

**MİKROÇOĞALTIMDA ÇEVRE KONTROLÜNDE SON  
GELİŞMELER: BESİN ORTAMI ÜST ÇEVRESİ VE  
KÜLTÜR ORTAMI ÇEVRESİ FAKTÖRLERİ**

**Ercan ÖZKAYNAK**

**Bülent SAMANCI**

**Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü  
Antalya/TURKEY**

**ÖZ:** Mikroçoğaltım, genetik olarak birbirinin aynı olan çok fazla sayıda bitki üretimi için kullanılan bir bitki doku kültürü tekniğidir. Bu derlemede, mikroçoğaltımda çevre kontrolünde son yıllardaki gelişmeler değerlendirilmiş ve ilk olarak; ışık, karbondioksit konsantrasyonu, sıcaklık, bağıl nem ve oksijenin de içinde bulunduğu besin ortamı üst çevresi faktörlerinin in vitro bitki fotosentezi ve büyümesine etkileri tartışılmıştır. İkinci olarak, pH, osmotik potansiyel, iyon komponentlerinin konsantrasyonları, şeker konsantrasyonunu kapsayan fiziksel ve kimyasal besin ortamı çevre faktörlerinin in vitro bitki büyümesine etkileri tartışılmıştır. Son olarak da in vitro bitkilerin büyümesinde etkili olan eksplant sıklığı, eksplant büyüklüğü ve patojenler gibi biyolojik faktörler tartışılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Mikroçoğaltım, fotoototrofik mikroçoğaltım, şeker, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ışık, pH.

**RECENT ADVANCES IN ENVIRONMENTAL CONTROL IN  
MICROPROPAGATION: AERIAL AND CULTURE  
MEDIUM ENVIRONMENTAL FACTORS**

**ABSTRACT:** Micropropagation is a plant tissue culture technique used for obtaining a large number of genetically identical plantlets. In this article, we evaluate recent topics in environment control in micropropagation and firstly, effects of aerial environmental factors including light, carbon dioxide, temperature, relative humidity and oxygen on the growth and photosynthesis of plantlets in vitro are discussed. Secondly effects of culture medium physical and chemical environmental factors including sugar concentration, concentrations of ion components, osmotic potential and pH of the culture medium on the growth of plantlets in vitro are discussed. Lastly, effects of biological factors such as explant size, explant density and pathogens on the growth of plantlets in vitro are discussed.

**Keywords:** Micropropagation, photoautotrophic micropropagation, sugar, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, light, pH.

**GİRİŞ**

Dünyada 600'e yakın kuruluş bitki doku kültürü yöntemlerini ve bunlardan özellikle mikroçoğaltımı kullanarak 50000 bitki çeşidinde, yılda yaklaşık olarak 500

milyondan fazla bitki üretimi yapmaktadır (Yu, 1998). Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından suni besin ortamlarında ve steril koşullar altında genetik olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitki üretmek amacıyla kullanılan bir doku kültürü tekniğidir. Bu teknik bahçe ve tarla bitkileri, peyzaj ve ormancılıkta birçok bitki türünde kullanılmaktadır (Kozai ve ark., 1997a; Nquyen ve Kozai, 1998; Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Buna rağmen, yüksek laboratuvar masrafları, düşük *in vitro* büyüme oranı, fizyolojik olarak üniform olmayan bitki gelişimi ve alıştırma aşamasında zayıf yaşama oranlarından kaynaklanan yüksek üretim maliyetlerinden dolayı mikroçoğaltımın ticari kullanımı günümüzde hala sınırlıdır. Yüksek üretim maliyetlerini düşürmek amacıyla mikroçoğaltımda çevre kontrolü ile ilgili son 10 yıldır yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bitkinin geliştiği kültür kutusu mikro çevre olarak değerlendirilmekte ve bitkinin geliştiği bu çevrenin kontrolü çalışmaları ön plana çıkmaktadır (Nquyen ve Kozai, 1998; Hatipoğlu, 1999; Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Konvensiyonel mikroçoğaltımda bitkilerin büyümeleri için enerji ve karbon kaynağı olarak şeker kullanılmakta, fotosentez için yeterli karbondioksit ve ışık yoğunluğu sağlanamamakta ve bitkilerin fotosentetik kapasiteleri düşük olmaktadır. Bu tip mikroçoğaltım, karbon kaynağı olarak şeker kullanıldığı için heterotrofik mikroçoğaltım adı verilmektedir. Sadece inorganik enerji kaynağı, ışık enerjisi, karbon dioksit, su ve minerallerin kullanıldığı; besin ortamında karbon kaynağı olarak şekerin kullanılmadığı mikroçoğaltım tipine ise fotoototrofik mikroçoğaltım adı verilmektedir. Fotoototrofik mikroçoğaltımda kültür ortamında *in vitro* bitkilerde organik maddelerin üretimi, inorganik maddeleri kullanarak fotosentezle sağlanabilmektedir. Fotoototrofik mikroçoğaltımda genel olarak büyük boyutlu kültür kapları kullanılabilen, mikrobiyal kontaminasyon azaltılmakta, bitki kalitesi yükseltilmekte ve heterotrofik mikroçoğaltıma göre bitkiler daha iyi geliştiği için alıştırma aşamasına gerek kalmadan *ex vitro* koşullara aktarılabilir (Kozai, 1991a; Pospisilova ve ark., 1992; Tanaka ve ark., 1992; Levin ve ark., 1997; Nquyen ve Kozai, 1998; Pruski ve ark., 2002).

Bu derleme, mikroçoğaltımla *in vitro* bitki üretiminde bitki kalitesini artırmak ve üretim maliyetlerini düşürmek amacıyla fiziksel, kimyasal ve biyolojik çevre koşullarının kontrolünü sağlamak için uygulanan yeni gelişmeleri değerlendirmek amacıyla hazırlanmıştır.

## **MİKROÇOĞALTIMDA *IN VITRO* ÇEVRE**

Mikroçoğaltımda *in vitro* bitkinin büyüme ve gelişimini etkileyen çevre faktörleri iki ana başlık altında değerlendirilmektedir (Jeong ve ark., 1995; Kozai ve

Smith, 1995; Kozai ve ark., 1995; Kozai ve ark., 1997a). Bunlardan birincisi, bitkinin kök bölgesinin geliştiği besin ortamı çevresi ve diğeri ise bitkilerin yaprak, gövde gibi vejetatif kısımlarının geliştiği besin ortamı üst çevresidir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Mikroçoğaltımda çevre faktörleri.

Table 1. Environmental factors in micropropagation.

<i>In vitro</i> çevre <i>In vitro</i> environment	
A. Bitkinin yaprak, gövde gibi üst vejetatif aksamının geliştiği çevre faktörleri (Besin ortamı üst çevresi) Aerial environmental factors	B. Kök bölgesi çevre faktörleri (Besin ortamı çevresi) Culture medium factors
1) Fiziksel çevre faktörleri Pyhsical environment factors a) Işık Light b) Gaz kompozisyonu Gas composition c) Sıcaklık Temperature d) Bağıl nem Relative humidity e) Gaz geçirgenliği Gas conductivity	1) Fiziksel çevre faktörleri Pyhsical environment factors a) Sıcaklık Temperature b) Osmotik potansiyel Osmotic potential c) Ortamın camsılaşılmaya etkisi Vitrification
2) Kimyasal çevre faktörleri Chemical environment factors a) Etilen ve hava değişim sayısı Ethylene and air change	2) Kimyasal çevre faktörleri Chemical environment factors a) İyon bileşenleri Ion components b) Organik bileşenler Organic components c) Ph
3) Biyolojik çevre faktörleri Biological environment factors b) Mikroorganizmalar Microorganisms	3) Biyolojik çevre faktörleri Biological environment factors a) Eksplant büyüklüğü Explant size b) Bitki sıklığı Plant density c) Bakteriyel ve fungal patojenler Bacterial and fungal pathogenes d) Yararlı mikroorganizmalar Beneficial microorganisms e) Diğer faktörler Other factors

## **IN VITRO KÜLTÜRLERDE BİTKİNİN YAPRAK, GÖVDE GİBİ ÜST VEJETATİF AKSAMININ GELİŞTİĞİ ÇEVRE FAKTÖRLERİ (BESİN ORTAMI ÜST ÇEVRESİ)**

### **FİZİKSEL ÇEVRE FAKTÖRLERİ**

#### **1. Işık**

##### **a) Işık yoğunluğu**

Fotosentetik foton akış yoğunluğu ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), bitkinin büyüme ve gelişmesinde, bitkilerin fotosentez yapabilmeleri için gerekli ışık yoğunluğu için bir ünite olarak kullanılmaktadır. Fotosentetik foton akış yoğunluğu (photosynthetic photon flux density, PPF) kültürlerin fotosentezinin sağlanması için en önemli parametrelerden biridir. Son zamanlara kadar mikroçoğaltımda genel olarak PPF'nin fotosentez üzerine etkilerinin fazla olmadığı ve yüksek PPF'nin kültürlerin büyümesini engellediği düşünülüyordu. Fakat son yıllarda yüksek PPF'nin fotosentezi ve büyümeyi teşvik ettiği belirlenmiştir. Kültür kutusundaki  $\text{CO}_2$  konsantrasyonunun kültürlerin  $\text{CO}_2$  doyma noktasından yüksek olması durumunda; yüksek PPF,  $\text{CO}_2$  zenginleştirilmesi ile birleştirildiğinde patates bitkilerinde fotosentetik büyümenin teşvik edildiği görülmüştür (Cournac ve ark., 1992). PPF arttıkça bitkilerde daha fazla kuru ağırlık artışı sağlamıştır. Kültür kutularındaki PPF, ışık kaynaklarından enerji çıkışı ve tipi, kültür kutusunun şekli ve materyali, kültür dolabındaki kutunun pozisyonu, ışık kaynağının pozisyonu, kültür kutusu kapak tipleri, kültür dolabı tipi ve kültür odasının ışık karakteristikleri gibi fiziksel özelliklerden etkilenmektedir (Kozai ve ark., 1990; Fujiwara ve Kozai, 1995; Nquyen ve Kozai, 1998).

##### **b) Işık kalitesi ve dağılımı**

*In vitro* kültürlerde ışığın dağılımını, öncelikli olarak kültür kutusu materyali ve ışık kaynağının özellikleri etkilemektedir. Farklı ışık kaynaklarında ışığın dağılımının önemli derecede farklılık gösterdiği ve ışık kaynağı olarak florasen lambalar kullanıldığında yüksek basınçlı sodyum lambalarına göre daha düşük kızıl ötesi radyasyon ürettiği belirtilmiştir. Işık dağılımı genel olarak kültür ihtiyaçlarına göre ayarlanır (Kozai ve Sekimoto, 1988). Sıra ışık kaynakları (florasen lambalar gibi) genel olarak kültür odalarında üniform yatay bir ışık dağılımı ve yeterli aydınlatmayı sağlamak için kültür kutusunun 30-40 cm yukarisına paralel gelecek şekilde yerleştirilir. Işık dağılımının birçok kültürde büyümeyi ve gelişmeyi etkilediği belirtilmiştir. Örneğin, domates kotiledonlarında tomurcuk farklılaşmasını, patatesten

büyüme ve morfolojiyi etkilemiştir (Gönülşen, 1987; Wilson ve ark., 1993; Nquyen ve Kozai, 1998).

Kırmızıdan kızıl ötesine ve maviden kırmızıya olan foton akış oranları bitki morfogenezisi için önemli faktörlerdir. Kültüre kırmızı ve kızıl ötesi ışık kaynakları uygulandığında *Azolea* bitkisine ait eksplantlarda (beyaz florasan lambalara göre) köklenme sağlanmıştır (Nquyen ve Kozai, 1998). Bitki morfogenezisinin kontrolü için mavi, kırmızı ve kızıl ötesi ışıkların düşük seviyelerde kullanılması gerektiği ve farklı tiplerde yayma özelliğine sahip olan ışık yayıcı diodlar kullanılarak bu ışıkların dağıtılarak verilebileceği belirtilmiştir. Işık yayıcı diodların kullanımı ile kırmızı ve kızıl ötesi ışığın dağılımı sağlanarak *in vitro* patates bitkilerinin büyümesi ve sürgün uzunluğu teşvik edilmiştir (Fujiwara ve Kozai 1995; Jeong ve ark., 1995; Miyashita ve ark., 1995; Kozai ve ark., 1997a, b; Kubota ve ark., 1997). Kirdmandee (1995), Okaliptusta kırmızı ışıkta kontrole (florasan lamba) göre 1.5 kat daha fazla boğum arası uzunluğu saptamıştır. Işık yayıcı diodlar kullanılarak  $140 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  'lık fotosentetik foton akış yoğunluğunun kırmızı ışıkta 4 ve kızıl ötesi ışıkta  $2 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 'ye olarak yansıtıldığı belirlenmiştir (Iwanami ve ark., 1992). *Pelargonium*'da *in vitro* koşullarda, kırmızı ışık uygulamasının beyaz ışığa göre sap uzunluğunu önemli derecede artırdığı, mavi ışığın ise engellediği saptanmıştır (Kozai ve ark., 1992).

### c) Işık yönü

Konvensiyonel mikroçoğaltımda kültür kutuları üstten ışıklandırma ile ışıklandırılır. Üstten ışıklandırma sistemi kültürlerin büyüme ve kalitesi için her zaman iyi performans göstermemekte ve kültür odasının ışıklandırılması ve soğutulmasında elektrik maliyetini artırmaktadır. Son yıllarda *in vitro* mikroçoğaltımda yandan ışıklandırma sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemde kültür kutuları bir hat oluşturacak şekilde dizilmekte ve ışık kaynağı bu kutu hattının yanına konmakta ve kutunun yan duvarlarına doğru yandan ışıklandırma ile bitkiler ışıklandırılmaktadır. Bu sistemin kullanımı ile *in vitro* bitki büyümesinin teşvik edildiği, sürgün uzunluğunun kontrol edilerek sürgün kalitesinin artırıldığı ve üretim maliyetlerinin azaltıldığı belirtilmiştir (Hayashi ve ark., 1992; Kozai ve ark., 1992; Fujiwara ve Kozai, 1995).

Yandan ışıklandırma sisteminde ışık yoğunluğunun üstten ışıklandırma sistemine göre yaklaşık 5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Yatay sistemde dikey sisteme göre daha düzenli ve üniform yapraklar elde edildiği ve bunun sonucunda kısmi olarak altta daha büyük, üstte daha küçük yapraklar oluştuğu belirlenmiştir. Bu sistemde enerjinin üst, orta ve alt kısımlardaki yapraklara dağıtımı düzgün bir şekilde sağlanır. Yandan ışıklandırma sisteminde bitkilerin kısa boğum arası uzunluğuna,

daha fazla yaprak sayısına ve kuru ağırlığa sahip oldukları belirlenmiştir. Bu sistemde birim alanda üstten ışıklandırma sistemine göre daha fazla sayıda kültür kutusu yerleştirilebilmekte ve kutularının kapladığı alan minimuma düşmektedir. Yandan ışıklandırma sisteminde geliştirilen bitkilerin üstten ışıklandırma sistemine göre ex vitro koşullara transfer aşamasında daha sağlıklı ve kaliteli oldukları belirtilmiştir (Aitken-Christie ve ark., 1995; Fujiwara ve Kozai, 1995; Kitaya ve ark., 1996; Kozai ve ark., 1997a,b; Kubota ve ark., 1997; Nquyen ve Kozai, 1998). Patateste yapılan araştırmada yandan ışıklandırma sisteminde ince ve zayıf sürgün yerine daha kısa sürgün uzunluğu saptanmıştır (Hayashi ve ark., 1992).

#### **d) Işık döngüsü**

Konvensiyonel mikroçoğaltımda genellikle 16/8 saat aydınlık/karanlık ışık döngüsü kullanılmaktadır. Morini ve ark. (1990), 16/8 saat ışık döngüsüne alternatif ışık döngü sistemlerinde in vitro bitki gelişimini incelemişler ve şeftali sürgünlerinde 4 saat ışık ve 2 saat karanlık şeklinde devam eden ışık döngüsünün 16/8 saat uygulamaya göre daha fazla büyüme sağladığını saptamışlardır. Hayashi ve ark., (1993) 24, 6, 1,5 ve 0,375 saat ışık döngülerinde kültür kutusunda CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun değişimini incelemişlerdir. Işık döngüsü kısaldıkça in vitro bitkilerde günlük CO<sub>2</sub> alımı artmış ve kısa ışık döngülerinde yaş ve kuru ağırlıklar daha yüksek bulunmuş ve büyüme teşvik edilmiştir. Araştırmalarda bağıl nemin de ışık döngülerinden etkilendiği ve karanlık periyotta bağıl nemin % 100'e yakın olduğu ve fotoperiyotta ise % 95 civarına düştüğü belirtilmiştir. Yapılan araştırmalarda genel olarak 12 saatten daha az veya 24 saatlik ışık uygulamalarının kültürlerin büyüme ve gelişmesini engellediği veya geciktirdiği belirtilmiştir (Fujiwara ve Kozai, 1995; Jeong ve ark., 1995; Kozai ve ark., 1997a; Kubota ve ark., 1997).

## **2. Gaz kompozisyonu**

### **a) Karbondioksit konsantrasyonu**

Kültür kutusu kapakları genel olarak patojenlerin girişini engelleyecek şekilde üretilmiştir. Bu durum aynı zamanda kültür kutusu içi ve dışı arasındaki gaz değişimini de engellemektedir. Sınırlı gaz değişiminden dolayı kültür kutusundaki karbondioksit konsantrasyonunun in vitro bitkilerde fotoperiyodun başlamasından iki saat sonra hızlı bir şekilde azaldığı ve daha sonra stabil bir konsantrasyona ulaştığı belirtilmiştir (Kozai ve Sekimoto, 1988; Hayashi ve ark., 1993; Desjardings, 1995).

Kültür kutusundaki CO<sub>2</sub> konsantrasyonu, kültür kutusunun içindeki CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun kontrol edilmesi veya kültür kutusundaki havalanma oranının

artırılması ile artırılabılır. Kültür kutusundaki yüksek CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun sağlanması ve yüksek bir gaz alış-verişi ile havalandırma için mikro gözenekli plastik film kapaklar kullanılmaktadır. Gaz geçirgen film kapaklarının kullanımı ile kültür ortamının gaz değişiminde artış olduğu, bağıl nem ve camsılaştırmanın azaldığı ve net fotosentez oranının ve büyümenin olumlu etkilendiği belirtilmiştir. Kültür kutusu içindeki CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun aktif kontrolü; CO<sub>2</sub>'nin kültür kutusuna doğrudan enjeksiyonu veya güçlü bir havalandırma sistemi ile veya büyük kültür kutusu (28 cm genişliğinde, 53 cm uzunluğunda ve 10,5 cm yüksekliğinde) kullanılarak sağlanabilmektedir (Jeong ve ark., 1995; Kozai ve ark., 1995; Kozai ve ark., 1997a).

Fotoototrofik mikroçoğaltımda yüksek ışık yoğunluğunda (100-200µmol/m<sup>2</sup>s), kültür ortamına CO<sub>2</sub> ilavesinin tütün, *Cymbidium* (bir çeşit orkide türü) karanfil ve patates bitkilerinde büyümeyi teşvik ettiği belirlenmiştir. Yine başka bir araştırmada büyük kültür kutusu kullanımı ile, şekeriz besin ortamında çilek bitkisinde konvensiyonel mikroçoğaltıma göre kuru ağırlık ve net fotosentez oranı daha yüksek bulunmuştur (Fujiwara ve ark., 1988; Kubota ve Kozai, 1992; Kozai ve Jeong, 1993; Nquyen ve Kozai, 1998). Patateste büyüme odasına 1500 µl/l CO<sub>2</sub> ilavesi ile kaliteli ve büyük kütleli bitkilerin hızlı bir şekilde üretimi sağlanmıştır (Pruski ve ark., 2002).

CO<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> dengesi ile ilgili yapılan çalışmalarda in vitro kültür sisteminde CO<sub>2</sub> sağlamak için bir bitki ile yararlı mantardan (Shiitake mantarı, *Lentinus edodes* Sing.) oluşan kültür sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemde ışık periyodunda bitki fotosentezde CO<sub>2</sub> kullanmakta ve O<sub>2</sub> vermektedir. Mantar miselleri bu O<sub>2</sub>'yi kullanarak, bitkilerin fotosentez yapabilmeleri için gerekli olan CO<sub>2</sub>'yi üretmektedir. Böylece kültür bitkileri ve mantarlar arasında kapalı bir sistemde CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> alış-verişi sağlanabilmektedir. Bu sistemde bitkiler hasat edildikten sonra kalan artıklar yararlı mantarların gelişmelerinde büyüme ortamı olarak kullanılabilir (Kitaya ve ark., 1995a; Kitaya ve ark., 1996).

Buddendorf-Joosten ve Woltering (1996), patateste farklı gaz kompozisyonlarının (kontrol: % 21 O<sub>2</sub>+% 0,05 CO<sub>2</sub>; A: % 21 O<sub>2</sub>+% 0,05 CO<sub>2</sub>+0,2µl/l etilen; B: % 21 O<sub>2</sub>+% 5 CO<sub>2</sub>; C: % 3 O<sub>2</sub>+% 0,05 CO<sub>2</sub>) in vitro bitki gelişimine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmada en yüksek yaprak ağırlığı ve boğum arası uzunluğu B ortamında; en yüksek yaprak alanı ve yaprak sayısı C ortamında; klorofil içeriği ise kontrolde bulunmuştur.

### b) Oksijen

*Primula moacoides* (C3 bitkisi) bitkisinde yapılan araştırmada in vitro koşullarda net fotosentez oranı % 1 O<sub>2</sub> (10 µmol/mol)'de % 21 O<sub>2</sub>'den yaklaşık 3 kat,

% 12 O<sub>2</sub>'de 1.5 kat daha fazla bulunmuştur (CO<sub>2</sub> konsantrasyonu yaklaşık 200µmol/mol) (Shimada ve ark., 1988). Kasımpatı (C<sub>3</sub> bitkisi) bitkisinin büyümesine düşük O<sub>2</sub> konsantrasyonlarının uzun süreli etkilerini araştıran Tanaka ve ark., (1991), % 5, 15 ve 21 O<sub>2</sub>'ye göre % 10 O<sub>2</sub>'nin (30 günde) önemli derecede daha yüksek bitki kuru ağırlık artışı sağladığını saptamıştır. Uygulamada O<sub>2</sub> konsantrasyonunun kontrolünde O<sub>2</sub> seviyesinin % 10 olması tavsiye edilmektedir. Kültür kutusundaki O<sub>2</sub> konsantrasyonu kutudaki CO<sub>2</sub> konsantrasyonu arttıkça azalır. *Caladium bicolor* (C<sub>3</sub> bitkisi) bitkisinde kültür kutusundaki O<sub>2</sub> azalması CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun artışı ile eşit bulunurken, *Dendrobium phalaenopsis* (CAM bitkisi) bitkisinde in vitroda O<sub>2</sub> konsantrasyonu düşüşü CO<sub>2</sub> konsantrasyonu artışından daha fazla bulunmuştur. Bu sonuçlar kültür kutusundaki O<sub>2</sub> konsantrasyonu değişiminin karbon fiksasyon sistemine bağlı olduğunu göstermektedir. Konvensiyonel mikroçoğaltımda kültür kutusundaki CO<sub>2</sub> konsantrasyonu genel olarak % 0,01-% 1-3 arasında değişirken O<sub>2</sub> konsantrasyonu yaklaşık % 18-22 arasında değişmektedir. Başka bir deyişle O<sub>2</sub> konsantrasyonunun % 21'den % 18'e kadar değişimi C<sub>3</sub> bitkilerinin net fotosentez oranını etkilemektedir. Fotoperiyotta O<sub>2</sub> konsantrasyonunun azalmasının hem net fotosentez oranını ve in vitro bitki büyümesini artırdığı hem de anaerobik koşullardan dolayı biyolojik kontaminasyonu azalttığı belirtilmiştir (Kozai ve ark., 1992; Fujiwara ve Kozai, 1995; Kitaya ve ark., 1996 ve Nquyen ve Kozai, 1998).

### c) Sıcaklık

Genelde klasik mikroçoğaltımda 25 °C kültür odası sıcaklığı yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bitki türüne özgü sıcaklık istekleri de farklılık göstermektedir (Gönülşen 1987; Kitaya ve ark., 1996). *In vitro* kültürlerde bitkilerin karanlık ve fotoperiyotta farklı sıcaklıklarda büyütülmesi mikroçoğaltımda önemli bir uygulamadır. Bu uygulamada in vitro bitkiler fotoperiyot ve karanlık periyotta farklı sıcaklıklarda büyütülmekte ve bu sıcaklık farklılıklarının in vitro bitki gelişimine olumlu etkileri olmaktadır. Bazı süs bitkilerinde fotoperiyot ve karanlık periyot sıcaklık farkı (difference of photoperiod and dark period temperature, DIF) artışı ile sürgün uzunluğu ve boğum arası uzunluğunda artış saptanmıştır (Kitaya ve ark., 1995b; Kubota ve ark., 1997). Üç farklı 25/15 °C (+10 DIF), 20/20 °C (0 DIF) ve 15/25 °C (-10 DIF) DIF uygulamalarının CO<sub>2</sub>'ce zenginleştirilmiş (1300-1500 µmol/mol) koşullarda in vitro patates bitkilerinin sap ve sürgün uzamasına olumlu etkilerini belirlemişlerdir (Jeong ve ark., 1995). Araştırmada sürgün uzunluğu düşük gece gündüz sıcaklık farkında daha kısa bulunmuş; kuru ve yaş ağırlıklar ise üç uygulamada da benzer bulunmuştur. Benzer bir sonuç *in vitro* koşullarda geliştirilen nane bitkisinde de bulunmuştur (Kubota ve ark., 1997). Başka bir araştırmada da gece gündüz sıcaklık farkı arttıkça sap uzunluğunun arttığı belirtilmiştir (Kozai ve ark., 1997b).



#### d) Bağıl nem

Kültür kutusundaki bağıl nem, *in vitro* koşullarda bitkilerin su ilişkilerini etkileyen önemli bir çevre faktörüdür. Bitkilerin su buharı basıncı ve terleme oranlarının % 98, % 96 ve % 94 bağıl nemde, % 99 luk bağıl nemden sırasıyla 2, 4 ve 6 kez daha fazla olduğu (oda sıcaklığında) bulunmuştur (Fujiwara ve Kozai, 1995; Nquyen ve Kozai, 1998). Bağıl nemdeki küçük bir farklılık su oranı ve bazı iyonlarının alımında önemli bir farklılığa neden olabilmektedir. Örneğin *in vitro* koşullarda 20 gün süreyle büyütülen patates bitkilerinin % 80 bağıl nemde % 90-95 neme göre birim kuru ağırlık başına % 50 daha fazla su ve iyon ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , P, K, Ca ve Mg) absorbe ettikleri belirlenmiştir (Kitaya ve ark., 1996). Patateste bağıl nemin % 100'den % 60'a düşürülmesinin yaprak alanı ve ağırlığını artırdığı, yaprak sayısı, klorofil içeriği ve boğum arası uzunluğunu ise azalttığı saptanmıştır (Buddendorf-Joosten ve Woltering, 1996).

Ayrıca yüksek bağıl nem, zayıf gelişmeye ve *ex vitro* koşullara transferden sonra fizyolojik ve morfolojik yapılar da farklılıklara neden olabilmekte ve bitkilerde yüksek oranda ölümler görülebilmektedir. Kültür kutusundaki bağıl nemin azaltılması ile kutikula tabakası ve stoma fonksiyonunun geliştiği ve daha kısa sürgün uzunluğuna ve daha yüksek kuru madde oranına sahip güçlü bitkiler elde edildiği belirtilmiştir (Kozai ve Jeong, 1993; Jeong ve ark., 1995; Nquyen ve Kozai, 1998; Pruski ve ark., 2002). Tanaka ve ark. (1992), kültür kutusundaki bağıl nem ve bitkilerin terleme oranının artmasının *in vitro* eksplantlardan bitki gelişimi sağladığını saptamışlar ve yaprak alanı artış oranının su buharı basıncının artış oranından daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Düşük bağıl nemde büyütülen bitkilerde *in vitro* koşullardan seraya veya açık tarlaya şaşırtmada yapraktan su kaybı ve su stresine karşı dayanıklılığın kontrol edilebileceği ve bitkilerin yaşama oranlarının artırılabilirliği belirtilmiştir (Buddendorf-Joosten ve Woltering, 1996).

#### e) Gaz geçirgenliği (hava hareketi, hava akımı)

Gaz geçirgenliğinin olmadığı kültür kutularında kültür kutusu içi ve dışı arasındaki gaz alış-verişi engellenmekte ve bunun sonucunda da bitki büyümesi sınırlı kalmaktadır. Kültür kutusunda düşük hava akımı  $\text{CO}_2$  konsantrasyonunda, bağıl nemde, hava sıcaklığında varyasyonlara neden olmaktadır. Mikro gözenekli kapaklara sahip kültür kutusunda ise kutu ile kültür odasındaki doğal hava değişiminin arttığı ve kültür kutusuna mikroorganizmaların girişinin engellendiği belirtilmiştir (Kozai ve ark., 1994)

Metalhidrat partikülleri kullanılarak kültür kutusu içindeki hava hareketleri belirlenmiştir. Araştırmada kültür kutusunun merkezinde aşağıdan yukarıya doğru,

kültür kutusunun yan taraflarında ise yukarıdan aşağıya doğru hava akımları saptanmıştır. Hava akımlarının kültür kutusu tipinden ve kısa dalga boylu radyasyon akışından da etkilendiği belirtilmiştir (Kitaya ve ark., 1996). Tanaka ve ark., (1992), in vitro koşullarda patates bitkisinde net fotosentez oranının doğal olarak havalandırılan kültür kutusunda; güçlendirilmiş havalandırma sağlayan sisteme göre daha düşük olduğunu saptamışlardır. Güçlendirilmiş havalandırma sisteminde doğal havalandırmaya ek olarak CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> gibi gazların karışımı ortama ilave edilmektedir. Güçlendirilmiş havalandırma sistemiyle meydan gelen fotosentez artışının kültür kutusundaki hava akımı artışıyla olumlu ilişkisi olduğu belirtilmiştir.

### 3. Kimyasal Çevre Faktörleri

#### a) Etilen ve hava değişim sayısı

Hava geçirgenliği olan kültür kutusunda etilen konsantrasyonunun artarak 2µmol/mol'den daha üst seviyelere çıktığını ve 21 günden 60 güne kadar büyütülen kültürlerde etilenin *Dahlia* ve *Petunia* bitki kültürlerinin büyümesini azalttığını belirtmiştir (Nquyen ve Kozai, 1998). Etilen konsantrasyonu toksik bileşiklerden dolayı hava alış-verişini sağlayan kültür kutularında bazı zamanlarda yükselmektedir. Bu problemleri çözenin basit bir yolu kültür kutusunun hava değişim sayısını artırmaktır. Hava değişim sayısı artışı, gaz alış-verişini sağlayan filtre veya güçlü bir havalandırma sistemi ile sağlanmaktadır (Fujiwara ve Kozai, 1995). Patateste yapılan araştırmada in vitro koşullarda etilenin bitki büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Buddendorf-Joosten ve Woltering, 1996).

Kültür kutusunda gaz difüzyonu; kültürler ile kutunun üst boşluk kısmındaki hava arasında gaz değişiminin, kültürler ile ortam arasındaki çözücülerin değişiminin ve ortamdaki çözücüler ve kutunun üst kısmındaki boşluktaki gazların dağılımının üniform olmasını sağlar (Fujiwara ve Kozai, 1995).

### 4. Biyolojik Çevre Faktörleri

#### a) Mikroorganizmalar

Mikroçoğaltımda kültür başlangıcında eksplantların ve kültür ortamının mikrobiyal kontaminasyonlardan temiz olması gerekmektedir. Şeker içeren ortamlar mikroorganizmaların gelişimi için uygun ortamlardır. Mikroorganizmalar ortamda bazı toksik maddeler üretebilirler ve sonuçta da besin ortamında bitkilerle rekabete girerek bitkilerin yapılarının bozulmasına ve ölmesine neden olurlar. Fotoototrofik mikroçoğaltımda ortamda şeker bulunmadığı için mikroorganizmaların gelişmesi büyük oranda engellenebilmektedir. Mikroorganizmalar şekerli ortamda yavaş

büyümekte ve ortamdaki toplam populasyonları düşük kalmaktadır. Böylece ortamda bulunan az miktardaki mikroorganizmalardan dolayı *in vitro* bitkinin yapısının bozulması ve ölmesi engellenebilmektedir (Kozai ve Smith, 1995; Levin ve ark., 1997).

## **KÖK BÖLGESİ ÇEVRE FAKTÖRLERİ (BESİN ORTAMI ÇEVRESİ)**

Mikroçoğaltımda köklerin geliştiği besin ortamının fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri *in vitro* bitki büyüme ve gelişmesini etkilemektedir.

### **1. Fiziksel Çevre Faktörleri**

#### **a) Sıcaklık**

Sıcaklık *in vitro* bitki kültür sistemlerinin de içinde bulunduğu tüm biyolojik sistemlerde önemli bir faktördür. Karanlık periyotta, kültür odasında kültür kutusu içindeki ve dışındaki hava sıcaklığı hemen hemen aynıdır. Fotoperiyotta ise ışıklanmadan veya net radyasyon akış yoğunluğundan dolayı hava sıcaklığı farkı 1-2 °C'dir. Bundan dolayı kültür kutusundaki sıcaklığı istenilen düzeyde (kullanım amacına göre genelde 18-25 °C) tutmak için kültür odasındaki hava sıcaklığının 1-2 °C daha yüksek olması gerekir (Fujiwara ve Kozai, 1995; Jeong ve ark., 1995; Kozai ve ark., 1997a; Kubota ve ark., 1997; Nquyen ve Kozai, 1998).

#### **b) Osmotik potansiyel**

Osmotik potansiyel, kültür ortamındaki iyon ve moleküllerin toplam molar konsantrasyonuna bağlıdır. Otamının osmotik potansiyeli kültürlerin büyüme ve gelişmesini etkiler. Kültür ortamının osmotik potansiyeli, temel komponentler sukroz, glukoz ve fruktoz gibi sakkaritler ve mannitol ve sorbitol gibi osmoregülatörler bileşikleri içine alır. Bitki büyürken mineral ve sukroz alımında artış olduğunda osmotik potansiyelde de artış meydana gelirken; suyun terleme ve buharlaşma ile taşınmasının azalması veya durması sonucunda ise osmotik potansiyelde azalma olur. Osmotik potansiyeller kültürde ortamın karbon kaynağında ve temel komponentlerinde değişikliğe neden olabilir (Fujiwara ve Kozai, 1995; Williams, 1995 Nquyen ve Kozai, 1998).

#### **c) Ortamın camsılaşmaya etkisi**

*In vitro* kültürlerde büyüyen dokular sıvı ortama temas ettiklerinde yapıları bozulabilmekte ve camsılaşma ortaya çıkabilmektedir. Sıvı ortamda bu problemlerden kurtulmak için paklobutrazol gibi büyüme geciktirici maddeler kullanılmakta veya

fiziksel çevrenin kontrolü sağlanmakta ve bitki biyoreaktörlerinin veya otomatik sıvı kültür sistemlerinin kullanımına gidilmektedir (Aitken-Christie ve ark., 1995). Camsılaşmanın mikroçoğaltımda ciddi bir problem olduğu ve gelişen bitkilerde zayıf palizat parankiması ve kütikula tabakası gelişimine; anormal yaprak, sap ve kök anatomisine neden olduğu belirtilmiştir. Ziv ve ark., (1983), karanfilde camsılaşma sorununu çözmek için kültürlerin birkaç gün sıvı ortamda büyütüldükten sonra katı ortamda alt kültüre alınmasının etkili olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan araştırmalarda agar, gelrit ve şeker konsantrasyonu artışının, makro element karışım oranının değiştirilmesinin ve kültür kutusunda havalandırma ve düşük bağıl nemin de bitkilerin camsılaşma oranını azalttığı belirtilmiştir (Jeong ve ark., 1995; Hatipoğlu, 1999).

## 2. Kimyasal Çevre Faktörleri

### a) İyon Komponentleri

#### Makro ve mikro elementler

Bitki doku kültürlerinde besin ortamına mineral maddeler eklenmesi farklı tepkiler verebilmektedir. Bazı türler MS ortamına göre daha düşük iyonik madde içeren ortamda daha iyi gelişirken, bazıları MS ortamında daha iyi gelişmektedirler. Optimum mineral madde ihtiyacı büyümenin aşamalarına ve eksplant tiplerine göre çeşitlilik gösterebilmektedir. Bir iyonun ortamdan çıkarılması bitki içindeki kullanılabilir bir iyonun kullanılma oranını ortaya çıkarılabilmektedir (Jeong ve ark., 1995; Williams, 1992, 1995).

Maksimum kültür büyümesi için ortamın inorganik iyon kompozisyonu ve inorganik iyon hacmi büyük bir öneme sahiptir. *In vitro* koşullarda karanfil bitkisi şekerli + 1/2 MS veya şekerli +1/2 MS ortamlarına göre şekerli + tam iyonik kompozisyonlu ortamda daha iyi büyüme göstermişlerdir (Nquyen ve Kozai, 1998). Kozai ve ark., (1991a), *in vitro*'da fotoototrofik koşullarda çilek bitkisinde yarı MS ortamında temel iyon kompozisyonu kullanılmış ve fotoototrofik koşullarda yüksek CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>'ün hızlı bir şekilde absorbe edilmiştir (21 günde artakalan PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> oranı % 3'e ulaşmıştır). Büyümenin daha sonraki aşamalarında PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> konsantrasyonu bitkiler için kullanışlı olduğunda net fotosentez oranını ve büyümeyi teşvik edeceği belirtilmiştir.

Mikroçoğaltımda bitki büyümesi için azot başlıca komponenttir. Türler göre NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ve NO<sub>3</sub><sup>-</sup>'nin alımı farklılıklar göstermekte ve *in vitro* bitki morfogenesisine etkileri olabilmektedir. Bazı bitkilerde yüksek potasyum konsantrasyonunun stress yaratabileceği belirtilmiştir. Sürekli bitki büyümesi için yeterli miktarda Ca alınması zorunludur. Fazla Ca konsantrasyonu hücre uzamasını engeller, Mg bazı özel rollerde

Ca'un yerini tutabilir. Bundan dolayı Ca alımını sınırlamak için Mg ilavesi önemli olabilir. Na ve Cl ortamda bulunan diğer elementlerce iyonik kompozisyonun dengelenmesinde gereklidirler (Williams, 1995). Yang ve ark., (1995), çilekte tam MS ortamında  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $H_2PO_4$  ve  $SO_4^{-2}$ 'de yaklaşık 1/3 oranında artış sağlandığında 1/2 MS veya tam MS ortamlarına göre kuru ve yaş ağırlık ve yaprak alanını önemli derecede daha yüksek bulmuşlardır.

Mikro elementler bazı biyokimyasal olaylar için ortamda bulunmaları esas olan besin elementleridir. Düşük konsantrasyonları normal büyüme için gereklidir. Mikro elementlerin kültür büyümesine etkilerini bunların arasındaki potansiyel etkileşimlerden dolayı belirgin bir şekilde saptamak zordur. Buna rağmen mikroelement noksanlığında örneğin, sürgün ucu nekrosisi, yaprak klorosisi (Zn, Fe, Mn), mantarlaşma (Cu, Fe) ve rozet yapı oluşumu (Zn, Mn) gibi belirtiler görülebilir. Demirin diğer mikroelementlere göre ortama eklenmesi fazla miktarlarda gerekmesi çözünürlük problemlerinden dolayı daha önemlidir. Mn ve Fe noksanlıklarından kaçınmak için ortama Fe ve EDTA eklenebilir veya Zn alımı azaltılabilir (Williams, 1995; Nguyen ve Kozai, 1998).

### **Çözünmemiş oksijen**

*In vitro* kültürde besin ortamındaki çözünmemiş  $O_2$  konsantrasyonu bitki büyümesini ve kök gelişmesini etkilemektedir. Bazı bitki türlerinde besin ortamındaki düşük  $O_2$  konsantrasyonundan ve kültür kutusu içindeki nemli atmosferden dolayı köklerin besin ortamının iç kısmından ziyade besin ortamının üst kısmında büyüme ve gelişme gösterdikleri belirlenmiştir (Kozai, 1991a). Fujiwara ve ark., (1993), yaptıkları çalışmada agar konsantrasyonunun 0'dan 8 g/l'ye kadar artışının şeker içeren ortamda  $O_2$  difüzyon katsayısının yaklaşık % 50 azaldığını ve zayıf sürgün büyümesi sağlandığını belirlemişlerdir.

### **b) Organik komponentler**

#### **Şeker konsantrasyonu**

Glukoz, sukroz, sorbitol gibi şekerler heterotrofik büyüyen kültürlerde karbon kaynağı olarak kullanılmakta ve net fotosentez oranında olumsuz etkiler yapmaktadırlar. *In vitro* kültürde konvensiyonel (heterotrofik) mikroçoğaltımda şeker besin ortamına konan bitki veya eksplantın başlangıçta yeterli düzeyde fotosentez yapamayan bitkiye destek vermekte ve kültürler ortamdaki şekeri kullanarak hızlı bir şekilde büyüme göstermektedirler. Şekerli ortamda bitki faaliyetleri ile birlikte mikrobiyal faaliyetler de artmakta, bitkilerde fizyolojik bozukluklar ve bitki kayıpları olabilmektedir. Ayrıca besin ortamında şekerin bulunması otomasyon ve robot

sistemlerin mikroçoğaltımda kullanımını da zorlaştırmaktadır. Fotoototrofik mikroçoğaltımda şekerin bu olumsuz yönlerini engellemek için kültür ortamına CO<sub>2</sub> ilave edilerek bitkilerin kendi kendine fotosentez yapabilmeleri sağlanmaktadır. Kozai (1991a) kültür kutusundaki CO<sub>2</sub> konsantrasyonunu artışı ve kültürlerin yüksek ışık yoğunluğunda büyütülmesi ile kültür ortamına şeker ilave edilmeden fotosentezle bitki büyümesinin sağlanabildiğini ve konvensiyonel mikroçoğaltımdaki yüksek üretim masraflarının azaltılabileceği belirtmiştir. *Cymbidium* ve karanfil kültürlerinde CO<sub>2</sub> ilave edilen ortamda CO<sub>2</sub> ile ilave edilmeyen ortama göre daha fazla bitki kuru ağırlık artışı saptanmıştır (Kozai ve Iwanami, 1988). Nakayama ve ark., (1991) patatesten CO<sub>2</sub> ilave edilen ortamda başlangıçtan 3 gün sonra net fotosentez oranının, şekerli ortamda, şekerli ortama (30 g/l) göre 8-10 kat daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Fujiwara ve ark., (1995) da *in vitro* patates bitkilerinde sakkaritlerin yokluğunda kültür kutusuna 350-1000 µmol/mol CO<sub>2</sub> ilave edildiğinde fotosentezle 4 kat daha fazla kuru ağırlık artışı sağlamışlardır. Yine karanfil kültürlerinde başlangıç şeker ağırlığının sadece % 2-8'ini bitkilerin absorbe ettiği bulunmuştur (Kozai ve Iwanami, 1988). Pruski ve ark., (2002), yaptıkları araştırmada 4 farklı kültür sisteminde (1: sukrozsuz ortam + hava, 2: 30 g/l sukroz + hava, 3: 1500 µl/l CO<sub>2</sub> + sukrozsuz ortam ve 4: 1500 µl/l CO<sub>2</sub> + 30 g/l sukrozlu ortam) patates bitkilerinin gelişimi incelemiştir. Araştırmada sukrozla birlikte CO<sub>2</sub> ilave edilen 4 nolu ortamda diğer ortamlara göre daha yüksek sürgün uzunluğu, boğum sayısı ve kuru ağırlık saptanmıştır. 3 nolu ortamda 1 nolu ortama göre yaklaşık 2 kat daha fazla sürgün uzunluğu saptanmıştır.

#### **Katılaştırıcı (Jelleştirici) ve destekleyici maddeler**

Mikroçoğaltımda katılaştırıcı maddelerin kullanımı ile bitkilerin besin ortamı ile uygun bir fiziksel temas kurması ve özellikle sıvı ortamlarda görülen camsılaşmaya karşı koruma sağlamaktadır. Katılaştırıcı maddelerin besin ortamlarında bazı olumsuz yönleri de vardır. Katılaştırıcı maddeler kullanıldığında otomasyona adaptasyon azalmakta, bazı kimyasal komponentlerin aktiviteleri bozulabilmekte ve kültür kutularının temizlenmesi ve bitki köklerinden jellerin temizlenmesi güç olabilmektedir. Buna ek olarak katılaştırıcı maddeler özellikle de agar veya jelrit *in vitro* sürgün veya embriyonik hücre büyümesinde engelleyici etkiler yapabilmektedirler (Smith ve Spomer, 1995).

Agar yerine bazı destekleyici maddelerin (selüloz kristalit agregat, kaya yünü ve vermikulit gibi) yüksek hava geçirgenliğine sahip oldukları ve bitki büyümesinin artmasını, bunun sonunda da *ex vitro* yaşama oranının artmasını sağladıkları belirtilmiştir (Williams, 1992; Fujiwara ve ark., 1993; Kozai ve ark., 1997b; Kubota ve ark., 1997; Nquyen ve Kozai, 1998). Kirdmanee ve ark., (1995), fotoototrofik olarak büyütülen Okalıptus bitkisinde CO<sub>2</sub> ilave edilmiş ortamda farklı

destekleyici maddeleri karşılaştırmışlardır. Araştırmada *in vitro* net fotosentez oranı ve *ex vitro* koşullara transferden sonra yaşama oranı en yüksek vermikulit de bulmuşlar bunu gelrit ve agar izlemiştir. Takazawa ve Kozai (1992), plastik kültür kutusunda destekleyici madde olarak selüloz kristalit agregat kullanmışlar ve maksimum bitki ağırlığı ve kuru madde oranı, minimum gövde/kök oranı ve kısa sürgün uzunluğu saptamışlardır (agar kullanılan ortama göre). Kozai ve ark., (1996) tatlı patates bitki kültürlerinde kaya yünü ve vermikulitin birlikte kullanılması ile agara göre klorofil konsantrasyonu ve kök büyümesinde artış saptamışlardır.

### c) pH

Ortam pH'sı *in vitro* bitkilerin morfogenezini, büyümesini ve gelişmesini etkileyen önemli bir faktördür. Standart olarak, pH ortam hazırlanırken ayarlanır ve ortamda pH'nın her zaman sabit kalmadığı bilinmektedir. pH'daki değişimler ortam hazırlarken ve otoklavdan önce ve kabında bitki gelişirken meydana gelmektedir. pH değişimleri bitki materyali ve ortam arasındaki iyon dengesinin bozulmasıyla ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda bitkiden ortama doğru mineral geçişi olabilmektedir. Bu denge noktası türlere bağlıdır. Bu dengede değişime neden olacak en büyük faktör NO<sub>3</sub>- ve NH<sub>4</sub>+ eklenmesi ve alımı arasındaki değişimlerdir. Bu denge kültür periyodu boyunca değişir. Başlangıçta pH düşebilir sonra artabilir (Williams, 1992; Nquyen ve Kozai, 1998).

Karanfil kültürlerinde pH'sı 5,5 olan besin ortamında % 59, pH'sı 6 olan ortamda ise % 4 oranında bitki büyümesi olumlu yönde etkilenmiştir (Gönülşen, 1987). Kobayashi ve ark., (1995) Torenia bitkisinde iki haftalık kültürlerde pH'nın yükseldiğini ve bunun sonucunda da vejetatif tomurcukların oluşumu ve büyümesi de olumlu etkilendiğini ve artıktan sonra pH hızlı bir şekilde düştüğünde ise çiçek tomurcukların oluşumu ve gelişiminin sağlandığını saptamışlardır.

## 3. Biyolojik Çevre Faktörleri

### a) Eksplant büyüklüğü ve eksplanttaki fizyolojik farklılıklar

Mikroçoğaltımda somatik embriyoların veya adventif tomurcukların kullanımı mutatik bitkilerin oranının daha yüksek çıkmasından dolayı sınırlanmaktadır Ticari mikroçoğaltımda boğumlu parça (nodal explant), özellikle de tek boğumlu parçalar ve aksillar tomurcuklar çoğaltma aşamasında en yaygın kullanılan eksplantlardır. Eksplantların farklı yaprak alanı ve ağırlığı, rejenere olan bitkide büyüme varyasyonlarına neden olabilmektedir. Pierik (1988) daha büyük eksplantların bazen daha küçük olanlardan daha kolay rejenere olduğunu belirtmiştir. Fotoototrofik koşullarda bitki büyümesine eksplantların yaprak alanının etkisi, ana

bitkide boğum pozisyonuna veya eksplantın yaş ağırlığına göre daha büyüktür (Gönülşen, 1987; Miyashita ve ark., 1996; Mansuroğlu ve Gürel,2001). Marcelis van Acker ve Leutsher (1993) iki boğumlu eksplantların gül ve şeflere da *ex vitro*da daha büyük bitkiler oluşturduklarını saptamışlardır. Ayrıca araştırmacılar iki boğumlu eksplantların üsteki yaprağı alındığında tek boğumlulara göre daha fazla bitki büyümesi sağladığını belirtmişlerdir. Aksillar, adventif veya meristematik dokulardan çoğaltılan bitkiler sera veya açık tarlaya şaşırtıldıklarında fizyolojik karakterlerinin aynı olması önemlidir. Genel olarak fidelerde ana sapın kısa ve kalın olması, düşük gövde/kök ağırlıkları, normal stoma ile birlikte geniş yaprak alanı ve kalın kütikula tabakası oluşumu istenmektedir. Fotoototrofik mikroçoğaltımda çevre kontrolü ile bitkilerin büyüme ve gelişmesi sağlanabilir ve morfolojik ve fizyolojik düzensizlikler azaltılabilir (Kozai ve ark., 1991b; Kozai, 1991b; Nquyen ve Kozai, 1998).

#### **b) Bitki sıklığı**

Kozai ve ark., (1989) fotoototrofik koşullarda (yüksek CO<sub>2</sub> ve ışık yoğunluğunda) patates bitkilerinin yaş ve kuru ağırlığının ve yaprak sayısının kültür kutusu içindeki bitki sıklığından etkilendiğini ve bitki sıklığı artıkça CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun, net fotosentez oranı ve mineral madde konsantrasyonunun azaldığını saptamışlardır. Yapılan bir araştırmada patates bitkisinde fotoototrofik koşullarda, kültür kutusu başına kuru ağırlık, bitki sıklığı artıkça artış göstermiş, bitki başına kuru ağırlık ise azalmıştır (Kozai, 1991a). Yine patateste yapılan bir araştırmada iki haftalık kültürlerde, kültür tüpü başına 5 tek boğum eksplantı bulunduğu diğer tüp başına 1, 2, 3 ve 4 tek boğum uygulamalarına göre maksimum sürgün uzunluğu ve kök sayısı elde edilmiştir (Sarkar ve ark., 1997).

#### **c) Bakteriyel ve fungal patojenler ve kontaminasyonlar**

Bitki doku kültürlerinde bakteri ve fungus kontaminasyonları önemli problemlere yol açabilir. Kontaminasyonlar özellikle kültürlerin erken aşamalarında yüksek oranlarda enfeksiyon yaparsa, doku kültürü laboratuvarında bitki kayıpları ve üretim kayıpları yüksek olabilmektedir. Mikroçoğaltımda virüssüz bitki üretimi için özellikle meristemler kullanılmakta ve sağlıklı bitki üretimi sağlanmaktadır.

#### **d) Yararlı mikroorganizmalar**

*In vitro* kültürde bitkiler, bazı simbiyotik funguslarla inoküle edildiklerinde bitki büyüme ve gelişmesini teşvik ettiği belirlenmiştir (Ishii ve ark., 1993). Nowak ve ark., (1998) patates bitkilerini yararlı *Pseudomonas* sp., strain PsJN bakterisi ile bulaştırmışlar ve 6 haftalık kültürlerde bakterisiz kültürlerle göre daha fazla boğum, sürgün uzunluğu, sürgün ve kök kuru ağırlığı saptamışlardır.



Çizelge 2. Konvensiyonel mikroçoğaltımda *in vitro* ve *ex vitro* bitki tepkileri.  
Table 2. Responses of plantlets *in vitro* and *ex vitro* in conventional micropropagation.\*

Çevre özellikleri Features of the environment	<i>In vitro</i> etkiler <i>In vitro</i> effects	<i>Ex vitro</i> etkiler <i>Ex vitro</i> effects
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Düşük hava değişim oranı (yüksek bağıl nem) (Low air exchange rate, high relative humidity) 1,2,3,4,5,6,7,8,9,12</li> <li>•Yüksek etilen konsantrasyonu (High ethylene concentration) 3,8,12,15</li> <li>•Karanlık peryotta yüksek CO<sub>2</sub> konsantrasyonu (High CO<sub>2</sub> during the dark period) 2,3,7,9,10</li> <li>•Fotoperyotta düşük CO<sub>2</sub> konsantrasyonu (Low CO<sub>2</sub> during the Photoperiod) 2,3,7,9,10</li> <li>•Düşük ışık yoğunluğu (Low light intensity) 2,3,4,5,7,11</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•zayıf kütikula yapısı (low cuticula structure)</li> <li>•zayıf stoma fonksiyonu (low stomata structure)</li> <li>•köklenmede ve besin alımında zorluk (difficulty in rooting and in nutrient uptake)</li> <li>•kısa sürgünler, düşük yaprak oluşumu (short shoots and low leaf initiation)</li> <li>•farklılaşmanın teşvik edilmesi/engellenmesi (promote/inhibit differentiation)</li> <li>•düşük net fotosentez oranı (low net photosynthetic rate)</li> <li>•zayıf yaprak oluşumu (low leaf initiation)</li> <li>•kendi kendine büyümede zorluk (difficulty in develop in autotrophy)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•aşırı terleme (excess transpiration)</li> <li>•su ve besin alımında zorluk (difficulty in water and nutrient uptake)</li> <li>•düşük büyüme (low growth)</li> <li>•negatif büyüme (negative growth)</li> <li>•düşük fotosentez (low photosynthesis)</li> <li>•çevre stresine karşı hassasiyet (sensitive to environmental stress)</li> </ul>

Çizelge 2. devamı.  
Table 2. continued.

Çevre özellikleri Features of the environment	<i>In vitro</i> etkiler <i>In vitro</i> effects	<i>Ex vitro</i> etkiler <i>Ex vitro</i> effects
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Sabit sıcaklık (Constant temperature)<sup>2,4,5,9,10,11</sup></li> <li>•Ortamda düşük çözünmemiş O<sub>2</sub> konsantrasyonu (Low dissolved oxygen in the medium)<sup>2,3,4,10</sup></li> <li>•Yüksek inorganik iyon konsantrasyonu (High inorganic ion concentration)<sup>2,3,4,5,9,11</sup></li> <li>•Ortamda şeker bulunması (Sugar containing medium)<sup>2,4,7,8,9,14</sup></li> <li>•Sabit hava ve ortam kompozisyonu Stagnation of the air and the medium composition<sup>2,3,7,10,12,13,14,15</sup></li> <li>•Ortamda hormonların bulunması (Hormone containing medium)<sup>4,8,9,12,13,14</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•yüksek karanlık respirasyon high dark respiration</li> <li>•köklenmede zorluk (difficulty in rooting)</li> <li>•ortamda yüksek osmotik basınç yüksek etilen üretimi High osmotic pressure in the medium, high ethylene production</li> <li>•camsılaşma, diğer fizyolojik bozukluklar, kontaminasyonlar, bitki kayıpları (Vitrification or other physiological disorders, contaminations, loss of plantlets)</li> <li>•gaz, iyon ve diğer maddelerin düşük taşınma oranı (low transfer coefficients of gas, ion and other substances)</li> <li>•sıcaklık, ışık, gaz, ortam kompozisyonu vb. ve gelişme aşamalarında bitkilerde şekil ve büyüklükte varyasyonlar (large spatial variations of temperature, gas and medium composition, light, etc.</li> <li>•yüksek mutasyon oranı (high mutation percentage)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•bitki ölümü (death of plants)</li> <li>•düşük fotosentez sonucu büyümede gerileme (growth retardation due to low net photosynthetic rate)</li> <li>•Üniform olmayan bitki gelişimi (non-uniform plant development)</li> </ul>

\*: <sup>1</sup>Ziv ve ark., 1983; <sup>2,3,4</sup>Kozai, 1991c,d,e; <sup>5</sup>Kozai ve ark., 1991b; <sup>6</sup>Aitken-Christie ve ark., 1995; <sup>7</sup>Desjardings, 1995; <sup>8</sup>Fujiwara ve Kozai, 1995; <sup>9</sup>Jeong ve ark., 1995; <sup>10</sup>Kozai ve ark., 1995; <sup>11</sup>Buddendorf-Joosten ve Woltering, 1996; <sup>12</sup>Kitaya ve ark., 1996; <sup>13</sup>Kozai ve ark., 1997a; <sup>14</sup>Nowak ve ark., 1998; <sup>15</sup>Pruski ve ark., 2002.

### e) Diğer faktörler

Eksplantın kronolojik yaşı ve gelişim sezonu hücrelerin farklılaşmasını ve fizyolojik yaşını etkileyen önemli faktörlerdir. Aralık ve Nisan aylarında yapılan patates kültürlerinde, Şubat, Mart, Mayıs ve Kasım aylarında yapılan kültürlere göre daha iyi bitki gelişimi sağlandığı bildirilmiştir (Gönülşen, 1987).

### SONUÇ

Son yıllarda bir çok araştırmada mikroçoğaltmada bitki büyüme ve gelişmesine fiziksel, kimyasal ve biyolojik çevrenin etkisinin önemi saptanmıştır. Bu çalışma, mikroçoğaltım sistemlerinde in vitro bitki üretimini optimize etmek, kaliteli bitki üretmek ve üretim maliyetlerini düşürmek için çevresel kontrolün rolünü anlamamızı sağlaması bakımından yararlı sonuçlar verebilecektir. Ayrıca üstten ışıklandırma yerine yandan ışıklandırma, kültür ortamına CO<sub>2</sub> ilavesi ve O<sub>2</sub>'nin kontrolü, şekersiz ortam kullanılarak mutasyon ve kontaminasyonların azaltılması gibi mikroçoğaltımdaki bazı temel uygulamalardaki yeni gelişmeler ve bitkilerin fotosentez oranlarının artmasında, fizyolojik olarak üniform büyüme ve gelişme göstermesinde ve ex vitro aşamada kaliteli fide üretiminin sağlanmasında besin ortamı çevre faktörlerinin önemi değerlendirilmiştir.

### LİTERATÜR LİSTESİ

- Aitken-Christie, J., T. Kozai, and S. Takayama. 1995. Automation in plant tissue culture-general introduction and overview. J. Aitken, T. Kozai, M. L. Smith (eds.) Automation and Envir. Cont. in Plant Tiss. Cult. 1-18. Kluwer A. Publ. Netherlands.
- Buddendorf-Joosten, J. M. C., and E. J. Woltering. 1996. Controlling the gaseous composition *in vitro*—description of a flow system and effects of the different gaseous components on in vitro growth of potato plantlets. Sci. Hort. 65: 11-13.
- Cournac, L., I. Cirier, and P. Chagvardieff. 1992. Improvement of photoautotrophic *Solanum tuberosum* plantlet culture by light and varietal constrains. Acta Hort. 319: 53-58.
- Desjardings, Y. 1995. Factors CO<sub>2</sub> fixation in striving to optimize photoautotrophy in micropropagated plants. Plant Tiss. Cult. and Biotech., 1 (1): 13-25.

- Fujiwara, K., T. Kozai, and I. Watanable. 1988. Development of photoautotrophic tissue culture system for shoot and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. *Acta Hort.* 230: 153-158.
- Fujiwara, K., J. Aitken-Christie, and T. Kozai. 1993. Water potential of radiata pine shoots cultured *in vitro* under different relative humidities. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 45: 144-150.
- Fujiwara, K., and T. Kozai. 1995. Physical microenvironment and its effects. J. Aitken-Christie, T. Kozai, and M. Lila Smith (eds.) *Automation and Envir. Con. in Plant Tiss. Cult.* Kluwer A. Publ. Netherlands.
- Göntülşen, N. 1987. Bitki doku kültürleri yöntemleri ve uygulama alanları. Ege Tarımsal Araş. Enst. Müd. Yayın No: 78, s, 137, Menemen, İzmir.
- Hatipoğlu, R. 1999. Bitki biyoteknolojisi. Çukurova Ü. Z. F. Genel Yayın No: 190, Ders Kitabı Yayın No: A-58, s 176, Adana.
- Hayashi, M, N. Fujita, Y. Kitaya, and T. Kozai. 1992. Effect of sideward lighting on the growth of potato plantlets *in vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 98: 143-148.
- Hayashi, M., T. Kozai, M. Tatenno, K. Fujiwara, and Y. Kitaya. 1993. Effects of the lighting cycle on the growth and morphology of potato plantlets *in vitro* under photomixotrophic culture conditions. *Envir. Cont. Biol.* 31: 169-175.
- Ishii, K., K. Iwase, K. Odani, and M. Ogowa. 1993. Inoculation of symbiotic mushroom fungi to *in vitro* cultured japanese black pine (*Pinus thunbergii*) and japanese red oak (*Quercus acutissima*). *Plant Tiss. Cult. Lett.* 10:84-88.
- Iwanami, Y., T. Kozai, Y. Kitaya, and S. Kino. 1992. Supplemental red and far-red lighting using light emitting diodes on stem elongation and growth of potato plantlets *in vitro*. *Int. Symp. Trans. Prod. Syst.*, p, 183.
- Jeong, B. R., K. Fujiwara, and T. Kozai. 1995. Environmental control and photoautotrophic micropropagation. *Hort. Rev.* (ed. Janick, J.) 17: 123-170, John Wiley and Sons Inc.
- Kirdmanee, C. 1995. Environmental control and its effects in *Eucalyptus* micropropagation under photoautotrophic conditions. PhD Thesis, Chiba Univ., Matsudo, pp 173.

- Kirdmanee, C., Y. Kitaya, and T. Kozai. 1995. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and supporting material in vitro on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 31: 144-149.
- Kitaya, Y., K. Sakami, and T. Kozai. 1995a. Development of photoautotrophic plant tissue culture system using CO<sub>2</sub> from Shitake mushroom. *Acta Hort.* 393: 195-202.
- Kitaya, Y., Y. Ohmura, and T. Kozai. 1995b. Effect of light intensity and lighting direction on the photoautotrophic growth and morphology of potato plantlets *in vitro*. *Sci. Hort.* 62: 15-24.
- Kitaya, Y., S. C. Monopatra, C. Kubota, and T. Kozai. 1996. Advantages of photoautotrophic micropropagation for space agriculture. pp 235-244. In Suge, H. (ed.) Proc. of Workshop on Several Aspects of Plant Growth and Dev. in Space. Nov 17-18, 1995, Japan.
- Kobayashi, C., W. Amaki, and H. Higuchi. 1995. Effects of medium pH on shoot growth and flowering of *Torenia* internodal stem segments *in vitro*. *Acta Hort.* 393: 135-142.
- Kozai, T. Y., and Iwanamai. 1988. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and sucrose concentration under high photon flux on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *J. Jpn Soc. Hort. Sci.* 57: 679-888.
- Kozai, T., and K. Sekimoto. 1988. Effects of number of air exchanges per hour of the closed vessel and the photosynthetic photon flux on the carbon dioxide concentration inside the vessel and the growth of strawberry plantlets *in vitro*. *Envir. Cont. in Biol.* 26: 21-29.
- Kozai, T., N. Nishiuchi, K. Fujiwara, and I. Watanabe. 1989. Effects of planting density in the vessel on the growth and net photosynthetic rates of potato plantlets in photoautotrophic micropropagation. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 28: 244-245.
- Kozai, T., H. Oki, and K. Fujiwara. 1990. Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet *in vitro*. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 22: 205-211.
- Kozai, T. 1991a. Photoautotrophic micropropagation. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 27: 47-51.

- Kozai, T. 1991b. Autotrophic micropropagation. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 17, High-Tech and Micropropagation I (ed. By Y.P.S., Bajaj), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1991, p 313-343.
- Kozai, T. 1991c. Micropropagation under photoautotrophic conditions. P. C. Deberg and R. H. Zimmerman (eds.) *Micropropagation*, 447-469.
- Kozai, T. 1991d. Controlled environments in conventional and automated micropropagation. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* vol. 8, p, 213-230.
- Kozai, T. 1991e. Acclimatization of micropropagated plants. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 17, High-Tech and Micropropagation I (ed. By Y.P.S., Bajaj), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1991, p, 127-141.
- Kozai, T. K. Iwabuchi, K. Watanabe, I. Watanabe. 1991a. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 25: 107-115.
- Kozai, T., K. Fujiwara, and G. Giacomelli. 1991b. Environmental control in micropropagation. *Int. Winter Meeting. The Amer. Soc. Agric. Engineers*, 17-20 December, 1991, p 1-13, Chicago, USA.
- Kozai, T., K. Fujiwara, M. Hayashi, and J. Aitken-Christie. 1992. The *in vitro* environment and its control in micropropagation. K. Kurata and T. Kozai (eds.), *Trans. Prod. Syst.* 247-282. Kluwer A. Publ. Netherlands.
- Kozai, T., and B. R. Jeong. 1993. Environmental control in plant tissue culture and its application for micropropagation. pp, 95-116. *In: Y. Hashimoto, G.P.A., Bot, W., Day, H., J. Tantau and H. Nonami (eds.). The Computerized Greenhouse: Automation Cont. Applications in Plant Prod.* 25 pp, Academic Press Inc. USA.
- Kozai, T., Y. Kitaya, K. Fujiwara, M. A. L. Smith, and J. Aitken-Christie. 1994. Environmental measurement and control systems. J. Aitken-Christie, T. Kozai, and M. Lila, Smith (eds.) *Automation and Envir. Cont. in Plant Tiss. Cult.* 539-574. Kluwer A. Publ. Netherlands.

- Kozai, T. Y. Kitaya, K. Fujiwara, and J. Adelberg 1995. Environmental control for large scale production of *in vitro* plantlets. M. Terzi (eds.) Current Issues in Plant Mol. and Cellular Biol. 659-667. Kluwer A. Publ. Netherlands.
- Kozai, T., and M. L. Smith. 1995. Environmental control in plant tissue culture-general introduction and overview. J. Aitken-Christie, T. Kozai and Smith, M. L. (eds), Automation and Envir. Cont. in Plant Tiss. Cult. Kluwer A. Publ. Netherlands, p 301-318.
- Kozai, T., Y. Kitaya, C. Kubota, R. Kobayashi, and S. Watanable. 1996. Optimization of photoautotrophic micropropagation condition for sweetpotato (*Ipomea batatas* L. Lam) plantlets. Int. Symp. on Plant Prod. in Closed Ecosystems. Automation Cult. and Envir. pp, 13, Japan.
- Kozai, T., C. Kubota, and B. R. Jeong. 1997a. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 51: 49-56.
- Kozai, T., N. T. Quynh, and C. Kubota. 1997b. Environmental control and its effects in transplant production under artificial light. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38 (2): 194-199.
- Kubota, C., and T. Kozai. 1992. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* under force and natural ventilation. Hort Sci. 27: 1312-1314.
- Kubota, C., K. Fujiwara, Y. Kitaya, and T. Kozai. 1997. Recent advances in environmental control in micropropagation. E. Goto et al (eds.) Plant Prod. in Closed Ecosystems, Kluwer A. Publ. Netherlands, 153-169.
- Levin, R., R. Stav, Y. Alper, and A. A. Watad. 1997. A technique for repeated non-axenic subculture of plant tissues in a bioreactor on liquid medium containing sucrose. Plant Tiss. Cult. and Biotech., 3 (1): 41-45.
- Mansuroğlu, S., E. Gürel. 2001. Mikroçoğaltım. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (edt.) 374 sayfa, 262-281.
- Marcelis van Acker, C. A. M., and K. J. Leutsher. 1993. Effect of cutting on heterogeneity and growth of *Rosa hybrida* cv Montrea and *Scheffera arboricola* cv Compacta. Sci. Hort. 54: 59-67.

- Miyashita, Y., Y. Kitaya, T. Kozai, and T. Kimura. 1995. Effects of red and far-red light on the growth and morphology of potato plantlets *in vitro*: using light emitting diode (LEDs) as a light source for micropropagation. *Acta Hort.* 393: 189-194.
- Miyashita, Y., Y. Kitaya, C. Kubota, and T. Kozai. 1996. Photoautotrophic growth of potato plantlets as affected by explant leaf area, fresh weight and stem length. *Sci. Hort.* 65: 199-202.
- Miyashita, Y., Y. Kitaya, C. Kubota, and T. Kozai. 1996. Photoautotrophic growth of potato plantlets as affected by explant leaf area, fresh weight and stem length. *Sci. Hort.* 65: 199-202.
- Morini, S., R. Fortuna, R. Sciutti, and R. Muelo. 1990. Effect of different light-dark cycles on growth of fruit tree shoots cultured *in vitro*. *Adv. Hort. Sci.* 4: 163-166.
- Nakayama, M, T. Kozai, and K. Watanabe. 1991. Effect of the presence/absence of sugar in the medium and natural/forced ventilation on the net photosynthetic rates of potato explants *in vitro*. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 8 (2): 105-109.
- Nguyen, Q.T., and T. Kozai. 1998. Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Envir. Cont. in Biol.* 36 (2): 59-75.
- Nowak, J. S., K. Asiedu, S. Bensalim, J. Richards, A. Steward, C. Smith, D. Stevens, and A. V. Sturz. 1998. From laboratory to applications: challenges and progress with *in vitro* dual cultures of potato and beneficial bacteria. *Plant Cell, Tiss. and Organ Cult.* 52: 97-103.
- Pierik, R. L. M. 1988. *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. *Acta Hort.* 226: 25-40.
- Pospisilova, J., J. Solarova, and J. Catsky. 1992. Photosynthetic response to stresses during *in vitro* cultivation. *Photosynthetica*, 26: 3-18.
- Pruski, K., T. Astatkie, M. Mirza, and J. Nowak. 2002. Photoautotrophic micropropagation of Russet Burbank potato. *Plant Cell, Tiss. and Organ Cult.*, 69:197-200.
- Sarkar, D., R. Chandra, and P. S. Naik. 1997. Effects of inoculation density on potato micropropagation. *Plant Cell Tiss. and Organ Cult.* 48 (1): 63-66.



- Shimada, N., I. Tanaka, T. Kozai. 1988. Effects of low O<sub>2</sub> concentration on net photosynthesis of C<sub>3</sub> plantlets *in vitro*. *Acta Hort.* 230: 171-175.
- Smith, M. A. L., and L. A. Spomer. 1995. Vessels, gels, liquid media and support systems. *In*: "Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture" (ed. By Aitken-Chiristie, J. Kozai, T., Smith, M. A. L.). Kluwer A. Publ. Netherlands, p 371-404.
- Takazawa, A., and T. Kozai. 1992. Effect of types of culture vessels with supporting materials on the growth of carnation plantlets *in vitro*. *Envir. Cont. in Biol.* 30: 65-70.
- Tanaka, K., I. Watanabe, and N. Shimada. 1991. Effects of O<sub>2</sub> concentrations on growth of photoautotrophically and photomixotrophically. *Envir. Cont. Biol.* 29: 107-116.
- Tanaka, K., K. Fujiwara, and T. Kozai. 1992. Effects of the presence/absence of sugar in the medium and natural/forced ventilation on the net photosynthetic rates of potato explants *in vitro*. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 8 (2): 105-109.
- Williams, R. R. 1992. Towards a model of mineral nutrition *in vitro*. *In*: "Transplant Production System" (ed. By Kurata, K., Kozai, T.). Kluwer A. Publ. Netherlands, p 213-229.
- Williams, R. R. 1995. The chemical microenvironment. *In*: "Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture" (ed. by Aitken-Chiristie, J. Kozai, T., Smith, M. A. L.). Kluwer A. Publ. Netherlands, p 405-439.
- Wilson, D. A., R. C. Weigel, R. M. Wheeler, and J. C. Sager. 1993. Light spectral quality effects on the growth of potato (*Solanum tuberosum* L.) nodal cuttings *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29: 5-8.
- Yang, C. S., T. Kozai, and B. R. Jeong. 1995. Ionic composition and strenght of culture medium affect photoautotrophic growth, transpiration and net photosynthetic rates of strawberry plantlets *in vitro*. *Acta Hort.* 393: 219-226.
- Yu, Q. 1998. Automatisation in micropropagation systems. Ms Thesis, Helsinki Univ. Finland.
- Ziv, M. G. Meir, and A. H. Halevy. 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2: 55-65.