

## **BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNDE STERİL (ASEPTİK) KOŞULLARIN SAĞLANMASI**

### **1) Çalışma mekanının havasının ve yüzeylerinin mikroorganizmalardan arındırılması:**

- Doku kültürlerinde eksplantlar laminar flow (steril kabin) içerisinde kültüre alınmaktadır. Yani çalışma mekanı 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 kültüre 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 fitilli bir cihaz kullanılarak yapılabilir.
- Yakma işleminin etkinliğinin artırılması için pens, bistüri vb. önce %96-99'luk 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/cm<sup>2</sup>) 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/cm<sup>2</sup>) 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.

- Çeşitle 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 edilebilir.

### **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.

## **SÜRGÜN UCU, TOMURCUK, BOĞUM KÜLTÜRLERİNİN UYGULANIŞI**

- Sürgün ucu kültürü için donör bitkinin aktif olarak gelişmekte olan taze sürgünlerinin yaklaşık 2 cm'lik uç kısmı, tomurcuk kültürü 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 Kültürleri ile Mikro Çoğaltımın Aşamaları:**

Dört aşaması bulunmaktadır. Bunlar:

- 1- Başlangıç (ilk kültür) aşaması,
- 2- Sürgün çoğaltma aşaması (alt kültürler),
- 3- Köklendirme aşaması ve
- 4- Dış koşullara alıştırmaya aşamasıdır.

#### **1- Başlangıç Aşaması:**

- Aseptik koşullarda sürgün ucu kültürü için yaklaşık 1 cm uzunlukta sürgün uçları; tomurcuk kültürü 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 kültür koşullarına ilk alındığı aşamadır, 3-4 hafta devam eder. Bu aşamada amaç, eksplantların kültüre alınması ve rejenerasyonun (sürgün oluşumu) sağlanmasıdır.
- Temel besin ortamına özellikle sitokininler (0.05-10  $\mu\text{M}$  dozlarında) ve çoğu kez düşük dozlarda oksinler (0.05-5  $\mu\text{M}$  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.
- *In vitro* sürgünler 3-4 hafta aralıklarla aseptik koşullarda alt kültürlere alınmaktadır.
- Bu aşamada da temel besin ortamlarına özellikle sitokininler (0.05-10  $\mu\text{M}$ ) ve çoğu kez düşük dozlarda oksinler (0.05-5  $\mu\text{M}$ ) 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  $\mu\text{M}$  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 kültürlere 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 kültüre 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 kalıntularından 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 alıştırlır.
- Dış koşullara alıştırma ve serada geliştirme aşamaları 1-3 ay sürer.