



## Bitki doku kültürlerinde ince hücre tabaka (TCL) kültür sistemi

### Thin cell layer (TCL) culture system in plant tissue cultures

Halide Hande Güngör<sup>1\*</sup> , Meltem Bayraktar<sup>2</sup> , Aynur Gürel<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 35040, İzmir Türkiye

<sup>2</sup> Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, 40100, Kırşehir, Türkiye

<sup>3</sup> Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 35040, İzmir Türkiye

#### Öz

Bitki ıslahı ve yetiştiriciliği açısından büyük öneme sahip olan bitki doku kültürü teknikleri, özellikle *in vitro* koşullarda bitkisel üretim için çeşitli yöntemleri kapsayan geniş bir bilimsel alandır. *In vitro* koşullarda bitki üretiminde kullanılan tekniklerin başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biri eksplant tipinin belirlenmesidir. İnce hücre tabaka (TCL) kültür sistemi ilk olarak 1973 yılında Tran Thanh Van tarafından ortaya atılmıştır. TCL kültür sistemi, ince hücre ve doku katmanlarını içeren uzunlamasına ya da enine kesilmiş eksplantların kültüre alınmasıyla, bu eksplantlardan doku, organ, embriyo veya tam bitki gibi yapıların rejenerasyonunun sağlandığı bir bitki doku kültürü tekniğidir. Bu teknik, *in vitro* mikroçoğaltım, sentetik tohum üretimi, kriyoprezervasyon ve genetik çalışmalarda başarı ile kullanılmaktadır. Bitki büyüme düzeltme faktörü ve geometrik faktör kavramları, bir TCL eksplantının rejenerasyon potansiyelinin geleneksel bir eksplantından daha büyük olduğunu göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** İnce hücre tabaka, TCL, *in vitro*, rejenerasyon, eksplant

#### 1 Giriş

Geleneksel bitki doku kültürlerinde, küçük (hücre ve doku) veya büyük bitki kısımları (tam bir organ), *in vitro* rejenerasyon veya organogenez için eksplant olarak kullanılabilirler [1]. Eksplant, bir bitki doku kültürü protokolünde başarıyı etkileyen anahtar faktörlerden biridir. Genotip (tür ve çeşit), eksplantın alındığı doku veya organ kaynağı ve yaşı, eksplant boyutu ve şekli dahil olmak üzere bir dizi biyotik faktör, doku kültüründeki başarıyı etkilemektedir [2]. Eksplant seçimi, *in vitro* rejenerasyonun sonucunu belirleyebilmesinden dolayı, araştırmacıların herhangi bir doku kültürü denemesini başlatmadan önce optimize etmesi gereken önemli bir parametredir. Çünkü, *in vitro* rejenerasyon ortamına eklenen aynı bitki büyüme düzenleyicilerinin varlığında, farklı eksplantlar farklı yanıtlar gösterebilmektedir [1].

İnce Hücre Tabaka (TCL) teknolojisi, 1970'lerde tütün bitkisinin çiçek sapından alınan uzunlamasına TCL eksplantlarından çiçeklerin, köklerin, sürgünlerin ve somatik

#### Abstract

Plant tissue culture techniques, which are of great importance in terms of plant breeding and cultivation, are a wide scientific area that includes various methods for plant production especially in *in vitro* conditions. One of the most important factors affecting the success of the techniques used in plant production in *in vitro* conditions is determination of explant type. Thin cell layer (TCL) culture system was first described by Tran Thanh Van in 1973. TCL culture system is a plant tissue culture technique in which structures such as tissue, organs, embryos, or whole plants are regenerated by culturing longitudinally or transversely excised explants containing thin layers of cells and tissue. This technique has been successfully used in *in vitro* micropropagation, synthetic seed production, cryopreservation and genetic studies. The concepts of plant growth correction factor and geometric factor have shown that the regeneration potential of a TCL explant is greater than that of a conventional explant.

**Keywords:** Thin cell layer, TCL, *in vitro*, regeneration, explant

embriyoların kontrollü gelişimi ile ortaya çıkmıştır [3]. TCL kültür sistemi, eksplant olarak dokunun minimal kullanımını sağlamaktadır [4]. TCL sistemi, farklı bitki organlarından (gövde, yaprak, kök, çiçek salkımı, çiçek primordiyumu, kotiledon, apikal bölge, embriyo vb.) kesilerek elde edilen küçük boyutlu eksplantlardan oluşur [5]. Geleneksel eksplantların aksine; TCL teknolojisi, tipik olarak 0.1-2 mm kalınlığında ince veya ultra ince bitki kısımlarının kullanılmasını gerektirmektedir [1]. Eksplantlar mümkün olduğunca az sayıda hücre içerecek şekilde kesilmektedirler [5].

TCL'ler eksplantın kesilme düzlemine bağlı olarak iki kategoriye ayrılır. Birinci grup en yaygın tip olan ve kalınlığı 100 µm ile 1-2 mm arasında değişen enine TCL (transversally TCL: tTCL)'dir. İkinci kategori ise, aynı kalınlıkta ancak farklı uzunluklarda çok özel hücre katmanlarını kapsayan uzunlamasına TCL (longitudinally TCL: lTCL)'dir [6]. lTCL'ler, epidermal hücrelerin tek tabakasında olduğu gibi yalnızca bir doku tipini içerirlerken;

\* Sorumlu yazar / Corresponding author, e-posta / e-mail: handegngr@gmail.com (H. H. Güngör)

Geliş / Received: 01.02.2022 Kabul / Accepted: 23.02.2022 Yayınlanma / Published: 15.04.2022

doi: 10.28948/ngumuh.1066541

tTCL'ler ise farklı doku tiplerine ait az sayıdaki hücreleri içerirler [7].

*Nicotiana tabacum*, *Lilium longiflorum*, *Dendranthema grandiflora* bitki türlerinden elde edilen TCL eksplantları üzerinde morfogenez, organ farklılaşması ve gelişimine yönelik yoğun şekilde çalışıldığı için TCL sistemleri açısından bu türler model bitkiler olarak kabul edilmişlerdir. Tütün (*N. tabacum*) en çok çalışılan bitkilerden biridir ve TCL terimi ve kavramının başlangıcından beri, diğer tüm TCL çalışmalarının dayandığı model sistem haline gelmiştir [3].

İlk ortaya çıktığından beri TCL'ler, geleneksel yöntemlerle *in vitro* rejenerasyonu başarılı olmayan birçok süs bitkisi türünün mikroçoğaltımında başarıyla kullanılmıştır [3]. Ayrıca TCL tekniği; tarla bitkileri, odunsu türler ve tıbbi bitkiler gibi pek çok bitki türüne de başarı ile uygulanmıştır [2, 8]. TCL eksplantlarının rejenerasyon potansiyeli açısından geleneksel eksplantlara kıyasla daha uygun bir eksplant olduğu da kanıtlanmıştır [9, 10]. Ekonomik açıdan önemli türlerin seri üretimini de mümkün kıldığından; TCL tekniği büyük avantaja sahiptir [6]. Geçtiğimiz son 30-40 yılda, eksplant olarak TCL'e dayanan yöntemler geliştirilmiş ve *in vitro* kitlesel çoğaltım, genetik transformasyon, sentetik tohum üretimi, kriyoprezervasyon ve *in vitro* seleksiyon için çok sayıda bitki türüne başarıyla uygulanmıştır [1, 2, 13, 50, 51]. Ayrıca TCL tekniği; bitkilerin hücre, doku ve organlarındaki farklılaşma ve totipotensi yeteneklerini değerlendirmek için de büyük bir deneysel fırsat sağlamaktadır [6].

TCL tekniği, bitki biliminde basit ve önemli bir biyoteknolojik araçtır. TCL tekniği ile spesifik organların morfogenetik özellikleri ve gelişimi yönlendirilebilir ve kontrol edilebilir [3, 6]. Bitkilerle ilgili genetik mühendisliği çalışmalarının önündeki en büyük engel, *in vitro* morfogenez ve rejenerasyonu kontrol edebilmenin zor olmasıdır. TCL sistemi, morfogenezi kontrol eden mekanizmaları inceleyebilmek için etkili bir araçtır. Geleneksel doku kültürü teknikleri ve uygulamalarının aksine, TCL sisteminin başarısının ardındaki esas mantık, TCL'lerin boyutlarının küçük olması ve az sayıda hücre içermeleridir [11].

## 2 İnce hücre tabaka kültür sistemine genel bir bakış

TCL sistemi kavramı ilk olarak 1973 yılında Tran Thanh Van tarafından ortaya atılmıştır. Tran Thanh Van *in vitro* yeniden programlamanın ve dolayısıyla bir organ veya embriyonun rejenerasyonunun, herhangi bir organ veya dokudan farklılaşmış hücrelerden izole edilen bir veya birkaç (3-6) tabaka ile mümkün olabileceğini açıklamıştır [2]. Bitki üzerindeki konumuna bakılmaksızın bitkinin herhangi bir kısmından alınan parçanın boyuta göre manipülasyonu ile organogenik potansiyeli kontrol edebilme fikri, TCL kavramının doğmasına sebep olmuştur [12]. Tran Thanh Van yaptığı çalışma ile; sadece oksin ve sitokin oranlarının manipülasyonu ile, tütünün çiçek sapı epidermal hücrelerinden alınan TCL'lerden çiçek, sürgün, kök ve kallus oluşumunun elde edilebileceğini göstermesi bitki doku kültürü tarihinde devrim niteliğinde bilgilere ulaşılmasını sağlamıştır [8]. Tütüne ilk uygulanmasından

sonra bitki doku kültüründe başka bitkilere de uygulanmasıyla, TCL'lerin birçok bitki türünün *in vitro* kültürlerinde etkili bir araç olduğu kanıtlanmıştır [1].

TCL farklı bitki organlarından (gövde, yaprak, kök, çiçek salkımı, çiçek, kotiledon, hipokotil, epikotil, apikal meristem, embriyo vb.) kesilen, az sayıda hücre veya doku içeren küçük boyutlu eksplantlardır. Adından da anlaşılacağı gibi, genellikle birkaç mm kalınlığında, ancak değişken oranlarda uzunluk ve çapa sahip ince bir hücre tabakasıdır [8, 13, 14]. Birkaç hücre katmanından oluşan TCL'ler genel olarak 0.5-1 mm kalınlığındadır [1]. Bir TCL'yi geleneksel bir eksplanttan ayıran en önemli faktör, yüzey/hacim oranı, boyutu ve kalınlığıdır [14]. TCL sistemi, eksplantın orijininin çok boyutuna odaklanmaktadır [15]. TCL'lerin şekli ve boyutu; hem türetildikleri organa hem de kesiliş şekline bağlıdır [2]. Kesiliş şekillerine göre, Tran Thanh Van tarafından iki tür TCL tanımlanmıştır: uzunlamasına TCL (ITCL-longitudinal TCL) ve enine TCL (tTCL-transverse TCL) [12]. Kullanımı daha yaygın olan tTCL eksplantlarının kalınlıkları 100 µm ile 1-2 mm arasında değişmektedir ve genellikle birkaç doku tipini içerirler. Buna karşılık; ITCL eksplantları çok spesifik bir hücre veya doku katmanını içerirlerken uzunlukları değişebilir, fakat kalınlıkları tTCL eksplantları kadardır [6, 14]. Uzunlamasına TCL'ler yalnızca bir doku tipini içerirlerken (örneğin; tek bir epidermal hücre tabakası veya birkaç (3-6) kortikal hücre tabakası); enine TCL'ler ise farklı doku tiplerinden (epidermal, kortikal, kambiyum, perivasküler- vasküler silindirin etrafında yer alan lifler- ve medüller doku- merkezi meristem dokuları ve ayrıca parankima hücreleri- vb.) az sayıda hücre ihtiva ederler [1, 12]. Yani; ITCL'ler epidermis ve sub-epidermis gibi yalnızca bir veya iki doku tipinden oluşurlarken, tTCL'ler ise çeşitli dokulara sahip olabilirler [1].

Bir enine TCL veya uzunlamasına TCL eksplantı, yeterince keskin bir bıçak kullanılarak herhangi bir doku veya organ tipinden hazırlanabilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, TCL eksplantlarının elle hazırlandığı rapor edilmiş ve çalışmalarda mikrotom kullanımına rastlanmamıştır. TCL tekniği, küçük boyutu ve uygulamanın ince ölçekli doğası nedeniyle gerek hazırlamak ve gerekse geliştirmek için geleneksel bir eksplanttan birkaç kat daha zahmetli olsa da, geleneksel bir eksplanttan birkaç kat daha fazla organ sağlayabilmektedir. Literatürde, tTCL'ler bazen ince kesitler (thin cross sections: TCS) olarak adlandırılırlarken, ITCL'ler ise epidermal şeritler, ince epidermal tabakalar veya ince epidermal şeritler olarak da isimlendirilirler [14].

TCL'ler, gelişimsel ve organogenik oluşumları kontrol etmede basit ama etkili bir yol sunmaktadır ve böylece belirli organların klonlarının kitlesel üretimini mümkün kılmaktadır [8]. TCL eksplantlarının farklılaşma kapasitesi; doğru sinyal algılama ve iletimi, dahili genetik makinenin bu sinyallere tepki verme kapasitesine bağlıdır [3].

TCL konsepti 45 yıldan fazla bir süredir birçok bitki türünde başarı ile uygulanmıştır (Tablo 1). Bu bitkilerden bazıları; orkide türleri, tütün, *Arabidopsis thaliana* veya aslanagzı gibi model bitkiler, tarla bitkileri (tahıllar, kolza, pirinç), bahçe bitkileri (çeşitli meyve, sebze ve süs bitkileri), tıbbi bitkiler, orman ağaçları (*Pinus* sp.), odunsu meyve bit-

**Tablo 1.** TCL eksplantlarının *in vitro* organogenez ve embriyogenez için başarıyla kullanıldıkları çeşitli bitki türleri

Bitki Türü	TCL'in alındığı bitki kısmı	TCL tipi	Eksplant boyutu	Elde edilen rejenerasyon (embriyo, protokorm, tam bitki vb.)	Referans
<i>Agave fourcroydes</i> Lem.	<i>In vitro</i> bitkiciklerden yapraklar ve kökler kesildikten sonra kalan kısım	tTCL	0.5-1.0 mm kalınlık	Doğrudan somatik embriyo rejenerasyonu	[16]
<i>Allium ascalonicum</i>	<i>Ex vitro</i> koşullarda yetiştirilen soğanlardan elde edilen sürgün uçları	tTCL	Belirtilmemiş	Dolaylı <i>in vitro</i> sürgün rejenerasyonu	[17]
<i>Allium schoenoprasum</i> L.	<i>In vitro</i> sürgünlerden elde edilen yapraklar	tTCL	0.5, 2 ve 5 mm kalınlık	Doğrudan <i>in vitro</i> bitkicik rejenerasyonu	[18]
<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Wettst	<i>In vitro</i> sürgünlerden elde edilen yapraklar ve internodlar	tTCL	<b>Yaprak:</b> uzunluk 3 mm'den genişlik 1 mm'den küçük <b>İnternod:</b> 1.5-2 mm çap ve 1-1.5 mm kalınlık	Doğrudan ve dolaylı <i>in vitro</i> sürgün rejenerasyonu	[4]
<i>Begonia tuberosus</i>	<i>Ex vitro</i> koşullarda yetiştirilen bitkilerin petiolleri, yaprak sapları ve gövdeleri	tTCL	1 mm kalınlık ve 10 mm çap	Dolaylı somatik embriyo rejenerasyonu	[19]
<i>Brassica napus</i> L.	<i>In vitro</i> fideciklerden elde edilen hipokotil ve petioller	tTCL	0.3-0.5 mm	Doğrudan ve dolaylı <i>in vitro</i> sürgün rejenerasyonu	[20]
<i>Cattleya forbesii</i> Lindl.	<i>In vitro</i> sürgünlerden elde edilen nodlu gövde kısımları ve protokorm	tTCL	<b>Gövde:</b> 0.5-1.5 mm kalınlık <b>Protokorm:</b> 1-2.5 mm kalınlık	Doğrudan protokorm benzeri yapılar ve sürgün rejenerasyonu	[21]
<i>Cymbidium Sleeping Nymph</i>	Protokorm	tTCL	0.5 mm	Doğrudan protokorm benzeri yapılar ve devamında sürgün rejenerasyonu	[22]
<i>Dendrobium aphyllum</i> Roxb	<i>Ex vitro</i> koşullarda yetiştirilen bitkilerden elde edilen nodlar	tTCL	0.1-0.4 mm	Doğrudan <i>in vitro</i> sürgün rejenerasyonu	[9]
<i>Dendrobium aqueum</i>	<i>In vitro</i> sürgünlerden elde edilen gövde	tTCL	0.5 mm kalınlık	Doğrudan somatik embriyo rejenerasyonu	[23]
<i>Dendrobium Candidum</i> Wall Ex Lindl.	<i>In vitro</i> sürgünlerden elde edilen nodlu gövde kısımları	tTCL	0.5 mm kalınlık	Doğrudan protokorm benzeri yapılar ve devamında sürgün rejenerasyonu	[24]
<i>Digitaria sanguinalis</i> L.	<i>In vitro</i> fideciklerden elde edilen apikal ve nodal bölgeler	tTCL	0.2-0.4 mm kalınlık ve 1 mm çap	Doğrudan <i>in vitro</i> bitkicik rejenerasyonu	[25]
<i>Eclipta alba</i>	<i>Ex vitro</i> koşullarda yetiştirilen bitkilerin nodal segmentleri	tTCL	1-3 mm kalınlık	Doğrudan <i>in vitro</i> sürgün rejenerasyonu	[26]
<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	<i>Ex vitro</i> koşullarda yetiştirilen bitkilerin yapraklar, kökler ve en dıştaki yeşil yapraklar uzaklaştırıldıktan sonra kalan doku	tTCL	0.8-1 mm	Dolaylı somatik embriyo rejenerasyonu ve devamında sürgün rejenerasyonu	[27]
<i>Ficus carica</i> L.	<i>Ex vitro</i> koşullarda yetiştirilen bitkilerin gövdeleri	tTCL	0.5-0.8 mm kalınlık ve 10 mm çap	Dolaylı <i>in vitro</i> sürgün rejenerasyonu	[28]
<i>Hadrolaelia grandis</i>	<i>In vitro</i> 'da çimlendirilmiş tohumlardan elde edilen 2-3 aylık protokormlar	tTCL-ITCL	0.5 mm kalınlık	Doğrudan protokorm benzeri yapılar ve devamında sürgün rejenerasyonu	[10]

<i>Jatropha curcas</i> L.	Ex vitro koşullarda yetiştirilen bitkilerin yaprak petiolleri	tTCL	0.8-1 mm kalınlık	Dolaylı somatik embriyo rejenerasyonu	[29]
<i>Lilium longiflorum</i>	In vitro pseudo-bulbletler	tTCL	0.5-0.7, 0.8-1.0, 1.2-1.5 mm kalınlık	Doğrudan somatik embriyo rejenerasyonu ve devamında sürgün rejenerasyonu	[30]
<i>Malaxis wallichii</i>	In vitro sürgünlerden elde edilen bir veya iki nodlu pseudo segmentler	tTCL	0.3-0.5 mm kalınlık	Doğrudan in vitro sürgün rejenerasyonu	[31]
<i>Oryza sativa</i> L.	In vitro fideciklerden elde edilen sürgün apikal meristemleri	tTCL	0.2-0.4 mm kalınlık	Doğrudan somatik embriyo rejenerasyonu ve devamında sürgün rejenerasyonu	[32]
<i>Phalaenopsis amabilis</i> cv. Jinan	In vitro sürgünlerden elde edilen yaprak ve çiçek sapı nodu	ITCL-tTCL	<b>Çiçek sapı nodu (tTCL):</b> 0.5 mm kalınlık <b>Yaprak (ITCL):</b> 0.5 mm uzunluk	Doğrudan somatik embriyo rejenerasyonu ve devamında sürgün rejenerasyonu	[33]
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Carioca	In vitro fideciklerden elde edilen epikotil, hipokotil, kotiledonlar, kökler	tTCL	0.3-0.5 mm kalınlık	Doğrudan in vitro sürgün rejenerasyonu	[34]
<i>Pinus patula</i> Schl. et Cham	Olgunlaşmamış zigotik embriyolar	tTCL-ITCL	0.3-0.5 mm kalınlık	Embriyogenik kallus rejenerasyonu	[35]
<i>Rubus sanctus</i> <i>Rubus hirtus</i>	In vitro sürgünlerden elde edilen gövdeler	tTCL	0.5-0.8 mm	Dolaylı somatik embriyo rejenerasyonu	[6]
<i>Scutellaria ocmulgee</i>	In vitro sürgünlerden elde edilen yapraklar ve internodlar	tTCL	<b>Yaprak:</b> 1225.50 µm uzunluk ve 107.65 µm kalınlık <b>İnternod:</b> 105 µm kalınlık ve 101 µm çap	Dolaylı in vitro sürgün rejenerasyonu	[36]
<i>Sesamum indicum</i> L. cv. Dhavari	In vitro fideciklerden elde edilen kök ve internodlar	tTCL	0.5- 2.5 mm kalınlık	Doğrudan in vitro sürgün rejenerasyonu	[37]
<i>Spilanthes acmella</i> L.	Ex vitro koşullarda yetiştirilen bitkilerin nodal segmentleri	tTCL	1-4 mm kalınlık	Doğrudan in vitro sürgün rejenerasyonu	[38]
<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	Hipokotil	tTCL	0.3-0.5 mm kalınlık	Doğrudan in vitro sürgün rejenerasyonu	[39]
<i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd.	Ex vitro bitkilerden elde edilen internodlar	tTCL	3-5 mm uzunluğunda	Dolaylı in vitro sürgün rejenerasyonu	[40]
<i>Urginea altissima</i> (L.f.) Baker	Ex vitro koşullarda yetiştirilen bitkilerden elde edilen yapraklar	ITCL	10 mm uzunluk ve 2 mm genişlik	Doğrudan in vitro sürgün rejenerasyonu	[41]
<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp	In vitro fideciklerden elde edilen kotiledon nodları	tTCL- ITCL	<b>ITCL:</b> 0.5 mm kalınlık 1 cm uzunluk <b>tTCL:</b> 0.3-0.5 mm kalınlık	Doğrudan in vitro bitkicik rejenerasyonu	[42]
<i>Pistacia lentiscus</i> var. Chia	Ex vitro koşullarda yetiştirilen yaprak, nod ve gövde kısımları	tTCL- ITCL	0.5-1 mm kalınlığında	Kallus rejenerasyonu	[49]

kileri (*Citrus* spp. ve elma). Fakat; buğday veya patates gibi temel mahsuller için veya daha geniş bir tıbbi ve farmasötik açıdan önemli türlerin yelpazesi için ve hatta sandal ağacı gibi nesli tükenmekte olan diğer odunsu ağaç türleri için TCL sistemine ait uygulamaların olmaması, bu tekniğin

potansiyelinin büyük ölçüde araştırılmadığının bir göstergesidir [2, 8].

### 3 İnce hücre tabaka kültür sisteminin avantajları ve dezavantajları

**Avantajları:** TCL eksplantları geleneksel eksplantlara göre pek çok avantaj sağlamaktadır:



- TCL eksplantları kullanıldıklarında; geleneksel eksplantlara göre daha yüksek bir organogenik veya embriyogenik yanıtlar elde edilebilmektedir [1]. TCL tekniği ile yüksek frekanslı organ rejenerasyonu sağlanabildiği gibi, istenen organın üretilmesi için gereken zaman aralığının azaltılması da mümkündür. Geleneksel eksplantlardan biri olan sürgün ucu eksplantı kullanılarak yılda 11.000 bitkicik üretilbilirken; tek bir enine TCL'den 80.000'den fazla bitkicik üretilbileceği belirlenmiştir [43].
- TCL tekniğinde besin ortamı ile temas halinde olan eksplantın yüzey alanı, geleneksel bir eksplantından daha büyüktür ve bu yüzden ortam bileşenlerinin taşınması daha verimli olmaktadır; böylelikle bu ortam bileşenleri, eksplantların alıcı hücrelerine nispeten daha fazla ulaşabilmektedir. Bu sebeple TCL eksplantlarında daha yüksek oranda ve hızlı şekilde *in vitro* büyüme ve morfogenez gözlemlenmektedir [1].
- *In vitro* başlangıç kültürlerinin kurulmasında veya altkültürlemeler sırasında bitki materyalinin mevcudiyeti sınırlıysa, eksplant olarak TCL'lerin kullanılması fayda sağlamaktadır [1].
- Olgun dokular *in vitro* olarak inatçı (rekalsitrant) olma eğiliminde olduklarından; genellikle mikroçoğaltımı zor olan konifer ve orman ağacı türlerinde genç dokulardan alınan TCL eksplantları daha iyi bir rejenerasyon fırsatı sunmaktadırlar [1].
- TCL kültür sistemi kimerizm olasılığını önemli ölçüde azaltmaktadır [44].
- Mikroçoğaltımı problemlili olan birçok süs bitkisinin çoğaltımı için TCL teknolojisi avantajlı bir şekilde kullanılabilmektedir [17].
- Bitki biyoteknolojisi ile ilgili yapılan araştırmalarda, gelişim süreçlerinin altında yatan genetik ve biyokimyasal soruları mümkün olan en basit şekilde cevaplayabilecek teknikler sürekli olarak araştırılmaktadır. TCL kültür sistemi, genetik çalışmalar için gerekli altyapıyı sunmaktadır [5]. TCL'ler genetik mühendisliğinin yanı sıra, *in vitro* çiçeklenmede, standartlaştırılmış sekonder metabolit üretimi için kültürlerin oluşturulmasında ve ayrıca genetik, farklılaşma ve biyokimyasal olayların incelenmesinde de kullanılmaktadır [12].
- Transgen ekspresyonu, *in vitro* çiçeklenme ve morfogenez gibi süreçleri kontrol eden mekanizmaların anlaşılmasını mümkün kılan TCL sistemleri, belirli fizyolojik ve genetik yolları ve süreçleri daha fazla aydınlatabilecek yeni araştırmaların yolunu açmaktadır [3].
- Morfoanatomik değişiklikler ve morfogenez üzerine yapılan çalışmalarda, TCL'lerin kullanımı daha faydalıdır; çünkü ışık veya elektron mikroskobu için TCL eksplantlarından örneklerin hazırlanması geleneksel eksplantlara kıyasla çok daha kolaydır [1].

- *A. thaliana*'daki rizogenez çalışmalarında adventif köklenme mekanizmasını anlamak için TCL sisteminin kullanımı, bu sistemin bitki gelişim biyolojisindeki temel araştırmalarda kullanılmasını mümkün kılmaktadır [1].
- Genetik transformasyonda, TCL bazlı rejenerasyon sistemlerinin kullanılması, daha büyük bir yüzey alanının enfekte olmasına izin verdiği için oldukça avantajlıdır [1].
- TCL'ler, anterleri veya stigmaları herhangi bir zamanda kullanılabilir hale getirmek üzere *in vitro* çiçeklerin üretimi gibi yüksek düzeyde uzmanlaşma gerektiren araştırmalar için belirli organların gerekli olabileceği, ancak doğal koşullar altında belirli mevsimlerle ciddi şekilde sınırlı olacağı durumlar için özel bir değere sahiptirler [8].
- Çevresel faktörlere karşı daha yüksek hassasiyetleri nedeniyle, TCL'ler *in vitro* seleksiyon çalışmalarında da başarıyla kullanılmaktadır [1].

**Dezavantajları:** TCL eksplantları bisturi yardımı ile kesilerek hazırlandığı için stabil bir boyutta kesilmesi zordur. Bu işlemin zor olması sebebi ile TCL tekniğinin geniş bitki türleri yelpazesinde kullanımı kısıtlı kalmaktadır. Genetik transformasyon çalışmalarında TCL sisteminin kullanılması, daha büyük bir yüzey alanının enfekte olmasına izin verebilecektir, ancak, *Agrobacterium*'un uzaklaştırılmasında veya aşırı bakteri üretiminin ve eksplant kontaminasyonunun önlenmesinde zorlukların oluşmasına yol açabilir [1].

#### 4 İnce hücre tabaka eksplantlarının rejenerasyon kapasitelerini etkileyen faktörler

Eksplant, bitki doku kültürlerinde en önemli biyotik faktördür [14]. Herhangi bir bitki türünün doku kültürü, büyük ölçekli mikroçoğaltımı ve ayrıca genetik transformasyonuna yönelik başarısının altında yatan temel faktör rejenerasyondur [7]. TCL eksplantları, besin ortamı ve çevresel koşullar gibi diğer kontrol edilebilir faktörlerle birlikte boyutlarının ve kökenlerinin bir sonucu olarak geleneksel eksplantlara göre daha yüksek rejenerasyon kapasitesine sahiptir [7, 14]. TCL teknolojisi ile, bir eksplantın morfogenetik (kallogenik, kaulogenik, rizogenik, somatik embriyogenik ve floral) yolları kontrollü ve tekrarlanabilir bir şekilde manipüle edilebilmektedir [7].

TCL eksplantlarının rejenerasyon kapasitelerini etkileyen bazı faktörler mevcuttur. Bunlardan birincisi ana bitki ve orijin etkisidir [7]. Genotip (tür ve çeşit), hazırlandığı doku veya organ, ana doku veya organın yaşı, boyutu ve şekli dahil olmak üzere bir dizi biyotik faktörün tümü, doku kültüründeki başarıyı etkilemektedir [2]. TCL eksplantlarında morfogenetik kapasite bakımından en büyük fark, kaynağın vejetatif veya floral olup olmamasından kaynaklanmaktadır. TCL eksplantlarında başarıyı etkileyen bir diğer faktör bitkinin gelişim evresidir. TCL eksplantlarının morfogenetik kapasitesi için ana bitkinin hangi fizyolojik aşamada olduğu çok önemlidir. Tran Thanh Van [46] 3 farklı gelişim evresindeki floral sürgünlerin rejenerasyon potansiyellerini test etmiştir. Çalışmada tamamen açmış çiçek aşaması, yeşil meyve aşaması ve

olgunlaşmış meyve aşaması denenmiş; en başarılı sonuç yeşil meyve aşamasındaki floral sürgünlerden elde edilmiştir. Ayrıca her çiçek dalının apikal ve bazal kısımlarından alınan eksplantlar da incelendiğinde, bazal kısımdan alınan eksplantların daha yüksek floral sürgün oluşturma oranına sahip olduğu gözlenmiştir [7].

Eksplant boyutu bir diğer önemli faktördür. Gendy vd. [47]'nin yaptıkları bir çalışmada, eksplant boyutu azaldıkça eksplantların kallus oluşturma yüzdelерinin arttığı belirlenmiştir. Nhut vd. [48]'nin yaptıkları bir çalışmada ise *Lilium longiflorum*'da 0.5, 1, 2 ve 3 mm kalınlığında farklı tTCL boyutları test edilmiştir. 60 günün sonunda 0.5 mm kalınlığındaki tTCL eksplantlarının %90'ında nekroz meydana gelirken; 1, 2 ve 3 mm kalınlığındaki tTCL'lerde ise %100'lük bir hayatta kalma oranıyla en fazla sürgün ve bitki elde edilmiştir [7].

Bir diğer faktör ise eksplantın ortama uyum sağlayıcı sağlayamadığı ile ilgilidir [7]. Biyotik faktörlerin yanı sıra eksplantların kültüre alındıkları besin ortamları ve maruz bırakıldıkları kontrollü çevre koşulları da eksplantın totipotensisini (herhangi bir bitki hücresinden bütün bir bitkiyi yeniden üretme yeteneği) ve/veya multipotensisini (herhangi bir bitki hücresinden herhangi bir organı yeniden üretme yeteneği) etkilemektedir [14].

##### 5 Bitki doku kültüründe rejenerasyon kapasitesini etkileyen iki faktör: büyüme düzeltme faktörü ve geometrik faktör

Bitki doku kültüründe bir bitkinin rejenerasyon potansiyelinin çalışmadan çalışmaya farklılık göstermesinin iki olası nedeni vardır. Birincisi; tüm varlıklar eşit doğmazlar. İkincisi ise tüm eksplantlar aynı rejenerasyon kapasitesine sahip değildirler. Bir bitki doku kültürü çalışmasında eksplantın organogenik sonucunu çok sayıda faktör etkileyebilmektedir. Ancak üretim, verim ve organogenik çıktındaki farklılıkların tümü tek bir faktörle ölçülmektedir: eksplant boyutu [45].

TCL, birkaç mm kalınlığında; ancak değişken uzunluk ve çap oranlarına sahip ince bir hücre katmanıdır [14]. Bir TCL'nin *in vitro* gelişimsel başarısının sırrı, yalnızca enine veya uzunlamasına kesilerek dahil edilebilen doku tiplerine değil, aynı zamanda eksplantın alanına ve hacmine de bağlıdır [8]. Bir TCL eksplantını geleneksel bir eksplanttan ayıran en önemli faktörler; yüzey-hacim oranı, boyutu ve kalınlığıdır (Şekil 1) [14]. TCL eksplantlarının görünüşte, morfogenez üretkenlikleri geleneksel eksplantlardan daha düşüktür; ancak **büyüme düzeltme faktörü** (growth correction factor: GCF) ve **geometrik faktör** (geometric factor: GF) kavramları göz önünde bulundurulduğunda TCL eksplantlarının gerçek (potansiyel) üretkenlikleri geleneksel bir eksplantınkinden kat kat fazladır. Bu sebeple de, yaklaşık 45 yıldan fazladır TCL'ler başta süs bitkileri ve orkideler olmak üzere tarla ve sebze bitkileri, ayrıca tıbbi bitkilere de uygulanmaktadır [2].

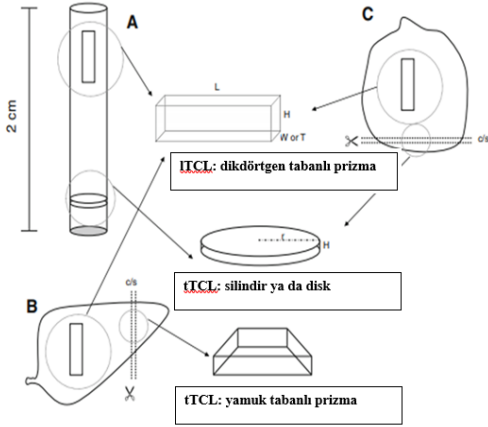
Bir eksplantın rejenerasyon kapasitesini (yani morfogenez veya organogenik potansiyelini) ölçülebilmek veya karşılaştırabilmek için iki yaklaşım mümkündür. İlki, bir eksplant tipinin rejenerasyon kapasitesini bir başka eksplantın rejenerasyon kapasitesi ile karşılaştırmaktır

(örneğin geleneksel bir eksplant ile bir tTCL veya bir ITCL'nin karşılaştırılması). Bu yaklaşım ile kültüre alınan eksplant başına rejenera olan sürgün sayısı karşılaştırılmış olunur. İkinci yaklaşım da ise kaynak organın (veya dokunun) veriminin farklı organ tipleri kullanılarak organ bazında ele alınmasıdır. Örneğin, bir organdan (yapraktan, taç yapraktan, protokorm benzeri yapıdan vb.) rejenera olan sürgünlerin sayısının karşılaştırılması. Birinci yaklaşımda eksplant verimi dikkate alınırken; ikinci yaklaşımda ise kaynak organın verimi dikkate alınmaktadır. Bir bitki doku kültürü denemesinde, araştırmacı hem rejenera organ(lar)ı oluşturan eksplantların yüzdesini hem de rejenera olan eksplant başına organ(lar)ın sayısını belirleyebilir. Bu durum, 'başarılı' rejenerasyon için iki bileşenin olduğu ve her iki yaklaşımın da doğru bir karşılaştırma seviyesi olduğu anlamına gelmektedir [14].

**Büyüme düzeltme faktörü** (GCF), iki eksplantın karşılaştırılmasında bir kaynak organdan kaç kat daha fazla hedef organın rejenera olabileceğini ifade eden orantılı bir sayıdır. GCF, herhangi bir bitki kaynak organ ya da dokusundan (örneğin yaprak, protokorm benzeri yapı-PLB, gövde, kök, apikal meristem vb.) türetilen herhangi bir eksplantın rejenerasyon kapasitesinin doğru bir şekilde karşılaştırılabilmesine izin veren yeni bir kavramdır. Aynı kültür koşulları ve deneysel prosedürlerin takip edilmesi koşulu ile, GCF; teorik olarak bir bilim insanının bir cins, tür veya çeşidin gerçek rejenerasyon kapasitesinin diğer protokollerle ve literatürde yayınlanmış olanlarla karşılaştırılmasını mümkün kılar. Genellikle protokol, eksplant boyutu ve hazırlığını içermektedir. Teoride her bir tür ya da çeşidin kendi rejenerasyon kapasitesi vardır. Çünkü eksplant tipi, konumu, yaşı, boyutu, bazal ortam, bitki büyüme düzenleyicileri, sakaroz, ışık, sıcaklık gibi birçok faktör rejenerasyon kapasitesini etkiler. Ancak iki eksplantın rejenerasyon kapasitesini karşılaştırırken eksplantların boyutu ve şekli çok önemlidir. Eksplantın rejenerasyon kapasitesinin eksplant boyutuna ve şekline bağlı olduğu; eksplant yüzeyine ve hacmine dayalı olarak da hesaplanabilen bir bileşeni vardır. Bu bileşen, **geometrik faktör** (GF) olarak tanımlanmaktadır. GF, herhangi bir *in vitro* koşuldaki bağımsızdır; sadece eksplant boyutuna, şekline ve rejenerasyon yapabilen dokuya bağlıdır [14].

Özellikle kaynak organ başına rejenera olan organların sayısı değerlendirilirse, TCL'ler gerçek rejenerasyon potansiyelleri açısından geleneksel bir eksplanttan daha üretkendir. Bu durum, GCF ve GF'nin uygulandığı üç bitki türünde (*Cymbidium* hibridi, krizantem ve elma) gösterilmiştir. GCF ve GF uygulanan bu türlerde, TCL eksplantlarının nispi üretkenliğinin, geleneksel eksplantlarınkinden 10 kat ile 13 kat arasında daha yüksek olduğu belirlenmiştir [1]. Eksplant boyutu, şekli ve hacmi hesaba katıldığında, TCL'nin üretkenliğinin geleneksel bir eksplanttan yüksek olmasının sebebi; TCL eksplantlarının kısmen daha yüksek morfogenez hücre oranına sahip olmasından ve ortam bileşenlerinin hücrelere daha kolay taşınabilmesinden kaynaklanmaktadır [8]. GCF ve GF kavramları göz önünde bulundurulduğunda; TCL'lerin gerçek veya gözlemlenen üretkenliğinin daha düşük görüldüğü durumlarda bile, geleneksel eksplantlara kıyasla

TCL'lerin daha fazla üretken oldukları belirlenmiştir [2]. Örneğin bir çalışmada X eksplantını kullanan bilim insanının 50 adet sürgün rejenerasyonu; Y eksplantını kullanan bilim insanının ise 100 adet sürgün rejenerasyonu elde ettiğini varsayalım. Y eksplantını kullanan bilim insanı, çalışmasında kullandığı protokolünün X eksplantını kullanan bilim insanının çalışmasından daha başarılı olduğunu öne sürer. Fakat bu her durumda doğru değildir. X eksplantını kullanan bilim insanı 1 mm uzunluğundaki eksplantı kullanırken, Y eksplantını kullanan bilim insanı 1 cm uzunluğunda eksplant kullandıysa bu demek oluyor ki Y eksplantı X eksplantından 10 kat büyüktür. Yani bir Y eksplantından 10 tane X eksplantı çıkarılabilir. Bu noktada eksplantların yüzey alanları dikkate alındığında; X eksplantını kullanan bilim insanının protokolü aslında Y eksplantını kullanan bilim insanının protokolüne göre verim açısından daha yüksek bir sonuç vermektedir [45].



**Şekil 1.** Enine ince hücre tabakası (tTCL) veya uzunlamasına ince hücre tabakasının (ITCL) hemen hemen her eksplant kaynağından nasıl üretilebileceğinin şematik diyagramı.

A: Herhangi bir monokotiledon veya dikotiledon bitkiden elde edilen gövde internod dokusu, çiçek sapları (pedisel/ pedikül), kökler ve apikal meristematik alanları içeren tipik kaynaklar.

B: Herhangi bir monokotiledon veya dikotiledon bitkiden elde edilen yapraklar, taç yaprakları (petal) ve çanak yaprakları (sepal) içeren tipik kaynaklar.

C: Orkideler, soğanımsı yumrular (korm), küçük soğanımsı yumrular (kormlet), yumrular (tuber) veya soğanlarda (bulb) bulunan protokorm benzeri yapılar veya yumurtalık (ovaryum) gibi yuvarlak veya kubbe benzeri organları içeren tipik kaynaklar.

A, B ve C için, ITCL eksplantı herhangi bir organın yüzeyinden (yalnızca epidermal ve subepidermal tabakalar) hazırlanırken; tTCL'de ise eksplant herhangi bir organın enine kesitiyle birkaç farklı hücre/doku tabaka tipini içerecek şekilde hazırlanır.

H: yükseklik, L: uzunluk, W veya T: genişlik veya kalınlık, r: yarıçap, c/s: doku boyunca enine kesit. Makas kesme çizgisi: enine kesit (c/s) elde etmek için eksplant üzerinde kesilecek bölgeyi göstermektedir. Küboid: Dikdörtgen tabanlı prizma; Trapezoid: Yamuk tabanlı prizma [14]

Bir başka örnek verecek olursak; bir yaprak kaynağından 2 adet geleneksel eksplant, 50 adet de TCL eksplantı elde edildiği varsayılırsa, kullanılan eksplant sayısı da dikkate alınarak **verim değerleri**, **Denklem 1** ve **Denklem 2**'deki gibi hesaplanmaktadır [45].

Geleneksel eksplant için verim değeri:

$$2 * (\%R_{conv} * SN_{conv})/100 \quad (1)$$

TCL eksplantı için verim değeri:

$$50 * (\%R_{tTCL} * SN_{tTCL})/100 \quad (2)$$

(%R<sub>conv</sub>: Geleneksel bir eksplanttan rejeneren olan sürgünlerin yüzdesi; %R<sub>tTCL</sub>: tTCL eksplantından rejeneren olan sürgünlerin yüzdesi; SN<sub>conv</sub>: Geleneksel eksplant başına rejeneren olan sürgün sayısı; SN<sub>tTCL</sub>: tTCL eksplantı başına rejeneren olan sürgün sayısı)

GF, GCF ile **Denklem 3**'de gösterildiği gibi orantılı olmalıdır. GF ve GCF arasındaki bağlantı, farklı eksplant tiplerinin rejenerasyon yüzdesidir, ancak hazırlanabilecek eksplant sayısı arasındaki farkı da dikkate almaktadır. GF ve GCF arasındaki orantılı faktör (k); besin ortamı, aydınlatma, genotip, eksplant yaşı, örneklem zamanı ve benzeri gibi rejenerasyon işleminin başarısını etkileyen diğer *in vitro* deneysel koşullara bağlıyken, eksplant büyüklüğü ve şekline bağlı değildir. Yalnızca tek bir faktör farklı ise (örneğin; bitki türü) k basitçe hesaplanır. Bununla birlikte, bir deneyde daha fazla faktör değişirse, yeni k değeri rejenerasyonun sonucunu etkileyen bu faktörlerden etkilenecektir. Başka bir deyişle, k yalnızca deneysel bir faktöre veya bitki büyüme düzenleyicileri, ışık yoğunluğu veya sıcaklık gibi bir faktördeki değişikliğe yanıt olarak deneysel şekilde belirlenebilmektedir. Yani, sadece eksplant boyutu ve şekli farklı olduğunda aynı deneysel koşullar altında (bazal ortam, bitki büyüme düzenleyicileri, sakaroz, ışık şiddeti, sıcaklık vb.) iki eksplantın karşılaştırılması durumunda k aynıdır [14].

$$GCF = k * GF * \frac{n * \%R_{tTCL}}{n * \%R_{conv}} \quad (3)$$

(GCF: Büyüme düzeltme faktörü; n: bir kaynak eksplantından teorik olarak hazırlanabilecek TCL sayısı; R: Rejenerasyon kapasitesi; %R<sub>tTCL</sub>: tTCL eksplantının rejenerasyon kapasitesi yüzdesi; %R<sub>conv</sub>: geleneksel eksplantın rejenerasyon kapasitesi yüzdesi; k: ortam, aydınlatma, genotip, eksplant yaşı, örneklem zamanı vb. deneysel koşullar; GF: Geometrik faktör) [14].

Teoriye göre, her bir kültür çeşidinin her bir eksplant tipi için kendine ait bir GCF'si vardır; çünkü eksplant tipi, konumu, yaşı, boyutunun yanı sıra besin ortamı, bitki büyüme düzenleyicileri, sükröz, ışık, sıcaklık gibi diğer birçok faktör de rejenerasyon kapasitesini etkilemektedir. Bununla birlikte, iki eksplantın rejenerasyon kapasitesini karşılaştırsak, boyutları ve şekilleri çok önemli parametrelerdir. GF ve GCF; eksplant boyutunun bilinmesi koşuluyla, farklı laboratuvarlarda *in vitro* bitki çalışmalarının doğrudan karşılaştırılmasını ve farklı eksplantlar kullanılacaksa bir rejenerasyon protokolünün teorik sonucunun tahmin edilmesini mümkün kılmaktadır. GF, yalnızca karşılaştırmak istediğimiz iki eksplantın şekline ve boyutuna bağlı olan sabit bir faktör olduğundan, farklı bitkilerden gelen aynı eksplantlar, aynı boyut ve şekle sahip olmaları koşuluyla ve eğer aynı doku tipi/tyiplerinden rejenerasyon meydana geldiyse doğrudan karşılaştırılabilirler. GCF ise besin ortamı, aydınlatma vb.

gibi diğer tüm deneysel faktörlerin aynı olması koşuluyla aynı bitkiden farklı eksplantların karşılaştırılmasına veya aynı eksplant türleri için farklı protokollerin karşılaştırılmasına izin vermektedir [14].

GCF ve GF kavramlarını birkaç örnek üzerinden inceleyelim. İlk olarak bir denemede 9 tane *Cymbidium* çeşidi kullanılmıştır. *Cymbidium* bitkisinde organogenez epidermal veya subepidermal hücrelerden meydana gelirken; mezofil hücrelerinden ise meydana gelmemiştir. Bu nedenle; bu denemede bitkinin tüm yüzey alanı değil, yalnızca bir eksplantın epidermal yüzey alanının ve epidermal hacminin rejenerasyon kapasitesini etkilediği göz önünde bulundurulmuştur. Bu çalışmada tTCL ve ITCL eksplantları geleneksel eksplanttan hazırlanmıştır. Geleneksel eksplant olarak yarım küre şeklindeki protokorm benzeri yapı (PLB) kullanılmıştır. tTCL eksplantı silindirik şekilde; ITCL eksplantı ise dikdörtgen tabanlı prizma şeklinde kesilmiştir. Geleneksel eksplant ve TCL eksplantları başına gelişen PLB sayısını karşılaştırırken aşağıdaki Denklem 4 ve Denklem 5 kullanılmaktadır. Bu iki denklemi incelediğimiz zaman, geometrik faktörün hem TCL eksplantlarından hem de geleneksel eksplanttan elde edilen PLB sayısı ile doğru orantılı olduğu görülmektedir [14].

$$PLB_{tTCL} = GF * k * PLB_{conv} \quad (4)$$

$$PLB_{ITCL} = GF * k * PLB_{conv} \quad (5)$$

( $PLB_{tTCL}$ : tTCL eksplantı başına gelişen PLB sayısı;  $PLB_{ITCL}$ : ITCL eksplantı başına gelişen PLB sayısı;  $PLB_{conv}$ : geleneksel eksplant başına gelişen PLB sayısı; GF: geometrik faktör; k: ortam, aydınlatma, genotip, eksplant yaşı, örnekleme zamanı vb. deneysel koşullar)

Silindirik şeklindeki tTCL eksplantının geometrik faktörü hesaplanırken Denklem 6 kullanılır. Denklemde silindirik şekilde olan tTCL eksplantının alanı, hacmi ve yarım küre şeklinde geleneksel PLB eksplantının alanı, hacmi hesaba katıldığında Denklem 6a elde edilir [14].

$$GF_{tTCL} = \frac{A_{tTCL}}{\frac{V_{tTCL}}{A_{conv}}} \quad (6)$$

$$GF_{tTCL} = \frac{2 * \pi * r_{tTCL} * h}{\frac{2 * \pi * r_{tTCL}^2 * h}{\frac{2}{3} * \pi * r_{conv}^3}} \quad (6a)$$

( $GF_{tTCL}$ : tTCL eksplantının geometrik faktörü;  $A_{tTCL}$ : tTCL eksplantının alanı;  $V_{tTCL}$ : tTCL eksplantının hacmi;  $A_{conv}$ : Geleneksel eksplantın alanı;  $V_{conv}$ : geleneksel eksplantın hacmi;  $r_{tTCL}$ : tTCL eksplantının yarıçapı;  $r_{conv}$ : geleneksel eksplantın yarıçapı; h: yükseklik)

9 farklı *Cymbidium* çeşidinin kullanıldığı aynı denemede tTCL eksplantı oluşturmak için geleneksel eksplantın sadece merkezi kısmının kullanıldığı bilindiği için tTCL eksplantının ve geleneksel eksplantın yarıçapları eşittir

( $r_{tTCL}=r_{conv}$ ). Denklem 6a'da sadeleştirme işlemleri yapıldığında  $GF_{tTCL}$  değerinin 2/3 olduğu bulunur. Geleneksel eksplant yarım küre şeklindeyse, tTCL eksplantı silindirik şekilde kesilmişse ve tTCL eksplantını oluşturmak için geleneksel eksplantın sadece merkezi kısmı kullanılmışsa GF değeri her zaman 2/3 çıkar [14].

GCF değerini hesaplamak için Denklem 3 kullanıldığında aşağıdaki şekilde Denklem 3a elde edilir. n değeri bu deney için 1 olarak alınır ve GF değeri de 2/3 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler Denklem 3a'da yerine konulduğunda Denklem 3b elde edilir. Bu örnekte sadece *Cymbidium* çeşitlerinin farklı olduğu bilindiğine göre denklemdeki k değeri sadece çeşite bağlı olarak değişen bir değişkendir. tTCL eksplantı başına gelişen PLB sayısı ve yüzdesinin bilinmesi durumunda GCF ve k değerleri sayısal olarak hesaplanabilir [14].

$$\frac{PLB_{tTCL}}{PLB_{conv}} = GCF \frac{\%PLB_{conv}}{n * \%PLB_{tTCL}} = k * GF \quad (3a)$$

$$\frac{PLB_{tTCL}}{PLB_{conv}} = GCF \frac{\%PLB_{conv}}{\%PLB_{tTCL}} = k * 2/3 \quad (3b)$$

( $PLB_{tTCL}$ : tTCL eksplantlarından elde edilen PLB sayısı;  $PLB_{conv}$ : geleneksel eksplanttan gelişen PLB sayısı; GCF: büyüme düzeltme faktörü;  $\%PLB_{conv}$ : geleneksel eksplanttan elde edilen PLB yüzdesi;  $\%PLB_{tTCL}$ : tTCL eksplantlarından elde edilen PLB yüzdesi; n: geleneksel bir eksplanttan oluşturulabilecek TCL eksplantı sayısı; GF: geometrik faktör; k: ortam, aydınlatma, genotip, eksplant yaşı, örnekleme zamanı vb. deneysel koşullar)

Dikdörtgen tabanlı prizma şeklindeki ITCL eksplantının GF değeri hesaplanırken Denklem 7 kullanılır. Denklemde dikdörtgen tabanlı prizma şeklinde olan ITCL eksplantının alanı, hacmi ve yarım küre şeklinde geleneksel PLB eksplantının alanı, hacmi hesaba katıldığında Denklem 7a elde edilir. Bu denklemde GF değerinin ITCL eksplantlarının kalınlığına ve geleneksel eksplantın yarıçapına bağlı olduğu belirlenmiş olur. Geleneksel eksplant yarım küre şeklindeyse, ITCL eksplantı dikdörtgen tabanlı prizma şeklinde kesilmişse ve rejenerasyon sadece epidermisten meydana geldiğinde ITCL eksplantı için GF değeri her zaman Denklem 7a'daki gibi çıkar [14].

$$GF_{ITCL} = \frac{A_{ITCL}}{\frac{A_{conv}}{V_{conv}}} \quad (7)$$

$$GF_{ITCL} = \frac{l * w}{\frac{l * w * h_{ITCL}}{\frac{2}{3} * \pi * r_{conv}^3}} = \frac{r_{conv}}{3 * h_{ITCL}} \quad (7a)$$

( $GF_{ITCL}$ : ITCL eksplantının geometrik faktörü;  $A_{ITCL}$ : ITCL eksplantının alanı;  $V_{ITCL}$ : ITCL eksplantının hacmi;  $A_{conv}$ : geleneksel eksplantın alanı;  $V_{conv}$ : geleneksel eksplantın hacmi; l: uzunluk; w: kalınlık;  $h_{ITCL}$ : ITCL eksplantının yüksekliği;  $r_{conv}$ : geleneksel eksplantın yarıçapı)



GCF değerini hesaplamak için **Denklem 3** kullanıldığında **Denklem 3c** elde edilir. **Denklem 3c**'de yukarıda hesaplanan GF değeri yerine yazıldığında ve iki eksplant tipi için de PLB oluşma yüzdesi %100 olarak alındığında **Denklem 3d** elde edilir [14].

$$\frac{PLB_{ITCL}}{PLB_{conv}} = GCF \frac{\%PLB_{conv}}{n * \%PLB_{ITCL}} = k * GF \quad (3c)$$

$$\frac{GCF}{n} = k * \frac{r_{conv}}{3 * h_{ITCL}} \quad (3d)$$

( $PLB_{ITCL}$ : ITCL eksplantından gelişen PLB sayısı;  $PLB_{conv}$ : geleneksel eksplanttan gelişen PLB sayısı; GCF: büyüme düzeltme faktörü;  $\%PLB_{conv}$ : geleneksel eksplanttan gelişen PLB yüzdesi;  $\%PLB_{ITCL}$ : ITCL eksplantından gelişen PLB yüzdesi; GF: geometrik faktör; k: ortam, aydınlatma, genotip, eksplant yaşı, örnekleme zamanı vb. deneysel koşullar; n: geleneksel eksplanttan elde edilen TCL eksplantı sayısı;  $r_{conv}$ : geleneksel eksplantın yarıçapı;  $h_{ITCL}$ : ITCL eksplantının yüksekliği)

İkinci örnek olarak *Chrysanthemum* bitkisi kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışma ele alındığında, *Chrysanthemum* bitkisinde de *Cymbidium* bitkisinde olduğu gibi organogenez; epidermal ve subepidermal hücrelerden meydana gelirken, mezofil hücrelerinden ise meydana gelmemektedir. Bu nedenle bir önceki örnekte olduğu gibi eksplantın epidermal yüzey alanı rejenerasyon kapasitesini etkilemektedir. Bu çalışmada tTCL ve ITCL eksplantları geleneksel internod eksplantlarından hazırlanmıştır. Geleneksel internod eksplantı yarım silindir şeklinde, tTCL eksplantı silindir şeklinde ve ITCL eksplantı ise dikdörtgen tabanlı prizma şeklindedir [14].

Silindir şeklindeki tTCL eksplantının geometrik faktörü hesaplanırken **Denklem 6** kullanılır. Denklemde silindir şeklinde olan tTCL eksplantının alanı, hacmi ve yarım silindir şeklindeki geleneksel internod eksplantının alanı, hacmi hesaba katıldığında **Denklem 6b** elde edilir. Geleneksel eksplantın sadece merkezi kısmı kullanıldığında geleneksel eksplantın yarıçapı ve tTCL eksplantının yarıçapı eşit olduğu için **Denklem 6b**'de gerekli sadeleştirmeler yapıldığında GF değeri 1 çıkar. Bu yüzden GF değerinin hesaplanması için **Denklem 8** kullanılır. **Denklem 8** incelendiğinde GF'nin her iki eksplantın da uzunluğuna bağlı olduğu belirlenmiş olur. Geleneksel eksplant yarım silindir şeklinde olduğunda, tTCL eksplantı bu yarım silindir şeklindeki geleneksel eksplantla aynı yarıçapta kesilmiş bir silindir şeklinde olduğunda ve rejenerasyon sadece epidermal ve subepidermal hücrelerden gerçekleştiğinde **Denklem 8**'de elde edilen GF değeri her zaman doğru olur [14].

$$GF_{tTCL} = \frac{\frac{2 * \pi * h_{tTCL}}{\pi * r^2 * h_{tTCL}}}{\frac{2 * \pi * r * h_{conv}}{\pi * r^2 * h_{conv}}} = \frac{\frac{2}{r}}{\frac{2}{r}} = 1 \quad (6b)$$

$$GF_{tTCL} = \frac{A_{tTCL}}{A_{conv}} = \frac{2 * h_{tTCL}}{h_{conv}} \quad (8)$$

( $GF_{tTCL}$ : tTCL eksplantının geometrik faktör değeri;  $h_{tTCL}$ : tTCL eksplantının yüksekliği;  $h_{conv}$ : geleneksel eksplantın yüksekliği; r: eksplantın yarıçapı;  $A_{tTCL}$ : tTCL eksplantının alanı;  $A_{conv}$ : geleneksel eksplantın alanı)

Dikdörtgen tabanlı prizma şeklindeki ITCL eksplantının GF değeri hesaplanırken **Denklem 7** kullanılır. Denklemde dikdörtgen tabanlı prizma şeklinde olan ITCL eksplantının alanı, hacmi ve yarım silindir şeklindeki geleneksel internod eksplantının alanı, hacmi hesaba katıldığında **Denklem 7b** elde edilir. **Denklem 7b** incelendiğinde GF değerinin geleneksel eksplantın yarıçapına ve ITCL eksplantının kalınlığına bağlı olduğu görülmektedir. ITCL eksplantı yarım silindir şeklindeki geleneksel eksplanttan dikdörtgen tabanlı prizma şeklinde kesildiyse ve rejenerasyon sadece epidermal ve subepidermal yüzeyde gerçekleştiyse elde edilen GF değeri her zaman doğru olur [14].

$$GF_{ITCL} = \frac{\frac{l * w}{l * w * h_{ITCL}}}{\frac{\pi * r * h_{conv}}{\frac{1}{2} * \pi * r^2 * h_{conv}}} = \frac{r}{2 * h_{ITCL}} \quad (7b)$$

( $GF_{ITCL}$ : ITCL eksplantının geometrik faktörü; l: uzunluk; w: kalınlık;  $h_{ITCL}$ : ITCL eksplantının yüksekliği;  $h_{conv}$ : geleneksel eksplantın yüksekliği; r: yarıçap)

GCF değerini hesaplarırken **Denklem 3** temel alınarak **Denklem 9** kullanılır. SR% değeri her iki eksplant tipi için de %100 olduğu durumda; **Denklem 9a** elde edilir [14].

$$\frac{SN_{TCL}}{SN_{conv}} = GCF \frac{\%SR_{conv}}{n * \%SR_{TCL}} = k * GF \quad (9)$$

$$GCF = n * k * GF \quad (9a)$$

( $SN_{TCL}$ : TCL eksplantlarından elde edilen sürgün sayısı;  $SN_{conv}$ : geleneksel eksplanttan elde edilen sürgün sayısı; GCF: büyüme düzeltme faktörü;  $\%SR_{conv}$ : geleneksel eksplanttan elde edilen sürgün rejenerasyon yüzdesi;  $\%SR_{TCL}$ : TCL eksplantlarından elde edilen sürgün rejenerasyon yüzdesi; GF: geometrik faktör; k: ortam, aydınlatma, genotip, eksplant yaşı, örnekleme zamanı vb. deneysel koşullar; n: geleneksel eksplanttan elde edilen TCL eksplantı sayısı)

## 6 Sonuç

İnce ya da ultra ince eksplantları ifade eden TCL eksplantlarının geleneksel bir eksplanttan çok daha fazla oranda organ ve embriyo rejenerasyonunu (kallus, kök, sürgün, çiçek ve somatik embriyo vb.) indükleyebildiği birçok çalışmada rapor edilmiştir. TCL eksplantları 100'ü aşkın bitki türü için yararlı alternatif eksplantlar olarak kullanılmıştır. Çoğu durumda organ hedefli rejenerasyon, diğer abiyotik ortam ve kültürle ilgili koşullar optimize edildikten sonra TCL'lerin kullanılmasıyla mümkün olabilmektedir. TCL tekniği az miktarda bitki materyali ve besin ortamı gerektirdiği için rejenerasyon ve transformasyonun temel ve uygulamalı yönlerinin incelenmesi açısından basitleştirilmiş bir sistem

sağlamaktadır. Bir TCL eksplantının gerçek rejenerasyon potansiyelini belirleyebilmek için büyüme düzeltme faktörü ve geometrik faktör göz önünde bulundurulmalıdır. Geometrik faktör, farklı bitkilerden alınan aynı boyut ve şekile sahip eksplantların rejenerasyon potansiyellerinin karşılaştırılabilmesini mümkün kılarken; büyüme düzeltme faktörü ise tüm deneysel koşulların aynı olduğu durumda aynı bitkiden alınan farklı eksplant tiplerinin rejenerasyon kapasitelerinin karşılaştırılmasına imkan vermektedir. Bu iki kavram sayesinde farklı laboratuvarlarda çalışan insanların aynı deney sonucuna ulaşmaları mümkündür. TCL tekniğinin, yalnızca doku kültürü ve *in vitro* rejenerasyon için değil; aynı zamanda kriyoprezervasyon, *in vitro* seleksiyon, *in vitro* mutagenез ve genetik transformasyon gibi uygulamalı biyoteknolojik çalışmalarda da parlak bir geleceği olduğu açıktır.

#### Çıkar çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

**Benzerlik oranı (iThenticate):** %1

#### Kaynaklar

- [1] J. A. Teixeira da Silva and J. Dobránszki, Recent advances and novelties in the thin cell layer-based plant biotechnology – A mini-review. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 100 (1), 89–96, 2019. <https://doi.org/10.5114/bta.2019.83215>.
- [2] J. A. Teixeira da Silva and J. Dobránszki, Plant thin cell layers: update and perspectives. *Folia Horticulturae*, 27/2, 183-190, 2015. <https://doi.org/10.1515/fhort-2015-0029>.
- [3] J. A. Teixeira da Silva, Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology, *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), 683-691, 2003. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1125>.
- [4] L. A. Croom, C. L. Jackson, B. N. Vaidya, P. Parajuli and N. Joshee, Thin Cell Layer (TCL) Culture System for Herbal Biomass Production and Genetic Transformation of *Bacopa monnieri* L. *Wettst. American Journal of Plant Sciences*, 7, 1232-1245, 2016. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2016.78119>.
- [5] D. T. Nhut, N. T. Hai, N. T. Don, J. A. Teixeira da Silva and K. Tran Thanh Van, Latest Applications of Thin Cell Layer (TCL) Culture Systems in Plant Regeneration and Morphogenesis. in: J. A. Teixeira da Silva (Eds.), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (Vol 2)*, Global Science Books, pp.465-471, London, 2006.
- [6] N. Sabooni and A. Shekafandeh, Somatic embryogenesis and plant regeneration of blackberry using the thin cell layer technique, 130, 313–321, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1225-4>.
- [7] D. T. Nhut, J. A. Teixeira D Silva and C. R. Aswat, The importance of the explant on regeneration in thin cell layer technology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 39, 266–276, 2003. <https://doi.org/10.1007/IVP2002408>.
- [8] J. Teixeira Da Silva, M. M. Altamura and J. Dobránszki, The untapped potential of plant thin cell layers. *Journal of Horticultural Research*, 23(2), 127-131, 2015. <https://doi.org/10.2478/johr-2015-0024>.
- [9] P. Bhattacharyya, P. Paul, S. Kumaria and P. Tandon, Transverse thin cell layer (t-TCL)-mediated improvised micropropagation protocol for endangered medicinal orchid *Dendrobium aphyllum* Roxb: an integrated phytomolecular approach. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40:137, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2703-y>.
- [10] S. M. Vudala, A. A. Padiyal and L. L. F. Ribas, Micropropagation of *Hadrolaelia grandis* through transverse and longitudinal thin cell layer culture. *South African Journal of Botany*, 121, 76-82, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.017>.
- [11] J. Teixeira Da Silva, Thin cell layer technology for induced response and control of rhizogenesis in chrysanthemum. *Plant Growth Regulation*, 39, 67–76, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1021854320969>.
- [12] J. A. Teixeira da Silva, Plant Thin Cell Layers: Challenging the Concept. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 2 (1), 79-81, 2008.
- [13] J. A. Teixeira da Silva and J. Dobránszki, Plant Thin Cell Layers: A 40-Year Celebration. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32, 922–943, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9336-6>.
- [14] J. A. Teixeira da Silva and J. Dobránszki, Dissecting the Concept of the Thin Cell Layer: Theoretical Basis and Practical Application of the Plant Growth Correction Factor to Apple, *Cymbidium* and *Chrysanthemum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33, 881–895, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9437-x>.
- [15] J. A. Teixeira Da Silva, Thin Cell Layers: Power-Tool for Organogenesis of Floricultural Crops. in: S. M. Jain and S. J. Ochatt (Eds.), *Protocols for in Vitro Propagation of Ornamental Plants, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC, Springer, pp. 377-397, 2010.
- [16] K. M. Monja-Mio and M. L. Robert, Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In vitro cell and developmental biology-Plant*, 49, 541–549, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>.
- [17] I. M. Hidayat, The use of thin cell layer (TCL) explants in micropropagation of shallot (*Allium ascalonicum* L.). VII International Symposium on Edible Alliaceae, pp. 251-258, Niğde, Turkey, 2016.
- [18] L. Tubic, J. Savic, N. Mitic J. Milojevic, D. Janosevic, S. Budimir and S. Zdravkovic'-Korac, Cytokinins differentially affect regeneration, plant growth and antioxidative enzymes activity in chive (*Allium schoenoprasum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124, 1–14, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0869-1>.
- [19] H. T. Tung, H. T. Van, H. G. Bao, L. T. Bien, H. D. Khai, V. Q. Luan, D. M. Cuong, T. H. Phong and D. T.

- Nhut, Silver nanoparticles enhanced efficiency of explant surface disinfection and somatic embryogenesis in *Begonia tuberosa* via thin cell layer culture. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 19(2), 337-347, 2021. <https://doi.org/10.15625/1811-4989/15872>.
- [20] A. B. Ghnaya, G. Charles and M. Branchard, Rapid shoot regeneration from thin cell layer explants excised from petioles and hypocotyls in four cultivars of *Brassica napus* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92, 25–30, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9298-0>.
- [21] M. Ekmekçigil, M. Bayraktar, Ö. Akkuş, A. Gürel, High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii* Lindl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 136, 451–464, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1526-2>.
- [22] S. Vyas, S. Guha, P. Kapoor and U. Rao, Micropropagation of *Cymbidium Sleeping Nymph* through protocorm-like bodies production by thin cell layer culture. *Scientia Horticulturae*, 123 (4), 551-557, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.11.020>.
- [23] S. Parthibhan, M. V. Rao, J.A. Teixeira Da Silva and T. S. Kumar, Somatic embryogenesis from stem thin cell layers of *Dendrobium aqueum*. *Biologia Plantarum*, 62 (3), 439-450, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0769-4>.
- [24] P. Zhao, W. Wang, F. S. Feng, F. Wu, Z. Q. Yang and W. J. Wang, High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium Candidum* Wall Ex Lindl. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 90:131–139, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9181-4>.
- [25] B. V. Le, M. Jeanneau, N. T. Do My, J. Vidal, K. T. Thanh Vân, Rapid regeneration of whole plants in large crabgrass (*Digitaria sanguinalis* L.) using thin-cell-layer culture. *Plant Cell Reports*, 18, 166–172, 1998. <http://dx.doi.org/10.1007/s002990050551>.
- [26] S. K. Singh, M. K. Rai and L. Sahoo, An improved and efficient micropropagation of *Eclipta alba* through transverse thin cell layer culture and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 328-333, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.005>.
- [27] J. E. Scherwinski-Pereira, R. S. da Guedes, P.C. P. Fermino Jr, T. L. Silva and F. H. S. Costa, Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In vitro cell and developmental biology-Plant*, 46, 378–385, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9279-6>.
- [28] R. Abdolinejad, A. Shekafandeh, A. Jowkar, A. Gharaghani and A. Alemzadeh, Indirect regeneration of *Ficus carica* by the TCL technique and genetic fidelity evaluation of the regenerated plants using flow cytometry and ISSR. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 143, 131–144, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01903-5>.
- [29] C. N. Mendoza-Pena and A. K. Hvoslef-Eide, A novel genotype-independent technique for successful induction of somatic embryogenesis of adult plants of *Jatropha curcas* L. using petiole transverse Thin Cell Layer (TCL). *African Journal of Biotechnology*, 20(2), 85-91, 2021. <https://doi.org/10.5897/AJB2020.17232>.
- [30] D. T. Nhut, B. V. Le, N. T. Minh, J. Teixeira de Silva, S. Fukai, M. Tanaka and K. Tran Thanh Van, Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regulation*, 37, 193–198, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1020532511081>.
- [31] B. Bose, S. Kumaria, H. Choudhury and P. Tandon, Insights into nuclear DNA content, hydrogen peroxide and antioxidative enzyme activities during transverse thin cell layer organogenesis and *ex vitro* acclimatization of *Malaxis wallichii*, a threatened medicinal orchid. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(4):955-968, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0474-3>.
- [32] D. T. Nhut, B. V. Le and K. Tran Thanh Van, Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) using thin cell layer culture of apical meristematic tissue. *Journal Of Plant Physiology*, 157, 559-565, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80112-1](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80112-1).
- [33] R. Ghahremani, S. D. Daylami, M. Mirmasoumi, N. Askari and K. Vahdati, Refining a protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration of *Phalaenopsis amabilis* cv. Jinan from mature tissues. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 45, 356-364, 2021.
- [34] M. H. Cruz de Carvalho, B. Van Le, Y. Zuily-Fodil, A. T. Pham Thi and K. Tran Thanh Van, Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science*, 159, 223 – 232, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00346-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00346-0).
- [35] M. A. Ramirez-Mosqueda, L. G. Iglesias-Andreu, A. A. Armas-Silva, E. J. Cruz-Gutierrez, J. F. de la Torre-Sanchez, O. R. Leyva-Ovalle and C. M. Galan-Paez, Effect of the thin cell layer technique in the induction of somatic embryos in *Pinus patula* Schl. et Cham. *Journal of Forestry Research*, 30, 1535–1539, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0663-0>.
- [36] B. N. Vaidya, C. L. Jackson, Z. D. Perry, S. A. Dhekney and N. Joshee, Agrobacterium-mediated transformation of thin cell layer explants of *Scutellaria ocmulgee* small: a rare plant with anti-tumor properties. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127, 57–69, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1029-y>.
- [37] B. Chattopadhyaya, J. Banerjee, A. Basu, S. K. Sen and M. K. Maiti, Shoot induction and regeneration using internodal transverse thin cell layer culture in *Sesamum indicum* L. *Plant Biotechnology Reports*, 4, 173–178, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11816-010-0133-4>.
- [38] S. K. Singh, M. K. Rai, P. Asthana and L. Sahoo, An improved micropropagation of *Spilanthes acmella* L. through transverse thin cell layer culture. *Acta*

- Physiologiae Plantarum, 31, 693–698, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0280-9>.
- [39] M. A. Ramirez-Mosqueda and L. G. Iglesias-Andreu, Direct Organogenesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni Using Thin Cell Layer (TCL) Method. Sugar Tech, 18, 424–428, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12355-015-0391-0>.
- [40] J. Swarna and R. Ravindhran, In vitro organogenesis from leaf and transverse thin cell layer derived callus cultures of *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd. Plant Growth Regulation, 70, 79–87, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9780-5>.
- [41] P. Baskaran, A. Kumari and J. V. Staden, In vitro propagation via organogenesis and synthetic seeds of *Urginea altissima* (L.f.) Baker: a threatened medicinal plant. 3 Biotech, 8, 18, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1028-7>.
- [42] B. V. Le, M. H. Cruz de Carvalho, Y. Zuily-Fodil, A. T. Pham Thi and K. Tran Thanh Van, Direct whole plant regeneration of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] from cotyledonary node thin cell layer explants. Journal of Plant Physiology, 159, 1255-1258, 2002. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00789>.
- [43] J. A. Teixeira da Silva, The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 113, 149–161, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0274-y>.
- [44] P. Azadi, K. Bagheri, M. Gholami, M. Mirmasoumi, A. Moradi and A. Sharafi, Thin Cell Layer, a Suitable Explant for In vitro Regeneration of Saffron (*Crocus sativus* L.). Journal of Advanced Studies in Topology, 19(6), 1429-1435, 2017.
- [45] J. A. Teixeira da Silva and J. Dobránszki, The Plant Growth Correction Factor. I. The Hypothetical and Philosophical Basis. International Journal of Plant Developmental Biology, 5 (1), 73-74, 2011.
- [46] F. Jullien and K. Tran Thanh Van, Micropropagation and embryoid formation from young leaves of *Bambusa glaucescens* ‘Golden goddess’. Plant Science, 98, 2, 199-207, 1994. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90010-8).
- [47] C. Gendy, M. Sene, B. V. Le, J. Vidal, and K. Tran Thanh Van, Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Plant Cell Reports, 15, 900-904, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF00231584>.
- [48] D. T. Nhut, B. V. Le, S. Fukai, M. Tanaka and K. Tran Thanh Van, Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. Plant Growth Regulation, 33, 59–65, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1010701024963>.
- [49] N. Çetin, B. Güler, A. Gürel, In Vitro Regeneration Potential of Thin Cell Layer Explants of Lentisk (*Pistacia lentiscus* var. Chia) Plant. Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 8(2), 960-977, 2021. <https://doi.org/10.35193/bseufbd.947888>.
- [50] M. I. Kozgar and S. Khan, Induced mutagenesis in crop plants. in: M. I. Kozgar and S. Khan (Eds.), Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability, Global Science Books, 6 (Special Issue 1), pp. 1-118.
- [51] S. Sharma, A. Shahzad, J. A. Teixeira da Silva, Synseed technology—A complete synthesis. Biotechnology Advances, 31, 186-207, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.007>

