

5. DERS – EMBRİYO KÜLKÜRÜ, PROTOPLAST KÜLTÜRÜ, SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ

EMBRİYO KÜLTÜRÜ

Bitkilerin tohumlarından ya da tohum taslaklarından embriyoların aseptik koşullarda izole edilerek yapay besin ortamları üzerinde kültüre alındığı in vitro tekniktir.

Embriyo kültürü tipleri;

- 1- Olgun tohum embriyolarının kültürü
- 2- Olgunlaşmamış erken bölünme fazındaki proembriyoların kültürü

Embriyo Kültürünün Kullanım Alanları:

- 1- Biyolojik temel çalışmalarda,
- 2- Tohumun çimlenmemesi durumunda,
- 3- İslah süresini kısaltmada,
- 4- Yaşamayan embriyoların kurtarılmasında,
- 5- Haploid bitkilerin üretiminde,
- 6- Tohum canlılıklarının test edilmesinde.

Embriyo Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler:

- 1- Genotip
- 2- Embriyonun kültüre alındığı dönem
- 3- Besin ortamlarının bileşimi
- 4- Çimlenmeyi uyarıcı uygulamalar
- 5- İnkübasyon koşulları
- 6- Embriyoların izolasyonu

PROTOPLAST KÜLTÜRÜ

Bir hücrenin duvarı uzaklaştırıldıktan sonra kalan kısmına protoplast adı verilmektedir.

Aseptik koşullarda bir hücreden protoplastın izole edilmesi, daha sonra canlı protoplastta yeniden hücre duvarının oluşturulması, hücrelerin mitoz bölünme ile çoğaltılması ve bitki rejenerasyonunun sağlanması aşamalarını içeren in vitro teknik protoplast kültürü olarak tanımlanmaktadır.

Protoplast kültürü, **somatik melezlemelere** olanak sağladığı için bitki ıslahında önemli bir tekniktir. Bu teknik, genetik ve biyolojik sınırlamalar nedeniyle klasik yöntemler ile gen akışının sağlanamadığı kombinasyonlarda melezlemeye olanak sağlamaktadır. Ayrıca protoplastlar, **mutant izolasyonu**, **hücre zarından madde taşınımı**, **hücre organellerinin** (nükleus, kloroplast, mitokondri gibi) **izolasyonu**, **gen aktarımı** ile ilgili çalışmalarda da kullanılabilir.

Protoplast Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler

- 1- Eksplant:** Hızlı büyüyen, genç, sağlıklı doku veya hücreler yüksek kalite ve canlılıkta protoplast verirler. Protoplast kaynakları;
- Yaprak mezofil hücreleri (özellikle dikotiledon bitkilerde)
 - Embriyogenik kallus ve hücre süspansiyonları (özellikle monokotiledon bitkilerde)
 - Genç bitki dokuları (hipokotil, kotiledon gibi)

- Olgunlaşmamış bitki doku ve organları (embriyo, kotiledon, meyve kabuğu vb)
- Meristematik hücreleri içeren dokular (apikal, aksillar ve kök ucu meristemleri)
- Özel protoplast kaynakları (polen, sepal, petal, stoma hücreleri, yumru dokular gibi)

Yaprak mezofil hücreleri:

- Özellikle dikotiledonlar için daha uygun protoplast kaynaklarıdır.
- Klorofil içerirler ve bu nedenle somatik melezlemede renksel ayırimda avantaj sağlar.
- Genellikle homojen büyüklükte hücrelerdir.
- Protoplast kültürlerinde genç ve tamamen açılmış yaprakların mezofil hücreleri en uygundur.

- İzolasyon öncesinde yaprakların alt epidermisi soyularak uzaklaştırılmalıdır. Epidermis tabakası enzimlerin etki derecesini azaltmakta ve epidermal hücreler izolasyon sırasında uygun olmayan protoplast vererek kültür ortamını kirletmektedir.

- Yaprak ana damarları izolasyon öncesinde kesilerek uzaklaştırılmalıdır.
- Yıkama sırasında yüksek santrifüj hızı uygun değildir.

Embriyogenik kallus ve hücre süspansiyonları

- Monokotiledonlarda özellikle tahıllarda en fazla kullanılan protoplast kaynaklarıdır.
- Homojen ve stabil protoplast verirler.
- Hızlı gelişme ve bölünme yeteneğine sahiptir.
- Protoplast füzyonunda yaprak mezofil hücreleri ile birlikte kullanılırlar ve renksel olarak ayırım sağlarlar.
- Protoplast izolasyonu için en uygun materyal alma dönemi hücre ya da kallusun alt kültüre alınmasından 3-4 gün sonraki devredir.
- Uzun süreli kültürlerde genetik dengesizlikler ve varyasyonlar ortaya çıkabilmektedir.

2- Donör bitki ve eksplanta yapılacak ön uygulamalar:

- Protoplast kültürünün başarısında donör bitkinin gelişme devresi ve şartları, kültür ortamı komponentleri, sıcaklık, ışık rejimleri önemlidir.
- Donör bitki protoplast izolasyonundan önce bir süre (2-7 gün) alt kültüre alınmalı ya da serada yetiştiriliyorsa gübreleme vb. ile gelişimi hızlandırılmalıdır.
- Donör bitkinin eksplant alınmadan önce 24-48 saat karanlıkta inkübe edilmesi hücre turgor basıncını düşürmekte (depo nişastaları tüketilmekte) ve izolasyon daha kolay olabilmektedir. Soğuk uygulaması (4-48 saat 4-10°C) ya da soğuk+karanlık uygulaması ile plazma zarının lipid kompozisyonu değiştirilebilir, oksidasyona neden olan enzim konsantrasyonu azaltılabilir.

Enzimlerin zararlı etkisini azaltmak için önce yaprak dokuları 0.5-1 saat plazmolize edilmelidir.

Plazmolizasyon, hücrenin çok yoğun bir tuz ortamına konulmasının ardından plazma zarının hücre duvarından ayrılması ve hücrenin büzülmesidir. Plazmolizasyon izolasyon sırasında elektrolitlerin hücre içine sızmasını, enzimlerin sitoplazma içine girmesini ve ozmotik şoku engelleyebilmektedir. Plazmolizasyon solüsyonu, enzim solüsyonu ile aynı ozmotik basınca sahip olmalıdır.

- Kullanılacak dokular enzimlerin etkinliğini artırmak üzere kesilip parçalanmalıdır. Yaprakların alt epidermisi soyulmalı ya da soyma kolay yapılamıyorsa bir fırça ile epidermis parçalanmalıdır. Donör bitkinin yapraklar alınmadan önce 12-24 saat karanlıkta tutulması turgor basıncını düşüreceği için epidermisen soyulmasını kolaylaştırır.

3- Ozmotik koşullar ve plazmolizasyon

Ozmotik basıncı ayarlamak için hem izolasyon ve hem de kültür solüsyonuna çeşitli şekerler ilave edilir. Manitol, sorbitol, glikoz ve sakkaroz ya da bunların karışımları bu amaçla kullanılabilir. Dengeleyici olarak KCl, CaCl₂ gibi tuzlar da kullanılabilir.

Protoplast İzolasyonunda Kullanılan Enzimler

Hücre duvarı selüloz (%20-30), hemiselüloz (monokotiledonlarda %37-65, dikotiledonlarda %27-30), pektinlerden (monokotiledonlarda %5, dikotiledonlarda %35) oluşmuştur.

Protoplast izolasyonunda kullanılan enzimler genellikle selülaz (örn. Cellulase Onozuka R-10), hemiselülaz (örn. Hemicelluase) ve pektinaz (örn. Macerozyme R-10) enzim grubundandır. Enzimlerin kompozisyonu ve konbantrasyonu başarıyı etkiler.

İzolasyon işlemi 25°C sıcaklıkta, karanlıkta ya da düşük ışık yoğunluğunda (100-500 lüks), 3-20 saatte yapılabilir. İnkübasyon karışımı 30-60 devir/dakika'da bir çalkalayıcı üzerinde bırakılabilir.

İnkübasyon işleminden sonra saflaştırma işleminde en fazla kullanılan yöntemler;

- 1- Filtrasyon (100-30 µm),
- 2- Santrifüj (2-5 dakika, 75-100 devirli),
- 3- Filtrasyon + Santrifüj,
- 4- Daha yoğun bir çözelti üzerinde yüzdürme

Protoplast Füzyonu ve Somatik Melezleme

İki protoplastın çekirdek ve sitoplazmalarının birbiriyle birleşmesidir. Bu birleşme sonucu oluşan bitkiye somatik hibrit adı verilir.

Bir protoplastın çekirdek ve sitoplazmasının diğer bir protoplastın sitoplazması ile birleşmesi sonucu oluşan melez bitkiye somatik sibirit denir.

Füzyon kimyasal (PEG) ya da elektriksel yollarla gerçekleştirilebilir.

İzole edilen protoplastlar negatif elektrik yüküne sahip olduklarından bir araya gelmezler. Birbirleri ile temas edebilmeleri için ortama pozitif yüklü bir iyonun verilmesi gerekir. Bu amaçla en fazla Ca⁺⁺ kullanılır. Bu iyonlar füzyona sebep olmazlar. Füzyonun gerçekleşmesi için PEG (Polietilen glikol) (%10-50) ilave edilir. Böylece protoplastlar birbirine yapışır ve aralarında bir hücre zarı köprüsü oluşur ve füzyon gerçekleşir, heterokaryonlar oluşur.

Elektriksel füzyonda hücre membranı geriye dönüşümlü olarak parçalanır, membranın geçirgenlik ve iletkenliği artırılır.

Önce protoplastlar elektrolitsiz bir solüsyonda (%9-11 manitol, 0.5 mM CaCl₂.H₂O) karıştırılır ve birbirlerine dokunmalarını sağlayacak değişken (alternatif akım) bir elektrik akımı verilir. Her iki yönden protoplastlar birbirine yapışarak kısa zincirler oluşturur. Daha sonra solüsyona çok kısa aralıklarla (milisaniye) direkt elektrik akımı verilir. Bu işlem sonucu birbirine bitişik yerlerde plazma membranları parçalanır ve protoplastlar birbiri içine girer.

SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ

Primer Metabolitler

Bitkilerin temel fonksiyonları için ihtiyaç duyulan karbonhidrat, protein ve yağ gibi maddelerdir.

Sekonder Metabolitler

Bitkiler tarafından üretilen ancak temel fonksiyonlarında ihtiyaç duyulmayan diosgenin, kodein, morfin, atropin gibi maddelerdir.

SEKONDER METABOLİTLER: Bitkiler tarafından farklı stres koşullarına (kuraklık, tuzluluk gibi) uyum, çeşitli canlılara karşı (mikroorganizmalar, böcekler ve diğer canlılar) savunma ve biyolojik döngülerinde gerekli bir unsur olarak üretilmektedir.

Bu maddeler insanlar tarafından tıbbi ilaç, kimya, kozmetik, zirai mücadele ve gıda (tat ve koku verici olarak) alanlarında kullanılmaktadır.

Örneğin;

- İlaç sanayisinde emetin (amipli dizanteride), kinin (sıtmada), kodein (öksürükte);
- Gıda alanında kinin (acılaştırıcı), vanilin (koku verici), meyan (tatlandırıcı);
- Kozmetikte yasemin yağı, gül yağı, lavanta yağı;

- Zirai mücadelede piretrin, sinerin, nikotin (insiktisit).

Bitki Doku ve Hücre Kültürü ile Sekonder Metabolitlerin Üretimi

Doğadan toplama ya da kültürü sırasında karşılaşılan problemler, kalite ve verimdeki farklılıklar, arz-talep dengesinin korunabilmesi ve serbest üretim sorunları nedeniyle sekonder metabolitlerin ana bitkiden doğrudan elde edilmesi yerine bu bitkinin hücre ve dokularından in vitro koşullarda üretilmesi alternatif bir yol olarak öne sürülmektedir.

Alkoloidler, fenoller, flavonoidler, lignin, organik asitler, peptidler, steroidler ve türevleri, taninler, terpenler ve vitaminler bitki hücre kültürleri ile üretilen bazı doğal bileşiklerdir.

A- Farklaşmış ve organize olmuş kültürler ile metabolitlerin üretimi

- 1- Kök kültürleri: Örneğin, Solanaceae familyasında (*Datura* ve *Nicotiana* türlerinde), *Agrobacterium rhizogenes* ile Ri-DNA transferi sonrasında tüylü kök yapısının elde edilmesi ile piridin (nikotin, anatabin) ve tropan (atropin, skopolamin, hiyosiyamin) alkoloidlerin yüksek oranda in vitro koşullarda elde edilmesi.
- 2- Sürgün kültürleri: Örneğin, *Catharanthus roseus* bitkisinin sürgün ucu kültürlerinden indol alkoloidlerin (katharantin ve vindolin) yüksek oranda üretimi.
- 3- Somatik embriyo kültürleri: Örneğin, *Theobroma cacao* (kakao) bitkisinin embriyo kültürlerinden kakao yağının üretimi.

B- Farklaşmamış ve organize olmamış kültürler ile metabolitlerin üretimi

Bu kültürlerde sekonder metabolitlerin üretimi farklılaşmış kültürlerdeki kadar yoğun değildir. Bunun nedenleri:

- Sekonder metabolitlerin biyosentezinden sorumlu genlerin farklılaşmayan dokularda ifade edilememesi,
- Farklaşmamış kültürlerde sekonder metabolitlerin üretimi için gerekli substratın başka biyosentez mekanizmalarına kayması,
- Depo bölgeleri bulunmadığı için birikimin mümkün olmaması,
- Sentezlenen metabolitlerin hızlı yıkımı.

Farklaşmamış ve organize olmamış kültürler ile metabolit üretimi;

- 1- Kallus kültürleri : Örneğin, *Hyosyamus niger* kallus dokusundan hiyosiyamin metabolitinin üretimi.
- 2- Hücre süspansiyon kültürleri: Örneğin, *Catharanthus roseus* hücre kültürlerinde bazı alkoloidlerin (aymalisin ve serpentin) birikimi.

Süspansiyon Kültürlerinde Sekonder Metabolit Üretimini Etkileyen Faktörler

- 1) Bitkisel koşullar
- 2) Besin ortamının yapısı
- 3) İnkübasyon koşulları
- 4) Öncül maddeler (örneğin *Nicotiana tabacum*' da öncül madde olarak polifenoller için feniladenin'in; nikotin için ornitin'in kullanımı)
- 5) Elisitörler (Fitoaleksinin adı verilen savunma mekanizması kimyasalların üretilmesinde önemlidir)
- 6) Tutuklama (Büyümenin baskılanması, metabolitlerin üretimini artırabilmektedir)
- 7) Eşzamanlı kültürler
- 8) İki aşamalı kültürler

ELİSİTÖRLER: Özel sekonder metabolitler olan fitoaleksinler mikroorganizmalar tarafından infekte edildikten sonra bitkilerde birikmektedir. Bu bileşikler anti-mikrobal aktiviteye sahiptir. Bitkinin kimyasal bir savunmasıdır.

Bir patojen ya da patojenin hücre duvarı tarafından açığa çıkarılan bileşikler benzer bir etki verebilmektedir. Bunlar elisitörler olarak tanımlanır ve fitoaleksinin üretimini başlatan prosese sahiptir.

Patojen orijinli bileşiklerden başka UV radyasyon, soğuk, sıcak, etilen, fungusitler, antibiyotikler, ağır metaller ve yüksek tuz konsantrasyonları da ürün birikimini uyarabilen faktörlerdir.

Tablo. Hücre kültürlerinde elisitör uygulamasından sonra sekonder metabolitlerin üretimi ile ilgili örnekler

Elisitör	Bitki türü	Sekonder metabolit
<i>Phytophthora megasperma</i>	<i>Glycine max</i> Soybean	Glycollin
Fungal homogenate	<i>Ruta graveolens</i>	Acridone exosides
<i>Phytium aphanidermatum</i>	<i>Catharanthus roseus</i> Periwinkle	Strictosidine lactam Ajmaciline Tabersonine Lochnericine Catharanthine
<i>Botrytis</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Verticillium</i> <i>Altenaria</i> Arachidonic acid Chitosan Nigram	<i>Papaver somniferum</i> Opium poppy	Sanguinarine