

KİMERA; DOKU KÜLTÜRÜNDEKİ UYGULAMALARI VE BİTKİ ISLAHINDAKİ KULLANIMI

Nesrin ÖRÇEN*

ÖZET

Birden fazla genotipe sahip hücrenin veya dokunun bir arada canlılıklarını devam ettirebilmeleri durumu kimera olarak tanımlanmaktadır. Kimeralar fizyolojik, histolojik, biyoteknolojik, genotipik ve anatomik araştırmalar için uygun çalışma materyalleri oluşturmaktadırlar. Kimeralı bitkilerin sınıflandırmaları; mutasyonun yeri ve apikal meristemde mutasyona uğrayan hücrelerin mutasyona uğramayan hücrelere oranları temel alınarak yapılmaktadır. Kimeralar; periklinal, meriklinal ve sektöriyel kimeralar olarak sınıflandırılırlar. Periklinal kimeralar daha stabil olduklarından ve vejetatif olarak çoğaltılabildiklerinden en önemli kategoriye oluşturmaktadırlar. Bu çalışmada; kimeralı yapıların oluşumu, kimeraların kategorileri, devam ettirilebilmeleri hususunda genel prensipler ve in vitro tekniklerin tartışılması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: doku kültürü, kimera

CHIMERA; TISSUE CULTURE APPLICATIONS AND ITS USAGE IN PLANT BREEDING

ABSTRACT

It is said to be a chimera when cells or tissue of more than one genotype are found growing adjacent together in that plant. Chimeras are the useful study tools for physiological, histological, biotechnological, genotypical, anatomical researches. Chimeral plants are be categorized on the basis of the location and relative proportion of mutated to non mutated cells in the apical meristem. Chimeras are being classified periclinal, mericlinal, sectorial chimeras. Periclinal chimeras are the most important category since they are relatively stable and can be vegetatively propagated. The aim of this study was argue that occurrence chimera construction, categorize of chimeras, basic principle at maintenance of chimera and in vitro techniques.

Key Words: tissue cultures, chimera

1.GİRİŞ

Normal bir bitki organizmasının bütün hücreleri aynı genotipik yapıya sahiptir. Ancak gen, bulunduğu yere göre yani bulunduğu dokuya göre okunur ya da çalışır. Kimeralı bitkilerde hücrelerin sahip olduğu genotipik yapı birbirlerinden farklı olmaktadır. Farklılık, bulunan genin okunup okunmaması veya okunma sıklığı ile ilgili değil bu genin olması veya olmaması ile ilgili olmaktadır. Genetik olarak değişik iki ya da daha fazla tipte dokudan oluşan bitkiler kimeralıdır (George, 1993). Bir bitkinin bir dokusunda beraber büyüeyebilen birden fazla genotipe sahip hücrelerin bulunması o bitkinin kimeralı olması anlamına gelir (Lineberg, 2007). Genotipleri farklı bu doku (hücre) tipleri buldukları yere uyma ve integre olabilme kapasitesindedirler. Ana hücre tipinde olmayan hücre tipleri mozaik şeklinde bitkinin her tarafına dağınık bir şekilde yayılabildiği durumlarda bir kimera saptanması zordur ve ana hücre

karyotipinin istikrarlı olmaması durumuyla oluşması muhtemeldir. Mutasyonlar veya kimeraya sebep etmenler genellikle düşük frekanslarda oluşur. Genotipi değişmiş hücreler, farklı meristem parçası, farklı vejetatif doku, tohum ya da polen oluşumuna sebep olmadığı sürece fark edilmeyebilirler (George, 1993).

Kimera'nın ilk olarak tanımı 17. yüzyılın sonlarında portakal üzerinde yapılmıştır. Winkler (1907) köpek üzümü (*Solanum nigrum*) ve domates (*Lycopersicon esculentum*) arasında oluşturdukları kimeralı kalluslardan adventif sürgünler geliştirmişlerdir. Daha sonra bu çalışmalar Solanaceae familyasına ait türler üzerinde yoğunlaşmıştır (Jorgensen, 1927; Neilson-Jones, 1969; Clayberg, 1975; Marcotrigiano ve Guin, 1984; Marcotrigiano, 1986).

1950' li yıllarda kolhisin kullanılarak bitkilerde sitokimeralar (kromozom sayısı katlanmış ve katlanmamış hücreler veya farklı

* Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, İzmir

* Sorumlu Yazar: nesrin.orcen@ege.edu.tr

ploidi seviyesindeki hücreler içeren doku, organ veya bitkiler) elde edilmiştir (Elliott, 1958). Bitki anatomisi çalışmalarında önemli bir payı olmasına rağmen sitokimeralar, plastit periklinal kimeralara oranla, in vitro da pek az çalışmada araç olarak kullanılmışlardır. Plastit periklinal kimeralar süs bitkilerinde farklı renklerde çiçekler ve yaprakların üretilip kullanılmasından dolayı ticari bir boyuta sahiptirler (Ardian, 1997). Plastidlerdeki spontan mutasyonlarla oluşan alaca yapraklı kimeralar çok sıklıkla görülen kimeralardandır. Kimeralarda alacalık izlenmesi çok kolay olan bir özelliktir. Ancak bütün özelliklerin kimeralısı olabilmektedir. Diğer sık görülen epidermal değişikliklerle oluşan ve rahatça izlenebilen kimeralara örnek olarak böğürtlende dikensizlik, şeftalide tüsüzlük ve karanfil ve krizantemde çeşitli petal ya da çiçek renklerindeki değişiklikler verilebilir.

Tilney-Bassett (1963) kimeral bitkilerin oluşumunun; yaralanmalar (aşılar bu guruba sokulabilir), doğal mutasyonlar, yapay mutasyonlar (antimitotikler bu guruba dâhil edilebilirler), kallus kültürleri, protoplast füzyonları ile olduğunu belirtmişlerdir. Burge ve ark. (2002)' da sentetik kimeraların in vitroda oluşma sebeplerini sünger doku kültürü (Carlson ve Chaleff, 1974), kallus kültürü karışımı (Marcotrigiano ve Gouin, 1984a), protoplast kültürü (Binding ve ark., 1987) ve in vitro aşılama metodu (Hirata ve ark., 1990; Noguchi ve ark., 1992) olarak bildirmişlerdir.

Genel anlamda kimeralar fizyolojik, histolojik, anatomik, genotipik, biyoteknolojik çalışmalar için çok kullanışlı araçlardır. Kimeralar; bitki organ ve doku ontogenetiğinin belirlendiği (Szymkowiak ve Sussex, 1996), transkripsiyonel faktörlerin hücreden hücreye aktarılıp aktarılmadıkları ve aktif kalıp kalmadıkları (Hake, 2001) farklı doku ve hücreler oluşurken hücreler arasında interaksiyonun nasıl olduğu (Hirata ve ark., 2001), gen ürünlerinin faaliyetlerinin bağımsız olup olmadığı (Szymkowiak ve Sussex, 1996) çalışmalar için iyi bir araçtır.

Bu çalışmada, gelecekte standart bir ıslah tekniği haline gelebilecek kimernın tanımı, sınıflandırılması, kimeralı bitkilerin oluşturulması ve çoğaltılması konusu açıklanmaya, aynı zamanda kimera tekniği ki; bu türler arası kullanılabilen ve birçok familya yayılmaya ihtiyacı olan bir teknik, kullanılarak yapılan in vitro çalışmalar derlenmeye çalışılmıştır.

2. APİKAL ORGANİZASYON

Kimeranın açıklanmasında apikal organizasyonun bilinmesine ihtiyaç vardır. **Tunika-korpus kuramı**'na göre; apikal uçta yapı ve görünüşü birbirine benzemeyen iki bölge ayırt edilir. Orta kısma korpus, dış kısma tunika denir. Korpusta hücreler geniş ve düzensiz dizilir, tunikada hücreler daha küçük, tek ya da az tabakalı olabilmektedir. (Yentür, 1995). Dikotiledonların çoğunda tunika ve korpus bölgeleri apikal organizasyonda söz konusudur. Tunika meristemin üst yüzey hücrelerinin oluşumuna, korpus ise meristemin hacim olarak büyümesine yardımcı olur. En genç yaprak primordiumu üzerindeki meristematik bölge de bulunan bu iki hücre katmanı, birbirlerinden hücre bölünme paternleri açısından farklılıklar gösteren içerir. Dış katmanlardaki (tunika) hücreler bölünme sırasında antiklinal oryantasyon gösterir. Hücre tablası meristem katmanına dik olarak şekillenir, böylece tunika katmanı kendini devam ettirir. Tunikada periklinal bölünme sebebiyle, katmanların genotipi ya da histogenler genellikle istikrarlı yapıda olmasına rağmen, seyrek olarak da olsa genotipik şekilleri değişebilir. İç kısım ya da korpus, tunika (dış kısım) gibi katmanlara ayrılmamış, antiklinal ve periklinal bölünmelerin her ikisinde görülebilmektedir.

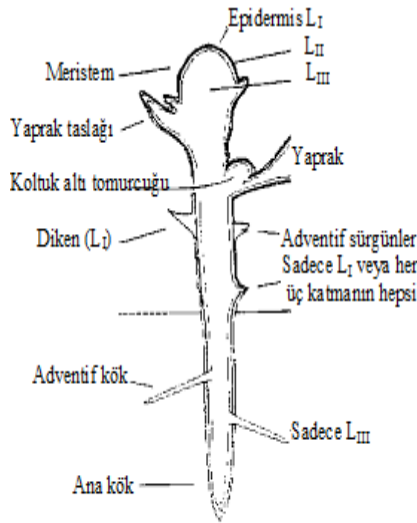
2.1. Bitki Dokularının Orijini

Bitkinin apikal meristemindeki hızlı bölünen hücreler, üst üste bulunan katman ya da katmanlardan (histogenden) (L_I, L_{II}, L_{III}) oluşmaktadır. Her katman bitkinin farklı dokularına orijin hücre görevi yaparak, farklı dokuları oluşturduğu konusunda bazı genellemeler yapılabilmektedir. Katmanlardaki farklı genotiplilik, oluşturacağı dokuda farklı genotipliliğe sebep olabilmektedir.

Apikal meristemdeki hızlı bölünen hücrelerden en dış katman olan L_I katmanı; yaprak, gövde, çiçek petalleri ve benzeri yapıların en dış katmanı olan epidermisi oluşturmaktadır (Şekil 1). Ondan sonraki katman olan L_{II} katmanı; gövdenin birkaç katmanının, yaprak ayasındaki hücrelerin büyük oranının ve üreme organlarının orijin katmanıdır. En dıştan üçüncü sırada olan katman olan L_{III} ise; gövdenin iç dokularının, yaprak damarların etrafındaki hücrelerin ve adventif köklerin oluşumuna katılan yeni hücrelerin kaynak katmanıdır (George, 1993).

Ploidi değişikliği, mutant plastitler, dikensizlik gibi izlenebilen kimeral

değişiklikler, oluştukları orijin hücrelerin tanınmasında marker olarak iyi iş görebilmektedirler. Sitokimera (kromozom sayısı katlanmış ve katlanmamış hücreleri içeren doku) çalışmaları, çeşitli doku ve organların ontogenetik orijinlerinin gösterilmesinde çok faydalı materyaller oluşturabilmektedirler. Türler bağli bazı farklılıklar olmasına rağmen, sitokimera çalışmalarından yaprak, gövde, çiçek organları ve köklerin hangi hücre katmanından meydana geldiğine dair birkaç genelleme yapılabilmektedir.



Şekil 1. Tipik bir dikotiledon bitkisinin hücre katmanları ve bunlardaki organlar. George (1993)'den alınmıştır.

3.KİMERALARIN SINIFLANDIRILMASI

Kimeralar birkaç değişik şekilde sınıflandırılabilirler. Orijinlerine göre (doğal mutasyon; kimyasal mutagenler ve kolhisin uygulamalarıyla; aşı ile oluşan kimeralar), davranışlarına göre (kromozomal kimeralar, nükleer gen-differansiyel ya da plastit gen-differansiyel kimeralar), ya da yapılarına göre (periklinal, meriklinal ve sektöriyel) olarak sınıflandırıldıkları belirtilmektedir (Canlı, 2003). Bu son sınıflandırma şekli olan yapılarına göre gruplandırma şekli, aynı zamanda kimeraların karakterize edilmesinde kullanılmaktadır.

Kimeralar periklinal, meriklinal ve sektöriyel kimeralar olarak karakterize edilirler. Mutasyonun lokalizasyonu ve apikal meristemde mutasyon olan hücrenin mutasyona uğramayan hücrelere oranları temel alınarak kimeranın karakterizasyonu yapılmaktadır.

3.1.Periklinal Kimeralar

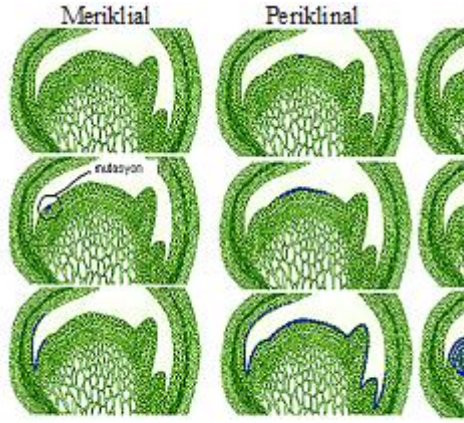
Bu kategoriye giren kimeralar, oransal olarak daha stabilize ve vegetatif olarak çoğaltılabildiklerinden, en önemli kategoriye oluşturmaktadırlar. Apikal uca yakın bölgede bir mutasyon olması periklinal kimeraların oluşumuna sebep olmaktadır. Apikal uçta mutasyona uğrayan hücrelerin bölünme hızlarının fazla olması sebebiyle, mutasyona uğramış hücreler bir katman haline gelebilmektedirler (Şekil 2). Örneğin, mutasyon L_1 de meydana gelmiş ise, oluşan sürgünün epidermal katmanı, yeni genetik tipe sahip olmaktadır. Periklinal L_1 kimeralara en iyi örnek dikensiz böğürtlendir. Bu tipin epidermal katmanı diken üretmemektedir. Modifiye epidermal hücreler "prickless" olarak isimlendirilmektedir. Dikensiz epidermis hücre sırası bütün gövdeyi kaplamaktadır. Bu hücreler dikensizlik genotipi içermektedir. Bunun periklinal kimera olup olmadığının anlaşılması için kökler kesilerek, köklerden adventif sürgünlerin oluşması sağlanmaktadır. Oluşan adventif kökler L_1 katmanından meydana gelmediğinden, bunlardan elde edilen bitkiler kimeralı olmamakta, oluşan adventif sürgünlerde dikenlilik özelliği gözlenmektedir (Lineberg 2007).

3.2.Meriklinal Kimeralar

Bu kimeralar mutasyonlu hücreler apikal tepeyi tamamıyla kaplamadığı durumda oluşturmaktadırlar. Mutant hücre katmanı meristemin belli bir oranında kalmaktadır. Oluşan kimeralı sürgün ya da yaprak, sadece mutasyonlu katmanı taşıyan oranda, normal genotipten farklılık göstermektedir. Diğer geri kalan kısım orijinal genotipe sahip meristemlerdir. Pek çok meriklinal kimera böyle sınırlanmış hücrelerden oluşmaktadır. Sadece bir yaprağın belli bir kısmı etkilenmiş olabilmektedir. Meriklinal ve periklinal kimeralar genellikle bir katman hücreden oluşturmaktadırlar (Şekil 2).

3.3.Sektöriyel Kimeralar

Bu kategorideki kimeralarda apikal meristemin bir dilimi mutasyona uğramıştır. Değişime uğramış genotip bütün hücre katmanları boyunca devam etmektedir. Bu kimeralar istikrarlı değildirler ve oluşan sürgün ve yapraklar kimeralı olmamaktadır. Her iki tipte normal ve mutasyonlu tipler sürgünlerin oluştuğu noktaya bağlı olarak oluşabilmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Kimera kategorileri ve meydana gelme şekilleri alınmıştır.

4.KİMERALI BİTKİLERİN OLUŞMA SEBEPLERİ

Tilney-Bassett (1963) kimeral bitkilerin oluşumunun; yaralanmalar (aşılar bu guruba sokulabilir), doğal mutasyonlar, yapay mutasyonlar (antimitotikler bu guruba dâhil edilebilirler), kallus kültürleri, protoplast füzyonları ile olduğunu belirtmişlerdir. Burge ve ark.(2002)' da sentetik kimeraların in vitroda oluşma sebeplerini sünger doku kültürü (Carlson ve Chaleff, 1974), kallus kültürü karışımı (Marcotrigiano ve Gouin, 1984a), protoplast kültürü (Binding ve ark., 1987) ve in vitro aşılama metodu (Hirata ve ark., 1990; Noguchi ve. ark., 1992) olarak bildirmişlerdir.

5.KİMERALI BİTKİLERİN ÜRETİLMESİ (ÇOĞALTILMASI)

Meriklinal ve sektöriyel kimeralar doğaları gereği istikrarlı olmayıp; oluşan doku veya organın aynı genotipi gösterme olasılıkları çok düşüktür. Periklinal kimeralar nispi olarak daha istikrarlı yapı göstermektedirler ve ticari olarak çok sık kullanılabilirlerdir.

Periklinal kimeraların üretilebilmeleri aşılama uygun olarak yapılan çoğaltım ile mümkündür. Diğer bir deyişle, dikensiz böğürtlen örneğinde olduğu gibi, oluşan yan tomurcuk meristem hücre katmanlarının, apikal meristemdeki hücre katmanlarıyla, aynı olmasıyla sağlanmaktadır. Eğer köklerden eksplant alınıp üretilirse dikensizlik özelliği kaybolmaktadır (McPheeters ve Skirvin, 1983). Apikal meristemdeki hücre katman motifli oluşacak koltuk altı meristeminin karakteristiğini ortaya koymaktadır.

Gerçek tipin üretilebilmesi yan tomurcuklara uygulanabilen tekniklere bağlı

olmaktadır. Periklinal kimeralı bitkilerde apikal meristemin katmansal organizasyonu yan meristemlerde de devam etmektedir. Fakat adventif sürgün farklılaşmasında bu genellikle kaybolmaktadır (Lineberger, 2007).

5.1.Kimeraların Çoğaltılmasında Sürgün Orijininin Etkisi

Yan tomurcukta bulunan üç hücre katmanı aynı apikal tomurcukta olduğu gibidir. Adventif tomurcuklar kendi oluştukları apikal meristemden farklı hücre katmanlarına sahiptirler. Böyle olduğu için periklinal kimeralar ancak koltuk altı tomurcuğundan vegetatif olarak üretilebilmektedirler. Adventif sürgünlerden yapılan konvansiyonel üretim metodu kimeralı hücre katmanlarının değişmesine neden olmaktadır. Bir bitkinin köklerinden elde edilen bitkiler ile gövdeden elde edilen bitkiler eğer birbirinden farklı ise; bu bitkinin kimeralı olduğu söylenebilir. Gövdeden meydana gelen adventif sürgünler sadece L_I veya her üç katmandan oluşurken, kökten meydana gelen adventif kökler sadece L_{III} katmanından oluşmaktadır. Geier ve Sangwan (1996) da, oluşan adventif sürgünün sadece L_I den meydana geldiğini belirtmiştir.

Stewart ve Dermen (1970) yaptıkları çalışmada; 16 krizantem çeşidinin bütün koltuk altı tomurcukları alındıktan sonra adventif olarak oluşturulan sürgünlerin (12 tane) periklinal olduklarını, oluşan sürgünlerin birkaçının en azından iki histogenden meydana geldiğini ve bunların da periklinal olduğunu bildirmişlerdir. Broertjes ve Keen (1980) çalışmalarında adventif sürgünlerin tek hücre veya iki hücre katmanından orijinlendiğinin belirtilmesine karşılık; Arisumi ve Frazier (1968) tarafından yapılan çalışmada adventif sürgünlerin her üç katmandan oluştuğu vurgulanmıştır.

Burk (1975), sitokimeralı veya plastitleri bakımından kimeralı bütün yapraklarından oluşturdukları sürgünlerin kimeralı olmadığını, oluşan adventif sürgünün tek hücre ya da L_{II} ve L_{III} katmanlarının küçük bir bölümünün katılımı ile oluştuklarını belirtmişlerdir.

6.KİMERANIN DOKU KÜLTÜRLERİNDEKİ UYGULAMALARI

Sentetik kimeralar in vitro teknikler kullanılarak oluşturulmaktadır. Bu sentetik kimeralar sünger dokuların ko-kültürü (Carlson ve Chaleff, 1974), kallus kültürlerini birleştirme (Marcotrigiano ve Gouin, 1984a), protoplastların kültürü (Binding ve ark., 1987) ve in vitro aşılama metodları (Hirata ve ark.,

1990; Noguchi ve ark., 1992) şeklinde olan çalışmalardır.

Carlson ve Chaleff, (1974) iki farklı tütün türüne ait sünger doku parçacıklarını birbirlerine temas edecek şekilde kültüre alarak bu bölgeden elde edilen kalusların her iki ayrı türün özelliğini gösterdiğini bildirmiştir. Daha sonra bu kaluslar sürgün verecek uygun ortamlarda sürgün oluşturmaya zorlanmışlardır. Oluşan sürgünler içinde kimeralı sürgünlere de rastlanmıştır.

Marcotrigiano ve Gouin (1984a) sentetik kimera elde etmek için kallus ve kallus süspansiyonu kullanmışlardır. Yeşil ve albino *Nicotiana tabacum* kallus dokusundan yararlanılan çalışmada; oluşan sürgünlerde en etkili genotipik karışma, karışık filitre edilmiş hücre (kallus) süspansiyondan elde edilmiştir.

Binding ve ark. (1987) *Solanum nigrum* ve *Solanum tuberosum* heterospesifik kimeralar hücre aşılama yöntemiyle protoplast kokültürlerinden elde edilmiştir. Periklinal, meriklinal, ve sektöriyel kimeralar çeşitli morfolojik ve sitolojik karakterler yardımıyla tanımlanmıştır. Morfogenezis çoğunlukla periklinal kimeralarda oluşmuştur.

Abu-Qaoud ve ark. (1990) yaptıkları çalışmalarında; adventif sürgün rejenerasyon sistemini kimeralı armudu (*Pyrus communis*) komponentlerine ayırmak için kullanılmışlardır. "Louise Bonne Panachée" alacalı tip ve kırmızı meyveli mutant "Red Hardy" in yaprakları değişik seviyelerde TDZ (thidiazuron) ve NAA içeren rejenerasyon ortamına yerleştirilerek, kimeral durumları iki ay sonra değerlendirilmiştir. Alacalı tipte rejeneren olanların %100'ü açılım göstermiştir. Sürgünler genellikle yeşil bunların yanında birkaç tanesi albino özellik göstermiştir. Red Hardy'den rejeneren olan rejenerantların %20-33'ü yeşil geriye kalanlar kırmızı renkte olmuşlardır. Kırmızı ve yeşil rejenerantların stabilitesi besin ortamındaki farklı şeker seviyelerinde ve total antosiyanin ölçümleri ile değerlendirilmiştir.

Hirata ve ark. (1990) araştırmalarında "Yoshin kanran" (yeşil renkli) ve "Murasaki kanran" (mor renkli) lahanası (*Brassica oleracea* L) arasında kimeralı bitkiler oluşturmuşlardır. Kimerik dokularda antosiyanin pigmentasyonunu gözlemek amacıyla, kimerik bitkilerde (V_0 , V_1) genotipik yapı, kimeralı bitkilerin her kapsülünden elde edilen döllerinde ve geri melezlerde antosiyanin pigmentasyonunun açılım şekline bakılarak analiz edilmiştir. İki V_0 kimerik bitkinin

döllerinin çoğunda ve onlardan vegetatif çoğaltılan V_1 bitkilerinde de bitki renginde açılım olmamıştır. Bununla beraber, "Murasaki kanran" ile melezlenen bir V_0 kimerik bitki ve bir V_1 kimeralı bitkinin iki kapsülünden elde edilen döllerde açılım gözlenmiştir.

Li (2005) Sardunyada L_I , L_{II} , L_{III} ' te plastit mutasyonlarıyla GWG (green-white-green (beyaz-yeşil-beyaz)), GGW (green-green-white) olarak farklı renklerde kimeralı sürgünler üretilmiştir. Sürgün oluşumu sırasında meristem katmanları arasındaki ilişkileri çözmede ve mutant genlerin sürgün oluşumuna etkilerinde kimeralar kullanılmıştır. Sardunyanın "Mrs Pollock" çeşidinin GGW ve GWG kimeralarının petiol ve internodlarından doku kültürü yoluyla GGG, GWG, GGW, WWW katmanlarını içeren kombinasyonlarda adventif sürgünler elde etmişlerdir.

Chen ve ark. (2006) hardal ve kırmızılâhana arasında in vitro aşılama yaparak türler arası kimeralar elde edilmiştir. Aşılama öncesi 6 günlük fideler dikey olarak kesilmiş ve farklı 6-BA ve NAA konsantrasyonlarıyla 1 dakika süresince muamele edil dikten sonra birbirleriyle birleştirilmişlerdir. Birleştirilmiş sürgün uçlarından sektöriyel kimeralar üretilmiştir. Muamelelerden sonra, % 6.33 kimeralı tomurcuklar elde edilmiştir. Sektöriyel kimeralar 1 mg/L BA içeren MS te çoğaltılarak periklinal ve meriklinal kimeralar geliştirilmiştir. Zhu ve ark. (2007) sentetik olarak sentez edilen TCC (T = Tuber mustard, C = Red cabbage) kimeralı bitkiden nodal segment ve yaprak explantı kullanılarak farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ile adventif sürgün oluşumu teşvik edilmiştir. Oluşan sürgünlerin orijini histolojik yöntemlerle ve moleküler markörler yardımıyla belirlenmiştir. Nodal bölgede oluşan adventif sürgünlerin sayısına BA konsantrasyonunun etkisi görülmemiştir. Fakat nodal segmentten oluşan adventif sürgün sayısına BA konsantrasyonunun etkisi önemli bulunmuştur. Nod bölgesinden oluşan adventif sürgünlerin çoğu TTT olmuş iken, sadece dördü kimerik olmuştur. Nodal segmentte oluşan adventif sürgünler CCC tipinde oldukları görülmüştür, buda bunların L_{II} ya da L_{II} ve L_{III} 'den meydana geldiğinin bir kanıtı olarak belirtilmiştir. Yaprak disklerinden oluşan adventif sürgünlere BA konsantrasyonunun etkisi önemli bulunmamıştır. Yaprak disklerinden oluşan adventif sürgünlerin CCC tipinde olmuştur,

fakat 70 taneden 2 tanesi kimeralı olmuştur. Bu sonuçlar bu adventif sürgünlerin L_{II} ya da L_{II} ve L_{III}'den meydana geldiğini göstermiştir. Rejenerasyonla elde edilen bütün kimeralı tipler orijinal donör explant tipinden farklı olmuştur. Adventif sürgünün orijini donör bitkinin orijinine bağlı olarak değişmiştir.

Camnareri ve ark. (2002) kimerik *Aster cordifolius* bitkisinde somaklonal varyasyon oluşturmak amacıyla bir protokol geliştirmişlerdir. Kromozom sayısı bakımından kimerik ve çizgili çiçek rengi olan "White Elegans" çeşidinin yaprak eksplantlarından (yaprak ayası ve sapından), IAA, 2,4 D ve BAP içeren MS ya da Gamborg'un B5 ortamlarında, bitkiler geliştirmişlerdir. En yüksek sürgün rejenerasyonu 2,4 D ve BAP içeren B5 besin ortamında gerçekleşmiştir.

Epidermal tüylerin morfolojisi ve sıklığı L₁ katmanının yapısının anlaşılmasında önemli bir göstergedir (Neilson-Jones, 1969; Goffreda ve ark., 1990; Lindsay ve ark., 1995). Stewart ve ark. (1972) *Camellia* türleri arasında oluşturulan kimeralarda, stoma büyüklüğünü kullanılarak L₁ katmanının aydınlatılmasına çalışılmıştır.

Çiçeklerin, genellikle L₂ katmanından orijinlendikleri kabul edildiğinden, çiçek şekli ve rengi L_{II} genotipinde olmaktadır. Nouguchi ve Hirata (1994) Brassica türleri (*B. campestris* + *B. oleracea*) arasında in vitro aşılama metoduna göre oluşturulan kimeraların yan tomurcukları doku kültürüyle çoğaltılmıştır. Çiçeklenme şekli her üç hücre katmanının katkısıyla oluşturulsa da; petal yapraklarının şekli ve rengi sadece üst iki katman tarafından belirlendiği bildirilmiştir. Schepper ve ark. (2001) açelya bitkisinin tetraploid petal yaprakları eksplant olarak kullanılarak, geniş kenarlı "Gerda Keessen nr.2" ve "Queen Fabiola" in vitro da rejenerasyonla edilmişlerdir. Flowsitometri kullanılarak ploidi seviyeleri belirlenmiştir. Alacalı yapraklarda 7 milimetreden büyük olan farklı renkli yaprakların tetraploid, çiçeğin geriye kalan kısmının diploid olduğu kanıtlanmıştır. Ne çiçek renginin nede ploidi farklılığı periklinal kimera orjinli olmamakta, çiçek dokusunun topografik lokalizasyonu ile ilgili olduğu ifade edilmektedir. Zalewska ve ark. (2007) mikro üretim tekniği ile çoğaltılan krizantem bitkilerinde explant tipinin genotip ve fenotipe etkisi araştırılmıştır. Meristem ucu ve yapraklardan oluşturulan adventif sürgünler in vitro da köklendirilerek çiçeklenmeye kadar serada tutulmuşlardır. İki farklı eksplanttan

elde edilen bitkilerin çiçek şekli ve çiçek rengi incelenmiştir. Adventif sürgünlerden elde edilen bitkilerin çiçek rengi 4 çeşitte orijinal bitkiyle aynı kalmıştır, iki çeşitte farklı bulunmuştur. Bu farklılık kimeral yapıdan veya somaklonal varyasyondan kaynaklandığı ifade edilmiştir. Varyasyon meristematik olmayan doku kullanıldığında ortaya çıktığı belirtilmiştir. Bu tekniğin krizantem ıslahı için yeni bir varyasyon kaynağı olabileceği vurgulanmıştır. Yamaguchi ve ark. (2009) iyon demeti ve gama ışını ile krizantemlerin koltuk altı tomurcuklarında, mutasyon metodu karşılaştırılması yapılmış, ve aynı zamanda oluşan mutasyonların kimerik yapıları analiz edilmiştir. Koltuk altı tomurcukları beş noda kadar uzatılmış sürgünler nod nod kesilerek, mutasyona tabii tutulmuş ve yeni nodun tekrar beş nodlu sürgün oluşturmasına izin verilmiştir. Köklerden rejenerasyon alan bitkilerin çiçek renklerine bakılarak, kimerik yapı belirlenmiştir. İyon demetiyle yapılan mutasyonların aksine, gamma ışınlarıyla elde edilen mutasyonların hepsi periklinal olmuştur.

Epidermisleri dikensizlik özelliği taşıyan kimeralı bitkilerin koltuk altı tomurcuklarıyla çoğaltılabilmeleri genellikle mümkün olmaktadır. Ancak oluşturulan adventif sürgünlerde de bu özelliğin devam ettirilebilmesi, orijin meristemin iç katmanlarının da dikensizlik genotipine sahip olmasının sağlanması ile mümkün olabilmektedir. Bu amaçla Hall ve arkadaşları (1986) yaptıkları çalışmalarında; "Thornless Loganberry" (TL) periklinal yapıya sahip bir kimeralı bitkiyi kullanmışlardır. Yabancı tipte dokuları dikenlilik içeren epidermis, mutasyonla dikensizlik özellik kazandırılmış meyveler, kimeralı yapıdan dolayı adventif sürgünler dikenlik özelliği taşımaktadırlar. Saf dikensizlik içeren meristem elde etmek için TL den dikensizlik katmanı alınarak, modifiye MS besin ortamında kallus ve adventif sürgün vermeye zorlanmışlardır. Bu sürgünlerden biri yaşamış, çiçeklenmiş ve tohumları dikensiz döl vermiştir. Canlı ve Skirvin (2003) dikensiz saf gül elde etmek için doku kültüründe *Rosa multiflora* (Fairmount 1) dikensiz gül tipi oluşturulmuşlardır. Yeni tipin kimeralı olup olmadığının belirlenmesi ve dikenli dikensiz dokuların her ikisini içeren dokulardan doku kültürü yardımıyla elde edilen rejenerantlardan in vivo ve in vitro şartlarda dikenlilik ve dikensizlik özellikleri araştırılmıştır. Kimeralı bitkilerin dikenli ve dikensiz rejenerantlar verdiği görülmüştür. FM1 bütün doku kültürü

denemeleri dikenli ve dikensiz rejenarantlar üretmiş olup, bu durum FM1in kimeralı olduğunu açıkça gösterdiği belirtilmiştir. TDZ denemelerinde 240 bitkiden 21 bitki dikensiz olarak ayrılmıştır. Canlı ve Skirvin (2008) yapıları çalışmalarında; BA (6-benzylaminopurine) ile dikenlilik arasında bir korelasyon gözlemlemişlerdir. Doku kültürüyle oluşturulan 690 bitki içerisinde 6 adet bitkinin saf (kimeralı olmayan) dikensiz bitki olduğunu belirtmişlerdir.

Genetik moleküler markörler ve kimeralı bitkilerin birlikte kullanıldığı çalışmalar da yapılmıştır. Fourré ve ark. (1997)'de dört Norveç ladininin embriyogenik klonları birkaç yıl alt kültüre alınarak olgun embriyolarının ve oluşan embriyoların kaliteleri belirlenmiştir. Oluşan morfolojik farklılıklar genom modifikasyonundan mı yoksa genom ekspresyonundan mı olduğu saptanmaya çalışılmıştır. RAPD moleküler yaklaşımının tek başına somaklonal varyasyonu ortaya koymadığı belirtilmiştir. Hirata ve arkadaşları çalışmalarında (2001) türler arasında in vitro aşılama ile sitoplazmik erkek kısırlık (CMS) elde etmişlerdir. Dişi ebeveyn olarak kullanılan *Brassica campestris* cv. "Komatsuna" ile kimeralı bitkinin geri melezinden elde edilen tohum döllerinde CMS ortaya çıkmıştır. CMS taşıyan bitki "Komatsuna" ile geriye melezlenerek stabil hale getirilmiştir. 17 S RNA geni prob olarak kullanılarak yapılan southern blot analiziyle ve kromozom sayımı (2n:20) ile CMS bitkilerinin içeriği tamamıyla "Komatsuna" morfolojisiyle aynı bulunmuştur. Bununla birlikte southern blot analizinde CMS bitkiler arasında her iki ebevyne benzeyen varyantlarda ortaya çıkmıştır. Kimeraların çoğaltılması ve sentezlenmesi işlemleri sırasında rekombinasyon ya da bilinmeyen bazı değişikliklerin mitokondrial genomda olduğu düşünülmektedir. L₁ katmanına özgü promotör kullanıldığında, RNA'nın sadece L₁ katmanında transkript olabileceği Session ve ark. (2000) tarafından gösterilmiştir.

7.SONUÇ

Kimeralardan yararlanılarak oluşturulan farklı genotipte epidermis içeren çeşitler (dikensiz gül ve böğürtlen) oluşturabilmiştir. Yine bu teknik sayesinde birçok süs bitkisinde çiçek ve yaprak rengi değişiklikleri yapılabilmektedir. Son yıllarda kimera tekniğinin moleküler genetik tekniklerle beraber kullanılması artan ilgi görmektedir. Klasik melezleme tekniğiyle mümkün olmayan türler

arası kombinasyonların kimera tekniğiyle mümkün olabileceği belirtilmektedir. Tarla bitkileri ıslahında kimeraların araç olarak kullanılması araştırılmaya ihtiyacı olan bir konudur. Yeni çeşitlerin ıslahında karşılaşılan sınırlamaların üstesinden gelinmesinde kimeraların kullanımı önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abu-Qaoudt, H., Skirvin, R. M., Chevreau, E. 1990. In vitro separation of chimeral pears into their component genotypes. *Euphytica* 48: 189-196.
- Ardian, A. S. 1997. Stability of cytochimeras of *Allium wakegi* Araki during in vivo and in vitro propagation. *Scientia Horticulturae* 71 (1-2): 93-102.
- Arisumi, T., Frazier, L. C. 1968. Cytological and morphological evidence for the single-cell origin of vegetatively propagated shoots in thirteen species of *Saintpaulia* treated with colchicine. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 93: 679-685.
- Binding, H., Witt, D., Monzer J., Mordhorst G., Kollmann, R. 1987. Plant cell graft chimeras obtained by co-culture of isolated protoplasts. *Protoplasma* 141:64-73
- Broertjes, C., Keen A. 1980. Adventitious shoots: Do they develop from one cell? *Euphytica* 29: 73-87.
- Burge, G. K., Morgan, Ed R., Seelye, J. F. 2002. Opportunities for synthetic plant chimeral breeding: Past and future. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 13-21.
- Burk, L. G. 1975. Clonal and selective propagation of tobacco from leaves. *Plt. Sci. Lett.* 4: 149-154.
- Cammareri, M., Errico, A., Filippone, E., Esposito, S., Conicella, C. 2002. Induction of variability in chimeric *Aster cordifolius* 'White Elegans' through somaclonal variation. *Euphytica* 128: 19-25.
- Canli, A. F. 2003. A Review on thornless roses. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6(19):1712-1719.
- Canli, A. F., Skirvin, R.M. 2003. Separation of thornless rose chimeras into their (*Rosa* sp.) consistent

- genotypes *in vitro*. Pakistan Journal of Biological Sciences 6(19):1644-1648.
- Canli, F. A., Skirvin, R. M. 2008 *In vitro* separation of a rose chimera. Plant Cell Tiss Organ Cult 95:353-361.
- Carlson, PS., Chaleff, RS. 1974 Heterogeneous association of cells formed *in vitro*. In Ledoux L (ed) Genetic Manipulations with Plant Materials (pp 245-261) Plenum Press, New York.
- Chen, L. P., Ge, Y. M., Zhu, X. Y. 2006. Artificial synthesis of interspecific chimeras between tuber mustard (*Brassica juncea*) and cabbage (*Brassica oleracea*) and cytological analysis. Plant Cell Rep 25: 907-913.
- Clayberg, CD. 1975. Insect resistance in a graft-induced periclinal chimera of tomato. HortScience 10: 13-15.
- Elliott, F.C. 1958. Plant Breeding and Cytogenetics. McGraw-Hill Book Company, inc. p:395.
- Fourré, J-L, Berger, P., Niquet, L., André, P. 1997 Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches Theor Appl Genet 94: 159-169.
- Geier, T., Sangwan, R.S. 1996 Histology and chimeral segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and Agrobacterium-mediated transformation in Kohleria internode explants Plant Cell Reports 15 (6): 386-390.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation By Tissue Culture, Exegetics Ltd., Edington, Wilts. BA13 4QG, England p:574.
- Goffreda, JC., Szymkowiak, EJ., Sussex, IM., Mutschler MA. 1990. Chimeric tomato plants show that aphid resistance and triacylglycerol production are epidermal autonomous characters. Plant Cell 2: 643-649.
- Hake, S. 2001. Transcription factors on the move. Trends Genet. 17:2-3.
- Hall, H. K., Quaz, M. H., Skirvin, R. M. 1986. Isolation of a pure Thornless Loganberry by meristem tip culture. Euphytica 35. 1039-1044.
- Hirata, Y., Yagishita, N., Sugimoto, M., Yamamoto, K. 1990. Intervarietal chimera formation in cabbage (*Brassica oleracea* L.). Japanese Journal of Breeding 40:(4) 419- 423.
- Hirata, Y., Motegi, T., Takeda, Y., Morikawa, K. 2001. Induction of cytoplasmic male sterility in the seed progeny derived from artificially-synthesized interspecific chimera in *Brassica*. Euphytica 117(2):143-149.
- Jorgensen, CA. 1927. A periclinal tomato-potato chimera. Hereditas.10: 293-301.
- Li, M. Y. 2005. Observation of high-frequency occurrence of chimeral adventitious shoots in tissue culture from the chimeral tissues of *Pelargonium zonale*. Hortscience 40 (5);1461-1463.
- Lindsay, GC., Hopping, ME., Binding, H., Burge, GK. 1995 Graft chimeras and somatic hybrids for new cultivars. NZ J. Bot.(33):79-92.
- Lineberger, R.D. 2007. <http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/chimeras/> chimera.html.
- Marcotrigiano, M. 1986. Experimentally synthesized plant chimeras 3. Qualitative and quantitative characteristics of the flowers of interspecific *Nicotiana* chimeras. Ann. Bot. 57: 435-442
- Marcotrigiano, M., Gouin, FR. 1984. Experimentally synthesized plant chimeras 2. A comparison of *in vitro* and *in vivo* techniques for the production of interspecific *Nicotiana* chimeras. Ann. Bot. 54: 513-521.
- Marcotrigiano, M., Gouin, FR. 1984a. Experimentally synthesized plant chimeras 1. *In vitro* recovery of *Nicotiana tabacum* L. chimeras from mixed callus cultures. Ann. Bot. 54: 503-511.
- McPheeters, K., Skirvin, R. M. 1983. Histogenic layer manipulation in chimeral 'Thornless Evergreen' trailing blackberry. Euphytica 32: 351-360.
- Neilson-Jones, W. 1969. Plant Chimeras, 2nd edition. Methuen, London.
- Noguchi, T., Hirata, Y., Yagishita, N. 1992. Intervarietal and interspecific chimera formation by *in vitro*-graft culture in *Brassica*. Theor. Appl. Genet. 83: 727-732.
- Noguchi, T., Hirata, Y. 1994. Vegetative and floral characteristics of

- interspecific Brassica chimeras produced by in vitro grafting. *Euphytica* 73: 273–280.
- Schepper, S. D., Leus, L., Mertens, M., Debergh, P., Bockstaele, EV., Loose, M. D. 2001. Somatic polyploidy and its consequences for flower coloration and flower morphology in azalea *Plant cell rep* 20:583–590.
- Sessions, A., Yanofsky, MF., Weigel, D. 2000. Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science* 289: 779–781.
- Stewart, RN., Dermen, H.1970. Somatic genetic analysis of the apical layers of chimeral sports in *Chrysanthemum* by experimental production of adventitious shoots. *Amer. J. Bot.* 57 (9): 1061-1071.
- Stewart, RN, Meyer, FG., Dermen, H. 1972. *Camellia*+‘Daisy Eagleson’, a graft chimera of *Camellia sasanqua* and *C. japonica*. *Am. J. Bot.* 59: 515–524.
- Szymkowiak, EJ., Sussex, IM. 1996. What chimeras can tell us about plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996. 47:351–76.
- Tilney-Bassett, R.A.E. 1963. The structure of periclinal chimeras. *Heredity* 18: 265-285.
- Yamaguchi, H., Shimizu, A., Hase, Y., Degi, K., Tanaka, A., Morishita, T. 2009. Mutation induction with ion beam irradiation of lateral buds of chrysanthemum and analysis of chimeric structure of induced mutants. *Euphytica* 165:97–103.
- Yentür, S.1995. Bitki Anatomisi, apikal örgütlenme kavramının evülasyonu, İstanbul Üniversitesi Yayınları, sayı:3808, p:560.
- Zalewska, M., Lema-Ruminska, J., Miler, N. 2007. In vitro propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in *chrysanthemum*. *Scientia Horticulturae* 113 70–73.
- Zhu, X. Y., Zhao, M, Ma, S., GeY, M., Zhang, M. F., Chen, L. P.2007. Induction and origin of adventitious shoots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. *Plant Cell Rep* 26:1727–1732.
- Winkler, H. 1907. Über propfbastarde und pflanzliche chimaeren. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 25: 568–576.