

DOKU KÜLTÜRÜ: TEMEL LABORATUVAR TEKNİKLERİ

Doç. Dr. Yıldız Aka Kaçar

- **Bitki Doku Kùltürü:** aseptik koşullarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir.



Bitki doku kültürünün amaçları;

- ** Bitkilerin klonal olarak hızlı çoğaltılması
- ** Geleneksel yöntemlerle kolay çoğaltılmayan bitkilerin çoğaltılması
- ** Patojenlerden arî bitki elde edilmesi
- ** Islah amaçlı çalışmalar
- ** Somaklonal varyasyonların oluşturulması
- ** Haploid bitkilerin elde edilmesi
- ** Bitki gen kaynaklarının muhafazası
- ** Biyokimyasal ürünlerin (sekonder metabolitlerin) elde edilmesi

- Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyiletirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur.
- Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri bakımından üç kısımda incelenir;



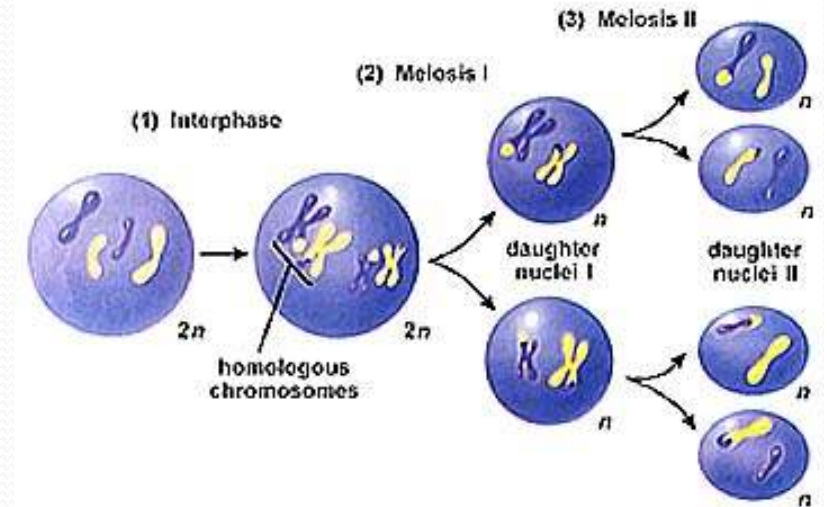
1. Organize olmuş meristematik hücreleri içeren somatik dokulardan rejenerasyon; uç ve yan mersitemlerden bitkiler çoğaltılır. Buna meristem kültürü yoluyla klonal çoğaltım denir. Elde edilen hücreler, tamamen donör (verici) bitkiye benzerler.



2. **Mersitematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon;** doğrudan bir bitki eksplantının kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının, genellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin (özellikle oksin ve sitokininler) etkisi sonucu bölünerek ve organize olarak, organları ve daha sonra da bitkiyi (direkt organogenesis) veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyo ve daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturması (direkt somatik embriyogenesis) şeklinde olabilir. Ayrıca her iki durum, belirli bir kallus, proto-kallus veya hücre süspansiyonu oluşumu devresinden sonra da ortaya çıkabilir (indirekt rejenerasyon).



3. **Mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon;** normal kromozom sayısının yarısını içeren hücrelerden direkt veya dolaylı yollarla bitki rejenerasyonunda, donör bitkinin kromozom sayısının yarısına sahip, genellikle steril olan haploid bitkiler elde edilebilir.



Bitki Doku Kùltürlerinin Tarihi Gelişimi

Tarih	Çalışmalar	Araştırmacılar
1902	İlk izole edilmiş hücre kùltürü	Haberlandt
1904	Olgun embriyoların kùltürü	Hanning
1917	Biyoteknoloji teriminin ilk defa kullanımı	Karl Ereky
1920	Oksinin tanımlanması	Went ve ark.
1922	Kök ve sürgün uçlarının laboratuvarda çoğaltımı	Kotte ve Robbins
1924	İlk embriyo kurtarma tekniğı (mısır)	Dieterich
1934	İlk sürekli kök kùltürleri (domates)	White
1934	İlk kallus kùltürleri	Gautheret
1942	İlk kallus kùltürlerinden sekonder metabolit eldesi	Gautheret
1946	Sürgün uçlarından (apikal meristem) ilk bitki eldesi	Ball
1953	DNA'nın yapısının belirlenmesi	Watson ve Crick
1990	Sentetik tohum geliştirme ve hızlı dondurma yoluyla germplazm muhafazası çalışmalarının başlaması	-
1995	İlk rekombinant insan gıdası	(Flavr Savr, domates)

Bitki Doku Kùltürlerinin Tarihi Gelişimi

1954	Hücre süspansiyonlarından ilk bitki eldesi	Muir ve ark.
1957	İlk sitokininin tanımlanması ve organ oluşumunda sitokin/oksin oranının öneminin ortaya konulması	Skoog ve Miller
1958	İlk somatik embriyogenesis (havuç)	Steward ve ark.
1960	Enzimler kullanılarak ilk canlı protoplast izolasyonu	Cocking
1962	MS besin ortamının geliştirilmesi	Murashige ve Skoog
1965	Tek hücreden bitki rejenerasyonu	Vasil ve Hilderbrandt
1967	İlk haploid bitkinin üretimi (anter polen kültürü)	Bourgin ve Nitsch
1968	B5 ortamının geliştirilmesi	Gamborg ve ark.
1970	HEPA filtrelerin kullanılmaya başlanması	-
1971	Protoplastlardan ilk bitki rejenerasyonu	Nagata ve Takabe
1978	Cinsler arası ilk somatik melezleme	Melchers ve ark.
1983	Transgenik ilk bitkinin elde edilmesi (tütün)	Murai ve ark.
1986	Transgenik ilk bitkinin tarla testleri (tütün)	-

BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNİN UYGULAMA ALANLARI

1) BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNİN BİTKİ ISLAHINDAKİ UYGULAMA ALANLARI

- Türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü
- Haploid bitki üretiminde anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürü
- Somaklonal varyasyon
- *In vitro* seleksiyon
- *In vitro* döllenme
- *In vitro* germplazm muhafazası
- Somatik hücre melezlemesi (protoplast füzyonu)
- Gen transferi

2) BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜNÜN TİCARİ VE ISLAH DIŞI UYGULAMALARI

- Hastalıksız bitki elde edilmesinde
- meristem kültürü
- Mikroçoğaltım
- Sentetik tohum üretimi (somatik embriyolar)
- Sekonder metabolit üretimi (kallus-hücre süspansiyonları)
- Kimeralar

3) BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNİN TEMEL ARAŞTIRMALAR DAKİ UYGULAMALARI

BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNİN BİTKİ ISLAHINDAKİ UYGULAMA ALANLARI

- Türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü:
 - Zigot oluşumundan sonra ortaya çıkan uyuşmazlıklar *in vivo* melezlemelerde embriyo oluşumunu veya oluşan embriyoların yaşamalarını engellemektedir.
 - Bu embriyolar özel besin ortamlarında doku kültürü ile geliştirilmekte ve yeni melez bitkiler elde edilebilmektedir.
 - Bu tekniğe embriyo kurtarma tekniği denilmektedir.

- Haploid bitki üretiminde anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürü:

- Mayoz bölünme geçirmiş haploid sayıda kromozoma sahip hücrelerde (polen/mikrospor veya megaspor) veya bu hücreleri içeren bitki kısımlarının (anter veya yumurtalık) doku kültürü yoluyla elde edilen hücrelerinde veya rejenerantlarında yapılan kromozom katlanması sonucu %100 homozigot bitkiler elde edilebilmektedir. Bu tekniğe *in vitro* haploidi tekniği denir.



• Somaklonal varyasyon:

- Uzun süreli kültürlerde veya kısa süreli de olsa yüksek bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda bulunan hücrelerden oluşan yeni bitkilerde gen veya kromozom bozuklukları sonucu kalıtsal ve fenotipik varyasyonlar (somaklonal varyasyonlar) ortaya çıkmaktadır.
- Bu varyasyonlar, yeni çeşit geliştirme ve iyileştirmelerde ıslahçılar tarafından kullanılmaktadır.





- ***In vitro* seleksiyon:**

- Tek hücre seviyesinde; tuz, herbisitler, patojenler vb. faktörlere karşı dayanıklılığa göre yapılan seleksiyonlar sonucu, bu hücrelerden elde edilen bitkilerde ilgili faktörlere dayanıklı veya toleranslı bitkiler ortaya çıkabilir.
- Bu tekniğe *in vitro* seleksiyon denir.



- *In vitro* dölleme:

- Bazı durumlarda (özellikle dış ortama alıştıramayan bitkilerden tohum almak için) doku kültürü ile elde edilen bitkiler laboratuvar şartlarında tozlaştırılmaktadır.
- Fakat bu uygulama çok sınırlı kalmıştır.

• *In vitro* germplazm muhafazası:

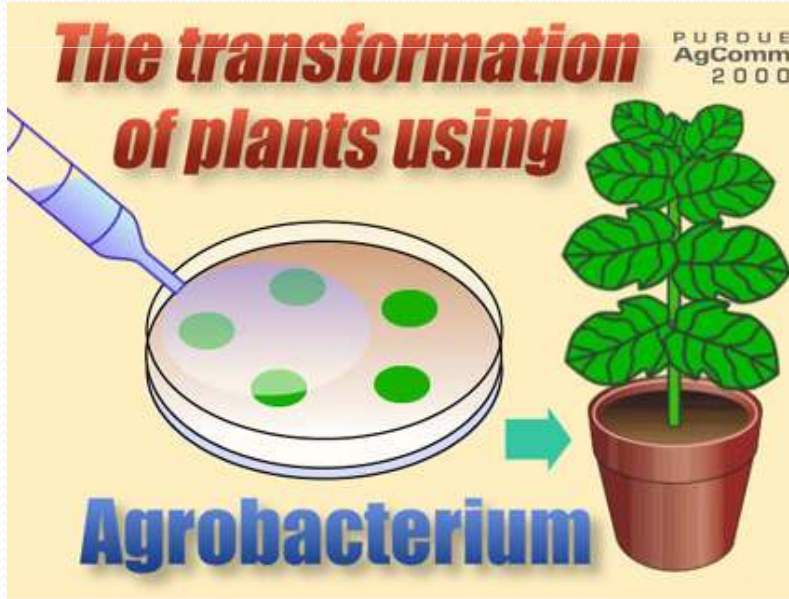
- Totipotent hücrelerin *in vitro* kültürü, kallus veya süspansiyon hücreleri şeklinde uzun süreli olarak veya belirli aralıklarla yeniden oluşturularak saklanabilir ve ihtiyaç duyulduğunda bu hücrelerden yeni bitkiler oluşturulabilir.
- Bu hücreler, meristemler veya minyatür bitkiler düşük sıcaklıkta (4 °C), çok az besin maddesine ve alana ihtiyaç duyarak aseptik şartlarda saklanabilir (1-4 yıl).
- Benzer şekilde çok düşük sıcaklıklarda (-196 °C), sıvı azot içinde doku ve hücreler hızlı bir şekilde dondurularak saklanabilirler.

• Somatik hücre melezlemesi (protoplast füzyonu):

- Protoplast füzyonu ve somatik melezleme, pre-zigotik eşeyssel uyumsuzluklar nedeniyle, klasik melezleme ile elde edilemeyen hibritlerin elde edilmesinde kimyasal ve fiziksel metotlar kullanılarak uygulanan bir tekniktir.
- Elde edilen somatik melez hücreden (heterokaryon), kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu yoluyla yeni bitkilerin elde edilmesi sistemin en önemli ve en gerekli parçasıdır.

- **Gen transferi:**

- Doku kültürlerinin bitkileri iyileştirmede en önemli ve yaygın olarak kullanılan uygulamalarından birisi de, gen veya genlerin bitkilere aktarılmasıdır.



BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜNÜN TİCARİ VE ISLAH DIŞI UYGULAMALARI

- **Hastaliksız bitki elde edilmesinde meristem kültürü:**
 - Tüm apikal meristem veya buradan alınan küçük embriyonik parçalar kültüre alınarak uygulanan tekniğe meristem kültürü denir.
 - Çok az miktarlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edildiğinde uç ve yan meristemlerden birçok yeni bitkicikler elde edilebilmektedir.
 - Bu metotla elde edilen bitkiler her bakımdan birbirinin benzeridirler.

• Mikroçoğaltım:

- Organize meristemlerden, henüz olgunlaşmamış veya olgunlaşmasını tamamlamış somatik hücrelerden direkt (organogenesis veya somatik embriyogenesis) veya indirekt (kallus, protoplast vb.) yollarla bitkilerin çoğaltılması ve köklendirilmesi işlemine genel olarak mikroçoğaltım denir.
- Daha az sürgün elde edilmesine rağmen uç ve yan meristemlerden kitle çoğaltım ticari olarak diğerlerinden daha fazla kullanılan bir metottur.



- **Sentetik tohum üretimi (somatik embriyolar):**

- Somatik embriyoların çeşitli metotlarla kaplanması sonucu sentetik (yapay) tohumlar elde edilmektedir.
- Sentetik tohumların, hibritlerin somatik çoğaltımında, erkısır ve ebeveyn hatların muhafazasında ve odunsu bitkilerin elit genotiplerinin elde tutulmasında kullanımı konusunda oldukça fazla çalışma yapılmaktadır.

• Sekonder metabolit üretimi (kallus-hücre süspansiyonları):

- *In vitro* hücre kültürleri sekonder metabolit üretiminde de önemli bir kaynak olarak görülmektedir.
- Bitki sekonder metabolitleri, bitki büyüme ve gelişmesinde doğrudan kullanılmayan maddelerdir. Işık mikroskobu ile görülebilen sekonder metabolitlerin (tanenler, antosiyaninler, karetenoitler) yanında UV ışığı ile görülebilenleri (alkaloitler) de vardır.

• Kimeralar:

- Kimerik bitkiler; farklı türlerin protoplastlarının karışık kültürü ve bitki rejenerasyonu, mutasyon uygulamaları sonucu bitki rejenerasyonu çalışmaları, apikal meristemle ilgili yapılan mikro-cerrahi çalışmaları ve gen transferi yapılması sırasında, bir bitkiyi oluşturan bütün hücrelerin ilgili gen veya genleri taşımaması durumlarında (özellikle partikül bombardımanı metodu ve apikal meristemler kullanıldığında) elde edilebilmektedir.

BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNİN TEMEL ARAŞTIRMALARDAKİ UYGULAMALARI

- Doku kültürü, protoplast izolasyonu ve füzyonu, hücre, doku ve bitki beslenmesi, sitogenetik çalışmalar, morfogenezis çalışmaları ve biyolojik azot fiksasyonu gibi temel araştırmalarda da kullanılmaktadır.
- Bu tür araştırmalar genellikle sistem geliştirmede faydalı olmaktadır.

DOKU KÜLTÜRÜNDE TEMEL TEKNİKLER

Doku kültürü işlemleri bir çok aşamadan oluşmaktadır. Bunlar;

- Uygun bir laboratuvar düzeninin kurulması,
- Kullanılacak bitki parçalarının (eksplant) ve besin ortamlarının seçimi, hazırlanması ve sterilizasyonu,
- Kallus ve hücre süspansiyonlarının oluşturulması,
- Kallus veya hücre süspansiyonlarından veya doğrudan somatik veya gametik hücrelerden bitki rejenerasyonunun uyarılması (organogenesis, somatik embriyogenesis veya meristem çoğaltımı yoluyla),
- Oluşan sürgünlerin çoğaltılması ve boylarının uzatılması, somatik embriyoların olgunlaştırılması,
- Uzayan sürgünlerin köklendirilmesi,
- Köklenen bitkilerin dış ortama alıştırılması (aklimatizasyon).

Sterilizasyon

- Doku Kùltüründe en önemli konu, steril işlemleri yapabilecek bazı temel alet ve ekipmanlara ve iyi bir laboratuvara sahip olmaktır.
- Doku kùltüründe en temel konular bitki parçaları ve kullanılacak alet ekipmanların iyice temizlenmesi (sterilizasyon), besin ortamlarının hazırlanması ve kùltüre alınacak yerin belirlenmesidir.

Doku kültüründe kontaminasyon kaynakları

1) Bakteriler

- *Agrobacterium*
- *Bacillus*
- *Lactobacillus*
- *Pseudomonas*
- *Staphylococcus*
- *Enterobacter*
- *Xanthomonas*

2) Funguslar

3) Virüsler ve mikoplazmalar



Sterilizasyon, sterilize edilecek yer ve materyale göre 3 kısımda değerlendirilir.

1. Çalışma alanının sterilizasyonu
2. Kullanılacak alet, ekipman, kapların ve besin ortamlarının sterilizasyonu
3. Bitki materyallerinin sterilizasyonu

Çalışma alanının sterilizasyonu

- Steril çalışma alanında kullanılacak yüzeyler kullanımdan en az 10-15 dakika önce %10'luk ticari sodyum hipoklorit solüsyonu (%5 NaOCl içeren) veya %70'lik alkolle silinir. Eğer kabin içinde UV lambası varsa açılır.
- Kullanılacak aletler (bisturi, pens vb.) kullanımdan önce etil veya metil alkol içine batırıldıktan sonra alev lambasına tutularak alevle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulur.
- Eksplantların kesiminde kullanılan fayanslar, alüminyum folyo içine sarılarak otoklavda sterilize edilir. Kültür kapları (cam kavanozlar) açıldıktan sonra boğazları ve ağız kısımları aleve tutularak sterilize edilir.

Besin ortamlarının, alet ve ekipmanların sterilizasyonu

Besin ortamları, alet ve ekipmanlar 3 şekilde sterilize edilirler:

1. Otoklav ve buhar (sıcak hava) sterilizasyonu
2. Filtre sterilizasyonu
3. Mikrodalga sterilizasyonu

Otoklav ve sıcak hava sterilizasyonu

- Besin ortamlarının sterilizasyonu, otoklavda 1.05 atm basınçta, 121 °C'de 15 dakika tutularak yapılır.
- Aletler ve boş kaplar otoklav poşeti içine konulduktan ve ağızları kapatılıp, otoklav bandı ile yapıştırıldıktan sonra sterilize edilirler. Otoklav bantları, sterilizasyon sonrası renk değiştirerek ortamın veya kapların sterilize edilip edilmediğini gösterir.
- Erlenler, pipetler (cam) ve diğer kuru materyaller, ağızları alüminyum folyo ile kapatılarak sıcak hava fırınında (etüv) 1-4 saat süreyle 200 °C'de sterilize edilirler.
- Plastik malzemeler kesinlikle otoklavda veya etüvde sterilize edilmezler.



Filtre sterilizasyonu

- Sıvı ortamlar ve ısı ile bozulabilen maddelerin stok solüsyonları için uygulanır.
- Filtre sterilizasyonu için, iki litre kapasiteli çelikten yapılmış silindirlere, 250 ml'lik plastik Sartorius filtreler ve tek kullanımlık selüloz nitrattan yapılmış membran filtreler (filtre, enjektör ucuna takılır ve ortam steril plastik veya cam şişeler içine süzülür) kullanılır.
- Filtre ile sterilize edilen besin ortamlarını kontaminasyon riskinden korumak için bu ortamlar en az 4-5 gün dolapta tutulduktan sonra kullanılmalıdır.

Mikrodalga sterilizasyonu

- Filtre ile sterilizasyonun pahalı ve az miktarda ortam için uygun olmakta, otoklav ile sterilizasyon ise uzun zaman almaktadır.
- Bunlara alternatif olarak mikrodalga ile sterilizasyon hem ucuz hem de daha kısa sürese sterilizasyonu sağlamaktadır.

Bitki materyallerinin yüzey sterilizasyonu

- Dış şartlardan (tarla, sera vb.) alınan eksplantlar öncelikle musluk suyu altında en az yarım saat tutulurlar.
- Tohum ve yumru gibi daha kaba parçalar 1-20 saniye alkol içinde tutulduktan sonra gerçek yüzey sterilizasyonu ortamına konulur.
- Yüzey sterilizasyonu için en fazla kullanılan maddeler etil alkol, sodyum veya kalsiyum hipoklorit, civa klorür, gümüş nitrat ve hidrojen peroksittir.
- Ayrıca sterilizasyon için biyositler de kullanılabilir.

Kullanılan bitki parçalarına göre farklı yüzey sterilizasyonu şekilleri

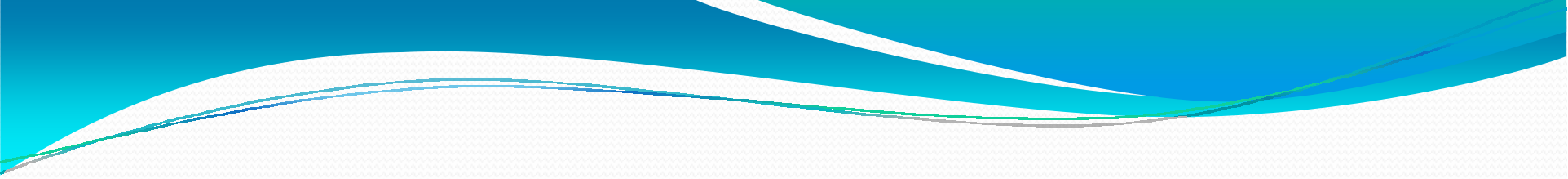
Eksplant	Ön sterilizasyon	Sterilizasyon
Tohum	10 sn saf alkolde muamele ve steril su ile durulama	20-30 dk %10-20'lik ticari sodyum hipoklorit solüsyonu içinde karıştırılarak tutulduktan sonra en az 3 defa steril su ile durulama, steril filtre kağıdı üzerinde kurutma.
Meyve, bakla	Kısa süreli saf alkol ile muamele	10-15 dk %10'luk ticari sodyum hipoklorit solüsyonu içinde karıştırılarak tutulduktan sonra en az 3 defa steril su ile durulama.
Gövde, hipokotil, petiyol	Yarım saat musluk suyu altında tutma	10-20 dk %15'lik ticari sodyum hipoklorit solüsyonu içinde karıştırılarak tutulduktan sonra en az 3 defa steril su ile durulama.
Yaprak	Yarım saat musluk suyu altında tutma	15 dk %10'luk ticari sodyum hipoklorit solüsyonu içinde karıştırılarak veya %0.1-0.25 HgCl ₂ solüsyonunda 2-5 dk çalkalandıktan sonra en az 3 defa steril su ile durulama.
Depo organları	Musluk suyu altında yıkama	20-30 dk %15-20'lik ticari sodyum hipoklorit solüsyonu içinde karıştırılarak tutulduktan sonra en az 3 defa steril su ile durulama, steril filtre kağıdı üzerinde kurutma.

BESİN ORTAMLARI

- **MS ortamı** (Murashige ve Skoog, 1962): tütün için geliştirilmiş yüksek tuz içerikli bir ortamdır. Özellikle düşük yoğunluklarda ($1/4$, $1/2$) yoğunluklarda birçok bitki türündeki köklendirme çalışmalarında başarıyla kullanılmaktadır.
- **B5 ortamı** (Gamborg ve ark, 1968): soya kallus kültürleri için geliştirilmiş nitrat azotu yüksek bir ortamdır.
- **LS ortamı** (Linsmaier ve Skoog, 1965): MS ortamının organik bileşikler bakımından farklı bir versiyonudur.
- **WH ortamı** (White, 1963): düşük tuz formülasyonlu ve domates köklerinin kültürü için geliştirilmiş bir ortamdır.
- **SH ortamı** (Schenk ve Hilderbrandt, 1972): hem monokotiledon hem de dikotiledonlar için uygun bir besin ortamıdır.
- **NN ortamı** (Nitsch ve Nitsch, 1969): anter kültürü için geliştirilmiştir.

- Bitki besin ortamlarında yer alan komponentler kullanım sıklığına göre sırasıyla;
 - su,
 - makro elementler,
 - mikro elementler,
 - vitaminler,
 - şekerler (karbon kaynağı),
 - yarı katılaştırıcılar (jel yapıcılar; agar, agaroz vb.),
 - bitki büyüme düzenleyicileri,
 - tamponlar,
 - amino asitler ve
 - kimyasal olarak tanımlanamayanlardır.

- **Makro elementler;** azot, fosfor, sodyum, magnezyum, kükürt, kalsiyum
- **Mikro elementler;** demir, manganez, çinko, bor, bakır, molibden, kobalt, iyot
- **Vitaminler;** tiamin (B_1), nikotinik asit (B_3), pridoksin (B_6), Myo-inositol ve d-biotin (H)'dir. Diğer vitaminler arasında d-pantotenik asit (B_5), askorbik asit (C), α -tokoferol (E), folik asit (M), retinol (A), riboflavin (B_2) ve kolekalsiferol (D_3)

- 
- **Şekerler;** sakkaroz, glikoz, maltoz, rafinoz, fruktoz
 - **Jel yapıcı maddeler;** agar, agaroz, Sea-Kem agaroz, aljinat, Phytigel, silikajel, jelatin ve nişasta

Bitki büyüme düzenleyicileri

- Bitki hormonları, bir dokuda üretilip, büyüme ve gelişmenin olacağı diğer dokulara taşınan ve çok düşük konsantrasyonlarda etkili olan endojen organik bileşiklerdir.
- En çok kullanılanlar; oksinler, sitokininler, gibberellinler, absisik asit ve etilendir.

Oksinler

- Fotoperyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidir.
- Oksinler, doku kültürlerinde tek başlarına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını, sitokinlerle birlikte yine kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını sağlayabilirler.

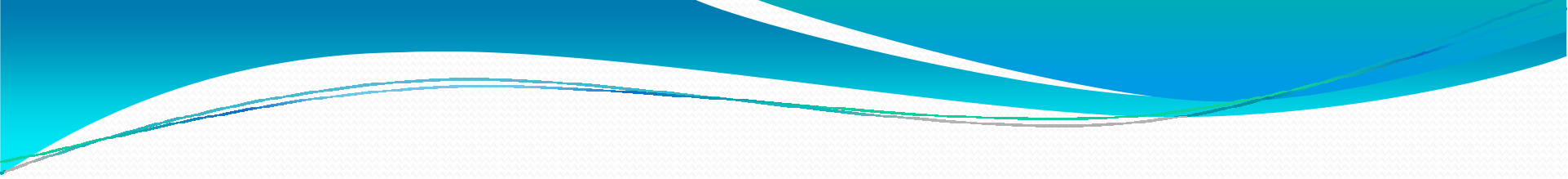
- 
- Oksinlerin büyümei arttırıcı etkileri iki mekanizma ile açıklanmaktadır.

a) Oksinler hücre çeperine H^+ iyonu taşınımını arttırıp hücre çeperinin esnekliğini arttırarak daha çok su alınmasını sağlarlar. Böylece hücre şişer ve büyür.

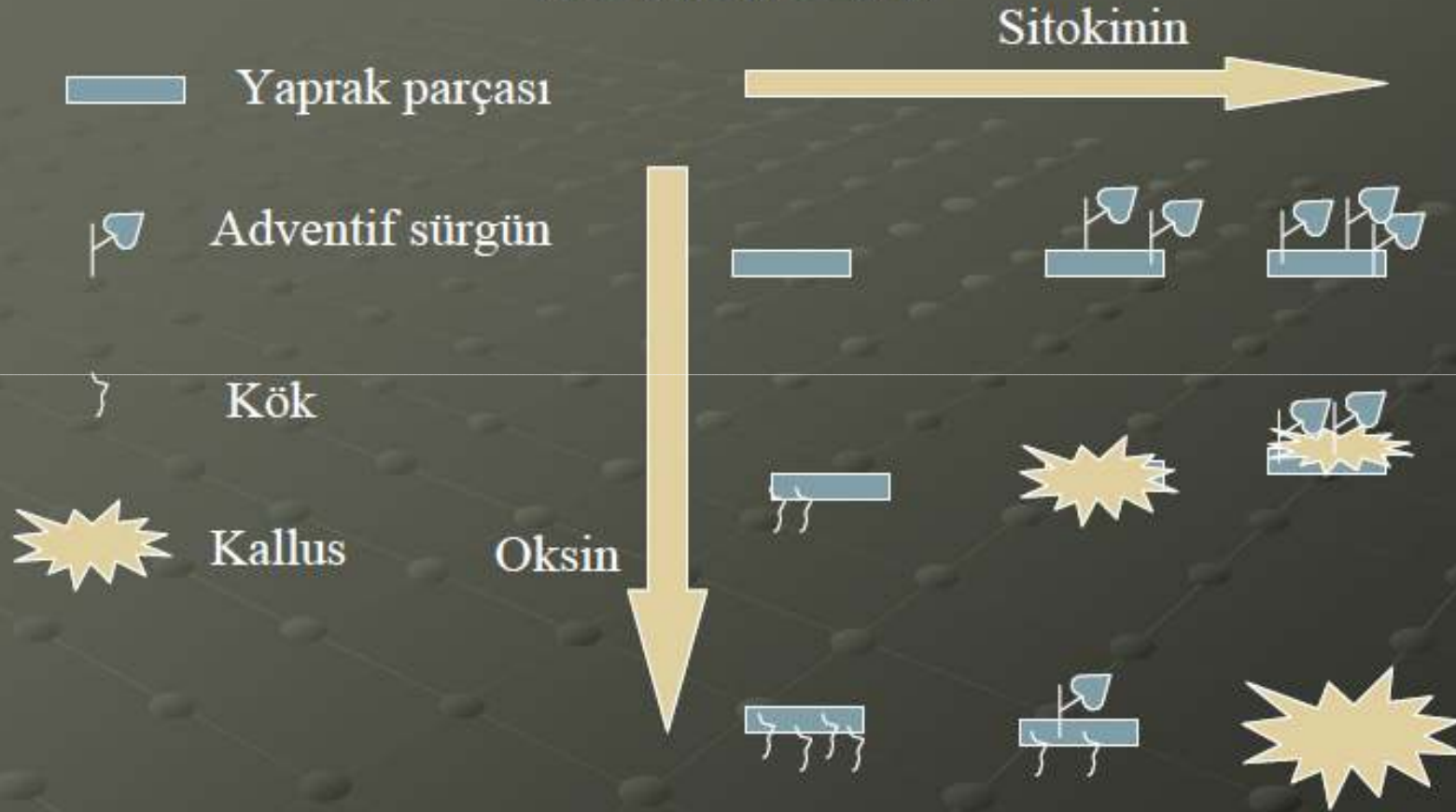
b) Büyümenin aynı hızda olabilmesi için gerekli mRNA'ların sentezini uyarırlar.

Sitokininin

- Hücresel bölünmesini ve özelleşmemiş genç hücrelerde farklılaşmayı ilerletir.
- Sitokinler olarak isimlendirilmelerinin nedeni de sitokinezi (sitoplazma bölünmesi) uyarmasıdır.
- Sitokinler klorofilin ve hücre proteininin bozulmasını yavaşlatıp RNA sentezini arttırarak yaşlanmanın geciktirilmesi ya da azaltılması şeklinde rol oynamaktadırlar.

- 
- Doku kültürü ortamında oksin/sitokinin oranı yüksekse köklenme, sitokinin/oksin oranı yüksekse sürgün oluşumu görülür.
 - Bu iki hormonun oranı dengelenince hücre kütlesi büyümeyi sürdürmekle birlikte farklılaşmaz ve küme oluşturur.
 - Farklılaşmamış bu hücre kümesi kallus olarak isimlendirilir.

In vitro kültürde gelişimin kontrolü



Gibberellinler

- Gibberellinler hem hücre bölünmesini uyararak hem de uzamayı sağlayarak gövdenin uzamasına neden olur.
- Tohum çimlenmesinde depo nişastasının hidrolizini gerçekleştiren α -amilaz enziminin oluşumunu sağlayarak, nişastanın embriyo tarafından kolaylıkla kullanılabilen şekerlere dönüşümüne yardımcı olur ve çimlenmeyi kolaylaştırır.

Absisik asit

- Donma, yüksek tuz içerikleri ve kuraklık gibi uygun olmayan koşullarda kalan bitkilerde ortaya çıkan değişimleri kontrol eder. Örneğin tuz stresi osmotin denilen yeni bazı proteinlerin sentezlenmesine neden olur.
- Absisik asit şekerlerin ve aminoasitlerin taşınmasında, depo maddelerinin sentezinde ya da her ikisinde etkili olabilmektedir.
- Tohumdaki depo ürünlerinin hidrolizi için gerekli enzimlerin sentezini engellemektedir. Ayrıca embriyonun büyümesi için gerekli şartlar sağlanıncaya kadar tohumun uyku halinde kalması da absisik asit sayesinde gerçekleştirilir.

Etilen

- Meyve olgunlaşması sırasında etilen sentez hızı artar. Kuraklık, su baskını, soğuk veya mekanik bir etki olarak rüzgar gibi stres koşulları etilen sentezini arttırır.
- Etilen özellikle dikotil bitkilerde yaprakların üst kısmındaki parankimatik hücrelerin uzamasına ve yaprağın kalınlaşmasına neden olurken genellikle köklerin ve gövdelerin uzamasını engeller.
- Bu durumda gövde ve kök daha kalın bir hal alır.

- **Amino asitler;** glisin, arginin, glutamin, prolin, aspartik asit
- **Kimyasal olarak tanımlanamayanlar;** Hindistan cevizi sütü, kazamino asit, maya özü (yeast extract)
- **Organik asitler;** fumarik asit, malik asit, sitrik asit ve sodyum piruvat
- **Antibiyotikler;** Karbenisilin, sefotaksim, eritromisin, genetisin, higromisin, kanamisin, streptomisin ve gentamisin

Stok solüsyonların hazırlanması ve saklanması

- **En çok hazırlanan stok solüsyonlar;** tuzlar, mikro elementler, bitki büyüme düzenleyicileri, vitaminler ve antibiyotiklerdir.
- Bunları hazırladıktan sonra ambalaj üzerine kullanılan madde, formülü, konsantrasyonu ve hazırlama tarihi mutlaka yazılmalıdır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonları 1 mL sıvıda 0.1-5.0 mg etkili madde bulunacak şekilde yapılabilir.
- Dondurucuya konulan stok solüsyonların kapları $\frac{3}{4}$ oranında doldurulmalı, kullanımdan en az yarım saat önce çıkartılıp, oda sıcaklığında, içinde su bulunan bir kaptaki tutularak çözüldükten sonra ortama ilave edilmelidir.

Kültür Şartları

- Sıcaklık → kültür odalarında kullanım amacına göre 18, 22 ve 25 °C'ye ayarlanır.
- Işık → beyaz serin floresan lambalarıyla sağlanır.
- Nem → %50-70 arasında bir değere ayarlanır.

Laboratuvarda Güvenlik

- Laboratuvarda; kapalı ayakkabılar giyilmeli, pipetler ağızla çekilmemeli, tehlikeli kimyasallar mutlaka aspiratörlü kabin içinde tartılmalı, besin ortamlarınının kapları ve malzeme kapları okunabilir şekilde etiketlenmeli, etiket tarihi mutlaka yazılmalıdır.

Sunumun Yayınlandığı Siteler:

- www.bahcebitkileri.org
- www.bahcebitkileri.org/bitkibiyoteknolojisi