

HAPLOİD BİTKİ ÜRETİMİ

Somatik hücrelerdeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitkiler denir. Haploid sayıda kromozoma sahip hücrelerde (polen/mikrospor veya megaspor) veya bu hücreleri içeren bitki kısımlarının (anter veya ovül) doku kültürü yoluyla elde edilen hücrelerinde veya rejenerantlarında yapılan kromozom katlanması sonucu homozigot bitkiler elde edilebilir. Bu tekniğe *in vitro* haploidi tekniği denir.

Haploid bitki üretimi

- Erkek gametten haploid uyartımı (Androgenesis)
 - Anter kültürü
 - Mikrospor kültürü
- Dişi gametten haploid uyartımı (Ginogenesis ve partenogenesis)
 - Ovül ve ovaryum kültürleri

ERKEK GAMETTEN HAPLOİD BİTKİELDE ETME (ANDROGENESIS)

In vitro kültüre alınan genç anterlerden haploidlerin basarıyla olusturulması ilk kez 1964 yılında *Datura stramonium* bitkisinde Guha ve Maheshwari tarafından gerçekleştirilmiştir. 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 çalışmalar yapılmış ve 25 familyaya ait 200 bitki türünde in vitro androgenesis tekniğinden basarılı sonuçlar elde edilmiştir.

ANTER KÜLTÜRÜNÜN YAPILIŞI

Henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler, anter kültürü için uygun başlangıç materyalidir.

Belirlenen aşamadaki anterleri bulunduran çiçek tomurcukları, yüzeysel dezenfeksiyon işlemine tabi tutulduktan sonra steril koşullarda tomurcukların içerisinden çıkartılan anterler, önceden hazırlanmış ve otoklavlanarak sterilize hale getirilmiş besin ortamlarının üzerine yerleştirilmektedir. 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.

Androgenesis direkt ve indirekt androgenesis olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kültürün 40. gününden sonra anterlerin içerisinde embriyolar çıkarak gözle görülebilir aşamaya 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

ANDROGENESİSİ 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.

GENOTİP

Anter kültüründe başarı, çok büyük bir oranda anterlerin alındığı bitkilerin genotipine bağlıdır. Şimdiye dek çalışılmış olan tüm bitki türlerinde; aynı kültür koşulları altında, anter yanıtları bakımından genotipler arasında büyük farklılıklar bulunmuştur. 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 BİTKİNİN YETİŞME KOŞULLARI

Donör bitkinin genotipi son derece elverişli olsa bile, mikrosporelerden in vitro koşullarda haploid embriyo uyarımını başarabilmek, bu bitkilerin yetiştirildiği koşullara da bağlıdır. Bitkilerin yetiştirildiği dönemdeki sıcaklık, ışık yoğunluğu ve günlük ısıtılma süresi, havadaki CO₂ 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 nispete 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
- ❖ floresans mikroskopu ve preparat hazırlanmasında buna uygun merkürük asit, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) gibi boyaların kullanılması
- ❖ **parafine gömerek kesit alma** ve bunun ardından preparatları hematoksilin veya metilen mavisi gibi değişik boyalarla boyama

ANTERLERE YAPILAN ÖN UYGULAMALAR

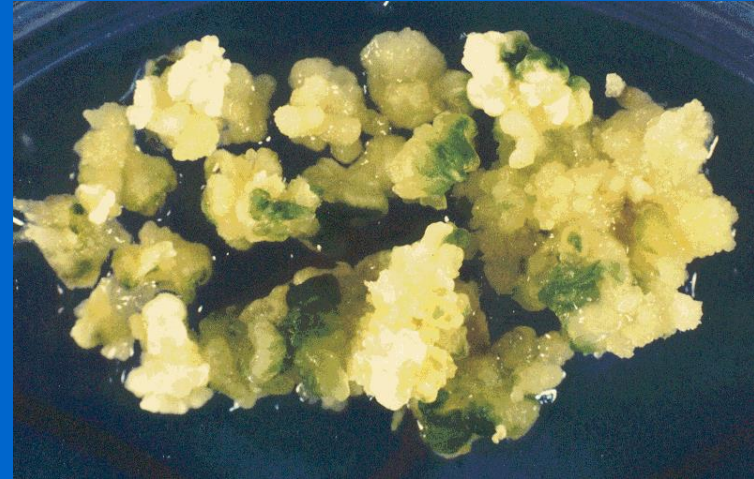
Anter kültüründe en etkili ön uygulama, tomurcuklara yapılan soğuk şoklarıdır. 4-10°C'ler arasında, 72 saat ile 4 haftaya kadar tutulan tomurcuklar; arpa, patates, mısır, buğday ve biber gibi bazı türlerde polen rejenerasyonu bakımından olumlu yanıtlar vermiştir.

Anter kültürlerinde soğuk uygulamasının etki mekanizması;

Nişasta birikiminin bloke edilmesi

Tek çekirdekli mikrospor döneminde tutuklanan mikrospor sayısının artırılması

Anter duvarının yaşlanmasının geciktirilmesi ve ABA gibi bazı engelleyici maddelerin etkisinin azaltılması



BESİN ORTAMININ BİLEŞİMİ VE YAPISI

Anter kültüründe ilk aşamada gametofitik dokuları uyaracak oksinler gerekli iken; bitkiciğe dönüşüm aşamasında sitokininlerin varlığına gereksinim duyulur.

Temel besin ortamı olarak, anter kültüründe en fazla Murashige ve Skoog, White ve Nitsch ortamları kullanılmaktadır.

Karbon kaynağı olarak çoğunlukla sakkaroz kullanılmaktadır.

Besin ortamına özellikle kültürün ilk günlerinde ilave edilen yüksek seker dozları (%6-12), anter kültüründen haploidlerin elde edilmesinde olumlu etki yapmaktadır.

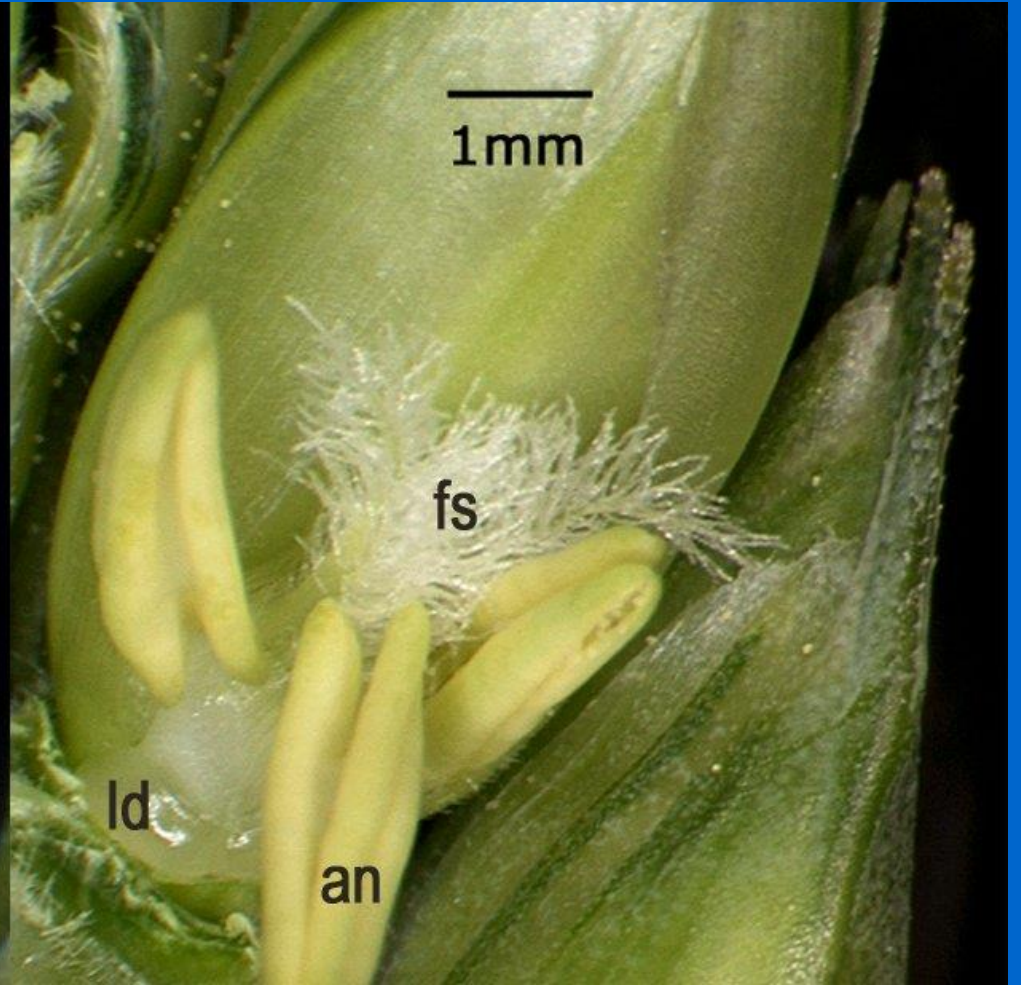
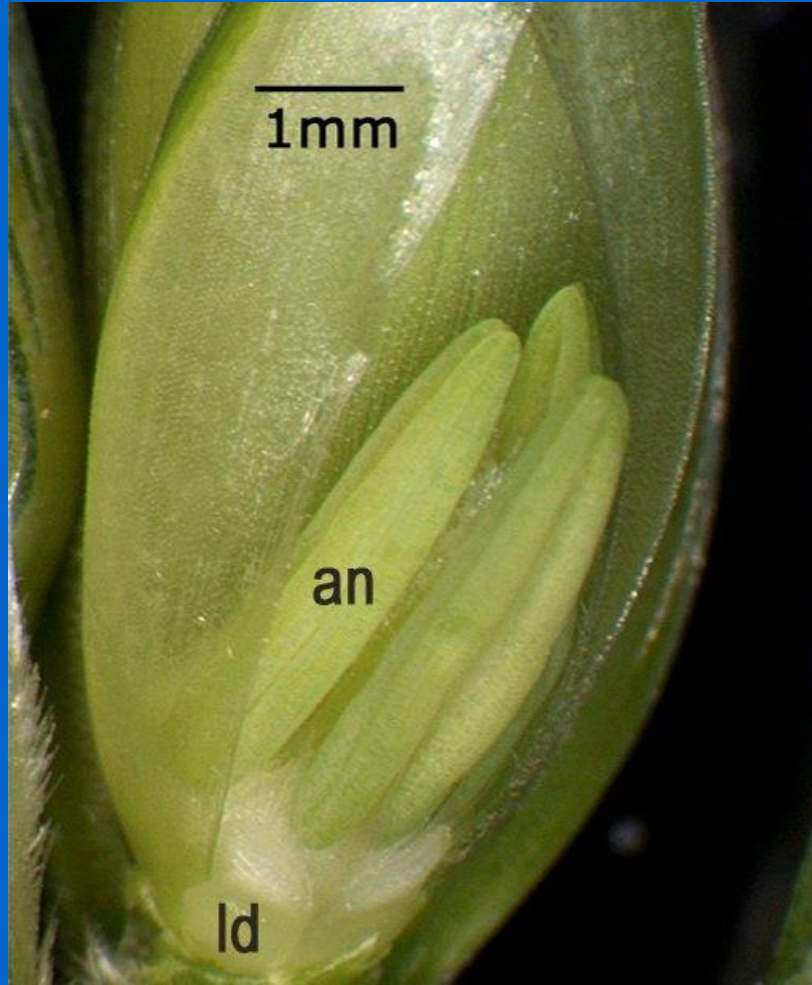
Besin ortamına katılan serin, glutamin gibi aminoasitler, AgNO₃ gibi etilen biosentezini inhibe edici maddeler veya aktif kömür gibi katkı maddeleri de anter kültüründen elde edilecek başarıyı artırma yönünde kullanılan çeşitli kimyasal maddeler arasında yer almaktadır.

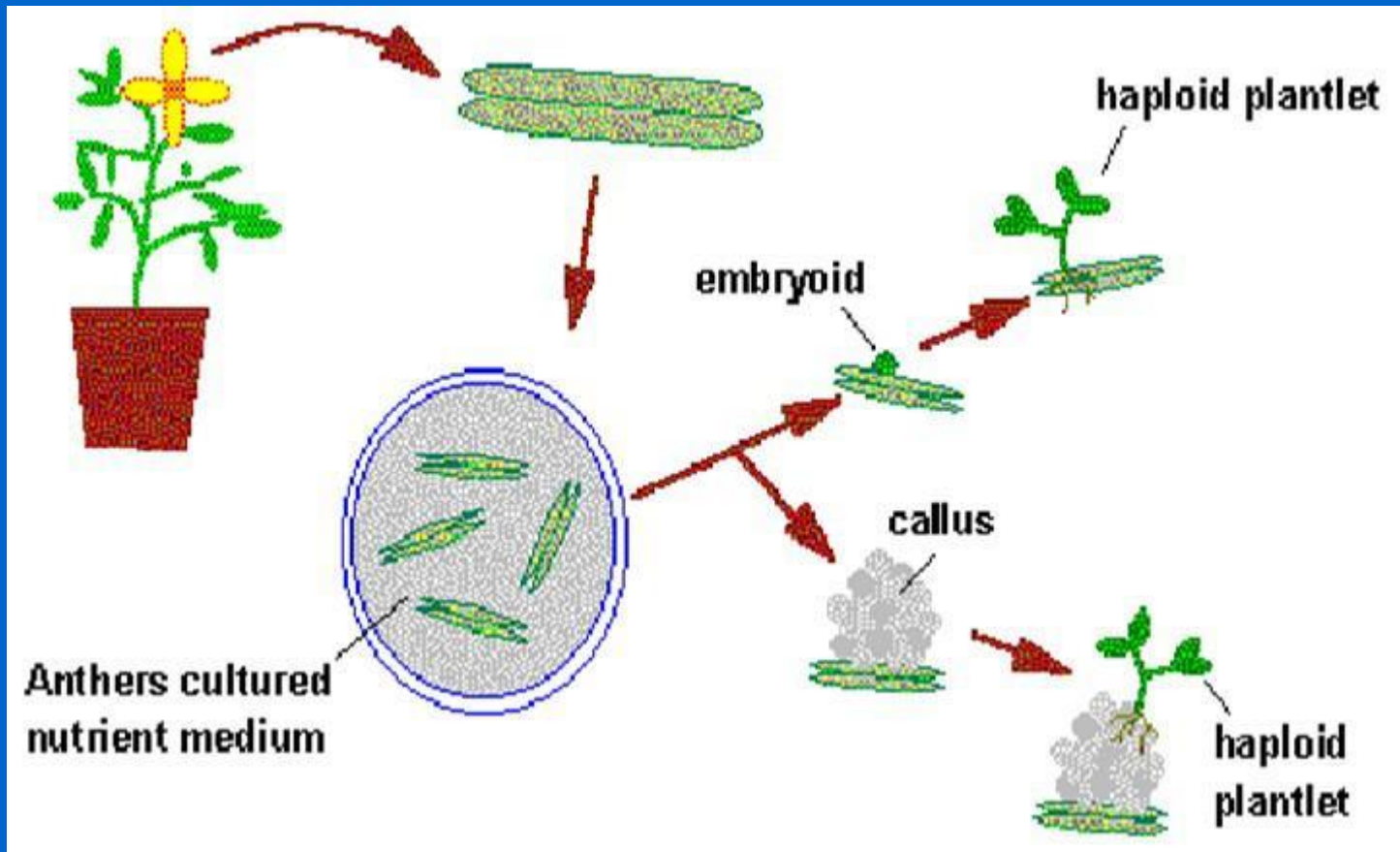
İNKÜBASYON KOSULLARI

İnkübasyon sırasındaki ısı, ya da sıcaklık gibi çevresel koşullar anter kültüründen sağlanacak başarı üzerinde etki yapan diğer bir grup faktördür.

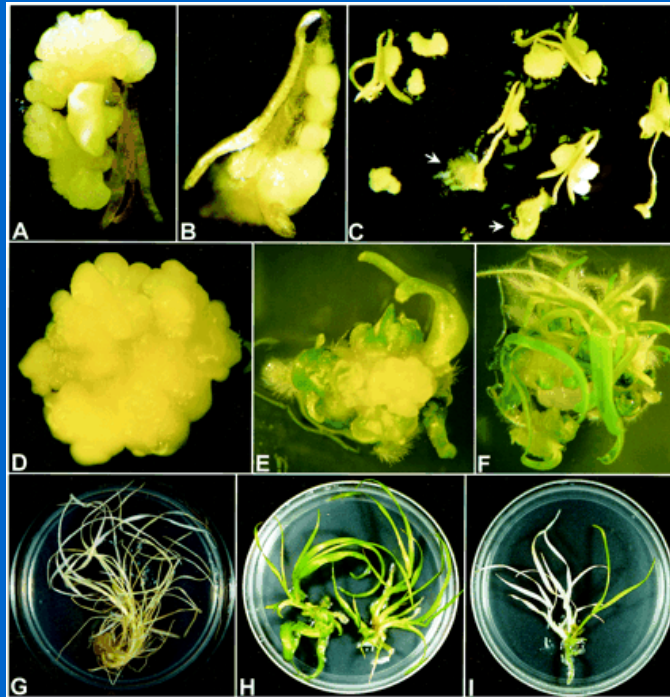
Başlangıçta anterler genellikle karanlıkta ve 20 ila 30oC'ler arasında kültüre alınmaktadır. Kültürün ilerleyen aşamalarında düşük ışık yoğunluğu (2000 lux) ve değişik günlük ısıklanma sürelerinde bekletilen anterlerde embriyo oluşumu gerçekleştikten sonra; rejeneren olan bitkiçikler daha yüksek ışık 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.





- **Anthers culture**



Dogramaci-Altuntepe et al. 2001. *J. Hered.* 92 (1): 56-64

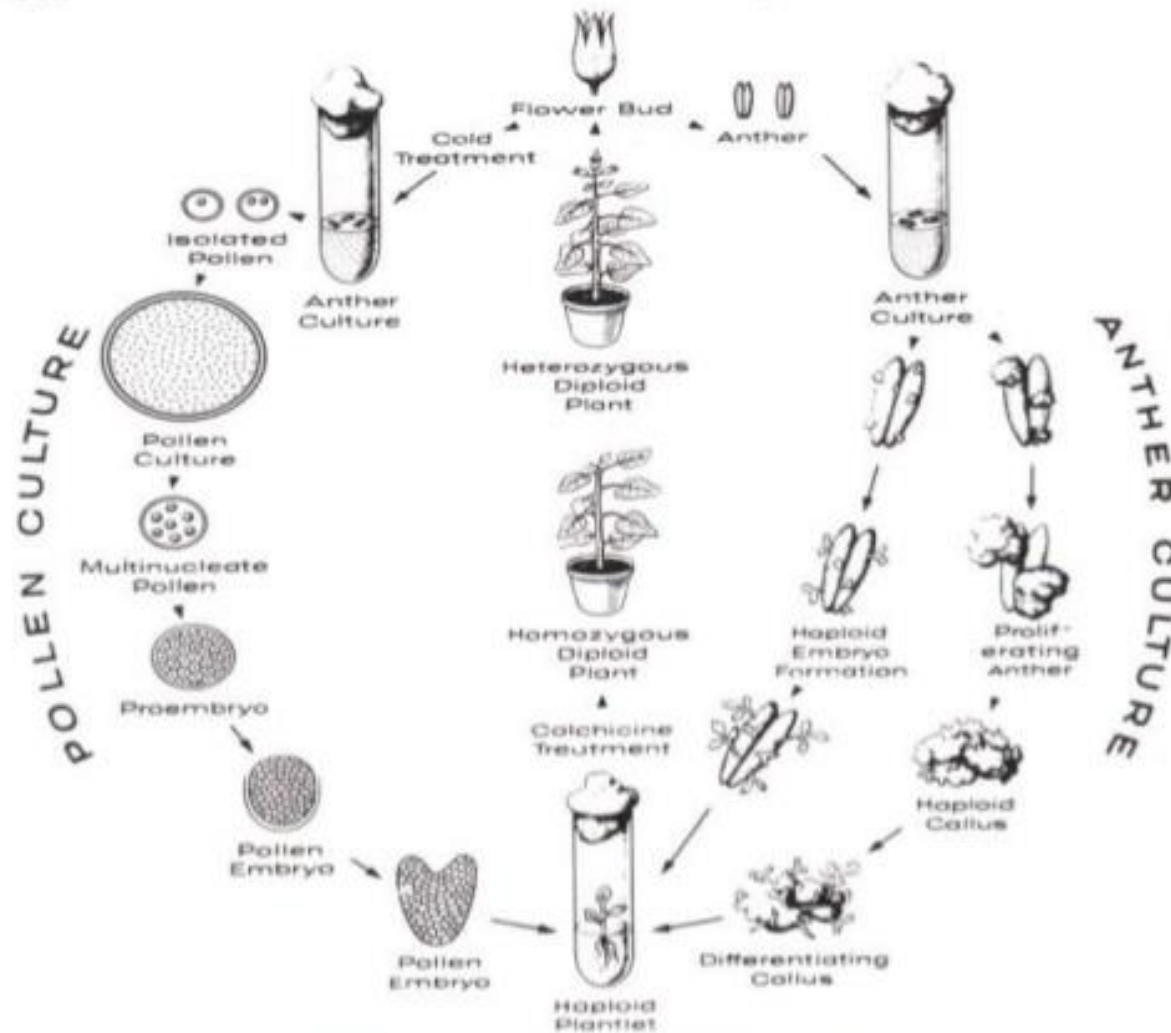


Figure 7. Diagrammatic illustration showing various modes of androgenesis and haploid plant formation by anther and isolated pollen culture. The homozygous plants are obtained by treating haploids with colchicine.

Haploid embryos



(A)



(B)

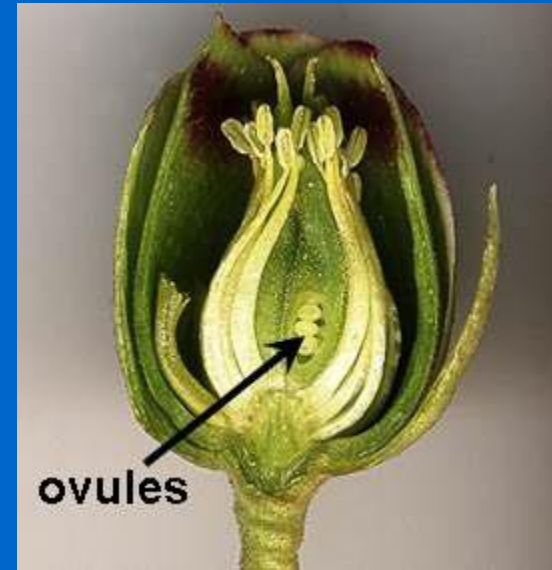


(C)



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' ya da '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. 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 irileşme meydana gelmekte; buna karşılık haploid bitkilerin elde edilmesi halinde bitkinin organları tam olarak oluştuğu halde diploidlere göre daha küçük olmaktadır.

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 floresans 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 kişinin 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 saptanmıştır. 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 saptanmıştır.

HAPLOİDLERİN SAĞLADIĞI AVANTAJLAR

1. Haploidleri kullanmanın en önemli avantajı, tam bir homozigotiye çok kısa bir sürede sağlamasıdır. Dihaploid hatların kullanılmasıyla genetik ve islah çalışmalarını yapmak kolaylaşmakta ve sonuca daha çabuk ulaşılabilmektedir.
2. Resesif genler, dominant genler tarafından baskılanamayacağından, homozigot bireylerde genetik açılımı izlemek daha kolay olacaktır.
3. Homozigot bitkilerin üretimi özellikle dioik türlerde ve kendine uyumsuzluk sorunu bulunan bitkilerde zor olup anter kültürü, bu bakımdan büyük kolaylık sağlamaktadır.
4. Yabancı döllenmiş türlerde heterozigoti oranı çok yüksek olduğundan bunlarda homozigot hatların elde edilmesi için 10-12 generasyon boyunca kendilemeler yapmak gerekmekte; kendine döllenmiş türlerde bile aynı amaçla 5-7 generasyon kendileme işlemine gereksinim duyulmaktadır.

5. F1 hibrit esitlerin gelistirilmesinde homozigot hatlar arasında üstün kombinasyon yeteneği verenlerinin belirlenmesi yöntemi kullanıldığından, haploidinin hibrit esit 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; yabani türler ile kültür esitleri arasında diploid seviyede melezleme yaparak kombinasyon yoluna gidilmektedir.

7. Kombinasyon ıslahında da sonuca çok kısa sürede ulaşmayı sağlayan haploidi sayesinde, F1 kademesindeki melez bitkilerden haploid çekerek; farklı genotiplerde bulunan ve tek bir genotipte toplanması arzu edilen özelliklere sahip bitkiler kazanmak mümkündür.

8. Anter kültürünün tüm bitkilere genellenemeyecek, türlere özgü bazı avantajları da bulunmaktadır. Örneğin kuşkonmaz 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.

9. DH hatların gen haritalarının çıkartılmasında da kullanılabilir. DH hatlardan oluşan bir populasyonda; heterozigotluk 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 taşımakta ve kolaylık sağlamaktadır.