

## MİKROÇOĞALTIMDA ALIŞTIRMA

Ercan ÖZKAYNAK<sup>1</sup>

Bülent SAMANCI<sup>1</sup>

Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya

### ÖZET

*Mikroçoğaltım, genetik olarak birbirinin aynı olan çok fazla sayıda bitki üretimi için kullanılan bir bitki doku kültürü tekniğidir. In vitrodaki özel koşullar anormal bitki büyüme ve gelişmesine neden olmaktadır. Ex vitroya transferden sonra in vitro bitkiler çevre koşullarındaki ani değişikliklerden kolayca zarar görmekte ve anormallikleri düzeltmek için alıştırma periyoduna gerek olmaktadır. Bu derlemede ilk olarak ex vitro koşullarda alıştırma sırasındaki fotosentez, su ilişkileri ve yaprak yapısı tartışılmıştır. Daha sonra da alıştırma aşamasının hızlandırılması için bitki yaşamasını sağlamanın yolları değerlendirilmiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** Mikroçoğaltım, net fotosentez oranı, alıştırma, ex vitro

### ACCLIMATIZATION IN MICROPROPAGATION

#### ABSTRACT

*Micropropagation is a plant tissue culture technique used for obtaining a large number of genetically identical plantlets. The special conditions during in vitro culture result in plantlets of abnormal growth and development. After ex vitro transfer, these in vitro plantlets might easily be impaired by sudden changes in environmental conditions and hence need a period of acclimatization to correct the abnormalities. In this article, firstly changes in leaf structure, water relations and photosynthesis during acclimatization of plantlets to ex vitro conditions are discussed. Then, some ways of improving plant survival and for speeding up of acclimatization are evaluated.*

**Key words:** Micropropagation, net photosynthetic rate, acclimatization, ex vitro

### GİRİŞ

Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, kök, sürgün vb.) yapay besin ortamlarında ve mikroorganizmalardan arındırılmış şartlar altında genetik olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitkiyi hızlı çoğaltma amacıyla kullanılan bir doku kültürü tekniğidir. Bu teknik bahçe ve tarla bitkileri, peyzaj ve ormancılıkta birçok bitki türünde kullanılmaktadır (Solarova ve Posposilova 1997, Nquyen ve Kozai 1998, Pospisilova ve ark., 1999a ve Mansuroğlu ve Gürel 2001). Fakat *ex vitro* koşullara (sera veya tarla) taktarıldıktan sonra bitkilerin zarar görmesinden veya fazla oranda bitki kayıplarından dolayı mikroçoğaltımın kullanımı geniş oranda sınırlı olmaktadır (Hayashi ve Kozai 1988, Kozai 1991, Ziv 1992, Zobayed ve ark. 1999 ve Soon ve ark. 2000). Bunun başlıca sebepleri; yapraklarda düşük mum tabakası oluşumu, zayıf kutikula gelişimi, düşük stoma fonksiyonu, zayıf ikincil kök oluşumu ve bunların sonucunda da aşırı su kaybı ve düşük fotosentez kapasitesidir. (Zobayed ve ark. 1999).

*In vitro* koşullarda mikrobiyal bulaşıklıkları önlemek için kullanılan kapalı kültür kutuları hava giriş-çıkışını azaltmakta ve bitki ile kültür kutusu arasındaki CO<sub>2</sub> giriş-çıkışını sınırlamaktadır. Kültür kutularında düşük hava değişim oranına bağlı olarak; yüksek bağıl nem, fotoperiyotta düşük, karanlık periyotta yüksek CO<sub>2</sub> konsantrasyonu ve ortamda yüksek etilen konsantrasyonu görülmektedir. Kültür ortamına genellikle karbon ve enerji kaynağı olarak şeker ilave edilmektedir. Ortama şeker ilave edilmesi ortamın su potansiyelini azaltmakta, bakteriyel ve fungal bulaşıklıkları artırmaktadır. Buna ek olarak besin ortamına yüksek dozlarda büyüme düzenleyicileri, vitaminler ve diğer organik bileşikler eklenmektedir. Ayrıca kültür ortamında gün boyunca sıcaklık sabit, inorganik iyon konsantrasyonu ve osmotik basınç yüksek olmaktadır.

Bu koşullarda anormal morfoloji, anatomi ve fizyolojiye sahip bitkiler gelişmekte ve bitkilerde büyümede gerileme, gelişme aşamalarında ve bitki büyüklüklerinde varyasyonlar meydana gelmektedir (Kozai 1991, Desjardings 1995, Kozai ve Smith 1995, Vorackova ve ark. 1998, Premkumer ve ark. 2001 ve Synkova ve Posposilova 2002).

Mikroçoğaltımda III. aşama sap gelişiminin ve köklenmenin tamamlandığı ve bitkilerin toprağa aktarıma hazır oldukları aşama olarak belirtilmiştir (Roberts ve ark., 1992). Mikroçoğaltımda alıştırma aşaması 4 aşama olarak değerlendirilmiş ve bu aşamada *in vitro*da aseptik koşullardan bitkiler septik koşullara aktarılmaktadır (Kozai ve ark. 1991 ve Roberts ve ark. 1992). Alıştırma terimi, bir organizmanın özellikle de bir bitkinin yeni bir ortama taşınmadan önceki iklimsel adaptasyonu olarak tanımlanmıştır (Kozai 1988). Bitkiler alıştırma aşamasında şeker yerine substratta büyürler ve ototorofik (yapraklarında klorofil içeren bitkiler fotosentezle karbon kaynağı olarak atmosferik CO<sub>2</sub>'yi kullanarak kendi kendilerine gelişirler) olarak gelişirler. Ototorofik (fotoototrofik) bitkiler sadece inorganik enerji kaynağı, ışık enerjisi, CO<sub>2</sub>, su ve minerallere ihtiyaç duyarlar. Heterotrofik ve mixotrofik bitkiler ise enerji ve karbon kaynağı olarak şeker ihtiyacı duyarlar. Eğer bir bitki karbon kaynağı olarak hem atmosferik CO<sub>2</sub>'yi hem de organik maddeleri kullanarak büyürse de mixotrofik olarak gelişir (Kozai 1988).

Sera koşullarında ve özellikle de tarlada, kültür kutularına göre daha düşük hava nemi mevcuttur. Bitkinin *ex vitro* koşullarda yetiştiği ortamın (substratın) su potansiyeli şeker içeren ortama göre daha yüksek olduğundan, bitkiler yapraklarından su kaybını engelleyemedikleri için hızlı bir şekilde solmaktadır. Buna ek olarak, köklerin ve kök ile sap arasındaki bağlantıların düşük hidrolik kondüktivitesinden dolayı su ilavesi de sınırlı kalmak-

tadır (Fila ve ark. 1998). Çünkü *ex vitro* koşullarda bitkilerde büyümede anormallikler, kuraklığa karşı hassasiyet ve fotosentezde bozukluklar görülür. Kütikula tabakası üzerindeki mumsu tabaka iyi gelişemediği için yapraklar üzerinde su birikemez ve stomalar normal şekilde kapanamaz. Bitkilerde su kaybı etkili olarak önlenemez (kaybedilen suyun yerine hemen su gelemez), kökler yeterince su alamazlar; nemlenme, yapraklarda nekrozlar, yaşlanma ve transferde birçok bitki zarar görür veya ölür (Estrada-Luna ve ark. 2001). Kültür kutusundaki düşük CO<sub>2</sub> konsantrasyonu, ortamda şeker ve mineral tuzların bulunması sonucu zayıf CO<sub>2</sub> fiksasyonu meydana gelir. Heterotrofik olarak büyüyen yapraklar transferden sonra fotoototrofik olarak gelişemezler ve bitkinin fotosentetik yapısını tamamlayabilmesi için yeni yaprakların gelişmesi gerekir (Roberts ve ark. 1992). Alıştırma, *in vitro* ile *ex vitro* koşullar arasında bir geçiş aşamasıdır ve *in vitro* koşullardaki anormalliklerin alıştırma aşamasında düzeltilerek normal bitki büyümesinin sağlanması gerekir. Alıştırmayı alıştırma sonrası aşaması takip eder. Bu aşamada bitkiler ototrofik olarak büyürler, bitki karakteristikleri daha stabildir ve daha az varyasyon görülür.

Bu derlemede, mikroçoğaltımda *in vitro* koşullarda geliştirilen bitkilerin normal koşullara aktarılmasında adaptasyon periyodu olan alıştırma aşamasındaki yaprak yapısı, fotosentez parametreleri, su ilişkileri tartışılmış ve alıştırma aşamasında hızlı ve sağlıklı bitki gelişimi uygulamaları değerlendirilmiştir.

### MİKROÇOĞALTIMDA ALIŞTIRMA AŞAMASININ ETKİLERİ

#### Yaprak Yapısı

*In vitro* koşullardan sera veya tarla koşullarına transferden sonra bitkilerin yaprak morfolojisinde ve anatomisinde önemli değişiklikler olmaktadır. *In vitro* koşullarda *Liquidambar styraciflua* (amerikan amber ağacı) bitkilerinin yapraklarında tarla koşullarına aktarılan ve büyütülen bitkilerin yapraklarına göre daha az kütikula gelişimi görülmüştür. Duvar sarmaşığında hem *in vitro* hem de *ex vitro* bitkilerde genç yapraklardan yaşlı yapraklara doğru kütikula kalınlığında ve mum içeriğinde artış saptanmıştır (Posposilova ve ark. 1999a). *Ex vitro*ya transferden iki hafta sonra *Brassica oleracea* (lahana) bitkilerinin yapraklarının üst yüzeyindeki epikütikular mumların niteliği ve yapısı fidelerin yapraklarına benzer bulunmuştur (Posposilova ve ark. 1999a). Birim alandaki mum içeriği, *Liquidambar styraciflua* (amerikan amber ağacı) bitkilerinin yapraklarında alıştırma aşamasından sonra değişmezken, *Malus domestica* yapraklarında azalmıştır. Başka bir deyişle, *Malus pumila* (cennet elması) bitkilerinin yapraklarında epikütikular mumların kalınlığı *in vitro* koşullarda geliştirilen bitkilerin *ex vitro* koşullara transferinden etkilenmezken, yeni gelişen yapraklarda daha yüksek bulunmuştur (Posposilova ve ark. 1999a). Bazı bitki türlerinde *in vitro* koşullarda gelişen bitkilerin yaprakları *ex vitro*

koşullarda yeterli büyüme sağlanamamakta ve bu yaprakların yerini yeni gelişmiş yapraklar almaktadır. Buna rağmen, bitkilerin *ex vitro* koşullara aktarılması başarılı olmuşsa hızlı şekilde büyüyebilirler. Örneğin, tütün bitkisinin toplam kuru madde miktarı *in vitro* koşullarda büyütülen bitkilere göre birkaç kat daha fazla bulunmuş, şaşırtılan bitkilerde daha yüksek bitki boyu, yaprak, sap ve kök kuru madde miktarı, daha geniş yaprak alanı ve yaprak kalınlığı saptanmıştır (Kozai 1991)

*Liquidambar styraciflua*, *Vaccinium corymbosum* (bataklık yaban yasemini) ve tütün bitkilerinde *ex vitro*ya transferden sonra stoma yoğunluğu azalmıştır (Noe ve Bonini 1996 ve Ticha ve ark. 1999). Fakat bir süre sonra yaprak başına toplam stoma sayısı, *ex vitro* koşullara transferden sonra yaprak alanındaki büyümeden dolayı artmıştır. Başka bir deyişle *Prunus serotina* (siyah kiraz) ve *Rhododendron spp.* (orman gülleri) bitkilerinde *ex vitro* koşullara transferden sonra stoma yoğunluğu artmış, stoma por uzunluğu ise azalmıştır. *In vitro* koşullarda büyütülen *Prunus cerasus*, *Vaccinium corymbosum* (bataklık yaban yasemini) ve tütün bitkilerinin yapraklarında yüzük şeklinde stoma oluşurken, *ex vitro* koşullara transferden sonra stomalar eliptik şekil almışlardır (Noe ve Bonini 1996, Ticha ve ark. 1999 ve Posposilova ve ark., 1999a). *Prunus cerasifera* (kiraz eriği) bitkilerinde stoma kapanma kabiliyetinin abiyotik faktörlere karşı tepki gösterdiği ve uygulamadan sonra tekrar açılmanın genç yapraklarda yaşlı yapraklara göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. *In vitro* koşullarda büyütülen *Solanum phureja*'nın bekçi hücrelerinde *ex vitro*da büyütülen bitkilere göre daha fazla kloroplast bulunmuştur (Posposilova ve ark. 1999a).

*In vitro* koşullarda büyütülen tütün bitkilerinde yaprak mezofili gevşek yapılı ve zayıf farklılaşmış bir palizat parankimasından ve iki veya üç katlı sünger parankimasından oluşmuştur. *Vaccinium corymbosum* (bataklık yaban yasemini) bitkisinde ise sadece bir veya iki organize olamamış sünger parankiması oluşmuştur (Noe ve Bonini 1996 ve Posposilova ve ark. 1999a). *Brassica oleracea* (lahana) bitkisinde sera koşullarına transferden üç hafta sonra bir palizat mezofil hücre tabakası gelişmiştir. Alıştırma aşamasını geçmiş *Liquidambar styraciflua* (amerikan amber ağacı) bitkisinde *in vitro* bitkilere göre daha kalın yapraklar ve palizat ve sünger parankimasına farklılaşmış mezofil dokusu gelişimi sağlanmıştır. Sünger parankimasında daha az ve daha küçük hava boşlukları bulunmuştur. Benzer sonuçlar, *Rubus idaeus* (ahududu), *Fragaria x ananassa* (bahçe çileği), *Liquidambar styraciflua* (amerikan amber ağacı), *Rhododendron spp.* (orman gülleri), *Rosa odorata x Rosa damascena* ve *Vaccinium corymbosum* (bataklık yaban yasemini) bitkilerinde de bulunmuştur. *In vitro* koşullarda büyütülmüş *Liquidambar styraciflua* (amerikan amber ağacı) bitkisinde mezofil hücrelerinde daha geniş vakuoller ve düzensiz sıralanmış membran sistemleriyle birlikte düzleşmiş kloroplastlar gelişmiş-

tir. Yine aynı bitkide alıştırma aşamasından geçmiş kloroplastlarda grana ve nişasta granülleri iyi gelişmiştir (Noe ve Bonini 1996 ve Posposilova ve ark. 1999a). *In vitro* kültürlerde bitkilerde görülen anatomik değişiklikler öncelikle yapraklarda CO<sub>2</sub> difüzyonunu ve net fotosentez (Fn) oranını etkilemektedir. Mikroçoğaltımla çoğaltılan bitkilerin yapraklarının genellikle küçük, zayıf veya gelişmeyen palizat hücreleri ile birlikte zayıf mesofil tabakası ve geniş hücreler arası boşluklara sahip olması, mesofildeki CO<sub>2</sub>'nin kullanılabilirliğini ve Fn'yi etkilemektedir. Işık koşulları klorofil içeriğini etkilemektedir. *In vitro* kültürde, sera ve tarla koşullarına göre daha düşük (*in vitro* koşullar için normal) ışık koşullarında tülakoid membranlarının, grana yığınlarına tam olarak farklılaşmadığı ve düzensiz olarak dizildikleri belirtilmiştir. *In vitro* bitkiler daha yüksek ışık yoğunluğuna aktarıldıktan sonra daha düşük Fn oranı göstermişlerdir (Desjardings 1995).

*In vitro* koşullarda genelde bağıl nem yüksektir. Bitki kalitesini artırmak için doku kültüründe bağıl nemi düşürmek önemli olmaktadır. Çok az bitki türünde *in vitro* koşullarda düşük bağıl nemde geliştirilen bitkiler *ex vitro* koşullara aktarıldıktan sonra yaşamışlardır. Gül bitkileri düşük bağıl nem ve yüksek ışıktaki büyütüldüklerinde *ex vitro* koşullarda alıştırma aşamasıyla benzer morfolojik farklılıklar göstermişlerdir (Buddendorf-Joosten ve Woltering 1996). *In vitro* koşullarda düşük ışık yoğunluğunda gölge özellikleri artmakta ve bitkiler *ex vitro* koşullara transfer edildiklerinde daha yüksek ışık yoğunluğunda ışık stresine girerek fotoinhibisyon hatta klorofillerin fotooksidasyonu meydana gelmekte ve yaprak ayasında klorotik kuru lekeler oluşmaktadır. Yine de bazı bitkiler herhangi bir strese girmeden yüksek ışığı tolere edebilmektedirler (Amoncia ve ark. 1999).

Serret ve ark. (2001) yaptıkları araştırmada, *Gardenia* bitkilerinde alıştırma aşamasında *ex vitro* koşullarda tüm yapraklarda *in vitro* koşullara benzer klorofil parametreleri saptamışlardır. 28 günlük alıştırma sonunda birim yaş ağırlık başına klorofil içeriği sakkaroz içermeyen ortamda gelişen bitkilerde, sakkarozlu (30g/l) ortamdakine göre önemli derecede daha yüksek bulunmuştur. Pruski ve ark. (2002), geleneksel olarak (sakkarozlu ortam) çoğaltılan bitkilerin yapraklarında geniş hücreler arası boşluklarla birlikte zayıf mezofil tabakası gelişiminin sağlandığı, az sayıda ve zayıf fonksiyona sahip stomaların geliştiğini ve alıştırma aşamasında bitkilerde su kayıplarından dolayı, yüksek oranda bitki kayıplarının meydana geldiğini belirtmişlerdir. CO<sub>2</sub> giriş-çıkışının sağlanabildiği ve sakkarozun bulunmadığı fotoototrofik mikroçoğaltım ile geleneksel yöntemlere göre daha güçlü bitki yapısı sağlandığı ve bitkilerin *ex vitro* koşullarda daha yüksek bitki yaşama oranı verdikleri belirtilmiştir.

Lucchesini ve ark. (2001) yaptıkları araştırmada *Myrtus communis* (adi mersin) bitkisinde *in vitro*da havalandırılmalı (gaz alış-verişi olan) ve kapalı (hava-

landırmasız) kültür kutularında gelişen bitkilerde *ex vitro* bitki gelişimini incelemişlerdir. Havalandırılmalı kültür kutularında gelişen bitkiler kapalı kutularda gelişen bitkilere göre daha yüksek yaşama oranı vermişlerdir. Alıştırmanın 14. gününde havalandırılmalı kutularda gelişen bitkilerde önemli derecede daha yüksek sap ve kök uzunluğu, kuru ve yaş ağırlık saptanmıştır. Alıştırma öncesi aşamada havalandırılmalı kutularda gelişmiş kök sistemleri, yüksek Fn oranı ve kuru madde birikiminin sağlanması *M. communis* (adi mersin) bitkilerinde *ex vitro* transfer stresine karşı daha güçlü bitki yapısı oluşumunu teşvik etmiştir.

### Su İlişkileri

*Ex vitro* koşullara alıştırma yapraklardaki stoma ve kütikula terleme oranı derece derece azaltılır. Çünkü su kaybında stoma düzenlemesi daha etkili olmakta ve kütikula ve epikütikular mumsu tabaka gelişimi sağlanmaktadır. Tütün bitkilerinin yapraklarındaki stoma ile gerçekleşen terleme oranı *ex vitro* koşullara transferden üç hafta sonra ölçüldüğünde, kontrol olarak kullanılan normal tütün fidelerinin yapraklarındaki stoma terleme oranı ile benzer bulunmuştur (Fila ve ark. 1998). *Ex vitro* koşullara transferden hemen sonra genellikle görülebilir nemlenme saptanmış ve düşük bağıl su içeriği bulunmuştur. Buna rağmen, birkaç gün veya hafta sonra bitkilerdeki su durumu dengelenebilmiştir. Örneğin, *Malus pumila* (cennet elması) bitkilerinde transferden üç hafta sonra bağıl su içeriği yaklaşık % 88 olarak bulunmuştur. *Ex vitro* koşullara transferden sonra tütün bitkilerinde su potansiyeli *in vitro* koşullarda sukroz içermeyen ortamda büyütülen bitkilerde azalmış, buna karşın patates bitkilerinde sukroz içeren ortamda artmıştır (Diaz-Perez ve ark. 1995; Posposilova ve ark. 1999a).

*Ex vitro*da bitki kayıplarının en büyük sebebi yapraklardan su kaybı sonucu görülen kurumalar ve köklerden suyun alınmasının engellenmesidir. Bu durum *in vitro* kültürde geliştirilen bitkilerde sera veya tarlada büyütülen bitkilere göre daha farklı fizyolojik, morfolojik ve anatomik yaprak ve kök farklılıklarına sahip fenotip oluşumuna neden olmaktadır. Diğer bir neden de transferden sonra fotomixotrofik koşullardan fotoototrofik koşullara geçişte pozitif karbon dengesinin yetersiz fotosentetik aktiviteden dolayı sağlanamamasıdır (Kirdmanee ve ark. 1995a). Bağda *in vitro* koşullarda paclobutrazol uygulaması ve azaltılmış bağıl nem *ex vitro*ya transferden sonra bitkilerin çürümeye karşı dayanıklılıklarını artırmış ve daha küçük stoma açıklığı, daha kısa saplar ve daha zayıf kökler geliştirmiştir. Paclobutrazol yaprak alanını azaltmış, kök sayısını artırmıştır (Novello ve ark. 1992). Ortamın bağıl nemi azaltıldığında, *in vitro* koşullarda daha kısa sürgünlere sahip olan güçlü patates bitkilerinde herhangi bir kuru ağırlık artışı olmaksızın *ex vitro* koşullara aktarmadan önce alıştırma aşamasına gerek kalmayacağı belirtilmiştir (Kirdmanee ve ark. 1995a). Farklı fotosentetik foton akış yoğunluğu (Photosynthetic Photon Flux Density= PPF) ve bağıl

nem koşullarında 1 günlük alıştırmaya aşamasından sonra *ex vitro* koşullara aktarılan okaliptus bitkilerinin gelişimi incelenmiş 1 günlük alıştırmada bitkilerde su kaybı yüksek PPF<sub>D</sub>'de düşüğe göre daha yüksek bulunmuştur (Kirdmanee ve ark. 1995a)

#### Fotosentetik Parametreler

Klorofil a ve b içeriği *ex vitro* koşullara transferden sonra artmaktadır. Transferden bir hafta sonra, fotoototrofik olarak büyütülen tütün bitkisinde aynı etki görülmüş, fakat fotomixotrofik olarak büyütülen bitkilerde klorofil a ve b içeriği kesikli bir azalma göstermiş daha sonra ise yavaş bir artış bulunmuştur. Patates ve *Spathiphyllum floribundum* (barış zambağı) bitkilerinde net fotosentez oranı transferin ilk haftasında azalmış, daha sonra artmıştır. *Calathea louisae* bitkilerinin *in vitro* koşullarda oluşan yaprakları transferin ilk günlerinde fotosentez yapamazken, *Spathiphyllum floribundum* (barış zambağı) bitkilerinin *in vitro* koşullarda oluşan yapraklarının normal şekilde fotosentez yaptıkları belirlenmiştir (Van Huylenbroeck ve Deberg 1996). Yine her iki bitki türünde de gerçek fotosentez aktivitesi yeni yapraklar tam olarak geliştiğinde ölçülmüştür. Tütün bitkilerinde *ex vitro* transferden iki hafta sonra *in vitro* bitkilere göre Fn oranı daha yüksek bulunmuştur (Posposilova ve ark. 1998, 1999a). Benzer şekilde *Malus pumila* (cennet elması) bitkilerinde transferden üç hafta sonra Fn oranı daha yüksek bulunmuş (Diaz-Perez ve ark. 1995); *Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* kök stoklarında transferden 1 ay sonra iki kattan daha fazla maksimum Fn oranı saptanmıştır (Fila ve ark. 1998). *Calathea louisae* ve *Spathiphyllum floribundum* (barış zambağı) bitkilerinde transferden hemen sonra yüksek ışıklanmaya maruz kalmaları, fotoinhibisyona ve fotobeyazlamaya neden olmuştur. Fotoinhibisyon transferden sonra fotosentezde geçici bir azalmaya neden olabilmektedir. *Ex vitro*da alıştırmış tütün bitkilerine serada az miktarda gölgeleme yapıldığında gece ve gündüz ışıklanma değişmiş ve genel olarak fotosentez doyma noktasına daha az ışıkta ulaşılmış ve fotoinhibisyon oluşmamıştır (Posposilova ve ark. 1999b).

*Ex vitro* kültürde bünyelerinde fazla su depo eden bitkilerin kuraklığa karşı fazla hassas oldukları ve geri dönüşümsüz doku zararı olabileceği belirtilmiş ve *ex vitro*da düşük Fn ve yaşama oranının başlıca sebeplerinin klorofil, yaprak gibi fotosentetik parametrelerin zarar görmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. PPF<sub>D</sub> ve bağıl nemin fotosentezi ve yaşama oranını etkileyen en önemli çevre faktörleri olduğu ve klasik mikroçoğaltımda alıştırmaya aşamasında; bitkilerin yüksek nem koşullarında tutulduğu, zamanla ışığın dereceli olarak artırıldığı ve bağıl nemin ise dereceli olarak azaltıldığı bildirilmiştir (Kirdmanee ve ark. 1995b). Amacio ve ark. (1999) bağda alıştırmaya aşamasında farklı PPF<sub>D</sub> seviyelerinin (düşük; 40mmol/m<sup>2</sup>s, yüksek; 90 mmol/m<sup>2</sup>s) etkilerini araştırmışlardır. Düşük ışıkta gelişen bitkilerde yüksek ışıkta gelişenlere

göre daha fazla gölgelenme faktörleri görülmüş ve yüksek ışıkta daha düşük klorofil içeriği saptanmıştır. Yüksek ışıkta gelişen bitkilerde alıştırmaya aşamasında klorofil başına ve birim alan başına yüksek fotosentez ve büyüme oranı saptanmıştır. Alıştırmada yüksek ışıkta düşük ışığa göre toplam biyolojik kütle ve bitki başına yaprak alanı 4 kat daha yüksek bulunmuş ve toplam yaprak alanının % 80'ini yeni gelişen yapraklar oluşturmuştur. Alıştırmadan ilk iki veya üç haftasında *in vitro*da oluşan yapraklar hem yeni yapraklar için metabolit kaynağı olarak kullanılmakta hem de tüm bitkide pozitif karbon dengesini sağlamaktadırlar (Van Huylenbroeck ve Deberg 1996).

Araştırmalarda *in vitro*da Fn oranının fotosentetik aparatların gelişmesinden değil, ışık periyodunda düşük CO<sub>2</sub> konsantrasyonundan dolayı engellendiği belirlenmiştir. (Vorackova ve ark. 1998). *In vitro* heterotrofik koşullarda, düşük ışık yoğunluğunda, düşük CO<sub>2</sub>'den dolayı düşük fotosentez oranları saptanmıştır. Yine de *ex vitro* koşullara transferden sonra mikroçoğaltımla çoğaltılan birçok bitkide ışık yoğunluğu artmasına ve bu artış fotosentez artışı ile doğru orantılı olmamasına rağmen fotosentetik parametrelerin fonksiyonları gelişmiştir. Alıştırmada yaşama oranlarının artırılması ve yeni yapıların gelişmesi ve bu aşamanın kısaltılarak başarılı bir alıştırmaya için ışık kontrolünün zorunlu olduğu belirtilmiştir (Amoncia ve ark. (1999). Serret ve ark. (2001) besin ortamında %3'ten daha fazla sukroz bulunduğunda alıştırmaya aşamasında büyümede artış olsa bile daha yüksek fotoinhibisyon ve daha düşük klorofil içeriği saptamışlardır.

### MİKROÇOĞALTIMDA BİTKİLERİ GELİŞTİRME OLANAKLARI

#### *In Vitro* Bitkilerin Güçlendirilmesi

*In vitro* bitkilerde; su buharını geçiren seçici kapaklar veya alttan soğutma yapmak suretiyle hava nemini azaltarak, ışık yoğunluğunu artırarak, *in vitro* koşullarda sukroz konsantrasyonunu azaltarak veya sukrozsuz ortam kullanılarak, güçlü havalandırma ile CO<sub>2</sub> konsantrasyonunu artırarak *ex vitro*ya transferden sonra bitkilerde görülen nemlenme engellenebilmektedir (Kirdmanee ve ark. 1995a ve Vorackova ve ark. 1998). Ancak bu işlemler kültür ortamının çabuk kurumasına ve bitki büyümesinde zararlara neden olabilir. *In vitro* koşullarda büyütülen bitkilerde yeni çıkan yapraklardan meydana gelen bağıl su kaybı ortama absisik asit (ABA), paclobutrazol, indolbütirik asit (IBA) veya 6-benzil amiopürin (BA) ilavesi ile azaltılabilmekte veya polietilen glikol ile ortamın osmotik potansiyeli düşürülebilmektedir. Ortamdaki sukroz ve agar konsantrasyonu da *ex vitro* koşullara alıştırmayı etkilemektedir (Kirdmanee ve ark. 1995b, Ggenoud-Gourichon ve ark. 1996, Van Huylenbroeck ve Deberg 1996, Fila ve ark. 1998 ve Vorackova ve ark. 1998). *In vitro* koşullarda kullanılan büyüme düzenleyicileri ve engelleyiciler *ex vitro* alıştırmaya aşamasında bitki morfogenesisi

kontrol etmek ve bitki yaşama oranını geliştirmek için kullanılabilir. 3.4 µM paclobutrazol uygulanan sıvı kültürlerde ve katı agarlı ortamda (kontrol) *Philodendron* yapraklarında *ex vitro* koşullarda stoma kapanma oranı kontrolde % 93, paclobutrazollu ortamda ise % 87.5 ve stoma açıklığı ise kontrolde 3.03 µ ve diğer uygulamada ise 2.58 µ bulunurken; mumsu tabaka içeriği ise sırasıyla 2.7 µg/g ve 2.3 µg/g yaş ağırlık olarak bulunmuştur. Paclobutrazol *Philodendron* bitkisinde normal stoma ve mumsu tabakası gelişimi sağlamıştır (Vorackova ve ark. 1998). Benzer sonuçlar patates, *Gladiolus* (glayöl, keklik çiğdemi), *Brodiaea* (brodye) ve *Nerin* bitkilerinde de bulunmuştur (Ziv 1992). Besin ortamına büyüme düzenleyicileri (ABA, GA<sub>3</sub>) eklenmesinin, *ex vitro*ya transferden sonra bitkilerin gelişmesini ve morfolojisini etkilediği, fakat pozitif bir etki yapmadığı belirtilmiştir. İlave besinler (sakkaroz), ve koruyucu bileşikler (prolin, putrescin) ilavesinin daha yararlı olabileceği belirtilmiştir (De Klerk 1999).

*Spathiphyllum* ve *Calathea* bitkilerinde yapılan araştırmada *in vitro*da sukroz artışı (%3'ten % 6'ya) *in vitro* gelişimin sonunda fotosentezi engellemiş, fotosentez reaksiyon merkezlerinin fonksiyonları bozulmuş, daha fazla mixotrofik metabolizm, daha yüksek nişasta ve sukroz rezervlerinin gelişmesine sebep olmuştur. Aşırtmanın ilk birkaç gününde net fotosentez azalmıştır. Bu peryotta yüksek sukroz konsantrasyonunda büyütülen bitkilerde başlıca besin rezervi olarak sukroz kullanılmış, ilk bir hafta sonunda ise tam fotosentetik kapasite gelişmiş ve bu sürede nişasta rezervleri tekrar artış göstermiştir. Aşırtma aşamasında ışık yoğunluğunda artış ilk hafta fotoinhibisyona neden olmuş, daha sonra fotosentetik aktivite tekrar artmıştır. *In vitro*da gelişen yapraklara göre yeni gelişen yapraklar *ex vitro* koşullara daha iyi adapte olarak daha yüksek Fn oranı vermişlerdir (Van Huylenbroeck ve Deberg, 1996). Vorackova ve ark. (1998), buğday ve kolzada farklı sukroz (kolzada: %1-10, buğdayda: %1, 3, 5, 7, 9) konsantrasyonları kullanmışlar ve bitkileri sera koşullarına aktardıktan sonra 14 gün süreyle toprakta büyümüşlerdir. Buğdayda % 5 ve kolzada % 8 ve % 9 sukroz konsantrasyonlarında *in vitro*da en iyi bitki gelişimi saptanmış ve en yüksek yaş ağırlık artışı bulunmuştur. Araştırma sonucuna göre *ex vitro*da en yüksek bitki yaş ağırlık artışı *in vitro*da en yüksek sukroz konsantrasyonlarında bulunmuştur. Yüksek sukroz konsantrasyonunları (% 7 ve % 9 buğdayda ve % 10 kolzada) transferden sonra büyüme oranını azaltmıştır.

Fujiwara ve ark. (1988) *in vitro* koşullarda geliştirilen bitkilerde köklenme ve aşırtma aşamasına uygun ışığı, sıcaklığı, nemi, CO<sub>2</sub> ve hava giriş-çıkışı ve ışığı kontrol edebilen, besin girişi-çıkışı olan özel bir kültür kutusundan oluşan, fotoototrofik doku kültürü sistemi geliştirmişler. Bu sistemde bitkiler; ortama şeker ilave edilmeden ototrofik olarak büyüebilmekte, kültür ortamına CO<sub>2</sub> ilave edilebilmekte, yüksek ışık yoğunluğunda gelişme sağlanabilmekte, bitkiler

klasik doku kültürüne göre daha düşük bağıl nemde gelişebilmekte, geniş kültür kutuları kullanılabilen ve köklenme ve aşırtma aşamalarında bitkilerin farklı koşullara transfer edilmelerine gerek kalmamaktadır. Araştırmada çilek sürgünleri fotoototrofik doku kültürü sisteminde (sıvı ortam, sakkaroz yok) kültür kutusu başına 200 sürgün, kontrolde (20 g/l sakkaroz ve 8 g/l agar) ise 50 sürgün konulmuş ve 28 gün sonra kuru ağırlık ve Fn oranı kontrole göre sırasıyla 1.7 ve 4 kat daha fazla bulunmuş ve yaprak alanı daha büyük olan bitkiler elde edilmiştir. Bu sistemde hem bitkilerin büyümesi teşvik edilmekte hem de köklenme ve aşırtma aşamalarında bitkilerin fotosentetik aktiviteleri ve çevre stresine karşı toleransları artış göstermektedir.

Whish ve ark. (1992), *Ptilotus* sürgünlerinin gelişmesine *in vitro* koşullarda farklı nem uygulamalarının (% 35, 45, 55, 65, 80 ve 100) aşırtma aşamasındaki etkilerini araştırmışlardır. Düşük nemde yüksek neme göre birim yaprak alanı başına daha fazla sayıda bitki hücresi bulunmuştur. Düşük nem koşullarında hücre sıklığındaki bu artış; mesofildeki sünger tabakasındaki hücre boşluğunun azalması ve palizat dokusunun iyi gelişmesi sonucu hücre büyüklüğünün azalmasının etkisiyle meydana gelmiştir. Düşük nem koşullarında kloroplastlar daha küçük ve daha yoğun şekilde dizilmişlerdir. Araştırma 6 hafta sonunda en yüksek yaşama oranı % 55-65 nemde bulunmuş ve bu değerlerin *ex vitro* koşullarla karşılaştırıldığında düşük değerler olduğu belirtilmiştir.

*Ex vitro* koşullara aktarılmadan önce mavi ışık spektrumu ile ışıklandırma klorofil sentezini teşvik etmiş ve ototrofik gelişimi olumlu etkilemiştir. *In vitro* aşamada veya aşırtma aşamasında sınırlı miktarda CO<sub>2</sub> zenginleştirmesinin asimilantların üretimini artırdığı ve stomaların kapanması sonucu su kayıplarını azalttığı belirlenmiştir (Reuther ve ark. 1992). Kirdmanee ve ark., (1995b) okaliptus bitkilerinde *in vitro* koşullarda CO<sub>2</sub> zenginleştirmesi (kontrol: 400 µmol/m<sup>2</sup>s CO<sub>2</sub>; zenginleştirilmiş: 1200 µmol/m<sup>2</sup>s CO<sub>2</sub>) ve destekleyici maddelerin (agar, gelrit ve vermikulit) aşırtma aşamasındaki etkilerini araştırmışlardır. *In vitro* koşullarda Fn oranı artışına paralel olarak kökte meydana gelen gelişme *ex vitro* koşullara transferden sonra da bitkilerde su alımını ve fotosentez aktivitesini olumlu etkilemiştir. CO<sub>2</sub>'ce zenginleştirilmiş koşullarda kontrole göre transferden 4 hafta sonra daha fazla sayıda birincil kökler, daha az oranda zarar görmüş yapraklar, daha yüksek sürgün uzunluğu ve yaprak alanı değerleri bunun sonucunda da *ex vitro*da yüksek Fn ve büyüme görülmüş ve daha yüksek yaşama oranı bulunmuştur. *Ex vitro* koşullarda en yüksek yaşama oranı vermikulit ve CO<sub>2</sub> zenginleştirmesinde saptanmıştır. Transferden sonra vermikulitte yetiştirilen bitkilerin yapraklarında diğer destekleyici maddelere göre kuraklığa karşı daha fazla dayanıklılık sağlanmış ve vermikulitte gelişen bitkiler agar veya gelritte gelişenlere göre daha iyi kök yapısı geliştirmiş, daha az oranda su stresi görülmüştür. Yine

Kirdmanee ve ark. (1995c) yaptıkları araştırmada okaliptüs bitkilerinde *in vitro* ototrofik koşullarda CO<sub>2</sub> zenginleştirmesinin (kontrol: 400 µmol/m<sup>2</sup>s CO<sub>2</sub>; zenginleştirilmiş: 1200 µmol/m<sup>2</sup>s CO<sub>2</sub>) ve farklı destek maddeleri (agar, gelrit, vermikulit ve plastik ağ) kullanımının bitkilerin kök, sürgün ve Fn oranına etkilerini ve anatomik özelliklerini incelemiştir. Yaprak palizat tabakası agar ve gelrite göre plastik ağ ve vermikulitte önemli derecede daha kalın bulunmuştur. Palizat tabaka indeksi (palizat tabaka kalınlığı/yaprak kalınlığı x100) her iki CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda da vermikulitte agarın hemen hemen iki katı daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca CO<sub>2</sub> zenginleştirilmesi kontrole göre daha kalın palizat tabakası ve daha büyük palizat tabaka indeksi gelişimi sağlamıştır. CO<sub>2</sub> zenginleştirilmesi hem Fn oranını artırmış hem de anatomik yapıyı da geliştirmiştir. Araştırma sonucuna göre *in vitro* koşullarda CO<sub>2</sub> zenginleştirilmesi ve destekleyici madde olarak vermikulitin kullanılması, *in vitro* bitkilerin alıştırılmış anatomilerinde (küçük ve yoğun stoma ve kalın ve tam yapılı palizat parankima tabakası) olumlu gelişmelere ve *ex vitro* koşullarda yüksek yaşama oranlarına neden olmuştur.

Kuşkonmaz, okaliptüs, *Ficus benjamina* (benjamin ağacı), *Fragaria x ananassa* (bahçe çileği) ve *Rubus idaeus* (ahududu) bitkilerinde *in vitro* kültürde CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun artırılması, ışığın artırılması ve bağıl nemin artırılması veya azaltılması *ex vitro* koşullarda alıştırma aşamasında bitki yaşama oranını ve büyümesini teşvik etmiştir (Kirdmanee ve ark. 1995a ve Posposilova ve ark. 1999a). Buna rağmen muzda artırılmış CO<sub>2</sub> konsantrasyonu *in vitro*da kuru madde akümülyasyonunu artırmış, fakat *ex vitro* koşullara transferden 20 gün sonra kuru madde artışı bakımından önemli bir farklılık bulunmamıştır (Posposilova ve ark., 1999a).

#### **Ex Vitro AlıŖtırmada GeliŖmeler**

*Ex vitro*ya transferden sonra bitkilerin alıştırılmasında farklı uygulamalar (ışık yoğunluğunda varyasyonlar, azaltılmış bağıl nem, artırılmış CO<sub>2</sub> konsantrasyonu gibi) yapılmaktadır (Estrada-Luna ve ark. 2001). Kasımpatı ve karanfilde, film yapısında antitranspirantlar (Aquawiltless, Clear spray, DC-200, Exhalt 4-10, Folicote, Vapor Gard, Protec ve Wiltpruf) *ex vitro* bitkilerde nemlenmeyi düzenlemek amacıyla test edilmiştir. Terlemeyi azaltmada en iyi etkiyi DC-200 yapmış olmasına rağmen, aynı antitranspirantın bitki büyümesine olumsuz etkisi olmuştur. Diğer antitranspirantların bitkinin güçlenmesine etkisi olmamıştır (Posposilova ve ark. 1999a).

*Ex vitro*ya transferden sonra bitkilerin genellikle kuraklıktan, fotoinhibisyonundan kaçınma ve anormalliklerin düzeltilmesi için gölgelemeyle birlikte dereceli olarak düşük nem koşullarına alıştırılmaları için zamana ihtiyaç vardır. ABA'nın transferden hemen sonra substrata eklenmesi bütün bitkilerinde stoma kondüktansını ve terleme oranını azaltarak transfer şokunu azaltmıştır. ABA uygulaması önemsiz derecede

de fotosentetik parametrelerini etkilemiş ve bitki büyümesini artırmıştır. *Ex vitro* alıştırma prosesini hızlandırmak için diğer bir yol bitkileri CO<sub>2</sub> zenginleştirilmesi yapılmış koşullarda büyüterek fotosentezi ve *ex vitro* büyümesini teşvik etmektir. Bütün bitkilerinde alıştırma aşamasında CO<sub>2</sub> ilave edilmesi Fn oranını, su kullanım etkinliğini ve büyümesini artırmış, fotokimyasal aktiviteleri ve gaz değişiminin stoma ile düzenlenmesini geliştirmiştir (Synkova ve Posposilova 2002). *Fragaria x ananassa* (bahçe çileği) bitkilerinde CO<sub>2</sub> zenginleştirmesinin transferden sonra bitki büyümesine bir etkisi olmamış, 20 gün sonra ise Fn oranı ve biyolojik kütle akümülyasyonunda artış sağlanmıştır (Solarova ve Posposilova 1997).

Alıştırma aşamasında güçlü bitkiler geliştirmek için (minimum bitki kaybı ile) iki farklı yöntem belirtilmiştir. Bunlardan birincisi, alıştırma ortamını kontrol etmek için bilgisayarlı bir çevre kontrol sistemi kurarak, alıştırmanın erken aşamalarında bağıl nem yükselmeden kontrol edilebilmekte ve aynı zamanda fotosentez için ışık ve CO<sub>2</sub> ilavesi yapılabilmektedir. Diğer yöntem ise doku kültüründeki çoğaltma ve köklenme aşamalarındaki çevre kontrolüne benzer bir alıştırma veya sera çevresi kontrolüdür. Böylece *in vitro* kültürden *ex vitro*ya geçişte çevrede küçük bir değişim olacaktır. Bu sistemde çoğaltma ve köklenme aşamalarında bitkiler şekersiz ortamda; ortama CO<sub>2</sub> ilave edilerek büyütülmekte ve alıştırma aşamasına yakın koşullarda gelişme sağlanmaktadır. Ayrıca sıcaklığı, nemi, ışık ayarı, CO<sub>2</sub> konsantrasyonu ve hava akış oranı bilgisayarla kontrol edilen alıştırma üniteleri geliştirilmiştir (Hayashi ve Kozai 1988). Konvensiyonel alıŖtırmada, alıŖtırma aşamasında çevre kontrolü için ana hedef alıŖtırma aşamasının erken dönemlerinde bağıl nemi yüksek tutmak olmaktadır. Nemi yüksek tutmak için bitkilerin etrafı plastik film ile kapatılarak gölgelendirilmekte ve aynı zamanda sisleme yapılmaktadır. Yüksek ışık yoğunluğunun bitkiye doğrudan teması zararlı olabileceği için gölgeleme zorunlu olmaktadır. Ayrıca yüksek ışık yoğunluğu ortamın sıcaklığını artırmakta ve bağıl nemini değiŖtirmekte ve bitkilerde su kaybı meydana gelmektedir. Yüksek nemi korumak için gölgeleme altında sisleme en kolay yoldur. Yine de bu uygulama fotosentezi kısıtlamakta ve bitkilerin ototrofik büyümelelerini ve köklenmelerini engellemektedir. Gölgelemenin derecesi ve sislemenin uzunluğu dikkatli bir şekilde dereceli olarak zamanla azaltılarak bitkilerin ototrofik gelişimi sağlanmaktadır (Reuther ve ark. 1992 ve Roberts ve ark. 1992). Okada ve ark. (1992), *in vitro* bitkilerde alıştırma aşamasında sisleme sistemi geliŖtirmişler ve sera içerisinde hava akımı sağlanarak bitkilerin nemden çürümesi engellenmektedir. Denemede 4 m uzunluğunda ve 0.9m genişliğinde küçük plastik tünel, bir fan (25 w, 25 cm çapında) ve sisleme muslukları veya tabancaları kullanılmış su damla büyüklüğü 30µm ve günün 7 ve 16 saatleri arasında sisleme yapılmış ve sislemeye hava akımı 23 °C'de başlatılmış ve 18 °C'de durdurulmuştur. Denemede

Gentian (*Gentiana scabra* var *Buergeri* M.) sürgün uçları kullanılmış ve vermikülit içeren tepsilere bitkiler transfer edilmiştir. Denemede üç uygulama yapılmış (gölgelememiş sisleme serası, gölgelememiş sisleme serası ve gölgelememiş sislemesiz sera) ve alıştırma başlangıcından 77 gün sonra bitki yaşama oranları gölgelememiş sisleme serasında % 87.5, gölgelememiş sisleme serasında % 50 ve sislemesizde ise % 37.5 olarak bulunmuştur. Araştırmada ayrıca uzun süre gölge uygulamasında kök oluşumunun engellendiği belirtilmiştir.

Estrada-Luna ve ark. (2001), Şili biberinde alıştırma aşamasında farklı nem uygulamalarının etkilerini araştırmışlardır. Bitkiler *in vitro* koşullardan, büyüme odasına düşük bağıl nem koşullarına (dereceli olarak ilk üç günde % 80, 70 ve 60 ) aktarılmış ve bu koşullarda bağıl su içeriği ilk iki gün içinde % 15'e düşmüş, üç günden sonra ise bitkiler su stresini yenmişler ve 6. günün sonunda daha sağlam yapılı bitkiler elde edilmiştir. *In vitro*da bitkiler yüksek terleme oranı ve stoma kondüktansı ve düşük stoma dayanıklılığı göstermiş ve *ex vitro*ya transferden sonra su noksanlığı başlamış ve stoma kondüktansı ve terleme, stoma kapasitesinden dolayı düşmüştür. Bağıl nemin dereceli olarak düşürülmesi stoma kondüktansını ve terlemeyi dereceli olarak düşürmüştür. Su noksanlığından dolayı birkaç gün süreyle transfer şoku olmasına rağmen, bitkiler bu şoku kolay atlattıklarıdır. Transferden sonra Fn oranı düşmüş, daha sonraki 3-4 gün içinde bitkiler su stresini yendikleri ve yeni gelişmiş yapraklar oluşturdukları için Fn oranı artmış ve alıştırma aşamasının başlangıcından sonuna kadar (1-24 gün) Fn oranı yaklaşık olarak 4 kat artış göstermiştir.

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Mikroçoğaltımda alıştırma *in vitro* ile normal koşullar arasında bir geçiş (adaptasyon) aşamasıdır. Mikroçoğaltımda *in vitro* koşullarda ve *ex vitro* alıştırma koşullarında bazı uygulamalar yapılarak bitkilerin sağlıklı bir şekilde normal koşullara aktarılması amaçlanır. Bu çerçevede mikroçoğaltımda başarılı bir alıştırma ve alıştırma sonrası için aşağıdaki uygulamaların yapılması önerilebilir. *In vitro* koşullarda yapılabilecek uygulamalar;

- 1). Bitkilerin *in vitro* koşullarda kendi kendilerine fotosentez yapabilmeleri için fototototrofik koşullarda (kültür ortamına CO<sub>2</sub> ilavesi, sukrozsuz besin ortamı, havalandırılmalı kültür kutularının kullanımı, ilave ışıklandırma yapılması) büyütülmesi.
- 2). Besin ortamına sukroz ilavesi, büyüme düzenleyicilerin ve geciktiricilerin (ABA, GA<sub>3</sub>, sitokininler, paclobutrazol gibi), osmotik basınç düzenleyicilerinin (manitol) ve agar yerine farklı destekleyici maddelerin (vermikülit vb.) kullanımı
- 3). Kültür ortamına CO<sub>2</sub> ilavesi veya CO<sub>2</sub> ile birlikte PPF D uygulamaları, düşük bağıl nem uygulamaları.

4). Işığ, CO<sub>2</sub> konsantrasyonu, besin ve gaz giriş-çıkışı kontrol edilebilen otomatik bilgisayar sistemlerde sıvı ortamda bitki gelişiminin sağlanması

5). *In vitro* kültür kutuları *ex vitro* alıştırma koşullarına aktarılmadan önce daha düşük bağıl nem koşullarına alıştırmak için alttan soğutulmakta ve böylece *ex vitro* koşullara uyum sağlanmaktadır.

*Ex vitro* alıştırma aşamasında yapılabilecek uygulamalar;

- 1). Yetiştirme ortamına büyüme düzenleyicileri, geciktiricileri ve diğer koruyucu maddelerin ilave edilmesi (ABA, prolin, putrescin vb. ).
- 2). Terlemeyi önlemek için antitranspirantların kullanılması ve bitkileri düşük bağıl nem koşullarına (*in vitro* koşullara göre) alıştırmak için farklı uygulamaların (kademeli olarak nemi düşürme, sisleme, gölgeleme) yapılması.
- 3). Farklı ışık yoğunluğu (PPFD) uygulamaları, CO<sub>2</sub> zenginleştirilmesi, vermikülit gibi farklı destek maddelerinde bitki gelişiminin sağlanması.
- 4). Çevre kontrolünün (nem, sıcaklık, ışık, gaz ve besin giriş-çıkışı vb.) bilgisayarlı sistemle yapıldığı alıştırma ünitelerinin kullanılması.

Mikroçoğaltımda alıştırmada en önemli koşullar; *in vitro* koşullarda kendi kendine fotosentez yapabilen (ototrofik olarak gelişen) ve güçlü kök ve yaprak yapısına sahip bitkileri geliştirmek ve *ex vitro* koşullarda minimum bitki kaybı ile kısa sürede çok fazla sayıda sağlıklı bitkiyi normal koşullara (sera, tarla vb.) aktarabilmektedir. Başarılı bir alıştırma, dikkatli bir *in vitro* ve *ex vitro* çevre kontrolü ve bitkilerdeki fizyolojik değişiklikleri dikkatli izlemeyle sağlanabilir.

### KAYNAKLAR

- Amoncia, S., Rebordao, J.P., Chaves, M.M., 1999. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 58: 31-37.
- Buddendorf-Joosten, J.M.C., Woltering, E.J. 1996. Controlling the gaseous composition *in vitro*-description of a flow system and effects of the different gaseous components on *in vitro* growth of potato plantlets. *Sci. Hort.* 65:11-13.
- De Klerk, G.J., 1999. Rooting treatments and the *ex vitro* performance of micropropagated plants: In International Symposium on Methods and Markers for Quality Assurance In Micropropagation. 24-27 August 1999, Cork. Irish Republic. Applied Plant Research, Centre for Plant Tissue Culture Research, Netherlands, abstract.
- Desjardings, Y. 1995. Factors CO<sub>2</sub> fixation in striving to optimize photoautotrophgy in micropropagated plants. *Plant Tissue Culture and Biotech.* 1(1): 13-25.
- Diaz-Perez, J.C., Sutter, E.G., Shackel, K.A., 1995. Acclimatization and subsequent gas exchange,

- water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. *Physiol. Plantarum*. 95:225-232.
- Estrada-Luna, A.A., Davies, F.T., and Egilla, J.N., 2001. Physiological changes and growth of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization and post-acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 66:17-24.
- Fila, G., Ghashghaie, J., Hoarau, J., Cornic G., 1998. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. *Physiol. Plantarum*. 102:411-418.
- Fujiwara, K., Kozai, T. and Watanabe I., 1988. Development of photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. *Acta Horticulturae, High Technology in Protected Cultivation*, 230, p:153-158.
- Genoud-Gourichon, C., Sallanon, H., Coudret, A., 1996. Effect of sucrose, adar, irradiance and water concentration during rooting phase on the acclimation of *Rosa hybrida* plantlets to *ex vitro* conditions. *Photosynthetica*. 32:263-270.
- Hayashi, M., and Kozai, T., 1988. Development of a facility for accelerating the acclimatization of tissue-cultured plantlets and the performance of test cultivations. *Symp. Florizel on Plant Micropropagation in Hort. Ind.* pp 123-134. Arlon, Belgium.
- Kirdmanee, C., Kitaya, Y., and Kozai, T., 1995a. Rapid acclimatization of *Eucalyptus* plantlets by controlling photosynthetic photon flux density and relative humidity. *Environ. Control in Biol*. 33(2): 123-132.
- Kirdmanee, C., Kitaya, Y and Kozai, T., 1995b. Effect of CO<sub>2</sub> enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol*. 31:144-149.
- Kirdmanee, C., Kitaya, Y and Kozai, T., 1995c. Effect of CO<sub>2</sub> enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro* anatomical comparisons. *Acta Horticulturae*. 393:111-118.
- Kozai, T., 1988. High technology in protected cultivation from environmental control engineering point of view. *Int. Symp. on High Technology. Protected Cultivation*, 10-11 May, 1988, Tokyo, Japan. pp. 3-43.
- Kozai, T., 1991. Acclimatization of micropropagated plants. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 17. *High-Tech and Micropropagation I*. (ed. By Y.P.S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p, 127-141.
- Kozai, T., Ting, K.C., and Aitken-Christie, J., 1991. Considerations for automation of micropropagation systems. *Symp. Amer. Soc. Agr. Eng.*, p:503-517.
- Kozai, T., Smith M.L., 1995. Environmental control in plant tissue culture- general introduction and overview. J. Aitken-Christie, T. Kozai and Smith, M. L. (eds), *Automation and Envir. Cont. in Plant Tiss. Cult.* Kluwer Academic Publ. Netherlands, p 301-318.
- Lucchesini, M., Mensuali-Sodi, A., Massai, R., and Gucci, R., 2001. Development of autotroph and tolerance to acclimatization of *Myrtus communis* transplants cultured *in vitro* under different aeration. *Biologia Plantarum*. 44 (2):167-174
- Mansuroğlu, S., Gürel, E., 2001. Mikroçoğaltım. *Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (edt.) 374 sayfa, 262-281.
- Noe, N., Bonini, L., 1996. Leaf anatomy of highbush blueberry grown *in vitro* and during acclimatization to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*. 38:19-25.
- Novello, V., Gribaudo, I., Roberts, A.V., 1992. Effects of paclobutrazol and reduced humidity on stomatal conductance of micropropagated grapevines. *Acta Horticulturae*, 319, *International Symposium on Transplant Production Systems*, 21-26 July 1992, Yokohama, Japan, volume,1:65-70.
- Nguyen, Q.T. and Kozai, T., 1998. Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Envir. Cont. in Biol*. 36(2) 59-75.
- Okada, M., Ozawa, N and Hamasaki, T., 1992. A fog chamber for acclimatizing *in vitro* propagated plants to outdoor climate. *Acta Horticulturae*, 319, *International Symposium on Transplant Production Systems*, 21-26 July 1992, Yokohama, Japan, volume,1: 159-162.
- Reuther, G., Botsch, K. and Meier K., 1992. Influence nutritional and environmental factors on production and photoautotrophy of transplants *In Vitro*. *Acta Horticulturae*, 319, *International Symposium on Transplant Production Systems*, 21-26 July 1992, Yokohama, Japan, volume,1: 47-52.
- Roberts A.V., Walker, S., Horan, I., Smith, E.F., and Mottley, J., 1992. The effects of growth retardants, humidity and lighting of stage III. on stage IV of micropropagation in Chrysanthemum and Rose. *Acta Horticulturae*, 319, *International Symposium on Transplant Production Systems*, 21-26 July 1992, Yokohama, Japan, volume,1:153-158.
- Pospisilova, J. Wilhelmova, N., Synkova, H., Catsky, J., Krebs, D., Hanackova, B., Snopek, J., 1998. Acclimatization of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions as affected by application of abscisic acid. *J. Exp. Botany*. 49:863-869.
- Pospisilova, J., Ticha, I., Kadlecěk, P., Haisel, D., and Plzakova, S., 1999a. Acclimatization of micro-



- propagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42(4): 481-497.
- Pospisilova, J., Synkova, H., Haisel, D., Catsky, J., Wilhelmova, N., and Sramek, F., 1999b. Effect of elevated CO<sub>2</sub> concentration on acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions. *J. of Exp. Bot.* 50:119-126.
- Premkumer, A., Mercado, J.A., and Quesada, M.A., 2001. Effect of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments and C/N ratio. *J. of Plant Physiology*. 158: 835-840.
- Pruski, K., Astatkie, T., Mirza, M., and Nowak, J., 2002. Photoautotrophic micropropagation of Russet Burbank potato. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 69:197-200.
- Serret, M.D., Trillos, M.I., and Araus, J.L., 2001. The Effects of *in vitro* culture conditions on the pattern of photoinhibition during acclimation of Gardenia plantlets to *ex vitro* conditions. *Photosynthetica*. 39(1): 67-73
- Solarova, J. and Pospisilova, J., 1997. Effect of carbon dioxide enrichment during *in vitro* cultivation and acclimatization to *ex vitro* condition. *Biologia Plantarum*. 39(1): 23-30
- Soon, J.H., Cui, Y.Y., Kozai, T., and Paek, K.Y., 2000. Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 61: 135-142.
- Synkova, H., and Pospisilova J., 2002. *In vitro* precultivation of tobacco affects the response of anti-oxidative enzymes to *ex vitro* acclimation. *J. of Plant Physiol.* 159: 781-789.
- Ticha, I., Radochova, B., Kadlec, P., 1999. Stomatal morphology during acclimatization of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*. 42:469-474.
- Van Huylenbroeck, J.M., Deberg, P.C., 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiol. Plantarum*. 96:298-304.
- Vorackova, Z., Lipavska, H. and Konecny, P., 1998. The efficiency of transfer of plants cultivated *in vitro* to *ex vitro* conditions as affected by sugar supply. *Biologia Plantarum*. 41:507-513.
- Whish, J.P.M., Williams, R.R., and Taji, A.M., 1992. Acclimatization effects of reduced humidity *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 319, International Symposium on Transplant Production Systems, 21-26 July 1992, Yokohama, Japan, volume,1: 213-236.
- Ziv, M. 1992. Morphogenic control for plant micropropagated in bioreactor cultures and its possible impact on acclimatization. *Acta Horticulturae*, 319, International Symposium on Transplant Production Systems, 21-26 July 1992, Yokohama, Japan, volume,1:119-124.
- Zobayed, S.M.A., Zobayed, F.A. Kubota, C., and Kozai, T., 1999. Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 35: 183-188.