

Çay ıslahının en önemli aşamalarından biri olan çayın mikro çoğaltımı konusunda yaptığım inceleme sonucunda aslında bir doku kültürü ile üretim tekniği olan "sentetik çay tohumu" üretimi yoluyla çayın mikro çoğaltımının çay üreticisi ülkelerde son yıllarda giderek yaygınlaşan bir teknik olduğunu gördüm.

Esasen bir doku kültürü teknolojisi olan sentetik tohum üretim tekniği ile moleküler ıslah yöntemleri uygulanarak istenilen tarımsal özelliklere sahip çay germplazmları tespit edildikten sonra ıslah edilmiş çay bitkilerinden elde edilen hibrit tohumların deneme parsellerine ekimi sonrası gelişen yeni elit çay bitkilerinden alınan eksplantların vejetatif yolla büyük alanlara ihtiyaç duyulmaksızın hızlı ve sağlıklı bir şekilde nasıl çoğaltılabileceği anlatılmaktadır. Ancak yine unutmamız gereken önemli konu buradada oluşacak olan kök sistemi saçak köktür...

4 °C'de Depolanmış Aljinatla Enkapsüle Edilmiş Koltuk Altı Tomurcuklarından Hızlı Sürgün Üretimi Yoluyla (Camellia sinensis (L.) O.Kuntze) Çay'ın Çoğaltılması

Tapan Kumar Mondal, Amita Bhattacharya , Anil Sood , Paramvir Singh Ahuja
Kuzey Bengal Tarım Üniversitesi, Çay Bilimi ve Teknolojisi, İleri Etütler Merkezi
Ürün Plantasyonu ve İşleme Bölümü. P.O. Pundibari 736 165 Hindistan.
Current Science, VOL. 83, NO. 8, 25 Ekim 2002

Çay veya *Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze bir çok insan için iş üreten önemli bir ticari üründür. Tıbbi, anti oksidatif ve anti mikrobiyal özelliklere sahip popüler bir içecektir. Çin, Assam ve Kamboçya varyeteleri gibi başlıca üç çay tipi Hindistan'ın güney, kuzey ve kuzeydoğu bölümleri gibi uzak bölgelerinin her yanına yayılmıştır. Mikroçoğaltım ve Sentetik Tohum teknikleri bu bölgeler arasında verimli bir germplazm değiş tokuşu sağladığı gibi çay yetiştiricisi ülkeler arasında da çay germplazm tesislerinin kurulmasını, depolanmasını ve dağıtımının başarılmasını sağlar. ***"Sentetik Tohum Teknolojisi"** ; üreme yapılarını gerekli besinlerle enkapsüle eden koruyucu bir kaplama sağlayarak tesis ve dağıtım engellerini kaldırmak, depolanmaları süresince güçlü ve yüksek adapte edilebilirliklerini sürdürmeleri ile ambalajlama, depolama ve taşımacılıkta kolaylık sağlayan ilave avantajlara sahiptir. *Camellia*, *Valeriana wallichii*, muz, ladin, dut, tatlı patates, elma ile süs bitkisi olarak kullanılan; okaliptüs, orkide, ocimum, vb. için çalışma rapor edilmektedir. Daha önceki araştırma raporlarımız hariç, çay hakkında rapor edilmiş veri bulunmamaktadır. Daha önce rapor edildiği üzere, çay embriyoları doğada inatçıdır ve zayıf bir geri dönüşüm frekansına sahiptir. Bu nedenle bu çalışmada, denemelerimizde koltuk altı tomurcukları gibi sürekli kullanılabilir üreme yapılarıyla çay 'da sentetik tohum üretimi için bir sistem geliştirmeye ve ayrıca tomurcuğun filizlenme etkinliği üzerine düşük sıcaklıklarda depolamanın etkisi anlamaya çalışılmıştır.

C.sinensis'in boğum bölümlerinin aseptik kültürlerine ; 250 mL'lik erlenmayer tüpler içerisindeki 0.98 mM IBA ile birlikte 8.88 mM BA ve %3'lük sukroz ilave edilen katılaştırılmış %8 agar MS ortamında yarım güçle başlanmıştı (Borosil, Mumbai). 30 gün sonra boğum bölümleri filizlenen tomurcuklar, 3.0 cm'lik bir yüksekliğe ulaşmaları için daha hızlı sürgün çoğaltılmasına imkan sağlayacak hormonsuz MS ortamına transfer edildiler. Sonuçta, yapraksız tek boğumlardan oluşan yaklaşık olarak 0.2 – 0.5 cm uzunluğundaki bölümler, üç alt kültürün her birinden 4 hafta sonra eksplant olarak alındı. Her birinden 20 eksplant ile her bir deneme 5 kez tekrar edildi ve her deneme içinde üçlü tekrarlamaları kullanıldı. Tüm kültürler, laboratuvar koşullarında yapıldı (52 mM m⁻² s⁻¹lik 16 saatlik aydınlatma fotoperiyodu ile 25±2 °C).

Boğum eksplantları tek tek sıvı esaslı MS ortamı içerisinde farklı konsantrasyonlardaki (%2, 3, 4, 5 ve 6 gibi) sodyum aljinat'a transfer edildi ayrıca MS ortamına 5mM TDZ ile birlikte 10mM NAA (MS1) ilave edilmiştir. MS1, önceki çalışmalarımıza dayalı olarak seçilmiştir. Boğum eksplantlarının her birine

sodyum aljinat çözeltisi bir dalma damlatıldıktan sonra manyetik bir karıştırıcı üzerinde 30 dakika süreyle kesintisiz olarak karıştırılan farklı konsantrasyonlarda ki (25, 50, 75 ve 100 mM) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi yavaşça damlatıldı ve Filizlenen tomurcuklar için aljinat tanelerinin tekstür, şekil ve boyutlarını optimize etmek için sodyum aljinat çözeltisi ile $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'un farklı konsantrasyon ve kombinasyonları teste edildi. Elde edilen mükemmel yuvarlaklıktaki tanecikler, 5mM TDZ ve 10 mM NAA ilave edilen steril MS1 ortamı içerisinde hidratlandı ve sonuçta koltuk altı tomurcuklarının filizlenmeleri için katılaştırılmış agar MS1 ortamı üzerine yatay olarak yerleştirildiler.

Benzer şekilde MS esaslı ortam içinde önceden hazırlanmış tanecikler, hormonsuz MS esaslı ortam üzerine yerleştirildi ve hidratlandı. Aljinat taneleri hazırlandıkları ortama bakılmak sızın daha hızlı sürgün üretimi için hormonsuz MS ortamına transfer edildi. Hem MS hem de MS1 esaslı ortamda enkapsüle edilen ve enkapsüle edilemeden türetilen boğum eksplantlarının sürgün üretimleri ve ayrıca;

- i) Tomurcuk filizlenmesi veya yüzde eksplant yanıtı
- ii) Tomurcuk filizlenmesi için geçen gün
- iii) Her bir boğum eksplantında oluşan sürgün sayısı bakımından karşılaştırılarak değerlendirildiler.

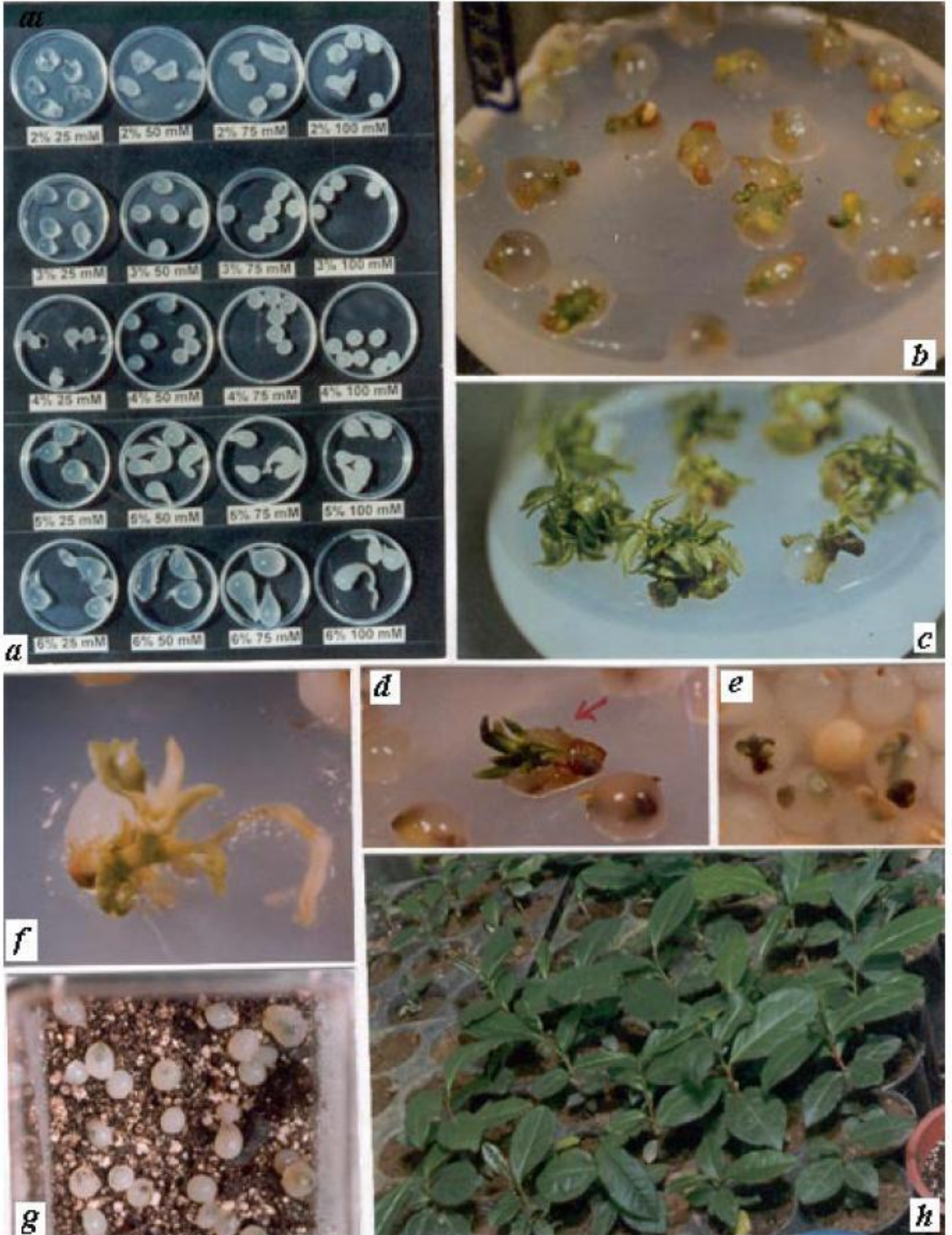
Depolanan enkapsüle edilmiş boğum eksplantlarının sürgün üretme etkinliği farklı zaman periyotları için test edildi. Enkapsüle edilmiş boğum eksplantları hem kültür laboratuvarı koşullarında hem de MS1 üzerinde 15, 30, 45 ve 60 gün süreyle düşük sıcaklıkta (4°C 'de) depolandı ardından bu aljinat taneleri hormonsuz MS ortamına transfer edildi. Etkisi;

- i) Boğum eksplantlarının filizlenmesi için geçen gün
- ii) Tomurcuk filizlenmesi bakımından sentetik tohumlar veya aljinat tanelerinin yüzde yanıtı
- iii) 60 günlük bir periyot süresince 15 günlük aralarla her bir tanede oluşan sürgünlerin miktarına bağlı olarak değerlendirildi.

Enkapsüle edilen tomurcuklar, laboratuvar koşulları altında sürgün tomurcuğu oluşturabilirliklerini test etmek için MS1 ortamı ile nemlendirilmiş steril toprak üzerine yerleştirildi. Biriktirilen enkapsüle edilmiş ve enkapsüle edilmemiş koltuk altı tomurcuklarından elde edilen 3 cm uzunluğundaki mikro sürgünlerin her birinin taze olarak kesilip çıkarılan uc noktası 30 dakika süreyle 500 mg/L IBA ile muamele edildi ve çoklu saksı tepsileri içinde; bahçe toprağı : nehir yatağı kumu : çiftlik gübresi (9:1:1) (pH:5.4) karışımı içeren saksılara doğrudan transfer edildi ve köklendirme ile iklime alıştırmaya için olgunlaşma odasında korundular. Veriler; çoklu saksı tepsileri koşulları içinde köklenme, büyüme yüzdesi ve köklenmiş bitkilerin hayatta kalma yüzdesi üzerinden kayıt edildi.

Sentetik tohumlar, %4 sodyum aljinat ile birlikte 75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi kullanılarak üretildiği zaman koltuk altı tomurcuklarının filizlenmesi için uygun pürüzsüzlükte tekstüre sahipti (şekil 1: a,e). Aljinat tanecikleri önceden hazırlanmasına ve MS1 üzerine yerleştirilmesine rağmen 30 gün sonra şişmiş ve ardından tomurcuk filizlenmesi göze çarpmıştır (şekil 1: b) , hormonsuz MS esaslı ortamda hazırlanmış ve yine hormonsuz MS esaslı ortamda yetiştirilmiş olanlardan sadece biri başarılı sonuç vermemiştir. Hormonsuz MS ortamı üzerinde oluşturulan MS1'li taneciklerden filizlenen tomurcuk sürgünü daha fazlaydı (şekil 1: c,f).

Boğum eksplantlarının enkapsüle edilmiş ve enkapsüle edilmemiş koltuk altı tomurcukları MS1 ortamı üzerinde yetiştirildiğinde 30 gün sonra filizlenmiş ve filizler, enkapsüle edilenlerle (%88.1) karşılaştırıldığında enkapsüle edilmeyen tomurcuklarda bir miktar daha fazlaydı (%90.2). Hormonsuz MS ortamına transferde, her bir boğum eksplantından meydana gelen sürgünlerin miktarı (5.2) başlangıç aşaması süresince aljinatla enkapsüle edilenlerle (8.0) karşılaştırıldığında düşüktü. Bununla birlikte, 60 gün sonra oluşan sürgün miktarı aljinatla enkapsüle edilen kopyalarıyla karşılaştırıldığında ise (12.0) enkapsüle edilmeyen eksplantlarda yüksekti (17.3) Enkapsüle edilmiş eksplantlar, MS esaslı hormonsuz ortam üzerinde başarılı sonuç vermedi.



Şekil 1: a, (%4) sodyum aljinat ve (75 mM) CaCl_2 kullanılan polimerizasyon. b, aljinat taneciklerinin şişmesi ve boğum eksplantlarının koltukaltı tomurcuklarının filizlenmesi. c ve d, aljinat taneciklerinden filizlenen sürgünlerin çoğalması. e, aljinat tanecikleriyle enkapsüle boğum eksplantları. f, aljinat tanecikleri içinde enkapsüle edilen mikro sürgünlerin köklenmesi. g, sıvı MS1 ortamı ile nemlendirilen steril **soilrite karışımı**** üzerindeki aljinat tanecikleri ve h, saksılar içerisinde büyüyen sağlıklı sürgünler.

Kültür laboratuvarı koşullarında 60 güne kadar depolandıklarında hem enkapsüle edilmiş hem de enkapsüle edilmemiş tomurcuk filizi verimi (%90.2 – 92.0) 45. güne kadar devam etmiş ancak 45.9 – 50. günde azalmıştır (Tablo 1). 4°C’de depolama, enkapsüle edilmiş veya enkapsüle edilmemiş boğum eksplantlarının her ikisi içinde tomurcuk filizlenme veriminde aksi bir etkiye neden olmadı, düşük sıcaklıkta depolama filizlenme için gerekli zamanda 15 gün kadar azalmaya yardımcı oldu (Tablo 1). Ayrıca, 4°C’de depolanan tomurcuklar 25±2 °C’de depolananlardan 15 gün daha erken filizlendi, ortalama olarak her iki koşulda elde edilen her bir alt kültürün ürettiği sürgün miktarında farklılık yoktu (Tablo 1).

MS1 içinde hazırlanan enkapsüle edilmiş tomurcukların çok az bir yüzdesi (şekil 1: g) MS1 ile nemlendirilmiş toprak üzerine yerleştirildiği zaman filizlendi ancak kültür laboratuvarı koşullarında korunmasına rağmen daha sonra nekrotik dönüşüm geçirdi.

Köklenme, IBA uygulamasından 60 gün sonra enkapsüle edilmiş ve enkapsüle edilmemiş koltuk altı tomurcuklarından türeyen 3.0 cm uzunluğundaki mikro sürgünlerde başladı. Önceki gözlemlerimize uygun olarak, kök oluşumu ve canlılığı enkapsüle edilen veya enkapsüle edilmeyen tomurcukların her ikisinden elde edilen mikro sürgünler içinde kök oluşturma verimliliğinde farklılıklar gözlemlendi. 4°C’de depolanan tomurcuklardan türeyen mikro sürgün kökleri üzerinde de ters bir etki gözlenmedi. Aljinatla enkapsüle edilen taneciklerden sağlıklı olarak köklendirilen mikro sürgünler saksılarda güçlü olarak gelişti (şekil 1: h).

Bu makalede, elit ve istenilen çay klonlarının (ıslah programı sonrası) klonal çoğaltımı için mikro üreme yapıları olarak kullanılabilir olan in vitro gelişim koşulları altındaki koltuk altı tomurcuklarında sentetik çay tohumu uygulamasının başarısı rapor edilmiştir. Ayrıca ; Dut, Santalum, Quercus ve Betula ‘da ki gibi 60 gün koşuluyla, periyodik olarak çayın varlığını sürdürebilir mikro üreme yapıları olan koltuk altı tomurcuklarından etkin depolamada sentetik tohumların avantajları da gösterilmiştir. (Tablo 1).

%4’lük sodyum aljinat solüsyonu ve 75 mM CaCl₂, boğum eksplantlı mükemmel yuvarlaklıkta aljinat tanecikleri verdi. Başlangıçta, 5mM TDZ ve 10mM NAA uygulamasının ardından MS esaslı hormonsuz ortama transferin sürgünün hızlı çoğalmasını teşvik ettiği görüldü. Böylece, en iyi yüzde tomurcuk filizlenmesi yanıtı TDZ ve NAA ilave edilen MS1 veya MS esaslı ortam üzerinde yetiştirildi zamandı. Bununla birlikte, boğum eksplantlarından hızlı sürgün çoğalması üzerine TDZ’nin etkilerini konu alan önceki raporumuzda olduğu gibi daha çok sayıda filizlenme için MS esaslı hormonsuz ortama transfer gereklidir. Bu, in vitro gelişim koşulları altında doku gelişimi üzerine kültür ortamındaki TDZ mevcudiyetinin devamının yararlı olmadığı gerçeğine dayalıdır. TDZ içsel cytokininin biyosentezini stimüle etme veya cytokininin metabolizma sının yönünü değiştirme potansiyeline sahip olduğu için kültür ortamında TDZ’nin mevcudiyetinin devamı bu çalışmada gerekli görülmedi.

Sentetik çay tohumlarını 4°C’de depolama hem enkapsüle edilmiş hem de enkapsüle edilmemiş koltuk altı tomurcuklarında, tomurcuk filizlenmesi için gereken süreyi 15 gün kadar azaltmıştır. Düşük sıcaklığın mikro üreme yapılarının kalıcılığını temin etmekten başka ; kivi, elma, kavak ve süs bitkileri gibi bir çok türün sürgün tomurcuklarının hızlı çoğalma etkinliği ile birlikte tomurcuk filizlenmesini de geliştirdiği bilinmektedir. Bu çalışma, koltuk altı tomurcuklarının efektif depolamasına açıklık kazandırarak nakillerini ve dünya genelinde değerli çay germplazmalarının değiş tokuşunu olanaklı kılmıştır.

Tablo 1

Kültür laboratuvarı koşullarında ve 4°C'de farklı zaman periyotları süresince depolanan aljinatla enkapsüle edilen ve enkapsüle edilmeyen boğum eksplantlarının tomurcuk filizlenmesi verimliliği ve sürgün çoğalma hızı

Time on MS1	Stored at (°C)	Explant	Germination (%)	Number of shoots per bead/explant			
				15 days	30 days	45 days	60 days
0 day	25 ± 2	UE	90.2	–	5.2 ± 0.7	11.5 ± 0.9	17.3 ± 0.8
		AE	88.1	–	8.04 ± 0.4	9.8 ± 0.7	12.0 ± 0.9
15 days	4	UE	90.1	4.2 ± 0.4	9.7 ± 0.5	12.9 ± 0.2	18.9 ± 0.7
	25 ± 2		89.1	–	5.3 ± 0.2	12.0 ± 0.3	17.6 ± 0.2
	4	AE	94.3	–	11.0 ± 0.4	12.7 ± 0.2	20.8 ± 0.8
30 days	25 ± 2		90.2	4.0 ± 0.2	9.9 ± 0.5	11.9 ± 1.0	18.5 ± 2.0
	4	UE	92.5	5.1 ± 0.4	10.8 ± 1.6	12.2 ± 0.8	19.3 ± 0.4
	25 ± 2		90.5		5.0 ± 0.2	10.8 ± 0.5	13.0 ± 1.8
	4	AE	95.0	3.5 ± 0.6	10.5 ± 0.6	13.2 ± 0.6	21.7 ± 0.4
45 days	25 ± 2			–	12.0 ± 0.5	13.0 ± 1.7	19.0 ± 0.5
	4	UE	89.7	3.7 ± 0.7	9.5 ± 0.7	13.9 ± 2.9	18.5 ± 0.6
	25 ± 2		91.0	–	9.5 ± 0.3	12.5 ± 1.5	19.1 ± 0.2
	4	AE	91.0	5.0 ± 0.4	11.7 ± 0.4	13.7 ± 0.9	19.3 ± 0.8
60 days	25 ± 2		92.0	–	11.3 ± 0.4	12.2 ± 0.7	17.3 ± 1.0
	4	UE	45.0	3.7 ± 1.4	10.5 ± 0.7	12.7 ± 0.2	14.3 ± 1.5
	25 ± 2		40.4	2.7 ± 0.1	9.0 ± 1.0	11.4 ± 0.9	12.0 ± 0.6
	4	AE	50.0	2.7 ± 0.4	7.7 ± 0.7	10.3 ± 0.5	12.5 ± 0.6
	25 ± 2		45.9	–	5.9 ± 0.5	10.9 ± 1.2	11.8 ± 1.0

Data (mean ± SE) pooled from three independent experiments, each with 100 samples per treatment. –, No response; UE, Un-encapsulated; AE, Alginate-encapsulated.

Kamil Engin İSLAMOĞLU,
Ziraat Mühendisi,
[E-Mail](#)

Kaynak: Tapan Kumar Mondal, Amita Bhattacharya , Anil Sood , Paramvir Singh Ahuja. 2002.

[Propagation of tea \(Camellia sinensis \(L.\) O. Kuntze\) by shoot proliferation of alginate-encapsulated axillary buds stored at 4°C.](#)

Institute of Himalayan Bioresource Technology

Palampur 176 061, India *Department of Plantation Crop and Processing Centre for Advanced Studies in Tea Science and Technology, North Bengal Agriculture University P.O. Pundibari 736 165, India

†For correspondence.e-mail: diht@csir.res.in

***Sentetik Tohum Teknolojisi ve Enkapsülasyon hakkında**

bilgi: http://www.sp.edu.sg/schools/cls/bioline_08.htm

****Soilrite karışımı hakkında bilgi:**

http://indianaquariumhobbyist.com/gallery2/v/User_Galleries/trevor/Substrate/Soilrite+-+Mix.JPG.html

Sentetik Çay Tohumu Üretim Tekniği Yoluyla Çayın Mikroçoğaltımını Konu Alan Diğer Çalışmalardan Bazı Örnekler :

Factors influencing synthetic seed germination in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)

Author : John, K. M. M. Kumar, R. R.

Journal title : JOURNAL OF PLANTATION CROPS

Bibliographic details :2006, VOL 34; NUMB 1, pages 40-42

Publisher :INDIAN SOCIETY FOR PLANTATION CROPS

Country of publication :India

ISBN :0304-5242

Encapsulation of embryonic axes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (tea) and subsequent in vitro germination

Author(s):SERAN Thayamini H.;HIRIMBUREGAMA K.;GUNASEKARE M.T.K.

Journal Title:Journal of horticultural science & biotechnology ISSN 1462-0316

Source: 2005, vol. 80, n^o1, pp. 154-158 [5 page(s) (article)]

Publisher:Headley, Ashford, ROYAUME-UNI (1998) (Revue)

Location:INIST-CNRS, Cote INIST : 2073, 35400012617982.0270

In vitro response of encapsulated somatic embryos of camellia

Journal :Plant Cell, Tissue and Organ Culture

Publisher :Springer Netherlands

ISSN :0167-6857 (Print) 1573-5044 (Online)

Issue :Volume 51, Number 2 / November, 1997

DOI :10.1023/A:1005958827202, Pages :119-125

Subject Collection :Biomedical and Life Sciences

SpringerLink Date :Tuesday, November 30, 2004

Recent Advances of Tea (*Camellia Sinensis*) Biotechnology

Authors: Mondal T.K.; Bhattacharya A.; Laxmikumaran M.; Singh Ahuja P.

Source: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Volume 76, Number 3, March 2004 , pp. 195-254(60)

Publisher: Springer

Direct rooting and hardening of tea microshoots in the field

Authors: Sharma M.; Sood A.; Nagar P.K.; Prakash O.; Ahuja P.S.

Source: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Volume 58, Number 2, 1999 , pp. 111-118(8)

Publisher: Springer

Micropropagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) using Thidiazuron

Authors: Mondal T.K.; Bhattacharya A.; Sood A.; Ahuja P.S.

Source: Plant Growth Regulation, Volume 26, Number 1, October 1998 , pp. 57-61(5)