

DERLEME /REVIEW

SENTETİK TOHUM

Hatice ÇÖLGEÇEN¹, M.Cihat TOKER²

ÖZ

1950’lerde bitki doku kültüründe kallustan “somatik embriyo” olarak adlandırılan embriyo ve embriyo benzeri yapıların geliştiği gözlenmiştir. Somatik embriyolar ve zigotik embriyoların geçirdiği evreler benzerdir. Somatik embriyolar değişik uygulamalarla sentetik tohumlara dönüştürülür. Sentetik tohumlar yaş tohumlar ve kurutulmuş tohumlar olarak iki tiptir. Farklı yöntemlerle sentetik tohum üretilmesi, özellikle verimli tohum üretemeyen bitkiler için kullanışlı olmuştur. Bu metod transgenik bitkilerin çoğaltımı için de önemlidir. Bitkilerin elit genotiplerinin saklanması ve hibritlerin somatik çoğaltımında da kullanılmaktadır. Nesli tükenmekte olan türlerin germplazmalarının ve tohumları kurumayan tropik türlerin üretimi ve saklanması bu teknik temeldir. Biyoteknolojik yolla üretilmiş yeni bitki hatlarının dağıtımı ve depolanması için yeni imkanlar sunar.

Anahtar Kelimeler : Somatik embriyo, Sentetik tohum, Kapsülasyon

SYNTHETIC SEED

ABSTRACT

Embryo and embryo like structures were developed from callus - called “somatic embryo”- were observed in plant tissue culture in 1950’s. Developing stages of somatic embryo and zygotic embryos are similar. The somatic embryos have been converted to synthetic seeds by various processes. There are two types of synthetic seeds : Hydrated seeds and desiccated seeds. Synthetic seed production by different processes is especially useful for plants which do not produce fertile seeds. This method is also important for the propagation of transgenic plants. It is also used for storing of elite genotypes of plants and somatic propagation of hybrids. This technique is extremely essential for producing and storing of germplasms of endangered species and tropic species of which seeds are not dried. It serves new opportunities for delivering and storing of biotechnologically produced new plant lines.

Keywords: Somatic embryo, Synthetic seed, Encapsulation

¹ Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi. Biyoloji Bölümü, 67100 İncivez, Zonguldak, TÜRKİYE.
Tel: +90 0372 257 4010-1128, Fax: +90 0372 257 41 81, E-posta: haticecolgecen@gmail.com

² Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü 06100 Ankara, TÜRKİYE

1. TOHUM NEDİR ve NASIL ÇİMLENİR?

Spermatophyta şubesindeki çiçek açan, polen, yumurta hücresi oluşturan ve döllenme sonucunda tohum meydana getiren yaklaşık 236 000 bitki türü bulunmaktadır. Gymnospermlerde 700-750 tür, angiospermlerde ise 170 000 tür dikotiledon, 65 000 tür monokotiledon vardır (Raven vd., 1999). Bunlar arasında verimli ve sağlıklı tohum verebilenlerin yanısıra, çeşitli sorunlar nedeniyle verimsiz ve cansız tohum oluşumu görülen türler de bulunmaktadır. Tohum; embriyo, besi doku (endosperm) ve tohum kabuğundan (testa) oluşan döllenmiş olgun tohum taslağına denir.

Embriyoyu besleyen besidoku çoğunlukla endospermdir. Bazen nusellus veya kotiledon gibi başka yapılar besleyici görev üstlenebilir. Olgun tohumlar genellikle endospermsiz tohumlar olarak ikiye ayrılır. Birçok yabancı ve kültür bitkisinin tohumları olgunlaşmış ana bitkiden ayrıldıktan sonra, çimlenmeleri için uygun koşullar olsa bile çimlenemezler. Böyle bitkilerin tohumları birkaç hafta veya ay hatta birkaç yıla kadar olabilen **dormansi (uyku)** haline girerler. Tohum dormansisinin bitkiye büyük yararı vardır ve uygun olmayan koşulların atlatılmasına olanak sağlar. Tohumların canlılıklarını ve çimlenme yeteneklerini korudukları süre, bitkilere göre değişiklik gösterir. Bitkilerinin çoğunun tohumları canlılıklarını 10-25 yıl koruyabilirler. Çimlenen tohumların yüzdesi yaş ile yavaş yavaş azalır (Ünal, 1988).

Çimlenme, tohumdaki embriyodan olgun bir bitkinin gelişmesindeki ilk adımdır. Bir tohumun çimlenmesi için su alması gerekir. Hidratasyonla tutulan fazla su nedeni ile şişme olayı gerçekleşir. Çimlenme sırasında aynı zamanda solunum hızı artar. Depo maddeleri hareketlenir. Depo nişastası enzimatik olarak parçalanma ile basit şekere ayrılır ve bu şekerlerde embriyoya taşınarak büyüme olayı için gerekli enerjiyi sağlar (Ünal, 1988).

2. SOMATİK EMBRİYOGENEZ

Embriyo normal şartlarda, polenden gelen sperm hücresi ile yumurta hücresinin birleşmesi ile (döllenme) oluşan 2n kromozomlu zigotun ardı ardına bölünmesi sonucu oluşmaktadır. 1950'lerde bitki doku kültüründe kallustan da embriyo ve embriyo benzeri yapıların geliştiği gözlenmiş fakat ilk somatik embriyogenez 1958'de Steward ve ark. tarafından havuçta somatik dokulardan gerçekleştirilmiştir. Özellikle zigotik embriyolardan alınan parçalar yüksek totipotensi kabiliyetinden dolayı önemli bir eksplant kaynağıdır. Kallus ve vegetatif dokulardan gelişen bu embriyolar **somatik embriyo** olarak adlandırılmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

Günümüzde buğday (*Triticum aestivum*), asma (*Vitis*), çeltik (*Oryza sativa*), soya (*Glycine max*), bezelye (*Pisum sativum*) ve yonca (*Medicago sativa*) gibi pek çok önemli kültür bitkisinde yüksek oranda somatik embriyo üreten çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

Günümüzde in vitro kültür şartlarını ve özellikle de bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak bir bitkinin herhangi bir doku veya organındaki somatik hücreden, doğrudan ve kallus yolu ile embriyo elde etmek mümkün olabilmektedir (Babaoğlu vd., 2001).

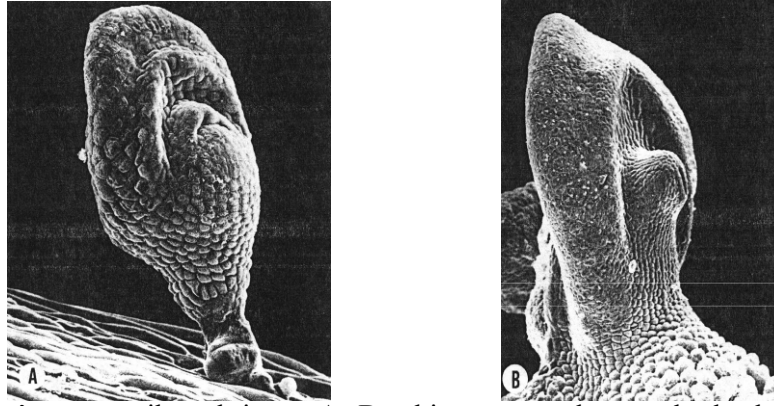
Somatik doku hücreleri öncelikle yüksek oranda oksin (genellikle 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), pikloram, naftalen asetik asit (NAA), dikampa içeren ortamda kültüre alınır daha sonra da oksin içermeyen ikinci bir ortama aktarırlarsa embriyo üretme yeteneği kazanmaktadırlar. Somatik embriyogenezde en çok kullanılan kültür ortamı MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamıdır. Oksinlerin somatik bitki hücrelerine embriyo üretimi için yeniden zigotik bir kapasite kazandırdığı bilinmektedir (Babaoğlu vd., 2001). Bu metotlarla elde edilen somatik embriyo bazı özellikler gösterir:

1. Somatik embriyodan elde edilen bitkiler genetik olarak klon oluştururlar. Zigotik embriyodan gelen bitkiler bir açılım gösterirler.
2. Zigottan gelişen iki çenekli bitki embriyosunun gösterdiği gelişim safhalarını somatik embriyolar da gösterir (Şekil 1- 4).
3. Somatik embriyolar organogenez yoluyla oluşan sürgünlerden farklı olarak gövde-kök eksenine aynı anda sahiptirler ve asıl doku ile vasküler bağlantıları olmadığından dokudan kolaylıkla ayrılabilirler (Şekil 2).
4. Besi doku(endosperm) içermezler.



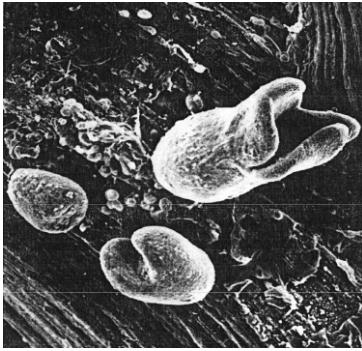
Şekil 1 Somatik embriyolar da zigotik embriyoların geçirdiği evreleri aynı şekilde geçirirler

Dikotiledonlar ve koniferler globular, kalp, torpedo ve kotiledon (olgun embriyo) embriyo gelişim evrelerini gösterirken, monokotiledonlar globular, skutellar, koleoptil embriyo gelişim evrelerini geçirirler (Raven vd., 1999). Önce bir tür için somatik embriyogenez ile embriyo elde edilmesi ve bitkiye dönüşüm yeteneği yüksek embriyo üretimi araştırılır. Somatik embriyogenez ile oluşturulan embriyoların kalitesinin artırılması da önemli bir araştırma konusudur (Redenbaugh, 1990). Ardından elde edilen embriyo miktarını artıracak kültür metodu geliştirilir. En çok kullanılan yöntem bioreaktörlerde kontrollü şartlar altında somatik embriyo üretmektir. Bioreaktörler kültür devam ederken, kültür ortamının, pH'nın, O₂, diğer

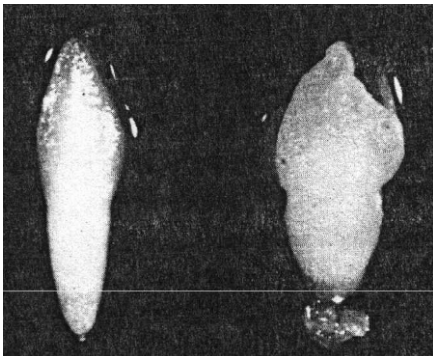


Şekil 2 *Dactylis glomerata*'nin somatik embriyosu A. Dar bir suspensörle yaprak eksplantı üzerindeki somatik embriyo. B. Bazale bağlı proembriyonal kompleksden somatik embriyonun gelişimi (Gray ve Purohit,1991)

gazların ve sıcaklığın kontrol edilebildiği dolayısı ile devamlı üretimin sağlandığı düzeneklerdir. Kontaminasyonun en aza indirildiği bu sistemler de maksimum seviyede homojenizasyon sağlanmaktadır. İlk biyoreaktörle somatik embriyo üretimi havuçta (*Daucus*) yapılmıştır. (Stuart vd., 1987). Bu aşamadan sonra sentetik tohum elde edilmesi evresine geçilir.



Şekil 3 Dikotil bir tür olan *Vitis* (asma)'in Somatik embriyosunun hipokotilden gelişimi (direkt somatik embriyogenez) (Gray ve Purohit,1991)



Şekil 4 *Vitis* (asma)' in zigotik embriyosu (solda) ile somatik embriyosunun (sağda) yan yana görünüşü (Gray ve Purohit,1991)

3. SENTETİK TOHUM

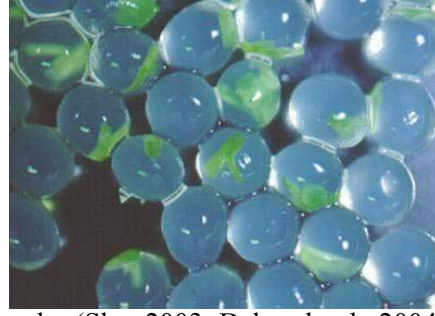
1970'lerde ilk kez sentetik tohum veya yapay tohum terimleri bitki tohumları ile analog olarak kulla-

nılmıştır. Sentetik tohum üretilmesi, özellikle canlı tohum üretemeyen bitkiler için kullanışlı olmuştur (Shu, 2003). Klon olarak üretilen bitkilerin çoğaltılması ve klonlanan özelliklerinin devamı amacı ile sentetik tohum çalışmaları yapılmıştır (Redenbaugh, 1990). Somatik embriyo üretiminin hızla gelişmesi, sentetik veya sahte tohum üretimi açısından ticari üretime avantaj sağlamış ve zaman içinde sentetik tohumların farklı formları ortaya çıkmıştır. İlk sentetik tohumdan bitki oluşumu, doku kültüründen elde edilen somatik embriyonun basitçe hidrate edilmesiyle yapılmıştır. Çıplak embriyo ile bazı bitkiler için hızlı klonal çoğalma sağlamasına rağmen, bu metod, iş gücü ve harcamaları yüksek, üretim verimi çok az olan bir yöntemdir. Koruyucu kaplama sistemlerinin denenmesiyle bu sorunun üstesinden gelinmiş, oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Hidrate olmuş, kapsüllenmiş embriyolar yalnızca birkaç hafta için düşük sıcaklıkta depo edilebiliyordu (Redenbaugh vd., 1986; Fujii vd., 1989; Fujii vd., 1992). Kurutulan ve % 20'den daha az nem içeren somatik embriyoların daha uzun süre depolanması sağlandı (Mckersie vd., 1989). Bu olay ile sentetik tohum teknolojisi atılıma geçmiş, hızla gelişme imkanı bulmuştur. Sonuçta yonca (*Medicago*), havuç (*Daucus carota*), Norveç ladini, kereviz (*Apium graveolens*) ve kahve (*Coffea arabica*) gibi tropik türlerde (Redenbaugh, 1990) de sentetik tohum üretilmiştir (Şekil 5).

Sentetik tohum teknolojisi aşağıdaki konulardaki ilerlemelere bağlı olarak gelişmiştir (Onishi vd., 1994):

1. Dikildiğinde yüksek bitkiye dönüşüm oranı yüksek somatik embriyolar üretebilmek,
2. Kültür sisteminin tasarımı
3. Somatik embriyogenez ve kapsülasyon arasındaki gerekli uyumun sağlanması

Onishi ve arkadaşları (1994), havuçta kapsüle alınacak somatik embriyoların kalitesini yükseltmiş ve bitkiye dönüşüm oranı yüksek embriyolar elde etmiş



Şekil 5. Kaplanmış sentetik tohum ve tohumlar (Shu, 2003; Debergh vd., 2004)

lerdir. Hücre çoğaltımı için sıvı ortam yerine katı ortam kullanmışlardır. 2.5 gr. kallustan bir ay içerisinde 509 000 adet torpedo evresinde embriyo, embriyo gelişimini takip eden dehidrasyon işleminden sonra 261 000 iyi gelişmiş ve vitrifiye olmayan embriyo elde etmişlerdir. Bunlardan 41 000 adet somatik embriyonun kapsüle alınabilir özellikte olduğunu görmüşler ve kapsüle almışlardır. Bunlardan % 80'ini de sera şartlarında bitkiye dönüştürmüşlerdir. Sonuç olarak; doğrudan embriyoyu ekmek yerine embriyoyu kaplayarak ekmenin daha yararlı olduğunu göstermişlerdir.

Yonca (Stuart ve arkadaşları 1987) ve havuçta (Molle ve arkadaşları 1993) bioreaktörde çok miktarda ve aynı gelişim evresindeki yüksek kaliteli somatik embriyolar üretilmiştir. Kullanılan bioreaktörlerin hacmi sınırlayıcıdır. Molle ve arkadaşları (1993), havuçta 10 litrelik bioreaktörlerde %77 bitkiye dönüşüm oranı, %100 yaşayabilme kabiliyeti, gelişimde eş zamanlılık (%90 torpedo şekilli embriyo) ve yüksek ürün (0.7×10^6 emb/L) kapasitesine ulaşmışlardır. Bioreaktörlerin basitliği ve işlemin kolay olması, ticari üretim için büyük yarar sağlar. Bu amaçla 20 cm. çapında, manyetik karıştırıcılı, 8 litrelik kültür kapları da kullanılmışlardır. Farklı bitki türlerinde de bioreaktörler ile somatik embriyoların üretilmesi araştırılmıştır.

Sentetik tohum üretiminde temel olan materyaller **bitki propagulleri**; yani bitkiden doğal olarak elde edilen sürgün tomurcukları ve bitki doku kültürü yoluyla elde edilen somatik embriyolardır. Kültür ortamında kimyasalları kontrol ederek bu bitki propagullerinden tek bir bitki elde edebilir (Shu, 2003). Sentetik tohum elde etmek için, nodal bölgeler, sürgün tomurcukları ve in vitro çoğaltılmış sürgünler kullanılır. Örneğin; *Manihot esculenta* Crantz'da nodal bölgelerden ve sürgün uçlarından alınan parçalar, %3'lük sodyum aljinatla kaplanarak sentetik tohumları hazırlanmıştır (Danso ve Ford-Lloyd, 2003). *Malus pumila* Mill (M26) sürgünle çoğaltılan bir bitkidir (Piccioni, 1997). Bu bitki ile daha sonra yapılan çalışmada, ilk beş yaprak sürgün rejenerasyonu için kullanılmış ve bunlardan elde edilen sürgün uçları %2 lik sodyum aljinat kullanılarak kapsüller içine alınmış ve sentetik tohum haline getirilmiştir (Sicurani ark., 2001). *Actinia delicosa* (Hayward kivi) da sürgün tomurcukları kullanılarak sentetik tohum elde edilmiştir (Adriani vd., 2000). Kenyada yapılan bir çalışmaya göre; tohumluk olarak

kullanılmak üzere depolanan patatelerde yoğun olarak virütik hastalık ortaya çıkmıştır. Bu problemi çözmek amacı ile çimlenen yumruların süren ve virüs taşımayan sürgün uçları kesilip, sodyum aljinat ile kaplanarak sentetik tohumlar elde edilmiştir. Yapılan çimlendirme deneylerinde, sentetik tohumun doğrudan tarlaya ekiminde başarı oranının düşük olduğu görülmüştür. Buna karşılık, önce tohumu kontrollü şartlarda çimlendirip, elde edilen fidelerin tarlaya dikilmesi ile başarı oranının çok yükseldiği belirlenmiştir (Nyende vd., 2002).

Sentetik tohumlar temelde, **yaş tohumlar "hydrated seeds"** ve **kurutulmuş tohumlar "desiccated seeds"** olmak üzere iki tiptir (Singh, 2005).

Yaş tohumlar "hydrated seeds": Bu sistemde somatik propaguller (embriyo veya tomurcuklar), sodyum aljinat, agar, gelrit, karragenan vb. hidrojelle kapsüle alınır. En yaygın kullanılan jel, kalsiyum tuzları ile katılaşabilen sodyum aljinattır. Süspansiyon kültüründen elenerek alınan somatik embriyolar sodyum aljinatla karıştırılır ve kalsiyum klorür çözeltisi ile damlatılır. Damla kalsiyum klorür çözeltisi ile hemen yüzeyde kompleks yapar ve içinde bir veya iki prapagul bulunan düzgün, yuvarlak boncuk şeklini alır. Boncuklar çözeltide 60-90 dakika tutulur, sonra su ile yıkanır, hava ile kurutulur ve 4°C ta saklanır. Aljinatla karıştırılacak tomurcuklar mümkün olan en küçük boyuta traşlanır. İkinci metotda, propaguller sıcaklıkla sıvılaştıran agar veya gelrit gibi jellerle karıştırılır ve kapsüller içine dökülerek soğutulup katılaştırılır.

Kurutulmuş tohumlar "desiccated seeds": Bu metotta sentetik tohum, somatik embriyoları ve tomurcukları polietilen glikolle (PEG) kaplayarak yapılır. Kaplanmış propaguller steril şartlarda, teflon yüzeyde saatlerce kurumaya bırakılır. Kuruyup ince bisküit şeklini alan karışım daha sonra in vitro kültür ortamına konarak re-hidrate edilir ve embriyolar böylece canlı tutulur.

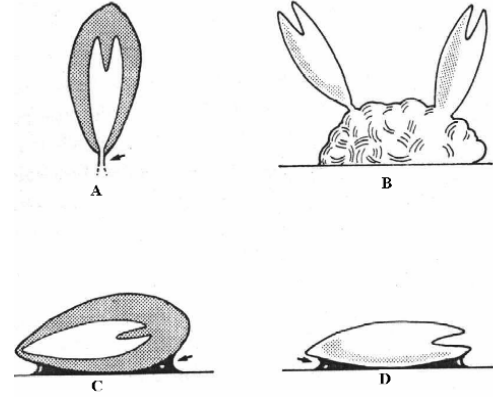
Hidrofobik kaplama: Üretilen sentetik tohumların hidrofobik kaplanmasında yeni bileşikler de denlenmektedir. Bu birleşikler aynı zamanda daha az yapışkan olduğundan boncukların tohum ekme makinası ile dikilebilmesini de sağlamıştır. Genellikle boncuklar talk pudrası ile pudralanarak yuvarlanıcı

hale getirilebilir ve kültür odasında kısa süre saklanabilir (Redenbaugh, 1990; Singh, 2005).

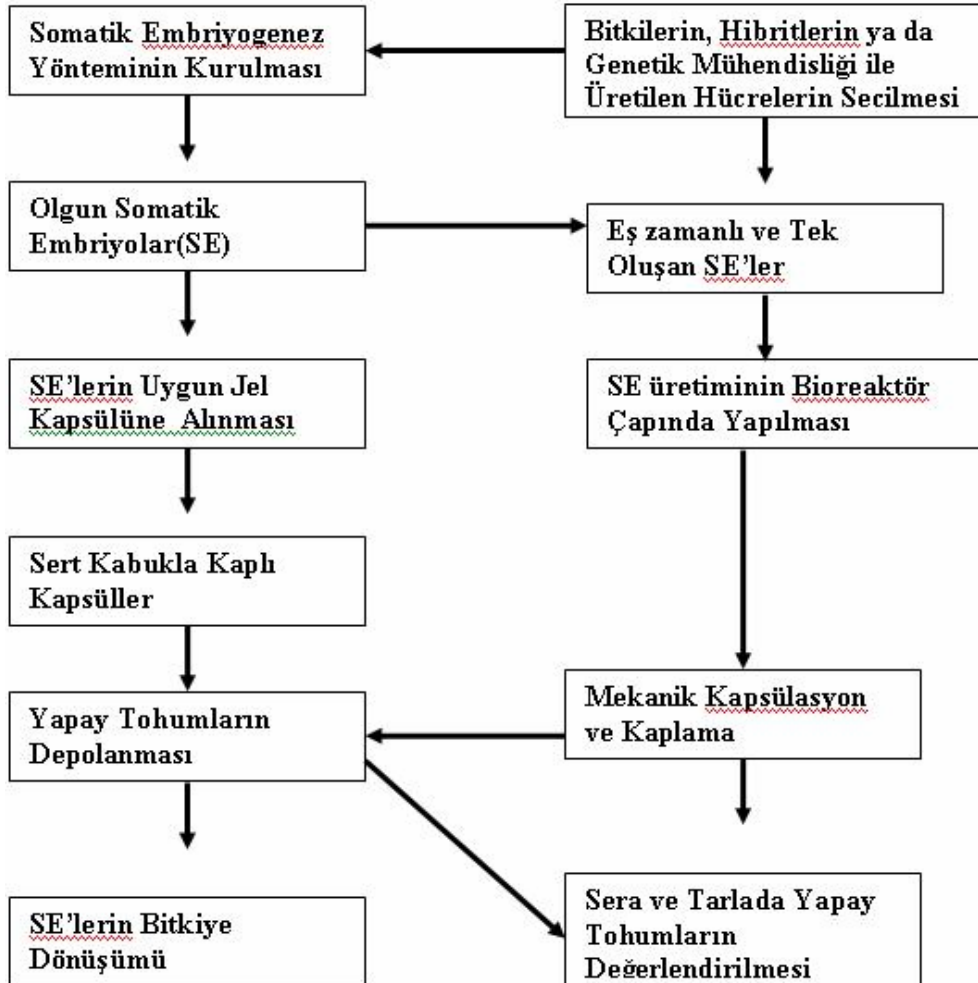
Zigotik tohum ile sentetik tohum arasındaki fark; zigotik embriyonun çimlenme sırasında besin kaynağı olarak kullanacağı endosperm-depo kotiledonlarına ve tohum kabuğuna sahip olması buna karşı somatik embriyonun bunların hiçbirine sahip olmamasıdır. Somatik embriyoların tohum olarak kullanılabilmesi için ekim ve çimlenme sırasında canlı kalmalarını sağlayacak ve bitkinin ilk gelişim sürecinde, gerekli besin maddelerini verecek bir sisteme ihtiyaçları vardır (Şekil 6). Bu amaç için sentetik tohum yapımında üç farklı teknik kullanılmaktadır (Babaoğlu vd., 2001):

1. Somatik embriyoların kaplanması,
2. Kurutulmuş ve kaplanmamış embriyoların ekimi,
3. Somatik embriyoların sıvı içerisine ekimidir.

Sentetik tohum elde etmek için izlenecek basamaklar, genel olarak farklı türlerde denense de benzer işlemlerden meydana gelir (Şekil 7).



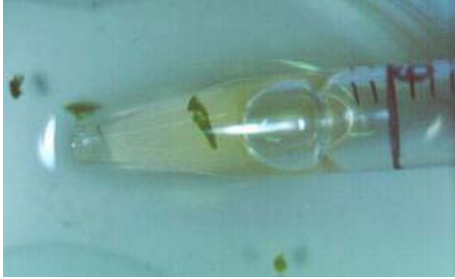
Şekil 6 Tohumdaki embriyo gelişimiyle *in vitro* koşullardaki somatik embriyo gelişiminin karşılaştırılması. A. Tohumdaki embriyo suspensör yoluyla ve direkt endospermden besin alabilir. B. Proembriyonal kompleksten gelişen embriyo yalnızca dar (solda) veya geniş (sağda) suspensör bağlantısıyla besin alır. C. İmbibisyon ve çimlenme süresince tohumdaki embriyo, tohum dokularıyla substrattan ayrılır. Okla gösterilen likit arayüzey tohum kabuğuyla bağlantılıdır. D. Çimlenme sürecinde somatik embriyo okla gösterilen likit arayüzey yardımıyla substratla direkt temasıdır (Gray ve Purohit, 1991).



Şekil 7. Sentetik tohum elde edilebilmesi için izlenecek basamaklar (Redenbaugh vd., 1987).

4. SOMATİK EMBRİYOLARIN KAPLANMASI

Sentetik tohum üretiminde, embriyolar kapsül şeklinde bir ortam içine alınarak kaplanır. Böylece gerçek endosperme benzer yapay bir yapı oluşturulabilir. Bu ortam içine alınabilecek birimler, 2-3 mm büyüklüğünde kesilen sürgün tomurcukları veya uygun metotla üretilmiş somatik embriyolardır. 5 mm'den büyük olan birimler bloklamaya uygun değildir. Çeşitli besin maddeleri ilavesi ile kapsülasyon jeli hazırlanır ve sürgün tomurcukları veya somatik embriyolarla karıştırılır. Bu şekilde hazırlanan kapsülasyon jeli ile embriyo karışımı, steril 10 ml'lik pipete çekilir (Şekil 8). Katılaştırma çözeltisi içine embriyoların yüklendiği jel damlatılır. Burada jel sertleşir ve içinde embriyo bulunan kapsül boncuk şeklini alır. Dikilene kadar sentetik tohumun dormant kalması için kapsüller suda çözülebilen reçine ile kaplanır (Redenbaugh vd., 1986,1987; Shu, 2003).



Şekil 8 Pipet içinde katılaştırma çözeltisine damlatılacak ortam ve somatik embriyo (Shu, 2003)

Sentetik tohum yapmak için somatik embriyoları kaplandığı ve sertleştirildiği jeller embriyoyu korumalı, çimlenmesine izin vermeli ve yeterince esnek olmalıdır. Buna karşılık taşıma, dağıtım, dikim işlemlerine dayanacak kadar katı ve sert olmalıdır (Shu, 2003).

Kapsül matriksi; yani jel çeşitli kaynaklardan elde edilir. Bunlar, bitkilerden (arap zamkı yada kitre zamkı), tohumlardan (keçiboynuzu, guar ya da tamarind yani (demirhindi meyvası-*Tamarindus indica*), deniz yosunlarından (agar, karragenan veya aljinat), mikroorganizmalardan (dekstran, gellan veya ksanthan zamkı) yapılan hidrojelldir (su tutabilen jel) (Tablo 1). Bu bileşikler uygun çözeltiler içinde sertleşir ve boncuklar haline gelir. Sertleştirme çözeltileri içinde iyon değişimi reaksiyonuyla boncuğun dış yüzünde stabil komplekslerin oluşumu sağlanır. Burada kullanılan elektrolitler bakır sülfat, kalsiyum klorür, amonyum klorürdür. Pek çok durumda bunun üstüne yapılan ikinci bir kaplama ile sentetik tohumda tohum kabuğunun yerini tutacak bir yapı oluşturulur (Redenbaugh vd., 1986; Shu, 2003).

Aljinat, sentetik tohum matriksi olarak sıklıkla seçilen önemli bir hidrojelldir. Bunun nedenleri ise, düşük toksisitesi, akışkanlığının az oluşu, hızlı jelasyon yeteneği ve maliyetinin düşük olmasıdır. Hızlı boncuk jelasyonu için "damlatarak katılaştırma

metodu" uygulanır. Embriyo yüklenmiş ve konsantrasyonu % 0.5-5.0 w/v arasında değişen sodyum alginat solusyonu, 30-100mM kalsiyum klorür solusyonu içine damlatılarak aljinat boncukları yapılabilir. Ardından boncuklar kalsiyum iyonlarının uzaklaştırılması için suyla yıkanır. Bu işlemi takiben 10-60 dakika içinde embriyo yüklü aljinat boncukları sertleşir. Aljinat kapsüllerin kolay ve seri üretilmelerine karşılık, suda eriyen besinlerini kolayca sızdırma, kök ve gövdenin ortaya çıkmasını engelleme gibi olumsuz yönleri de vardır. Aynı zamanda aljinat kapsüllerin saklanma süreleride çok kısadır. Yapışkan özelliğe olmaları ve hava ile temaslarında hızla kurumaları nedeniyle aljinat kaplı sentetik tohumların elle veya makineyle dikilmesi zordur. Su kaybederek kurumayı engellenmek için, kapsüller "Elvaks 4260" gibi bazı bileşiklerle (aliminyum monosterat, gluteralehidit, polilizin, poliprolin v.b.) kaplanır. Böylece kapsül yüzeyinin daha az hidrofilik olması sağlanır. Kaplanan ve kaplanmayan kapsüller arasında sürgün oluşturma oranı arasında fark yoktur (Redenbaugh vd., 1987; Onishi vd., 1994).

Kapsülün ya da boncukların sertleşmesi, solusyondaki maddelerin konsantrasyonuyla kontrol edilir. Kapsül ya da boncukların büyüklüğü, sürgün tomurcuğu ya da somatik embriyonun büyüklüğüyle ve pipetin iç çapıyla belirlenir. Embriyo taşıyan kapsüller yani sentetik tohumlar ayrılarak, katılaştırma solusyonuna veya suya batırılarak biriktirilir. Aljinat jel ile embriyoların kapsüle alınmasıyla sağlanan yararlar şunlardır (Onishi vd., 1994):

-Embriyoların mekanik zararlardan korunması,

-İçinin görünür olması ile kaliteli boncukların seçiminin yapılabilmesi,

-Transgenik bitki üretimi için maliyeti önemli derecede azaltmasıdır.

Damlatarak katılaştırma metodu kullanılarak bugüne kadar birkaç kapsülasyon aracı geliştirilmiştir (Kouma, 1989; Garret vd., 1991). Bunlarda embriyo taşıyan aljinat damlası, kalsiyum klorür solusyonu içeren katılaştırma kanalı içine damlatılır. Rastgele kapsülasyon yapan makine embriyo ile yüklü ya da embriyo ile yüklü olmayan jel boncuklarını yüksek hızda üretir. Araç 5 mm. çapında 1200 delikli bir tepsiye sahiptir (Şekil 9A). Embriyo ve aljinat karışımı kanaldan tabla üzerindeki deliklere akar. Tablanın orbital hareketi ile delik içinde belli hacim aljinat ve bir iki adet embriyo kalır. Bu da alt tabladaki katılaştırma çözeltisine düşer ve boncuk şeklini alır. 1000 ml'lik aljinat solusyonundan dakikada, 8000 adet boncuk yapılır. Bu boncukların bazısı embriyo içerirken bazısı embriyo içermeyebilir (Garret vd., 1991).

Garret ve arkadaşları (1991) yaptıkları sistemden, embriyo taşımayan kapsülleri ayırabilmek için sisteme bazı yeni bileşenler eklemiştir. Tabladan aşağı akan damlalar ışık kaynağı ve dijital kamera arasından geçer. Bu arada bilgi işlem kontrol siste-

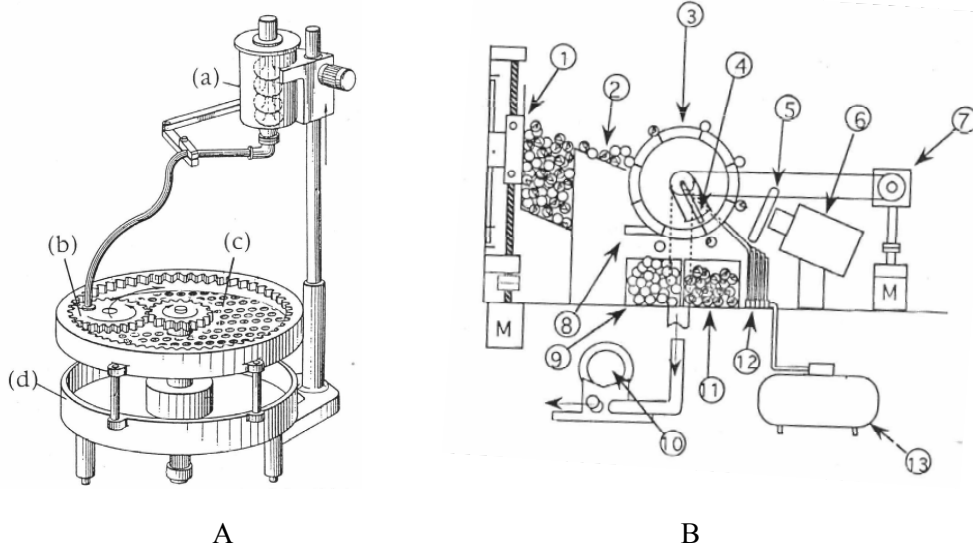
Tablo 1. Kaplama maddeleri (Redenbaugh vd., 1986)

JEL	KONSANTRASYON (w/v)	KATILAŞTIRMA AJANI	KONSANTRASYON mM
Sodyum veya Potasyum Aljinat	0.5-5.0	CaCl ₂ LaCl ₃ CoCl ₂ FeCl ₂ Ca(OH) ₂ Ca(NO ₃) ₂	30-100
Sodyum alginat Jelatinli	2.0 5.0	CaCl ₂	30-100
Karragenan(Carrageenan)	0.2-0.8	KCl	500
Karragenan	3.0	KCl NH ₄ Cl CaCl ₂	300-500 300-500 50-100
Guar sakızı	2.0	Sodyum tetraborat	100-120
Agar	5.0	Tannik asit	100
Tragakant sakızı	2.5	CaCl ₂	100
Sodyum Pektat	2.0	CaCl ₂ CuSO ₄	100 100
Karboksimetil selüloz	2.5	CuSO ₄	100

miyle taranır. Kontrol sistemi embriyo yüklü olmayan boncukları uzaklaştırır. Embriyo taşıyan damla geçişi olduğu zaman ise kontrol mekanizması bu damlayı katılaştırma çözeltisine düşürür ve embriyolu boncukların oluşmasını sağlar.

Sakamoto ve arkadaşları (1992) tarafından yapılan sistemde de hiç embriyo içermeyen veya ikiden fazla embriyo içeren boncuklar elde edilir. Bu araştırmacılar tarafından yapılan ikinci bir aletle elde edilen jel boncukları renklerine göre CCD kamera ile ayıklanır (Şekil 9B). Büyük standart alanlı koyu renk ta

şıyan boncuklar embriyo yüklü oldukları için üretim kutusuna dökülürken, küçük alanlı embriyo yüklenmemiş boncuklar, soluk-renksiz küçük olan boncuklar, yani düşük kaliteli embriyo taşıyan boncuklar uzaklaştırılır. Bu sistem ile embriyo ile yüklü olmayan boncuklar, sistemden ayrıldığı için kaliteli embriyoların olduğu boncuklar bitki üretiminde başarı yüzdesini artırır. *Ipomoea batatas* (tatlı patates)'de yapılan bir çalışmada, embriyolar büyüklüklerine, renklerine, şekillerine göre kamera ile ayrılmış ve sonuçta çimlenme yüzdesi artırılmıştır (Padmanabhan, 1998).



Şekil 9. A. Somatik embriyoları kapsülleme aleti. (a) Embriyoları taşıyan aljinat solusyonununun yerleştirildiği çark, (b) Delikli tablaya bu solusyonun yerleştirilmesini sağlayan dişliler, (c) 5 mm çapında, 1200 delik içeren tabla, (d) Aljinat solusyonu damlalarının sertleştiği hazne. B. Embriyo taşıyan ve taşımayan jel boncukları ayırma aleti. (1)Zıplatici, (2)Atış levhası, (3)Döner halka, (4)Dışarı atış kafası, (5)Işık, (6)CCD kamera, (7)İndeks, (8)Sıyırma fırçası, (9)Boş kapsülleri toplama kutusu, (10)Hava akımı sağlayan parça, (11)Ürün toplayıcı, (12)Elektrik, (13)Hava kompresörü (Onishi vd., 1994).

Bu şekilde kapsüle alınmış embriyoların çok mükemmel durumda olmalarına rağmen çimlenmedikleri gözlenmiştir. Bunun sebebinin jelin sertliği, esnek olmaması ve dış kısım geçirgen olmadığından içerideki oksijenin azlığıdır. Sakamoto ve arkadaşları (1992) yukarıdaki zorlukları ortadan kaldıran ve su ile temasta jel yatağın yarılmasını sağlayan bir metod geliştirmişlerdir. Bu metoda göre kalsiyum klorür çözeltisinde 10 dakika kalarak sertleşen boncuklar, musluk suyunda 3 saat yıkanarak yüzeydeki fazla kalsiyum iyonları akıtılır. Kendi kendine kırılmayı sağlamak amacı ile 60 dakika potasyum nitrat çözeltisi ile muamele edilir. Potasyum iyonları kalsiyum ile yer değiştirir. Ardından 40 dakika musluk suyu ile yıkanır ve kapsüller şişer. Bu şekilde hazırlanmış olan sentetik tohumlar nemli ve düşük elektrik iletkenliği olan toprağa dikildiğinde kapsül incilir ve bir müddet sonrada kendiliğinden yarılarak açılır (Şekil 10).

Pek çok araştırmacı çoğaltılmalarında değişik problemler olan, hızlı çoğaltılmaları önemli olan türlerde çalışmalar yapmaktadır.

Gupta ve Duran (1987) *Pinus taeda* L. proembriyolarından alınan eksplantlardan kurulan MS süspansiyon kültürlerinde somatik embriyolar elde edilmiştir. %1'lik sodyum aljinat ve bundan elde edilen somatik embriyolu damlacıklar 100 mM kalsiyum nitrat içerisinde 8-10 dakika bekletilmişlerdir. Elde edilen bu sentetik tohumlar soğukta saklanmışlardır. Gupta vd. (1987) aynı zamanda likit nitrojen ile yapılan dondurarak saklama (Kriyo-koruma) işleminden sonra somatik poliembriyonik kitledeki değişiklikleri incelemişlerdir. *Pinus taeda* L. ve *Picea abies* (Norveç ladini)'in embriyojenik kallusları -196 °C'de saklanmıştır. Kriyo-koruyucu olarak dimetil sülfoksit (%10), polietilen glikol(%8), glukoz(%10) kullanılmıştır. Plastik viyaller veya alüminyum zarflar içerisinde dondurulan hücre kitleleri hızlı bir şekilde eritilir ve değiştirilerek hazırlanmış MS alt kültür ortamına yerleştirilir. Dondurulmamış hücrelerin 1 gramından 12-13 somatik embriyo elde edilirken dondurularak saklanan hücrelerin 1 gramından ise 6-7 somatik embriyo elde olmuştur. Sonradan eritilen hücrelerin gelişimi 5. haftada inhibe olmaktadır. 30. güne kadar alt kültüre aldıktan sonra inhibisyon ortadan kalkmaktadır. Sonuçlara göre sıvı nitrojende uzun süreli embriyojenik hücre hatlarının depolanması ağaç gelişim programları için uygulanabilir.

Carica papaya L.'nin 2mm çapındaki somatik embriyoları çok miktarda sıvı MS ortamında üretildikten sonra sadece %2.5 sodyum aljinatla sentetik

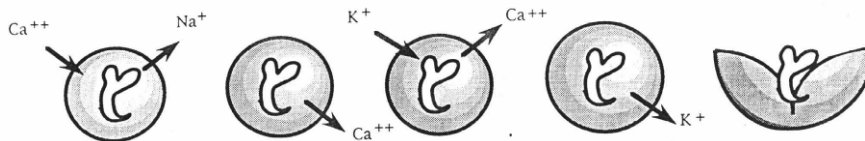
tohumları üretilmişlerdir. Kapsüllerde besin tuzlarının varlığı veya yokluğu, sodyum aljinat konsantrasyonu ve CaCl_2 'de bekletme süresi bunlardan bitki elde edilmesini etkilemektedir. %2.5 sodyum aljinatla, MS tuzlarını kullanarak ve CaCl_2 'de 10 dakika bekleme süresi sonucunda en iyi çimlenme yüzdesi %77 olarak bulunmuştur (Castillo vd., 1998).

Asparagus officinalis L.'de ön kapsülasyon işlemi yapılmadan sentetik tohumlar ekilirse çimlenme toprakta gerçekleşmemektedir. Ön kapsülasyon işleminde bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmaz. Kısa kökleri çıkmış olan somatik embriyolar kapsülasyon işlemine girebilir. Bu embriyolar toprakta %72 oranında çimlenebilirler (Mamiya ve Sakamoto, 2001).

İpekçi ve Gözükırmızı (2003) ekonomik olarak önemli bir tür olan *Paulownia elongata*'da hızlı çoğaltım amacıyla yaptıkları çalışmada öncelikle yaprak ve internodal bölgeden aldıkları eksplantlarda direk somatik embriyogenezi gerçekleştirmişlerdir. 7 gün içerisinde globular evrede görülmeye başlayan somatik embriyolar olgunlaşmaları için MS17 ortamına alınmıştır. Olgunlaşan somatik embriyolar %3 sodyum aljinat kullanılarak 50mM CaCl_2 'de 30 dakika bekletilerek kapsüle alınmışlardır. Bu kapsüller 30-60 gün arasında 4 °C'de saklandıklarında çimlenme yüzdelilerindeki değişikliklere bakılmıştır. Soğukta saklanmayan kapsüllerdeki embriyolar %53.3 oranında çimlenirken, 30-60 gün saklanan kapsüllerdeki embriyoların sırasıyla %43.2 ve %32.4 oranında çimlendiği belirlenmiştir.

Ananas comosus L. Merr.'deki dormant yan tomurcuklardan çok sayıda sürgünün bulunduğu püsküller elde edilir. 2-5 mm'lik ince sürgünler püskülden ayırılarak %3'lük sodyum aljinat ile kapsül içine alınır. Bu kapsüller 4°C'de 45 güne kadar saklanabilir. Bu yeni çoğaltım yöntemiyle ananasda sentetik tohumla üretim gerçekleştirilmiştir (Soneji vd., 2002).

Maruyama ve ark. (2003) sawara servi ağacının (*Chamaecyparis pisifera* Sieb. Et Zucc.) somatik embriyolarını Woody Plant (WP) ortamında elde etmişler ve %2'lik sodyum aljinat damlalarını %1.4'lük kalsiyum klorid içerisine damlatarak sentetik tohumlar üretmişlerdir. Steril ve steril olmayan ortamlarda yapay tohumlardan bitkiye dönüşüm oranını sırasıyla %60 ve %100 oranında elde edilmişlerdir. Somatik embriyolar orta-uzunlukta depolama için 4 °C'de ve uzun süreli depolamalarda sıvı nitrojende başarıyla korunmuştur. Bu yöntemlerle somatik embriyolar uzun süre saklanabilmektedir.



Şekil 10 Kendi kendine yarılan sentetik tohum (Onishi vd., 1994).

Capsicum annuum L.(tatlı biber)'de klasik hibrit tohum üretimi uzun süren bir işlemdir. F1 döllerinin büyük çoğunluğu sterilidir. Bu nedenle seçkin genotipleri çoğaltmada sentetik tohum üretimi yapılmıştır. Zigotik embriyo kültüründen elde edilen kolay dağılan, nodular ve sarı renkli kalluslardan sıvı MS ortamında torpedo evresine kadar somatik embriyolar geliştirilmiştir. 20 gün 0.5 mg/l ABA uygulanan somatik embriyolar %3'lük sodyum aljinat ile kapsüllenmiştir. Bunlardaki çimlenme oranı %58 iken kurutulan embriyolarda %40 bulunmuştur (Phonkajornyord vd., 2004).

Ağaçlarda da yapılan çalışmalar üretilmesi zor olan türler için ümit vermektedir. *Pinus patula* ağaçlarının vejetatif sürgün parçalarından elde edilen somatik embriyoların çimlenmesinde kapsülasyonda kullanılan sodyum aljinat konsantrasyonunun ve $CaCl_2$ 'de bekletme süresinin önemli olduğu görülmüştür. En iyi çimlenme olan %89 çimlenme oranı %2.5 sodyum aljinat ve 5 dakika $CaCl_2$ 'de bekleme süresi denenerek elde edilmiştir. 2 °C'de 120 gün depolanma sonucunda çimlenme oranında bir düşme olmamıştır (Malabadi ve Staden, 2005).

Farklı maddeler kullanılmasıyla hazırlanan kapsüllerin depolanması oldukça zor olmaktadır. Bunun nedeni kapsüller içerisindeki embriyoların solunum yapması ve nemli ortamda saklanmazsa kapsüllerin hızla kurumasıdır. Bunun yanında kurumayı önlemek içinde hidrofobik bir membranla kaplanma yapılabilir (Redenbaugh, 1990). Ayrıca yukarıda anlattığımız denemelerin dışında eczacılıkta kullanılan ilaç kapsülleri içerisine embriyoların yerleştirilmesiyle sentetik tohum üretilmeye çalışılmıştır. Kapsülün iç yüzeyi su geçirmeyen tabakayla kaplanır. Bunun için polivinil klorid (PVC), polivinil asetat (PVA) ve benton kullanılır. Besin maddesinin sağlanmasını ve somatik embriyonun gelişimini kontrol etmek için bu işlem yapılır. Bu maddelerin seçimi akışkanlık ve besin maddelerini geçirmeme özelliklerine göre yapılır. Çimlenme ortamı ve embriyo kapsül içerisine yerleştirilir. Havuç somatik embriyolarında bu yöntem denemiş ve %90 başarı elde edilmiştir. Bu tip kapsülle de embriyo korunması sağlanmıştır (Dupuis ve ark., 1994).

5. YAPAY ENDOSPERM

Çimlenmenin başlangıcında embriyoya besin sağlayan bir sistem gereklidir. Bu amaçla serbest şekilli mikrokapsüllerin geliştirilmesi denenmiştir. Çapı 0.5 mm olan sakkaroz granülleri özel bir spreyle kaplanır. Jel boncukları içine bu mikrokapsüller konduğu zaman sakkaroz dereceli olarak serbest kalır. Kaplama vaksı, elvaks, resin ve sıcaklık bu serbest hale geçişi kontrol eder. 4°C'de sakkaroz hiç serbest kalmazken, 25°C'de 3 günden 3 haftaya kadar değişen bir zaman dilimi içinde kaplamanın miktarına bağlı olarak serbest kalır (Onishi vd., 1994). Kapsül matriksi içine bitki propagüllerinin gelişimine yardımcı olacak başka maddeler eklenebilir. Örneğin, besin maddeleri, bitki büyüme düzenleyicileri,

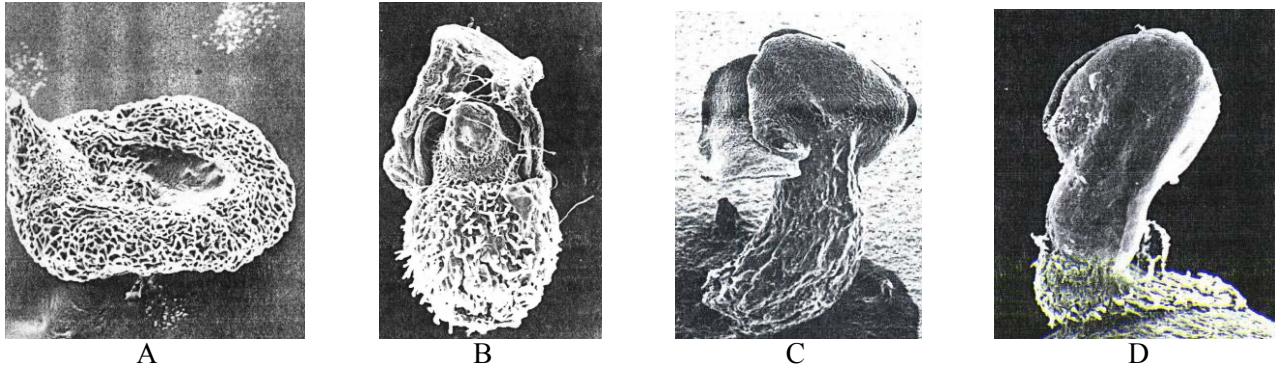
pestisid ve fungusitler bu amaçla kullanılabilir (Redenbaugh vd., 1987; Babaoğlu vd., 2001). Buna örnek olarak *Camellia japonica*'da yapılan bir çalışmada somatik embriyoların kapsül matrikslerine %3 sükröz, giberellik asit, IAA ve kalsiyumun bulunmadığı MS bazal ortam tuzları eklenmediğinde *in vitro* çimlenme sıklığının etkilendiği görülmüştür. Bu matriks içine BAP ve IBA eklendiğinde sekonder embriyogenezin boncuklar içerisinde meydana geldiği gözlemiştir (Janeiro vd., 1997). *Citrus reticulata* Blanco.'da anter kültüründen elde edilen somatik embriyolar üç farklı deneme yapılarak çimlendirilmiştir. Hiçbir kapsülasyon işlemi yapılmayanlar, hormon eklenmemiş matriksle kapsülasyon, giberellik asit içeren yapay endospermle kapsülasyon denenmiştir. Sırasıyla bunlarda görülen çimlenme oranları %15, %26.7, %50'dir. Giberellik asit çimlenme oranı artırdığı gibi 4°C'de bir aylık depolama işleminden sonra da çimlenme oranı düşük olsa da, %25 oranında gerçekleşmesini sağlamıştır (Antonietta vd., 1999). Hibrit pirinç somatik embriyoları sentetik endosperm içerisine alınırken içerisine MS tuzları, %3 sükröz, IAA, NAA, BA ve aktif kömür eklenmiştir. Koruyucu olarak katılan bavistin, streptomisin çimlenme dönüşüme etkili olmamıştır. Çimlenme %52, dönüşüm %47 olarak tespit edilmiştir (Arun Kumar vd., 2005).

6. SOMATİK EMBRİYOLARIN KURUTULMASI

Normal gelişim gösteren zigotik embriyonun kotiledonlarında depo edilen protein, yağ, nişasta miktarları artar. Daha sonra besinlerin taşınması durur ve su kaybetmeye başlar. Pek çok bitkinin tohumu kuruyarak hayatta kalır (Şekil 11). Böylece birkaç yıl depo edilebilirler. 1980'lerin başlarındaki ilk sentetik tohum çalışmalarında, erken gelişme fazlarındaki somatik embriyolar kullanıldığından, bu genç embriyo yeterince depo yapamadığından kurutma işlemine tolerans gösteremiyor ve depo edilemiyorlardı. Daha sonra yapılan çalışmalarla somatik embriyolar geliştirilmiş içlerindeki depo maddeleri artırılmış ve kurutulmuş olarak uzun süre saklanabilmişlerdir (Babaoğlu vd., 2001). *Dactylis glomerata* somatik embriyoları %13 nem oranı kalıncaya kadar kurutulmuşlardır. Kurutulan embriyoların büyüklükleri azalmış, sarı renkli ve kırılğan hale gelmişlerdir. Embriyoların dış duvarları çökmüştür. Daha sonra 15 dakikada şişirilebilmişler ve bir işlemde geçmemiş olan embriyoların büyüklüklerine kısa zamanda ulaşmışlardır (Gray vd., 1987).

6.1 Kurumaya Tolerans

Kurumaya tolerans veya strese karşı cevap eğilimini açığa çıkarmak için somatik embriyoya ABA (absisik asit) ile ön muamele gereklidir. Yapılan ön işlemin tipi, uygulamanın süresi, muamele yapılan embriyonun evresi, kurumaya toleransı etkileyen kritik etmenlerdir. Kuruma oranı ise ikinci derecede önemlidir. Embriyolar olgunlaşmamışsa 1 haftadan daha uzun sürede kurumaları optimaldir. Olgun emb-



Şekil 11 Kurutulmuş ve su almış *Dactylis glomerata* ve *Vitis* somatik embriyolarının taramalı elektron mikroskopunda görünüşleri. A. Kurutulmuş *D. glomerata* somatik embriyosu. B. Su almış ve çimlenmeden sonra *D. glomerata* somatik embriyosu. Çimlenmenin ilk işareti olan kök tüyleri görülmekte. C. Kurutulmuş *Vitis* somatik embriyosu. D. Su almış *Vitis* somatik embriyosu (Gray ve Purohit, 1991).

riyolar çok sayıda ise steril kabinde kurutma tercih edilir. Somatik embriyoların kuruması, şeker metabolizmasında değişiklikleri tetikler. Yonca somatik embriyoları ile yapılan bir çalışmada kurumadan önce yüksek miktarlarda sakkaroz, glukoz ve fruktoz içeriği tespit edilmişken, kurumadan sonra glukoz ve fruktoz miktarlarının çok düştüğü tespit edilmiştir (Tablo 2). Nişasta ise oransal olarak artmıştır. Bu şekerlerin verdiği tolerans kurumaya karşı çok önemlidir (Horobowicz vd., 1995). *Eleothenococcus senticosus* erken kotiledon evresindeki somatik embriyoları %6 oranında sükröz bulunan ortamda olgunlaştırılır ve kurumaya toleransı artırılır (Choi ve Jeong, 2002). Yine yoncada elde edilen somatik embriyolar kotiledon evresinde ABA bulunan ortam içerisinde bekletilir. Optimal ABA'da bekletme süresinin 4 gün olduğu bulunmuştur. Daha sonra kurutulmuş embriyoların %60'ından bitki elde edilmiştir. Kurutmadan önce seçilerek işlem yapılan embriyolardan ise %90-100 oranında bitkiye dönüşüm tespit edilmiştir. Kurutulma işlemi geçiren somatik embriyolardan elde edilen fidelerin kurutma işlemi yapılmayanlara göre daha kuvvetli oldukları belirlenmiştir. Gerçek tohumlardan çıkan fideler ise kurutma işlemi çıkanlardan daha kuvvetlidir (Senaratna vd., 1990). Kerevizde yapılan bir çalışmada elde edilen somatik embriyolar hem kurutulmuş hemde kapsüller içerisine alınmıştır. Kurutulmuş embriyolardan bitki elde etme oranı %53-80'ken, kapsüllerden bitki elde etme oranı %25-45 arasında bulunmuştur. Türler göre sentetik tohum yapımında seçilen metodun farklı olabileceği görülmektedir (Onishi vd., 1992).

Tablo 2 Hızlı kurutmadan önce ve sonra yonca somatik embriyolarındaki çözülebilir şeker konsantrasyonları (mg/g dw) (Horobowicz vd., 1995)

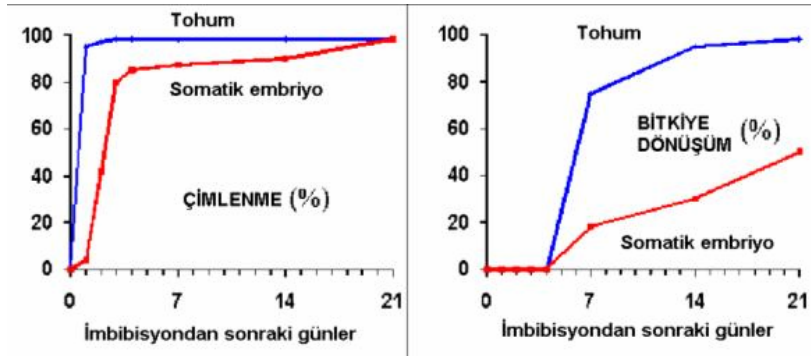
ŞEKER	ÖNCE	SONRA
Fruktoz	13.5	0.4
Glukoz	5.0	0.4
Sakkaroz	84.5	48.0
Raffinoz	14.7	9.2
Nişasta	16.6	10.9

7. SENTETİK TOHULARIN DİKİMİ

Normal bir tohum, çimlenmede su alır almaz kök oluşturur. Depo maddeleri hareketlenir. Kurutulmuş embriyoların ekim işleminde, embriyolar yapışkan bir jel ile karıştırıldıktan sonra toprağa püskürtülür. Bu yöntemde bitki gelişimini artırmak için jel içerisine sakkaroz da ilave edilmektedir. Bu yöntemin en önemli zararı embriyoların çimlenme ve bitkiye dönüşüm oranlarının düşük olmasıdır (Babaoğlu vd., 2001).

Kereviz ve havuçlarda, steril olmayan ekimlerde embriyo hücrelerinde klorofil oluştuğundan, dikimden sonra bu embriyolar ototrofik olarak beslenebilir. Kereviz somatik embriyoları, karbohidrat ve diğer besinlerin dışarıdan sağlandığı yapay ortamda, serada %50-80 oranında bitki oluşturmuştur. Yine kapsül içerisindeki havuç somatik embriyoları, dikimi takip eden 4. günde ilk yaprakları vermişlerdir. Bunların %50'sinin iki hafta içinde bitkiciğe dönüştüğü, 5. haftaya kadar pek çok bitkiciğin birkaç yaprağının oluştuğu gözlenmiştir (Onishi vd., 1994).

Kuru somatik embriyolarla normal tohumlar karşılaştırıldığında çimlenme yüzdelerinde çok fark görülmezken, kuru somatik embriyolardan fide elde edilmesi daha azdır (Şekil 12). Bunun nedeni açık değildir. Normal tohum çimlendikten sonra bazı kritik bileşenler endospermden sağlanır. Buna karşılık, somatik embriyolar az protein depo ederler. Tabii olarak depo protein düzeyleri kuvvetli olanlarda bitki oluşumu da fazladır. Somatik embriyolar nişasta ve sakkarozu depo ederler oysa tohumlarda galaktomannan adı verilen hücre duvarındaki hemiselüloz da endospermden depo edilir. Fakat bu karbohidrat somatik embriyoda da mevcut olmasına karşılık, kuru somatik embriyo depo edilen nişasta ve sakkarozu çimlenmede hızla tüketir. Tohumlarla karşılaştırıldığında kuru somatik embriyonun suyu içine alışması çok hızlıdır. Çünkü suyun geçmesi gereken bir tohum kabuğu yoktur. Hızlı hidrate oluş embriyolara zarar verir (Lai vd., 1995). Yapılan bir çalışmada *Citrus reticulata*'nın yapay endosperimli sentetik tohumları toprakta çimlenmemesine karşılık perlitte çimlenmişlerdir (Antonietta vd., 1999).



Şekil 12 Yonca (*Medicago sativa*)'nın kuru somatik embriyo ve tohumlarının çimlenme ve bitkiye dönme yüzdelere mukayesesi (Singh, 2005).

Zayıf çimlenmenin nedeni ise anormal apikal meristem veya plumula gelişimidir. Köksüz sürgün oluşumu bu fidelerde nadir görülür fakat sürgünsüz kök oluşumu daha yaygındır. Bu nedenle tohumlarla sentetik tohumların çimlenme oranları birbirlerine yakın olmasına rağmen bitkiye dönüşüm oranları zigotik embriyolara göre düşüktür. Depo proteini ve nişastası çimlenen somatik embriyoda hızla hidrolize olmasına karşılık, çimlenme ortamında besin maddeleri katılması ile kuru somatik embriyoların çimlenmesi ve fide oluşumu artırılır (Singh, 2005).

8. SENTETİK TOHUMUN MALİYETİ

Sentetik tohumun maliyeti, araştırma ve geliştirme çalışmalarının basitliğine veya karmaşıklığına bağlı olarak değişir. Örneğin kolay elde edilen bir embriyonun maliyeti ile genetik düzenlenmiş bir embriyonun maliyeti arasında fark vardır. Otomasyon sistemlerinin geliştirilmesi, pahalı olmasına karşılık çok miktarda üretim yapılması, bitki başına maliyeti çok düşürür. Üretimi daha çok el emeğine dayanan ve hidrate kapsülle alınmış yonca sentetik tohumundan serada yetiştirilen her bir bitkinin maliyeti 0,033 \$'dir. Çalışmaların başında olunması bir genelleme yapılmasını engellemektedir. Fakat teknoloji geliştikçe pek çok bitkide maliyetin düşmesine sebep olacaktır (Redenbaugh vd., 1987; Gray ve Purohit, 1991).

9. SENTETİK TOHUMUN ÖNEMİ VE KULLANIM ALANLARI

Sentetik tohum, tohum üretmeyen bitkilerin, hibrid süs bitkilerinin (çelikle üretilen) veya poliploid bitkilerin elit türlerinin üretilmesinde kullanılabilir. Doku kültürüne cevap vermeyen bitkilerin (mango, kakao ve hindistan cevizi gibi) sentetik tohum şeklinde germplazmalarının saklanması sağlar. Transgenik bitkilerde kaynak bitkinin (orjinal genotipin) somatik embriyo şeklinde korunmasını sağlar. Sentetik tohum bitki çoğaltımını kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda boyutları küçüktür. Depolama, işleme, nakletme ve dikme işlemlerinde sentetik tohumlar bize bazı üstünlükler sağlar. Sentetik tohumun potansiyel kullanımını şöyle özetleyebiliriz (Saiprasad, 2001):

Dağılım sisteminde;

1. Transplantların fiyatlarının düşürülmesinde,
2. Seçilmiş elit genotiplerin; elle tozlaştırılmış hibridlerin, genetik mühendisliği ile oluşturulmuş bitkilerin, steril ve stabil olmayan genotiplerin, doğrudan seraya ve tarlaya ekimlerinde,
3. Çok büyük alanda monokültürlerin yetiştirilmesinde,
4. Karışık-genotiplerin plantasyonunda,
5. Mikroorganizmalar, bitki büyüme regülatörleri, pestisidler, fungusitler, besin maddeleri ve antibiyotikler gibi adjuvanların taşıyıcısı olarak,
6. Mayoz bölünmede stabil olmayan elit genotiplerin üretilmesinde.

Analitik alet olarak;

1. Zigotik embriyogeni ile karşılaştırmada,
2. Çok miktarda benzer embriyo oluşturmada,
3. Endospermin embriyo gelişimi ve çimlenmedeki rolünün araştırılmasında,
4. Tohum kabuğu oluşumunu araştırmada,
5. Somaklonal dağılımın incelemesinde.

Sentetik tohum teknolojisi farklı ürünlerin çoğaltılması için ticari alanda pek çok üstünlük sağlamaktadır. Özellikle gerçek tohumları kullanılmayan veya patates gibi çoğaltım için mevcut tohumu olmayan, gerçek tohumu pahalı olan, hibrit pirinç gibi hibrit bitkiler ve enfeksiyonlara çokça eğilimi olan (sarı zambak, sarımsak, şeker kamışı, tatlı patatesi, üzüm ve mango) vejetatif olarak çoğaltılan pek çok bitki için yararlıdır. Ticari kullanımı olan aşağıdaki bitkilerin üretiminde başarı ile kullanılmaktadır: *Medicago sativa* (yonca), *Apium graveolens* (kereviz), *Cymbidium* (orkide), *Daucus carota* (havuç), *Dendrobium* (orkide), *Dioscorea ftoribunda*, *Gossypium hirsutum* (pamuk), *Medicago sativa*

(yonca), *Morus indica*, *Picorrhiza kruosa*, *Pogostemon patchouli*, *Phalaenopsis* (orkide), *Rheum emodi*, *Santalum album*, *Spathoglottis plicata* (orkide) ve Neem (*Azadirachta*).

KAYNAKLAR

- Adriani, M., Piccioni, E. and Standardi, A. (2000). Effect of different treatments on the conversation of 'Hayward' kiwifruit synthetic seeds to whole plants following encapsulation of in vitro-derived buds. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 28, 59-67.
- Antonietta, G.M., Emanuele, P. and Alvaro, S. (1999). Effects of encapsulation on *Citrus reticulata* Blanco somatic embryo conversion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55, 235-237.
- Arun Kumar, M.B., Vakeswaran, V. and Krishnasamy, V. (2005). Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81, 97-100.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S.. (2001). Bitki Biyoteknolojisi I. *Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Basımevi, 71-88,
- Castillo, B., Smith, M.A.L. and Yadava, U.L. (1998). Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. *Plant Cell Reports* 17, 172-176.
- Choi, Y.E. and Jeong, J.H. (2002). Dormancy induction of somatic embryos Siberian ginseng by high sucrose concentrations enhances the conservation of hydrated artificial seeds and dehydration resistance. *Plant Cell Reports* 20, 1112-1116.
- Danso, K.E. and Ford-Lloyd, B.V. (2003). Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm. *Plant Cell Reports* 21, 718-725.
- Debergh, P., Van Huylenbroeck, J., Werbrouck, S., Van Staden, J., Finnie, J. And Jäger, A. (11.1.2004). Synthetic seed.
- http://allserv.rug.ac.be/~pdebergh/emb/emb5_d02.htm
- Dupuis, J.M., Roffat, C., DeRose, R.T. and Molle, F. (1994). Pharmaceutical capsules as a coating system for artificial seeds. *Bio / Technology* 12, 385-389.
- Fujii, J.A., Slade, D., Aguirre Rascon, J., Redenbaugh, K. (1992). Field planting of alfalfa artificial seeds. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 28,73-80.
- Fujii, J.A., Slade, D., Redenbaugh, K. (1989). Maturation and greenhouse planting of alfalfa artificial seeds. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 25, 1179-1182.
- Garret, r.e., Smith, N.E., Mehlschav, J.J, and Ragenbough, M. K. (1991). Gel encapsulation of tomato seeds. *Appl. Eng.Agric.* 7 (1), 25-31.
- Gray, D.J., Conger, B.V. and Songstad, D.D. (1987). Desiccated Quiescent somatic embryos of orchardgrass for use as synthetic seeds. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 23(1), 29-33.
- Gray, D.J., Purohit, A. (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seed Technology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10, 33-61.
- Gupta, P.K. and Durzan, D.J. (1987). Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Bio/Technology* 5, 147-151.
- Gupta, P.K., Durzan, D.J. and Finkle, B.J. (1987). Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. *Canadian Journal of Forest Research* 17, 1130-1134.
- Horobowicz, M., Obendorf, R. L., McKersie, B. D. and Viands, D. R. (1995). Soluble saccharides and cyclitols in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos, leaflets and mature seeds. *Plant Science* 109, 191-198
- İpekçi, Z. and Gözükmızı, N. (2003). Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Reports* 22, 16-24.
- Janeiro, L.V., Ballester, A. and Vieitez, A.M. (1997) In vitro response of encapsulated somatic embryos camellia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51, 119-125.
- Kouma, Y. (1989).Method of applying gel coating to plant seeds. United States Patent 4, 808.430.
- Lai, F. M., Lecouteux, C.G., McKersie, B.D. (1995). Germination of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds and somatic embryos. I. Mobilization of storage reserves. *J. Plant Physiology* 145, 507-513.
- Malabadi, R.B. and Staden, J. (2005). Storability and germination of sodium alginate encapsulated somatic embryos derived from the vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82, 259-265.

- Mamiya, K. and Sakamoto, Y. (2001). A method to produce encapsulatable units for synthetic seeds in *Asparagus officinalis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64, 27-32
- Maruyama, E., Hosoi, Y. and Ishii, K. (2003). Somatic embryo culture for propagation, artificial seed production, and conservation of sawara cypress (*Chamaecyparis pisifera* Sieb. Et Zucc.). *Journal of Forest Research* 8, 1-8.
- McKersie, B.D., Senaratna, T., Bowley, S. R., Brown, D.C.W., Krochko, J.E. and Bewley, J.D. (1989). Application of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa (*Medicago sativa*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 25, 1183-1188.
- Molle, F., Dupuis, J.M., Ducos, J.P., Anselm, A., Crolus-Savidan, I., Petiard, V. and Freyssinet, G. (1993). Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic Seeds. 257-288. In: *Synseeds. Applications of synthetic seeds to crop improvement*. Redenbaugh, K. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Murashige, T. ve Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Nyende, A.B., Schittenhelm, S., Mix-Wagner and Greef, J.M. (2002). Synthetic potato seeds offer the potential to improve the Kenyan seed system. *Landbauforschung Völkenrode* 52(3), 141-148
- Onishi, N., Mashiko, T. and Okamoto, A. (1992) Cultural system producing encapsulatable units of synthetic seeds in celery. *Acta Horticulturae* 319, 113-118.
- Onishi, N., Sakamoto, Y. and Hirosawa, T. (1994). Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39, 137-145.
- Padmanabhan, K., Cantliffe, D.J. and Harelle, R.C. (1998). Computer vision analysis of somatic embryos of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] for assessing their ability to convert to plants. *Plant Cell Reports* 17, 681-684.
- Phonkajornyord P., Pawelzik, E. and Vearasilp, S. (2004). Dry synthetic seed production and desiccation tolerance induction in somatic embryo of sweet pepper. *Deutscher Tropentag*, October 5-7, Berlin.
- Piccioni, E. (1997) Plantlets from encapsulated micropropagated buds of M.26 apple rootstock. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47, 255-260.
- Raven, P.H., Evert, R.F. ve Eichhorn, S.E. (1999). *Biology of Plants*, W.H. Freeman and Company /Worth Publishers 555-569.
- Redenbaugh, K. (1990). Application of artificial seed to tropical crops. *HortScience* 25(3), 251-255.
- Redenbaugh, K., Paasch, B.D., Nichol, J.W., Kossler, M.E., Viss, P.R. ve Walker, K.A. (1986). Somatic seeds: Encapsulation of asexual plant embryos. *Bio / Technology* 4, 797-801.
- Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, P.R. ve Fujii, J.A. (1987). Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *HortScience* 22(5), 803-809.
- Saiprasad G. V. S. (2001). Artificial Seeds and their Applications. *Resonance*, 39-46.
- Sakamoto, Y., Mashiko, T., Suzuki, A., Kawata, H. and Iwasaki, A. (1992). Development of encapsulating technology for synthetic seeds. *Acta Horticulturae* 319, 71-76.
- Senaratna, T., McKersie, B.D. and Bowley S. R. (1990). Artificial seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L.) induction of desiccation tolerance in somatic embryos *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 26, 85-90.
- Shu, W. (14.11.2003). Artificial plant seed production. http://www.sp.edu.sg/schools/cls/bioline_08.htm
- Sicurani, M., Piccioni, E. and Standardi, A. (2001). Micropropagation and preparation of synthetic seed in M.26 apple rootstock I: Attempts towards saving labor in the production of adventitious shoot tips suitable for encapsulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66, 207-216.
- Singh, F. (11.3.2005). Artificial seed on the way. The Tribune, Agricultural Tribune India on line ed. <http://www.tribuneindia.com/2003/20030106/agro.htm#1>.
- Somatic Embryogenesis: The Development Of Synthetic Seeds. (11.2.2004) <http://www.plant.uoguelph.ca/research/embryo/synseeds.htm>
- Soneji J.R., Rao, P.S. and Mhatre, M. (2002). Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Plant Cell Reports* 20, 891-894.
- Stuart, D.A., Strickland, S.G. and Walker, K.E. (1987). Bioreactor production of alfalfa somatic embryos. *HortScience* 22(5), 800-803.
- Ünal, M. (1988). Bitki Embriyolojisi İstanbul.



Hatice ÇÖLGEÇEN, 1972’de Ankara’da doğdu. İlk, orta lise öğrenimini Ankara’da tamamladı. 1996’da Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden bölüm birincisi olarak mezun oldu. 1999’da “Bilim Uzmanı”, 2005’de “Fen Doktoru” ünvanını aldı. Aynı yıl Zonguldak

Karaelmas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde “Yardımcı Doçent Doktor” ünvanını aldı. Evli ve iki çocuk annesidir



M. Cihat Toker, 1943’de İstanbul’da doğdu. İlk, orta lise tahsilini Ankara’da tamamladı. 1966 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesine Tabii İlimler Bölümünden mezun oldu. 1972’de “Bilim Uzmanı”, 1975’de “Fen Doktoru” ünvanını aldı. 1984’de “Yardımcı Doçent Doktor”, 1989’ da “Doçent”,

2000’de “Profesör” ünvanını aldı. Halen Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Botanik Anabilim Dalı Başkanı olarak görev yapmaktadır. Evlidir.