

MİKRO ÇOĞALTIM

- Doku kültürü yoluyla çoğaltım mikro çoğaltım olarak adlandırılmaktadır.
- Bahçe bitkilerinde doku kültürü ile çoğaltım bazı meyve türlerinin (örneğin, kivi, muz, mavi yemiş gibi üzüksü meyveler), klon anaçların büyük çoğunluğunun ve ekonomik değeri yüksek süs bitkilerinin (örneğin, orkide) ve ayrıca virüsten arındırılmış çeşitlerin (örneğin, asmada) kitlesel (çok miktarda) çoğaltımında tüm dünyada ve özellikle gelişmiş ülkelerde ticari anlamda yoğun olarak kullanılmaktadır.
- Mikro çoğaltım, bitkilerin *in vitro* koşullarda çoğaltılmasıdır.
- “*In vitro*” Latince bir kelime olup tam karşılığı “cam içerisinde” dir.
- Biyolojide “*in vitro*” kelimesi “laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda” anlamında kullanılmaktadır.
- Buna göre mikro çoğaltım, 1) hücre, doku, organ gibi bitki kısımlarının (eksplant), 2) içerisinde yapay besin ortamı bulunan ve ışığı geçirebilen kapalı kaplarda, 3) tamamen aseptik koşullarda kültüre alınması, 4) bu kültürlerin kontrollü koşullarda sürgün ve daha sonra kök oluşumuna yönlendirilmesi, 5) son aşamada da *in vitro* bitkiciklerin dış koşullara (*ex vitro*) alıştırılması ve geliştirilmesi ile tamamlanan bir çoğaltım şeklidir.
- Mikro çoğaltım uygulamaları dış koşullara (*ex vitro*) alıştırma ve bazen köklendirme aşamaları dışında tamamen aseptik (steril, mikroorganizmalardan arı) koşullarda gerçekleştirilmektedir.
- Çalışma ortamında aseptik koşullar laminar flow ya da steril kabin denilen ve sahip olduğu HEPA filtre sayesinde çalışma ortamının havasındaki 0.3µ ve daha büyük mikroorganizmaların tutulduğu kabinler ile sağlanmaktadır.
- Pens, penset, bistüri gibi aletler yakılarak ya da özel sterilizatör ile mikroorganizmalarından arındırılmaktadır.
- Besin ortamları otoklavda (1 atm. Basınç ve 121°C’de yaklaşık 20 dakika) tutularak ya da filtreden (yaklaşık por genişliği 0.2µ) geçirilerek mikroorganizmalarından arındırılmaktadır.
- Ayrıca steril besin ortamlarının konulacağı kapların da steril olması gerekmektedir.
- Eksplantlar ise yaygın olarak ticari sodyum hipoklorit ya da kalsiyum hipokloritin %10-20’lik solüsyonları ile dezenfekte edilmektedir. Bu amaçla bakır sülfat, oksijen peroksit gibi kimyasal maddeler de kullanılabilir. Uygulamalardan sonra kimyasal maddelerin bitki dokularından uzaklaştırılması için çalkalamalarda da steril saf su (1 saatten fazla otoklavlanmış) kullanılmaktadır.

Mikro Çoğaltımın Avantajları:

- 1- Spesifik klonların kitlesel çoğaltımı,
- 2-Köklenme, çimlenme zorluğu gibi nedenlerle diğer yöntemlerle çoğaltılamayan bitkilerin çoğaltılabilmesi,
- 3- Patojenlerden arı bitkilerin çoğaltımı,
- 4- Hibrit tohum üretimi için ebeveyn bitkilerin klonal çoğaltımı,
- 5- Yıl boyunca anaç vb. üretimi,

6- Germplazmın (genetik kaynakların) korunması.

Mikro oğaltımın Dezavantajları:

1- Pahalı oluşu,

2- Yüksek bilgi birikimine olan gereksinimi,

3- Yoğun emek gerektirmesi,

4- Özellikle besin ortamlarının büyüme düzenleyici madde bileşimi ve konsantrasyonuna bağlı olarak zaman içerisinde genetik yapıda ortaya çıkabilecek değişimler.

- Mikro çoğaltımın esası da 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 totipotenttir.
- Mikro çoğaltımda, eksplant (bitki kısmı) olarak dölleme sonucu oluşmuş bir hücre, doku, organ ya da kısımları (zigot, embriyo, tohum gibi) kullanılırsa bu bir generatif çoğaltım tekniği; somatik hücre, doku ya da organ kısımları (sürgün ucu, tomurcuk, yaprak, kök, yumru, soğan, somatik embriyo gibi) kullanıldığında ise bir vegetatif çoğaltım tekniğidir.
- Buna göre mikro çoğaltım bazı doku kültürü teknikleri kullanılarak yapılan bir oğaltımdır.
- Bu amaçla kullanılan başlıca doku kültürü teknikleri, **sürgün ucu kültürü, tomurcuk kültürü, kök kültürü, somatik embriyogenesis, mikro aşılama, embriyo kültürü, tohum kültürüdür.**
- Virüsten ari bitki çoğaltımında meristem kültürü ve mikro aşılama gibi doku kültürü tekniklerinden de yararlanılmaktadır. Ayrıca bazı özel amaçlar (ıslah vb.) için hücre kültürü ve kallus kültürü gibi diğer yöntemler de kullanılabilir.
- Tohumunda besin dokusu bulunmadığı için doğada çimlenmesi besin sağlayan funguslar ile simbiyotik yaşantısına bağlı olan orkide, tohumlarının aseptik koşullarda yapay besin ortamında kültüre alınması ile yani mikro çoğaltım yöntemiyle çimlendirilerek tam bir bitkiye dönüşümü sağlanabilmektedir. Mikro oğaltım içerisinde bu bir generatif çoğaltım şeklidir.
- Bununla birlikte bahçe bitkilerinde mikro çoğaltım daha çok başlangıç aşamasında eksplant olarak büyüme özelliğine sahip somatik dokuların (özellikle sürgün ucu) kültüre alınması ile gerçekleştirilen yoğun bir klonal çoğaltım tekniğidir.

Mikro çoğaltımın aşamaları:

Mikro çoğaltımın 4 aşaması bulunmaktadır. Bunlar:

1- Başlangıç (ilk kültür) aşaması,

2- Sürgün oğaltım aşaması,

3- Köklendirme aşaması ve

4- Dış koşullara alıştırma aşamasıdır.

1. Aşama - Başlangıç (ilk kültür) aşaması:

- Bu aşamanın amacı eksplantları kontaminasyon olmadan aseptik kültür koşullarına başarıyla almak ve *in vitro* koşullarda eksplantlardan ilk sürgün oluşumunu sağlamaktır. Mikro çoğaltımda eksplant kaynağı olarak en fazla kullanılan bitki kısımları sürgün ucu, tomurcuk, yan tomurcuk ile birlikte boğumlar, soğan, yumru gibi organ parçaları, köklerdir. Buna göre kültürün adı sürgün ucu kültürü, tomurcuk kültürü, boğum kültürü, kök kültürü gibi isimler almaktadır.
- Bu aşamada eksplantlar adına doğru, hastalık ve zararlılar ile bulaşık olmayan, yapacağımız kültüre göre uygun gelişme aşamasındaki bitkilerden (ana kaynak) alınmalıdır.
- Kültüre alınmadan önce dışsal enfeksiyon kaynaklarının (mikroorganizmalar) eksplantlardan uzaklaştırılması için dezenfeksiyon işlemi yapılmaktadır. Dezenfeksiyon önce suda yıkama ve daha sonra alkol, bakır sülfat, sodyum hipoklorit gibi kimyasal maddeler kullanılarak yapılabilir. Mikroorganizmalar soğan, yumru gibi dayanıklı organların alevden geçirilmesi ile de uzaklaştırılabilir.
- Her zaman karşılaşmamakla birlikte eksplantta içsel enfeksiyon sorunu ile karşılaşılırsa uygun sistemik fungusitler, antibiyotikler, PPM (Plant Preservative Mixture) gibi maddeler de besin ortamına katılarak kullanılabilir.
- Eksplantlar yapay besin ortamı üzerinde kültüre alınmaktadır.
- Besin ortamı farklı araştırmacıların önerdikleri reçetelere ve daha önce yapılmış araştırmaların sonuçlarına göre makro ve mikro besin elementlerini, vitaminleri, amino asitleri, sitokinin, gibberellik asit, oksin gibi büyümeyi düzenleyici maddeleri, enerji kaynağı olarak şekeri içermelidir. Genellikle pH'sı 5.5-5.8'e ayarlanan besin ortamını yarı katı hale getirmek için agar gibi katılaştırıcı maddeler de ilave edilmelidir. Çünkü eksplantların oksijene ihtiyacı olduğu için bir kısmının besin ortamının üzerinde kalması, yani tamamen besin ortamına batmaması gerekmektedir. Bununla birlikte özel destek düzeneklerine sahip kaplar kullanıldığında ya da çalkalayıcılar üzerinde inkübasyon koşulları sağlandığında eksplantlar sıvı besin ortamlarında da kültüre alınabilmektedir.
- Hazırlanan besin ortamı mikroorganizmalardan arındırılmak üzere otoklavda 1 atmosfer basınç altında 121°C sıcaklıkta örneğin 20 dakika süreyle sterilize edilmelidir.

2. Aşama - Sürgün çoğaltma aşaması:

- Bu aşamanın amacı 3-4 hafta arayla mikro sürgünlerin alt kültüre alınması yoluyla köklendirme için gerekli olan sayıda sürgün çoğaltımını sağlamaktır.
- Bu aşamada da genellikle başlangıç aşamasındaki besin ortamına benzer bileşimde bir ortam hazırlanmaktadır. Hem başlangıç ve hem de çoğaltma aşamalarında büyümeyi düzenleyici maddelerden sitokininin oranı oksin oranından daha yüksektir. Bazen oksin hiç kullanılmamaktadır. Bu amaçla benzil adenin (0.5-1 mg/l) en fazla kullanılan sitokininidir.

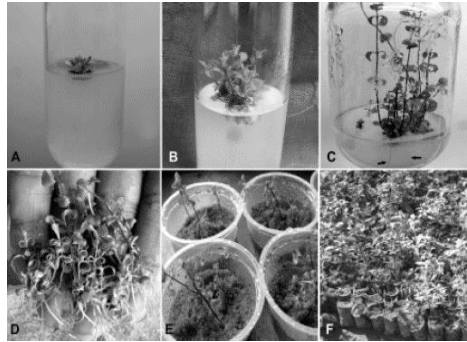
3. Aşama - Köklendirme aşaması:

- Bu aşamada mikro sürgünlerde (mikro çelik) kök oluşumu sağlanmaktadır.

- Köklenme *in vitro* koşullarda ya da *ex vitro* (serada mist, fog ya da nemlendirilmiş kapalı sistemler) koşullarda sağlanabilmektedir.
- *İn vitro* köklenme için besin ortamına oksin ilave edilmektedir. Ayrıca besin ortamının makro elementlerinin konsantrasyonu ½ oranında azaltılmaktadır. *Ex vitro* köklenme için mikro sürgünlerin dip kısmına oksin uygulaması yapılmaktadır.
- Mikro sürgünlerin köklendirilmesi için indol bütirik asit (IBA), naftalenasetik asit (NAA), indolasetik asit (IAA) en fazla kullanılan oksinlerdir.

4. Aşama – Dış koşullara alıştırma aşaması:

- Bu aşama bitkiciklerin *in vitro* koşullardan alınarak *ex vitro* (dış) koşullara taşındığı ve böylece heterotrofik (besinin hazır olduğu) koşullardan ototrofik (besinin bitki tarafından sentezlendiği) koşullara alındığı aşamadır.
- Bu aşamada bitkiler aktif gelişme durumunda olmalıdır. Çünkü ototrofik koşullara alışma *in vitro* koşullardan çıkarıldıktan sonraki yeni gelişmeye bağlıdır.
- Bitkicikler *in vitro* koşullarda kapalı kaplar içerisinde yaklaşık %100 nemli bir ortamda geliştikleri için dış koşullara çıkarıldığında birdenbire düşük neme maruz bırakılmamalıdır. Bitkicikler önce mist, fog, nemlendirilmiş kapalı koşulları bulunan seralarda yüksek nem altında tutulmalı ve normal atmosfer nemine tedrici olarak alıştırılmalıdır.



Şekil. Mikro çoğaltımın aşamaları A- Başlangıç (ilk kültür) aşaması; B- Sürgün oluşturma aşaması; C- Köklendirme aşaması; D-Köklenmiş bitkicikler; E-Dış koşullara alıştırma aşaması; F- Doku kültürü ile çoğaltılmış bitkilerin görünümü.