

BİTKİLERİN BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE TİCARİ ÇOĞALTIMI; MEVCUT VE GELECEKTEKİ DURUM

Ahmet Onay^{1*}, Hakan Yıldırım², Vedat Pirinç², Engin Tilkat³, Yelda Özden Çiftçi⁴, Hülya Akdemir⁴,
Veysel Süzer⁴, Nazan Çalar¹, Mahir Binici¹, Ömer Faruk Akdemir¹, Fatih M. Kılınç¹

¹ Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 21280 Diyarbakır

² Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 21280 Diyarbakır

³ Batman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 72100 Batman

⁴ Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 41400 Gebze-Kocaeli

*ahmetonay45@gmail.com

Özet: Bu çalışma ile özellikle ticari biyoteknolojik çoğaltım yöntemlerinin bugün ve gelecekte hangi istikamette faaliyet gösterebileceklerini gündeme getirerek konu ile ilgili farkındalık oluşturmak istenmiştir. Dünya nüfusunun hızla artmasıyla üzerinde yaşayan insanların besin ve ilaç gereksinimi arttırdığından dolayı bitki bilimcilerinin işi her geçen gün biraz daha güçleşmektedir. İnsanlığın gereksinim duydukları besin, ilaç ve bitkisel ihtiyaçların giderilmesinde önemli bir rol oynamasından dolayı bitki biyoteknolojisi uygulamaları her geçen gün artış göstermektedir. Bitki biyoteknolojisi; çeşitli doku kültürü ve genetik mühendisliği tekniklerini kullanarak bitkilerin moleküler seviyede iyileştirilmesinde kullanılan önemli araçlara sahiptir. Bitki hücre, doku ve organ kültürleri bitki biyoteknolojisinin en önemli ticari çoğaltım araçlarıdır ve birçok çoğaltma tekniğini içermektedir. Bu bağlamda öncelikle gen mühendisliği ve transgenik bitki kavramları açıklanmış; daha sonra bitkilerin biyoteknolojik yöntemlerle ticari olarak hangi ülkelerde ve nasıl üretildiği ile çiftçilerin transgenik bitkileri niçin ürettikleri irdelenmiştir. Ayrıca, son zamanlarda gündemde olan biyoteknolojik ürünlerin çevreye herhangi bir etkisinin olup olmadığı ile gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde bitki biyoteknolojisinin etkilerinin neler olduğuna da değinilmiştir. Bitki biyoteknolojisinin bitki ıslahı ve ziraatına nasıl uyum sağladığı; in vitro çoğaltım için kullanılan teknikler, personel ihtiyacı gibi programların ana hatları şemalarla gösterilmiştir. Çalışmada son olarak ekonomik öneme sahip bitkilerin kitlesel üretimi için gerekli hususlar tartışılarak; Türkiye ve Dünya’da biyoteknolojik ürünlerin üretildiği önemli ticari firmalar sunulmuştur. Biyoteknolojik yöntemlerle çoğaltmanın ekonomik uygunluğu da tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bitki biyoteknolojisi, bitki doku kültürü, transgenik bitki.

Commercial Mass Propagation of Plants Via Biotechnological Tools: Current Situation And Future Investment

Abstract: The aim of this study is to implement awareness about the biotechnological tools for in vitro mass propagation of plants, and to bring to the agenda what kind of function they may have in the future. Rapid increase in the world population necessitate more nutrition and medicine for humankind and this makes life hard for plant scientist. There is an increasing trend for the application of biotechnological tools because it plays an important role for the production of cheap nutrition, medicine and other needs as time goes on. However, plant biotechnology including various tissue culture and genetic engineering techniques have important tools to improve the plants at the molecular level. Plant tissue culture is the most important technique for commercial production and it consist of several propagation techniques. In this review, the following will be discussed after describing what is/are genetic engineering, transgenic plants, biotechnology: What are global areas of commercial biotech crops? Why do farmers grow transgenic crops? How has the adoption of plant biotechnology impacted the environment? What is the plant biotech's impact in developed and in developing countries? In addition to these, techniques available for in vitro propagation, tissue culture requirements, as well as establishments and personel needs for such programs are outlined. Factors need consideration for establishing a large scale production of in vitro plants is also discussed. A survey of commercial companies that utilizes the tissue culture technology around the world, as well as Turkey is presented. The economic feasibility of investment in mass propagation of plants through tissue culture, in addition to cost-benefit analysis of such project is also discussed.

Key words: Plant biotechnology, plant tissue cell culture, transgenic plants.

1. GİRİŞ

Bitki biyoteknolojisi bitkilerin verim, kalitesini arttırmak, bitki verimliliğini sınırlayan hastalık, zararlı ve stres faktörlerini engellemek, azaltmak veya ortadan kaldırmak için moleküler, hücre ve doku kültürü temelli teknolojilerin kullanıldığı bir süreçtir [1]. Bugün kullanılan bitki biyoteknolojisi teknikleri, verimliliği etkileyen özelliklerin herhangi bir organizmadan bitkilere aktarılmasıyla diğer bir deyimle transformasyon teknikleriyle yapılmaktadır. Ancak bu aşamaya gelmesi yüzyıllarca devam eden bilimsel çalışmaların birleştirilmesiyle sağlanmıştır. Bitkilerde verimliliğin iyileştirilmesinde geleneksel metotlar yüzyıllardır kullanılmaktadır. Geleneksel ıslah metotları çoğaltım için en güçlü ve en çok gelişen bitkilerin tohumlarının seçilip ekilmesi ile yapılmıştır. Daha yüksek verim, pestisitlere dayanıklılık gibi özellikler ile bitkilerin seçilmesi, ıslahı ve genetik bilimi tam olarak anlaşılmadan bitkilerin genetik içeriği çiftçiler tarafından dramatik bir şekilde değiştirilmiştir. Bunun sonucu günümüzde yetiştiriciliği yapılan bitkiler yabancı atalarına çok az benzemektedir. Modern biyoteknolojinin yöntemleri; faydalı özellikler üretme ve onları bir organizmadan başka bir organizmaya aktarmak için genlerin seçilmesinde ıslahçılara yardımcı olmaktadır. Bu süreç binlerce genin transferiyle ilgili olan ve yapılan değişikliklerle ilgili ıslahçılara daha fazla bilgi sağladığı için melezlemeden daha seçici ve kusursuzdur. Bir bitki veya organizmadan diğerine genetik materyal aktarma yeteneği dünyanın artan besin ihtiyacını karşılamada yeni olanaklar sağlamaktadır [2]. Örneğin, Genetik Modifiye ürünler aktarılan özelliğe bağlı olarak böcek zararına karşı bitkileri korur ve genel toprak bakterisi, *Bacillus thuringiensis* (Bt)'de bulunan seçilmiş genleri içerirler. Bt genomu insan sağlığına zarar vermeyen fakat bazı bitki zararlılarının larvalarına toksik olan bir proteini üretmek için bitkideki genetik bilgiyi kullanmaktadır. Bitkiye zarar veren böcekler Bt'li bitkilere zarar veremedikleri için bitkilerin verimliliği artar ve pestisit kullanımına da gerek kalmaz. Calgene şirketi 1989'da bitki biyoteknolojisi kullanılarak, raf ömrü artırılmış ilk ürün olarak *Flavr Savr* domateslerini piyasaya sürmüştür [3]. O zamandan beri birçok ekonomik bitkide çok sayıda özellik iyileştirilmiştir. Bugün insektisit ve pestisitlere dayanıklı veya geniş spektrumlu herbisitlere dayanıklılık kazandırılmış birçok bitki ticari olarak satılmaktadır. Virüs hastalıklarına dayanıklılık için modifiye edilmiş olan önemli ticari bitkilere; patates, kabak, salatalık, karpuz ve papaya örnek verilebilir. Bu bitkiler bağışıklığa benzeyen, çapraz koruma olarak bilinen bir mekanizma aracılığıyla virüslere dayanıklılık göstermektedir. Soya fasulyesi, mısır, kanola ve diğer tane bitkileri güvenli, geniş spektrumlu herbisitlere

Ahmet Onay, Hakan Yıldırım, Vedat Pirinç, Engin Tilkat, Yelda Özden Çiftçi, Hülya

...
dayanıklılığa yönelik olarak modifiye edilmişlerdir. Herbisit toleransı çiftçilere daha seçici yabani ot kontrolü sağlamaktadır. Bu anlamda çiftçiler ekim işleminden önce herbisit uygulamak yerine, bitkinin gelişimi süresince ihtiyaç duyulduğu zamanlarda herbisit uygulayabilmektedir. Bitki biyoteknolojisindeki diğer gelişmeleri ise iyileştirilmiş ürün, artırılmış besin içeriği, tıbbi özellikler ve ilaçlar, daha sağlıklı pişirme yağları, uzatılmış raf ömrü, yenilenebilir kaynaklar ve endüstriyel besin maddeleri ile diğer istenilen besinleri de içeren birçok gelişme olarak sıralanabilir.

Bugün bitki biyoteknolojisinin ticari olarak kullanımını iki ana başlık altında toplayabiliriz [4]; A. Bitkilerin özelliklerinin iyileştirilerek çoğaltılması veya klonlanması; B. Farmasötik sanayi için ham madde üretimi.

Bitkilerin özelliklerinin iyileştirilerek çoğaltılmasında, çoğu 1960 ve 1970'li yıllarda kurulmuş bitki doku kültürü laboratuvarlarının da uyguladıkları doku kültürü teknikleridir. Pierik (1997) tarafından doku kültürü tekniklerinin bilimsel uygulamalarını şöyle sıralamaktadır [5];

1. Bitkilerin ıslahı ve moleküler biyolojisi,
2. Botanik araştırmaları,
3. Sekonder metabolit üretimi,
4. Fitopatolojik çalışmalar,
5. Vegetatif çoğaltma.

Doku kültürü teknikleri öncelikli olarak araştırma amaçlı yapılmakla birlikte; sonraki adımlarda başarılı çoğaltma metotları geliştirildikten sonra ticari üretimde kullanılmaktadır. Bu teknolojilerin kullanımı gelişmekte olan ülkelerde besin yetersizliği ve açlığa karşı savaşta önemli bir rol oynayabilir. Bugün Dünya üzerinde yaklaşık 800 milyon insan yeterli besin alamamaktadır. 2030 yılına kadar dünya nüfusu 8 milyarın üzerinde olacağı tahmin edildiği için besin temini daha da güçleşecektir. Dünya nüfusu artarken buna paralel olarak besin üretimi başa baş gitmemektedir. Çünkü dünya üzerindeki karaların sadece %10'u tarıma elverişli ve hatta bazı bölgelerde yoğun toprak erozyonu önemli bir problemdir. Bu zorlukları yenmek için çiftçiler birim alanda daha fazla besin hammaddesi üretmek zorundadırlar. Bitki biyoteknolojisi; temel besin kaynakları üretiminin artırılması, üretimin iyileştirilmesi, tarım üzerine çevrenin etkisinin azaltılması ve küçük ölçekteki çiftçilerin daha fazla besin hammaddesi üretmesine olanak sağlamaktadır. Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde ise, artan gıda ve ilaç taleplerini karşılamak için yatırımlar yapılmış ve her geçen gün yeni yatırımlar yapılmaktadır. Bu derlemenin amacı; bitki biyoteknolojisinin en önemli kullanım araçlarından birisi olan in vitro bitki doku kültürü teknikleri hakkında başta ülkemizdeki

Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum

farkındalığı arttırmak ve bu tekniklerin ticari olarak kullanılmasına yönelik olarak teknik altyapının nasıl oluşturulabileceği vurgulamaktır.

2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ NEDİR?

1902'de Haberlandt birkaç yıl sonra bitki doku kültürünün dayandığı esası oluşturacak olan totipotensi kavramını ileri sürmüş olup [6]; bu kavrama göre, her bir bitki hücresi bağımsız olarak, uygun besin maddesi, ışık ve sıcaklık gibi çevre koşulları sağlandığında ana bireye benzer şekilde tam bir bitki geliştirme yeteneğine sahiptir. **Doku kültürü**, bitkiden izole edilen doku (eksplant) parçasını yapay besi ortamında süresiz yaşatma tekniğidir. Hücre ve dokular bölünerek kök, yaprak, sürgün, embriyo veya tam bitki geliştirirler. Bazen kültürdeki hücre ve dokulardan kallus olarak adlandırılan farklılaşmamış hücre topluluğu gelişebilir. Bu bilgi ekonomik önemi olan çoğu bitkilerin klonal olarak çoğaltılmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bugün, bitki doku kültürü; bitkilerin iyileştirilmesi, ıslahı ve vejetatif olarak çoğaltılan bitkilerden virüsten arı bitki üretimini de içeren dört farklı alanda ticari olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bitki doku kültürü gelişmiş ülkelerde bitkilerin yoğun üretimine ilave olarak laboratuvarında sentezlenemeyen ikincil metabolitlerin ve doğal kaynaklardan tıbbi bileşenlerin üretiminde de kullanılmaktadır [7].

3. BİTKİLERİN ÇOĞALTILMASINDA KULLANILAN İN VİTRO TEKNİKLER

Bitkilerin çoğaltılmasında kullanılan bütün hücre ve doku kültürü tekniklerinde görülen farklılaşma tipleri, kök ve sürgün üretimidir. Bu iki olaya birleşik olarak organogenez adı verilir. Bazen bu iki süreç kendiliğinden düzenlenmiş olarak (zigotik bitki embriyolarındaki gibi) meydana gelir ve bu olay somatik veya adventif embriyogenez olarak adlandırılır [8,9]. Somatik embriyolar bazı durumlarda zigotik embriyolara benzer şekilde bir gelişme sırası izlemektedir. Kök, sürgün ve somatik embriyoların oluşumu çok sayıda biyokimyasal olayı kapsamaktadır. Farklılaşmanın düzenlenmesi iç kontrol mekanizması ile yapılır. Kültürlerde morfolojik değişiklikler görülmesine karşın, morfolojik olarak aynı ürün oluşmasına neden olan başka biyokimyasal farklılaşmalar da meydana gelebilir.

3.1. Organogenez ve Embriyogenez'in Kökeni

Kültürdeki hücreler genellikle gruplar halinde bulunurlar. Grup içindeki hücreler şekil ve büyüklük bakımından oldukça değişiktirler. Organ ve embriyo oluşumuna neden olan

...
olayların sırasını belirlemek oldukça zordur. Bitkilerin embriyogenez aracılığıyla karışık hücre süspansiyonlarından elde edilmesi, somatik hücrenin çok hücreli kökene sahip olduğunu göstermez. Çünkü çoğu bitki türlerinde tek hücreler izole edilerek, tam bitkiler elde edilmiştir [10]. İn vitro morfogenez neden olan doku kültürü (hücre kültürüne karşıt olarak) ya meristematik hücrelerin çoğalması ya da dokulardaki meristematik hücrelerle oluşur. Somatik embriyolar in vitro kültüre alınan diploid hücrelerin üç kaynağından oluşabilirler; 1. Yaşlı bitkilerin vejetatif hücrelerinden, 2. Zigot hariç diğer üreme dokularından ve 3. Genç bitkilerin ve embriyoların hipokotil ve kotiledonlarından oluşabilirler.

3.2. Somatik Embriyogenez

Somatik embriyogenezde hücre bölünme ve gelişmesinin sırası zigotik embriyogenezden farklıdır. Bunun nedeni; in vitro kültürler araştırıcının kontrolü altında gelişirken, bütün bitki sistemini kontrol etmek zordur. Bu yüzden somatik embriyolar zigotik embriyolardan şekil ve büyüklük bakımından farklılıklar gösterir. Havuç bitkisi hücre farklılaşması çalışmaları için model bir sistem olarak kullanılmaktadır ve bilinen en iyi kontrol edilebilen somatik embriyogenez sürecidir. Somatik embriyogenez, sadece in vitro kültürde meydana gelmemekle birlikte; *Citrus*'un nuseller dokusunda olduğu gibi, doğada kendiliğinden de oluşabilmektedir ki (nuseller embriyonu) bu somatik embriyo oluşumu üzerine genotipin etkisini göstermektedir [11]. Doğal olarak **poliembriyogenik** olan türler oldukça embriyojenik doku kültürleri oluştururken; embriyogenik olmayan türler daha az somatik embriyo oluştururlar. Kültürde embriyogenezin başlatılması için gerekli bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) çeşit ve konsantrasyonu bitki türleri arasında değişiklik gösterir. Fakat çoğu kültürler embriyo oluşumu için gerekli olan hücre bölünmesinin hızlı bir oranını elde etmek için bu başlama basamağından önce yüksek oksine (genellikle 2,4-D) ihtiyaç duyarlar.

İki tip somatik embriyogenez vardır [10]

1. Doğrudan somatik embriyogenez: Zigotik embriyo, kotiledon, yaprak ve gövde gibi bitki dokularından direkt olarak eşeysiz olarak embriyoların üretimidir. Tek bir hücre (veya hücre grubu), meristematik büyümeyi başlatır ancak bu hücre soyunun embriyoyu oluşturması çok nadir görülür. Bu durumun *Citrus* nuseller dokusunda, bazı anter kültürlerinde ve bazen protoplastlarda meydana geldiği tespit edilmiştir.

2. Dolaylı somatik embriyogenez: Farklılaşmamış kallus ve süspansiyon kültürlerinden embriyoların farklılaşması olarak tanımlanır. Somatik embriyo önceden oluşmuş meristematik gruptaki bir hücreden gelişir. Genel olarak bir gruptaki bütün hücreler embriyogenez potansiyeline sahipse de, böyle bir grupta genellikle yüzeydeki bazı hücreler embriyo oluşturur.

3.3. Organogenez

Organogenez çok yaygındır ve embriyogeneze göre daha kontrol edilebilir bir süreçtir. Organogenezin kontrolü uygun BBD'lerin kültür besisi ortamına uygulanması ile yapılır [9]. Bu BBD'lerin doğası türler arasında farklılık gösterse de, oksin-sitokinin oranı değişik sistemlerde belirli bir etkiye sahiptir. Kültüre alınan hücrelerin organogenezi, önceden var olan veya teşvik edilmiş meristematik primordiyumların varlığına bağlıdır. Bu primordiyumlar hızlıca bölünen meristematik hücre gruplarına sahiptirler ve biyokimyasal organizasyon derecesi farklılaşmaya yardımcı olur. Meristematik hücre grupları, uygun şartlar altında genellikle yüksek oksin seviyelerinde çok sayıda vakuol içeren kültüre alınmış uyku halindeki hücrelerden oluşur. Kültüre alınan dokular ve önceden var olan aksillar meristemler durumunda, apikal baskınlığın etkisi uzaklaştırılarak, bölünme teşvik edilebilir. Bu durum, sitokininlerin ilavesi ile başlar. Adventif meristemler ya doğrudan olarak kültüre alınan dokuların hücrelerinden ya da kallus oluştuktan sonra oluşur. Takip edilen bu yol rejenerasyonu yapılan bitkilerin genetik yapısında da etkili olur.

3.4. Doku Kültürü Teknikleri ile Bitkilerin Çoğaltılmasının Aşamaları

Doku kültüründe çoğaltım için izlenebilecek her biri çok özel beslenme ve inkübasyon koşulları gerektiren temel dört aşama tanımlanmıştır [12]. Bu aşamalar sırasıyla şu şekilde gerçekleşmektedir;

3.4.1. Kültürlerin başlatılması

Bu aşamada eksplantları (sürgün ucu, lateral tomurcuk, yaprak vb.) yüzeyinde bulunan bulaşıklardan arındırmak için yüzey sterilizasyonuna tabi tutulur. Bu aşamanın ana hedefi, büyüme miktarına bakılmaksızın takip eden aşamalarda kullanılacak aksenik (steril) veya enfeksiyonsuz rejenerantlar elde etmektir. Bu aşamada kültürler çoğaltma metoduna uygun olarak sürekli ya da periyodik ışık altında inkübe edilirler.

3.4.2. Sürgünlerin Çoğaltılması

Üretilen bitkilerin sayısını belirlediği için, herhangi bir çoğaltma programındaki en önemli aşamadır. Bu aşamada planlanan ya da istenilen bitki sayısı elde etmek için tekrarlanan alt kültür ve yeniden kültürle sürgünler çoğaltılır. Besi ortamının fiziksel durumu, kimyasal içeriği ve inkübasyon koşulları sürgünlerin çoğaltılmasında oldukça önemlidir.

3.4.3. Köklenme

Önceki aşamada üretilen sürgünler, bitki türüne göre değişen uzunluklarda kesilerek, yüksek oksin içeren bir ortamda bireysel olarak köklendirilir. Bu aşamada, iyi bir kök sistemi oluşur ve tam bitkiler elde edilir.

3.4.4. Adaptasyon (Alıştırma)

Epidermislerinde kutikula tabakası tam olarak gelişmediği ve fonksiyonel stomalara sahip olmadıkları [13] için in vitro rejenerasyonla gelişen bitkiler heterotroftur [14]. İn vitro üretilen bitkiler direkt olarak dış ortama aktarıldıklarında, fazla miktarda su kaybettikleri için birçoğu hemen ölür. Bu nedenle rejenerasyon sonucu oluşan bitkiler kademeli olarak doğal gelişme ortamına alıştırılması gerekir. Doğal büyüme ortamına alıştırma safhasında bitkicikler modern tesislere sahip olmayan işletmede polietilen torbalarla kapatılır ve geçen zamanla birlikte torbada delikler açarak, dış ortama tedricen uyumu sağlanır veya ışık, sıcaklık ve nemin kontrol edilebildiği özel büyüme odaları veya kabinlerinde dış ortama alıştırılır. Alıştırma yapılmayan bitkiler dış ortama aktarıldığında hemen ölür. Bu yüzden in vitro çoğaltılan bitkiler toprağa transfer edilmelerinden önce kutikula gelişimi ve stoma fonksiyonlarının başlatılması ve fotosentezi uyarmak için adaptasyona veya alıştırmaya tabi tutulmalıdır. Bu nedenle bu safha bütün çoğaltım sürecindeki en önemli aşamadır. Bu yüzden bu aşama toprak, ışık, sıcaklık ve sulama ile ilgili koşulların düzenlenmesi yoluyla yapılmalıdır. Bu aşamadan önceki bütün aşamalarda her bitki türü kendi çok özel ihtiyaçları göz önüne alınmalıdır.

Doku kültürü ile çoğaltılacak her bitki türü için aşağıda belirtilen parametrelerin değerlendirilmesi gerekir: (1) Eksplant kaynağı, (2) Besi ortamı içeriği ve fiziksel koşullar, (3) Işık yoğunluğu, sıcaklık, ışık-karanlık periyodu ve nemlilik ile ilgili inkübasyon koşullarının belirlenmesi ve (4) Adaptasyon koşulları ve toprağa aktarma.

4. DOKU KÜLTÜRÜ İLE TİCARİ BİTKİ ÜRETİMİ İÇİN GEREKLİ YATIRIM

Son 20 yıl içinde tüm dünyada değişik ülkelerde çok sayıda şirketler kurularak önemli miktarda yatırımlar yapılmıştır. Ticari bitki doku kültürü laboratuvarları batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da genellikle 1970 ve 1980'li yıllarda kurulmuştur. Bitki doku kültürü teknikleri kullanarak ticari üretim yapan bazı uluslararası şirketler Tablo 1'de sunulmuştur.

5. TÜRKİYE'DE BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ İLE BİTKİ ÇOĞALTIMI

Ülkemizde çoğu üniversitelerde iyi eğitilmiş üst düzey personel ve alt yapısı mevcut bitki biyoteknoloji laboratuvarları mevcuttur. Bu laboratuvarların çoğu ticari çoğaltım için değil, tamamen lisansüstü öğrenci çalışmaları ile araştırmaya kullanılmaktadır. Klonal anaç ihtiyacımızın büyük bir kısmını ithalat yoluyla temin ettiğimiz için son 10-15 yıl içerisinde ciddi oranda özel doku kültürü laboratuvarında üretim faaliyetleri gösterilmektedir. Ayrıca, 2012 yılı Ocak ayı itibariyle meyve klon anaçları ithalatının yasaklanmasıyla birlikte; özel sektör doku kültürü laboratuvarlarına yönelik olarak çok sayıda yatırım yapılmaya başlamıştır. Tablo 2'de ülkemizdeki ticari doku kültürü laboratuvarlarının bir listesi verilmiştir.

Tablo 1. Bitki doku kültürü tekniklerini ticari çoğaltım için kullanan önemli uluslararası ticari firmalar.

No	Şirket	Ülke	Kuruluş Tarihi	Üretilen bitki grubu	Üretim Milyon	Birim fiyat (USD)	Referans
1	Rancho tissue technology	ABD	1987	Yeşillik bitkiler, çok yıllıklar, tropikal, süs bitkileri	4	0.5-0.8	www.ranchotissue.com
2	Agriforest Biotech. Ltd	Kanada	1988	Hostas, gölge ağaçları, güller, leylak	4	1.5	www.agriforestbiotech.com
3	Total of 36 Commercial TC units	Hindistan	1996	Medikal bitkiler, muz, Şeker kamışı, orkideler	40	1.2	www.indvitrolab.com
4	Tissue-Grown Corp.	USA	1986	Patates , sardunya, karanfil	7	-	www.tissuegrown.com
5	Davao Musatech Corp.	Filipinler	1992	Şeker kamışı, muz, manyok	12	0.9	www.davaomusatech.com
6	Phytoculture	ABD	1986	Patates, orkide, süs	10	1.5	www.phytocul

							...
	Ltd.			bitkileri			ture.com
7	Lapanday Bio Trends	Filipinler	1994	Hindistan cevizi, bambu orkide	14	1.6	www.lapandybio.com
8	Watsonville Lab. Galif.	ABD	1984	Patates, çilek	30	1-2	www.watsenlab.com
9	Vitrobio Valenda SL	İspanya	2000	Muz, hint yer elması, patates	10	1.4	www.vitrobiovalen.com
10	Marionnet GFA	Fransa	1990	Hurma, çilek, kuşkonmaz, ahududu	5	-	www.marionnet.com
11	MTPM Micropropagation	Hindistan	1997	Orman ağaçları	2	-	www.dbtmicropropagation.in
12	A.G. Biotech Laboratories Ltd.	Hindistan	1992	Muz, Üzüm, İncir, Çilek, Şeker kamışı, Zencefil, Vanilya, zerdeçal, zeytin, orkideler, tik, bambu	6	-	www.agbiotech.com
13	KF Bioplant	Hindistan	1992	Karanfil, lilyum çilek	10	-	www.kfbioplants.com
14	Agri Vitro Tech Laboratories	Hindistan	2002	Muz ve Hurma	9	-	www.agrivitro.com
15	Microsun Biotech	Hindistan	2010	Muz	2	-	www.microsunbt.com
16	Benzur Nurseries Ltd. Sunshine	İsrail	1982	Süs bitkileri, çiçekler, muz	8	-	www.benzurnursery.com
17	Horticulture LLC Jin Bei Agriculture	Çin	1998	Ekzotik bitkiler, süs bitkileri	3.5	-	www.sunshinehorty.com
18	Science and Technology Development Co., Ltd	Çin	1985	Süs bitkileri	5	-	www.jbsbio.com
19	Plant Biotech	Avust.	2006	Ekzotik bitkiler	1	0.99	www.plantbiotech.com
20	Hayleys Agro Biotech (Pvt) Ltd	Sri Lanka	1878	Çiçekli bitkiler, süs bitkileri, çilek	10	-	www.hayleysagrobiotech.com

Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum

21	Sheel Biotech Limited	Hindistan	1994	Muz, Bambu, Süs Bitkileri, Sera Tasarımı	6		www.sheelbiotech.com
22	Plant Science	ABD	1988	Çilek, Enginar	350		www.plantsciences.com
23	Paramount Farm	ABD	1997	Antepfıstığı ve Badem	13	1	www.paramountfarms.com

Bu laboratuvarların çoğunda örneğin muz, armut, turuncgiller, klonal elma anaçları, patates, çilek gibi bazı meyve ve sebzelerin çoğaltımı üzerine yoğunlaşmıştır. Diğer bazı laboratuvarlar ise; tıbbi bitkiler, süs ve yeşil bitkilerin çoğaltımını yapmaktadırlar. Özel teşebbüslerden dikkat çeken bazı firmalar; Toros-Agripark-Adana, Vitroplant-Adana, Algen Tarım İstanbul, Yediveren Agrobiotech Park-Ankara, Bdk fidancılık-İzmir, İzel Süs Bitkileri Yalova'da faaliyet göstermektedirler. Beta Ziraat ve Ticaret A.Ş. tarafından 2005 yılında Bursa/Yenişehir'de ilk özel yerli Biyoteknoloji laboratuvarı kurulmuş ve özellikle sebze tohumluğu geliştirme amacıyla faaliyet göstermektedir.

Doku kültürü ile çoğaltım tesislerinin kurulması ile yeni iş imkanları ortaya çıkacak, üretimden nakliye kadar birçok alanda yeni istihdam olanağı sağlanacaktır. Bu bağlamda, şimdilik Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde faaliyet gösteren bir şirket bulunmamaktadır [15]. Özellikle fidancılık firmalarının kendi klonal anaç materyali ihtiyaçlarını karşılayabilmeleri, ilerleyen zamanlarda diğer üretim bölgelerinden de gelecek taleplere cevap verilmesi hususunda Batman veya komşu herhangi bir ilde "Ticari Doku Kültürü Laboratuvarı'nın nasıl oluşturulabileceği ve hangi istikamette faaliyet gösterebileceğiyle ilgili olarak çıkarılan fizibilite çalışması hakkında bilgi verilmeye çalışılacaktır.

6. DOKU KÜLTÜRÜ İLE BİTKİ ÇOĞALTILMASI İÇİN GEREKSİNİM VE ALTYAPI

Doku kültürü teknikleri ile bitkilerin çok miktarda ticari olarak çoğaltılması için aşağıdaki gereksinimlere ihtiyaç duyulmaktadır;

1. Doku kültürü çalışmaları için uygun altyapılar, in vivo koşullara alıştırma için seralar ve üretilen bitkiler piyasaya sürünceye kadar tutmak için bir fidanlık gereklidir.
2. Bitki doku kültürünün farklı uygulama alanlarında farklı seviyelerde bilimsel ve teknik bilgiyle projeler de çalışmak için farklı bilimsel ve teknik seviyeler iyi eğitilmiş personeller ihtiyacı vardır.

3. Bitkilerin çoğaltılması, üretim kalitesi, programlama ve ürünlerin pazarlanması için planlama gerekir.

4. Sürdürülebilir büyüme ve gelişme için projeleri desteklemede AR-GE faaliyetleri için yeterli imkana sahip olmak gerekir.

Bu bilgiler temel alınarak, laboratuvarın gereksinimleri planlanabilir. Genel olarak doku kültürü laboratuvarları aşağıda belirtilen temel tesislere sahip olmalıdır:

1. Hazırlık odası. Bu kısım besi ortamının hazırlanması için kullanılır. Havalandırma ve personel hareketlerini kontrol etmek için laboratuvarın tercih edilen genişliği yaklaşık 30 m²'dir. Bu tip laboratuvarların sayısı üretimin miktarı ile belirlenir.

2. Yıkama odası. Çalışmalar sırasında kullanılan tüm cam malzemenin ve kültür kaplarının yıkanması, distile su üretilmesi, besi ortamı ve kültür kaplarının sterilasyonu için 6x6m'lik bir oda yeterlidir.

3. Doku kültürü (Steril) odası. Bu oda steril şartlar altında doku izole edilerek kültüre alındığı yerdir. Herhangi bir bulaştan kaçınmak için hava akımı kontrol altında olmalıdır. Bu oda çalışmanın büyüklüğüne göre bir veya daha fazla laminar akımlı kabin bulundurulabilir.

Tablo 2. Bitki doku kültürü tekniklerini ticari çoğaltım için kullanan önemli ulusal ticari firmalar.

No	Şirket	Kuruluş Tarihi	Üretilen bitki grubu	Üretim Milyon	Birim fiyat (USD)	Referans
1	Toros-Agripark-Adana,	2005	Muz fidesi, kiraz bodur anacı, badem fidanı, şeftali fidanı, patates sert ve yumuşak	0.21	-	www.tekfen.com
2	Vitroplant-Adana,	2007	çekirdekli meyve fidanı	0.5	-	www.vitroplantturkey.com
3	Algen Tarım İstanbul,	2008	Meyve anaçları		-	www.algentarim.com
4	Yediveren Agrobiotech Park-Ankara,	2007	Meyve fidanı çeşitleri, süsbitkileri, kesme çiçek, orkide ve patates		-	www.yediveren.com

Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum

Sıra No	Bitki Türü / Ürün	Yıl	Bitki Türü / Ürün	Alan (m ²)	Üretim Durumu	Web Sitesi
5	Bdk Bitki Doku Kültürü Fidancılık Tarım Sanayi Ve Ticaret Ltd.Sti-İzmir	2006	Meyve anaçları, süs bitkileri,	2	-	www.bitkidokukulturu.com
6	İzel Süs Bitkileri-Yalova	2001	Süs bitki fideleri Armut, Kiraz ve Kivi	0.8	-	www.izelsb.com
7	Beta Ziraat ve Ticaret A.Ş. Bursa/Yenişehir		Sebze hazır fide üretimi	0.4	-	www.betaziraat.com
8	Bagem Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı & Sera-İstanbul	2005	Meyve anaçları, iç ve dış mekân süs bitkileri, patates fidesi muz fidanı	1.5	-	www.bageminvitro.com
9	Cemre Tarım Fidancılık- Mersin	2007	Şeftali anaç, kiraz anaç, erik anaç	0.15	1.5-2	www.cemrefidancilik.com
10	Doğa tohumculuk-Nevşehir	2006	Mini yumru patates	2	0.6	www.dogaseed.com

4. İnkübasyon (Bitki büyüme) Odası. Bu odadaki hava bitki ihtiyacına göre ayarlanır ve bitkinin büyüme ve gelişmesi için en uygun koşulları oluşturan ışık ve karanlık periyodu sağlanır. Enfeksiyon veya elektrik arızası durumunda meydana gelecek olası bir hata, mevcut materyalin tamamının elden çıkmasına neden olmamak için, büyük bir oda yerine birkaç küçük inkübasyon odası daima daha uygun olacaktır Oda genişliği yaklaşık 6x6m olarak düşünülebilir.

5. Sera ve plastik odalar. Doku kültürü teknikleri ile çoğaltılmış bitkilerin iklimlendirilmesi için ışık ve sıcaklık kontrollü plastik bina ve seralara yapılmalıdır. 600 m²'lik bir alıştırma odası, toplam 50.000 bitkiciğin alıştırılması için yeterlidir. Bu tip tesisler küçük bölmelere ayrılabilir bir şekilde kurulursa farklı bitki türlerinin çoğaltılmasında; enfeksiyon veya farklı problemlerden dolayı olası bitki kayıpları önlemek için ciddi bir önlem olabilir. Böyle tesisler bitkilerin hızlı büyümesi ve ihtiyaç duyduğu su ve uygun nemliliği sağlamak için sisteme sistemi veya buhar ve iyi sulama için donanımlı olmalıdır.

6. Fidanlık. İn vitro üretilen bitkilerin pazarlamadan önce muhafaza için, 10 da büyüklüğünde ilave fidanlık gereklidir. Bu fidanlık olası alıştırma işlemleri için sundurma sistemlerine sahip olmalı; ayrıca iyi bir sulama veya beslenme sistemiyle birlikte olası herhangi bir enfeksiyonu kontrol altına almak için ilaçlamaya yönelik altyapı imkanlarına sahip olmalıdır.

7. Yönetim Binası. Doku kültürü ile bitki çoğaltılan tesise işlerin organizasyonu ve planlanmasının yapıldığı bir yönetim binası bulunmalıdır.

7. DOKU KÜLTÜRÜ LABORATUVARLARI İÇİN GEREKLİ YATIRIM DURUMU

Bir doku kültürü tesisi kurulması için gerekli alet, ekipman ve ortalama yatırım miktarı Tablo 3’de verilmiştir [16].

Tablo 3. Yatırım için gerekli ekipman ve maliyetleri.

No	Mahiyeti	Tahmin edilen maliyet (USD)
1	Hazırlık laboratuvarı, inkübasyon odaları, doku kültürü odası, yönetim bölümü vs.den oluşur DK binasının kurulması	200.000
2	İnkübasyon odası için elektrik araçları, merkezi klima sistemi, bölünmüş birimler, elektrik jeneratörü	200.000
3	Farklı büyüklükte laminar kabinlerde dahil olmak üzere otoklav, fırın, bilgisayar, su Arıtıcıları ve deiyonize ediciler, besi ortamı karıştırıcıları, pH metreler, teraziler gibi laboratuvar araçları	200.000
4	Organik tuzlar, büyüme düzenleyicileri, amino asitler, vitaminler, agarıda içeren kimyasallar	200.000
5	Farklı büyüklük ve sayıda cam eşya ve şişeler, kültür tüpleri, kavanoz, bardak, petri kapları, pipetler, dereceli silindirlir vb.	50.000
6	Sera, plastik sera ve fidanlık	200.000
7	Diğer araçlar	50.000
8	Bilimsel geziler, konferanslar, eğitim	50.000
Toplam: Bir milyon yüz elli bin dolar USD		1.150 MİLYON

8. MALİYET ANALİZİ

Bitki doku kültürü ile bitkilerin üretim maliyeti; besi ortamı için kimyasal maddelerin masrafı, işçi masrafı (laboratuvar, sera, fidanlık vb.) tesislerin amortismanları ve tesislerin yönetimi ve gözlenmesini de içeren birçok unsurdan oluşur [16]. Üretimde kullanılan besi ortamının maliyeti belirlenirken; agar, büyüme düzenleyiciler, vitaminler, şeker ve organik tuzların maliyetini hesaplamalıdır. Bu tip kimyasalları fiyatları markaya göre değişebilir.

Örneğin 25 mg 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)’nın paketinin maliyeti 300 USD ise ve bu madde 5 mg/l oranlı ortamda kullanılırsa, yalnız 1mg’nın fiyatı 12 USD dir. Böylece fiyatının $1\text{mg} = 1200/1000 = 1.2$ senttir. Sonra, 1 litre ortamda bu spesifik bileşenin fiyatı $= 5\text{mg} \times 1.2$ sent $= 6$ senttir. Şimdi üretim maliyetini düşürmek için her tüpte 1 eksplant yerine 5 eksplant tutabilen benzer içerikli veya magenta kavanoz kullanımı tavsiye edilir. Bir litreye göre

Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum
sonradan 200 eksplant aşılabilen 25 ml/kavanoz oranında 40 kavanoza dağıtılabilir. Böylece her bir bitki için NAA'nın maliyeti bu aşamada 6 sent/200 bitki =0.03 senttir. Bu şekilde, diğer besi ortamı bileşenlerinin maliyetleri Tablo 4'te gösterildiği gibi hesaplanabilir [16].

Tablo 4. Besi ortamı bileşenlerinin maliyeti

No	Bileşenler	Kullanım oranı	Birim fiyat (USD)	Maliyet/Litre (cent)	Maliyeti/Bitki (cent)
1	Büyüme düzenleyicileri	mg	1-6/g*	4-12	0.03-0.06
2	Sukroz**	30g/l	1/kg	3	0.15
3	Vitaminler	mg	5-10/g*	2-5	0.1-0.25
4	Organik tuzlar	mg	10/kg	1	0.05
5	Agar***	7 g/l	100/kg	10	0.5
			Toplam	20-31 cents	0.83-1.01 cents

Birden fazla büyüme düzenleyicisi veya vitamin kullanılırsa, maliyet artar ve fiyat büyüme düzenleyicisi ve vitaminin tipine bağlı olarak değişir.

** Analitik saflıkta şeker yerine çay şekeri kullanılabilir. Şekerin 1 kg'ı 33 litre besi ortamı hazırlamaya yeterlidir.

*** Bir kilogram agar 142 litre besi ortamı hazırlamak için yeterlidir.

Bir litre besi ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasal bileşikler yukarıdaki bir vitamin ve bir büyüme düzenleyicisi kullanıldığında maliyet 2-3.1 USD arasında olmakta ve kültürde 200 bitki yetiştirilebilmektedir. Bu yüzden her bir bitki için besin ortamı maliyeti 1.1-1.5 sent/safhadır. İn vitro çoğaltmanın 3 safhası için toplam maliyet 3.3-4.5 senttir. Diğer taraftan işçi masrafı, her bir işçi için minimum 200 kap/gün kültür yapılmasından sorumlu olduğu düşünülürse aylık maaşı çalışılan günlere bölünerek hesaplanabilir. Aylık maaşlar ülkeler arasında farklılık gösterebilir. Örneğin, aylık asgari ücretin 200-300 USD olduğunu düşünürsek, beş bitkinin kültür kabında kültüre alınmasının maliyeti 4-6 senttir. Aylık maaşlar farklı ülkelerde farklıdır. Mesela ülkemizde asgari ücret yaklaşık 300 USD civarındadır. Bunun anlamı şudur; beş bitkili her kavanoz bitkinin maliyeti 4-6 sent arasındadır. Dolayısıyla her bir bitkinin iş gücü maliyeti 0.8-1.2 sent'tir. Doku kültürü yöntemleri ile bitki çoğaltmada yapılan yönetim, planlama ve veri analizi; su, elektrik, gaz ve transfer harcamaları, gübreleme, ilaçlama, torf ve plastik örtü alımı gibi serada yapılan harcamalarla birlikte; sera, fidanlık ve benzeri yapıların tamirat ve işçilik harcamaları bitki türüne göre 4.5 senttir. Fidan başına toplam masraf 8.6-10.2 sent olarak ortaya çıkmaktadır.

Ahmet Onay, Hakan Yıldırım, Vedat Pirinç, Engin Tilkat, Yelda Özden Çiftçi, Hülya

Bitki doku kültürü yöntemi ile bitki çoğaltılmasında ortalama 10 sentlik bir masraf düşünülmektedir. Bazı ticari firmalar ürettikleri bitkileri test tüplerinde 50-80 sente veya küçük saksılarda 1.5 USD satmaktadırlar (Rancho Tissue Technology Company). Üretim maliyeti gelişmekte olan ülkelerde Amerika ve Avrupa'ya göre muhtemelen daha düşük olacaktır. Çünkü bu ülkelerde daha ucuz işgücü, alet ve ekipmanlar [17], robotik olmayan sistemlerin ile lokal olarak üretilen saf olmayan kimyasal ve cam malzemelerin kullanımı mümkündür. Ayrıca arazilerinin maliyeti, tesislerin kurulumu ve işçilik daha ucuzdur. Üretim maliyeti her doku kültürü çoğaltım programında sınırlayıcı bir faktör olduğundan özenle ele alınması gereken hususlardan biridir. Bu maliyetler; bitkilerin in vitro üretiminden toprağa transferi, in vitro kültürlerdeki bazı bitki türlerinin üretiminin zorluğu ve süreç boyunca meydana gelebilecek olası genetik varyasyonlardan, doku kültürlerinin mikrobiyal kontaminasyondan şiddetle etkilenir. Eğer böyle problemlerle karşılaşılırsa, üretim maliyeti doğal olarak artacaktır.

9. DOKU KÜLTÜRÜNDE YATIRIMIN EKONOMİK UYGUNLUĞU

Bitki doku kültürü ile bitkilerin ticari üretimi için bir yatırımdan önce, kullanılacak mikroçoğaltım protokolünün ekonomik, faydalı ve sürdürülebilir nitelikte olması gerektiği gibi aşağıda belirtilen parametrelerin dikkatli bir şekilde hesaplanması gerekir;

1. Üretilen bitkiler için pazar büyüklüğü,
2. Mekan ve işgücü gereksinimlerinin belirlenmesi,
3. Üretim maliyeti,
4. Konvansiyonel olarak üretilmiş bitkilerin pazar fiyatları,
5. Üretilen genç bitkilerin yılın hangi zamanında ve nasıl pazarlanabileceği,
6. Tüketici tercihleri,
7. Son zamanlardaki bilimsel gelişmelere göre mikroçoğaltım tekniklerinin nasıl olduğunun bilinmesi ve
8. Teknoloji transferine uygunluğu.

Ekonomik önemi olan süs ve orman bitkileri, patates, muz, çam, elma, çilek, antepfıstığı, hurma ve armut, badem, şeftali, kiraz, kayısı için talep daha fazla olabilir. Yukarıdaki hesaplamalarda da vurgulandığı gibi bitki üretiminin ortalama maliyeti 10 senttir. Bu maliyet makine, laboratuvar ekipmanları, sera yapımı ve proje yürütücülüğü için lider yardımcılarında

maaşlarda göz önüne alındığında 2 sent daha artabilir. Ticari bir bitki türünden in vitro tekniklerle ekonomik üretime gerekli tesislerin kurulmasında 3-4 yıl hatta antepfıstığı ve ceviz gibi çoğaltılması zor olan bitkilerde 5-6 yıl sonra geçilebilir. Yoğun üretimden önce stok kültürlerin oluşturulması gereklidir.

Doku kültürü teknikleriyle çoğaltım yapılmasında hedeflenen çıktılar şu şekilde özetlemek mümkün olabilir;

1. Yerel tüketim için seçkin bitkilerin daha düşük fiyatla üretilmesi ve ihracat yapılarak gelir elde edilmesi.

2. Gelişmiş ülkelerdeki biyoteknoloji uygulamaları ile ülkemizdeki arasındaki farkı azaltmak için teknoloji ve bilimdeki gelişmelerin takip edilmesi.

3. Ülkemizde yeni gelişmekte olan bu teknolojinin ekonomik önemi olan diğer türlere uygulanması için teknik personelin yetiştirilmesi.

10. SONUÇ

Gelişmiş ülkelerde bitki biyoteknolojisine yoğun ilgi, bitkisel üretime katkısından dolayı bu alandaki yatırımlar her geçen gün artmaktadır. Yeni mesleklerin yaratılması, insan kaynaklarının geliştirilmesi ve çok miktarda klonal bitki üretimini de içeren bu yatırımların birçok avantajı vardır. Ülkemizdeki üniversitelerde yetişmiş elemanlar bu alanda yatırım yapacak girişimcilere her türlü teorik bilgi ve teknik destek donanımına sahiptir. Bu tip üretim tesislerinin her ilimizde o bölgeye ait ekonomik türlerin doku kültürü yöntemleriyle çok miktarda üretimi için teşvik programlarının oluşturulması gereklidir. Destekler öncelikle küçük ölçekte özellikle gelir getirici anaç bitki üretimi, süs bitkisi üretimi, patates tohumluğu ve muz gibi in vitro çoğaltılması nispeten kolay ve gelir getirici bitkilerle başlatılabilir. Elde edilecek sonuçlara göre özellikle Güney doğu Anadolu Bölgesi için antepfıstığı, ceviz ve badem anaçları ve aşılı fidan üretimine geçilebilir.

Kaynaklar

1. www.aboutbioscience.com (erişim tarihi: 10.04.2012).
2. Fred S. Betz, Bruce G. Hammond, Roy L. Fuchs, 2000. Safety and Advantages of Bacillus thuringiensis-Protected Plants to Control Insect Pests, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 156-173.
3. Redenbaugh K, Hiatt W., Martineau B., Emlay D., 1994. Regulatory assessment of the FLAVRSAVR tomato, *Trends in Food Science & Technology*, 5 (4), 105-110

4. Davey M., Anthony P., 2010. *Plant Cell Culture Essential Methods*, Wiley-Blackwell.
5. Pierik R.L.M. 1997. *In vitro Culture of Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers, p:353.
6. Krikorian A. D., Berquam D.L., 1969. Plant cell and tissue cultures: The role of Haberlandt, *The Botanical Review*, 35(1), 59-67.
7. Winkelmann T., Geier T., Preil, W., 2006. Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985–2004, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86:319–327.
8. Onay A., 2003. Micropropagation of pistachio. In: *Micropropagation forest trees and fruits*. Forestry Sciences, Volume; 75, Chapter 19, Section C: 565-588. Edited by S. Mohan Jain and Katsuaki Ishii. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
9. Onay A. (2005). Pistachio, *Pistacia vera* L. In: *Protocols for Somatic Embryogenesis In Woody Plants*. In: Forestry Sciences, (Eds.: S.Mohan Jain & P. Gupta). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands., pp. 289-300,
10. Onay A., 2000. Histology of somatic embryo initiation and development in pistachio (*Pistacia vera* L.), *Turkish Journal of Botany*. 24:91-95.
11. Koltunow A.M., Hidaka T., Robinson S. P., 1996. Polyembryony in Citrus Accumulation of Seed Storage Proteins in Seeds and in Embryos Cultured *in vitro*, *Plant Physiology*, 11: 599-609.
12. Murashige T., 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annals Review Plant Physiology*, 25, 135.
13. Czynczyk A., Takubowski T., 2007. Value of standard and new selected rooted rootstocks for apples in Poland *Acta Horticulturae*, 732, 51.
14. Adelberg J., Koroggel M., Toler J., 2000. Greenhouse and nursery growth of micropropagated Hostas from liquid culture. *Horticulture Technology*, 10, 754.
15. Yıldırım H., Onay A., Pirinç V., Şimşek M., 2010. Bitkisel Materyallerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Laboratuar Şartlarında Üretimi ve Ticari Doku Kültürü Laboratuarlarının Oluşturulması, 1. Uluslar arası Katılımlı Kamu-Üniversite-Sanayi İşbirliği Sempozyumu (UDUSİS) 24-26 Mayıs 2010, Diyarbakır. Bildiriler Kitabı s: 279-282.
16. Omar M.S., Aouine M., 2007. Commercial *in vitro* Mass Propagation of Plants: Current Status and Future Investment Prospects, 94-99.
17. Herman E., 2000. Automated micropopagation system In. *Regeneration and micropropagation. Techniques system and media 1997-1999*, In: *Recent advances in Plant tissue culture Volume 6 Agritechnology Publication Agriculture Cell Report: Shrub Oak N. Y.*