**Tohum kalite değerlendirmesi**

**Özet**

Başarılı bir bitki standı/duruşu oluşturulması; yüksek kaliteli, hızlı, yeknesak fide çıkışı hâsıl eden genetik olarak saf tohum gerektirir. Bol miktarda kaliteli tohumluk arzını garantiye almak için, tohumluk sanayi; rutin bir şekilde genetik saflıktan tohum dayanıklılık analizlerine kadar uzanan tohum kalite testlerinin bir dizesini kullanmaktadır. Bu testlerin duyarlılığını daha da ileri düzeylerde geliştirmek üzere, tohumluk bilim adamları; faal bir şekilde, yeni tohumluk kalite testleri geliştirmede ve mevcutlarını da yeniden hassaslaştırmada görev almaktadırlar. Bu yaklaşım; yeni moleküler biyoloji ilerlemeleri, tohumluk kalite değerlendirmeleri konusunda daha da fazla durmaya yer vererek, tohumluk ürünlerine sokulmuş bulunduklarından daha da önemli bir hal almış bulunmaktadır. Bu bildirinin amacı; tohumluk kalite değerlendirmesindeki en son kaydedilen gelişmeleri tarif etmek ve araştırma fırsatlarının gelecek beş yıl içerisinde nerelerde bulunduğunu ortaya koymaktır. Tohumluk kalitesi bileşenleri; genetik ve mekanik saflık, tohum çimlenme ve dayanıklılık ile tohum sağlık testini içermektedir. Bunların üstüne tohumluk kalitesinin daha yüksek hassasiyetle incelenmesini hak eden başka bir alanı da tohumluk vasıf güçlendirilmelerinin kesintisiz geliştirilmesidir. Bu tohumluk kalite vasıflarının birçokları; rutin şekilde, tohumluk analizcileri tarafından değerlendirilmekle birlikte, bilgisayar teknolojilerindeki gelişmeler; tohumluk kalite testlerini daha da ileri düzeylerde standartlaştırma ve çoğaltmanın vaadini tutmaktadır.

**Genetik saflık**

Bitki ıslahçıları tarafından Yeni çeşitler geliştirildiğinde, kısıtlı bir miktarda tohum; daha geniş yetiştirici ihtiyaçlarını karşılamak için yeterli miktarlara çoğaltılır. Bu tohum çoğaltıldığı için, ıslahçı tohumunun genetik saflığının önceden üzerinde uzlaşılmadığını garantiye almak üzere mutlaka izlenmiş olması gereği bulunmaktadır. Genetik saflığı sürdürmede iki temel kaygı taşınmaktadır. Birincisi; ıslahçısı tarafından ilk olarak geliştirilmiş olan çeşidin genetik kompozisyonu, tohumluk çoğaltımının birkaç yeni nesillerinden sonra yetiştiriciye pazarlanankiyle aynı olmalıdır. İkincisi; melez tohumluk ürünleri için, melezlemenin başarısı, kendilemenin ve dış çaprazlamanın yüzdesini asgariye indirerek garanti edilmiş olmalıdır.

Geleneksel olarak, ıslahçılar, tohumluk şirketleri ve belgelendirme kuruluşları; tohumluk, fide ve/veya olgun bitki tarafından dışa vurulan fiziksel testler kullanılarak genetik saflıklarını saptarlar. Bununla beraber, laboratuar ve tarla testlerinin başarısı; çevresel stresler veya hasat sonrası elle işleme tutma işlemlerinin tohum ve fidenin belli anatomik/morfolojik özelliklerini maskelediği veya değiştirdiğinden dolayı sınırlı kalmaktadır. Netice itibarıyla, genetik saflık saptamaları; elektroforetik jeller üzerinde sıklıkla ayrıştırılıp, tohumluk/fide enzimlerinin biyokimyasal karakterizasyonlarına doğru kayış göstermektedir. Mısır tohumluk endüstrisi, örnek olarak; rutin şekilde, nişasta jelli eletkroforezis kullanarak melez genetik saflığını taramaya tabi tutmaktadır (McDonald, 1990). Bu teknikler bile; soy içi döllenmiş ebeveynler için farklılaşan polimorfik bantlama desenleri oluşturan birkaç enzimatik ölçümlerle sınırlı kalmaktadır. Gelecekteki üstün, genetik olarak mühendislikten geçirilmiş çeşitler ve melezlerin yeni sürümleri; daha yüksek hassasiyetle genetik saflık testleri geliştirilmesinin üzerine daha da büyük sorumluluk getirmektedir.

***Polimorfik DNA’ nın Rastgele Şiddetlendirilmesi (RAPD)***

Genetik saflık testlerindeki en son bir gelişme; rastgele polimorfik DNA şiddetlendirilmesi veya RAPD olarak adlandırılan polimeraz enzim zincir tepkime (PCR) teknolojisi olmuştur. Bu teknik; tamamlayıcı DNA’ nın her bir şeridinde bir tane olup, iki farklı yerde bireysel olarak tohumların genomik DNA şablonunu hibritleştiren tek bir rastgele seçilen oligonükleotid primeri kullanmaktadır. Uygun sıcaklık değişimleri altında, sıcaklıkça kararlı bir DNA polimerazı; kesintili DNA ürünleri sentezlemektedir( genellikle de 200 ila 2000 temel çiftler uzunluklu). Her bir primer; elektroforetik jel üzerinde ayırt edilebilen birkaç kendine has DNA parçacığını büyütebilmektedir. Bu parçacıklardan bazıları; genotipin kendine özgü özellikleri olup genetik saflık testlerinde kullanışlıdırlar.

Çoğu RAPD araştırmaları; gelişmekte olan bitkilerden alınan dokular üzerinde gerçekleştirilmektedir. McDonald ve ark. (1994); analiz süresini düşüren, beş agronomik ürünün tohumluklarından doğrudan bir DNA çıkarım prosedürü geliştirmişlerdi. Soya fasulyesi tohumlukları (Glycine max L. Merr.) ile olan diğer başka çalışmalar; funguslarla bulaşıklığın, tohum bozulmasının ve tohumluk olgunlaşma ortamlarının farklılığının RAPD markerlerinin kararlılığını etkilemediğini göstermişlerdir. Mısır tohumlarıyla (Zea mays L.) çalışmalar; RAPD markerlerinin baskın olduklarını ve hibrit tohumluğun genellikle kendilenmiş ebeveynlerin her ikisinden de gelen markörlere sahip bulunduklarını ortaya koymuştur(Zhang et a/., 1996a). İlginç bir şekilde, mısır embriyosundan elde edilen RAPD markerleri; tohum kabuğu ve endosperm’den alınanlardakilerde bulunmazken ebeveynlerinki karakteristikti; bu, söz konusu tohum dokularının su kaybına ve tohumluk olgunlaşma esnasında DNA’ da ardı sıra oluşan bozulmaya bağlanmıştı(McDonald, 1995a). RAPD markerleri aynı zamanda; soya fasulyesinde (Zhang et al., 1996b), petunyalarda (Petunia hybiida Vilm.) ve siklamende (Cyclamen persicum Mill.) genetik saflığı belirlemek üzere kullanılabilmektedir (Zhang et al., 1997).

Bu bulgulara dayalı olarak, RAPD markerlerinin kullanımları; kısmen ucuz, basit, hızlıdır, gelişen bitki dokularını kullanmaktan kaçınır, bir seri ürüne uygulanabilmekte ve tohumluklarda genetik saflığın belirlenmesinde daha yüksek duyarlığa erişmek maksadıyla başarıyla kullanılabilmektedir. RAPD’ ların diğer avantajları arasında aşağıdakiler yer almaktadır(McDonald, 1995a): (i) RAPD’ lar; bir genin nükleotid kompozisyonu, bir enzim gibi bir genin ürünü yerine saptanıyor olduğundan çeşitlerin daha yüksek potansiyel ayırımını sağlayabilmektedir, (ii) RAPD’ lar; protein elektroforezin’den çok daha başarılıdır, (iii) RAPD’ lar; başka diğer DNA teknolojilerinde kullanılan radyoizotoplarla bağlantılı çevresel atık ve potansiyel insan sağlığı konularına açık değildirler, (iv) RAPD’ lar; bir DNA termoçevrimcisi hariç, protein elektroforezindekiler gibi aynı genel donanımları ve teknik uzmanlığı gerektirmektedir ve (v) bir RAPD analizinin maliyeti ve tamamlanması için gerekli zaman; halen kullanılmakta olan protein elektroforez protokollerindekilere eşdeğerdir.

RAPD sonuçlarının tekrarlanabilirliği konusundaki ilk baştaki kaygılar; jele eklenen DNA konsantrasyonlarının standartlaştırılması ve kararlı tepkime kullanımı ile termoçevirim şartları ile bağlantılı olmuştu. Sayısız RAPD tekniği varyasyonları; genotiple ilişkili bir marker özgünleştiriciliği geliştirmek üzere bir kere keşfedilmiş olduğunda, oluşmaktadır. Bunlar; türe has PCR (Wu et al., 1989), türe özgü bağlama (Nickerson et al., 1990) ve dizili vasıflandırılmış büyütülmüş bölge (SCAR) (Paran ve Michelmore, 1993) ölçümlerini içermektedir. RAPD’ ların avantajları açık olduğu halde, moleküler biyoloji tekniklerindeki süre gelen gelişmeler; genetik saflık saptamalarındaki duyarlığı arttırmada daha da büyük ümit vermektedir.

Otomatikleştirilmiş genetik saflık analizlerinin gereksinimlerini karşılayabilecek özellikteki diğer genetik marker sistemleri; aşağıda verilmekte olanları içermektedir (Rafalski ve Tingey, 1993):

***Kısıtlamalı kesit uzunluklu polimorfizmler(RFLPs)***

RFLP markerleri; eş-baskındırlar (heterozigotlar her bir homozigottan ayırt edilebilir) ve tek bir yerdeki tam genetik bilgiyi sağlamaktadır. Bununla beraber, RFLP analizi için gerek duyulan DNA miktarı; göreli olarak daha fazladır (5 ila 10 mg) ve RFLP haritalamasının otomasyonu güçlük göstermektedir. Rutin genetik saflık analizi için RFLP markörlerinin kullanımındaki önemli bir gelişme; hassas radyoaktif olmayan markör sistemlerinin çıkması olmuştur (Allefs etal., 1990).

***Basit ardışık tekerrürler***

(AC)n, (AG)n ve (AT)n gibi basit ardışık tekerrürler( mikrouydu tekerrürlü polimorfizimler olarak da bilinmektedir); mebzul miktarlarda bulunur ve yüksek düzeylerde de polimorfiktirler. Bu yaklaşım; PCR tabanlı teknolojiyi kullanır, ancak başlangıç çaba ve masraflarının dikkate değer bir kısmı; özgün bir genotip haritası yaratmak için ilk olarak yeterli mikrouydu markerler belirlenmesi işinde kullanılmaktadır.

***Diğer teknikler***

Genetik saflık araştırması için diğer tamamlayıcı bir teknik ise; genetik saflık parmak izlerinin bilinen bir kitaplığına karşı DNA bantlama desenlerinin objektif analizi için bilgisayarlı görüntüleme kullanımıdır (Bell et al., 1998). PCR teknolojilerinde hangi saflaştırılmaların ilerde yatmakta olduğu halen daha belirsizliğini korumaktadır, ancak genetik saflık testine uygulanmaları ise belirgindir. Gelecek; sadece tek bir zaruri gende farklılık gösteren yeni, genetik olarak mühendislik görmüş çeşitlerin giderek artan şekilde sürümlerini tohum firmalarının yapacaklarını işaret etmektedir. Bunlar olurken, genetik saflık testi yapmada daha da büyük sıkılık gerekli olacaktır.

***Tohum yaşam gücü***

Standart çimlenme testi; bir tohum yığınının tarla performansını kararlı bir şekilde öngöremez. Sonuç olarak da, tohumluk bilim adamları; başka bir tohumluk kalite parametresi, tohumluk yaşam gücüne vurgu yapmışlardır. Bu; tarla şartlarının geniş bir açılım altında hızlı yeknesak çıkış ve normal fideler geliştirme potansiyelini saptayan tohumluk özellikleri olanlar şeklinde tarif edilmektedir (AOSA, 1983). Çoğu ürünlerde tohumluk yaşam gücü ortaya çıkışı için azami potansiyel; fizyolojik olum olarak da bilinen bir safhada, tohumun kendi azami kuru ağırlığında olduğu zamanda başarılmaktadır (TeKrony ve Egli, 1997).

Tohumluk yaşam gücü değerlendirmesinin sabitlenmesi; tohumluk bozulmasına neyin yol açtığının daha da kapsamlı anlayışını geliştirecek tohumluk bilim adamlarına ihtiyaç göstermektedir. Bu anlayış; değişik olayların, hasatta olgunlaşmamış veya aşırı olgunlaşmış tohumluk, hasatta fiziksel tohumluk kötü muamelesi, taşıma esnasında uygun olmayan depolama ve kötü ekim ve bakım dahil tohumluk kalitesindeki kayba katkı yaptığı bilinciyle başlar. Bu durumların her birisi de fiziksel (mekanik kırılma-çatlamalar, yara-bereler-ezilmeler-çarpmalar ve kesikler) (McDonald, 1985) ve fizyolojik (kötü doku, hücre ve hücre zarı işlevleri) tohumluk kalitesindeki kaybın aslına doğru tanımlanması için farklı birer tohumluk yaşam gücü testini gerektirebilecektir. Kötü kaliteli tohumluklar; bozucu olaylara yeknesak şekilde tepki gösteren tam bütün varlıklar olarak da görülmemelidirler. Aslında, tohumluk; şekilce, kimyaca, işlevce ve bozulmaya karşı duyarlılıkça farklılık gösteren önemli dokular/organlar ve organcıklardan oluşan bir karma yapıyı temsil etmektedir. Mısır endospermi, örnek olarak; temel olarak proteinlerden ve yağlardan oluşmuş olan embriyo kadar bozucu olaylara karşı duyarlık gösterici olmayan temel olarak nişastadan oluşmuştur. Endosperm; mısır tohumluğu kuru ağırlığının %80’i temsil ederken, tohumluk bilim adamlarının; çimlenen tohumluk kısmı olan embriyo ile temsil edilen tohumluğun geri kalan %20’lik kısmı üzerinde odaklanışları önem arz etmektedir.

Bingham ve ark. (1994); yaşlı mısır fidelerinde, kökçük uzama oranının koleoptil uzama oranından daha fazla bir ölçeğe geriletilmiş olduğunu çıkarmıştı. Aynı şekilde, Das ve Sen Mandi (1992); marker olarak tetrazolyum klorit kullanarak, farklı yaşlarda buğday embriyolarının kökçüklerinin bozulma gösterecek ilk tohum kısmı olduğunu ortaya koymuştu. Karşıt şekilde, Krishnasamy ve Seshu (1989); çeltik tohumluklarında, bozulmanın ardışıklığının dış deri, yanal pul, kökçük kını, embriyo tomurcuğu, kökçük, orta çanak/mezokotil ve kalkancık ile takip edilen koruyucu kın yaprak olduğunu bildirmiştir. Chauhan (1985); soya fasulyesinde embriyona ait eksenin büyüme noktalarının, yaşlanmaya en eğilimli olduğunu keşfetmişti. Bu bulgular; tohumluk kısımlarının eş zamanlı yaşlanmadıklarını ve tohumluk bozulmasının en hassas önlemlerinin ilk önce bozunuma uğrayan tohumluk kısımları üzerine yoğunlaşması gerektiğini göstermektedir.

Tohum bozulumuna dair bugün ki anlayışımız; yaşlanma esnasında çimlenme için gerekli moleküllerin bozunmaya uğradığını ortaya koymaktadır. Nautiyal ei al. (1985); Shorea robusta tohumlarında yaşlanma sırasında ilk olarak yüksek elektroforetik hareket edebilirliğe sahip proteinlerin bozulmaya uğradıklarını bildirmişti. Proteazlar; arttırılmış amino asit içeriklerinde zirve yaparak, mısır tohumlarının yaşlanması sırasında (Basavarajappa et al., 1991) artış gösterirler ve güvercin bezelyesinin hızlandırılmış yaşlanması esnasında ise protein içeriğinde bir azalış (Kalpana ve Madhava Rao, 1993) gösterir. Dell’Aquila ve Di Turi (1995); çimlenmeye özgü proteinlerin depolama sırasında azaldıklarını ortaya koymuşlar ve tohum yaşam gücünün markörleri olarak kullanılmalarını önermişlerdir. Tohum karbonhidrat rezervleri üzerindeki çalışmalar; genellikle, şekerlerin azalışının tohum yaşlanması sırasında yoğunlaştığını ortaya koymaktadır. Rao ve Kalpana (1994); şekerlerin azalmasında bir artış olduğunu ve bozulmuş güvercin bezelyeleri tohumlarının nişasta ve çözülebilir şekerlerinde ise bir azalış olduğunu bulmuşlardı. Ray et aL (1990); hızlandırılmış yaşlanma esnasında, çözünebilir karbonhidratların ve amilaz aktivitesinin çeltik tohumlarında artmış olduğunu göstermişti. Bu; kötü bir şekilde bozulmuş buğday embriyolarının çimlenme esnasında kullanılabilir şekerden daha az yararlanabildiklerinin bildirildiği Ganguli ve Sen Mandi (1990) tarafından yapılan raporla uyumlu bulunmaktadır. Begnami ve Cortelazzo (1996); nişasta bozulmasının hızlanmış yaşlanma süreçleri sırasında oluştuğunu öne çıkaran Fransız fasulyesi tohumlarının hızlanmış yaşlanması esnasında küçük nişasta taneciklerinden çok sayıda bulmuştu. El Refai ve ark. (1988); baklada tohum yaşlanması ile birlikte şekerlerin azalışında bir sürekli gerilemeyi rapor etmişlerdi. Douglass ve ark. (1993) ve Parera et al. (1996); farklı tatlı mısır endosperm tiplerinin tohum nişasta içerikleri ile tarla çıkışları arasında doğru bir ilişki bildirmişlerdi.

Doğal tohum yaşlanmasına dair yorumlar çıkarmak için birçok araştırma hızlandırılmış yaşlandırma koşuları kullanırken, tartışmalar; doğal yaşlanma sırasında oluşan şekilde aynı biyokimyasal olayları hızlandırılmış yaşlanmanın doğurup doğurmadığına ilişkin sürmektedir. Priestley ve Leopold (1983) ve Priesdey et al. (1985); doğal şekilde yaşlanmış soya fasulyelerindeki serbest radikallerde küçük bir artış buna karşın hızlandırılmış yaşlanmış tohumlarda ise serbest radikallerin ikiye katlandığını bildirmişlerdir. Powell ve Harman (1985) da hızlandırılmış yaşlanma sırasında oluşan fizyolojik olguların doğal yaşlanma sırasında oluşanları yansıtıp yansıtmadığını sorgulamışlardı. Aksine olarak Liklatchev ve ark. (1984); çözünebilir şeker içeriğinde bir azalış, fitin hidrolizinde artış ve hem doğal hem de hızlandırılmış yaşlanmanın her ikisi esnasında da belirli proteinlerin elektroforetik hareketliliğinde bir değişim bulmuşlardı. Bu araştırıcılar; hızlandırılmış yaşlanma sırasında biyokimyasal değişikliklerin, sadece bunların oluşumlarındaki oranlarda olan farkla, doğal yaşlanmada ortaya çıkanlarla aynı şekilde oldukları sonucunu çıkarmışlardı.

Moleküler biyolojideki ilerlemeler; tohum kalitesinin değerlendirilmesini geliştirmek için de kullanılabilmesi mümkündür. Çalışmalar; tohum bozulmasındaki ilk değişimlerin yetersiz hücre çoğalmasına ve eşleşmemiş RNA çevirimine yol açan DNA/RNA’da ortaya çıktığını ortaya koymaktadır. Örnek olarak, DNA sentezi; hızlandırılmış yaşlanmayı takiben mısır tohumlarında düşürülmüştür (Cruz Garcia et al., 1995); bu muhtemelen domateste (Van Pijlen et al., 1995) ve bezelyede (Sivritepe ve Dourado, 1994) bulunduğu üzere fide kök uçlarındaki mitozis sırasında normal dışı anafazlara yol açmış olabilir. Diğer başka vakalarda, bozucu olgular; RNase aktivitesinin, 25S ve 18S rRNA’da kayba ve radyoaktif lösinin proteinlere yetersiz çevirimine yol açan çeltik embriyolarındaki zayıflatılmış hayatiyet derecesi ile artmış olduğu RNA düzeyinde olacağı düşünülmektedir (Ghosh and Chaudhuri, 1984). Bu bozucu olgulara neyin yol açtığı; tartışmalıdır, ne var ki çoğu kanıt; bunun serbest radikal saldırıları ile ilişkili olabilmesinin muhtemel olduğunu öne sürmektedir (Wilson and McDonald, 1986a). Hücre zarlarının; tohum bozulması sırasında bozulduğu çok iyi bilinmektedir. Bu; solunum testinin başarısına katkı yapan hücre zarınca zengin mitokondriler gibi organel düzeyinde olduğu kadar iyi bir şekilde, tohum kalitesinin bir ölçüsü olarak iletkenlik testinin başarısını destekleyen, hücresel plazmalemma düzeyinde de ortaya çıkmaktadır (Ferguson et al., 1990; Kalpana ve Madhava Rao, 1995). Serbest radikal zarar; organa özgü de olması muhtemeldir. Smith (1989); marul kotiledonlarının; çimlenme eksenine göre depo rezervlerini harekete geçirmek için bir hareketsizliğe ve hücrealtı yapıda bir kırılmaya yol açan kotiledoncu nekrozla sonuçlanan lipid peroksidasyonuna maruz kaldığını ortaya atmıştır. Çalışmaların çoğu; serbest radikal lipid peroksidatif saldırısıyla yol açıldığı farz edilen, depolama sırasında lipidlerin veya yağ asitlerinin bozulmalarını belgelemektedir. Bu durum; güvercin bezelyesinde (Kalpana ve Madhava Rao, 1996), çeltikte (Ray et al., 1990). soyada (Ferguson et al., 1990; Trawatha et al., 1995a,b), ayçiçeğinde (Haider et al., 1983), yamaç çamı (slash pine)’da (Marquez Millano et al., 1991), ve marulda (Harman and Hill, 1991) geçerlidir. Karşı çıkan raporlar; bezelyede (Powell ve Harman, 1985) ve güvercin bezelyesinde (Kalpana ve Madhava Rao, 1994) lipid peroksidasyonu ile tohum bozulması arasında herhangi bir bağlantı bulmamıştı. Eğer lipid peroksidasyonu tohum bozulmasının bir sebebi ise, tohum kalitesinin ölçüleri olarak tepkimelerin ürünlerini değerlendirmesi mümkün olabilecektir. Örneğin, aldehitler ve diğer uçucu bileşiklerin tohum çimlenmesine toksik olan lipid peroksidasyonu (Wilson and McDonald 1986a) ürünleri olduğu bilinmektedir (Gardner et al., 1990; Zhang et al. 1993). Bu uçucu bileşikler; tohum çimlenmesi sırasında ölçülebilmekte ve tohum kalitesi ile ortak ilişkilidir (Wilson ve McDonald, 1986b; Tyagi, 1992; Zhang et al., 1993, 1995).

Tohum yaşam gücünü değerlendirmek için, bir dizi yaşam gücü testleri geliştirilmiş bulunmakta ve diğerlerinin de hassas ayarları verilmektedir. Bunlardan iki tanesi; hızlandırılmış yaşlanma ve iletkenlik yaşam gücü testleridir.

***Hızlandırılmış yaşlanma***

Hızlandırılmış yaşam testi; basitliği, standartlaştırma kolaylığı (TeKrony. 1995) ve çok geniş çaptaki ürünlere uygulanabilirliği (McDonald, 1995b) dolayısıyla en çok bilinenlerden bir tanesidir. Testte, tohumlar; standart bir çimlenme testi ile takip edilen (AOSA, 1983) yüksek sıcaklığa (genellikle 41°C) ve yüksek bağıl nem (ekseriyetle %100 RH) stresine kısa sürelerle tabi tutulmaktadır. Düşük kaliteli tohumlar bu koşullar altında yüksek kaliteli tohumlardan daha hızlı bir şekilde bozulmaktadırlar. Hızlandırılmış yaşlanma testi ise standartlaştırılmış olarak dikkate alınmakta ve tohum yatağı koşullarının bir çeşitlemesi altında tarla çıkışı ile ilişki kurmaktadır (Egli and TeKrony, 1996).

Bu testin avantajlarından bir tanesi; sıcaklığın ve yaşlanma süresinin belirli ürünler için en iyi hızlandırılmış yaşlanma koşullarını elde etmek üzere maniple etmek kolaylığıdır. Sonuç olarak, araştırma; çeşitli ürünler için ideal test koşullarının daha ileri seviyelerde tanımlanmasına yönelik devam etmektedir. Bunların bir kısmı; AOSA Tohum Yaşam Gücü Testi Klavuzunda (AOSA, 1983) listelenmiştir ve bu tavsiyelerden bazılarının ince ayarları sürmektedir. Örneğin, 72 saat süreyle 43°C’li hızlandırılmış bir yaşlanma testinde; sorgum tohumları (Sorghum bicolor {L.] Moench) için üç ekiliş tarihinde stant çıkışı ile en kararlı ilişkiyi sağlamıştı (Ibrahim et al., 1993). Mısır tohumlarında hızlandırılmış yaşlanma için en son yapılan tavsiyeler; 42°C’ de 96 saat süreli yerine 72 saat süreyle 45°C’linin kullanımını önermektedir (D. M. TeKrony, 1996, kişisel görüşme; Goggi, 1996, kişisel haberleşme). Son zamanlara kadar, hızlandırılmış yaşlanma test tavsiyeleri; % 100 RH’lik bir yaşlanma ortamına erişmek için su kullanmıştı. Çoğu snail tohumlu bitkiler için, bu; hızlı su alımı ve tohum bozulmasıyla sonuçlanmaktadır. Nem alımını uzaklaştırmak için, Zhang ve McDonald (1996); sature edilmiş tuz çözeltilerinin, tohum bozulmasını geciktirerek hızlandırılmış yaşlanma ortamının bağıl nemini düşürmek üzere su yerine kullanılmasını önermişti. Bu tür bir prosedür; sadece küçük tohumlu bitkilerin hızlandırılmış yaşlanma testine izin vermemekte aynı zaman da sonuçları değiştiren hızlandırılmış yaşlanma sırasında tohumlar üzerinde depo funguslarının çıkış olasılığını da düşürmektedir (Moreno and Ramirez, 1985; Konenkov ve Dudina, 1986; Onesirosan, 1986; Gupta et al., 1993; Shekaramurthy et al., 1994).

Gelecekteki hızlandırılmış yaşlanma testi sonucu; belirli ürünlere ilişkin optimum sıcaklık, sure ve bağıl nem koşullarını tanımlamayı sürdürecektir.

***İletkenlik***

Düşük kaliteli tohumluklar; sıkça su aldırmanın ilk saatleri boyunca yüksek kaliteli tohumlardan daha fazla su dışarı sızdırmaktadır, iletkenlik testi; geniş tohumlu baklagil tohum kalitesini izlemeye önemli bir yaklaşım haline gelmiştir (Hampton, 1995). Powell (1986); su aldırma esnasında tohum su sızıntısının derecesinin tohum olgunlaşma safhası, tohum yaşlanma derecesi ve su aldırma zararının olma olasılığı ile etkilendiğini vurgulamıştı. TeKrony ve Hunter (1995); tohumluk yaşam gücünün düşük iletkenlik değerleri ile bağlantılı olan mısırdaki siyah tabaka olum safhasında maksimum olduğunu göstermişti. Ram ve Wiesner (1988); yapay yaşlanmanın hücre zarı geçirgenliğini artırdığını ve buğdayda tohum elektrolitlerinin kaybını şiddetlendirdiğini göstermişti. Bununla birlikte, iletkenliğin; tohum kalitesini değerlendirmede yararlılığının kanıtlanmadığı durumlarda bulunmaktadır. Vertucci ve Leopold (1984); yüksek nem içeriğinde (24%’ ün üzerinde) soya tohumlarının dışarı su sızıntılarına karşı bir direnç tesis ettiğini vurgulamışlardı. Herter ve Burris (1989); kuruma zararına maruz kalmış mısır tohumunun fide uzunluklarının, hücre zarı yırtılmalarının kuruma zararından sorumlu tek faktör olabileceğini ortaya koyan, iletkenlik değerlerinin geniş bir dağılımı üzerinde az bir değişiklik yaptığını bildirmişti. Tohum güçlendirmelerinin kullanımı da iletkenlik test sonuçlarını değiştirmektedir. Örneğin, ön çimlendirilmiş mısır tohumları; ön çimlendirilmemişlerden daha az sızdırmaktadır (Sung and Chang, 1993).

Gelecekte iletkenlik testindeki ilerlemeler; bozulmuş hücreden sızdırılan bileşiklerin doğasını daha iyi kavramadan sağlanabilecektir. Örneğin, Pandey (1989); Fransız fasulyesi tohumlarından dışa sızanların UV emen maddeler, şekerler, amino asitler, fosforlar ve potasyum iyonları ile dehidrojenaz enzimleri içerdiğini bildirmişti. Taylor et al. (1995); çeşitli sayısız sebze tohumlarından sızmış en baskın amino asitlerin; alanin (pırasa, soğan and lahana), glutamik asit (pırasa ve soğan) ile arginin (pırasa ve lahana) içerdiğini, buna mukabil domates ve biber tohumlarının sadece çok az miktarlarda amino asit sızdırdığını bulmuştu. Tersine şekilde, Sanchez de Jimenez et al. (1991); 14-17 yaşlı mısır tohumlarını tohum yaşam yeteneği gerilemiş olsa dahi poliamin içeriğinde herhangi bir değişiklik olmadığını göstermişti. Belirli bileşikleri sızışlarını algılanması; gelecekte iletkenlik tohum yaşam gücü sonuçlarının daha hassas bir şekilde değerlendirilmesini sağlayabilecektir.

**Tohum sağlık testi**

Tohum sağlık testi; bulaşma eşiklerine göre hastalıklarla başa çıkmak için, ürün tesis sahasında tohum kaynaklı bulaşmanın potansiyel etkisini saptamak için ve ihraç edilen ürünlerin bitki sağlığı denetimlerine ilişkin gereksinimleri karşılamak için kullanılmaktadır (McGee, 1995). Patojenlere karşı tohumları test etmede kullanılan en azından beş yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar aşağıdaki kısımlarda tartışılmaktadır.

***Doğrudan inceleme***

Tohum zararlılarını saptamada en yaygın teknik; zararlı saptanmasında duyarlılığı düşük ve işgücü yoğun yaklaşımında da olsa hızlı ve ucuz olduğundan tohumun doğrudan incelenmesidir. Zararlılar; tohumun içinde, üzerinde ve eşlik eden şekilde gözlemlenebilmektedir. Birçok işaret ve belirtiler; tohum yüzeyinden dışa vurulabilmektedir. Diğerleri ise, tohum dokusunu yumuşatarak ve örneğin zararlı miselyumu için içyapıları inceleme şeklinde algılanmaktadır. Diğer “smut teliospores” gibi, yayılıcı yapılar tohum yıkanmasını takiben mikroskopik olarak algılanabilmektedir.

***Kuluçka testleri***

Kuluçka testleri; belirli mantar ve/veya bakteri gurupları için seçici kültür ortamlarının geliştirilmesinde ötürü doğrudan tohum incelemelerinden daha fazla birçok mantar ve bakteriye duyarlıdırlar. Tohumlar; çoğunlukla, bir kimyasalla önceden, zararlının gelişimini optimize etmek ve seçimini yapmak için kurutma kağıtları veya kültür ortamı üzerine yerleştirilen tohumları ve yüzeylerini sterilize etmek için işlemeden geçirilirler. Kuluçkalamadan sonra, hedef zararlı; morfolojik veya biyokimyasal testlerle saptanır. Bir diğer yaklaşım ise tohum kaynaklı zararlıların bir göstericisi olarak duyarlı bir bitki kullanmaktır. Örneğin, tohumlar hasat edilebilir, bir alt örnek homojen hale getirilebilir ve tohumdan alınan süpernatant, belirtilerin varlığı ya da yokluğu yoluyla temsil edici örnekte aranan zararlının olup olmadığını saptamak üzere bir gösterge bitki üzerine doğrudan yerleştirilebilir.

***Hariçte yetiştirme testleri***

Hariçte yetiştirme testleri; başka zararlıların olmaması halinde tohumların tarlada veya serada ekildiği yerlerde kullanılmakta ve fide zararlı emarelerine karşı incelenmektedir. Bu prosedür; zamana, yere ve işgücüne gerek duyar ve zararlının tarlada nasıl dağılabildiğinin bir göstergesini verebilse de duyarlığı yetersiz kalır.

***Serolojik testler***

Serolojik testler zararlısına özgü ve makul maliyetli olmaları dolayısıyla giderek daha önemli hale gelmektedirler. Teşhis kitleri; hazır bulunmakta, ne var ki test sonuçları şüpheci bir şekilde yorumlanmayı gerektirmektedir. Bu testler; poliklonal karşıt maddelerin (antikorlar) değişen çeşitliliği (Lamka et al., 1991), konakçı parçacıklardan gelen antijen salımı yapmayan tohum dokuları (Ding et al., 1992), tohum dokuları tarafından yerleşim yerlerini bağlama rekabeti ve antikor uyuşumsal olgularına yol açan veya antijen bağlamayla çatışan ayıraçlar (Tijessen, 1985) ile uyuşumlu olabilmektedir. Serolojik testlerin özel bir kaygı verici noktası; artık yaşayabilir olmayan zararlı üreme yapılarından gelen üst deri çıkıntılarını bağlayan antikorların bir sonucu olarak sahte doğrulayanların algılanabileceği olasılığıdır. Bunu arkadan dolanmak için, zararlı yaşayabilme yeteneği testleri; olumlayıcı (pozitif) zararlı teşhisinin gerçekleştirilmesinden önce olumlayıcı serolojik testlerle birleştirilmektedir (Franken and Van Vuurde, 1990).

***DNA hibritleştirme testleri***

DNA hibritleştirme testleri; son dönemlerde tohum kaynaklı zararlıların algılanması için yöntemler olarak moleküler biyoloji çalışmalarından çıkmış bulunmaktadır. Bir DNA duyargası ilk olarak, belirli bir zararlı DNA’ sına tamamlayıcı olarak tanımlanmaktadır. Ardından tohumlar; yeknesaklaştırılmakta ve duyarga (probe); benek leke (dot-blot) hibritleştirme ölçümleri yoluyla daha sonra algılanmakta olan, onun zararlı DNA’ sına bağlanması için içeri sokulmaktadır (Schaad et al., 1989: Yao etal., 1991). Bazı olaylarda, duyarga-zararlı DNA’ sının miktarı; pozitif bir test sağlamak için yetersiz olmaktadır. Bu sorun; ardışık analizlerde kolayca çözünen düzeylere DNA’ yı büyüten PCR sürecini kullanarak çözüme kavuşturulabilir (Prossen eta].,1993).

***Bilgisayar teknolojisi***

Tohumluk kalite değerlendirmelerinde bilgisayarların kullanımı; geleneksel tohum kalite analizlerinin sayısını arttırmak için gelecekte artacaktır. Araştırma; şimdilik, tohum testi durumlarında bilgisayarların nasıl kullanılabileceğini ortaya koymak yolu altında yürümektedir. En açık kullanımı, tohumluk test kayıtlarının sürdürülmesi yoluyla olmaktadır. Diğer yaklaşımlar ise; tohum test kurallarının derlenmesi, bilgisayar tarafından rahatça erişilebilecek merkezi kopmak diskler üzerine tohum analiz materyallerinin ve el kitaplarının derlenmesini içermektedir. Bu ise; tohum testinin standartlaştırılmasına yardımcı olacaktır. Diğer başka yararları ise bilgisayar kullanımlarının araştırılmaktadır. Bunların çoğunluğu; saflık veya çimlenme analizlerinin bazı yönlerini güçlendirmek üzere bilgisayarlı görüntülemeyi hizmete koymaktadır.

***Saflık***

Yazılım programları; tohum teşhisinde tohum analizcilerine yardımcı olmak üzere geliştiriliyor bulunmaktadır. Soya fasulyesi tohumlarının (Misra, 1989; Shyy and Misra, 1989) ve bir dizi yabani ot tohumlarının (Peterson ve Krutz, 1992) boyut, biçim, renk ve dokusu; artık bilgisayarlar kullanılarak değerlendirilebilmektedir. Yazılım programları; aynı zamanda depolanmış bilgisayar kütüphanesinde bilinen desenlere göre karşılaştırmaların yapıldığı genotip elektroforetik bandlama desenlerini ayırt etmek üzere hazır bulunmaktadır (Bell et al., 1997). Bilgisayarlı görüntüleme; diploid ve tetraploid ot tohumlarını ayırt edebilmektedir (Berlage et al., 1987). Başkaları da; canlı dokusu havuzlarında depolanmış tohumlardaki fenotipik çeşitlenmeyi saptamak için renkli görüntü veritabanlarını oluşturmaktadır (Howarth and Stanwood, 1994; Panigrahi et a]., 1995). Tohum bütünlüğü ve sağlamlığı gibi fiziksel özellikler; bilgisayar görüntülemesiyle değerlendirilebilmektedir. Mısır tohumunun örneğin fiziksel bütünlüğü (Liao et a]., 1993) ve sert bir yüzeye çarptırıldığında çıkardıkları sessel özelliklerinin yüksek hızlı ses ötesi analizleri yoluyla soya fasulyesine ait olanlar (Misra et al., 1990; Shyy and Misra, 1992) makine görüşüyle izlenebilmektedir.

***Çimlenme***

Bilgisayarlar keza, çeşitli tohum çimlenme/yaşam gücü analizleri amaçlarıyla da gelişmektedirler. Howarth ve Stanwood (1993b); tohum yaşam yeteneği ile irtibatlı olan mısır tohumu tetrazolyum klorit boyama desenlerini görüntülemek için bir yazılım programı geliştirdiler. Fide gelişim oranı belirlemeleri; değerlendirmelerde periyodisite ve tarafsızlık gereklilikleri dolayısıyla bilgisayar destekli teknoloji için ideal bir modeldir. Örneğin, görüntü analiz teknikleri; marul ve havuç (McCormac et al., 1990) için ve marul ve sorgum(Howarth ve Stanwood, 1993a) için eğik levha yaklaşımları kullanılarak geliştirilmiş bulunmaktadır. Önceden belirlenmiş aralıklarla tohum sıvı sızıntılarının yayımı; iletkenlik test verilerin daha kapsamlı yorumlanmalarını sağlayan, bilgisayarlarla izlenebilmektedir (Furman et al., 1987; Giacomelli et al., 1987). Belki de, tohumluk kalite/yaşama gücü analizlerinde bilgisayarların en heyecan verici kullanımları; çiçeksi ve tek yıllık sebze bitkilerin fideli üretiminde olmaktadır. Fideli bitki üreticileri; yeknesak, fide katındaki her bir hücrede pazarlanabilir fide elde etmeyle ilgili olduklarından, boş hücreler; maliyetli ve zaman alıcı bir işlem olan- elle doldurulmayı gerektirmektedir. Bu gereklilik; sadece yüksek kaliteli tohumun üretimi ve pazarlanması üzerinde zorlu yükler bindirmektedir. Bu ihtiyaçlara; geri plandan bir fide katındaki fide örtüsünü bölümlere ayıran, boş hücreleri tespit eden ve dolduran ve dolu hücrelerdeki fide yaprak alanlarını hesaplayan bilgisayarların yardımıyla cevap verilmektedir (Fly et al, 1992; Hirvonen et al., 1992; Sase et al, 1992; Tai et al, 1994; Giacommelli et al., 1996; Ling ve Ruzhitsky, 1996). Bu saptamalar; tohum firmalarınca bir endeks değeri olarak ifade edilmektedir ve yetiştiriciye etiket üzerinde temin edilmektedir.

***Tohum güçlendirmeleri***

Yüksek değerli tohumlar giderek performanslarını daha da ileri seviyelere çıkarmak üzere değişik ön işlemlere tabi tutulmaktadırlar. Bu husus; bilhassa üreticilerin beklentilerinin, fide tepsisindeki tüm tohumların hızlı, yeknesak çıkışlarıyla izlenen bir hücrede tek bir tohumun yerleşmesini işin içerisine kattığı hallerde fideli (şaşırtmalı) bitki üretimi için doğrudur. Bu beklentilere cevap vermek adına, tohum firmaları; tohum peletleri ve kaplamalarını ihtiva eden, fiziksel tohum güçlendirmelerini geliştirmişlerdir. Tohum peletleri; bu yolla küçük ve hafif tohumları daha büyük ve ağır yaparak ve biçimsiz şekilli tohumları tek düze şekilde yuvarlak hale getirerek tümüyle tohumun biçimini kapatmaktadır: her iki işlem de mekanik ekicilerle doğru ekim yapmayı kolaylaştırmaktadır. Tohum kaplama işlemleri; tohum performansını geliştirir fakat tohum biçimini kapatmaz. Geleneksel olarak, bir bulamaç içerisinde uygulanmaktadırlar ancak halen geçerli eğilim; katkılarının yapışkanlı bir polimerin boyalı çözeltisinde çözündüğü film kaplayıcıların kullanımına doğru kaymaktadır. Bu; böylelikle kimyasal madde ve elle işlem görme sırasında gereksiz insan maruziyetinin istenmeyen çıkışıyla bağlantılı “toz uzaklaştırma” sorunlarını eşzamanlı olarak azaltırken çevresel kaygılara cevap vererek, büyüme teşvik edici kimyasalları en az düzeylerde uyulama imkân tanımaktadır. Tohum peleti/kaplamasını uygulama işlemi; aynı zamanda, tohum kalitesine de etkide bulunmaktadır. Örneğin, peletleme ve kaplama materyalleri; uygulama sırasında “yaş” olurlar ve arttırılan solunuma ve düşürülen tohum kalitesine yol açan çimlenme prosesini istemeyerek tetikleyebilir. Kuruduktan sonra çok sert hal alan peletleme materyalleri; kökçük çıkışlarını da kısıtlayabilir. Başka hallerde ise, peletler; hassas ekime tehlikeye düşüren ve dahası bir saflık değerlendirmesi yürüten tohum analizcisine zorluk çıkaran çoklu tohumlar etrafta oluşturur. Peletleme ve kaplama işlemlerinin her ikisinde de, büyüme teşvik edici kimyasallar tohum performansını geliştirmek için eklenebilmektedir. Tohum analizcileri; fizyolojik bir etki oluşturma yeteneği düzeylerinde büyüme teşvik edici kimyasalın varlığını doğrulayan testler geliştirmek zorunda kalacaklardır. Bir başka yaklaşım ise tohum performansını geliştirmeye yönelik; polietilen glikol (PEG) veya çeşitli tuzlar, veya matrikondisyonlama gibi kurutma işlemi ile takip edilen doğrudan su uygulaması (Khan et a!., 1992) ve varilde ön çimlendirme (Rowse, 1996) gibi ozmotikler kullanarak gerçekleştirilen bir hidrasyon/dehidrasyon işlemi olan ön çimlendirmeyi içermektedir (Mauromicale and Cavallaro, 1995; Perez Garcia et al., 1995; Oluoch and Wslbaum, 1996). Bu hidrasyon prosesi; çimlenmenin en erken fizyolojik safhalarını başlatır ve daha hızlı ve tek düze fide çıkışları ile neticelenen, beklide tohum depolama esnasında zararlanmış hücre zarlarının ve organellerin fizyolojik onarımlarına (Copeland and McDonald, 1995) önayak olmaktadır. Bununla birlikte, ön çimlendirme; tohum kalitesini düşürebilmektedir. Örneğin, ön çimlendirilmiş tohumlar; tohum yaşam yeteneğini azaltan ve çimlenme hızını düşüren daha kısa depolama ömrüne sahip olabilmektedir (Carpenter, 1989; Jensen and Ison,1994). Bu belki de gelişmekte olana kökçük uçunda fiziksel yetersizliklere yol açan (Maude et al., 1994) geri kuruma esnasında maruz kalınan tohum hücre zarı zararına (Huang and Zou, 1989; Finch-Savage et a/., 1991; Armstrong and McDonald, 1992) yüklenebilir. Bir diğer faktör de tohum performansını etkileyen; ön çimlendirme sırasında kullanılan ozmotik ortamın cinsidir. Domates ve kuşkonmazda, inorganik tuzlar; hücre zarı hasarı ve enzimatik değişimler yoluyla PEG’ den tohumlara daha zararlı olmuştu (Frett et al, 1991). Ön çimlendirme sırasında tohumlara temin edilen oksijen miktarı da performansı etkiler. Düşük oksijen düzeyleri (<21%); saf oksijende ön çimlendirilmiş tohumlara nazaran daha iyi misk kavunu tohum performansı şeklinde netice vermişti (Yeoung et al., 1996).

Diğer tohum performansını ileri götürmeye yönelik fizyolojik yaklaşımlar; organik çözgenler kullanarak tohumlara büyüme-teşvik edici maddelerin emdirilmesi ve seçici şekilde hastalık yapan mikroplara saldırtmak üzere yararlı biyolojik mikropların katılmasını içermektedir (Callan et al., 1991; Kumar ve Dube, 1992; Capper ve Higgins, 1993; Dandurand ve Knudsen, 1993). Yine de, aseton kullanımı; bezelye tohumlarına başlangıç tohum nem içeriklerine bağlı olarak zehirli olabilmekte (Coolbear et al.. 1991) ve biyolojik varlıkların başarılı uygulanmasını ve etkinliklerini saptamak için yöntemler; halen daha tohum test laboratuarında geliştirilmek durumundadır. Tohum güçlendirme uygulamalarının dahi ileri düzey tartışmaları için Taylor et al. (1998)’ a bakınız.

***Yorum***

Gelecek tohum kalite değerlendirmeleri; tohum performansını güçlendirmeye dönük yeni yaklaşımlar geliştirildikçe daha da karmaşık haller alacaktır. Kimyasal madde ve tohumluk şirketleri; genetik saflık testlerine karşı koyan moleküler biyolojideki gelişmeler vasıtasıyla tohum içerisine belirli genleri ve gen ürünlerini sokma işine girişiyorlar. Tohum performansı; dosdoğru bir şekilde takip edilmesi şart olan tohuma kimyasal ve biyolojik ajanlar katarak artan bir şekilde ilerletilmektedir. Bu genetik ve fiziksel/fizyolojik tohum güçlendirilmeleri; tüketiciye bir maliyet bindirecektir. Tohum maliyetleri artarken, yetiştiricilerin ilerletilmiş tohum performansına dair beklentileri ve talepleri daha da artacak ve kötü ürün durumu oluşumu kabul edilemez olacaktır. Sadece en iyi kaliteli tohumun pazara verildiğini garantiye almak için, tohum kalite kontrol programları giderek daha da önemli hale gelecektir. Bu bildiri; genetik saflığın izlenmesini, tohum yaşam gücünü ve tohum sağlığı testi yapmayı geliştirmek için gelecek beş yıllık sürede tohum kalitesi değerlendirmede beklenen ilerlemelerden bazılarını açıklamaktadır.