



Briyofitlerde Doku Kültürü

Şadiye Gül BOZDOĞAN^{1*}

Cemil İŞLEK¹

Recep KARA¹

Tülay EZER¹

¹Niğde Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 51100, Niğde

*Sorumlu Yazar:

E-posta: bozdogan.gul@gmail.com

Geliş Tarihi: 30 Mart 2013

Kabul Tarihi: 05 Mayıs 2013

Özet

Yararlı pek çok özellikleri nedeniyle briyofitler günümüzde biyoteknoloji alanında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Doku kültürü ile *in vitro* koşullarda briyofit çoğaltımı bu çalışmaların temeli olarak kabul edilebilir. Doku kültürü ile çoğaltım yalnızca biyoteknolojik çalışmalara öncülük etmez, aynı zamanda da ülkelerin biyolojik zenginliklerinin korunması amacıyla da üretilir. Ülkemizde briyofit doku kültürü ve buna bağlı çalışmalar başlangıç aşamasında olup devam eden yıllarda hızla artacaktır.

Anahtar kelimeler: Briyofitler, *in vitro* kültür, biyoteknoloji

Tissue Culture in Bryophytes

Abstract

Due to many useful features of bryophytes are a quite widely used nowadays in the field of biotechnology. *In vitro* bryophyte propagation by tissue culture of this studies can be considered as a basis. Propagation by tissue culture does not only lead to biotechnological research but also is produced for the protection of the biodiversity of the country. In our country, bryophyte tissue culture and its related studies are in the initial stages and are expected to increase rapidly in the following years.

Key words: Bryophytes, *in vitro* culture, biotechnology

GİRİŞ

Biyoteknoloji canlıların veya onların ürünlerinin, insana ve çevresine yararlı bir ürün üretmek veya bir problemi çözmek için kullanılması olarak tanımlanır. Başlıca odak noktası moleküler biyoloji olmasına rağmen, biyoteknoloji tek başına var olan, dar kapsamlı bir çalışma alanı değildir [1].

Briyofitler ekonomik, etnik kullanımının yanı sıra ve biyoteknoloji alanında da oldukça yaygın kullanıma sahiptir. Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldıkları herkeşçe bilinmektedir. Özellikle Çin'de briyofit türlerinin pek çoğu yanık, çürük, dıştan yaralanmalar, kırıklar, konvülsiyonlar, yılan sokması, akciğer tüberkülozu, nevrasteni, üropati ve pnömoni gibi durumlarda kullanılmıştır [2].

İlaç endüstrisinde hammadde kaynağı çoğunlukla vasküler bitkilerdir. Karasal bitkilerin ikinci büyük grubu olan briyofitler bu konuda onlardan sonra yer almaktadır. Karayosunlarının sekonder metabolit üretimi, antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri, sitotoksik etkileri ve bu bağlamda ilaç olarak kullanılmaları son yıllarda biyoteknoloji çalışanlarının ilgisini çekmektedir. Bu çalışmalarda doku kültürü ile üretim temel amaçtır. Dünyada özellikle 1980 ve sonrası briyofitlerin doku kültürü ile üretimi hız kazanmıştır ancak ülkemizde bu çalışmalar başlangıç aşamasındadır.

Bitkilerde Doku Kültürü

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir [3]. Bitki doku kültürleri yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitlilik oluşturulmasında, kaybolmakta olan türlerin korunmasında, bitkilerin klonal hızlı çoğaltılmasında, geleneksel yöntemlerle çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde uygulanmaktadır [4].

Bitkilerin özelliklerinin iyileştirilerek çoğaltılmasında, çoğu 1960 ve 1970'li yıllarda kurulmuş bitki doku kültürü laboratuvarlarının da uyguladıkları doku kültürü teknikleridir [5]. İlk izole edilmiş hücrelerin kültürü [6], 1962 yılında [7] MS besiyerinin geliştirilmesi ve 1970 yılında HEPA filtrelerinin kullanılmaya başlanması bitki doku kültüründe önemli çalışmalar olmuştur [2, 8-10]. Bu tarihten itibaren gerek vasküler bitkiler gerekse briyofit doku kültürü tekniklerinin geliştirilmesi yönünde yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Pierik (1997) [11] tarafından doku kültürü tekniklerinin bilimsel uygulamaları bitkilerin ıslahı ve moleküler biyolojisi, botanik araştırmaları, sekonder metabolit üretimi, fitopatolojik çalışmalar ve vejetatif çoğalma olarak sıralanmaktadır [5, 12].

Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolit üretimi daha güvenilir, basit ve tahmin edilebilir. Normalde ana bitkide bulunmayan bileşiklerin de üretilebilmesine olanak sağlamaktadır. Politik, coğrafik ve mevsimsel engellerden bağımsız üretim yapılabilir. Karmaşık bitki ekstraksiyonlarıyla karşılaştırıldığında fitokimyasalların izolasyonu daha çabuk ve etkili yapılabilir. Hücre kültürleriyle bitkinin kendisinden elde edilen fitokimyasalların miktarı karşılaştırıldığında hücre kültürlerinden çok daha fazla ürün elde edilebilir ve hatta üretim endüstriyel boyuta taşınabilir [13].

Bitki Doku Kültürü Ve Aşamaları

Doku kültürü çalışmalarında besiyeri ve kültür koşullarının düzeni çalışılan bitki ve bitki dokusuna göre değişiklik gösterir. Bu durum doku kültürü ile beklenen sonuçları elde etmek açısından oldukça büyük önem taşımaktadır.

Steril koşullarda ve geliştirilmiş besiyerleri üzerinde kültüre alınmak suretiyle dokulardan, hücrelerden veya tek bir hücreden tam bir bitkiyi *in vitro* koşullarda elde etmek mümkündür. Bu sayede, elit bitki çeşitleri klon olarak çoğaltılabilir, tehlike altındaki bitkiler korunabilir ve meristem kültürü ile virüssüz bitkiler elde edilebilir, bitkisel gen kaynakları saklanabilir veya bitki hücre kültürlerinden sekonder metabolitler elde edilebilir. Bütün bu uygulama alanlarının yanında, doku kültürü ayrıca transgenik bitki üretimi için de vazgeçilmez bir araçtır. Doku kültürünün bu özelliği, bitki hücrelerinin *totipotensi* özelliğine sahip olmaları ve büyüme ortamı ile hormonların etkisiyle yönlendirilebilir olmasından kaynaklanmaktadır. Bununla beraber her bir bitki türünün ve *eksplant* tipinin bilinmesi, etkili bir rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi için gereklidir. Eksplantın fizyolojik durumu, doku kültürüne vereceği tepki açısından çok önemli bir role sahiptir. Örneğin, genç eksplantlar genellikle yaşlı olanlara göre daha başarılı sonuçlar verirler [14].

Doku kültürünün başarısı, büyüme ortamının kompozisyonu ve hormonlar ile sıcaklık, pH, ışık ve nem gibi kültür koşullarına bağlıdır. Büyüme ortamı bitki büyüme ve gelişmesi için ihtiyaç duyulan mineral ve vitaminlerin bir karışımını içerir; bitkilerin gelişmesi için ihtiyaç duyduğu her şeyi (şekerler dahil) kapsar [14].

Doku kültüründe çoğaltım için izlenebilecek her biri çok özel beslenme ve inkübasyon koşulları gerektiren temel dört aşama tanımlanmıştır [5, 15]. Bu aşamalar sırasıyla: kültürlerin başlatılması, sürgünlerin çoğaltılması, köklenme ve iklimle alıştırmadır [5]. Briyofitlerde kök oluşumu görülmediğinden diğer üç aşama ile doku kültürleri gerçekleştirilmektedir.

Bitkilerin Çoğaltılmasında Kullanılan *In Vitro* Teknikler

Bitkilerin çoğaltılmasında kullanılan bütün hücre ve doku kültürü tekniklerinde görülen farklılaşma tipleri, kök ve sürgün üretimidir. Bu iki olaya birleşik olarak *organogenez* adı verilir. Bazen bu iki süreç kendiliğinden düzenlenmiş olarak (zigotik bitki embriyolarındaki gibi) meydana gelir ve bu olay *somatik* veya *adventif embriyogenez* olarak adlandırılır [5, 16-17]. Somatik embriyolar bazı durumlarda zigotik embriyolara benzer şekilde bir gelişme sırası izlemektedir. Kök, sürgün ve somatik embriyoların oluşumu çok sayıda biyokimyasal olayı kapsamaktadır. Farklılaşmanın düzenlenmesi iç kontrol mekanizması ile yapılır. Kültürlerde morfolojik değişiklikler görülmesine karşın, morfolojik olarak aynı türün oluşmasına neden olan başka biyokimyasal farklılaşmalar da meydana gelebilir [5].

Kültür Tipleri

Bitkilerde doku kültürü tiplerini kallus kültürü, hücre süspansiyon kültürü, anter/mikrospor kültürü, protoplast kültürü, embriyo ve meristem kültürü olarak sınıflandırmak mümkündür. Kallus hücreler yaralandığı zaman gelişen düzensiz bir hücre yığıdır ve birçok *in vitro* kültür için kullanışlıdır. Kallus eksplantlar; farklılaşmamış hücre çoğalmasını sağlayan besiyerleri üzerinde kültüre alındığı zaman gelişir ve genellikle organ oluşumunun olmadığı durumlarda, daha çok teşvik edilir. Diğer bir ifadeyle kallus üretimi çoğunlukla organogenez öncülük eder fakat kallus organ oluşturmaya bir kez başlarsa, takibinde kallus oluşumu durur. Bitki büyüme hormonları kullanılarak kallus sürekli olarak çoğaltılabilir ve daha sonra da organ veya somatik embriyo oluşumuna yönlendirilebilir [14]. Gevşek ve kırılğan kallus dokusu, küçük parçalara ayrılabilir ve hücre süspansiyon kültürünü oluşturmak için sıvı besiyerlerinde büyütülebilirler. Bu duruma hücre süspansiyon kültürü denir [14]. Haploid bitki üretimi için anterlerin veya izole edilmiş mikrosporların kültürü anter kültürü veya mikrospor kültürü olarak bilinir [14]. Hücre çeperleri yok edilmiş hücre zarı ile çevrili hücrelerin kültürüdür. Bir hücrenin duvarı uzaklaştırıldığında geriye kalan kısmına protoplast denir. Protoplastlar izotonik ortamlarda canlılığını sürdürüp, yeni duvar oluşturup, mitozla bölünebilir, yeni hücre grupları ve daha sonra da yeni bitkiler oluşturabilirler [18]. Embriyo kültürü, olgunlaşmamış ovül veya tohumlardan izole edilen embriyoların *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıdır [14].

Briyofitler Ve Doku Kültürü

Briyofit terimi, herbiri farklı özelliklere sahip karayosunları (Bryophyta), ciğerotları (Marchantiophyta) ve boynuzlu ciğerotlarının (Anthocerotophyta) hepsini kapsamaktadır. Onları birbirinden ayıran özelliklere karşın hayat döngüleri temelde aynıdır.

Ototrofik haploid gametofit nesil yaşam döngülerinde hakim durumdadır ve heterotrofik diploid sporofit nesli destekler. Gametofit iki farklı gelişim aşamasıyla karakterize edilir. Bunlardan ilk aşama (protonema yolu); apikal ve subapikal hücre bölünmesi ve gelişmesi ile

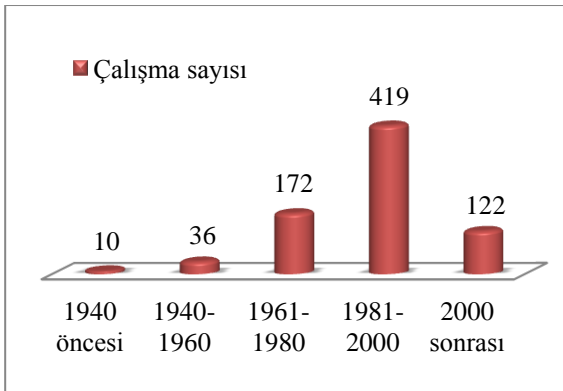
kloronema ve kaulonema denilen yapıların ipliksi bir ağ, basit apikal meristemden kaulonemal büyüme ile ayrılan gametofor ya da yapraklı sürgünün oluşmasıdır. İkinci aşama ise vasküler olmayan fotosentetik sap oluşumudur; bu sap yaprakları, üreme organlarını ve gövde tabanından gelişen ipliksi rizodi taşır [19].

Briyofitlerde yaşam döngüsü onların üremelerini ifade etse de bu tanım belirsizlik/eksiklik içermektedir. Eşeyli üremeleri bir sperm ve yumurta hücresinin birleşmesiyle olurken, aynı zamanda eşeysiz (vejetatif) üreme ile de fizyolojik olarak bağımsız olan pek çok bitki oluşturabilirler. Bu organizmalar sadece birkaç hücreden yeni bir bitki üretme kabiliyetine sahiptirler. Onları öldüren durum ne olursa olsun hayatta kalmak için farklı şekillerde donatılmış, farklı özel hücrelere sahiptirler. Bu sayede somatik mutasyonlara karşı adapte olabilirler [20].

Gametofit fizyolojisinin yüksek abiyotik stres toleransı ve poikilohidrik (ortamda bulunan su miktarına göre su gereksinimini ayarlamak) bir yol içermesi onların ilginç bir araştırma yönünü ortaya çıkarır. Buna ilaveten bazı briyofitler muazzam bir metabolit çeşitliliğine ve biyolojik olarak aktif bileşiklere sahip oldukları için biyoteknolojik ve biyofarmakolojik yaklaşımlara bir potansiyel oluştururlar [21-27].

Briyofitler için ilk aksenik (axenic) kültür Servettaz (1913) [28] tarafından kurulmuştur ancak, bu çalışmanın *in vitro* kültür ile ilgili pek çok sorunu olmuştur. Servettaz (1913)'a göre ise ilk karayosunu kültürü Becquerel (1906) [29] tarafından yapılan *Atrichum undulatum* ve *Brachythecium velutinum* protonemasının saf kültürünün geliştirilmesi olarak tanımlanan bir çalışmadır [30]. Briyofitlerde doku kültürü çalışmaları bu tarihlerden itibaren 1940'lara kadar yılda ortalama bir ya da birkaç çalışma ile devam etmiştir. 1940'lardan sonra yapılan çalışma sayısı ise ilk döneme göre daha da artarak 1960'lara kadar bu şekilde devam etmiştir. Bu konu üzerindeki çalışmalar vasküler bitkilerde de gerçekleştirilen doku kültürü çalışmalarındaki ilerlemelere paralel olarak 1960 ve sonrasında oldukça büyük bir artış göstermiştir. Yapılan çeşitli literatür çalışmaları sonucu briyofitlerde doku kültürü çalışmaları sayısının yıllara göre dağılımı Şekil 1.'de gösterilmiştir [31].

Physcomitrella patens Hedw. (Bruch & Schimp.) briyofit gelişimi üzerine bilimsel bir model organizma olarak öncü bir örnektir [27, 32-38]. Diğer briyofitler arasında *P. patens*'in (Funariaceae) en önemli avantajı katı mineral besiyeri [39] ve şişe ya da bio-reaktör içerisindeki sıvı ortamda aksenik *in vitro* kültürünün kolay olmasıdır [27, 40-42]. Bu nedenle doku kültürü materyali olduğu pek çok çalışma mevcuttur [43-46].



Şekil 1. Briyofitlerde doku kültürü çalışmaları sayısının yıllara göre dağılımı

Briyofitlerde eksplant türleri

Kültüre alınan bitki dokusuna eksplant denir. Gemma, yaprak parçaları, rizoidler, rizoidal gemmalar ve sporlar briyofit türüne bağlı olarak seçilen eksplantlar arasında yer alır.

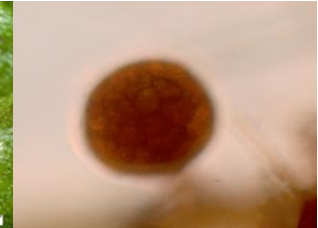
Briyofitlerde vejetatif üreme iki temel durumla gerçekleşir. Bunlardan ilki bitki üzerinden kopan parçaların gelişimi ile olan *kopma* (fragmentasyon); diğeri ise *vejetatif diasporlar* adı verilen yapıların gelişimi ile olan eşeysiz üremedir. Kopma eşeysiz üremenin basit bir şeklidir ki briyofit bahçeleri düzenlemek için Japonların kullandığı bir yöntemdir. Vejetatif diasporlar çeşitli tipte olan ve farklı ülkelerde farklı isimlerle benimsenen eşeysiz üreme yapılarıdır. Bunlardan bazıları dökülücü sürgün uçları ve dalları, bulbiller, rizoidal tuberler, flagelliform dallar ve gemmalardır (Şekil 2-5) [47]. Örneğin epifitik *Orhotrichum lyelli* Hook. & Taylor'nin yaprakları üzerinde yoğun bir şekilde gemmalar, *Campylopus subulatus* Schimp.'ta dökülücü sürgünler, *Dicranum montanum* Hedw.'ta flagelliform dallar, *Pohlia annotina* (Hedw.) Lindb'da bulbil, *Bryum ruderale* Crundw. & Nyholm'de rizoidal tuber bulunur.

Briyofitlerin gemmaları tek, çift veya çok hücreli ve çeşitli şekillerde (küresel, disk şeklinde, yıldız şeklinde, plak şeklinde) olabilir. Goebel (1905) [48], gemmaları tutuklu tomurcuk ya da sınırlanmış tomurcuk veya düz tomurcuk olarak düzenlenmiş olduklarını kabul eder. Worsdell (1915)'e [49] göre gemma anormal şekilde düzenlenen minyatür sürgünlerdir [50]. Yaprak veya tallus üzerinde, rizoidlerde, özelleşmiş gemma kapları içerisinde bulunabilen gemmalar briyofit yaşamının doğal sürecinde bitkiden ayrılıp uygun ortam koşullarında yeni bir bitki meydana getirebilirler [50]. Çiğerothu *Marchantia polymorpha* (L.)'da gemmalar bir arada ve çanak benzeri bir yapı içerisinde dururlar. Bu yapıya da gemma çanağı adı verilir.

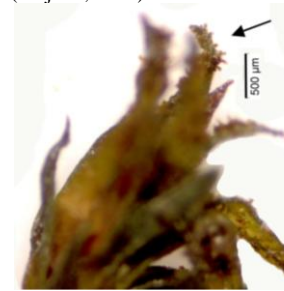
Sporofit içerisinde mayoz bölünme ile oluşan sporlar da doku kültürü çalışmalarında eksplant olarak seçilir. Gametofit sterilizasyonunun zor olduğu durumlarda özellikle briyofit doku kültürü sporlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir.



Şekil 2. *Marchantia polymorpha*'da gemmalar (Orijinal, 2013)



Şekil 3. *Bryum ruderale*'de rizoidal tuber (Orijinal, 2013)



Şekil 4. *Orhotrichum lyelli*'nin yaprakları üzerindeki gemmalar (Orijinal, 2013)



Şekil 5. *Pohlia annotina*'da bulbil (Orijinal, 2013)

Briyofit doku kültürü hazırlık aşamaları

Araştırma materyaline bağlı olarak değişik hazırlık çalışmaları mevcuttur. Vujić ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [51] toplama işleminden sonra bitkiler +4°C'de plastik torbalarda depolanmış ve deneysel çalışmaya kadar dinlendirilmiştir. Laboratuvar koşullarında, diseksiyon mikroskobu altında görünen mekanik kirlilikten arındırılmıştır. Olgunlaşmış ya da neredeyse olgunlaşmakta olan sporofitten kapsüller ayrılmış ve başarılı bir şekilde ayrılan gametofitler cam şişeye konularak, üzeri tülbeyle kaplanmış ve musluk suyu altında 30 dakika boyunca durulanmıştır [51]. Sabovljević ve arkadaşlarına göre [52] ise sterilizasyondan önce doğada, kontrol şartları altında ya da sera koşullarında yetiştirilmiş, sporofiti olan ya da olmayan briyofit örneği 18±2°C'de 10/14 saat ışık/karanlık periyodunda tutulmalıdır, bu tutulmanın sebebi bitki dormansisinin kırılmasıdır. Doku kültürü sporofitli kısımdan başlatılacaksa, olgun sporofit 5 dakika, gametofitten başlatılacaksa 30 dakika musluk suyu ile yıkanır [52].

Briyofit doku kültüründe sterilizasyon

Çoğunlukla *in vitro* kültür işlemleri briyofitler için sorunsuz olmamaktadır. Özellikle ciğerotları ve boynuzlu ciğerotlarının aksenik kültürleri mantarlar ya da siyanobakteriler gibi simbiyotik ortakları tarafından engellenmiş olabilir [27, 53]. Bu nedenle briyofit doku kültüründe sterilizasyon işlemi büyük önem taşımaktadır. Sterilizasyon ile briyofitlerle aynı ortamı paylaşan senik (xenic) organizmalar steril edilebilir fakat briyofit dokularını sterilizasyon çözeltisi ile gereğinden fazla muamele etmek hayati faaliyetlerini engelleyebilir.

Briyofitlerle yapılan önceki çalışmalarda hipoklorit bazlı çamaşır suyu sterilizasyon ajanı olarak kullanılmıştır [54-56] fakat gametofit dokularının hassasiyeti gözlenmiştir [56]. Son yıllarda sterilizasyon aracı olarak sodyum diklorozosiyanat (NaDCC) kullanımı artmıştır [56, 57]. Briyofit türü ve eksplant tipine göre sterilizasyon çözeltisinin yüzdesi ve muamele süreci de değişir.

Briyofit yapraklarının çoğunlukla kütiksüz tek hücre tabakası içermesi göz önüne alındığında, ticari çamaşır suyunun kullanılması ve kullanım süresi işlemleri oldukça kritiktir. Briyofit gametofiti çamaşır suyunun yüksek konsantrasyonları ile steril edilebilir ancak bu durum ölümcül olabildiği gibi eksplantlara zarar verici de olabilir. Bu yüzden apikal sürgünler için en uygun çamaşır suyu konsantrasyonu %7-10 arasında değişir [52]. Bunun yanı sıra sporofitin % 70 lik etanol ile birkaç saniye muamele edilip %1 lik NaOCl içerisinde 3 dakika kadar bekletildiği [58] çalışmalar da mevcuttur.

Briyofit doku kültüründe besiyeri ve bileşenleri

Briyofit doku kültürü çalışmalarında briyofit çeşidine göre hazırlanan besiyerleri de çeşitlilik gösterir. MS [7], BCD [59] ve Knop [60] besiyerleri yaygın olarak briyofit doku kültüründe kullanılır. Bu besiyerleri çeşitli oranlarda vitamin ve mineral tuzlar içermektedir ancak şeker ve hormon yüzdeleri değişiklik gösterir. Zenginleştirilen besiyerlerinde pH, otoklavda sterilize edilmeden önce (114°C ve 108kPa, 25 dakika) genellikle 5.8 olarak ayarlanır.

Aşırı miktarda karbonhidrat bitkilerde eşeyssel üremeyi teşvik eder [50]. Yüksek bitkilerde çiçeklenme karbonhidrat-nitrojen oranına bağlıdır [50, 61, 62]. *Marchantia polymorpha*'da da nispeten böyle bir durum

söz konusudur yüksek oranda karbonhidrat-nitrojen eşeyssel dallanma ile sonuçlanır [50, 63]. Karbonhidrat *Riccia crystalliana*'da gametangial üretimi destekler ve aynı zamanda etkiler. Sükroz ile optimum gametangial büyüme görülürken, fruktoz ve glukoz gametangial büyümede daha az etkilidir. Buna ilaveten sükroz yokluğunda ve %8 sükroz bulunması durumunda gametangia üretilmez [50, 64]. *Bryum argenteum* ve *Atrichum undulatum*'un kullanıldığı bir çalışmada *in vitro* kültürde şekerlerin etkisi araştırılmıştır [65]. Bu çalışmada MS besiyeri farklı konsantrasyonlarda ve farklı şekerlerle (sükroz, fruktoz, glukoz) zenginleştirilmiştir. Fruktoz diğer şekerlere kıyasen en etkili şeker olarak belirlenmiştir.

Bilinen briyofit hormonları şunları içermektedir: oksin (IAA) büyüme ve gametangial üretimi düzenler; sitokinin (izopenteniladenin, zeatin ve büyük olasılıkla Faktör H) protonemal tomurcuk formasyonu ve dallanmayı düzenler; giberellin benzeri bileşikler sitokinin tepkilerini inhibe eder; lunularik asit ve ABA dormansiyi ve kuruma direncini düzenler; etilen anteridiyal üretimi kontrol eder ve yaşlanmayı tetikler; asetil kolin ve kriptomolar (foto-alıcı pigmentler) ise briyofit büyüme ve gelişmesinin kontrol edilmesinde önemli bir rol oynar [47]. *Bryum argenteum* ve *Atrichum undulatum* morfogenezisi üzerine fitohormonların etkisi araştırıldığı bir çalışmada, IBA (indol-3-bütirik asit), NAA (α) ve BAP (6-benzilaminopurin) farklı konsantrasyonlarda besiyerine eklenmiştir [66]. Çalışma sonucunda düşük konsantrasyonlarda protonema boyutu artarken, yüksek konrantrasyonlarda (1µM ve sonrasında) azalma görülmüştür. *Bryum argenteum* morfogenezisi üzerine fitohormonların etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada giberellinler (GA₃ ve GA₇) çeşitli konsantrasyonlarda besiyerine eklenmiştir [67]. *Bryum argenteum* her iki bileşikle de benzer tepki göstermiştir, giberellin konrantrasyonunun arttığı besiyerlerinde hafif bir şekilde protonema çapı da artmıştır.

Briyofit doku kültürünü etkileyen fiziksel faktörler

Diğer doku kültürü çalışmalarında olduğu gibi briyofit doku kültürü çalışmaları da steril malzemelerle steril kabin içerisinde gerçekleştirilir. Doku kültürü çalışmalarının başarısı için hazırlık aşamaları ve sterilizasyona önem verilmelidir. Hazırlanan besiyerlerine briyofit türüne göre seçilen eksplantlar yerleştirilir, daha sonra kültürler büyüme odalarında veya büyüme dolaplarında büyütülür. Kültürlerin iyi bir şekilde büyütülmesi için nem, ışık ve sıcaklık kontrol altında tutulmalıdır. Kültürler, petri kapları, test tüpleri, magenta kapları, şişeler ve erlenler gibi farklı kaplarda büyütülebilirler [14].

Briyofitlerin *in vitro* kültüründe başarılı bir sıcaklık kontrolü önemlidir [68]. Araştırmalarda pek çok briyofit 15-25°C arası sıcaklıkta optimal büyüme göstermiştir, 30-35°C arası ise onlar için zararlıdır [68, 69]. Sıcaklık, ışık yoğunluğu ve gün uzunluğu gametangia ve sporofit indüklenmesinde önemli bir faktördür. Düşük sıcaklık (15°C) büyümeyi uyarabilir ancak bu duruma karşı verilen cevap türe özgüdür. Işık yoğunluğu ve gün uzunluğunun etkisi daha değişkendir [64, 68, 70-72]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kültür koşulları genellikle 25±2°C'de beyaz floresan ışık altında (47µmol ms⁻²s⁻¹ parlaklık) ve 16/8 saat aydınlık/karanlık rejiminde tutulacaktır [67, 73]. Daha sonra kültürler 4-6 haftalık periyotlarla altkültüre alınır [73]. Bu şartlar dışında briyofit doku kültüründe sıcaklık ve gün uzunluğunun çeşitli kombinasyonlarının da yapıldığı pek çok çalışma mevcuttur [74-76].

SONUÇ

Briyofitlerin ekonomik ve endüstriyel faaliyetlerde materyal olması dışında, bazıları belirlenmiş bazıları muhtemel olan faydalarından dolayı günlük yaşamdaki önemi hızla artmaktadır. Briyofitler üzerine yapılan biyoteknolojik çalışmalar, biyolojik aktivitelerine paralel olarak gerek dünya çapında yapılan çalışmaların devamı olarak, gerekse ülkemizde daha önce bu tarz çalışmaların yapılmamış olması sebebiyle artacaktır.

Briyofitlerin çeşitli biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi, bu aktivitelere sebep olan maddelerin tanımlanması veya çeşitli laboratuvar çalışmaları ile gerçekleştirilir. Yaşadıkları ortamdan doğrudan etkilenen briyofitlerden elde edilecek sonuçların doğruları tam olarak yansıtmayacağı düşüncesi sebebiyle, laboratuvarda briyofit doku kültürü ile briyofitlerin çoğaltılması ve bu şekilde analiz yapılması zorunludur.

Briyofitlerde uygulanan doku kültürü çalışmaları temel olarak aynı işlemlerle yapılsa da her türün kendi gelişim isteğine bağlı olarak sonuçlar farklılaşmaktadır. Çünkü briyofitler farklı morfoloji ve fizyolojiye sahip pek çok bitki çeşidinin bir arada olduğu (yapraklı karayosunları, ciğerotları, boynuzlu ciğerotları) geniş bir gruptur. Briyofitlerin doku kültürü çalışmaları briyofitler üzerine yapılan biyoteknolojik çalışmalar arasında temel aşamalardan biri olarak önemli bir yer tutmaktadır.

Bu derleme çalışması ile ülkemizde briyofitler üzerine yapılacak olan biyoteknolojik araştırmalara bir başlangıç oluşturmak amaçlanmıştır.

KAYNAKLAR

[1] Thieman, W. J. ve Palladiano, M. A. Çeviri Editörü: Mücella Tekelioğlu. 2013. Biyoteknolojiye Giriş. Palme Yayıncılık, Ankara.

[2] Asakawa, Y. 2011. Bryophytes: chemical diversity, synthesis and biotechnology. Flavour Fragr. J. 2011, 26, 318-320.

[3] Babaoğlu, M., Gürel E., Özcan S. 2002. Bitki Biyoteknolojisi-I Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya.

[4] Aydın, Y. 2007. Bitki Doku Kültürü Sistemleri. Bitkilerde Biyoteknolojik Uygulamalar Kursu. Gebze-Kocaeli.

[5] Onay, A., Yıldırım, H., Piriç, V., Tilkat, E., Çiftçi, Y. Ö., Akdemir, H., Süzerer, V., Çalar, N., Binici, M., Akdemir, Ö. F., Kılınç, F. M. 2012. Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum. Batman University Journal of Life Sciences, Volume 1, Number 2.

[6] Haberlandt, G. 1902. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitz-Ber Math-Nat Kl Kais Akad Wiss Wien, 111:69-92.

[7] Murashige, T. ve Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15: 473-497.

[8] Pierik, R. L. M. 1993. Micropropagation: Technology and Opportunities, In: Prakash J., Pierik R. L. M (eds), Plant Biotechnology. Commercial Prospects and Problems, UK.

[9] Kung, S. D. 1993. Introduction: From Green Revolution to Gene Revolution. Transgenic Plants Vol.2 Present Status and Social and Economic Impacts, Academic Press.

[10] Endress, H. R. 1994. Basic Techniques. In: Plant Cell Biotechnologies, Springer Verlag, Berlin.

[11] Pierik, R. L. M. 1997. In vitro Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers.

[12] Krikorian, A. D. ve Berquam, DL. 1969. Plant Cell and Tissue Culture: The Role of Haberlandt, The Botanical Review.

[13] Yağcı, C., Toker, M. C. ve Toker, G. 2008. Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoidler. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 1 (1): 47-58.

[14] Öktem, H. A. ve Yücel, M. 2012. Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik. Nobel Yayınları. Ankara.

[15] Murashige, T. 1974. Plant Propagation Through Tissue Culture. Annals Review Plant Physiology, 25, 35.

[16] Onay, A. 2003. Micropropagation of Pistachio. In: Micropropagation Forest Trees and Fruits. Forestry Sciences, Vol:75; Chapter 19; Section C: 565- 588. Edited by S Mohan Jain and Katsuaki Ishii. Kluwer Academic Publishers.

[17] Onay, A. 2005. Pistachio, Pistacia vera L. In: Protocols for Somatic Embryogenesis In Woody Plants. In forestry Sciences, (eds.: S. Mohan Jain & P. Gupta). Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

[18] www.istanbul.edu.tr/fennotlar1324976130.ppt. 14.02.2013.

[19] Didier, G. S. ve Zyrd, J. P. 2001. The Moss *Physcomitrella patens*, Now and Then. Plant Physiology, Vol. 127, pp. 1430-1438.

[20] Glime, J. M. 2013. Adaptive Strategies: Life Cycles. Chapt. 4-6. In: Glime, JM. Bryophyte Ecology. Volume 1. Physiological 4-6-1 Ecology Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. Last updated 19 February 2013 and available at www.bryocol.mtu.edu

[21] Asakawa, Y. 1981. Biologically active substances obtained from bryophytes. J Hattori Bot Lab. 50:123-142.

[22] Zinsmeister, H. D., Becker, H., Eicher, T. 1991. Moose, eine Quelle biologisch aktiver Naturstoffe? Angewandte Chemie. 103:134-151.

[23] Lang, D., Eisinger, J., Reski, R., Rensing, S. A. 2005. Representation and high-quality annotation of the *Physcomitrella patens* transcriptome demonstrates a high proportion of proteins involved in metabolism among mosses. Plant Biol. 7:228-237.

[24] Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B., Vidal, S. 2006. A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. Plant J. 45:237-249.

[25] Asakawa, Y. 2007. Biologically active compounds from bryophytes. Pure Appl Chem. 79:557-580.

[26] Rensing, S. A., Lang, D., Zimmer, A. D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P. F., Lindquist, E. A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin, I. T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S. I., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Ashton, N., Barbazuk, W. B., Barker, E., Bennetzen, J. L., Blankenship, R., Cho, S. H., Dutcher, S. K., Estelle, M., Fawcett, J. A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K. A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D. R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P. J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S. H., Stueber, K., Theodoulou, F. L., Tu, H., Van de Peer, Y., Verrier, P. J., Waters, E., Wood, A., Yang, L., Cove, D., Cuming, A. C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B. D., Reski, R., Grigoriev, I. V., Quatrano, R. S., Boore, J. L. 2007. The *Physcomitrella* Genome Reveals

Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science*. 319:64-69.

[27] Beike, A. K., Horst, N. A. ve Rensing, S. A. 2010. Technical notes: axenic bryophyte in vitro cultivation. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*, Vol 20, 102-108.

[28] Servettaz, C. 1913. recherches expérimentales sur le développement et la nutrition des mousses en milieux stérilisés, *Annales Sci. Nat. Biol. Veg.*, 17, 111-223.

[29] Becquerel, P. 1906. Germination des spores d'*Atrichum undulatum* et d'*Hypnum velutinum*. Nutrition et développement de leurs protonema dans des milieux stérilisés. *Rev gen bot* 18:49-67.

[30] Cvetić, T., Sabovljević, M., Sabovljević, A. ve Grubišić, D. 2005. In Vitro Culture and Apogamy-Alternative Pathway in the Life Cycle of the Moss *Amblystegium Serpens* (Amblystegiaceae). *Arch. Biol. Sci. Belgrade*, 57 (4), 267-272.

[31] Anonim. Bryonet. Yayınlanmamış Veri. 25.02.2013.

[32] Reski, R. 1998. Development, genetics and molecular biology of mosses. *Bot Acta*. 111:1-15.

[33] Reski, R. 2003. *Physcomitrella patens* as a novel tool for plant functional genomics. In: Vasil IK. (ed) *Plant biotechnology 2002 and beyond*. Kluwer Acad. Publ., pp 205-209.

[34] Cove, D. J. 2005. *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Gen.*, 39:339-358.

[35] Frank, W., Decker, E. L., Reski, R. 2005. Molecular tools to study *Physcomitrella patens*. *Plant Biol*. 7: 220-227.

[36] Cove, D. J., Bezanilla, M., Harries, P., Quatrano, R. S. 2006. Mosses as model systems for the study of metabolism and development. *Annu Rev of Plant Biol.*, 57:497-520.

[37] Beike, A. K., Decker E. L., Frank, W., Lang, D., Vervliet-Scheebaum, M., Zimmer, A. D., Reski, R. 2010. Applied Bryology – Bryotechnology. *Trop. Bryol.* 31:22-32.

[38] Prigge, M. J. ve Bezanilla, M. 2010. Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development*. 137: 3535-3543.

[39] Reski, R. ve Abel, W. O. 1985. Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165, 354-358.

[40] Hohe, A., Reski, R. 2002. Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. *Plant Sci*. 163:69-74.

[41] Decker, E. L., Reski, R. 2004. The moss bioreactor. *Curr Opin Plant Biol*. 7:166-170.

[42] Hohe, A., Reski, R. 2005. From axenic spore germination to molecular farming: one century of bryophyte in vitro culture. *Plant Cell Rep*. 23:513-521.

[43] Cove, D. 1996. In vitro culture, mutant selection, genetic analysis and transformation of *Physcomitrella patens*. *Plant Tissue Culture Manual*, F2, 1-43.

[44] Barta, A., Bajaj, Y. P. S. 1996. Regeneration of plants from protoplast of mosses (*Funaria hygrometrica* and *Physcomitrella patens*). *Biotechnology and Agriculture and Forestry*. Vol. 38.

[45] Schulz, P. A., Hofmann, A. H., Russo, V. E. A., Hartmann, E., Laloue, M., and Schwartzberg K von. 2001. Cytokinin Overproducing *ove* Mutants of *Physcomitrella patens* Show Increased Riboside to Base Conversion. *Plant Physiology*, Vol. 126, pp. 1224-1231.

[46] Akita, M., ve Valkonen, J. P. T. 2001. Conditions for efficient protoplast release in moss (*Physcomitrella patens*). *Mem. School. B.O.S.T. Kinki University*. No: 8: 49-55.

[47] Glime, J. M. 2013. Ecophysiology of Development: Hormones. Chapt. 5-1. In: Glime, J. M. *Bryophyte Ecology*. Volume 1. Physiological Ecology Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. 19 February 2013 and available at www.bryoecol.mtu.edu

[48] Goebel, K. 1905. Organography of plants, especially of the archegoniatae and spermatophyta. Part II. *Special organography*. Oxford: Clarendon Press.

[49] Worsdell, W. C. 1915. *The Principles of Plant Teratology*. Vol 1, Ray Society, London.

[50] Chopra, R. N. ve Kumra, P. K. 1988. *Biology of Bryophytes*. New Age International Publishers.

[51] Vujičić, M., Cvetić, T., Sabovljević, A., Sabovljević, M. 2010. Axenically culturing the bryophytes: a case study of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. ssp. *ruderalis* Bischl. & Boisselier (Marchantiophyta, Marchantiaceae). *Kragujevac Journal of Science* 32: 73-81.

[52] Sabovljević, A., Sabovljević, M. ve Jockovic N. 2009. In vitro culture and secondary metabolite isolation in bryophytes. In: Jain S.K. & Saxena P.K. (eds), *Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants*. New York, Humana Press, Springer science, pp. 117-128.

[53] Duckett, J. G., Fletcher, R., Matcham, H. W., Read, J. T., Russell, A. J., Pressel, S. 2004. In vitro Cultivation of Bryophytes; Practicalities, Progress, Problems and Promise. *Journal of Bryology*, 26: 3-20.

[54] Sokal, I., Kuta, E., Przywara, L. 1997. Callus induction and gametophyte regeneration in moss cultures. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 39:35-42

[55] Sabovljevic, M., Bijelovic, A., Dragicevic, I. 2003. In vitro culture of mosses: *Aloina aloides* (K.F. Schultz) Kindb., *Brachythecium velutinum* (Hedw.) B.S.G., *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid., *Eurhynchium praelongum* (Hedw.) B.S.G. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm. *Turk. J Bot* 27:441-446

[56] Rowntree, J. K. 2006. Development of novel methods for the initiation of in vitro bryophyte cultures for conservation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2006) 87:191-201

[57] Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M. M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., Rowntree, J. K. Conservation in vitro of threatened plants - progress in the last decade. *In Vitro Cell Dev Pl* 42: 206-214; 2006

[58] Md Giush, U. A., Chang, Y. D. ve Lee, C. H. 2010. Factors affecting on in vitro gametophyte formation from spore culture of four moss species. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.*, 28(1): 108-114.

[59] Ashton, N. W. ve Cove, D. J. 1977. The isolation and preliminary characterisation of auxotrophic and analogue resistant mutant in the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics*. 154, 87-95.

[60] Reski, R. ve Abel, W. O. 1985. Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165:354-358.

[61] Klebs, G. 1903. *Willkürliche Entwicklungsänderungen bei Pflanzen*. Fisher, Jena

[62] Kraus, E. J. and Kraybill, H.R. 1918. *Vegetation and reproduction with special reference to tomato*. Oregon Agr. College Expt. Sta. Bul. 149.

- [63] Wann, P. B. 1925. Some of the factors involved in the sexual reproduction of *Marchantia polymorpha*. American Journal of Botany 12: 307-318.
- [64] Chopra, R. N. ve Sood, S. 1973. In vitro studies on the reproductive biology of *Riccia crystallina*. Bryologist, 76: 278-285.
- [65] Sabovljević, A., Sabovljević, M., Grubisić, D., Konjević, R. 2005. The effect of sugars on development of two moss species (*Bryum argenteum* and *Atrichum undulatum*) during *in vitro* culture. Belg. Journ. Bot. 138(1): 79-84.
- [66] Bijelovic, A., Sabovljević, M., Grubisić, D., Konjević, R. 2004. Phytohormone influence on the morphogenesis of two mosses (*Bryum argenteum* Hedw. and *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv.). Israel Journal of Plant Sciences, Vol. 52, pp. 31-36.
- [67] Sabovljević, A., Sabovljević, M., Grubisić, D. 2010. Giberellin influence on the morphogenesis of the moss *bryum argenteum* hedw. In *in vitro* conditions. Arch. Biol. Sci., belgrade, 62(2): 372-380.
- [68] Rowntree, J. K., Pressel, S., Ramsay, M. M., Sabovljević, A., Sabovljević, M. 2011. In vitro conservation of European bryophytes. In *Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 47:55-64.
- [69] Furness, S. B., Grime, J. P. 1982. Growth-Rate and Temperature Responses in Bryophytes. A Comparative-Study of Species of Contrasted Ecology. *J Ecol.* 70:525-536.
- [70] Monroe, J. H. 1965. Some factors evoking formation of sex organs in *Funaria*. *Bryologist* 68: 337-339.
- [71] Nakosteen, P. C. ve Hughes, K. W. 1978. Sexual life cycle of three species of Funariaceae in culture. *Bryologist* 81: 307-314.
- [72] Hohe, A., Rensing, S. A., Mildner, M., Lang, D., Reski, R. 2002b. Day length and temperature strongly influence sexual reproduction and expression of a novel MADS-box gene in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biology* 4: 595-602.
- [73] Sabovljević, A., Soković, M., Glamočlija, J., Čirić, A., Vujučić, M., Pejin, B., Sabovljević, M. 2011. Bio-activities of extracts from some axenically farmed and naturally grown bryophytes. *Journal Medicinal Plants Research*, Vol. 5(4), pp.565-571.
- [74] Vujičić, M., Sabovljević, A. & Sabovljević, M. 2009. Axenically culturing the bryophytes: a case study of the moss *Dicranum scoparium* Hedw. (Dicranaceae, Bryophyta). *Botanica Serbica* 33(2): 137-140.
- [75] Vujičić, M., Sabovljević, A. ve Sabovljević, M. 2011. Axenically culturing the bryophytes: establishment and propagation of the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Bryophyta, Hypnaceae) in *in vitro* conditions. *Botanica Serbica* 35(1), 71-77.
- [76] Sabovljević, A., Vujučić, M., Skorić, M., Bajić-Ljubičić, J., Sabovljević, M. 2012. Axenically Culturing the Bryophytes: Establishment and Propagation of the Pleurocarpous Moss *Thamnobryum alopecurum* Nieuwland ex Gangulee (Bryophyta, Neckeraeae) In *Vitro Conditions*. *Pak. J. Bot.*, 44(1): 339-344.