

Doku Kültür Yöntemleri ve Bitki Islahında Kullanım Olanakları

Aydın TÜRKEÇ*
Z. Metin TURAN**

ÖZET

Son yıllarda, tarım ve endüstride geniş ölçüde uygulama alanı bulunan doku kültür teknikleri, bitkiyle ilgili birçok sorunun çözümüne olanak sağlayan bir sistem haline gelmiştir.

Doku kültürü klasik ıslah yöntemlerinden farklı olarak bitkinin çeşitli kısımlarından alınan küçük parçaların, steril gıda ortamında ve uygun çevre koşullarında kültüre alma işlemidir.

Bugün için, doku kültür yöntemlerinden olan embriyo kültürüyle türler ve cinsler arası melezleme sorunlarının çözümü, anter kültürüyle haploid bitki eldesi, meristem kültürüyle virüssüz bitki eldesi, protoplast kültürüyle somatik hibridizasyon çalışmaları başarılmıştır.

Ne var ki, teknikteki son gelişmeler zaman ve ekonomik açıdan büyük avantaj sağlarken kuvvetli bir populasyon geliştirme metodu olarak dikkati çekmemektedir. Teknik problemler kültürün her safhasında görülebilmektedir. Bu nedenle bitki regenerasyonu için daha çok çabaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Doku kültürü, embriyo kültürü, anter kültürü, haploidler, meristem kültürü, protoplast kültürü, somatik hibridizasyon.

* Araş. Gör.; U.Ü. Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü.

** Prof. Dr.; U.Ü. Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü.

SUMMARY

Methods of Tissue Culture and Their Usage Possibilities in Plant Breeding

In the recent years, techniques of tissue culture finding an extensive application area in agriculture and industry have become a system providing possibilities to the solution of many problems related with plant.

Being different than klassical plant breeding methods, the tissue culture is a kind of procedure obtaining tiny pieces form different parts of plant and culturing them in steril nutrient medium and available environmental conditions.

For today, some special problems of hybridization had been solved by using a few different tissue culture techniques. For instance, the embryo culture has been succesfuley used for the solution of inter-species and intergenus hybridization problems, the anther culture for obtaining haploid plant, the meristem culture for the production of virus free plant and the protoplast culture for somatic hybridization research.

Although recent advences in this technique provide great advantages in respect of time and economy, it takes atention as a strong method for population improvement. Technical problems appear in every stage of tissue culture. For that rcason, it needs a great deal of efforts for plant regeneration.

Key Words: Tissue culture, embryo culture, anter culture, haploids, meristem culture, protoplast culture, somatik hybridization.

GİRİŞ

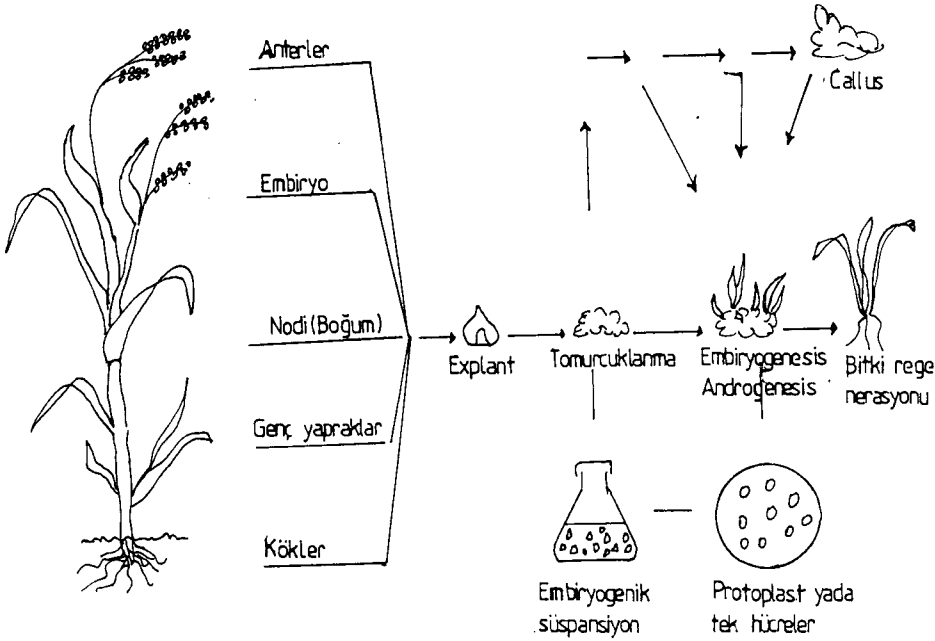
Geçmişten günümüze kadar ıslahçılar tarafından buğday, mısır, çeltik ve diğer tahıl türlerinde yapılan çalışmalarda, yüksek verim, kalitenin arttırılması, hastalıklara dayanıklılık ve diğer agronomik öneme sahip karakterlerin geliştirilmesi konusunda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, şu an ve gelecekte bile sürekli artan dünya popülasyonunun beslenme ihtiyacını karşılamak için daha çok çabaya ihtiyaç vardır. Günümüzde, belirtilen amaçlar doğrultusunda, klasik ıslah yöntemlerinde karşılaşılan sorunların çok olması, ıslahçıları ürün ıslahında yeni teknolojileri araştırmaya yöneltmiştir. Artık doku kültür yöntemleri ve rekombinant DNA teknolojisi sayesinde, yeni karakterleri daha kesin olarak kombin etmek, geniş popülasyonlardan istenilen özelliklere sahip nadir bulunan genotipleri selekte etmek ve ıslah hatlarına doğrudan gen transferi çalışmalarını rahatlıkla yapmak mümkün hale gelmiştir. Bugün için tek bir hücre, protoplast, polen tanesi ya da meristem dokusundan in vitro şartlarda bitki eldesi sorun olmaktan çıkmıştır.

Doku kültürü temel olarak yeni bitki meydana getirebilme kapasitesine sahip çok sayıda farklılaşmamış hücreleri yetiştirme sistemidir (Welsh, 1985). Diğer bir deyişle bitkinin çeşitli kısımlarında alınan küçük parçacıkların steril hale getirildikten sonra steril gıda ortamlarında kültüre alma işlemidir.

Doku kültür yöntemlerini genel olarak 5 grup altında incelemek mümkündür. Bu yöntemlerin kendine has özellikleri olmasına rağmen temelde hepsinde, kullanılan ve gerekli olan teknikler aynıdır (Gönülşen, 1987).

CALLUS VE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ

Doku kültürü genel olarak callus üretimiyle başlar. Callus organize olmamış hücreler yığınıdır (Gönülşen, 1987). Callus, yaprak, kök, sap dahil çok sayıda farklı doku tipinden elde edilebilir (Şekil: 1). Buğday, arpa, çavdar ve triticlede olgunlaşmış ya da olgunlaşmamış embiryo, hypocoty, kök ve sürgün apex'leri, olgunlaşmış ve olgunlaşmamış ve yaprak kını segmentleri, sap kısımları ve çiçekler, callus kültürü için explant kaynağı olarak kullanılabilir (Mad-dock, 1985).



Şekil: 1

Genel tahıl doku kültür şeması (Lörz, 1987)

Callus kültürünün değerli olabilmesi için callus hücrelerinin totipotent olması yani hücrelerin bütün genetik bilgilere sahip ve bütün organları farklılaşmış

bir bitki meydana getirebilme kapasitesine sahip olması gerekir. Callus çoğu zaman bitki türüne bağlı olarak, bitki hormon ve kimyasal maddelerinin uygun kombinasyonlarını içeren agar ortamında elde edilir (Welsh, 1985).

Callus kültürünün uzun süre devam ettirilmesi bazı kromozomal değişimlere neden olabilir. Bu değişimler, tekniğin bitki ıslahında kullanımında engel yatarsa da bu genetik varyasyon ıslah programlarında değerlendirilebilir (Gönülşen, 1987).

Bazı tahıl türlerinde Callus'dan bitki regenerasyonu başarılmıştır. Buğday, arpa, çavdar ve triticale kültürleri doku davranışı açısından şekerpancarı, mısır ve darılara nazaran daha az tepkili bulunmuştur. Bununla beraber bu bitkilerden elde edilen regenerant bitkiler arasında varyasyonlar görülmüştür. Bu varyasyonlar çoğunlukla morfolojik karakterlerde oluşmuştur (Maddock, 1985).

SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜ

Callus doku generasyonunu takiben hücreler birbirinden ayrılır ve sıvı gıda ortamına nakledilerek hücre süspansiyonları elde edilir (Şekil: 1). Her türlü hücre süspansiyonunda normal hücre çoğalmasına imkân sağlayan deneysel tekniklerle belirlenmiş kendine özgü çevresel koşullara ihtiyaç duyar. Bu devre sonunda potansiyel bireylerin sayısı ortaya çıkar (Welsh, 1981).

Uzun süreden beri biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalarda kullanılan süspansiyon kültürleri protoplast kültürü çalışmalarında hücrelerin izolasyonu içinde kullanılmaktadır.

Embriyogenik süspansiyon kültürleri bazı yem bitkisi türlerinde ve mısır, buğday, çeltik, triticale ve arpada elde edilebilmiştir (Lörz, Göbel, Brown, 1987). Ancak bu bitkilerde ilk alt kültür boyunca embriyogenik kapasite kaybolmakta ve süspansiyonlardan regene olmuş bitkilerde chlorophl eksikliği gibi somaklonal varyasyonlar görülmektedir.

EMBİRYO KÜLTÜRÜ

Embryo kültürü, embryonun yumurtalık içerisinde gelişmenin belirli bir devresinde izole edilerek gıda ortamında çimlendirilip geliştirilmesidir.

Kültürü yapılan bitkilerin yabancı türleri, kalite, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, stres, çevre koşullarına dayanıklılık ve male sterilité gibi önemli özellikler için genetik varyabiletinin yararlı hazineleridir. Kültürü yapılan çeşitlerde böyle özellikleri birleştirmek farklı ebeveynler arası melezlemeleri gerektirir. Bununla birlikte böyle melezlemelerde çeşitli melezleme sorunlarıyla karşılaşılır. Embryo ve endosperm arasındaki uyumsuzluklar, melez embryo absorpsiyonlarıyla sonuçlanan büyük problemlere neden olabilir. Böyle durumlarda embryo kültürü melezlenmesi zor olan türler ve cinsler arası melez elde edilmesinde başarılı olarak kullanılabilir (Vasiljevic, 1989).

Ayrıca embriyo kültüründen dermansinin kırılması ve erken çimlenme sorunlarının çözümünde de yararlanılmaktadır (Kott ve Kasha, 1985).

Genel olarak tahıllarda embriyo kültürü 3 önemli uygulama alanına sahiptir (Kott ve Kasha, 1985).

1- Haploid bitki üretimi,

2- Tür ve cinslerarası melezlemelerde yaşamayan embriyoların kullanılması,

3- Totipotent hücre kültürü için explant kaynağı olarak kullanılabilir.

1- Haploid bitki üretimi: Haploid bitki üretimi için, Bulbosum metodu, embriyo kültüründe uzun zamandan beri ve özellikle arpa ıslahında kullanılmaktadır.

2- Türler ve cinslerarası melezlemeler: Tahıl tohumları arasında yeni ve yararlı agronomik karakterleri belirlemek için geniş ölçüde hyridizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Burada başarı derecesi bunların birbirleriyle ilişkilerine ya da melezleme uygunluğuna bağlıdır. Embriyo kültürü geniş hizridizasyon çalışmalarında düzenli olarak kullanılmaktadır. Arpada, interspesifik hyridleri bulmak için kullanılmıştır ve bu sayede soğuga ve mildiyöye dayanıklılık gibi özelliklerin aktarılmasına çalışılmıştır (Kott ve Kasha, 1985).

Cinslerarası melezlemelerin amacı, hyrid üretiminden genum ilişkisini anlamak ve istenilen amaca uygun tohum üretmek olduğu kadar, sitogenetik çalışmalarda yararlanmaktır. Birçok tahıl türünde bu amaç için çalışmalar yapılmıştır. Örneğin Hordeum x Triticum, Hordeum x Secale, Triticum x Secale, vs. melezleri elde edilmiş ve istenilen tipte varyasyonun yakalanmasına çalışılmıştır (Kott ve Kasha, 1985).

3- Explant kaynağı olarak: Olgunlaşmamış embriyolar tahıllarda ayrıca callus regenerasyonu için kaynak oluşturur. Bu da seleksiyon çalışmalarında özel orana sahip regenerantların bulunmasında, seleksiyon için varyabilite kaynağı sağlanmasında kullanılmaktadır (Kott ve Kasha, 1985).

ANTER KÜLTÜRÜ

Genel olarak haploid bitki ıslahı için kullanılan anter kültürü, bir bitkiden elde edilen olgunlaşmamış anterlerden bitki regenerasyon yöntemidir (Dunwell, 1985).

Günümüzde anter ya da polenlerin in vitro kültürüyle üretimi ıslahçı ve genetikçiler arasında büyük bir ilgi yaratmıştır. Bunun nedenleri ise genel olarak;

1- Haploidlerde dominant etkilerin yokluğu genetik çalışmaları kolaylaştırmaktadır ve böylece resesif allellerin kısa zamanda teşhis ve değerlendirme potansiyeli ortaya çıkar (Goral, 1990).

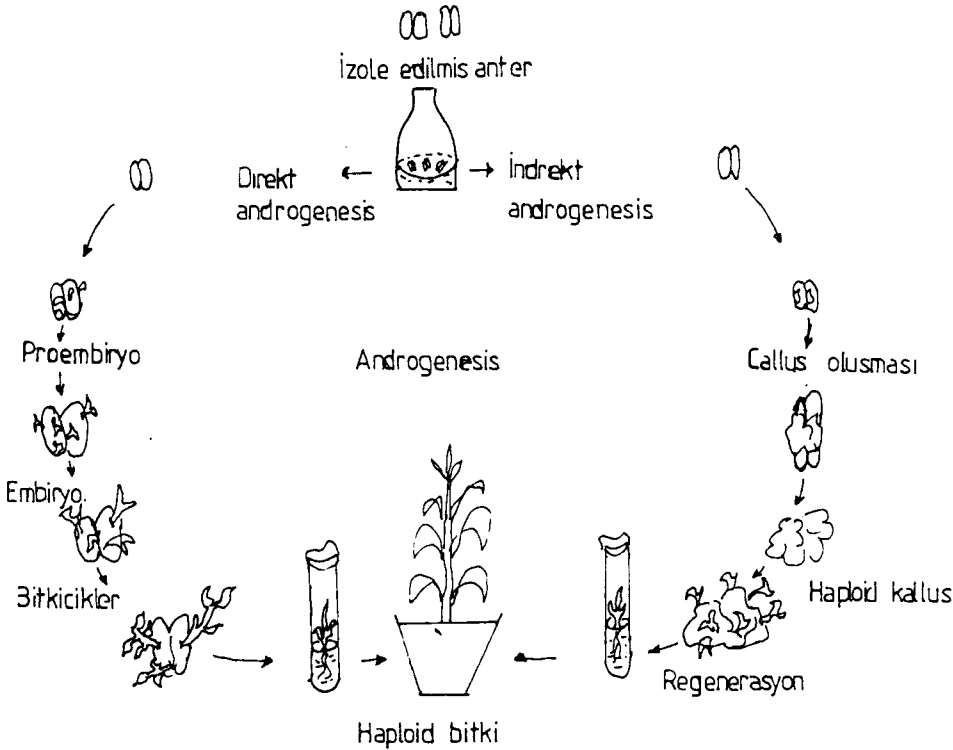
2- Yapay olarak kromozomların iki katına çıkarılmasıyla homozigot bitkilerin eldesi mümkündür. Bitki ıslahında oldukça önemli olan bu inbred hatların zamandan bağımsız olarak kısa sürede elde edilmesi mümkündür (Dunwell, 1985).

Böylelikle kendine uyumsuz bitkilerde dahi kısa zamanda homozigot hat eldesi mümkün olmaktadır. Ayrıca haploidlerin X ışınları gibi konvensiyonel mutagenlere maruz bırakılmasıyla genetik varyabilite yaratılması da mümkündür. Bu da istenilen mutantların seçimi ve yeni varyetelerin geliştirilmesine imkân sağlamaktadır (Dunwell, 1985).

Anter kültürüyle haploid bitki eldesi başlıca iki yolla olmaktadır (Şekil: 2) (Gönülşen, 1987).

1- Direkt androgenesis: Mikrospor bir zigot gibi davranarak in vivo'daki değişim embriyolojik devreleri geçirir. 4-8 haftada bitkicik oluşur.

2- İndirekt androgenesis: *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Brassica* gibi türlerde embriyogenesis yerine mikrospor bölünerek kallus dokusu oluşturur. Callus aynı ya da farklı gıda ortamlarında farklılaştırılarak, embryo kök ve sürgün oluşturur (Organogenesis).



Şekil: 2

Anter kültürü yoluyla haploid bitkilerin oluşması (Gönülşen, 1987)

Anter kültürü çoğu gramine türlerini kapsayan 200'ün üzerindeki bitki türünde uygulanmış, bunlardan ya haploid bitki ya da callus ya da yalnızca küçük embriyoid formları elde edilmiştir. Tahıl türlerinde anter kültürüne gösterdikleri tepki açısından da farklılıklar vardır. Tepki gösteren anterlerin en yüksek yüzdesi buğdayda % 87, çeltik % 67, çavdar % 43, mısır % 17, arpa % 1 olarak bulunmuştur (Dunwell, 1985).

MERİSTEM KÜLTÜRÜ

Bitkide meristem doku bölünebilir hücrelerin oluşturduğu dokudur. Bitkide bulundukları bölgelere göre meristem dokular apical (uç), interkalar (ara) ve lateral meristem olmak üzere üç grup altında toplanabilmektedir (Gönülşen, 1987).

Meristem kültürü çalışmalarında çoğunlukla uç meristemler kullanılır. Uç meristemden meydana gelen küçük sürgün uçlarından aseptik kültür ortamında bitkicik eldesi mümkündür (Kyte, 1983). Meristem kültürünün esası da uç meristemin birkaç yaprak taslağıyla izole edilip uygun gıda ortamına yerleştirilmesidir (Gönülşen, 1987).

Meristem kültürünün birçok uygulama alanı vardır.

Meristem kültürü çoğunlukla virüssüz bitki eldesi için kullanılmıştır. Virüs yoğunluğu bitkinin büyüme noktalarına gidildikçe azalmaktadır. Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte üç meristemin virüsten daha hızlı bölünmesinden kaynaklandığı sanılmaktadır (Dale ve Webb, 1985).

Meristem kültürünün diğer bir kullanım alanları vejetatif olarak muhafaza ve mikro üretilerdir. İslah çalışmaları için bazı bitkilerin muhafaza ve çoğaltımına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bitkilerden bazıları; haploid bitkiler, steril mutantlar, erkek steril hatlar, tohumla çoğalmada kaybedilen nadir kromozom kombinasyonları, aneuploid ve diğer bitkiler, özel heterozigot kombinasyonlu bulunması zor, hibrid genotiplerdir. Bu gibi bitkilerin tarlada yetiştirildiğinde hastalıklara karşı dayanıksız ve muhafaza zor olmaktadır. Ayrıca yaşam süresi sınırlı olan bu bitkilerin uzun süre muhafazası şarttır (Dale ve Webb).

Vejetatif olarak uzun süre muhafazada, 2-4 cm ulaşan bitkicikler 2-4°C sıcaklık ve düşük ışık intensitesi altında yeni kültür kaplarına alınır. Bu koşullar altında minimum büyüme gerçekleşir ve başka bir kültür kapına gerek duyulmadan bitkicikler 2-3 yıl canlı kalabilmektedir. İhtiyaç duyulduğunda bitkiler yeni kültür kaplarına alınır ve 25°C sıcaklık ve yüksek ışık intensitesi altında yetiştirilir.

Meristem kültürüyle binlerce bitki kısa sürede zamandan bağımsız olarak elde edilebilmektedir.

PROTOPLAST KÜLTÜRÜ

Son yıllarda, doku kültür tekniklerinden biri olan protoplast kültüründeki gelişmeler bitki ıslahında yeni olanaklar yaratmaktadır.

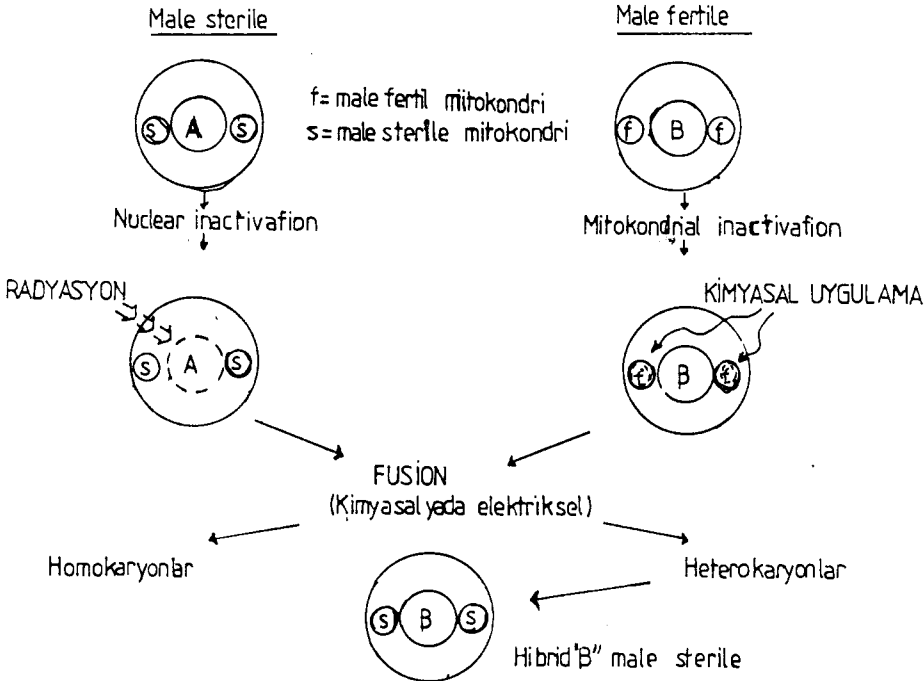
Protoplast adı verilen hücre duvarı çeşitli enzimlerle (macerozyme, cellulase, driselase) yıkılan hücreler birçok bitkinin değişik organlarından, özellikle yaprak mezofil hücrelerinden elde edilmekte ve kültüre alınmaktadır (Jones, 1985).

Protoplast kültürü daha çok nicotiana, petunia, solanum gibi solenaceous familyasına ait türlerde uygulanmaya başlanmış, fakat tahıl türlerinde ise henüz gelişme aşamasındadır (Chung, 1986).

Hücre ıslahında, DNA transferinde ve somatik hyridizasyonda önemli engel teşkil eden hücre duvarının enzimlerle yıkılmasıyla sexual melezlemedeki sorunları devre dışı bırakacağı ümit edilen protoplast fizyonu ile yeni melez hücreler elde edilebilmektedir.

Protoplast füzyonunun bitki ıslahındaki rolü sadece sexual melezleme yöntemlerinde karşılaşılan melezleme sorunlarını ortadan kaldırmak değil, aynı zamanda stoplazma içindeki hücre organellerinin (kloroplast, mitokondri, plazmid) üzerinde bulunduğu bilinen bazı karakterlerin (erkek sterillik, antibiyotik, herbisit ve hastalıklara dayanıklılık vs.) stoplazmaların birleşmesi anında melez hücreye aktarılabilenmektedir (Chung, 1986).

Şekil 3'de protoplast füzyonu ile cytoplasmik kısırlığın aktarımı görülmektedir (Cocking, 1990).



Şekil: 3

Protoplast fusionu ile sitoplazmik erkek kısırlığının transferi

Tahıl protoplast kültürleri, hernekadar regenere embiryoid ve bitkicik oranları sınırlı ölçüde başarılıymışsa da, callus aşamasına kadar çoğu tür de başarılıdır. Tahıllarda genelde kültür koşullarında yaşayan protoplastlar sonradan totipotensi özelliklerini kaybetmektedir (Lörz, 1987).

Protoplast kültürü açısından tahılların gösterdikleri tepki de farklı olmaktadır. En çok tepkili olandan en aza doğru, Pannicum, Pennisetum, Saccharum, Sorghum, Zea, Oryza, Triticum, Triticale, Hordeum şeklinde sıralanmaktadır. Tahıllardan bu tepkinin neden düşük olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte hücre duvarının kaldırılması, ozmatik şok doku kültür ortamı ve kromazomal değişikliklerden kaynaklandığı sanılmaktadır (Jones, 1985).

SONUÇ

Bütün ıslah programları generasyon devri ve populasyon büyüklüğü olmak üzere iki ciddi problemle sınırlanmıştır. Tek yıllık bitkilerde bile ıslahçılar generasyon süresini azaltmak ve sera, kışlık ve yazlık alternatif yetiştirme yerleri kullanarak programlarını hızlandırmak için sürekli çalışmaktadırlar (Welsh, 1981).

Bunun yanında bitki ıslahında amaç, hastalık ve zararlılara dayanıklı, değişik çevre koşullarına tolerant, yüksek verimli kültür bitkileri geliştirerek insanlığın yararına sunmaktır. Bu amaçlara ulaşmak için yapılan ıslah çalışmalarında populasyonda geniş bir genetik değişkenliğin olması şarttır. Islah çalışmalarının bilinçli olarak kullanılmasından bu yana bitki ıslahçıları doğal olarak bulunan genetik değişkenlikten yararlanmışlardır. Ancak günümüzde bu tür çalışmalarda gene bir genetik değişkenliğin bulunması ve bunların ıslahta kullanılması zorunlu hale gelmiştir (Welsh, 1981).

Doku kültür teknikleri bitki ıslahı ve geliştirme programlarında, gerek zamanın kısaltılması ve gerekse genetik değişkenliğin yaratılması gibi daha birçok değişik amaçlar için kullanılabilinmektedir.

Kısaca açıklanmış olan bu doku kültür teknikleri zaman ve ekonomik açıdan büyük avantaj sağlarken kuvvetli bir populasyon geliştirme metodu olarak dikkati çekmemektedir.

Teknik problemler doku kültürünün her safhasında görülebilmektedir. Bu nedenle regenerasyon için daha çok çabaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte henüz gelişme aşamasında olan bu tekniklerin gelecekte insanlar için büyük avantaj sağlayacağı kesindir.

KAYNAKLAR

CHUNG, J.D., 1986. Protoplast techniquies in Tissue Culture, ASPAC Tecnical Bulletin 10: 112.

- COCKING, E.C., 1990. All Sorts of Plant Genetic Manipulation, Genetic Engineering of Crop Plants 1: 4-5.
- DALE, P.J. and WEBB, K.S., 1985. Germplasm Storage and Micropagation. Cereal Tissue and Cell Culture 3: 80-94.
- DUNWELL, J.M., 1985. Anter and Ovary Culture, Cereal Tissue and Cell Culture 1: 1-30.
- GORAL, S., VASILJEVIC, L., BRAR, D.S., 1990. Anter Culture, Plant Biotechnology and Sunflower Improvement, s. 601.
- GÖNÜLŞEN, N., 1987. Bitki Doku Kùltürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları, T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Ege Tarımsal Araştırma Ens. Müdürlüğü, Yayın No: 78, Menemen, İzmir.
- JONES, M.G.K., 1985. Cereal Protoplast, Cereal Tissue and Cell Culture 7: 217-218.
- KYTE, L., 1983. Plants From Test Tubes 4: 66-67.
- KOTT, L.S., KASHA, 1985. Embryo Culture and Haploid Plant Production 2: 46-68.
- LORZ, H., GOBEL, E. and BROWN, P., 1988. Advances in Tissue Culture and Progress Towards Genetic Transformation of Cereals. Plant. Breeding 4-22.
- MACDOCK, S.E., 1985. Cell Culture, Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Wheat, Barley, Oats, Rye and Triticale, Cereal Tissue and Cell Culture 5: 132-160.
- WELSH, R., 1981. Fundamentals of Plant Genetics and Breeding 19: 255-259, Breeding with Tissue Culture.
- VASILJEVIC, L., 1989. Embryo Culture, Use of Biotechnology in Sunflower Breeding, 1987 and 1988 Progress Report.