

3. DERS – SÜRGÜN UCU, TOMURCUK, BOĞUM VE MERİSTEM KÜLTÜRLERİ

SÜRGÜN UCU KÜLTÜRÜ:

Aktif dönemdeki taze sürgünlerin büyüme konisini içerecek şekilde 1-2 cm uzunluğundaki uç kısımlarının yapay besin ortamı üzerinde aseptik koşullarda kültüre alınarak bitkiye dönüştürüldüğü bir *in vitro* tekniktir.

TOMURCUK VE BOĞUM KÜLTÜRÜ:

Aktif ya da dinlenme dönemindeki sürgünlerden izole edilen tepe ya da koltuk altı tomurcukların, yalnız başına ya da üzerinde bulunduğu dal parçası ile birlikte yapay besin ortamı üzerinde aseptik koşullarda kültüre alınarak bitkiye dönüştürüldüğü bir *in vitro* tekniktir.

Sürgün Ucu, Tomurcuk ve Boğum Kültürlerinin Kullanım Alanları:

1- Mikro Çoğaltım: Bu amaçla sürgün ucu ve tomurcuk kültürlerinden yararlanılabilmektedir. Bununla birlikte embriyo, yaprak, kök, yumru, soğan, kallus, hücre kültürleri, mikro aşılama ve somatik embriyogenesis de mikro çoğaltım amacıyla kullanılabilmektedir.

2- Germplasm Muhafazası: Genetik materyalin *in vitro* koşullarda korunması kapsamında sürgün ucu ve tomurcuk kültürlerinden yararlanılabilmektedir. Bu amaçla örneğin somatik embriyogenesis de kullanılabilmektedir.

4- Gen Aktarımı: Bazı türlerde bu kültürler gen transferi çalışmalarında kullanılabilmektedir. Bu kültürlerin esas alındığı gen aktarımı çalışmalarında transformasyon frekansı düşük olabilmekte ve kimerik transgenik bitkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle gen transferinde yaygın olarak yaprak diskleri ve somatik embriyolar kullanılmaktadır.

Sürgün Ucu, Tomurcuk ve Boğum Kültürlerinde Başarıyı Etkileyen Faktörler:

1- Bitkisel materyal:

- **Eksplantın büyüklüğü:** Eksplantın boyutu çok küçük olduğunda (örneğin 1mm), yaşama şansı 5-10mm olana göre azalmaktadır.

- **Donör bitkinin durumu:** Eksplantın alındığı bitkinin (donör bitki) yaşı, içinde bulunduğu fizyolojik durum (aktif ya da dinlenme halinde oluşu), eksplantın alındığı kaynak (apikal ya da aksiller-koltuk altı tomurcuklar) kültürlerde de başarıyı etkilemektedir.

- **Genotip:** Genotiplerin rejenerasyon yetenekleri birbirinden farklı olabilmektedir. Bu durum kültürlerin başarısını etkilemektedir.

2- Besin ortamının yapısı:

- Sürgün ucu, tomurcuk ve boğum kültürlerinde en yaygın kullanılmakta olan temel besin ortamı Murashige ve Skoog ortamıdır. Bitki tür ve çeşitlerine bağlı olarak kimi zaman bu besin ortamının makro element düzeyi $\frac{1}{2}$ kuvvetinde kullanılabilmektedir. MS ortamı dışında diğer temel besin ortamlarının esas alındığı çalışmalar da bulunmaktadır.
- Temel besin ortamlarına sitokinin ve düşük dozlarda oksin ilave edilmesi sürgün oluşumunu ve gelişimini artırmaktadır. Mikro sürgünlerin boğum aralarını uzatarak onların uzunluklarının artırılması amacı ile de GA₃ kullanılabilmektedir.
- Şeker kaynağı olarak genellikle %3 oranında sakkaroz önerilmektedir.
- Ortamlar %0.6-0.7 dozunda agar ile yarı katı duruma getirilmekte ya da sıvı besin ortamları kullanılabilmektedir. Yaygın olarak yarı katılaştırılmış ortamlar esas alınmaktadır.

3- Kültür koşulları:

- Kültür koşulları tür ve çeşitlere bağlı olarak değişebilmektedir. Genellikle kültür odalarında 25oC sıcaklık düzeyi, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık uygulaması ve 4000 lüks değerindeki aydınlatma kullanılabilmektedir.

Sürgün ucu, Tomurcuk ve Boğum Kùltürlerinin Uygulanışı:

- Sürgün ucu kùltürü için donör bitkinin aktif olarak gelişmekte olan taze sürgünlerinin yaklaşık 2 cm'lik uç kısmı, tomurcuk kùltürü için aktif ya da dinlenme döneminde bulunan dallardan apikal ya da aksillar (koltuk altı) tomurcukları 2-3 cm uzunlukta bir sürgün parçası ile birlikte alınarak laboratuvara getirilir,
- Sterilizasyon için önce akan musluk suyu altında yıkama, aseptik koşullarda %70'lik etil alkol içerisine 10-30 saniye daldırma, ardından sodyum hipoklorit solusyonunda 10-20 dakika bekletme ve steril saf su ile 5'er dakika 3 kez çalkalama yapılır.

Sürgün Ucu ve Tomurcuk Kùltürleri ile Mikro Çoğaltımın Aşamaları:

Dört aşaması bulunmaktadır. Bunlar:

- 1- Başlangıç (ilk kùltür) aşaması,
- 2- Sürgün çoğaltma aşaması (alt kùltürler),
- 3- Köklendirme aşaması ve
- 4- Dış koşullara alıştıırma aşamasıdır.

1- Başlangıç Aşaması:

- Aseptik koşullarda sürgün ucu kùltürü için yaklaşık 1 cm uzunlukta sürgün uçları; tomurcuk kùltürü için üzerinde tomurcukları taşıyan sürgün parçaları (boğum) 1-2 cm uzunlukta kesilerek ya da sadece tomurcuklar koparılarak daha önceden hazırlanmış besin ortamına dikilir.
- Bu aşama eksplantların kùltür koşullarına ilk alındığı aşamadır, 3-4 hafta devam eder. Bu aşamada amaç, eksplantların kùltüre alınması ve rejenerasyonun (sürgün oluşumu) sağlanmasıdır.
- Temel besin ortamına özellikle sitokininler (0.05-10 μM dozlarında) ve çoğu kez düşük dozlarda oksinler (0.05-5 μM dozlarında) ilave edilir.
- Genel olarak bu aşamada sürgün çoğaltımı hedeflenmemektedir.
- İnkübasyon genellikle 25°C sıcaklık ve 16 saat aydınlık koşullarda gerçekleştirilir.
- Bu aşamanın sonunda elde edilen sürgünler çoğaltma (proliferasyon) ortamlarına transfer edilir.

2- Sürgün Çoğaltma Aşaması:

- Başlangıç aşamasından alınan sürgünlerin bol miktarda çoğaltımının amaçlandığı aşamadır.
- İn vitro sürgünler 3-4 hafta aralıklarla aseptik koşullarda alt kùltürlere alınmaktadır.
- Bu aşamada da temel besin ortamlarına özellikle sitokininler (0.05-10 μM) ve çoğu kez düşük dozlarda oksinler (0.05-5 μM) ilave edilir.
- Genel olarak bu aşamada sürgün çoğaltımı hedeflenmektedir.
- İnkübasyon 25°C sıcaklık ve 16 saat aydınlık koşullarda gerçekleştirilir.

3- Köklendirme Aşaması:

- Yeterli sayıda çoğaltılan sürgünlerin *in vitro* ya da *ex vitro* koşullarda köklendirildiği aşamadır.
- Bu aşamada oksinlerin (örneğin NAA, IBA, IAA) kullanımı köklenme oranını yükseltmektedir. Oksinler, 0.1-10 μM dozlarında,
 - Temel besin ortamına katılarak,
 - Sürgünlerin dip kısımlarına hızlı ya da yavaş daldırma yöntemi ile uygulanabilmektedir.
- Köklenme oranı, oksin uygulamalarının yanında temel besin ortamının makro element düzeyini $\frac{1}{2}$ ya da $\frac{1}{4}$ oranlarında azaltarak, başlangıçta kùltürlere 7-10 gün karanlık uygulaması yaparak, besin ortamına aktif kömür katarak (örneğin 2 g/L) artırılabilir.
- Bazı çalışmalarda sürgünler yüksek oksin içeren besin ortamları üzerinde 1 hafta kùltüre alınmakta ve daha sonra hormonsuz ortama transfer edilmektedir.

- Köklenme sonuçları 1-2 ayda alınmaktadır. İnkübasyon bu aşamada da 25°C sıcaklık ve 16 saat aydınlık koşullarda gerçekleştirilir.

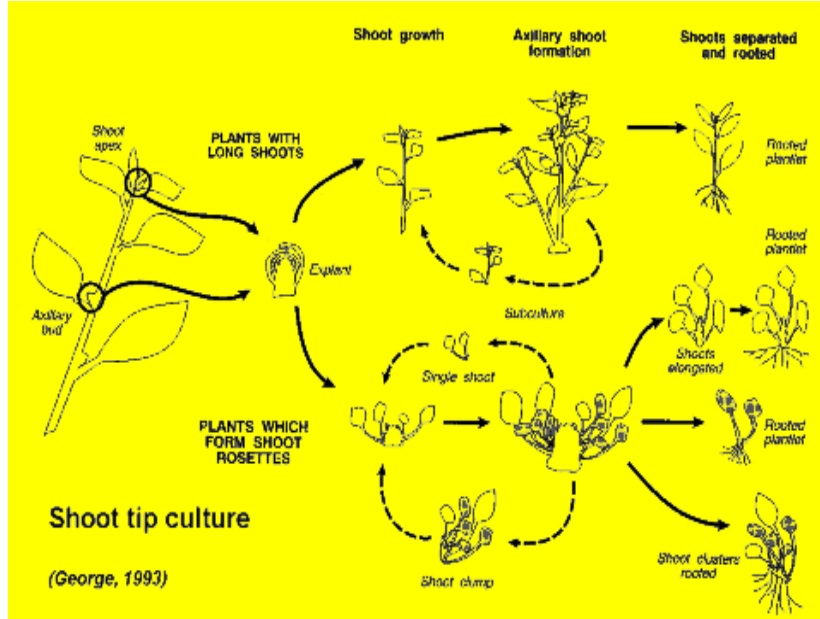
4- Aklimatizasyon Aşaması:

- Köklenmiş sürgünlerin dış koşullara alıştırdığı aşamadır.

- *In vitro* koşullardan alınan köklenmiş sürgünler önce yıkanarak agar ve şeker kalıntılarından temizlenir ve torf, perlit, vermikulit, sfagnum yosunu, kum ve/veya bahçe toprağı karışımlarını içeren viyollere, küçük saksılara ya da jiffy potlara dikilir.

- Mist ya da fog sistemine sahip olan ve plastik örtü ile kaplı alçak tünellerin bulunduğu seralarda yavaş yavaş dış ortamın nem düzeylerine kontrollü olarak alıştırılır.

- Dış koşullara alıştırma ve serada geliştirme aşamaları 1-3 ay sürer.



Şekil. Sürgün ucu kültürü

SOMAKLONAL VARYASYON

- Doku kültürlerinde ortaya çıkan kalıtsal değişikliklerin tümü “somaklonal varyasyon” olarak tanımlanmaktadır
- Mikroçoğaltım, bir eşeysiz (klonal) çoğaltım şekli olmakla birlikte kültürlerde beklenmeyen ve kontrol edilemeyen varyasyonlar ortaya çıkabilmektedir.
- Somaklonal varyasyon, çoğaltımı yapılan genotipin, ana eksplant kaynağından (asıl genotipten) genetik olarak farklılaşması olduğu için klonal çoğaltımın temel ilkesine aykırıdır. Bu nedenle mikroçoğaltımda somaklonal varyasyon kesinlikle istenmez.
- Ancak bu varyasyonlar bitki ıslahında büyük önem taşımaktadır. Çünkü ıslah için genetik farklılığın yaratılması önemlidir.
- Somaklonal varyasyon üzerine genotip, eksplant kaynağı, kültür tipi, ortam bileşimi, bitki büyüme düzenleyicileri, inkübasyon koşulları, doku tipi ve kültür uzunluğunun etkileri önemlidir.
- Doku kültürlerinde somaklonal varyasyon fenotipik (morfolojik) gözlemler, sitolojik ve moleküler analizler ile ortaya çıkarılabilmektedir.
- Morfolojik olarak *in vitro* sürgünlerde yaprak şekillerinde belirgin anormallikler, renkte değişim, cüceleşme;
- Sitolojik olarak kromozom sayılarında değişimler somaklonal varyasyona örnek olarak verilebilir.

- Moleküler teknikler ile örneğin alt kültürlerdeki mikro sürgünlerden alınan DNA örneklerinde SSR analizinin yapılmasıyla genotipte somaklonal varyasyonun ortaya çıkıp çıkmadığı belirlenebilmektedir.

MERİSTEM KÜLTÜRÜ:

Virüsten ari bitkisel materyal elde etmek üzere meristemin uç kısmının (1mm'den küçük) yapay besin ortamı üzerinde aseptik koşullarda kültüre alınarak bitkiye dönüştürüldüğü bir in vitro tekniktir.

Meristem Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler:

1- Bitkisel materyal:

- **Eksplantın büyüklüğü:** Meristem kültürü için henüz gelişmemiş birkaç yaprak taslağı ile birlikte meristematik kubbeden oluşan 1 mm'den küçük eksplanlar kullanılmaktadır. Bu eksplantların 0.2-0.5 mm arasında olması virüs eliminasyonunda başarıyı artırmaktadır.
- **Donör bitkinin durumu:** Eksplantın alındığı bitkinin (donör bitki) yaşı, içinde bulunduğu fizyolojik durum, eksplantın alındığı kaynak meristem kültürlerinde de başarıyı etkilemektedir.
- **Genotip:** Genotiplerin rejenerasyon yetenekleri birbirinden farklı olabilmektedir. Bu durum meristem kültürünün başarısını etkilemektedir.

2- Besin ortamının yapısı:

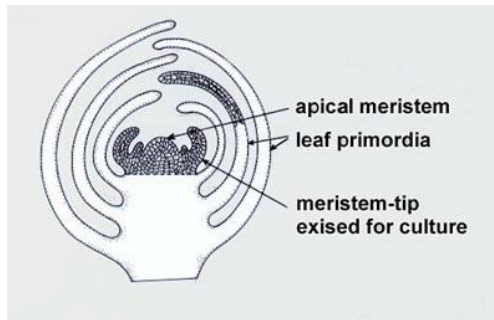
- Meristem kültürlerinde en yaygın kullanılmakta olan temel besin ortamı Murashige ve Skoog ortamıdır. MS ortamı dışında diğer temel besin ortamlarının esas alındığı çalışmalar da bulunmaktadır.
- Temel besin ortamlarına sitokinin, düşük dozlarda oksin ve GA₃'ün ilave edilmesi sürgün oluşumunu ve gelişimini artırmaktadır.
- Şeker kaynağı olarak meristem kültürlerinde de genellikle %3 oranında sakkaroz önerilmektedir.
- Ortamlar %0.6-0.7 dozunda agar ile yarı katı duruma getirilmekte ya da sıvı besin ortamları kullanılabilir. Yaygın olarak yarı katılaştırılmış ortamlar esas alınmaktadır.

3- Kültür koşulları:

- Meristem kültürlerinde de kültür koşulları tür ve çeşitlere bağlı olarak değişebilmektedir. Genellikle kültür odalarında 25°C sıcaklık düzeyi, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık uygulaması ve 4000 lüks değerindeki aydınlatma kullanılabilir.

Meristem Kültürünün Uygulanışı:

- Dinlenmede olmayan donör bitkiden sürgün kısımları alınarak aboratuara getirilir,
- Sterilizasyon için önce akan musluk suyu altında yıkama, aseptik koşullarda %70'lik etil alkol içerisine 10-30 saniye daldırma, ardından sodyum hipoklorit solusyonunda 10-20 dakika bekletme ve steril saf su ile 5'er dakika 3 kez çalkalama yapılır,
- Aseptik koşullarda binoküler stereomikroskop altında sürgünlerden meristem ucu (1mm'den küçük ve genellikle 0.5 mm'den küçük) kesilerek daha önceden hazırlanmış besin ortamına dikilir,



Şekil. Meristem kültürleri için eksplantın alındığı yer

- Yaklaşık 3-4 hafta meristemlerin canlılığı ve sürgün gelişimi izlenir ve bu sürenin sonunda elde edilen sürgünlerde virüs testleri yapılır,
- Virüsten ari bitki üretimi için in vitro koşullarda mikro çoğaltım aşamasına geçilir.
- Virüs ile bulaşık bitkilerden virüsü elimine etmek üzere sadece meristem kültürünün uygulanması yeterli olmayabilir. Bu durumda meristem kültürü ile birlikte termoterapi (sıcaklık uygulaması) işlemi yapılır. Bu işlemde sıcaklık;
 - 1- Donör bitkilere,
 - 2-Meristemlerin kültüre alınmasından önce tomurcukların bulunduğu sürgünlere,
 - 3- Kültüre alınan meristemlere uygulanabilir.
- Genellikle 30-38°C sıcaklıkta 4-6 hafta termoterapi uygulanmış bitki kısımlarından meristem kültürlerinin yapılması ile virüsten ari bitki elde etmede başarılı sonuçlar alınmaktadır.
- Bazı araştırmacılar kemoterapi (kimyasal madde kullanımı) teknikleri ile birlikte meristem kültürünü kullanarak virüsten ari bitki elde etmişlerdir.
- Bu amaçla virüsün replikasyonunu engelleyen ya da virüs hareketini önleyen antiviral bileşikler kültür ortamına ilave edilmektedir. Bu antiviral ajanlardan en yaygın kullanılanı Ribavirin'dir. Bu maddenin yüksek dozlarında virüs eliminasyonu artmaktadır, ancak 20-50 mg/l'nin üzerindeki dozları büyümeyi azaltmakta ve bitki dokusu için fitotoksik etki göstermektedir.
- Krayoterapi (soğuk uygulaması) ile birlikte meristem kültürünün uygulanması da virüsten ari bitki üretiminde araştırılan bir konudur. Örneğin 5oC'de 4-7.5 ay bırakılan krizantem bitkisinden alınan meristemlerin kullanılması ile virüs eliminasyonunda başarılı sonuçlar alınmıştır.