TARIMSAL VE ENDÜSTRİYEL BİYOTEKNOLOJİ UYGULAMALARI - BİYOEKONOMİ

EDİTÖR: Dr. Kaan HÜRKAN

Yazarlar:
Doç. Dr. Arzu ÜNAL
Dr. Adnan AYDIN
Dr. Kaan HÜRKAN
Uzm. Biyolog Yasemin KEMEÇ HÜRKAN

İKSAD
Publishing House

TARIMSAL VE ENDÜSTRİYEL

BİYOTEKNOLOJİ UYGULAMALARI - BİYOEKONOMİ

Editör:

Dr. Kaan HÜRKAN

Yazarlar:

Doç. Dr. Arzu ÜNAL

Dr. Adnan AYDIN

Dr. Kaan HÜRKAN

Uzm. Biyolog Yasemin KEMEÇ HÜRKAN

İKSAD
Publishing House

Copyright © 2020 by iksad publishing house
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or transmitted in any form or by
any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of
brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses permitted by copyright law. Institution of Economic Development and Social
Researches Publications®
(The Licence Number of Publicator: 2014/31220)
TURKEY TR: +90 342 606 06 75
USA: +1 631 685 0 853
E mail: iksadyayinevi@gmail.com
www.iksadyayinevi.com

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.
Iksad Publications – 2020©

ISBN: 978-625-7914-98-7
Cover Design: İbrahim KAYA
April / 2020
Ankara / Turkey
Size = 16 x 24 cm

İÇİNDEKİLER

EDİTÖRDEN

ÖNSÖZ

Dr. Kaan HÜRKAN……3

BÖLÜM 1

BİTKİSEL ÜRÜNLERİN GÜVENİRLİĞİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN BAZI MODERN MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÖNTEMLERİ

Dr. Kaan HÜRKAN……5

BÖLÜM 2

BİTKİ ISLAHINDA MOLEKÜLER BELİRTEÇLERİN KULLANIMI

Dr. Adnan AYDIN……39

BÖLÜM 3

BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİ

Uzm. Biyolog Yasemin KEMEÇ HÜRKAN……...71

BÖLÜM 4

ENDÜSTRİYEL BİYOTEKNOLOJİ UYGULAMALARI VE BİYOEKONOMİ

Doç. Dr. Arzu ÜNAL……...121

Sevgili kızım Doğa'ya…

ÖNSÖZ

Yeşil devrim ile başlayan tarımsal ürünlerdeki üretim artışı politikası, tarım yapılabilecek alan sayısının her geçen gün azalması, sanayi kaynaklı iklim değişikliğinin tarım bitkilerinde verim düşüşüne sebep olması ve en önemlisi insan nüfusunun hızlanarak artması ile sekteye uğramış durumdadır. Dünya nüfusunun 2050 yılında yaklaşık 10 milyara ulaşacağı düşünüldüğünde gittikçe azalan tarım alanlarında daha fazla ürün ve gittikçe bozulan iklimsel şartlarda daha verimli tarım ürünlerinin üretilmesi bir zorunluluk haline gelmiştir. Bu durum genetik mühendisliği, moleküler belirteçler, moleküler tanılama araçları, doku kültürü ve canlıların genetiğinin değiştirilmesi gibi bilimsel araç ve tekniklerin kullanıldığı tarımsal biyoteknolojinin önemini arttırmakta ve bu bilim dalını günümüz ve geleceğin en önemli bilim dalı haline gelmesini sağlamaktadır.

Bu kitapta gıda ürünlerinin moleküler biyoloji temelli teknikler ile nasıl tespit edilebileceği, moleküler belirteçlerin bitki ıslahında nasıl kullanılabileceği, doku kültürü ile tarımsal ürünlerin mikroçoğaltımlarının nasıl yapılabileceği ve endüstriyel biyoteknolojinin biyoekonomiye nasıl katkıları olabileceği konularına yer verilirken günümüz ve gelecekte ihtiyaç duyulacak biyoteknolojik yöntemler detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

Her bir bölümü, konusunda uzman akademisyenlerce yazılmış olan bu kitabın Lisans, Yüksek Lisans ve Doktora öğrencilerine rehberlik etmesini diliyorum.

Kitabın hazırlanmasında emeği geçen kıymetli yazarlara, kitabın basım ve yayımında bizlere destek olan İktisadi Kalkınma ve Sosyal Araştırmalar Enstitüsü (İKSAD) yayınevine ve ismi kitapta yer almayan fakat kitabın hazırlanmasında emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Editör
12 Nisan 2020

BÖLÜM 1

BİTKİSEL ÜRÜNLERİN GÜVENİRLİĞİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN BAZI MODERN MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÖNTEMLERİ

Dr. Kaan HÜRKAN[1]

[1] Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Iğdır, Türkiye. kaan.hurkan@igdir.edu.tr

GİRİŞ

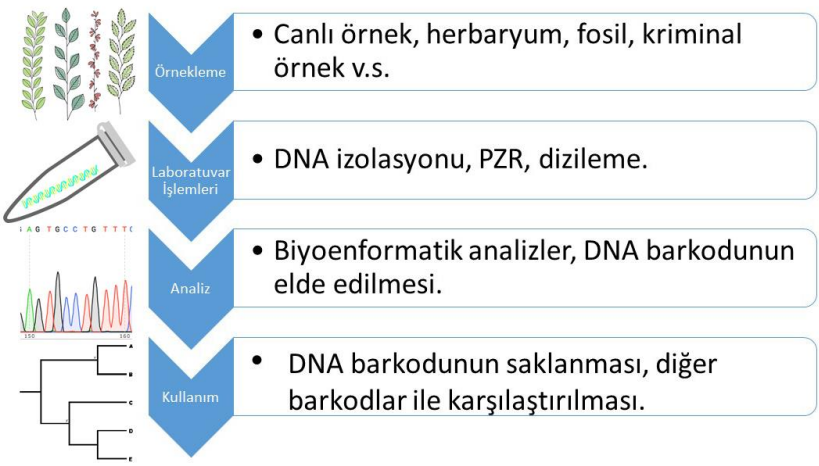
Bitkisel ürünler arasında coğrafi işareti alınmış, patent ile tescil edilmiş, çeşitli ödüller almış veya oldukça sınırlı alanlardan çok az miktarlarda elde edilebilir özellikte olanlar piyasada yüksek miktarda talep görmekte ve ekonomik açıdan daha yüksek değerlere imal edilerek satılmaktadır. Bu tip değerli ürünlerin içerisine daha ucuza mal edilen farklı içeriklerin karıştırılması ile tüketicilerin aldatılması oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. Hatta bu aldatmaca, tüketicilerin sağlığı üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilmektedir. Bu bölümde özellikle bitkisel ürünlerdeki aldatmacaların modern moleküler biyoloji yöntemleri ile tespit edilmesinde kullanılan başlıca yöntemler ele alınmıştır.

1. DNA BARKODLAMA YÖNTEMİ

DNA'nın molekül yapısının 1953 yılında ortaya çıkarılması ile birlikte moleküler biyolojide devrim yaşandı. DNA'yı oluşturan dört adet baz (Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin) yeryüzündeki tüm canlılarda ortak olarak bulunmaktadır. Bu dört bazın anlamlandırdığı nükleotitlerin DNA boyunca farklı sıralarda dizilmesi, biyolojik çeşitliliğin temelini oluşturmaktadır.

Genomda daha önceden belirlenmiş olan bölgelerde bulunan kısa (600 – 1500 bç) nükleotit dizilerinin ortaya çıkarılarak bu bölgelerin türleri birbirinden ayırt edebilmek amacıyla kullanılmasına DNA barkodlama denilmektedir (Lahaye ve diğerleri, 2008). Bu bölgelerde oluşan

mutasyonlar, türler arasında ve hatta genotipler arasında baz dizilişi farklılıklarını doğurarak canlıların birbirlerinden ayırt edilebilmelerini sağlamaktadır. Bu mutasyonlardan en temel olanı bir bazın, farklı bir baz ile yer değiştirdiği baz değişimi mutasyonudur. Eğer baz değişimleri aynı grup bazlar arasında gerçekleşiyorsa (ör: Pürin-Pürin veya Pirimidin-Pirimidin) bu mutasyona transisyon, eğer farklı grup bazlar arasında gerçekleşiyorsa (ör: Pürin-Pirimidin veya tam tersi) bu mutasyona transversiyon denilmektedir. Baz değişimleri haricinde DNA dizisinde bazı bazların eksilmesi (delesyon), baz eklenmesi (insersiyon) veya tekrar etmesi (duplikasyon) şeklinde de mutasyonlar olabilmektedir. Canlı genomundaki tüm bu değişimler, DNA barkodlamanın temel mantığını oluşturmaktadır. DNA barkodlama temel olarak DNA ekstraksiyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), DNA dizileme, Biyoenformatik analizler ve DNA barkodunun gen bankalarında saklanması aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. DNA Barkodlama İş Akışı Şeması

1.1. DNA Barkodlamada Temel İş Akışı

1.1.1. DNA ekstraksiyonu

DNA barkodlamada ilk adım, DNA molekülünün organizmadan başarılı ve temiz bir şekilde izole edilmesidir. Bu amaçla yapılan tüm işlemlere DNA ekstraksiyonu denilmektedir. Günümüzde DNA ekstraksiyonunu kolaylaştırmak ve harcanan zamanı azaltmak için birçok firma tarafından farklı özelliklerde ticari DNA ekstraksiyon kitleri üretilmektedir. İster ticari kitler kullanılsın, isterse de manuel yöntemler, DNA ekstraksiyonu parçalama (liziz), çöktürme (presipitasyon) ve saflaştırma (pürifikasyon) şeklinde üç temel adımdan oluşmaktadır. Bu bölümde moleküler biyoloji laboratuvarlarında en yaygın kullanılan DNA ekstraksiyonu yöntemi olan değiştirilmiş Doyle & Doyle 1987 yöntemi anlatılmıştır (Doyle ve Doyle 1987).

Değiştirilmiş Doyle & Doyle (1987) DNA Ekstraksiyon Yöntemi

- Yaklaşık 50 mg yaprak dokusu sıvı azot kullanılarak toz haline getirilir,
- Toz 1,5 ml'lik tüp içerisine alınır ve tüpe 700 µl %2 CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) içeren ekstraksiyon tamponu [20 mM EDTA, 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 1,4 M NaCl, %2 CTAB ve %0,4 β-mercaptoethanol (kullanılmadan hemen önce)] eklenir,
- Karışım 65°C'de 45 dakika boyunca her 15 dakikada bir hafifçe karıştırılarak bekletilir,

- Karışıma 500 µl kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenir ve tüp 1 dakika boyunca hafifçe karıştırılır,
- Örnek 12000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edilir, oluşan üst fazdan yaklaşık 600 µl'lik kısım mikropipet aracılığı ile dikkatlice alınarak yeni tüpe aktarılır ve üzerine tekrar 500 µl kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenerek 12000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edilir,
- Üst fazdan 500 µl'lik kısım yeni tüpe alınarak üzerine 700 µl soğuk (-20°C) izopropanol eklenir, hafifçe karıştırıldıktan sonra 12000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edilir ve bu aşamada DNA molekülünün tüpün tabanına yapıştığı gözlemlenir,
- DNA'ya yapışan tuz kalıntısının giderilmesi için oluşan DNA peleti 700 µl % 70 etanol ile iki defa yıkanır,
- Tüp ters çevrilerek etanolün tamamen kuruması beklenir,
- Son adımda DNA peletinin çözünmesi için tüpe 100 µl TE tamponu [10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0] eklenir ve 37°C'de bir saat bekletildikten sonra -20°C'de saklanır.

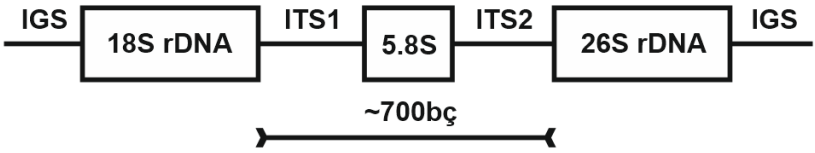
1.1.2. Barkod Bölgelerinin Seçimi

DNA barkod bölgelerinin geliştirilmesi ve test edilmesi her bitki grubu için ayrı ayrı yapılması gereken uzun bir süreci kapsamaktadır. Farklı canlı gruplarına ait DNA bölgelerinin farklı hızlarda değişime uğraması, tüm canlılar için evrensel bir barkod bölgesinin kullanılamamasına neden olmaktadır (Hollingsworth ve diğerleri, 2009). Mitokondri genomunda bulunan *sitokrom oksidaz-1* (*CO1*)

geni tüm hayvan gruplarında kullanılabilirken, daha karmaşık genoma sahip bitkiler için farklı barkod bölgelerinin kullanılması gerekmektedir. Bu bölümde bitkilerde en yaygın kullanılan barkod bölgelerinden ITS, *LEAFY*, *rbc*L, *mat*K, *acc*D-*psa*I ve *trn*H-*psb*A üzerinde durulacaktır.

Internal Transcribed Spacer (Transkripsiyonu Yapılan İç Ara Bölgeler – ITS)

ITS bölgesi kromozomal DNA üzerinde, ribozomun küçük alt birimi ile büyük alt birimini kodlayan genler arasında bulunan ve bitkilerde yaklaşık 600 – 750 bç uzunluğunda olan bölgedir ve genomda yüzlerce kopyası bulunmaktadır (Şekil 2).



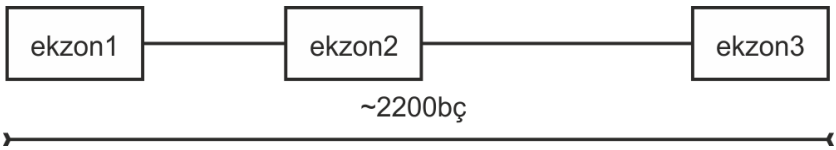
Şekil 2. ITS Bölgesinin Yapısı Ve Pozisyonu (Hürkan, 2017). IGS: Intergenic Spacer (Genler Arası Bölge)

ITS bölgesi gen kodlamayan ITS1 ve ITS2 ile birlikte bu bölgelerin arasında bulunan ile birlikte gen kodlamasında görev alan 5.8S bölgelerinden oluşmaktadır. Bitkilerde ITS bölgesinin tamamının PZR ile çoğaltılmasında genellikle evrensel bağlanma özelliğine sahip bir primer ile birlikte sadece kapalı tohumlulara (angiosperm) bağlanan bir primer kullanılmaktadır. Fakat oldukça karmaşık genoma sahip olan bitkilerde bu primer setinin her zaman için çalışma garantisi

yoktur. Bu nedenle farklı bitki grupları için özelleşmiş primer setleri kullanılmalı veya tasarlanmalıdır. Ayrıca ITS bölgesi mantarlarda da bulunduğu için primerler tasarlanırken en az bir tanesinin bitkilere özgü olması, PZR aşamasında spesifik olmayan ürünlerin oluşumunun önüne geçecektir. Yaygın olarak kullanılan ve kapalı tohumlulara özgü ITS primerleri Baldwin ve diğerleri (1995), tarafından tasarlanmış ve uzun yıllar kullanılmıştır. Yakın bir zamanda ise Cheng ve diğerleri (2016), tarafından tasarlanan yeni nesil primerler bilim insanlarının kullanımına sunulmuştur.

LEAFY

Arabidopsis türlerinde çiçek meristem dokusunun gelişiminde görevli olan ve çiçeklenme zamanını kontrol eden LEAFY geni kromozomal DNA'da bulunmaktadır ve diploit kapalı tohumlularda sadece bir kopyasının bulunduğu bilinmektedir (Balquez ve diğerleri, 1997). Bu gen tohumlu bitkilerde oldukça korunmuştur ve üç ekzon ile iki intron bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 3).



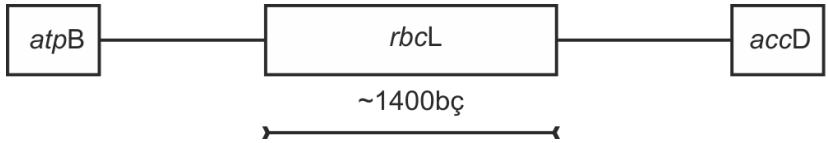
Şekil 3. LEAFY Bölgesinin Yapısı (Hürkan, 2017)

LEAFY bölgesi genomda tek kopya olarak bulunduğundan ITS bölgesinde olduğu gibi fonksiyonel olmayan kopyalarının PZR ile çoğaltılması riski içermemektedir. LEAFY bölgesinin iç kısmında bulunan intron bölgeleri polimorfizme açık bölgelerdir ve özellikle tür

ve tür altı sistematik kategorilerde çözünürlüğü oldukça başarılıdır (Oh ve Potter, 2003). Yaklaşık 2200 bç uzunluğunda bir bölge olduğu için en az iki çift primer kullanılarak çoğaltılması gerekmektedir.

***rbc*L**

Kloroplast kökenli olan *rbc*L ribulose-1,5-bis-phosphate carboxylase / oxygenase (RuBisCO) enzimini kodlayan bir gen bölgesidir (Chase ve diğerleri, 1993). Kloroplast genomunda *atp*B ve *acc*D genleri arasında bulunmaktadır (Şekil 4). Hem gen kodladığı için hem de kloroplast kökenli (maternal kalıtım göstermektedir) olduğu için polimorfizm oranı düşüktür ve bu nedenle cins ve üstü sistematik kategoriler için kullanılması uygundur (Li ve diğerleri, 2015).

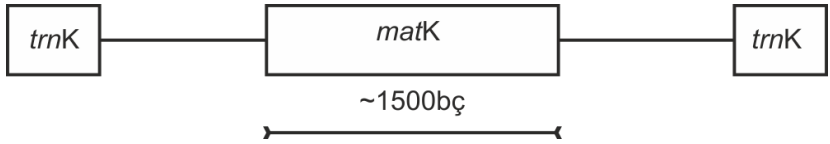


Şekil 4. Rbcl Bölgesinin Yapısı (Hürkan, 2017)

GenBank veri tabanında (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) bitkilere ait 173 bin *rbc*L nükleotit dizisi bulunmaktadır ve bitkilerde en çok kullanılan DNA barkod bölgeleri arasındadır. rbcL bölgesinin uzunluğu yaklaşık 1400 bç olduğundan iki çift primer seti kullanılarak çoğaltılması önerilmektedir.

***mat*K**

*Maturase*K kloroplast kökenlidir, iki *trn*K ekzonu arasında bulunur ve kapalı tohumlularda yaklaşık 1500 bç uzunluğundadır (Hilu ve diğerleri, 1999) (Şekil 5).

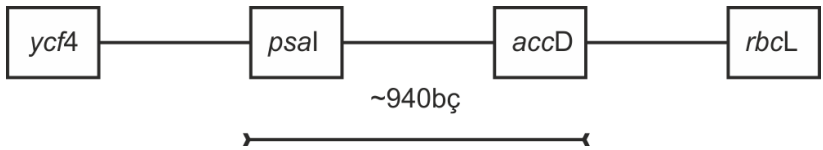


Şekil 5. Matk Bölgesinin Yapısı (Hürkan, 2017)

matK bölgesi, ITS bölgesine göre daha düşük transisyon/transversiyon oranına sahiptir ve uzunluk olarak barkodlama için kullanılmaya uygundur (Min ve Mickey, 2007). matK bölgesinin diğer kloroplast bölgelerine göre daha hızlı evrim geçiren bir bölge olması, tür sistematik kategorisinde kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Lahaye ve diğerleri (2008), bölgeyi tek primer çifti ile çoğaltmayı başarabilmişken, Cuenoud ve diğerleri (2002), bölgenin iki parça halinde toplam dört primer çifti ile çoğaltılmasını önermişlerdir.

***acc*D-*psa*I**

Bu bölge kloroplast kökenlidir. İki gen ve bir genler arası bölgeden oluşan barkod bölgesinin toplam uzunluğu yaklaşık 940 bç'dir (Şekil 6). Kodlayan bölge içerdiğinden dolayı dizileme sonrasında çoklu dizi hizalaması işleminde oldukça sorunsuz bir bölgedir.

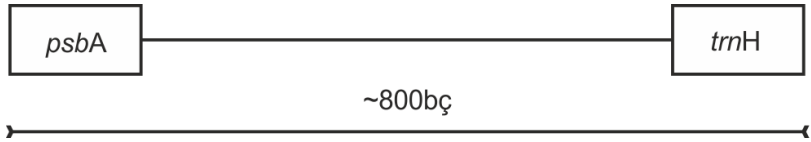


Şekil 6. *Acc*d-*Psa*ı Bölgesinin Yapısı (Hürkan, 2017)

Bölgenin PZR ile çoğaltılabilmesi için gerekli primer çifti Dong ve diğerleri (2012), tarafından verilmiştir. Bu bölge bazı bitki gruplarında yer almamaktadır ve bazı bitki gruplarında ise çok fazla polimorfik olduğundan dolayı barkod bölgesi olarak kullanılmadan önce, kullanılması planlanan bitki grubu için detaylı literatür incelemesi yapılması ve primerlerin çok dikkatli seçilmesi veya tasarlanması gerekmektedir.

***trn*H-*psb*A**

Gen bankası veri tabanı incelendiğinde son dönemlerde en çok tercih edilen kloroplast kökenli barkod bölgelerinden biri olduğu görülmektedir. Bu barkodlama bölgesinin 5' ve 3' bölgelerinde birer ekzon bulunması primer tasarımını kolaylaştırmaktadır (Şekil 7).



Şekil 7. *Trn*h-*Psb*a Bölgesinin Yapısı (Hürkan, 2017)

Tüm barkod bölgelerinde olduğu gibi bu bölgede de intron alanı oldukça polimorfiktir ve bu polimorfizmler genellikle insersiyon veya delesyon şeklindedir (Kress ve Erickson, 2007). İntron bölgesinin geniş bitki gruplarında çok fazla polimorfizm göstermesi, çoklu dizi hizalaması sırasında karmaşıklıklara yol açabilmektedir (Chang ve diğerleri, 2006). Bazı açık tohumlularda (gymnosperm) ve tek çeneklilerde (monokotil) intron bölgesinin duplikasyona uğramasıyla

barkod bölgesi 1000 bç'den daha uzun olabilmektedir (Hollingsworth ve diğerleri, 2009).

1.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Her bölünme öncesinde hücre içerisinde (*in vivo*) gerçekleşen DNA replikasyonu ile genetik materyal iki katına çıkar ve yavru hücrelere aktarılır. Bu replikasyon sırasında hücre içerisinde birçok enzim aktif rol oynar. DNA'nın hücre dışında, tüp içerisinde (*in vitro*) çoğaltılması tekniği ilk defa Kary B. Mullis tarafından 1985 yılında geliştirilmiş ve bu tekniğin adı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) olarak adlandırılmıştır. Bu teknik ile birlikte bilim insanları, hücre içi biyokimyasal olaylara ihtiyaç duymadan DNA'nın herhangi bir bölgesinin milyonlarca kopyasını elde edebilme fırsatı bulmuşlar ve moleküler biyoloji çalışmalarında bu andan itibaren devrim yaşanmıştır. Başlarda oldukça yavaş ve zahmetli olan PZR, sıcaklığa dayanıklı bir enzim olan *Taq* Polimeraz Enziminin, jeotermal bölgelerde yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilerek PZR'de kullanılmaya başlaması ile son derece pratik ve kolayca uygulanabilir hale gelmiştir. PZR tekniğinde, hücre içi replikasyonun aksine DNA sarmalının gevşemesini, her iki iplikçiğin replikasyon sırasında açık kalmasını, replikasyonun nerede yapılacağını bildiren primer parçalarının sentezlenmesini, RNA parçalarının çıkarılmasını ve DNA parçalarının birbirine bağlanmasını sağlayan enzimlere ihtiyaç duyulmamaktadır. PZR için ihtiyaç duyulan tek enzim, primerlere nükleotit eklenmesini sağlayan DNA polimeraz enzimidir.

Standart bir PZR karışımında yer alan maddeler şu şekilde sıralanabilir;

- ✓ Kalıp DNA
- ✓ Reaksiyon Tamponu
- ✓ dNTP'ler (ATP, GTP, CTP, TTP)
- ✓ İleri ve geri primerler
- ✓ *Taq* polimeraz
- ✓ Nükleaz içermeyen saf su

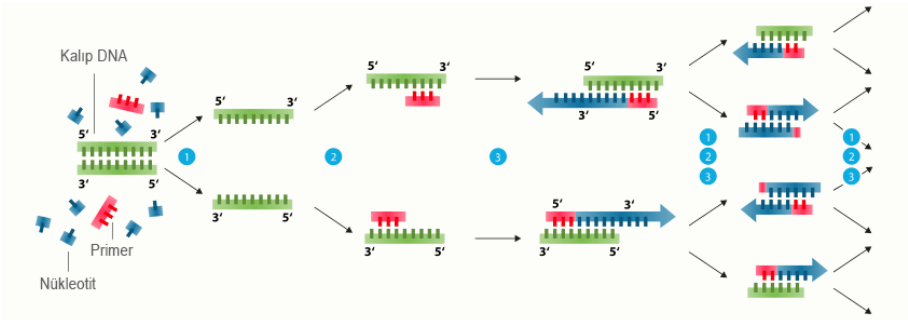
PZR basamakları şu şekildedir;

Denatürasyon: Bu aşamada kalıp DNA'nın ikili sarmal yapısı (dsDNA) yüksek sıcaklıkta (~94ºC) bozularak denatüre olur ve tek iplikçikli (ssDNA) forma dönüşür. Böylelikle primerlerin bağanması için kalıplık edecek DNA zinciri oluşur.

Bağlanma: Bu aşamada birbirinin tamamlayıcısı olan primerler (ssDNA) ile kalıp DNA (ssDNA) eşleşir ve dsDNA'yı oluşturur. Kalıp DNA ile primerler arasında iyonik bağlar oluşur ve kırılması oldukça zordur. Primerlerin bağlandığı bölgeler, *Taq* polimeraz tarafından tanınır ve karşı zincirin sentezlenmesi için başlangıç noktasını oluşturur. Bağlanma sıcaklığı primerin uzunluğunda, Guanin / Sitozin içeriğine göre değişebilmektedir.

Uzama: Uzama aşaması, *Taq* polimeraz enziminin nükleotitleri art arda yerleştirerek kalıp zincire bir tamamlayıcı (komplementer) zincir oluşturması aşamasıdır. Bu aşamanın sonucunda çift iplikçikli DNA

oluşur. Uzamanın gerçekleştirileceği sıcaklık *Taq* polimeraz enziminin özelliğine bağlıdır. Bu sıcaklık genel olarak bağlanma sıcaklığı ile denatürasyon sıcaklığı arasındadır ve optimum sıcaklık 72ºC'dir. *Taq* polimeraz, primerleri 5′ → 3′ yönünde dizer. Uzama aşamasının süresi, çoğaltılacak bölgenin uzunluğu ve *Taq* polimeraz enziminin hızı ile belirlenir. Bu süre 1000bç için genellikle 1 dakikadır. İdeal şartlarda, her bir döngü sonrasında ürün miktarı ikiye katlanmaktadır. Otuz döngüden oluşan bir PZR'de kopya sayısı reaksiyon tamamlandığında 2^{30}=1073741824'e ulaşabilmektedir.

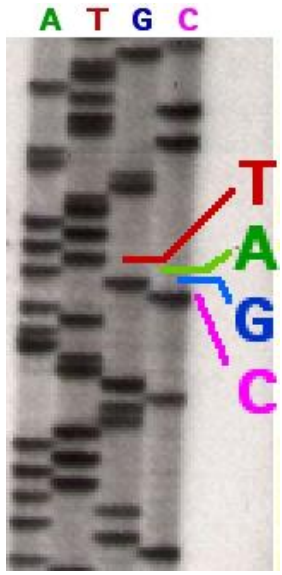


Şekil 8. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kalıp DNA'nın Çoğalma Aşamaları (Aryal, 2018)

1.1.4. Zincir sonlandırma yöntemi (Sanger Dizileme) ile DNA dizileme

Kısa DNA parçalarındaki nükleotit dizilerini ortaya çıkarmanın birçok yöntemi mevcuttur. Günümüz de dâhil bu yöntemlerden en çok kullanılanı Sanger dizileme yöntemidir. Yöntem Frederick Sanger tarafından 1977 yılında geliştirilmiştir ve temeli DNA polimeraz aktivitesi ile dideoksinükleotittrifosfatlar (ddNTP) kullanılarak zincir sonlandırılmasına dayanır. Reaksiyon tıpkı klasik PZR gibi başlar,

fakat farklı floresan boyalar ile işaretlenen ddNTP'ler her bir uzama reaksiyonunu sonlandırır (Şekil 9). Her bir reaksiyonun, hangi ddNTP ile sonlandırıldığı floresan boya seviyesini okuyan bir algılayıcı ile tespit edilir. Bilgisayar ortamına aktarılan floresan verileri Adenin için yeşil, Guanin için siyah, Timin için kırmızı ve Sitozin için mavi renkte temsil edilir ve bir elektroferogram verisi oluşturulur (Şekil 10). Elektroferogramda her renk bir nükleotiti ve floresan sinyal gücünü gösterir.



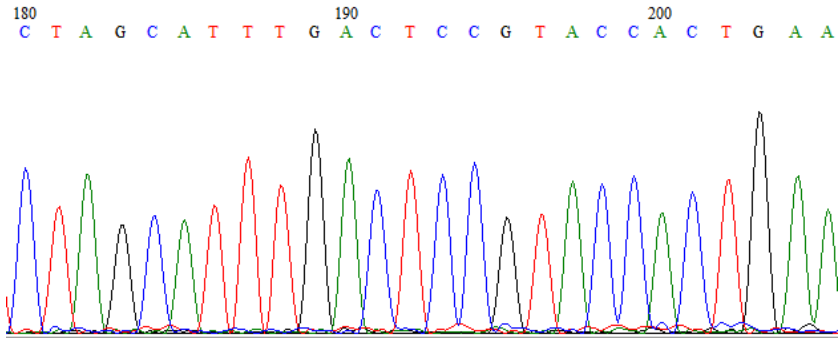
Şekil 9. Sanger Yöntemi İle Gerçekleştirilen DNA Dizileme İşleminde Floresan Boyalı ddNTP'lar DNA Polimeraz İle Uzatılmaya Başlanan Zincirleri Sonlandırır
(Https://En.Wikipedia.Org/Wiki/Sanger_Sequencing#/Media/File:Sequencing.Jpg)

1.1.5. Temel biyoenformatik analizler

Her laboratuvar işleminin ardından olduğu gibi DNA barkodlama sürecinde de laboratuvar işlemleri tamamlandığında elde edilen

verilerin bilgisayar ortamında (*in silico*) işlenmesi ve anlamlı bir sonuç haline getirilmesi gerekmektedir. Verilerin bilgisayar ortamında işlenmesi süreci, en az laboratuvar işlemleri kadar titizlikle gerçekleştirilmelidir. Çünkü verilerin işlenmesi sırasında oluşabilecek hatalar DNA barkodlarını doğrudan etkilemektedir.

Sanger DNA dizileme sonuçları, araştırıcılara ab1 dosya formatında teslim edilir. Bu dosya içerisinde hem nükleotit dizileri hem de elektroferogram verileri yer alır (Şekil 10).



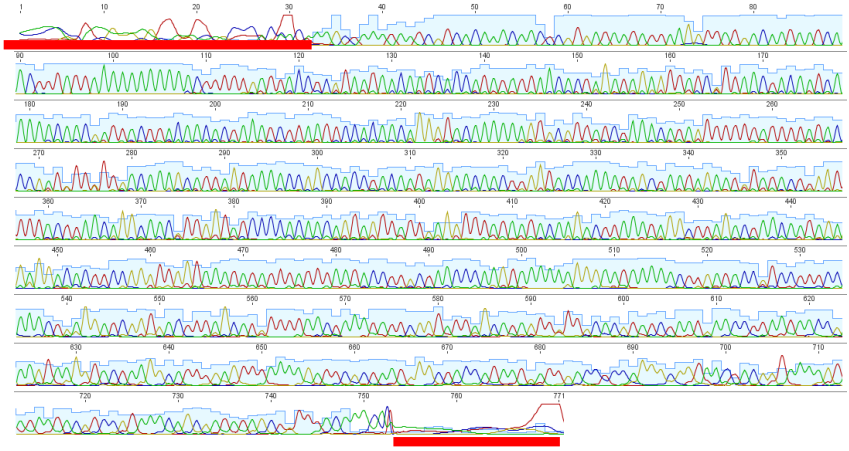
Şekil 10. DNA Dizileme İşlemi Sonucunda Oluşturulan Elektroferogram Verisi Görünümü

DNA dizleme dosyasını bilgisayarda görüntüleyebilmek için birçok farklı yazılım kullanılabilir. Bunlardan ücretsiz olan bazı yazılımlar;

- BioEdit (Hall, 1999)
- FinchTV (https://digitalworldbiology.com/FinchTV)
- Chromas (http://technelysium.com.au/wp/chromas/)
- MEGA (https://www.megasoftware.net/)
- Chromatogram Explorer (http://www.dnabaser.com/download/chromatogram-explorer/)
- Seqverter (http://www.genestudio.com/download_seq.htm)

Yukarıda listelenen ücretsiz yazılımlar veya satın alınabilecek daha kapsamlı yazılımlar ile ab1 formatındaki elektroferogram dosyaları açılıp düzenlenebilir ve DNA dizi verileri herhangi bir metin düzenleyicisi tarafından açılabilir özelliğe sahip olan FASTA formatına dönüştürülebilir.

DNA dizileme dosyası üzerinde yapılacak ilk işlem, dizi verilerinin başında ve sonunda bulunan düşük kaliteli okumaların temizlenmesidir ve bu işlem "trim" olarak adlandırılır (Şekil 11).

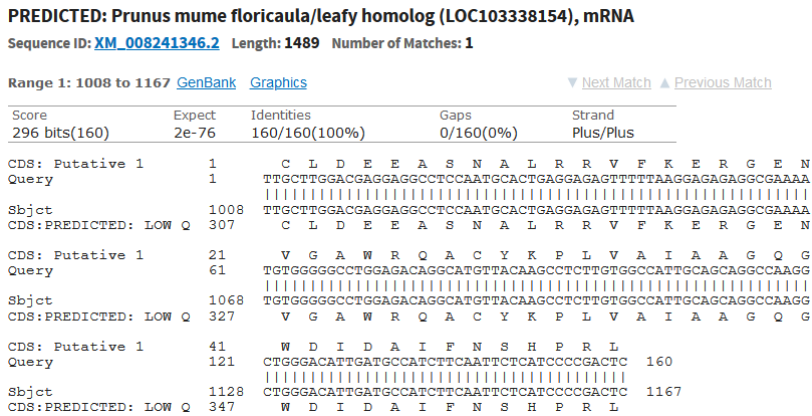


Şekil 11. DNA Dizileme Dosyasında Her İki Uçta Bulunan Ve Temizlenmesi Gereken Düşük Kaliteli Bölgelerin Görünümü (Kırmızı İle Gösterilmiştir)

Düşük kaliteli okuma bölgelerinin temizlenmesinin ardından doğru bölgenin dizilendiğini teyit etmek amacıyla National Center for Biotechnology Information (NCBI) hizmetinde bulunan Basic Local Search Alignment Tool (BLASTn - https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) kullanılarak nükleotit BLAST işlemi yapılması ve eşleşen

sonuçların incelenerek istenilen organizmaya ait olduğu kontrol edilmelidir. Beklenen organizma yerine farklı ve filogenetik açıdan uzak bir organizma ile yüksek oranda eşleşme sağlanıyorsa, laboratuvar işlemlerinde bulaşma (kontaminasyon) durumundan veya DNA dizileme hizmetinin alındığı biyoteknoloji firmasından kaynaklı bir sorun olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır ve tüm işlemler titizlikle kontrol edilmelidir.

Elde edilen barkod bölgesinin kodlayan dizi (coding sequence – CDS) içermesi durumunda bu bölgenin etiketlenmesi (annotation), daha sonra yapılacak çalışmalarda kolaylık sağlayacaktır. Etiketleme işlemi için birçok yöntem mevcuttur. Basit ve ücretsiz olan yöntem, elde edilen barkod bölgesine BLASTn işleminin uygulanması ve sonuç gösterim ekranında "Alignment" sekmesinin altında bulunan "CDS" seçeneğinin işaretlenmesidir (Şekil 12). Böylelikle barkod dizisinde kodlayan bölgeler, NCBI veri tabanında bulunan kodlayan bölgeler ile eşleştirilecektir (Şekil 12).



Şekil 12. LFY Barkod Bölgesinin Blastn İşlemi Sonrasında CDS Seçeneği İle Kodlayan Bölgesinin Gösterimi

Yukarıda belirtilen temel biyoenformatik analizler gerçekleştirildikten sonra DNA barkod bölgeleri, çalışmanın amacına göre ileri biyoenformatik analizler için hazır duruma gelmektedir.

Değerlendirme

DNA yapısının detaylı bir şekilde keşfedilmesinden sonra, genomda bulunan kısa DNA dizilerinin bitki sistematiğinde ve filogenisinde kullanımı, hem bitki sistematikçileri hem de moleküler biyologlar için bir dönüm noktası olmuştur. Klasik morfolojiye dayalı sistematik, özellikler karmaşık bitki gruplarında (Ör: orkideler) türlerin ve hatta cinslerin birbirlerinden ayrımı noktasında tıkanmış durumdadır.

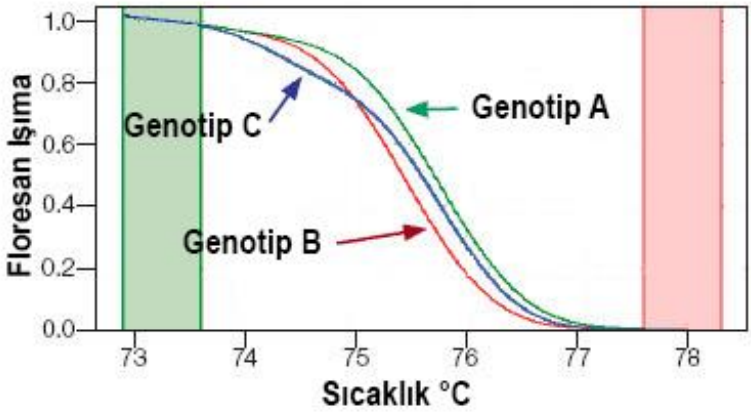
DNA barkodlama, sistematik ve filogenetik kullanım avantajlarının yanı sıra, bitkisel ve hayvansal ürünlerin içeriklerinin tespitinde de oldukça sık kullanılmaktadır. Bitkisel ürünlerin güvenirliğinin kontrolünde ve gıda aldatmacalarının tespit edilmesinde yukarıda değinilen DNA barkodlama bölgeleri yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Analizler öncesinde, üzerinde çalışılacak olan bitki grubuna özel DNA barkodlama bölgesinin belirlenmesi için literatür taraması titizlikle yapılmalı, gerekli görüldüğü durumlarda çalışılacak bitki grubuna özgü primerlerin sentezlenmesi gerektiği unutulmamalıdır.

2. GERÇEK-ZAMANLI KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEMELLİ YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME YÖNTEMİ (HIGH RESOLUTION MELTING VEYA HRM)

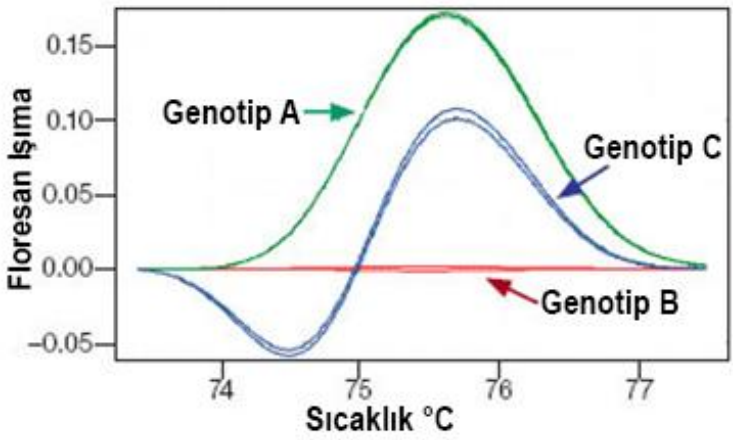
DNA'nın *in vitro* şartlarda polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle çoğaltılmaya başlandığı 1983 yılı, moleküler biyoloji için bir kilometre taşıdır. Teknik, temel olarak yüksek ısıya dayanıklı *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen polimeraz enziminin (*Taq* polimeraz) çok az miktardaki DNA'yı, tekrar eden döngüler halinde milyonlarca kopya halinde çoğaltmasına dayanır.

Gerçek-Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time qPCR), *in vitro* şartlarda çoğalan amplikonların çeşitli floresan boyalar ile işaretlenerek gerçek zamanlı olarak takip edilebildiği, çoğalmanın ne kadar oranda gerçekleştiğinin hesaplanabildiği ve hatta çoğalan amplikon sayısının belirlenebildiği bir yöntemdir. Çoğalmanın takip edilebilmesi ve hesaplanabilmesi, özellikle canlıların gen anlatım seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.
qPCR temelli oldukça yeni bir teknoloji olan HRM, amplikonlara kademeli olarak sıcaklık artışı uygulamasıyla floresan boyalı olan çift iplikçikli DNA'nın (dsDNA) denatüre olup tek iplikçikli DNA'ya (ssDNA) dönüşürken meydana gelen floresan ışıma oranındaki değişimin sürekli olarak ölçülmesine dayanır (Şekil 13 ve 14). DNA'nın denatürasyon süresi DNA molekülünün uzunluğuna, Guanin/Sitozin içeriğine ve içerdiği nükleotit çeşitlerine bağlıdır. Sıcaklık artışına bağlı olarak denatüre olan DNA'nın floresan ışıması

azalmaya başlar ve son derece hassas bir detektör tarafından algılanır. Sonuç olarak farklı amplikonlar farklı zamanlarda ışıma farklılığı gösterir ve bu şekilde tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) dahi son derece hassas olarak algılanır. HRM tekniğinin bu denli hassas oluşu, genotipleme, metilasyon seviyesinin ölçümü, popülasyon genetiği, gıda ürünlerindeki sahteciliğin tespiti, gıda güvenirliğinin korunması ve daha bir çok alanda kullanımına olanak sağlamaktadır.



Şekil 13. Farklı Genotiplere Ait HRM Erime Eğrileri



Şekil 14. Bir Genotipe (Genotip B) Normalleştirilmiş HRM Erime Eğrileri

HRM yönteminde işlem basamakları temelde şu şekilde sıralanmaktadır;

2.1. Çalışılacak Bitki Grubuna Özgü Moleküler Belirteçlerin Belirlenmesi

Tıpkı DNA barkodlamada olduğu gibi, HRM yönteminin doğru sonuçlar verebilmesi için doğru moleküler belirteçlerin (markır) seçilmesi gerekmektedir. HRM yönteminde sonucun doğruluğu, çalışılan bitki genotiplerinin birbirlerinden ayırt edilebilmeleri, yani qPCR ile çoğaltılacak bölgelerin SNP içermeleri anlamına gelmektedir. HRM yönteminin kullanıldığı çalışmalarda genomdaki basit dizi tekrarlarının (Simple Sequence Repeat veya SSR) oldukça yoğun olarak kullanıldığı görülmektedir. Bitki genetik çalışmalarında oldukça önemli rolü olan SSR belirteçler, özellikle genotipleme amacıyla uzun bir süredir kullanılmaktadır. Genom boyunca tekrar eden bu dizilerin tekrar sayıları ve motifleri (nükleotit sıralamaları), bitki gruplarının birbirlerinden ayırt edilebilmesine yardımcı olmaktadır.

Bitkisel ürünlerin ve gıda ürünlerinin HRM yöntemi ile analizleri yapılmadan önce, çalışılacak bitki grubuna özgü (spesifik) SSR belirteçler detaylı literatür taraması ile belirlenmelidir. Her Real-Time qPCR analizinde olduğu gibi en verimli sonuç için amplikon boyutunun 150 bç'den küçük olması (ideal olarak 120 bç) gerekmektedir.

HRM analizlerinde günümüzde SSR belirteçleri haricinde DNA barkod bölgeleri de kullanılmaya başlanmıştır ve bu yöntem BAR-HRM olarak isimlendirilmektedir. Filogenetik açıdan yakın bitki gruplarını ayırt edebilme gücüne sahip barkod bölgeleri, amplikon boyutu 150 bç'nin altında olacak şekilde yeni primerler tasarlanarak HRM analizleri için kullanılmaya uygun olmaktadır. Druml ve Cichna-Markl (2014), tarafından yapılan bir derleme makalede, HRM ile gıda ürünlerinin analizlerinin yapıldığı birçok çalışma derlenmiş ve hangi gıda ürünlerinde hangi HRM işaretçilerinin kullanımının yaygın olduğu tablo halinde verilmiştir.

2.2. HRM reaksiyonu

Oda sıcaklığında son derece durağan (stabil) olan çift iplikçikli DNA, artan sıcaklıklarda denatüre olur ve belirli sıcaklığa geldiğinde her bir iplikçik birbirinden ayrılmaktadır. Çift iplikçikli DNA'nın %50'sinin denatüre olduğu sıcaklık erime sıcaklığı (Melting Temperature veya Tm) olarak adlandırılmakta ve Tm, DNA parçasındaki nükleotit çeşidine, parçanın uzunluğuna ve Guanin/Sitozin içeriğine göre değişiklik göstermektedir. Guanin ve Sitozin bazları arasında bulunan üçlü hidrojen bağı, Adenin ve Timin arasındaki ikili hidrojen bağına göre daha sağlam olmakta ve daha yüksek Tm'da kopmaktadır. Bu da Guanin ve Sitozin bazlarınca zengin olan DNA parçalarının daha yüksek sıcaklıklarda denatüre olması anlamına gelmektedir. Bütün bu farkların tespit edilebilmesi DNA'nın floresan olarak boyanmasına bağlıdır. Örneğin SYBR® Green boyası, çift iplikçikli DNA'ya, nükleotit dizisi ne olursa olsun bağlanmaktadır. SYBR® Green çift

iplikçikli DNA'ya bağlanmadığı durumda oldukça az floresan parlaklığa sahipken, çift iplikçikli DNA'ya bağlandığı durumda son derece yüksek parlaklığa sahiptir. HRM sırasında kademeli olarak artan sıcaklık (ör: 0,05°C/s) DNA'yı denatüre edeceğinden floresan parlaklığında sürekli bir azalmaya neden olacaktır. Bu yöntemde hassas bir detektör tarafından ölçülen floresan parlaklık seviyesine ait veriler, yazılım tarafından sıcaklık değerleri ile bağdaştırılarak iki boyutlu bir grafik haline dönüştürülmekte ve reaksiyondaki genotipler arasındaki farklar ortaya çıkarılmaktadır.

2.3. Veri analizi

Sıcaklığın kademeli olarak arttırıldığı erime işlemi sırasında kaydedilen floresan parlama (F) ve sıcaklık (T) verileri cihaz tarafından sağlanan yazılım veya harici istatistik yazılımları kullanılarak anlamlı hale dönüştürülebilmektedir. Yazılım tarafından oluşturulan erime eğrileri arasındaki farklar, reaksiyona sokulan bitkisel ürünler arasındaki genotip, çeşit veya tür farklarını ortaya koymaktadır. Bir örnekle açıklamak gerekirse, sadece A bitkisinden elde edilmesi gereken bir bitkisel ürünün içerisinde farklı bitkisel katkı maddelerinin olduğundan şüphelenildiği durumda, HRM analizi A bitkisi referans alınarak gerçekleştirilir. Yani reaksiyona hem A bitkisi hem de şüphelenilen bitkisel ürün aynı anda dahil edilir ve sonuçta yazılım tarafından oluşturulan erime eğrilerinin A bitkisine ait erime eğrisi ile tam olarak örtüşüp örtüşmediği gözlemlenir. Tam olarak örtüşme durumunda bitkisel ürünün orijinalliği teyit edilirken,

farklı erime eğrilerinin görülmesi, bitkisel ürün içerisinde farklı katkı ürünlerinin olduğunu göstermektedir.

Değerlendirme

Son on yılda HRM yönteminin bitkisel gıda ürünlerinin orijinalliğinin belirlenmesinde, gıda ürünlerine eklenen katkı maddelerinin belirlenmesinde, gıda aldatmacasının tespitinde kullanılabilmesi için oldukça yoğun çalışmalar yapılmakta ve HRM yöntemine ve en çok gıda aldatmacasının yapıldığı bitkisel ürünlere özgü primerler geliştirilmektedir. Yöntemin düşük maliyetli, son derece hızlı ve en az laboratuvar işlemi kullanılarak gerçekleştirilebilir olması, gelecekte gıda ürünlerinin orijinalliğinin tespitinde güvenle kullanılabilecek bir yöntem olabileceğini biz araştırıcılara göstermektedir.

3. YENİ NESİL DİZİLEME TEMELLİ YÖNTEMLERE GENEL BİR BAKIŞ

Uzun yıllardır kullanılan ve DNA polimeraz enzimi ile zincir sonlandırmalı dideoksinükleotitlerin seçici olarak dâhil edilmesine dayanan Sanger dizileme yöntemi ilk defa 1977 yılında Frederick Sanger ve meslektaşları tarafından geliştirilmiştir. Yaklaşık 40 yıldan fazladır geniş çapta kullanılan bu yöntemin yerini günümüzde Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing veya NGS) almıştır. Patel ve diğerleri, 2006, tarafından gerçekleştirilen maliyet analizi çalışmasına göre Hepatit C virüsünün tespit edilebilmesi için Sanger dizilemede £178 (yaklaşık ₺1280) harcanması gerekirken NGS'de £119 (yaklaşık ₺856) harcanması yeterlidir (2020 yılı için yaklaşık

fiyatlandırma). Başta fark küçük gibi görünse de milyonlarca nükletitin olduğu genom dizileme söz konusu olduğunda bu fark on binlerce Türk Lirası'na denk gelmektedir. Sanger dizilemenin aksine, NGS'de paralel olarak aynı anda milyonlarca dizileme reaksiyonunun gerçekleştirilmesi, tüm dizileme işleminin oldukça kısa sürede gerçekleştirilmesini sağlamaktadır.

Tüm bu avantajları ile NGS, transkriptom dizilerinin ortaya çıkarılmasında, plastit ve çekirdek genomlarının ortaya çıkarılmasında günümüzde kullanılan en verimli yöntemdir. Farklı firmalar tarafından NGS sistemi sürekli olarak geliştirilmekte, firmalar arasındaki bu yoğun rekabet moleküler biyologlar ve biyoteknologların işlerini oldukça kolaylaştırmaktadır.

3.1. RNA-Seq

Moleküler biyoloji biliminde santral dogma, DNA'da genler içerisinde saklanan bilginin önce RNA'ya (transkripsiyon), sonra da proteine (translasyon) aktarılmasını tanımlamaktadır (Crick, 1970). DNA'da yer alan bu genetik bilginin fenotipe dönüşebilmesi, çevresel faktörlerin de dâhil olduğu birçok uyarana bağlıdır. Bu nedenle canlılarda fenotipin belirlenmesini sağlayan RNA'nın tamamının (transkriptom) dizilenmesi, canlıların genetik ve morfolojik ilişkilendirilmesi için önemli veriler sağlayabilmektedir.

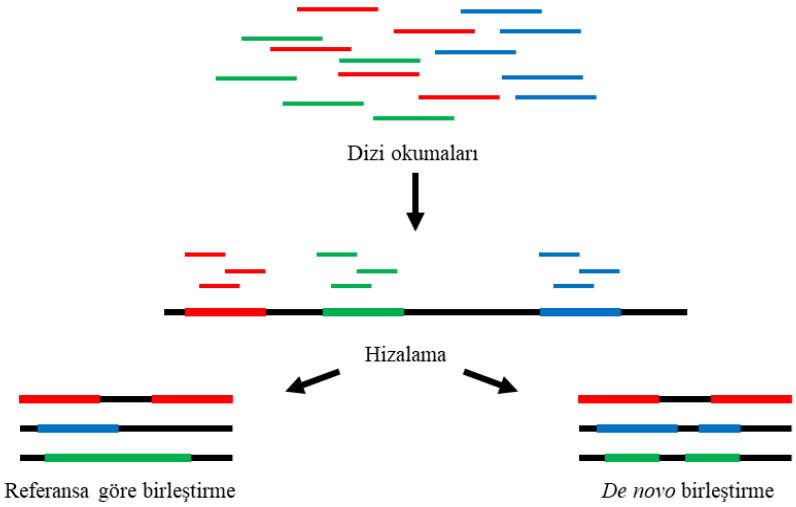
Yüksek verimli yeni nesil dizileme teknolojilerinin gelişimi, transkriptomiklerin analiz edilebilmesini sağlamıştır. Bu yöntemde RNA öncelikle tamamlayıcı DNA'ya (complementary DNA veya cDNA) dönüştürülür. Daha sonra bu cDNA'dan, seçilen NGS teknolojisine göre bir kütüphane oluşturulur ve NGS işlemini gerçekleştiren cihaz ile dizi okumaları gerçekleştirilir.

Transkriptom dizilemenin ilk aşaması RNA'nın organizmadan izolasyonudur. RNA-Seq analizlerinin güvenilir olabilmesi için yüksek kaliteli RNA'ya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle RNA ekstraksiyon sürenin son derece dikkatli yapılması ve herhangi bir DNA kontaminasyonunun olmaması gerekmektedir. Farklı organizma ve doku çeşitlerinden yüksek kaliteli RNA izolasyonu sağlanabilmesi için piyasada bir çok markaya ait RNA izolasyon kitleri bulunmaktadır. Araştırıcıya düşen görev, çalışacağı organizmaya en uygun kite karar vermek, üreticinin protokolünü takip etmek ve gerekirse protokolü değiştirerek en verimli RNA ekstraksiyonu yöntemini oluşturmaktır.

Tüm NGS işlemlerinde ortak olan adım kütüphane hazırlanmasıdır. RNA'nın dokudan izolasyonu sonrasında ters transkripsiyon enzimi kullanılarak cDNA sentezi yapılır. cDNA'nın NGS teknolojisine uygun hale getirilmesine kütüphane hazırlama aşaması denilmektedir. Kütüphane hazırlama aşaması kullanılan RNA çeşidine ve NGS teknolojisine göre farklılık göstermektedir. Kütüphane hazırlama işlemi; istenilen RNA molekülünün dokudan izolasyonu, ters

transkriptaz enzimi ile cDNA sentezlenmesi, rastgele primerler kullanılarak cDNA'nın çoğaltılması veya küçük parçalara ayrılması ve son olarak bu parçalara dizileme adaptörlerinin bağlanması adımlarından oluşmaktadır. Araştırıcının hangi NGS teknolojisini kullanacağını önceden belirlemesi ve teknolojiye uygun protokoller kullanarak NGS öncesi işlemleri titizlikle yapması gerekmektedir.

İster RNA-Seq olsun, ister diğer NGS yöntemleri, dizileme işleminin son aşaması, elde edilen milyonlarca dizi okumasının birleştirilmesidir. Bu aşamada sırasıyla dizi okumaları temizlenir (trim), hizalanır (align), parçalar bir araya getirilir (assemble), okuma kalitesinin değerlendirilir ve son olarak birleştirilen veriler değerlendirilir (Şekil 15).



Şekil 15. NGS Verilerinin Biyoenformatik Olarak İşlenmesi

RNA-Seq ile genomda fonksiyonel diziler ortaya çıkarılabilmekte, genetik bilgi fenotip ile ilişkilendirilebilmekte ve bitki grupları birbirinden ayırt edilebilmektedir.

3.2. Genom dizileme

NGS teknolojisinin sağladığı en önemli getirisi kuşkusuz canlı genomlarının kısa sürede ve uygun maliyetli olarak ortaya çıkarılmasıdır. Birçok NGS teknolojisi mevcuttur (Illumina, NovaSeq, IonTorrent Pacific BioSciences, Oxford Nanopore ve her geçen gün eklenen yeni teknolojiler) ve bütün bu teknolojilerin temeli milyonlarca küçük dizinin paralel olarak okunmasına dayanmaktadır. Tıpkı RNA-Seq yöntemindeki gibi iş akışı neredeyse tamamen aynıdır. Genom dizilemedeki en büyük fark, başlangıç molekülü olarak RNA'nın değil, DNA'nın kullanılmasıdır. Böylece cDNA sentezleme aşaması da iş akışından çıkarılmaktadır.

Genom dizilemede karar verilmesi gereken en önemli nokta özellikle bitkilerde hangi genomun dizisinin elde edilmesine ihtiyaç duyulduğudur. Bitki hücrelerinde, hayvan hücrelerinin aksine yer alan kloroplast, bitki genomu çalışan araştırıcılar için bir ek seçenektir. Çekirdek genomuna göre çok daha küçük olması, dizileme işleminin çok daha kısa sürmesini ve çok daha az maliyetli olmasını sağlamaktadır. Ayrıca kloroplast genomunda, bitki gruplarının birbirlerinden ayırt edilebilmesini sağlayan barkod bölgelerinin bulunması, kloroplast genomunu bitki gruplarının teşhisi ve bitkisel ürünlerin tanımlanmasında kullanımına olanak tanımaktadır. Bunun yanı sıra mitokondri genomunun dizilenmesi ile de hem bitki hem de

hayvan gruplarının teşhisinde kullanılabilecek birçok moleküler işaretçi ortaya çıkarılabilmektedir.

Genel Değerlendirme

Geçtiğimiz son 100 yıl, hem teknolojide hem de teknolojiye bağlı olarak moleküler biyolojideki gelişmelerin en fazla ivme kazandığı dönemdir. DNA yapısının keşfedilmesinin üzerinden (1953) 30 yıl sonra, DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmaya başlanmıştır (1983). DNA parçalarının baz dizileri Sanger'in zincir sonlandırma yöntemiyle ortaya çıkarılmıştır (1977) ve günümüzde bu teknoloji halen kullanılmaktadır. Moleküler biyologlar ile birlikte çalışan mühendislerin ve bilgisayar programcılarının azmi ile günümüzde bir organizmaya ait tüm genom dizisi sadece birkaç saat içerisinde ortaya çıkarılabilir duruma gelmiştir. Moleküler biyolojinin tüm bu imkânlarından yararlanılarak insan sağlığına etki eden ilk faktör olan besinlerin testlerini yapmak, insanların daha kaliteli besin maddelerine erişebilmelerini ve gıda maddeleri içerisine katılabilecek katkı maddelerine karşı daha bilinçli olmalarını sağlamaktadır.

Bu kitap bölümünde anlatılan modern moleküler biyoloji yöntemleri, bitkisel gıda ürünlerinin içeriklerinin tespit edilmesinde, bitkisel ürünlerin içeriklerine eklenen katkı maddelerinin belirlenmesinde ve bitkisel ürünlerde gıda aldatmacalarının tespit edilmesinde kullanılabilen yüzlerce yöntemden sadece birkaçıdır. Araştırıcılar, hangi bitki grubu ile çalışacaklarsa bu konuda literatür çalışmalarını titizlikle gerçekleştirmeli, literatürdeki boşlukları iyi tespit etmeli ve bu boşlukları doldurabilecek kendi yöntemlerini geliştirmelidirler.

KAYNAKÇA

Aryal, S. (2018). URL: https://microbiologyinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-procedure-types-applications-and-animation/. Erişim tarihi: 07.02.2020.

Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S. ve Donoghue, M. J. (1995). The its Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden, 82(2), 247–277.

Blázquez, M. A., Soowal, L. N., Lee, I. ve Weigel, D. (1997). LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. Development, 124(19), 3835–3844.

Chang, C. C., Lin, H. C., Lin, I. P., Chow, T. Y., Chen, H. H., Chen, W. H., Chaw, S. M. (2006). The chloroplast genome of Phalaenopsis aphrodite (Orchidaceae): Comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications. Molecular Biology and Evolution, 23(2), 279–291. doi:10.1093/molbev/msj029

Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Albert, V. A. (1993). Phylogenetics of Seed Plants: An Analysis of Nucleotide Sequences from the Plastid Gene rbcL. Annals of the Missouri Botanical Garden, 80(3), 528–580.

Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y. ve Zhou, S. (2016). Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. Mol Ecol Resour, 16: 138-149. doi:10.1111/1755-0998.12438.

Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. Nature, 227(5258), 561

Cuenoud, P., Savolainen, V., Chatrou, L. W., Powell, M., Grayer, R. J. ve Chase, M. W. (2002). Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid rbcL, atpB, and matK DNA sequences. American Journal of Botany, 89(1), 132–144. doi:10.3732/ajb.89.1.132

Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L. ve Zhou, S. (2012). Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. PLoS ONE. doi:10.1371/journal.pone.0035071

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19, 11-15.

Druml, Barbara & Cichna-Markl, Margit. (2014). High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. Food Chemistry. 158. 245–254. 10.1016/j.foodchem.2014.02.111

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Hilu, K. W., Alice, L. A. ve Liang, H., (1999). Phylogeny of Poaceae inferred from matK sequences. Annals of the Missouri Botanical Gardens 86:835-851.

Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(31), 12794–12797. doi:10.1073/pnas.0905845106

Hurkan, K. (2017). Karasal bitkilerde DNA barkodlama: Bazı DNA barkod bölgelerinin incelenmesi. Uluslararası Fen Araştırmalarında Yenilikçi Yaklaşımlar Dergisi, 1(1), 57-67. doi: 10.29329/ijiasr.2017.99.6.

Kress, W. J. ve Erickson, D. L. (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcLGene Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. PLoS ONE, 2(6), e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508

Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(8), 2923–2928. doi:10.1073/pnas.0709936105.

Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y. ve Chen, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. Biological Reviews, 90(1), 157–166. doi:10.1111/brv.12104.

Min, X. J. ve Hickey, D. A. (2007). Barcoding: Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. Molecular Ecology Notes, 7(3), 365–373. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01698.x

Oh, S. H. ve Potter, D. (2003). Phylogenetic utility of the second intron of LEAFY in Neillia and Stephanandra (Rosaceae) and implications for the origin of Stephanandra. Molecular Phylogenetics and Evolution, 29, 203–215. doi:10.1016/S1055-7903(03)00093-9.

Patel, Nishma & Ferns, BR & Nastouli, Eleni & Kozlakidis, Zisis & Kellam, Paul & Morris, S. (2016). Cost analysis of standard Sanger sequencing versus next generation sequencing in the ICONIC study. DOI:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32322-4

BÖLÜM 2

BİTKİ ISLAHINDA MOLEKÜLER BELİRTEÇLERİN KULLANIMI

Dr. Adnan AYDIN[2]

[2] Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Iğdır, Türkiye. adnan.aydin@igdir.edu.tr

GİRİŞ

Moleküler belirteçlerin ortaya çıkmasını gerektiren en önemli faktörlerden biri klasik bitki ıslahının çok zaman alması ve daha hızlı, daha etkin bir şekilde, eldeki bitki materyalinin daha verimli kullanımı açısından moleküler belirteçlerin kullanımını gerektirmiştir. Moleküler belirteçlerin bitki ıslahında seleksiyon stratejilerini geliştirmek için geniş kapsamlı yeni uygulamaların benimsenmesinde önemli ölçüde etkilemiştir (Yorgancılar vd. 2015).

Günümüzde teknolojnin gelişmesiyle birlikte genetik düzeyde olan çalışmalar da giderek hız kazanmaktadır. Bu bağlamda bitki ıslahı, bitki grupları arasındaki genetik çeşitlilikten kaynaklanan çeşitliliği ve genetik yapıyı anlamak başarıyı artırmada en önemli faktörlerden biridir (Abdellatif ve Soliman 2013). Kültür bitkilerinde farklı çeşit üretebilmek için ıslah çalışmalarında iyi ebeveynler seçilerek başarı şansı artırılabilir. Bitki popülasyon yapısını anlamak ve heterotik grupları tanımlamak için genetik çalışmalarda moleküler belirteçlerin kullanımı oldukça önemlidir. Genetik çeşitliliğin ortaya konmasında morfolojik belirteçler (Van Esbroeck vd. 1999), biyokimyasal belirteçler (Wendel vd. 1992) ve DNA'ya dayalı moleküler belirteçler (Yu vd. 2012) kullanılarak yapılmaktadır. Her ne kadar morfolojik ve biyokimyasal belirteçler kullanılsa da bu belirteçler çevre şartlarından etkilendiklerinden bitki genomunu tanımlamakta yetersiz kalmaktadırlar (Lukonge vd. 2007). Moleküler belirteçler ise doğrudan allellik çeşitliliğini ölçebildikleri ve organizmalar arasındaki

genetik uzaklıkları verdiklerinden dolayı daha güvenilir ve bilgi vericidirler (Tyagi vd. 2014). Özellikle 1985 yılında Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) icat edilmesiyle farklı çalışmalarda kullanılmak üzere moleküler belirteçlerin üretimi daha da artmıştır. PZR tabanlı moleküler belirteçler, popülasyon genetiği, genotip tanımlamaları ve korunması, tohum saflığı ve hibrit kalitesinin izlenmesi, gen etiketlemesi, germplazm değerlendirmesi, filogenetik çalışmalar, akrabalık çalışmaları, teşhis, genetik ve adli tıp, konservasyon gibi moleküler genetik çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Alzohairy vd 2015). İdeal bir moleküler belirteç tekniğinin;

1. Polimorfik olması ve bütün genomda kullanılabilir olması

2. Genetik farklılıkların ortaya çıkarılmasında güçlü olması

3. Çok sayıda olması, bağımsız olması ve güvenilir belirteçler üretiyor olabilmesi

4. Karmaşık olmamalı, hızlı sonuç veriyor olmalı ve ucuza mal edilmesi

5. Az miktarda Nükleikasite veya dokuya ihtiyaç duyması

6. Farklı fenotiplerle bağlantı oluşturması gibi özelliklere sahip olması istenen özellikleri arasındadır.

Fakat hiçbir moleküler belirteç tekniği yukarıda bahsedilen ideal bir belirteç tekniğinin hepsine aynı anda sahip olamamaktadır. Moleküler belirteçler, kodlama yapan veya kodlama yapmayan lokuslarda genomun farklı bölgelerini hedefler. Buna bağlı olarak günümüze dek 100 yakın belirteç tekniği geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları Tablo 1'de geliştirilme dönemlerine bağlı olarak gruplandırılmıştır.

Tablo 1. Günümüze Değin Geliştirilmiş Bazı Moleküler Belirteçlerin Bilgileri (Alzohairy vd 2015)

KISALTMA	YIL	TEKNİK	KAYNAK
A) Birinci Nesil belirteçler			
ASO	1986	Allele Specific Oligonucleotides	Saiki et al. (1986)
AS-PCR	1988	Allele Specific Polymerase Chain Reaction	Landegren et al. (1988)
OP	1988	Oligonucleotide Polymorphism	Beckmann (1988)
PCR	1985	Polymerase Chain Reaction	Saiki et al. (1985)
RFLP	1974	Restriction Fragment Length Polymorphism	Grodzicker et al. (1974)
SSCP	1989	Single Stranded Conformational Polymorphism	Orita et al. (1989)
STS	1989	Sequence Tagged Site	Olsen et al. (1989)
VNTR	1985	Variable Number Tandem Repeats	Jeffreys et al. (1985)
B) İkinci Nesil Belirteçler			
AP-PCR	1990	Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction	Welsh and McClelland (1990)
ARMS	1992	Amplification Refractory Mutation System PCR	Newton et al. (1989)
CAPS	1992	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence	Akopyanz et al. (1992)
DOP-PCR	1992	Degenerate Oligonucleotides Primer - PCR	Telenius (1992)
ISJ-PCR	1991	Intron-Exon Splice Junction PCR	Weining and Langridge (1991)
ISSR	1994	Inter Simple Sequence Repeats	Zietkiewicz et al. (1994)
MAAP	1993	Multiple Arbitrary Amplicon Profiling	Caetano-Anolles et al. (1993)
RAPD	1990	Randomly Amplified Polymorphic DNA	Williams et al. (1990)
Double-RAPD	1991	RAPD by using two primers	Klein-Lankhorst et al. (1991)
RLGS	1991	Restriction Landmark Genome Scanning	Hatada et al. (1991)

SAMPL	1994	Selective Ampl. MicroSatellite Polymorph. Loci	Morgante and Vogel (1994)
SCAR	1993	Sequence Characterized Amplified Region	Paran and Michelmore (1993)
SSR	1992	Simple Sequence Repeats	Akkaya et al. (1992)
STMS	1990	Sequence Tagged Micro Satellite Sites	Beckmann and Soller (1990)
Tetra-PCR	1992	Allele specific amplification by tetra-primer PCR	Ye et al. (1992)
C) Üçüncü Nesil Belirteçler			
AFLP	1995	Amplified Fragment Length Polymorphism	Vos et al. (1995)
ASAP	1995	Allele Specific Associated Primers	Gu et al. (1995)
CFLB	1996	Cleavage Fragment Length Polymorphism	Brow (1996)
DAMD-PCR	1997	Directed Ampl. of Mini Satellite DNA-PCR	Bebeli et al. (1997)
IMP	2001	Inter-MITE Polymorphism	Chang et al. (2001)
IRAP	1999	Inter- Retrotransposon Amplified Polymorphism	Kalendar et al. (1999)
ISTR	1996	Inverse Sequence-Tagged Repeats	Rohde (1996)
MITE	2000	Miniature Inverted-Repeat Transposable Element	Casa et al. (2000)
qRT-PCR	1996	quantitative Real Time PCR	Heid et al. (1996)
RBIP	1998	Retrotransposon Based Insertional Polymorphism	Flavell et al. (1998)
REMAP	1999	Retrotransposon-MicroSatellite Ampl. Polym.	Kalender et al. (1999)
R-ISSR	2005	Combinations of RAPD-ISSR and RAPD-SSR	Ye et al. (2005)
R-PCR	1995	Restricted-PCR	Puskás and Bottka (1995)
RT-PCR	1993	Real-Time PCR	Higuchi et al. (1993)
SNP	1994	Single Nucleotide Polymorphisms	Jordan and Humphries

			(1994)
SRAP	2001	Sequence Related Ampl. Polymorphism	Li and Quiros (2001)
SSAP	1997	Sequence Specific Ampl. Polymorphism	Waugh et al. (1997)
TE-AFLP	2000	Three Endonuclease AFLP	Van der Wurff et al. (2000)
Triple-RAPD	2008	Triple RAPD by using three primers, or more	Mansour et al. (2008)
D) Yeni Nesil Belirteçler			
DArt	2004	Diversity ARrays Technology	Wenzl et al. (2004)
KASP	2013	Kbioscience Allele-Specific Polym. Assay	Uitdewilligen et al. (2013)
MSAP	2003	Methylation Sensitive Ampl. Polymorphism	Baurens et al. (2003)
RGF	2008	Recursive Genome Function	Pellionisz (2008)
sRNA-qRT-PCR	2010	Small RNA qRT-PCR	Varkonyi-G and Hellens (2010)
E) Genom Dizileme (Birinci ve Yeni Nesil)			
AFFYMETRIX	1991	DNA and RNA Microarrays / Chip	Fodor et al. (1991, 2007)
ddNTPs	1980	Dideoxynucleotide Sequencing (ABI)	Sanger et al. (1980)
ILLUMINA / SOLEXA	2008/2006	The first Short Read Sequencer / bridgePCR	in: Bentley (2006)
Ion Torrent	2010	Proton sequencing (Portable sequencer) / emPCR	Pennisi (2010)
NanoPorSeq (?)	2015/1995	Nanopore genome sequencer	Hayden (2012)
ROCHE454	1996	Pyrosequencing (the 1st Next Gen. Seq.) / emPCR	Ronaghi et al. (1996, 1999)
RT-SEQ (SMRT)	2013/2010	Single Molecule Real Time seq./ PACBIOSCI	http://pacbiodevnet.com
SOLiD/ABI	2006	Seq. by Oligonucl. Ligation and Detection / emPCR	in: Tang et al. (2009)
StarLight (?)	2015	Single-molecule sequencing with quantum dots	in: Glenn et al. (2011)

1. BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER

Biyokimyasal belirteçlerin kullanımı, tohum depolama, proteinlerinin ve izozimlerinin analizini içerir. Bu teknik enzimatik fonksiyonları kullanır ve spesifik genler için alel frekanslarının ölçülmesinde kullanılan güçlü ve nispeten ucuz bir yöntemdir. Allozimler, populasyonlar arasında ve populasyonlar içerisinde gen ve genotipik frekansların bir tahminini sağlar. Bu bilgi genetik çeşitliliği, gen akışını, türlerin genetik yapısını ve türlerin dışa geçiş oranları, populasyon yapısı ve bitki yabani akrabalarında olduğu gibi populasyon ayrışması arasındaki karşılaştırmaları ölçmek için kullanılabilir (Brown 1979, Hamrick ve Godt 1997, Guarino 1999, Volis vd. 2001, Gonzalez vd. 2005, Spooner vd. 2005).

Biyokimyasal belirteçlerinen önemli avantajları, ko-dominant özellikte olması, epistatik ve pleiotropik etkilerin olmaması, kullanımlarının kolay olması ve düşük maaliyerde kullanılabilir olmasıdır. İzozimlerin dezavantajları ise şunlardır:

1. Karşılık gelen az sayıdaki belirteçe sahip tür başına yalnızca birkaç izozim sistemi vardır;
2. Mevcut olan polimorfik enzimatik sistemlerin sayısı sınırlıdır ve enzimatik lokuslar, genomun (ifade edilen kısım) sadece küçük ve rastgele olmayan bir kısmını temsil eder (bu nedenle, gözlenen değişkenlik tüm genomu temsil etmeyebilir);
3. Bu belirteçlerin çok sayıda numunenin analiz edilmesine izin vermesine rağmen, farklı türlerden, lokuslardan ve Laboratuvarlardan numunelerin karşılaştırılması problemlidir

çünkü ekstraksiyon metodolojisi, bitki dokusu ve bitki aşamasından etkilenirler (Mondini vd. 2009).

2. RESTRİKSİYON-HİBRİDİZASYON TABANLI MOLEKÜLER BELİRTEÇLER

Restiriksiyon-hibridizasyon tekniklerine dayanan moleküler belirteçler, bitki çalışmaları alanında nispeten erken kullanılmış ve restriksiyon endonükleazlarının ve hibridizasyon yönteminin kullanımının birleştirilmesiyle ortaya çıkmıştır. Restiriksiyon endonükleazları, DNA'yı kesebilen, spesifik palindromik dizilerini tanıyan ve farklı boyutlarda DNA dizi parçaları üreten bakteriyel enzimlerdir (Southern 1975). DNA dizilerindeki herhangi bir değişiklik (nokta mutasyonları), iki bölge arasındaki mutasyonlar (delesyonlar ve translokasyonlar) veya enzim bölgesi içindeki mutasyonlar, DNA dizilerinin endonükleazlarla muamelesinden sonra farklı uzunluktaki fragmentlerin ortaya çıkmasına neden olmakta ve varyasyon üretilebilmektedir. RFLP ve VNTRs belirteçleri, Restiriksiyon-hibridizasyon tekniklerine dayanan moleküler belirteçlere örnektirler. RFLP'de DNA polimorfizmi kimyasal olarak etiketlenmiş bir DNA probunun hibridizasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır.

RFLP tekniğinin avantajları:

1. Tür, Cins ve Familyalar arası transfer edilebilirliği yüksektir.
2. Farklı laboratuvar ve farklı araştırıcılar tarafından aynı sonuçlar elde edilebildiğinden güvenilirdir.
3. RFLP belirteçleri ko-dominant özellikte olduklarından homozigot ve heterizogot bireylerin bir birinden ayrılmasında kullanılabilmektedirler.
4. Polimorfizim düzeyleri orta derecededir.

RFLP tekniğinin dezavantajları:

1. Analizlerin zaman alıcı, yüksek maliyette ve çok iş gücü gerektirmektedir.

2. Radyoaktif etiketleme yönteminin kullanılıyor olması çevreye ve sağlığa zarar vermektedir.

3. Kullanılan DNA'nın yüksek kalitede olması DNA izolasyonu zorluğunu ortaya koymaktadır.

4. Az kopya edilen dizilişlerin genomlarda belli noktalarda kümelenmelerinden dolayı RFLP belirteçleri genom üzerinde rastgele dağılım göstermediklerinden haritalamayı olumsuz yönde etkilemektedir. (Yorgancılar vd. 2015).

3. BAZI PZR TABANLI MOLEKÜLER BELİRTEÇLER

3.1. RAPD

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğinin geliştirilmesiyle, bir genomun spesifik bölgelerinin çoğaltılması ve analiz edilmesini daha mümkün bir hale getirmiştir (Althoff vd. 2007). Bunların arasında ilk

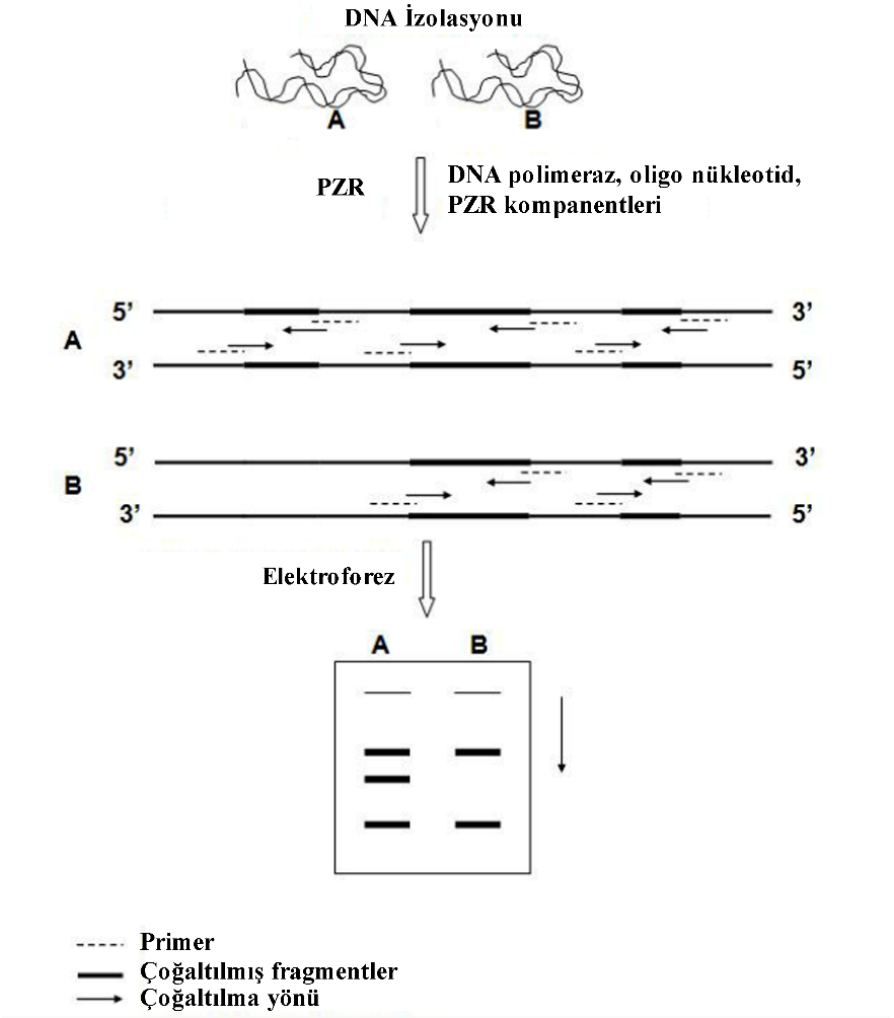
geliştirilen PZR tabanlı belirteç RAPD tekniğidir. RAPD belirteçleri basit, kısa oligonükleotid primerlerin kullanılmasıyla genomik DNA'nın herhangi bir parçasının rastgele olarak PZR yardımıyla çoğaltılması sonucu oluşan amplifikasyonlar arasındaki polimorfizime dayanır (Williams vd. 1990). Uzunluğu 10 nükletidten oluşan ve Operon sistemiyle geliştirilen tek tip primer kullanılmaktadır. Kullanılan bu primer, her iki DNA ipliğinde de 5′→3′ yönünde çalışır. Dolayısıyla kullanılan primerin yapışabildiği DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgenin amplifikasyonu yapılır (Şekil 1).

PZR ile çoğaltılmış amplikonlar agaroz veya poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle ayrılabilmekte ve bu şekilde polimorfizim belirlenebilmektedir. RAPD tekniğinin uygulanmasındaki kolaylık, oligonükleotidlerin çok fazla sayıda bulunabilmesi ve kolay bir yöntem olması, RFLP tekniğinin tersine az miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulması gibi avantajlarından dolayı tercih edilen bir belirteç yöntemidir.

RAPD tekniği de diğer PZR tabanlı teknikler gibi karakterizasyon ve haritalama çalışmalarında daha az çalışmaya, daha az zamana ve daha az maliyete gereksinim duyduğundan ötürü çok tercih edildiği rapor edilmektedir (Yorgancılar vd 2015). RAPD tekniğini diğer büyük avantajlarından biriside genomik DNA (gDNA) bilgisine ihtiyaç duyulmamasıdır.

RAPD belirteçlerinin bu avantajlarına karşılık, dominant özellikte olmasından kaynaklanan yorumlamanın zorluğu, karmaşık olması ve

tekrar edilebilirliğinin olmaması en büyük dezavantajları arasında gelmektedir (Williams vd. 1990).



Şekil 1. RAPD Amplifikasyonunun Çoğaltım Şeması

RAPD tekniğinin, genetik varyasyon araştırmalarında, bitki genetik haritalarının çıkarılmasında ve markır yardımıyla seleksiyonda (MAS "Marker Asissted Selection") yoğun olarak kullanılmasının nedeni,

tekniğin diğer moleküler tekniklere göre daha ucuz, daha az DNA gerektirmesi ve kullanılabilirliğini daha kolay olmasından kaynaklanmaktadır Aydın 2004).

RAPD tekniğinin avantajları:

1. Az iş gücü gerektiri, ucuzudur ve hızlı sonuç verir.
2. Çok fazla DNA'ya ihtiyaç duymaz
3. gDNA bilgisine ihtiyaç yoktur.
4. Polimorfizim oranı yüksektir.

RAPD tekniğinin dezavantajları:

1- Güvenilirliği düşüktür.

2- Farklı laboratuvarlarda farklı sonuçlar elde edilebilmekte ve farklı PZR cihazları arasında da farklı sonuçlar oluşabilmektedir.

3- Dominant belirteç olması dezavantajları arasında sayılmaktadır.

3.2. AFLP

Vos vd. (1995) tarafından geliştirilen bu teknik, RAPD tekniğinin prensiplerinden yararlanarak RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek için AFLP tekniğini geliştirmişlerdir. AFLP tekniğinin tekrarlanabilirliği ve polimorfizim düzeyi RAPD tekniğine göre daha yüksek olması bu tekniğin kullanılabilirliğini artırmıştır. Bu teknikte gDNA önce altı baz dizisini tanıyan *Eco*RI (5'…G^AATTC…3') ve

daha sonra dört baz dizisini tanıyan *Mse*I (5'…T^TAA…3') restriksiyon enzimleri tarafından kesilir.

Kesilen parçaların uçlarına nükleotid dizilişi sentetik olan DNA'lar eklenir. Eklenen sentetik DNA'nın nükleotid dizilişini de taşıyan başlatıcı DNA'lar (primerler) kullanımıyla nispeten spesifik DNA çoğaltımı yapılır. Bu çoğaltma iki aşamada gerçekleştirilir. İlk aşamada, her iki uçtan DNA kesim enzimlerinin tanıdığı diziden sonraki ilk nükleotide göre seçici çoğaltımın yapıldığı ön üretim yapılır. Asıl üretimde ön üretimde elde edilen parçaların kullanımıyla kesim enzimi tanıma yerinden sonraki ikinci ve üçüncü nükleotidler için seçici üretim yapılır. Bütün başlatıcılar sentetik uçların nükleotid dizilişini de taşıdığı için üretim oldukça spesifik şartlarda yapılmış olur.

AFLP tekniğinin avantajları:

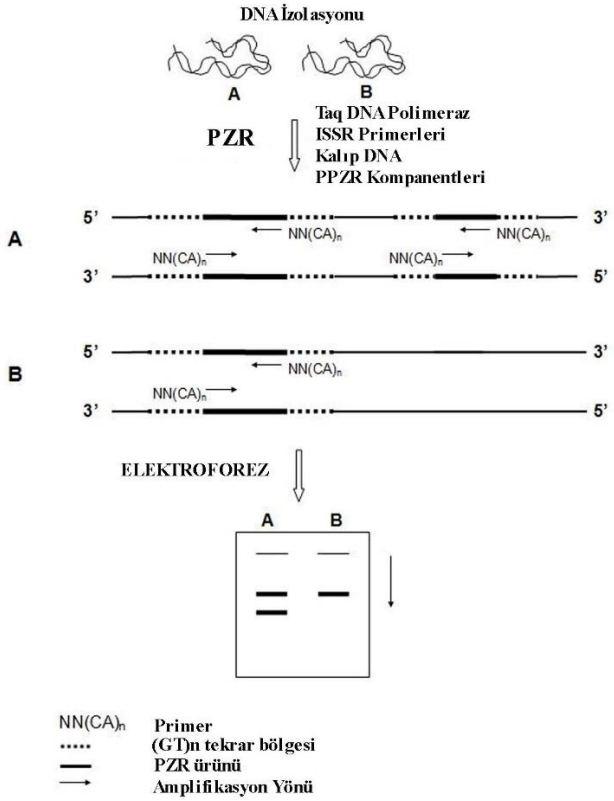
1. RAPD'den yavaş RFLP'den hızlıdır.
2. Masraf, işgücü ve güvenirlik açısından RAPD ve RFLP arasındadır.
3. Çok sayıda aynı anda etkili bir şekilde tarama yapması nedeni ile parmak izi analizine çok uygundur.
4. Sayıları RAPD ve RFLP'den daha fazladır.
5. Genomik DNA ile ilgili ön bilgiye gerek yoktur.
6. Polimorfizm oranı çok yüksektir.
7. Bu özelliklerinden dolayı otomasyona uygundur.

AFLP tekniğinin dezavantajları:

1. Çoğunlukla dominant belirteç özelliğindedir. Ancak son zamanlarda ko-dominant belirteçler de verdiği bildirilmiştir.
2. Farklı genetik haritalar arasında transferleri güçtür.

3.3. ISSR

ISSR yöntemi, ökaryotik genomlarda tekrar eden 2, 3, 4, 5 gibi nükleotid birimlerinin lokustan bağımsız bir şekilde genomda rastgele dağılımlarını esas alan ve bu tekrar bölgeleri arasındaki bölgelerin çoğaltımı sağlayan ancak RAPD yöntemine göre çok daha hassas ve tekrarlanabilirliği yüksek olan bir yöntem olarak rapor edilmektedir (Şekil 2) (Zietkiewicz vd. 1994, Yorgancılar vd. 2015).



Şekil 2. ISSR Amplifikasyonunun Çoğaltım Şeması

ISSR belirteçleri genetik varyasyonun ortaya konmasında, germplazmlar arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koyan çalışmalarda, genom haritalarının oluşturulmasında ve evrim biyolojisinin anlaşılmasında birçok bitki de uygulanabilen etkili bir yöntemdir (Reddy vd. 2002).

ISSR belirteçlerinin kullanımı hızlı olması, uygulanmasının kolay olması ve SSR bölgeleri arasını çoğaltan primerlerin RAPD tekniği primerlerine göre daha uzun olması bu yöntemin güvenirliğini

artırmaktadır (Bornet ve Branchard, 2001). Yeterli bilgi sunan ISSR yönteminde kullanılan primerlerin düşük bir maliyet sunması, zamandan tasarruf etmesi ve genetik analizlerde kolaylık sağlaması bu yöntemin avantajları arasındadır.

ISSR yöntemi bazı durumlarda ko-dominant belirteç sunmalarına karşı genelde Mendel kalıtımına uygun olarak dominant belirteçler vermektedir (Wang vd. 1998). Genelde dominant belirteç üretiyor olması da bazı moleküler belirteç yöntemlerine karşı dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.

ISSR belirteçleri AFLP belirteçlerinin yüksek maliyeti, RAPD belirteçlerinin düşük güvenirliği ve Primer sentezlenebilmesi için sekans bilgisi gerektiren SSR belirteçlerinin olumsuzluklarını gidererek önemli ölçüde avantaj sağlamaktadır (Zietkiewicz vd. 1994).

3.4. SSR (Mikrosatellit)

Ökaryotik genomlar önemli miktarda ardışık olan ve ardışık olmayan tekrarlı DNA dizleri içermektedir. Ardışık tekrarlar (TR - "tandem repeat"), en az iki bitişik tekrarlayan birimi içeren DNA dizi motifleridir. Ardışık tekrarlar hem prokaryotik hem de ökaryotik genomlarda bulunmaktadırlar (Victoria vd. 2011). Ardışık dizileri farklı tekrar birim büyüklüğüne ve tekrarlanma sayısına göre üç kategoriye ayrılmaktadırlar (Aydın 2018).

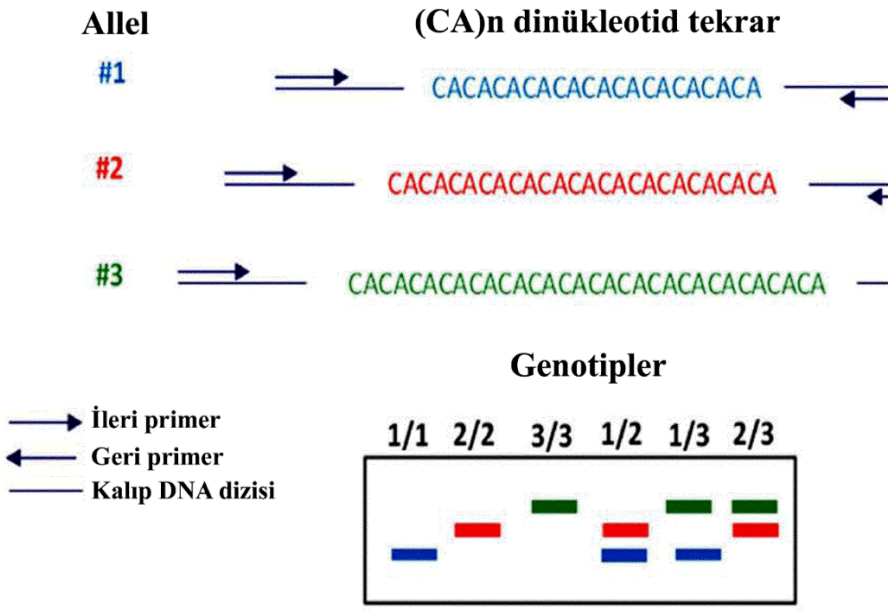
Bunlar:

1. Basit tekrarlı diziler (SSR'lar) olarak da adlandırılan mikrosatallitlerdir (Şekil 3) ve 1-50 baz çifti "base pair" (bp) büyüklüğündeki DNA tekrar dizilerinden oluşurlar, 5-100 kez arasında tekrarlarlar ve sıklıkla genomun ökromatin bölgelerde bulunurlar,
2. Minisatallitler, genellikle genomun ökromatin ve heterokromatin bölgelerinde bulunan 20-50 kez tekrarlanan ve 10-400 bp büyüklüğünde olan DNA tekrar dizilerinden oluşur,
3. Satallitler ise birim boyutu 5-300 bp'dir, genellikle sentromer ve telomerlerin heterokromatin bölgelerinde bulunan 10,000-1,000,000 kez tekrar eden bölgelerdir (Jeffreys vd. 1985; Gemayel vd. 2012; Bagshaw 2017).

Son yıllarda ardışık tekrar eden DNA dizileri arasında mikrosatellitler, bitki genotiplemeleri için en yaygın şekilde ve güvenilir kullanılan moleküler belirteç tipi olmuştur. İlk olarak Litt ve Lutty (1989) tarafından isimlendirilen bu basit tekrarlı DNA dizileri mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, ve hexanükleotit motiflerinin bitki ve hayvan genomlarında ardışık olarak dizilmektedirler (Ashley 2010). Mikrosatallitler ko-dominant özellikte olması, genomda bol miktarda bulunmaları ve düzgün dağılış göstermeleri, polimorfizim düzeylerinin yüksek olması, multi-lokus ve multi-allellik özelliği göstermesi, tekrarlanabilirliklerinin yüksek düzeyde olması ve güvenilir özellikte olmaları bu belirteç tekniğinin hem güvenirliğini

artırmış hem de kullanılırlığını yaygınlaştırmıştır (İnce vd. 2017). Bu belirteçler başta genetik çeşitlilik, popülasyon yapısını anlama, hibritlerin tanımlanmasında, genetik haritalamalarda, çeşit teşhisinde, ebeveynleri bir birinden ayırmada, filogenetik çalışmalarda, popülasyon genetiğinde, MAS ve pek çok agronomik çalışmalarda dahil olmak üzere bir çok çalışmada kullanımı yaygınlaşmıştır (Azpilicueta vd. 2013; Dufresnes vd. 2014).

Mikrosatallitler (SSR) hücre içinde bulunan organel DNA'sı ya da nüklear genomda bulunma durumlarına göre sınıflandırılabilir. Bunlar mitokondri, kloroplast veya çekirdekteki bulunma durumuna göre değişir. Aynı zamanda SSR'lar DNA dizisi üzerindeki bulunduğu bölgeye göre de sınıflandırılmaktadırlar. DNA dizisi üzerindeki bulunduğu bölgeye göre genomik-SSR ya da EST-SSR'lar olarak sınıflandırılmaktadırlar. Genomik tabanlı SSR'lar gelenekseldir ve genomun ifade edilmeyen bölgeleri üzerinde bulunmaktadırlar. EST tabanlı SSR'lar ise genin ifade edilebilen kısmından elde edilmekte ve agronomik özellikleri de etkilemektedirler (Aydın 2018).



Şekil 3. SSR Amplifikasyonunun Çoğaltım Şeması

SSR'lar arasında epistatik ve pleiotropik etkilerinin olmaması hem de diğer lokuslarla etkileşimlerini engeller hemde polimorfizim düzeyleri çevre şartları, bitki gelişim, doku-organ varyasyonlarından etkilenmesi durumunu ortadan kaldırmakta ve bu belirteç tekniği için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Buna karşın SSR'lardaki Null allelerin varlığı ve homoplasi durumu dezavantaj sağlamaktadır (Aydın 2018). Null allelerin varlığı SSR belirteçlerinin trasnfer edilebiliriğini olumsuz yönde etkilemekte ve homozigot ile heterozigot bireylerin ayırt edilmesinde sorunlar ortaya koymaktadır.

3.5. SNP

SNP belirteçleri aynı DNA dizileri arasındaki tek nükleotidten kaynaklanan polimorfizim olarak tanımlanmaktadır (Jordan and Humphries 1994). SNP'ler, genomda en fazla miktarda bulunan moleküler belirteçtir. Genomun kodlanmayan bölgelerinde genelde daha yaygın bulunurlar. Kodlama bölgelerinde, bir SNP mevcut olduğunda, bir amino asit sekansı değişimine (Sunyaev vd. 1999) neden olan eşanlamlı olmayan mutasyonlar veya amino asit sekansını değiştirmeyen eş anlamlı mutasyonlar üretebilir. Bununla birlikte, eş anlamlı değişiklikler mRNA eklemesini değiştirerek fenotipik farklılıklara neden olabilir (Richard ve Beckman 1995).

SNP genotipleme analizlerinin çoğu, alel spesifik hibridizasyon, oligonükleotit ligasyonu ya da primer uzatma gibi yöntemlere dayanır (Sobrino vd. 2005). Genotipleme yöntemleri, DNA çipleri dahil, SNP'lere dayanan allel spesifik PZR ve primer uzatma yaklaşımları, yüksek veri çıkışları ve otomasyona uygun olmaları açısından özellikle çekicidir. Bitki çeşitlerinin hızlı tanımlanması ve ultra yüksek çözünürlükte genetik haritaların oluşturulması da dahil olmak üzere çok çeşitli amaçlarla kullanılmaktadırlar (Mondini vd. 2009).

Tablo 2. Bazı Moleküler Belirteçlerin Farklı Özelliklerinin Karşılaştırılması.

Molecular Belirteçler	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	CAPS	SCAR	IRAP/ REMAP	RAMP	SSCP	SNP
Polimorfizim Derecesi	O	O	O	O	D	O	O	O	D	Y
Lokus Spesifikliği	E	H	H	H	E	E	E	E	E	E
Dominant/Kodominant	Ko	Do	Do	Ko	Ko	Ko	Do	Do	Ko	Ko
Çoğaltma Kolaylı	Y	D	Y	O	Y	Y	Y	O	O	Y
Bulunma sıklığı	Y	Y	Y	O	D	D	Y	O	D	Y
Dizi Bilgi İsteği	E	H	H	H	E	E	E	H	E	E
DNA Kalitesi	Y	D	O	D	D	D	D	D	D	D
Otomasyon	H	E	E	E	E	E	E	E	H	E
Maliyet	Y	D	O	D/O	O	D	D	O	Y	D
Teknik Gereksinim	Y	D	O	D/O	Y	O	Y	Y	Y	O

Anahtar: Y: Yüksek, O: Orta, D: Düşük, E: Evet, H: Hayır, Do: Dominant, Ko: Kodominant

SONUÇ

Moleküler belirteçlerin gelişmesiyle bitki genomu daha çok tanınmakta ve bu bağlamda bitki ıslahındaki gelişmeler hız kazanarak daha da ileri düzeye gelmektedir. Moleküler belirteçler geliştirildikçe ve teknolojinin ilerlemesi ile hem sağlık alanında hem de tarım alanında ilerlemeler sağlanmaktadır. Ayrıca biyoloji bilimi ile evrim süreci daha iyi analiz edilip organizmaların gelişme süreçleri ve populasyonlar hakkında daha fazla bilgiye ulaşılmaktadır.

Moleküler belirteçlerin geliştirilmesinden önce morfolojik belirteçlerin çevre şartlarından etkilenmesi yapılan ıslah çalışmalarında yanıltıcı sonuçların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Fakat moleküler belirteçlerin geliştirilmesi, PZR'nin ortaya çıkmasıyla artmış ve ıslah çalışmaları daha hızlı ve kesin bilgilerle

sonuçlanmıştır. Moleküler belirteçlerin geliştirilmesi en ideal belirteç yönteminin ortaya konmasını amaçlamış ve bu bağlamda çok sayıda moleküler belirteç geliştirilmiştir. Islah amacına göre, farklı belirteç teknikleri kullanılmakta ve bu amaçla da gen piramitleri oluşturulmakta, istenen özellikler moleküler ıslah teknikleri ile seleksiyon yapılabilmekte, Populasyon yapısı anlaşılarak istenen genetik varyasyonlar ortaya çıkarılabilmekte, türlerin ve çeşitlerin tanısı teşhis edilebilmekte, yabani gen kaynaklarından istenen özellikteki genlerin transferi daha hızlı şekilde yapılarak yeni çeşitlerin geliştirilmesi hız kazanabilmektedir. Gelişen moleküler belirteç teknolojisi ve MAS tekniği sayesinde bitki ıslahı çalışmaları daha olumlu bir şekilde yürütülebilecek, klasik ıslaha oranla çok daha hızlı bir zaman diliminde başarılı ve güvenilir sonuçların elde edilmesi mümkün kılacaktır.

KAYNAKÇA

Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A. and Cregan, P. B. (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. Genetics, (132), 1131-1139.

Akopyanz, N., Bukanov, N. O., Westblom, T. U. and Berg, D. E. (1992) PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nucleic Acids Research, (20), 6221-6225.

Althoff, D. M., Gitzendanner, M. A., Segraves, K. A. (2007). The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. Systematic Biology, (56), 477-484.

Alzohairy, A. M., Gyulai, G., Ohm, H., Szabó, Z., Ragheb, S. M., Ajmal Ali, M., Elsawy, H. and Bahieldin, A. (2015). Plant DNA Barcoding and Phylogenetics. Eds. M. Ajmal Ali, Gábor Gyulai and Fahad Al-Hemaid. Lambert Academic Publishing, Germany. Nuclear and Organelle Specific PCR Markers, Pages: 501-524.

Ashley, M. V. (2010). Plant Parentage, Pollination, and Dispersal: How DNA Microsatellites have Altered the Landscape. Critical Reviews in Plant Sciences, (29), 148-161.

Aydın, A. (2018). Türkiye'de Tescillenmiş Bazı Ticari Pamuk çeşitlerinin Moleküler Karakterizasyonu Üzerine Bir Araştırma. Akdeniz Üniversitesi, Doktora Tezi.

Azpilicueta, M. M., Gallo, L. A., van Zonneveld, M., Thomas, E., Moreno, C. and Marchelli, P. (2013). Management of Nothofagus Genetic Resources: Definition of Genetic Zones Based on a Combination of Nuclear and Chloroplast Marker Data. Forest Ecology and Management, (302), 414-424.

Bagshaw, A. T. M. (2017). Functional Mechanisms of Microsatellite DNA in Eukaryotic Genomes. Genome Biology and Evolution, (9), 2428-2443.

Baurens, P., Bonnot, F., Bienvenu, D., Causse, S., and Legavre, T. (2003). Using SD-AFLP and MSAP to assess CCGG methylation in the banana genome. Plant Molecular Biology Reporter, (21), 339–348.

Bebeli, P. J., Zhou, Z., Somers, D. J. and Gustafson, J. P. (1997). PCR primed with mini satellite core sequences yields DNA fingerprinting probes in wheat. Theoretical and Applied Genetics, (95), 276–283.

Beckmann, J. S. (1988). Oligonucleotide polymorphisms: A new tool for genomic genetics. Bio/Technology, (6), 161–164.

Beckmann, J. S. and Soller, M. (1990). Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged micro satellite sites. Bio/Technology, (8), 930–932.

Bentley, D. R. (2006). Whole-genome re-sequencing. Current Opinion *in* Genetics & Development, (16), 545–552.

Bornet, B. & Branchard, M. (2001). Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter, (19), 209–215.

Brow, M. A., Oldenburg, M. C., Lyamichev, V., Heisler, L. M., Lyamicheva, N., Hall, J. G., Eagan, N. J., Olive, D. M., Smith, L. M., Fors, L. and Dahlberg, J. E. (1996). Differentiation of bacterial 16S rRNA genes and intergenic regions and Mycobacterium tuberculosis katG genes by structure-specific endonuclease cleavage. Journal *of* Clinical Microbiology, (34), 3129–3137.

Brown, A. H. D. (1979). Enzyme polymorphism in plant populations. Theoretical Population Biology, (15), 1-42.

Caetano-Anollés, G., Bassam, B. J. and Gresshoff, P. M. (1993). Enhanced detection of polymorphic DNA by multiple arbitrary amplicon profiling of endonuclease-digested DNA: identification of markers tightly linked to the super nodulation locus in soybean. Molecular Genetics and Genomics, (241), 57–64.

Casa, A. M., Brouwer, C., Nagel, A., Wang, L., Zhang, Q., Kresovich, S. and Wessler, S. R. (2000). The MITE family Heartbreaker (Hbr): Molecular markers in maize. Proceedings of the National Academy of Sciences, (97), 10083–10089.

Chang, R. Y., O'Donoughue, L. S. and Bureau, T. E. (2001). Inter-MITE polymorphisms (IMP): a high throughput transposon-based genome mapping

and fingerprinting approach. Theoretical and Applied Genetics, (102), 773-781.

Dufresnes, C., Brelsford, A., Beziers, P., Perrin, N. (2014). Stronger Transferability but Lower Variability in Transcriptomic- than in Anonymous Microsatellites: Evidence From Hylid Frogs. Molecular Ecology Resources, (14), 716-725.

Flavell, A. J., Knox, M. R., Pearce, S. R. and Ellis, T. H. N. (1998). Retro transposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. The Plant Journal, (16), 643–650.

Fodor, A. A., Tickle, T. L. and Richardson, C. (2007). Towards the uniform distribution of null P values on Affymetrix microarrays. Genome Biology, (8), R69.

Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T. and Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science, (251), 767–73.

Gemayel, R., Boeynaems, J. C. S. and Verstrepen, K. J. (2012) Beyond Junk-Variable Tandem Repeats as Facilitators of Rapid Evolution of Regulatory and Coding Sequences. Genes, (3), 461-480.

Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. Molecular Ecology Resources, (11), 759–769.

Gonzalez, A.A., Wong, A., Delgado-Salinas, R., Gepts, P. (2005). Assessment of inter simple sequence repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean. Crop Science, (45), 606-615.

Grodzicker, T., Williams, J., Sharp, P. and Sambrook, J. (1974). Physical mapping of temperaturesensitive mutations of adenoviruses. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, (39), 439–446.

Gu, W. K., Weeden, N. F., Yu, J. and Wallace, D. H. (1995). Large-scale, cost-effective screening of PCR products in marker-assited selection applications. Theoretical and Applied Genetics, (91), 465–470.

Guarino, L. (1999). Approaches to Measuring Genetic Erosion. In Proceedings of the Technical Meeting on the Methodology of the FAO World Information

and Early Warning System on Plant Genetic Resources; Prague, Czech Republic, June 21-23.

Hamrick, J. L., Godt, M. J. W. (1997). Allozyme diversity in cultivated crops. Crop Science, (37), 26-30.

Hatada, I., Hayashizaki, Y., Hirotsune, S., Komatsubara, H. and Mukai, T. (1991). A genome scanning method for higher organism using restriction sites as landmarks. Proceedings of the National Academy of Sciences, (88), 397–400.

Hayden, E. C. (2012). Nanopore genome sequencer makes its debut. Technique promises it will produce a human genome in 15 minutes. Nature, doi:10.1038/nature.10051.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. Genome Research, (6), 986–993.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology, (11), 1026–1030.

Ince, A. G., Karaca, M., Uygur Göçer, E. and Aydin, A. (2017). Descriptive Statistics and PIC Values of Genomic- and Trascriptomic-Microsatellites in Several Plant Species. Jornal of Scientific and Engineering Research, (4), 236-246.

Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. (1985). Hyper variable mini satellite regions in human DNA. Nature, (314), 67–73.

Jordan, S. A. and Humphries, P. (1994). Single nucleotide polymorphism in exon 2 of the BCP gene on 7q31-q35. Human Molecular Genetics, (3), 1915

Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A. and Schulman, A. H. (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theor Appl Genet, (98), 704–711.

Klein-Lankhorst, R. M., Vermunt, A., Weide, R., Liharska, T. and Zabel, P. (1991). Isolation of molecular markers for tomato (L. esculentum) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Theoretical and Applied Genetics, (83), 108–14.

Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. and Hood, L. (1988). DNA diagnostics. Molecular techniques and automation. Science, (241), 1077–1080.

Li, G. and Quiros, C. F. (2001). Sequence-relatedamplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. Theoretical and Applied Genetics, (103), 455–461.

Litt, M. and Luty, J. A. (1989). A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. The American Journal of Human Genetics, (44), 397-401.

Mansour, A., Omayma, M. I., Solliman, M. and EL-Din, M. (2008). Diversity assessments among Mango (Mangifera indica L.) cultivars in Egypt using ISSR and three-primer based RAPD fingerprints. The African Journal of Plant Science and Biotechnology, (2), 87–92.

Morgante, M. and Vogel, J. (1994). Compound microsatellite primers for the detection of genetic polymorphisms. U. S. Patent Appl., 08/326456.

Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J. C. and Markham, A. F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Research, (17), 2503–2516.

Olsen, M., Hood, L., Cantor, C. and Botstein, D. (1989). A common language for physical mapping of the human genome. Science, (245), 1434–1435.

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. Genomics, (5), 874–879.

Paran, I. and Michelmore, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theoretical and Applied Genetics, (85), 985–993.

Pellionisz, A. J. (2008). The Principle of Recursive Genome Function. Cerebellum, (7),348–359.

Pennisi, E. (2010). Semiconductors Inspire New Sequencing Technologies. Science, (327), 1190.

Puskás, L. G. and Bottka, S. (1995). Reduction of mispriming in amplification reactions with restricted PCR. Genome Research, (5), 309–11.

Reddy, M. P., Sarla, N. and Siddiq, A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, (128), 9–17.

Richard, I., and Beckman, J. S. (1995). How neutral are synonymous codon mutations? Nature Genetics. (10), 259.

Rohde, W. (1996). Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. Journal of Genetics & Breeding, (50), 249–261.

Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M. and Nyren, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. Analytical Biochemistry, (242), 84–89.

Ronaghi, M., Nygren, M., Lundeberg, J. and Nyren, P. (1999). Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing. Analytical Biochemistry, (267), 65–71.

Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature, (324), 163–166.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, (230), 1350–1354.

Sanger, F., Coulson, A. R., Barrell, B. G, Smith, A. J. H. and Roe, B. A. (1980). Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. Journal of Molecular Biology, (143), 161–178.

Sobrino, B.; Briona, M.; Carracedoa, A. (2005). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. Forensic Science International. (154), 181-194.

Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. Journal of Molecular Biology, (98), 503.

Spooner, D., van Treuren, R., and de Vicente, M. C. (2005). Molecular Markers for Genebank Management. Bioversity International: Rome, Italy.

Sunyaev, S., Hanke, J., Aydin, A., Wirkner, U., Zastrow, I., Reich, J., Bork, P. (1999). Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human disease-associated genes. Journal of Molecular Medicine. (77), 754-760.

Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B. B., Siddiqui, A., Lao, K. and Surani, M. A. (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. Nature Methods, (6), 377–82.

Telenius, H., Carter N. P., Bebb, C. E., Nordenskjold, M., Ponder, B. J. and Tunnacliffe, A. (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. Genomics, (13), 718–725.

Uitdewilligen, J. G., Wolters, A. M., D'hoop, B. B., Borm, T. J., Visser, R. G., and van Eck, H. J. (2013). A next-generation sequencing method for genotyping-by-sequencing of highly heterozygous autotetraploid potato. PLoS One, 8(5), e62355.

van der Wurff, A. W. G., Chan, Y. L., van Straalen, N. M. and Schouten, J. (2000). TE-AFLP: combining rapidity and robustness in DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, (28), 105–109.

Varkonyi-Gasic, E. and Hellens, R. P. (2010). qRT-PCR of small RNAs. Methods Journal of Molecular Biology, (631), 109–22.

Victoria, F. C., Maia, L. C. and Oliveira, A. C. (2011). In silico Comparative Analysis of SSR Markers in Plants. BMC Plant Biology, doi:10.1186/1471-2229-11-15.

Volis, S., Mendlinger, S., Turuspekov ,Y., Esnazarov, U., Abugalieva, S., Orlovsky, N. (2001). Allozyme variation in Turkmenistan populations of wild barley Hordeum Spontaneum. Koch. Annals. Botany, (87), 435-446.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Peleman, J., Kuper. (1995). AFLP: A new technique for finger printing. Nucleic Acids Research, (23), 4407–4414.

Wang, R., Mahalingan, G., and Knap, H. T. (1998). (C-A) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, Glycine max (L.) Merr. Theoretical and Applied Genetics, (96), 1086–1096.

Waugh, R., McLean, K., Flavell, A. J., Pearce, S. R., Kumar, A., Thomas, B. T. and Powell, W. (1997). Genetic distribution of BARE-1 retro transposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). Molecular Genetics and Genomics, (253), 687–694.

Weining, S. and Langridge, P. (1991). Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on polymerase chain reaction. Theoretical and Applied Genetics, (82), 209–216.

Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, (18), 7213–7218.

Wenzl, P., Carling, J., Kudrna, D., Jaccoud, D., Huttner, E., Kleinhofs, A. and Kilian A. (2004). Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. Proceedings of the National Academy of Sciences, (101), 9915–9920.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. L., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, (18), 6531–6535.

Ye, C., Yu, Z., Kong, F., Wu, S. and Wang B. (2005). R-ISSR as a new tool for genomic fingerprinting, mapping, and gene tagging. Plant Molecular Biology Reporter, (23), 167–177.

Ye, S., Humphries, S. and Green, F. (1992). Allele specific amplification by tetra-primer PCR. Nucleic Acids Research, (20), 1152.

Yorgancilar, M., Yakisir, E., Tanur Erkoyuncu, M. (2015). Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı. Journal of Bahri Dagdas Crop Research, 4 (2),1-12.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, (20), 176–183.

BÖLÜM 3

BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİ

Uzm. Biyolog Yasemin KEMEÇ HÜRKAN[3]

[3] Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çanakkale, Türkiye. kemecyasemin@gmail.com

GİRİŞ

Bitki biyoteknolojisi, tarımsal üretimde kayıpları önlemek, verim ve kaliteyi arttırmak, bitki verimliliğini sınırlayan hastalık, zararlıları engellemek, genetik kaynaklarımızı gen ve protein düzeyinde tanımlamak, biyotik ve abiyotik stres koşularına karşı dayanıklılığın arttırılmasını sağlamak amacıyla bitkileri, hayvanları ve mikroorganizmaları modifiye etmek için genetik mühendisliği, moleküler biyoloji, fizyoloji ve biyokimya gibi alanların kullanılmasını sağlayan multidisipliner bir teknolojidir. Ayrıca klasik ıslah yaklaşımların süresini kısaltmak ve başarısını artırmak amacıyla üstün nitelikli bitki genotiplerinin etkin biçimde seçimine olanak sağlamak, yerel bitki gen kaynaklarımızın belirlenmesini, korunmasını, değerlendirilmesini ve karakterizasyonunu sağlamak, gen aktarım çalışmaları ve bitki doku kültürü çalışmaları ile yeni nesil bitkiler elde etmeye olanak sağlayan bir teknolojidir. Herbisit ve pestisitlere dayanıklı, raf ömrü uzun, tarımsal ürünlerden yüksek verim elde etmek için üstün özelliklerin seçilip yeni nesil bitkiler elde etmek için kullanılan gen aktarım (bitki transformasyon) tekniklerinin çoğunun ön koşulu bitki doku ve hücrelerinin steril besiyerinde çoğaltılmasına imkan verecek olan doku kültürü yöntemlerinin kullanılmasıdır (Gürel, 2016; Onay ve diğerleri, 2012).

Bitki doku kültürü steril koşullar altında (*in vitro* ortamda), yapay bir besiyerinde, hücre, doku organ gibi bitki kısımlarından veya bütün bir bitkiden yeni bir bitki veya bitkisel ürün elde etmeyi sağlayan bitki

biyoteknolojisinin önemli bir alanıdır. Bu sayede birçok bitki çeşidi klonal olarak çoğaltılabilir, endemik ve tehlike altındaki türler korunabilir, meristem kültürü ile hastalık ve virüsten ari bitkiler elde edilebilir, somatik embriyolardan sentetik tohumlar üretilebilir, bitkisel gen kaynakları korunabilir ve kallus-hücre süspansiyon kültürlerinden sekonder metabolitler elde edilebilir (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016). Bütün bunların hepsi bitki hücrelerinin totipotensi yeteneğine sahip olmalarından kaynaklıdır. Totipotensi, farklılaşmış her bir bitki hücresinin rejenerasyonla, uygun büyüme ortamı, ışık ve sıcaklık gibi çevre koşulları sağlandığında ana bitkiye benzer tam bir bitki meydana getirme yeteneğidir (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Onay ve diğerleri, 2012). Bu özellik bitki hücrelerini hayvan hücrelerinden ayırır ve onu eşsiz kılar.

Bu bölümde;

- ✓ Bir doku kültürü laboratuvarı ve düzeni nasıl olmalı,
- ✓ Kullanılacak malzemelerin ve çalışılacak bitki parçasının (eksplant) sterilizasyonu nasıl yapılmalı,
- ✓ Besiyerleri ve bitki büyüme düzenleyicilerin temel özellikleri nelerdir,
- ✓ Kültür ortamı ve şartları nasıl olmalı,
- ✓ Kültür çeşitleri ve rejenerasyon sistemleri nelerdir bunlar üzerinde durulacaktır.

1. DOKU KÜLTÜRÜ LABORATUVARI

Bir doku kültürü laboratuvarı diğer laboratuvarlardan bağımsız ve ayrı bir yerde kurulmalıdır. Çünkü bir doku kültürü laboratuvarında en önemli faktör aseptik şartların sağlanmasıdır. Laboratuvarın kurulumu sırasında kullanılan malzemeler (yalıtım, pencereler, su tesisatı, klima sistemi, elektrik tesisatı, dolaplar, bençler vb.) laboratuvar düzeni ve şartlarına uygun bir şekilde seçilmelidir.

Genel olarak standart bir doku kültürü laboratuvarı aşağıdaki tesisleri içermelidir;

1.1. Yıkama Odası

Yıkama odası çalışmalar sırasında kullanılan tüm cam malzemenin ve kültür kaplarının yıkanması, distile su üretilmesi, besiyeri ve kültür kaplarının sterilitasyonu için gereklidir. Yıkama odası büyük bir yıkama lavabosu, su muslukları, asitlere ve bazlara dayanıklı boşaltma sistemleri, raflar, çalışma tezgâhları ve distile su üretim cihazlarını (Şekil 1) içermelidir. Yıkanmış malzemeleri kurutmak için sıcak hava fırınlarının, bulaşık makinelerinin, asit banyoları ve pipet yıkayıcılarının yıkama alanında bulunması gerekmektedir.

Şekil 1. Distile Su Üretim Cihazı

1.2. Hazırlık Odası

Laboratuvarın bu bölümü besiyeri hazırlanması için kullanılır. Besiyeri hazırlanması için gerekli malzemeler ve cihazlar şunlardır:

- ✓ Çalışma tezgahı (benç),
- ✓ Sıcaklığa duyarlı kimyasalların ve stok çözeltisinin depolanması için bir buzdolabı ve dondurucu,
- ✓ Sürekli saf su ihtiyacı için distile su cihazı,
- ✓ pH metre,
- ✓ Hassas terazi,
- ✓ Isıya dayanıklı maddeleri sterilize etmek için filtre sterilizasyon üniteleri,
- ✓ Besiyerini steril etmek için otoklav,

✓ Besiyeri hazırlarken kullanılan kimyasalları çözmek için manyetik karıştırıcı,

✓ İnorganik kimyasalları depolamak için steril bir raf veya dolap,

✓ Besiyerini ve stok çözeltileri saklamak için borosilikat cam şişeler ve besiyerini dağıtmak için kültür kapları-magentalar,

✓ Bir hava ve vakum pompası, ispirto ocağı veya gaz ocağı (Şekil 2),

✓ Besiyerini hazırlamak için bir mikrodalga fırın,

Şekil 2. Sıra İle Ph Metre, Hassas Terazi, Otoklav Ve Borosilikat Cam Şişeler, Kültür Kapları, İspirto Ocağı

Kültür ortamı hazırlarken, analitik saflıktaki kimyasallar kullanılmalı ve çok hassas tartılmalıdır. Besiyerini hazırlarken kullanılan su en

yüksek saflıkta ve en yüksek kalitede olmalıdır. Musluk suyu uygun değildir çünkü katyonlar (amonyum, kalsiyum, demir, magnezyum, sodyum, klorürler, florürler, fosfatlar vb.), mikroorganizmalar (algler, mantarlar, bakteriler), gazlar (oksijen, karbon dioksit, azot) ve partikül maddeler (silt, yağlar, organik madde vb) içerebilir.

1.3. Ekim Odası

Bu oda ekimi yapılacak eksplantın besiyeri içeren kültür kaplarına aktarıldığı steril odalardır. Herhangi bir kontaminasyondan kaçınmak için hava akımını kontrol etmek gereklidir. Bunun için laminar hava akışlı HEPA filtreli steril kabinlere ihtiyaç vardır (Şekil 3). Ekim öncesi kabinin içi %70-95'lik etil alkol ile silinmeli ve çalışılacak malzemeler kabine konulup ultraviyole ışıkla steril edilmelidir.

Şekil 3. Laminar Hava Akışlı HEPA Filtreli Steril Kabin

1.4. Kültür Odası

Kültürler büyüme odalarında veya bitki büyütme kabinlerinde büyütülürler (Şekil 4). Kültürlerin iyi bir şekilde büyütülmeleri için kültür odasının sıcaklığı, nemi ve ışığı kontrol altında tutulması gerekmektedir. Bu çevresel faktörler, kültür sırasında veya dolaylı olarak sonraki nesillerde tepki olarak büyüme ve farklılaşma sürecini doğrudan etkilemektedir. Sıcaklık genel olarak 22-25 °C civarında tutulur ve bunun için büyüme odaları çok iyi yalıtımlı olup sıcaklığı sabit tutmak için klimalar kullanılmaktadır. Odanın bağıl nemi %50-60 arasında olmalıdır. Kültür odasında kullanılan rafların her birine 25-50 µmol m^{-2} s^{-1} ışık şiddetine sahip beyaz floresan lambalar kullanılmalıdır. Floresan lambalar kültür kapları ile arasında 40-50 cm mesafe olacak şekilde yerleştirilmelidir. Sıcaklık sensörü ve ışık zamanlayıcısı, kültür şartının gerektirdiği şekilde sırasıyla sıcaklığı ve fotoperiyodu düzenlemek için kültür odasına yerleştirilir. Hem ışık hem de sıcaklık, genel olarak 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık kültürlerin inkübe edilmesi için 24 saatlik bir süre boyunca programlanabilir olmalıdır. Kültürler magenta kapları, tüpler, petri kapları, şişeler ve erlenler gibi değişik kültür kaplarına ekilebilmektedir.

Şekil 4. Sırsı İle Bitki Büyütme Kabini Ve Bitki Büyütme Odası (Şahin, 2016)

1.5. Seralar

Çoğaltılmış kültürlerin iklimlendirilmesi (aklimatizasyon) için uygun nem, ışık ve sıcaklığa sahip seralara ihtiyaç vardır. Kültürler dış ortama karşı çok hassas oldukları için olası bir enfeksiyon, kontaminasyon ya da başka bir problem için çevrenin buna uygun olarak düzenlenmesi kültürlerin kaybını engellemek için son derece önemlidir. Seranın, bitkilerin ihtiyaç duyduğu su ve uygun nemliliği sağlamak için sisleme sistemi ya da buhar ve iyi bir sulama sistemi için donanımlı olması gerekmektedir (Samal ve Rout, 2018; Gürel, 2016; Onay ve diğerleri, 2012).

2. STERİLİZASYON

2.1. Çalışma Ortamının ve Malzemelerin Sterilizasyonu

Steril bir çalışma alanı oluşturmak için öncelikle çalışılacak alan ve kabin içi (laminar flow hood) en az 10-15 dakika önce %10'luk ticari sodyum hipoklorit çözeltisi (%5 NaOCl) veya %70'lik etil alkol ile

silinir. Eğer kabinin ultraviyole lambası var ise çalışma öncesi çalıştırılır.

Bisturi, pens vb. aletler kullanımdan önce etil alkole daldırılıp aleve tutularak, yüksek sıcaklıkta ısıtılmış cam boncuklar (glass beads) kullanılarak ya da alüminyum folyoya sarılıp otoklav içerisinde steril edilir. Çalışılacak tüm malzemeler otoklavda (kültür kapları, erlenler, beherler, cam şişeler, besiyerleri, fayanslar, petri kapları, tüpler vb.) 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121 °C'de steril edilir. Ağzı açık olan malzemeler (erlenler, beherler, tüpler), petri kapları ve fayanslar alüminyum folyo ile kaplanarak otoklava konulur. Besiyerlerinin hazırlandığı cam şişelerin ağızları otoklava konmadan önce gevşek bırakılmalı çıkarıldıktan sonra hemen sıkılmalıdır. Besiyerine eklenecek olan bitki büyüme düzenleyicileri, vitaminler ve sıcaklıktan etkilenen diğer organik maddeler 0.22-0.45 µm poroziteye sahip steril şırınga filtreler ile steril edilir. Çalışma ortamında mutlaka sürekli ispirto ocağının açık olması gerekmektedir. Kültür kapları ve petri kapları açıldıktan sonra boğaz ve ağız kısımları mutlaka aleve tutulmalıdır. Bu işlem sayesinde kapların ağız kısmından gelebilecek olası kontaminantların engellenmesi sağlanır. Ayrıca çalışma sonunda kültür kaplarının ve petri kaplarının kenarları streç film ile sıkıca sarılmalıdır. Bu işlem sayesinde dışarıdan gelebilecek kontaminasyon kaynaklı patojenlerin içeri girmesi engellenir. Çalışma öncesinde mutlaka temiz bir önlük giyilmeli, eller yıkanmalı, saçlar toplanarak bone takılmalı, yüze maske takılmalı ve kabine girmeden önce eller etil alkol ile steril edilmelidir. Böylelikle dışarıdan gelebilecek

bakteriyel ve fungal kontaminantlar engellenmiş olunur. Aksi taktirde kabine giren ufacık bir kontaminasyon kaynağı bütün bir denemenin kaybedilmesine neden olabilir.

2.2. Eksplantların Yüzeysel Sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonu doku kültürü işlemleri içerisinde en önemli noktadır. Bitki materyallerinin yüzeylerinde faklı pşaral ve funguslar bulunmaktadır. Bu bakteriler ve funguslar bitki materyalleri üzerinde çoğalarak toksik ve öldürücü etkiye neden olurlar. Ortamda gelişen bakteriler ve funguslar da bitkiler ile besin rekabetine girerler ve bitkilerin ölmesine neden olurlar. Bütün bunlar tüm bir denemenin yok olmasına neden olarak zaman ve emeğin boşa gitmesine neden olur. Bunların olmaması için, doku kültürü çalışmaları için en ideal eksplant kaynağı steril tohumdan elde edilmiş fidelerdir. Böylelikle bu şekilde elde edilmiş fidelerin kullanılması ile sterilizasyon işlemine ihtiyaç olmayacak ve eksplantlar sterilizasyon işleminin zararlı etkilerinden korunmuş olacaklar. Aksi taktirde böyle bir imkan yok ise dış koşullardan (tarla, sera vb.) alınan eksplantlar (tohum, yaprak, sürgün, yumru, gövde vb.) kullanılır. Dış ortamdan alınan eksplant öncelikle musluk suyu altında en az yarım saat yıkanmalıdır. Bir deney için kullanılan dezenfektanlar kullanılacak eksplant tipine ve bitki türüne göre değişiklik göstermektedir. Genellikle yüzey sterilizasyonu için kullanılan dezenfektan türleri etil alkol, sodyum hipoklorit, civa klorür, hidrojen peroksit ve gümüş nitrattır. Sterilizasyon süresi ve kullanılacak dezenfektanın konsantrasyonu kullanılacak eksplant tipine göre değişmektedir. Sterilizasyon

sırasında ortama yayıcı yapıştırıcı olarak 2 damla Tween-20 eklenebilir. Çok küçük tohumların sterilizasyonu filtre kağıdı içerisinde yapılabilir. Bazı eksplant tipleri (yumru, gövde, kalın kabuklu tohum vb.) endojen kontaminasyon etmenleri taşımaktadır. Bunları yok etmek için eksplant tipine göre farklı süre ve konsantrasyonda biyositler kullanılabilir (Gürel, 2016; Babaoğlu ve diğerleri, 2002).

3. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ ORTAMI

3.1. Temel Besiyeri

Doku kültürü çalışmalarında başarının sağlanması için en önemli unsur çalışılacak eksplanta uygun besiyerinin seçimidir. Besiyerlerinde bitkinin ihtiyaç duyduğu makro ve mikro elementler, vitaminler, şekerler, bitki büyüme düzenleyicileri mevcuttur. Bunların yanı sıra jel yapıcı maddeler, antibiyotikler, biyositler ve diğer içerikler vardır.

Bitkiler büyüme ve gelişme için en az 17 besin maddesine ya da elementine ihtiyaç duymaktadırlar. Bunlardan üç tanesi hidrojen (H), oksijen (O) ve karbondur (C). Bitkiler diğer 14 tane zorunlu elementi doğrudan topraktan aldıkları için besiyeri içerisinde bulunması gerekmektedir. Bütün bu elementler her bitkinin ihtiyacına göre farklı konsantrasyonlarda bulunur ve bitkinin yaşamını devam ettirebilmesi için olması gereken, diğer elementler ile yeri doldurulamayan yani yokluğunda bitkinin yaşamının tehlike altında olduğu olmazsa olmaz

elementlerdir. Bitkilerde büyüme, gelişme ve farklılaşma için son derece önemli rollere sahiptirler.

MS besiyeri araştırmacılar tarafından en sık kullanılan kültür ortamıdır. Murashige ve Skoog (1962) tarafından tütün için geliştirilmiş tuz konsantrasyonu yüksek olan bir ortamdır. B5 besiyeri, soya kallus kültürleri için geliştirilmiş nitrat azotu yüksek bir ortamdır (Gamborg ve diğerleri, 1968). LS besiyeri, MS besiyerine benzerdir (Linsmaier ve Skoog, 1965). MS besiyerinden farkı ise organik bileşikler bakımından farklılık göstermesidir. WH besiyeri, domates köklerinin kültürü için geliştirilmiş düşük tuz konsantrasyonlu bir ortamdır (White, 1963). NN besiyeri anter kültürü için geliştirilmiştir (Nitsch ve Nitsch, 1969). WPM besiyeri odunsu (ağaç) türlerin kültüründe yaygın olarak kullanılmaktadır (McCown ve Lloyd, 1981). DKW besiyeri nodal eksplantlardan sürgünlerin çoğaltımı için geliştirilmiştir (Driver ve Kuniyuki, (1984); McGranahan, ve diğerleri, (1987)). Knudson (Knudson, 1946) ve Orchimax besiyerleri orkide doku kültürü için geliştirilmiştir. Piyasada bunun gibi pek çok kültür ortamı mevcuttur. Bu yüzden kullanılacak besiyeri bitki ve eksplantın türüne ve ayrıca ne üretmek istediğimize bağlı olarak deney tasarımından önce belirlenmelidir (Babaoğlu ve diğerleri, 2002, Gürel, 2016; Gardiner ve Miller, 2008; White, 2006; Fageria, 2009; Rice, 2007).

3.1.1. Makro Elementler

Azot (N), fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) ve kükürt (S) önemli makro elementlerdir. Bitkiler için önemli bazı rollere sahiptirler. Onlardan bazıları şunlardır: Azot bitkilerin büyüme hızını etkilemektedir. Nükleik asitlerin, proteinlerin, klorofilin, amino asitlerin, alkaloitlerin ve bazı bitki hormonlarının moleküler yapısında önemli bir elementtir (Samal ve Bout, 2018; Aktaş ve Ateş, 1998; Boşgelmez vd., 2001; Güzel vd., 2004; Kacar ve Katkat, 2010). Bitkilerde köklerin solunumunda, meyvelerin olgunlaşmasında, çiçeklenmenin zamanında gerçekleşmesinde ve yeni hücrelerin oluşumunda son derece önemlidir (Kantarcı, 2000; Fageria, 2009). Azot eksikliğinde bitkilerde büyüme oranı düşer, vegetatif gelişimi olumsuz etkiler ve yapraklarda klorozis görülür. Azot fazlalığı bitkilerde vegetatif gelişme periyodunu uzatır, çiçeklenme zamanını geciktirir, meyvenin geç olgunlaşmasına neden olur ve hastalıklara karşı dayanıklılığı azaltır (Foth, 1984; Aktaş ve Ateş, 1998; Boşgelmez vd., 2001; Güzel vd., 2004; Kacar ve Katkat, 2010). Besiyerlerinde farklı formlarda bulunmaktadır (NH_4^+, NO_3^-), fakat en fazla NO_3^- formda bulunur. Bitkiler ilk önce NH_4^+ formunda azotu kullanır, daha sonra pH düşünce NO_3^- formunu kullanmaya başlar (Babaoğlu ve diğerleri, 2002).

Fosfor, DNA ve ATP (Adenozin trifosfat) moleküllerinin bir parçası olarak meristematik ve diğer hızlı gelişen dokularda bol miktarda bulunur (Samal ve Bout, 2018). Fosfor, hücre bölünmesi, çiçek ve meyve oluşumunda önemli rol oynar, bitkilerin olgunlaşmasını

hızlandırır, potasyumun bitkiler tarafından alınmasını sağlar, bitkinin hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığını artırır ve bitki köklerinin suyu almasını düzenler (Foth, 1984; Plaster, 1992; McCauley vd., 2009; Aktaş ve Ateş, 1998; Boşgelmez vd., 2001). Fosfor eksikliği bitkilerde büyümeyi yavaşlatır. Meyve ve ağaçlarda sürgün ve tomurcuk oluşumu azalır, kök gelişimi zayıflar, hastalık ve don olaylarında bitkinin dayanıklılığı azalır (Foth, 1984; Aktaş ve Ateş, 1998; Boşgelmez vd., 2001; Plaster, 1992).

Potasyum normal hücre bölünmesi için gereklidir ve meristematik büyümeyi teşvik eder. Bitki protoplazmasının, yağlarının veya karbonhidratlarının gerçek bir bileşeni olmamasına rağmen, bitkilerde birçok reaksiyonda rol oynar (Samal ve Bout, 2018). Protein ve nişasta oluşumu, enzim ve koenzim aktivasyonunda, fotosentez, şeker transferinde rol oynarlar. Bitkinin su dengesini sağlamasında, kuraklık ve don olaylarında dayanıklılığı arttırır (Brady, 1990; McCauley vd., 2009; Kantarcı, 2000). Potasyum bitkilerin hastalıklara karşı dayanıklılığını arttırır, kök sisteminin gelişimini sağlar, klorofil oluşumunda rol oynar, stomaların açılıp kapanmasını sağlar (Brady, 1990; McCauley vd., 2009; Foth, 1984; Boşgelmez vd., 2001; Kacar ve Katkat, 2010). Potasyum eksikliği yaprak oluşumunu olumsuz etkiler, turgor basıncını düşürerek bitkide su kıtlığına sebep olur, kuraklığa ve dona karşı bitkinin daha hassas olmasına sebep olur, floem ve ksilem dokularının oluşumunun gerilemesine neden olur (Aktaş ve Ateş, 1998; Boşgelmez vd., 2001).

Kalsiyum pektat formundaki kalsiyum, bitki hücre duvarlarının ayrılmaz bir bileşenidir (Samal ve Bout, 2018). Bitkileri hastalık ve zararlılara karşı korur ve protein oluşumunda, karbonhidratların taşınmasında rol oynar (Boşgelmez vd., 2001; Kacar ve Katkat, 2010; Plaster, 1992). Bitkilerde kalsiyum eksikliği yapraklarda nekrozlara neden olur. Bitkinin gelişimini sağlayan meristem dokularının gelişimini yavaşlatır, sürgün ve kök ucu büyüme ve gelişimini olumsuz etkiler (Boşgelmez vd., 2001; Güzel vd., 2004; McCauley vd., 2009). Fazla olması durumunda diğer besin elementlerini bitkilerin yararlanamayacağı formlara dönüştürür (Aktaş ve Ateş, 1998; Boşgelmez vd., 2001).

Magnezyum klorofilin yapı taşıdır. Fotosentezde anahtar elementtir. Protein sentezinde, ATP'nin yapımında, karbondioksit asimilasyonunda ve enzimlerin aktivasyonunda rol almaktadır (Samal ve Bout, 2018; Aktaş ve Ateş, 1998; Boşgelmez vd., 2001; Kacar ve Katkat, 2010; McCauley vd., 2009). Magnezyum eksikliğinde fotosentez geriler ve klorofil miktarı düşer. Yaşlı yapraklarda damarlar arasında klorozis görülür (Aktaş ve Ateş, 1998; Kacar ve Katkat, 2010; Samal ve Bout, 2018).

Kükürt bazı proteinlerin bileşiminde bulunmaktadır. Bazı enzimlerin yapısında bulunmaktadır (Samal ve Bout, 2018). Kükürt kök büyümesini ve nodül oluşumunu hızlandırır. Kükürt eksikliğinde protein ve klorofil sentezi olumsuz etkilenir. Genç yapraklarda

klorozis görülür. Büyüme ve gelişme geriler, bitkiler bodur kalır ve gövde ince bir hal alır.

Tablo 1. MS ortamında bulunan makro elementler (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Samal ve Bout, 2018)

Makro Elementler	**Mg/l**
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
KH_2PO_4	170
$MgSO_4.7H_2O$	370
$CaCl_2.2H_2O$	440

3.1.2. Mikro Elementler

Makro elementlerin yanı sıra bitkiler için önemli olan bir diğer element grubu mikro elementlerdir. Fakat bunlar bitkiler için makro elementlere kıyasla daha az miktarlarda gereklidirler. Demir (Fe), manganez (Mn), çinko (Zn), bor (B), bakır (Cu), molibden (Mo) ve klor (Cl) önemli mikro elementlerdir (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016; Samal ve Bout, 2018).

Demir hücre bölünmesinde, solunum ve fotosentez reaksiyonlarında önemli rollere sahiptir. Demirin bitki hücreleri tarafından daha iyi bir şekilde kullanılması için şelatlanmış formda ortama ilave edilmektedir. Demir EDTA ile şelatlandığında kültür ortamında daha kararlı hale gelir ve bitkiler tarafından daha geniş bir pH aralığında absorbe edilmektedir (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016; Samal ve Bout, 2018). Demir eksikliğinde klorofil üretimi azalır,

yapraklarda nekroz ve klorozis görülür. Bitkilerde büyüme ve gelişme yavaşlar (Aktaş ve Ateş, 1998; Boşgelmez vd., 2001; Kacar ve Katkat, 2010).

Manganez kloroplast membranında önemli bir elementtir. Yaşamsal öneme sahip enzimlerin aktivasyonunda, fotosentezde suyun parçalanmasında, tohum çimlenmesinde ve meyve olgunlaşmasında önemli bir role sahiptir. Bitkilerde manganez eksikliğinin en belirgin semptomu yapraklarda klorozis oluşmasıdır (Samal ve Bout, 2018; Aktaş ve Ateş, 1998; Boşgelmez vd., 2001; Kacar ve Katkat, 2010; McCauley vd., 2009; Plaster, 1992).

Çinko oksin (indol-3-asetik asitin (IAA)) üretiminde olduğu gibi klorofil oluşumunda da yer alan bir enzim aktivatörüdür (Samal ve Bout, 2018). Çinko eksikliğinde enzim aktivitesinin azalmasına bağlı olarak karbonhidrat, protein ve büyüme hormonları (oksin) da zarar görür. Klorofil içeriğinin azlığından dolayı yaprak damarlarında klorozis görülür. Sürgünler ölür ve yapraklar erken dökülür (Boşgelmez vd., 2001; Kacar ve Katkat, 2010; Plaster, 1992).

Bor, şeker, su ve hormonların hareketinde rol oynadığı tahmin edilen önemli bir iz elementtir. Hücre duvarlarının oluşumunu ve dokuların yeniden çoğalmasını sağlamaktır. Karbonhidrat biyosentezi, nükleik asit ve protein metabolizmaları üzerinde rol oynar. Bor eksikliğinde yapraklarda klorozis görülür ve ayrıca yapraklar ve gövde gevrek,

kolay kırılır ve biçimsiz bir hal alır (Samal ve Bout, 2018; Boşgelmez vd., 2001; McCauley vd., 2009; Plaster, 1992).

Bakır solunum ve protein sentezinde, klorofil üretiminde, çeşitli oksidaz enzimlerin aktivasyonunda, protein ve karbonhidrat metabolizmasında rol oynamaktadır. Bakır eksikliğinde bodur gelişme, şekil bozukluğu, genç yapraklarda klorozis, geç olgunlaşma ve mantar hastalıklarına karşı hassasiyet oluşur (Plaster, 1992; Aktaş ve Ateş, 1998; Boşgelmez vd., 2001; McCauley vd., 2009; Kacar ve Katkat, 2010).

Molibden protein sentezinde, enzim aktivitesinde ve baklagillerde azot fiksasyonu için gerekli bir elementtir. Molibden eksikliğinde baklagillerde bodur bir büyüme ve yapraklarda klorozis meydana gelir (Samal ve Bout, 2018; Boşgelmez vd., 2001; Kacar ve Katkat, 2010; McCauley vd., 2009).

Klor fotosentezde, turgor basıncında, ATP enzim aktivasyonunda, stoma hareketlerinin düzenlenmesinde ve hücre çoğalmasında etkili bir elementtir (Plaster, 1992; Boşgelmez vd., 2001; McCauley vd., 2009; Kacar ve Katkat, 2010). Klor eksikliğinde klorozis görülür, yaprak kenarları solar, transpirasyon etkilenir, bazı bitkilerde hücre çoğalması geriler ve yaprakların büyümesinde yavaşlama meydana gelir (Boşgelmez vd., 2001). MS ortamında bulunan mikro elementler Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. MS ortamında bulunan mikro elementler (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Samal ve Bout, 2018)

Mikro Elementler	**Mg/l**
$MnSO_4.7H_2O$	22.3
$ZnSO_4$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3

3.1.3. Vitaminler ve Şekerler

Vitaminler enzim sistemlerinde katalitik fonksiyonlara sahiptir ve sadece eser miktarda gereklidir. Thiamin (B_1), nikotik asit (B_3) ve pridoksin (B_6) en sık kullanılan vitaminlerdir. Myo-inositol, d-biotin (H), riboflavin (B_2), d-pantotenik asit (B_5), askorbik asit (C), α-tokoferol (E), retinol (A), folik asit (M) ve kolekalsiferol (D_3) besiyerine eklenen diğer vitaminlerdir. MS ortamına eklenen vitaminler Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. MS ortamında bulunan vitaminler (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Samal ve Bout, 2018)

Vitaminler	**Mg/l**
Myo-İnositol	100.0
Thiamin-HCl	0.1
Nikotinik asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Glisin	2.0

Bitkiler *in vitro* koşullarda henüz yeterince fotosentez yapamadıklarından dolayı karbon ihtiyacını karşılamak için dışarıdan karbon kaynağı olarak şeker ilave edilir. En sık kullanılan karbon kaynağı sakkarozdur. Besiyerinde sıkça kullanılan diğer şekerler glikoz, maltoz, rafinoz ve fruktozdur. MS ortamında, genellikle litre başına 30 g sakkaroz karbon kaynağı olarak eklenir (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016; Samal ve Bout, 2018).

3.1.4. Jel Yapıcılar, Antibiyotikler ve Biyositler

Jel yapıcılar besiyerini yarı katı hale getiren bileşiklerdir. Bunlar genellikle kırmızı deniz alglerinden elde edilirler. En sık kullanılanları agar, agaroz, Phytagel™ ve ya Gelrite™, Sea-Kem agaroz, silikajel, aljinat, nişasta ve jelatindir.

Kullanılan eksplantın türüne göre kontaminasyonu engellemek amacı ile karbenisilin, eritromisin, genetisin, sefotaksim, kanamisin, higromsin, gentamisin ve streptomisin gibi antibiyotikler besiyerine

eklenebilmektedir. Besiyerinin kontaminasyonunu engellemek amacı ile en sık kullanılan biyosit PPM (bitki koruma solüsyonu)'dir (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016).

3.1.5. Besiyerine Eklenen Diğer Maddeler

Doku kültürü ortamına kimyasal olarak tanımlanamayan birçok destek maddesi eklenmektedir. Bunlardan bazıları farklı konsantrasyonlarda bir amino asit, peptid, yağ asidi, karbonhidrat, vitamin ve bitki yetiştirme maddesi kaynağı olarak günümüzde hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki doku kültürünün ilk başarılı kültürü maya ekstraktı ile yapılmıştır. Kültür ortamına eklenen diğer ilaveler şunlardır:

- ✓ Et, malt ve maya ekstraktı ve fibrin özütü,
- ✓ Muz, ananas, domates de dahil olmak üzere çeşitli meyvelerden meyve suları, meyve ekstraktları,
- ✓ Olgunlaşmamış zigotik embriyoları besleyen sıvılar,
- ✓ Fide veya bitki yapraklarının özleri,
- ✓ Haşlanmış patates özü ve mısır maserasyon sıvısı,
- ✓ Bitki özsuyu, kök veya rizomların ekstraktları. Bitki köklerinin bitkilerde sitokinin sentezinin ana bölgesi olduğu düşünülmektedir.
- ✓ Protein (genellikle kazein) hidrolizatları (Robbins, 1922; White, 1934; Steward ve Shantz, 1959; Rangaswamy, 1963; Guha ve Maheshwari, 1964; La Rue, 1949; Saalbach ve Koblitz, 1978; Borkird ve Sink, 1983; Fox ve Miller, 1959).

3.1.6. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Bitki büyüme düzenleyicileri bitkiler tarafından üretilen, bitkilerin çeşitli bölgelerine taşınarak orada büyüme ve gelişmeyi sağlayan ve çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olan organik maddelerdir. Doku kültürü ortamında kallus elde etmek, sürgünlerden kök üretmek için kültür ortamına eklenmeleri gerekmektedir. En sık kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri oksin, sitokinin, gibberellin, absisik asittir ve jasmonik asit (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016). Ayrıca son yıllarda keşfedilen, strigolakton ve karrikin de doku kültürü ortamlarında kullanılan bitki büyüme düzenleyicileridir.

Oksinler bitkilerde; hücre gelişiminde ve farklılaşmasında, fotoperyodizmde, kök oluşumu ve lateral kök gelişiminde, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesinde, yaşlanmanın (senesens) geciktirilmesinde yaprak ve meyve dökülmesinin engellenmesinde ve apikal dominansta rol oynamaktadırlar. Ayrıca etilen fitohormonunun üretimini de uyarırlar. Doku kültürü ortamında oksinlerin tek başına kullanımı köklenmeyi, kallus uyarımını, somatik embriyo oluşumunun uyarımını ve hücre süspansiyonlarının elde edilmesini teşvik ederler. Sitokininler ile birlikte ise kallus oluşumunda, somatik embriyo oluşumunun uyarımında ve sürgün rejenerasyonunda rol alırlar. El edilen sürgünlerin köklendirilmesinde sık olarak kullanılan bir fitohormondur. Doğal oksin, indol-3-asetik asittir (IAA), sentetik oksinler ise, naftalen asetik asit (NAA), indol bütirik asit (IBA), 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016; Eyidoğan ve Ekmekçi, 2016; Ünsal, 1993; Baktır, 2010).

Sitokininler bitkilerde; hücre bölünmesini, sürgün büyümesini, yeniden farklılaşmayı, rejenerasyonu ve yaşlanmayı geciktirmeyi teşvik eder. Doku kültürü ortamında sürgün gelişimini teşvik ederler, kültür ortamına oksin ile birlikte eşit konsantrasyonda eklenirse kallus oluşumunu teşvik ederler. Doğal sitokininler zeatin, dihidrozeatin, izopentenil adenin (2İP) ve dimetilaliladenin'dir. Sentetik sitokininler ise kinetin (N6 furfurilamino purin), benziladenin (BA) ve tetrahidropiranilbenzil adenin (PBA)'dir. Uygulamalarda en sık kullanılan sitokinin benziladenin'dir. Son yıllarda keşfedilen thidiazuron da (TDZ) bitki rejenerasyonunda oldukça başarılı sonuçlar vermektedir (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016; Ünsal, 1993).

Gibberellinler bitkilerde; hücre uzamasında, bodurluğun ortadan kaldırılmasında, partenokarpik meyve tutumunda, çimlenmeyi teşvik etmede, tohum ve tomurcuk dormansisinin kırılmasında, soğuklama ihtiyacının (vernelizasyon) giderilmesinde oldukça yaygın kullanıma sahiptir. Ayrıca embriyo ve ovül kültüründe, meristemlerde bitki rejenerasyonunda, organogenesisi ve adventif kök oluşumunu engellemede ve kallus gelişiminde kullanıma sahiptir. En sık kullanılan gibberellin GA_3'tür (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Tyler ve diğerleri, 2004; Olszewski ve diğerleri, 2002).

Absisik asitler bitkilerde; tohumlarda dormansiyi ve tohum depo proteinlerini uyarmaktadır, stomaların kapanmasını teşvik eder ve gövde büyümesini inhibe eder. Kuraklık ve diğer stres faktörlerinde rol alır. Gibberellik asit ile antogonist çalışır. Absisik asitin doku

kültüründeki rolü tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen somatik embriyoların olgunlaşmasında kullanılmaktadır. Kültür ortamına absisik asit ilavesinin anormal embriyo gelişimini engellediği belirtilmektedir. En sık kullanılan absisik asit ABA'dır (Babaoğlu ve diğerleri, 2002).

Jasmonik asitler bitkilerde; kök oluşumunu teşvik eder, etilen biyosentezini etkileyerek meyve olgunlaşmasını teşvik eder, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığı arttırır, dormant durumdaki tohumların dormansisini kırarak çimlenmeyi teşvik eder, dışarıdan uygulandığında kök büyümesini, tohum çimlenmesi, klorofil üretimini, kallus oluşumunu ve polen taneciklerinin çimlenmesini engeller. Gaz halinde patates bitkisine püskürtülmesi halinde ya da doku kültürü ortamında yumru oluşumunu (tuberizasyon) teşvik etmektedir (Yıldız ve Yılmaz, 2001; Fan ve diğerleri, 1997; Koda ve diğerleri, 1991).

Strigolaktonlar (SL) ilk kez pamuk bitkisinin köklerinden (*Gossypium hirsutum*) izole edilmiştir ve parazitik bitki olan *Striga lutea* tohumlarının çimlenmesini uyarma kabiliyetine bağlı olarak strigol olarak adlandırılmıştır. Strigolaktonlar metillenmiş butenolid (D-halkası) ve bir enol eter kısmından oluşmaktadır. Strigolaktonun bitkiler üzerindeki görevleri arasında, *Striga* spp. ve *Orobanche* spp. gibi parazitik bitkilerin çimlenmesini teşvik eder, angiospermlerde yan köklerin ve kök tüylerinin gelişiminde ve sürgün dallanmasında (aksiller tomurcuk büyümesi) rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca,

köklerden sentezlenen SL'ler, arbusküler mikorhizal (AM) mantarlarının hif oluşumunu indükleyerek mantar ve konakçı arasındaki teması kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Birçok çalışmada strigolaktonun, bitkinin besin, kuraklık ve tuz stresine karşı adaptasyonunda önemli bir role sahip olduğu ortaya konmuştur. En çok kullanılan strigolakton GR24'tür (Van der Berg ve Ewing, 1991; Cook ve diğerleri, 1966; De Cuyper ve diğerleri, 2017).

Bazı bitki fizyologlarına göre Akdeniz biyomunda bazı bitki türlerinin tohumlarının çimlenmesi için yangın gereklidir. Araştırmacılar duman içindeki bazı kimyasalların bu tohumları çimlendirdiğini düşünmüşlerdir. Bitki kaynaklı dumanın tohum çimlenmesini uyardığını ilk bildiren De Lange ve Boucher (1990) olmuştur. Baldwin vd. (1994) çalışmalarında GC-MS ve atomik absorbsiyon (AA) spektrofotometresi kullanarak dumanın aktif olan kısmında 71 tane bileşik tanımlamışlardır. Aynı çalışmada ayrıca yanmış selülozdan elde edilen duman ile çimlenme aktivitesinin sağlanabileceği belirtilmiştir. Flematti vd., (2004), duman içindeki bu kimyasalı keşfetmişler ve karrikin olarak adlandırmışlardır. Yani karrikinler; yanan bitkisel materyallerin (şeker ve selüloz da dahil olmak üzere karbonhidratların ısıtılması veya yakılmasıyla oluşur) dumanında bulunan bir grup bitki büyüme düzenleyicisidir. Yapılan çalışmalar sonucunda dumanın içerisinde nitrojen oksitlerin ve siyanohidrinlerin tohum çimlenmesini uyardığı bildirilmiştir, fakat Van Staden vd., (2004)'nın yapmış olduğu bir çalışma sonucunda dumanın içeriğinde var olan butenolid ailesinden olan karrikinlerin de

çimlenmeyi uyardığı bulunmuştur. Karrikin sadece C, H ve O içeren bir piran halkasına kaynaştırılmış bir butenolit (3-metil-2H-furo [2,3-c] piran-2-one) olarak bilinen spesifik bir lakton tipidir. Bu özelliğinden dolayı strigolaktonlar ile ilişkilendirilmektedir. Bu zamana kadar altı tane karrikin keşfedilmiştir. Bunlar; KAR1, KAR2, KAR3, KAR4, KAR5 ve KAR6 olarak adlandırılmıştır, ancak KAR1 en aktif olandır. Karrikinler dormansiyi kırarak dormant durumda bulunan tohumun çimlenmesini teşvik eder. Bitki materyalinden elde edilen dumanın (smoke water), Arabidopsis dahil olmak üzere 80 farklı cinsten 1200 bitki türünün tohum çimlenmesini olumlu yönde etkilediği çalışmalar sonucunda gösterilmiştir. Strigolaktonlar gibi *Striga* ve *Orobanche* gibi parazitik bitkilerin çimlenmesini uyarır, yan köklerin gelişimini ve sürgün gelişimini kontrol eder, fide uzunluğunu arttırır ve çeşitli stres (oksidatif stres, kuraklık, düşük ışık yoğunlukları, yüksek sıcaklık, tuzluluk, düşük ozmotik potansiye vb.) durumlarında bitki adaptasyonunu (De Cuyper ve diğerleri, 2017; Nelson ve diğerleri, 2012; Flematti ve diğerleri, 2015; Flematti ve diğerleri, 2011; Chiwocha ve diğerleri, 2009; George ve diğerleri, 2008).

4. DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE BİTKİLERİN ÇOĞALTIM AŞAMALARI

4.1. Besiyeri Hazırlama

Besiyerleri çoğunlukla pek çok firmada hazır olarak satılmaktadır ve hazırlama protokolü üzerlerinde mevcuttur. Fakat çalışmak için temel bir MS besiyeri hazırlamak istiyorsak kullanılacak olan makro ve

mikro elementlerin ve vitaminlerin stok solüsyonlarının hazırlanması gerekmektedir.

4.1.1. MS Besiyeri İçin Stok Solüsyon Hazırlama

4.1.1.1. MS Makro Element (MS-I, 20X) Stok Solüsyonu

MS-I stok solüsyon elde etmek için Tablo 4'teki elementler karıştırılır. Tüm makro elementler tarif edildiği gibi karıştırılır ve çözelti 2000 ml'ye tamamlanır ve kullanılana kadar 4 °C'de saklanır. Bu stok solüsyondan 20 litre MS besiyeri elde edilebilmektedir. 1 litre MS besiyeri hazırlamak için 100 ml stok kullanılmalıdır.

Tablo 4. MS makro element (MS-I) stok solüsyonu (Samal ve Bout, 2018)

Makro Elementler	**g/ml**	**Çözgen Madde**
KNO_3 NH_4NO_3 $MgSO_4$ KH_2PO_4	38.0 g 33.0 g 7.4 g 3.4 g	Yaklaşık 1000 ml distile su içerisinde çözülmektedir.
$CaCl_2.2H_2O$	8.82 g	Yaklaşık 500 ml distile su içerisinde çözülmektedir.

4.1.1.2. MS Mikro Element (MS-II, 100X) Stok Solüsyonu

$FeSO_4.7H_2O$ ve $Na_2EDTA.2H_2O$ dışındaki tüm mikro besinler, MS-II stoğunu hazırlamak için birlikte çözülür. 100 litre MS besiyeri için MS-II stoğu Tablo 5'deki gibi hazırlanır. 1 litre MS besiyeri hazırlamak için 10 ml stok kullanılmalıdır.

Tablo 5. MS mikro element (MS-II) stok solüsyonu (Samal ve Bout, 2018)

Mikro Elementler	g/ml ve mg/ml	Çözgen Madde
$MnSO_4.4H_2O$	2.23 g	Tüm kimyasallar 1000 ml distile su içerisinde çözdürülür ve kullanılana kadar 4 °C'de saklanır.
$ZnSO_4.7H_2O$	860 mg	
H_3BO_3	620 mg	
KI	83 mg	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	25 mg	
$CuSO_4.5H_2O$	2.5 mg	
$CoCl_2.6H_2O$	2.5 mg	

4.1.1.3. MS Demir (MS-III, 20X) Stok Solüsyonu

100 litre MS besiyeri için MS-III stoğu Tablo 6'deki gibi hazırlanır. Na_2EDTA çözeltisine $FeSO_4$ çözeltisini ekleyin ve kuvvetlice karıştırın. Hacmi 200 ml distile su ile tamamlayın. Stoku 4 °C'de pyrex şişelere koyarak ya da alüminyum folyo ya sararak saklayın. 1 litre MS besiyeri hazırlamak için bu stoktan 10 ml kullanılmalıdır.

Tablo 6. MS demir (MS-III, 20X) stok solüsyonu (Samal ve Bout, 2018)

Demir Elementi	**mg/ml**	**Çözgen Madde**
$Na_2EDTA.2H_2O$	746 mg	İkisinide 80 ml distile suda çözülür.
$FeSO_4.7H_2O$	556 mg	

4.1.1.4. MS vitamin (MS-IV, 100X) stok solüsyonu

100 litre MS besiyeri için vitamin stok solüsyon miktarı Tablo 7'de verilmiştir. 1 litre MS besiyeri hazırlamak için bu stoktan 10 ml kullanılmalıdır.

Tablo 7. MS vitamin (MS-IV, 100X) stok solüsyonu (Samal ve Bout, 2018)

Vitamin	**g/ml ve mg/ml**	**Çözgen Madde**
Myo-inositol	10.0 g	Kimyasal 1000 ml distile su içerisinde çözülür ve kullanılana kadar 4 °C'de saklanır.
Thiamine	10.0 mg	
Nicotinic acid	50.0 mg	
Pyridoxine HCl	50.0 mg	
Glycine	200.0 mg	

1 litre MS besiyeri hazırlamak için tüm stok solüsyonlar (MS-I, MS-II, MS-III ve MS-IV) belirtilen miktarda eklenir ve karıştırılır. Karbon kaynağı eklenir (sakaroz, glikoz, maltoz, rafinoz ve früktoz vb.) ve yapılan çalışmaya göre içerisine oksin, sitokinin ya da başka bir bitki büyüme düzenleyicisi eklenir ve pH 5,2-5,8'e ayarlanır. En son ortamı yarı katı hale getirmek için agar eklenir ve agar eriyene kadar

karıştırılır. Hazırlanan ortam 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121 °C'de otoklavda steril edilir.

4.2. Eksplant Seçimi ve Sterilizasyon

Eksplant doku kültüründe çalışılacak olan bitki parçasıdır. Eksplant olarak, meristem, sürgün ucu, kök parçası, nodyum, tomurcuk, çiçek ya da çiçek sapı, anter, gövde, yaprak ya da yaprak sapı, tohum, embriyo, hipokotil, yumru, tek bir hücre ya da protoplast kullanılabilmektedir. Çalışmanın amacına göre eksplant türleri Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Kültür tipi ve kullanılacak eksplant (Samal ve Bout, 2018)

Kültür Tipi	**Kullanılacak Eksplant**
Kallus kültürü Hücre kültürü	Yaprak, anter, kök ve yumru parçaları, yaprak sapı,
Meristem kültürü	Apikal ve aksiller (koltuk altı) tomurcuklar
Protoplast kültürü	Kallus/hücre kültürleri, yapraklar
Mikroçoğaltım	Meristemlerden, sürgünlerden ve apikal tomurcuklardan kesilen nodyumlar
Germplazm muhafazası	Virüs ve bakteriden ari bitki kısımları
Organogenez	Yaprak, kök ve yumru parçaları, protoplast ve kallus
Embriyo kültürü	Olgun veya olgunlaşmamış tohumlar
Anter kültürü	Anter veya polen taneleri

Doku kültürü için hastalıksız bitkilerin kullanılması çok önemlidir. Bunun için bitkilerin laboratuvar ortamında büyütülmesi daha sağlıklı sonuçlar verir. Arazi ortamından alınacaksa da 2 hafta ile 6 ay arasında laboratuvar ortamında kontrollü koşullar altında özel bakım yapılır ve bitkiler mümkün olduğunca sağlıklı hale getirilir. Doku kültüründe en önemli işlem bitkileri mantarlardan ve bakterilerden arındırmaktır. Bunun için kullanılacak eksplantın türüne göre en iyi sterilizasyon yöntemi seçilmelidir. Eksplantları sterilize etmek için çeşitli sterilize edici ajanlar / kimyasallar kullanılır, sterilize edici ajan bitki dokusu için toksiktir, bu nedenle eksplant hasarını en aza indirgemek için uygun sterilize edici ajan konsantrasyonu ve işlem süresini standartlaştırmak gerekmektedir. Sterilizasyon ön işlemi için eksplant akan bir suyun altında yıkanır, yaklaşık %75 etanol içerisinde 40 saniye kadar bekletilir ve birkaç damla Tween-20 ile temizlenerek durulanır. Bu aşamadan sonra kullanılacak eksplantlar (Kalsiyum ve sodyum hipoklorit, Hidrojen peroksit, Bromür su, Gümüş nitrat, Civa klorür) farklı konsantrasyon ve sürede çeşitli kimyasal ajanlar ile muamele edilir. Sterilizasyon ajanı muamelesinden sonra eksplantlar yapışan toksik ajanları çıkarmak için steril distile suyla 4-5 kez yıkanır (Samal ve Bout, 2018).

4.3. Eksplantların Kültür Ortamına Ekimi

Eksplantlar kültür ortamına ekilmeden önce ekim işleminin yapılacağı odanın sterilizasyonundan emin olmak gerekmektedir. İlk işlem olarak odanın ve çalışılacak malzemelerin sterilizasyonu yapılmaktadır. Ekim işlemi laminar hava akışlı HEPA filtreli steril kabin içerisinde

gerçekleştirilir. Pensler, bisturiler, makaslar ve özelerin %70-95'lik alkole daldırılıp ekim işleminden önce aleve tutularak steril edilmesi sağlanmalıdır. Ekim işleminden sonra kullanılan kültür kaplarının (magenta, petri kabı, cam şişeler vb.) etrafı sıkıca streç film ile kaplanmalı ve kültür tüplerine pamuk tıkaçlar yerleştirilmelidir. Ekim işleminden sonra eksplantlar özel kültür odalarına ya da bitki büyütme kabinlerinde muhafaza edilir. Çalışılan deney gruplarını kontaminasyon var mı yok mu diye düzenli aralıklarla kontrol etmek gerekmektedir. Ekimden yaklaşık bir hafta sonra eğer kontaminasyon var ise bakteri ve mantar kolonileri oluşmaya başlar. Steril olmayan kültür kapları alınarak bakteri ve mantarlar otoklavda öldürülmelidir. Kullanılan eksplant türüne ve deneyin özelliklerine göre kültüre alınan örnekler düzenli aralıklarla (bir hafta ile bir ay arasındaki bir periyotta) taze besiyerlerine (altkültür işlemi) aktarılmaları gerekmektedir. Eğer altkültür yapılmazsa kültür kaplarındaki dokular hem azalan besin kaynağı bakımından rekabete girerler, hem de kültür kabının içerisinde gereğinden fazla kalabalık olmaya başlarlar (Samal ve Bout, 2018).

4.4. Dış Ortama Alıştırma (aklimatizasyon)

Steril koşullarda, yüksek nem içeren ve tüm besin maddelerinin bulunduğu bir ortamda gelişen bitkileri, daha düşük nem içeren ve steril olmayan bir ortama aktarmak çok dikkat isteyen ve kademeli olarak yapılması gereken bir işlemdir. Öncelikle bitkiler kültür kaplarından çıkarılır ve agarlı besiyerinin uzaklaşması için çok dikkatli bir şekilde yıkanmalıdır. Yüksek nem (%100) içeren sisleme

sistemine sahip seralardaki steril topraklara ekimi gerçekleştirilir. Ayrıca su kaybını minimize etmek için üzerleri kaplanmalıdır. Herhangi bir kontaminasyona karşı tüm önlemler alınmalıdır. Aksi takdirde alıştırma süreci uygun bir şekilde tamamlanmaz ya da herhangi bir nedenden dolayı kontaminasyon gerçekleşirse çalışma tüm bitkilerin kaybı ile sonuçlanabilir. Bu nedenle aklimatizasyon doku kültüründe çok önemli bir aşamadır (Samal ve Bout, 2018; Gürel, 2016).

5. Kültür Tipleri

5.1. Kallus Kültürü

Kallus, bitkiden bir parça (yaprak, kök, gövde vb.) kesilip alınarak içerisinde bitki büyüme düzenleyicileri (oksin-sitokinin) içeren steril edilmiş yarı katı besiyerinde büyütülmesi sonucu oluşan farklılaşmamış hücre kütlesidir. Oksin ve sitokinin bitki büyüme düzenleyicileri genellikle kallus hücrelerinin sürekli olarak çoğalmasını ve kallus formunda kalmasını sağlayabilir ya da farklı konsantrasyonlarda kullanımı kallus dokusunu organogenez ve somatik embriyogenez oluşumuna yönlendirebilir. Kallus kültürleri organogenez, bitki rejenerasyonu, somatik embriyogenez ve hücre süspansiyon kültürlerinin başlangıç noktasını teşkil etmektedir. Ayrıca kallus hücreleri somaklonal varyasyonların da oluşmasını teşvik edebilmektedir. Kallus kültürlerinin stabil bir şekilde çoğalmaları ve büyümeleri için belirli aralıklar ile altkültürleme yapılması çok önemlidir (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016; George ve diğerleri, 2008).

5.1.1. Somaklonal Varyasyon

Doku kültürü çalışmalarında kullanılan bitki hücreleri *in vitro* koşullar altında büyümeleri süresinde bazı genetik ya da hücre ve doku düzeyinde bazı değişiklikler geçirirler. Bu değişikliklerin bazıları kültüre alınan eksplantlardaki anormal hücrelerden kaynaklanırken, bazıları ise kültür ortamında meydana gelen değişikliklerden (bitki büyüme düzeneyicilerinden oksin ve sitokininin konsantrasyonu, kültür ortamının bileşimi, kültür koşulları, kültür süresi vb.) kaynaklanmaktadır. Bunların dışındaki bazı değişiklikler kalıtsal değildir yani sonraki nesillere aktarılmaz bunlar epigenetik değişimlerdir. Epigenetik değişikliklerin aksine belli bir genetik değişikliğin veya mutasyonun sonucunda ortaya çıkan (DNA metilasyonu, nükleik asit öncüllerinin kaybı, *in vitro* hücre bölünmesindeki anormallikler vb.) ve sonraki nesillere aktarılan bu değişikliklere somaklonal varyasyon denir. Somaklonal varyasyonun hem iyi hem de kötü yanları vardır. Somaklonal varyasyonun klonal çoğaltım olarak ifade edilen mikroçoğaltım tekniğinde meydana gelmesi sonucunda aynı genetik yapıdaki bitkileri üretmek pek mümkün olmayabilir. Bu yüzden mikroçoğaltım tekniğinde varyasyonların gerçekleşmemesi için en güvenilir doku kültürü tekniklerinin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Ama bazı durumlarda mikroçoğaltımda meydana gelen bu istenmeyen fenotipik ve genotipik değişiklikler bitki ıslahında büyük önem taşımaktadır. Bu değişiklikler sayesinde doğal varyasyonun daraldığı veya varyasyon meydana getirmenin zor olduğu durumlarda yeni hücre hatlarının gelişimi için istenen özelliklere sahip somaklonal varyantların

meydana getirilmesi mümkün olmaktadır. Bu genetik olarak farklı bitkiler kallus dokusundan ya da sürgün tabanında şekillenen kallus dokusundaki yarı düzenli kültürlerden meydana gelebilir. Bu varyasyonlar sayesinde bitki ıslahında büyük adımlar atılmıştır ve hastalıklara, soğuğa, tuzluluğa ve donmaya toleranslı hücre hatları kallus dokuları kullanılarak elde edilmiştir. Ayrıca fungal toksinlere, herbisitlere ve tuza dayanıklı hücre hatları *in vitro* seleksiyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016; George ve diğerleri, 2008).

5.2. Hücre Süspansiyon Kültürü

Hücre süspansiyon kültürü, çalkalanmakta olan bütün besin elementlerini içeren sıvı besiyerindeki hücre kümeleri ve kallus hücrelerinden meydana gelmektedir. Bu kültür sayesinde pek çok alanda ekonomik önemi olan sekonder metabolitler üretilmektedir. Sekonder metabolitler bitkinin normal büyüme ve gelişmesi için ihtiyaç duymadığı fakat yan ürün olarak bitkiler tarafından üretilen kimyasal maddelerdir. Sekonder metabolitlerin bitkilerde, değişen çevre şartlarından kaynaklı stres ortamına karşı koyma, herbivorlara ve mikroorganizmalara karşı savunma, polinasyonda hayvanları cezbetmek için renk ve koku üretmek gibi görevleri vardır. Bitkiler tarafından üretilen belli başlı sekonder metabolitler flavanoidler, alkaloidler, terpenler ve tananlerdir. Sekonder metabolitlerin ilaç üretiminden, besin katkı maddesi olarak kullanımına, parfümeri ve zirai mücadelede kullanımına kadar pek çok alanda ekonomik değeri vardır. Sekonder metabolitleri büyük ölçekli üretmek için

biyoreaktörlerden (fermentörler) yararlanılmaktadır. Üretimde hücre süspansiyon kültürlerinden optimum büyüme ve üretimi arzu edilen sekonder metabolitin maksimum birikiminin sağlanması için öncüller (precursors), biyodönüşüm (biyotransformasyon), hücre geçirgenliği, tutuklama (immobilizasyon), elisitasyon, senkronize ve iki aşamalı kültürler gibi deneysel yaklaşımlar kullanılmaktadır (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016; Aktaş ve Çölgeçen, 2017).

5.3. Anter/Mikrospor Kültürü (Haploit Bitki Üretimi)

Anter kültürü, içerisinde olgunlaşmamış polenler (mikrosporlar) taşıyan anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay bir besiyerinde haploid embriyolar elde edilmesi olarak bilinir. Anter kültürü mikrospor kültürüne göre daha avantajlıdır. Çünkü içerisinde binlerce mikrospor barındırmaktadır ve böylece aseptik şartlarda optimum kültür ortamında birçok haploid bitki elde edilebilmektedir. Ayrıca haploid bitkiler bazı kimyasallar (kolşisin vb.) ile kromozom katlanması sağlanır ve dihaploid duruma getirilir. Böylece kısa sürede, çok sayıda % 100 homozigot bitki hatları elde edilmektedir. Haploid bitkiler ıslah çalışmalarında genetik analizlerde ve benzer çalışmalarda kullanılan önemli bir materyaldir. Bu sayede ıslah süresi kısalarak çok sayıda %100 saf hatlar elde edilir, F1 hibrit çeşit ıslahında doğrudan ebeveyn olarak kullanılabilir, dayanıklılık çalışmalarında istenilen özelliklerin seçimine yeni kültürlerin oluşturulmasına ve mutasyon ıslahında resesif mutasyonların ortaya çıkarılmasına imkan verir. Bunun yanı sıra bazı dezavantajları vardır; genotipe bağlı olarak bazı türlerde cevap almak zordur ve bazı türlerde

ise albino bitkiler gelişebilir. Bunlar ıslah çalışmaları için büyük sorunlardır (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016; Çağlar ve Abak, 1999).

5.4. Protoplast Kültürü ve Somatik Melezleme

Protoplast, hücre duvarı yok edilmiş hücre zarı ile çevrili hücrenin bütün unsurlarını içeren yapıdır. Protoplast kültürü ise, aseptik koşullarda bir hücreden protoplastın izole edilmesi, daha sonra bu protoplastlardan yeniden hücre duvarının oluşturulması, hücrelerin mitoz bölünme ile çoğaltılması ve bitki rejenerasyonu ile tam bir bitki elde edilmesini sağlayan *in vitro* tekniktir. Selülozik yapıdaki hücre duvarı ya mekanik olarak ya da enzimatik olarak parçalanarak elde edilen protoplastları kullanarak, tek bir hücreden tam bir bitki rejenere etmek ya da somatik melezler geliştirebilmek mümkün olabilmektedir. Hücre duvarının yapısı pektin, selüloz, hemiselüloz, lipit ve proteinden meydana gelmektedir. Bu yapıları parçalamak için bir enzimin varlığı şarttır. En yaygın kullanılan enzimler, selülaz ve pektinazdır. Protoplast kültüründe eksplant kaynağı olarak, yaprak mezofil hücreleri, embriyogenik kallus ve hücre süspansiyonları, genç bitki dokuları (hipokotil, kotiledon vb.), 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 vb.) kullanılmaktadır. Protoplast kültürü sayesinde bitki ıslahında önemli bir teknik olan somatik melezleme yapılmaktadır ve bu teknik, klasik yöntemler ile gen akışının sağlanamadığı

kombinasyonlarda melezlemeye olanak sağlamaktadır. Ayrıca protoplast kültürü, mutant izolasyonu, hücre organellerinin (nükleus, kloroplast, mitokondri vb.) izolasyonu, gen aktarımı ve hücre zarından madde taşınımı ile ilgili çalışmalarda da kullanılabilmektedir.

Somatik melezleme, iki protoplastın çekirdek ve sitoplazmalarının birbiriyle birleştirilmesi olayıdır. Bir protoplastın çekirdek ve sitoplazmasının diğer bir protoplastın sitoplazması ile birleşmesi sonucu oluşan melez bitkiye ise somatik sibrit denir. Protoplast füzyonu daha çok kimyasal (PEG-polietilen glikol) ya da elektriksel yollarla gerçekleştirilir. Somatik melezleme çeşitli uyuşmazlıklar gösteren cins ve türler arası melezlemeye ve yeni türlerin elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Ve hatta cins ve türler arası mitokondriyel DNA, kloroplast ve sitoplazma gibi çekirdek dışı genetik elementlerin transferine de olanak sağlamaktadır. Protoplastlar bitki rejenerasyonu ve gen transferi için çok cazip görülse de protoplastlar ile çalışmak çok büyük hassasiyet ve dikkat isteyen bir iştir. Bu nedenle, protoplastlardan bitki rejenerasyonu çalışmalarından ziyade, proteinlerin yerini belirleme ve geçici transgen analizleri için yaygın olarak kullanılmaktadır (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016).

5.5. Embriyo Kültürü

Bitkilerin tohumlarından ya da tohum taslaklarından embriyoların steril koşullarda izole edilerek yapay bir besiyerinde *in vitro* koşullarda kültüre alınması işlemidir. Olgun tohum embriyoların

kültürü ve olgunlaşmamış erken bölünme fazındaki proembriyoların kültürü olmak üzere iki tip embriyo kültürü vardır. Embriyo kültürü, dormant, inatçı ve sert tohum kabuğuna sahip türlerin çimlenmesinde kullanılarak ıslah süresini kısaltmak için iyi bir yöntemdir. Bunun yanı sıra embriyosu tam olarak gelişmeyen türlerden çimlenebilir normal bitkiler üretilmesinde ve çimlenme yeteneği olmayan tohumlar oluşturan türler arası melezlerden yaşayan hibrit embriyolar oluşturulmasında kullanılmaktadır. Ayrıca embriyo kültürü ile haploit bitki üretimi, tohum canlılık testi, olgunlaşmamış embriyo ve embriyogenik kallus ile direkt somatik embriyoların üretimi de sağlanabilmektedir (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016).

5.6. Meristem Kültürü

Tarla ve sahadan alınan ve *in vivo* olarak yetiştirilen bitki materyalleri genellikle fungal, bakteriyal ve viral hastalıklar ile bulaşık olabilirler. Doku kültürü yolu ile çoğaltım sırasında bitki materyallerini sterilize etsek bile bazı durumlarda kültür ortamında bakteri ve mantar kolonileri gelişebilmekte ve büyük kayıplara neden olmaktadır. Bu durum yüzey sterilizasyonun yeteri kadar yapılmadığı durumlardan, eksplantın içine gizlenmiş olan mikroorganizmalardan ya da uzun bir steril kültür döneminden sonra doğal olarak meydana gelen kronik kontaminasyonlardan kaynaklı olabilir. Bunun için özellikle mikroçoğaltım çalışmalarında bütün bitkiler hastalıktan ari olması gerekmektedir. Apikal meristem uçları kullanılarak virüsten, bakteriden ve mantardan ari hastalıksız bitkiler elde edilebilmektedir. Meristem kültürü ile virüsten ari bitki materyali elde etmek,

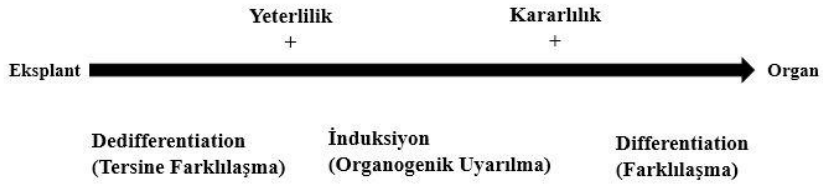
mikroçoğaltım, germplazm muhafazası, genetik transformasyon, bakteri ve mantardan ari bitki eldesi mümkün olmaktadır. Meristem kültüründe kullanılan eksplantın büyüklüğü, fizyolojik durumu, alındığı mevsim, kültür ortamı (mineral tuzlar, şekerler, agar, büyüme düzenleyicileri vb.) ve şartları başarıyı etkileyen faktörler arasındadır. Meristem kültürünün başarısız olduğu durumlarda termoterapi uygulaması ile virüssüz bitkilerin üretiminde başarı sağlanmıştır (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016).

6. *In Vitro* Bitki Rejenerasyon Yöntemleri

6.1. Organogenez

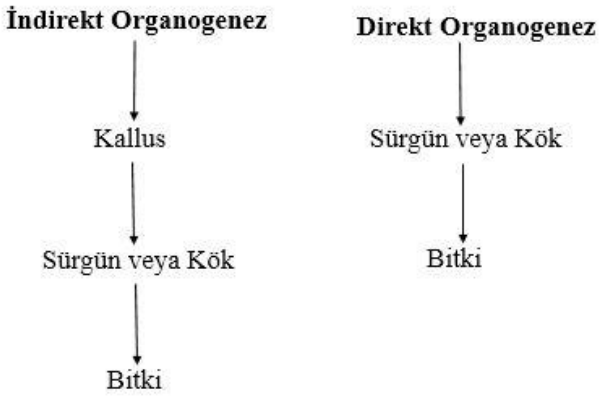
Somatik hücrelerden ya da dokulardan sürgünler, kökler ya da yapraklar gibi organların oluşmasına organogenez denilmektedir. Bitkisel dokular tamamen farklılaşan hücrelere, bozulmamış bir hücre zarı sistemine ve canlı bir çekirdeğe sahip olduğu sürece tekrar meristematik bir özellik kazanarak mitoz bölünme gösterebilirler. Bu bölünmeler sonucunda adventif sürgün ya da kök sistemi doğrudan ya da farklılaşmamış hücre yığını olan kallus dokusundan sürgün veya kök meydana getirir. İşte bu farklılaşmamış bitki dokusunun bu şekilde hücre yığınına dönüşmesine tersine farklılaşma (dedifferentiation), böyle bir hücre yığınından sürgün ve kök gibi morfolojik bir değişikliğin olması ise yeniden farklılaşma (redifferentiation) olarak adlandırılır (Şekil 5). Bütün bu özellikler bitkisel dokuları eşsiz kılan totipotensi özelliğinden kaynaklanır. İşte bu özellik sayesinde de protoplastların, hücrelerin, dokuların ve

organların kültürleri yapılarak *in vitro* bitki rejenerasyonu sağlanmış olunur.



Şekil 5. Organogenez Oluşum Aşamaları

Organogenez indirekt ve direkt olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 6). İndirekt organogenezde, kullanılan eksplanttan doğrudan kallus dokusu oluşturulur oksin ve sitokinin gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması ile sürgün ya da kök oluşumu teşvik edilerek tam bir bitki elde edilmektedir. Direkt organogenezde ise kullanılan eksplanttan doğrudan sürgün ya da kök dokusu oluşturularak tam bir bitki rejenerasyonu sağlanmış olunur.

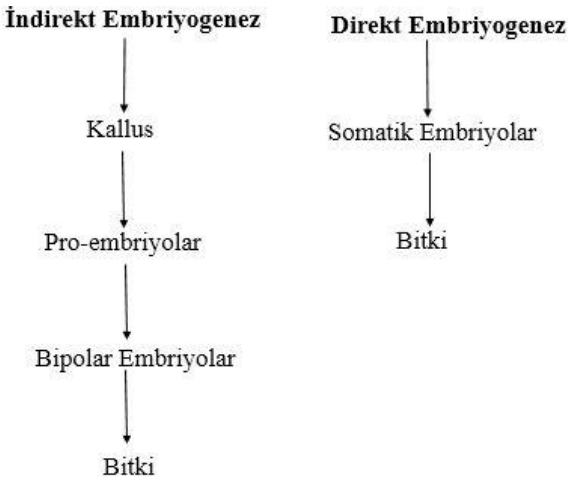


Şekil 6. Organogenez Çeşitleri

İndirekt organogenezde klonal çoğaltım pek mümkün olmayabilir, fakat somaklonal varyantların seçimi ve kitlesel çoğaltım için ideal bir sistemdir. Bitki transformasyon çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Direkt organogenez ise bitkilerin etkin çoğaltımı, transgenik bitki üretimi ve en önemlisi klonal çoğaltım için başarılı bir şekilde uygulanabilmektedir (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016).

6.2. Somatik Embriyogenez

Bitkinin somatik dokularından kapalı vasküler sisteme sahip kök ile sürgün yapısını içeren bipolar (iki kutuplu) bir embriyonun üretilmesini sağlayan aseksüel gelişim sürecine somatik embriyogenez denir. Kallus ve vejetatif dokulardan gelişen embriyolara somatik embriyo adı verilmektedir. Somatik embriyogenez *in vitro* bitki üretiminde klonal çoğaltım için çok uygun bir tekniktir. Somatik embriyogenez eksplant kaynağı, genotip, besin ortamının içeriği ve çevresel şartlar gibi faktörlerden etkilenmektedir. Somatik embriyogenez de organogenezde olduğu gibi indirekt ve direkt embriyogenez olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 7).



Şekil 7. Somatik Embriyogenez Çeşitleri

İndirekt embriyogenezde eksplant öncelikle oksin içeren besiyerine aktarılır ve kallus oluşumu teşvik edilir. Daha sonra bu kalluslardan pro-embriyolar oluşur. Kallus oksin içermeyen bir besiyerine aktarılırsa pro-embriyolardan bipolar embriyolar oluşur. Eğer şartlar uygun ise bipolar embriyolardan bitkicikler elde edilir. Direkt embriyogenezde ise eksplant dokusundaki tek bir hücre ya da hücre gruplarından bitki gelişir. Direkt embriyogenezde en sık kullanılan eksplant kaynağı olgunlaşmamış somatik embriyolardır. İndirekt somatik embriyogenez, somaklonal varyantların seleksiyonunda ve transgenik bitki üretiminde kullanılırken, direkt somatik embriyogenez somaklonal varyasyon ihtimali düşük olduğundan klonal çoğaltım için daha avantajlıdır. Somatik embriyogenez tekniği kullanılarak, klonal çoğaltım, transgenik bitki üretimi ve sentetik tohum üretimi mümkün olmaktadır (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Gürel, 2016).

KAYNAKÇA

Aktaş, M. & Ateş, A. (1998). Bitkilerde Beslenme Bozuklukları Nedenleri Tanınmaları. Nurol Matbaacılık A.Ş. Ostim-Ankara.

Aktaş, T., & Çölgeçen, H. (2017). Farklı Bitki Türlerinde Bitki Doku Kültürü Teknikleriyle Flavonoidlerin Üretimi. Karaelmas Science and Engineering Journal, 7(2), 665-673.

Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M. A. (2002). Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları. Mehmet Babaoğlu, Ekrem Gürel ve Sebahattin Özcan (Ed.), Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri (s.1-373). Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi.

Baktır, İ. (2010). Bitki Büyüme Düzenleyicileri Özellikleri ve Tarımda Kullanımları. Hasad Yayıncılık.

Baldwin, I. T., Staszak-Kozinski, L., & Davidson, R. (1994). Up in smoke: I. Smoke-derived germination cues for postfire annual, Nicotiana attenuata Torr. Ex. Watson. Journal of Chemical Ecology, 20(9), 2345-2371.

Borkird, C., & Sink, K. C. (1983). Medium components for shoot cultures of chlorophyll-deficient mutants of Petunia inflata. Plant cell reports, 2(1), 1-4.

Boşgelmez, A., Boşgelmez, İ. İ., Savaşçı, S. & Paslı, N. (2001). Ekoloji – II (Toprak), Başkent Klişe Matbaacılık, Kızılay-Ankara.

Brady, N. C. (1990). The Nature and Properties of Soils (10. Baskı), Macmillan Publishing Company, New York, USA.

Chiwocha, S. D., Dixon, K. W., Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Merritt, D. J., Nelson, D. C., ... & Stevens, J. C. (2009). Karrikins: a new family of plant growth regulators in smoke. Plant science, 177(4), 252-256.

Çağlar, G., & ABAK, K. (1999). Hıyarda (Cucumis sativus L.) in situ uyartım sonucu elde edilen haploid embriyolardan in vitro haploid bitki oluşturma. Tr. J. of Agriculture and Forestry, 23, 283-290.

De Cuyper, C., Struk, S., Braem, L., Gevaert, K., De Jaeger, G., & Goormachtig, S. (2017). Strigolactones, karrikins and beyond. Plant, cell & environment, 40(9), 1691-1703.

De Lange, J. H., & Boucher, C. (1990). Autecological studies on Audouinia capitata (Bruniaceae). I. Plant-derived smoke as a seed germination cue. South African Journal of Botany, 56(6), 700-703.

Driver, J. A. & Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. Horticultural Science 19:507–509.

Eyidoğan, F. ve Ekmekçi, Y. (2016). Biyoteknolojisi ve Genetik. Hüseyin Avni Öktem ve Meral Yücel (Ed.), Bitki Gelişimi ve Fizyolojisi (s. 101-103). Ankara: Nobel.

Fageria, N. K. (2009). The Use of Nutrients in Crop Plants. CRC Pres, Boca Raton, Florida, New York.

Fan, X., Mattheis, J. P., Fellman, J. K., & Patterson, M. E. (1997). Changes in jasmonic acid concentration during early development of apple fruit. Physiologia Plantarum, 101(2), 328-332.

Flematti, G. R., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2015). What are karrikins and how were they 'discovered'by plants?. BMC biology, 13(1), 108.

Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Trengove, R. D. (2004). A compound from smoke that promotes seed germination. Science, 305(5686), 977-977.

Flematti, G. R., Scaffidi, A., Dixon, K. W., Smith, S. M., & Ghisalberti, E. L. (2011). Production of the seed germination stimulant karrikinolide from combustion of simple carbohydrates. Journal of agricultural and food chemistry, 59(4), 1195-1198.

Foth, H. D. (1978). Fundamentals of soil science. Soil Science, 125(4), 272.

Fox, J. E., & Miller, C. (1959). Factors in corn steep water promoting growth of plant tissues. Plant physiology, 34(5), 577.

Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental cell research, 50(1), 151-158.

Gardiner, D. T. & Miller, R. W. (2008). Soils in Our Environment (11. Baskı). Pearson/Prentice Hall, USA: Upper Saddle Hill.

George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk, G. J. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture (3. Baskı), The Components of Plant Tissue Culture Media II : Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems (s. 119-121). Netherlands: Springer.

Germination of witchweed (Striga lutea Lour.): isolation and properties of a potent stimulant

Guha, S., & Maheshwari, S. C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of Datura. Nature, 204(4957), 497-497.

Gürel, S. (2016). Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik. Hüseyin Avni Öktem ve Meral Yücel (Ed.), Doku Kültürü: Bitki Gelişiminin Yönlendirilmesi (s. 113-128). Ankara: Nobel.

Güzel, N., Gülüt, K. Y. & Büyük, G. (2004). Toprak Verimliliği ve Gübreler. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 246, Ders Kitapları Yayın No: A-80, Adana.

Kacar, B. & Katkat, V. (2010). Bitki Besleme. 5. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım Tic. Ltd. Şti, Kızılay-Ankara.

Kantarcı, M. D. (2000). Toprak İlmi. İÜ Toprak İlmi ve Ekoloji Anabilim Dalı, İ Ü Yayın No. 4261, Orman Fakültesi Yayın No. 462, İstanbul, 420 s.

Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin. 15: 214-217.

Koda, Y., Kikuta, Y., Tazaki, H., Tsujino, Y., Sakamura, S. & Yoshihara., T., (1991). Potato tuber -inducing activities of jasmonic acid related compounds, Phytochemistry, 30, 1435-1438.

La Rue, C.D. (1949). Cultures of the endosperm of maize. American Journal of Botany. 36-798.

Linsmaier, E. M., & Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 18(1), 100-127.

McCauley, A., Jones, C., & Jacobsen, J. (2009). Plant nutrient functions and deficiency and toxicity symptoms. Nutrient management module, 9, 1-16.

McCown, B. H. & Lloyd, G. (1981). Woody Plant Medium (WPM)-a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. Horticultural Science. 16: 453.

McGranahan, G.H., et al. (1962). Cell and Tissue Culture in Forestry Bonga, J. B ve D. J Durzan (Ed.), Martinus Nijhoff, Dordrecht, 261-271.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3), 473-497.

Nelson, D. C., Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2012). Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation. Annual review of plant biology, 63.

Nitsch, J. P., & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. Science, 163(3862), 85-87.

Olszewski, N., Sun, T. P., & Gubler, F. (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. The Plant Cell, 14(suppl 1), S61-S80.

Onay, A., Yıldırım, H., Pirinç, V., Tilkat, E., Çiftçi, Y. Ö., Akdemir, H., Süzerer, V., Çalar, N., Binici, M., Akdemir, Ö. F. ve Kılınç, F. M. (2012). Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut Ve Gelecekteki Durum. Batman University Journal of Life Sciences, 1(2), 11–28.

Plaster, E. J. (1992). Soil Science and Management (2. Baskı), Delmar Publishers Inc., Albany, New York, USA.

Ranga Swamy, N.S. (1963). Studies on culturing seeds of Orobanche aegyptiaca. Maheshwari and Ranga Swamy (Ed.). 345-354.

Rice, R. W. (2007). The physiological role of minerals in the plant. Mineral nutrition and plant disease. APS Press, St. Paul, MI, 9-29.

Robbins, W. J. (1922). Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. Botanical gazette, 73(5), 376-390.

Saalbach, G., & Koblitz, H. (1978). Attempts to initiate callus formation from barley leaves. Plant Science Letters, 13(2), 165-169.

Samal, K. C. & Rout, G. R. (2018). Practical Manual on Plant Tissue Culture and its Certification (2. Baskı). Bhubaneswar: M.S. Infotech.

Steward, F. C., & Shantz, E. M. (1959). The chemical regulation of growth (some substances and extracts which induce growth and morphogenesis). Annual Review of Plant Physiology, 10(1), 379-404.

Şahin, M. (2016). Bitkilerde Doku Kültürü Yöntemi ve Uygulama Alanları. Apelasyon, Sayı: 29.

Tyler, L., Thomas, S. G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Sun, T. P. (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. Plant physiology, 135(2), 1008-1019.

Ünsal, P. N. (1993). Bitki Büyüme Maddeleri. İstanbul Üniversitesi, Enstitü yayın no:4 İstanbul.

Van Den Berg, J. H., & Ewing, E. E. (1991). Jasmonates and their role in plant growth and development, with special reference to the control of potato tuberization: a review. American Potato Journal, 68(11), 781-794.

Van Staden, J., Jager, A. K., Light, M. E., & Burger, B. V. (2004). Isolation of the major germination cue from plant-derived smoke.

White, F. F. (1993). Vectors for gene transfer in higher plants. Kung, S. D., Wu, R. (Ed.), Transgenic Plants (1. Baskı), Engineering and Utilization (s. 15-48), Academic Press.

White, P. R. (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiology, 9(3), 585.

White, R. E. (2006). Principles and Practice of Soil Science: The Soil as a Natural Resource (4. Baskı). United Kingdom: Wiley-Blackwell Scientific Publication, London.

Yıldız, K., & Yılmaz, H. (2001). Jasmontlar (Jasmonic acid and Methyl jasmonate) Yeni Bir Bitkisel Hormon Grubu Olabilir Mi?. Derim, 18(2), 89-95.

BÖLÜM 4

ENDÜSTRİYEL BİYOTEKNOLOJİ UYGULAMALARI VE BİYOEKONOMİ

Doç. Dr. Arzu ÜNAL[4]

[4] Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Iğdır, Türkiye. arzu.unal@igdir.edu.tr

GİRİŞ

Endüstriyel Biyoteknolojı'nin tanımına geçmeden önce Biyoteknoloji'nin tanım ve kapsamını ele alıp değerlendirmek uygun olacaktır. Sözcük olarak ilk kez 1919 yılında Macar asıllı Karoly Ereky tarafından kullanılan BİYOTEKNOLOJİ'nin günümüzde kullanılan birçok tanımı bulunmaktadır. Bunlar arasında ilgili çevrelerce en yaygın kabul göreni EFB (European Federation of Biotechnology) tarafından yapılan tanımlamadır. Bu tanımlamaya göre BİYOTEKNOLOJI Çevre ve insan sağlığına zarar vermeden, biyolojik sistemlerin mühendislik ilkeleri esas alınarak mal ve hizmet üretiminde kullanılmasıdır. Söz konusu tanımdaki BİYOLOJİK SİSTEMLER deyimi, her türlü biyolojik kaynaktan (bitki, hayvan ve mikroorganizma gibi) elde edilen doku ve hücrelere ek olarak enzim, nükleik asitler gibi doğal ve yapay biyomolekülleri de kapsar. Tanımda ÇEVRE VE İNSAN SAĞLIĞI deyimine yer verilmekle, biyoteknoloji sistem ve süreçlerinin biyolojik-silah gibi insan sağlığını ve ekolojik yaşamı tehdit etmeyecek şekilde kullanılması gerektiği vurgulanmak istenmiştir. Diğer yandan, tanımdaki MAL VE HİZMET ÜRETİMİ deyimi ile ticari değeri olan MAL (örneğin, antibiyotk, alkol, çeşitli organik asitler vb) üretimi ile katı/sıvı kirliliklerin arıtımı, insan sağlığı gibi genelde kâr unsuru içermeyen HİZMET'lerin üretimine işaret edilmek istenmiştir.

Biyoteknoloji sistem ve süreçlerin kullanılmasının insan yaşamındaki yeri insanlık tarihi kadar eskidir. Örneğin bugün birer biyoteknoloji

süreci oldukları bilinen bira yapımı, ekmek yapımı ve şarap yapımı gibi üretim süreçlerinin insanlık tarihinde çok eski bir geçmişi bulunmaktadır. Fermantasyonun mikroorganizmalarca gerçekleştirilen (maya ve bakteriler) tarafından bir biyoteknoloji süreci olabileceği, ilk kez Louis Pasteur tarafından (1856) 19. yüzyılda gösterilmiştir. Aseton, bütanol ve penisilin gibi fermantasyon ürünlerinin endüstriyel ölçekte (ticari ölçekte) üretimleri 20. yüzyıllın ilk yarısında gerçekleştirilmiştir. Özellikle I. Dünya Savaşı sırasında gliserol, bütanol gibi patlayıcı yapımında ve penisilin gibi enfektif hastalıkların tedavisinde kullanılan fermantasyon ürünlerine duyulan büyük gereksinim endüstriyel–ölçekteki Fermantasyon Biyoteknolojsi'nin kurulma ve gelişmesinde önemli rol oynamıştır. Fermantasyon Biyoteknolojisi'nin gelişimi sırasında elde edilen teknolojik bilgi birikimi ve kazanımlar KLASİK BİYOTEKNOLOJİ olarak tanımlanan biyoteknoloji süreçlerinn ilerlemesine büyük katkıda bulunmuştur. Klasik Biyoteknoloji süreçlerinin kullanıldığı fermantasyon teknolojileri günümüzde de çeşitli bitkisel ve hayvansal endüstriyel ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır.

Petrokimya endüstrisinin 1920'li yıllardan sonra büyük gelişme göstererek fermantasyonla üretilecek birçok ürünün bu endüstri kolu tarafından daha ucuz maliyetle üretilebilmesi, ayrıca ucuz petrolün kimya endüstrisinin gereksinimi olan hammadde ve enerjiyi düşük fiyatlarla edinebilmesi fermantasyon teknolojisinin diğer bir deyimle, KLASİK MİKROBİYAL BİYOTEKNOLOJİ'NİN ileri düzeylerde gelişmesini engelleyen bir faktör olmuştur. 1973'lü yıllara

gelindiğinde, OPEC (*Organization of Petroleum Exporting Countries: Petrol İhraç Eden Ülkeler Birliği*) ülkelerinin PETROL fiyatlarını arttıran politikaları sonucu artan petrol fiyatları, özellikle hammadde ve enerjice petrole bağımlı sanayileşmiş batı ülkelerinde beklenmedik ekonomik sorun ve krizlere neden olmuştur. Bu durum, moleküler genetik alanındaki gelişmelerin ve biyoteknoloji uygulamalarının gerçekleşmesinde motive edici bir unsur olmuştur.

İlk kez İNSÜLİN ve BÜYÜME HORMONU gibi insan proteinlerini şifreleyebilen sentetik genlerin Rekombinant DNA teknikleriyle bakteri genomuna aktarılıp bakteri genomuna entegre edilmesiyle, söz konusu proteinleri üretebilen klonlanmış mikroorganizmalar elde edilmiştir. Bu şekilde MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ veya REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ olarak da adlandırılan MODERN BİYOTEKNOLOJİ'nin ilk adımları atılmıştır. Klasik Biyoteknoji, Modern Biyoteknoloji olarak iki ayrı grupta ele alabileceğimiz BİYOTEKNOLOJİ diğer birçok bilim dalından farklı olarak multidisipliner bir özelliğe sahiptir. Nitekim Biyoteknolojinin gelişmesine biyoloji, fizik, kimya, mikrobiyoloji, fizyoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, genetik vb. temel bilim dallarındaki gelişmelerin önemli katkısı olmuştur. Temel bilimlerdeki gelişmelerin üzerine bina edilen günümüz Biyoteknoloji'sinin, örneğin Çevre Biyoteknolojisi, Gıda Biyoteknolojisi, Tarım Biyoteknolojisi, Tıbbi Biyoteknoloji, Fermantasyon Biyoteknolojisi, Gen Biyoteknolojisi gibi değişik uygulama alanları bulunmaktadır.

1. ENDÜSTRİYEL BİYOTEKNOLOJİ UYGULAMALARI

Endüstriyel Biyoteknoloji uygulamaları Sürdürülebilir Kalkınma ve Biyoekonomi'nin itici gücüdür.

1.1. Sürdürülebilir Kalkınma

"Sürdürülebilir ekonomik kalkınma" 21. yüzyılın başından itibaren uluslararası arenada kalkınmada izlenmesi gereken temel strateji olarak kabul edilmektedir. Bu gerekliliğin temelinde yeryüzündeki hammadde ve enerji kaynaklarındaki giderek ortaya çıkan düşüşün yanı sıra 2050 yılında 10 milyara ulaşacağı tahmin edilen dünya nüfusundaki artış gibi küresel ölçekteki sosyoekonomik nedenler de bulunmaktadır. Özellikle son 200 yıldır fosil kökenli enerji ve hammadde kaynaklarının kullanımına dayalı üretim süreçlerinin kullanılageldiği ekonomik modellerin gerek kaynak tüketimi açısından gerekse ekolojik açıdan yarattığı sorunlar, sürdürülebilir ekonomik model arayışları için zorlayıcı nedenler olmuştur. Nitekim bu durum Birleşmiş Milletler tarafından 2000 yılı eylül ayında yayınlanan deklarasyonda "Yakın gelecekte tüm çocuk ve torunlarımızı insan etkinlikleri sonucu onarılmaz şekilde bozulmuş ve kaynakları tükenmiş bir gezegende yaşatmak için özel bir çaba harcamamıza gerek kalmayacaktır" ifadesiyle özetlenmeye çalışılmıştır. Sürdürülebilir ekonomik kalkınma modeli arayışlarını zorunlu kılan küresel nedenler arasında özellikle petrole bağlı enerji ve hammadde kaynaklarının üretiminde ortaya çıkan sorunlar kadar bu kaynakların uluslararası paylaşımında gözlenen güvenlik sorunları da önemli yer tutmaktadır. Nedenlerden bir diğeri de konvansiyonel teknolojilerin

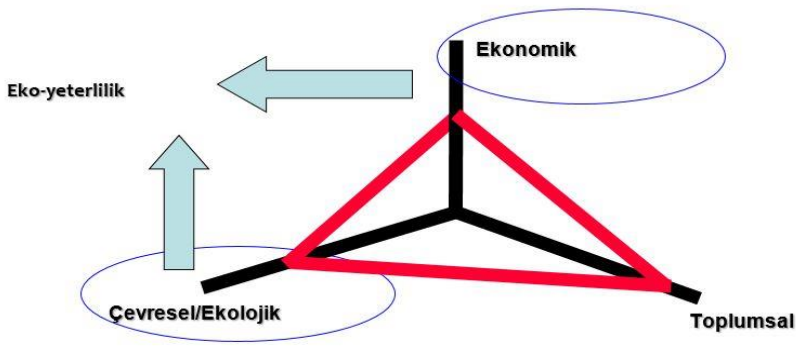
yol açtığı çevre ve sağlık sorunları nedeniyle çevre-dostu yeni teknolojiler için her gün artış gösteren kamuoyu baskısıdır.

Ekonomi ile doğal çevrenin karşılıklı bağımlılığının kalkınma politikalarında ele alınmasının gerekliliğine ilişkin ilk kapsamlı uyarı 1972 yılında Roma Kulübü'nün "Büyümenin Sınırları" başlıklı raporunda yapılmıştır. Ancak sürdürülebilir kalkınmanın küresel çapta aktif bir politika haline dönüşmesi, bu raporun yayınlanmasından sonra 20 yıllık bir gecikme ile 1992 Rio Zirvesi'nden sonra mümkün olabilmiştir.

Sonuçta bu süreç 2000 yılından itibaren Birleşmiş Milletler tarafından küresel kalkınma stratejisi olarak da kabul edilmiştir. Doğal kaynakların (su ve fosil enerji kaynakları gibi) daha az kullanımı, başta CO_2 olmak üzere kirletici emisyonların azaltılarak çevrenin küresel, bölgesel ve yerel ölçeklerde daha az kirletilmesi, bireysel ve toplumsal yaşam kalitesinin artırılması gibi nedenler söz konusu stratejinin temel hedeflerini oluştururken, diğer yandan bu hedeflere ulaşmakta izlenecek stratejik süreçler ise şu şekilde belirlenmiştir:

a) Mal ve enerji üretimde hammadde olarak yenilenebilir kaynakların kullanılması
b) Ürünlerin çevre-dostu nitelikte olması
c) Kirlilik üretmeyen ya da en az kirlilik üreten temiz üretim teknolojilerinin kullanılması
d) Enerji kullanımında tasarruf

Bu hedefler doğrultusunda ekonomik büyümenin temel dayanağını oluşturacak teknolojik yenileşmelerden (renovasyonlardan) beklenenler arasında ise üretilecek mal, hizmet ve proseslerde üstün rekabet edilebilirlik niteliğine ulaşmak, yüksek katma-değer yaratmak, yeni istihdam alanları oluşturabilmek, toplumun etik, kültürel ve ekonomik talepleriyle uyumlu olmak gibi özellikler yer almaktadır. Şekil 1'de şematik olarak özetlenmeye çalışıldığı gibi toplumsal değerlendirme, ekonomik verimlilik ve kârlılık, çevresel uyumluluk sürdürülebilir kalkınmanın 3 paydaşını oluşturan temel öğelerdir. Bu öğelerin aralarındaki bağlantının oluşturduğu üçgenin kenar uzunlukları ile sürdürülebilir kalkınmanın verim ve başarısı arasında doğru orantılı bir ilişki vardır. Yani sürdürülebilir ekonomik sürece uygun olarak üretilecek bir mal, hizmet ya da bu amaçla kullanılacak bir teknik süreç, toplumsal-etik değerlerle uzlaşmış olmanın yanı sıra kısaca Eko-yeterlilik diye tanımlanan hem ekolojik ham de ekonomik uygunluğu ortaklaşa yansıtan parametre açısından da yüksek değerde olmak zorundadır.

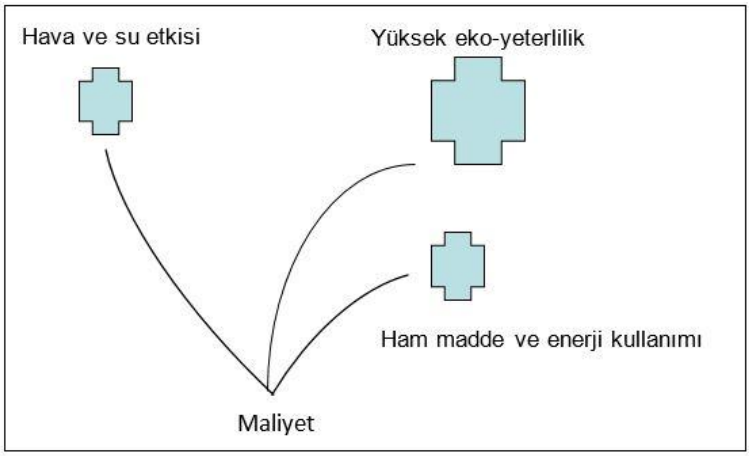


Şekil 1. Sürdürülebilir Kalkınmanın Temel Dayanakları ve Eko-Yeterlilik İlişkisinin Şematik Açıklaması

1.1.1. Sürdürülebilir Kalkınma İçin Eko-Yeterlilik Analizi

Eko-yeterlilik analizi yeni mal, hizmet ve süreçlerin sürdürülebilirlik değerini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır**.** Söz konusu analitik değerlendirmenin grafiksel boyutlandırılması ve analizi, apsise maliyet, ordinata da 6 ayrı paremetre açısından çevresel-etki değerlendirilmesi yerleştirilerek yapılmaktadır (Şekil 2). *Çevresel etki değerlendirmede* ele alınan paremetreler aşağıda belirtilmiştir:

a) Madde kullanımı
b) Enerji kullanımı
c) Yaratılan emisyonlar
d) Yer kullanımı
e) Zarar potansiyeli
f) Toksisite



Şekil 2. Eko-Yeterlilik Analizinin Parametrik Değerlendirmesi

1.2. Biyoekonomi

1.2.1. Biyoekonomi Nedir?

Bitki, hayvan, mikroorganizma ve diğer tüm canlıların araştırma, geliştirme**,** üretim, ticaret ve tüketimi ile ilgili ekonomik faaliyetlerin tümü biyoekonomi olarak tanımlanmıştır. Bilimsel anlamda biyoekonomi, canlılardan biyoteknoloji gibi yeni yöntemlerle artı değerler üretilerek ekonomik kazanç sağlanmasını hedeflemektedir. Bu kazançta amaç, sağlıkta gelişme, tarım ve endüstride verim ve kalite artışı, çevrede sürdürülebilir iyileştirmedir. Etkinlik, tarım ve ormana yönelikse YEŞİL, endüstriye yönelikse BEYAZ ve denizlere yönelikse MAVİ biyoekonomi anlaşılmaktadır.

1.2.2. Biyoekonomiye Neden İhtiyaç Duylmaktadır?

Günümüz koşullarında gerçekleştirilen sürdürülebilir kalkınma üretimde kullanılan kaynakların sınırlı ve yenilenemez olmasından dolayı ekolojik dengeyi bozduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Özellikle gelişmiş ülkelerde toplumların mevcut fiziksel ve enerji tüketimleri göz önünde bulundurulduğunda dünyanın mevcut tüketim düzeyinin sürdürülebilir olmadığı bilinmektedir. Sürdürülebilir ve ekolojik dengeyi gözeten bir üretim modeli için biyoekonomi, gelecek yıllar içerisinde önemini arttırarak devam edecektir. OECD (2009) raporlarına göre, biyoekonomik gelişmelerin temelinde, gelişen ülkelerde artan nüfus ve kişi başına düşen gelir yer almaktadır.

Dünya nüfusu gelecek 10 yıl içerisinde 10 milyara ulaşacağı ve bu artışın %97'sinin gelişen ülkelerde meydana geleceği tahmin

edilmektedir. Artan bu nüfus sonuç itibariyle gıda, yem, su kaynakları, enerji gibi kaynakların üzerinde baskı yaratacaktır. Yine rapora göre 2030 yılına kadar GSYİH miktarının OECD ülkelerinde %2.3 ve gelişen ülkelerde %4.6 oranında artacağı öngörülmektedir.

Ayrıca biyokimyasal ürünlerin toplam kimyasal ürünler içerisindeki payının %35'e, biyoteknoloji ile üretilen ürünlerin oranının ise %50'ye ulaşılacağı tahmin edilmektedir. Bu nedenle biyoekonomi alanında bir yapılanmaya ihtiyaç duyulmakta ve biyoekonomi alanındaki ihtiyacın özel sektör girişimleri ile karşılanması gerekmektedir.

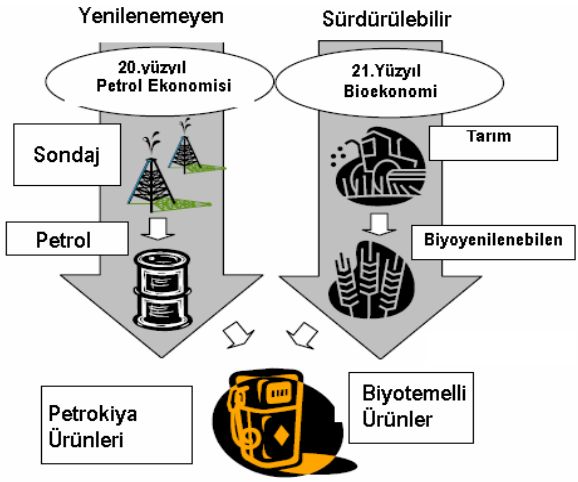
1.2.3. Biyoekonominin Sürdürülebilir Kalkınmadaki Yeri Ve Önemi

Biyoekonomi ya da Biyoloji-temelli Ekonomi için günümüzde değişik tanımlar yapılmaktadır. Bunlardan biri de "Etkin Biyoproseslerin ve yenilenebilir biyokaynakların sağlıklı ve sürdürülebilir büyüme ve gelişme için kullanıldığı etkinlikler bütünüdür" şeklinde yapılmış olan tanımlamadır. Sürecin tarımsal yönüne daha ağırlık veren diğer bir tanım da "Temel yapıtaşları ve enerjisi bitki / tahıl kökenli kaynaklardan gelen ekonomidir" şeklindedir. Biyoekonomi, Tarımsal Biyoteknoloji, Çevre, Sağlık, Ormancılık, Enerji gibi sektörlerdeki yeni teknoloji ve AR-GE'lerden yararlanan bir süreçtir. Bunlar dışında Biyoekonomi, Bilişim Teknolojisi, Biyolojik Bilimler, Kimya, Fizik ve Mühendislik alanlarındaki gelişmelerden yararlanan multidisipliner bir özelliğe de sahiptir. Ne var ki, gelecekte de bugün olduğu gibi

kaçınılmaz olarak Biyoekonominin temel iticini gücünü Biyoteknoloji'deki gelişmelerin oluşturacağı ilgili çevrelerce geniş çapta kabul edilmektedir.

Endüstriyel devrim sürecine geçilmeden önce toplumların yaşamında geçerli olan Tarım Ekonomisi çevre ile uyumluğu temelinde sürdürülebilirlik özelliği de taşımaktaydı. Günümüz ekonomik yaşamının temelini oluşturan ve 200 yıllık geçmişi olan endüstriyel devrimin üzerinde yaşadığımız gezegende gerek hammadde ve enerji kaynaklarının tüketimi, gerekse çevre ve insan sağlığı açısından önemli olumsuzluklar yarattığı bilinen bir gerçektir. Bu nedenle gelecekteki sürdürülebilir ekonominin temeli ancak endüstriyel alanda teknolojik yenileşmeyle sağlanabilecektir. Yeni teknolojiler arasında bu yönde en umut verici olanı Biyoteknoloji olarak göze çarpmaktadır. Günümüzde Biyoteknoloji teknikleri kullanılarak tarımsal kökenli tahıl ve bitkisel lignoselülozları enerji ve mal üretiminde hammadde olarak değerlendirebilmek olanaklıdır. Böylesi Biyoteknoloji süreçlerinin aynı amaçlarla fosil kaynakların tüketimine dayanan konvansiyonel teknolojilere seçenek oluşturabileceği ilgili otoritelerce geniş kabul gören bir gerçektir (Şekil 3). Yenilenebilir kaynaklara dayanması ve çevre dostu üretim özellikleri bakımından Bitkisel ve hayvansal kökenli kaynaklardan üretilen Biyoteknoloji ürünlerin eko-yeterlilik değerlerinin yüksek oluşu bunların sürdürülebilir katsayılarını da olumlu yönde etkilemektedir. Diğer yandan, sürdürülebilirlik açısından bir diğer önemli konu da, petrol gibi fosil kaynakların aksine bitkisel kaynaklardan üretilecek enerji ve

ürünler bunların tüketimine bağlı olarak oluşacak ve sonuçta küresel boyutta iklimsel değişmelere neden olabilecek gaz emisyonları yaratmayacaktır.



Şekil 3. Petrole Dayalı Konvansiyonel Ekonomi ile Biyoekonominin Şematik Karşılaştırması

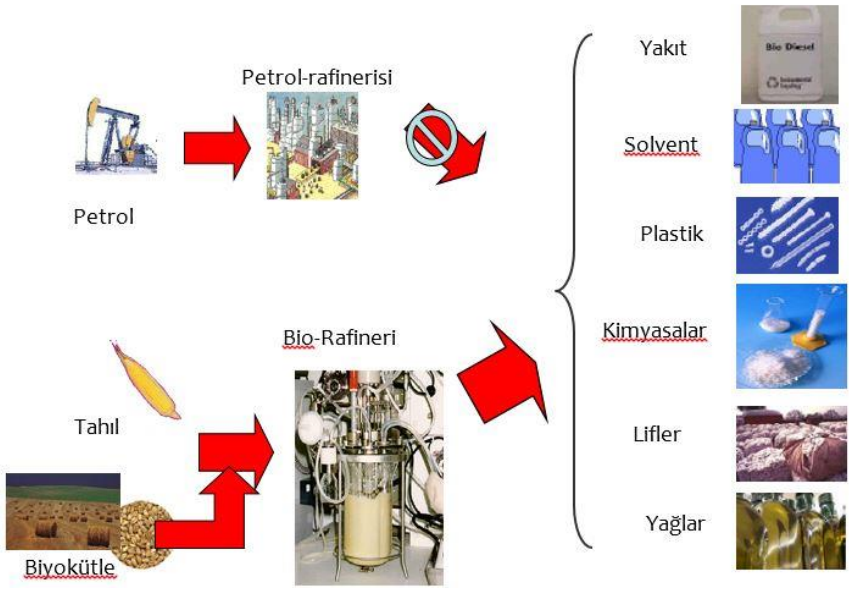
Günümüzdeki Biyoteknoloji uygulamaları, ilaç, gıda-içecek, tekstil, deterjan, kağıt, kimya ve tarım gibi ekonominin değişik sektörlerinde yüksek katma değer ve eko-yeterlilik gibi paremetreler açısından olumlu sonuçlar yaratan yeniliklere neden olmuştur. Bilindiği gibi kimya endüstrisi ürettiği mal ve hizmetlerle insan yaşamında gıdadan giyime kadar değişik alanlarda önemli bir yer tutmaktadır. Bazı çevrelerce "Beyaz Teknoloji" olarak da adlandırılan Endüstriyel Biyoteknolojideki son gelişmeler, bu teknoloji dalının Kimya Endüstrisi'ne seçenek oluşturacağını ortaya koymaktadır. Endüstriyel Biyoteknoloji "mal ve hizmet üretiminde mikroorganizma veya enzimlerin kullanıldığı endüstriyel üretim süreci" olarak

tanımlanmaktadır. Ancak felsefi temelde "doğanın alet çantasının endüstriyel üretim amaçlı kullanımıdır" şeklinde de tanımlanmaktadır. Dünya genelinde henüz emekleme döneminde olduğu söylenen Endüstriyel Biyoteknoloji her geçen gün büyüme gösteren bir pazar potansiyeline sahiptir. Endüstriyel Biyoteknoloji ürünlerinin dünyadaki pazar payının önümüzdeki yıllarda 200 milyar ABD dolarının üzerine çıkacağı tahmin edilmektedir. Son yıllarda dünya pazarlarında satışa sunulan kimyasalların %10-20'sinin Endüstriyel Biyoteknoloji ürünü olacağı ileri sürülürken, bu sektörde her yıl 11-22 milyar Euroluk katma değer üretileceği düşünülmektedir. Endüstriyel Biyoteknoloji günümüzde petrokimya kökenli birçok ürünü biyokütle ve tahıl gibi bitkisel kökenli kaynaklardan üretebilmektedir (Şekil 4). Gelecekte Biyoekonominin temelini oluşturacak Biyoteknoloji sürecinin kuracağı biyorafinerilerin günümüzdeki petrolrafinerilerin yerini alması söz konusudur. Endüstriyel Biyoteknolojinin sürdürülebilir kalkınmaya getireceği kazanımlar ise:

- *Kirlilik ve atıkta azalma*
- *Enerji, hammadde ve su kullanımında azalma*
- *İyi kalitede gıda üretimi*
- *Atıklardan yeni malzemeler ve biyoyakıtların üretimi*
- *Kimyasal süreçlere alternatif oluşturmak* şeklinde sıralanabilir.

Biyoteknolojinin sürdürülebilir endüstriyel üretime katkısını Vitamin B_{12} örneği üzerinden yapılan değerlendirmeyle anlatmak mümkündür: Söz konusu vitaminin Biyoteknoloji süreciyle üretimi kimyasal üretim

süreciyle karşılaştırıldığında; Biyoteknoloji süreciyle üretime bağlı olarak maliyette ve tüm çevresel etkide % 40, CO_2 emisyonunda % 30, kaynak kullanımında % 60 ve atık üretiminde % 95 tasarruf sağlandığı görülmüştür.



Şekil 4. Değişik Ürünlerin Üretiminde Petrole ve Biyokütle Kullanımına Dayalı Süreçler

1.2.4. Biyoekonominin Uluslararası Arenada Gelişimi

Dünya üzerinde 1992 yılında 8.1 milyar ABD Doları gelir getiren, 100.000 kişi istihdam eden biyoendüstri, 2001 yılında 34.8 milyar ABD Doları gelir getiren ve 190.000 kişi istihdam eden bir sektör haline gelmiştir**.**

Ancak söz konusu Biyoendüstriyel gelirlerin % 97'sinin ve istihdamın % 96'sının ABD'de, Kanada'da ve Avrupa ülkelerinde gerçekleştiğini

söyleyebiliriz. İstatistiklerine göre resmi kaydı bulunan büyük firmalar temelinde ABD'de 318 (yıllık cirosu 33 milyar ABD Doları), Avrupa'da 102 (yıllık cirosu 12.8 milyar ABD Doları) firma bulunmaktadır.

Geçtiğimiz yıllarda ABD'de Biyoteknoloji alanında AR-GE çalışmaları için 20.5 milyar ABD Doları, Avrupa'da ise 7.6 milyar ABD Doları bütçe ayrıldığı rapor edilmiştir. Biyoekonomiyi stratejik hedef seçen ülkelerden ABD'nin Ulusal Araştırma Kurumu bu yüzyılın sonunda ABD'de yakıtların % 50'sinin, organik kimyasalların da %90'nının yenilenebilir kaynaklardan üretileceğini öngörmektedir.

AB' de sürdürülebilir kalkınma ile ilgili zirve kararları ilk kez 2000 yılı Lizbon Stratejisi ile ele alınmıştır. Lizbon Stratejisi ile 2010 yılı için rekabet gücü yüksek ve bilgi teknolojilerine dayalı ekonomik kalkınma hedefi belirlenmiştir. 2001 yılı Kopenhag Zirvesi ile de rekabet edilebilirlikte ve sürdürülebilirlikte Biyoteknoloji potansiyelinin kullanılması kararına varılmıştır.

Sonuçta AB tarafından 2001-2006 yılları arası 2020 yılı hedefli "Biyo Temelli Yaşam Bilimleri ve Bilgi Temelli Biyo-Ekonomi" (KBBE: The European Knowledge Based Bio-Economy) Stratejisi geliştirilmiştir. AB ülkelerinin Biyoekonomi etkinlikleri arasında eşgüdümü sağlamak amacıyla kurulan KBBE-NET ağının toplantısına ait rapordaki saptamalara göre:

- ABD‘de Biyoteknoloji alanındaki AR-GE yatırımlarının miktarı AB’dekilerin 3 katı kadardır.
- Biyoküitle kullanımı için ABD’de ayrılan bütçe AB’de bu amaçla ayrılan bütçenin 2 katı kadardır.
- Çin 2001-2005 döneminde Biyoteknoloji yatırımlarında 1.5 milyar Euroluk harcama yapmış olup gelecek 5 yılda bunu 2 kat artıracağı düşünülmektedir.
- Japonya’nın 2007’de Biyoteknoloji AR-GE’sine ayırdığı desteği 2 kat, istihdamı 3 kat artıracağı tahmin edilmektedir.
- Hindistan’da gelecek 5 yıl içinde 5 milyar dolarlık gelir getireceği tahmin edilen Biyoteknoloji sektöründe 1 milyon istihdam sağlanacağını beklenmektedir.

1990’ladan sonra dile getirilmeye başlanan Biyoekonomi süreci hızla gelişme kaydetmektedir. Son yıllarda, gerek AB ve gerekse ABD, gelecek için biyoekonomi planlarını ardı ardına ilan etmişlerdir. 2012 yılının Şubatında AB “Avrupa İçin Sürdürülebilir Biyoekonomi”, daha sonra da ABD “Ulusal Biyoekonomi” planlarını açıklamışlardır. Bu planlarda ana hedef biyolojide AR-GE ve yeniliklere yöneliktir. Fakat AB BEYAZ biyoekonomiye odaklanırken, ABD YEŞİL, BEYAZ, MAVİ olmak üzere her üç dalı da birlikte ele almaktadır.

2050’lere doğru bitkisel ve hayvansal üretim artışına ilişkin hususlar Uluslararası Gıda Politikaları Araştırma Enstitüsünün (International Food Policy Research Institute – IFPRI) yayınladığı bir raporda ele alınmıştır. Söz konusu rapor, şu anda tükettiğimiz gıdanın miktarının

%70 artırılması gereğine değinirken, bu artışın et için %80 ve tahıl için %52 civarında olması öngörülmüştür. Bu da, günümüzde 260 milyon tonluk dünya et üretiminin 2050'lerde 455 milyon tona çıkarılması gerekeceği anlamına gelmektedir.

2. Sonuç ve Genel Değerlendirme

Endüstriyel Biyoteknoloji ve Biyoekonominin kırsal kalkınma alanında sağlayacağı yararlar oldukça fazladır. Uluslararası ve ulusal ekonomik model olarak seçilmesi durumunda getireceği yararlar ve kazanımlar şu şekilde özetlenebilir:

- Ekonomik Yararlar
  - Sürdürülebilir yeni pazar fırsatları / iş olanakları yaratılacaktır
  - Petrol ürünlerine bağımlılıkta azalma olacaktır
- Çevresel Yararlar
  - Küresel ekosistemde karbon dengesi sağlanacaktır
  - İnsan kaynaklı kirlenme minimize edilecektir
- Sosyal Yararlar
  - İnsan ve çevre sağlığında iyileşme olacaktır
  - Kırsal ekonomik kalkınmada itici güç oluşturulacaktır

Bölgesel ve havza boyutunda Iğdır ilimizi ele aldığımızda, kırsal alanda yapılacak Endüstriyel Biyoteknoloji ve Biyoekonomi'ye ait iş yatırımlarının toplam istihdam oranları bakımından ülkemize getireceği önemli kazanımlar söz konusudur.

Kırsal alanda yapılacak Endüstriyel Biyoteknoloji temelli yatırım ve üretimler ülkemizde toplam istihdamın yaklaşık %35'ini oluşturan tarım sektöründeki istihdamı olumlu yönde etkileyecektir. Yine bu yöndeki yatırımlar kırsal bölgelerden kent göç gibi sosyal sorunların engellenmesine de neden olacaktır. Örneğin kırsal bölgelere kurulacak biyorafineriler kırsal bölgelerde yeni istihdam olanakları sağlayacaktır. Ayrıca, biyoekonomiye yönelik endüstriyel uygulamaların kırsal kalkınmada yaratacağı olumlu gelişmelerin, ülkenin içinde bulunduğu bazı bölgesel sorunlara da çözüm getirmekte yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Endüstriyel Biyoteknoloji ve Biyoekonominin özellikle tarım potansiyeli yüksek ülkelerde uygulanmasıyla gerek enerji gerekse hammadde yönünden dışa bağımlılık azalacağından ulusal bütçelerdeki sorunlara da çözüm getirebileceği ileri sürülmektedir.

Sonuç olarak, mikroklimatik Iğdır Havzasında bitkisel ve hayvansal üretim potansiyeli orta ölçekte yeterli olup, gerek kırsal kalkınma, gerek sürdürülebilir tarım açısından Bioyoekonomiye katkı sağlayacak Endüstriyel Biyoteknoloji uygulamalarına ihtiyaç vardır.

Biyoekonomiye geçişin, girişimcilik anlayışı ile bu alandaki pazarlara ve iş fırsatlarına erişimin kolaylaşmasına yardımcı olacak çeşitli girişimci ilişkileri ve girişimleri incelenmeli, biyogirişimciliğin bileşenleri kategorize edilmeli, Dünyada ve Türkiye'deki biyogirişimciliğe ilişkin çalışmalar takip edilmelidir. Bu kapsamda

tarım sektöründeki biyoekonomi alanında yapılan faaliyetler belirlenerek sektördeki yeni fırsatlar incelenmeli ve çalışma kapsamında tarımsal biyoekonomi alanındaki gelişmeler ile ülkelerin kalkınmaları arasındaki ilişkiler ortaya konularak, tarımsal biyoekonomi girişimciliği yaygınlaştırılmalıdır.

Biyoekonomi alanında AR-GE çalışmalarının artırılması ve piyasa talebi doğrultusunda yönlendirilmesi sağlanmalı ve araştırma projeleri desteklenmelidir. Bu kapsamda üniversite, kamu, özel sektör uzmanlarından oluşan çalışma gruplarıyla patente konu AR-GE hizmetlerinin hayata geçirilmesi, milli ve yerli üretime katkı sağlanması öncelikli konular arasında yer almalıdır.

Şekil 5. Bitkisel - Hayvansal Üretimde Kullanılan Endüstriyel Biyoteknoloji Uygulamaları ve Biyoekonomi'nin Şematize Edilmesi *(Https://Www.Google.Com.Tr/Search?Q=Biyoekonomi&Source)*

KAYNAKÇA

Bayramoğlu, Z, Tekin, M, Ağızan, K. (2018). Türkiye'de Biyoekonomi Girişimciliğinin Tarımdaki Önemi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 21, 227-236. DOI: 10.18016/ksutarimdoga.vi.472161

Canadian Agriculture and the Bio-Economy – Solutions to Consumer Trends February 9th, 2005.

EU-Russia Symposium on S&T Co-operationin Biotechnology, Moscow 14-15 March 2005.

Industrial or White Biotechnology (A Driver of Sustainable Growth in Europe). Working Document from EuropaBio and ESAB. A Policy Agenda for Europe 2006.

Kolankaya, N., Ünal, A., (1996). Genel Mikrobiyoloji Ders Notları I-II. Hacettepe Üniversitesi.

Life Scieces and biotechnology, 2002. Luxemburg Office for Official Puplications of the European Comminities,

Madigan, M. T., Martingo, J., (2009). Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. Palme Yayıncılık. ISBN: 6055829629.

Meadows, H. D. (1990). Ekonomik Büyümenin Sınırları, Çev. Kemal Tosun ve diğerleri, İşletme İktisadı Enstitüsü Yayını No.112, İstanbul.

New perspectives on the Knowledge-Based Bio-Economy Conference report EU Commission. 2005.

OECD (2009). The bioeconomy to 2030: designing a policy agend. OECD Publishing, 322s.

Oğuz C, Bayramoğlu, Z. (2018). Tarım Ekonomisi Kitabı, Atlas Kitapevi, 3.Baskı, 1-222.

Özçelik, S. (2019). Biyoteknoloji. Ankara: Bizimbüro Matbaacılık. ISBN: 978605895022.

Report on First Meeting of the Knowledge Based Bio-Economy KBBB-Net Brussels,16 March, 2006.

Stewart, C. N., (Ed.). (2008). Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik: İlkeler, Teknikler ve Uygulamalar. (Öktem, H. A. ve Yücel, M., 2016, Çev.) Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık. ISBN: 9786051331829.

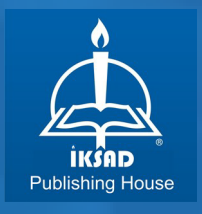
The New Bioeconomy. Industrial and Environmental Biotechnology in Developing Countries. Ad Hoc Expert Group Meeting Palais des Nations, Geneva 15–16 November 2001.

TOB (2017). http://www.tarim.gov.tr/Konular/MakroEkonomik-Gostergeler, (Erişim tarihi: 04.09.2017).

Urry Lisa, A., Cain Michael L., Wasserman Steven, A., Minorsky Peter, V., Reece Jane B., Campbell Neil, A. (2017). Campbell Biology, Eleventh Edition.

Ünal A., Çalışkan M., Şahin M., Bıyık E. and Kolankaya N. (2014). "Biotechnology, Genetic Resources and Bio-Economy Related Activıties in Turkey" Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 7 (1): 49-51, 2014 ISSN: 1308-0040, E-ISSN: 2146-0132.

White Biotechnology: Gateway to a More Sustainable Future. F. Sijbesma, Chairman EuropaBio, MB DSM Lyon, April 10, 2003.



978-625-7914-98-7