

## PATATESTE DOKU KÜLTÜRÜNÜN KULLANIM ALANLARI VE UYGULANMASI

Tahsin KARADOĞAN (1)

**ÖZET :** *Doku kültürü tekniği patatesten gen kaynaklarının korunması, hastalıkların elemine edilmesi, hızlı çoğaltım ve ıslah çalışmalarında geniş bir kullanım alanı bulmuştur.*

*Gen kaynakları kültür ortamındaki bitkinin büyümesini yavaşlatmak ile korunabilir. Bu işlem ortama büyümeyi engelleyici maddeler ilave ederek sağlandığı gibi, ortamın besin maddelerini veya sıcaklığını değiştirmek suretiyle de gerçekleştirilebilir. Ayrıca kültürün hızlı veya kademeli dondurulması ile de gen kaynakları muhafaza edilebilmektedir.*

*Patates bitkisi için büyük problem yaratan hastalıklar (özellikle virüsler) doku kültürü ile bitkiden elemine edilebilmektedir.*

*Virüssüz bitki veya ıslah materyali, doku kültürü ile hızlı bir şekilde çoğaltılarak kısa zamanda üretim aşamasına gelebilmektedir.*

*Bunların yanında doku kültüründen mutasyon, seleksiyon, dayanıklılık ve melezleme ıslahında faydalanılmaktadır. Uyuşmazlıklarda, eşeysel olarak melezlenmesi mümkün olmayan türlerin melezlenmesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ayrıca bir bitkinin ıslah süresi doku kültürü ile kısaltulabilmektedir.*

### GİRİŞ

Bir üretim tekniği olan doku kültürü çalışmalarına, 19. yüzyılın sonları ve 20. yüzyılın ilk dönemlerinde başlanılmakla beraber, 1960 yılında uygun besi ortamı keşfedilinceye kadar nemli bir gelişme gösterilememiştir (Er ve Canbolat, 1992). Besi ortamının keşfinden sonra, yapılan çalışmalar yeni gelişmeleri arkasından getirmiş, bugün birçok bitkide pratik kullanım alanı bulmuştur.

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde gen kaynaklarının korunması, hastalıkların elemine edilmesi ve hızlı çoğaltım amacıyla (Doods, 1988) patates üretiminde doku kültürü kullanılmaktadır. Ayrıca patatesin kalitesini ve verimini

---

(1) Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Erzurum.

iyileştirmek için yapılan ıslah çalışmalarında da doku kültüründen yararlanma günden güne artış göstermektedir.

## GEN KAYNAKLARININ KORUNMASI

Patateste bir genotipin devamlılığını sağlayabilmek için doku kültürü haricinde, her yıl tarlada üretilmesi gereklidir. Genotiplerin doku kültürü ile devamlılığının sürdürülmesinin tarla şartlarında üretimine göre bazı avantajları vardır.

a) Tarla şartlarında 1000'lerce genotipin üretimi doku kültürüne göre hem zor, hem de daha masraflıdır.

b) Tarla şartlarında çevre ve patojen riski bulunmaktadır.

c) Islah materyali için kullanılacak yabancı bir genotipin özelliğini kaybetmeden, yalnızca gen kaynağının bulunduğu bölgelerde devamlılığı sağlanabilir ve üretilir. Halbuki doku kültürü ile hiç bir özelliği kaybetmeden binlerce kopyası yapılabilir.

d) Doku kültürü ile çoğaltılan genotiplerin ulusal ve uluslararası dağıtımı daha kolay ve ucuz olmaktadır.

e) Doku kültürü ile istendiği anda genotip kısa zamanda fazla miktarda üretilir.

f) Doku kültürü ile iklime bağlı kalımsızın yılın her döneminde çoğalma yapılabilmektedir.

Yukarıdaki avantajlarından dolayı patateste gen kaynaklarının korunması için doku kültürüne başvurulmuştur. Doku kültürü ile gen kaynaklarının korunması (1) kültür ortamındaki fidelerin büyümesini yavaşlatmak (Doods ve Lizarraga, 1988) veya (2) kültür ortamındaki bitki dokularını dondurmak (Gönülşen, 1987) suretiyle yapılmaktadır.

### 1. Kültür Ortamındaki Fidenin Büyümesini Yavaşlatmak

Fidenin büyümesini yavaşlatmak 3 yolla yapılmaktadır.

#### 1.a. Büyüme Engelleyci Kimyasal Maddelerin Kullanımı

Büyüme geciktiren kimyasal maddelerin vitra ortamında fidelerin büyüme oranlarını düşürerek ortamda kalma sürelerini uzatmaktadır. Bu bileşiklere karşı çeşitlerin ve bitki materyallerinin tepkisi farklılık göstermektedir.

Doku kültüründe kullanılan bazı büyüme engelleyciler aşağıdaki şekilde uygulanmaktadır.

Maleic Hydrazide (MH), kültür ortamına 10 mg/1 ilave edildiğinde fidenin gelişmesini geciktirmektedir.

Diaminozide (B 995), açelya ve krizantemlerde yaprak spreyi olarak kullanılan bileşik, kültür ortamına 100 mg/l püskürtüldüğünde fidenin büyümesini yavaşlatmaktadır.

Absisik asit (ABA), dormansiyi kontrol ettiği gibi 15 mg/l'lik solusyonu kültür ortamına ilave edildiğinde büyümeyi yavaşlatmaktadır.

Trans-cinnamic asit (TCA) gibi fenolik bileşiklerde büyümeyi engelleyiciler olarak kullanılmaktadır.

### **1.b. Ortamın Ozmatik Basıncının Artırılması**

Büyümeyi sınırlamanın ikinci yoluda ortamın ozmatik basıncını artırarak, büyüme kültüründeki elverişli suyu azaltmaktır. Bunun için osmatik şekerler (mannitol ve sorbitol vs) kullanılmaktadır (Doods ve Lizarraga, 1988). Ortama % 6 oranında mannitol ilavesi bu amaç için uygundur. Ayrıca ortamın sükröz konsantrasyonunu değiştirmek suretiyle de fidelerin büyümesi yavaşlatılmaktadır. Kültür ortama sahip her 250 ml'lik kaba 60 ml veya her 60 ml'lik kaba 20 ml sükröz ilave edildiğinde fidenin büyüme oranı değişmektedir. Sükrözün etkisi ya besinsel ya da ozmatik yolla olmaktadır (Wang ve Hu, 1985).

### **1.c. Inkübasyon Sıcaklığını Ayarlama**

Yaşayan birçok organizmada olduğu gibi bitkilerdeki enzim faaliyetleri de belirli sıcaklıklarda vuku bulur. Bu enzimlerin biyokimyasal olarak optimum sıcaklıkları belirlenmiştir. Buna bağlı olarak bitkiler için optimum sıcaklıklar tesbit edilmiştir. In vitro ortamında bitkiler optimum sıcaklıktan aşağı veya yukarı sıcaklıklarda tutulursa büyüme sınırlanır. Bu işlem yapılırken bitkinin aşırı strese maruz kalmaması gerekmektedir. Bitkiler -3 °C'nin altında ve 28 °C'nin üstünde tutulursa stres görülmektedir (Doods, 1988). Sıcaklığın bu sınırlar içerisinde tutulması halinde bitki canlı kalır ve büyümeye devam eder. Patates bitkisinin büyümesinin minimum olduğu sıcaklıklar 6 °C (Westcolt ve ark., 1977) ve 22 °C (Westcolt, 1981) dir. Bunların yanında bitkilerin gündüz 12°C'de 16 saat ve gece 6 °C'de 8 saat tutulması halinde büyüme minimuma inmektedir (Wang ve Hu, 1985).

Minimum büyüme için sürgün ucu ve meristem kültürü daha fazla kullanılmaktadır. Çünkü bunlar kallus ve hücre kültürüne göre genetik olarak daha stabildir. Ayrıca kültür minimum büyüme ortamına konmadan önce on inkübasyon için 22 °C'de 1 mg/l 6-benzelaminapürin veya 0.5 mg/l 3-indol asetik asit ortamında iki gün veya 27 °C'de 0.2 mg/l ciberallik asit ortamında birgün tutulması gerekmektedir (Wang ve Hu, 1985).

Minimum büyüme ortamında yaklaşık 1-2 yıl saklanan kültürün yumru oluşum problemi ortaya çıkabilmektedir. Bunu önlemek için kültürün 10 °C'de depolanması uygun olmaktadır (Kwiatkowski ve ark., 1988).

## **2. Kültürün Dondurarak Muhafazası**

Bitki dokularının - 196 °C gibi düşük sıcaklıklarda dondurarak uzun süre muhafazası mümkündür (Bajaj, 1979). Çünkü düşük sıcaklıklarda bütün metabolik olaylar durmakta ve hiç bir genetik değişim meydana gelmemektedir. Dondurarak muhafaza için süngür ucu, meristem, somatik hücre, protoplast, embriyo, anter ve polen kültürleri kullanılmaktadır (Kartha, 1981).

Belirli bir dokunun dondurarak korumasındaki başarı, dokunun her bir hücresi içerisinde buz kristallerinin sebep olduğu zararın önlenmesi veya minimuma indirilmesine bağlıdır. Dondurarak muhafazada kültürü soğuğa karşı korumak için dimetil süloksit, etilen glikol, dietilen glikol, propilen glikol, rezometilen tetramin, dimetil asetamid, polivinil pirolidon ve değişik şekerler kullanılmaktadır (Gönülşen, 1987).

Bugün dondurarak muhafazada iki yaklaşım başı çekmektedir.

### **2.a. Çok Hızlı Dondurma**

Hücre içerisinde oluşan buz kristalleri hızlı dondurmada mikrobik büyüklükte olmaktadır. Bunlar hücrenin membranını ve iç organellerini parçalamamaktadır. Bunun yanında eritme işlemi kristalleşmeyi önlemek için yeterince hızlı yapılmalıdır. Bu metot sürgün uçlarının dondurulmasında başarılı bir metottur (Doods, 1988).

### **2.b. Kademeli Dondurma**

Yavaş ve kademeli dondurma işlemine birçok doku kültürü için başvurulmaktadır. Hücrenin zarar görmesi dış kısımların dondurulmasına bağlıdır. Hücreler soğutulurken, etrafındaki sıvı kademeli bir şekilde buz çekirdeklerine bağlı olarak donar. Bu esnada hücre içi akışkan sıvı henüz donmaz. Dışta buz oluşumuyla meydana gelen su buharı basıncı hücre içerisindeki suyu çeker. Bunun sonucu hücre eriyiğinin donma noktası düşer. Bu şekilde patatesten gen kaynaklarının korunması halinde genetik zararlanma çok az görülür. Fakat böyle koruma özel tesis istendiğinden diğer yöntemlere göre daha pahalıdır.

## **PATOJEN ELEMINASYONU**

Böcekler, nematotlar, funguslar ve bakterilerin aksine, virüsler konukcu

oldukları bitkilere uygulanacak kimyasal ilaçlarla kontrol altına alınamazlar.

Bitkileri virüs hastalıklarından arındırmak için 2 teknik kullanılmaktadır.

### **1. Isı ile Tedavi**

Bu metotla bitkiler belirli sıcaklıklarda tutularak virüsler elemine edilir. Sıcaklığın yüksek olduğu ortamda virüslerin replikasyonu önlediğinden bitkiler virüsten arındırılmaktadır. ABD'de yapılan çalışmalarda bitki 35 °C'de 56 gün veya 36 °C'de 39 gün tutulduğunda birkaç patates çeşidinde PYKV virüsleri elemine edilmiştir (Boks, 1990).

Bazı araştırmacılar sıcaklık ile tedavide, değişen sıcaklık uygulamaların tavsiye etmektedirler. Hindistan'da yapılan bir araştırmada 2 ay 32 °C ve ardından 4 ay 29 °C tutulduğunda bitki PYKV virüslerinden arındırılmıştır (Boks, 1990).

Sıcaklık ile tedavide yumruların bozulması, mutant hatların oluşması, renk bozulması ve bazen sürgün vermemeleri nedeniyle uygun bir yöntem olarak görülmemektedir (Boks, 1990).

### **2. Doku Kültürü ile Virüslerin Eliminasyonu**

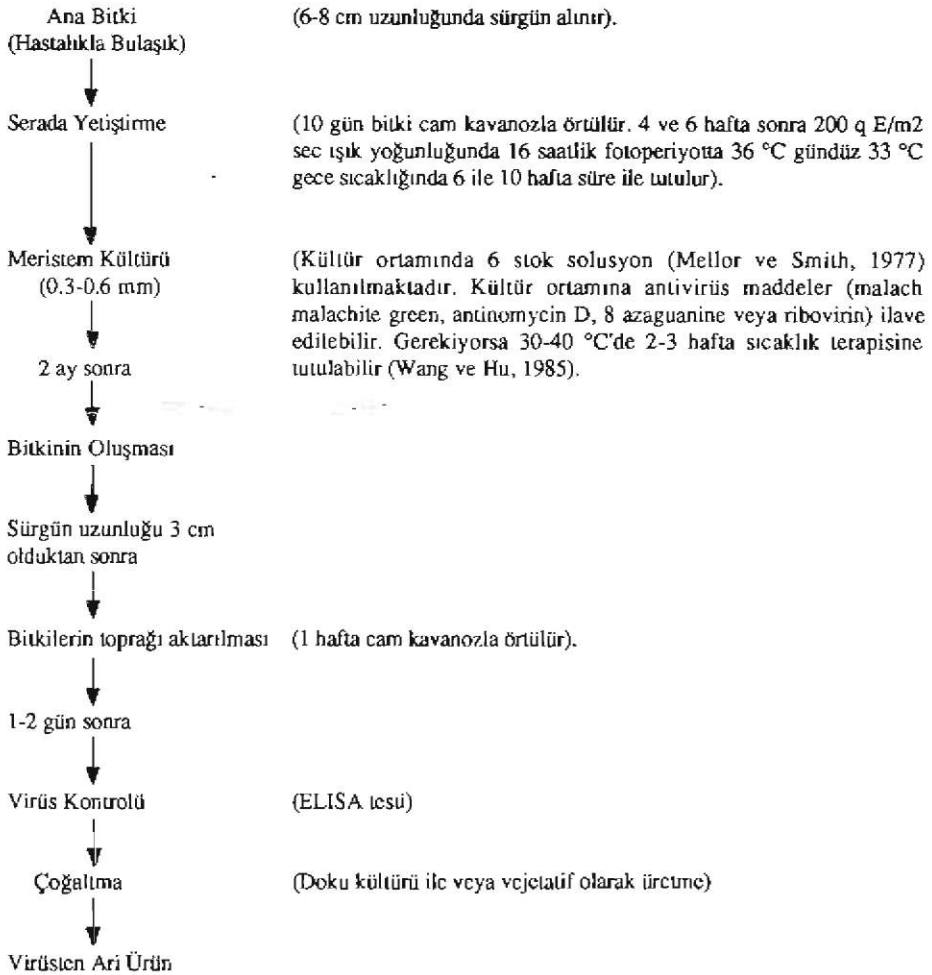
Virüs elemine etmek için protoplast, kallus ve hücre kültürleri kullanılmakla beraber, en iyi sonucu meristem kültürü vermektedir. Meristem kültürü ana bitkinin bütün özelliklerini taşımasına rağmen, diğer kültürlerde mutasyonla değişim olabilir.

Bulaşık bitkinin virüsten arındırılması için izlenen yol Şekil 1'de şematize edilmiştir.

### **HIZLI ÇOĞALTMA**

Hızlı çoğaltma, (a) ıslah sonucu elde edilen, (b) gen bankasında bulunan ve (c) patojenden arındırılmış genotiplerin çoğaltılması amacıyla başvurulan bir işlemdir.

Bugün hızlı çoğaltma teknikleri; 1. In vitro'da fide halinde çoğaltma ve tarlaya aktarma, 2. In vitro ortamında mikro yumrular üretme ve tarlaya aktarma, 3. In vitroda üretilen fidelerden steril olmayan ortamlarda küçük yumrular üretme ve tarlaya aktarma, 4. Pirleri keserek serada köklendirme ve tarlaya aktarmak olmak üzere 4 kategoriye ayrılmıştır (Jones, 1988). Bu tekniklere yumru üzerinde bulunan bütün sürgünlerin uygun ortamda geliştirilerek çoğaltılması da eklenebilir. Hızlı çoğaltma metotlarından in vitroda fide halinde üretilip, tarlaya aktarma işlemi dünyada en çok kullanılan yöntemdir. Bunu pirlerin kesilerek çoğaltılması işlemi izlemektedir (Jones, 1988).



Şekil 1. Meristem kültürü ve sıcaklık terapisi ile bitkinin virüsten arındırılması. (Gönülşen, 1987)'den alınan Tablo, Wang ve Hu, (1985) ve Wright (1988)'in belirttiği değerlerle modifiye edilmiştir.

In vitro ortamında yapılan çoğaltma metotları esasta birbirine benzemektedir. In vitroda bütün çoğaltma metotları tek ve çok boğumlu patates sürgünlerinin sıvı veya katı ortamda hızlı geliştirilmesi üzerine kurulmuştur.

### Tek Boğum Kesimiyle Çoğaltma

Yapraklar ile tek bir boğum in vitro içerisindeki küçük fideden kesilir. Yapraklar büyük ve yaşlı ise dikkatlice koparılır. Büyük yaprakların tek boğum üzerinde bırakılması halinde olgun yapraklardaki hormonlar yeni gelişen bitkinin

gelişmesine ket vurmaktadırlar. Kesilen bir boğum katı agar ortamına (Espinoza ve ark., 1984) bırakılır. Yan tomurcuklar 3-4 hafta içerisinde hızlı bir şekilde büyürler (Şekil 2).

### **Çoklu Boğum Kesimiyle Çoğaltma**

Meristem kültürü veya diğer kültürlerle yenilenen fide 250 ml'lik erlenmayer içerisindeki agar ortamı üzerine yatay olarak konur. Yirmi gün içerisinde bu sürgünden 2 veya 3 koltuk altı sürgünü gelişir. Gelişen sürgünler tekrar agar ortamına yatay olarak konur ve yeniden koltuk altı sürgünleri gelişir. Bu işlem 20 gün aralıklarla 3 kez tekrarlanır.

Gerek tek gerekse çoklu boğum kesimiyle çoğaltılan fideler direkt steril olmayan ortama köklendirmek amacıyla aktarılabildikleri gibi, sıvı kültüre aktarılarak da çoğaltma işlemine devam edilebilir (Şekil 2).

### **Sıvı Kültüre Aktarma**

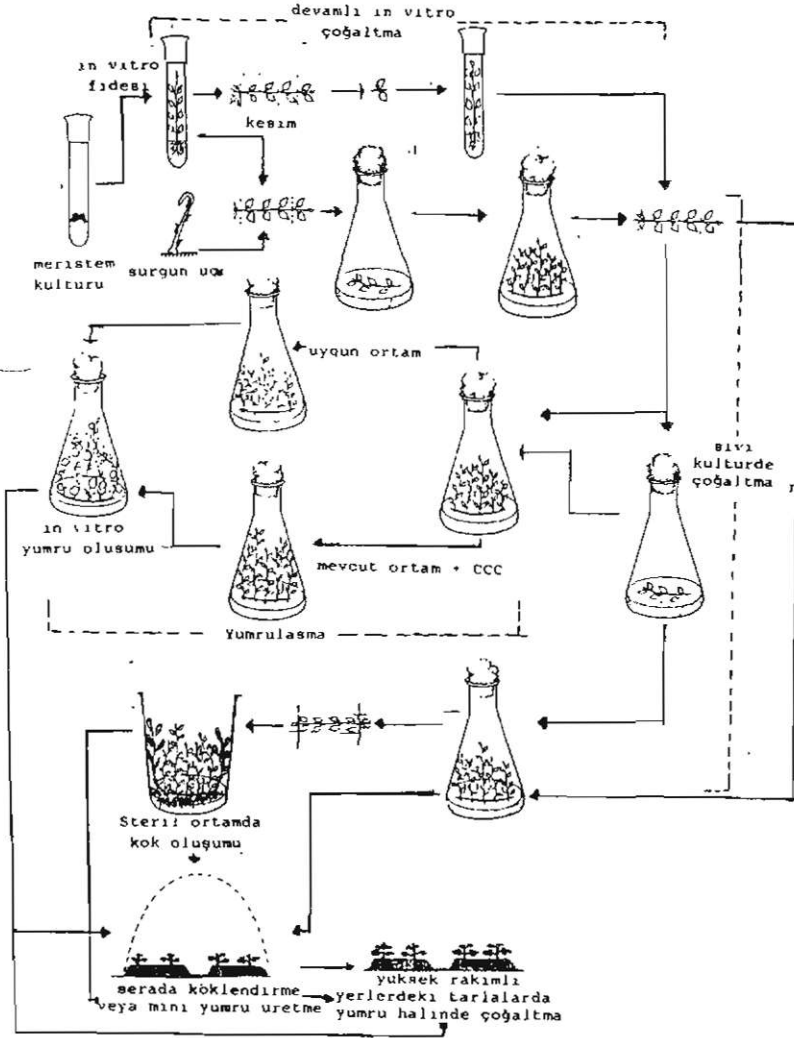
In vitro ortamında tekli veya çoklu boğum kesimiyle çoğaltılan fideler, her biri 3 veya 4 nod ihtiva edecek şekilde kesilir ve büyük yapraklar uzaklaştırılır. Her bir parça 15 ml'lik sıvı ortama (Espinoza ve ark., 1984) yerleştirilir. Ortamın havasız kalmaması için 80 d/d hızla sallanır. İki veya üç hafta sonra herbir ekplant 60 ve 70 boğum ihtiva edecek şekilde büyür. Bu ortamdan doğrudan serada steril olmayan ortama aktarma yapılabilir (Şekil 2).

### **Köklendirme ve Steril Olmayan Şartlara Transfer**

Gerek tekli, gerekse çoklu boğumdan çoğaltılan veya sıvı kültürden alınan fidelerin büyük yaprakları alınır. Bu fidelerin çok boğumlu sürgünleri veya tek boğumlu 16-25 sürgün uygun kap içerisine agar ortamına bırakılır. Fideler 3-5 cm uzadığında ve iyi kök sistemine kavuştukları zaman, yüksek organik madde ihtiva eden yataklara veya saksılara transfer edilir. Bu ortamda oluşan yumrular tarlada çoğaltmaya alınmaktadır (Şekil 2). Steril olmayan ortamda köklendirilen fideler doğrudan tarlaya aktarılabılır.

### **In Vitro Ortamında Yumru Oluşturma**

Şekil 2'de yumrulaştırma işlemi için kullanılan metot gösterilmiştir. Sıvı veya katı kültür ortamından alınan fideler 8 saatlik fotoperiyotta (Slimmon ve ark., 1989), Wang ve Hu (1982)'nin modifiye ettiği kültür ortamına (Ortiz ve Saldana, 1987) veya CCC ilave edilmiş sıvı kültür ortamına (Dooks, 1988) yatay olarak bırakılır. Bu



Şekil 2. Tek ve çok boğumlu çoğaltım ile sürgünlerin köklendirilmesi ve yumurlaşmanın şematize edilmesi

kültür ortamında 12 hafta sonra mikro yumrular oluşmaktadır. Bu yumrular direkt tarlaya dikilebildiği gibi, seralarda mini yumru üretimi için de kullanılmaktadır.

Yumru oluşturmanın fide üretimine göre bazı avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlardan birincisi gen bankalarında bulunan genotiplerin dağılımının daha kolay



olmasıdır. İkincisi ise üretilen yumruların uygun ortamlarda depolanma özelliğine sahip olmalarıdır. Yani üretildikten hemen sonra kullanılmayabilirler.

Doku kültürü ile üretilen fidelerin veya mikro yumruların tarla şartlarındaki performansı oldukça yüksektir. Wattimena ve ark. (1983) tarafından yapılan bir çalışmada, verim bakımından gerçek yumru kullanımı ile mikro yumru ve mikro sürgün kullanımı arasında önemli bir fark bulunamamıştır. Burada dikkat edilecek husus, fidelerin steril ortamdan direkt tarlaya akarılmasının uygun olmamasıdır. Belirli bir süre serada çevreye uyumu sağlanmalıdır (Sipos ve ark., 1988). Aksi halde verimde önemli azalmalar meydana gelmektedir. Gerek mikro fide girekse mikro yumru üretimini dezavantajları, (a) üretimlerinin pahalı olması ve (b) tek sürgün verdiklerinden dış şartlardan fazla etkilenmesidir. Bunun yanında kültür ortamındaki yumru verimi ile tarladaki yumru verimi arasında olumlu ilişki bulunduğundan (Alsadon ve ark., 1988) verim hakkında önceden tahmin yürütülebilir.

## **PATATES ISLAHINDA DOKU KÜLTÜRÜNÜN KULLANIMI**

### **Kallus Kültürü**

Kallus, düzenli olmayan yara dokusudur. Genelde mutasyon ıslahında kullanılmaktadır. Genetik varyabilitesi çok yüksek olduğundan biktilerin çoğaltımı için kullanımı uygun değildir. Hücrelerinin kolayca dağılabilmeleri nedeniyle hücre ve protoplast kültüründe başlangıç materyali olarak da kullanılabilirler.

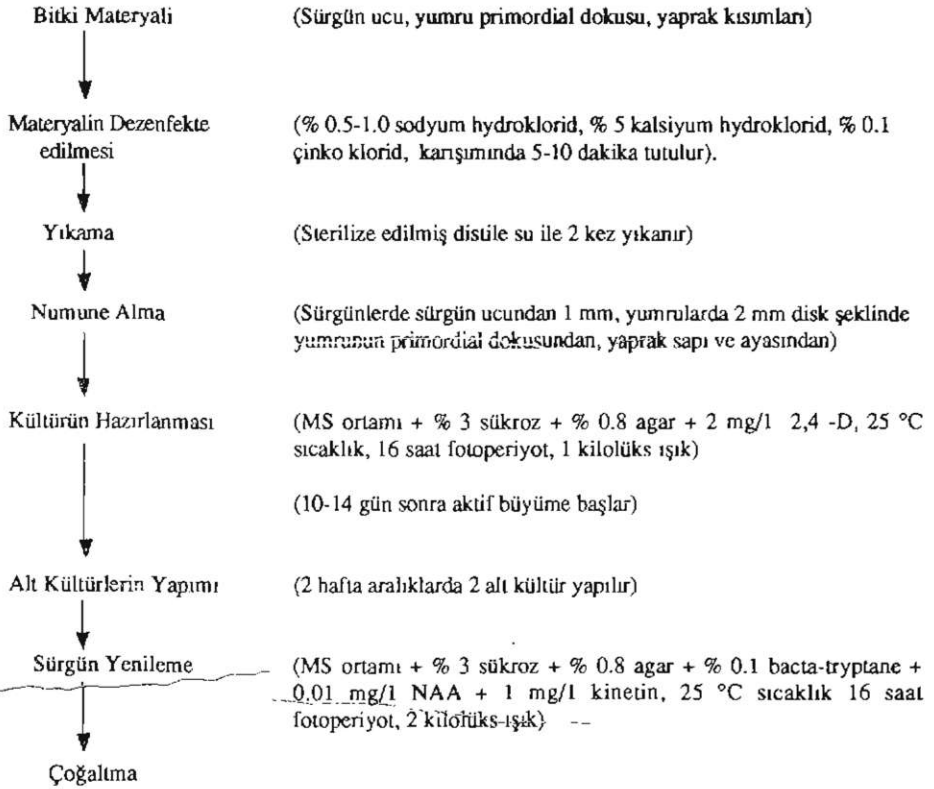
Bitkiler sürgün, yumru ve yaprak kalluslarından yenilenebilir. Kültür için bitkinin genç dokuları tercih edilmelidir (Macit, 1972). Kallus dokusunu in vitro şartlarında yenilemede 3 kademe bulunmaktadır (Şekil 3).

1. Bitki materyalinin belirli bir kısmının farklılaşması
2. Farklılaşan bu kallus hücresinin köklerde, sürgünlerin meristemlerinde veya embriyolarında çoğalması.
3. Kültür ortamında bu farklılaşan kısımlardan bitki elde edilmesi.

Varyasyonlar morfoloji, ploidi düzeyi, kromozom sayısı, verim ve enzimler yönünden meydana gelebilmektedir. Kromozom sayısındaki değişiklikler yanında kromomlarda yapı değişiklikleri de vuku bulabilir (Evans ve Reed, 1981).

Kültür esnasında doğrudan mutasyona rastlanıldığı gibi, ortama etil metan sülfanat, etil sülfat gibi mutagenler (Handro, 1981) ilave edilerek de mutasyon artırılabilir. Mutasyon neticesinde elverişli genotipler bulmak mümkündür.

Kallusu kültürü esnasında ortama hastalık etmenleri ilave ederek dayanıklılık bakımından seleksiyon yapılabilir.



Şekil 3. Kallus kültürünün uygulanış yöntemi (Wang ve Hu, 1985)

### Anter Kültürü

Autotetraploid ( $2n = 4x = 48$ ) bitkilerden dihaploid ( $2n = 2x = 24$ ) bunlardan da monohaploid ( $2n = x = 12$ ) bitkiler elde etmek amacıyla anter kültüründen yararlanılır. Patates bitkisinde haploid bitkilerin elde edilmesinin şu avantajları vardır.

1. Autotetraploidlerden elde edilen dihaploidler yabani diploidlerle kolayca mezlelenebilirler. Bu yolla yabani türlerde bulunan iyi karakterler kültür varyetelerine kolayca aktarılabilir.

2. Anter kültürü ile elde edilen haploidlerin kromozomlarının katlanmasıyla homozigot hatlar elde edilir. Böylece daha kısa yoldan bu hatları melez azmanlığında kullanmak mümkündür.

3. Haploid bitkiler katlanmadan veya katlandıktan sonra mutasyon ve seleksiyon ıslahında kullanılabilirler. Mutasyona uğrayan ressesif genler dublikasyona uğradıklarından haploidlerin katlanmasıyla kendini gösterebilmektedirler.

4. Sitolojik çalışmalar kolay olduğundan genlerin etkisi kolayca tanımlanmakta, bu da genetik mühendisliğine kolaylık sağlamaktadır.

Patates bitkisinde partenogenesis yolu ile haploid bitki elde edilebilir. Fakat anter kültürünün partenogenesis ile haploid bitki elde etmeye göre bazı avantajları vardır. (a) Mikrosporlar çiçek içerisinde makrospordan daha elverişli durumdadırlar. Erkek organlardan daha fazla bitki elde edilebilir. (b) Bütün patates türlerinde anter kültürü ile çoğaltma söz konusu iken, ancak birkaç yabancı tür partenogenesis yolu ile çoğaltılabilir. (c) Anter kültürü ile çoğaltılan bitkilerde kromozom kendiliğinden katlandığından, tamamen homozigot diploid ve tetraploid fideler elde edilebilir (Wenzel ve Uhrig, 1981).

Anter kültürü pratik olarak dayanıklılık ıslahında kullanılır. Anter kültüründeki başarı kültür materyali olan bitkinin genotipi, kültüre alma zamanında polen tanelerinin gelişme devresi ve in vitro ortamındaki kültürel ve fiziksel şartlara bağlı olarak değişir (Wang ve Hu, 1985).

**Genetik Faktörler :** Anter kültürüne karşı genotiplerin gösterdiği tepkiler farklıdır. Bu farklılıklar mikrosporların bölünmemesi ve bölünmenin farklı devrelerde meydana gelmesinden kaynaklanmaktadır (Wang ve Hu, 1985).

**Polenlerin Gelişme Devresi :** Pollen danelerinin in vitro ortamında bitki oluşturmaları, gelişme devrelerine göre değişmektedir. Anter kültürleri tek çekirdekli dönemde kültüre alındığı zaman daha iyi gelişme göstermektedir (Dunwell ve Sanderland, 1973).

**Kültür Şartları ve Besinler :** Yapılan çalışmada (Sopory, 1979) kültürün ilk 4 gününde mikrospor bölünme başlangıcında sükröz konsantrasyonunun % 6 civarında olması gerektiği, sonraki dönemlerde azaltılabileceği kaydetmektedir. Stokininin ise mutlak kültür ortamında bulunması gerektiği belirtilmektedir. Genelde MS ortamına % 10 hintcevizisi sütü, ZEA ve BA ilave edilmektedir (Wang ve Hu, 1985). Yine kültür ortamında sıcaklığın 25 °C, fotoperiyodun 12-16 saat ve ışığın ise 2-4 kilolüks olması halinde anter kültüründe başarı artmaktadır (Wang ve Hu, 1985).

#### **Anter Kültürünün Pratik Olarak Uygulanması**

Çiçek tomurcuğu, tarla şartlarında 10 kilolüks ışıktaki 16 saat fotoperiyotta tutulmaktadır. Tomurcuk 1.5-3.0 mm uzunluğunda ve açık yeşil renkte olduğu zaman mikrospor tek çekirdek ihtiva etmektedir. Bu dönemde alınan tomurcuk kültür ortamına konmadan önce % 3-9'luk kalsiyum klorid, % 1'lik sodyum klorid, % 0.1'lik çinko klorid karışımı içerisinde 10-30 dakika tutulur. Sonra sterilize edilmiş

distile su ile yıkanır. Anterler kesilerek çapı 4-6 cm olan petri kaplarına konur. Petri kaplarında MS tuzlarına ilaveten % 6 sükröz, % 0.5 aktive edilmiş kömür,  $6 \times 10^{-6}$  M IAA,  $4 \times 10^{-6}$  M BA ve % 0.5-1.0 oranında agar bulunur (Sopory, 1979). Sıcaklık 25 °C'ye, fotoperiyot 16 saate, ışık 2-4 kilolükse ayarlanır (Wang ve Hu, 1985). Bu ortamda 3-12 hafta sonra kallus veya embriyo oluşur. Bunların iyi gelişmesi için taze kültür ortamına aktarılır. Kallus kültüründe belirtilen yöntemlerle fide yetiştirilir.

### **Embriyo Kültürü**

Tozlanıp döllenme olayı gerçekleştikten sonra meydana gelen embriyonun aseptik şartlar altında elverişli besin ortamına transfer edilerek tam bir bitki elde edilmesidir (Marks, 1973). Normal embriyonun meydana geldiği türler arasındaki melezlemede, embriyo ile onun çevresindeki doku arasındaki uyumsuzluk olduğunda, embriyoyu kurtarmak için embriyo kültürüne başvurulur. Ayrıca ıslah programlarında ıslah süresini kısaltmak için ve embriyoların gelişmesi üzerine çevre şartlarının etkisini belirlemek amacıyla embriyo kültüründen yararlanılır.

Patateste olgunlaşmamış embriyonun in vitro ortamında geliştirilmesi, uzak çaprazlamalardan embriyonun kurtarılmasına mücadele etmektedir (Speck ve ark. 1987). Patates ıslahında yabancı türlerde mevcut olan bazı iyi karakterlerin bu yolla kültür bitkisine dahil edilmesi mümkündür.

### **Protoplast Kültürü**

Protoplast kültürü, mutasyon ıslahı, somatik melezleme ve genetik manipülasyonlar için büyük bir potansiyele sahiptir. Protoplast kültürü protoplast izolasyonu ve protoplast fizyonu olmak üzere iki esasta incelenmektedir.

### **Protoplast İzolasyonu**

Bitki materyali olarak, saksıda yetiştirilen bitkinin yaprakları veya kültüre alınmış (sürgün kültürünün yaprakları, kültüre alınmış sürgünler ve süspanse edilmiş hücreler) materyal kullanılabilir.

Protoplast kaynağı olarak kullanılacak bitkinin, protoplast izolasyonundan 4-10 gün önce 6 saatlik fotoperiyotta ve 7 kilolüks ışık intersitesinde tutulması gerekir. Genelde kültüre alınmış hücreler protoplast izolasyonu için daha uygundur.

### **Protoplast İzolasyonu ve Sıfırlama**

Protoplastlar solüsyon içerisinde bulunan enzimler (selülozaze, hemiselülozaze, pektinaze grubu enzimler) hücre duvarlarını parçalamaları neticesinde izole edilir.

Ortamin ozmatik dengesini sağlamak için kültür ortamında sorbitol, monnitol, glikoz ve sükroz gibi maddeler bulunmalıdır (Vasil, 1976). İzole edilmiş kültürün stabilitesini devam ettirebilmek için ortama kalsiyum klorid ilave edilir. Protoplast izolasyonu için gerekli süre 25-30 °C'de 4 saattir. Hücre duvarı parçalandıktan sonra santrifüjle saflaştırma işlemi yapılır (Binding ve ark., 1978). Protoplast karışımı 40-100 qm porlu filtreden geçirilir. Filtre üzerinde vasküler dokular, hücre yığınları ve parçalanmış hücreler tutulur. Ayrıca protoplast ve hücre fragmentleri alınır. Sükroz ve sorbitol ile kombine edilir ve 350 d/d hızla 3-10 dakika santrifüje tabi tutulur. Sükroz protoplastın bozulmasına mani olur.

**Protoplastın Çoğaltılması :** Saflaştırılmış protoplast sıvı kültür ortamına konur ve kültür ortamında hücre duvarları oluşur. Sonra katı kültür ortamına aktarılır. Kültür yoğunluğu  $4 \times 10^4$  protoplast/ml olmalıdır. Ayrıca ortamda ozmatik denge sağlayıcılar bulunmalıdır. Kültür ortamı kallus hücre kültürü gibidir. Membran stabilitesini artırmak için kalsiyum konsantrasyonu 2-4 katına çıkarılır. Protoplast ortamında auxin ve stokinin gereklidir. Bu ortamda hücre bölünmesi başlar (Wang ve Ha, 1985; Li ve Cambolat, 1992). Devamlı hücre bölünmesini takiben 1-3 hafta içerisinde hücre yığını meydana gelir (Vasil, 1976). Yığından sonra farklılaşma ve morfolojenesis yolu ile kök ve sürgün oluşur.

Protoplast klonları arasında büyük oranda varyasyonlar meydana gelebilmektedir. Varyasyonların çoğu oktoploidi, aneuploidi, mixoploidi gibi kromozomal katlanma ile oluşur. Protoplast izolasyonu ile yeni varyeteler elde edilebilir.

### **Protoplast Fizyonu (Somatik Melezleme)**

Protoplast kültürü ile normal olarak eşeyssel yolla elde edilmesi mümkün olmayan somatik melezleme yapılabilmektedir (Hess, 1975).

Somatik melezleme patates bitkisinde problem yaratmasına rağmen, *S. chacoense* ile kültür varyeteleri (Butenko ve Kochko, 1979) ve diploidi patates ile *S. nigrum* (Binding ve ark., 1982) arasında başarı ile gerçekleştirilmiştir.

Somatik melezleme bir genotipin stoplazmasının diğer bir genotipin çekirdeğine transferi şeklinde gerçekleşmektedir. Bu teknik stoplazmik karakterlerin transferi için fayda sağlamıştır. Bu yolla tütüne stoplazmik erkek kısırılığı aktarılmıştır (Espinoza ve ark., 1984). Aynı şekilde patates bitkisine de erkek kısırılığının aktarılabilceği ümit edilmektedir. Bu da kastre etmeden ana bitkiler kullanılarak hibrit tohum üretimine imkan sağlamaktadır.

## KAYNAKLAR

- Alsadon, A.A., K.W. Knutson and J.C. Wilkinson, 1988. Relationships between microtuber and minituber production and yield characteristics of six potato cultivar. *Am. Potato J.* 65 : 468 (Abst).
- Bajaj, Y.P.S., 1979. Technology and prospects of cryopreservation of germplasm. *Euphytica* 28 : 270-285.
- Binding, H., R.Nehls, O. Schieder, S.K. Sopory and G. Wenzel 1978. Regeneration of mesophyll protoplast isolated from dihaploid clones of *Solanum tuberosum*. *Physi. Plant* 43 : 5254.
- Binding, H., S.M. Jain, J. Finger, G. Mordhorst, R. Nehls and J. Gressel, 1982. Somatic hybridization of an arazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 63 : 273-277.
- Boks, J.A., 1990. Tohumluk Patates Üretimi ve Patates Virüs Hastalıkları. (Çev. Sehnaz Ternar), Matbaa Teknisyenleri Basımevi, Çağaloğlu, İstanbul, s. 190-201.
- Butenko, R.G. and A.A. Kuchko, 1979. Somatic hybridization of *Solanum tuberosum* L. and *Solanum characoense* Bitt. by protoplast fusion. In "Advances in Protoplast Research" pp. 293-300. Hung. Acad Sci., Budapest.
- Doods, J.H., 1988. Tissue culture technology : Practical application of sophisticated methods. *Am. Potato J* 65 : 165-178.
- Doods, J.H. and R. Lizararga, 1988. Use of tissue culture techniques for germplasm conservation at the international Potato Center. *Am. Potato J* 65 : 477-478. (Abst).
- Dunwell, J.M. and N. Sonderland, 1973. Anther culture of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica* 22 : 317-323.
- Er, C. ve N. Canbolat, 1992. Bitki Islahında Doku Kültürleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Yayın Dairesi Başkanlığı Matbaası, Ankara.
- Espinoza, N.O., R. Estrada, P. Tovar, J.E. Bryan and J. Doods 1984. Tissue culture micropropagation, conservation and export of potato germplasm. *Specialized Technology Document CIP*, Lima.
- Evans, D.A. and S.M. Reed 1981. Cytogenetics Techniques. "Plant Tissue Culture" (Ed. T.A.b Thorpe). Acad. Pres. New York. pp. 213-240.
- Gönülşen, N., 1987. Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araş. Enst. Müd. Yay. No : 78, Menemen, İzmir.

- Handro, W., 1981. Mutagenesis and in vitro selection. "Plant Tissue Culture" (Ed. T.A. Thorpe) Acad. Press. New York pp. 155-180.
- Helene, V. and M. Cappadocia, 1990. Anther culture in two clones of *Solanum chacoense* Bitt. and Some of their reciprocal hybrids. *Am. Potato J* 67 : 584 (Abst).
- Hess, D., 1975. Genetic manipulations with higher plants. *Plant Research and Development* 2 : 56-66.
- Jones, E.D., 1988. A current assessment of in vitro culture and other rapid multiplication methods in North America and Europe. *Am. Potato* 1 65 : 209-220.
- Kartha, K.K., 1981. Meristem culture and cryopreservation methods and applications. *Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture* . (Ed. T.A. Thorpe) Acad Press, New York. pp. 181-212.
- Kwiatkowski, S., M.W. Martin, C.R. Brown and C.J. Sluis, 1988. Serial microtuber formation as a long term conservation method for in vitro potato germplasm. *Am. Potato J* 65 : 369-374.
- Macit, F., 1972. Doku kültürleri ve bitki ıslahı, "Bitki ıslahı semineri" Türkiye Ziraî Araştırmacılar Derneği Yay. no : 1, İzmir, s. 175-206.
- Marks, G.E., 1973. Selecting asparagus plants as sources of haploids. *Euphytica* 22 : 310-316.
- Mellor, F.C. and R.S. Smith, 1977. Virus-free potatoes by tissue culture. In *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Structure*. (J. Reinert and Y.P.S. Bajaj, Eds) Springer-Verlag, Berlin. pp. 616-637.
- Ortiz, G.M. and H.L. Saldana, 1987. Potato minitubers : Technology validation in Mexico. *Am. Potato J* 64 : 535-544.
- Sipos, J., J. Nowak, G. Hicks, 1988. Effect of Danimozide on survival growth and yield of micropropagated potatoes. *Am. Potato J* 65 : 353-363.
- Slimmon, T., V.S. Mochoda and R. Coffir, 1989. The effect on in vitro microtuberization of potato cultivars. *Am. Potato J* 66 : 843-844.
- Sopory, S.K., 1979. Effect of sucrose, hormones, and metabolic inhibitors on the development of pollen embrioids in anther cultures of dihaploid *Solanum tuberosum*. *Canadian J. of Botany* 57 : 2691-2694.
- Speck, V., L. Schilde-Rentschler and P.E. Schmiediche, 1987. Embriyo culture eliminates crossability barriers in the section potato of the genus *Solanum*. *Euphytica*.

- Vasil, I.K., 1976. The progress. Proplems and prospects of plant protoplast research. *Advances in Agronomy* 28 : 160-199.
- Wang, P. and C. Hu, 1982. In vitro mass tuberization and virus-free seed potato production in Taiwan. *Am Potato J* 59 : 33-37.
- Wang, P. and C. Hu, 1985. Potato Tissue Culture and Its Applications in Agriculture. (*Potato Phyiology*, ed. Li. P.H) pp. 504-564.
- Wattimena, G., B. McCown and G. Weis, 1983. Comparative field performance of potatoes from microculture. *Am. Potato J* 60 : 27-33.
- Wenzel, G. and H. Uhrig, 1981. Breeding for nemotode and virus resistance in potato via anther culture. *Thear Appl. Genet.* 59 : 333-340.
- Westcott, R.J., 1981. Tissue culture storage of potato germplasm. 1. Minimal growth storage. *Potato Res.* 24 : 331-342.
- Westcott, R.J., G.G. Henshow and V.M. Roca, 1977. Tissue culture storage of potato germplasm : Culture initiation and plant regeneration. *Plant Science Letters.* 9: 309-315.
- Wright, N.S., 1988. Assembly quality control and use of a potato cultivar collection rendered virus-free by heat therapy and tissue culture. *Am. Potato J* 65 : 181-197.