

1.DERS

Bitki Doku Kùltùrleri

Bitki organ, doku, hücre ve protoplastlarının (eksplant) steril (aseptik) şartlarda, yapay besin ortamları üzerinde, kontrollü koşullarda kùltüre alınmasıdır.

Bitki doku kùltùrleri *in vitro* koşullarda yapılmaktadır.

“*In vitro*” Latince bir kelime olup tam karşılığı “cam içerisinde” dir.

Biyolojide “*in vitro*” kelimesi “laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda” anlamında kullanılmaktadır.

- Doku kùltùrlerinin esası biyolojinin ilkelerinden birisi olan “**totipotensi**” kavramına dayanmaktadır.
- Totipotensi, her canlı hücrenin tam bir organizma oluşturma potansiyeline sahip olmasıdır. Çünkü her hücre bunun için ihtiyaç duyulan genetik bilginin tamamına sahiptir.
- Sürgün ve köklerin uç kısımlarında büyüme noktalarındaki meristematik hücreler ya da zigot gibi hücreler diğer hücrelere göre daha totipotentir.

Doku Kùltùrlerinin Uygulandığı Alanlar

1- Bitki Islahında Uygulama Alanları

Embriyo kùltürü
Anter ve ovül kùltürü (in vitro haploidi tekniği)
Somaklonal varyasyon
İn vitro seleksiyon
İn vitro çiçeklenme, çiçek tozu üretimi, dölleme
İn vitro germlazm muhafazası
Gen transferi

2- Bitki Çoğaltımında

Virüsten ari bitki üretimi
Mikroçoğaltım
Sentetik tohum üretimi (somatik embriyolar)

3- Diğer Uygulama Alanları

Sekonder metabolit üretimi
Kimeralar
Temel araştırmalar (beslenme, sitogenetik, morfogenezis çalışmaları gibi)

BİTKİ DOKU KÙLTÜRLERİNDE STERİL (ASEPTİK) KOŞULLARIN SAĞLANMASI

1) Çalışma mekanının havasının ve yüzeylerinin mikroorganizmalardan arındırılması:

- Doku kùltùrlerinde eksplantlar laminar flow (steril kabin) içerisinde kùltüre alınmaktadır. Yani çalışma mekanını farklı büyüklüklerde ve tiplerde olan bu cihazlardır.
- Kabine takılı olan HEPA filtre, havadaki 0.3µ ve daha büyük mikroorganizmaları cihaz çalıştığı sürece tutmaktadır.
- HEPA filtrelerin mikroorganizmalardan arındırdığı hava kabin içerisine yani eksplantların kùltüre alındığı mekana verilmektedir. Bu sayede çalışma mekanının havası yaklaşık 15 dakikada mikroorganizmalardan tamamen arınmaktadır.

- Hepa filtreler cihazın çalıştırılma süresine bağlı olarak işlevini yitirdiğinden değiştirilmek zorundadır. Aksi takdirde kabinde aseptik koşullar sağlanamamaktadır.
- Cihazda çalışmanın yapıldığı yüzeylerin her çalışmadan önce ve çalışma sırasında %70'lik etil alkol ya da uygun bir sterilizasyon maddesi kullanılarak silinmesi gerekmektedir. Böylece yüzeyde bulunan mikroorganizmalar ortadan kaldırılmalıdır.
- Ayrıca kültür kabı ve benzerleri kabine alınmadan önce üzerlerine %70'lik etil alkol püskürtülmelidir.

2) Eksplantların kültüre alınması sırasında kullanılan pens, penset, bistüri vb. aletlerin mikroorganizmalardan arındırılması:

- Pens, bistüri gibi aletler yakılarak ya da elektrikli özel sterilizatörler ile mikroorganizmalarından arındırılmaktadır.
- Yakma işlemi kabin içerisine takılı doğal gaz vb. ile çalışan bir alev makinasında, alev oluşturulabilen taşınabilir ya da fiilli bir cihaz kullanılarak yapılabilir.
- Yakma işleminin etkinliğinin artırılması için pens, bistüri vb. önce %96-99'lük etil alkol içerisine daldırılır, daha sonra alevden geçirilir ve taşıyıcı bir destek üzerine özellikle uç kısımları herhangi bir yere dokunmayacak şekilde soğuması için bırakılır.
- Alkol yanıcı özellikte bir madde olduğundan yangın çıkmasına karşı dikkatli olunmalı, kabin içinde alkol alevden uzak tutulmalı ve hiçbir zaman sıcakken pens ve bistüriler alkol içerisine daldırılmamalıdır.

3) Besin ortamlarının mikroorganizmalardan arındırılması:

- Besin ortamları otoklavda 121oC sıcaklıkta yüksek basınç altında (1.05 kg/cm²) belirli bir süre tutularak ya da por genişliği 0.22µ olan filtrelerden geçirilerek steril kaplar içerisine süzme yoluyla mikroorganizmalarından arındırılmaktadır.
- Besin ortamlarının otoklavda tutulma süreleri hacimleri ile ilişkilidir. Sterilizasyon işlemi başladıktan sonra örneğin 20-50 ml hacimdeki besin ortamı için 20 dakikalık süre yeterli olabilmektedir.
- Özellikle ısıya hassas olan maddelerin (büyümeyi düzenleyici maddeler gibi) filtre sterilizasyonundan sonra otoklanmış ve sıcaklığı yaklaşık olarak 35-45oC'ye inmiş besin ortamına ilave edilmesi önerilmektedir.

4) Kültür kapları, kağıt, cam plakalar, saf su vb. maddelerin mikroorganizmalardan arındırılması:

- Otoklavlanan besin ortamları steril kabin içerisinde kültür kaplarına dökülecek ise bu kültür kaplarının önceden mikroorganizmalarından arındırılmış olması gerekmektedir.
- Tek kullanımlık steril plastik kaplar hazır alınabilir.
- Eğer çok kez kullanılabilir özellikteki kaplar bu iş için kullanılacak ise bunların otoklavda 121oC'de yüksek basınç altında (1.05 kg/cm²) 1-1.5 saat tutularak ya da yaklaşık 200oC'deki fırınlarda 2-4 saat bekletilerek mikroorganizmalarından arındırılması gerekmektedir.
- Kabin içerisinde eksplantların dikime hazırlanması için üzerine alınacağı kağıt, cam vb. plakaların da yukarıda belirtilen yöntemlerden biri ile mikroorganizmalarından arındırılması gerekmektedir.
- Çeşitli amaçlar için aseptik koşullarda kullanılacak steril saf suyun sterilizasyonu otoklavda (121oC, 1.05 kg/cm²) en az 1 saat tutularak sağlanmalıdır.

5) Başlangıç aşamasında dışarıdan alınan eksplantların mikroorganizmalardan arındırılması:

Yüzey sterilizasyonu: Çoğu kez sadece yüzey sterilizasyon ile eksplantlar mikroorganizmalarından arındırılabilir.

- Eksplantlar genellikle sodyum hipoklorit solusyonu kullanılarak mikroorganizmalarından arındırılmaktadır.
- Bu amaçla sodyum hipokloritin %5 aktif madde içeren ticari markalarından hazırlanacak %10-20'lik solusyonlar içerisinde eksplantlar 5-30 dakika süreyle çalkalanmaktadır.

- Uygulama süresi eksplantın tipine (taze sürgün ucu, yaprak, çiçek, tomurcuk, kök, tohum, yumru, soğan vb.), bitki tür ve çeşidine göre değişmektedir.
- Ardından bu maddenin dokulardan uzaklaştırılması için en az 3 kez 5'er dakika süreyle önceden steril hale getirilmiş saf su ile aseptik koşullarda (steril kabinde) eksplantlar çalkalanmalıdır.
- Eksplantların sterilizasyonunda sodyum hipokloritten başka kalsiyum hipoklorit (%9-10; 5-30 dakika), oksijen peroksit (%3-12; 5-15 dakika), gümüş nitrat (%1; 5-30 dakika), civa klorür (%0.1-1; 2-10 dakika), etil alkol (%70-96; 0.1-5 dakika) gibi maddeler de kullanılabilir.
- Uygulamalardan sonra bu kimyasal maddelerin de bitki dokularından uzaklaştırılması için eksplantlar yukarıda belirtildiği gibi steril saf su ile çalkalanmalıdır.
- Sterilizasyonu güç olan eksplantlarda yukarıdaki yöntemlerin 2'si birbiri ardından uygulanabilmektedir.
- Yüzey gerilimini azaltarak dezenfektanların eksplanta daha iyi temas etmesini sağlamak için Tween 20 ya da 80 gibi maddeler sterilant maddeler içerisine 1-2 damla ilave edilebilmektedir.

İçsel sterilizasyon:

- Kimi zaman eksplantların iç dokuları da mikroorganizmalar ile bulaşık olabilmektedir. Eksplantların, yüzey sterilizasyonunun ardından besin ortamına dikilmesinden bir süre sonra kontaminasyon sorunu ortaya çıkmaktadır. Bu durumda mikroorganizmanın tanımlanmasından sonra besin ortamına etkili olabilecek antibiyotik, sistemik fungusit ya da özel formülasyona sahip karışımların (örneğin, PPM-Plant Preservative Mixture) ilave edilmesi gerekebilir.