

BİYOTEKNOLOJİ VE BİTKİ ISLAHINDAKİ KULLANIM ALANLARI

İlknur AKGÜN⁽¹⁾ Metin TOSUN⁽¹⁾ Sevim SAĞSÖZ⁽¹⁾

ÖZET: *Bitki ıslahı alanındaki biyoteknolojik çalışmalar doku kültürü uygulamaları ve rekombinant DNA teknolojisi olarak gruplandırılabilir. Doku kültürü teknikleri hastalısız bitki elde etme, hızlı üretim, türler ve cinsler arası melezlemelerin yapılması ve embriyolarının yaşatılması, bükilerde ıslah süresinin kısaltılması ve mutasyon yaratma gibi birçok alanda kullanılmaktadır.*

Bitkisel üretimin artırılmasında en ilgi çeken diğer bir biyoteknolojik yöntem de rekombinant DNA teknolojisidir. Bu teknikle bükiler arasında doğrudan gen aktarımı yapılabildiği gibi birbiri ile ilişkisiz olan bir organizmadan, diğer bir organizmaya tek gen yada gen gruplarının transferi mümkündür. Bitki ıslahında dayanıklı varyetelerin geliştirilmesi, nitrojen fikse eden genlerin baklagil olmayan bitkilere aktarılması, fotosentetik etkinliğin artırılması ile verim artışının sağlanması, besin kalitesinin yükseltilmesi gibi daha bir çok alanda rekombinant DNA teknolojisi çalışmaları sürdürülmektedir.

BIOTECHNOLOGY AND ITS APPLICATION IN PLANT BREEDING

SUMMARY: *Applications of biotechnology in plant breeding include tissue culture and recombinant DNA technics. Tissue culture technics have a wide range of uses such as production of disease-free plants, rapid plant regeneration, inter- and intra-specific crosses, retesining embryo viability, providing short-cut variety development and inducing plant mutations.*

The other application of biotechnological technics in improving of plant production is recombinant DNA technics. Gene transfer is directly achieved between plant as well as between organisms not inter-related. Applications of recombinant DNA technics on the development of resistant cultivars also include the transfer of Nif genes of legumes to non legume plant, high plant productivity through increasing photosentetic efficiency and enhancing of food quality.

GİRİŞ

Tarımsal alanların genişletilmesinin zor hatta imkansız olduğu günümüzde, birim alandan daha fazla ürün elde etmek, maliyeti düşürmek ve kaliteyi yükseltmek, insan beslenmesi yönünden büyük önem taşımaktadır. Bu konuda biyoteknolojik uygulamalar büyük kolaylıklar sağlayacaktır. Biyoteknolojiden bitki ıslahında faydalanılması yanında, insan ve hayvan sağlığı, çevre koruma, madencilik, alternatif enerji kaynakları yaratma, kimya ve gıda sanayisinde olmak üzere birçok alanda yararlanılmaktadır.

⁽¹⁾ Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü.

Bitki ıslahında uygulanan biyoteknolojik çalışmalar iki ana grup altında toplanabilir.

1- Doku Kültürü Uygulamaları

2- Genetik Mühendisliği yada Rekombinant DNA teknolojisi

1- DOKU KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

Klasik bitki ıslahı yöntemlerini içeren seleksiyon, melezleme, poliploidi, suni mutasyonlar ve erkek kısırılığını kapsayan konularda bir hayli yol alınmış olmasına karşın sitoplazma ile taşınan plazmotipler arasında transferler mümkün olmamıştır. Bitki ıslahında kaydedilen ilerlemelerin son halkalarından birisi olan doku kültürü uygulamaları ile bu tip çalışmalar yapılabilmektedir. Özellikle bitki üretimi için besin ortamlarının belirlenmesinden sonra, doku kültürü uygulamaları büyük bir hız kazanmış ve birçok bitkide yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Bitki ıslahı programlarında potansiyel kullanım alanına sahip, doku kültürü yöntemleri aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1. Embriyo Kültürü

Embriyonun yumurtalık içerisinden izole edilerek özel bir gıda ortamında çimlendirilip geliştirilmesine embriyo kültürü denir. Bitki yetiştiriciliğinde embriyo kültürü çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır (Gönülşen, 1987).

a. Döllenmeden tohum olgunluğuna kadar geçen gelişme devrelerinin incelenmesi: Bitkilerde morfogenezini anlamak için zigotun oluşmasından sonraki devrelerde meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi gerekmektedir. Normal olarak bitki üzerinde embriyo gelişmesinin izlenmesi zordur. Oysa kültüre alınmış genç bir yumurtalık bu konuda iyi bir araştırma materyali oluşturabilmektedir.

b. Tohum dormansisini kırmak: Bazı tohumlar, çimlenmeden önce tohum kabuğu veya endospermden kaynaklanan uzun bir süre dormansi dönemine gereksinim duymakta ve dormansinin kırılması için bazı ön işlemleri gerektirmektedir. Embriyo kültürü ile herhangi bir ön işlem uygulanmadan, çimlenme sağlanabilmektedir. Gül, elma, yağ palmiyesi ve iris tohumlarında dormansiyi kırmak için embriyo kültürü kullanılmıştır (Pierik, 1989). Yine bu metod, tohum canlılığını saptamada kullanılan yöntemlerden birisidir (Sağsöz, 1995).

c. Embriyo dejenerasyonunun önlenmesi: Melezlenmesi zor olan uzak akraba türlerin melezlenmesinde veya cinsler arası melezlemelerde embriyo kültürü kullanılmaktadır. Hibrid embriyo, endosperm tarafından yeteri kadar beslenemediğinden gelişememekte veya canlı tohum oluşturma yeteneğini kaybetmektedir. Bu durumlarda embriyo yumurtalıktan alınarak kültür ortamında yaşamını sürdürmesi sağlanmaktadır. Embriyo kültürü bu amaçla keten, domates, pamuk arpa ve çeltik türleri arasındaki interspesifik, *Hordeum x Secale*, *Triticum x*

Secale ve arpa ile çavdarın diploid ve tetraploidleri arasındaki *intergenetik* melezlemelerde sıklıkla kullanılmaktadır (Pierik, 1989).

d. Besi dokusu çok küçük veya hiç olmayan tohumların geliştirilmesi: Orkide tohumları gibi besin rezervleri çok az veya hiç olmayan bitkilerin tohumlarının yetiştirilmesinde embriyo kültürü yöntemi kullanılmaktadır (Pierik,1989).

e. Haploidlerin üretimi: *Hordeum vulgare* x *H.bulbosum* melezlerinin elde edilmesinden sonra *H. bulbosumun* 'un kromozomları elemine olur ve geriye *H. vulgare* 'nin haploid embriyosu kalır. Bu embriyo yalnızca embriyo kültürü ile yaşatılabilir (Pierik,1989). Benzer metot kullanılarak *Nicotiana tabacum* x *N. africana*, *Solanum tuberosum* x *S. phurjea*, *Medicago sativa* x *M. falcata* arasındaki melezlemelerde haploidler elde edilmiştir (Mantell ve ark., 1985).

f. Vejetatif üretim: Bazı familyalara (Gramineae ve Conifereae) ait türlerin embriyoları vejetatif üretimde başlangıç materyeli olarak kullanılabilir (Pierik, 1989).

2. Meristem Kültürü

Meristem devamlı olarak bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerin oluşturduğu dokudur. Bu doku birkaç yaprak taslağı ile birlikte binoküler mikroskop altında izole edilip, uygun gıda ortamına yerleştirilerek meristem kültürü oluşturulmaktadır.

Meristem kültüründen değişik amaçlar için yararlanmak mümkündür.

1. Hastaliksız ve virüssüz bitki üretimi: Meristem kültürü hastalık etmenlerinden arındırılmış fidecikler elde etmek için kullanılmaktadır. Meristem dokularının virüslerden arınmış olmasının nedenleri şöyle sıralanabilir.

a. Meristem dokularının pul, tüğ ve yaprak taslakları tarafından korunmuş olması,

b. Bu dokuların auxin ve cytokinin zengin olması ve bu hormonların da virüslerin çoğalmasını engelleyici etki yapması (Quak, 1977),

c. Meristematik dokularda virüslerin çoğalması için gerekli enzimlerin bulunmaması (Mellor ve Stace-Smith, 1969),

d. Meristematik dokularda doğal olarak ortaya çıkan inhibitörlerin varlığıdır (Pierik, 1989).

Değişik bitkiler üzerinde çalışan birçok araştırmacı meristem kültürü ile virüssüz bitki elde konusunda başarılı sonuçlar almışlardır. (Çilek (Adams, 1972), asma (Galzy, 1972) patates, üçgül, çökyıllık çim, tütün, kiraz (Pierik, 1989) ve daha birçok bitkide).

2. Meristem kültüründen vejetatif üretimde faydalanılmaktadır. Gerçek meristem kültüründe meristem ucu ile 1-2 yaprak taslağından oluşan ve 0.1 mm'den küçük bir explantın izole edilme zorunluluğu vardır. Bitki üretimi amacıyla gerçek meristem yerine 3-10 mm boyunda sürgün uçları (Shoot-tip) kullanılmaktadır. Bu metodla, klasik vejetatif üretim yöntemleri ile üretimi zor yada yavaş olan bitkilerin hızlı üretimi sağlanmaktadır. Bu teknik,

elma (Werner ve Boe, 1980), erik (Rosati ve ark., 1980) çilek, *Coffea canephora*, *Coffea arabica*, *Populus* ve *Citrus* türlerinde (Pierik, 1989) başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

3. Bitkilerin uzun süreli muhafazası: Meristem dokularının hastalıklardan arı olması, boyutlarının küçük ve hızlı çoğalma özelliğine sahip olmalarından dolayı uzun süreli muhafazalar için uygun bir materyal oluşturmaktadır. Bu nedenle bitki türlerinin germ plazmalarının korunmasında meristem dokuları kullanılabilir (Withers, 1983).

3. Anter (Polen) Kültürü

Haploid bitki elde etmek amacıyla kullanılan ve özellikle bitki ıslahı yönünden önem taşıyan anter kültürü, bir bitkiden izole edilen anterlerin uygun bir gıda ortamına alınarak yeni bitkilerin geliştirilmesi tekniğidir. Bu tekniğin kullanılması ile kısa sürede homozigot saf hatlar oluşturulabilmektedir. Ayrıca kendine uyumsuz olan hatlarda önemli bir problem olan homozigot hatların elde edilmesi sorunu da ortadan kalkmaktadır. Yine, fazla miktarda haploid bitki üretimi sağlayacak olan anter kültürü ile istenilen mutant tiplerin seçimi ve yeni varyetelerin geliştirilmesi mümkündür. Nitekim bu metotla tütün, çeltik, buğday, yonca, arpa, ve patates türlerinde istenilen mutant tipler elde edilebilmiştir (Poehlman, 1983; Pierik, 1989).

4. Kallus Kültürü

Kallus kültürü bitkiden alınacak bir parçadan uygun bir gıda ortamında steril şartlarda kallus dokusunun oluşturulmasıdır. Çeşitli türlerin çok farklı organlarından kallus kültürü yapılabilirse de bazı dokuları kültüre almak güçtür. Genellikle gövde ve köklerin iletim demetlerine yakın dokuları daha iyi sonuç vermektedir.

Kallus kültürünün uzun süre devam ettirilmesi sonucunda kromozom sayısında azalma yada artmalar meydana gelebilmekte ve sitolojik stabilite bozulmaktadır. Bu durum bitki üretimi ve bitki ıslahında problem oluştursa da kallus kültürlerinde görülen genetik varyasyon bitki ıslahı programlarında değerlendirilmektedir (Ingram, 1980).

5. Protoplast Füzyonu

Doku kültürü uygulamalarında en son gelişmeler protoplast kültürü konusunda olmuştur. Bitki protoplastları, selülozik hücre çeperi enzimatik yolla çözdürülmüş hücrelerdir. İki ayrı bitkiden elde edilen bu hücreler birleştirilerek yeni bir bitki oluşturulmaktadır. Protoplast füzyonu tür içi, türler ve cinsler arasında yapılabilmektedir (Shepard ve ark., 1983). Bu teknik kullanılarak *Solanum tuberosum* (yumru oluşturan ve hastalıklara dayanıksız yada çok az dayanıklı) ve *Solanum brevidens* (yumru oluşturmeyen ve hastalıklara dayanıklı), *Brassica oleracea* ve *Brassica campestris* ile *Medicago sativa* ve *Medicago falcata* arasında somatik hibridizasyon gerçekleştirilmiştir (Bengochea ve Dodds, 1986). Yine Solanaceae familyasına ait 66 türde ve bu familyaya ait olmayan diğer birçok türde (*Trifolium repens*,

Citrus sinensis, *Daucus carota*) protoplast füzyonu çalışmaları yapılmaktadır. Bunun yanında buğdaygiller familyasında çeltik hariç diğer türlerde ve yemeklik dane baklagillerde protoplast füzyonu tekniği ile yeni bitkilerin elde edilmesi çok zordur (Pierik, 1989; Jacobsen, 1992). Ayrıca birbirine uzak akraba olan türlerin hibrid hücreleri sıklıkla aneuploid olmakta yada rejenerasyona uğramış bitkilerin sayısı çok az ve bu bitkiler de sterildir (Poehlman, 1983; Pierik, 1989). Buna rağmen protoplast füzyonu çalışmaları normal yolla melez elde edilemeyen birçok bitki türünde sürdürülmektedir. Seksüel melezleme yapılamayan *Petunia parviflora* ($2n=18$) ve *Petunia parodi* ($2n=14$) arasında somatik hibridler elde edilmiştir (Day, 1980). Bunlara ilaveten bu metottan biyoloji, bitki fizyolojisi, sitogenetik, viroloji ve patoloji gibi çeşitli alanlarda yararlanılmaktadır (Bajaj, 1977; Wood ve ark., 1980).

6. Somaklonal Varyasyon

Doku kültürü ortamına alınmış somatik hücrelerde meydana gelen varyasyondur. Bu varyasyon, mutasyon ve epigenetik varyasyona bağlı olarak meydana gelmektedir. Mutasyon kalıcıdır, epigenetik varyasyon ise genetik karakterlerde olmayan varyasyondur. Bu tip fenotipik varyasyonu ortam kompozisyonu (hormonlar), genotipin yapısı (somaklonal varyasyon için az veya çok hassas olması), üretim sistemi (farklılaşmış yada farklılaşmamış dokular), alt kültür sayısı ve ploidi seviyesi gibi faktörler yaratabilmektedir (Jacobsen, 1992). Ekonomik öneme sahip kültür bitkilerinde somaklonal varyasyonun kullanılması ile genetik ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu metodla hastalıklara, herbisite, tuzluluğa dayanıklı çeşitler elde edilebildiği gibi yeni çiçek renklerine sahip çeşitler de oluşturulmuştur. *Kalanchoe blossfeldiana* çiçek türünün sarı çiçekli bitkileri in vitro ortamına alınmış ve bu kültür ortamından izole edilen bitkilerde sarı çiçek renginin yanında pembe ve yarısı pembe yarısı sarı olan (kimerik) çiçeklere sahip bitkiler de meydana gelmiştir (Pierik, 1989). Yine somaklonal varyasyonla yulafta bitki boyu, başaklanma zamanı, kılçık morfolojisi, marulda yaprak ağırlığı, uzunluğu, genişliği, şekli ve rengi, sorgumda fertilitite ve yaprak morfolojisi, soğanda yumru büyüklüğü ve şekli, kolzada çiçeklenme zamanı ile glukosinolat içeriği ve mısırdaki polen fertilitesi yönünden yeni tipler elde edilmiştir (Mantell ve ark., 1985). Ayrıca bu metod domates, patates, şeker kamışı ve tütün (Pierik, 1989) türlerinde yaygın olarak çalışılmaktadır.

7. Hücre Kültürü

Bu metotta, izole edilmiş bitki hücreleri steril şartlar altında kültüre alınarak bitki rejenerasyonu sağlanmaktadır. Pratikte yada teorikte gen transfer sistemlerinin çoğu tek bir hücreden tam bir bitkinin oluşmasına bağlıdır. Tek bir hücre için başlangıç materyali; 1.süspansiyon kültürleri, 2.epidermis hücre tabakası daha ince olan dokular ve 3.polen taneleri olabilir (Conger ve ark. 1988; Pierik, 1989). Hücre kültüründen elde edilmiş bitkilerde genetik varyasyon ortaya çıkabilmektedir. Bu varyasyon, nokta mutasyonlarına, kromozomların

yeniden düzenlenmesine, inversiyona, duplikasyon ve delasyonlara bağlı olarak meydana gelmektedir (Chaleff, 1983). Yine, hücre kültürlerine değişik stres faktörleri uygulanarak hücre seviyesinde seçim yapılabilir ve herbisitlere dayanıklı, tuza toleranslı, demir ve alüminyum gibi metallere toleranslı, düşük sıcaklıklara ve bitki patojenleri tarafından üretilen maddelere dayanıklı bitkiler elde edilebilir (Poehlman, 1983; Binh ve Heszy, 1990).

Bitki hücrelerinden rejenerasyonun en önemli iki yolu organogenesis ve somatik embriyogenesisidir. Birçok bitkide somatic embrogenesis başarmıştır (Gray ve ark., 1984; Williams ve Maheswaran, 1986; Conger ve ark., 1988). Bunun yanında bazı bitki türlerinde (*N. tabacum*, *Asparagus officinalis*, *Brassica napus* ve *Citrus sinensis* gibi) tek bir hücreden tam bitkiler oluşturulmuştur (Vasil ve Vasil 1980).

2. GENETİK MÜHENDİSLİĞİ VEYA REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

Tarımsal üretimin artırılmasında modern biyoteknolojik yöntemler arasında en fazla ilgi çeken rekombinant DNA teknikleridir. Bitkilerde genetik mühendisliği çalışmaları iki aşamada gerçekleştirilir. Birincisi bitkiye aktarılması arzu edilen gen veya gen gruplarının belirlenmesi, bunların izole edilmesi ve bitki hücresine aktarılmasıdır. İkinci aşama ise doku kültürü yöntemlerinden yararlanılarak bu hücrelerden yeni bitkilerin (rejenere) elde edilmeleridir.

Bitki ıslahının temelinde istenilen fenotipleri meydana getirmek için bitkiler arasında genetik bilginin transfer edilmesi bulunmaktadır. Bu transfer esnasında karşılaşılan en büyük problem de genetik farklılık yada uyumsuzluk engelidir. Genetik mühendisliği bu engeli ortadan kaldırmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi genetik materyalin doğrudan manipülasyonuna imkan sağlamaktadır. Bu teknikte, farklı bitkilerden gen aktarılabildiği gibi, birbiriyle ilişkisiz olan bir organizmadan diğer bir organizmaya tek gen yada gen gruplarının transferi de mümkündür.

Genetik mühendisliğinin bitki ıslahındaki kullanım alanları aşağıdaki gibi sıralanabilir.

I. Dayanıklı Varyetelerin Geliştirilmesi

Her yıl kültür bitkilerinde böceklerin veya hastalıkların meydana getirdiği kayıplar önemli boyutlara ulaşmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin kullanılması ile dayanıklı çeşitler elde edilebilir. Bu çeşitler, ekosistemdeki dengein bozulmasında önemli bir etkiye sahip olan tarımsal ilaçların kullanımını azaltacağı gibi, iyi bir pazar da oluşturabilecektir.

a. Herbisitlere dayanıklılık genin aktarılması:

Genetik mühendisliği vasıtasıyla bitkilere herbisitlere karşı dayanıklılık kazandırılabilir.

b. Böceklere dayanıklı genlerin aktarılması:

Bitkilere aktarılmış toksik genler böceklerle etkili olabilmektedir. Bunlardan bir tanesi olan *Bacillus thuringiensis* bir çok *Lepidoptera* türüne ve diğer bazı böceklerle karşı patojenik

olup özel toksik proteinler üretmektedir. Bu toksik maddelerin oluşumunu sağlayan genlerin bitkilere aktarılması ile bazı olumlu sonuçlar elde edilmiştir. En önemli örneklerinden birisi *B. thuringiensis* 'den endo-toksigeni aktarılan pamuk ve domates bitkilerinin bazı zararlı böceklere karşı dayanıklılık kazanmış olmalarıdır (Miller ve ark., 1983; Veaeck ve ark., 1989; Gatabhouse, 1991). Yine, Brassica türlerinde lahanaya beyaz kelebeğine karşı mücadelede *B. thuringiensis* 'den yararlanılmış ve tırtıl popülasyonunun oluşumu önemli miktarda azaltılabilmektedir (Mantell ve ark., 1985).

c. Virüslere karşı tolerans sağlayan viral proteinlerin aktarılması:

Viral hastalıkların kontrolünde önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da böyle hastalıkların kontrolü sınırlıdır. Virüs hastalıklarının kontrolünde virüslerden arındırılmış tohum kullanımı, yabancı otların ve böcek vektörlerinin kontrol edilmesi ve genetik dayanıklılık gibi değişik metotlar kullanılmaktadır. Bu metotlardan en etkili olanı genetik dayanıklılıktır. Viral genlerin bitkilere aktarılması ile virüs zararı önemli miktarda azaltılabilmektedir. Bu sistemde virüslerin bir bitki içerisinde hücreden hücreye taşınması sınırlanmakta ya da viral replikasyonun oluşumu engellenmektedir. Viral kılıf protein (CP) genlerinin kullanımı ile yonca mozayik virüsüne (Van Dun ve ark., 1987), patates X virüsüne (PVX) ve patates Y virüsüne (PVY) (Hemenway ve ark., 1988; Lawson ve ark., 1990) tam veya kısmen dayanıklı bitkiler elde edilmiştir. Yine, domates mozayik virüsüne (ToMV) ait bir kılıf proteini şifreleyen genlerin aktarılması ile bu virüse dayanıklı domates çeşitleri geliştirilmiştir (Nelson ve ark., 1988). Bu konuda patates varyetelerini de içeren bir kaç kültür bitkisinde tarla testleri dönemine ulaşmış çalışmalar vardır (Kaniewski ve ark., 1990).

d. Doğal koruma mekanizmasını sağlayan genlerin kullanımı:

Bitkiler bakteriyel, fungal veya diğer patojenler tarafından saldırıya uğradığında bir savunma mekanizması ile tepki gösterirler. Bu olaylardan sorumlu genlerin bitkilere aktarılması ile tolerans artırılabilir. Asmalarda Botrytis'i etkin bir şekilde kontrol edebilen bir gen, tütün bitkisine aktarıldığında fungal patojenlere karşı dayanıklılık artabilmektedir (Hain ve ark., 1990). Yine bir ipek böceğinden (*Hyalophora cecropia*) izole edilen antibakteriyel genlerin bitkilere aktarılmasıyla bakteriyel hastalıklara dayanıklı bitkiler elde edilmeye çalışılmaktadır (Mantell ve ark., 1985).

2. Baklagil Olmayan Bitkilere Nitrojen Fikse Eden Genlerin Aktarılması

Özellikle tahıllarda verim artışı azotlu gübre uygulaması ile sağlanabilmektedir. Son zamanlarda azotlu gübrelere tepkisi fazla olan bir çok çeşit geliştirilmiştir. Yüksek azotlu gübre uygulamaları ise su kirliliğine sebep olduğu gibi maliyeti de yükseltmektedir. Bu nedenlerden dolayı baklagillerden nitrojen fikse eden genlerin buğdaygil bitkilerine aktarılmasına çalışılmaktadır.

Bakterilerde nitrojen fiksasyonu nif genleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Nif genleri üzerindeki ilk çalışmalar serbest yaşayan ve nitrojen fikse eden *Klebsiella pneumoniae* üzerinde yapılmıştır. Son zamanlarda Rhizobium soylarında da çalışmalar başlatılmıştır. Bu çalışmalarda 17 adet nif geni belirlenmiştir. Bu genler nitrogenase, kofaktör ve elektron transfer komponentlerinin polipeptid sentezini ve nitrogenaz oluşumunu kontrol eden ürünlerin sentezini kodlamaktadır (Sundaresan ve ark., 1983).

Bitki ve bakteri arasındaki interaksiyon çok kompleks olup moleküler ve genetik detayları henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bakteriye nif genleri üzerindeki son çalışmalar, nitrojen fiksasyon kabiliyetinin bitkilere taşınmasının mümkün olabileceğini göstermiştir (Mantell ve ark., 1985).

3. Bitkilerde Fotosentetik Etkinliğin Arttırılması

Bitkiler tarafından gerçekleştirilen en önemli işlev fotosentezdir. Bu fizyolojik olay, biosferdeki güneş enerjisinin kullanılması için uygun bir mekanizmadır. Bitkiler güneş enerjisinin yaklaşık % 3-4'ünü kullanabilmektedir. Karbon fiksasyonunda ilk enzim ribulose biphosphate carboxylase (RuBPCase) olup çoğu durumda etkisiz bir katalizördür. Özellikle C₃ bitkilerinde bu enzim fotorespirasyonda oxygenase olarak da görev yapmaktadır. Bu da CO₂ fiksasyonunu azaltıcı bir etkiye sahiptir. C₃ bitkilerinde fikse edilen karbonun yaklaşık %25'i fotorespirasyonla kayb olduğundan fotosentez aktivitesi de düşmektedir. Bu tip bitkilerde Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak RuBPCase enziminin katalizör etkinliğinin arttırılmasının mümkün olduğu bildirilmiştir. Mutagenlerle CO₂ için yüksek, O₂ için ise düşük affiniteye sahip enzimler oluşturularak, bitkilerde fotosentetik etkinlik arttırılabilecektir (Mantell ve ark., 1985).

4. Tohum Depo Proteinlerini Kodlayan Genlerin Manipasyonu ile Besin Kalitesinin Arttırılması

Tohumlu bitkiler, insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Tohumlar, karbonhidrad kaynağı olmalarının yanında önemli bazı proteinleri de içermektedirler. İnsanların ve hayvanların beslenmesinde önemli bir yeri olan tahıllar ve baklagiller, belirli amino asitleri sınırlı miktarda bulundurmaktadır. Çoğu tahıllar lizin yönünden fakir, threonine içeriği ise eser miktardadır. Yine baklagillerde sülfür amino asitleri çok azdır. Çeltik gibi bazı tohumlu bitkilerde ise protein seviyesi çok düşüktür (Payne ve Rhodes, 1982).

Tahılların depo proteinleri genel olarak prolamin grubunda yer alır. Bunlar lysince eksik, proline, glutamine ve asparagine yönünden zengindir. Baklagillerde globulinler depolanır ve methionince eksiktir. Bu depo proteinlerini kodlayan genler hakkında önemli bilgiler mevcut olup, bunların birkaçını kodlayan genler klonlanabilmektedir. Fakat tohum içerisinde bu depo proteinlerinin nasıl düzenlendiği henüz tam olarak anlaşılmadığından bir depo proteininin

başarılı bir şekilde bitkilere yerleştirilmiş örnek sayısı fazla değildir. Fasulyede "Phaseolin" proteinini kodlayan bir gen, *Agrobacterium* plazmidi yoluyla ayçiçeği hücrelerine aktarılmıştır (Murai ve ark., 1983). Bitki gen vektörleri alanındaki hızlı ilerlemeler yakın gelecekte dikotiledon bitkilerin bir çoğunda bu tip manipulasyonları mümkün kılabilir. Ancak tahullar için uygun doğal vektör sistemlerinin bulunmaması bu tip genlerin aktarılmasında problem oluşturmaktadır (Mantell ve ark., 1985).

5. Rekombinant DNA Tekniği Kullanılarak Yeni Çiçek Renklerinin Oluşturulması

Anthocyanin biyosentezinden sorumlu bir mısır genini (DRF-geni) taşıyan *Petunia* bitkileri elde edilmiştir (Jacobsen, 1992). Bu gen *Petunia* bitkisinde yeni bir çiçek rengini (tuğla kırmızısı) oluşturan pelargonidin pigmentinin sentezine yol açmaktadır. Normalde pelargonidin pigmenti *Petunia* bitkisinde bulunmamaktadır (Meyer ve ark., 1987).

6. İstenilmeyen Genlerin Baskılanması.

Bir çok bitki istenilmeyen özelliklere (bazı baklagillerdeki yüksek alkaloid içeriği, acılık özelliği v.b.) sahiptir. Bu özellikler onların kullanımını sınırlamaktadır. İstenilmeyen özelliklerden sorumlu gen veya genlerin yok edilmesi veya azaltılması konusunda çalışmalar başlatılmıştır. Bu çalışmalar, mRNA fonksiyonunun engellenmesi (Vander Krol ve ark., 1990) veya belirli bir bölgeye etkili özel mutagenlerle bu genlerin kesilmesi ya da etkilerinin azaltılması (Odell ve ark., 1990) esasına dayanmaktadır.

SONUÇ

Modern biyoteknolojik yöntemler yüksek verimli ve üstün özellikli bitkilerin elde edilmesinde önemli imkanlar sunmakla birlikte her derde deva olarak görülmemelidir. Rekombinant DNA teknolojisi bitki ıslahında bir araç olarak rutin bir şekilde kullanıma izin verecek yeterli düzeye henüz ulaşamamıştır. Bitkilerde bu uygulamayı kısıtlayan en önemli faktörlerden bir tanesi, kantitatif özelliklerin birden fazla gen gruplarının kontrolü altında olmasıdır. Bu durum öncelikle söz konusu genlerin belirlenmesini ve izole edilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu da uzun yıllar ve pahalı bir ekip çalışmasını gerektirmektedir.

Yukarıda belirtilen özellikler yönünden çok büyük ilerlemeler kaydedilmesine karşın genetik olarak iyileştirilmiş bitkilerin bir çoğu tarla testleri seviyesine ulaşmamıştır. Bu nedenle transgenik bitkilerin ticari olarak kullanımı için, daha uzun yıllara ihtiyaç duyulacaktır.

KAYNAKLAR

- Adams, A.N., 1972. An improved medium for strawberry meristem culture. *J. Horts. Sci.*, 47, 263-264.
- Bajaj, Y.P.S., 1977. Protoplast Isolation, Culture and Somatic Hybridization. *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Springer-Verlag, p.467-495.
- Bengochea, T., J.H. Dodds, 1986. *Plant Protoplasts A Biotechnological Tool For Plant Improvement*. Printed in Great Britain at the University Press. Cambridge.
- Binh, Do Q., L.E. Heszy, 1990. Restoration of the regeneration potential of long-term cell culture in rice (*O. sativa* L.) by salt pretreatment. *J. Plant Physiol.* Vol. 136, 336-340.
- Chaleff, R.S., 1983. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. *Science*, 219, 676-682.
- Conger, B.V., R.N. Trigiano, D.J. Gray, 1988. *Cell Culture of the Poaceae (Gramineae)*. *Plant Cell Biotechnology (M.S.S. Pais et al. Eds.)*, Springer-Verlag, Berlin.
- Day, P.R., 1980. *Tissue Culture Methods in Plant Breeding. Tissue Culture Methods for Plant Pathologist*, Blackwell Sci. Publ. p.223-231.
- Galzy, R., 1972. La culture invitro des apex de vitis rupestris. *Compt. Rend. D.*, 274, 210-213.
- Gathouse, J.A., 1991. Breeding for Resistance to Insects. *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology (Murray. D.R. Ed.)* pp.250-275. *Biotechnology in Agriculture No:4*.
- Gray, D.S., B.V. Conger, G.E. Hanning, 1984. Somatic embryogenesis in suspension and suspension-derived callus cultures of *D. glomerata*. *Protoplasma*, 122, 196-202.
- Gönülşen, N. 1987. Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. *Ege Tarımsal Araş. Enst. Müd. Yay. No:78, Menemen- İzmir*.
- Hain, R., B. Bieseler, H. Kind, G. Schröder, R. Stöcher, 1990. Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in Synthesis of the phytoalexin resveratrol. *Plant. Mol. Biol.*, 15, 325-335.
- Hemenway, C., R.X. Frang, W.K. Kaniewski, N.H. Chua, N.E. Tumer, 1988. Analysis of mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO Journal*, 7, 1273-1280.
- Jacobsen, E., 1992. *Introduction to Plant Breeding II. Genetic Variation. Part IV. Genetic Manipulation In Vitro. International Course on Applied Plant Breeding*, 133 p., Wageningen, The Netherlands.
- Ingram, D.S., 1980. *Tissue Culture Methods in Plant Pathology. Tissue Culture Methods for Plant Pathologist*, Blackwell Sci. Publ., p.3
- Kaniewski, W., C. Lawson, B. Sammons, L. Haley, J. Hart, X. Delannay, N.E. Tumer, 1990. Field resistance of transgenic burbank potato to effects of infection by potato virüs X and potato virüs Y. *Biotechnology*, 8, 750-754.
- Lawson, C., W. Kaniewski, L. Haley, R. Rozman, C. Newell, P. Sanders, N.E. Tumer, 1990. Engineering resistance to a mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic russet burbank. *Biotechnology*, 8, 127-134.

- Mantell, S.H., J.A. Matthews, R.A. McKee, 1985. Principles of Plant Biotechnology. Blackwell Sci. Publ., 268p.
- Mellor, F.C., R. Stace- Smith, 1969. Development of excised potato buns in nutrient culture. Can.J. Bot., 47, 1617-1621.
- Meyer, P., I. Heidmann, G. Forkmann, H. Saedler, 1987. A new *Petunia* flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. Nature, 330, 677-678.
- Miller, L.K., A.J. Lingg, L.A. Bulla, 1983. Bacterial viral and fungal insecticides. Science, 219, 715-721.
- Murai, N., D.W. Sutton, M.G. Murray, J.L. Slightom, D.J. Merlo, N.A. Reichert, C. Sengupta Gopalan, C.A. Stock, R.F. Barker, J.D. Kemp, T.C. Hall, 1983. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor inducing plasmid vectors. Science, 222, 476-482.
- Nelson, R.S., S.M. McCormick, X. Delaney, P. Dube, J. Layton, E.J. Anderson, M. Kaniewska, R.K. Proksch, R.B. Horsch, S.g. Rogers, R.T. Fraley, R.N. Beachy, 1988. Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plant expressing coat protein from tobacco mosaic virus. Biotechnology, 6,403-409.
- Odell, J.T., P. Caimi, B. Sauer, S. Russell, 1990. Site directed recombination in the genome of transgenic tobacco. Mol. Gen. 223, 369-378.
- Payne, P.I., A.P. Rhodes, 1982. Cereal storage proteins. Structure and role in agriculture and food technology. In Encyclopedia of Plant Physiology 14A, Springer-Verlag, Berlin.
- Pierik, R.L.M., 1989. In Vitro Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publisher Group 3300 AH Dordrecht, The Netherlands, 344p.
- Poehlman, J.M., 1983. Breeding Field Crops. The AVI Book Published by Van Nostrand Reinhold New York, 715p.
- Quak, F., 1977. Meristem culture and virus-free plants. Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Springer-Verlag, p.598-615.
- Rosati, P., G. Marino, C. Swierczewski, 1980. In vitro propagation of Japanese plum. J. Amer. Soc. HortSci. 105, 126-129.
- Sağsöz, S., 1995. Tohumluk Bilimi. Atatürk Üniv. Yay. No:677, Ziraat Fak. Yay. No:302, 299 s.
- Shepard, J.F., D. Bidney, T. Barsby, R. Kemble, 1983. Genetic transfer in plant through interspecific protoplast fusion. Science, 219, 683-688.
- Sundaresan, V., J.D.G. Jones, D.W. Ow, F.M. Ausubel, 1983. *Klebsiella pneumoniae* nif A product activates the *Rhizobium meliloti* nitrogenase promoter. Nature, 301, 728-731.
- Van Dun, C.M.P., J.F. Bol, L. Van Vloten-Doting, 1987. Expression of alfalfa mosaic virus coat protein genes in transgenic tobacco plant. Virology, 159,299-305.
- Van der Krol, A., L.A. Mur, P. de Lange, J.N.M. Mol, A. Stuitje, 1990. Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. Plant Mol. Biol., 14, 457-466.

- Vasil, I.K., V. Vasil, 1980. Clonal Propagation. In perspectives in Plant Cell and Tissue Culture Int. Rev. Cytol. Suppl. 11A (Vasil I.K. Ed.). Academic Press Orlando.
- Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Hofte, S. Jansens, M. De Beuckeleer, C. Dear, M. Zabeau, M. Van Montagu, J. Leemans, 1989. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 328,33-39.
- Werner, E.M., A.A. Boc, 1980. In vitro propagation of Malling 7 apple rootstock. *HortScience*, 15, 509-510.
- Williams, E.G., G. Maheswaran, 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. *Ann. Bot.*,57, 444-462.
- Withers, L.A.,1983. Germplasm Storage in Plant Biotechnology. In plant Biotechnology (Mantell S.H., H.Smith Eds.)pp.187-218 Cambridge University Press Cambridge.
- Wood, K.R., M.I. Boulton, A.S. Maule, 1980. The infection of cucumber protoplasts with cucumber mosaic virus or viral RNA. *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*. Blackwell Sci. Publ. p.79-86.