

# ACTA NATURA ET SCIENTIA

## Bitkilerin Totipotensi Yeteneklerinin Bitki Islahında Kullanılması: Doku Kültürü Teknikleri

İsmail Karakaş<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Ege University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, Bornova, İzmir, 35100, Türkiye

✉ Corresponding Author: karakasgiller@outlook.com

Please cite this paper as follows:

Karakaş, İ. (2023). Bitkilerin Totipotensi Yeteneklerinin Bitki Islahında Kullanılması: Doku Kültürü Teknikleri. *Acta Natura et Scientia*, 4(2), 94-113. <https://doi.org/10.29329/actanatsci.2023.354.1>

### MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi

Geliş: 24. 02.2023

Düzeltilme: 30.03.2023

Kabul: 02.05.2023

Çevrimiçi Yayınlanma: 14.08.2023

Anahtar Kelimeler:

Islah

Doku kültürü

Totipotensi

Embriyo kültürü

Protoplast füzyonu

Haploid tekniği

### Ö Z E T

Biyoteknolojik yöntemlerin bazıları 1980'li yıllardan sonra kültür bitkilerinde başarı ile uygulanmaya başlamış ve dünya çapında birçok ülkenin tarım sistemlerine dâhil edilerek pratiğe aktarılabilir duruma gelmiştir. Bitki doku kültüründe totipotensi; canlı bir bitki hücresinden tamamen yeni bir bitki üretme yeteneği olarak tanımlanabilir. Teorik olarak kök, yaprak, polen ve petal hücrelerinden tamamen yeni bitkiler yetiştirmek mümkündür. Bitki doku kültürü hücrelerin, dokuların, organların ve bunların bileşenlerinin tanımlanmış fiziksel ve kimyasal koşullar altında *in vitro* aseptik kültürü hem temel ve uygulamalı çalışmalarda hem de ticari uygulamada önemli bir araçtır. Bitki ıslahı programlarında klasik ve biyoteknolojik yöntemlerin kombinasyonu, daha iyi hastalık toleransı ve stres tolerans kapasiteleri, iyi adapte edilmiş yüksek verimli genotiplerde yararlı varyantların seçimi ve üstün kalitede bitkiler üretmek için geniş bir potansiyele sahiptir. Bitki kalitesinin iyileştirilmesi ve ekonomik sürdürülebilirlik için önemli fırsatlar sağlayan bir araç olarak bitki doku kültürü, bitki ıslahı programlarında süreyi ve iş gücünü azaltmıştır.

# Using the Totipotency Abilities of Plants in Plant Breeding: Tissue Culture Techniques

## ARTICLE INFO

### Article History

Article History

Received: 24.02.2023

Revised: 30.03.2023

Accepted: 02.05.2023

Available online: 14.08.2023

### Keywords:

Breeding

Tissue culture

Totipotency

Embryo culture

Protoplast fusion

Haploid technique

## A B S T R A C T

Some of the biotechnological methods have been successfully applied in cultivated plants after the 1980s and have become practical by being included in the agricultural systems of many countries around the world. Totipotency in plant tissue culture; It can be defined as the ability to produce a completely new plant from a living plant cell. Theoretically, it is possible to grow completely new plants from root, leaf, pollen and petal cells. Plant tissue culture The *in vitro* aseptic culture of cells, tissues, organs and their components under defined physical and chemical conditions is an important tool in both basic and applied studies and commercial application. The combination of classical and biotechnological methods in plant breeding programs has ample potential to produce plants of superior quality and better disease tolerance and stress tolerance capacities, selection of useful variants in well-adapted high yielding genotypes. As a tool that provides significant opportunities for plant quality improvement and economic sustainability, plant tissue culture has reduced the time and workforce in plant breeding programs.

## GİRİŞ

İnsanoğlu, bazı besin kaynaklarının arzu edilen özelliklere sahip olması nedeniyle diğerlerine tercih edildiğini kabul ederek ve dolayısıyla şu veya bu şekilde üstün sayılanları seçerek evrimsel doğal seçilimi değiştirmiştir. Gelişmiş “çeşitlerin” seçimi bilinçsiz bir şekilde başlamış, ancak günümüze gelinceye kadar daha organize hale gelmiştir. Sonunda, bitkilerin ve hayvanların seçici üreme olasılığı kabul edilmiş ve modern tarımsal gelişmenin temel taşı haline gelmiştir. Buna karşılık modern tarım, modern uygarlığın temeli haline gelmiş ve insanoğlunun geçimlik bir yaşam tarzından daha önce hayal bile edilemeyen faaliyetler peşinde koşmayı teşvik eden bir yaşam tarzına geçmesine izin vermiştir. Bu düşünülemez faaliyetler, bitki biliminin anlayışı, gelişimi ve takibi ile gerçekleşmiştir. Bitkilerin çeşitli faydalı ürün ve ürünlere dönüşmesi ancak insanların çabası ve araştırmaları ile mümkün olmuştur (Trigiano & Gray, 2004). Günümüzde biyoteknoloji ile hiç beklemediğimiz özelliklere sahip bitkiler elde etmek mümkün hale gelmiştir (George vd., 2008).

Biyoteknoloji, peynir ve turşu yapımı, gıda muhafazası ve fermantasyon için yüzyıllardır kullanılmakta olan bir tekniktir (Zhong vd., 1995). Biyoteknoloji 1970’lerde çeşitli gen teknolojilerinin geliştirilmesine yol açan ve dolayısıyla 20. yüzyılın en büyük bilimsel devrimi olarak kabul edilen restriksiyon enzimlerinin keşfi ile büyük bir ivme kazanmıştır. Biyoteknoloji, gerçek anlamda bir organizmanın özelliklerini, insanlığın yararına hücresel ve moleküler düzeyde geleneksel teknolojilerin yapabileceğinden daha verimli bir şekilde değiştirmek ve geliştirmekle ilgilenir. İlgili biyolojik sisteme (organizma) bağlı olarak, bitki biyoteknolojisi, mikrobiyal biyoteknoloji, hayvan biyoteknolojisi ve insan biyoteknolojisi olarak ayrılabilir. Bitki biyoteknolojileri; moleküler biyoteknoloji ve genetik, rekombinant DNA teknolojisi araştırmaları, genom karakterizasyonu, gen transfer teknikleri, hücrelerin, dokuların, organların aseptik büyümesi ve bitkilerin *in vitro* rejenerasyonuna kadar uzanan geniş bir strateji ve teknoloji grubunun bir parçası olarak kabul edilir (Zhong vd., 1995). Geleneksel bitki ıslahından farklı olarak, genetik modifikasyonlar için biyoteknolojik yöntemler büyük ölçüde organ, doku, hücre, protoplast ve moleküler seviyelerde çalışmaktadır. Bu

yenilikçi teknikler, verimli ve hassas bitki ıslahı için geleneksel yöntemlere ek olarak kabul edilmektedir (Zhong vd., 1995; Brown & Thorpe, 1995; Kang vd., 2007).

Modern bitki biyoteknolojisinin teorik çerçevesi ve deneysel temeli, hücresel totipotens (tek bir hücrenin bütün bir bitkiyi bölme ve üretme yeteneği) ve genetik transformasyon (genetik değişim, yabancı genetiğin kararlı entegrasyonu ve ifadesi) kavramlarından türemiştir. Hücre Teorisinin doğasında bulunan totipotens kavramının geçerliliğini test etmek için hiçbir sürekli veya organize girişimde bulunulmamıştır. Yirminci yüzyılın başına kadar Avusturyalı Alman botanikçi Gottlieb Haberlandt, bütün bitkileri yenileme umuduyla bitki hücrelerini besin solüsyonlarında kültürleyerek totipotensiye dair deneysel kanıtlar elde etmeye çalışan ilk kişi olmuştur (Vasil, 2008). Bitki hücrelerinin totipotensinin doğrudan ve kesin kanıtı nihayet, bir mikrokültür odasında yeni hazırlanmış bir besin solüsyonunda yetiştirilen tamamen izole edilmiş tek bir hibrit tütün hücresinden bitkileri yeniden üreten Vasil & Hildebrandt (1965a, 1965b, 1967) tarafından sağlanmıştır. Bu sonuçlar, yalnızca Schleiden ve Schwann'ın "Hücre Teorisinin" en önemli ilkelerinden biri olan totipotens kavramını doğrulamakla kalmamış, aynı zamanda 1980'lerde bitkilerin genetik dönüşümü için teorik çerçeveyi de yaratmıştır (Vasil & Hildebrandt, 1965a, 1965b, 1967; Vasil, 2008). Bitki doku kültürü tekniklerinin pratikte kullanılmasını sağlayan bitkilere özgü özel bir yetenek olarak adlandırılan "Totipotent" teriminin tam bir organizmaya dönüşebilir veya bir organizmanın herhangi bir hücre tipine farklılaşabilmesi olarak temelde farklı iki yorumu vardır (Condic, 2014). Birinci ve daha geniş anlamda, yalnızca zigotlar veya tek hücreli embriyolar totipotenttir. İkinci kavram ise, bir organizmanın tüm çeşitli hücre tiplerine dönüşebilen ancak her biri farklı koşullar altında gelişebilen hücreler de totipotent olarak tanımlanmaktadır (Fehér, 2019).

Tarımsal biyoteknoloji kapsamında önemli bir kavram haline gelen bitki biyoteknolojisi: bitki doku kültürü, genetik transformasyon ve moleküler biyoloji tekniklerinin çeşitli yönleriyle ilgilenir. Doku kültürü yöntemleri, tarla, meyve, sebze ve orman bitkileri ile

tıbbi ve aromatik bitkilerin iyileştirilmesi için genetik değişkenliğin yaratılması, korunması ve kullanılması için zengin bir kapsam sunar. Kallus ve bitki rejenerasyonunun uyarılması, mikro çoğaltma, somatik embriyogenez, somaklonal varyasyon, meristem kültürü, anter kültürü, embriyo kültürü, protoplast kültürü, kriyoprezervasyon ve sekonder metabolitlerin üretimi gibi çeşitli özel alanları içerir. Bunlar arasında mikro çoğaltma, somaklonal varyasyon ve embriyo, anter ve protoplast kültürü, bitki ıslahında doğrudan uygulamalara sahiptir. Mikroçoğaltma teknolojisi, vejetatif olarak çoğaltılan bitki türlerinde özel bir öneme sahip olan bitkilerin türüne uygun, hızlı ve kitlesel çoğalmasını sağlar. Anter ve mikrospor kültürü, somaklonal varyasyon, embriyo kültürü ve somatik hibridizasyon gibi bazı temel doku kültürü teknikleri, ticari çeşitlerde kademeli iyileştirme elde etmek için faydalı genetik değişkenlik oluşturmak için kullanılmaktadır. Aromaterapide kullanılan gıda aromaları, gıda boyaları, boyalar, parfümler, ilaçlar ve kokulu yağlar gibi sekonder metabolitlerin hücre kültürleri yoluyla üretimi moleküler tarımın önde gelen örnekleridir (Gosal vd., 2010).

Bitki doku kültürü tekniklerinin deneysel temeli, Alman Bilimler Akademisi'nden Gottlieb Haberlandt tarafından 1902'de tek hücre kültürü üzerine yaptığı gözlemler üzerine önerilmiştir. İlk gerçek kültürler, *Acer pseudoplatanus*'un (Dağ akçağacı) kambiyal dokusundan elde edilmiştir. Bitki doku kültürü (Mikroçoğaltma) terimi genellikle bitki hücrelerinin, dokularının, organlarının ve bunların bileşenlerinin, tanımlanmış kimyasal ve fiziksel faktörlerin *in vitro* olarak aseptik kültürü için kullanılır. Bitki doku kültürü teknikleri sayesinde; genç, hastaliksız, meristematik bitki parçaları, "eksplantlar" olarak adlandırılan daha küçük parçalara ayrılabilir ve bütün bir bitki haline getirilebilmektedir. Bu teknik, günümüzde neredeyse tüm bitki hücrelerinin totipotent ve rejeneratif olma yeteneğine sahip olması nedeniyle mümkün olmuştur. Hücrenin her kopyası, tüm bitkiyi oluşturmak için gerekli olan genetik bilgiye ve hücresel mekanizmaya sahiptir. İki kavram, plastisite ve totipotens, rejenerasyon ve bitki hücre kültürünü anlamak için iki merkezi süreçlerdir. Bitki hücreleri ve dokuları *in vitro* olarak kültürlendiğinde,

bunların çoğu genellikle çok yüksek derecede bir plastisite sergiler, bu da bir tip organ veya dokunun başka bir tipten başlatılmasına izin verir. Bu şekilde, tüm bitki daha sonra rejenere edilebilir, işte genetik potansiyelin bu tip korunmasına totipotens denir (Bidabadi & Jain, 2020; Sivagamasundari, 2022).

Geleneksel yetiştirme, çeşitli çevresel ve iklimsel faktörlerden etkilenir, ancak mikro çoğaltma ve doku kültürü teknikleri, minimum yer ve zaman kullanarak iyi bir düzenli bitki tedarikini garanti etmektedir. Mikroçoğaltma, yapay büyüme ortamlarında aseptik ve uygun koşullarda bitki dokularından veya tohumlarından vejetatif büyüme ve çoğalma işlemi olarak tanımlanmaktadır. Doku kültürü başarısı temel olarak ana bitkideki eksplantların genotipine, yaşına, türlerine ve konumuna bağlıdır. Doku kültüründe *in vitro* mikro çoğaltmanın avantajları; hızlı klonal yayılma ve çoğalma, kontrollü ve değiştirilmiş çevre koşulları, yıl boyunca dikim materyalinin mevcudiyeti, istenilen klonların tanımlanması ve üretilmesi, sekonder metabolitlerin üretimi, tehdit altındaki bitki türlerinin korunması gibi çok geniş bir kullanım alanı sunmaktadır (Bhojwani & Razdan, 1986; Nhut, 2022).

1990'larda, *in vitro* teknolojilerin artan sayıda bitki türüne uygulanmasında devam eden genişleme gözlemlenmiştir. Doku kültürü teknikleri, tahullar ve otlar (Vasil & Vasil, 1994), baklagiller (Davey vd., 1994), sebzeler (Reynolds, 1994), patates (Jones, 1994), diğer kök ve yumru bitkileri (Krikorian, 1994), yağlı tohumlar (Palmer & Keller, 1994), ılıman meyveler (Zimmerman & Swartz, 1994), tropikal meyveler (Grosser, 1994), orman ağaçları (Harry & Thorpe, 1994), ve tabii ki süs bitkilerinde (Debergh, 1994) kullanılmaya başlanılmıştır.

Dünya nüfusunun hızla artması ve insanoğlunun daha kaliteli besinlere duyduğu gereksinim bitki ıslahçıların işini her geçen gün biraz daha zorlaştırmaktadır. Islah amaçlarında meydana gelen çeşitlilik ve birbirinden bağımsız olan çok sayıda gen tarafından kontrol edilen birçok karakterin tek bir genotip üzerinde toplanması zorunluluğu, ıslah programlarında incelenmesi gereken popülasyonların büyüklüğünü de arttırmaktadır. Popülasyon büyüklüğü arttıkça geleneksel ıslah yöntemleri ile bu

popülasyonları elde etmek ve incelenmesi de uzun bir süreç olup aynı zamanda yoğun bir iş gücüne gereksinim göstermektedir. Bu sebeplerden dolayı günümüzde daha çok farklı model bitkilerde başarıyla uygulanan ve son yıllarda ekonomik önemi olan kültür bitkilerinde kullanılabilmesi için yoğun çalışmalar yapılan biyoteknolojik yöntemlerin geleneksel bitki ıslah programlarında karşılaşılan sorunları çözerek bitki ıslahının etkinliğini arttırabileceği üzerinde durulmaktadır (Genç & Yağbasanlar, 2018).

### Doku Kültürü Tekniklerine Genel Bir Bakış

Biyoteknolojik yöntemlerin çoğu yüzyıl önce keşfedilmiş olmasına rağmen, önemli bazı yöntemler 1980'li yıllardan sonra kültür bitkilerinde başarı ile uygulanmaya ve pratiğe aktarılabilir duruma gelmiştir. Hem klasik hem de biyoteknolojik yöntemlerle bitki ıslahı ve mahsul üretimi, bitki kalitesinin iyileştirilmesi ve ekonomik sürdürülebilirlik için önemli fırsatlar sağlayan bir araç olarak kullanılmaya başlanmıştır. *In vitro* çoğaltma yoluyla, yeni ve/veya seçkin bitkiler, geleneksel yöntemlere göre çok daha hızlı bir şekilde toplu olarak çoğaltılabilir hale gelmiştir (Gosal vd., 2010; Baydar, 2020).

### Bitkilerin Totipotensi Yetenekleri ile Mikro Çoğaltma ve *In vitro* Bankacılık Yöntemi

Mikro çoğaltma (*in vitro* çoğaltma), bitkilerin çeşitli doku, hücre ve organ kültürü yöntemleri ile klonal, türüne uygun çoğaltma için kullanılan en yaygın terimdir. Mikro çoğaltma, tanımlanmış uygun kültür ortamları ile ve kontrollü çevresel koşullar altında kapalı kaplarda doku ve organların küçük bölümlerinin (yani eksplantların) aseptik kültürünü ifade eder (Tripathi vd., 2021). Doku kültürü tekniklerinden biri olan mikro çoğaltma, şu anda ticari olarak en verimli ve pratik odaklı bitki biyoteknolojisidir ve çoğu durumda virüs veya diğer patojenlerden arınmış olan birçok bitki türünden çok sayıda klonal olarak çoğaltılmış bitkilerin hızlı bir şekilde üretilmesiyle sonuçlanır. Ayrıca, mikro çoğaltım artık transgenik bitkilerin ve somatik olarak yetiştirilmiş bitkilerin üretimindeki teknik bağlantıdır. Transgenik bitkilerin verimli üretimi

büyük ölçüde, içine “yabancı” DNA’nın eklendiği ve ifade edildiği hücrelerden, dokulardan veya organlardan bütün bitkileri yeniden üretme yeteneğine dayanır. Ek olarak, mikro çoğaltma ve diğer doku kültürü teknikleri ile moleküler biyolojideki yeni modaliteler, yeni genotiplerin veya arzu edilen bitkilerin seçimlerinin daha hızlı test edilmesini sağlayabilmektedir (Loberant & Altman, 2010).

Mikro çoğaltma, önemli tarla, bahçe ve orman bitkileri ile tıbbi/aromatik bitkilerin, küçük bitki parçalarından *in vitro* klonal çoğaltımı için kullanılan endüstriyel bir teknoloji haline gelen bitki doku kültürünün en iyi *in vitro* ticari uygulamalarından biridir. Mikroçoğaltma, tek tek bitkilerin genetik olarak aynı kopyalarının nispeten kısa bir süre ve sınırlı bir alanda, tipine uygun, hızlı ve kitlesel olarak çoğalmasını sağlayarak eski çeşitlerin gençleşmesini veya biyotik ve abiyotik streslere dirençli yeni çeşitlerin hızla yenilenmesini sağlamaktadır (Kane, 2011; Bhojwani & Dantu, 2013). Dünyada her yıl mikroçoğaltım yoluyla farklı bitki türlerine ait tahminen 500 milyondan fazla bitki üretilmektedir. Mikroçoğaltma endüstrisi çevre dostudur ve kimyasal olarak çok az hammadde gerektirir. Bu teknoloji aşağıdaki avantajlara sahiptir:

- i) Üretilen gerçek tipte bitkiler, yani donörle aynı (*in vitro* klonlama).
- ii) Tek bir eksplanttan bütün bir bitkinin rejenere edilmesi.
- iii) Seçilen iyi özelliklere sahip bitkiler, dünyanın herhangi bir yerinde aynı özelliklere sahip olarak çoğaltılabilir.
- iv) Elit klonların/çeşitlerin hızlı ve toplu çoğaltılması (1 ila 10/döngü her biri 2 hafta), aksi takdirde geleneksel yöntemlerle çoğaltılması zordur.
- v) Mevsimsel ve hammadde kısıtlamalarından bağımsızdır.
- vi) Hastaliksız bitki üretimi.
- vii) Ulusal/uluslararası germplazm değişimi için elit bitki materyali, patojen ve böcek riskini ortadan kaldırır.

viii) Klasik yöntemlere kıyasla daha kolay sekonder metabolit üretimini mümkün kılmaktadır.

ix) Mikro çoğaltılmış, tarlada yetişen bitkiler daha yüksek verim verir ve daha iyi kalite sergiler (Gosal vd., 2010).

Haberlandt dönüm noktası niteliğindeki araştırmasında ilk olarak bitki hücresi kültürü kavramını keşfetmiştir (Haberlandt, 1902). Daha sonra, dünyanın dört bir yanındaki araştırmacılar, canlı bitki hücresi, doku ve organ kültürlerinin üretimi için gerekli olan bu koşulların tanımını büyük bir ilgiyle takip ettiler. Haberlandt, tarihi makalesinin yayınlanmasından bu yana geçen 100 yılda muhtemelen bitki doku kültürünü totipotens kavramını incelemek ve morfogenezini keşfetmek için bir sistem olarak kullanmayı amaçlasa da elde edilen muazzam ilerlemeyi öngörmesi pek olası değildir. Bitki doku kültürünün birçok potansiyel kullanımının en pratik ve ticari uygulaması, arzu edilen genotiplerin ekonomik olarak uygulanabilir hızlı çoğalmasını sağlamak için mikro çoğaltmanın kullanılmasıdır (Baydar, 2020). Bitkileri küçük bitki parçalarından, hatta hücrelerden hızla çoğaltma yeteneği, bilim insanlarının önemli mahsul türlerinin üstün elit genotiplerini oluşturmak için biyoteknolojinin pratik uygulamalarını, yani doğrudan genetik müdahaleyi başarıyla uygulamalarını sağlayan temeli sağlamıştır (Read, 2004).

*In vitro* ortamda bitkilerin hücresel totipotensi yetenekleri sayesinde, kallus farklılaşması ve vejetatif çoğaltmanın oluşturulması gibi, bitki bilimlerinin uygulamalı alanlarında farklı bakış açıları getirmiş ve yeni boyutlar kazandırmıştır. Arzu edilen ve ticari bakımdan önemli kültür bitkilerinin hızlı vejetatif çoğaltımı veya mikro çoğaltım özellikleri, tam bitkilerle yetiştirmek için: nodal sürgünler segmentinden çoklu sürgün indüksiyonu (Şekil 1b) ve bunların *in vitro* köklenmesi (Şekil 1c) yoluyla mümkündür. Somatik embriyogenesis ve organogenesis (kallus farklılaşması) diğer mikro çoğaltma yöntemleridir. Olgun tohumlardan elde edilen fideler (Şekil 1d), nadir ve nesli tükenmekte olan bitki türlerinin büyük ölçekli çoğaltması için bir



kaynak olarak da kullanılabilir (Dagla, 2012). Virüssüz bitkiler, virüs bulaşmış bitkilerin apikal meristemleri kullanılarak yetiştirilebilir (Bhojwani & Razdan, 1986). Özellikle klasik ıslah metotları ile uzun yıllar alan homozigot bitkilerin elde edilmesi, olgunlaşmamış polen hücreleri gibi haploid hücrelerin diploidizasyonu ile tek bir nesilde elde edilebilir (Hussain vd., 2012). Protoplast teknolojisi, geleneksel melezleme yöntemlerinin güç olduğu, uzaktan akraba bitki türlerinin ve cinslerinin somatik hibritlerinin ve sibridlerinin geliştirilmesini mümkün kılmıştır (Baydar, 2020).

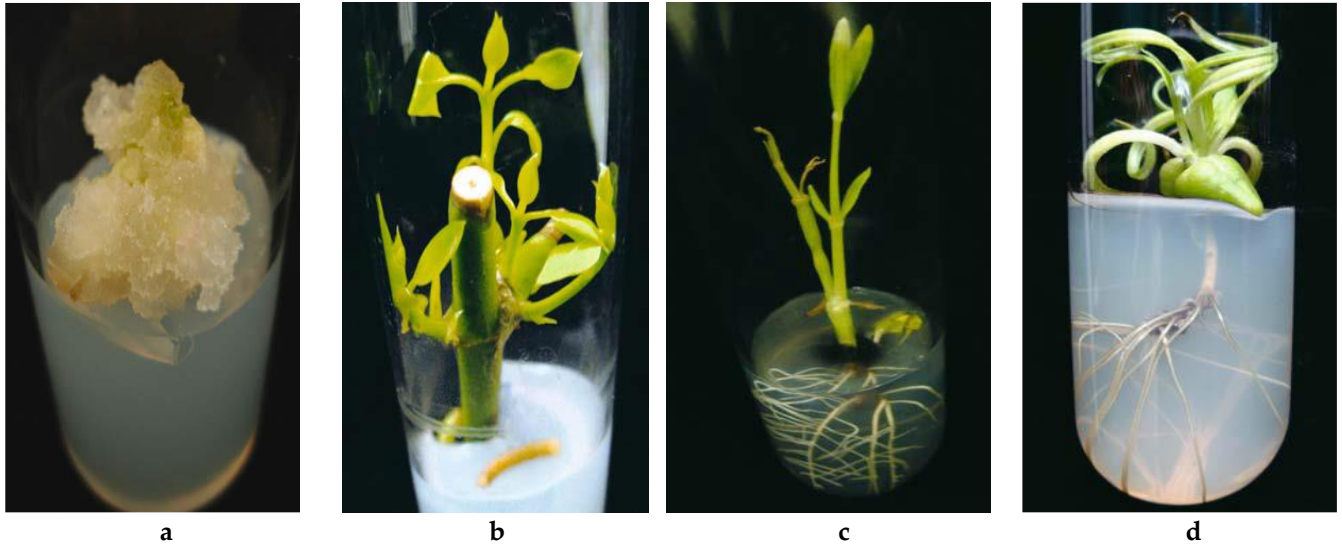
Protoplastlar ayrıca, bakterilere gen transferine benzer bir şekilde bitkilerin genetik mühendisliği için uygun bir materyaldir. Tüm bu yöntemlerin başarılı uygulamaları ile doku ve hücre kültürü teknikleri sayesinde, ekonomik açıdan önemli bitkilerin yeni çeşitlerinin üretimi için hücre varyantlarının seçimi ve uyarılması için önemli bir kaynak haline gelmiştir (Dagla, 2012).

### Embriyo Kültürü ile *In Vitro* Tozlaşma

Zigot (döllenen yumurta), bir dizi iyi tanımlanmış gelişim evresinden geçerek, bir sonraki neslin atası olan bir embriyo oluşturur (George vd., 2008). Embriyonun büyümesini ve gelişmesini çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörler düzenler. Çevre dokular, özellikle endosperm, önceden belirlenmiş embriyo gelişim modelini de kontrol eder. Bu faktörlerdeki herhangi bir bozukluk ve aşırı anormallik durumlarında da embriyonun düşmesine neden olur (Bhojwani & Dantu, 2013). Geniş hibridizasyonun zigotik safha sonrası başarısızlığının en yaygın nedeni, zayıf endosperm gelişimi nedeniyle embriyo abortusudur. Laboratuvar ortamında eksize edilmiş zigotik embriyoların gelişimin farklı aşamalarında kültürü, embriyogenezin gelişimsel ve fizyolojik yönleri hakkında faydalı bilgiler sağlamıştır (Bhojwani & Dantu, 2013). Embriyo kültürü, düşük tohum oluşumu, tohum dormansisi, yavaş tohum çimlenmesi gibi embriyo büyümesini indüklemeye gibi sorunları çözenin üstesinden gelmede başarılı olmuştur (Raghavan, 1980, 1994; Yeung vd., 1981; Collins & Grosser, 1984; Zenkteler & Nietzsche, 1990).

Zigotik veya tohum embriyoları, örneğin kallus kültürlerini başlatmak için bitki doku kültüründe eksplantlar olarak sıklıkla avantajlı bir şekilde kullanılır (George vd., 2008). Embriyo kültüründe embriyolar tohumlardan ayrılır ve elde edilen embriyolar ayrı ayrı izole edilerek eksplant başına bir bitki sağlamak için *in vitro* olarak çimlenmesi sağlanır. Embriyo kültürü aynı zamanda, uzamış bir dormansi periyoduna sahip tohumlardan hızlı bir şekilde fide üretimine de yardımcı olmaktadır. Ebeveynler genetik olarak farklı türler olduğunda, geniş gen havuzuna sahip bitkiler ile yapılan kapsamlı melezleme çalışmalarında, endosperm dejenerasyonu embriyo kaybına ve melezlemenin başarısız olmasına yol açmaktadır. Bu gibi durumlarda, embriyo kültürü veya embriyo kurtarma tekniği, türler arası melezler elde etmek için pratik bir yaklaşımdır (Gosal & Bajaj 1983). Embriyo kültürü ayrıca kapsamlı melezleme çalışmalarında haploidler üretmek için de kullanılır (Bains vd., 1995; Verma vd., 1995).

Bitki yetiştiricileri tarafından kullanılan doku kültürü tekniklerinden en başarılısı embriyo kültürüdür. Embriyo ölümü, bazen aynı türler arasında ve bazen de farklı türler arasında çapraz üreme sonrası ortaya çıkan yaygın vakalardan biridir. Bu gibi durumlarda, embriyo erken aşamalarda izole edilmedikçe ve bir bitkiye dönüşmek ve gelişmek için bir diyetle büyütülmedikçe embriyo ölümü kaçınılmazdır. Doğrudan döllenmeden sonra embriyonun küçük olması nedeniyle izole edilemediği çok erken evrelerde, araştırmacılar tüm yumurtayı izole ederek embriyonun gelişimine kadar uygun ortamı sağlayarak embriyo gelişimine izin vermektedirler. Ovul teknolojisi, özellikle genetik olarak farklı türlerde uyumsuzlukları ortadan kaldırmak için de kullanılır. Polen, akarlar aşılana hazır olmadan erken bir zamanda olgunlaşabilir. Çiçeklenme mevsiminde bazı inhibitörlerin varlığından dolayı aşı tüpü çiçek tarhında büyüyemez. *In vitro* tozlaşma ve döllenme, oositlerin izole edilmesi ve daha sonra fidelere veya yumurtalık implantlarına daha sonra büyüyen canlı embriyoların tohumlarının elde edilmesi için istenen bitkiden polen ile döllenmesi ile bu sorunun üstesinden gelinmektedir (Baday, 2018).



**Figure 1.** An example of micropropagation a: Callus replication. b: Multiple shoot induction from nodal shoots segment. c: *In vitro* rooting of the shoot to grow a full plant. d: *In vitro* seed germination and seedling development (Dagla, 2012).

**Şekil 1:** Bir mikro çoğaltım örneği a: Kallus çoğaltımı b: Nodal sürgünler segmentinden çoklu sürgün induksiyonu. c: Tam bir bitki yetiştirmek için sürgünün *in vitro* köklenmesi. d: *In vitro* tohum çimlenmesi ve fide gelişimi (Dagla, 2012).

Embriyo kültüründe daha fazla ilerleme ve genetik çalışmalarda embriyo kültürü tekniğini kullanma imkânını, ilk kez gösteren Laibach'ın (1925, 1929) *Linum* (çok yıllık keten)'daki çalışması olmuştur. *Linum*'daki belirli türler arası melezlemelerde, meyvenin ufaldığı ve tohumların cılız ve cansız olduğu bulunmuş, ancak bu tür tohumların embriyoları kesilip bir sakkaroz ortamına yerleştirildiğinde, çimlenmeleri sağlandığı gözlemlenmiştir (Dulberger, 1973). Embriyo kültürü Gregory & Purvis (1938) tarafından vernalizasyon çalışmalarında da bir araç olarak kullanılmıştır. Bu çalışma, eksiz edilmiş çavdar embriyolarını %2 sakkaroz ortamında vernalize ettikten sonra çimlenmenin endosperm veya aleuron tabakasının vernalizasyonuna değil, embriyonun soğuk tedaviye yanıtına bağlı olduğunu göstermişlerdir. Gregory & deRopp (1938), bu çalışmaya mütakiben çiçek oluşumu için embriyoların vernalizasyonu sırasında şekerin gerekliliğini gösterebilmişlerdir (Narayanaswami & Norstog, 1964; Yatsuyanagi & Takahashi, 1953). Szala vd. (2016), *Brassica oleracea* L. × *B. rapa* L. melezlerini elde etmek için açılan yumurtalıkların *in vitro* tozlaşmasının uygulanması üzerine yaptıkları çalışmada, *B. napus*'un yeniden sentezleri, *B. oleracea* × *B. rapa*'nın türler arası hibridizasyonu ve ardından embriyo kurtarma ve

genom ikiye katlama yoluyla gerçekleştirilmiştir. Doğal olarak gerçekleşen belirli alogami engelleri nedeniyle, tozlaşma yeterince iyi olmamış ve bu nedenle *B. rapa* poleni, yumurtalıkları açılmış bir *B. oleracea* *in vitro* olarak tozlaştırılmıştır. Çalışmanın ardından, *B. napus*'un başarılı bir şekilde geliştirildiğini ve farklı özellikler için genetik yapısını genişlettiğini bildirmişlerdir (Tefera, 2019).

### Maternal Haploid Tekniği ve Anter Kültürü Yöntemleriyle Di/Double Haploid Bitki Üretimi

Geleneksel bitki ıslah yöntemleri, gerekli homozigotluk seviyesini elde etmek üzere arzu edilen özellikler için altı ila yedi seçim döngüsü gerektirmektedir. Bu süreç, bir çeşidin tescil edilmesi için klasik ıslah yöntemleri ile 11 ila 13 yıl alırken, double haploid (DH) teknolojisi ile tek bir nesilde daha hızlı tam homozigot bitkilerin elde edilmesine yardımcı olarak ıslah programlarını hızlandırmaktadır (Hussain vd., 2012). Haploid bitkiler, gametik kromozom sayısını (2n yerine n) taşıyan sporofitlerdir. Bir haploidin kendiliğinden veya indüklenmiş kromozom kopyalanması meydana geldiğinde, ortaya çıkan bitkiye double haploid (DH) adı verilir. Karşılaştırıldığında, dihaploid bitkiler (2n = 2x), bir ototetraploidten (4x) elde edilen haploid bitkilerdir (Kasha & Maluszynsky, 2003).

Kendiliğinden veya kolçisinlerin indüklediği kromozomal ikiye katlama ile geliştirilen double haploidler, tek bir nesilde heterozigot bitkilerden tamamen homozigot hatların doğrudan üretimine yol açmaktadır. Anter kültürü yoluyla double haploid ıslahı, heyecan verici ve güçlü bir araç olarak bitki ıslahı için geleneksel tekniklere uygun bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Tefera, 2019). Ayrıca double haploid tekniği, homozigot saf hatların stabilitesi için en az üç ila dört nesil kendileme tasarrufu da sağlamaktadır (Hassawi vd., 2005). Örnek olarak lahanagiller familyasından *Brassica* türlerinde, çok sayıda kendine uyumsuzluk SI (Self-incompatibility) allelleri bulunduğundan F6 jenerasyonuna kadar en az beş kere tomurcuk tozlaşması gerekirken, DH teknolojisi sayesinde sadece bir defa tomurcuk tozlaşması yeterli olabilmektedir. Ayrıca bitki ıslah programlarında F6 jenerasyonuna kadar yapılan kendileme işlemi ile heterozigotluk oranı %2-3 oranında devam ederken, DH tekniği ile elde edilen hatların homozigotluk oranı %100 oranında gerçekleşmektedir (Baydar, 2020).

Günümüzde en yaygın kullanılan haploidy teknikleri anter ve polen kültürüne dayalı androgenesistir. Temel amaç mikrospor kaynaklı embriyo elde etmek ve bu süreçte olgunlaşmamış mikrosporlar (tek çekirdekli safhadan erken çift çekirdekli safhaya kadar) *in vitro* ortamda sıcak, soğuk ve kolçisin uygulamaları ile gametofitik polen oluşumu yerine sporofitik haploid veya double haploid (DH) embriyo oluşturulmaya çalışılarak daha hızlı bir homozigotiye ulaşmak bu teknoloji sayesinde mümkün olmaktadır (Baydar, 2020). Double haploid (DH) tekniğinde kolçisinin yanı sıra; trifluralin, oryzalin, sülfonamid, pendimetalin ve klorpirifos gibi çeşitli kimyasal herbisitler, kromozom ikiye katlanmasını indüklemeye büyük potansiyele sahiptir (Allum vd., 2007). Bu antimitotik ajanların kromozom ikiye katlanmasını gerçekleştirme mekanizmaları, kolçisin ile aynıdır. Kolçisin ile karşılaştırıldığında, bu ajanlar bitki tübülüne karşı daha baskın bir afiniteye sahip olup mikromolar seviyede kullanılan konsantrasyon, toksisite daha düşük iken, kolçisine benzer bir kromozom katlama etkisine sahiptir. Kimyasal antimitotik ajanların yanı sıra, önemli bir fiziksel mutajen olarak yüksek sıcaklık da bitkilerde

kromozom katlama çalışmalarında etkili olduğu kanıtlanmıştır (Zhang vd., 2003; Wang vd., 2012, 2013a). Yüksek sıcaklıkta işleme, tek biçimliliğe ve ekonomik ve operasyonel avantajlara sahiptir (Guo vd., 2017).

İlk doğal sporofitik haploid 1921'de Dorothy Bergner tarafından bir yabancı ot türü olan *Datura stramonium* L.'de gözlemlenmiş, Blakeslee vd. (1922), tarafından rapor edilmiştir. Bunu tütün, buğday ve diğer bazı mahsul türlerinde doğal haploidlerin raporları izlemiştir. Bu çalışmadan sonra, bitki ıslahında ve genetik araştırmalarda haploidlerin önemi giderek ivme kazanmaya başlamıştır (Kumari & Aswath, 2018). *Datura anoxia*'nın olgunlaşmamış anterlerinin *in vitro* kültüründen haploid embriyo gelişimi ilk kez Guha & Maheswari (1964) tarafından, mikrosporların normal gametofitik gelişimini sporofitik bir gelişime dönüştürmenin mümkün olduğunu ve daha sonra haploid kromozom sayısına sahip embriyoların ve bitkilerin üretileceği keşfedilmiştir. Bu, haploidlerin gelişiminde bir ilerleme ve atılım olmuş ve tespit edilen kendiliğinden haploidlerin sayısı istikrarlı bir şekilde artarak 1974'te Kasha (1974) 100'den fazla anjiyosperm türünün oluşumunu kaydetmiştir. Daha sonra, DH'nin *in vitro* yöntemlerle geliştirilmesi için çaba harcanmış ve 250'den fazla bitki türü için protokoller yayınlanmıştır (Maluszynski vd., 2003).

Double haploid (DH) tekniğindeki ilerleme ve atılımlar, özellikle *Solanaceae*, *Brassicaceae* ve *Gramineae*'de başarılı olan anter kültürü hakkında daha ileri ve kapsamlı araştırmaların yolunu açmıştır. Bununla birlikte, ilgili angiosperm bitkilerinin tümü, embriyogenez indüksiyonuna verimli bir şekilde yanıt vermez ancak, arpa (*Hordeum vulgare* L.), kolza tohumu (*Brassica napus* L.), tütün (*Nicotiana spp.*) ve buğday (*Triticum aestivum* L.), yüksek rejenerasyon verimlilikleri (Forster vd., 2007), *Arabidopsis* gibi bilimsel veya ekonomik olarak ilginç diğer türler, birçok odunsu bitki veya baklagil familyasının üyeleri mikrospor embriyogenezini incelemek için model türler olarak kabul edilmektedirler. (Sangwan-Norreel vd., 1986; Bajaj, 1990a; Germanà, 2006, 2009). Double haploid (DH) tekniği: gamet embriyogenezini, yüksek bir genom heterozigotluğu, uzun bir gençlik dönemi ile uzun bir nesil döngüsü, büyük bir boyut



ve genellikle kendine uyumsuzluk ile karakterize edilen ve bunların olmadığı odunsu bitkilerde homozigotluk elde etmek için özellikle vazgeçilmez bir araçtır (Germanà, 2006, 2009).

### Somaklonal Varyasyon

Bitki doku kültürü, bitki ıslahçılarında yardımcı olmak için pek çok yeni aracın geliştirildiği kolaylaştırıcı bir teknolojidir. Bitki doku kültürü teknikleri ile ıslah sürecinin hızını veya etkinliğini artırmak, mevcut germplazma erişilebilirliğini iyileştirmek ve bitki ıslahı için yeni varyasyonlar yaratmak mümkün olmaktadır. Bitki doku kültürü tekniklerinden somaklonal varyasyon, doku kültürü sistemlerinin hem avantajı hem de dezavantajı olduğu için benzersiz bir konuma sahiptir. Somaklonal varyasyon ilk olarak 1981'de konuyu gözden geçiren ve o dönemde bitki ıslahı için potansiyel kullanımlarına dikkat çekmek için birkaç araştırmacı arasında yer alan Larkin ve Scowcroft tarafından, hücre ve doku kültürlerinden kaynaklanan varyasyon olarak tanımlanmıştır (Larkin & Scowcroft, 1981). Beklentileri büyük ölçüde, patates (Shepard vd., 1980), şeker kamışı (Heinz, 1973; Krishnamurthi & Tlaskal, 1974), mısır (Green, 1977) ve çeltik (Oono, 1978) protoplast ve eksplant kültürlerinden türetilen bitkilerde geniş çeşitlilik rapor edilen gözlemlerden kaynaklanmaktadır. Kısa süre sonra, somaklonal varyasyonun yaygın olduğunu ve bu nedenle görünüşte tüm bitki yetiştiricileri için erişilebilir olduğunu gösteren, tüm türler yelpazesinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (Karp, 1995). Şu anda, somaklonal varyant terimi evrensel olarak doku kültüründen türetilmiş varyantların tüm formları için kullanılmaktadır (Bajaj, 1990b), bununla birlikte protoklonal, gametoklonal ve meriklonal varyasyon gibi diğer isimler genellikle sırasıyla protoplast, anter ve meristem kültürlerinden varyantları tanımlamak için kullanılmaktadır (Bajaj, 1990b).

Günümüzde kullanılan doku kültürü tekniklerinden bir diğeri de somaklonal varyasyon yöntemidir. Braun (1959) tarafından somaklonal varyasyonun ilk gözlemi ve raporundan bu yana, doku kültürü yapılan birçok bitkinin ana problemlerinden biri olmuştur ve olmaya devam etmektedir. Bitki hücrelerinin *in vitro* olarak büyümesi

ve bütün bitkilere dönüşmesi, sadece hücrenin mitotik bölünmesini içeren aseksüel bir süreçtir ve teorik olarak herhangi bir varyasyona neden olmamalıdır. İdeal olarak, genetik olarak tek tip bitkilerin klonal çoğaltılması beklentidir (Bairu vd., 2011). Bu nedenle, kültür süreci sırasında kontrolsüz ve rastgele spontane varyasyonların ortaya çıkması beklenmeyen ve çoğunlukla istenmeyen bir olgudur (Karp, 1994). Bununla birlikte, bu olumsuz etkilerin aksine, yeni varyantların yaratılması yoluyla mahsulün iyileştirilmesindeki yararlılığı da iyi bir şekilde belgelenmiştir. İndüklenmiş somaklonal varyasyon, poligenik özelliklere sahip ekinlerin genetik manipülasyonu için kullanılabilir (Bairu vd., 2011). Hastalıklara dayanıklılık ve kalite iyileştirme ve daha iyi verim sergileyebilen yeni çeşitlerin üretilmesi yoluyla bitki ıslahı için de önemli bir araç olabileceği bildirilmektedir (Karp, 1995; Emaldi vd., 2004). Bu nedenle somaklonal varyasyonun yararlı potansiyellerini kabul etmek önemlidir. Doku kültüründen türetilen bitkilere somaklonlar denir ve farklılıklar sergileyen doku kültüründen türetilen bitkilere somaklonal varyantlar adı verilir (Larkin & Scowcroft, 1981).

Skirvin & Janick (1976) bahçe bitkileri türlerinin genotip iyileştirmesinde klonal varyasyonun önemini ilk vurgulayanlar arasında yer almaktadır. Shepard vd. (1980), 'Russet Burbank' patatesinin (*Solanum tuberosum* L.) kültürlenmiş yaprak protoplastlarından (protoklonlar) rejenere edilen bitkiler arasında büyük çeşitlilik olduğunu göstermiştir. Bu genetik değişkenlik kaynağının kapsamını ve olası önemini araştırırken, konuyu kapsamlı bir şekilde gözden geçiren Larkin & Scowcroft (1981), ilk olarak "somaklonal varyasyon" teriminin, bir süre sonra doku veya hücre kültüründen rejenere edilen bitkiler arasında gözlenen fenotipik varyasyonu tanımlamak için kullanılmasını önermişlerdir (Skirvin vd., 1994).

Kallus kültürleri somatik mutantları geri kazanmak için kullanılabilir, çünkü *in vitro* kültür ortamı tek tek hücrenin bölünmesini ve tüm bitkinin yenilenmesini teşvik etmektedir. Somaklonal varyantlar somatik veya genetik olarak stabil olabilir. Genetik olarak kararlı varyasyonlar mutasyonlar olarak adlandırılabilir. Bununla birlikte, tersine çevrilebilir epigenetik varyasyonların olasılığı

nedeniyle, bu alan, “mutasyonlar” yerine “varyasyonlar” terimini kullanmaktadır (Wang & Wang, 2012). DNA dizisindeki herhangi bir değişiklik, kalıtsaldır ve mahsulün iyileştirilmesi için önemlidir. Öte yandan, epigenetik değişiklikler geçicidir ve geri dönüşümlüdür ve kalıtsal değildir (Meins, 1983). Genetik olarak kararlı somaklonal varyantlar, nokta mutasyonları, kromozom sayısı ve yapısındaki değişiklikler, rekombinasyonlar, DNA dizilerinin metilasyonu, nükleer, mitokondriyal veya kloroplast genomlarındaki delesyonlar ve transpozisyonlar nedeniyle ortaya çıkabilmektedir (Lee & Phillips, 1988; Phillips vd., 1990).

Gengenbach & Umpeck (1982), izole edilmiş mitokondriyal DNA'nın restriksiyon enzim analizini kullanarak mitokondriyal olarak kontrol edilen erkek kısırlığının ortaya koyarak somaklonal varyasyonun nükleer DNA ile sınırlı olmadığını göstermiştir. Aydın vd. (2016), yaptıkları çalışmada Murashige ve Skoog üzerinde endosperm destekli olgun çavdar embriyosundan elde edilen kalluslardaki varyasyonun tespiti için rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD) ve coupled restriksiyon enzimi rastgele amplifikasyon (CRED-RA) belirteçleri kullanılmışlar ve sonuç olarak RAPD ve CRED-RA tekniklerinin somaklonal varyasyonun tespiti için kullanılabilirliğini bildirmişlerdir.

Somaklonal varyasyon tekniği bazı durumlarda, arzu edilen morfolojik özellikler, hastalık direnci, böcek direnci, asit toleransı ve tuz toleransı dahil olmak üzere çeşitlere istenen özellikleri kazandırmak için doku kültürü varyasyonundan da yararlanılmıştır (Baydar, 2020).

### Protoplast Füzyonu ile Somatik Hibridizasyon

Bir protoplast, hücre duvarı çıkarılmış sitoplazma ve çekirdekten oluşan bir bitki hücresinin canlı kısmıdır. Protoplastlar, tüm bitki organlarından veya doku kültürlerinden izole edilebilmektedir (George vd., 2008). Teorik olarak, protoplastların totipotent olduğu varsayılır, bu da farklılaşma ve çeşitli organlara dönüşme yeteneğine sahip oldukları anlamına gelmektedir (Ishaku vd., 2020). Protoplast füzyonu, faydalı agronomik özelliklere sahip ve aynı zamanda ticari ölçekte satılabilen mahsullerin üretilmesinde çok önemli bir teknik haline gelmiştir.

Özellikle son birkaç on yılda, genetiği değiştirilmiş mahsullerin halk tarafından onaylanmaması gibi nedenlerden dolayı, protoplast füzyonunu kullanan araştırmalarda bir artış meydana gelmiştir (Davey vd., 2010; Grosser vd., 2010). Protoplast füzyonu yoluyla somatik hibridizasyon, türler arası ve türler arası hibritlerin üretimi için önemli bir araç haline gelmiştir ve iki farklı genomun kaynaştırıcı protoplastlarını, ardından istenen somatik hibrit hücrelerin seçimini ve müteakip hibrit bitkinin rejenerasyonunu içermektedir (Şekil 2). Somatik hibridizasyon, artan verim ve hastalıklara karşı direnç ile yeni melezler oluşturmak için farklı tarla ve bahçe bitkilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tuz toleransı, kalite iyileştirme, sitoplazmik erkek kısırlığının (CMS) transferi, çekirdeksiz triploidler ve anaç iyileştirme için de kullanılmıştır (Wang vd., 2013b).

Bitki protoplastlarının füzyonu, yapılan araştırmalar sonucunda kimyasallar tarafından indüklenebileceği gözlemlenmiş, böylece farklı soy ve türlerin protoplastları, heterokaryonları üretmek için birleştirilebileceği fikri ortaya atılmıştır. Heterokaryonların sürekli mitotik bölünmesinden kaynaklanan kallus hücreleri, uygun bir seçim sistemi kullanılarak tanımlanabileceği ve somatik hibrit hücre hatlarına ve en sonunda bitkilere dönüştürülebileceği kanıtlanmıştır (Ishaku vd., 2020). Bitki ıslahı için somatik hibrit üretmek için protoplast füzyonunu incelemek gerekirse ilk olarak, cinsel melez uyumsuzlukların üstesinden gelinebileceği ve ikincisi ise kloroplastlar, mitokondri ve plazmonların birleştirilebilmesi gibi yeteneklerinden dolayı protoplast füzyonu tekniğinin bitki ıslahı için çok önemli olduğu bildirilmiştir. Hem tür içi hem de türler arası seviyelerde çok sayıda somatik hibrit kombinasyon üretilmiştir; Schieder & Vasil (1961) tarafından yapılan son incelemede elde edilen somatik hibrit kombinasyonların özet bir listesi mevcuttur. Petunya türleri üzerinde beş yıllık bir süre boyunca üç melez uyumluluk seviyesi ile protoplast füzyonu üzerine yürütülen çalışmada, benzersiz ve daha önce ulaşılamaz tür kombinasyonları oluşturmak için bu teknolojiye yararlanma yönünde kaydedilen ilerlemeyi simgelediği gözlemlenmiştir (Verma vd., 2008).



**Figure 2.** Schematic representation of hybrid plant production by protoplast fusion technique (Hussain et al., 2012).

**Şekil 1.** Protoplast füzyonu tekniği ile hibrit bitki üretiminin şematik gösterimi (Hussain vd., 2012).

Protoplast, plazmalemmayı ve doğal selülozik hücre duvarı olmadan tüm hücreyi içermektedir. Protoplast teknolojisinde, somatik hücrelerden izole edilen iki genetik olarak farklı protoplast ve paraseksüel hibrit protoplastlar elde etmek için deneysel olarak kaynaştırılmaktadır. Hibrit protoplast, heteroplazmik sitoplazma ve iki kaynaşmış ana çekirdek içerir. Protoplast füzyonu, çeşitli prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde genetik rekombinasyonu indüklemek için nispeten yeni birçok yönlü bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Bhojwani vd., 1977). Protoplast füzyonu, türler arası ve hatta türler arası hibritleri üretmek için kullanılabilir. Protoplast füzyonu, geleneksel melezleme sistemlerinin dayattığı genetik alışverişin önündeki engelleri yıktığı için gen manipülasyonunun önemli bir aracı haline gelmiştir. Protoplast füzyon tekniği, genetik analiz ve suş iyileştirme için büyük bir potansiyele sahiptir. Endüstriyel olarak faydalı mikroorganizmalar için özellikle faydalı olduğu bildirilmiştir (Muralidhar & Panda, 2000). Günümüzde izole edilmiş protoplastlar, esas olarak bitki virüsü enfeksiyonlarına yönelik araştırmalarda ve seçilen DNA fragmentlerini bitki hücrelerine entegre etmek üzere hücrenin genetik bilgisini değiştirmek için kullanılmaktadır. Genetiği değiştirilmiş hücreler, yalnızca yeni genetik yapıya sahip bütün bitkiler onlardan yeniden üretilebiliyorsa genel pratik değere sahip olacaktır. Bu nedenle,

protoplast kültürlerinden bitkileri geri kazanma yeteneği, bitki bilimindeki bu tür genetik mühendisliği projelerinin başarısı için hayati öneme sahiptir (Davey vd., 2005).

Somatik hibridizasyonu kullanan en yaygın hedef, her iki füzyon ebeveyninin tam genomları ile simetrik hibritlerin üretilmesidir. Türler arası tütün hibritlerinin ilk raporundan bu yana (Carlson vd., 1972), çok sayıda simetrik hibrit üretilmiştir. İlişkisiz genomların protoplast füzyonu yoluyla birleştirilmesi, genellikle ebeveynlerden birinin nükleer ve/veya sitoplazmik genomlarının kısmen veya tamamen ortadan kaldırılmasına yol açsa da her iki ebeveyninden de agronomik öneme sahip özelliklere sahip simetrik somatik hibritlerin elde edildiği birçok örnek vardır (Swapnil vd., 2020). Dihaploid *S. tuberosum* ve diploid *S. circaefolium*'un protoplastlarının kaynaştırılmasıyla elde edilen dört simetrik hibritten üçü, patojen *P. infestans*'a karşı tamamen dirençli olduğu ve dört hibridin tümü, nematod *Globodera pallida*'ya karşı oldukça dirençli olduğu gözlemlenmiştir. Somatik hibrit (dişi ebeveyn olarak) ve *S. tuberosum* arasındaki eşeyli hibritlerin canlı tohumlar oluşturması, hibritlerin patates ıslahındaki potansiyeline işaret etmektedir (Mattheij vd., 1992). *S. tuberosum* ve *S. phureja* arasındaki altı tetraploid somatik hibritten biri, tarla denemeleri altında patates çeşidinden üç kat daha fazla verim verdiği bildirilmiştir (Mattheij vd., 1992). Kameya vd.

(1990) *S. melongena* ve *S. integrifolium* arasında, iki türün toplam kromozom sayısına sahip olan ve *Pseudomonas solanacearum*'a ebeveynlerden herhangi birinden daha yüksek direnç gösteren somatik melezler üretmiştir. Yine yapılan çalışmalar sonucunda, Japon turpu ve karnabahar arasındaki somatik melezler, karnabaharda ciddi bir hastalık olan yumru köke karşı direnç göstermiştir (Hagimori vd., 1992). Krizantem (*Dendranthema x grandiflorum*) ve pelin (*Artemisia sieversiana*) arasındaki somatik melezler, *Puccinia horiana*'nın neden olduğu pasa karşı krizantemden daha dirençli olduğu bildirilmiştir (Furuta vd., 2004).

### Meristem ve Sürgün Ucu Kültürü ile Virüssüz Bitkilerin Üretimi

Bir bitkinin büyüme konisi veya sürgün uçları, steril koşullarda bir besi yerinde eksplant olarak kullanılarak kültüre alınıp bunlardan tam bir bitkinin elde edilmesi meristem ve sürgün ucu kültürü olarak adlandırılmaktadır. Virüsten ari bitki elde edilmesinde en çok başvurulan *in vitro* tekniği apikal meristem ve sürgün ucu kültürleridir. Bu kültürde kullanılan eksplant kaynakları meristematik bölümlerin en yoğun olarak gerçekleştiği dokulardan alındığından virüs bulaşıklığı hiç veya az düzeyde olmaktadır. Virüsten ari bitki elde etmek ve başarı şansını artırmak için genellikle meristemlerin alınacağı sürgünlere sıcaklık uygulaması yani termoterapi uygulanarak virüssüz bitki elde edilmesinde başarı şansını artırmaktadır (Baydar, 2020).

Zararlılar ve patojenler, tarla ve bahçe bitkilerinde önemli hasarlara ve ekonomik kayıplara neden olur. Bu hasarın büyük bir kısmı virüs enfeksiyonlarından kaynaklanmaktadır. Genellikle vejetatif yollarla çoğaltılan patates, tatlı patates, muz, şeker kamışı, bazı bahçe ve tarla bitkileri virüs enfeksiyonundan kaynaklanan yıllık küresel tarımsal ürün kayıplarının kaba bir tahmini 69 milyar ABD doları civarındadır. Tek başına asma yaklaşık 53 virüs tarafından enfekte edilir (Bhojwani & Dantu, 2013), tek viral hastalıktan dolayı yani Grapevine Fanleaf Virus (Asma yelpaze yaprak virüsü) tahmini yıllık kayıp, 1,5 milyar ABD Dolarıdır (Komar vd., 2007). Patates Leafroll Virüsü (Patates yaprak kıvrılma virüsü) ve Patates Virüsü Y

(PVY) bunların arasında en zararlı patates virüsleri (Loebenstein vd., 2001) tek başına Patates Leafroll Virüsü toplam verimi neredeyse %60 ve pazarlanabilir verimi %88 oranına kadar azaltabilmektedir. Şeker kamışının en yaygın viral hastalıklarından biri olan Sugarcane Mosaic Potyvirus (Şeker kamışı mozaik virüsü), çok sayıda geleneksel olarak yüksek verimli şeker kamışı çeşidinin ekim dışı kalması nedeniyle %50 kayıplara neden olmaktadır. Patojenlerin klonal olarak çoğaltılan bitkilerde bulaşması çok hızlıdır. Bitki materyalleri, çeşitli doku kültürü aşamalarına tabi tutulduğunda bakteri ve mantar gibi patojenlerin çoğundan temizlenmektedir. Bununla birlikte, virüsün ortadan kaldırılması, özel meristem tip kültürü tekniğini gerektirmektedir (Bhojwani & Razdan, 1986).

- a) Virüslerin bitkilerdeki dağılımı eşit değildir, enfekte olmuş bitkilerin apikal meristemleri ya serbesttir ya da çok düşük konsantrasyondadır (Quack, 1977; Wang & Hu, 1980). Bitkideki virüs titresi, meristem ucundan uzaklaştıkça artmaktadır (Holmes, 1948). Meristem ucunda virüs olmaması için çeşitli nedenler öne sürülmüştür (Wang ve Hu, 1980): a) konukçu bitkideki virüs çoğalması, virüslerin metabolizmasına bağlıdır. Aktif olarak bölünen meristematik hücrelerde yüksek metabolik aktivite virüs replikasyonuna izin vermemekte olduğu,
- b) virüslerin bitkide hızla yayılması meristemde bulunmayan vasküler sistem yoluyla olmaktadır. Vasküler olmayan bölgeleri istila eden virüsler, hızla büyüyen uç bölgesine ayak uydurmak için oldukça yavaş olan plazmodesmatal bağlantılar yoluyla hücreden hücreye hareket etmekte olduğu,
- c) sürgün uçlarındaki yüksek endojen oksin seviyesi virüslere karşı inhibitör olabileceği ve
- d) meristem muhtemelen belirli 'virüs inaktive edici sistemler' tarafından korunuyor olabileceği öne sürülmüş ve meristem kültürü çeşitli araştırmalara konu olmuştur (Bhojwani & Dantu, 2013).

Holmes (1948), sürgün uçlarındaki virüs dağılımının gradyanı bilgisini ilk kez sürgün ucu



kesimleri yoluyla Dahlia'nın enfekte olmuş bitkilerinde virüssüz bitkiler yetiştirmek için uygulamıştır. Aynı prensipte, Morel & Martin (1952), Dahlia (Yıldız çiçeği) bitkilerinden Dahlia Mozaik Virüsünü (DMV) yok etmek için meristem ucu kültürü tekniğini geliştirmiştir. Hastalıklı bitkilerden alınan meristem uçlarını bir besin ortamında kültüre almışlar ve virüssüz sürgünler elde etmişlerdir. Bu sürgünler köklenmeyi başaramamış ve tamamen virüssüz Dahlia bitkilerini geri kazanmak için sağlıklı fide anaçlarına aşılınmaları gerekmiştir. O zamandan beri, meristem ucu kültürü en çok virüs eradikasyonu için etkili bir teknik olmuş ve geniş bir yelpazede virüssüz bitkiler üretmek için başarıyla uygulanmıştır (Bhojwani & Razdan, 1986).

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitki doku kültürü teknikleri, günümüzde en umut verici uygulama alanlarını temsil etmekte olup geleceğe dair bir bakış açısı sunmaktadır. Kozai (1988, 1991) tarafından da bildirildiği üzere *in vitro* aşılama, köklendirme ve iklimlendirmenin eş zamanlı uygulanması kullanılarak birçok doku kültürü tekniği günümüzde modernize edilmiştir (Read, 2004). Yetiştirilmesi zor türleri ve elit genotipleri, klasik ıslah programları ve biyoteknolojik araştırmaların kombinasyonu ile çoğaltmak daha mümkün hale gelmiştir. Biyoteknolojik araştırmaların geniş uygulama alanlarını temsil eden bitki doku kültürü teknikleri, süs ve orman ağaçlarının mikro çoğaltımı, farmasötik olarak ilginç ve aynı zamanda yararlı bileşiklerin üretimi ve ağaçlar da dahil olmak üzere temel mahsul bitkilerinin besin değerini iyileştirmek için bitki ıslahından değerli germplazmın dondurularak saklanmasına kadar uzanmaktadır. *In vitro* kültür, sürdürülebilir ve rekabetçi tarım ve ormancılıkta benzersiz bir role sahiptir ve iyileştirilmiş bitkilerin hızlı bir şekilde tanıtılması için bitki ıslahında başarıyla uygulanmıştır (Hussain vd., 2012).

Bitki doku kültürü günümüzde, bitki ıslahının ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Bitkilerin arzulan özelliklerini iyileştirmek, verimi arttırmak, abiyotik ve biyotik streslere daha toleranslı bitkiler geliştirmek için genetik mühendisliği ve moleküler ıslah teknikleri, haploid induksiyon veya somaklonal

varyasyon gibi tüm biyoteknolojik yaklaşımlar, etkili bir *in vitro* bitki rejenerasyon sistemine güçlü bir şekilde bağlıdır. Hızlı, kaliteli, hastaliksız ve üniform dikim stoğu üretimi ancak doku kültürü teknikleri ile mümkündür. Ayrıca bitkilerde daralan genetik varyabilitenin genişletilmesi ve bu geliştirilen varyabilitelerden arzulan özelliklere sahip daha verimli, abiyotik ve biyotik stres faktörlerine daha dayanıklı bitkiler yaratmak için çeşitli doku kültürü teknikleri kullanılmakta olup bu *in vitro* prosedürler, birçok türde başarılı bir şekilde uygulanmış ve kullanılmış, gelişmiş büyüme ve iyileştirilmiş verim ile çok daha fazlasını sergilemiştir (Bridgen vd., 2018).

Geleneksel bitki ıslahı, inatçı melezleri kurtarmak için embriyo kültürü gibi tekniklerle geliştirilmiştir. Protoplast füzyonu ve somaklonal varyasyon gibi teknolojiler ise genellikle, var olan genetik çeşitlilikten faydalanmak veya yeni bir genetik varyabilite oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu teknolojiler ile arzu edilen bitkiler elde edildiğinde, çok sayıda geliştirilen klonu ticari pazar için daha hızlı ve verimli bir şekilde üretmek için mikro çoğaltma da kullanılabilir. Ayrıca doku kültürü teknikleri ile virüssüz, hastalıktan arı bitki, hızlı klonal çoğaltım, nesli tükenmekte olan bitkilerin çoğaltılmasında, bitkilerden sekonder metabolit ve ilaç hammaddesi elde etme gibi gelecek çalışmalarda da başvurulacak önemli bir teknik haline gelmektedir (Smith, 2012; Dagla, 2012; Bridgen vd., 2018). Ayrıca bitkilerden sekonder metabolit üretimi ve ilaç hammaddesi elde etme gibi çalışmaların yanı sıra, çeşitli bitki doku kültürü yöntemleri ile yenilebilir aşı kaynağı olarak bitkilerin üretiminde de kullanılabileceği bildirilmiştir (Karakas & Tonk, 2022). Doku kültürü tekniklerinin, günümüzde arzu edilen özelliklere sahip abiyotik ve biyotik stres koşullarına daha dayanıklı aynı zamanda daha verimli çeşitler elde etmek için, klasik ıslah çalışmaları ile birlikte kullanılması gerekliliği olduğu aşikârdır.

## Etik Standartlara Uygunluk

### Çıkar Çatışması

Yazar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını deklare etmektedir.

## Etik Onay

Yazar bu çalışma için resmi etik kurul onayının gerekli olmadığını bildirmektedir.

## Veri Kullanılabilirliği Bildirimi

Bu çalışmada yeni bir veri oluşturulmadığı veya analiz edilmediği için veri kullanılabilirliği bu makale için geçerli değildir.

## KAYNAKLAR

- Allum, J. F., Bringloe, D. H., & Roberts, A. V. (2007). Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant Cell Reports*, 26, 1977-1984. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0411-y>
- Aydin, M., Arslan, E., Taspınar, M. S., Karadayı, G., & Agar, G. (2016). Analyses of somaclonal variation in endosperm-supported mature embryo culture of rye (*Secale cereale* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(6), 1082-1089. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1224980>
- Baday, S. J. (2018). Plant tissue culture. *International Journal of Agriculture and Environmental Research*, 4(4), 977-990.
- Bains, N. S., Singh, J., Ravi, & Gosal, S. S. (1995). Production of wheat haploids through embryo rescue from wheat × maize crosses. *Current Science*, 69(7), 621-623.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 147-173. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>
- Bajaj, Y. P. S. (Ed.). (1990a). *Biotechnology in Agriculture and Forestry 11: Somaclonal Variation in Crop Improvement I*. Springer.
- Bajaj, Y. P. S. (1990b). Somaclonal variation-origin, induction, cryopreservation, and implications in plant breeding. In Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Somaclonal Variation in Crop Improvement I* (pp. 3-48). Springer.
- Baydar, H. (2020). *Bitki Genetiği ve Islahı* (1. Baskı). Nobel Akademik Yayıncılık.
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Production of virus-free plants. In S. S. Bhojwani & P. K. Dantu (Eds.), *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, (pp. 227-243). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_16)
- Bhojwani, S. S., & Razdan, M. K. (1986). *Plant tissue culture: Theory and practice*. Elsevier.
- Bhojwani, S. S., Power, J. B., & Cocking, E. C. (1977). Isolation, culture and division of cotton callus protoplasts. *Plant Science Letters*, 8(1), 85-89. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(77\)90176-6](https://doi.org/10.1016/0304-4211(77)90176-6)
- Bidabadi, S. S., & Jain, S. M. (2020). Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. *Plants*, 9(6), 702. <https://doi.org/10.3390/plants9060702>
- Blakeslee, A. F., Belling, J., Farnham, M. E., & Bergner, A. D. (1922). A haploid mutant in the jimson weed, "*Datura stramonium*". *Science*, 55(1433), 646-647. <https://doi.org/10.1126/science.55.1433.646>
- Braun, A. C. (1959). A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 45(7), 932-938. <https://doi.org/10.1073/pnas.45.7.932>
- Bridgen, M. P., Houtven, W. V., & Eeckhaut, T. (2018). Plant tissue culture techniques for breeding. In J. Van Huylenbroeck (Ed.), *Ornamental Crops. Handbook of Plant Breeding*, vol 11 (pp. 127-144). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-90698-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-90698-0_6)
- Brown, D. C. W., & Thorpe, T. A. (1995). Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 409-415. <https://doi.org/10.1007/BF00364616>
- Carlson, P. S., Smith, H. H., & Dearing, R. D. (1972). Parasexual interspecific plant hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(8), 2292-2294. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.8.2292>
- Collins, G. B., & Grosser, J. W. (1984). Culture of embryos. In I. K. Vasil & F. Constabel (Eds.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants Vol. 1. Laboratory procedures and their applications* (pp. 241-257). Academic Press.

- Condic, M. L. (2014). Totipotency: What it is and what it is not. *Stem Cells and Development*, 23(8), 796-812. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0364>
- Dagla, H. R. (2012). Plant tissue culture: Historical developments and applied aspects. *Resonance*, 17(8), 759-767.
- Davey, M. R., Anthony, P., Patel, D., & Power, J. B. (2010). Plant protoplasts: Isolation, culture and plant regeneration. In M. R. Davey & P. Anthony (Eds.), *Plant cell culture essential methods* (pp. 153-173). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470686522.ch9>
- Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., & Lowe, K. C. (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 23(2), 131-171. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.008>
- Davey, M. R., Kumar, V., & Hammatt, N. (1994). *In vitro* culture of legumes. In I. K. Vasil & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 313-329). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_13)
- Debergh, P. (1994). *In vitro* culture of ornamentals. In I. K. Vasil & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 561-573). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8\\_22](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_22)
- Dulberger, R. (1973). Distyly in *Linum pubescens* and *L. mucronatum*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 66(2), 117-126. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1973.tb02164.x>
- Emaldi, U., Trujillo, I., & De Garcia, E. (2004). Comparison of characteristics of bananas (*Musa sp.*) from the somaclone CIEN BTA-03 and its parental clone Williams. *Fruits*, 59(4), 257-263. <https://doi.org/10.1051/fruits:2004024>
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology?. *Frontiers in Plant Science*, 10, 536. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J., & Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12(8), 368-375. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.007>
- Furuta, H., Shinoyama, H., Nomura, Y., Maeda, M., & Makara, K. (2004). Production of intergeneric somatic hybrids of chrysanthemum [*Dendranthema* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] and wormwood (*Artemisia sieversiana* JF Ehrh. ex. Willd) with rust (*Puccinia horiana* Henning) resistance by electrofusion of protoplasts. *Plant Science*, 166(3), 695-702. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.007>
- Genç, İ., & Yağbasanlar, T., (2018). *Bitki Islahı* (9. Baskı). Çukurova Üniversitesi Yayınları Genel Yayın No: 59, Kitap Yayın No: A-13.
- Gengenbach, B. G., & Umbeck, P. (1982). Characteristics of T-cytoplasm revertants from tissue culture. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 56, 140-142.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. J. D. (2008). Plant tissue culture procedure – Background. In E. F. George, M. A. Hall, G. J. D. Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (pp. 1-28). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1)
- Germana, M. A. (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 131-146. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9088-0>
- Germanà, M. A. (2009). Haploids and doubled haploids in fruit trees. In A. Touraev, B. P. Forster S. M. Jain (Eds.), *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_21)
- Gosal, S. S., & Bajaj, Y. P. S. (1983). Interspecific hybridization between *Vigna mungo* and *Vigna radiata* through embryo culture. *Euphytica*, 32(1), 129-137. <https://doi.org/10.1007/BF00036873>
- Gosal, S. S., Wani, S. H., & Kang, M. S. (2010). Biotechnology and crop improvement. *Journal of Crop Improvement*, 24(2), 153-217. <https://doi.org/10.1080/15427520903584555>
- Green, C. E. (1977). Prospects for crop improvement in the field of cell culture. *HortScience*, 12(2), 131-134. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.12.2.131>
- Gregory, F. G., & De Ropp, R. S. (1938). Vernalization of excised embryos. *Nature*, 142(3593), 481-482. <https://doi.org/10.1038/142481b0>

- Gregory, F. G., & Purvis, O. N. (1938). Studies in Vernalisation of Cereals: II. the vernalisation of excised mature embryos, and of developing ears. *Annals of Botany*, 2(5), 237-251.
- Grosser, J. W. (1994). *In vitro* culture of tropical fruits. In I. K. Vasil, & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 475-496). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8\\_19](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_19)
- Grosser, J. W., Calovic, M., & Louzada, E. S. (2010). Protoplast fusion technology – somatic hybridization and cybridization. In M. R. Davey, & P. Anthony (Eds.), *Plant cell culture: essential methods*. (pp. 175-198). Wiley-Blackwell.
- Guha, S., & Maheshwari, S. C. (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204 (4957), 497-497. <https://doi.org/10.1038/204497a0>
- Guo, L., Xu, W., Zhang, Y., Zhang, J., & Wei, Z. (2017). Inducing triploids and tetraploids with high temperatures in *Populus* sect. *Tacamahaca*. *Plant Cell Reports*, 36, 313-326. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2081-0>
- Haberlandt, G. J. F. (1902). Culturversuehe mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse*, 111, 69-91.
- Hagimori, M., Nagaoka, M., Kato, N., & Yoshikawa, H. (1992). Production and characterization of somatic hybrids between the Japanese radish and cauliflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 84(7-8), 819-824. <https://doi.org/10.1007/bf00227390>
- Harry, I. S., & Thorpe, T. A. (1994). *In vitro* culture of forest trees. In I. K. Vasil & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 539-560). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8\\_21](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_21)
- Hassawi, D. S., Qrunfleh, I., & Dradkah, N. (2005). Production of doubled haploids from some Jordanian wheat cultivars via anther culture technique. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 3(1), 161-164.
- Heinz, D. J. (1973). Sugar-cane improvement through induced mutations using vegetative propagules and cell culture techniques. *International Atomic Energy Agency, Vienna (Austria). Joint FAO/IAEA Div. of Atomic Energy in Food and Agriculture; Proceedings series: Panel on Mutation Breeding of Vegetatively Propagated and Perennial Crops* (pp. 53-59). Austria.
- Holmes, F. O. (1948). The filterable viruses of determinative bacteriology. In F. O. Holmes (Ed.), *The filterable viruses* (pp. 1127-1286). Williams & Wilkins Co.
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: Current status and opportunities. In A. Leva & L. M. R. Rinaldi (Eds.), *Recent Advances in Plant in Vitro Culture* (pp. 1-28). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/50568>
- Ishaku, G. A., Ayuba Abaka Kalum, M. A., & Islam, S. (2020). Applications of protoplast fusion in plant biotechnology. *Asian Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*, Article no.AJBGE.55804.
- Jones, M. G. K. (1994). *In vitro* culture of potato. In I. K. Vasil & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 363-378). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_15)
- Kameya, T., Miyazawa, N., & Toki, S. (1990). Production of somatic hybrids between *Solanum melongena* L. and *S. integrifolium* Poir. *Japanese Journal of Breeding*, 40(4), 429-434. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.40.429>
- Kane, M. (2011). Propagation by shoot culture. In R. N., Trigiano, & Gray, D. J. (Eds.), *Plant tissue culture, development and biotechnology* (pp 181-191). CRC Press.
- Kang, M. S., Subudhi, P. K., Baisakh, N., & Priyadarshan, P. M. (2007). Crop breeding methodologies: Classic and modern. In M. S. Kang & P. M. Priyadarshan (Eds.), *Breeding major food staples* (pp. 38-40). <https://doi.org/10.1002/9780470376447.ch1>



- Karakas, İ., & Tonk, F. A. (2022). Plants that can be used as plant-based edible vaccines; current situation and recent developments. *Virology & Immunology Journal*, 6(3), 000302. <https://doi.org/10.23880/vij-16000302>
- Karp, A. (1995). Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica*, 85, 295-302. <https://doi.org/10.1007/BF00023959>
- Karp, A. (1994). Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In I. K. Vasil & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 139-151). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_6)
- Kasha, K. J. (1974). *Haploids in higher plants: Advances and potential. Proceedings of the 1st International Symposium*. Canada.
- Kasha, K. J., & Maluszynski, M. (2003). Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. In M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster & I. Szarejko (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants: A manual* (pp. 1-4). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_1)
- Komar, V., Vigne, E., Demangeat, G., & Fuchs, M. (2007). Beneficial effect of selective virus elimination on the performance of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(2), 202-210. <https://doi.org/10.5344/ajev.2007.58.2.202>
- Kozai, T. (1988). Autotrophic (sugar free) tissue culture for promoting the growth of plantlets *in vitro* and for reducing biological contamination. *Proceedings of the International Symposium on Application of Biotechnology for Small Industries*, Thailand. pp. 39-51.
- Kozai, T. (1991). Micropropagation under photoautotrophic conditions. In P. C. Debergh, & R. H. Zimmerman (Eds.), *Micropropagation: Technology and Application* (pp. 447-469). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0\\_26](https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_26)
- Krikorian, A. D. (1994). *In vitro* culture of plantation crops. In I. K. Vasil & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 497-537). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8\\_20](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_20)
- Krishnamurthi, M., & Tlaskal, J. (1974). Fiji disease resistant *Saccharum officinarum* var. 'Pindar' sub clones from tissue cultures. *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology*, 15, 130-137.
- Kumari, P. T., & Aswath, C. (2018). Haploid and double haploids in ornamentals – A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(07), 1322-1336. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.158>
- Laibach, F. (1925). Das Taubwerden von Bastardsamen und die kunstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. *Zeitschrift für Botanik*, 17, 417-459.
- Laibach, F. (1929). Ectogenesis in plants: Methods and genetic possibilities of propagating embryos otherwise dying in the seed. *Journal of Heredity*, 20(5), 201-208. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a103178>
- Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation — A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60, 197-214. <https://doi.org/10.1007/BF02342540>
- Lee, M., & Phillips, R. L. (1988). The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39(1), 413-437. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.39.060188.002213>
- Loberant, B., & Altman, A. (2010). Micropropagation of plants. In M. C. Flickinger (Ed.), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology* (pp. 3499-3515). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib442>
- Loebenstein, G., Berger, P. H., Brunt, A. A., & Lawson, R. H. (Eds.). (2001). *Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0842-6>

- Maluszynski, M., Kasha, K. J., & Szarejko, I. (2003). Published doubled haploid protocols in plant species. In M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster, & I. Szarejko (Eds.), *Doubled haploid production in crop plants: A manual* (pp. 309-335). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4\\_46](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_46)
- Mattheij, W. M., Eijlander, R., De Koning, J. R. A., & Louwes, K. M. (1992). Interspecific hybridization between the cultivated potato *Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* L. and the wild species *S. circaefolium* subsp. *circaefolium* Bitter exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens: 1. Somatic hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 83(4), 459-466. <https://doi.org/10.1007/bf00226534>
- Meins, F. (1983). Heritable variation in plant cell culture. *Annual Review of Plant Physiology*, 34(1), 327-346. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.34.060183.001551>
- Morel, G., & Martin, C. (1952). *Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus* [Cure of dahlias attacked by a virus disease]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*, 235(21), 1324-1325.
- Muralidhar, R. V., & Panda, T. (2000). Fungal protoplast fusion – A revisit. *Bioprocess Engineering*, 22, 429-431. <https://doi.org/10.1007/s004490050755>
- Narayanaswami, S., & Norstog, K. (1964). Plant embryo culture. *The Botanical Review*, 30(4), 587-628.
- Nhut, D. T. (2022). General information: some aspects of plant tissue culture. In D. T. Nhut, H. T. Tung, & E. CT. Yeung (Eds.), *Plant tissue culture: New techniques and application in horticultural species of tropical region* (pp. 1-23). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-6498-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-16-6498-4_1)
- Oono, K. (1978). Test tube breeding of rice by tissue culture. *Tropical Agriculture Research Series: Proceedings of A Symposium on Tropical Agriculture Researches*, 11, 109-124.
- Palmer, C. E., & Keller, W. A. (1994). *In vitro* culture of oilseeds. In I. K. Vasil, & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 413-455). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_17)
- Phillips, R. L., Kaeppler, S. M., & Peschke, V. M. (1990). Do we understand somaclonal variation?. In H. J. J. Nijkamp, L. H. W. Van Der Plas & J. Van Aartrijk (Eds), *Progress in plant cellular and molecular biology: Proceedings of the VIIIth international congress on plant tissue and cell culture* (pp. 131-141). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-2103-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-94-009-2103-0_19)
- Quack, F. (1977). Meristem culture: A potential technique for in vitro virus-free plants production in vegetatively propagated crops. In J. Reinert & Y. P. S. Bajaj (Eds.), *Advances in plant tissue culture: Current developments and future trends* (pp. 598-615). Springer.
- Raghavan, V. (1980). Embryo culture. *International Review of Cytology*, 11, 209-240. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60331-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60331-9)
- Raghavan, V. (1994). *In vitro* methods for the control of fertilization and embryo development. In I. K. Vasil & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 173-194). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_8)
- Read, P. E. (2004). Micropropagation: past, present and future. *Acta Horticulturae*, 748\_1, 17-27. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.748.1>
- Reynolds, J. F. (1994). *In vitro* culture of vegetable crops. In I. K. Vasil & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 331-362). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_14)
- Sangwan-Norreel, B. S., Sangwan, R. S., & Paré, J. (1986). Haploïdie et embryogenèse provoquée *in vitro*. *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques*, 133(4), 7-39. <https://doi.org/10.1080/01811789.1986.10826796>
- Schieder, O., & Vasil, I. K. (1961). Protoplast fusion and somatic hybridization. *International Review of Cytology*, 11, 21-46. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60324-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60324-1)
- Shepard, J. F., Bidney, D., & Shahin, E. (1980). Potato protoplasts in crop improvement. *Science*, 208(4439), 17-24. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60324-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60324-1)

- Sivagamasundari, U. (2022). Concepts of plant tissue culture. In H. K. Singh (Ed.), *Current research and innovations in plant pathology Volume-16* (pp. 57-69). Akinik Publishers.
- Skirvin, R. M., & Janick, J. (1976). Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. *Journal of the American society for Horticultural Science*, 101(3), 281-290. <https://doi.org/10.21273/JASHS.101.3.281>
- Skirvin, R. M., McPheeters, K. D., & Norton, M. (1994). Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience*, 29(11), 1232-1237.
- Smith, R. H. (2012). *Plant tissue culture: Techniques and experiments* (Third ed.). Academic Press.
- Swapnil, Singh, D., Ekka, J. P., & Kumari, P (2020). Somatic hybridization: An effective tool for crop improvement. *Food and Scientific Reports*, 1(7), 21-23.
- Szala, L., Sosnowska, K., Popławska, W., Liersch, A., Olejnik, A., Kozłowska, K., Bocianowski, J., & Cegielska-Taras, T. (2016). Development of new restorer lines for CMS *ogura* system with the use of resynthesized oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Breeding Science*, 66(4), 516-521. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.15042>
- Tefera, A. A. (2019). Review on application of plant tissue culture in plant breeding. *Journal of Natural Sciences Research*, 9(3), 20-25. <https://doi.org/10.7176/JNSR/9-3-03>
- Trigiano, R. N., & Gray, D. J. (Eds.) (2004). *Plant development and biotechnology*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203506561>
- Tripathi, M. K., Tiwari, S., Tripathi, N., Tiwari, G., Bhatt, D., Vibhute, M., Gupta, N., Mishra, N., Parihar, P., Singh, P., Sharma, A., Ahuja, A., & Tiwari, S. (2021). plant tissue culture techniques for conservation of biodiversity of some plants appropriate for propagation in degraded and temperate areas. In M. Tripathi (Ed.), *Current Topics in Agricultural Sciences Vol. 4* (pp. 30-60). *B International*. <https://doi.org/10.9734/bpi/ctas/v4/2119C>
- Vasil, I. K. (2008). A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 27, 1423-1440. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0571-4>
- Vasil, I. K., & Vasil, V. (1994). *In vitro* culture of cereals and grasses. In I. K. Vasil & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 293-312). *Plant cell and tissue culture* (pp. 293-312) Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_12)
- Vasil, V., & Hildebrandt, A. C. (1965a). Growth and tissue formation from single, isolated tobacco cells in microculture. *Science*, 147(3664), 1454-1455. <https://doi.org/10.1126/science.147.3664.1454>
- Vasil, V., & Hildebrandt, A. C. (1965b). Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. *Science*, 150(3698), 889-892. <https://doi.org/10.1126/science.150.3698.889>
- Vasil, V., & Hildebrandt, A. C. (1967). Further studies on the growth and differentiation of single, isolated cells of tobacco *in vitro*. *Planta*, 75, 139-151. <https://doi.org/10.1007/BF00387129>
- Verma, M. M., Ravi, & Sandhu, J. S. (1995). Characterization of the interspecific cross *Cicer anatinum* L. × *C. judaicum* (Boiss). *Plant Breeding*, 114(6), 549-551. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1995.tb00856.x>
- Verma, N., Bansal, M. C., & Kumar, V. (2008). Protoplast fusion technology and its biotechnological applications. *Chemical Engineering Transactions*, 14, 113-120.
- Wang, J., Jiang, J., & Wang, Y. (2013b). Protoplast fusion for crop improvement and breeding in China. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112, 131-142. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0221-y>
- Wang, J., Li, D. L., & Kang, X. Y. (2012). Induction of unreduced megaspores with high temperature during megasporogenesis in *Populus*. *Annals of Forest Science*, 69, 59-67. <https://doi.org/10.1007/s13595-011-0152-5>
- Wang, J., Shi, L., Song, S.Y., Tian, J., & Kang, X.Y. (2013a) Tetraploid production through zygotic chromosome doubling in *Populus*. *Silva Fennica*, 47(2), 932. <https://doi.org/10.14214/sf.932>
- Wang, P. J., & Hu, C. Y. (1980). Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture. In A. Fiechter (Ed.), *Advances in Biomedical Engineering, Volume 18. Advances in Biochemical Engineering, vol 18* (pp. 61-99). Springer. [https://doi.org/10.1007/3-540-09936-0\\_3](https://doi.org/10.1007/3-540-09936-0_3)

- Wang, Q. M., & Wang, L. (2012). An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant Cell Reports*, 31(9), 1535-1547. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1281-5>
- Yatsuyanagi, S., & Takahashi, K. (1953). Studies on the vernalization of wheat: I. The effects of sugar and anaerobic condition in the vernalization of wheat. *Japanese Journal of Breeding*, 2(4), 214-216. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.2.214>
- Yeung E. C., Thorpe T. A. & Jensen C. J. (1981). *In vitro* fertilization and embryo culture. In T. A. Thorpe (Ed.), *Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture* (pp. 253-271). Academic Press.
- Zenkeler, M., & Nitzsche, W. (1990). *In vitro* culture of wheat ovules. In Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Wheat. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 13*. Springer, [https://doi.org/10.1007/978-3-662-10933-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-662-10933-5_14)
- Zhang, X. Z., Liu, G. J., Yan, L. Y., Zhao, Y. B., Chang, R. F., & Wu, L. P. (2003). Creating triploid germplasm via induced 2n pollen in *Capsicum annum* L. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78(1), 84-88. <https://doi.org/10.1080/14620316.2003.11511592>
- Zhong, J. J., Yu, J. T., & Yoshida, T. (1995). Recent advances in plant cell cultures in bioreactors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 461-467. <https://doi.org/10.1007/bf00364621>
- Zimmerman, R. H., & Swartz, H. J. (1994). *In vitro* culture of temperate fruits. In I. K. Vasil & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 457-474). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8\\_18](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_18)