı olarak cam kültür kaplarının kullanılması embriyoların gözlenmesine olanak sağlaması bakımından daha uygun olmaktadır. Ayrıca tüm kaplar otoklavda (115 °C, 20 dakika) sterilize edilir.

10.3. Embriyo Kültürünün Uygulama Alanları

Zigotik embriyo kültürünün en yararlı ve güncel uygulama alanı istenen özellikleri taşıyan nadir bitkilerin yetiştirilebilmesidir. Embriyo kültürünün uygulama alanları

bazı araştırıcılar tarafından derlenen örneklele aşağıda verilmiştir (Monnier 1990a, 1990b; Hu ve Zanetini, 1995; Bhojwani ve Razdan, 1996):

10.3.1. Biyolojik temel çalışmalarda embriyo kùltürü

- a) Embriyo kùltürü temel embriyogenesi çalışmak için iyi bir olanaktır. Embriyogenesisteki çeşitli dñemler bu yolla analiz edilebilmektedir.
- b) Embriyo kùltürü ile embriyonal büyüme ihtiyaçları belirlenmektedir. Kısaca embriyo kùltürü, normal embriyogenesi için uygun besin isteklerini belirlemek, beslenmenin ve fitohormonların etkisini ortaya koymak için iyi bir aratırıdır.
- c) Zigotik embriyoların kùltürü tohum taslağında embriyonun büyümesindeki koşulları belirlememizi sağılamaktadır.

10.3.2. Tohumun imlenmemesi durumunda embriyo kùltürü

Tohum dormansisi ve tohum sterilitesi embriyo kùltürü ile kırılabilir. Bazı türlerdeki tohum dormansisi embriyoyu çevreleyen yapıda var olan kimyasal engelleyiciler veya mekaniksel dayanıklılık nedeniyledir. Böyle durumda embriyoların izole edilip besin ortamında kùltüre alınması ile dormansi ortadan kaldırılmaktadır. Tohum sterilitesi embriyoyu çevreleyen yapıların uyumsuzluğu nedeni ile olabilir. Böyle durumlarda da embriyo kùltürü ile canlı fideler elde edilmektedir. Çimlenme için paraziderin gerekli olduğı durumlarda da *in vitro*'a. parazite gerek olmadan çimlenme gerçekleşebilmektedir.

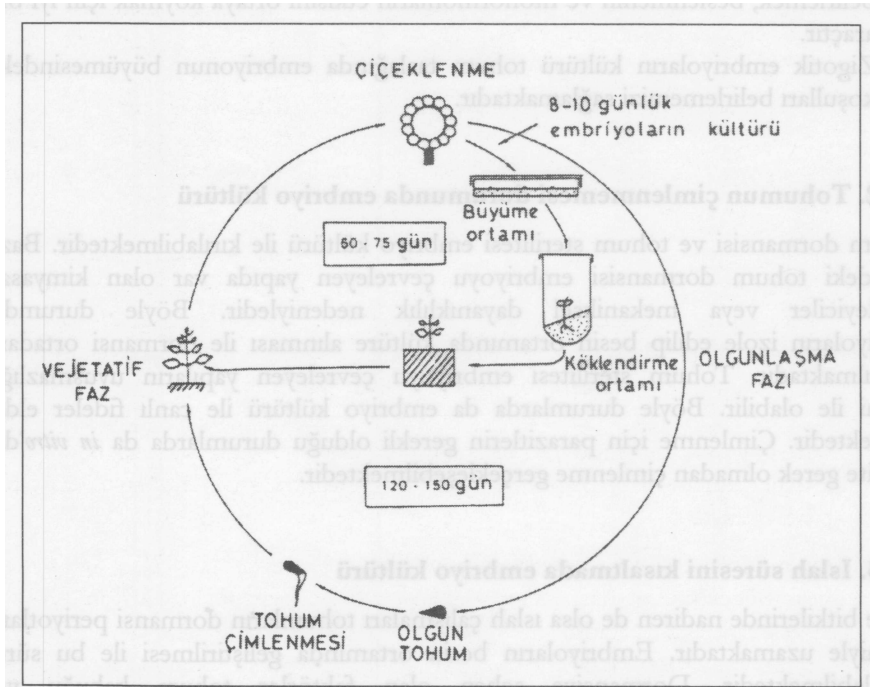
10.3.3. Islah süresini kısaltmada embriyo kùltürü

Bahçe bitkilerinde nadiren de olsa ıslah çalışmaları tohumların dormansi periyotları nedeniyle uzamaktadır. Embriyoların besin ortamında geliştirilmesi ile bu süre kısaltılabilmektedir. Dormansiye sebep olan faktörler tohum kabuğı ve endospermdeki endogen inhibitörler, düşük sıcaklık, özel ışık gereksinimleri gibi faktörler ise embriyonun kùltüre alınması ile bunlar giderilmektedir. Sert tohum kabuğı nedeniyle çimlenmenin geciktiğı durumlarda da embriyo kùltürü ile çimlenme hızlandırılmaktadır.

Olgun olmayan embriyoların izolasyonu ve kùltürü ile de ıslah programı kısaltılmaktadır. Örneğın, iris tohumları birkaç yıl süren bir dormansi periyodu geçirmektedir. Embriyo kùltürü kullanılarak irisin yaşam çemberi 2 veya 3 yıldan 1 yıla hatta 1 yıldan daha az bir süreye indirilmektedir. *Koşa* (gül) normal olarak bir yılda çiçeklenmeye ulaşmaktadır. Embriyo kùltürü ile 1 yılda 2 generasyon üretilerek ıslah çemberinin kısaltılması mümkün olmaktadır.

Malus türlerinde (dağ elması) toprağa ekilen tohumların çimlenmesi 9 ay almaktadır. Embriyo kültürlerinde ise çimlenme 48 saat içerisinde ba  layıp ve 4 haftada   a  ırtılabilecek büyüklükte fideler elde edilmektedir. 5 ay sonunda fideler yaklaşık 1 m y  ksekl  ğe ulaşmaktadır.

Soya ve ayçiçeğinde tohum olgunluğu dönemi yaşam çemberinin (120-150 gün) % 50-60'ını almaktadır. Ayçiçeğinin 10 günlük olgunlaşmamış embriyolarının *in vitro* kültürü yolu ile yaşam çemberi süresi yarıya indirilebilmiştir. Benzer olarak 7 ve 10-18 günlük embriyoların kültüre alınması ile ayçiçeğinde 1 yılda 4 generasyon alınabilmiştir (  ekil 10.4).



Şekil 10.4. Ayçiçeğinde olgunlaşmamış embriyoların kültürü ile yaşam çemberinin kısaltılması (Bhojwani ve Razdan, 1996).

10.3.4. Yaşamayan embriyoların kurtarılmasında embriyo kültürü

- Embriyoların yetersiz gelişmesi: Meyvenin çok hızlı olarak olgunlaşması ve embriyonun tam olarak gelişmesini sağ layamadığı durumdur. Böyle meyvelerin tohumlarından embriyolar çıkarılıp *in vitro* kültüre alındığı zaman çimlenir ve normal bitkiler üretilir (Monnier, 1990a).
- Hibrit embriyoların ya   ayamaması: Uzak akraba olan türler arası melezler   oğ unlukla başarısızdır, döllenme olmakla beraber hibrit embriyonun yaşamadığı görülmektedir. Bu duruma embriyo d   mesi veya abortus

denilmektedir. Bunun sebeplerinden biri endospermin gelişmemesi veya dejenere olmasıdır. Bu durumda embriyo beslenemediğinden dolayı ölür ve çimlenebilir tohumlar meydana getirmez. Hibrit embriyonun izolasyonu ve kültüre alınması ile yapay besin ortamı endospermin yerine geçebilmekte böylece hibrit embriyolar yaşıatılmaktadır.

Böyle başarısız melezlerde embriyonun potansiyel olarak normal büyüme yeteneğinde olduğunu, tam hibrit embriyoların düşme olayının başlamasından önce izole edilerek besin ortamında kültüre alınması ile yaşıatılabileceğini ve hibrit bitkilerin elde edilebileceğini göstermesi tarıma önemli katkılarda bulunmuştur. O zamandan bu yana embriyo kültür tekniği melezlemelerde döllenme sonrası engeller yüzünden normal olarak başarısız olan melezlerden hem tarımsal bakımdan önemli bitkileri elde etme hem de bahçe bitkilerini üretmek amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır. Örneğin, embriyo kültürü tekniği benimseninceye kadar *Ulium beriyi* ve *JL regale*'yi melezlemek için yapılan bütün çalışmalar başarısız olmuştur. *İL auratum* ile *JL speciosum-albüm* melezleri de olgunlaşmamış embriyoların kültürü ile elde edilmiştir.

Embriyo kültürü *Fabaceae* familyasında birçok türlerarası melezi üretmek için başarıyla uygulanmaktadır. Örneğin, *Melilotus officinalis* agronomik olarak önemli bir türdür fakat sığırlara zararlı olan kumarini yüksek miktarda içermektedir. Düşük miktarda kumarine neden olan genleri *M. officinalis*'e dahil etmek amacıyla *M. alba* ile melezleme yapılmış ve hibrit embriyo bir süre büyümüş fakat olgunlaşmaya ulaşamamıştır. Bu melezden embriyo kültürü yoluyla bazı hibrit bitkiler elde edilebilmiştir. *Trifolium* cinsinde de melez embriyonun beslenememesi nedeniyle melezlerin elde edilmesinin mümkün olmadığı durumlarda embriyo kültürü başarıyla uygulanmıştır.

Kültürü yapılan domatesin (*Lycopersicon esculentum*) yabani domatesle (*L. peruvianurn*) melezlenmesi, böceklerle ve hastalıklara dayanıklılığın yabani türden kültür türüne aktarılması amacını taşımaktadır. *JL peruvianurn* x *JL esculentum* melezi döllenme öncesi engeller yüzünden başarılı olmamıştır. Resiproğunda döllenme meydana gelmiştir fakat melez embriyonun düşmesi yüzünden yaşayabilir tohumlar alınamamıştır. Embriyo kültürü ile *JL esculentum* dişi ebeveyn olarak kullanıldığında bu melezden hibrit bitkiler üretilbilmiştir. Bu melezlerde "embriyo-kallus kültürü" de aynı amaçla kullanılmıştır. Embriyo-kallus kültürü aynı zamanda direkt bitki oluşturma yeteneğindeki embriyoların gelişmediği, *L. esculentum* x *JL ekilense* ve *JL esculentum* x *Solanum lycopersicoides* melezlemelerinden hibritlerin elde edilmesinde de kullanılmıştır.

Ory^a cinsinde de hastalık ve zararlılara dayanıklı yüksek verimli çeltik çeşitlerini ve uygun olmayan çevresel koşullara dayanabilirliğini geliştirme amacı ile türler arası melezler embriyo kültürü vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir.

Hordeum jubatum x *Secale cereale* cinsler arası (intergenerik) melezinde, hibrit tohumların döllenmeden 13-16 gün sonra tahrip oldukları gözlenmiş ve melezde yapılan histolojik

altında belirtilen bu yöntem arpa ıslahında kullanılmaktadır (Şekil 10.5) (Emiroğlu ve Gürel, 1993).

10.3.6. Embriyo kültürü ile tohum canlılıklarının hızlı test edilmesi

Embriyonun çimlenmesi ile gerçekleştirilen bu tohum canlılık testine diğer metodlara göre daha doğru ve güvenilir bir test olarak bakılmaktadır. (Bhoiwani ve Razdan, 1996).

10.3.7. Embriyo kültürü ile ender bitkilerin çoğaltılması

Ticari muzun yabancı bir akrabası olan *Musa balbisiana* tohumları doğada çimlenmemektedir. Bununla birlikte fideler embriyoların kültüre alınması ile kolaylıkla elde edilebilmektedir. Bazı hindistan cevizlerinde sıvı endosperm yerine yumuşak ve yağlı bir doku gelişmektedir. Bu tip hindistan cevizleri “makapuno” olarak adlandırılır ve bunların tohumları normal koşullar altında çimlenmede başarısız olmaktadır. *İn vitro* kültür tekniği kullanılarak makapuno embriyolarından bitkicikler yetiştirilmiştir. Bu yolla embriyo kültürü ile elde edilip tarlada yetiştirilen bitkilerin % 85’i makapuno cevizlerini taşımıştır (Bhojwani ve Razdan, 1996).

10.4. Embriyo Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler

Embriyo kültürü çalışmalarında başarıyı etkileyen bazı faktörler aşağıda belirtilmiştir.

1. *Genotip:* Diğer doku kültürü çalışmalarında olduğu gibi embriyo kültüründe de genotip etkisi söz konusudur. *In vitro* kültürde bazı türlerin embriyolarının gelişmesi çok kolay olurken bazı türlerde oldukça zordur.
2. *Embriyonun kültüre alındığı dönem:* Çok küçük embriyoların *in vitro* gelişmesi zordur. Embriyo *in vivo*’da ne kadar gelişmiş ise *in vitro*’daki gelişimi de o ölçüde daha kolay olmaktadır. Örneğin, *Brassica napus*’un erken globular dönem embriyolarının *in vitro* kültüründe embriyo olgunlaşma oranının embriyo boyutu ile ilişkisi gösterilmiştir. 30 (İm’den daha küçük embriyolar kültürde gelişmemiş ve 50 pm’den daha küçük embriyoların %3.7’si, 50 jLm’den daha büyük embriyoların ise %28.9’u fide meydana getirmiştir (Goralski ve ark., 1998).
3. *Besin ortamının bileşimi:* Olgun embriyolar basit bir ortamda gelişirken erken gelişme dönemindeki embriyolar daha komplike bir ortama gerek duymaktadır. Embriyo kültürü için geliştirilmiş çeşitli ortamlar bulunmaktadır.

4. *Kültür koşulları*: Embriyo kültüründe oksijen önemli bir faktördür. Bazı türlerin embriyo kültürlerinin önce karanlıkta inkübe edilmesi sonra aydınlığa alınması uygun olmaktadır. Kültürde optimum sıcaklık bitki türüne göre değişmektedir. Ayrıca, dormansiyi kırmak için soğuk uygulaması gerekebilir.
5. *Embriyoların izolasyonu*: Embriyoyu zedelemekten izole etmek özellikle erken gelişme dönemindeki embriyoların süspansiyonunun zarar görmemesi başarı için önemlidir.

10.5. Embriyo Kültürünün Uygulanması

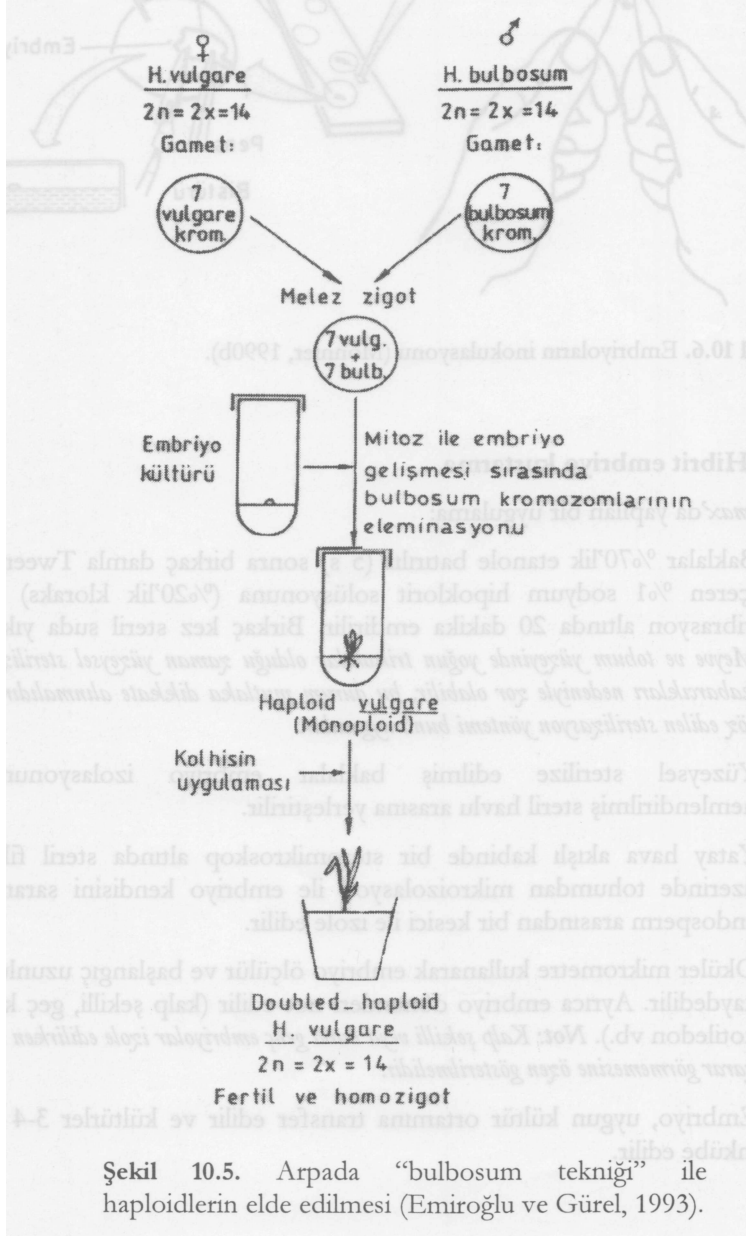
Tohum dormansisinin kırılması ve hibrit embriyoların yaşatılması amacı ile yapılan embriyo kültürü uygulamalarına ait birer örnek aşağıda verilmiştir (Hu ve Zanetdini, 1995). Embriyoların inokulasyonu ise Şekil 10.6' da gösterilmiştir.

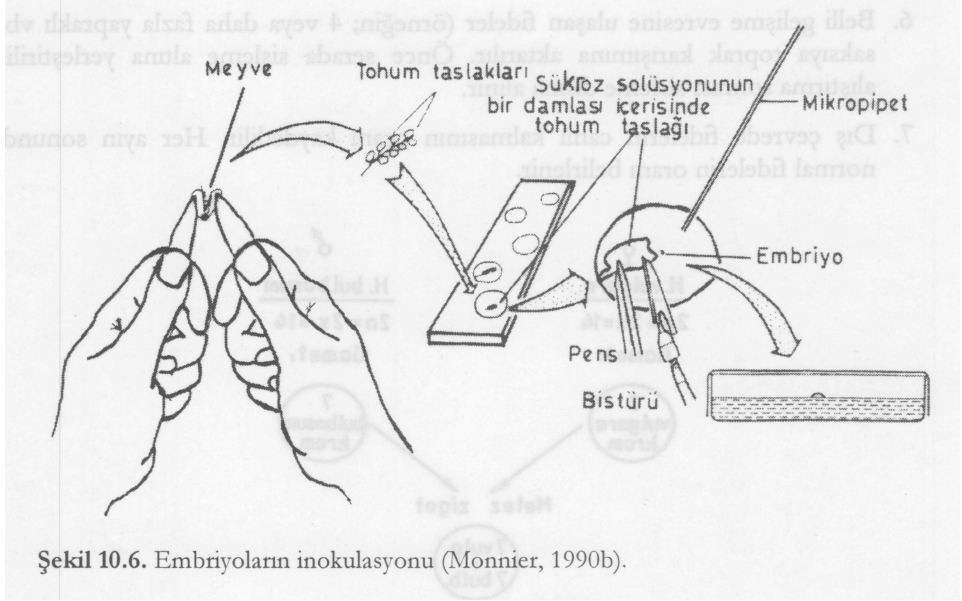
10.5.1. Tohum dormansisinin giderilmesi

Ilex crenata cv. Convexa'da yapılan bir uygulama:

1. Tohumu yıkama: Akan su altında plastik bir kafeste meyveler yıkanır ve meyve etinden tohumlar ayrılır.
2. Sterilizasyon: Tohumlar %0.5 sodyum hipokloritte (%10'luk kloraks) 5 dakika süreyle yüzeysel olarak sterilize edilir, sonra birkaç kez steril distile su ile çalkalanır ve tohumlardan embriyoyu ayırma işlemine geçinceye kadar steril distile suda bekletilir.
3. Embriyoyu izole etme: Yatay hava akışlı kabinde steromikroskop altında filtre kağıdı üzerinde tohumdan embriyoyu ayırma işlemine geçilir. Öncelikle tohumda mikropolar açıklık kısmı belirlenmeye çalışılır çünkü embriyo mikropolar açıklığa doğru yerleşmiş durumdadır. Steril keskin bir bistürü (bıçak) ile tohum yarılar, embriyo steril olarak izole edilir ve besin ortamının yüzeyine transfer edilir.
4. Kültürler ilk hafta karanlıkta inkübe edilir, sonra aydınlığa alınır. İnkübasyonun ilk ayı boyunca *in vitro* embriyonik gelişmeye ilişkin veriler kaydedilir. Kültürlerin gözlemleri 4 hafta için haftalık olarak steromikroskop altında yapılır. Kalp şekilli, geç kalp şekilli safha, torpedo, linear olgun dönem embriyo yüzdeleri ve çimlenme dönemleri olarak kaydedilir ve embriyo gelişim dönemi verileri histogram olarak sunulabilir. Ayrıca deforme olan kotiledonlar, kallus oluşumu gibi gelişim anormallikleri gösteren embriyoların oranı belirlenir.
5. Takiben fide gelişimi üzerine veriler kaydedilir.

6. Belli gelişme evresine ulaşan fideler (örneğin; 4 veya daha fazla yapraklı vb.) saksıya toprak karışımına aktarılır. Önce serada şişleme altına yerleştirilir, alıştırma sonrası şişleme dışına alınır.
7. Dış çevrede fidelerin canlı kalmasının oranı kaydedilir. Her ayın sonunda normal fidelerin oranı belirlenir.





Şekil 10.6. Embriyoların inokulasyonu (Monnier, 1990b).

10.5.2. Hibrit embriyo kurtarma

G y cine mayada yapılan bir uygulama:

1. Baklalar %70'lik etanole batırılır (5 s) sonra birkaç damla Tween deterjanı içeren %1 sodyum hipoklorit solüsyonuna (%20'lik kloraks) ultrasonik vibrasyon altında 20 dakika emdirilir. Birkaç kez steril suda yıkanır. *Not: Meyve ve tohum yüzeyinde yoğun trikomlar olduğu  aman yüzeysel sterilizasyon hava kabarcıkları nedeniyle %00 olabilir, bu durum mutlaka dikkate alınmalıdır. Yukarıda s    edilen sterilizasyon yöntemi buna uygundur.*
2. Yüzeysel sterilize edilmiş baklalar embriyo izolasyonuna kadar nemlendirilmiş steril havlu arasına yerleştirilir.
3. Yatay hava akışlı kabinde bir steromikroskop altında steril filtre kağıdı üzerinde tohumdan mikroizolasyon ile embriyo kendisini saran hüresel endosperm arasından bir kesici ile izole edilir.
4. Oküler mikrometre kullanarak embriyo     l r ve başlangıç uzunluğu olarak kaydedilir. Ayrıca embriyo dönemleri not edilir (kalp şekilli, geç kalp, erken kotiledon vb.). *Not: Kalp şekilli veya daha genç embriyolar igole edilirken s spensorum   arar g r memesine    en gösterilmelidir.*
5. Embriyo, uygun kültür ortamına transfer edilir ve kültürler 3-4 hafta için inkübe edilir.

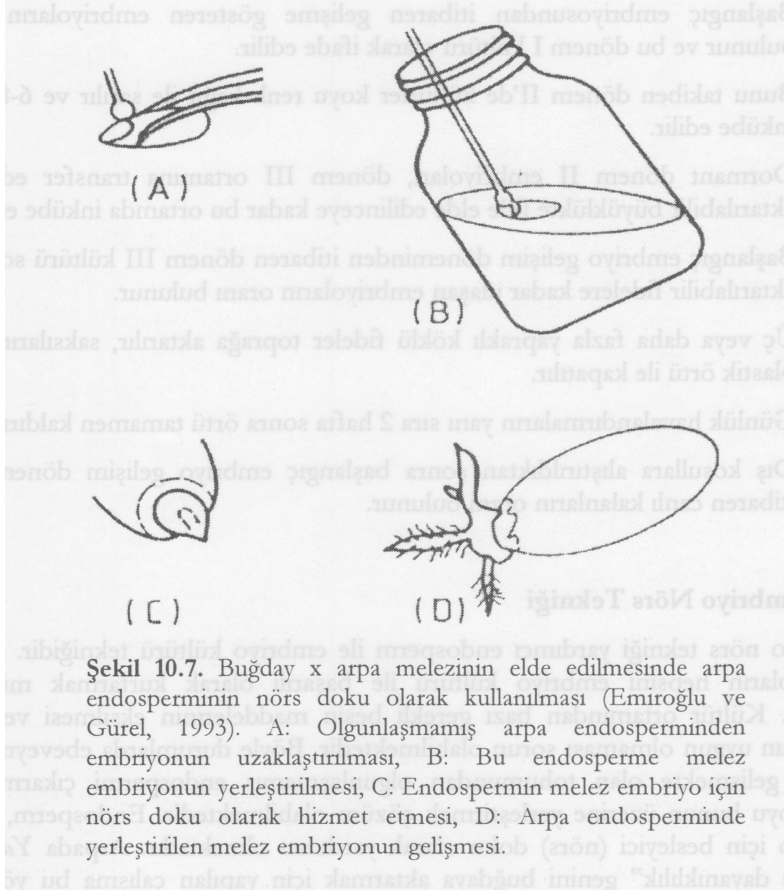
6. Başlangıç embriyosundan idbaren gelişme gösteren embriyoların oranı bulunur ve bu dönem I kùltürü olarak ifade edilir.
7. Bunu takiben dönem H'de kùltürler koyu renk kağıt ile sarılır ve 6-8 hafta inkübe edilir.
8. Dormant dönem II embriyoları, dönem III ortamına transfer edilir ve aktarılabılır büyüklükte fide elde edilinceye kadar bu ortamda inkübe edilir.
9. Başlangıç embriyo gelişim döneminden itibaren dönem III kùltürü sonunda aktarılabılır fidelere kadar ulaşan embriyoların oranı bulunur.
10. Uç veya daha fazla yapraklı köklü fideler toprağı aktarılır, saksıların üzeri plastik örtü ile kapatılır.
11. Günlük havalandırmaların yanı sıra 2 hafta sonra örtü tamamen kaldırılır.
12. Dış koşullara alıştırdıktan sonra başlangıç embriyo gelişim döneminden itibaren canlı kalanların oranı bulunur.

10.6. Embriyo Nörs Tekniğı

Embriyo nörs tekniğı yardımcı endosperm ile embriyo kùltürü tekniğıdir. Düşen embriyoların hepsini embriyo kùltürü ile başarılı olarak kurtarmak mümkün değildir. Kùltür ortamından bazı gerekli besin maddelerinin eksilmesi ve besin ortamının uygun olmaması sorun olabilmektedir. Böyle durumlarda ebeveynlerden birinin gelişmekte olan tohumundan olgunlaşmamış endospermi çıkarmak ve embriyoyu bunun üzerine yerleştirmek çözüm olabilmektedir. Endosperm, melez embriyo için besleyici (nörs) doku olarak yardımcı olmaktadır. Arpada Yd? “sarı cüceliğı dayanıklılık” genini buğdaya aktarmak için yapılan çalışma bu yöntemle örnek olarak gösterilmektedir. Buğday x arpa tozlaşmasında döllenme gerçekleşmektedir ancak, oranı düşük olmaktadır ve bu embriyolar kùltüre alınmazlarsa düşmektedir. Kùltürde de bu embriyoların yaşama oranı düşüktür. Gelişmekte olan arpa tohumlarının embriyoları çıkarıldıktan sonra, çıkarılan embriyonun yerine melez embriyoların yerleştirilmesi ve kùltüre alınması ile yaşayabilen embriyoların oranı artırılmıştır. Bu yöntem şematik olarak Şekil 10.7’de gösterilmiştir (Emiroğı ve Gürel, 1993).

10.7. Embriyo - Kallus Hibritleri

Kùltüre alınan bir embriyo aynen tohum çimlenmesinde olduğı gibi bir bitki meydana getirmektedir. Fakat eğer embriyo önce bir kallus meydana getirir, kalkıştan farklılaşma ile bitkiler elde edilirse birden fazla sayıda bitki elde edilebilmektedir. Kùltüre akan embriyo melez ise bir embriyodan kallus aracılığıyla fazla sayıda melez bitki elde edilmektedir (Emiroğı ve Gürel, 1993).



10.8. Sonuç

Embriyo kültürü, embriyonal büyüme ve farklılaşma üzerine besinlerin, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve diğer kimyasal ve fiziksel faktörlerin etkilerini incelemek için yararlı bir tekniktir. Ayrıca, agronomik olarak önemli bitkilerin, bahçe bitkilerinin, orman türlerinin olgunlaşmamış embriyolarından bitkilerin geliştirilmesi ile türler ve cinsler arası melezler elde edilebilmektedir. Böylece   r  nlerin iyileştirilmesinde biyoteknolojik metodların uygulama alanı önemli ölçüde genişlemektedir. Bazı türlerde tohum dormansisinin üstesinden gelinmesi de bu teknik ile başarılmaktadır.

Kaynaklar

- Angra DC, Barbosa MM, Prestes AM, Fernandes MIB (1999) Embryo culture of backcrosses between *Triticum aestivum* Thell. and *Agropyron elongatum* Hoşt. Beauv. Pesquisa. Agropecuaria-Brasileira, 34(2): 209-215.
- Bhojwani, SS and MK Razdan (1996) Plant Tissue Culture: Theary and Practice, Revised Edition, pp. 297-335, Elsevier Science, Amsterdam.
- Bürün B, Korkmaz A (1999) Arpa (*Hordeum vulgare* L.) embriyo kùltürü üzerine bir araştırma (basılmamış).
- Chen YQ, Dai JG, Zhu WH (1998) *In vitro* culture of mature embriyo of Chinese yew (*Taxus chinensis*). Plant Physiol. Comm., 34:3,191-193.
- Collin HA, Edwards S (1998) Plant Celi Culture. BIOS Scientitic Publishers Limited, UK.
- Dorrestein B, Baum M, Malhotra RS, Dorrestein B (1998) Interspecific hybridization between cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and the wild annual species *C. judaicum* Boiss., *C. pinnatifidum* Jaub. and sp., and *C. bijugum* K. H. Rech. 3rd European Conference on Grain Legumes, pp. 362-363, Valladoid, Spain, 14-19 November 1998.
- Emiroğlu Ü, Gürel A (1993) Bitki ıslahında modern biyoteknoloji. The Biotechnology Revulation, Short Course, February 8-12, 1993, Bornava, İzmir.
- George EF (1993) Plant Propagadon by Tissue Culture, Part 1, The Technology, Exegetics Ltd., Edington, England.
- Goralski G, Przywara L, Liu CM (1998) *In vitro* culture of early globular-stage embryos of *Brassica napus* L. Açta Biologica Cracoviensia, Series Botanica, 40: 53-60.
- Hejazi SMHZ, Zeinali H Poor AH (1998) Study of different factors in wheat haploid producdon through Crossing with maize. IranianJ. Agri. Sci., 29(1): 207-225.
- Hu CY, Zanettini MHB (1995) Embriyo culture and embriyo rescue for wide cross hybrids. In: Gamborg OL, Phillips GC (eds), Plant Celi Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods, pp. 129-140, Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- Monnier M (1990a) Zygotic embriyo culture. In: Bhojwani SS (ed), Plant Tissue Culture: Applications and Limitations, pp. 366-393, The Netherlands.
- Monnier M (1990b) Culture of zygotic embryos of higher plants. In: Pollard JW, Walker JM (eds), Plant Celi and Tissue Culture, Methods in Molecular Biology, Vol. 6, pp. 129-139, The Humana Press, USA.
- Pulida I, Rodriguez LE, Mosquera T, Fischer G, Angarita A (1999) Rescue and culture of immature sexual embriyos in two crosses of *Astroemeria* ('Saxony' x 'Tiara' and 'Saxony' x A.zula'). Acta-Hort., 482: 299-304.
- Raghavan V (1980) Embryo culture. In: Vasil IK (ed), Perspectives in Plant Celi and Tissue Culture, pp. 209-236, Academic Press, Newyork.
- Sarma D, Konwar BK, Deka PC (1999) Application of embriyo rescue in japonica x indica rice hybridization. Oryza, 36(1): 35-3.

B. Bürün, A. Gürel

Zhao J, Zhou C, Yang HY (1998) *In vitro* development of early proembryos and plant regeneration via microculture in *Oryza sativa*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 55(3): 167-174.

Bölüm 11

Somaklonal Varyasyon

Betül Bürün

Muğla Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü - MUĞLA
e-posta: bbetul@mu.edu.tr

11.1. Giriş

Somatik hücrelerin *in vitro* rejenerasyonu mitotik bölünme ile gerçekleşmektedir ve bu bir eşeysiz (aseksüel) üretilir. Klonal çoğal tim amacı ile kullanılan *in vitro* teknikler mikroçoğaltım teknikleri olarak da ifade edilmektedir. Amaç, aynı genetik yapıda bitkileri üretmektir. Ancak, bu tekniklerde beklenmeyen ve kontrol edilemeyen varyasyonlar da ortaya çıkmaktadır. Bu tür varyasyonlar doğal olarak meydana gelmektedir ve bunlar ya hücrelerdeki genetik değişimler yada hücre ve dokulardaki geçici değişimler olarak ifade edilmektedir. Mikroçoğaltım amacı ile yürütülen çalışmalarda varyasyonlar istenmez. Bu nedenle mikro çoğal tımda en güvenilir doku kültürü tekniklerinin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Fakat yine de hangi teknik kullanılırsa kullanılsın mikroçoğaltıma boyunca genetik değişimin ortaya çıkma olasılığı her zaman bulunmaktadır. Kültüre alınan hücrelerde çok yaygın olarak görülen ve mikroçoğaltımda istenmeyen bu fenotipik ve genotipik varyasyonlar bitki ıslahında büyük önem taşımaktadır. Bitki ıslahında doğal varyasyonun daraldığı veya varyasyon meydana getirmenin zor olduğu durumlarda avantajlı olarak değerlendirilen bu varyasyon yeni bir kaynak olarak görülmektedir ve doku kültürlerinde ortaya çıkan bu kalıtsal değişikliklerin tümü 'somaklonal varyasyon' olarak tanımlanmaktadır (George, 1993).

Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (2001) Bitki Biyoteknolojisi I - Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi

Somaklona varyasyonun nedenleri ve yararlanma olanakları üzerinde yoğun çalışmalar yürütölmektedir. Bu bölümde de bitki doku kültürlerindeki somaklona varyasyonun nedenleri ve bu varyasyondan bitki ıslahında yararlanma konuları ele alınacaktır.

11.2. *In Vitro* Doğal Varyasyonlar

Doku kültüründe pro toplaş dardan gelişen bitkiler “protoklon”, kalkıştan rej enere olan klonlar “kalliklon” olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra somatik hücrelerden herhangi bir doku kültürü tekniği ile elde edilen tüm bitkiler “somaklon” sözcüğü ile ifade edilmeye başlanmıştır (George, 1993). Buna göre pro toplaş ttan gelişen bitkilerdeki varyasyona “protoklonal varyasyon”, anter kültüründen elde edilen bitkiciklerde gözlenen varyasyona ise “gametoklonal varyasyon” denilmektedir. Fakat genel olarak hepsi için “somaklonal varyasyon” sözcüğü de kullanılmaktadır. Bu nedenle somaklonal varyasyon doku kültürlerinde ortaya çıkan kaktsal değişiklikler olarak tanımlanır. Doku kültürlerinde kalıtsal olmayan değişiklikler de görülmektedir. Bunlar “epigenetik varyasyonlar” olarak adlandırılmaktadır (George, 1993; Karp, 1994).

Kültüre alman hücre ve dokular ile rej enere olan bitkilerde sık sık s tabii olmayan değişimlere de ras Banmaktadır. Bu değişimlerin nedenleri tam olarak bilinmemekle beraber mutasyon, gen amplifikasyonu gibi nedenlerle meydana geldiği belirtilmektedir. Genetik materyaldeki bu stabil olmayan bazı değişimler eşeysel (seksüel) melezlemelerle döllere aktarabilmektedir (George 1993).

Gamederin eşeysel yollarla birleşmesi olmadan hücrede bir değişim olursa mutasyona uğradığı belirtilmektedir. Mutasyonlar, karyotipdeki değişimler ile, kromozom sayısı veya yapısındaki değişimlerle veya bir yada daha fazla genin pozisyonundaki değişimlerle ortaya çıkabilir. Canlı organizmalarda bu yolla oluşabilecek spontan mutasyonlar gibi *in vitro* kültür boyunca da bir takım mutasyonlar meydana gelmektedir. Bu mutasyonların bazıları bitki ıslahı için yararlı olabilir ve bunlardan ıslah programlarında yararlanılmaktadır.

Somaklonal varyasyonlar ile klasik yapay mutasyonların sebep olduğu varyasyonlar arasındaki farklar aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Van De Bulk, 1991, George, 1993):

1. Somaklonal mutasyonların frekansı kimyasal ve fiziksel mutagen uygulamalarıyla elde edilen mutasyonlardan daha yüksektir.
2. Mutasyonlar genellikle dominanttan resesife doğru olmaktadır. Mutagen uygulamaları ile elde edilen mutasyonlarda dominantların frekansı düşüktür. Oysa somaklonlar arasında dominant mutasyonların oranı daha yüksektir.

3. Haploid bitki kùltùrlerinden elde edilen mu tan t hùcrelerde hem dominant hem de resesif mutasyonlar hemen görùlebilmekte ve homozigot mutant bitkiler elde edilebilmektedir.
4. Somaklona l varyasyonun hùcre düzeyinde seleksiyonu da başka bir avantajdır. Örneğ in, tütünde kùltür ortamına tuz ilave edilerek bu koşullarda yaşama yeteneğ i iyi olan tuza toleranslı hùcrelerden bitkiler rejenere edilmiştir.

Diğ er taraftan mutandarm *in vitro?*de seleksiyonu *in virdya* göre bazı üstünlüklere sahiptir:

- a. *In vitro?*de seleksiyon bütün bir yıl boyunca yapılabilir.
- b. Deneme ortamı devamlı olarak kontrol altında tutulabilir.
- c. Tarla yada sera şartları için söz konusu olan bazı riskler *in vitro?*da yoktur. *In vitro* çalışmalar daha kısa sürede yapılabilir.

In vitro seleksiyonun bu üstünlüklerinin yanı sıra, kùltüre alınan hùcrelerden bitki rejenerasyonu frekansının düşük olması ve özellikle kùltürde belirlenen ekstrem koşullara toleransın hùcre ve bitki düzeyinde farklı olması da dezavantajlarıdır (Bürün, 1996).

11.2.1. Somaklona l ve epigenetik varyasyon

Doku kùltürlerinde ortaya çıkan kalıtsal değ işiklikler somaklona l varyasyon, kalıtsal olmayan değ işiklikler de epigenetik varyasyon olarak ifade edilmektedir. Epigenetik ve somaklona l varyasyon arasındaki farklar aşağ da verilmiştir (De Klerk, 1990):

1. Somaklona l varyasyon kalıtsaldır yani dôle geçer, epigenetik varyasyon ise dôle aktarılamaz.
2. Bitki yaşamı boyunca epigenetik varyasyon tersine dönebilir, oysa somaklona l varyasyon tersine çevrilemez.
3. Somaklona l varyasyon çoğ unlukla adventif meristemlerden meydana gelen bitkilerde görülürken, epigenetik varyasyon hem bu bitkilerde hem de apikal/aksiller meristemlerden meydana gelen bitkilerde gözlenebilir.
4. Epigenetik varyasyon önceden tahmin edilebilir, oysa somaklona l varyasyon bilinemez (genellikle aynı koş ullar aynı tip epigenetik varyasyona yol açarken aynı koş ullarda aynı tip somaklona l varyasyon meydana gelmez).
5. Epigenetik varyasyon bir fizyolojik tepki, somaklona l varyasyon ise tesadüfen ortaya çıkmaktadır.

11.3. Doku Kültürü Tekniklerinin Varyasyonda Etkileri

Doku kültürlerinden elde edilen bitkilerin fenotipik ve genetik açıdan değişme olasılıkları bitkiciklerin hangi metoda üretildiğine bağlıdır. Söz konusu bu bitki üretim metodarı  ekil 11.1'de verilmiştir.

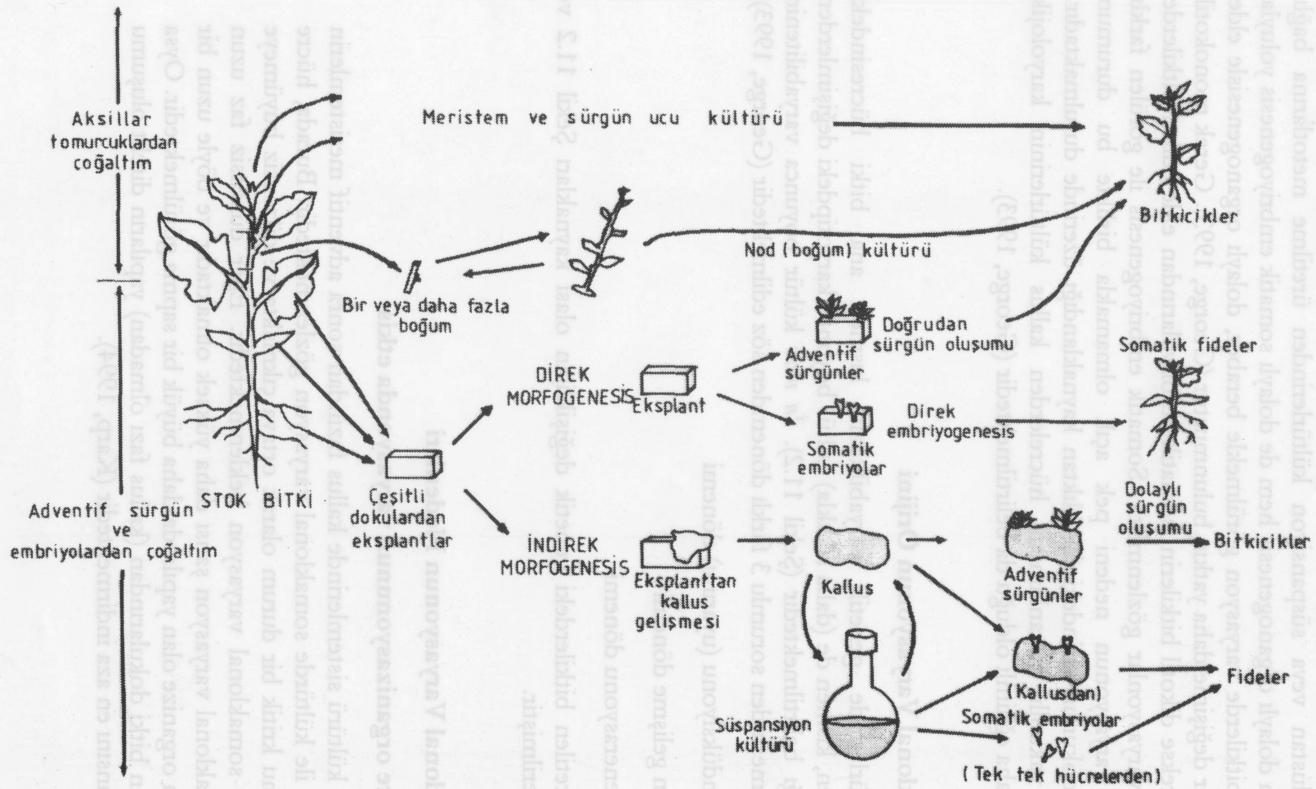
Mikroçoğaltımda ortaya çıkan genetik değişikliklerden sakınmanın en güvenilir yöntemleri direkt sürgün oluşumu, direkt embriyogenesis, boğum (nod) ve sürgün kültürüdür ( ekil 11.1). Sürgün kültürlerinde görülen varyasyonlar muhtemelen ansızın oluşan mutasyonlardandır. Görülen çoğu değişiklikler geçici özelliktedir. Bunların genotipten mi yoksa epigenetik mi olduğu dikkatli bir analiz yapılmadan belirlenemez. Sürgün kültürlerinden elde edilen ve genetik açıdan farklı bitkiler aksiller tomurcukdan ziyade, taban kallusundaki rasgele tomurcuklardan gelişen sürgün oluşumuna bağlı olmaktadır (George 1993).

Hücrelerin totipotent olması nedeniyle somatik hücrelerden bitki rejenerasyonu ortaya çıkmaktadır. Bu yetenekteki bir hücre farklılaşmamış bir hücre yığını meydana getirip sonra tekrar farklılaşarak tam organizasyonlu bireyleri meydana getirmektedir. Böyle bir yöntemde varyasyon meydana gelir ve varyasyonun derecesi doku kültürü tekniğine göre değişmektedir (George, 1993).

Fenotipik varyabilite tüm cinslerin hücre süspansiyon kültürlerinde ve kallus kültürlerinde yaygın olarak görülmektedir. Mutasyonlar, direkt organogenesis veya somatik embriyogenesis te daha az görülmekte, kallus kültürlerinden elde edilen bitkilerde ise (dolaylı/indirekt rejenerasyon) ise daha sık görülmektedir. Bu genetik değişimler genellikle kalıtsaldır (George 1993).

Kallus Kültürleri: Düzensiz (organize, olmamış) kültürlerde (kallus kültürleri vb.) somaklonal varyasyonun ortaya çıkma frekansı yüksektir. Yani genetik açıdan farklı bitkiler ortaya çıkmaktadır. Ama kallus ve süspansiyon kültürlerinden elde edilen tüm bitkilerin orijinal stok bitkiden genetik açıdan farklı olması da mümkün değildir. Şekil 11.2'de gösterildiği gibi bazı durumlarda bir kültür genetik yapısını muhafaza ederken, bazen sadece bir bölümü genetik açıdan değişik hücrelerden meydana gelmiş olabilir. Bitkinin genetik yapısının, onun doku kültürlerinden oluşan somaklonal varyasyonun derecesi üzerinde güçlü bir etkisi bulunmaktadır. Doku kültürü teknikleri ile orijinal ana bitkiden daha üstün bitkilerin elde edilebilmesi bitki ıslahı açısından çok büyük önem taşımaktadır (George, 1993).

Yarı Düzenli Kültürler: Düzenli meristematik merkezleri içeren kültürler genetik açıdan normal bitkiler vermektedir. Sürgün kültürlerinde sürgünün tabanında şekillenen kallus çoğunlukla yarı düzenlidir ve bu durum somaklonal varyasyona sebep olmaktadır (George, 1993).



Şekil 11.1. Temel mikroçoğaltım metodları (George, 1993)

Rejenerasyon Metodu: Rejenerasyon edilen bitkiler arasındaki genetik değişim derecesi kalliştan veya süspansiyon kültürlerinden üretilme metodlarına bağk olabilir. Hem dolayk organogenesis hem de dolayk somatik embriyogenesis yoluyla elde edilen bitkilerde varyasyon görülmekle beraber, dolayk organogenesisle elde edilen bitkiler değişime daha yatkın bulunmuştur (George, 1993). Gerek monokotil bitkilerin gerekse dikotil bitkilerin, somatik embriyolarından elde edilen bitkilerde somaklonal varyasyonlar gözlenmiştir. Somatik embriyogenesis ile görülen farkk somaklonal varyasyonun nedeni pek açık olmamakla birlikte bu durumun embriyonik dokunun tipindeki farklılıktan kaynaklandığı üzerinde durulmaktadır. Genişlemiş vakuollü parankimatik hücrelerden kallus kültürlerinin karyolojik değişikliğe daha eğilimli olduğu da belirtilmektedir (George, 1993).

11.4. Somaklonal Varyasyonun Orijini

Doku kültürlerinde genetik varyabikentin kısmen ana bitki hücresindeki değişimlerden, kısmen de (daha sıklıkla) kültür boyunca karyotipdeki değişimlerden kaynaklandığı belirtilmektedir (şekil 11.2). * n vitro* kültür boyunca varyabikentin meydana gelmesinden sorumlu 3 farkk dönemden söz edilmektedir (George, 1993):

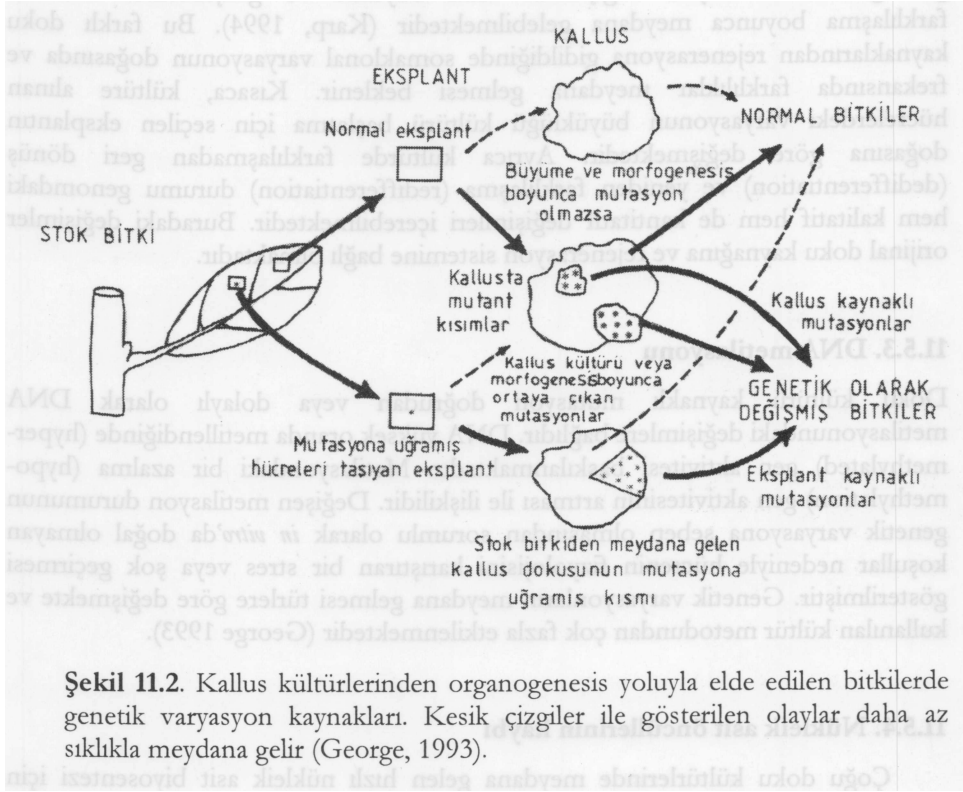
- a) Kültür indüksiyonu (uyarımı) dönemi
- b) Kültürün geçişme dönemi
- c) Bitki rejenerasyonu dönemi

Kalliştan üretilen bitkilerdeki genetik değişikliğin olası kaynakları şekil 11.2 ve 11.3'de gösterilmiştir.

11.5. Somaklonal Varyasyonun Nedenleri

11.5.1. Hücre organizasyonunun varyasyonda etkisi

 eşidi doku kültürü sistemlerinde kallus fazından sonra adventif meristemlerin formasyonu ile kültürde somaklonal varyasyon gözlenmektedir. Burada, hücre organizasyonu kritik bir durum olarak ortaya çıkmakta ve düzensiz büyümeye bağk olarak somaklonal varyasyon beklenmektedir. Eğer düzensiz faz uzun sürerse somaklonal varyasyon şansı daha yüksek olmaktadır ve böyle uzun bir fazdan sonra organize olan yapılarda daha büyük bir sapma görülmektedir. Oysa kültüre akan bitki dokularından (kallus fazı olmadan) yapıların direkt oluşumu kararsızlık şansını en aza indirmektedir (Karp, 1994).



11.5.2. Doku kaynağındaki varyasyon

Donör bitki orijinindeki değişimler: Somaklona varyasyon donör bitkide meydana gelen somatik mutasyonlardan ortaya çıkmaktadır. Bitkilerin vejetatif parçaları aynı genetik potansiyele sahip hücreleri içermektedir. Fakat bitkide farklı genetik yapıları hücreler de bulunabilmektedir. Böyle genetik olarak farklı hücreleri taşıyan stok bir bitkinin dokularından kültür başlatılırsa genetik olarak değişik bitkilerin elde edilmesi mümkün olmaktadır. Bu şekilde genetik ve fizyolojik potansiyeli farklı olan hücrelerin bileşimi kimera olarak tanımlanmaktadır (Şekil 11.4).

Eksplant kaynaklı varyasyon: Hücre normal bir mitoz bölünme geçirmezse yani, sitoplazma bölünmesi gerçekleşmeyip kromozomlar aynı hücre içinde duplika olursa bu endoreduplikasyon olarak ifade edilmektedir. Böylece kromozom sayısı katlanmış hücreler ortaya çıkmaktadır. Böyle bir bitkinin somatik dokuları arasında farklı kromozom sayısına sahip hücrelerin varlığı polisomati olarak isimlendirilir. Olgun bir bitkinin bazı kısımları diğerlerinden polisomatik olmaya daha duyarlıdır. Örneğin, meristemde ve sporofitik üretkenlikte olan dokularda genellikle polisomati meydana gelmez. Endopoliploidi, politeni ve DNA dizisinde eksilme

gibi genomdaki büyük değişmeler bitki büyüme ve gelişmesinde somatik farklılaşma boyunca meydana gelebilmektedir (Karp, 1994). Bu farklı doku kaynaklarından rejenerasyona gidildiğinde somaklonal varyasyonun doğasında ve frekansında farklılıklar meydana gelmesi beklenir. Kısaca, kültüre alınan hücrelerdeki varyasyonun büyüklüğü kültürü başlatma için seçilen eksplantın doğasına göre değişmektedir. Ayrıca kültürde farklılaşmadan geri dönüş (dedifferentiation) ve yeniden farklılaşma (redifferentiation) durumu genomdaki hem kalitatif hem de kantitatif değişimleri içerebilmektedir. Buradaki değişimler orijinal doku kaynağına ve rejenerasyon sistemine bağlı olmaktadır.

11.5.3. DNA metilasyonu

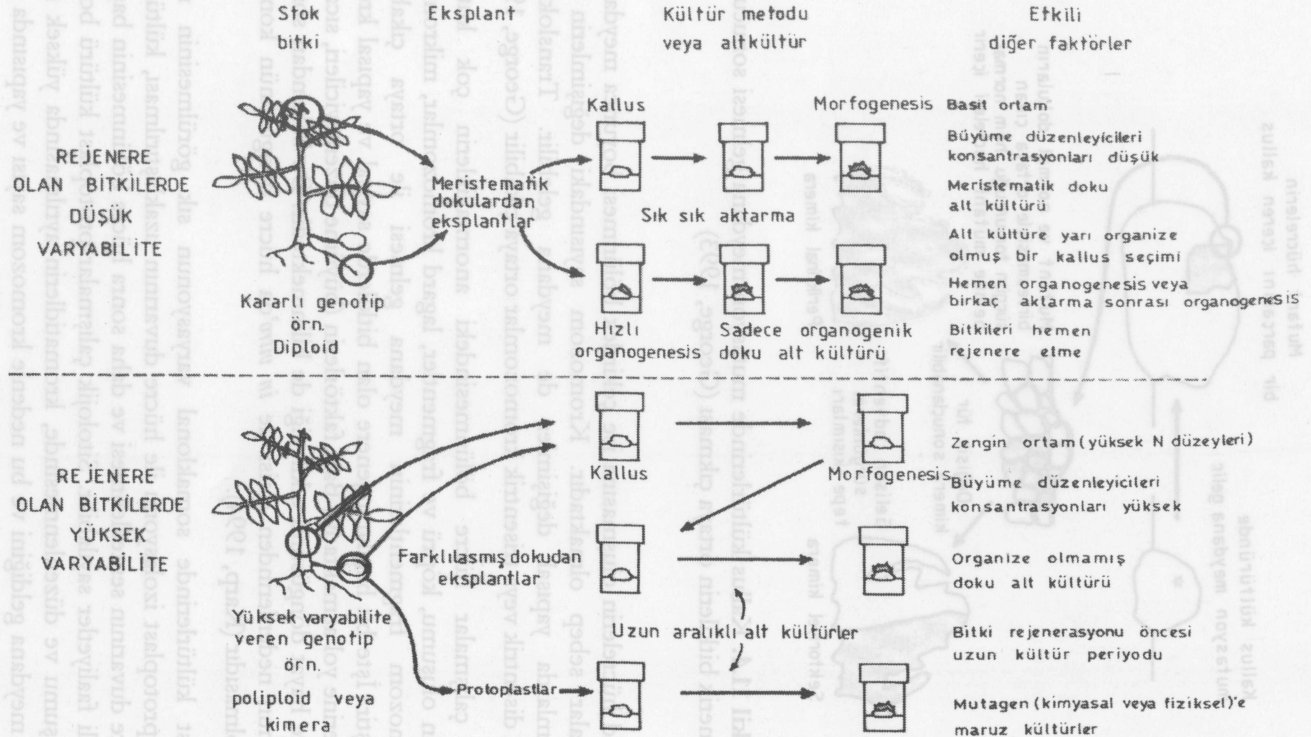
Doku kültürü kaynaklı mutasyon doğrudan veya dolaylı olarak DNA metilasyonundaki değişimlere bağlıdır. DNA yüksek oranda metillendiğinde (hyper-methylated) gen aktivitesi baskılanmaktadır. Metilasyondaki bir azalma (hypo-methylation) gen aktivitesinin artması ile ilişkilidir. Değişen metilasyon durumunun genetik varyasyona sebep olmasından sorumlu olarak *in vitro'da* doğal olmayan koşullar nedeniyle hücrenin fizyolojisini karıştıran bir stres veya şok geçirmesi gösterilmiştir. Genetik varyasyonların meydana gelmesi türlere göre değişmekte ve kullanılan kültür metodundan çok fazla etkilenmektedir (George 1993).

11.5.4. Nükleik asit öncüllerinin kaybı

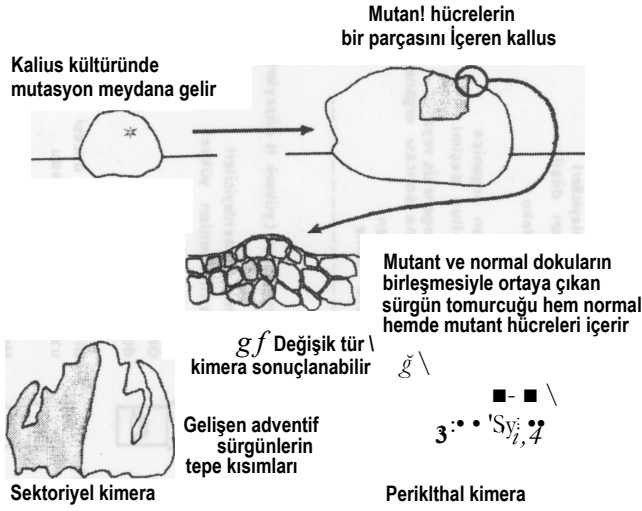
Çoğu doku kültürlerinde meydana gelen hızlı nükleik asit biyosentezi için gerekli öncüllerin eksikliğinin, bazı mutasyonların ortaya çıkmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle genellikle adenin bazı, bitki doku kültürü ortamına ilave edilmektedir. Fakat diğer DNA bazlarının kullanımı çok sınırlıdır (George 1993).

11.5.5. *in vitro* hücre bölünmesindeki anormallikler

Aktif olarak bölünen meristematik hücrelerin kültür sırasında çoğunlukla s tabii kalmasına karşın, geniş vakuole sahip hücrelerde değişimler meydana gelmektedir. Parankimatik dokularda değişik ploidi düzeylerine sahip hücreler bulunmaktadır. Kültürde poliploid hücrelerin meydana gelmesinin nedeni mitoz boyunca iğ ipliği oluşumunun başarısızlığı veya olağan (bipolar) iki kutuplu iğ iplikleri yerine anormal çok kutuplu (multipolar) iğlerin meydana gelmesidir. Diğer bir neden de hücre bölünmesinin interfazın G₂ alt devresinde geçici olarak durması ve sonra normal mitoz olmadan hücrenin tekrar G₁'de hücre döngüsüne girmesi olarak ifade edilmektedir.



Şekil 11.3. Kallus kültürlerinde ve kallustan rejenera olan bitkilerde genetik varyabiliteyi etkileyen faktörler (George, 1993).



Şekil 11.4. Kallus kültürlerinde mutasyon meydana gelmesi sonucu kimerik bitkilerin ortaya çıkması (George, 1993)

Aneuploid hücrelerin oluşmasına ise çekirdek bölünmesi boyunca meydana gelen bazı hatalar sebep olmaktadır. Kromozom sayısındaki değişimlerin dışında, kromozomlarda yapısal değişimler de meydana gelebilir. Translokasyonlar, delesyon, disentrik veya trisentrik kromozomlar ortaya çıkabilir (George, 1993).

Sitolojik çalışmalar hücre bölünmesindeki anormalliklerin çok kutuplu iğ ipliklerinin oluşumu, köprü ve fragmender, lagard kromozomlar, mikronukleuslar ve kromozom fragmenderinin meydana gelmesi ile ortaya çıkabileceğini göstermiştir. İşte bu hatalar rejenere olan bitkilerde sayısal ve yapısal kromozom değişmelerine yol açmaktadır. Bazı faktörlerin (büyüme düzenleyicileri, sıcaklık, ışık vb.) hücre hayat döngüsünü etkilediği de bilinmektedir. Bu bakımdan somaklonal varyasyonun nedenlerinden birisi de *in vitro*'da hücre döngüsünün kontrolünün yetersiz olmasıdır (Karp, 1994).

Protoplast kültürlerinde somaklonal varyasyonun sık görülmesinin nedenleri arasında protoplast izolasyonu ile hücre duvarının uzaklaştırılması, kültür sonrası yeni hücre duvarının s en tezlenmesi ve daha sonra hücre bölünmesinin başlatılması gibi çeşitli faaliyetler sayılabilir. Sitolojik çalışmalar protoplast kültürü boyunca iğ ipliği oluşumu ve düzenlenmesinde, kromatidlerin ayrılmasında yüksek frekansta hataların meydana geldiğini ve bu nedenle kromozom sayısı ve yapısında geniş bir varyasyon ortaya çıktığını göstermiştir (Karp, 1994).

11.5.6. Bitki büyüme düzenleyicilerinin önemi

Hücre döngüsü üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkili olduğu ve bunun somaklona varyasyona neden olduğu bilinmektedir. Hem oksin hem de sitokinin grubu büyüme düzenleyicilerinin nispi düzeyleri ile hücre popülasyonunun genetik kompozisyonunun etkilendiği belirtilmektedir. Bu etkiler tek başına ve kombinasyon halinde kullanılan her iki grup büyüme düzenleyicilerine göre değişmektedir (George, 1993; Karp, 1994).

Oksinler: Herhangi bir oksin kallus ve hücre süspansiyonlarının başlatılmasına sebep olmak ve gelişmeyi sağlamak için kültür ortamına mudaka eklenmektedir. Bu tür oksin ilaveli kültürlerde genetik değişimler de yüksek olmaktadır. Oksinlerin mutagenik olduğu ve DNA metilasyonunu arttırmasının etkisi üzerinde durulmaktadır. Örneğin, kallusu başlatma ve korumada ve hücre kültürlerinde sık sık kullanılan 2,4 D oksini aneuploidi, poliploidi ve endoreduplikasyon gibi genetik anormalliklere sebep olarak gösterilmektedir (De Klerk, 1990; George, 1993).

Sitokininler: Sitokininler kültüre alınan dokularda hücre bölünme oranını arttırmaktadır. Stokininler özellikle düşük konsantrasyonlarda kararlı meristematik hücrelerin bölünmesini teşvik ederken yüksek oranlarda poliploid hücrelerin frekansını arttırmaktadır. Örneğin, çeltik kallus kültürleri ortamına ilave edilen yüksek benziladenin (BA) konsantrasyonunun genetik varyabiliteyi arttırdığı belirtilmektedir (George, 1993).

Doku kültürlerindeki kararsızlık, kültür ortamından kaynaklandığı gibi araştırılan genotiplerin özel kararsızlığı sonucu da olabilir. Sitokininlerin sitogenetik stabilite üzerindeki etkilerinin araştırılması sonucu zeatinin benziladeninden daha yüksek varyabiliteye sebep olduğu tespit edilmiştir. Genetik kararsızlığın protoklonların erken gelişme döneminde daha çok ortaya çıktığı çekirdeğin DNA içeriğinin sitofotometrik analizleri ile gösterilmiştir (Zuba ve Binding, 1979).

11.5.7. Kültür ortamının bileşimi

Kültür ortamının bileşimi kültürdeki hücrelerin ploidi düzeyini, bu durumda farklı kromozom sayısına sahip hücrelerin nispi oranlarını etkileyebilmektedir. Örneğin, *Pisum* kök parçaları basit bir ortamda kültüre alındığında hücrelerin tümü diploid iken, ortamda maya ekstraktı, hindistan cevizi sütü veya kinetin bulunması hücre bölünme oranını arttırmış ve bölünen hücrelerin diploid, tetraploid ve oktoploid dokuları oluşturmaya neden olmuştur. Benzer şekilde kültür ortamındaki potasyum nitrat düzeyi buğday an ter kültürlerinden rej enere olan bitkilerde albino bitki sayısını etkileyebilmektedir. Şelat ajanları ve mikrobesein metalleri kromozom kırılmalarına sebep olmaktadır. Metal iyonlarının etkisi onların pozitif kutba çekilme oranı ile ilişkili bulunmaktadır. Bitki kültür ortamında besin iyonlarının mutagenik etkisi sırasıyla $Zn^{+2} > Cu^{+2} > Ni^{+2} > Co^{+2} > Fe^{+3} > Mn^{+2} > Mg^{+2} > Ca^{+2}$ olarak tahmin edilmektedir (George, 1993).

11.5.8. Kültürel koşullar

Sıcaklık: Kültürlerin inkübe edildiğ i sıcaklık mutasyon oranını etkileyebilir.   rneğ in 35   C'de inkübe edilen tütün kallusu diploid iken, 25   C'de kültüre alınan aynı doku belirgin olarak karyolojik kararsızlık göstermiş ve tetraploid bulunmuştur. *Ijolum multiflorum*'da somatik embriyolardan albino fidelerin meydana gelmesi genellikle genotipe bağılı olmakla birlikte artan sıcaklık ile hatalı bitki yüzdesinin de arttığ ı gözlenmiştir (George, 1993).

Kültür metodu: Reduplike olmayan hücreler içeren bitki dokuları eksplant olarak kullanıldığ ında stok bitki ile aynı ploidi düzeyinde olan bitkiler   retilmektedir. Diploid türlerde özellikle az kromozom sayısına sahip olanların alt kültürlerinde orijinal kromozom sayısı korunmuş olmakla birlikte düşük oranda da olsa karyotipik değ i  melerin meydana gelmesi olasıdır. Sık sık yapılan alt kültürler kromozom sayısının korunmasında etkili olmuştur (George, 1993).

11.5.9. Kültür süresi

Kültürler, uzun bir süre alt kültürler yoluyla korunduğ unda ve alt kültürler arasındaki süre uzadığ ında genellikle mutasyona uğ rayan hücrelerin oranı ile genetik değ i  im artmaktadır.   rneğ in, yoncada uzun süreli alt kültür aralıkları yüksek ploidi düzeyine sahip hücrelerin oranını arttırmış ve embriyogenik kapasite azalmıştır. Oysa alt kültürler 7 günlük aralıklarla yapıldığ ında ploidi düzeyi kararlı bulunmuştur (George, 1993).

Petunia hybrida cv. Rose of Heaven mezofil pro topla   darından ve yaprak disklerinden kaynaklanan kallus kültürlerinden rejenere olan bitkiler yüksek bir genetik ve kromozomal varyasyon sergilemiştir. Bu varyasyon kültür sırasında veya rejenerasyon yöntemi sırasında ortaya çıkmış olabilir. Yaprak disklerinden kaynaklanan 12 bitkinin 7'si tetraploid, 2'si aneuploid iken 3'   normal diploid (2n=14) kromozom sayısına sahip bulunmuştur. Protoplastlardan kaynaklanan 17 bitkiden diploid kromozom sayısına sahip olan bulunmamıştır. Ayrıca çalışmada somaklonal varyasyonun oluş derecesi uzun süreli (6 ile 18 ay) kallus kültürlerinden rej enere olan bitkilerde, kısa süreli (2 ile 3 ay) k  lt  rlerdekinden daha büyük bulunmuştur. Genetik değ i  melerin kültür fazı boyunca arttığ ı üzerinde durulmaktadır (Lewis-Smith ve ark., 1990).

11.5.10. Genotipin etkisi

Genetik varyasyon t  r içinde farklı varyeteler veya k  ltivarlar arasında farklı olabilmektedir. Farklı genomların farklı tepki vermesi nedeniyle somaklonal varyasyon genotipe bağılıdır diye belirtilmektedir. Bazı genotiplerin kültürde oldukça kararlı olmalarına karşın bazıları ploidi düzeyine bakmaksızın devamlı kararsızdır.   alı  malar kültürde kromozom kırılmalarının başlaması ile

heterokromatin arasında bir korelasyonu ortaya koymuştur. Bu korelasyon heterokromatinin geç replikasyonu ile açıklanmaktadır. Heterokromatin teorisine göre, geniş heterokromatin segmenderi içeren bitkilerin doku kültürlerinde kromozom aberasyonlarının daha yüksek meydana gelebileceği tahmin edilmektedir (Karp, 1994).

Cai *ve ark.* (1990) sorgumda varyasyonun önemli ölçüde genotipe bağlı olduğunu belirterek, kültürdeki artan zamanla varyasyonun arttığını vurgulamış ve incelenen popülasyondaki somaklonal varyasyon oranını %11.3, somaklonal varyant frekansını %1.6 olarak belirtmiş ve bulunan varyantların bazılarının sonraki çalışmalar için ıslah programlarında yararlı olabileceğini ortaya koymuşlardır.

11.5.11. Stres

Bitkiler çevre stresine (ekstrem çevre koşullarına) maruz bırakıldığı zaman “genom şoku” ile hızlı evrimsel değişmelerin meydana gelebileceği savunulmuş ve doku kültürü de bir stres şekli olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle doku kültüründe de genomik değişmelerin meydana gelebileceği vurgulanmıştır (De Klerk, 1990).

11.6. Somaklonal Varyasyonun Belirlenmesi

Somaklonal varyasyonun belirlenmesi çeşitli çalışmalar ile mümkün olmaktadır. Somaklonal varyasyon fenotipik, sitolojik ve moleküler düzeyde incelemeler ile ortaya konmaktadır (De Klerk, 1990).

1. Somaklonal varyasyonun büyüklüğü genellikle bir veya daha fazla kalitatif sapmalar gösteren bitkilerin oranı olarak belirlenmektedir. Örneğin, belirgin morfolojik değişime uğramış bitkilerin oranı, yaprak şeklinde gözlenen sapma, albinizm, cüceleşme vb.
2. Kantitatif özelliklere ait verilerin kontrole göre geniş sınırları ve somaklonal popülasyonda belli bir özellik için standart sapma değeri somaklonal varyasyonun büyüklüğünü belirlemektedir.

Fenotipik varyasyonun ölçülmesi: Fenotip üzerine somaklonal varyasyonun etkisi genellikle bir veya daha fazla özellikte sapma gösteren bitkilerin oranı olarak belirlenmektedir.

Kromozom sayısı varyasyonu:

Bu * tür varyasyon mitotik hücrelerdeki kromozomların sayılması (genellikle kök uçlarında), her hücrenin DNA içeriğinin ölçülmesi (sitofotometrik olarak), stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayılarının tespiti veya stoma boyunun ölçülmesiyle belirlenmektedir. Son iki metot her zaman doğru sonuç vermemekle birlikte uygulaması daha kolaydır.

Kromozom sayısı değişimleri doku kültürlerinde ve doku kültürlerinden rejenere olan bitkilerde en erken gözlenen genetik değişimlerdir. Kromozom sayısı belirlemeleri ile genotip, ortam bileşimi, doku tipi ve kültür uzunluğunun etkileri üzerinde kallus dokularında ve rej enere olan bitkilerde somaklonal varyasyonun derecesi üzerinde çalışmalar bulunmaktadır. Bürün (1998), haploid tütün bitkilerinin somatik dokularının *in vitro* kültürlerinde kallus fazından sonra elde edilen bitkiler arasında haploid, diploid ve aneuploid bitkileri belirlemiştir. Kromozom sayısı değişmiş bitkiler farklı bir fenotipe sahip oldukları gibi, bu bitkiler normal fenotipte de görülebilmektedir. Ayrıca normal kromozom sayılı bitkilerde de fenotipik değişiklikler gözlenebilmektedir. Kromozom yapısı değişikliklerinin saptanması ise oldukça zahmetli olup sitolojik ve moleküler çalışmalarla ortaya konulmaktadır.

11.7. Somaklonal Varyasyondan Yararlanma

Bitki ıslahında gerekli iki temel konu uygun genetik varyasyonun varlığı ve etkili bir seleksiyon yönteminin olmasıdır. Tür içinde yararlı varyasyon olmadığı zaman yabani ve akraba olmayan türler ve mutasyon teknikleri genetik varyasyonu genişletmek için kullanılmaktadır. Son yıllarda üzerinde durulan diğer bir varyasyon kaynağı da hücre ve doku kültürlerinde belirlenen somaklonal varyasyon olmuştur. Varyasyon gösteren bitkiler somaklonal varyantlar olarak ifade edilmektedir. Somaklonal varyandar arasında klorofil eksikliği olan bitkiler, poliploidi ve aneuploidi gibi kromozom aberasyonlarına sahip bitki varyantları gözlenmiş ve bunlar bitki ıslahı için pek bir değere sahip bulunmamıştır. Ancak bu değişen bitki özellikleri arasında hastalıklara dayanıklılık gibi önemli özellikler de söz konusu olmuştur (Van den Bulk, 1991).

Somaklonal varyasyonun avantajları kısaca şöyle özetlenebilir (Karp, 1994):

1. Hızlı bir varyasyon kaynağı olarak elverişlidir.
2. Bazı değişimler yüksek frekanslarda meydana gelebilir.
3. Agronomik özellikler değişebilir.
4. Bazı değişimler homozigottur.
5. Yeni varyandar ortaya çıkabilmektedir.
6. Yeni varyeteler üretilebilmektedir.

Somaklonal varyasyon bitki ıslahı açısından yeni bir varyasyon kaynağıdır. Ancak bu varyabilite kaynağının avantajlarının yanı sıra uygulamasında bir takım problemler de vardır (Semai ve Lepoivre, 1990; Karp, 1994). Bunlar:

1. Varyasyon çeşide bağlıdır.
2. Değişim frekansı çok farklıdır.
3. Çoğu değişimler istenmeyen değişimlerdir.

4. Bazı değişmeler kararsızdır.
5. Çoğu değişmeler yeni değildir.
6. İstenilen karakterler değişmeyebilir.
7. İstenilen karakter elverişsiz tarla performansları ile birlikte bulunabilir.
8. Varyantları tanımlamak için elverişli markörlerin kaybı söz konusu olabilir.
9. Varyandarin yasal bir düzenlemesi yoktur.

Somaklona varyasyonun arzu edilmeyen yönlerinin daha fazla olduğu görüşü de bulunmaktadır (De Klerk, 1990):

1. Çeşitli süs bitkilerinin mikroöretiminde (orkide, anteryum, zambak ve afrika menekşesinin bazı kısımlarında) somaklona varyasyon nedeniyle sapmalar görölmektedir. Bu nedenle somaklona varyasyon mikroöretimde büyük kayıplara neden olmaktadır.
2. Bitki biyoteknolojisinde bitki ıslahı teknikleri somatik hücrelerden rejenerasyona dayanmaktadır. Bu tür bitkiler mudaka somaklona varyasyonun etkisi altındadır. Ancak istenmeyen mutan dar ayrılarak uz aklaş tırılabilir. Fakat bu çok yıllık bitkilerde pek mümkün olmamaktadır.
3. Bazı istenmeyen mutasyonlar hemen tanınamayacak ve bu yüzden böylesi mutandar uzaklaştıramayacaktır. Örneğin, yağ palmiyeleri tarlada birkaç yıl költürden sonra anormallikler göstermiştir.
4. Somaklona varyasyon, hücre költürlerinde sekonder metabolit üretimini de etkilemektedir.

11.7.1. Somaklona varyasyonun bitki ıslahında kullanımındaki sorunlar

Somaklona varyasyonun yararlılığı açısından genel sonuçlar belirtmek pek mümkün değildir. Çünkü bitki türleri içinde bile çeşidere göre farklı frekansta somaklona varyasyon gözlenmektedir. Genotipe bağıllık nedeniyle bir çeşitte elverişli somaklona varyandarin elde edilmesi diğer çeşidelerde de benzer olacağını göstermez. Somaklona varyasyon üzerinde etkili faktörler aşığda Tablo 11.1’de verilmiştir (Karp, 1994).

Kromozom sayı ve yapısındaki değişiklikler genellikle büyümede ve fertilitede istenmeyen düzensizliklere neden olur ve canlılık azalır. Bu sebeplerden somaklona varyasyonun gerçekten bitki ıslahında yeni bir varyabilite kaynağı olup olmadığı da tartışılmaktadır.

Tablo 11.1. Somaklonal varyasyonu etkileyen faktörler (Karp, 1994).

Faktör	Genel Etki
Genotip	Farklı genotipler farklı derecede varyasyon gösterebilirler.
Ploidi	Yüksek ploidi düzeyine sahip olan bitkilerde daha fazla kromozom sayısı değişimleri görülmektedir.
Rejenerasyon Sistemi	Protoplasma eksplantlara göre daha yüksek varyasyon gösterir.
Kültür Süresi	Uzun süre kültürler daha büyük varyasyonlara neden olur.
Doku Kaynağı	Bazı dokular (örnek: yaşk) daha fazla varyasyon gösterir.
Büyüme Düzenleyicileri	Yüksek konsantrasyonları varyabikiteyi artırır.

11.7.2. Bitki ıslahında somaklonal varyasyonun yararları

Bitki ıslahında somaklonal varyasyonun ilk başarılı uygulamalarından biri şeker kamışında hastalıklara dayanıklı bitkilerin seçimidir. *Helmthosporium sacchari*, *Sclerospora sacchari* ve *Fiji* hastalığına dayanıklı klonlar kalkışlardan rejenera olan bitkilerden üretilmiştir (Van den Bulk, 1991).

Hastaklara dayanıklı somaklonal varyantların seçiminde *in vitro* seleksiyon uygulama olanağı Carlson (1973) tarafından tütünde, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* sebep olduğu vahşi ateş hastalığında gösterilmiştir. Haploid hücreler ve protoplasma metionin sulfoksimin (MSO)'e duyarlılık için test edilmiştir. Bu bileşik tütün yapraklarında *P. syringae* pv. *tabaci* tarafından üretilen toksin, tabtoksin gibi klorodok lekeler ortaya çıkarmaktadır. MSO'ne dayanıklı kalkıştan rejenera olan bitkiler hastakça dayanıklılık göstermiştir (Van den Bulk, 1991).

Bitki ıslahında bir varyabikte kaynağı olarak somaklonal varyasyonun en büyük avantajı geniş bir varyasyon kaynağı olması ve hızla elde edilebilmesidir. Bu somaklonal varyasyon alternatif ıslah metodları sınır kaldığında özellikle eşeysiz olarak çoğaltılan ve apomiktik türlerde stokların yetersiz olması nedeniyle ıslah çalışmalarının sınırlandığı durumlarda ümidi olmaktadır. Böyle türlerde kültüre akınan eksplantlardan rejenerasyon ile varyabikte ortaya çıkarılmaktadır. Diğer bir avantajı da yüksek frekansta kromozom katlanması ile poliploid bitkileri elde etme aracı olarak kullanılmasıdır.

Çoğu değişimler agronomik özelliklerde meydana gelmiştir. Bazı yararlı varyasyonlar hastaklara dayanıklılık, başaklanma ve olgunlaşma tarihi, tane verimi, protein içeriği ve tane kabuğundaki değişimlerdir. Örneğin, Zagorska ve ark. (1985), tütün ve domatesin farklı varyetelerinin doku kültüründen rejenera olan bitkilerinde somaklonal varyasyonu incelemişlerdir. Tütünde çoğu bitkilerin, yapraklarında, çiçeklerinde, yaprakların kimyasal bileşiminde, verimde ve bazı tütün hastaklarına dayanıklılıkta değişiklikler saptamışlardır. Yüksek verim, kaktek, *Peronospora tabacina*'nın, *Thielavia basicola*'nın ve tütün mozaik virüsüne dayanıklı soylar elde

etmişlerdir. Domateste ise en büyük varyabiliteyi morfolojik özelliklerde gözlemişlerdir.

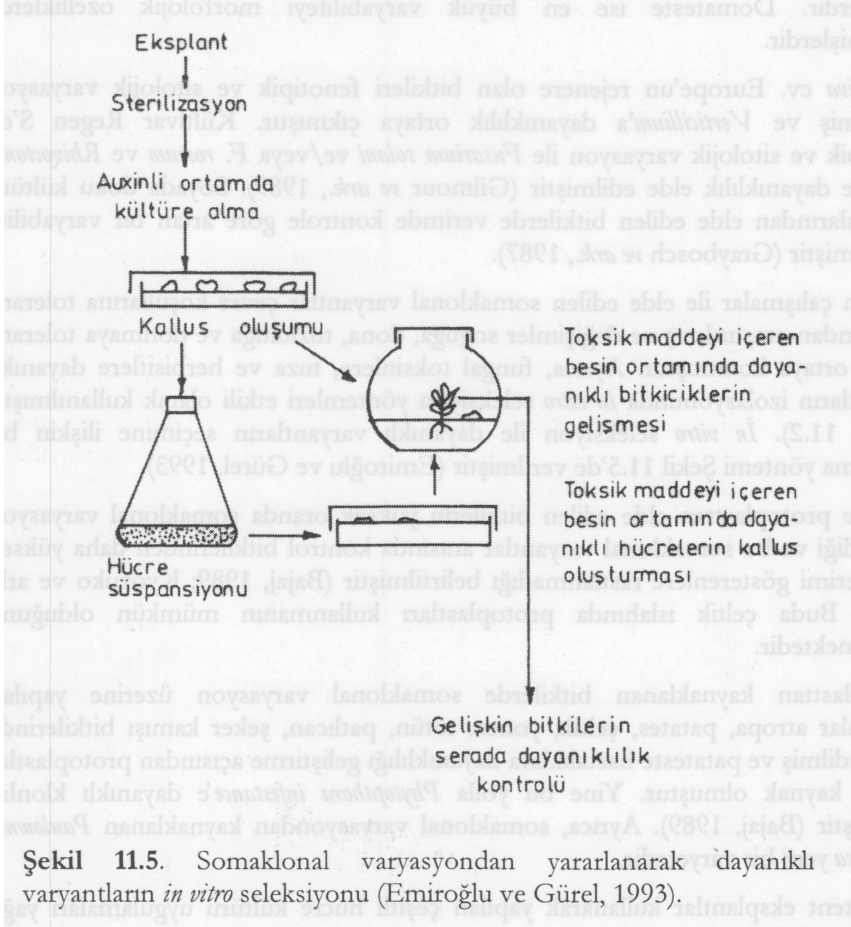
M. sativa cv. Europe'un rejenere olan bitkileri fenotipik ve sitolojik varyasyon göstermiş ve *Verticillium* dayanıklılık ortaya çıkmıştır. Kültivar Regen S'de fenotipik ve sitolojik varyasyon ile *Fusarium solani* ve/veya *F. roseum* ve *Rhizoctonia solani* dayanıklılık elde edilmiştir (Gilmour ve ark., 1989). Soyada doku kültürü çalışmalarından elde edilen bitkilerde verimde kontrole göre artan bir varyabilite gözlenmiştir (Graybosch ve ark., 1987).

Yapılan çalışmalar ile elde edilen somaklona varyantlar çevre koşullarına tolerans bakımından araştırılmış ve değişimler soğuga, dona, tuzluluğa ve donmaya tolerans olarak ortaya konmuştur. Ayrıca, fungal toksinlere, tuza ve herbisitlere dayanıklı mutantların izolasyonunda *in vitro* seleksiyon yöntemleri etkili olarak kullanılmıştır (Tablo 11.2). *In vitro* seleksiyon ile dayanıklı varyantların seçimine ilişkin bir uygulama yöntemi Şekil 11.5'de verilmiştir (Emiroğlu ve Gürel, 1993).

Çeltikte protoplasttan elde edilen bitkilerin yüksek oranda somaklona varyasyon sergilediği ve bu somaklona varyantlar arasında kontrol bitkilerinden daha yüksek tane verimi gösterenlere rasdanmadığı belirtilmiştir (Bajaj, 1989; Kyozyuko ve ark., 1989). Buda çeltik ıslahında pro toplaş darı kullanmanın mümkün olduğunu göstermektedir.

Protoplasttan kaynaklanan bitkilerde somaklona varyasyon üzerine yapılan çalışmalar atropa, patates, çeldek, yonca, tütün, patlıcan, şeker kamışı bitkilerinde rapor edilmiş ve patateste hastalıklara dayanıklılığı geliştirme açısından protoplasdar iyi bir kaynak olmuştur. Yine bu yolla *Phytophthora infestans* e dayanıklı klonlar seçilmiştir (Bajaj, 1989). Ayrıca, somaklona varyasyondan kaynaklanan *Paulownia tomentosa* yeni bir varyetedir.

Totipotent eksplandar kullanarak yapılan çeşitli hücre kültürü uygulamaları yağlı tohumlu *Brassica hrdz* somaklona varyantları üretmek için kullanılmıştır. *B. juncea'mn* hipokotil ve kotileden eksplandarmdan tuza toleranslı varyandar elde edilmiştir. Yine *B. napuPda* mikrosporların mutagenesisi ve haploid protoplasdar yoluyla herbisidere tolerant bitkiler elde edilmiştir. Ayrıca *B. napus* mikrospor kültürlerinden oleik asit düzeyleri artmış mutandar seçilmiştir. *B. napus'tu Phoma lingam* ve *Alternaria brassicicola* solgunluk patojenlerine dayanıklı rejenerandar elde edilmiştir (Palmer ve Keller, 1994). Ayçiçeğinde hipokotil eksplandarmdan *Phoma macdonaldii* ve *Phomopsis spp.*'nin kültür filtrelerine dayanıklı kalluslar izole edilmiş fakat rejenerasyon baş arılamamış tır (Palmer ve Keller, 1994). *Unum usitatissimum'*da ise tuza toleranslı bitkiler elde edilmiş fakat bu bitkilerde birkaç generasyon sonra tolerans kaybolmuştur. Benzer durum sulfonilyurea herbisitine dayanıklılıkta da gözlenmiştir (Palmer ve Keller, 1994). Bu örnekler bitki ıslahında somaklona varyasyon potansiyeknin başarıyla kullanılabikneceğinin örnekleridir.



11.8. *In Vitro* Seleksiyon Uygulamaları

Birtakım seleksiyon stratejileri ile ortaya konan somaklonal varyantlara ilişkin bilgiler Van de Bulk (1991) tarafından aşağıdaki gibi verilmiştir:

Bitki düzeyinde hastalığa dayanıklı varyantların seçimi: Somaklonal varyandarda bitki düzeyinde başarılı seleksiyonu rapor eden çalışmalar liste halinde Tablo 11.3'de verilmiştir. Tablodan, bitki düzeyinde hastalığa dayanıklı varyandarm seçiminin bakteriyel patojenler için olduğu gibi fungal ve viral patojenler için de başarılı uygulamalarının olduğu görülmektedir. Ancak bazı durumlarda dayanıklı olarak seçilen bitkilerin çoğunlukla istenmeyen bazı özelliklere değiştiği de görülmektedir. Bu durum, istenmeyen değişimlerin meydana gelmesi seçilen varyandarm değersiz olduğunu göstermez. Çünkü elde edilen yeni dayanıklılık kaynağı herhangi bir ıslah programı ile ticari çeşidire aktarılabilir.

Tablo 11.2. *In vitro* seleksiyonla elde edilen somaklona varyasyon örnekleri (Van den Bulk, 1991; Karp, 1994).

Bitki	Patojen	Seçici Ajan	Seleksiyon Düzeyi
(A) Hastalıklara Dayanıldık			
Yonca	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i>	Kültürü filtre etme	Kallus
Yonca	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>Medicaginis</i> <i>F. solani</i>	Kültürü filtre etme	Embriyogenik hücre süspansiyonu
Arpa	<i>Fusarium spp.</i>	Fusaric asit	Kallus
Arpa	<i>Helminthosporium sativum</i>	Ham toksin	Kallus
Patıcan	Nadir görülen yaprak hastalığı (Mikoplazma benzeri organizma)	Patojen	Bulaşık dokudan elde edilen kallus
Patıcan	<i>Verticillium dahliae</i>	Kültürü filtre etme	Hücre süspansiyonu
Şerbetçiotu	<i>Verticillium alboatrum</i>	Kültürü filtre etme	Kallus
Mısır	<i>Helminthosporium maydis</i>	HmT toksin	Kallus
Yulaf	<i>Helminthosporium victoriae</i>	Victorin	Kallus
Şeftali	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i>	Kültürü filtre etme	Kallus
Patates	<i>Phytophthora infestans</i>	Kültürü filtre etme	Kallus
Patates	<i>Fusarium oxysporum</i>	Kültürü filtre etme	Kallus
Çeltik	<i>Helminthosporium oryzae</i>	Ham toksin	Kallus
Çeltik	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Bakteriyal hücreler	Kallus
Şeker kamışı	<i>Helminthosporium sacchari</i>	Toksin	Kallus
Tütün	<i>Pseudomonas syringae tabaci</i>	Methionine sulfoximine	Hücreler, protoplastlar
Tütün	<i>Pseudomonas syringae tabaci</i> , <i>Alternaria alternata</i>	Ham toksin	Kallus
Tütün	Tütün Mozaik Virüsü	Virüs	Bulaşık dokudan elde edilen kallus
Tütün	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Nicotianae</i>	Kültürü filtre etme	Hücre süspansiyonları
Tütün	<i>Phytophthora parasitica</i>		
Domates	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>Iycopersici</i>	Kültürü filtre etme	Kallus
Domates	Tütün Mozaik Virüsü	Virüs	Bulaşık eksplantlar
Domates	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Kültürü filtre etme	Kallus
Buğday	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Syringomycin	Kallus

Tablo 11.2 .'nin devamı...

Bitki Patojen	Seçici Ajan	Seleksiyon Düzeyi
Buğday <i>Helminthosporium sativum</i>	Ham toksin	Kallus
Kereviz <i>Fusarium oxysporium f.sp.apii</i>		
Yulaf <i>Helminthosporium victoriae</i>		
Karaağaç <i>Ceratocystis ulmi</i>		
(B) Herbisit/İlaç		
Mısır	Imidazolinone	
Mısır, Tütün	Sulfonylurea	
Petunya	Methotrexate	
Tütün	Atrazine	
Mısır	Methomyl	
Domates	8-azaguanine	
Tütün	Amitrole	
Havuç, Petunya	Glyphosate	
Patates	MCPA, NIDEL	
Tütün	Picloram	
Tütün	Paraquat	
Tütün	Hydroxyurea	
Çeltik, Tütün	Amino asit analogları	
(C) Tuza Tolerans		
eker		
Pancar		
Çeltik		
(D) Aliminyum'a Tolerans		
Yonca		Sadece hücre hattu

Toksinler ile in vitro seleksiyon: Patojen tarafından üretilen toksik metabolitlerin *in vitro'*   seçici ajanlar olarak kullanılması esasına dayanmakta ve çoğı seçici baskılar kallus düzeyinde uygulanmaktadır (ekil 11.5). *In vitro* seleksiyon ile çeşitli türlerde elde edilen hastalığı dayanıldı bitkilerin bir  stes  Tablo 11.2'de verilmiştir.

F totoksinler ile seleksiyon: Seçici ajan olarak fitotoksinleri kullanma yoluyla *in vitro*'da seçilen hücre veya dokulardan rejenerasyon sonrası elde edilen toksine dayanıldı  bitkilerin patojene dayanıklılık göstermesidir. Bitkiye özgü özel toksinin seleksiyonda başarıyla kullanıldığı alışmalar Tablo 11.2'de görülmektedir.

Tablo 11.3. Varyantların bitki düzeyinde seçimi ile elde edilen hastalığa dayanıklı bitkiler (Van den Bulk, 1991).

Bitki	Patojen	Doku Kültürü
Yonca	<i>Verticillium albo-atrum</i>	Protoplastlar
Yonca	<i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i>	Embriyogenik hücre süspansiyonu
Elma	<i>Phytophthora cactorum</i>	Eksplantlar
Muz	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i>	Meristem
Arpa	<i>Rhynchosporium secalis</i>	Kallus
Kereviz	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Apii</i>	Embriyogenik süspansiyon kültürü, kallus
Kereviz	<i>Septoria apii</i> , <i>Cercospora apii</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i>	Embriyogenik süspansiyon kültürü
Salata	Salata Mozaik Virüsü, <i>Bremia lactucae</i>	Kallus
Mısır	<i>Helminthosporium maydis</i>	Kallus
Şeftali	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Kallus
Kavak	<i>Septoria musiva</i>	Kallus
Kavak	<i>Melampsora medusae</i>	Kallus
Patates	<i>Alternaria solani</i>	Protoplastlar
Patates	<i>Phytophthora infestans</i>	Protoplastlar
Patates	Patates X Virüsü, Patates Y Virüsü	Kallus, Eksplantlar
Patates	<i>Streptomyces scabies</i> , Patates Y Virüsü, Patates Yaprak Kıvrıklığı Virüsü	Protoplastlar
Patates	<i>Streptomyces scabies</i>	Eksplantlar
Çeltik	<i>Helminthosporium oryzae</i>	Kallus
Şeker kamışı	Fijii Virüsü	Kallus
Şeker kamışı	<i>Sclerospora sacchari</i>	Kallus
Şeker kamışı	<i>Helminthosporium sacchari</i>	Süspansiyon kültürü, Eksplantlar
Şeker kamışı	<i>Ustilago scitaminea</i>	Kallus
Şeker kamışı	<i>Puccinia melanocephala</i>	Kallus
Tütün	<i>Phytophthora parasitica</i> pv. <i>nicotianae</i> , <i>Pseudomonas solanacearum</i>	Protoplastlar
Domates	Tütün Mozaik Virüsü	Eksplantlar
Domates	<i>Fusarium oxysporum</i> / sp. <i>lycopersici</i> Irk 2	Kallus
Domates	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> Irk 2, Irk 3	Protoplastlar
Domates	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Kallus

Ancak burada seleksiyon yöntemine toksinlerin uygunluğu önemlidir. Hastalık gelişiminde görülen toksinlerin her zaman seçici bir ajan olarak kullanılması elverişli değildir. Bu toksinin etki şekline ve toksinin özelliklerine bağlıdır. Örneğin, *Verticillium dahliae* tarafından üretilen *vt* toksinine patates doku kültürlerinin reaksiyonu üzerine bir araştırma duyarlı bir genotipin pro toplaş darının hemen hemen hiç etkilenmediğini, oysa hücre süspansiyonlarının etkilendiğini göstermiştir.

Kültürü filtre etme ile seleksiyon: Filtre edilmiş ham kültür sıvılarının seçici ajan olarak kullanılmasıdır. Özellikle filtre edilmiş kültür fitotoksik aktivite sergilemektedir.

Patojenler ile in vitro seleksiyon: Eğer hastalık belirleyicileri (toksinler gibi) seçici ajan olarak kullanılmak için elverişli değilse patojenin kendisi kullanılabilir. Ancak bu sınırlıdır. Çünkü doku kültürü koşulları altında patojenin hızlı olarak kültür ortamını kaplaması gözlemlere engel olabilmektedir.

11. 9. Sonuç

Bitki doku kültürlerinde ortaya çıkan somaklonal varyasyon önemli bir kaynaktır. şimdiye kadar somaklonlardan elde edilen yeni çeşitlerin sayısı sınırlıdır. Somaklonal varyasyonun kontrolsüz ve tesadüfi olması sınırlayıcı bir faktör olmuştur. Ancak gelecek için ümitli görülmektedir. Somaklonal varyasyonun orijininin daha iyi anlaşılması için doku kültürü ile başlatılan bu değişimlerle ilgili moleküler düzeyde çalışmalar da yapılmaktadır.

Sonuç olarak hem hücre hem de doku kültürü ve *in vitro* seleksiyon yöntemleri hastalıklara dayanıklılık konusunda bitki ışlahında önemli bir potansiyele sahiptir. Bu yeni teknikler geleneksel dayanıklılık ışlahı tekniklerinin yerini alamayacaktır. Fakat dayanıklı materyal elde mevcut olmadığında veya var olan varyetelerde bilinen dayanıklılık genini aktarmak güç olduğu zaman uygulanabilecektir. Yeni dayanıklılık kaynakları ortaya çıkarılması çok büyük bir avantajdır ve bu konuda başarılı örnekler bulunmaktadır.

Kaynaklar

Bajaj YPS (1989) Recent advances in the isolation and culture of protoplasts and their implications in crop improvement. In: Bajaj YPS (ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 8, Plant Protoplasts and Genetic Engineering I, pp. 3-22, Springer-Verlag, Berlin.

Bürün B (1996) Doku kültürü ve bitki ışlahı. Hasad, 133: 35-36.

- Bürün B (1998) Tütünde (*Nicotiana tabacum* L.) somatik dokuların *in vitro* kültürleri ve bitkilerin ploidi düzeyi. XIV. Ulusal Biyoloji Kongresi, 7-10 Eylül, Cilt III, s. 403-412, Samsun.
- Cai T, Ejeta G, Axtell JD, Butler LG (1990) Somaclonal variation in high tannin sorghums. Theor. Appl. Genet., 79: 737-747.
- De Klerk GJ (1990) How to measure somaclonal variation. Ağa Bot. Neerl., 39(2): 129-144.
- Emiroğlu Ü, Gürel A (1993) Bitki ıslahında modern biyoteknoloji. The Biotechnology Revolution Short Course, February 8-12, s. 94-125, Bornova, İzmir.
- George EF (1993). Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1, The Technology, Exegetics Ltd., England.
- Gilmour DM, Golds TJ, Davey MR (1989) Medicago protoplasts: Fusion, culture and plant regeneration. In: Bajaj YPS (ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 8, Plant Protoplasts and Genetic Engineering I, pp. 370-388, Springer-Verlag, Berlin.
- Graybosch RA, Edge ME, Delannay Z (1987) Somaclonal variation in soybean plants regenerated from the cotyledonary node tissue culture system. Crop Sci., 27: 803-806.
- Karp A (1994) Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds), Plant Celi and Tissue Culture, pp. 139-151, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kyozuka J, Shimamoto K, Ogura H (1989) Regeneration of plants from rice protoplasts. In: Bajaj YPS (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 8, Plant Protoplasts and Genetic Engineering I, pp. 109-123, Springer-Verlag, Berlin.
- Lewis-Smith AC, Chamberlain M, Smith SM (1990) Genetic and chromosomal variation in *Petunia hybrida* plants regenerated from protoplast and callus cultures. Biol. Plant., 32(4): 247-255.
- Palmer CE and WA Keller (1994). *In vitro* culture of oilseeds. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds), Plant Celi and Tissue Culture, pp. 413-455, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Semai J, Lepoivre P (1990) Application of tissue culture variability to crop improvement. In: Bhojwoni SS (ed), Plant Tissue Culture: Applications and Limitations, Developments in Crop Science 19, pp. 301-315, The Netherlands.
- Van den Bulk RW (1991) Application of celi and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding- a review. Euphytica, 56: 269-285.
- Zagorska N, Abadjieva M, Chalukova M, Achkova Z, Nikova V (1985) Somaclonal variation in tobacco and tomato plants regenerated from tissue cultures. Proceedings of an International Symposium on Nuclear Techniques and *In Vitro* Culture for Plant improvement, pp. 349-356, Vienna, 19-23 August, 1985.
- Zuba M, Binding H (1989) Isolation and culture of potato protoplasts. In: Bajaj YPS (ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 8, Plant Protoplasts and Genetic Engineering I, pp. 124-146, Springer-Verlag, Berlin.

Sözlük

A

Aborsiyon: Embriyonun normal gelişme göstermemesi.

Absisyon: Yaprak, meyve ve çiçek gibi bitki organlarının hastalık veya fizyolojik yaşlılık nedeniyle dökülmesi (düşmesi).

Adventif: Organların alışlagelmiş doku veya bölgelerden değil de beklenmedik yerlerden meydana gelmesi. Mesela, normal olarak embriyodan gelişmesi beklenen kök veya sürgünün yaprak dokusundan meydana gelmesi.

Aklimatizasyon: *In vitro* koşullarda rejenere edilen bitkilerin sera veya tarla koşullarına alıştırılması.

Aksenik: Kontaminasyon yapan bir mikroorganizma ile bulaşık olmayan. Sadece bir tip organizma veya hücre içeren kültüre de aksenik kültür denir.

Allotetraploid: Diploid iki türün, kromozom sayılarını yarıya indirgmeden birleşmeleri sonucu oluşan bir çeşit allopoliploid.

Androgenesis: Erkek gamet hücresinden bitki meydana gelmesi.

B

Biyosit: Eksplandarm endojen veya eksojen sterilizasyonu (bakteriyel ve fungal kontaminasyonda) ve besin ortamlarında uzun süreli koruma amaçlı olarak kullanılan bileşikler.

Biyoteknoloji: Bir organizmayı (çoğunlukla mikroorganizma veya onun salgıladığı enzimi) endüstriyel işlemden kullanarak ürün elde etmek.

Biyotip: Benzer genetik içeriğe sahip organizmaların oluşturduğu topluluğu.

C

Çoklu füzyon: Sıvı füzyon ortamında birden fazla somatik hücrenin birbirleriyle birleşmesi. Somatik melezlemede genellikle arzu edilmeyen bir durumdur.

D

Delesyon: Kromozomdan bir parça eksilmesi olayıdır.

Disentrik kromozom: İki sentromerli kromozom.

Dormansi: Tohum, spor veya tomucuklarda büyüme ve gelişmenin inaktif olduğu dönem.

E

Eksojen: Organizma ve hücrenin dışından kökenlenen, veya dışarıdan sağlanan. Örneğin, hücre veya dokunun kendisinin üretmeyip dışarıdan sağlanan bitki büyüme düzenleyicileri.

Eksplant: Bitkiden izole edilerek doku kültürü ortamına konulan herhangi bir materyal (organ, doku, hücre vs.).

Embriyoid (somatik embriyo): Zigottan değil de somatik hücrelerin farklılaşması sonucu oluşan embriyo.

Endojen: Organizma ve hücrenin içinden kökenlenen, veya kendisi tarafından üretilen. Örneğin, hücre veya dokunun kendisinin ürettiği bitki büyüme düzenleyicileri.

Endopoliploidi: Somatik hücrelerde kromozom sayısının kadanmasıdır.

F

Farklılaşma (differentiation): Meristematik bölünmeler sonunda oluşan hücrelerin, fizyolojik ve morfolojik değişikliklere uğrayarak özelleşmiş hücre grupları, dokuları (epidermis, parenkima, kambiyum) veya organları (sürgün, kök) meydana getirmesi.

G

Gametofit: Bitkinin, haploid kromozom sayısına sahip gameteri üretmesi işlemi.

Genetik mühendisliği: Organizmaların genetik yapılarında yapay yollarla değişiklikler (transformasyonlar) meydana getirmek.

Germplazm: Yeni bir organizmanın elde edilebileceği herhangi bir genetik materyal. Bitkiler için; tohumlar, sürgün kültürleri veya rejenerasyon yeteneğine sahip hücre kültürleri birer germplazmdır.

Ginogenesis: Dişi gamet hücresinden bitki meydana gelmesi.

H

HEPA filtre: Sahip olduğu çok küçük porlar (0.22 µm çaplı) sayesinde mikroorganizmaların tamamına yakının geçmesine izin vermeyen özel geliştirilmiş filtre.

Heterokaryon: Genetik içerikleri farklı iki veya daha fazla somatik hücre çekirdeğin bir arada yer aldığı hücre.

Heterotrof: Beslenmek için ihtiyaç duyduğu maddeleri kendisi üretmeyip dışarıdan alan canlı.

Heterotrofik faz: Embriyo bu faz süresince endospermi ve embriyo etrafındaki ana dokuyu kaynak olarak kullanır, yani embriyonun bağımlı olduğu bir fazdır.

Hidrofonik: Besin maddelerince zenginleştirilmiş çözelti içinde (topraksız) bitki yetiştirmek.

Hiperhidrisite: Bitki dokularında aşın su birikimi

Homokaryon: Genetik içerikleri aynı iki veya daha fazla somatik hücre çekirdeğinin bir arada yer aldığı hücre.

Hormon-otonom: İzole edilmiş bir dokudan meydana gelen kallusun artık dışarıdan bir hormon desteğine ihtiyaç duymadan bölünmesine devam etmesi. Hormon-otonom kalkışların ihtiyaç duydukları hormonları kendilerinin sentezlediklerine inanılmaktadır.

•
I

Izodiyametrik: Bütün boyutları bir birine eşit olan. Genelde yuvarlak veya polihedral hücreler için kullanılır.

K

Kallus: Yapay kültür ortamlarına konulan bitki hücresi veya dokularından meydana gelen farklılaşmamış hücreler yığını. Genelde kallus dokusu yaralanmış veya kesilmiş doku yüzeylerinde oluşur.

Kimera: Aşılamada hem anaç hem de kalemin özelliklerini taşıyan varyantlar elde edilebilmektedir. Bunlar kimeradır. Bu şekilde her iki bitkiye ait özellikleri taşıyan bitkiye aşı melezi veya kimera denir.

Krayoprezervasyon: Bitki hücre, doku veya organlarının dondurularak saklanması.

O

Organogenesis: Hücrelere ve dokulara baskı uygulanıp bazı değişikliklere sebep olunarak sürgün veya kök primordiyumu (taslağı) diye isimlendirilen tek kutuplu ve vasküler sistemi kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının meydana gelmesi işlemi.

Ototrofik faz: Embriyonun ihtiyaç duyduğu maddeleri metabolik olarak sentezleme yeteneğinde olduğu fazdır. Embriyo beslenme açısından bağımsızdır.

Ozmotik dengeleyici: Ortamın ozmotik konsantrasyonunun dengede kalmasını sağlayan bileşikler.

P

Plazmolizasyon: Bitki hücresinin osmozis yolu ile su kaybetmesi sonucunda, protoplastın büzüşerek hücre içine çekilmesi ve hücre zarından plazma zarının ayrılması işlemi.

Polisomati: Endomitozla oluşan yavru kromozomların birbirinden ayrılmayarak bağımsız kromozomlar halini almasıdır.

Politeni: Endomitozla oluşan yavru kromozomlar birbirinden ayrılmayıp **ÇOK** sayıda kromatidden ibaret dev kromozomları meydana getirmesi politenidir. Endopoliploidinin özel halidir.

Primordiyum: Belli hücre, doku veya organı meydana getirecek olan olgunlaşmamış yapılar/hücreler yığını (taslaklar).

Pro-embriyo: Çoğunlukla tozlaşmadan birkaç gün sonraki henüz olgunlaşmamış embriyolardır.

Protoplast: Hücre çeperi genellikle enzimlerle eritilip uzaklaştırılmış bitki hücresi.

Protoplast füzyonu: İki veya daha fazla protoplastın birbirleri ile kaynaşarak tek hücre haline gelmeleri.

R

Rejenerasyon: Herhangi bir bitki materyalinden (hücre, doku veya organ) yeni bir bitkinin meydana gelmesi.

S

Sekonder metabolit: Hücresinin temel metabolik faaliyetlerinin (solunum, fotosentez vs.) bir ürünü olmayan bileşikler. Dolayısı ile, bu metabolitler özelleşmiş hücrelerde üretilirler.

Sentetik (yapay) tohum: Besin maddesi ve koruyucu bileşikler içeren özel maddelerle kaplanmış somatik embriyolar.

Sinergistik interasksiyon: Bir maddenin yararının tek başına değil onunla birlikte bir ya da birkaç maddenin de bulunmasına bağlı olmasıdır.

Somatik embriyogenesis: Somatik hücrelerin farklılaşarak bipolar (sürgün ve kök) yapıdaki embriyoları oluşturma işlemi.

Somatik melez: İki somatik hücrenin füzyonu sonucu oluşan melez (hibrit) bitki.

Sporofit: Bir bitkinin hayat döngüsünde, diploid veya eşeysiz olduğu dönem.

Suspensor: Embriyoyu embriyo kesesine bağlayan yapı.

T

Tersine-farklılaşma (de-differendasyon): Özelleşmiş bir hücre veya dokunun kendine özgü yapısını kaybederek tekrar başlangıçtaki farklılaşmamış (özelleşmemiş) durumuna dönmesi. Yaprak dokusundan kallus meydana gelmesi buna örnek olarak verilebilir.

Totipotensi: Farklılaşmış belli bir bitki hücresinin rejenerasyonla tam bir bitki meydana getirme yeteneği.

Translokasyon: Homolog olmayan kromozomlar arasında kromozom parçalarının yer değiştirmesidir.

V

Vitrifikasyon (camlaşma): Bitki dokusunun bünyesine fazla miktarda su alması sonucunda şeffaf ve jelimsi bir görüntü kazanması. Suyun doku içerisinde donmadan katılaşması olarak ta tanımlanır.

Y

Yeniden-farklılaşma (re-differentiation): Farklılaşmış bir hücrenin veya dokunun, farklılaşmamış eski durumuna dönerek oradan da tekrar başka bir hücre veya doku tipine farklılaşması. Yaprak mezofil hücresinin tersine farklılaşarak kallus hücresine dönüşmesi ve buradan da yeniden farklılaşarak sürgün veya kök hücresine dönüşmesi gibi.

İndeks

A. tumefaciens.....	84, 85, 86
adaptasyon.....	112
advendf.....	49, 50, 204, 270, 272
aksenik.....	108
albino	127, 128, 132
alkaloid.....	172, 225, 230, 234, 256
amino asit.....	1, 18, 40, 101
androgenesis.....	142,162, 180, 183
anter.....	4, 14, 73,142,145, 150, 156, 157,
	162,171,187, 262, 346, 355
arpa.....	84,111,120, 142, 149,160, 172,
	327, 336, 341,342
asetokarmin.....	153
aseton	104
askorbik asit.....	16, 101, 198, 329
asma	143, 194
Aspergillus niger.....	100
Atropa	186, 213, 219, 222, 256, 286, 320
azot	229, 230
baklagiller.....	1,92, 106, 118, 121
bakteri.....	1,8,11,84,190,236
besin ortamı.....	8, 29, 327
biber.....	142,148,154,172,177,187, 235
bistüri	94
bitki büyüme düzenleyicileri..	18, 22, 40, 94,
	231
biyoreaktör.....	82, 249, 252, 255
buğday.....	1, 33, 72, 85, 111, 142, 154, 160,
	177, 330, 355
Calcoflour Beyazı.....	94, 103
canlılık.....	27, 94,103,127, 128, 131, 305,
	308
Cellulase R-10.....	100
civa klorür.....	12
CPW	98,99
çeltik.....	1, 72, 84, 85,120,142, 150, 160,
	318, 354,360
dihaploid.....	138, 142, 176, 178, 183
dikotiledon.....	91
dioik	138
DNA. ...	1, 3, 44, 66, 84, 85, 118,120, 122,
	124,132,152,176,179,188, 217,
	219, 243,258,319, 353, 357
domates.....	14,32, 97, 165, 262
donör ..	95, 96, 97,150,193,196,197, 352
elektro füzyon.....	122, 124, 129
elektroporasyon.....	84, 118
ELISA.....	204, 277
enzim	6, 16, 93, 101, 103, 104,192, 239
epidermal.....	39, 50, 62, 93, 104,197
epidermis.....	36, 45, 47, 62, 93, 97,104
epigenetik varyasyon.....	347
eşey hücresi.....	139
Evans mavisii.....	103
Fı.....	132,137,138,149,150,179, 336
FDA	94,103,104,131
fenol safranin.....	103
Ficoll	103
filtrasyon.....	102
flow sitometri.....	174,176,177
Füzyon..	105, 122, 126,127, 128,
	130,131
gelrite	17,42,94,268
gen transferi.....	2, 6, 119,160
genotip.....	73,149, 216, 337, 359
Geranium	266, 271
germplazm.....	3, 4, 191, 282, 284, 322, 323
glikoz	16,21,108,230,290
globular.....	147
gül.....	214, 263, 333
haploid.....	2, 3, 4, 55, 68, 137, 139, 140,
	156,164,181,188, 330, 343, 357
hastalaksız bitki.....	5
hemiselüloz.....	91
hemositometre.....	94
HEP A.....	3, 9
hıyar.....	142,162,172,177,180
Hindistan cevizi.....	12, 18,108,136, 329
hipokotil ..	13, 39, 80, 81, 95, 119, 331, 363
hücre duvarı..	53, 31, 91, 106, 112,122, 126
hücre süspansiyonları.....	5, 27, 42, 95, 102
hücre zan.....	289, 295
Işık.....	6, 8, 23, 24, 43, 72, 74,131,195,
	229, 233, 234, 269
<i>In vivo</i>	190
İnkübasyon.....	93,100,102, 158, 187, 285,
	286
izolasyon.....	53, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98,
	99,101,102,103,104,119,124
kalsiyum.....	12, 15, 21, 83, 109, 143, 233,
	238, 242, 313

karpuz.....	166,170,172,177,178
kavun.....	142,165,169,176, 306, 307, 316
kazamino asit.....	18, 108
kemoterapi.....	199, 202, 206, 277
Kimera.....	198
kiraz.....	201
klonal çoğaltım.....	2
klorofil.....	93, 95,130,162, 276, 357
krayoterapi.....	199, 203
kültür yoğunluğu.....	105, 109
Laminar hava akışlı kabin.....	8, 9, 94
lavanta.....	214
lipaz.....	99
Macerozyme R-10.....	100
makro elementler.....	15
manitol.....	94, 98,101,108, 126, 285, 290
manyetik karıştırıcı.....	9
MES.....	19, 94, 99,101,277
metabolit.....	211, 223, 224, 236, 244, 252
mısır.....	1, 33, 72, 79, 85,143,154,160, 317, 330, 336
mikro elementler.....	15
mikroaşıllama.....	199, 203
mikroçoğaltım...5,191, 262, 264, 277, 278	
mikrodalga.....	9, 10, 12
mikroenjeksiyon.....	84
mikrokallus.....	89, 110, 113
mikroskop.....	94, 105
mikrospor.....	146,152,157, 159, 160, 161
monokotil.....	349
Nescofilm.....	110
nikotinik asit.....	16, 20, 40, 108, 267, 329
nitrat.....	11, 14, 18, 83,230, 243, 328, 355
nörs.....	93,111,341
nükleaz.....	99
otoklav.....	9,10, 25, 94,110,126
ovaryum.....	162,163,164,171,185
övül.....	162,163,164,171
ozmotik basıncı.....	26,101, 113, 328
öncüller.....	229, 235
Parafilm.....	110
partikül tabancası.....	84
Pastör pipet.....	104
patates.....	18, 32, 97, 120,138,154,177, 191, 202, 207, 263, 284, 310, 364
patıcan ..	142, 144, 154, 159, 160,172, 360
PEG.....	119,124,126,127,128, 254, 290
pektinaz.....	91, 94, 99
Percoll.....	103
petiyol.....	13
pipet.....	9, 94,117,118,161,313
plazma.....	103
plazma zan.....	97
plazmolizasyon.....	93, 97, 99, 101
ppm.....	30, 287, 296, 310, 313, 314
pridoksin.....	20,108, 267
proteaz.....	99
PVP-10.....	94, 101
santrifüj.....	9, 94, 102
sekonder metabolit.....	5
seleksiyon.....	4,73, 122,130, 131, 160, 319, 347, 357, 359, 360, 364, 366
selülazlar.....	99
selüloz.....	11,12, 91,111,112, 211, 239, 240, 253
sentetik tohum.....	3, 5, 31, 82
sitogenetik.....	6, 354
sitrik asit.....	18, 101, 277
sodyum hipoklorit.....	10, 13,14, 78, 143, 196, 267, 340
Somaklonal...4, 26, 263, 283, 345, 346, 347, 350, 352, 356, 357, 361, 364, 366	
sorbitol.....	16, 94, 98,101, 108, 293, 296, 303, 304, 309, 310, 314, 321
steril.....	8,10,13, 46, 94,143, 273, 338
sterilizasyon... 7,10, 25,104, 267, 278, 338	
thiamine.....	108, 278
totipotent.....	4, 90, 349
transgenik.....	3, 31, 289
Tween-20.....	13, 143, 267
UV.....	6,10, 27, 94,103,104,141, 211, 234, 236
verim...92, 93, 97,105, 218, 220, 225, 228	
virüs.....	190,191,192,193,197,199, 200, 202, 203, 204, 207, 263, 264, 277
vitaminler.....	16, 215, 268, 329
vitrikasyon	26, 276, 299, 300, 309, 312
yasemin.....	214
zeatin.....	19, 22, 29, 41,108, 112, 136, 155
zigot.....	4