

# Bitki Doku Kùltürü Nedir?

- **Bitki doku kùltürü;** aseptik Şartlarda,, diğer üretim yöntemlerinden farklı olarak kontrollü çevresel koşullarda, belirli bir steril besi ortamında, bütün bir bitki hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri) , protoplast, doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitlerin) üretilmesidir.

# Bitki doku kùltùrleri

- Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak,
- Kaybolmakta olan tùrlerin korunması,
- Hastalıklardan ari bitkisel materyal elde edilmesi,
- oğaltılması zor olan tùrlerin üretimi
- Hastalıklara dayanıklılığı arttırmak
- Dayanıklı bitki genotiplerini korumak
- Bitki hastalıklarına karsı somaklonal dayanıklılık olusturmak
- Dayanıklı bireyleri secmek veya dayanıklılığa cevap veren genlerin aktarılmasını kolaylastırmak
- Gen aktarımına yardımcı olmak

- Bitki doku kültürü ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu kültürü yapılan hücrelerin özelliklerine göre 3 kısımda incelenir.

1. Organize olmuş meristematik hücreleri ihtiva eden somatik dokulardan rejenerasyon

-Uç ve yan meristemlerden bitkiler çoğalır. Buna meristem kültürü yoluyla klonal çağaltım denir.

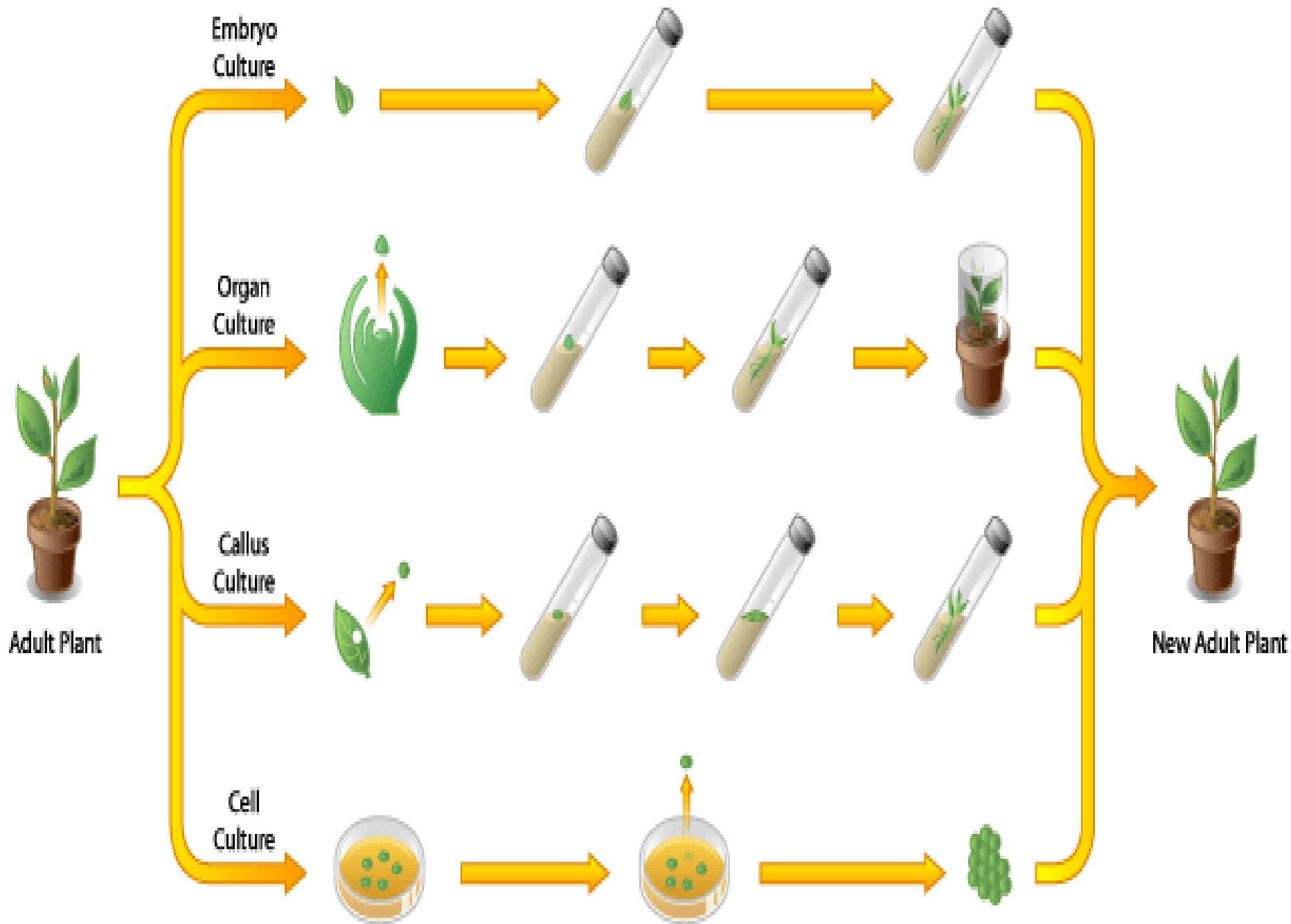
2. Meristematik olmayan hücrelerden rejenerasyon

- Bitki eksplantının kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin somatik hücrelerin bir kısmının genellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin (oksin ve sitokinin) etkisi sonucu bölünerek ve organize olarak organları ve daha sonrada bitkiyi veya bir somatik hücrenin bölünerek embriyo veya daha sonrada tam bir bitkiyi oluşturması şeklinde olabilir.

1. Mayoz bölünme geçirmiş gamet hücrelerden rejenerasyon

tarih	Çalışmalar	Araştırcılar
1902	İlk izole edilmiş hücrelerin kültürü	haberland
1904	Olgun embriyoların kültür	Hanning
1917	Biyoteknolojşi teriminin ilk defa kullanımı	Karl Eraky
1920	Oksinin tanımlanması	Went ve ark
1922	Kök ve sürgün uçlarının labaratuarda çoğaltımı	Kotte ve robbins
1924	İlk embriyo kurtarma tekniği (mısır)	Dieterich
1934	İlk sürekli kök kültürleri (domates)	White
1934	İlk kallus oluşumu	Gautheret
1942	İlk kallus kültürlerinden sekonder metabolit eldesi	Gautheret
1946	Sürgün uçlarından (apikal meristem) ilk bitki eldesi	Ball
1953	DNA nın yapısının belirlenmesi	Watson Crick
1954	Hücre süspansiyonlarından ilk bitki eldesi	Muir ve ark

1957	İlk sitokin tanımı ve organ oluşumunda sitokin/oksin oranının öneminin ortaya konulması	Skoog ve miller
1958	İlk somatik embriyogenesis (havuç)	Steward ve ark
1960	Enzimler kullanılarak ilk canlı protoplast izolasyonu	Cocking
1962	MS besi ortamının geliştirilmesi	Murashige ve skoog
1965	Tek hücreden bitki rejenerasyonu	Vasil ve Hilderbrandı
1967	İlk haploid bitkinin üretimi (anter polen kültürü)	Bourgin ve Nitsch
1968	B5 ortamının geliştirilmesi	Gamborg ve ark
1970	HEPA filtrelerinin kullanılmaya başlanması	
1971	Protoplastlardan ilk bitki rejenerasyonu	Nagata ve Takabe
1978	Cinsler arası ilk somatik melezleme	Melchers ve ark
1983	Transgenik ilk bitkinin elde edilmesi (tütün)	
1986	Transgenik ilk bitkinin tarla testleri (tütün)	
1990	Sentetik tohum geliştirme ve hızlı dondurma	



# Bitki doku kulturlerinde kontaminasyon

- Etkisiz yuzeyssel sterilizasyonun neden olduğu akut kontaminasyon
- Eksplant icinde gizli olan mikroorganizmaların veya alt kultur sırasında yerlesen mikroorganizmaların neden olduğu kontaminasyon
- Uzun bir steril kultur doneminden sonra doğal olarak meydana gelen kronik kontaminasyon

# Mikrocoğaltım

- Bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi olusturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, govde, surgun, kok, kallus, tek hucre ya da polen tanesi vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik kosullar altında yeni bitkilerin elde edilmesine **mikrocoğaltım** denir.
- Bitkilerin in vitro uretimi, kullanılan eksplantın ozelliğine gore (embriyo, meristem, anter, hucre veya protoplast kulturu vb.) adlandırılır.
- Mikrocoğaltımın basarısı, eksplantların alındığı anac bitkinin genotipi, sağlık durumu, ve yetisme kosulları (beslenme, ısıık, sıcaklık, vb.) ile doğrudan iliskilidir.



# Mikrocoğaltımın avantajları

- a) **Hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi**
- b) **Kitlesel üretimde ;**
  - Üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerlik (homojenite)
  - ◦ Diğer yöntemlerden daha kısa kültür süresi
  - Zor üretilen türlerin daha kolay üretimi
  - Seçilen belirli/üstün genotiplerin hızlı üretimi
  - ◦ Üretimde daha az anac kullanılması
- c) **Somaklonal varyasyondan dolayı yeni cesitlerin/ genotiplerin elde edilmesi**

# Mikroçoğaltım asamaları

- Hazırlık aşaması
- Kultur başlangıç aşaması
- Surgun çoğaltım aşaması
- Surgun gelişimi ve köklendirme aşaması
- Dış ortama alıştırma aşamasıdır.



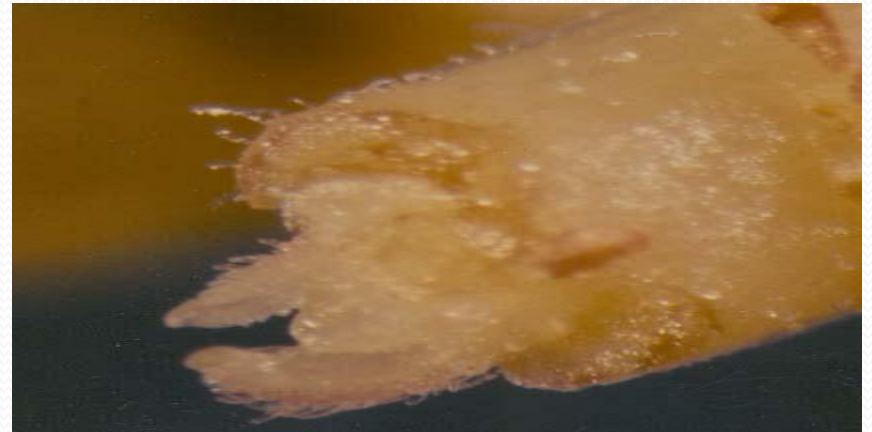
# HASTALIKSIZ BİTKİ ÜRETİMİ

- In vitro yetistirilen bitkiler fungal, bakteriyal ve viral hastalıklar ile bulasık olabilir, zararlı bocekler ve nematodlardan zarar gorebilirler.
- Vegetatif coğaltmada en onemli konu temiz bir baslangic materyalinin kullanımidir.
- Temiz materyallerin elde edilmesi amaciyla bitki doku kulturu tekniklerinden yararlanılmaktadir.

# Meristem kültürü

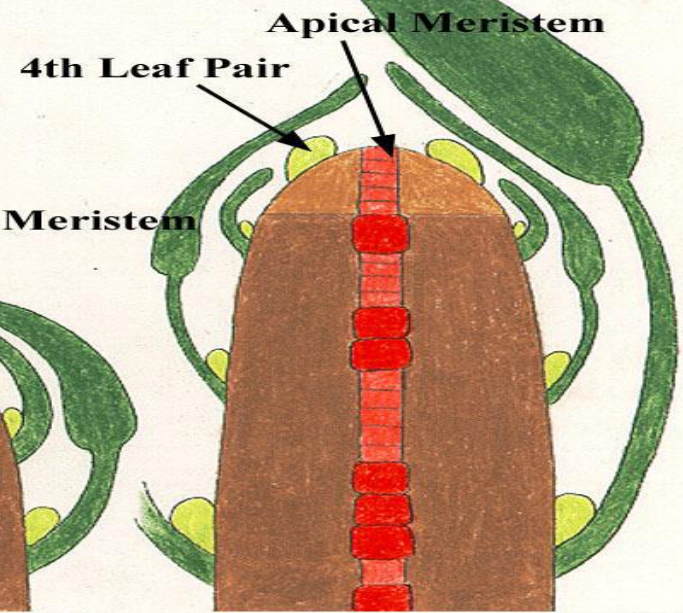
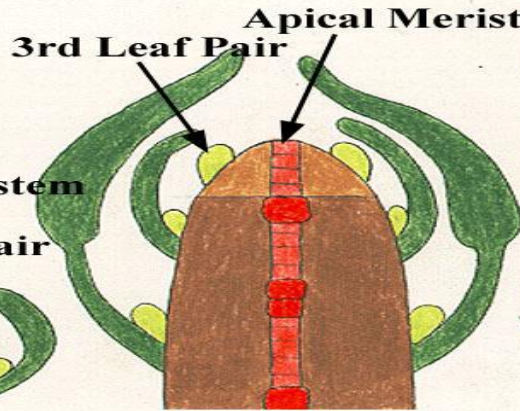
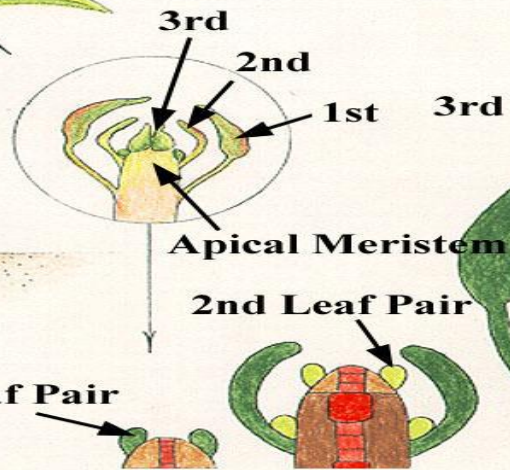
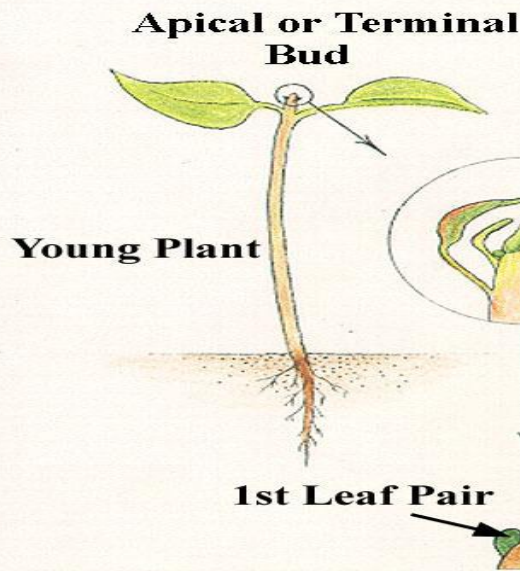
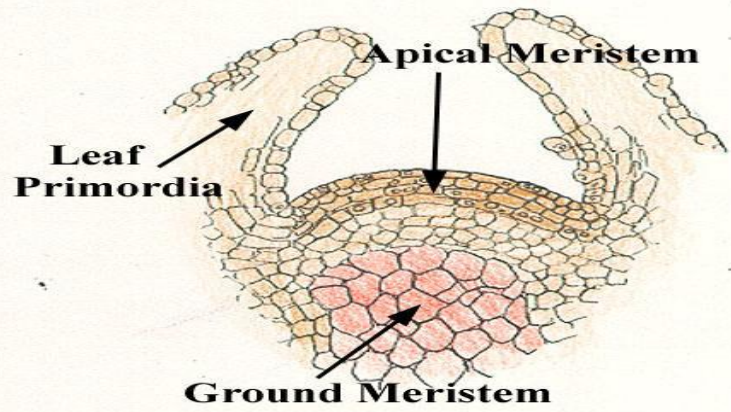
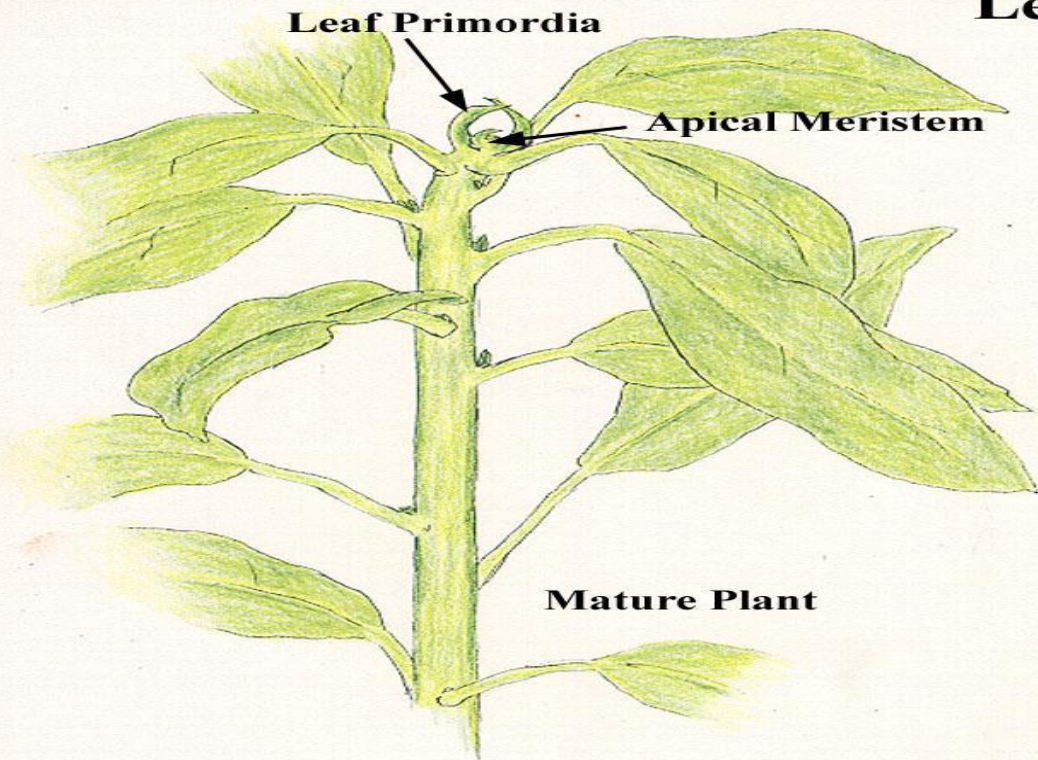
# 1. MERİSTEM KÜLTÜRÜ

- Bitkilerin primer meristematik dokularının izole edilerek steril koşullarda ve yapay besin ortamları üzerinde yetiştirme ve bu yolla yeni bitkiler elde etme esasına dayanan bir vejetatif mikro-çoğaltım yöntemidir.



- Meristem ve surgun ucu kulturlerinin uygulama alanları:
- Virussuz materyal elde etmek
- Mikrocoğaltım
- Germplazm muhafazası
- Genetik transformasyonlar
- Bitki materyallerinin uluslar arası değisimi
- Bakteri ve mantarlardan ari bitkilerin uretilmesi

# Leaf Primordium



# Meristem ucu kültüründe başarıyı etkileyen faktörler

## a) Bitki materyali

- ❖ Eksplantın büyüklüğü
- ❖ Donör bitkinin fizyolojik durumu
- ❖ Eksplantın alındığı mevsim
- ❖ Çeşit

## b) Kültür ortamı

- ❖ Mineral tuzlar
- ❖ Şekerler
- ❖ Agar
- ❖ Büyüme düzenleyiciler

## c) Kültür şartları



# Eksplantın büyüklüğü

- Büyük eksplantlar daha yüksek canlılık ve rejenerasyon kapasitesine sahip olmasına karşın, küçük eksplantlar virus eliminasyonunda daha avantajlıdır.

# Donör bitkinin fizyolojik durumu

- Meristem ucu eksplantları bitkide vegetatif buyumenin aktif olduğu bir dönemde alınırda kulturde basarın oranı artmaktadır.

- **Eksplantın alındığı mevsim**
- Kullanılan bitki
- turune gore,
- eksplantın
- alındığı mevsim
- basarıyı
- etkilemektedir.

## • **Çesit**

- Bitki doku kültürlerinde, iki genotip aynı kültür koşulları altında her zaman benzer şekilde cevap vermemektedir.
- In vitro kültürde, farklı genotipler arasındaki bu önemli farklılığı fizyolojik ve epigenetik faktörler de etkilemektedir.

## • **Mineral tuzlar**

- Eksplantlar genç fidanlardan alındığı zaman MS ortamı uygundur, ancak olgun ağaçlardan alınan eksplantlar için bu ortam toksiktir ve bu eksplantlar için düşük tuz oranına sahip ortamlar daha elverişlidir.

- **Sekerler**

- Karbon kaynağı, meristem ucu kulturu icin kullanılan kultur ortamının onemli bir unsurudur.
- Genel olarak tum besin ortamları karbon kaynağı olarak %1-3 oranında sakkaroz icerir.

- **Agar**

- Coğunlukla eksplantlar yarı-katı ortamda kulture alınmakta ve kultur ortamında ortamı katılastırmak icin agar kullanılmaktadır.

# Büyüme düzenleyicileri

- Coğru bitki turlerinde buyumeyi ve meristem in gelisimini destekleyen dusuk bir sitokin in duzeyi genellikle uygun olmaktadır.
- Oksinler kulturu baslatmak icin mutlaka gerekli olmamasına karsın, dusuk konsantrasyonlarda ilave edilmesi faydalı bulunmudur.
- Gicerellinler, surgun gelisimini ve coklu surgun olusumunu tesvik etmesi nedeniyle kultur ortamına ilave edilebilir.

# Kültür şartları

- Isık, sıcaklık, fotoperiyot gibi çevre şartları in vitro' da farklılaşmayı etkilemektedir.
- Optimal koşullar her genotip için ayrı ayrı belirlenmelidir.

# Meristem ucu kültürü uygulamalarında kullanılan besin ortamları

- En yaygın kullanılan besin ortamı MS (Murashige ve Skoog) ortamıdır.
- Ortamda buyume duzenleyicilerinin cesit ve konsantrasyonları turlere gore değismektedir.



- **Meristem ucu kültürü uygulamalarında**
- **yüzey sterilizasyonu**
- % 90'lık etil alkole (10-30 sn) batırma,
- % 0,5-10 sodyum hipoklorit solusyonunda 15 dk bekletme ve steril distile su ile birkac kez calkalama
- **Kültür odası kosulları**
- Genellikle buyume odasının sıcaklığı 24-26 oC'ye, aydınlatma ise 4000 luks'e ayarlanır.

# Meristem ucu kültürü metodunun uygulanması

- Eksplantın alınacağı uygun bir donör secilir. Bitkiden en az bir boğum (nod) iceren sap parcaları kesilir.
- Donör bitkiye uygun sterilizasyon yontemi belirlenir. Kesilen sap parcalarına uygulanır.
- Bitki materyali binokuler stereomikroskop tablasına yerlestirilir. Tomurcuğun apikal meristemini gormek icin oncelikle yapraklar temizlenir sonra genc yaprak taslakları ile apikal kubbe kesilir.
- Ayrılan eksplant kultur ortamına yerlestirilir ve ortamın su kaybını onlemek icin kultur kapları parafilm ile kaplanır.
- Kaplar kultur odasına yerlestirilir ve genellikle 25 °C'de 4000 luks ısıhta 12-16 saat fotoperiyotta bırakılır.
- Eğer eksplant canlılığını devam ettirirse 7-14 gun icerisinde eksplantta bir uzama ve bitkicik gelisimi gorulur.

- Gelisen bitkicikler çoğaltım için boğumlarının ayrılabilceği buyukluğe ulasıncaya kadar in vitro' da gelismeye bırakılır.
- In vitro'da gelisen bitkicikler steril kosullar altında kultur kaplarından çıkarılır ve boğumlarına ayrılır.
- Her bir parca, aksiller tomurcuğun buyumesini sağlayacak taze ortama aktarılır.
- Boylece orijinal bitki virusten ari olarak çoğaltılabilir.

# Meristem ucu kültürü alısmalarında dikkat edilecek noktalar

- Donor dokular genc kısımlardan ve bitkinin aktif olarak buyuyen bolgelerinden alınmalı.
- Donor bitkilerin damlama sulama ile sulanması enfeksiyon problemlerini azaltmada yardımcı olur.
- Meristem bolgesi etil alkol ile silinmiş binokuler stereomikroskobu altında yatay hava akıslı kabinde çalışarak meristem bolgesi izole edilmelidir.
- Çok küçük eksplantın kulture alınması halinde gelişme sansı düşüktür.
- Bu nedenle meristemin yaprak taslakları ile birlikte kulture alınması başarıyı arttırmaktadır.
- Kesmenin bir sonucu olarak ortaya çıkan fenolik oksidasyon toksik etki yapabilir.
- Kararma durumu halinde meristem derhal taze ortama aktarılması ile önlenabilir.

# Meristem ucu kültürü tekniğinin sınırlamaları

- Virusten arındırmada eksplant boyutu ile kontaminasyon derecesi arasında negatif bir ilişki vardır.
- Virusten arındırılmış bitkilerin elde edilmesinde stok bitkinin fizyolojik durumu etkili olmaktadır.
- Meristem kültürünün virus eliminasyonunda etkili bir yöntem olarak tanımlanmasına karşın meristemlerin her zaman virusten arındırılmış olmadığı da unutulmamalıdır.

- Virusten ari bitkilerin uretilmesinde kullanılan yontemler
- Meristem ucu kulturu
- Sıcaklık uygulaması (termoterapi)
- Meristem kulturu ile birlikte sıcaklık uygulaması
- Kimyasal madde kullanımı (kemoterapi)
- Soğuk uygulaması (krayoterapi)
- Mikroasılama
- Virusten ari bitkilerin kallus ve protoplasttan elde edilmesi
- Virusten ari diğcr eksplantların kullanılması

# Sıcaklık uygulaması (termoterapi)

- Sıcak uygulaması aktif olarak buyuyan vegetatif materyal üzerinde etkili olmaktadır.
- Sıcaklık uygulaması ile çoğu virusler ve bazı sistemik bakteriyal hastalıklar elimine olmaktadır.
- Sıcaklık uygulamasında buyume için gerekli optimum sıcaklığın üzerinde bir sıcaklık seçmek gereklidir.
- Sıcaklık uygulamasında bitki kısımları (celikler veya soğanlar, yumrular) sıcak suda ya da sıcak havada (50-52 °C) belirli surelerde (10-30 dk) bırakılmaktadır.

# Meristem kültürü ile birlikte sıcaklık uygulaması

- Sıcaklık uygulaması, coğunlukla sadece meristem kültürü ile uzaklastrlmas zor olan viruslerin eliminasyonu icin kullanılmaktadır.



# Meristem kültürü ile birlikte sıcaklık uygulaması

- Sıcaklık uygulaması, çoğunlukla sadece meristem kültürü ile uzaklaştırılması zor olan viruslerin eliminasyonu için kullanılmaktadır.

- Sıcaklık uygulaması 3 farklı şekilde yapılmaktadır;
- Bulasık olan bitkiler önce artan sıcaklıklara maruz bırakılır sonra meristem uçları kulture alınır.
- Meristemlerin kulture alınmasından önce in vitro surgunlere yüksek sıcaklık uygulaması yapılır.
- Kulture alınan meristemlere sıcaklık uygulaması yapılır.

# Kimyasal madde kullanımı

- Yaygın olarak ribavirin (virazole-1.β-Dribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) kullanılmaktadır.

- **Soğuk uygulama (kryoterapi)**
- Yüksek sıcaklık uygulamaları ile meristem kültürünün kombinasyonuna benzer şekilde meristem ucu kültürü ile birlikte düşük sıcaklık uygulamalarının da virus eliminasyonu konusunda başarılı olmaktadır.

# Mikroasılama

- Virusten ari anacların (coğur) uzerine meristemlerin asılanması tekniğidir.
- Virusle bulasık olmayan tohumlar kok stokları olarak kullanılmaktadır.
- Ya virusle bulasık ana bitkiden direkt olarak aseptik on islemler ile ayrılan meristem ucu ya da mersitem ucunun in vitro kulturunden sonuclanan kucuk bir surgun ucu virusten ari anaca asılanmaktadır.
- Bu tur mikroasılama meristem ucu kulturunun basarisız olduğu turlerde virusten ari stokları uretmek icin kullanılmaktadır.

# Virüsten ari bitkilerin kallus ve protoplasttan elde edilmesi

- Adventif tomurcuk veya somatik embriyogenesis yoluyla nusellustan kaynaklanan kallustan rejenerere olan bitkicikler yüksek derecede virusten aridir.
- **Virüsten ari diğer eksplantlar**
- Virusle bulasık olan bitkilerin yaprakları patojenin penetrasyon yapamadığı yerlerde koyu yesil alanlara sahiptir. Boyle bolgelerden alınan eksplantlardan elde edilen rejenerantların çoğu virusten ari olmaktadır.



# Bakteri ve Mantarlardan Ari Bitkilerin Üretimi

- Meristem kültürü tekniği, donör bitkinin bakteriyal ve fungal patojenler ile enfekte olduğu durumlarda da avantaj sağlamaktadır.
- Bitkide terminal bolgenin vasküler farklılaşma bölgesinin üst kısmı patojenik partikülleri pek içermez.
- Bu nedenle, eğer bulasık olan bir bitkiden, söz konusu bu bölgeden küçük bir eksplant alınıp in vitro'da başarılı olarak geliştirilirse patojensiz bitki elde edilmesi mümkün olmaktadır.

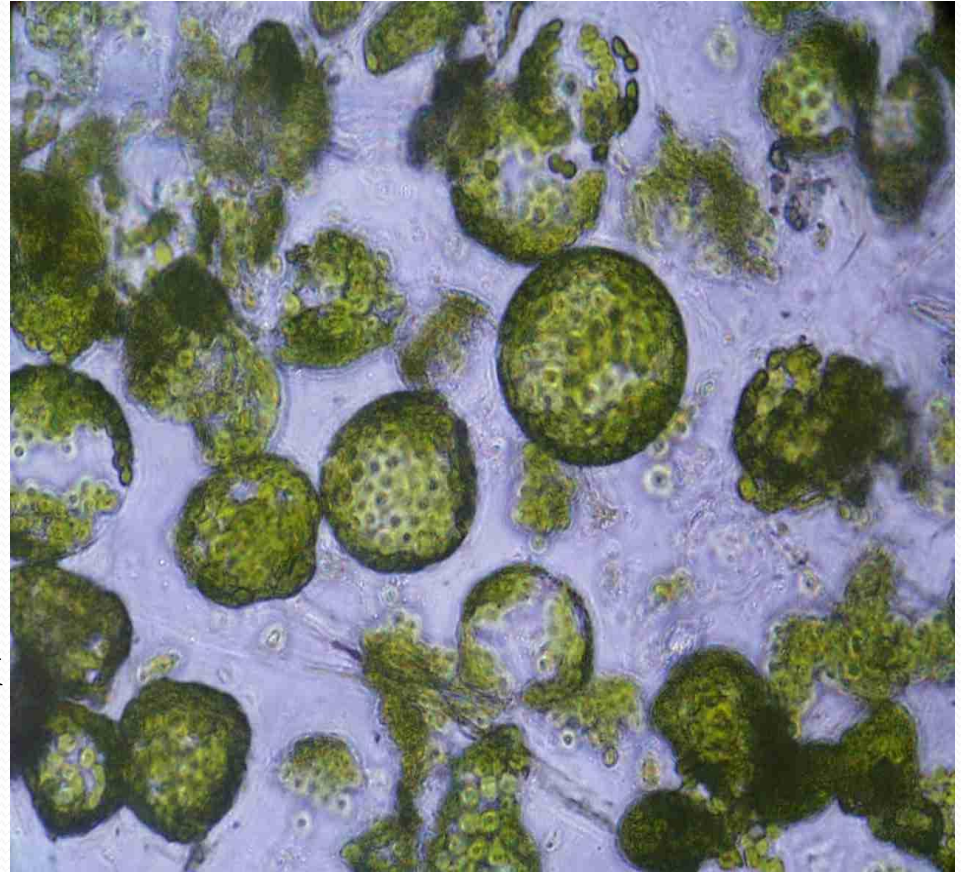




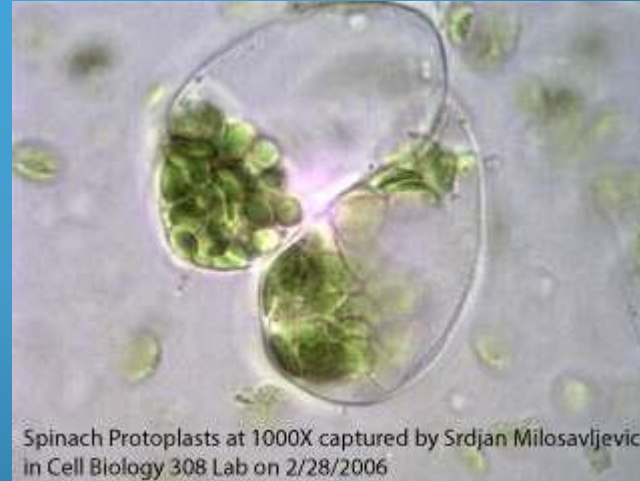
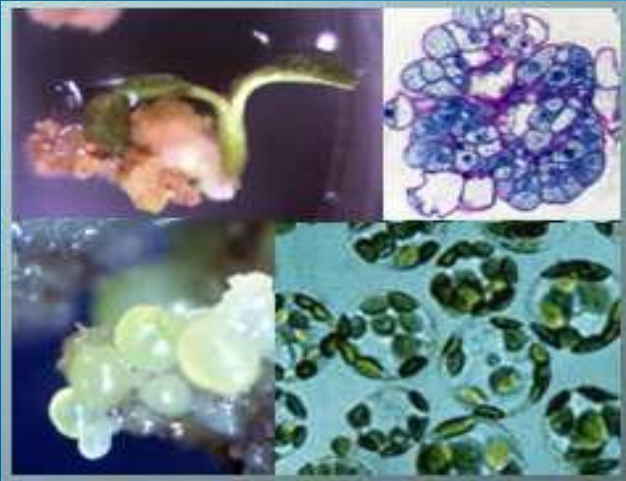
# Protoplast kültürü

# PROTOPLAST KÜLTÜRÜ

- Selülozik yapıdaki hücre çeperleri, mekanik ya da enzimatik yollarla çıkarılmış olan hücrelere “protoplast” denilmektedir.
- Protoplast kültürü ise, izole edilen protoplastların, hücre modifikasyonu ve somatik hibridizasyon yöntemleriyle bitki tür ve çeşitlerinin geliştirilmesi amacıyla uygun besin ortamlarında kültüre alınmasıdır.



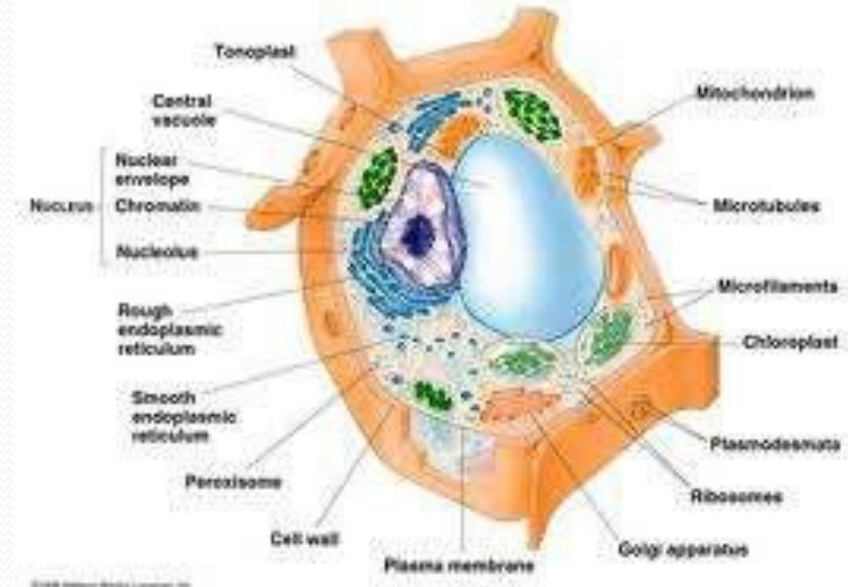
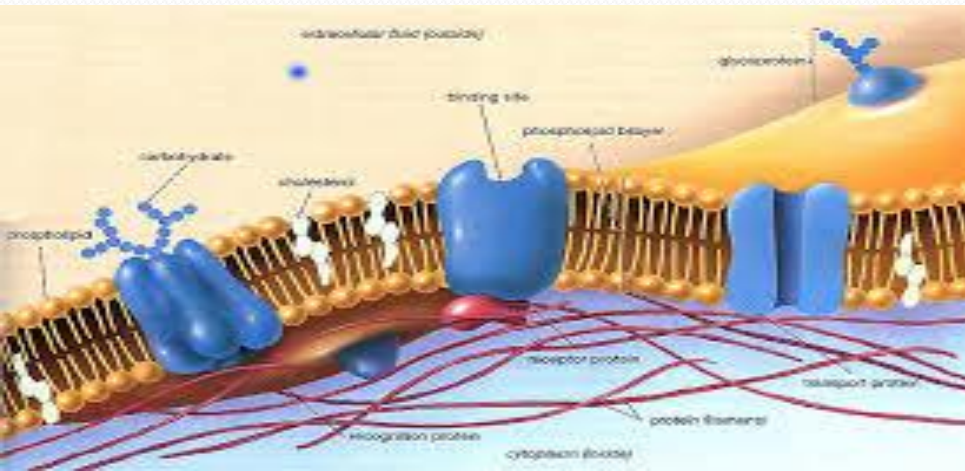
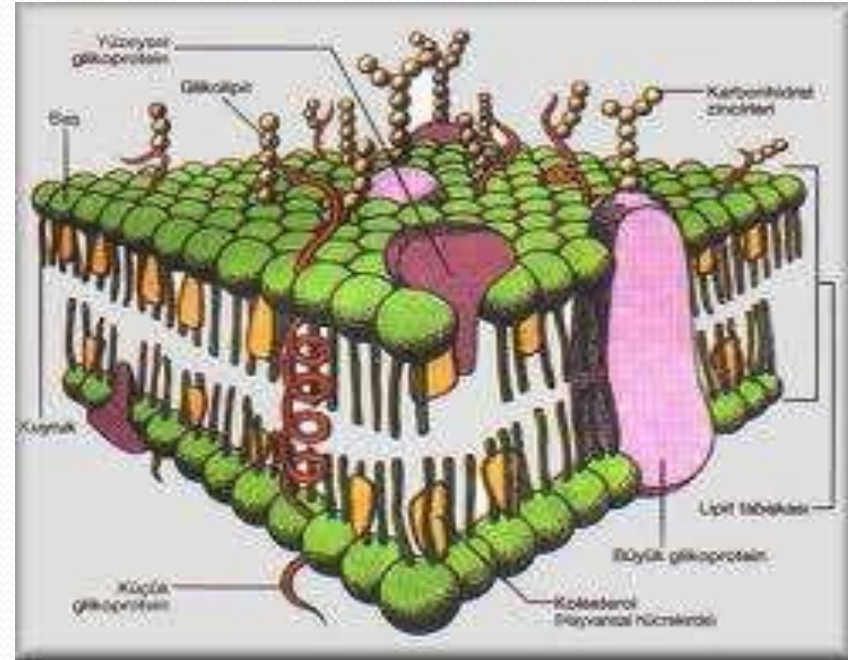
- Protoplastların canlılığı üzerine etki eden faktörler;
- Enzimin saflığı
- Kültür ortamının ozmotik basıncı



- Bir bitkinin hücre, doku, organ, meristem veya embriyo gibi çeşitli parçalarından yeni bitki veya bitkiler elde edilmesine bitki rejenerasyonu denir.
- In vitro şartlarda tek hücreden yeni bitki elde edilmesine **totipotansi**, böyle bir hücreye de **totipotent hücre** denir.

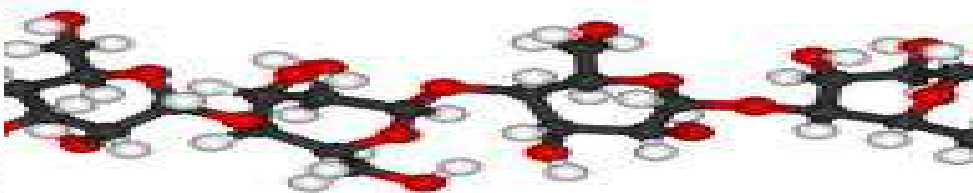
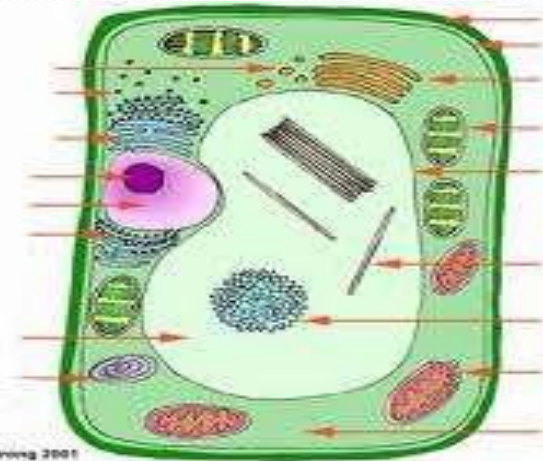
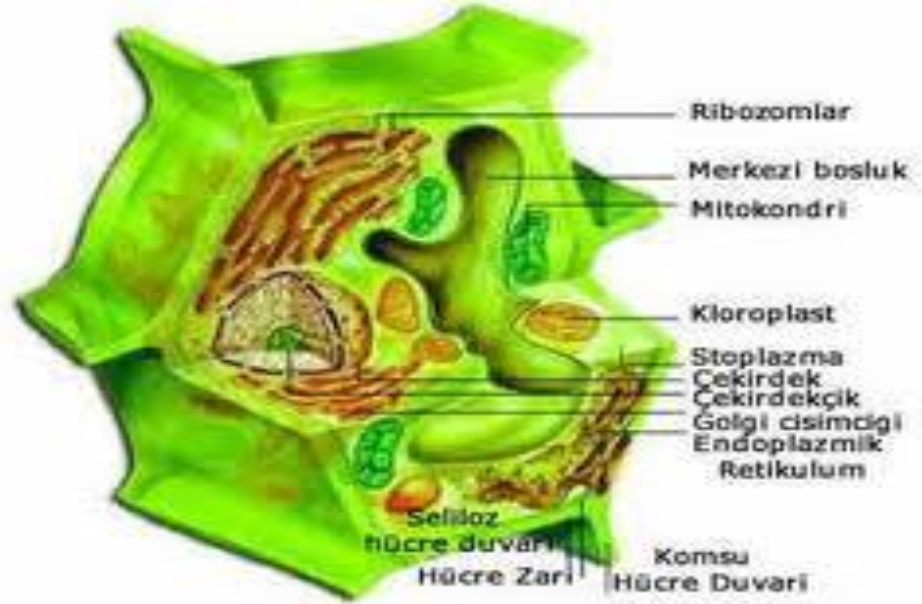
# Bitkilerde Hücre Duvarı Kompozisyonu

- Bitkilerde hücre duvarı hücre için mekanik bir sınır ve destek olarak görev yapmakta, ozmotik değişiklikler sonucu hücrenin patlamasını ve mikroorganizmaların hücreyi enfekte etmesini engellemektedir.



# Bitki hücre duvarının 3 ana unsuru

- Selüloz
  - Hemiselüloz
  - Pektik maddeler
- 
- Hücre duvarı, hücrenin büyüklüğünü, şeklini ve dengesini belirler.



# Protoplast izolasyonu

- Eksplant kaynakları
- Donör bitki materyalinin ön muamelesi ve yetistirme şartları
- Protoplast izolasyonunda kullanılan yıkama solüsyonları, enzimler ve enzim karışımları
- Ozmotik şartlar ve plazmolizasyon
- Enzim inkübasyonu
- Protoplastların yıkanması ve saflastırılması
- İzolasyon sonrası uygulanan testler



# Eksplant kaynakları

- **Yaprak mezofil hücreleri** (klorofil içerdiklerinden somatik melezlemede yapılan renksel ayırmada avantajlıdır)
- **Embriyonik hücreler** (daha hızlı gelişme ve bölünme gösterirler)
- **Genç bitki dokuları**
- **Henüz olgunlaşmamış bitki doku ve organları** (embriyo, kotiledon, meyve kabuğu)
- **Meristematik hücreleri içeren dokular** (gövde apikal meristemi, yan ve kök ucu meristemleri)
- **Özel protoplast kaynakları** (polen tanesi, skutellum, stoma hücreleri vb.)

# Dönör bitki materyalinin ön muamelesi ve yetiştirme şartları

- Eksplantın alındığı bitkinin gelişme devresi ve şartları
- Kültür ortamı komponentleri
- Sıcaklık
- Işık

# Protoplast izolasyonunda kullanılan yıkama solüsyonları, enzimler ve enzim solüsyonları

- Yıkama solüsyonları;  
CaCl<sub>2</sub>, manitol, CPW
- Enzimler;  
Selülaz, hemiselülaz, pektinaz

# Ozmotik şartlar ve plazmolizasyon

Ozmotik basıncı ayarlamak için;

- Manitol
- Sorbitol
- Glikoz
- Sakkaroz
- KCl
- $\text{CaCl}_2$  kullanılır.

- Enzim inkübasyonu
- İnkübasyon süresi kısa tutulmalıdır.
- Sıcaklık arttıkça inkübasyon süresi kısalır.

# Protoplastların yıkanması ve saflaştırılması

- En çok kullanılan saflastırma metodları;
- Filtrasyon
- Santrifüj
- Karışık metod
- Daha yoğun bir çözelti içinde yüzdürme

- Filtrasyon metodunda, ortalama protoplastçapına göre değisen ve azalan porozitede bir seri filtreden protoplastlar geçirilir ve az sayıda santrifüj islemi uygulanır.
1. En çok kullanılan teknik filtrasyon ve santrifüj isleminin birlikte uygulanmasıdır.
  2. İlk önce protoplast karışımı bir filtreden geçirilir, daha sonra 5-10 dk santrifüj edilir.
  3. Bazı durumlarda protoplastlar sakkaroz çözeltisinde düşük devirde santrifüj edilir. Sakkaroz özeltisi protoplastlardan daha fazla yoğun olduğu için protoplastlar çözelti üzerinde toplanırlar ve pipetle çekilerek uzaklaştırılırlar. Buna yüzdürme metodu denir.

# İzolasyon sonrası uygulanan testler

- Hücre duvarı kalıntısının tespiti
- Canlılık testleri
- Protoplast büyüklüğü ve verim tespiti

# Protoplast kültürünün kullanım amaçları

- Somoklonal varyasyon yaratılarak, bunlar arasından amaca uygun fertlerin seçilmesi,
- Melezlenmeleri mümkün olmayan türlerin protoplast füzyonu ile mezlenebilmeleri,
- Protoplastlar bünyelerine makro moleküller, organeller ve hatta hücre çekirdekleri de alabildiğinden, istenilen bilgilerin yeni bitkilere aktarılması.



# Protoplast kültür teknikleri

- Sıvı damla kültürleri tekniği
- Sıvı kültür tekniği
- Agaroz blokları kültürü tekniği
- Agaroz damla kültürü
- Asılı veya Agar içinde kültür tekniği oturan damla kültürü
- Agar üzerinde sıvı kültür tekniği
- Agaroz ortamı kültürü tekniği
- Protoplastların tutuklanması
- Nörs kültürleri ve besleyici hücreler

# Protoplastların kültür sonrası davranışları

- **Strese tepki:** enzim etkisi sonucu bitki hücrelerinin kendi savunma mekanizmasını geliştirmesi
- **Tamir mekanizması:** hücre zarında ve zar proteinlerinde oluşan zararın giderilmesi, yeni zarın oluşturulması
- **Adaptasyon:** organellerin ve sitoplazmanın morfolojik ve fonksiyonel olarak adaptasyonu
- **Hücre bölünmesi:** hücre hayat döngüsünün yeniden başlaması, hücre bölünmesi ve kallus oluşumu
- **Morfogenesis:** organize hücre gelişmesi, bölünmenin uyarılması ve değişimin başlayarak organize doku ve daha sonra bitkilerin oluşturulması

# Somatik hücreler arası melezleme (protoplast füzyon)

- Protoplast füzyonu ve somatik melezleme, pre-zigotik eseysel uyumsuzluklar nedeniyle, klasik melezleme ile elde edilemeye hibritlerin elde edilmesinde kimyasal ve fiziksel yöntemlen kullanılarak uygulanan bir tekniktir.

- **Somatik melezleme**, iki protoplastın çekirdek, sitoplazma veya her ikisinin de birbirleriyle belirli ortam ve şartlarda birleştirilmesidir. Füzyon sonucu oluşan yapılara füzyon ürünleri veya heterokaryonlar denir.



M. sativa x M. coerulea somatik hibridine ait çiçekler

# Protoplast füzyon aşamaları

- Füzyonu olacak her iki cins veya türden tekrarlanabilir bir şekilde protoplastlar elde edilir
- Protoplastlar çeşitli metodlarla birleştirilir (füzyon)
- Füzyon ürünlerinin seçimi yapılır
- Heterokaryonların kültürü sonucu önce kallus sonra sürgün rejenerasyonu yoluyla bitkiler elde edilir
- Somatik melezler seleksiyona tabi tutulur
- Somatik melez bitkiler ebeveynlerle karşılaştırmalı olarak analiz edilir
- Verim ve tarla denemeleri yapılır
- Tohum üretimi ve tescil işlemi yapılır.

## Protoplast füzyonunda;

- Polietilen glikol (PEG) ile füzyon ve
- Elektrofüzyon metodları kullanılmaktadır.



# Somatik hibritlerin analizi

- RAPD profilleri
- Kromozom sayımı
- Southern analizi
- Flow Sitometri
- RFLP
- İn situ genomik melezleme gibi biyokimyasal ve
- sitolojik metodlar kullanılarak yapılır.

# Evebeynlerle, F1 hibrit ve somatik hibrit bitkilerin karşılaştırılmasında;

- Fraksiyon I protein analizi
- Kromozom sayısı ve karyotipi
- İzozimler
- Mitokondriyel DNA miktarının tespiti
- Kloroplast DNA miktarının tespiti
- Nükleer DNA miktarının tespiti
- Genel morfoloji (somaklonal varyasyon)



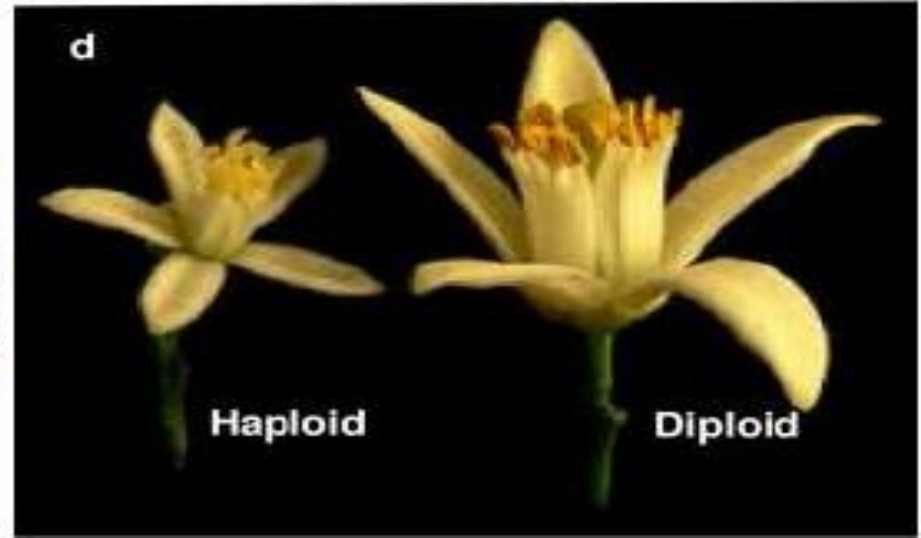
# Protoplast kültürünün dezavantajları

- Her bitki türü için tekrarlanabilir bir sekilde protoplasttan bitki elde etme metodu gelistirilmis değildir.
- Heterokaryonların etkin bir sekilde ayırımı yapılamamaktadır.
- Somatik melez bitkiler genellikle steril olmakta, dl vermemekte veya fertil olması durumunda çok genis bir somaklonal varyasyon göstermektedir.

# HAPLOİD BİTKİ ÜRETİMİ

- Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitkiler denmektedir.
- Haploidler, her bir lokustaki allelerden sadece bir seriyi içermekte ve bu özellikleri ile ıslah çalışmalarında önemli yer tutmaktadırlar.
- Haploid bitkilerin kromozom sayılarınının katlanması sayesinde %100 homozigot saf hatlar elde edilebilmektedir.

- Haploid bitkilerin elde edilmesinde kullanılan baslangıç materyalleri gametlerdir.
- Esas olarak, haploidlerin elde edilebilmesi için iki yöntem bulunmaktadır;
- - ya erkek gametten ya da
- - dişi gametten in vitro koşullarda bitki oluşumunu sağlanabilmektedir.



# ERKEK GAMETTEN HAPLOİD BİTKİ ELDE ETME (ANDROGENESİS)

In vitro kültüre alınan genç anterlerden haploidlerin basarıyla oluŖturulması ilk kez 1964 yılında *Datura stramonium* bitkisinde Guha ve Maheshwari tarafından gerekleŖtirilmiŖtir. 1967 yılında Bourgin ve Nitsch'in tütün bitkisinde anter kültür yoluyla haploid embriyolar elde etmesinden sonra, özellikle ekonomik önemi fazla olan tahıllar, sebzeler ve seker pancarı basta olmak üzere günümüze değin pek çok bitki türünde anter kültürü yoluyla haploid eldesi üzerinde alıŖmalar yapılmıŖ ve 25 familyaya ait 200 bitki türünde in vitro androgenesis tekniğinden basarılı sonuçlar elde edilmiŖtir.

# ANTER KÜLTÜRÜNÜN YAPILIŞI

- Henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu asamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler, anter kültürü için uygun başlangıç materyalidir.
- Belirlenen asamadaki anterleri bulunduran çiçek tomurcukları, yüzeysel dezenfeksiyon işlemine tabi tutulduktan sonra steril koşullarda tomurcukların içerisinde çıkarılan anterler, önceden hazırlanmış ve otoklavlanarak sterilize hale getirilmiş besi ortamlarının üzerine yerleştirilmektedir.

# ANTER KÜLTÜRÜNÜN YAPILIŞI

- Çoğunlukla petri kutularına, agarla katılaştırılmış besin ortamlarına yerleştirilen anterlerin dikim işlemi tamamlandıktan sonra petri kutularının kenarları bir film seritle kapatılarak herhangi bir enfeksiyona karşı, dış ortamdaki atmosferle olan ilişki kesilmektedir.
- Petri kutuları içerisindeki anterler inkübasyon için değişik koşullara alınabilmekte, tütün gibi anter kültürüne son derece olumlu yanıt veren bitkilerde 24-28°C sıcaklıkta ve fotoperiyodik bir düzende aydınlatılan bir iklim dolabında yapılan inkübasyon yeterli olmaktadır.

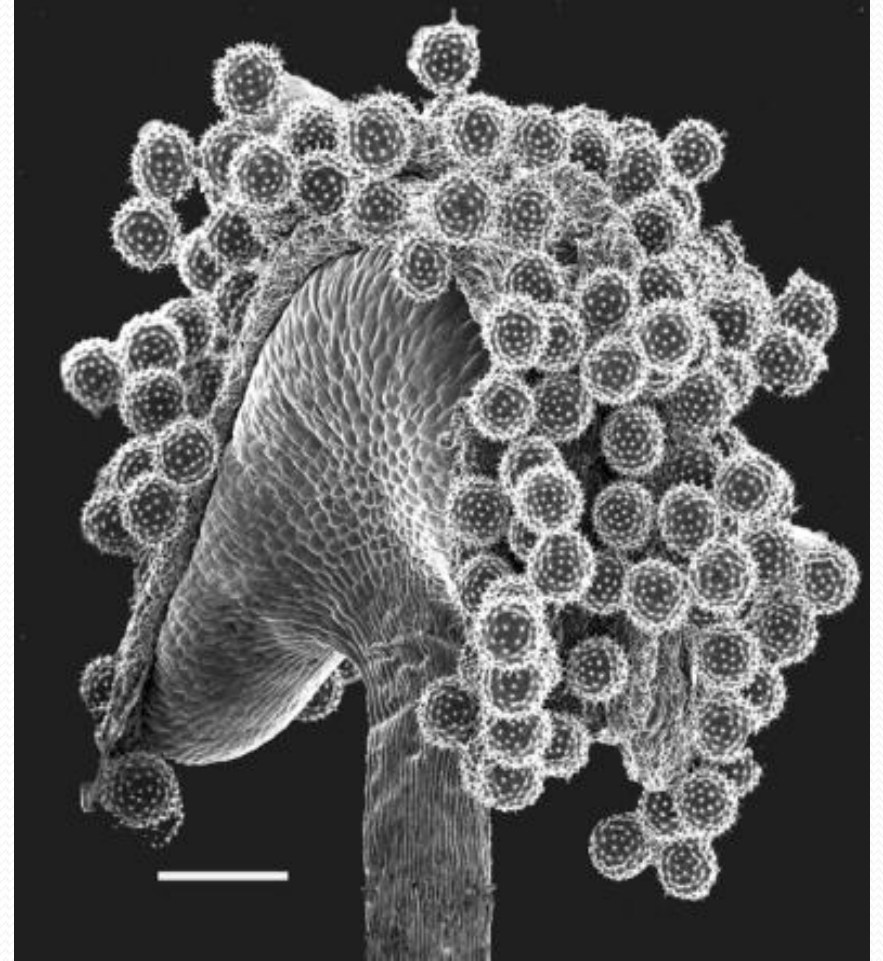


# ANTER KÜLTÜRÜNÜN YAPILIŞI

- Androgenesis direkt ve indirekt androgenesis olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.
- Kültürün 40. gününden sonra anterlerin içerisinde embriyolar çıkarak gözle görülebilir asamaya ulaşmaktadır. Buna **direkt androgenesis** adı verilmektedir.
- Bunun dışında, bazı türlerde önce kallus oluşmakta, daha sonra kallustan organogenesis veya embriyogenesis yoluyla haploid bitkiler oluşabilmektedir. Bu ikinci oluşum yoluna **indirekt androgenesis** denilmektedir.

# ANDROGENESISİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

- Anter kültüründen elde edilen başarı, yani elde edilen haploid embriyo sayısı birçok faktörün etkisi altında bulunmaktadır.
- Bu faktörlerin bir bölümü, anterlerin alındığı donör bitkiden kaynaklanmakta olup diğer bir bölümü de anter kültürü tekniğinin uygulanması sırasındaki koşullarla ilişkilidir.

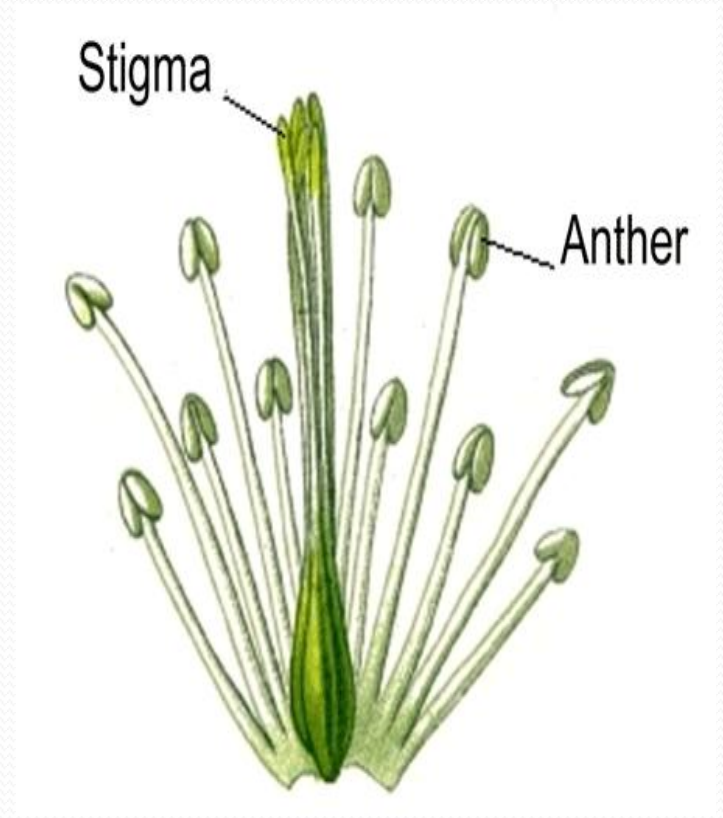


# genotip

- Anter kùltüründe basarı, çok büyük bir oranda anterlerin alındığı bitkilerin genotipine bağlıdır.
- Simdiye dek alışılmıs olan tüm bitki türlerinde; aynı kùltür kosulları altında, anter yanıtları bakımından genotipler arasında büyük farklılıklar bulunmustur



- Herhangi bir genotipten yüksek oranda haploid embriyo elde etmek için;
- Her genotip için kültür koşullarını optimize etmek ve anter kültüründe embriyo oluşturma başarısı yüksek genotiplerle embriyo oluşturma kapasitesi düşük olan genotipleri melezlemek gerekmektedir.



# DONÖR BITKİNİN YETİŞME KOSULLARI

- Donör bitkinin genotipi son derece elverişli olsa bile, mikrosporlardan in vitro koşullarda haploid embriyo uyarımını başarabilmek, bu bitkilerin yetiştirildiği koşullara da bağlıdır.
- Bitkilerin yetiştirildiği dönemdeki sıcaklık, ışık yoğunluğu ve günlük ısıtılma süresi, havadaki CO<sub>2</sub> konsantrasyonu, bitkinin beslenme koşulları başta olmak üzere tüm çevresel faktörler, o bitkilerden alınan anterlerden elde edilecek başarı üzerinde etkili olabilmektedir.

# ANTERLERİN GELİŞME DÖNEMİ

- Çoğu bitki türünün anter kültürlerinde en iyi sonuçlar, tek çekirdekli mikrospor döneminin erken veya geç aşamasındaki mikrosporları içeren anterlerden alınmaktadır.
- Mikrosporlar içerisinde nisasta depolanmaya başladıktan sonra, gelişmeyi sporofitik yöne kaydırmak ve haploid embriyo elde etmek için yapılacak uyarılar etkili olamamaktadır.

- **Mikrospor gelişme aşamasını belirlemek için kullanılan yöntemler;**
- ezme preparasyon tekniği ve asetokarmin ile hızlı boyama
- flouresans mikroskobu ve preparat hazırlanmasında buna uygun merkürük asit, DAPI gibi boyaların kullanılması
- parafine gömerek kesit alma ve bunun ardından preparatları hematoksilin veya metilen mavisi gibi değişik boylarla boyama

# ANTERLERE YAPILAN ÖN UYGULAMALAR

- Anter kültüründe en etkili ön uygulama, tomurcuklara yapılan soğuk soklarıdır.
- 4-100C'ler arasında, 72 saat ile 4 haftaya kadar tutulan tomurcuklar; arpa, patates, mısır, buğday ve biber gibi bazı türlerde polen rejenerasyonu bakımından olumlu yanıtlar vermiştir.





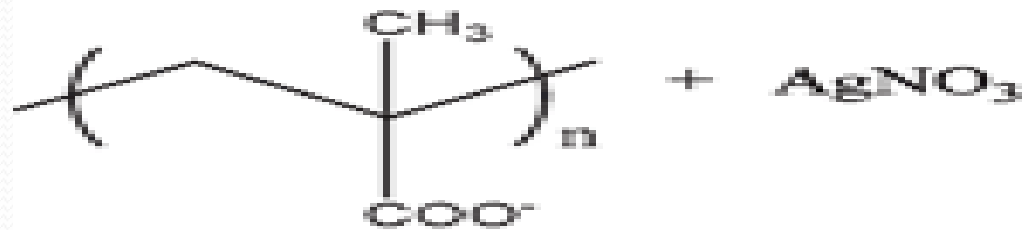
- **Anter kültürlerde soğuk uygulamasının etki mekanizması;**
- Nisasta birikiminin bloke edilmesi
- Tek çekirdekli mikrospor döneminde tutuklanan mikrospor sayısının artırılması
- Anter duvarının yaslantmasının geciktirilmesi ve ABA gibi bazı engelleyici maddelerin etkisinin azaltılması

# BESİN ORTAMININ BİLESİMİ VE YAPISI

- Anter kültüründe genel olarak ilk asamada gametofitik dokuları sporofitik gelişmeye dönüştürme yönünde uyaracak oksinler gerekli iken; bitkiciğe dönüşüm asamasında sitokinlerin varlığına gereksinim duyulur.

- Temel besin ortamı olarak, anter kültüründe en fazla Murashige ve Skoog, White ve Nitsch ortamları kullanılmaktadır.
- Karbon kaynağı olarak anter kültürlerinde büyük bir çoğunlukla sakkaroz kullanılmaktadır.
- Besin ortamına özellikle kültürün ilk günlerinde ilave edilen yüksek seker dozları (%6-12), anter kültüründen haploidlerin elde edilmesinde olumlu etki yapmaktadır.

- Besin ortamına katılan serin, glutamin gibi aminoasitler, AgNO<sub>3</sub> gibi etilen biyosentezini inhibe edici maddeler veya aktif kömür gibi katkı maddeleri de anter kültüründen elde edilecek başarıyı artırma yönünde kullanılan çeşitli kimyasal maddeler arasında yer almaktadır.



# İNKÜBASYON KOSULLARI

- İnkübasyon sırasındaki ısı, 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 oC'ler arasında kültüre alınmaktadır. Kültürün ilerleyen aşamalarında düşük ışık yoğunluğu (2000 lux) ve değişik günlük ışıklandırma sürelerinde bekletilen anterlerde embriyo oluşumgerçekleştikten sonra; rejeneren bitkiler daha yüksek ışık yoğunluğuna (3000-10000 lux) sahip koşullara aktarılmaktadır.
- Bazı bitki türlerine ait anter kültürlerinde inkübasyonun ilk günlerinde yüksek sıcaklık uygulamaları, embriyo oluşumu üzerinde çok olumlu etki yapmaktadır.

# DİŞİ GAMETTEN HAPLOİDİ UYARTIMI (GYNOGENESIS VE PARTHENOGENESIS)



- Ovül ve Ovaryum Kültürleri
- Döllenmemiş yumurtalığın ya da yumurta hücrelerinin kültüre alınmasıyla haploid embriyo ve bitki oluşumuna 'ovaryum' veya 'ovül kültürleri' adı verilmektedir.

# EKSİK VEYA YETERSİZ POLENLERLE TOZLAMA

- Partenogenetik embriyo olusumunu uyarmak üzere kullanılacak eksik veya yetersiz polenleri elde etmek için, değisik kimyasal maddeler ile radyoaktif ısın uygulamalarından yararlanılmaktadır.
- Ayrıca, uzak akrabalar arası melezlemeler, tozlamaların geciktirilmesi, sıcaklık sokları da uygulanan diğer tekniklerdir.
- Polenlere yapılan bu uygulamalar sayesinde polen generatif çekirdeği inaktif hale geçirilmekte, bununla birlikte çimlenme yeteneğini koruyan polenler disicik tepesi üzerinde çimlendiklerinde oluşturdıkları uyartım sonucunda, partenogenetik olarak haploid embriyolar meydana gelmektedir.

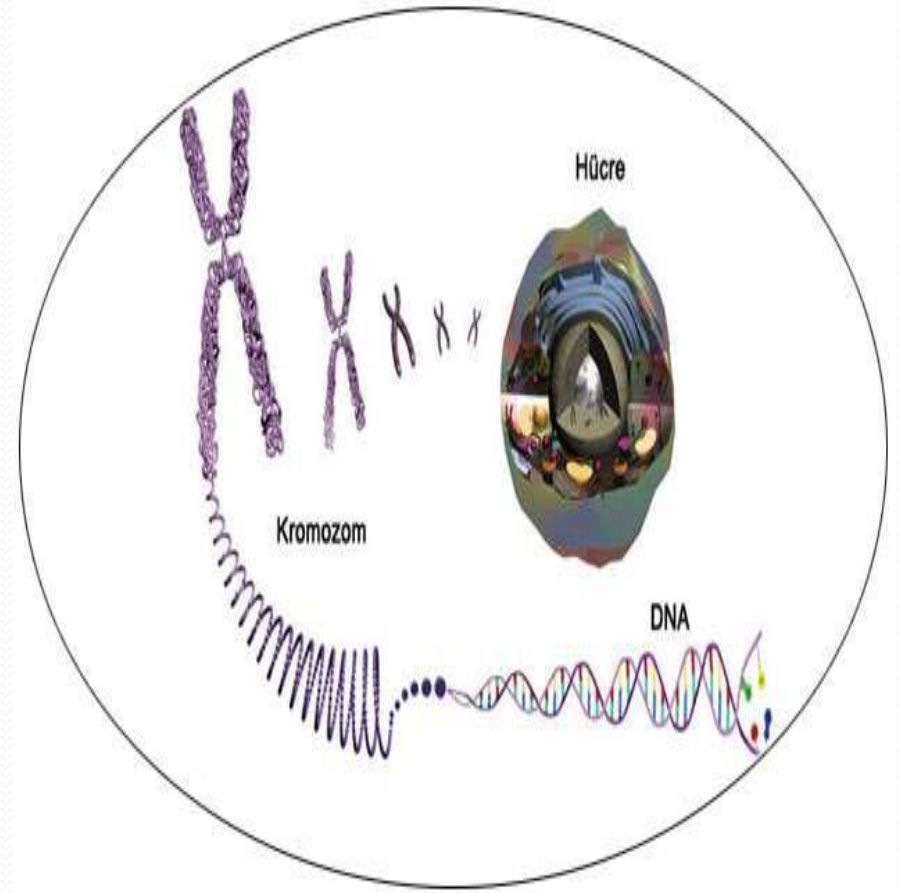
# HAPLOİD BİTKİLERDE KROMOZOM KATLAMA

- Haploid bitkilerin kromozom setlerinin katlanması ve % 100 homozigot safhatların hızla geliştirilmesi, haploidi tekniğinin esasını oluşturmaktadır.
- Kromozom katlanması pratikte çoğunlukla kimyasal madde uygulamalarıyla gerçekleştirilmektedir uygulamalarıyla gerçekleştirilmektedir.
- Günümüzde kromozom katlaması için bitki ıslahçıları tarafından en yaygın kullanılan kimyasal madde, kolhisindir.
- 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.



# PLOİDİ BELİRLEME

- **Fenotipik Gözlemler:**  
Bitkilerin kromozom sayısı Arttıkça, bitkinin tüm organlarında bir irilesme meydana gelmekte; buna karşılık haploid bitkilerin elde edilmesi halinde bitkinin organları tam olarak olduğu halde diploidlere göre daha küçük olmaktadır.

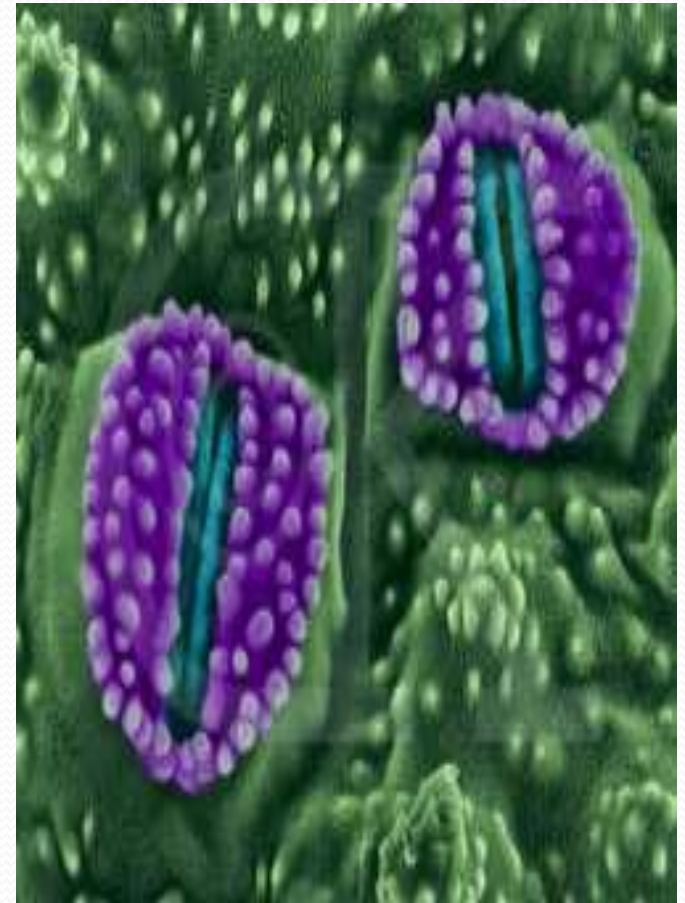


# PLOİDİ BELİRLEME

- **Kromozom Sayımları:**  
Bitkilerin genellikle kök uçlarında yapılan kromozom sayımları, güvenilirliği en fazla olan yöntemdir. Sağlıklı ve güçlü bir gelişme gösteren taze kök uçlarından alınan örnekler, kromozom sayımları için en uygun materyaldir.

- **Flow Sitometri:** hücrelerin tek tek flouresans dedektörden geçerken emdiklerin ısının analizine dayanan bir yöntemdir. Her bitki türü için yöntemin optimize edilme gereksinimi, bu yöntemin dezavantajlarından biri olsa da; miksoploid hücrelerin varlığının ortaya çıkartılması, bir kisinin günde 100'den fazla bitkide analiz yapabilme olanağını sunması gibi avantajları vardır.

- **Stomatal İncelemeler:** Değisik bitki türlerinde stomaların iriliği, dolayısıyla birim alanda bulunan stoma sayısı ile ploidi düzeyi arasında güvenilir iliskiler saptanmıstır.
- Örneğin kereviz, tütün, brüksel lahanası, havuç, karpuz, kavun, hıyar, biber ve kabakta haploid bitkilerin stomalarının diploidlerine göre daha küçük olduğu, dolayısıyla birim alanda daha fazla stoma bulunduğu saptanmıstır.



# HAPLOİDLERİN SAĞLADIĞI AVANTAJLAR

- 1. Haploidleri kullanmanın en basta 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 ulaşılabilir.
- 2. Resesif genler, dominant genler tarafından maskelenemeyeceğinden, homozigot bireylerde genetik açılımı izlemek daha basit bir işlem haline gelmektedir.
- 3. Homozigot bitkilerin üretimi özellikle dioik türlerde ve kendine uyumsuzluk sorunu bulunan bitkilerde zor olup anter kültürü, bu bakımdan büyük kolaylık sağlamaktadır.

- 4. Yabancı döllenen türlerde heterozigoti oranı çok yüksek olduğundan bunlarda homozigot hatların elde edilmesi için 10-12 generasyon boyunca kendilemeler yapmak gerekmekte; kendine döllenen türlerde bile aynı amaçla 5-7 generasyon kendileme işlemine gereksinim duyulmaktadır.
- 5. F<sub>1</sub> hibrit çeşitlerin geliştirilmesinde homozigot hatlar arasında üstün kombinasyon yeteneği verenlerinin belirlenmesi yöntemi kullanıldığından, haploidinin hibrit çeşit ıslahında özel bir önemi bulunmaktadır.
- 6. 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 çeşitleri arasında diploid seviyede melezleme yaparak kombinasyon yoluna gidilmektedir.

- 7. Kombinasyon ıslahında da sonuca çok kısa sürede ulaşmayı sağlayan haploidi sayesinde, F<sub>1</sub> kademesindeki melez bitkilerden haploid çekerek; farklı genotiplerde bulunan ve tek bir genotipte toplanması arzu edilen özelliklere sahip bitkiler kazanmak mümkündür.
- 8. Haploidi, resesif mutasyonların açığa çıkartılması ve bunlardan homozigot bireylerin elde edilmesini de sağlayabildiği gibi; somatik hibridizasyon işleminin diploid protoplastlara göre daha kolay yapılabilmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca iki haploid protoplastın birlesmesinin sonucu “diploid” olacağından; protoplast kültürü kullanılarak yapılan somatik hibridizasyon tekniğinin bilinen dezavantajlarınının büyük bir kısmı böylece ortadan kalkacaktır.

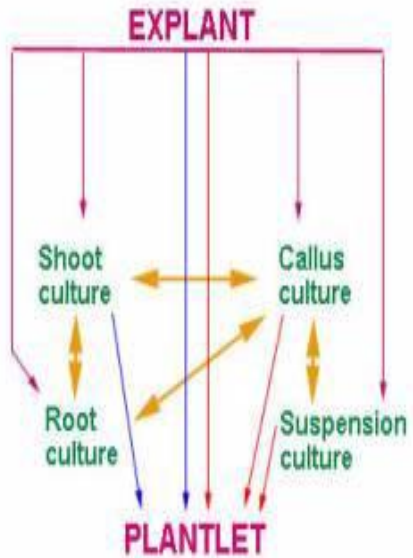
- 9. Anter kültürünün tüm bitkilere genellenemeyecek, türlere özgü bazı avantajları da bulunmaktadır. Örneğin kuskonmaz bitkisinde XY kromozom yapısına sahip erkek bitkilerden anter kültürü yoluyla DH hatlar elde edildiğinde XX ve YY kromozom yapısında bireyler oluşmaktadır. Böylece doğada oluşma olasılığı bulunmayan YY kromozom yapısına sahip bitkiler, ya da diğer bir deyişle süper erkek bitkiler elde edilebilmektedir.



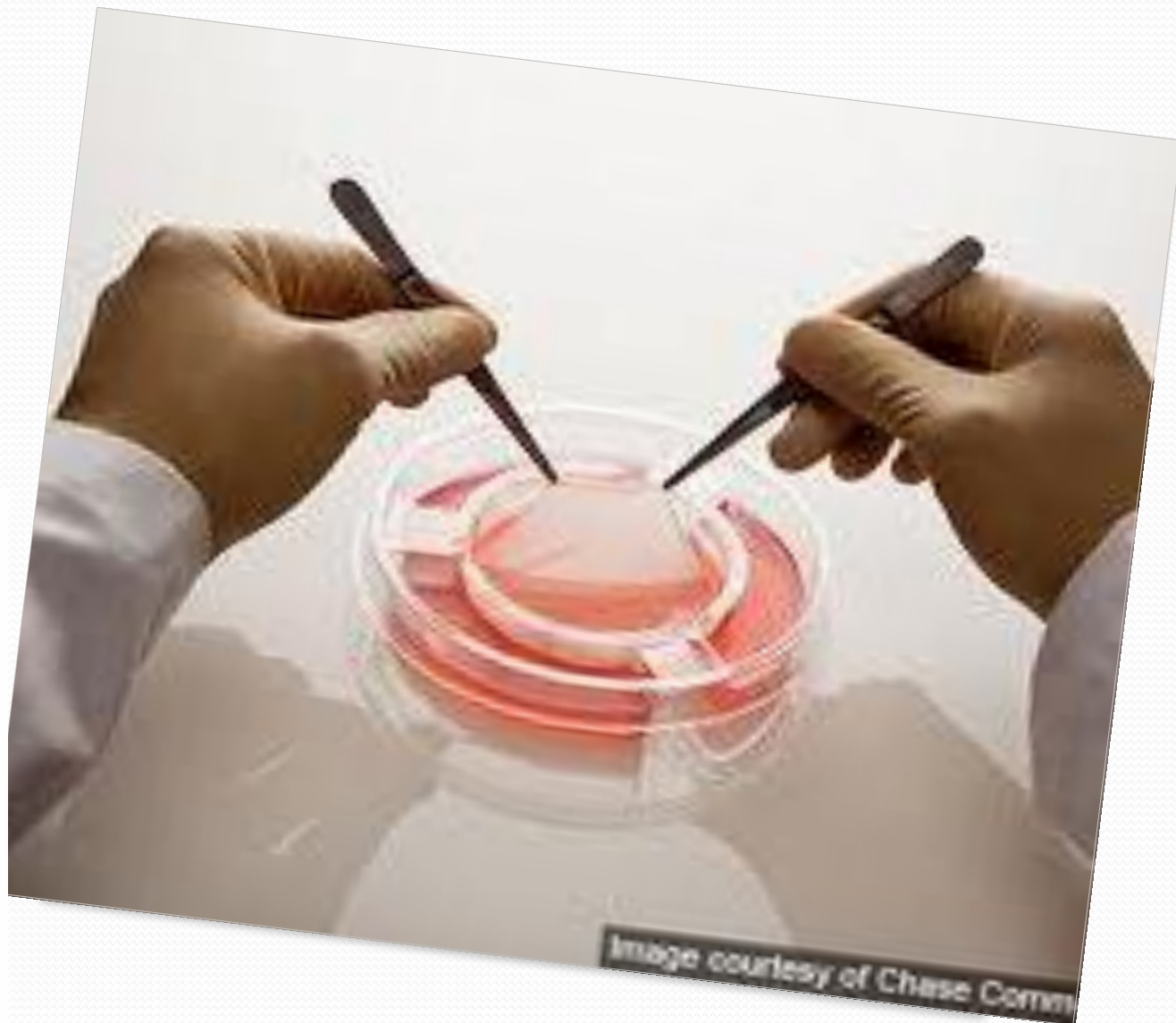
- 10. DH hatların güncel uygulamalarından biri de gen haritalarının çıkartılmasında kullanımlarıdır. DH hatlardan oluşan bir populasyonda; heterozigoti nedeniyle ortaya çıkan intermediyer ekspresyonlara rastlanmaz. Bu nedenle de fenotipik işaretleyicilerin (marker) tanımlanması çok daha etkin olabilmektedir. DH hatlarda 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 çıkartılıyorsa önem tasımakta ve kolaylık sağlamaktadır.

# OORGANESİS VE SOMATİK EMBRİYOGENESİS

## Organogenesis



- Somatic Embryogenesis
- Organogenesis



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

- Etkin bir organ olusumunun yerine getirilebilmesi için gerekli olan sartlar;
  1. uygun eksplantın seçilmesi,
  2. büyümede aktif maddeleri içeren uygun bir besin ortamının seçilmesi ve
  3. fiziksel çevre kosullarının kontrolüdür.

# EKSPLANT SEÇİMİ

- Kültüre alınan eksplantın davranışını etkileyen faktörler;
- Basta genotipik varyasyon olmak üzere doku kaynağı olarak kullanılan organ,
- organın ontogenetik ve fizyolojik yaşı,
- eksplantın bitkiden alındığı dönem,
- eksplantın büyüklüğü ve eksplantın alındığı bitkinin diğer genel özellikleri

# Organesiz çalışmalarında yaygın olarak kullanılan eksplantlar

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

# Besin ortamlarının seçilmesi

- **besin ortamının temel içerikleri;**
- inorganik maddeler,
- organik maddeler,
- bitki büyüme düzenleyicileri ve
- doğal kompleksler olmak üzere 4 ana grup
- altında incelenir.

## İnorganik maddeler

- 1) Temel makro elementler  
N,K,P,Ca,S,Mg
- 2) Temel mikro elementler  
Fe,Mn,B,Cu,Zn,I,Mo,Co

## Organik maddeler

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

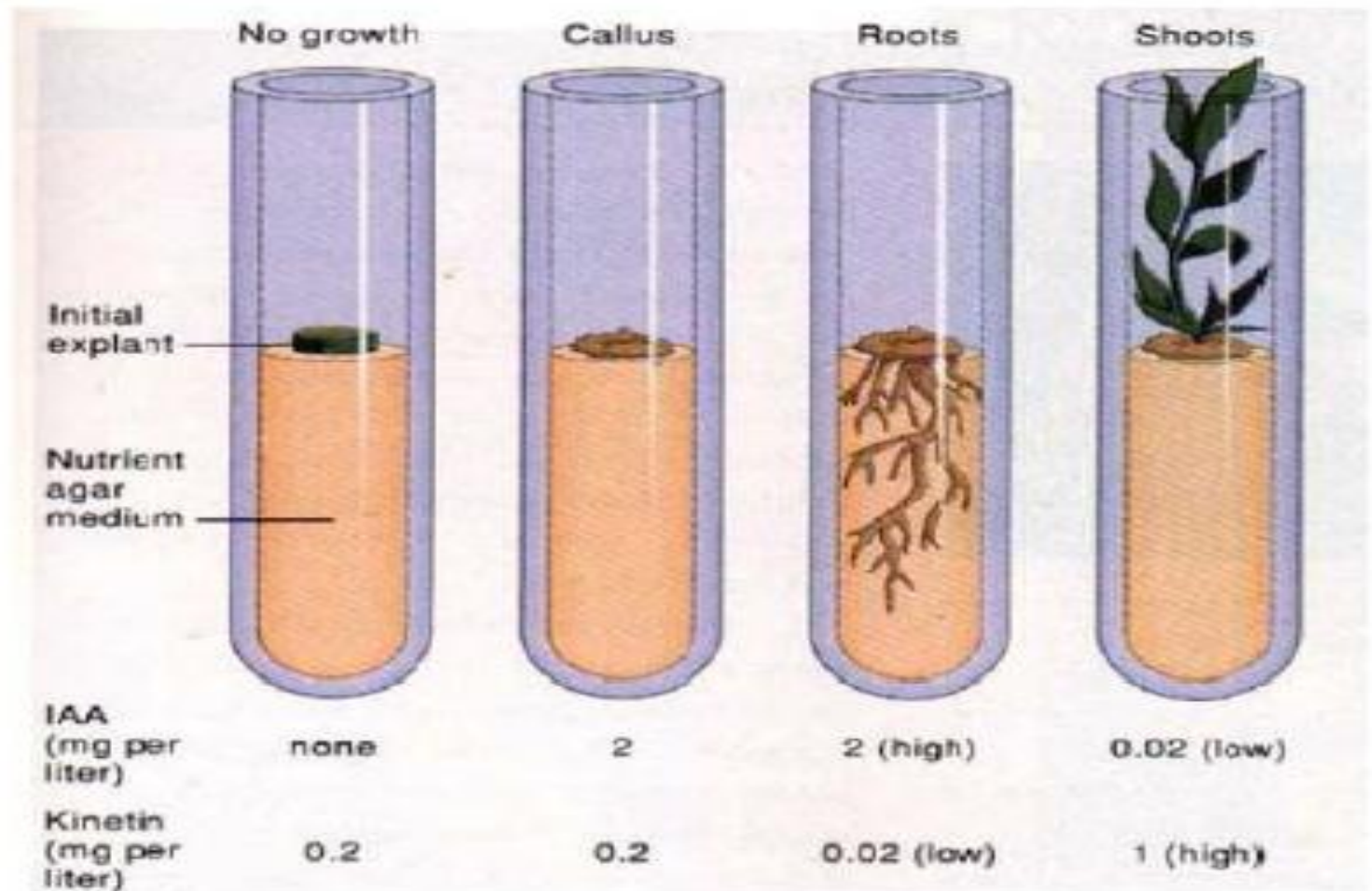


# Bitki büyüme düzenleyiciler

- oksin ve sitokinin in vitro kültürde en çok ihtiyaç duyulan bitki büyüme düzenleyicileridir.
- **En fazla kullanılan oksinler;**
- 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D),
- naftelen asetik asit (NAA),
- indol asetik asit (IAA) ve
- indol bütirik asit (IBA)'tir.

- **En fazla kullanılan sitokinler ise;**
  - kinetin ve
  - N6-benziladenin/benzil amino pürin
  - (BA/BAP)'dir.
- 
- Bitki türlerinin büyük bir çoğunluğu uygun oksin/sitokin oranına, sürgün ve kök oluşturarak cevap verir.

# Oorganesiz hormonal kontrol



**Auxin:**

IAA  
(mg per liter)

none

2

2 (high)

0.02 (low)

**Cytokinin:**

Kinetin  
(mg per liter)

0.2

0.2

0.02 (low)

1 (high)

# Doğal kompleksler

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

# Kültür şartları

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

# Ortamın fiziksel hali

- ortamın katı ya da sıvı olması organogenesiste önemli rol oynar.
- Agar ile katılaştırılmış ortamda büyütülen kallus yavas büyür ve varolan kallus kümesinin çevresinde yeni hücreler gelişir.
- Fakat hücre süspansiyon kültürlerinde tek veya küme hücreler devamlı olarak besin ortamına maruz kaldığından daha fazla büyüme gösterirler.
- Genel olarak organogenesiste en çok başarı katı ortam üzerinde kallus veya yayılmış hücre süspansiyonları ile sağlanmıştır.

# Ortamın pH

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

# nem

- kültür çevresinin nem oranı genellikle %100'e yakındır.
- Bazı durumlarda nem oranının düzenlenmesi farklılaşmanın ne yönde olacağının belirlenmesi açısından önemlidir.



# ıŒık

- farklılaşma için gerekli ısıık bileşenleri;
  - ısığın siddeti,
  - gün içinde uygulama periyodu ve
  - niteliğidir.
- 
- Maksimum kallus büyümesi karanlıkta olmasına rağmen, düşük ısıık siddeti organogenesis ve embriyogenesisi arttırabilir.

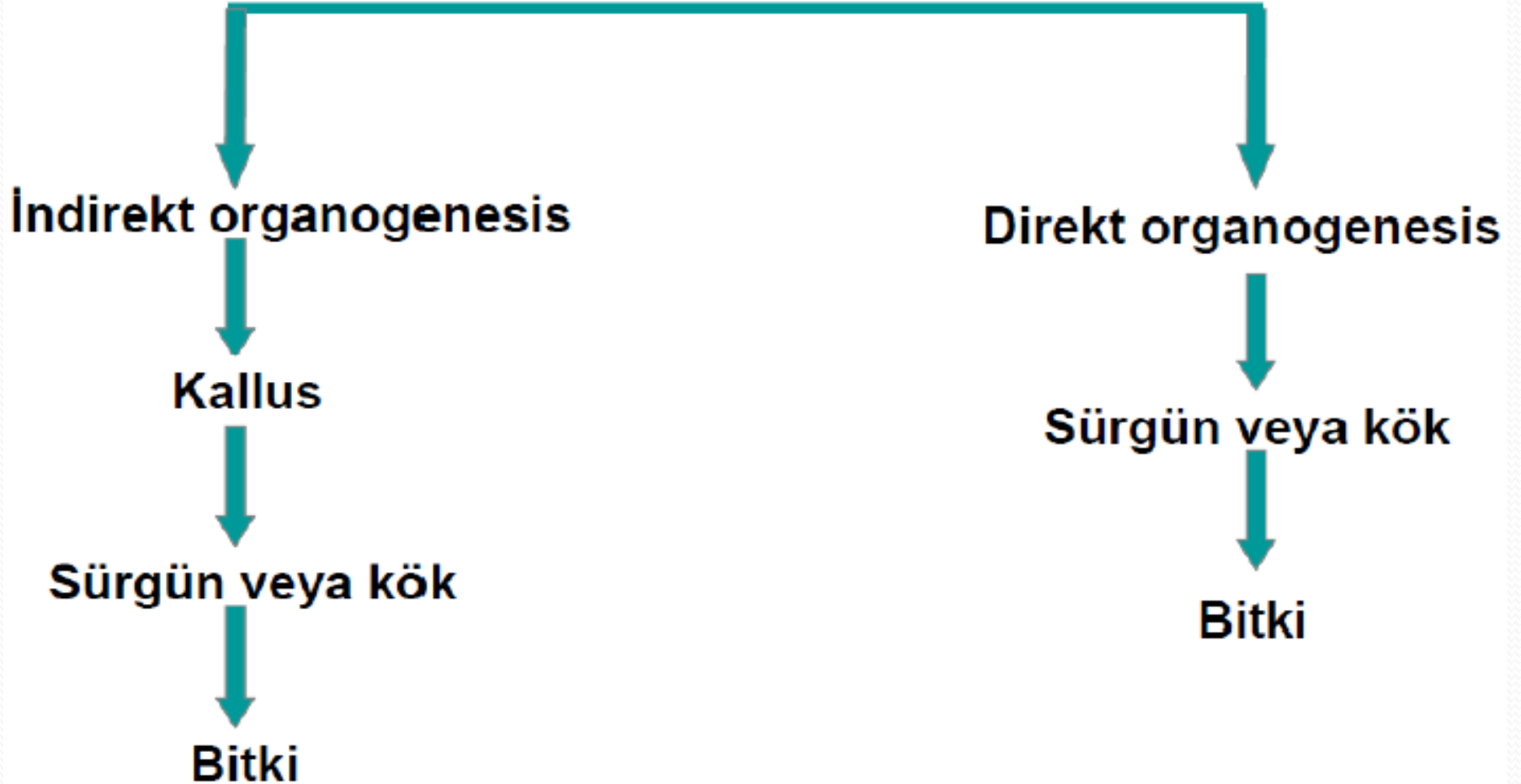
# sıcaklık

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

# Kültür kaplarında biriken gazlar

- kültüre alınan eksplantların etrafındaki atmosferin gaz içeriği bitki kültür sistemlerinin performansını etkiler.
- Atmosferin gaz içeriği etilen, oksijen, karbondioksit, etanol, ve asetaldehitten oluşur.

# ORGANOGENESIS ÇEŞİTLERİ



- Organogenesisisteki anahtar morfolojik özellik meristematik merkezlerin oluşumudur.
- Direkt ve indirekt organogenesisin her ikisinde de, meristematik merkezler vakuollü parenkima hücrelerinden oluşurlar.
- Bu hücreler yapı olarak küçük, izodiyametrik, ince duvarlı hücrelerdir ve yoğun bir şekilde boyanan belirgin çekirdeklere sahiptirler.

- **Kallus:** organizasyon göstermemis hücreler yığını olarak tanımlanmaktadır.
- Tipik kallus hücresi fazlaca vakuollü parenkima hücrelidir ve çok ince çevresel bir sitoplazma katmanı ile hücre duvarına karşı baskılanmış bir çekirdeğe sahiptir.
- Aynı bitki türünden alınan eksplantlar organogenesis oluşturma kapasitese bakımından büyük farklılıklar gösterebilir, bunun yanında kallus homojen değildir ve kültürde yas ile birlikte çeşitli değişikliklere maruz kalmaktadır.



# Kallusdan sürgün gelişim



- eksplantın çevresinde hücre dizileri oluşur
- hücre dizileri ve eksplant arasındaki bölgelerde trake elementleri ortaya çıkar
- Kültürden bir hafta sonra trake elementlerinin yanında hücre bölünme bölgeleri gözlenmeye başlar.
- Bu bölgenin içinde özellikle kallusun alt yarısında takip eden günlerde meristematik merkezler oluşur.
- Bu merkezler daha sonraki günlerde gözle görülebilir sürgün taslağını oluştururlar.
- En önce oluşan sürgünler ortama temas eden kallus yüzeylerinin geniş çıkıntıları üzerinde görülür.
- Tomurcuklar iki hafta sonra ortaya çıkar ve bariz yapraklı vejetatif sürgünler 18-21 günlük dokularda gözlenebilir.

# Organogenesisde meydana gelen önemli olaylar

- **Hücresel yeterlilik ve kararlılık:**
- Organogenesisde önemli olan yaklaşımlardan biri esneklik (plastisite) teorisidir.
- Organ oluşumunun erken safhalarında gelişim süreci esnek bir yol izler.
- Gelişimin belli bir kritik dönemine kadar, meristemi meydana getiren hücre veya hücreler tarafsız davranır, fakat daha sonra ortamdaki şartlara veya uyarıcılara göre ya sürgün meristemi ya da kök meristemi olarak saptanırlar ve morfogenetik süreç sürgün veya kök olarak sonuçlanır.



- Eksplantın ortama konulmasından belirgin bir organın ortaya çıkmasına kadar geçen süre içinde, üç asamada incelenebilecek bir dizi olaylar meydana gelmektedir.
- 1) yeterlilik (competence)
- 2) kararlılık (determination)
- 3) morfolojik farklılaşma.

- Yeterliliğin kazanıldığı birinci asamada, ortama konulan eksplant dokusu, organogenik bir uyarım için belli bir yetenek, diğer bir ifadeyle yeterlilik kazanır ve bu asamada öncelikle olgun eksplant dokusunun tersine-farklılaşması (dedifferentiation) gerçekleşir. Bu durumda yeterliliğin kazanılması herhangi bir ortamda (sürgün, kök veya kallus) gerçekleşebilir.
- Bu ilk asamanın sonunda organ oluşturmak için yeterlilik kazanan hücre veya hücrelerin, belli bir gelişme tipi (sürgün, kök veya kallus oluşumu) için kararlı hale getirilmeleri gerekir.
- Bu işlemin gerçekleştirildiği süreç in vitro organogenesisteki kararlılık aşaması olarak adlandırılır ve söz konusu gelişme tipinin belirlenmesinde, ortamdaki bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyon ve kombinasyonları önemli olmaktadır.
- Üçüncü asamada ise, morfolojik farklılaşma ve gelişme tamamlanarak belirgin organlar gözükmeye başlar ve bu gelişmenin tamamlanması, yine herhangi bir ortamda gerçekleşebilir.
- İkinci asama sonunda hücre veya hücreler hangi organogenik yol için kararlı hale gelmişlerse, artık onların meydana getireceği organ tipini değiştirmek mümkün değildir.

# Fizyolojik kimyasal ve metabolik olayalar

- Steward ve ark. (1964)'nin görüsüne göre; Hücrenin gelisme potansiyelinin ortaya çıkması için hücrenin fiziksel ve/veya fizyolojik olarak izolasyonununun gerekli olduğu düşünölmektedir.
- İzolasyon islemi anne dokunun bağlantısını etkili bir şekilde yok eder ve hücreleri böylece fiziksel ve kimyasal kısıtlamalardan kurtarır.
- Hücreler kimyasal bir uyarıya maruz kaldıkları zaman sessiz durumlarından aktif büyüme için gerekli olan kapasiteye doğru geçis yaparlar ve gerekli besinler ortamda varsa onların kalıtsal morfojenik potansiyelini açığa vururlar.

- Morfojenik hücre yığınlarında (meristematik merkezler veya embriyogenik hücre kümeleri) bunları çevreleyen kalın bir hücre duvarı vardır ve bunların arasında veya bunları çevreleyen hücrelerde/dokularda plazmadezmata mevcut değildir
- Fakat yığınların içinde daha ince hücre duvarları ve fazla miktarda plazmadezmata vardır ve bu da muhtemel hücrelerarası iletişimin var olduğunu göstermektedir.
- Organ oluşturan dokular üzerine yapılan biyokimyasal çalışmalara göre; meristematik merkez ve sürgün primordiyasının oluşmasından önce nispete birikimi olmaktadır ve organogenesis için ortamdan devamlı serbest şekerin sağlanması gerekir.
- Sürgün oluşumuna yönelecek olan dokular, çok daha yüksek miktarda adenozin fosfataz ve NAD<sup>+</sup> bulundurlar ve daha düşük enerji yükü içerirler.

# Oorganesisin avantajları

- H¼cre veya dokulardan yeni bitki meydana getirmeye imkan tanıdığı için, generatif yoldan çoğaltılması zor olan bitkilerin üretimine olanak sağlamaktadır.
- Bitki transformasyon çalışmalarında oldukça önemlidir.

# Oorganesisin dezavantajları

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

# Somatik embriyogenesisiz

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

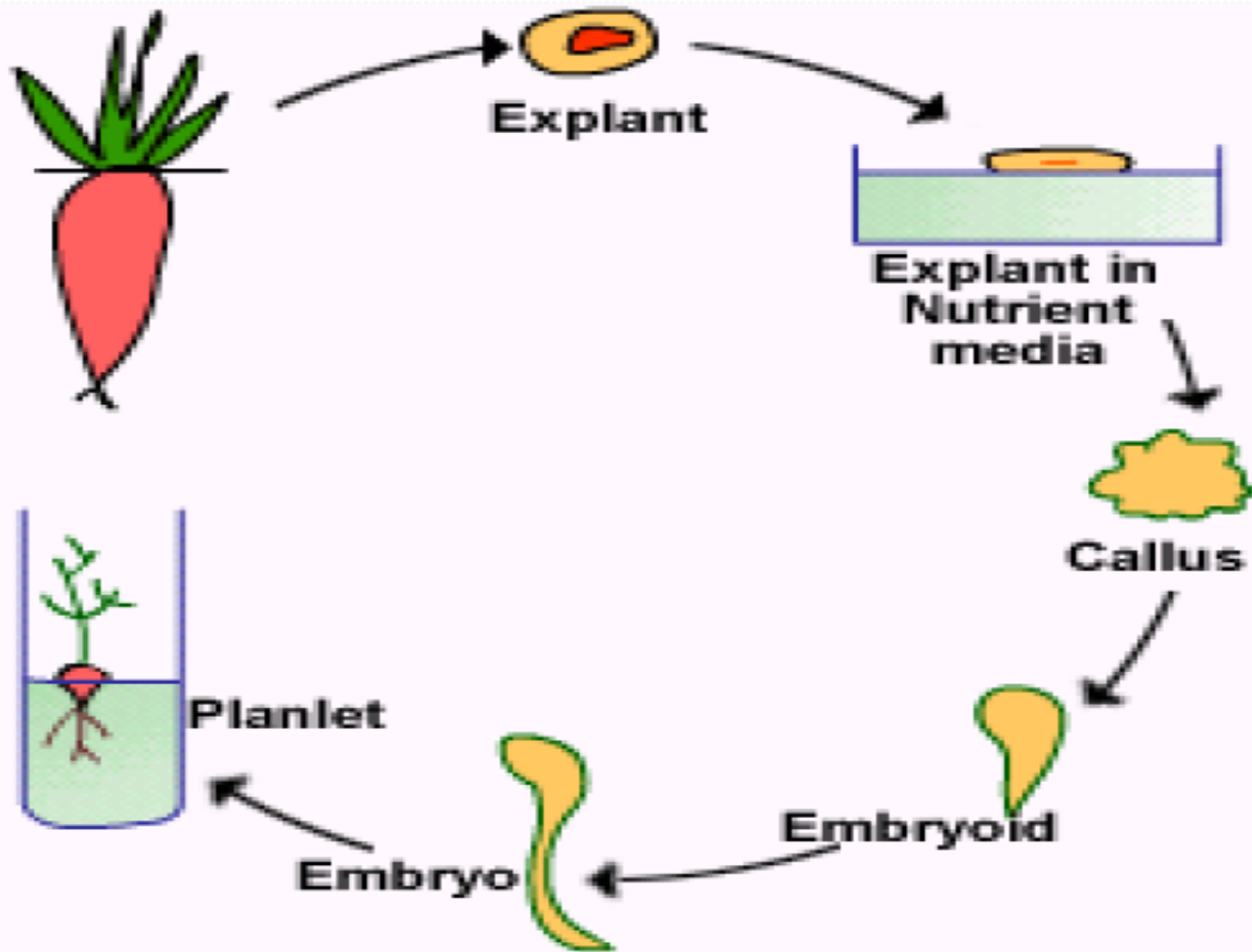




- Vejetatif
- hücrelerden
- gelisen embriyolar
- **somatik embriyo**
- olarak
- adlandırılmaktadır.

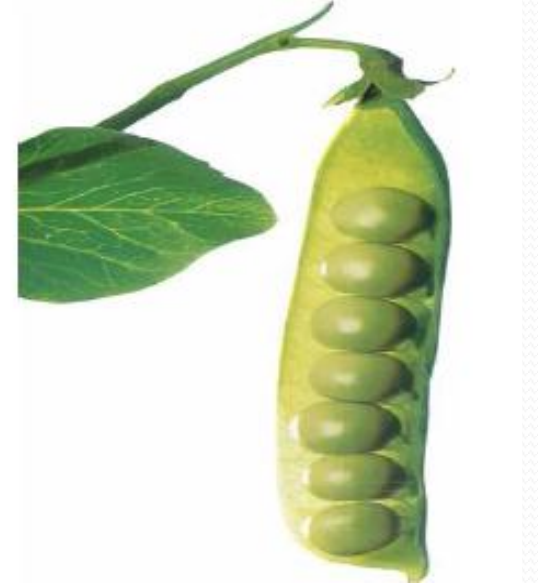


- Somatik embriyogenesis ilk defa havuç bitkisinin somatik dokularından elde edilmistir.



- Genel olarak somatik embriyo üretimi için çok değisik bitki kısımları kullanılabilir.
- Ancak, olgunlaşmamış zigotik embriyolar somatik embriyogenesis için önemli bir kaynak oluşturmaktadır.
- Bunun nedeni zigotik embriyoların embriyogenik gelişme için gerekli olan genleri aktif hale getirdiklerine inanılmaktadır.

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



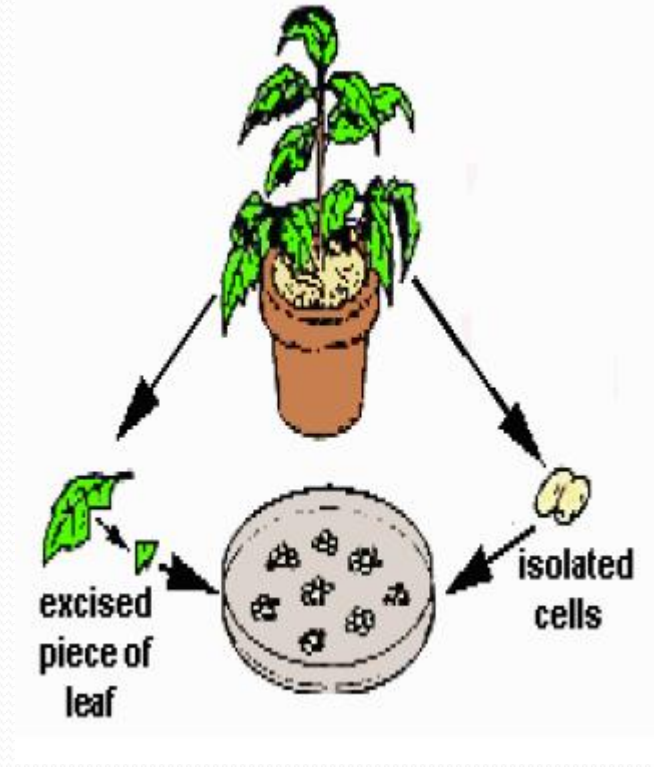
- Somatik embriyo elde etmek için somatik doku hücreleri öncelikle yüksek oranda oksin (genellikle 2,4-D) içeren ortamda kültüre alınır.
- Daha sonra da oksin içermeyen yeni ortama aktarılırsa embriyo üretme yeteneğini kazanmaktadırlar.
- Oksinlerin somatik bitki hücrelerine embriyo üretimi için yeniden zigotik bir kapasite kazandırdığı belirtilmektedir.

# Somatik embriyolar olusurken;

- Globular
  - Kalp
  - Torpido
  - Kotiledon
  - olusum safhalarını geçirirler.
- 
- Somatik embriyolar organogenesis yoluyla gelisen sürgünlerden farklılık gösterirler.
  - Gövde-kök ekseninde aynı zamanda sahip olup, asıl doku ile vaskuler bağlantıları olmadığından dolayı dokudan kolaylıkla ayrılabilirler.

## 1. Eksplant kaynağı:

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





- 2. Genotip:
- Somatik embriyo oluşturma frekansı bakımından türler arasında önemli farklılıklar gözleendiği, aynı tür içerisindeki farklı genotip ve çeşitlerin dahi embriyo oluşturma kabiliyetleri farklı olmaktadır.
- Örneğin patatesten anter kültürü yoluyla somatik embriyo üretimi kalıtsal olup, düşük embriyogenesis kapasitesine sahip genotipler arasında yapılan melezlemeler sonucunda rejenerasyon kabiliyeti daha yüksek olan döller elde edilebilmiştir.

# 3. Besin ortamının içeriği:

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

- **Sitokininlerin** besin ortamına ilave edilmesi genellikle somatik embriyo olusumunu engellemektedir.
- Ancak, tam bir embriyo olgunlaşması ve bitki gelişimi için içsel hormon seviyesine bağlı olarak çok düşük oranlarda sitokinin ve özellikle de BA gerekli olmaktadır.
- Bazı bitki türlerinde **gibberellik asit de** embriyoların bitkiye dönüşümünü teşvik etmektedir.
- Ortama **absisik asit (ABA) ilave edilmesinin de** anormal embriyo gelişimini engellediği belirtilmektedir.

- Murahige ve Skoog tarafından geliştirilen MS temel besin ortamı embriyogenesis çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.
- İlave olarak , B5, SH ve N6 ortamları da birçok bitki türünde başarılı sonuçlar vermektedir.
- Yüksek oranda indirgen N formu somatik embriyo oluşumunu ve gelişimini teşvik etmektedir.
- Besin ortamına inositol ve sorbitol gibi şekerlerin katılması embriyo yapısını iyileştirirken, sakkaroz ise embriyogenesisi teşvik etmektedir.

## 4. Çevre Sartları:

- Isık kaynağı, yoğunluğu ve süresi ile sıcaklık somatik embriyo olusumunda önemli rol oynamaktadır.
- Kallus olusumu için eksplantlar önce karanlıkta veya 500- 1000 lüks ısıık altında 16 saatlik fotoperiyotta kültüre alınırılar daha sonra embriyo olgunlaşması ve bitkicik gelişimi için 5000-10000 lüks ısıık siddetine tabi tutulurlar.
- Bitki türüne bağlı olmakla beraber en yüksek oranda embriyo gelişimi 24-26 oC de gerçekleşmektedir.

# Somatik embriyo rejenerasyonu

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

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

# Direk emriyogenesis

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



# Olgunlaşmamış zigotik veya embriyolardan direkt embriyogenesis

- Çiçeklenmeden 10-21 gün sonra 2-6 mm büyüklükteki olgunlaşmamış tohumları taşıyan baklalar hasat edilir.
- Sterilizasyon gerçekleştirilir.
- Olgunlaşmamış kotiledonlar düz yüzeyleri yukarı gelecek şekilde embriyo tesvik ortamlarına yerleştirilir.
- Kültür başlangıcından 4-6 hafta sonra kotiledonlar üzerinde oluşan somatik embriyolar ve dokular kesilerek embriyo gelişme ortamına aktarılır.
- Embriyo gelişme ortamında 4 hafta gelisen ve 5 mm den büyük olan embriyolar çimlenme ve gelişme için MS ortamına aktarılarak bitkicikler elde edilir.

- 
- Fotooo koyy

# İndirek embriyogenesis

- İndirekt embriyogenesiste eksplant yüksek oksin içeren besin ortamında kültüre alındığı zaman önce embriyonik kallus oluşumu daha sonra da bu kallus üzerinde pro-embriyoların olduğu gözlenir.
- Bu kallus oksin içermeyen besin ortamına aktarıldığı zaman da pro-embriyolardan bipolar (kök ve sürgün ucu meristemleri aynı anda oluşan sürgün eksenli) embriyolar oluşur ve şartlar uygun ise bu embriyolardan bitkicikler elde edilir.
- Oksin içeren katı besin ortamında gelişen embriyonik kalluslar küçük parçalara ayrılarak yine oksin içeren sıvı besin ortamlarına alınarak süspansiyon kültürleri oluşturulabilir.
- Süspansiyon kültürlerinde önce hücreler kallus parçasından ayrılır daha sonra da tekrar hızlı bölünerek kallus yumaklarını oluştururlar.
- Bu kallus yumakları oksin içermeyen besin ortamına aktarıldığında ise somatik embriyolar gelişir.

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



# Somatik embriyogenesi kullanım alanları

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

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

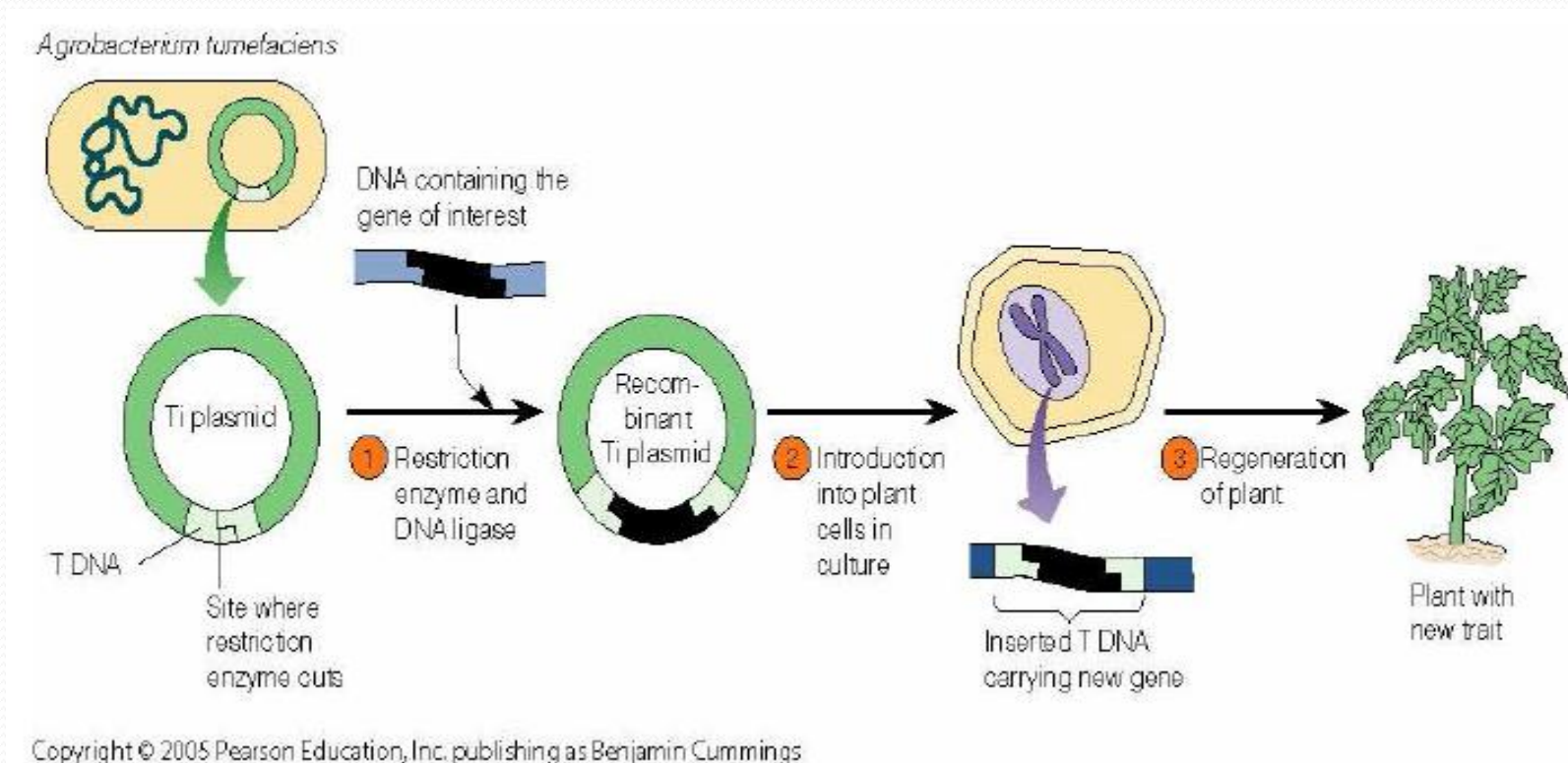
- Somatik embriyoların sentetik tohum olarak hızlı klonal çoğaltımda kullanılabilmesi için su tekniklerin geliştirilmesi gerekmektedir:
- 1. Bitkiye dönüştürme kabiliyeti yüksek olan embriyoların üretilmesi
- 2. İstenen miktarda embriyo üretimi sağlayacak kültür sisteminin geliştirilmesi
- 3. Kültür sistemi ile kaplama işleminin entegrasyonu

- **GEN AKTARIMI:**

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



- 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.







# Genetik kaynakları muhafazası

- Germplazm muhafazasında iki temel yöntem uygulanmaktadır;
- Bitki materyalinde büyümenin yavaşlatılması veya azaltılması
- Bitki materyalinin soğukta muhafaza edilmesi (kryoprezervasyon)

Tablo: bitki gen kaynaklarının başlıca muhafaza yöntemleri

Muhafaza edilen materyal	Muhafaza yöntemleri	
Tohum	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 kültürü
	İnatçı tohumlar	Doku kültürü ile muhafaza
Bitki	Kültüre edilmiş genç bitki (plantlet)	1) altkültür (in vitro koşullarda) 2) 0 °C'de karanlıkta veya öteki kontrollü koşullarda
	Saksıya şaşırtma ve tarlaya dikim	Gözlem evi (sıcaklık, nem, ışık kontrollü koşullarda)
Organ	Kallus	1) altkültür (in vitro koşullarda) 2) soğukta muhafaza (LN <sub>2</sub> 'de)
Doku	Sürgün ucu	1) Düşük sıcaklıkta muhafaza 2) soğukta muhafaza (LN <sub>2</sub> 'de)
Hücre	Hücre kültürü	1) altkültür (in vitro koşullarda) 2) soğukta muhafaza (LN <sub>2</sub> 'de)
	Protoplast kültürü	soğukta muhafaza (LN <sub>2</sub> 'de)

# Yavaş yada azaltılmış büyüme ile muhafaza

- Yavaş ya da azaltılmış büyüme ile muhafazanın esası, bitki kültürlerinin canlı kalabilmelerinin izin verdiği oranda, kültür ortamının ve kültür koşullarının değiştirilmesine dayanır.

# Sogukta muhafaza

- Bitki örneklerinin dakikada birkaç °C, kademe kademe soğutularak muhazasıdır.
- Örnekler çoğunlukla sıvı azota daldırılarak depolanırlar.



# Dondurma işleri ve zararları

- Bitkisel hücrelerde donmanın iki tipi vardır;
- 1. Hücre dışı (ekstraselüler) donma
- 2. Hücre içi (intraselüler) donma

# Hücre dışı buz oluşumu

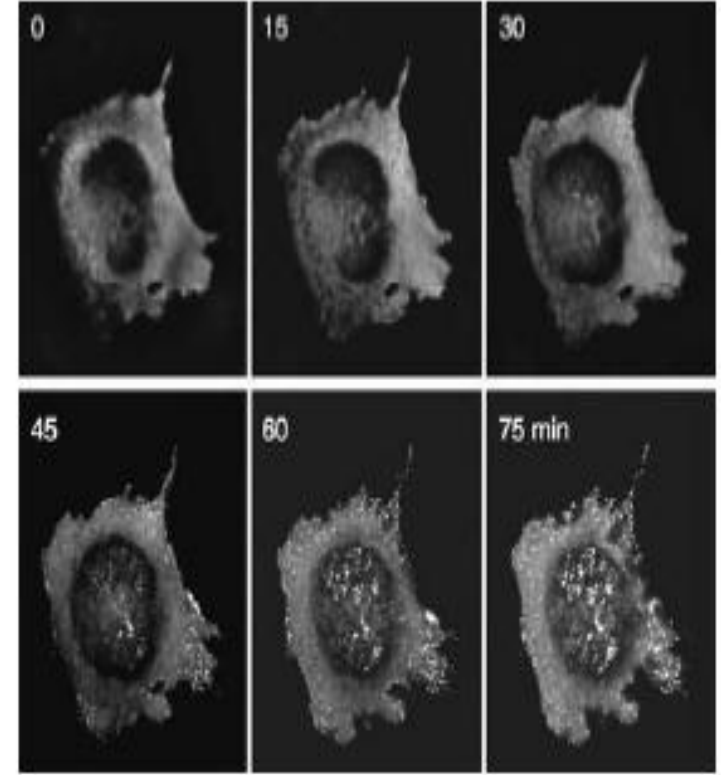
- Bitki hücreleri yavaş soğutulduğu zaman buz kristalleri genellikle hücre duvarının dışında oluşur.
- Sıcaklık, suyun donma noktasının altına düştüğünde buz kristalleri hücreler arası ortam boşluğunda oluşur
- Hücre dışı buz oluşumunda, hücre düzeyinde iki temel olay gerçekleşir.
- 1.Suyun çıkarılması (dehidrasyon)
- 2. Hücre zarının açılması

# 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.
- Hücre içi buz oluşumunun meydana gelme derecesi soğutma oranına ve materyalin bulunduğu muhafaza soğukluğunun minimum derecesine bağlıdır.

# Hücre içinde serbest suyun azalması

- Donma noktası altındaki sıcaklıklarda hücrelerin hayatta kalması için serbest suyun azaltılması gerekir.



Hücrenin 75 dakika içerisinde donma aşamalarını gösteren şekil

- Hücrede serbest suyu azaltmak için sakkaroz ve ABA kullanılmaktadır.
- Bu işlemler sırasıyla;
- Altkültür yapılması,
- Krayoprotektant ilavesi,
- Hücre dışı donmanın sağlanması

# Ön dondurma yöntemi

- Sıvı azota daldırıldıktan sonra hücrelerin canlılığını muhafaza etmek için gerekli öndondurma sıcaklığı, soğuğa dayanıklılıkla yakından ilişkilidir.

# Yavaş dondurma kuralları

- 1. Hücre kültürünün hasadı ya da apikal meristemin izolasyonu yapılır.
- 2. Materyale uygun ön işlem ya da önkültür yapılır.
- 3. Öndondurma öncesi krayoprotektantların ilavesi damla damla yavaşça ya da seri halde damlatılarak hızla doğrudan yapılabilir.
- 4. Materyalde donmayı baslatmak için  $-7^{\circ}\text{C}$  ile  $-10^{\circ}\text{C}$ 'de buz asılması yapılır.
- 5. Materyal  $\text{LN}_2$  içine daldırılır ve orada depolanır.
- 6. Hızlı çözündürme yaklaşık  $37^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta su banyosunda yapılır.
- 7. Krayoprotektantların materyalden uzaklaştırılması yapılır
- 8. Kültüre edilmiş materyal yeniden kültüre alınarak canlılık kontrolü yapılır.

# Vitrifikasyon (camlaştırma) yöntemi

- Bu yöntem, LN<sub>2</sub> sıcaklığına düşürmek için yapılan hızlı soğutma sırasında buz kristallerinin gelişme sıcaklığından (genellikle -10 °C ile -40 °C arasındaki sıcaklık zonundan) hızla geçilirken oluşan hücre içi buz kristallerinin gelişmesinin engellenmesinden ibarettir.





# Vitrifikasyon kuralla1503476rı

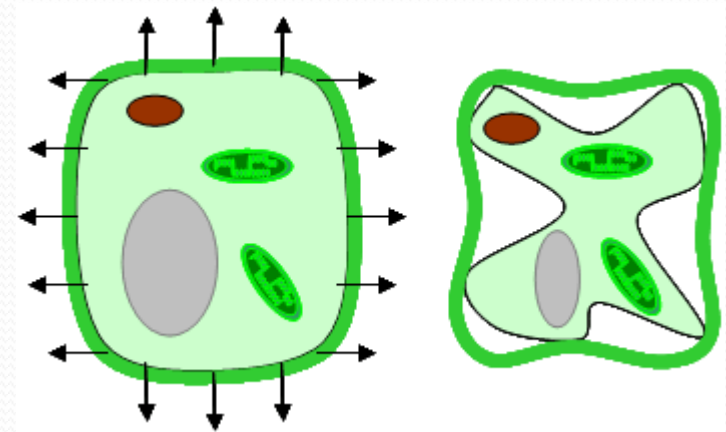
- Uygun dönemde kültür ya da uygun boyutlarda materyal seçimi yapılıır.
- 2. 0.3-1 M sakkaroz içeren ortamda önkültür yapılıır.
- 3. Ufak sise ya da tp içindeki materyale doğrudan 0.3-0.5 mL vitrifikasyon çözeltisi ilave edilir.
- 4. Tüpler doğrudan LN<sub>2</sub>'ye batırılıır ve depolanır.
- 5. Tüplerin 40 °C'deki suya batırılmasıyla hızlı çözündürme yapılıır.
- 6. Buzlar zndrldkten sonra vitrifikasyon zeltisi 1.2-1 M sakkaroz içeren suyla sulandırılıp 5 kez yıkanır.
- 7. Filtre kağıdı üzerine toplanan materyal ıkarılıır ve filtre kağıdının üzerinden yarı katı ortama alınarak yeniden kültür yapılıır ve rejenerasyon sağlanır.

# hızlı soğutma ve hızlı çözündürmeyle ön dondurma yönteminin kombinasyonu

- Hızlı soğutma/hızlı çözündürme yöntemi, öndondurmayla kombine edildiğinde, önceden uygun krayoprotektant uygulanmış soğuğa az dayanıklı veya duyarlı örneklerin soğukta muhafazasında çok yararlı olmaktadır.

## Hızlı dondurma yöntemi

- Plazmolize ederek kısmi kurutmayla
- kombine edilmiş öndondurma yöntemidir.



# Hızlı dondurma kuralları

- Uygun dönemdeki kültürler seçilir.
- 2. Yüksek ozmotikum ortamında, 1-3 gün kadar önkültür yapılır.
- 3. Ufak siseler ya da tüpler içindeki hücrelere 0.5-1 mL krayoprotektant ilave edilir.
- 4. Oda sıcaklığında 5-10 dakika krayoprotektant maddenin inkübasyonu beklenir.
- 5. Tüpler -30 varlığında -30 °C'ye hazırlanmış dondurucunun buhar fazına, doğrudan transfer edilir., bir saat burada bekletilir.
- 6. Sonra derhal LN<sub>2</sub>'ye batırılır ve depolanır.
- 7. Çözündürme tüplerin 40 °C'deki suya batırılmasıyla yapılır.
- 8. 1 M sakkaroz ilave edilmiş suyla krayoprotektant madde 5 kez yıkanır.
- 9. Kültürler doğrudan rejenerasyon ya da altkültür ortamına alınır.

# Kurutma yöntemleri

- Kurutma yönteminde, hormon uygulaması ya da yüksek dozda ozmotikum uygulaması ile potansiyel kurumaya toleransın kontrolü amaçlanır.

# Kurutma kuralları (yapay tohumların soğukta muhafazası)

- Somatik embriyoların ve embriyonik kallusların uygun gelişme döneminde seçilmesi gerekir.
- 2. Önkültür yapılır.
- 3. Uygun nem oranına kadar kurutulan örnekler daha sonra tüplere ya da siselere transfer edilir. Tüp ya da siseler doğrudan LN 'nin buhar ya da
- 4. LN<sub>2</sub>'likit fazına maruz bırakılır.
- 5. Çözündürme işlemleri tüplerin 40 °C sıcaklıktaki suya daldırılmasıyla hızlı ya da oda sıcaklığında tutulmasıyla yavaş olarak yapılır.
- 6. Yeniden kültür işlemine tabi tutularak, kültürlerin rejenere olmaları veya altkültür ortamında yeniden kullanılmaları sağlanır.



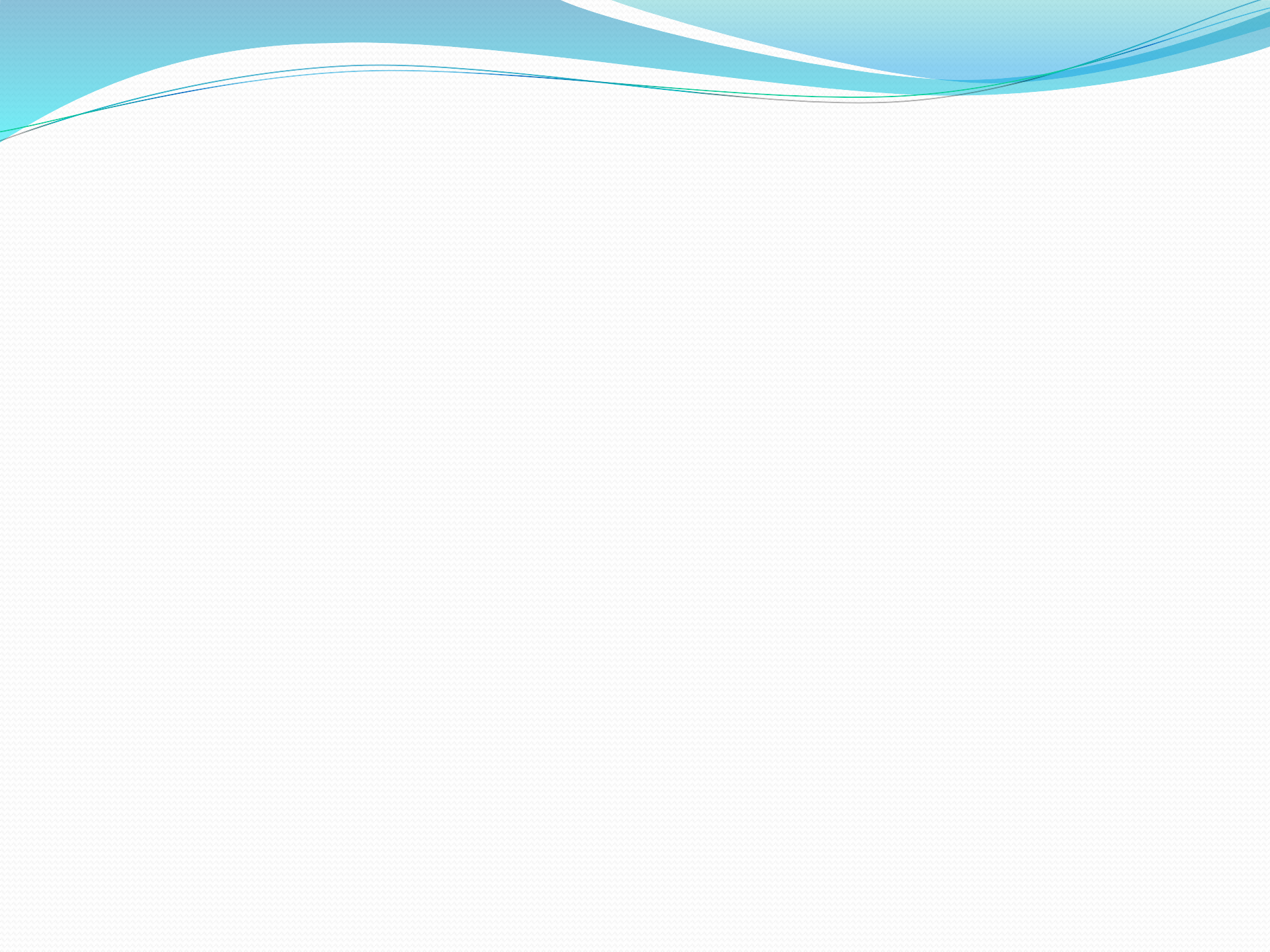


















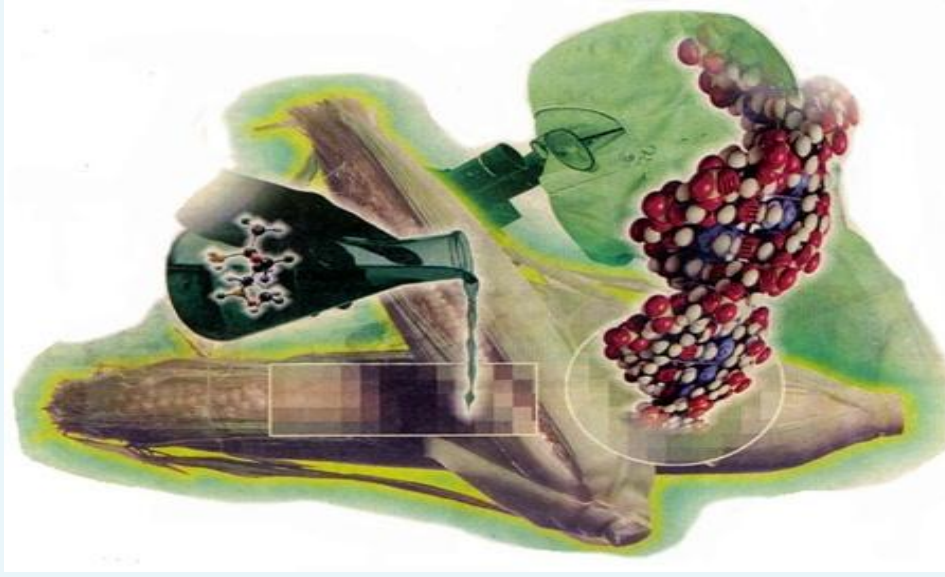


# GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALAR (GDO)



# İçindekiler;

- ▶ GDO Nedir?
- ▶ GDO'nun Tarihçesi
- ▶ Neden GDO?
- ▶ Gen Transfer Aşamaları
- ▶ Bitkilerde ve Hayvanlarda Gen Transferi
- ▶ GDO'nun olumlu ve olumsuz yönleri
- ▶ İnsan Sağlığına Etkisi
- ▶ GDO'nun Biyolojik Çeşitliliğe Etkisi
- ▶ GDO'un Çiftçiye Yararları ve Zararları
- ▶ Hukuki Boyut
- ▶ GDO'nun Dünya'daki ve Türkiye'deki Yeri
- ▶ Toplumun Bakış Açısı
- ▶ Üretilen GDO'lar
- ▶ Sonuç ve Alınabilecek Önlemler
- ▶ Kaynakça



Akıl almaz bir hızla ilerleyen gen teknolojisi artık sadece bir araştırma alanı olmaktan çıkıp sağlıktan tükettiğimiz besinlere, kullandığımız eşyalardan hayvanlarımıza kadar birçok alanda hayatımıza girmiştir. Gen teknolojisinin en ses getiren meyvesi **genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO)** tüm dünyanın gündemine oturmuştur.

# GDO Nedir?

- ❑ Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO), organizmanın gen diziliminin değiştirilmesi ya da gen aktarımı ile kendi doğasında bulunmayan bir özellik kazandırılmasıyla oluşan ürünlerdir. Bu ürünlere ayrıca **transgenik ürünler**, bu teknolojiye **rekombinant DNA teknolojisi** denir.
- ❑ Genetik modifikasyon terimi en genel anlamıyla hayvan, bitki ve mikroorganizmalar gibi canlıların genetik yapısını değiştiren bir dizi özel teknolojiyi ifade eder.

# GDO'nun Tarihçesi

II. Dünya Savaşından sonra dünya nüfusu hızla artmaya başladı. Artan nüfusun beslenme gereksinimlerinin karşılanması için “Yeşil Devrim” olarak adlandırılan bir gelişme yaşandı. Bu devrim temelde dar alanda en yüksek düzeyde ürün alınabilmesi için tarım ilaçlarının, kimyasal gübrelerin ve aşırı suyun kullanılmasıydı. Hatalı kullanılan tarım ilaçlarının ve kimyasal gübrelerin insan sağlığına zarar verdiği gösterildi. Bazı tarım ilaçları yasaklandı. Zamanında kurtarıcı olarak gösterilen yeşil devrim geride çevre kirliliği gibi ciddi yan etkiler bıraktı.

# Neden GDO?

- Kapitalizmin doğası gereği sürekli daha fazla tüketme eğiliminde olunması sermayeyi yeni pazarlar aramaya zorunlu kıldı.
- Mendel teorileri üzerine kurulmuş olan bitki ve hayvan ıslahı tekniklerinin yavaş ve pahalı olması araştırmacıları yeni arayışlara yöneltmiştir.



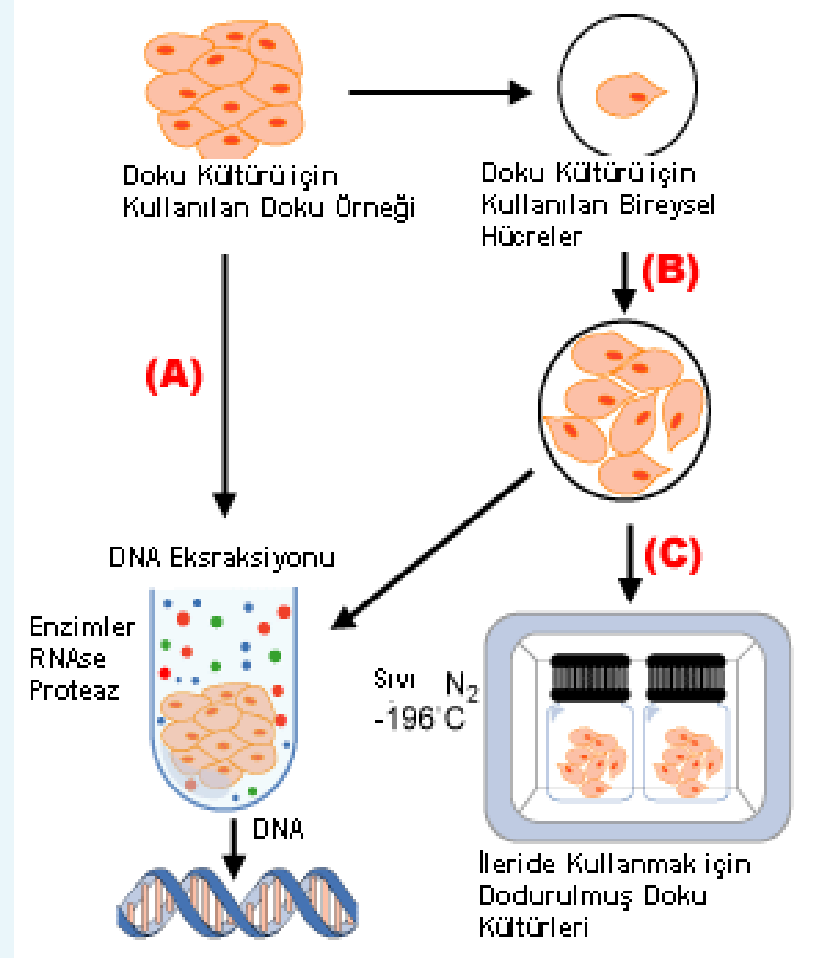
# Bitkilerde Gen Aktarım Nedenleri

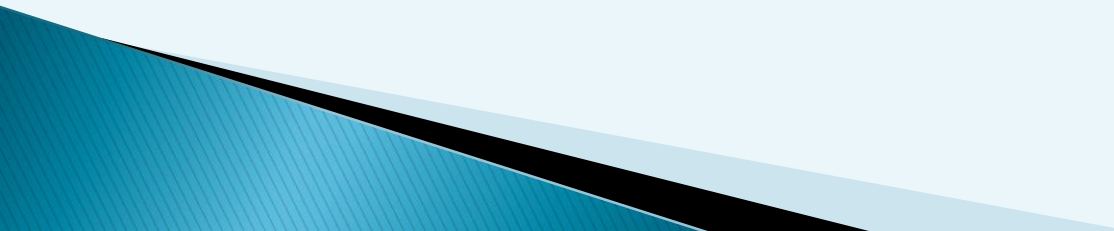


- ▶ Herbisit ve böceklere karşı dayanıklılık kazandırılması,
- ▶ Virüsler, fungus, bakteri ve bitki parazitlerine karşı dirençlilik kazandırılması,
- ▶ Çevresel koşullara tolerans,
- ▶ Azot fiksasyonu ve ürün miktarının geliştirilmesi,
- ▶ Geç olgunlaşma,
- ▶ Besinsel özelliklerin geliştirilmesi,
- ▶ Erkek kısırlık,
- ▶ Sekonder metabolit, ilaç, aşı vb. üretimi.

# Bitkilerde Gen Transfer Aşamaları

- ▶ **DNA ekstrasyonu:** Bu basamakta, istenilen organizmanın tüm DNA'sı ekstrakte edilir.
- ▶ **Tek bir genin klonlanması:** Bu DNA içerisindeki genin yeri tespit edilerek kopyalama işlemi gerçekleştirilir.



- ▶ **Genin dizayn edilmesi:** İlgili gen kopyalandıktan sonra bitki içerisinde eksprese olabilmesi için modifiye edilir.
  - ▶ **Transformasyon:** Genin modifiye edilmesinden sonra, çeşitli transformasyon metodların bir tanesi kullanılarak, klonlanmış yeni genler, bitki hücrelerine aktarılır.
  - ▶ **Geri çaprazlama:** Bu yöntem ile yüksek verimli elit transgenik yeni hatlar elde edilmeye çalışılır.
- 



# Gen Transfer Yöntemleri

- A. Klasik ıslah yöntemleri ile gen aktarımı
- B. Bitki doku kültürü yardımı ile gen aktarımı
- C. Modern gen aktarım yöntemleri

## 1. Dolaylı Gen aktarımı

- Agrobacterium tumefaciens*
- Agrobacterium rhizogenes*
- virusler

## 2. Direkt Gen aktarımı

### Gen aktarımında kullanılan yöntemler

#### Dolaylı Gen Aktarımı

*Agrobacterium tumefaciens*  
aracılığı ile  
*Agrobacterium rhizogenes*  
aracılığı ile  
Virüsler

#### Dolaysız Gen Aktarımı

- Biyolistik
- Elektroporasyon
- Mikroenjeksiyon
- Makroenjeksiyon
- Agro-enfeksiyon
- Polen transformasyonu
- Zigotik embriyoya DNA emdirilmesi
- Fiberler aracılığı ile DNA aktarımı
- Sonikasyon
- Desikasyon
- Elektroforez ve mikrolazer

# Bitki Gen Aktarımında Kullanılan İki Farklı Yöntem



İstenilen özelliği taşıyan gen



Yeni DNA, kesilip Agrobacterium hücresine yapıştırılır.



Agrobacterium yeni DNA'yı bitki hücrelerine aktarır.



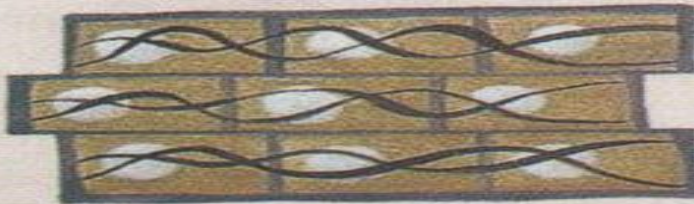
Küçük metal parçacıkları yeni DNA ile kaplanır.



DNA kaplı metal parçacıklar, parçacık tabancasına yerleştirilir ve hücreye ateşlenir.



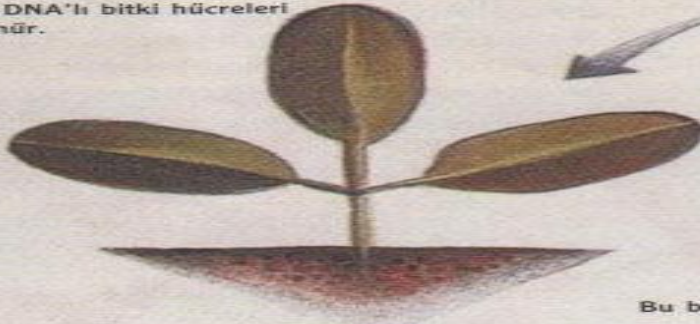
Yeni DNA, bitki kromozomuna girer.



Yeni DNA'lı bitki hücreleri bölünür.



Yeni özellikleri taşıyan bitki hücreleri, petri kabında yeni bitkiciklere dönüşür.



Bu bitkicikler, toprağa aktarılır.

# Gen Aktarımı ile İlgili Sorunlar

- ▶ Yatay gen kaçıışı: Aynı tür bir bitki içinde gerçekleşen kaçıışa denir.
- ▶ Dikey gen kaçıışı: Farklı tür bir bitki içinde gerçekleşen kaçıışa denir.

# Hayvanlarda Gen Aktarım Nedenleri



- ▶ İnsan terapötik proteinleri üretimi,
- ▶ Organ ve doku nakilleri,
- ▶ İnsan sütüne benzer inek sütü yapımı,
- ▶ Hastalıkların hayvan modelleri,
- ▶ Hücre terapisi,
- ▶ Et, süt vb. üretim artışı, özellik iyileştirmesi, hastalık direnci.

# Genetiği Değiştirilmiş (Transgenik) Hayvanlar

Transgenik hayvanlar, genomlarında kendilerine ait olmayan bir geni taşıyan hayvanlar olarak tanımlanır.

Niçin transgenik hayvanlar?

- ✓ Yeni bilgilerin kazandırılması,
- ✓ Genetik şifrenin çözümlmesi
- ✓ Fizyolojik sistemlerin genetik kodunun belirlenmesi,
- ✓ Genetik olarak hastalık modellerinin geliştirilmesi,
- ✓ Yeni özellikli hayvanların üretilmesi,
- ✓ Yeni hayvansal ürünlerin üretilmesidir.



# Genetiği Değiştirilmiş Gıdalar (GDG)



Günümüzde üretilmekte olan GDG'ler:

- ✓ Zehirlik potansiyeli azaltılmış GDG'ler,
- ✓ Herbisid ve insektisidlere dirençli soya fasülyesi, mısır, pamuk cinsleri
- ✓ Asya ülkelerinde görülen kronik beslenme yoksunluğuna yönelik demir ve vitaminlerden zenginleştirilmiş pirinç,
- ✓ Afrika'da ürünlere zarar veren bir virüse karşı dirençli hale getirilmiş tatlı bir patates türü,
- ✓ İklim koşullarındaki aşırı değişimlere dirençli çeşitli bitki türleri.



## Geliştirilmekte olan bazı GDG'ler:

- ✓ Hepatit B gibi bulaşıcı hastalıklara karşı insan aşıları içeren muzlar,
- ✓ Normal olgunlaşma sürecinden hızlı gelişen balıklar,
- ✓ Erken ürün veren çeşitli meyve ve sebze türleridir.



# GDO'nun Potansiyel Yararları

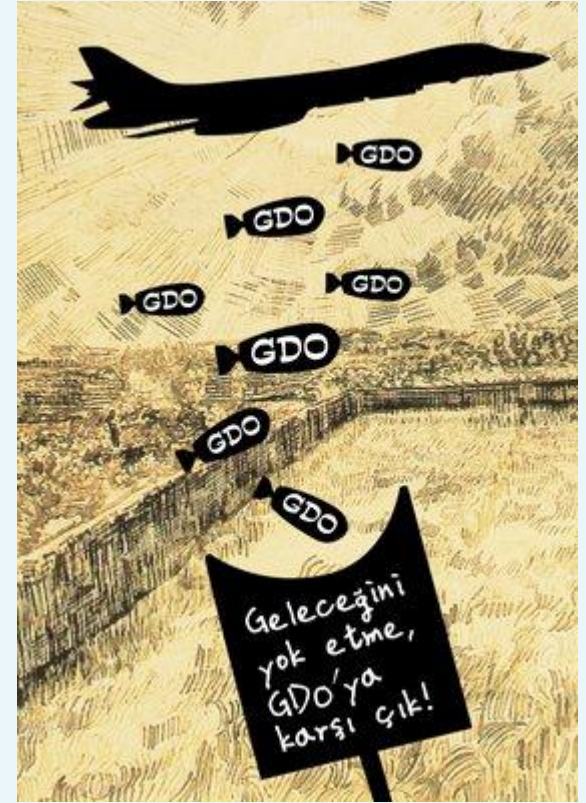
1. Besin kalitesinin ve sağlığa yönelik faydalarının artırılması,
2. Meyve ve sebzelerin raf ömrü ve organoleptik kalitelerinin artırılması,
3. Bitkisel ve hayvansal ürün veriminin artırılması,
4. Yenilebilir aşı ve ilaç üretimi,
5. İnsan hastalıklarının tedavisinde ve organ naklinde kullanılması,
6. Bio-fabrikalar ve endüstriyel kullanım için ürün ham materyali olarak kullanımı,
7. Çevresel faydaları.





# GDO' ların Potansiyel Riskleri

1. Besin kalitesindeki değişiklik ve gıda güvenliği,
2. Allerjik reaksiyonlar ve toksik etkiler,
3. Gen patentleme ve terminatör teknolojisinin etkisi,
4. GD gıdaların etiketlenmesi ile ilgili kaygılar,
5. Çevresel kaygılar,
6. Biyolojik ve genetik çeşitliliğin tehdidi,
7. Çeşitli grupların kaygıları,
8. Dini, kültürel ve etik kaygılar,
9. Bilinmeyen korkular.



# İnsan Sağlığına Etkileri



- ▶ GDO teknolojisinin riskleri göz önünde bulundurularak birçok ülke bu ürünlerin doğaya salınımları konusunda sıkı bir kontrol sistemi uygulamakta ve gıdaların bu tür ürünlerden yapılmaları yada bunları içermeleri durumunda ürün etiketlerinde beyan edilmeleri zorunluluğu getirmektedir.

- ▶ Yapılan araştırmalar sonucunda antibiyotiklere karşı direnç, allerjinite ve toksisite gibi etkiler tespit edilmiştir. Ancak GD ürünlerin sağlık üzerinde, özellikle uzun dönemde yaratabilecekleri etkiler üzerinde henüz kesin bir bilgi bulunmamaktadır.

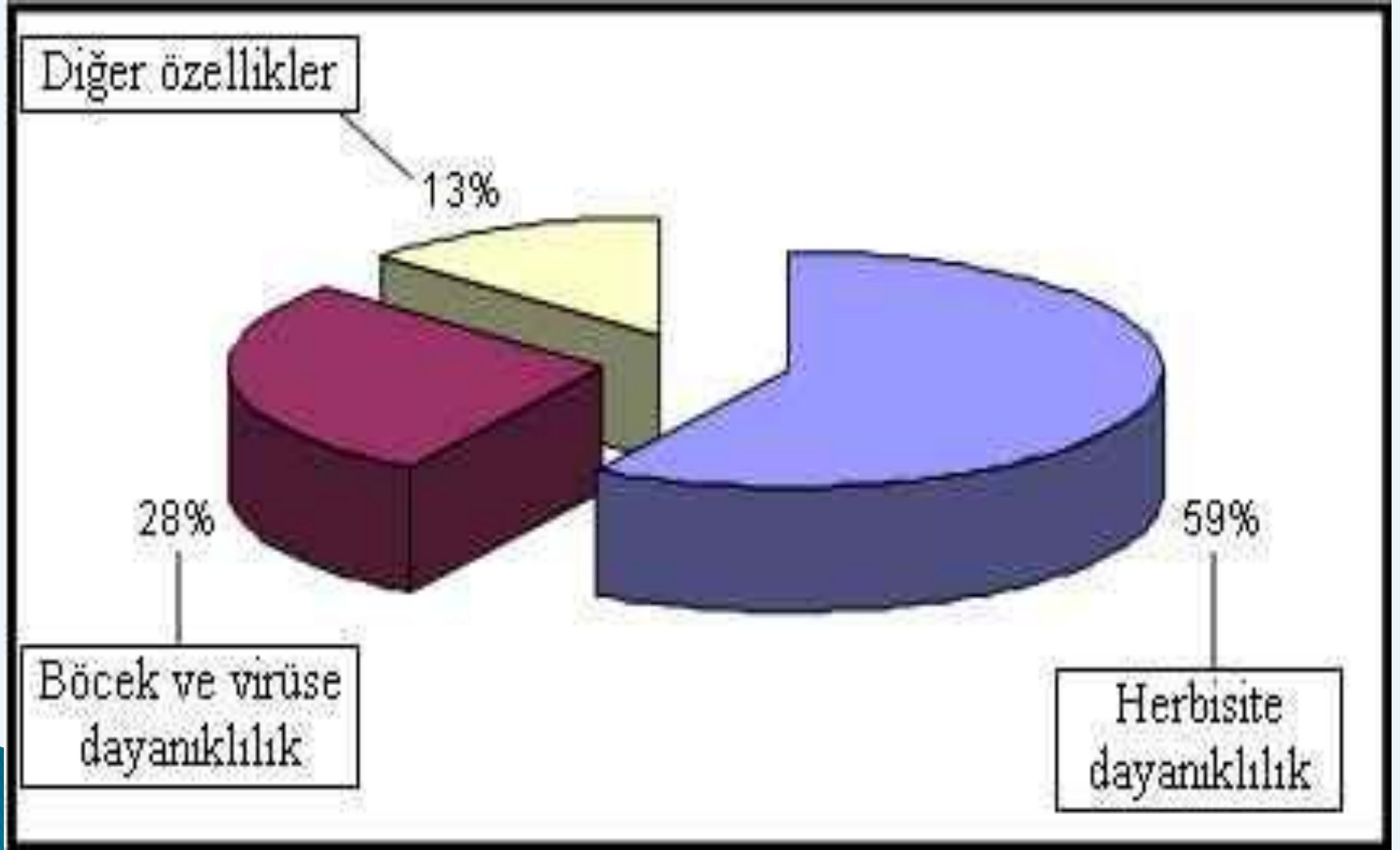




- ▶ Yani aktarılan genlerin doğal bitki türüne atlayarak, buldukları çevredeki doğal türlerde genetik çeşitliliğinin kaybına neden olmaları,
- ▶ Yabani türlerin doğal yapılarında sapmalara neden olmaları,
- ▶ Tek yönlü kimyasal uygulanmasından kaynaklanacak olan tek yönlü evrimin teşvik edilmesiyle ekosistemdeki tür dağılımını ve dengeleri bozmaları gibi...



## GDO ürünlere aktarılan özelliklerin gruplandırılması



# GD'li Ürünlerin Çiftçiye Yararları

- ▶ Bitkileri bazı zararlı böceklerden korumak için ilaç masrafından kurtulacaklardır.
- ▶ İstemedikleri yabancı otlardan kurtulmak için istedikleri kadar ilaç kullanılabilecek ve bu şekilde bitkiler hiçbir zarar görmeyecektir.



# GD'li Ürünlerin Çiftçiye Zararları

- ▶ Fazla ilaç kullanımından dolayı toprak kirlenmesi gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca maddi yükümlülüğü artırmaktadır.
- ▶ GD'li ürünlerin ekilmeye başlanmasıyla **tohumluk hakkı** kalmayacaktır. Çünkü üretilmekte olan GD bitkilerin büyük bir kısmı, açık tozlaşan melez türler. Yani her yıl bu tohumların yenilenmesi gerekir.
- ▶ GD tohumlarının fiyatları, klasik tohumlardan, değiştirilen özelliğe göre daha pahalıdır.



- ▶ Yetkililerin söylediklerine göre, GDO'lu ürünlerde verim yüksek olsa da, çiftçi bundan pek karlı çıkmayacaktır.



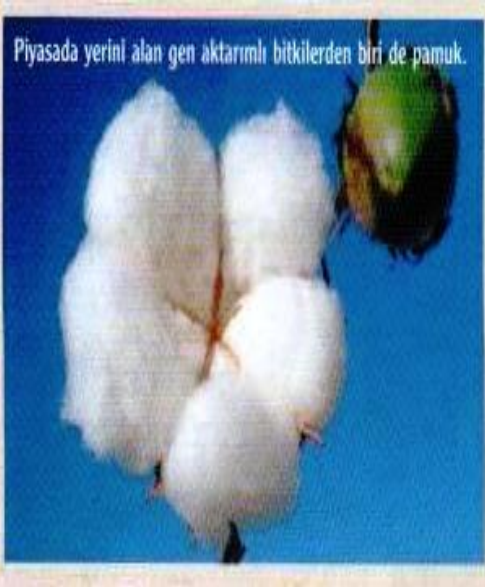
# Çeşitli GDO Ürünleri

- ▶ Kutuplarda yaşayan bir tür balıktan izole edilen anti-freeze (yani bitki dokularında donmayı engelleyen) geni **domates** ve çilek gibi bitkilere aktarılarak soğuğa dirençli GD domatesler ve çilekler (geliştirilme aşamasında) geliştirilmektedir.





**Değiştirilmemiş beyaz piringç (solda)  
ve genetik modifiye edilmiş altın piringç (sağda)**



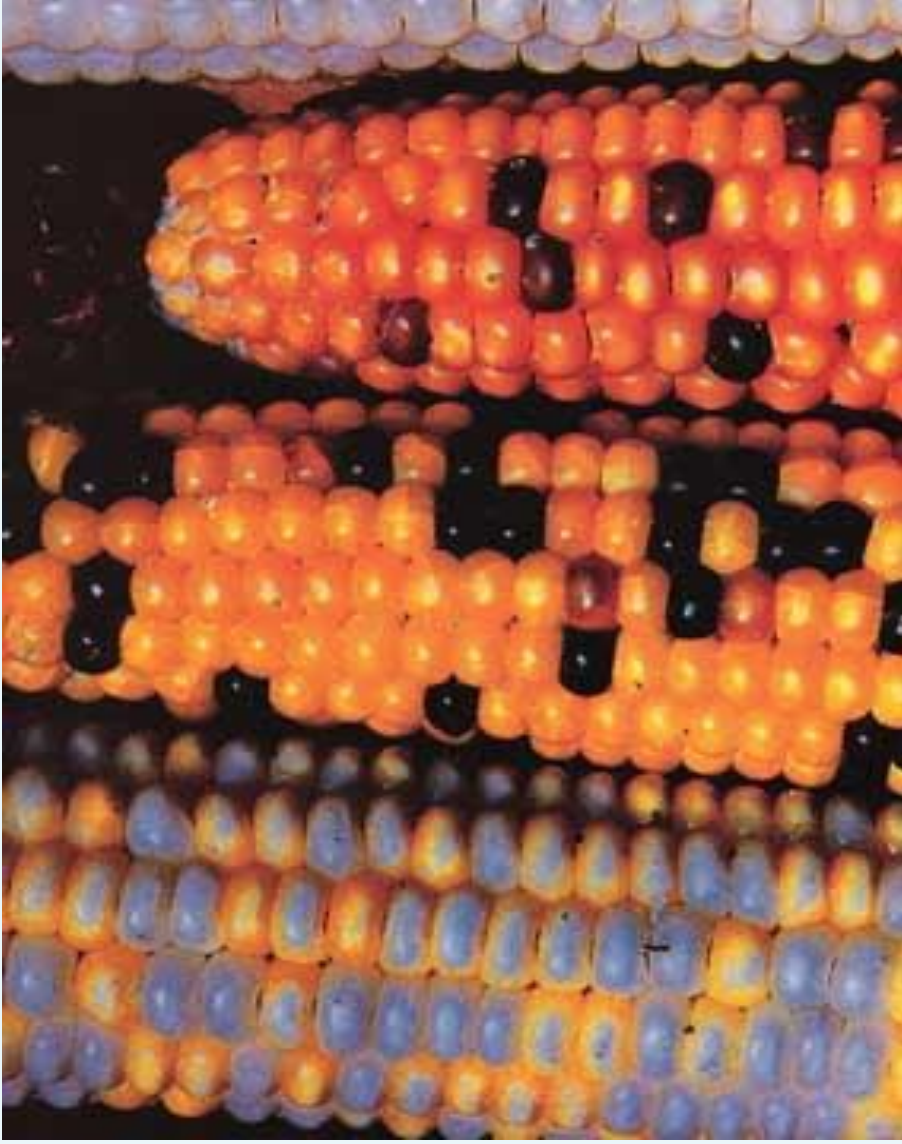
Zararlı bitkilerle savaşmada kullanılan ilaçlara karşı dayanıklı hale getirilmiş **soya fasulyesi, kolza, kanola, mısır ve pamuk bitkileri** de var.

# Amino asit içeriği yükseltilmiş tahıl ve patatesler.



- ▶ Avusturalya'daki **Bresatec domuzları** (hayvanın yemden yararlanma kabiliyeti ve et verimi arttırılmıştır).
- ▶ ABD'deki **AquAdvantage somon balıkları** (okyanus yayın balığının antifreeze protein geni aktarılmış, kısa sürede büyüyen balık).
- ▶ İnsan sütüne benzer inek sütü yapılmıştır.





- ▶ Zararlı böceklere karşı kendi zehrini üreten **mısır** çeşitleri. *Bacillus thuringiensis*'den alınan bir genle bu böcekler için zehirli olan ancak başka canlılara zarar vermeyen madde üretimi sağlanıyor.

# Sonuç

- ▶ Dünyada genetik yapısı değiştirilmiş canlıların ve bunlardan elde edilen gıdaların dağılımı hızla artmaktadır.
- ▶ Mısır ve soyadan üretilen yağ, un, nişasta, glikoz şurubu, sakkaroz, fruktoz içeren gıdalar; bisküvi, kraker, pudingler, bitkisel yağlar, bebek mamaları, şekerlemeler, çikolata ve gofletler, hazır çorbalar, mısır ve soyayı yem olarak tüketen tavuk ve benzeri hayvanlardan elde edilen gıdalar ile pamuk GDO'lu olma riski taşıyan tarımsal ürünlerin başında gelmektedir.



- ▶ Bu ürünlerin özellikle insan sağlığı üzerinde kısa ve uzun dönemde oluşturacağı etkiler ise yeterince bilinmemektedir. Ayrıca bu ürünlerin genetik çeşitliliği tehdit etmesi durumunda geri dönüşü olmayan bir sürece de girilmiş olacaktır.



# Alınabilecek Önlemler

- ▶ GDO'lu tohumların kontrolsüz alanlarda ekimine izin verilmemeli,
- ▶ Gümrüklerde, iç piyasada etkin bir denetim sistemi kurulmalı,
- ▶ Türkiye'de GDO'lu ürünler konusunda kendi araştırmalarını yapmalı, teknolojisini kendi üretmeli,
- ▶ Tarımda, girdiden çıktıya, tüm alanlarda bağımlılık zincirini kıran, kendi potansiyelini kullanan bir politika izlenmelidir.



# GDO nasıl belirlenir

- ▶ Transgenik bitkiler genomlarına yeni gen yada genlerin eklenmesi ile karakterize edilir.
- ▶ Aktarılan bu yeni genler ile yeni bir protein ifade edilir.
- ▶ GDO tanı teknolojisinin temelini genetiği değiştirilmemiş çeşit ile transgenik ürünler arasındaki farkın bulunması ile oluşturur.
- ▶ Genel olarak GDO'lu ürünlerin belirlenmesi 2 farklı aşamada yapılmaktadır

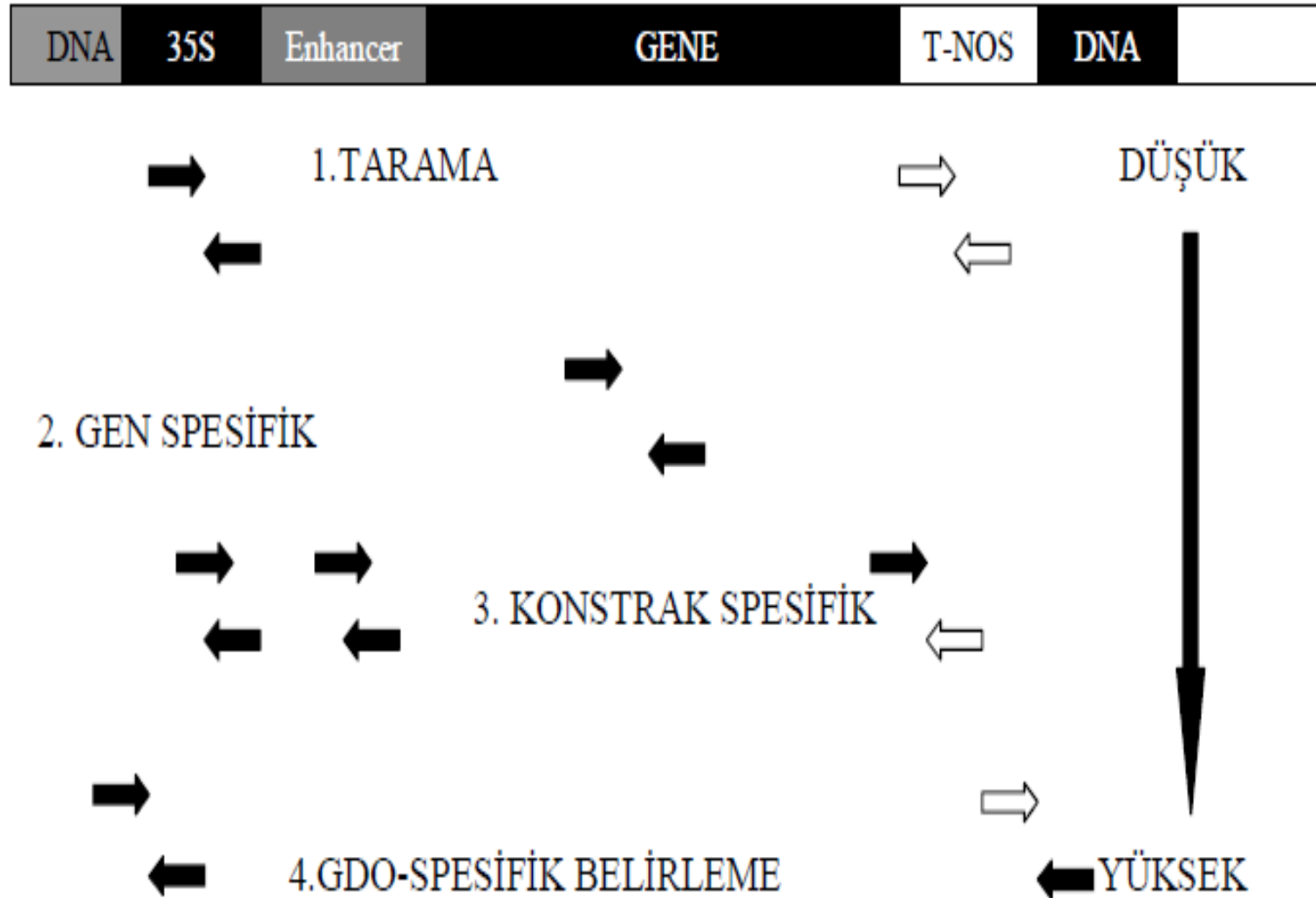
- ▶ A. Aktarılan yeni DNA nın veya ifade edilen yeni protein dizinin belirlenmesi  
----3 aşamada yapılır
- ▶ B.enzimatik reaksiyonların ürününü tespit etmek için kimyasal analiz yöntemlerinin kullanılması

Günümüzde mısır, soya, pamuk gibi tarla bitkilerinde genetik modifikasyonların belirlenmesi için iki bilimsel yaklaşım kullanılmaktadır. Birincisi, **ELISA** (Enzyme linked immuno sorbent assay) antijen ve antikor arasındaki bağlanma özelliğini kullanarak özel proteinlerin varlığını test eder, diğeri **PCR** (Polymerase Chain Reaction), tahıla aktarılmış olan DNA sekanslarının belirlenmesine dayanır. Bu yöntemler örnekteki miktar (yüzde) hakkında bilgi verebilir. AB'de geçerliliği onaylanan ilk yöntem, pazara sunum için onaylanan birçok GDO'nun tespit edilebildiği PCR'a dayalı tayin yöntemidir (Lipp ve ark. 1999).

Pietsch ve ark. (1997) tarafından geliştirilen bu metot, aktarılan genin konakçı organizmada işlevselliği için gerekli olan 35S promotor ve *nos* terminatör kontrol tayinine dayanır. Yöntem geçerliliği IHCP (JRC)'nin Gıda Üretimi ve Tüketici Malları Birimi (Food Products and Consumer Goods Unit) tarafından uygun sertifikalı referans materyallerinin üretiminden sorumlu olan JRC, IRMM (Referans Materyaller ve Ölçümler Enstitüsü) ile işbirliği ile koordine edilmiştir.

1. Birinci aşama DNA'sı izole edilen eldeki ürünün GDO'lu olup olmadığına yönelik tarama aşamasıdır.

- ▶ Bu aşamada özellikle en çok kullanılan 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin amplifikasyonu standart PCR yöntemi ile yapılır.
- ▶ Eğer sonuç pozitif ise ikinci aşamada hangi çeşit GDO olduğunu belirlemeye yönelik spesifik PCR yöntemleri uygulanır.
- ▶ Üçüncü aşamada ise ikinci aşamada belirlenen GDO'nun Real-Time PCR kullanılarak kantitatif tayini yapılır.



Şekil 1.1. GDO belirleme aşamaları (Jensen ve ark., 2003)

**Çizelge 3.10. 35S promotor ve Nos terminatör taranmasında kullanılan primerler**

<b>Primer Adı</b>	<b>Baz dizilimi 5'-3'</b>
35sPF	AAA GAT GGA CCC CCA CCC AC
35sPR	GAG GAA GGG TCT TGC GAA GG
NOS1	GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG
NOS3	TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA



Yukarıda bahsedildiği gibi araştırmalar ayrıca proteine dayalı yöntemlerin geliştirilmesine de yönelmiştir. Roundup Ready® soyanın tayininde hassasiyeti yüksek, ELISA tabanlı bir yöntem kullanılması geçerlilik onayı almış olup (Lipp ve ark. 2000) diğer yöntemler de geliştirilmiştir (<http://mbg.jrc.ec.europa.eu/home/ict/methodsdatabase.htm>).

Proteine dayalı yaklaşım, ilgi duyulan proteine karşı geliştirilmiş özel antikorlar kullanır. ELISA özel olarak, yahut diğer benzer olmayan proteinlerin de bulunduğu örnekte, ilgi duyulan proteini belirler veya ölçer. ELISA yöntemi özel bir proteine bağlanması için bir antikor, tespiti çoğaltabilmek için ikinci bir antikor (tercihe bağlı) ve ilgilenilen protein standardı ile karşılaştırılarak, reaksiyonun sonucunu bir renk ürünü olarak ölçebileceğimiz, antikora bağlı bir enzim kullanır.

Testin doğru biçimde yapılabilmesi için eğitilmiş personel ve özel ekipman gerekmektedir.

## ELISA analizinin anahtar özellikleri;

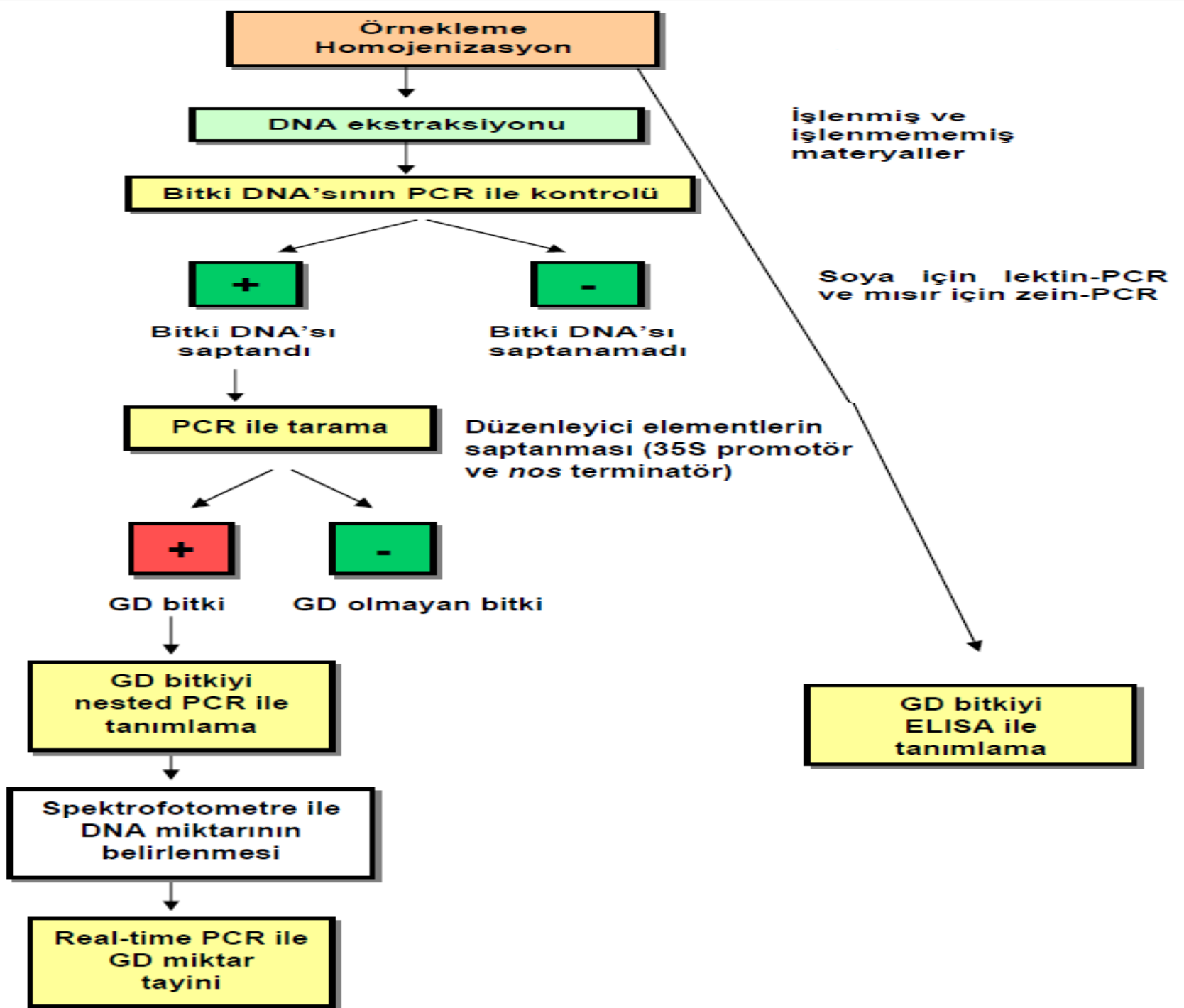
- PCR'dan daha az hassastır, bu nedenle, düşük seviyelerdeki kontaminasyon sonucu oluşan “yanlış pozitif” sonuçlarla PCR'a nazaran daha nadiren karşılaşılır.
- Analiz geliştirilmesi ve antikor ve protein standartları oluşturmanın yüksek ön maliyeti vardır.
- Kimyasallar geliştirildikten sonra örnek başına maliyeti düşüktür.
- Aynı protein özelliğini gösteren farklı transgenik vakalar arasında farkı ayırt edemeyebilir.
- Proteine dayalı yöntemler kimyasallar ve yöntem gelişimi için önemli bir ön hazırlık zamanı gerektirir.

- Proteine dayalı testler, ölçülebilir bir protein üretildiğinde pratik ve etkili bir analiz yöntemidir. Ancak genetik olarak değiştirilmiş ürünler yalnızca bazı gelişim safhalarında veya belli bitki bölümlerinde üretilirler ve bunları ELISA ile kolayca ölçmek mümkün olmayabilir.
- Buna ek olarak, özellikle endüstriyel işlemler proteinlerin kolayca bozulmasına sebep olabilir ve bu nedenle işlenmiş gıdalarda ELISA yöntemini kullanmak problemlidir.

ELISA (Clark ve Adams 1977) yönteminde antijen ve antikorlar arasındaki özel etkileşim esastır. ELISA'daki anahtar ayraç moleküller, antijen adı verilen yabancı maddelere karşı vücut bağışıklık sistemi tarafından üretilen anitkor adı verilen çözüdür proteinlerdir. GDO'ların belirlenmesi durumunda bu antijen, genetik modifikasyon sonucu sentezlenen yeni protein olabilir.

Onaylanan genetiği değiştirilmiş tahıllarda kullanılan transgenlerin ürünleri olan proteinlere karşı kullanılabilcek özgün antikorlardan sadece bir kaçı ticari olarak mevcuttur. Buna örnek olarak *nptII* gen ürününe (*npt II* ve *APH(3')II*) ve *gus* gen ürününe karşı olan antikorlar örnek verilebilir.

Yöntem	Test yapılan molekül	Süre	Kullanım kolaylığı	Sonuçlar
ELISA	Protein	2-8 saat	Orta; laboratuvar bilgisi gerektirir; testler tahıla ve çeşide özeldir	Özel genetik modifikasyonu tespit edebilir, test numunesinde GDO için nicel tayin yapmak mümkündür
PCR	DNA	1-3 gün	Zor; özelleşmiş alet ve eğitim gerektirir	Çok hassas, yanlış pozitiflere maruz kalabilir; GDO DNA'nın varlığını tespit eder, test numunesinde GDO için nicel tayin yapmak mümkündür



Örnek

% GMO Özellikleri (Spesifik ingredient)

RR soya

MON810

Bisküvi # 1

%0

%0

Karışık un (MON, RR)

%1

%1

MON810 un

-

%1

Aperatif gıda

%2,2

-

Soya sütü tozu

%8,9

-

Bisküvi MON810

-

%2



**Örnek****zein lectin 35S nos E35S/hsp70(b) CTP/EPSPS**

<i>IRMM-410S-0(%0)</i>	-	+	-	-	-	-
<i>IRMM-410S-1(%0,1)</i>	-	+	+	+	-	+
<i>IRMM-410S-2(%0,5)</i>	-	+	+	+	-	+
<i>IRMM-410S-3(%1)</i>	-	+	+	+	-	+
<i>IRMM-410S-4(%2)</i>	-	+	+	+	-	+
<i>IRMM-413S-0(%0)</i>	+	-	-	-	-	-
<i>IRMM-413S-1(%0,1)</i>	+	-	+	-	+	-
<i>IRMM-413S-2(%0,5)</i>	+	-	+	-	+	-
<i>IRMM-413S-3(%1)</i>	+	-	+	-	+	-
<i>IRMM-413S-4(%2)</i>	+	-	+	-	+	-
<i>Bisküvi #1</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Karışık un</i>	+	+	+	+	+	+
<i>MON810 un</i>	+	-	+	-	+	-
<i>Aperatif gıda</i>	-	+	+	+	-	+
<i>Soya sütü tozu</i>	-	+	+	+	-	+
<i>Bisküvi MON810</i>	+	-	+	-	+	-

# monsanto

Soya hattı GTS 40-3-2 Monsanto Canada Şti. tarafından soya üretiminde zararlı bitkilerle mücadelede alternatif bir sistem olarak glufosatın kullanımına olanak sağlamak için geliştirilmiştir. GTS 40-3-2 nin geliştirilmesi, *Agrobacterium tumefaciens* suşu CP4'den izole edilen glufosat dirençli 5-enolpurivil-şikimat-3-fosfat sentaz (EPSPS) enzimini kodlayan genin, ticari soya çeşidi (Asgrow Tohum Şirketi) A5403'e aktarılması yolu ile olmuştur.

## Glufosat toleransı

Roundup®'in aktif molekülü olan Glufosat, sistemik, seçici olmayan zararlı ot kontrol maddesi olarak dünya çapında kullanılan bir herbisittir. Glufosat 5-enolpurivil-şikimat-3-fosfat sentaz (EPSPS) enziminin kompetitif inhibitörü olarak görev yapar. EPSPS fenilalanin, tirozin ve triptofan aromatik aminoasitlerinin üretiminde yer alan şikimat biyokimyasal yolunda zorunlu bir enzimdir (Şekil 1). EPSPS'in engellenmesi büyümenin durdurulması ve bitki ölümüne yol açar.



# Plant Biotechnology:

*- why and how...*

<https://personel.omu.edu.tr/tr/zafer.secgin>

Ondokuz Mayıs Üniversitesi,  
Ziraat Fakültesi,  
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

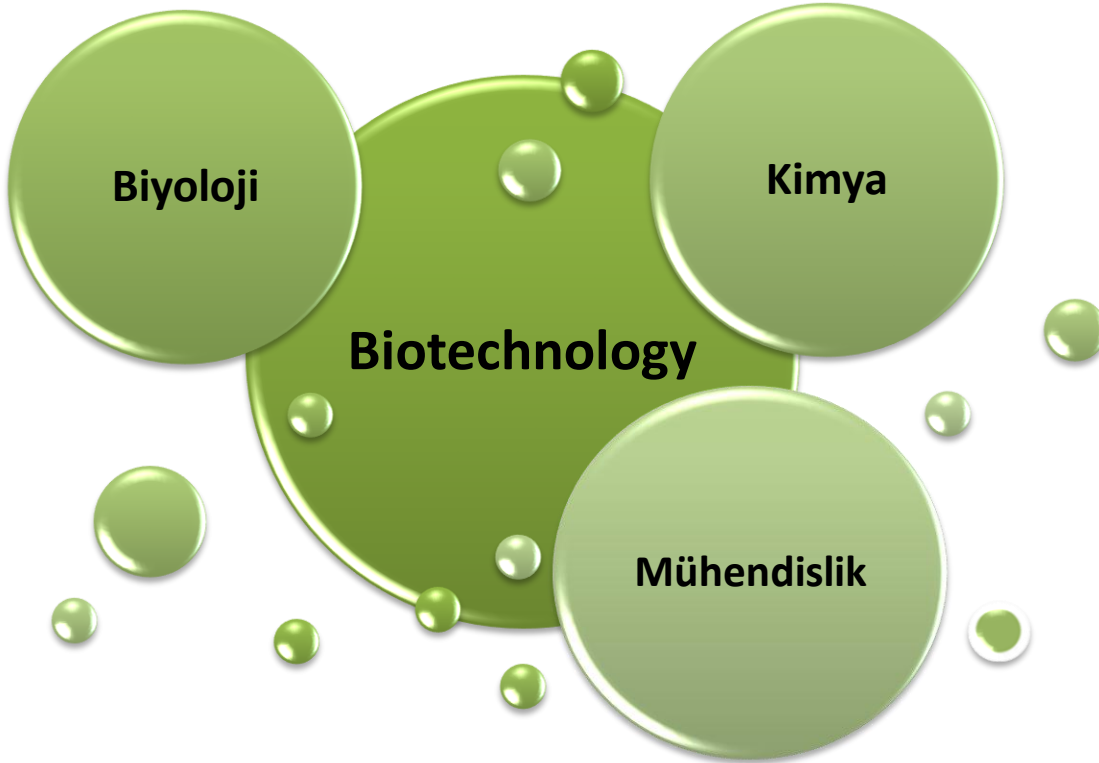
Zafer SEÇGİN

“Plants for Life”

“Plant Biotechnology for Sustainability and Global Economy”

# Biyoteknoloji – nedir?

İnsan yararı için yaşam sistemlerinden yararlanmak yada genetik olarak geliştirmek için kullanılan tekniklerin tamamı.



# Biyoteknoloji - yeni bir şey mi?

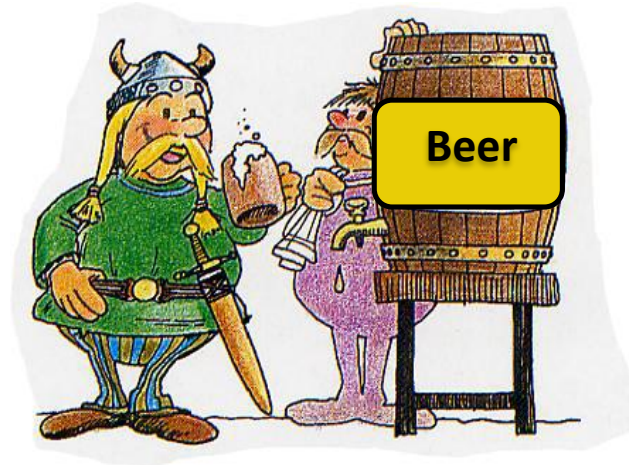
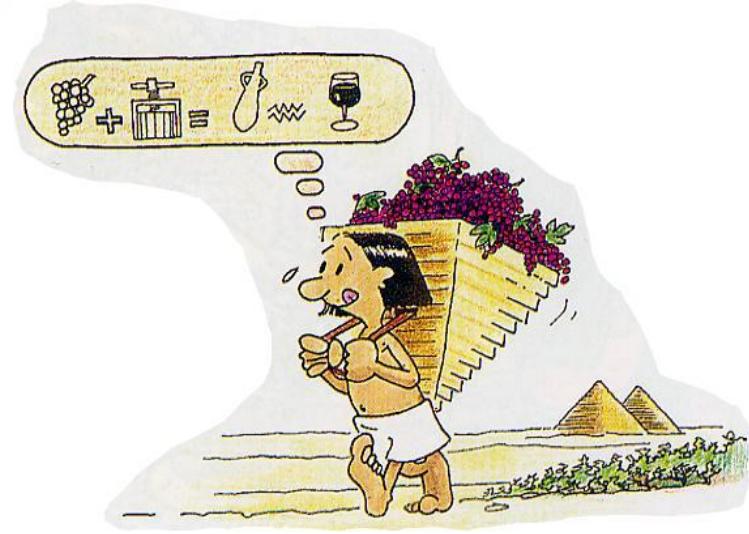
Tarih öncesi çağlarda bazı mikroorganizmalar zaten fermentasyon gibi süreçler için kullanılmıştır:

- Bira
- Peynir
- Şarap

## Günümüzde Biyoteknoloji



Organizma ve daha iyi araçlar hakkında daha iyi bilgiye dayanır.



# Bitkisel Biyoteknoloji



**Bitkiler yeryüzündeki yaşam için çok önemlidir.**

- İnsan kalorisi alımının % 90'ını ve protein alımının % 80'ini (hayvansal ürünlerden gelen geri kalanı) sağlarlar.



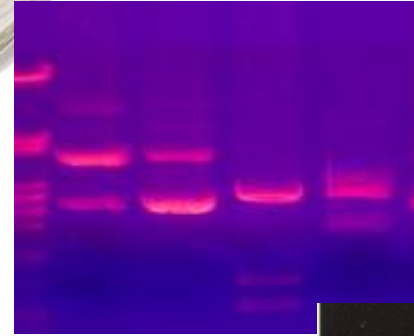
# Bitki Biyoteknolojisi Araçları



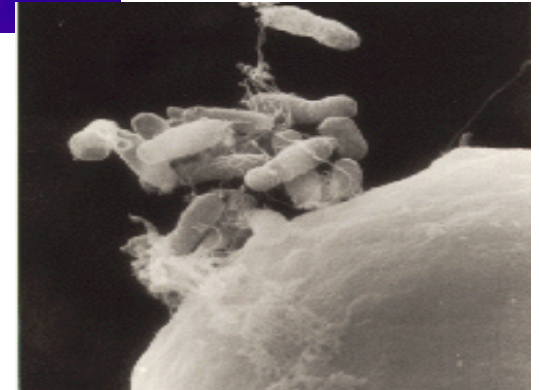
Mevcut zorluklarla mücadele etmek için bitki biyoteknolojisi çeşitli araçlar kullanıyor



- *In vitro* kültür  
(Doku kültürü)



- Genomik analiz
- Genom manipülasyonu
- Moleküler markör
- Fitoremidasyon





# *In vitro* kültür



Bitki hücreleri **totipotensi**'ye sahip



Sınırsız sayıda özel hücre tipine ayırt  
etmek için bir hücrenin potansiyeli

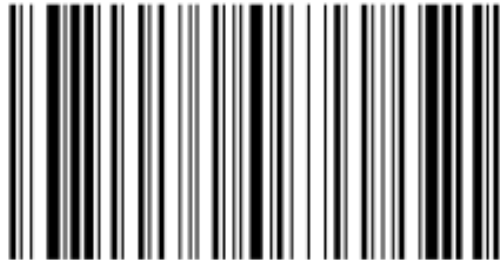
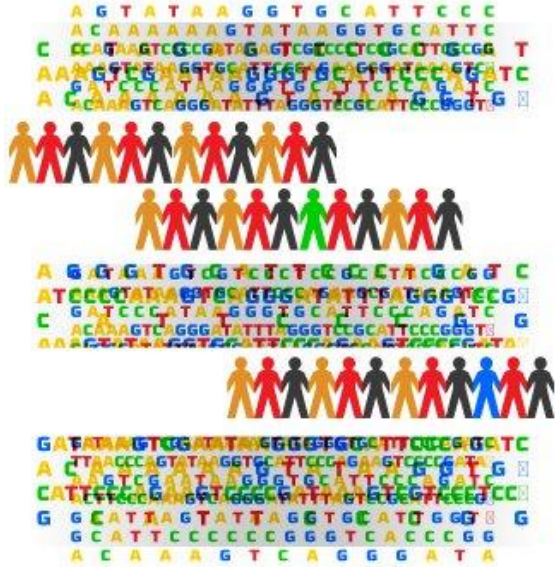


*In vitro* kültürde kontrollü koşullar kullanılır  
(*ışık ve sıcaklık, kültür ortamı, çevrede*)



**Bitki materyalinin biyoteknolojik üretimi**

# Genomik analiz



İnsan genomunun **dizilenmesi**=>  
=> Bazı hastalıkların belirlenmesi



Bazı bitkilerin genom dizileri çıkarılıştır.

**Genome sequencing**



Her bir birey ile ilgili özelliklerin tanımlamaya yardımcı olur (örneğin: zararlılara ve hastalıklara direnç, iyileştirilmiş besin değeri, artan hasat sonrası değer...)

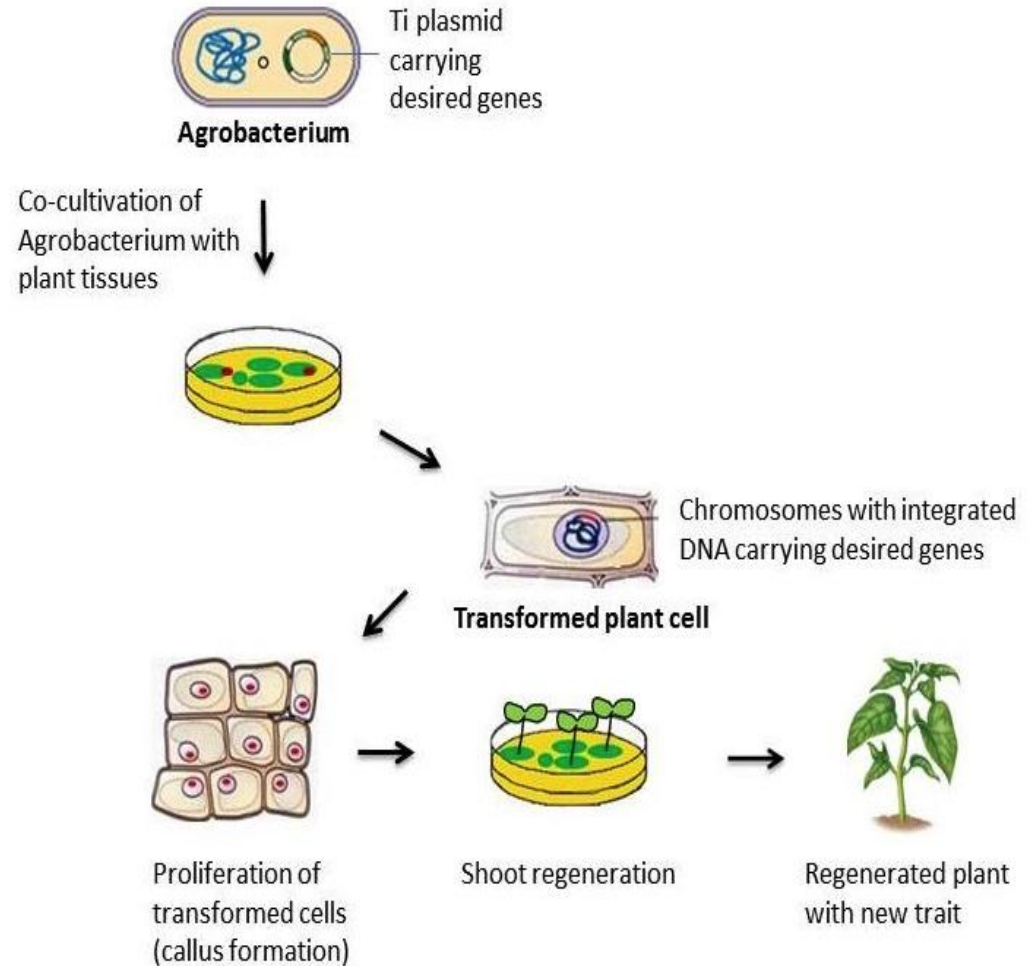
# Genom manipulasyonu - *Agrobacterium*

***Agrobacterium tumefaciens*** bir toprak bakterisidir.

(atmosferik N<sub>2</sub>'yi sabitleyebilen)

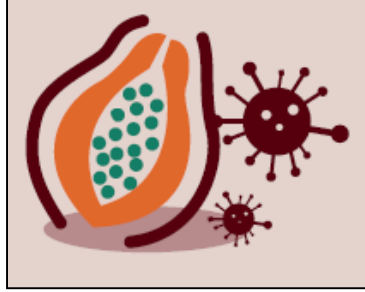
***Agrobacterium*** çevresel strese daha yüksek verimlilik, hastalık direnci veya toleransla bitkiler elde etmek için yeni araçlar sağlar.

*Agrobacterium* biyolojik vektörünün kullanılmasını yanında diğer teknikler de etkilidir (örneğin: biyolistik veya direkt gen transferi).



# Araştırmalarda biyoteknolojik çözümleri

Virus  
dirençli  
papaya



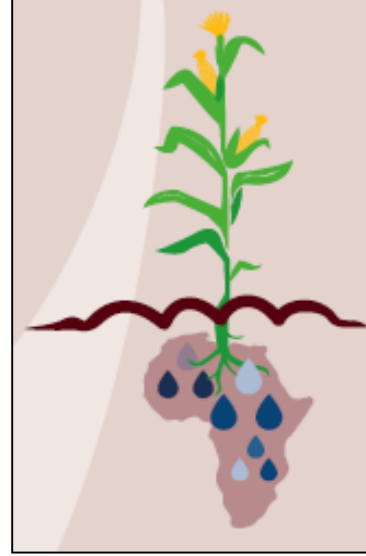
Gulutensiz  
wheat



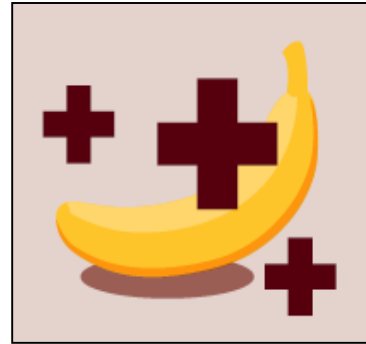
Altın rice  
(zenginleştirmiş  
 $\beta$ -carotene)



Kurak -  
toleranslı  
mısır



**Bananas**  
zenginleştirilm  
iç vitamin A



# Bitki Biyoteknolojisi - dünyada yararları

## Kırsal Alanların Geliştirilmesi

Mısır Soya gibi Biyoteknolojik ürünler çiftçi gelirlerini ve gıda güvenliği artarken yoksulluk azalır.

## Doğal yaşam alanlarının korunması

Çiftçilerin daha az arazi üzerinde daha fazla büyümelerine yardımcı olarak, doğal yaşam alanları daha iyi korunmaktadır

## Çevreye verilen zararın azaltılması

Glifosata dirençli mısır, pamuk ve soya fasulyesi gibi herbisite toleranslı ürünler, toprakta karbon kalmasına yardımcı olarak toprak işleme ihtiyacını azaltır.



## Bazı iyileştirmeler



Tüm biyoteknoloji çözümlerine rağmen, olumsuz ortamlara karşı direncin artmasıyla birlikte yeni çeşitlere acil ihtiyaç duyulmaktadır, bu da örneğin verimlilik, karlılık ve sürdürülebilirliğin artırılması için:



Verimli azot kullanımı



Çevresel strese toleranslı (drought, salinity)



Zararlılara ve hastalıklara karşı dayanıklı

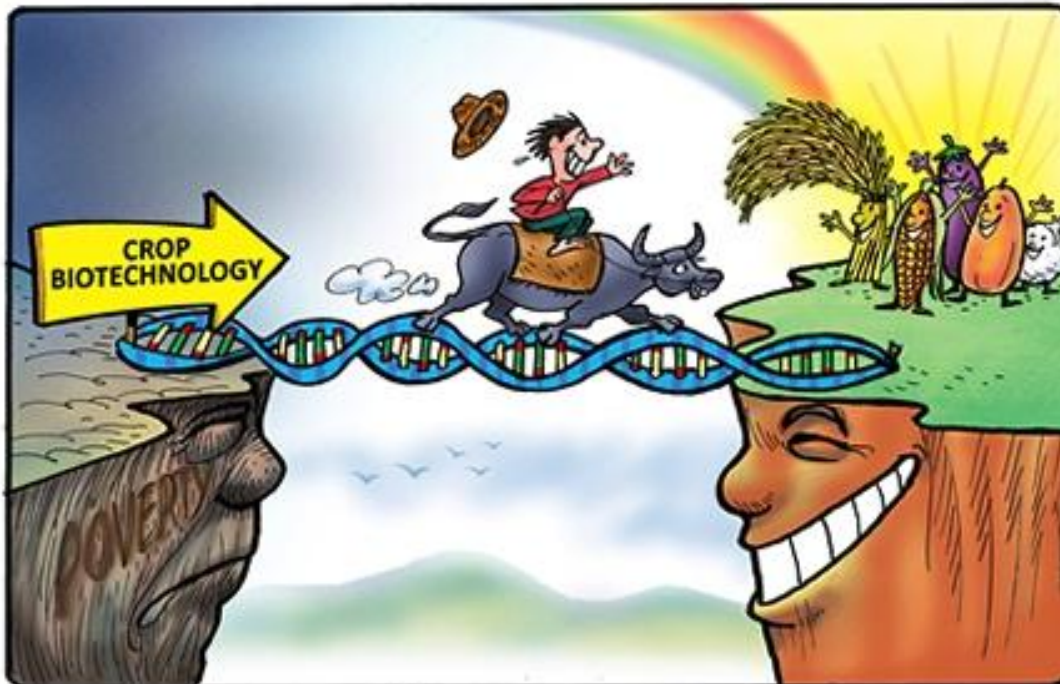


Daha besleyici ve daha yüksek verim

Thank you for your attention!

From crops that enable farmers to maximize productivity and ensure food security, to foods that enhance consumer diets and reduce health risks...

**... the potential of plant biotechnology is limitless!**



Norman B. Isaac (1st place, Professional Category)

## Some key references

Chawla H., 2010. **Introduction to Plant Biotechnology** (3<sup>a</sup> Ed). Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA

Pauls K. P., 1995. **Plant Biotechnology for Crop Improvement**. Biotechnology Advances, Vol. 13, No. 4, pp. 673-693

**Contributions of Agricultural Biotechnology in Alleviation of Poverty and Hunger.** Pocket K. collaborative initiative among the National Council for Science and Technology (NSCT), Ministry of Agriculture, Program for Biosafety Systems (PBS -IFPRI) and ISAAA AfriCenter  
<http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/foldable/Pocket%20K30%20%28English%29.pdf>

International Service for the acquisition of agri-biotech applications - <http://www.isaaa.org/kc/>

### **Plant Biotechnology 101 Answering Your Questions**

[https://croplife.org/wp-content/uploads/pdf\\_files/CL\\_Biotech101\\_A4\\_Book\\_WEB\\_Single.compressed-min.pdf](https://croplife.org/wp-content/uploads/pdf_files/CL_Biotech101_A4_Book_WEB_Single.compressed-min.pdf)  
[www.croplife.org](http://www.croplife.org)