

MİKROÇOĞALTIMDA ÇEVRESEL KONTROL FAKTÖRLERİ

Ercan ÖZKAYNAK, Bülent SAMANCI

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya, Türkiye.

ÖZET

Mikroçoğaltım, genetik olarak birbirinin aynı olan çok fazla sayıda bitki klonunun üretiminde kullanılan bir bitki doku kültürü tekniğidir. Bu teknik bahçe bitkileri, tarla bitkileri, ormancılık ve peyzaj mimarlığında ticari üretimde kullanılmaktadır. Son yıllardaki araştırmalar yüksek kalitede bitki üretiminin yanında etkili enerji kullanımı için *in vitro* çevre kontrolünün önemli olduğunu göstermiştir. Bu derlemede mikroçoğaltımda çevre kontrolünde ilk olarak ışık, karbondioksit konsantrasyonu, sıcaklık, bağıl nem ve oksijen gibi besin ortamı üst çevresi faktörlerinin, pH, iyon bileşenlerinin konsantrasyonları, şeker konsantrasyonu gibi fiziksel ve kimyasal besin ortamı çevre faktörlerinin ve eksplant sıklığı, eksplant büyüklüğü ve patojenler gibi biyolojik faktörlerin *in vitro* bitki büyümesine etkileri tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Fotoototrofik mikroçoğaltım, CO₂, Şeker, Işık.

RECENT ADVANCES IN ENVIRONMENTAL CONTROL IN MICROPROPAGATION

ABSTRACT

Micropropagation is a plant tissue culture technique that can yield a large number of genetically identical plantlets. This technique has been commercially used in horticulture, field crops, forestry and landscape architecture. Controlling *in vitro* environment is important for producing high quality plantlets with efficient use of energy. In this article, we evaluate environmental control factors currently used in micropropagation such as aerial environmental factors including light, carbon dioxide concentration, temperature, relative air humidity and oxygen, the effects of culture medium physical and chemical environmental factors including sugar concentration, concentrations of ion components and pH of the culture medium together with the effects of biological factors such as explant size, explant density and pathogens on the growth and photosynthesis of plantlets *in vitro* are discussed.

Keywords: Photoautotrophic micropropagation, CO₂, Sugar, Light

1. GİRİŞ

Dünyada 600'e yakın kuruluş bitki doku kültürü yöntemlerini ve bunlardan özellikle mikroçoğaltımı kullanarak 50000 bitki çeşidinde, yılda yaklaşık 500 milyondan fazla bitki üretimi yapmaktadır. (Yu, 1998). Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından suni besin ortamlarında ve steril koşullar altında genetik yapı olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitki üretmek amacıyla kullanılan bir doku kültürü tekniğidir. Mikroçoğaltımla kısa bir sürede, dar bir alanda, yetiştirme mevsimine bağlı kalmaksızın, hastaliksız

çok fazla sayıda bitki üretimi yapılabilir. Günümüzde kasımpatı, karanfil, fuchsia, gladiol gibi bazı süs bitkilerinin ticari üretimi; bazı otsu (soğan, yer fıstığı, kuşkonmaz, pancar, brassica, fiğ ve nohut türleri, soya, çim türleri, mısır gibi) ve odunsu (*Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Ribes*, *Atriplex*, *Betula*, *Coffee* türleri gibi) türlerin ve okaliptus ve kavak gibi orman ağaçlarının üretimi mikroçoğaltımla yapılabilmektedir. Buna rağmen, yüksek laboratuvar masrafları, düşük *in vitro* büyüme oranı, fizyolojik olarak uniform olmayan bitki gelişimi ve alıştırma aşamasında düşük yaşama oranlarından kaynaklanan yüksek üretim maliyetlerinden dolayı mikroçoğaltımın ticari kullanımı günümüzde sınırlı bir düzeyde kalmaktadır. Yüksek üretim

maliyetlerini düşürmek amacıyla mikroçoğaltımda çevre kontrolü ile ilgili son 10 yıldır yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bitkinin geliştiği kültür kabı mikro çevre olarak değerlendirilmekte ve bu çevrenin kontrolü ile ilgili çalışmalar ön plana çıkmaktadır (Kozai ve ark., 1997a; Nquyen ve Kozai, 1998; Hatipoğlu, 1999; Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Konvensiyonel mikroçoğaltımda bitkilerin büyümeleri için enerji ve karbon kaynağı olarak şeker kullanılmakta, fotosentez için yeterli karbondioksit ve ışık yoğunluğu sağlanamamakta ve bitkilerin fotosentez kapasiteleri düşük olmaktadır. Bu tip mikroçoğaltıma karbon kaynağı olarak şeker kullanıldığı için heterotrofik mikroçoğaltım adı verilmektedir. Işık enerjisi, karbon kaynağı olarak karbondioksit, su ve minerallerin kullanıldığı ve besin ortamında şekerin bulunmadığı mikroçoğaltım tipine ise fotoototrofik mikroçoğaltım adı verilmektedir.

Fotoototrofik mikroçoğaltımda, kültür ortamında *in vitro* bitkilerde fotosentezle inorganik maddeleri kullanarak organik maddelerin üretimi sağlanabilmektedir (Kozai, 1991a; Pospisilova ve ark., 1992; Levin ve ark., 1997; Nquyen ve Kozai, 1998).

Bu derleme, mikroçoğaltımla *in vitro* bitki üretiminde bitki kalitesini artırmak ve üretim maliyetlerini düşürmek amacıyla fiziksel, kimyasal ve biyolojik çevre koşullarının kontrolünü sağlamak için yapılan çeşitli uygulamalar ele alınmıştır.

2. MİKROÇOĞALTIMDA *IN VITRO* ÇEVRE FAKTÖRLERİ

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

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

2. 1. Mikroçoğaltımda Bitkinin Vejetatif Aksamının Geliştiği Besin Ortamı Üst Çevre Faktörleri

2. 1. 1. Fiziksel Çevre Faktörleri

Işık

Mikroçoğaltımda ışık dağılımı genel olarak kültür ihtiyaçlarına göre ayarlanır. Işık dağılımının birçok kültürde büyümeyi ve gelişmeyi etkilediği belirtilmiştir. Örneğin, domates kotiledonlarında tomurcuk farklılaşmasını, patatesten büyümeyi ve morfolojiyi etkilemiştir (Gönülşen, 1987; Kozai ve Sekimoto, 1988; Nquyen ve Kozai, 1998).

In vitro kültüre kırmızı ve kızıl ötesi ışık kaynakları uygulandığında *Azolea* bitkisine ait eksplantlarda (beyaz florasan lambalara göre) köklenme sağlanmıştır (Nquyen ve Kozai, 1998). Yine *Pelargonium*'da *in vitro* koşullarda, kırmızı ışık uygulamasının beyaz ışığa göre sap uzunluğunu önemli derecede artırdığı, mavi ışığın ise engellediği saptanmıştır (Kozai ve ark., 1992).

Konvensiyonel mikroçoğaltımda kültür kapları üstten ışıklandırma ile ışıklandırılır. Üstten ışıklandırma sistemi kültürlerin büyüme ve gelişmesi için her zaman yeterli olmamakta ve kültür odasının ışıklandırılması ve soğutulmasında elektrik maliyetini artırmaktadır. Son yıllarda mikroçoğaltımda yandan ışıklandırma sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemde kültür kutuları bir hat oluşturacak şekilde dizilmekte ve ışık kaynağı bu kutu

hattının yanına konmakta ve kutunun yan duvarlarına doğru ışıklandırma ile bitkiler ışıklandırılmaktadır. Bu sistemin kullanımı ile *in vitro* bitki büyümesinin teşvik edildiği, sürgün uzunluğunun kontrol edilerek sürgün kalitesinin artırıldığı ve üretim maliyetlerinin azaltıldığı belirtilmiştir (Kozai ve ark., 1992; Fujiwara ve Kozai, 1995). Yandan ışıklandırma sisteminde ışık yoğunluğunun üstten ışıklandırma sistemine göre yaklaşık 5 kat daha fazla olduğu ve enerjinin üst, orta ve alt kısımlardaki yapraklara dağıtımının uniform bir şekilde sağlandığı belirtilmiştir. Yandan ışıklandırma sisteminde bitkilerin kısa boğum arası uzunluğuna, daha fazla yaprak sayısına ve kuru ağırlığa sahip oldukları belirlenmiştir. Bu sistemin bir diğer avantajı da birim alana üstten ışıklandırma sistemine göre daha fazla sayıda kültür kutusu konulabilmekte ve kutularının kapladığı alan minimuma inmektedir. Yandan ışıklandırma sisteminde geliştirilen bitkilerin üstten ışıklandırma sistemine göre *in vivo* koşullara transfer aşamasında daha sağlıklı ve kaliteli oldukları belirtilmiştir (Aitken-Christie ve ark., 1995; Fujiwara ve Kozai, 1995; Kitaya ve ark., 1996; Kozai ve ark., 1997a,b; Kubota ve ark., 1997; Nquyen ve Kozai, 1998).

Konvensiyonel mikroçoğaltımda genellikle 16/8 saat aydınlık/karanlık ışık döngüsü kullanılmaktadır. Morini ve ark., (1990), 16/8 saat ışık döngüsüne alternatif ışık döngü sistemlerinde *in vitro* bitki gelişimini incelemişler ve *Prunus cerasifera* sürgünlerinde 4 saat ışık ve 2 saat karanlık şeklinde devam eden ışık döngüsünün 16/8 saat uygulamaya göre daha fazla büyüme sağladığını saptamışlardır. Hayashi ve ark., (1993) 24, 6, 1.5 ve 0.375 saat ışık döngülerinde kültür kutusunda CO₂ konsantrasyonunun değişimini incelemişlerdir. Işık döngüsü kısaltıkça

in vitro bitkilerde günlük CO₂ alımı artmış ve kısa ışık döngülerinde yaş ve kuru ağırlıklar artış göstermiş ve büyüme teşvik edilmiştir. Gece/gündüz sıcaklık farkı sera koşullarında zambak gibi bazı süs bitkilerinde sap uzunluğunun kontrolünde uygulamada da kullanılmaktadır. Araştırmalarda genel olarak 12 saatten daha az veya 24 saatlik ışık uygulamalarının kültürlerin büyüme ve gelişmesini engellediği veya geciktirdiği belirtilmiştir (Fujiwara ve Kozai, 1995; Jeong ve ark., 1995; Kubota ve ark., 1997).

Karbondioksit Konsantrasyonu

Kültür kutusunda yüksek CO₂ konsantrasyonunun sağlanması için mikro gözenekli plastik kapaklar kullanılmaktadır. Gaz geçirgen kapaklarının kullanımı ile kültür ortamının gaz değişiminde artış olduğu, bağıl nem ve camsılaşmanın azaldığı ve net fotosentez oranının ve büyümenin olumlu etkilendiği belirtilmiştir. Kültür kutusu içindeki CO₂ konsantrasyonunun aktif kontrolü; CO₂'nin kültür kutusuna doğrudan enjeksiyonu veya güçlü bir havalandırma sistemi ile veya büyük kültür kutusu (28 cm genişliğinde, 53 cm uzunluğunda ve 10.5 cm yüksekliğinde) kullanılarak sağlanabilmektedir (Jeong ve ark., 1995; Kozai ve ark., 1995; Kozai ve ark., 1997a).

Fotoototrofik mikroçoğaltımda yüksek ışık yoğunluğunda kültür ortamına CO₂ ilavesinin tütün, *Cymbidium* karanfil ve patates bitkilerinde büyümeyi teşvik ettiği belirlenmiştir. Yine başka bir araştırmada büyük kültür kutusu kullanımı ile, şekersiz besin ortamında çilek bitkisinde konvensiyonel mikroçoğaltıma göre kuru ağırlık ve net fotosentez oranı daha yüksek bulunmuştur (Nquyen ve Kozai, 1998).

Woltering (1990) *in vitro* gül ve gerbera kültürlerinde 10.000 ppm'den yüksek CO₂ konsantrasyonunun uygun olduğunu, daha düşük konsantrasyonlarda ise yapraklarda yaşlanma ve kopmaların oluştuğunu belirlemiştir. CO₂/O₂ dengesi ile ilgili yapılan bir çalışmada *in vitro* kültür sisteminde CO₂ sağlamak için bir bitki ile yararlı mantardan (Shiitake mantarı, *Lentinus edodes* Sing.) oluşan kültür sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemde ışık periyodunda bitki fotosentezde CO₂ kullanmakta ve O₂ vermektedir. Mantar miselleri bu O₂'yi kullanarak, bitkilerin fotosentez yapabilmeleri için gerekli olan CO₂'yi üretmektedir. Böylece kültür bitkileri ve mantarlar arasında kapalı bir sistemde CO₂/O₂ alış-verişi sağlanabilmektedir. Bu sistemde bitkiler hasat edildikten sonra kalan artıklar yararlı mantarların gelişmesi için büyüme ortamı olarak kullanılabilir (Kitaya ve ark., 1996).

Oksijen Konsantrasyonu

Kasımpatı bitkisinin büyümesine düşük O₂ konsantrasyonlarının uzun süreli etkilerini araştıran Tanaka ve ark., (1991), % 5, 15 ve 21 O₂'ye göre % 10 O₂'nin (30 günde) önemli derecede daha yüksek bitki kuru ağırlık artışı sağladığını saptamıştır. Uygulamada O₂ konsantrasyonun kontrolünde O₂ seviyesinin % 10 olması tavsiye edilmektedir. Konvensiyonel mikroçoğaltımda kültür kutusundaki CO₂ konsantrasyonu genel olarak %0.01-%1-3 arasında değişirken O₂ konsantrasyonu yaklaşık % 18-22 arasında değişmektedir. Fotoperiyotta O₂ konsantrasyonunun azalmasının hem net fotosentez oranını ve *in vitro* bitki büyümesini artırdığı hem de anaerobik koşullardan dolayı biyolojik kontaminasyonu azalttığı belirtilmiştir

(Kozai ve ark., 1992; Fujiwara ve Kozai, 1995; Kitaya ve ark., 1996 ve Nquyen ve Kozai, 1998).

Sıcaklık Faktörü

Sıcaklık *in vitro* bitki kültür sistemlerinin de içinde bulunduğu tüm biyolojik sistemlerde önemli bir faktördür. Karanlık periyotta, kültür odasında kültür kutusu içindeki ve dışındaki hava sıcaklığı hemen hemen aynıdır. Fotoperiyotta ise ışıktan dolayı hava sıcaklığı farkı 1-2 °C'dir. Bundan dolayı kültür kutusundaki sıcaklığı istenilen düzeyde tutmak için kültür odası hava sıcaklığının 1-2 °C daha yüksek olması gerekmektedir (Fujiwara ve Kozai, 1995; Jeong ve ark., 1995; Nquyen ve Kozai, 1998). Genelde klasik mikroçoğaltımda 25 °C'lik kültür odası sıcaklığı yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bitki türüne özgü sıcaklık istekleri de farklılık göstermektedir (Gönülşen 1987; Kitaya ve ark., 1996). Bitkilerin karanlık ve fotoperiyotta farklı sıcaklıklarda büyütülmesi mikroçoğaltımda önemli bir tekniktir. Bu teknikte *in vitro* bitkiler gece ve gündüz farklı sıcaklıklarda büyütülmekte ve bu sıcaklık farklılıklarının *in vitro* bitki gelişimine olumlu etkileri olmaktadır. Bazı süs bitkilerinde gece gündüz sıcaklık farkı artışı ile sürgün uzunluğu ve boğum arası uzunluğunda artış saptanmıştır. Başka bir araştırmada da gece gündüz sıcaklık farkı arttıkça sap uzunluğunun arttığı belirlenmiştir (Kozai ve ark., 1997b; Kubota ve ark., 1997; Nquyen ve Kozai, 1998).

Bağıl Nem Faktörü

Kültür kutusunda bağıl nem *in vitro* koşullarda bitkilerin su ilişkilerini etkileyen önemli bir çevre faktörüdür. Bitkilerin su buharı basıncı ve terleme

oranlarının % 98, % 96 ve % 94 bağıl nemde, % 99'lük bağıl nemden sırasıyla 2, 4 ve 6 kez daha fazla olduğu (oda sıcaklığında) bulunmuştur (Fujiwara ve Kozai, 1995; Nquyen ve Kozai, 1998). Bağıl nem, su oranını ve Ca gibi mineral maddelerin alımını artırmakta ve bağıl nemdeki küçük bir farklılık su oranı ve bazı iyonlarının alımında önemli bir farklılığa neden olabilmektedir. Örneğin *in vitro* koşullarda 20 gün süreyle büyütülen patates bitkilerinin % 80 bağıl nemde % 90-95 neme göre birim kuru ağırlık başına % 50 daha fazla su ve iyon (NO_3^- , NH_4^+ , P, K, Ca ve Mg) absorbe ettikleri belirlenmiştir (Kitaya ve ark., 1996). Patateste bağıl nemin % 100'den % 60'a düşürülmesinin yaprak alanı ve ağırlığını artırdığı, yaprak sayısı, klorofil içeriği ve boğum arası uzunluğunu ise azalttığı saptanmıştır (Buddendorf-Joosten ve Woltering, 1996).

Kültür kutusundaki bağıl nemin azaltılması ile kütikula tabakası ve stoma fonksiyonunun geliştiği ve daha kısa sürgün uzunluğuna ve daha yüksek kuru madde oranına sahip güçlü bitkiler elde edildiği belirtilmiştir (Jeong ve ark., 1995; Nquyen ve Kozai, 1998; Pruski ve ark., 2002). Düşük bağıl nem içeren koşullarda büyütülen bitkilerde *in vitro* koşullardan seraya veya açık tarlaya şaşırtma aşamasında yapraktan su kaybı ve su stresine karşı dayanıklılığın kontrol edilebileceği ve bitkilerin yaşama oranlarının artırılacağı belirtilmiştir (Buddendorf-Joosten ve Woltering, 1996).

2. 1. 2. Kimyasal Çevre Faktörleri

Hava alış-verişi olan kültür kutusunda etilen konsantrasyonunun artarak $2\mu\text{mol/mol}$ 'den daha üst seviyelere çıktığı ve 21 günden 60 güne kadar büyütülen Dahlia ve Petunia bitki kültürlerinin büyümesini azalttığı belirlenmiştir. Yine etilenin, kültürleri

yapılan dokular tarafından üretildiği ve farklı morfogenetik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir. Kültür sistemine ve kullanılan kültür kapaklarının niteliğine göre bağıl olarak etilenin organogenesisi uyarıcı veya engelleyici etkilerinin olabileceği belirtilmiştir. Etilen konsantrasyonu toksik bileşiklerden dolayı hava alış-verişini sağlayan kültür kutularında bazı zamanlarda yükselmektedir. Bu problemleri çözenin basit bir yolu kültür kutusunun hava değişim sayısını artırmaktır. Hava değişim sayısı artışı, gaz alış-verişini sağlayan filtre veya güçlü bir havalandırma sistemi ile sağlanmaktadır (Fujiwara ve Kozai, 1995; Nquyen ve Kozai, 1998; Gürel ve Türker, 2001).

In vitro kültürlerde besin ortamında etilen inhibitörleri (AgNO_3 , aminoethoxyvinyglycine (AVG), CoCl_2 , 2,5-norbornadiene gibi) de kullanılmaktadır. Brar ve ark., (1999), *Vigna unguiculata* bitkisinde yaptıkları araştırmada besin ortamına 25 M CoCl_2 veya 100 M 2,5 norbonadiene eklendiğinde sürgün sayısında artış sağlanmıştır.

2. 1. 3. Biyolojik Çevre Faktörleri

Mikroçoğaltımda kültür başlangıcında eksplantların ve kültür ortamının mikrobiyal kontaminasyonlardan temiz olması gerekmektedir. Şeker içeren ortamlar mikroorganizmaların gelişimi için uygun ortamlardır. Mikroorganizmalar ortamda bazı toksik maddeler üretebilir ve besin ortamında bitkilerle rekabete girerek bitkilerin yapılarının bozulmasına ve ölmesine neden olurlar. Fotoototrofik mikroçoğaltımda ortamda şeker bulunmadığı için mikroorganizmaların büyümesi büyük oranda engellenebilmekte ve ortamda düşük popülasyona sahip mikroorganizmalardan dolayı *in vitro*

bitkinin yapısının bozulması ve ölmesi engellenebilmektedir (Kozai ve Smith, 1995; Levin ve ark., 1997).

2. 2. Kök Bölgesi (Besin Ortamı) Çevre Faktörleri

2. 2. 1. Fiziksel Çevre Faktörleri

In vitro kültürlerde büyüyen dokular sıvı ortam ile temas ettiklerinde yapıları bozulabilmekte ve en önemli fiziksel sorunlardan biri olan camsılaşma ortaya çıkabilmektedir. Camsılaşmanın

mikroçoğaltımda önemli bir problem olduğu ve gelişen bitkilerde zayıf palizat parankimasi ve kütikula tabakası gelişimi, anormal yaprak, sap ve kök anatomisine neden olduğu belirtilmiştir (Nquyen ve Kozai, 1998). Ziv ve ark., (1983), karanfilde camsılaşma sorununu çözmek için kültürlerin birkaç gün sıvı ortamda büyütüldükten sonra katı ortamda alt kültüre alınmasının etkili olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan araştırmalarda agar, gelrit ve şeker konsantrasyonu artışının, makro element karışım oranının değiştirilmesinin ve kültür kabında havalandırmanın ve düşük bağıl nemin bitkilerin camsılaşma oranını azalttığı belirtilmiştir (Jeong ve ark., 1995; Hatipoğlu, 1999).

2. 2. 2. Kimyasal Çevre Faktörleri İyon Komponentleri

Mikroçoğaltımda, besin ortamına mineral maddelerin ilavesi ile farklı tepkiler ortaya çıkabilmektedir. Bazı türler MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamına göre daha düşük iyonik madde içeren ortamda daha iyi gelişirken, bazıları MS ortamında daha iyi gelişmektedirler. Optimum mineral madde ihtiyacı büyümenin aşamalarına ve eksplant tiplerine göre çeşitlilik göstermektedir. Bir iyonun ortamdan çıkarılması bitki içindeki kullanılabilir

bir iyonun kullanılma oranını ortaya çıkarabilmektedir (Jeong ve ark., 1995; Williams, 1992, 1995).

Maksimum kültür büyümesi için ortamın inorganik iyon kompozisyonu ve inorganik iyon hacmi büyük bir öneme sahiptir. *In vitro* koşullarda karanfil bitki kültürlerinde şekerli + 1/2 MS veya şekerli + 1/2 MS ortamlarına göre şekerli + tam iyon kompozisyonlu MS ortamında daha iyi büyüme göstermiştir (Nquyen ve Kozai, 1998). *In vitro* fotoototrofik koşullarda çilek bitkisinde yarı MS ortamında temel iyon konsantrasyonu kullanılan bitkilerde PO_4^{-3} 'ün hızlı bir şekilde absorbe edildiği (21 günde PO_4^{-3} oranı % 3'e düşmüştür) ve net fotosentez oranı ve büyümenin PO_4^{-3} konsantrasyonu uygun olduğunda teşvik edildiği belirlenmiştir (Kozai ve ark., 1991a). Yang ve ark., (1995), çilekte tam MS ortamında Ca^{+2} , Mg^{+2} , H_2PO_4 ve SO_4^{-2} 'de yaklaşık 1/3 oranında artış sağlandığında 1/2 MS veya tam MS ortamlarına göre kuru ve yaş ağırlık ve yaprak alanını önemli derecede daha yüksek bulmuşlardır.

Besin ortamında amonyum/nitrat oranının da çok önemli bir etki yaptığı bilinmektedir. Özellikle camsılaşmada ve diğer besinlerin ve pH'nın değişimine etkili olduğu bildirilmiştir (George, 1993).

Mikroçoğaltımda besin ortamına konan eksplantın kesim yüzeyinden çıkan fenolik bileşiklerin oksidasyonu bazı bitki türlerinin kültüründe önemli problemlere yol açabilmektedir. Bu durum besin ortamının kararmasına ve dokularda toksik etkiye yol açarak, eksplantların gelişme ve farklılaşma yeteneklerini ciddi olarak sınırlandırmaktadır. Besin ortamının ve dokuların kararmasını engellemek için fenolik bileşiklerin ortamdaki uzaklaştırılması (aktif karbon veya polivinilpiroliden, PVP, gibi fenolik adsorbantların kullanımı ile) ve fenolaz

enziminin inaktivite edilmesi ile sağlanabilmektedir. Besin ortamındaki toksik bileşikler yok etmenin en etkin ve kolay yolu aktif karbon kullanmaktır. Ancak aktif karbon toksik bileşiklerle birlikte ortamdaki oksin ve sitokin gibi organik bileşikler ile diğer bir çok bileşiği de absorbe etmektedir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

In vitro kültürde besin ortamındaki çözünmemiş O₂ konsantrasyonu bitki büyümesini ve kök gelişmesini etkilemektedir. Bazı bitki türlerinde besin ortamındaki düşük O₂ konsantrasyonundan ve kültür kutusu içindeki nemli atmosferden dolayı köklerin besin ortamının iç kısmından ziyade besin ortamının üst kısmında büyüme ve gelişme gösterdikleri belirlenmiştir (Kozai, 1991a).

Organik Komponentler

Glukoz ve sukroz gibi şekerler klasik mikroçoğaltımda karbon kaynağı olarak kullanılmakta ve fotosenteze olumsuz etkiler yapmaktadırlar. Kozai (1991a) kültür kutusundaki CO₂ konsantrasyonu artışı ve kültürlerin yüksek ışık yoğunluğunda büyütülmesi ile kültür ortamına şeker ilave edilmeden fotosentezle bitki büyümesinin sağlanabildiğini ve böylece yüksek üretim maliyetlerinin azaltılabileceğini belirtmiştir. Cymbidium ve karanfil kültürlerinde CO₂ ilave edilen ortamda CO₂ ilave edilmeyen ortama göre daha fazla bitki kuru ağırlık artışı saptanmıştır (Kozai ve Iwanami, 1988). Karanfil kültürlerinde başlangıç şeker ağırlığının sadece % 2-8'ini bitkilerin absorbe ettiği bulunmuştur (Kozai ve Iwanami, 1988). Patateste CO₂ ilave edilen ortamda başlangıçtan 3 gün sonra net fotosentez oranının, şekerli ortamda, şekerli ortama göre 8-10 kat daha yüksek olduğunu saptamışlardır (Nquyen ve Kozai, 1998). Şekerli ortamlarda

gelişen bitkilerde yüksek ışık yoğunluğunda ortama CO₂ ilave edildiğinde tütün, Cymbidium, karanfil ve patates bitkilerinde büyümenin teşvik edildiği belirtilmiştir. Yine gül ve patates kültürlerinde besin ortamındaki şeker konsantrasyonu azaldığı zaman net fotosentez oranında artış saptanmıştır (Jeong ve ark., 1995).

Mikroçoğaltımda katılaştırıcı maddelerin kullanımı ile bitkilerin besin ortamı ile uygun bir fiziksel temas kurması ve özellikle sıvı ortamlarda görülen camsılaşmaya karşı koruma sağlamaktadır. *Malus sp.* ve *Pyrus communis*'te sırasıyla 3 ve 6 g/l agar konsantrasyonunda en yüksek sürgün uzaması ve sürgün büyümesi saptanmıştır (Jeong ve ark., 1995). Kirdmande ve ark., (1995), fotoototrofik olarak büyütülen Okalipthus bitkisinde CO₂ ilave edilmiş ortamda farklı destekleyici maddeleri karşılaştırmışlardır. Araştırmada *in vitro* net fotosentez oranı ve in vivo koşullara transferden sonra yaşama oranını en yüksek vermikulit ortamında bulmuşlar bunu gelrit ile agar ortamları izlemiştir. Kozai ve ark., (1996) tatlı patates bitki kültürlerinde kaya yünü ve vermikulitin birlikte kullanılması ile agara göre klorofil konsantrasyonu ve kök büyümesinde artış saptamışlardır.

pH

Ortam pH'sı *in vitro* bitkilerin morfojenesisini, büyümesini ve gelişmesini etkileyen önemli bir faktördür. Standart olarak, pH ortam hazırlanırken ayarlanır. Ancak ortamda pH'nın her zaman sabit kalmadığı bilinmektedir. pH değişimleri bitki materyali ve ortam arasındaki iyon dengesinin bozulmasıyla ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda bitkiden ortama doğru mineral geçişi olabilmektedir. Bu denge noktası türlere

bağlıdır. Karanfil kültürlerinde pH'sı 5.5 olan besin ortamında % 59, pH'sı 6 olan ortamda ise % 4 oranında bitki büyümesi olumlu yönde etkilenmiştir (Gönülşen, 1987). Çilekte sıvı ortamda pH'nın kültürden 20-30 gün sonra 6.0'dan 4'e düştüğü belirlenmiştir (Williams, 1992; Nquyen ve Kozai, 1998). PH'nın bu derece hızlı değiştiği kültürlerde besin ortamında MES (1g/l) gibi tampon çözeltiler kullanılarak pH değişimleri kontrol edilmektedir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

2. 2. 3. Biyolojik Çevre Faktöleri

Mikroçoğaltımda somatik embriyoların veya adventif sürgünlerin kullanımı mutasyona uğramış bitkilerin oranının daha yüksek çıkmasından dolayı sınırlı kalmaktadır. Ticari mikroçoğaltımda tek boğum parçaları ve aksillar tomurcuklar çoğaltma aşamasında en yaygın olarak kullanılan eksplantlardır. Eksplantların farklı yaprak alanı ve ağırlığı, rejenere olan bitkinin büyümesinde varyasyonlara neden olabilmektedir. (Gönülşen, 1987; Mansuroğlu ve Gürel,2001). Marcelis van Acker ve Leutsher (1993), iki boğumlu eksplantların gül ve şeflere da in vivo koşullarda daha büyük bitkiler oluşturduklarını saptamışlardır. Ayrıca araştırmacılar iki boğumlu eksplantların üsteki yaprağı alındığında tek boğumlulara göre daha fazla bitki büyümesi sağladığını belirtmişlerdir. Mikroçoğaltımla geliştirilen fiderlerde genel olarak ana sapın kısa ve kalın olması, düşük gövde/kök ağırlıkları, normal stoma ile birlikte geniş yaprak alanı ve kalın kütikula tabakası oluşumu istenmektedir. Fotoototrofik mikroçoğaltımda çevre kontrolü ile bitkilerin büyüme ve gelişmesi sağlanabilmekte, morfolojik ve fizyolojik düzensizlikler azaltılabilmektedir (Kozai ve ark.,

1991b; Kozai, 1991b; Nquyen ve Kozai, 1998).

Kozai ve ark., (1989), fotoototrofik koşullarda patates bitkilerinin yaş ve kuru ağırlığının ve yaprak sayısının kültür kutusu içindeki bitki sıklığından etkilendiğini ve bitki sıklığı artıkça CO₂ konsantrasyonunun, net fotosentez oranı ve mineral madde konsantrasyonunun azaldığını saptamışlardır. Patateste yapılan bir araştırmada iki haftalık kültürlerde, kültür tüpü başına 5 tek boğum eksplantı bulunduğu diğer uygulamalara göre (1, 2, 3 ve 4 boğum) maksimum sürgün uzunluğu ve kök sayısı elde edilmiştir (Sarkar ve ark., 1997).

Bazı simbiyotik funguslar *in vitro* kültürde bitkilere inoküle edildiklerinde bitki büyüme ve gelişmesini teşvik ettiği belirlenmiştir. Nowak ve ark., (1998), patates bitkilerini *Pseudomonas sp.* bakterisi ile bulaştırmışlar ve 6 haftalık kültürlerde bakterisiz kültürlere göre daha fazla boğum, sürgün uzunluğu, sürgün ve kök kuru ağırlığı saptamışlardır.

3. MİKROÇOĞALTIMDA OTOMASYON SİSTEMLERİNİN KULLANIMI, BİTKİ BİYOREAKTÖRLERİ VE DÜŞÜK SICAKLIKTA GERMLAZM MUHAFAZASI

Mikroçoğaltımda robot sistemlerin kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmış ve boğum parçalarının eksplant olarak kullanımı ile patates, karanfil ve *Eucalyptus* bitkilerinde bir prototip geliştirilmiştir. Bu sistemde ilk olarak, bir kamera ile bitkinin rengi, şekli ve sürgün boyunca boğumların pozisyonu tanımlanmakta ve eğer bitki normal bir bitki olarak tanımlanmışsa bitki tepe kısmından tutularak boğum araları üstten alta doğru tek tek kesilmektedir. Kesimden sonra önceden belirlenmiş

olan pozisyonda yeni kültür kutusuna eksplant aktarılmakta ve robotun bitkiyi tutan ve kesen kısımları otomatik olarak sterilize edilmektedir.

Bu tip bir robotla 5-8 milyar maliyetle bir yılda milyonlarca fidenin hazırlanabileceği ve robotun bilgisayar sisteminde bazı değişiklikler yapılarak, farklı bitki türlerinde de kullanılabileceği belirtilmiştir. Bitkilerin büyüme odasından dış koşullara transferinde de taşıyıcı robotların kullanılabileceği belirtilmiştir (Kozai, 1991c; Mansuroğlu ve Gürel, 2001)

Bitki biyoreaktörleri sıvı ortam kullanılarak fazla sayıda bitkinin hastalısız olarak gelişmesini sağlayacak şekilde dizayn edilmiş kültür sistemleridir. Bu sistemlerde kültürler taze ortam kültür kutusu içindeki bitki dokusu taşınmaksızın verilebilir ve azaldığında eklenebilir. Eksplantın besin ortamından yararlanabilme yeteneği katı ortamdaki sıvı ortamdaki filtrelere sterilizasyonu yapılabilir ve kapalı aseptik kültürler kontaminasyon tehlikesi olmadan aktarılabilir.

Bitki biyoreaktörleri; zambakgillerde, çilekte ve patates gibi bitkilerde geniş ölçekli bitki üretimi için kullanılmaktadır. Biyoreaktörlerde bazı bitkilerde sürgünlerden (*Atropa belladonna*, patates), bazı türlerde adventif tomurcuklardan (begonya, gladiol, antrium türleri), bazı bitki türlerinde ise aksillar tomurcuklardan (*Fragaria ananassa*) gelişen bitkiler kullanılmıştır (Takayama ve Akita, 1998).

Hale ve ark., (1992) yaptıkları araştırmada bazı bitki türlerinde (kavun, tütün ve begonya) sabit sıvı ortamda, sürekli besin akışı sağlayan sıvı ortamlı biyoreaktörlerle agarlı ortamda *in vitro* bitki gelişimini incelemişlerdir. Araştırmada begonya kültürleri sıvı ortamda katı ortama göre iki kat daha fazla yaş ağırlık vermişlerdir. Fakat kuru

madde oranı agarlı ortamda daha yüksek bulunmuştur. Tütünde ise yaş ağırlık artışı biyoreaktörde agarlı ortamdaki % 76 daha fazla, sabit sıvı ortamda ise 3.6 kat daha fazla bulunmuştur. Kavunda ise sürgün gelişim ortamında sıvı kültürlerde 2.25 kat, sürgün uzama ortamında ise 2.8 kat daha yüksek bulunmuştur. Kuru ağırlık, biyoreaktörde agarlı ortamdaki önemli derecede daha yüksek bulunmuştur.

In vitro koşullarda bitki kültürlerinin üretim için çoğaltılmadan önce veya mevcut germplasm stoklarının kullanılmadan muhafaza edilmesi gerekebilmektedir. *In vitro* koşullarda düşük sıcaklıkta ve düşük ışık yoğunluğunda kısa veya uzun süreli muhafaza yapılmaktadır. Brokoli bitki kültürleri, *in vitro* koşullarda 5 °C ve 10 °C 'de düşük ışık yoğunluğunda kuru madde, klorofil içeriği ve fotosentez kapasitesi azalmaksızın 6 hafta süre ile başarılı bir şekilde muhafaza edilmiştir (Kubota ve ark., 1996). *Prunus virginiana* L., *Amelanchier alnifoli* Nutt. ve *Solanum tuberosum* türlerinin *in vitro* koşullarda 4 °C'de düşük ışık yoğunluğunda kısa süreli (12 hafta) olarak muhafazası sağlanmıştır (Pruski ve ark., 2000). Yine patates bitkileri *in vitro* koşullarda sukroz (40 g/l) ve manitol (20 g/l) içeren besin ortamında 6 °C'de 30 aya kadar alt kültüre alınmaksızın muhafaza edilmiştir (Sarkar ve Naik, 1998).

5. FOTOOTOTROFİK MİKROÇOĞALTIMIN AVANTAJLARI

In vitro koşullarda bitkilerin ortamdaki CO₂'i kullanarak kendileri için gerekli organik maddeleri üretmeleri sistemine dayanan fotoototrofik mikroçoğaltımın klasik mikroçoğaltıma göre birçok avantajı vardır. Bu avantajlar aşağıda sırasıyla verilmiştir.

- 1) Fizyolojik, morfolojik genetik düzensizlikler ve bitkilerin büyümesi kontrol edilebilmektedir.
- 2) Köklendirme ve alıştırma aşamasına transfer kolaylaşmakta ve bu aşamada bitki kayıpları azaltılmaktadır.
- 3) Bitki büyüme düzenleyicilerinin ve şeker gibi diğer organik maddelerin kullanımı minimum düzeye inmekte ve bunların kullanılmaması mutasyon oranlarını azaltmaktadır.
- 4) Bakteriyel ve fungal kontaminasyonlardan dolayı bitki kayıpları azalmaktadır.
- 5) Minimum kontaminasyon riski altında büyük boyutlu kültür kutuları kullanılabilir.
- 6) Büyümeyi ve gelişmeyi sağlayan kültür ortamındaki CO₂, ışık, sıcaklık gibi çevre faktörlerinin dinamik kontrolü yapılabilmektedir.
- 7) Otomasyona, bilgisayar ve robot sistemlerine yatkınlık artmaktadır.
- 8) Üniform büyüme ve gelişme sağlanmaktadır.

Son yıllarda mikroçoğaltımın ticari kullanımı artıkça; yüksek üretim maliyetlerinin azaltılmasını sağlamak ve kaliteli bitki elde etmek amacıyla fiziksel, kimyasal ve biyolojik çevre koşullarının kontrolü daha da önem kazanmıştır. Bu derlemede, mikroçoğaltım sistemlerinde *in vitro* bitki üretimini optimize etmek, hastaliksız bitki üretimini sağlamak ve üretim maliyetlerini azaltmak için besin ortamı faktörleri ve üstten ışıklandırma

yerine yandan ışıklandırma, kültür ortamında CO₂ ilavesi ve O₂'nin kontrolü, şekersiz ortam kullanılarak mutasyon ve kontaminasyonların azaltılması gibi mikroçoğaltımdaki bazı temel uygulamalardaki yeni gelişmeler değerlendirilerek, bitkilerin fotosentez oranlarının artmasında, fizyolojik olarak üniform büyüme ve gelişme göstermesinde ve *in vivo* aşamada kaliteli fide üretiminin sağlanmasında çevre faktörlerinin önemi değerlendirilmiştir.

Kaynaklar

- Aitken-Christie, J., T. Kozai, and S. Takayama, 1995. Automation in Plant Tissue Culture-General Introduction and Overview. J. Aitken, T. Kozai, M. L. Smith (eds.) Automation and Envir. Cont. in Plant Tiss. Cult.. 1-18. Kluwer A. Publ. Netherlands.
- Brar, M.S., M.J., Moore, J.M., Al-Khayri, T.E. Morelock, E.J., Anderson, 1999. Ethylene Inhibitors promote *In Vitro* Regeneration of Cowpea (*Vigna unguilata* L.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology, Vol:35, 222-225.
- Buddendorf-Joosten, J. M. C., E. J. Woltering, 1996. Controlling The Gaseous Composition In Vitro-Description of A Flow System and Effects of The Different Gaseous Components on *In Vitro* Growth of Potato Plantlets. Sci. Hort. 65:11-13.
- Fujiwara, K., T. Kozai, 1995. Physical Microenvironment and Its Effects. J. Aitken-Christie, T. Kozai, and M. Lila Smith (eds.) Automation and Envir. Cont. in Plant Tiss. Cult. Kluwer A. Publ. Netherlands.
- George, E.F., 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part I. The Technology, Second Edition. Exegetics Ltd., England.
- Gönülşen, N. 1987. Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. Ege Tar. Araş. Enst. Müd. Yayın No: 78, s, 137, İzmir.
- Gürel, E., A.U., Türker, 2001. Organogenesis. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (edt.) 374 sayfa, 37-70.
- Hale, S.A., R.E. Young, J.W., Adelberg, R.J., Keese and N:D. Camper, 1992. Bioreactor Development for Continual-

- flow, Liquid Plant Tissue Culture. Acta Horticulturae, 319, Transplant Production System, 107-112.
- Hatipoğlu, R. 1999. Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniv. Zir. Fak. Genel Yayın No: 190, Ders Kitabı Yayın No: A-58, s 176, Adana.
- Hayashi, M., T. Kozai, M. Tateno, K. Fujiwara, Y. Kitaya, 1993. Effects of The Lighting Cycle on The Growth and Morphology of Potato Plantlets *In Vitro* under Photomixotrophic Culture Conditions. *Envir. Cont. Biol.* 31:169-175.
- Jeong, B. R., K. Fujiwara and T. Kozai, 1995. Environmental Control and Photoautotrophic Micropropagation. *Hort. Rev.* (ed. Janick, J.) 17:123-170, John Wiley and Sons Inc.
- Kirdmanee, C., Y. Kitaya, T. Kozai, 1995. Effects of CO₂ Enrichment and Supporting Material *In Vitro* on Photoautotrophic Growth of *Eucalyptus* Plantlets *In Vitro* and Ex Vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31:144-149.
- Kitaya, Y., S. C. Monopatra, C. Kubota, and T. Kozai, 1996. Advantages of Photoautotrophic Micropropagation for Space Agriculture. pp 235-244. In Suge, H. (ed.) Proc. of Workshop on Several Aspects of Plant Growth and Dev. in Space. Nov 17-18, 1995, Japan.
- Kozai, T. Y. Iwanamai, 1988. Effects of CO₂ Enrichment and Sucrose Concentration under High Photon Flux on Plantlet Growth of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) In Tissue Culture during The Preparation Stage. *J. Jpn Soc. Hort. Sci.* 57:679-888.
- Kozai, T., and K. Sekimoto, 1988. Effects of Number of Air Exchanges per Hour of The Closed Vessel and The Photosynthetic Photon Flux on The Carbon Dioxide Concentration Inside The Vessel and The Growth of Strawberry Plantlets *In Vitro*. *Envir. Cont. in Biol.* 26:21-29.
- Kozai, T., N. Nishiuchi, K. Fujiwara, I. Watanabe, 1989. Effects of Planting Density in The Vessel on The Growth and Net Photosynthetic Rates of Potato Plantlets in Photoautotrophic Micropropagation. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 28:244-245.
- Kozai, T. 1991a. Photoautotrophic Micropropagation. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27:47-51.
- Kozai, T. 1991b. Autotrophic Micropropagation. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 17, High-Tech and Micropropagation I (ed. By Y.P.S., Bajaj), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1991, p 313-343.
- Kozai, T. 1991c. Micropropagation under Photoautotrophic Conditions. P. C. Deberg and R. H. Zimmerman (eds.) *Micropropagation*, 447-469.
- Kozai, T. K. Iwabuchi, K. Watanabe, I. Watanabe, 1991a. Photoautotrophic and Photomixotrophic Growth of Strawberry Plantlets *In Vitro* and Changes in Nutrient Composition of The Medium. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 25:107-115.
- Kozai, T., K. Fujiwara, and G. Giacomelli, 1991b. Environmental Control Micropropagation. *Int. Winter Meeting. The Amer. Soc. Agric. Engineers*, 17-20 December, 1991, p 1-13, Chicago, USA.
- Kozai, T., K. Fujiwara, M. Hayashi, and J. Aitken-Christie, 1992. The *In Vitro* Environment and Its Control in Micropropagation. K. Kurata and T. Kozai (eds.), *Trans. Prod. Syst.* 247-282. Kluwer A. Publ. Netherlands.
- Kozai, T. Y. Kitaya, K. Fujiwara, and J. Adelberg, 1995. Environmental Control for Large Scale Production of *In vitro* Plantlets. M. Terzi (eds.) *Current Issues in Plant Mol. and Cellular Biol.* 659-667. Kluwer A. Publ. Netherlands.
- Kozai, T., M. L. Smith, 1995. Environmental Control in Plant Tissue Culture-General Introduction and Overview. J. Aitken-Christie, T. Kozai and Smith, M. L. (eds), *Automation and Envir. Cont. in Plant Tiss. Cult.* Kluwer A. Publ. Netherlands, p 301-318.
- Kozai, T., Y. Kitaya, C. Kubota, R. Kobayashi, S. Watanabe, 1996. Optimization of Photoautotrophic Micropropagation Condition for Sweetpotato (*Ipomea batatas* L. Lam) Plantlets. *Int. Symp. on Plant Prod. in Closed Ecosystems. Automation Cult. and Envir.* pp, 13, Japan.
- Kozai, T., C. Kubota, B. R. Jeong, 1997a. Environmental Control for The Large-Scale Production of Plants through *In Vitro* Techniques. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 51:49-56.
- Kozai, T., N. T. Quynh, and C. Kubota, 1997b. Environmental Control and Its Effects in Transplant Production under Artificial Light. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 38(2):194-199.

- Kubota, C., N. Rajapakse, and R.E., Young, 1996. Low Temperature Storage of Micropropagated Plantlets under Selected Light Environment. *HortScience*, 31(3):449-452.
- Kubota, C., K. Fujiwara, Y. Kitaya, and T. Kozai, 1997. Recent Advances in Environmental Control in Micropropagation. E. Goto et al (eds.) *Plant Prod. in Closed Ecosystems*, Kluwer A. Publ. Netherlands, 153-169.
- Levin, R., R. Stav, Y. Alper, and A. A. Watad, 1997. A Technique for Repeated Non-axenic Subculture of Plant Tissues in A Bioreactor on Liquid Medium Containing Sucrose. *Plant Tiss. Cult. and Biotech.*, 3(1): 41-45.
- Mansuroğlu, S., E. Gürel, 2001. Mikroçoğaltım. *Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (edt.) 374 sayfa, 262-281.
- Marcelis van Acker, C.A.M., K. J. Leutsher, 1993. Effect of Cutting on Heterogeneity and Growth of *Rosa hybrida* cv Montrea and *Scheffera arboricola* cv Compacta. *Sci. Hort.* 54:59-67.
- Morini, S., R. Fortuna, R. Sciutti, and R. Muelo, 1990. Effect of Different Light-dark Cycles on Growth of Fruit Tree Shoots Cultured *In Vitro*. *Adv. Hort. Sci.* 4:163-166.
- Murashige, T., F., Skoog, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497.
- Nguyen, Q.T. and T. Kozai, 1998. Environmental Effects on The Growth of Plantlets in Micropropagation. *Envir. Cont. in Biol.* 36(2) 59-75.
- Nowak, J. S., K. Asiedu, S. Bensalim, J. Richards, A. Steward, C. Smith, D. Stevens, and A. V. Sturz, 1998. From Laboratory to Applications: Challenges and Progress with *In Vitro* Dual Cultures of Potato and Beneficial Bacteria. *Plant Cell, Tiss. and Organ Cult.* 52:97-103.
- Pospisilova, J., J. Solarova, and J. Catsky, 1992. Photosynthetic Response to Stresses during *In Vitro* Cultivation. *Photosynthetica*, 26:3-18.
- Pruski, K., T. Astatkie, M. Mirza, and J. Nowak. 2002. Photoautotrophic Micropropagation of Russet Burbank Potato. *Plant Cell. Tiss. and Organ Cult.*, 69:197-200.
- Pruski, K., T. Kozai, T. Lewis, T. Astatkie, and J. Nowak. 2000. Sucrose and Light Effects on *In Vitro* Cultures of Potato, Chokecherry and Saskatoon Berry during Low Temperature Storage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 63:215-221.
- Sarkar, D., R. Chandra, P. S. Naik, 1997. Effects of Inoculation Density on Potato Micropropagation. *Plant Cell Tiss. and Organ Cult.* 48(1):63-66.
- Sarkar, D., and P. S. Naik. 1998. Factors Affecting Minimal Growth Conservation of Potato Microplants *In Vitro*. *Euphytica.* 102 (2):275-280.
- Takayama, S., M. Akita, 1998. Bioreactor Techniques for Large-Scale Culture of Plant Propagules. *Adv. Hort. Sci.* 12:93-100.
- Tanaka, K., I. Watanable, and N. Shimada, 1991. Effects of O₂ Concentrations on Growth of Photoautotrophically and Photomixotrophically. *Envir. Cont. Biol.* 29:107-116.
- Williams, R. R. 1992. Towards A Model of Mineral Nutrition *In Vitro*. In "Transplant Production System" (ed. By Kurata, K., Kozai, T.). Kluwer A. Publ. Netherlands, p 213-229.
- Williams, R. R. 1995. The Chemical Microenvironment. In "Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture" (ed. by Aitken-Chirstie, J. Kozai, T., Smith, M. A. L.). Kluwer A. Publ. Netherlands, p 405-439.
- Woltering, E. J. 1990. Beneficial Effects of Carbon Dioxide on Development of Gerbera and Rose Plantlets Grown *In Vitro*. *Sci. Hort.* 44:341-345.
- Yang, C. S., T. Kozai, and B. R. Jeong, 1995. Ionic Composition and Strength of Culture Medium Affect Photoautotrophic Growth, Transpiration and Net Photosynthetic Rates of Strawberry Plantlets *In Vitro*. *Acta Hort.* 393:219-226.
- Yu, Q. 1998. Automatisation in Micropropagation Systems. Helsinki Univ. Finland.
- Ziv, M. G. Meir, and A. H. Halevy, 1983. Factors Influencing The Production of Hardened Glaucous Carnation Plantlets *In Vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2:55-65.