

BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİ

Bitki doku kültürleri, bitki organ, doku, hücre ve protoplastlarının (eksplant), steril (aseptik) şartlarda, yapay besin ortamları üzerinde, kontrollü koşullarda kültüre alınmasıdır.

Bitki doku kültürleri *in vitro* koşullarda yapılmaktadır.

“*In vitro*” Latince bir kelime olup tam karşılığı “cam içerisinde” dir.

Biyolojide “*in vitro*” kelimesi “laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda” anlamında kullanılmaktadır.

- Doku kültürlerinin esası biyolojinin ilkelerinden birisi olan “**totipotensi**” kavramına dayanmaktadır.
- Totipotensi, her canlı hücrenin tam bir organizma oluşturma potansiyeline sahip olmasıdır. Çünkü her hücre bunun için ihtiyaç duyulan genetik bilginin tamamına sahiptir.
- Sürgün ve köklerin uç kısımlarında büyüme noktalarındaki meristematik hücreler ya da zigot gibi hücreler diğer hücrelere göre daha totipotenttir.

Doku Kültürlerinin Uygulandığı Alanlar

1- Bitki Islahında Uygulama Alanları

- Embriyo kültürü
- Anter ve ovül kültürü (*in vitro* haploidi tekniği)
- Somaklonal varyasyon
- In vitro* seleksiyon
- In vitro* çiçeklenme, çiçek tozu üretimi, dölleme
- In vitro* germlazm muhafazası
- Gen transferi

2- Bitki Çoğaltımında

- Virüsten ari bitki üretimi
- Mikroçoğaltım
- Sentetik tohum üretimi (somatik embriyolar)

3- Diğer Uygulama Alanları

- Sekonder metabolit üretimi
- Kimeralar
- Temel araştırmalar (beslenme, sitogenetik, morfogenesis çalışmaları gibi)

BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNDE STERİL (ASEPTİK) KOŞULLARIN SAĞLANMASI

1) Çalışma mekanının havasının ve yüzeylerinin mikroorganizmalardan arındırılması:

- Doku kültürlerinde eksplantlar laminar flow (steril kabin) içerisinde kültüre alınmaktadır. Yani çalışma mekanını farklı büyüklüklerde ve tiplerde olan bu cihazlardır.
 - Kabine takılı olan HEPA filtre, havadaki 0.3µ ve daha büyük mikroorganizmaları cihaz çalıştığı sürece tutmaktadır.
 - Mikroorganizmalardan HEPA filtre sayesinde arındırılan hava, kabin içerisine yani eksplantların kültüre alındığı mekana verilmektedir. Bu sayede çalışma mekanının havası yaklaşık 15 dakikada mikroorganizmalardan tamamen arınmaktadır.

- Hepa filtreler cihazın çalıştırılma süresine bağlı olarak zaman içerisinde işlevini yitirdiğinden değiştirilmek zorundadır. Aksi takdirde kabinde aseptik koşullar sağlanamamaktadır.
- Cihazda çalışmanın yapıldığı yüzeylerin her çalışmadan önce ve çalışma sırasında %70'lik etil alkol ya da uygun bir sterilizasyon maddesi kullanılarak silinmesi gerekmektedir. Böylece yüzeyde bulunan mikroorganizmalar ortadan kaldırılmalıdır.
- Ayrıca kültür kabı ve benzerleri kabine alınmadan önce üzerlerine %70'lik etil alkol püskürtülmelidir.

2) Eksplantların kültüre alınması sırasında kullanılan pens, penset, bistüri vb. aletlerin mikroorganizmalardan arındırılması:

- Pens, bistüri gibi aletler yakılarak ya da elektrikli özel sterilizatörler ile mikroorganizmalarından arındırılmaktadır.
- Yakma işlemi kabin içerisine takılı doğal gaz vb. ile çalışan bir alev makinası, alev oluşturulabilen taşınabilir ya da fitilli bir cihaz kullanılarak yapılabilir.
- Yakma işleminin etkinliğinin artırılması için pens, bistüri vb. önce %96-99'lük etil alkol içerisine daldırılır, daha sonra alevden geçirilir ve taşıyıcı bir destek üzerine özellikle uç kısımları herhangi bir yere dokunmayacak şekilde soğuması için bırakılır.
- Alkol yanıcı özellikte bir madde olduğundan yangın çıkmasına karşı dikkatli olunmalı, kabin içinde alkol, alevden uzak tutulmalı ve hiçbir zaman sıcakken pens ve bistüriler alkol içerisine daldırılmamalıdır.

3) Besin ortamlarının mikroorganizmalardan arındırılması:

- Besin ortamları otoklavda 121°C sıcaklıkta yüksek basınç altında (1.05 kg/cm²) belirli bir süre tutularak ya da por genişliği 0.22µ olan filtrelerden geçirilerek steril kaplar içerisine süzme yoluyla mikroorganizmalarından arındırılmaktadır.
- Besin ortamlarının otoklavda tutulma süreleri hacimleri ile ilişkilidir. Sterilizasyon işlemi başladıktan sonra örneğin 20-50 ml hacimdeki besin ortamı için 20 dakikalık süre yeterli olabilmektedir.
- Özellikle ısıya hassas olan maddelerin (büyümeyi düzenleyici maddeler gibi) filtre sterilizasyonundan sonra otoklavlanmış ve sıcaklığı yaklaşık olarak 35-45°C'ye inmiş besin ortamına ilave edilmesi önerilmektedir.

4) Kültür kapları, kağıt, cam plakalar, saf su vb. maddelerin mikroorganizmalardan arındırılması:

- Otoklavlanan besin ortamları steril kabin içerisnde kültür kaplarına dökülecek ise bu kültür kaplarının önceden mikroorganizmalarından arındırılmış olması gerekmektedir.
- Tek kullanımlık steril plastik kaplar hazır alınabilir.
- Eğer çok kez kullanılabilir özellikteki kaplar bu iş için kullanılacak ise bunların otoklavda 121°C'de yüksek basınç altında (1.05 kg/cm²) 1-1.5 saat tutularak ya da yaklaşık 200°C'deki fırınlarda 2-4 saat bekletilerek mikroorganizmalarından arındırılması gerekmektedir.
- Kabin içerisnde eksplantların dikime hazırlanması için üzerine alınacağı kağıt vb. plakaların da yukarıda belirtilen yöntemlerden biri ile mikroorganizmalarından arındırılması gerekmektedir.
- Çeşitli amaçlar için aseptik koşullarda kullanılacak steril saf suyun sterilizasyonu otoklavda (121°C, 1.05 kg/cm²) en az 1 saat tutularak sağlanmalıdır.

5) Başlangıç aşamasında dışarıdan alınan eksplantların mikroorganizmalardan arındırılması:

Yüzey sterilizasyonu: Çoğu kez sadece yüzey sterilizasyonu ile eksplantlar mikroorganizmalarından arındırılabilir.

- Eksplantlar genellikle sodyum hipoklorit solusyonu kullanılarak mikroorganizmalarından arındırılmaktadır.
- Bu amaçla sodyum hipokloritin %5 aktif madde içeren ticari markalarından hazırlanacak %10-20'lik solusyonları içerisnde eksplantlar 5-30 dakika süreyle çalkalanmaktadır.

- Uygulama süresi eksplantın tipine (taze sürgün ucu, yaprak, çiçek, tomurcuk, kök, tohum, yumru, soğan vb.), bitki tür ve çeşidine göre değişmektedir.
- Ardından bu maddenin dokulardan uzaklaştırılması için en az 3 kez 5'er dakika süreyle önceden steril hale getirilmiş saf su ile aseptik koşullarda (steril kabinde) eksplantlar çalkalanmalıdır.
- Eksplantların sterilizasyonunda sodyum hipokloritten başka kalsiyum hipoklorit (%9-10; 5-30 dakika), oksijen peroksit (%3-12; 5-15 dakika), gümüş nitrat (%1; 5-30 dakika), civa klorür (%0.1-1; 2-10 dakika), etil alkol (%70-96; 0.1-5 dakika) gibi maddeler de kullanılabilir.
- Uygulamalardan sonra bu kimyasal maddelerin de bitki dokularından uzaklaştırılması için eksplantlar yukarıda belirtildiği gibi steril saf su ile çalkalanmalıdır.
- Sterilizasyonu güç olan eksplantlarda yukarıdaki yöntemlerin 2'si birbiri ardından uygulanabilmektedir.
- Yüzey gerilimini azaltarak dezenfektanların eksplanta daha iyi temas etmesini sağlamak için Tween 20 ya da 80 gibi maddeler sterilant maddeler içerisine 1-2 damla ilave edilebilmektedir.

İçsel sterilizasyon:

- Kimi zaman eksplantların iç dokuları da mikroorganizmalar ile bulaşık olabilmektedir. Eksplantların, yüzey sterilizasyonunun ardından besin ortamına dikilmesinden bir süre sonra kontaminasyon sorunu ortaya çıkmaktadır. Bu durumda mikroorganizmanın tanımlanmasından sonra besin ortamına etkili olabilecek antibiyotik, sistemik fungusit ya da özel formülasyona sahip karışımların (örneğin, PPM-Plant Preservative Mixture) ilave edilmesi gerekebilir.

DOKU KÜLTÜRLERİNDE BESİN ORTAMLARININ İÇERİĞİ

Doku Kültürlerinde Besin Ortamlarının İçeriğinde Bulunan Maddeler:

1) Su:

- Doku kültürlerinde besin ortamının %95'i sudur.
- Besin ortamlarının hazırlanmasında kullanılacak suyun kalitesi yüksek olmalıdır.
- Musluk suyu besin ortamlarının hazırlanmasında kullanılamaz. Musluk suyu, miktarı belli olmayan oranlarda çeşitli katyonları, anyonları, organik maddeleri, partikülleri, zararlı gazları içermektedir.
- Besin ortamlarında kullanılacak suyun bu maddelerden arındırılmış olması gerekmektedir.
- Besin ortamlarının hazırlığında kullanılacak su en azından deiyonize su olmalıdır. Deiyonize suyun daha sonra iki kez destile edilmesi ise ideal olmaktadır.

2) Makro ve mikro elementler:

- Besin ortamlarında makro elementler; N (25-60mM), K (20-30mM), P, Ca, S ve Mg (1-3mM) ve
- Mikro elementler; Fe, Mo (1µM), I (5µM), Zn (5-30µM), Mn (20-90µM), B (25-100µM), Cu, Co (0.1µM) bulunur.
- Makro elementler milimol düzeyinde ilave edilirken mikro elementler mikromol düzeyinde ortamlara katılır.
- Bu elementlerin kullanım miktarları farklı araştırmacılar tarafından geliştirilmiş besin ortamı reçetelerinde değişiklik göstermektedir.
- Bu reçetelerden hangisinin kullanılacağı bitki türü, doku kültürünün tipi, eksplant kaynağı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.

3) Vitaminler:

- Vitaminler enzim reaksiyonlarında katalitik etkiye sahiptir.
- Bitkilerde büyümeyi ve gelişmeyi olumlu yönde etkilerler.

- Thiamin (B1), nikotik asit, pyridoksin (B6) ve myo-inositol doku klkr ortamlarında sıkla kullanılmaktadır.
- Farklı besin ortamlarında thiamin ve pyridoksin 0.1-10 mg/l; nikotik asit 0.1-5mg/l, myo-inostol 50-5000mg/l dozlarında kullanılmaktadır.
- Biotin, folik asit, askorbit asit, pantotenik asit (B5), tokoferol (E vitamini), riboflavin (B2) ve p-aminobenzoik asit de besin ortamlarında kullanılan diğer vitaminlerdir.

4) Amino asitler:

- Hücre gelişimini uyarmak için kullanılan organik azot kaynaklarıdır.
- Glisin (2mg/l), L-glutamin, L-asparagin (100mg/l) sıklık kullanılan amino asitlerdir.

5) Kompleks organik maddeler:

- Kazein hidrolizat (%0.05-0.1), hindistan cevizi sütü (%5-20), maya ekstraktları, malt ekstraktları vb. kompleks maddeler de kimi kültürlerde kullanılmaktadır.
- Bu maddelerin zararlı etki yaratmaması için kullanmadan önce test edilmeleri önemlidir.

6) Aktif karbon:

- Kültürlerde olumsuz etki yapabilecek toksik maddeleri (fenolik bileşikler gibi) absorbe eder,
- Kültürlerde karanlık koşul oluşturulmasını sağlar (köklendirme).
- Besin ortamlarına %0.2-3 dozlarında aktif kömür katılabilmektedir.

7) Büyümeyi düzenleyici maddeler:

- Doku kültürlerinde oksinler, sitokininler ve gibberellik asit (GA₃) en fazla kullanılan büyümeyi düzenleyici maddelerdir.
- Absizik asit (ABA) ve etilen de nadir olmakla birlikte doku kültürlerinde kullanılabilen diğer büyümeyi düzenleyici maddelerdir.

Oksinler:

- Oksinler hücre bölünmesini ve genişlemesini sağlar.
- Kallus kültürleri, hücre süspansiyon kültürleri, somatik embriyo ve kök oluşurmada çok etkili maddelerdir.
- Sitokininler ile birlikte düşük dozlarda kullanıldığında sürgün oluşumunu da olumlu etkilemektedir.
- İndol asetik asit (IAA), indolbtirik asit (IBA), naftalen asetik asit (NAA), 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) en yaygın kullanılan oksinlerdir.
- IAA doğal oksindir. Diğerleri sentetik olarak üretilmektedir.

Sitokininler:

- Sitokininler hücre bölünmesi, farklılaşma, rejenerasyon ve sürgün çoğaltımında etkilidir.
- Köklenme zerine olumsuz etkiye sahiptir.
- Kinetin, benziladenin (benzil amino purin) (BA, BAP), zeatin, thidiazuron (TDZ) en fazla kullanılan sitokininlerdir. Zeatin doğal sitokinin formudur.

Gibberellik Asit:

- Gibberellik asit (GA₃) boğum aralarının ve dolayısıyla sürgün boylarının uzamasını, gözlerin gelişimini, meristemlerden sürgün oluşumunu, embriyolarda ve tomurcuklarda dormansiyi kaldırarak çimlenme ve sürmeyi uyarır.
- Kallus gelişimi ve köklenme üzerine olumsuz etkiye sahiptir.

8- Karbon ve enerji kaynağı:

- Doku kültürlerinde eksplantlar heterotrof (kendi besinlerini yapamayan) oldukları için enerji kaynağı olarak besin ortamlarında şekere gereksinim duyarlar.

- En fazla sakaroz bu amaçla kullanılmaktadır.
- Kullanım dozu kültür tipine göre değişmekle birlikte %1-5'dir. En fazla %3 dozunda kullanılmaktadır.
- Sık olmamakla birlikte glikoz, maltoz ve fruktoz da bu amaçla kullanılabilen diğer şekerlerdir.
- Manitol ve sorbitol gibi alkol şekerleri bitki dokularında metabolize edilemezler ve bunlar genellikle protoplast kültürlerinde ozmotik dengeleyici olarak kullanılırlar.

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ TİPLERİ

SÜRGÜN UCU, TOMURCUK, BOĞUM VE MERİSTEM KÜLTÜRLERİ

SÜRGÜN UCU KÜLTÜRÜ:

Aktif dönemdeki taze sürgünlerin büyüme konisini içerecek şekilde 1-2 cm uzunluğundaki uç kısımlarının yapay besin ortamı üzerinde aseptik koşullarda kültüre alınarak bitkiye dönüştürüldüğü bir *in vitro* tekniktir.

TOMURCUK VE BOĞUM KÜLTÜRÜ:

Aktif ya da dinlenme dönemindeki sürgünlerden izole edilen tepe ya da koltuk altı tomurcukların, yalnız başına ya da üzerinde bulunduğu dal parçası ile birlikte yapay besin ortamı üzerinde aseptik koşullarda kültüre alınarak bitkiye dönüştürüldüğü bir *in vitro* tekniktir.

Sürgün Ucu, Tomurcuk ve Boğum Kültürlerinin Kullanım Alanları:

1- Mikro Çoğaltım: Bu amaçla sürgün ucu ve tomurcuk kültürlerinden yararlanılabilmektedir. Bununla birlikte embriyo, yaprak, kök, yumru, soğan, kallus, hücre kültürleri, mikro aşılama ve somatik embriyogenesis de mikro çoğaltım amacıyla kullanılabilir.

2- Germplasm Muhafazası: Genetik materyalin *in vitro* koşullarda korunması kapsamında sürgün ucu ve tomurcuk kültürlerinden yararlanılabilmektedir. Bu amaçla örneğin somatik embriyogenesis de kullanılabilir.

3- Gen Aktarımı: Bazı türlerde bu kültürler gen transferi çalışmalarında kullanılabilir. Bu kültürlerin esas alındığı gen aktarımı çalışmalarında transformasyon frekansı düşük olabilmekte ve kimerik transgenik bitkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle gen transferinde yaygın olarak yaprak diskleri ve somatik embriyolar kullanılmaktadır.

Sürgün Ucu, Tomurcuk ve Boğum Kültürlerinde Başarıyı Etkileyen Faktörler:

1- Bitkisel materyal:

- **Eksplantın büyüklüğü:** Eksplantın boyutu çok küçük olduğunda (örneğin 1mm), yaşama şansı 5-10mm olana göre azalmaktadır.

- **Donör bitkinin durumu:** Eksplantın alındığı bitkinin (donör bitki) yaşı, içinde bulunduğu fizyolojik durum (aktif ya da dinlenme halinde oluşu), eksplantın alındığı kaynak (apikal ya da aksiller-koltuk altı tomurcuklar) kültürlerde de başarıyı etkilemektedir.

- **Genotip:** Genotiplerin rejenerasyon yetenekleri birbirinden farklı olabilmektedir. Bu durum kültürlerin başarısını etkilemektedir.

2- Besin ortamının yapısı:

- Sürgün ucu, tomurcuk ve boğum kültürlerinde en yaygın kullanılmakta olan temel besin ortamı Murashige ve Skoog (MS) ortamıdır. Bitki tür ve çeşitlerine bağlı olarak kimi zaman bu besin ortamının makro element düzeyi ½ kuvvetinde kullanılabilir. MS ortamı dışında diğer temel besin ortamlarının esas alındığı çalışmalar da bulunmaktadır.
- Temel besin ortamlarına sitokinin ve düşük dozlarda oksin ilave edilmesi sürgün oluşumunu ve gelişimini artırmaktadır. Mikro sürgünlerin boğum aralarını uzatarak onların uzunluklarının artırılması amacı ile de GA₃, mikro sürgünlerin (çeliklerin) köklendirilmesi amacıyla oksinler kullanılabilir.

- Şeker kaynağı olarak genellikle %3 oranında sakkaroz önerilmektedir.
- Ortamlar %0.6-0.7 dozunda agar ile yarı katı duruma getirilmekte ya da sıvı besin ortamları kullanılabilir. Yaygın olarak yarı katılaştırılmış ortamlar esas alınmaktadır.

3- Kültür koşulları:

- Kültür koşulları tür ve çeşitlere bağlı olarak değişebilmektedir. Genellikle kültür odalarında 25°C sıcaklık düzeyi, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık uygulaması ve 4000 lüks değerindeki aydınlatma kullanılabilir.

Sürgün Ucu ve Tomurcuk Kültürleri ile Mikro Çoğaltımın Aşamaları:

Dört aşaması bulunmaktadır. Bunlar:

- 1- Başlangıç (ilk kültür) aşaması,
- 2- Sürgün çoğaltma aşaması (alt kültürler),
- 3- Köklendirme aşaması ve
- 4- Dış koşullara alıştırmaya aşamasıdır.

1- Başlangıç Aşaması:

- Aseptik koşullarda sürgün ucu kültürü için yaklaşık 1 cm uzunlukta sürgün uçları; tomurcuk kültürü için üzerinde tomurcukları taşıyan sürgün parçaları (boğum) 1-2 cm uzunlukta kesilerek ya da sadece tomurcuklar koparılarak daha önceden hazırlanmış besin ortamına dikilir.
- Bu aşama eksplantların kültür koşullarına ilk alındığı aşamadır, 3-4 hafta devam eder. Bu aşamada amaç, eksplantların kültüre alınması ve rejenerasyonun (sürgün oluşumu) sağlanmasıdır.
- Temel besin ortamına özellikle sitokinler (0.05-10 µM dozlarında) ve çoğu kez düşük dozlarda oksinler (0.05-5 µM dozlarında) ilave edilir.
- Genel olarak bu aşamada sürgün çoğaltımı hedeflenmemektedir.
- İnkübasyon genellikle 25°C sıcaklık ve 16 saat aydınlık koşullarda gerçekleştirilir.
- Bu aşamanın sonunda elde edilen sürgünler çoğaltma (proliferasyon) ortamlarına transfer edilir.

2- Sürgün Çoğaltma Aşaması:

- Başlangıç aşamasından alınan sürgünlerin bol miktarda çoğaltımının amaçlandığı aşamadır.
- İn vitro sürgünler 3-4 hafta aralıklarla aseptik koşullarda alt kültürlerle alınmaktadır.
- Bu aşamada da temel besin ortamlarına özellikle sitokinler (0.05-10 µM) ve çoğu kez düşük dozlarda oksinler (0.05-5 µM) ilave edilir.
- Genel olarak bu aşamada sürgün çoğaltımı hedeflenmektedir.
- İnkübasyon 25°C sıcaklık ve 16 saat aydınlık koşullarda gerçekleştirilir.

3- Köklendirme Aşaması:

- Yeterli sayıda çoğaltılan sürgünlerin *in vitro* ya da *ex vitro* koşullarda köklendirildiği aşamadır.
- Bu aşamada oksinlerin (örneğin NAA, IBA, IAA) kullanımı köklenme oranını yükseltmektedir. Oksinler, 0.1-10 µM dozlarında,
 - Temel besin ortamına katılarak,
 - Sürgünlerin dip kısımlarına hızlı ya da yavaş daldırma yöntemi ile uygulanabilmektedir.
- Köklenme oranı, oksin uygulamalarının yanında temel besin ortamının makro element düzeyini ½ ya da ¼ oranlarında azaltarak, başlangıçta kültürlerle 7-10 gün karanlık uygulaması yaparak, besin ortamına aktif kömür katarak (örneğin 2 g/L) artırılabilir.
- Bazı çalışmalarda sürgünler yüksek oksin içeren besin ortamları üzerinde 1 hafta kültüre alınmakta ve daha sonra hormonsuz ortama transfer edilmektedir.

- Köklenme sonuçları 1-2 ayda alınmaktadır. İnkübasyon bu aşamada da 25°C sıcaklık ve 16 saat aydınlık koşullarda gerçekleştirilir.

4- Aklimatizasyon Aşaması:

- Köklenmiş sürgünlerin dış koşullara alıştırdığı aşamadır.

- *In vitro* koşullardan alınan köklenmiş sürgünler önce yıkanarak agar ve şeker kalıntularından temizlenir ve torf, perlit, vermikulit, sfagnum yosunu, kum ve/veya bahçe toprağı karışımlarını içeren viyollere, küçük saksılara ya da jiffy potlara dikilir.

- Mist ya da fog sistemine sahip olan ve plastik örtü ile kaplı alçak tünellerin bulunduğu seralarda yavaş yavaş dış ortamın nem düzeylerine kontrollü olarak alıştırılır.

- Dış koşullara alıştırma ve serada geliştirme aşamaları 1-3 ay sürer.

SOMAKLONAL VARYASYON

- Doku kültürlerinde ortaya çıkan kalıtsal değişikliklerin tümü “somaklonal varyasyon” olarak tanımlanmaktadır
- Mikroçoğaltım, bir eşeysiz (klonal) çoğaltım şekli olmakla birlikte kültürlerde beklenmeyen ve kontrol edilemeyen varyasyonlar ortaya çıkabilmektedir.
- Somaklonal varyasyon, çoğaltımı yapılan genotipin, ana eksplant kaynağından (asıl genotipten) genetik olarak farklılaşması olduğu için klonal çoğaltımın temel ilkesine aykırıdır. Bu nedenle mikroçoğaltımda somaklonal varyasyon kesinlikle istenmez.
- Ancak bu varyasyonlar bitki ıslahında büyük önem taşımaktadır. Çünkü ıslah için genetik farklılığın yaratılması önemlidir.
- Somaklonal varyasyon üzerine genotip, eksplant kaynağı, kültür tipi, ortam bileşimi, bitki büyüme düzenleyicileri, inkübasyon koşulları, doku tipi ve kültür uzunluğunun etkileri önemlidir.
- Doku kültürlerinde somaklonal varyasyon fenotipik (morfolojik) gözlemler, sitolojik ve moleküler analizler ile belirlenebilmektedir.
- Morfolojik olarak in vitro sürgünlerde yaprak şekillerinde belirgin anormallikler, renkte değişim, cüceleşme;
- Sitolojik olarak kromozom sayılarında değişimler somaklonal varyasyona örnek olarak verilebilir.
- Moleküler teknikler ile örneğin alt kültürlerdeki mikro sürgünlerden alınan DNA örneklerinde SSR analizinin yapılmasıyla genotipte somaklonal varyasyonun ortaya çıkıp çıkmadığı belirlenebilmektedir.

MERİSTEM KÜLTÜRÜ:

Virüsten ari bitkisel materyal elde etmek üzere meristemin uç kısmının (1mm'den küçük) yapay besin ortamı üzerinde aseptik koşullarda kültüre alınarak bitkiye dönüştürüldüğü bir in vitro tekniktir.

Meristem Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler:

1- Bitkisel materyal:

- **Eksplantın büyüklüğü:** Meristem kültürü için henüz gelişmemiş birkaç yaprak taslağı ile birlikte meristematik kubbeden oluşan 1 mm'den küçük eksplantlar kullanılmaktadır. Bu eksplantların 0.2-0.5 mm arasında olması virüs eliminasyonunda başarıyı artırmaktadır.

- **Donör bitkinin durumu:** Eksplantın alındığı bitkinin (donör bitki) yaşı, içinde bulunduğu fizyolojik durum, eksplantın alındığı kaynak meristem kültürlerinde de başarıyı etkilemektedir.

- **Genotip:** Genotiplerin rejenerasyon yetenekleri birbirinden farklı olabilmektedir. Bu durum meristem kültürünün başarısını etkilemektedir.

2- Besin ortamının yapısı:

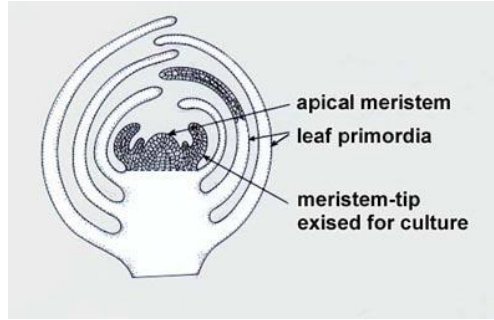
- Meristem kültürlerinde en yaygın kullanılmakta olan temel besin ortamı Murashige ve Skoog ortamıdır. MS ortamı dışında diğer temel besin ortamlarının esas alındığı çalışmalar da bulunmaktadır.
- Temel besin ortamlarına sitokinin, düşük dozlarda oksin ve GA₃'ün ilave edilmesi sürgün oluşumunu ve gelişimini artırmaktadır.
- Şeker kaynağı olarak meristem kültürlerinde de genellikle %3 oranında sakkaroz önerilmektedir.
- Ortamlar %0.6-0.7 dozunda agar ile yarı katı duruma getirilmekte ya da sıvı besin ortamları kullanılabilir. Yaygın olarak yarı katılaştırılmış ortamlar esas alınmaktadır.

3- Kültür koşulları:

- Meristem kültürlerinde de kültür koşulları tür ve çeşitlere bağlı olarak değişebilmektedir. Genellikle kültür odalarında 25°C sıcaklık düzeyi, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık uygulaması ve 4000 lüks değerindeki aydınlatma kullanılabilir.

Meristem Kültürünün Uygulanışı:

- Dinlenmede olmayan donör bitkiden sürgün kısımları alınarak laboratuara getirilir,
- Sterilizasyon için önce akan musluk suyu altında yıkama, aseptik koşullarda %70'lik etil alkol içerisine 10-30 saniye daldırma, ardından sodyum hipoklorit solusyonunda 10-20 dakika bekletme ve steril saf su ile 5'er dakika 3 kez çalkalama yapılır,
- Aseptik koşullarda binoküler stereomikroskop altında sürgünlerden meristem ucu (1mm'den küçük ve genellikle 0.5 mm'den küçük) kesilerek daha önceden hazırlanmış besin ortamına dikilir,



Şekil. Meristem kültürleri için eksplantın alındığı yer

- Yaklaşık 3-4 hafta meristemlerin canlılığı ve sürgün gelişimi izlenir ve bu sürenin sonunda elde edilen sürgünlerde virüs testleri yapılır,
- Virüsten ari bitki üretimi için in vitro koşullarda mikro çoğaltım aşamasına geçilir.
- Virüs ile bulaşık bitkilerden virüsü elimine etmek üzere sadece meristem kültürünün uygulanması yeterli olmayabilir. Bu durumda meristem kültürü ile birlikte termoterapi (sıcaklık uygulaması) işlemi yapılır. Bu işlemde sıcaklık;
 - 1- Donör bitkilere,
 - 2-Meristemlerin kültüre alınmasından önce tomurcukların bulunduğu sürgünlere,
 - 3- Kültüre alınan meristemlere uygulanabilir.
- Genellikle 30-38°C sıcaklıkta 4-6 hafta termoterapi uygulanmış bitki kısımlarından meristem kültürlerinin yapılması ile virüsten ari bitki elde etmede başarılı sonuçlar alınmaktadır.
- Bazı araştırmacılar kemoterapi (kimyasal madde kullanımı) teknikleri ile birlikte meristem kültürünü kullanarak virüsten ari bitki elde etmişlerdir.
- Bu amaçla virüsün replikasyonunu engelleyen ya da virüs hareketini önleyen antiviral bileşikler kültür ortamına ilave edilmektedir. Bu antiviral ajanlardan en yaygın kullanılanı Ribavirin'dir. Bu maddenin

yüksek dozlarında virüs eliminasyonu artmaktadır, ancak 20-50 mg/l'nin üzerindeki dozları büyümeyi azaltmakta ve bitki dokusu için fitotoksik etki göstermektedir.

- Krayoterapi (soğuk uygulaması) ile birlikte meristem kültürünün uygulanması da virüsten arı bitki üretiminde araştırılan bir konudur. Örneğin 5°C'de 4-7.5 ay bırakılan krizantem bitkisinden alınan meristemlerin kullanılması ile virüs eliminasyonunda başarılı sonuçlar alınmıştır.

EMBRIYO 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 çimlenememesi durumunda,
- 3- İslah süresini kısaltmada,
- 4- Yaşamayan embriyoların kurtarılmasında,
- 5- 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

SOMATİK EMBRİYOGENESİS

In vitro koşullarda vejetatif hücrelerden embriyo oluşumu somatik embriyogenesis olarak tanımlanmaktadır.

Somatik embriyoların zigotik embriyolardan en önemli farkı, orijinleri somatik hücreler olduğu için elde edilen bitkilerde genetik açılımın meydana gelmemesi ve bir klon oluşturabilmeleridir. Oysa zigotik embriyolar döllenmiş yumurta hücrelerinden meydana geldiği için gelişen bitkilerde genetik açılım ortaya çıkmaktadır.

Dikotiledon bitkilerde zigotik embriyolar gibi somatik embriyolarda da;

- **Globular,**
- **Kalp,**
- **Torpedo,**
- **Kotiledon**

gelişim safhaları bulunmaktadır. Somatik embriyolarda da gövde-kök eksenini aynı anda bulunmaktadır.

Somatik embriyogenesis;

- **Direkt** (doğrudan) **somatik embriyogenesis**,
- **İndirekt** (kallus dokusundan) **somatik embriyogenesis**

olmak üzere iki şekilde meydana gelmektedir.

- 1) **Direkt somatik embriyogenesis:** Somatik embriyoların eksplant üzerinde bulunan tek bir hücre ya da hücre gruplarından arada kallus aşaması olmadan doğrudan meydana geldiği durumdur. Bu embriyolar kallustan değil doğrudan eksplant hücrelerinden oluştuğu için genetik özellikleri eksplantın özellikleri ile tamamen aynıdır.
- 2) **İndirekt somatik embriyogenesis:** Somatik embriyoların yüksek oksin içeren ortamlarda eksplanttan meydana gelen embriyogenik kallustan oluştuğu durumdur. Kallus aşaması nedeniyle oluşan somatik embriyolarda varyasyon ortaya çıkma olasılığı yüksektir.

Somatik Embriyogenesisin Kullanım Alanları:

- 1) **Klonal çoğaltım:** Farklı türlerde somatik embriyoların oluşum, çoğalma ve bitkiye dönüşüm protokollerinin geliştirilmesinden sonra somatik embriyogenesis hızlı, yoğun ve bir örnek bitki çoğaltımı için önemli bir kaynak durumuna gelmiştir. Bu tekniğin özellikle *Pynus* türlerindeki başarısı çoğaltımda büyük bir potansiyel sağlamıştır. Biyoreaktörlerin geliştirilmesi ile otomatik bir düzen içerisinde hızlı üretim ve çoğaltım çok az bir iş gücüyle gerçekleştirilebilmektedir.
- 2) **Sentetik tohum üretimi:** Somatik embriyolar, zigotik embriyolardan farklı olarak çimlenme sırasında besin kaynağı olarak kullanabilecekleri endosperm ya da depo kotiledonlarına ve bir tohum kabuğuna sahip değildir. Bu nedenle somatik embriyoların tohum olarak kullanılabilmesi için ekim sırasında onları koruyacak, çimlenme gerçekleşene kadar canlı tutacak ve bitkilerin ilk gelişmesi sırasında gerekli olan besin maddelerini sağlayacak bir duruma getirilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla uygulamada en fazla somatik embriyoların kaplanması işlemi üzerinde durulmaktadır.
- 3) **Gen aktarımı**
- 4) **Genetik materyalin muhafazası**

Somatik Embriyogenesisi Etkileyen Faktörler:

- **Genotip:** Somatik embriyo oluşturma oranı bitki türleri ve aynı türün çeşitleri arasında büyük farklılık gösterebilmektedir. Farklı genotiplerin embriyogenesisden sorumlu genleri genomlarında bulundurup bulundurmamalarına göre o tür için somatik embriyogenesisin başarısı ortaya çıkmaktadır. Somatik embriyo oluşturma oranı yüksek bir çeşidin, başarı oranı düşük bir çeşit ile melezlenmesi sonucu elde edilen dölde başarı oranı yüksek olmaktadır.
- **Eksplant kaynağı:** Tüm bitki dokularının somatik embriyo oluşturma oranı aynı düzeyde değildir. Genel olarak genç ve rejenerasyon kabiliyeti yüksek dokulardan somatik embriyo oluşumu daha başarılıdır. Bu bakımdan olgunlaşmamış kotiledonlar çok iyi sonuç vermektedir. Bazı türlerde in vitro yaprak, gövde ve kök eksplantlarından da başarılı sonuçlar alınmıştır. Hücre süspansiyon kültürleri de bu bakımdan önemli bir kaynaktır. Nitekim somatik embriyolar ilk kez havuç bitkisinde hücre kültürlerinde elde edilmiştir.
- **Besin ortamının içeriği:** Somatik embriyogenesis için bitki türlerine göre farklı temel besin ortamları esas alınmaktadır. MS (Murashige ve Skoog), DKW (Driver ve Kuniyuki Walnut), WPM (Woody Plant Medium), B5 (Gamborg ve ark.), N6 (Chu ve ark.) gibi ortamlar en fazla kullanılanlardır. Somatik embriyogenesisin uyarılması için başlangıçta ortama

oksinlerin ilave edilmesi gerekmektedir. Temel besin ortamlarına kazein hidrolizat gibi ilave azot kaynaklarının katılması embriyogenesis için gerekli olabilmektedir.

- **İnkübasyon koşulları:** Özellikle karanlık uygulaması somatik embriyogenesisi çoğu kez olumlu etkilemektedir. Burada en önemli faktör ışığın oksinleri parçalayıcı etkiye sahip olmasıdır. Bununla birlikte somatik embriyoların rejenerasyonu için ışık gereklidir. Embriyoların olgunlaşması ve bitkiye dönüşümünde 16 saat normal aydınlık (5000-10000 lüks ışık şiddetinde) 8 saat karanlık uygulaması önerilmektedir. Somatik embriyogenesis çalışmalarında kültür odasının sıcaklık düzeyi 25°C olmalıdır.

HAPLOİD BİTKİ ELDE EDİLMESİ

Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere **haploid bitkiler** denir.

Haploidler her bir lokustaki allellerden sadece bir seriyi içermektedir.

Haploid bitkilerin doğada kendiliğinden ortaya çıkma sıklığı genotiplere bağlı olarak %0.1-0.001 ve hatta bazı türlerde %0'dır.

Günümüzde haploid bitkilerin elde edilebilmesi için en etkin yöntem erkek veya dişi gametlerin başlangıç materyali olarak kullanıldığı *in vitro* tekniklerdir.

Bir türün normal kromozom sayısının yarısına sahip olan gametlerden yararlanarak, o türün gametik kromozom sayısını taşıyan bitkilerin elde edildiği teknik **haploidizasyon** olarak tanımlanmaktadır.

Haploid bitkiler gamet oluşturamadıkları için kısırdırlar ve tohum bağlayamazlar.

Bu bitkilerin ıslah programlarında kullanılabilmesi için yeniden diploid bitkilere dönüştürülmesi gerekir.

Haploid bir bitkinin kromozomlarının bazı kimyasal maddeler yardımıyla ya da spontan olarak katlanması sonucunda ait olduğu türün kromozom sayısına (2n) yeniden kavuşturulması, böylece mutlak homozigot bitkilerin elde edilmesine **dihaploidizasyon** adı verilmektedir.

Haploidizasyon Tekniğinin Kullanım Alanları:

- 1- Haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanması yoluyla kısa zamanda %100 homozigot saf hatlar elde edilebilmektedir. Böylece dihaploidizasyon yöntemi ile homozigot hatlara bir generasyonda ulaşılabilir (klasik yöntem ile bu süre yabancı döllenen türlerde 10-12 generasyon; kendine döllenenlerde 5-7 generasyondur).
- 2- Klasik yöntemler ile homozigotiye ulaşmanın zor olduğu türlerde (dioik türler, kendileme depresyonu olan türler gibi) dihaploidizasyon yöntemi ile homozigotiye bir generasyonda ulaşılabilir.
- 3- Odunsu bitki türlerinde uzun gençlik kısırlığı nedeniyle klasik yöntemler ile homozigotinin elde edilmesi çok uzun zaman almaktadır. Dihaploidizasyon yöntemi ile bu süre kısalmaktadır.
- 4- Dihaploid bitkilerden elde edilen saf hatlar F₁ hibrit çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilir.
- 5- Arzu edilen özellikler melez bitkilerden F₁ kademesinde haploidizasyon tekniği ile elde edilerek kombinasyon ıslahında kullanılabilir.
- 6- Haploidizasyon ile resesif mutasyonlar açığa çıkarılabilir.
- 7- Haploid bitkilerin hücrelerinde somatik hibridizasyon daha kolay uygulanabilir.
- 8- Tetraploid türlerde haploidizasyon tekniği ile diploid bitkilerin üretimi mümkün olabilmektedir.

- 9- Bazı dioik türlerde haploidizasyon tekniği ile saf erkek bitkiler elde edilebilmektedir.
- 10- Özellikle poligenik olarak kontrol edilen bir karakterin moleküler düzeyde tanımlanması dihaploid hatlarda daha kolay olmaktadır.
- 11- Sitolojik, fizyolojik, genetik çalışmalarda haploid ve dihaploidler önemli deneysel materyaldir.

Haploid Bitki Elde Edilme Yöntemleri:

A- Erkek Gametten Haploid Bitki Elde Eldesi (Androgenesis)

- 1- Anter Kültürü
- 2- Mikrospor Kültürü

B- Dişi Gametten Haploid Bitki Elde Edilmesi (Gynogenesis, partenogenesis)

- 1- Ovül Kültürü
- 2- Ovaryum Kültürü
- 3- Kromozom eliminasyonu (Bulbosum tekniği)
- 4- Eksik veya yetersiz polenler ile tozlama

ANTER KÜLTÜRÜ

Haploid embriyo ve bitki oluşumu amacıyla olgunlaşmamış mikrosporları (polenleri) içeren anterlerin aseptik koşullarda çiçek tomurcuklarından çıkarılarak yapay besin ortamları üzerinde kültüre alındığı in vitro tekniktir.

Androgenisi Etkileyen Faktörler:

- 1- Donör Bitkiden Kaynaklanan Faktörler
 - a) Donör bitkinin genotipi
 - b) Yetiştirme koşulları
- 2- Anter Kültürü Tekniğinden Kaynaklanan Faktörler
 - a) Anterin gelişme dönemi
 - b) Anterlere yapılan ön uygulamalar
 - c) Besin ortamının bileşimi
 - d) İnkübasyon koşulları

Anterlerin Gelişme Dönemi:

- Anter kültüründe en uygun başlangıç materyali, tek çekirdekli ya da birinci polen mitozundan hemen önceki dönemde bulunan mikrosporları içeren anterlerdir.
- Mikrosporlar içerisinde nişasta depolanmaya başladıktan sonra başarılı sonuçlar alınamamaktadır.

Anterlere Yapılan Ön Uygulamalar:

- Tomurcuklara yapılan soğuk şokları (4-10 °C'de 4 gün-4 hafta)
- Tomurcuklara ethrel uygulaması
- Santrifüj etme

Besin Ortamının Bileşimi:

- Androgenesis için en fazla kullanılan temel besin ortamları MS (Murashige ve Skoog), White and Nitsch ve B5 (Gamborg ve ark.)'dir.
- İlk aşamada gametofitik gelişmeyi sporofitik gelişmeye dönüştürmek üzere ortama oksinler ilave edilirken; bitkiciklerin elde edilme aşamasında sitokininlere ihtiyaç duyulmaktadır. Anter kültüründe 2,4-D, NAA ya da IAA en fazla kullanılan oksinler; kinetin, benzil adenin ve zeatin en fazla kullanılan sitokininlerdir.
- Besin ortamlarına özellikle kültürün ilk aşamasında yüksek şeker dozlarının (%6-12) ilave edilmesi haploidlerin elde edilmesinde başarıyı artırmaktadır.
- Anter kültüründe besin ortamına serin, glutamin gibi aminoasitlerin, $AgNO_3$ 'ün ve aktif kömürün ilave edilmesi olumlu etki yapmaktadır.

İnkübasyon koşulları:

- Başlangıçta anterlerin karanlıkta ve 20-30°C sıcaklıkta; ilerleyen aşamalarda düşük ışık yoğunluğunda (2000 lüks) tutulması embriyo oluşumunu olumlu etkilemektedir. Rejenerasyon aşamasında daha yüksek ışık yoğunluğu gerekmektedir.
- Bazı türlerde başlangıç aşamasında anterlere 3-14 gün süreyle yüksek sıcaklık uygulaması (30-35°C) ve daha sonra 25°C'ye alınması embriyo oluşumunu artırmaktadır.

MİKROSPOR KÜLTÜRÜ

Haploid embriyo ve bitki oluşumu amacıyla olgunlaşmamış mikrosporların (polenleri) aseptik koşullarda anter içerisinden izole edilerek yapay besin ortamları üzerinde kültüre alındığı in vitro tekniktir.

Polen kültürü olarak da isimlendirilir.

Anter kültürüne göre daha komplike bir tekniktir.

Mikrospor kültürünün avantajları;

- 1- Anter kültüründe anterlerin diploid yapıdaki dokularından da (anter duvarı, septum, tapetum gibi) embriyo (diploid yapıda) oluşabilmekte ve bu embriyolar haploid embriyolar ile rekabete girebilmektedir. Oysa mikrospor kültüründe oluşan embriyolar tamamen haploiddir.
- 2- Mikrospor kültüründe besin ortamı ile doğrudan temas halinde oldukları için mikrosporlar besin maddelerini daha iyi alabilmektedir.
- 3- Anter dokusunda bulunan engelleyici maddeler (ABA, toksik maddeler gibi) anterle birlikte uzaklaştırıldığından sorun olmaktan çıkmaktadır.
- 4- Tek bir mikrospordan embriyo oluşumu sağlandığı için genetik manüplasyonlar, mutasyon, biyolojik testler vb. çalışmalar için uygun bir tekniktir.
- 5- Bazı bitki türlerinde haploid embriyo verimi bu teknikte daha yüksektir.

OVÜL VE OVARYUM KÜLTÜRLERİ

Haploid embriyo ve bitki oluşumu amacıyla döllenmemiş yumurta hücresinin ya da yumurtalığın aseptik koşullarda yapay besin ortamları üzerinde kültüre alındığı in vitro tekniktir.

Gynogenesisi Etkileyen Faktörler:

- 1- Genotip
- 2- Donör bitkilerin yetiştirildiği koşullar
- 3- Yumurtalığın gelişme dönemi
- 4- Çiçek tomurcuklarına yapılan ön uygulamalar
- 5- Besin ortamlarının bileşimi
- 6- İnkübasyon koşulları

HAPLOİD BİTKİLERDE KROMOZOM KATLAMA

- Günümüzde kromozom katlaması için en yaygın kullanılan kimyasal madde **kolhisin** ($C_{22}H_{25}O_6$)'dir.
- Bu madde Liliaceae familyasına ait *Colchicum autumnale* L. (güz çiğdemi) bitkisinin köklerinden elde edilir.
- Alkoloid yapısında kuvvetli bir zehirdir.
- Kolhisin, mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve böylece replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar.
- Bu amaçla kafein, oryzalin, trifluralin, amiprofosmethyl, diazot monoksit de kullanılan diğer maddelerdir.

PLOİDİ BELİRLEME

- Fenotipik gözlemler
- Kromozom sayımları
- Flow sitometri
- Stoma ve kloroplastların incelenmesi
- Moleküler analizler

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 ayırmada 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 bileşenleri, 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 epidermisenin 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 karbohidrat, 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-mikrobiale 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 exposides
<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

BITKİ GERMLAZMLARININ İN VİTRO MUHAFAZASI

Bitki germplazmalarının in vitro koşullarda muhafazasında iki temel yöntem uygulanmaktadır:

- 1- Büyümenin yavaşlatılması
- 2- Soğukta muhafaza (kryoprezervasyon)

1- Büyümenin Yavaşlatılması Yöntemi ile Germplazm Muhafazası

İn vitro kültürlerde bitki hücre ve dokularında büyüme;

- İnkübasyon sıcaklığının azaltılması,
- Besin ortamının yapısının değiştirilmesi,
- Bitki materyalinin mineral yağ ile kaplanması,
- Dehidrasyon,
- Sıcaklık ve besin ortamının yapısının birlikte değiştirilmesi,
- Kültürlerde basınç ve gaz bileşiminin değiştirilmesi yoluyla azaltılabilmektedir.

İnkübasyon sıcaklığının azaltılması:

Bitki türlerinin normal koşullardaki optimum büyüme sıcaklıklarına bağlıdır. Örneğin 25°C'de büyüme gösteren bir türde muhafaza sıcaklığı 4-10°C'ye; 30°C'de büyüyen bir türde 15-20°C'ye düşürülmektedir. Ayrıca aydınlatma periyodu ve ışık yoğunluğu da (50 lükse kadar düşürülmekte) düzenlenebilmektedir.

Besin ortamının yapısının değiştirilmesi: Metabolik faaliyetlerin azaltılması amacıyla ortama büyümeyi kontrol edici absisik asit, N- dimetil suksinik asit ve manitol ilavesi; şekersiz besin ortamının kullanılması.

Bitki materyalinin mineral yağ ile kaplanması: Solunumun engellenmesi amacıyla eksplantın mineral yağ ile kaplanması.

Dehidrasyon: Metabolik faaliyetlerin azaltılması amacıyla suyun azaltılması.

Kültürlerde basınç ve gaz bileşiminin değiştirilmesi: Solunumu azaltmak amacıyla düşük basınç ve düşük oksijen kullanılması.

2- Soğukta Muhafaza (Krayoprezervasyon)

Krayoprezervasyon, biyolojik materyalin canlı olarak dondurulması ve daha sonra sıvı azot içerisinde çok düşük sıcaklıklarda (-196 °C) muhafaza edilmesidir. Bu teknik ile;

- Sürgün uçları ve meristemler
- Hücreler ve somatik embriyolar
- Protoplastlar
- Embriyo, endosperm, ovul, anter, polen ve tohum vb.

muhafaza edilmektedir.

Bitkisel materyalin soğukta muhafazasındaki olumsuz etkiler, hücrelerde;

- Kurutmaya ve donmaya toleransın teşvik edilmesi,
- Hücre içi boşlukların (vakuollerin) azaltılması,
- Hücre zarı geçirgenliğinin artırılması,
- Şekerlerin hücre içerisinde artırılması ile sağlanır.

Canlı hücreleri dona karşı koruyan kimyasalların (krayoprotektantların) belirlenmesinden sonra bu tekniğin uygulanmasında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu maddeler içinde en yaygın kullanılanı DMSO (dimetil sülfoksit)'dir ve -20 °C'de yüksek koruma sağlamaktadır. Bu madde, hücrede dondurulamayan suyun artışını sağlar, hücre zarının geçirgenliğini artırır, şeker ve suyun tutulmasını kolaylaştırır.

Tablo: In vitro soğukta muhafaza işlemlerinde krayoprotektant (antifriz) olarak kullanılan kimyasal bileşikler

Alkoller	Kükürt Bileşikleri	Polimerler
Etilen glikol	Amino asitler	Hidroksietilen amidon
Gliserol	Dimetil sülfoksit (DMSO)	Polietilen glikol (PEG)
Propilen glikol	Şekerler (Glikoz, Sakaroz vb.)	Polivinil pirolidon (PVP)
Sorbitol		
Manitol		

Hücre İçinde Serbest Suyun Azaltılması:

Soğukta muhafazadan önce hücrelerde serbest suyun azaltılması ve hücrelerin daha az vakuol ihtiva eder duruma gelmesi istenir. Hücrede serbest suyu azaltmak için sakkaroz (0.3, 0.5 ve 1 M) ve ABA kullanılmaktadır. **Soğukta muhafazada esas alınan bazı uygulamalar:**

- 1) Alt kültüre alma,
- 2) Krayoprotektant (DMSO, sakkaroz, gliserol, etilen glikol gibi) ilavesi,
- 3) Hücre dışı donmanın sağlanması,
- 4) Vitrifikasyon,
- 5) Kurutmadır.

İn Vitro Kültürlerde

Dondurma Yöntemleri

1- Yavaş dondurma: Materyal özel dondurucular içerisine yerleştirilir ve sıcaklığı 0.5-1.0 °C/dakika olacak şekilde yavaş yavaş -30, -40 °C'ye soğutulur. Hücreler arası su donar ve hücre dışarıya doğru su kaybederek büzülür ve hücre içi buz oluşumu önlenir.

2- Hızlı dondurma: Materyalin dona karşı koruyucu maddeler ile muamele edildikten sonra sıvı azot içerisine daldırılması ile uygulanır.

GEN TRANSFERİ

Belirli bir özelliği tanımlayan doğal ya da sentetik yapıdaki nükleik asit dizilerinin (genlerin) bir bitkinin genomuna genetik mühendisliği teknikleri ile aktarılmasıdır.

Gen transferi için ilk aşama genlerin izolasyonu ve manipülasyonudur.

Gen transferinde genel olarak cDNA (komplementar DNA) aktarılabacak gen olarak kullanılmaktadır. cDNA, mRNA'dan elde edilmektedir. Bunların intronları bulunmadığı için yapıları genin tamamına göre daha küçüktür. Böylece daha kolay manipüle edilebilmektedirler.

Hedef geni taşıyan DNA parçasının bir vektör DNA'ya eklenerek rekombinant DNA'ların oluşturulması, klonlama ile bunların çoğaltılması ve saflaştırılması gerekmektedir. Genin klonlamasında kullanılan aracı moleküllere vektör adı verilmektedir.

Vektörler konukçu organizmanın içerisinde ondan bağımsız olarak çoğalabilmektedir. Plazmitler (bakteri hücrelerinde bakteri DNA'sından bağımsız olarak bulunan dairesel DNA molekülleri) ve bakteriyofajlar (bakteriyi enfekte eden virüsler) en bilinen vektörlerdir.

Arzu Edilen Geni Taşıyan Rekombinant DNA'nın Bitkilere Aktarılması

Bitkilere gen aktarım yöntemleri:

1- *Agrobacterium* bakterisinin aracılığı ile

2- Virüslerin aracılığı ile

3- Direkt olarak elektroporasyon, mikro enjeksiyon, biolistik (partikül bombardımanı) ve kimyasal uygulamalar (PEG) ile gen aktarımı.

Agrobacterium Bakterisinin Aracılığı ile Gen Transferi

Agrobacterium tumefaciens, toprakta doğal olarak yaşayan, gram negatif, spor oluşturmeyen, hareketli, çubuk şekilli (basil) bir bakteri olup yaralanmış dokulardan organizmaya girerek tümör benzeri dokular oluşturmaktadır.

Bu bakteri meyve ağaçları, asma, otsu ve odunsu süs bitkileri ve sebzelerin dahil olduğu bir çok dikotiledon bitkide taç tümörlerine neden olmaktadır.

Agrobacterium.tumefaciens'in taç tümör oluşturmalarının nedeni sahip olduğu tümör indüksiyon plasmidinin (**Ti plasmidi**) T-DNA bölgesini bitki genomuna entegre etmesidir. Ti plasmidi dairesel bir DNA molekülüdür.

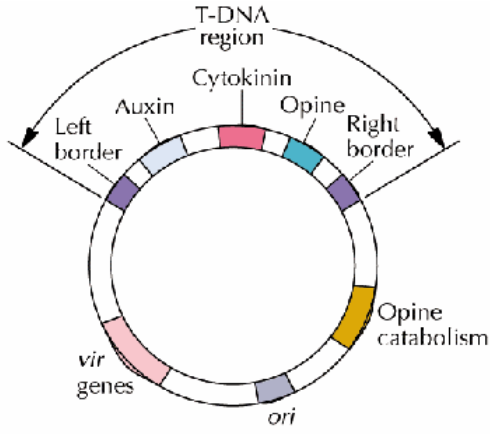
Ti plasmid farklı bölgelerden oluşmaktadır. Bunlar:

1- Vir bölgesi: T-DNA aktarımı için gerekli olan bölge.

2- Ori bölgesi: Replikasyon orijin noktası.

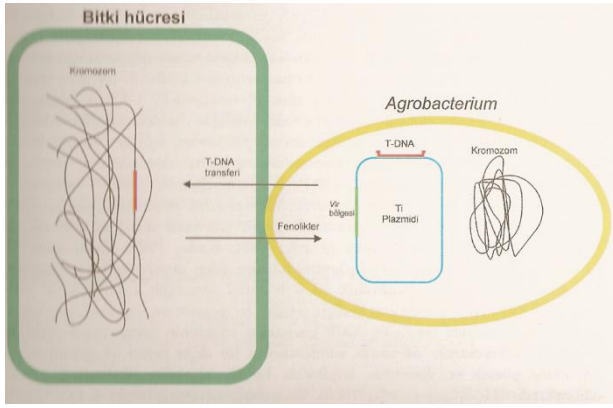
3- Opin bölgesi: Bakteri tarafından karbon ve azot kaynağı olarak kullanılan opinlerin (octopin ve nopalinin) parçalanmasından sorumlu gen bölgesi.

4- T-DNA bölgesi: Tümör oluşumu, opin sentezi ve farklılaşmanın engellenmesi olaylarından sorumlu olan 24 bp'lık sağ ve sol sonlanma bölgeleriyle sınırlanmış DNA'nın yer aldığı bölge.



T-DNA'nın bir bitki hücresine aktarımı 4 aşamada gerçekleşir:

- 1- *Agrobacterium*'un bitki hücresine tutunması ve koloni oluşturması,
- 2- Virulens genlerin uyarılması,
- 3- T-DNA transferi,
- 4- T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonu

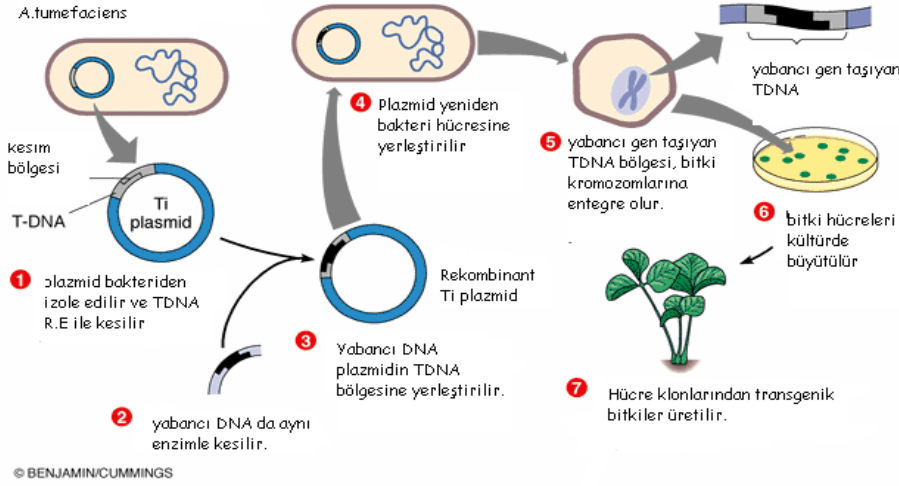


T-DNA aktarımında gerekli olan unsurlar:

- 1) T-DNA bölgesi
- 2) Vir genleri
- 3) Kromozomal genler

Rekombinant Ti plazmidin bitkiye aktarılmasında esas alınan dokular:

- 1- Yaprak diskleri (parçaları)
- 2- Meristemler
- 3- Protoplastlar
- 4- Somatik embriyolar



Partikül Bombardmanı (Biyolistik Mikro Mermi Tabancası ile) Gen Transferi

Biyolistik, biyolojik ve balistik kelimelerinin kısaltılmasından elde edilmiştir. Bu yöntemde, DNA ile kaplı hızlandırılmış mikro taşıyıcılarla (mermilerle) gen aktarımı yapılmaktadır.

Yöntemin başarısını etkileyen faktörler:

- 1- Partikül hızlandırmada kullanılan helyum gazının basıncı,
- 2- Mikro taşıyıcının (merminin) boyutu, tipi ve sayısı,
- 3- Makro taşıyıcı (kovan) ile hedef doku arasındaki uzaklık,
- 4- DNA'nın mikro taşıyıcı (mermi) partiküllere yapışması için kullanılan spermidin ve $CaCl_2$ 'ün konsantrasyonu

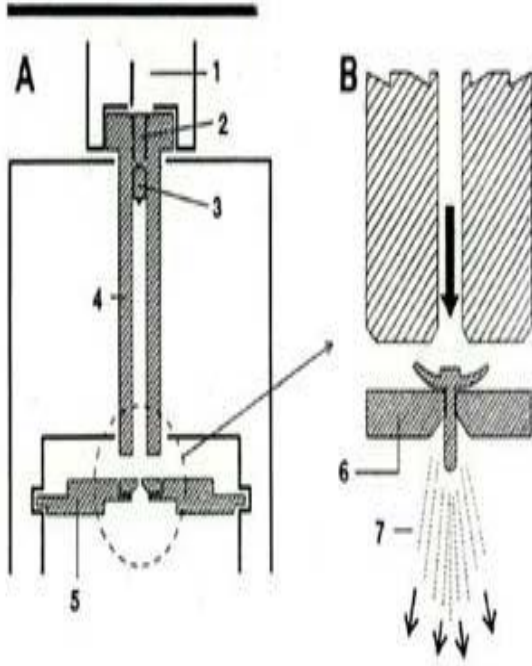
Mikro mermiler, altın ya da tungsten partikülleridir. Tungstenin ortalama çapı 0.5-2.0 μm 'dir.

Ancak düzensiz şekilleri, bazı hücre tipleri için toksik etkileri, DNA çökmesine neden olabilen yüzey oksidasyonu nedeniyle tercih edilmezler. Bunun yerine 1-3 μm çapta, düzenli şekillere sahip altın partikülleri kullanılması tercih edilebilmektedir.

Biolistik Yöntemin özellikleri:

- Kullanım kolaylığı,
- Her ateşlemede mikro taşıyıcıların birden fazla hücreye ulaşabilmesi,
- Dokulara zarar verebilmesi,
- Mikro taşıyıcılara bağlı genlerin biyolojik aktivitelerinin bozulmaması,
- Bir çok doku, hücre ve canlı türüne uygulanabilmesi,
- Kullanılan malzemelerin bazı modellerde pahalı olması
- Başarılı yöntemin belirlenmesi için denemelerin gerekli olması

1. Ateşleme mili
2. Barut ateşleyicisi
3. Mikro taşıyıcıları (tungsten veya altın) taşıyan makro taşıyıcı (plastik kovan)
4. Hızlanma tüpü
5. Durdurucu tabaka rafı ve durdurucu tabaka
6. Makro taşıyıcıyı (kovan) tutmuş haldeki durdurucu tabaka
7. Ateşlenmiş mikro taşıyıcılar



Elektroporasyon Yöntemiyle Gen Aktarımı

Elektroporasyon, hürelere veya dokulara kısa zamanlı çok kuvvetli elektrik akımı uygulayarak, hücre zarında nanometre boyutunda geçici porlar oluşturulması işlemidir.

Böylece hücre zarı DNA, enzim ve diğer makromoleküllerin geçişine izin vermektedir.

Bu yöntemde hedef hücreler ve bu hücelere sokulacak moleküller solusyonda süspansiyon halinde bulunmaktadır.

Yöntemin Özellikleri:

- Hızlı bir yöntemdir,
- Geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Tüm hücelerde etkilidir,
- Hücelerin çoğu hedef DNA molekülünü içine almaktadır,
- Gerekli olan DNA miktarı diğer yöntemlerden daha düşüktür,
- Toksik etkiye sahip değildir.
- Bununla birlikte akımlar yanlış uzunlukta ve siddette uygulanırsa bazı porlar çok büyüyebilmekte ve hücre zarar görebilmektedir,
- İyon dengesizlikleri ortaya çıkabilmekte ve bu durum hücre fonksiyonunda bozukluklara ve hücre ölümlerine neden olabilmektedir.