

KONU VIII

BİTKİ ISLAHINDA KULLANILAN BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLER

Geleneksel ıslah yöntemlerine son yıllarda ilave edilmiş en önemli kaynak, biyoteknolojik yöntemlerdir. Bu teknoloji; doku, organ, izole edilmiş hücreler, kalluslar, protoplastlar, embriyonik dokular vb. yapılardan bitkilerin elde edilmesini sağlayan bir teknolojidir. Bir kültür tekniğine, bitki cins, tür ve çeşitleri kendi aralarında ve kendi içlerinde her zaman aynı yönde tepki vermezler. Bu durum, bitki ıslah programlarında rutin olarak kullanılabilen üniform tekniklerinin geliştirilmesini engellemektedir. Bir ıslah programında bu tekniklerin kullanılabilmesi için, ıslahçının çalışacağı özel yöntemlere ve çalışma ortamlarına ihtiyacı vardır.

Biyoteknolojik Çalışmaların Türkiye’deki Seyri

Biyoteknolojik çalışmalarının Türkiye’deki geçmişi yaklaşık 30-35 yıllık bir geçmişi vardır.

Son yıllarda, doku kültürü çalışmaları, moleküler biyoloji ve moleküler genetik alanında geliştirilen teknikler ile bütünleşerek sürdürülmektedir. Bu çalışmaların sonucu olarak başta virüssüz bitki elde etmek olmak üzere stres koşullara dayanıklılık, daha yüksek kalite ürün elde etmek gibi çeşitli amaçlarla araştırmalar yapılmaktadır. Türkiye’de, birçok üniversitede, Tübitak araştırma merkezinde ve Birçok Araştırma Enstitüsünün laboratuvarlarında hücre ve doku kültürü alanında çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca, birçok üniversite müfredat programına uygulamalı hücre ve doku kültür tekniklerini kapsayan biyoteknoloji dersleri koymuştur. ilave olarak, hücre ve doku kültür alanında çalışacak elemanları yetiştirmek amacıyla farklı kuruluşlar tarafından, zaman zaman, kısa süreli kurslar düzenlenmektedir.

Biyoteknolojik Çalışmalar İçin Gerekli Şartlar

- i) Sterilizasyonu mümkün olduğunca sağlanabilen, bir laboratuvar.
- ii) Kimyasal maddeler.
- iii) Çeşitli cam malzemeler.
- iv) Yıkama ünitesi ve Kurutma fırını.
- v) Kimyasal maddeleri saklamak ve temiz kapların kirlenmesini önlemek için kabin veya dolaplar.
- vi) Steril çalışma alanı veya steril kabin ünitesi.
- vii) Kullanılan ekipmanları sterilize etmek için otoklav, filtre sterilasyon ünitesi, mikrodalga fırın.
- viii) Işık, sıcaklık ve rutubeti kontrol edilebilen kültür odası, iklim dolabı veya inkubatör.
- ix) Elektrik, su, gaz ve çalışma alanındaki hava ve basıncı ayarlayacak servis elemanları.
- x) Saf su cihazı, PH metre, çalkalayıcı gibi servis elemanları.

Biyoteknolojik Çalışmalarda Başarıyı Etkileyen Faktörler

- i) Mineral tuzlar, hormonlar, enzimler ve vitaminler, karbon ve enerji kaynakları ve diğer organik bileşiklerden oluşan kültür ortamının besin kompozisyonu.
- ii) Kültüre alınan bitki materyalinin kaynağı, fizyolojik olgunluğu (yaşı) ve büyüklüğü (hacimsel kapasitesi).
- iii) Besi ortamının aydınlatılmasında kullanılan ışığın süresi, dalga boyu ve yoğunluğu.
- iv) Besi ortamının bulunduğu ortamın sıcaklığı.
- v) Kültür ortamının oksijen kapasitesi ve gaz dengesi
- vi) Alt kültürün niteliği (morfo-genetik potansiyelin kaybolma durumu ve kültür ortamındaki değişkenliğin durumu)
- vii) Besi ortamına alınan bitki genotipi (çeşit)
- viii) Besi ortamına alınan materyalin orijin aldığı verici bitkinin yetiştirildiği mevsim.

Bitki Islahında Kullanılan Biyoteknolojik Yöntemler

- 1) Klonla Çoğaltma
- 2) Meristem Kültürü
- 3) Genetik Materyal Muhafazası
- 4) Embriyo Kültürü
- 5) Haploid Bitki Elde Etme
- 5a) Anter ve Polen Kültürü
- 5b) Yumurta ve Yumurtalık Kültürü
- 5c) Kromozom Eliminasyonu (Bulbosum Tekniği)
- 6) Besi Ortamında Tozlanma ve Döllenme

- 7) Somaklonal Varyasyon
- 8) Somatik Hücre Melezlemesi ve Protoplast Kültürü
- 9) Gen Transferi

KLONAL ÇOĞALTMA

-Çeşitli doku ve organlar sterilize edildikten sonra veya steril şartlarda yetiştirilen bitkilerden bu yapılar alınarak makro ve mikro besin elementleri, şeker ve bitki düzenleyici maddeler (hormonlar) ihtiva eden kültür ortamında kültüre alınırlar.

-Bu yapılardan sağlıklı bitkiler elde edilir.

-Yeni bir bitkinin ilk birimini oluşturan bu farklılaşmış yapılar, ihtiyaca bağlı olarak, alt kültürlerle aktarılabilirler.

-Her bitki türü için uygun çimlendirme sağlayan besi ortamı teorik olarak belirlenerek, gün uzunluğu, ışık yoğunluğu, sıcaklık ve rutubet gibi çevresel faktörler, uygun bir gelişmenin sağlanması için ayarlanır.

-Sap ve kök oluşumundan sonra birkaç yapraklı gelişme seviyesine ulaşan bitkicikler gelişmelerinin tamamlanması için saksı yada tarlaya transfer edilirler.

-Fideler direkt tarlaya transfer edilecekse, tarlaya transfer edilmeden önce 7-10 gün ön yetiştirmeye alınırlar ve daha sonra tarlaya transfer edilirler.

Klonal Çoğaltma Yönteminin Kullanım Alanları

- a) Heterozigot bir genotipin, açılmadan üretilmesi
- b) Tohum ile çoğaltılma olanağının bulunmadığı bitkilerin çoğaltılması
- c) Kendine uyumsuz bitkilerin çoğaltılması
- d) Erkek kısır bitkilerin çoğaltılması
- e) Hastalık ihtiva etmeyen genetik materyallerden vejetatif olarak çoğaltılması,
- f) Genetik materyallerin korunması ve ulusal veya uluslararası değişimlerinin sağlanması,
- g) Somaklonal orijinli bitkilerin açılmadan çoğaltılması.

MERİSTEM KÜLTÜRÜ

-Bu teknik;Bitkilerin büyüme konileri veya büyüme konisinin yanında birkaç yaprak primordiyasının steril koşullarda kültüre alınmasını kapsar. Vejetatif yolla çoğalan birçok bitki cinsi, potansiyel verimlerini ve kalitelerini azaltan, sistematik virüsleri bünyelerinde barındırırlar.

Virüslerin elemine edilmesinde kullanılan yöntemler

- 1) Sıcaklık uygulaması
- 2) Meristem kültürü
- 3) Sıcaklık uygulamasının ardından meristem kültürü
- 4) Kimyasal madde uygulaması + meristem kültürü
- 5) Adventif sürgün oluşumundan sonra meristem kültürü
- 6) Meristemlerin virüsüz anaçlara aktarılmasıdır.

Bu yöntemler içinde, en basit ve yaygın olarak kullanılan yöntem, sıcaklık uygulanmasıdır. Bu yöntem kullanılarak, virüsler tamamen yok edilebildiği gibi pasif hale de getirilebilirler. Ancak, üzerinde çalışılan bitki materyali,

- a) sıcaklığa hassas bir materyal ise veya
- b) sıcaklık uygulamasına yeteri kadar tepki vermiyorsa, ya da
- c) virüs sıcaklıktan etkilenmiyorsa bu yöntem yeterli değildir.Özellikle birden fazla virüsün olduğu durumlarda birkaç yöntem kombine edilerek kullanılması gerekir.

Virüslerin yeniden bulaşmasının önlenmesi için:

- 1) Bitkiler, enfeksiyon ve araçların bulunmadığı sera şartlarında veya doğal olarak virüs ihtiva etmeyen alanlarda yetiştirilir.
- 2) Başta böcekler ve nematodlar olmak üzere hastalık taşıyan araçların (vektör) kontrol edilir.
- 3) Bitki yetiştirme esnasında bulaşık el-ayak, elbise, aşı malzemesi gibi steril şartları bozucu faktörler dikkate alınır.
- 4) Bitkilerin yetiştiriciliğinde; temiz saksılar ve dolgu malzemeleri kullanılır.
- 5) Gerekli şartlar sağlanamıyorsa; hastalıksız bitki materyali doku kültür ortamında yetiştirilir.
- 6) Sürekli olarak seleksiyon yapılarak virüs ihtiva eden bitki materyalleri ayıklanır.

Sıcaklık uygulamasında; materyal önce sıcaklıkla muamele edilir sonra besi ortamında kültüre alınır. Kimyasal uygulamasında; materyal kimyasal madde ile muamele edildikten sonra besi ortamında kültüre alınır. Ancak virüslerin eliminasyonunda tek tip sistemlerin kullanılması çoğu kez yeterli değildir. Birkaç yöntemin kombine edilmesiyle meristem kültüründen elde edilen başarı şansı artmıştır. Meristem kültürünün mümkün olmadığı koşullarda veya köklendirmenin mümkün olmadığı koşullarda mikroyenjeksiyon olarak da adlandırılan, meristemin virüssüz anaca aşılması ve ardından besi ortamında kültürünün yapılması yolu tercih edilmektedir.

GENETİK MATERYAL MUHAFAZASI

Hızla erozyona uğrayan genetik materyalleri korumak için gen bankaları kurulmuştur. Gen bankalarında; bitki cins ve türlerine ait bitki, Tohum, Organ, Doku ve hücreler muhafaza edilirler. Bazı bitki genotiplerinin tohumları hastalık ve zararlıların etkileri sonucunda zaman içinde canlılıklarını kaybedebilirler. Somatik veya gametik hücrelerden bitkilerin elde edilmesi araştırmacıları, bitki materyallerinin, doku ortamında muhafazası yönündeki araştırmalara yöneltmiştir.

Materyallerin Muhafazası Açısından

Doku Kültür Yöntemlerinin Avantajları:

- 1) Geleneksel yöntemlerine göre ihtiyaç duyulan muhafaza alanı azdır.
- 2) Bitkiler, hastalık ve zararlılarından arı olarak muhafaza edilir
- 3) Çok özel muhafaza koşullarına ihtiyaç duyan bitkilere, uygun ortam sağlanır
- 4) Materyallerin hastalık ve zararlılardan arı olarak, uluslararası mübadelelerindeki engeller minimuma indirilir

Muhafazada yaygın Olarak Kullanılan Yöntemler

- 1) Büyümenin yavaşlatılması

Kısa veya orta vadeli muhafaza için bu yöntem uygulanır.

Büyümenin yavaşlatılması; hücre bölünmesinin yavaşlamasını→dolayısıyla

- Stabilitenin daha uzun süre korunmasını ve
- Genetik varyasyonun azalmasını sağlamaktadır.

Ayrıca

- Alt kültürün tekrarlanma sayısı azaltmakta,
- dolayısıyla muhafaza alanı azalmaktadır.

- 2) Genetik stokların donmuş olarak, -196 oC'de, sıvı azot içinde muhafaza edilmesi

Uzun süreli muhafaza bu yöntem tercih edilir. Bu yöntem Cryopreservation olarak adlandırılır.

EMBRİYO KÜLTÜRÜ

Belirli bir fizyolojik olgunluğa sahip embriyonun, tohumdan veya tohum taslaklarından çıkarılması ve besin ortamında kültüre alınmasıdır

Embriyo kültüründe başarı oranının düşük olmasının sebepleri:

- a) Genotiplerin respons yeteneklerinin farklılık arz etmesi
- b) Bulaşma problemi
- c) Embriyoların izole edildikleri zaman küçük olmaları
- d) Embriyo gelişmesinin sekteye uğraması
- e) Özellikle sert tohumlarda embriyonun zarar görmesi
- f) Besi ortamı

Embriyo kültürünün kullanım alanları

- 1) Uyuşmazlık problemi olan uzak akrabalar arasındaki melezlemelerde
- 2) Bir yabancı türden, kültür çeşitlerine, arzu edilen karakterlerin aktarılmasında, melez embriyonun zayıf kalıp, öldüğü durumlarda
- 3) Embriyo kültürü ile tohumdaki dormansi engelini ortadan kaldırmak.
- 4) Haploid bitki elde etmek.
- 5) Parazit bitkilerin tohumlarının, konukçu bitki olmadan çimlendirilmesinin mümkün olmadığı koşullarda
- 6) Doğal koşullarda tohumları çimlenemeyen bitkilerin tohumlarının çimlendirilmesinde
- 7) Erken olgunlaşan, bilhassa taş çekirdekli meyvelerde, sağlıklı embriyolardan sağlıklı bitkilerin elde edilmesinde.

Embriyo kültüründe; olgunlaşmayan ve olgun embriyoların kültürü yapılmaktadır. Olgun olmayan embriyoların kültüründe; embriyoların gelişebilmesi için özel besi ortamına ihtiyaç vardır. Olgun embriyoların kültüründe; embriyolar basit besin ortamında çimlenebilir ve bitkicik oluşturabilirler.

HAPLOİD ELDE ETME

Haploid: bir organizmanın, dokunun veya hücrenin türe has gametik kromozom sayısı kadar kromozoma sahip olması durumudur.

Haploidler

- a) Stojik araştırmalarda
- b) Melezleme ıslahında
- c) Melez azmanlığının elde edilmesinde
- d) Mutasyon ıslahında
- e) Aneuploid bitkilerin elde edilmesinde kullanılır.

Haploidler; doğal olarak ya da yapay olarak elde edilmektedirler.

Doğal haploidler; mono-embriyo veya poli-embriyolardan

Yapay haploidler; 1) Anter ve Polen Kültürü, 2) Yumurta ve yumurtalık kültürü ve 3) Kromozom eliminasyonu ile elde edilmektedirler.

ANTER KÜLTÜRÜ VE POLEN KÜLTÜRÜ

Anter kültürü ; Belirli bir olgunluk safhasına erişmiş olanpolen ana hücrelerini ihtiva eden anterlerintoplanmasısterilize edilmesiuygun besi ortamında kültür yapılmasıdır.

Anter kültür tekniğinin başarıları

- 1) Bitki genotipi
- 2) Anter verici bitkinin yetiştirildiği ekolojik koşullar
- 3) Polen tanesinin fizyolojik olgunluğu
- 4) Ön muamele
- 5) Kültür ortamının besin kompozisyonu
- 6) Kültür odasının koşulları
- 7) Kültür kabının özellikleri
- 8) Anter duvarının aktivitesi

POLEN KÜLTÜRÜ

Polen kültürü; steril edilmiş olan olgun anterlerden polenlerin çıkarılıp, besi ortamında kültüre alınmasıdır.

Polen kültürünün avantajları

- 1) Kontrol edilemeyen anter duvarlarının ve diğer dokuların etkilerinin elemine edilebilmesi
- 2) Kültür ortamında çimlenmeye etki eden faktörlerin etkilerinin kontrol altına alınması
- 3) Çimlenmenin tek bir hücreden sağlanması
- 4) Anter kültürüne göre anter başına daha yüksek bitki verimi elde edilmesi.

YUMURTA VE YUMURTALIK KÜLTÜRÜ

Döllenmemiş yumurtaların veya döllenmemiş yumurtaların bulunduğu yumurtalığın, besi ortamında kültüre alınmasıdır.Bu teknik sayesinde; buğday, arpa, çeltik, mısır ve şekerpancarında haploid bitkiler elde edilmiştir. Yumurta ve yumurtalık kültürünün başarısını etkileyen faktörler

- a) Verici bitkinin yetiştirme şartları
- b) Embriyo kesesinin gelişme safhası
- c) Çiçek tomurcuğunun kültür öncesi muamele edilmesi
- d) Yumurta ve yumurtalığın ön kültürü
- e) Kültür ortamının kompozisyonudur.

KROMOZOM ELİMİNASYON (BULBOSUM) TEKNİĞİ

Kromozom eliminasyon yöntemi veya Bulbosum Tekniği; arpada türlerarası melezlemelerde oluşan F1 döllerinin kromozomların hücre içerisinde erimesi ve bunun sonucu hücredeki kromozom sayısının haploid olarak kalmasına dayanmaktadır.

BESİ ORTAMINDA TOZLANMA VE DÖLLENME

Bu yöntem; özellikle tozlanmadan sonra polenlerin stigma üzerinde çimlenmemesi veya polen tüpünün dişik borusu içinde gelişmesinin engellenmesi sonucu döllenmenin oluşmadığı durumlarda eşeysel üremenin sağlanması amacıyla uygulanmaktadır. Bu yöntem

- a) stigma tozlanması ve döllenmesi

b) plasenta döllemesi

c) izole edilen yumurtaların besi ortamında döllemesi olmak üzere üç değişik şekilde uygulanmaktadır.

Stigma tozlanması ve döllemesinde; izole edilen dişı organ, besi ortamına alınır ve sterilize edilmiş anterlerden alınan polenler, stigma üzerine serpilir. Bu yöntem sayesinde yumurtalığın olgunlaşmadan öldüğü bitkilerde tohum elde etmek mümkün olabilmektedir.

Plasenta döllemesi yönteminde; döllememiş yumurtalarla birlikte plasenta, izole edilerek besi ortamına alınır. Sterilize edilen anterlerden alınan polenler, yumurtaların üzerine serpilir. Bu yöntem, özellikle kendilenmiş bitkilerin elde edilmesinde başarıyla kullanılmaktadır. İzole edilen yumurtaların besi ortamında tozlanma ve döllemesinde; döllememiş yumurtaların toplanması, besi ortamında kültürlere alınması, dölleme kabiliyetine sahip polenlerle tozlanarak döllemelerini ihtiva eder. Besi ortamında tozlanma ve dölleme yönteminin kullanım alanları

a) Kendine uyumsuzluğun önlenmesi

b) Melezlemelerde uyumsuzluğun önlenmesi

c) Haploid bitkilerin elde edilmesi

d) Döllemenin fizyolojisinin araştırılması

e) Erkek veya dişı çiçeklerin olgunlaşmadan döküldüğü durumlarda tohum elde etmek

SOMAKLONAL VARYASYON

Besi ortamlarında kültüre alınan birçok kültür bitkisinde varyasyon belirlenmiştir. Somatik kökenli hücrelerde meydana gelen a) kalıcılık arz eden (somaklonal) ve b) kalıcılık arz etmeyen (epigenetik) varyasyon tespit edilmiştir.

Somaklonal varyasyonlar; a) nokta mutasyonları, b) kromozom düzensizlikleri, c) kromozomlardaki kopmalar ve d) katlanmalar veya ters dönmeleri ihtiva eder.

Somaklonal varyasyon ile mutasyon arasındaki farklılıklar

a) Somaklonal varyasyonların frekansı, mutagenler ile oluşturulan mutasyonların frekansından daha yüksektir.

b) Mutasyonlar genel olarak dominanttan resessife doğru olup, dominant mutasyonların frekansı, somaklonal varyasyonlardan daha düşüktür.

c) Haploid bitki kültürlerinde ortaya çıkan somaklonal varyasyonlar hemen gözlenebilmesine karşılık, mutasyonla ortaya çıkan değişiklikler genel olarak ileri generasyonlarda gözlenebilirler.

d) Kontrollü koşullar altında olması nedeniyle çevre faktörlerinin baskısının ortadan kaldırıldığı için somaklonal varyasyonların besi ortamındaki seleksiyonu, mutasyonların seleksiyonuna göre daha avantajlıdır.

Somaklonal varyasyonların, bitki ıslahındaki kullanım alanları

1) Özel bir karakterin eksik olduğı bitki çeşidinin veya klonun kültürü yapılır.

2) Hücre kültürü ile muhafaza edilen genetik materyallerde varyasyonlar ortaya çıkabilir.

3) Hücre kültürleri çeşitli işlemlere tabi tutulduktan sonra gerekli testlerden geçirilir, avantajlı bulunanlar çoğaltılır veya yeni çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılabilir.

SOMATİK HÜCRE MELEZLEMESİ VE PROTOPLAST KÜLTÜRÜ

Somatik hücre melezlemesi; iki protoplastın çekirdek, sitoplazma veya her ikisinin de birbiri ile belirli oranlarda bir araya getirilmesi ile bunlardan besi ortamında melez bitkilerin elde edilmesini

Somatik hücre melezlemesinin bitki ıslahındaki kullanım amaçları

1) Melezlemeden sonra tohum elde edilemediğı şartlarda, tohum oluşturan melez formların elde edilmesi

2) Kromozomlar katlanarak poliploid bitkiler elde edilemediğı durumlarda, poliploid bitki elde etmek

3) Eşeyli üreme sisteminde, eşey organlarından kaynaklanan problemlerden dolayı eşeyli üremenin aksaması durumunda melez dölleri elde etmek

4) Her iki ebeveynin, hem somatik hem de genetik materyallerini döllere aktarmak

5) Özellikle türlerarası melezlemelerde, yabancı türlerden kültür çeşitlerine, gen aktarımının mümkün olmadığı durumlarda gen aktarımını sağlamak

6) Generatif devreye ulaşması uzun zaman alan bitkilerde, daha erken dönemde melezleme yapmak

Protoplast Elde etmek için; a) yaprak mezofili, b) embriyogenik hücreler, c) henüz olgunlaşmamış bitki doku ve organları, d) meristematik hücreleri ihtiva eden dokular, e) kalluslar ve hücre çözelti kültürleri kullanılmaktadır.

Melezleme yapmak için türlerin saf protoplastları karıştırılır. Ancak protoplastlar negatif yüklü olduklarından bir araya gelemesler. Protoplastların bir araya gelmelerini sağlamak için ortama pozitif iyonlar verilir.

Protoplast Kültürü; kimyasal maddelerle muamele edilen doku ve organların hücre duvarlarının parçalanması ile ayrılan protoplastların, besin ortamında kültüre alınmasını kapsayan tekniktir.

Hücre duvarı; a)monokotiledon bitkilerde %20 seluloz, %35-65 hemiseluloz ve %35 pektinaz ve b) dikotiledon bitkilerde %20-30 seluloz, %25-30 hemiseluloz ve %35 pektinaz içerir. **Hücre duvarı;**monokotiledon bitkilerde seluloz, dikotiledon bitkilerde seluloz ve pektinazemzimleri ile parçalanır.

Protoplastları elde edilecek olan bitki materyalleri;Mannitol, şeker ve hücreler arasındaki bağları ayırmak için başlangıçta plazmolize sebep olan ozmotik iyonlar ihtiva eden ortamda bir süre bekletilirler. Sürenin sonunda protoplast hücreleri, filtre edilerek, enzim ve doku parçalarından arındırıldıktan sonra, enzim ihtiva etmeyen çözelti ile yıkanılır ve besin ortamlarında kültüre alınırlar.

Protoplast kültürü;

- a) somatik hücre melezlemesi
- b) besi ortamında seleksiyon
- c) gen transferi
- d) poliploid bitkilerin elde edilmesinde kullanılmaktadır.

Gen Transferi; bir verici bitkiden türünden, özel genetik bilgi ile kodlanmış DNA parçasının, alıcı bitkiye, araçlar kullanılarak veya direkt aktarılmasını ihtiva eder.Bitki hücre duvarı, yabancı DNA'nın transferinde çok önemli bir engeldir. DNA transferinde bu engeli aşmak için aracı organizmaların (*E. coli* ve *A. tumefaciens* gibi), DNA çemberleri (plazmidlerinin) kullanılır.Bazı bitkilerde, aracı organizmaların, gen transferinde tatmin edici sonuç vermemesi nedeniyle direkt transfer yöntemleri kullanılmaktadır.

Gen transferinde kullanılan direk yöntemleri

a) Protoplastmaya transferde kullanılan yöntemler

- I. Kimyasal
- II. elektroporasyon
- III. Lipozonlar

b) hücre ve dokulara transferde kullanılan yöntemler

- I. Biyolojik
- II. mikro enjeksiyon
- III. elektroforez ve mikrolazer
- IV. çimlenmekte olan polenlerin veya izole edilen embriyoların, aktarılabak DNA çözeltisi ile muamele edilmesi
- V. tozlanmanın ardından kesilen stigma yüzeyine DNA uygulanması
- VI. polen tüpü yoluyla ve fiberler aracılığıyla gen transferi
- VII. ses dalgalarının hücreler arası ve hücre zarında boşluklar açmasıyla bu boşluklardan DNA parçalarının hücreye girmesinden oluşan sonikasyon yöntemi
- VIII. soldurulan dokuların aktarılabak DNA çözeltisi içinde yeniden su aldırılmasını ihtiva eden desikasyon yöntemi

Kombine edilmiş DNA tekniğı ile transfer yöntemi; mikroorganizmalar kullanılarak geliştirilmiş olup 1975 yılında S. N. Cohen tarafından açıklanmıştır.

Bakteri modelinde; *E. Coli* bakteri türünün DNA'sı bir aracı (vektör) gibi kullanılmıştır. Bakteri hücrelerinden DNA molekülleri izole edilir ve bir enzimle belirli bir yerinden kesilir. Üzerinde durulan ve transfere konu olan genetik bilgiyi taşıyan DNA parçası, bakteri DNA'sındaki kesilen kısma bağlanır. Bir enzim vasıtası ile bakteri DNA'sının dairesel yapısı yeniden tamamlanır.

Protoplastlara gen aktarımı yönteminde; gen aktarılabak olan protoplastlar hücre çözelti kültürü, kallus kültürü ve farklılaşmamış bitki dokularından izole edilir. Bu yöntemin tercih edilmesinin sebepleri:

a) hücre duvarlarının parçalanmasında enzimlerin kullanılması nedeniyle dokuların zarar görür ve bu sayede rejenerasyonun artar.

b) hücrelerin DNA molekülü ile temasının kolay olması nedeniyle transgenik bitki elde etme şansı artar.

c) DNA transferinde aracı kullanılmadığından, aracıdan kaynaklanan problemlerin ortadan kalkar.

Kimyasal yolla gen aktarımında, hücre içi ozmotik basınç ve hücre dışı ozmotik basınç dengesinden yararlanılır. Hücreler; polietilen glikol, polivinil alkol veya kalsiyum fosfat ile muamele edildiklerinde, geçirgenlikleri artar. Muamele esnasında, ortamda bulunan transfer edilecek DNA parçası, geçirgenliği artan hücre zarlarından, hücreye geçer. Elektroporasyon sisteminde; yabancı DNA parçasının da içinde bulunduğu protoplast çözeltisinin bulunduğu ortama yüksek voltajlı elektrik uygulanır. Bunun sonucu hücre zarının geçirgenliği artar ve mikroporlar oluşur. Bu mikroporlardan, transfer edilecek DNA parçası, hücre içerisine girer.

Bu yöntemlerden biyolistiklerle gen transferinde; mikro ateşleyici haline getirilmiş olan vektör DNA bitki hücrelerini hücre duvarlarını ve hücre membranlarını geçebilecek bir hızla hedef hücrelere fırlatılır. Biyolojik yöntemi; özellikle bakteri sistemi ile gen transferinin yapılamadığı bitkilerde başarı ile uygulanmaktadır. Ayrıca; kullanımının kolay olması mikro taşıyıcıların çok sayıda hücreye DNA parçalarını taşıyabilmesi başta bitki organları olmak üzere meristem dokulara, kalluslara, primitif embriyolara ve mikrosporlara uygulanabilmesi sayesinde yoğun olarak kullanılmaktadır.

Mikro enjeksiyon tekniği; doğrudan gen aktarımı sağlayan sistemler içinde en emin olarak hücrenin istenilen bölümüne DNA'nın transferini sağlar. Bu sistemde; aktarılabilecek olan DNA'nın çözeltisi mikro pipetler yardımı ile

- a) protoplastlara,
- b) izole edilen hücrelere,
- c) meristem dokulara, d) kalluslara,
- e) zigot ve
- f) primitif embriyo dokularına eser miktarda aktarılır.

Biyoteknolojinin Bitki İslahında Kullanılabilirliği

Biyoteknolojik yöntemlerle elde edilen bitkiler, yüksek oranda genetik varyasyon ihtiva ederler. Bu varyasyonlar; a) doğal ve yapay melezleme, b) euploid ve aneuploid, c) doğal ve yapay mutasyonlar ile ortaya çıkan varyasyonlara ilave olarak gen havuzunun genişletilmesi bakımından ıslahçılara kullanabilecekleri yeni olanaklar sağlar. Ayrıca; özel bir genotipin doku kültürü ile çoğaltılabilmesi, günümüzde kullanılsa bile gelecekte kullanılma potansiyeli bulunan önemli bir genetik materyalin güvenli bir şekilde muhafaza edilmesine de olanak sağlar.

Başarılı uygulamalarının yaygınlaştırılması ve bitki ıslahında yeni gelişmelerin potansiyelinin belirlenmesi için önemli araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmaların neticesinde, yakın zamanda birçok gelişme olmuştur. Bu gelişmelerden en önemlisi mevcut ekilen bitki çeşitlerine göre birçok karakter bakımından üstün özelliğe sahip, transgenik bitkilerin ekim alanının çok fazla genişlemesidir. Ancak; bu alanda elde edilen başarıların, en azından şimdilik, çok sınırlı kalmış olduğu anlaşılmaktadır. Geliştirilecek olan çok yönlü ve bütün bitkilerde rutin olarak kullanılabilecek, daha ucuz ve güvenli biyoteknolojik yöntemler, bitki ıslahı alanında önemli katkılar sağlayabilir.