

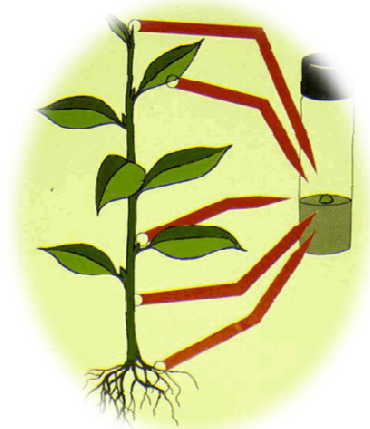


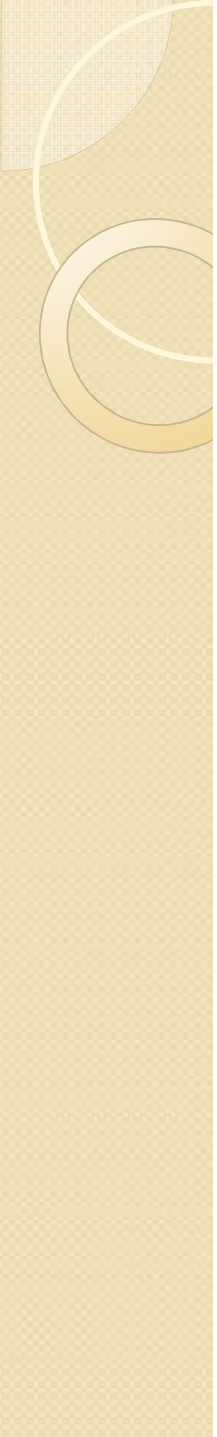
Hastaliksız Bitki Üretimi ile Mikroçoğaltım

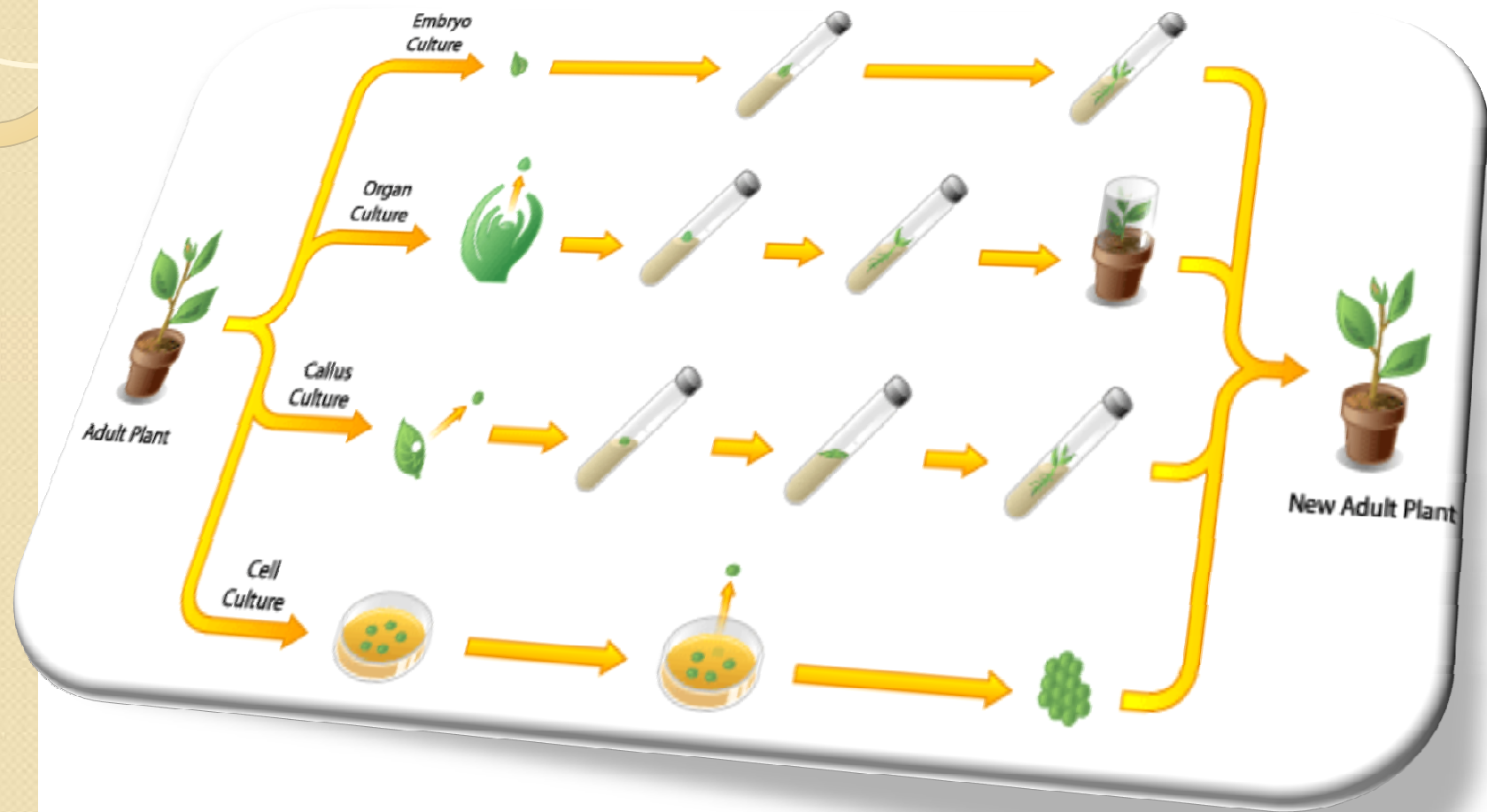
Doç. Dr. Yıldız Aka Kaçar

Mikroçoğaltım

Bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesine mikroçoğaltım denir.



- 
- Bitkilerin in vitro üretimi, kullanılan eksplantın özelliğine göre (embriyo, meristem, anter, hücre veya protoplast kültürü vb.) adlandırılır.
 - Mikroçoğaltımın başarısı, eksplantların alındığı anaç bitkinin genotipi, sağlık durumu, ve yetiştirme koşulları (beslenme, ışık, sıcaklık, vb.) ile doğrudan ilişkilidir.



Mikroçoğaltımın avantajları

- a) Hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi
- b) Kitlesele üretimde ;
 - Üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerlik (homojenite)
 - Diğer yöntemlerden daha kısa kültür süresi
 - Zor üretilen türlerin daha kolay üretimi
 - Seçilen belirli/üstün genotiplerin hızlı üretimi
 - Üretimde daha az anaç kullanılması
- c) Somaklonal varyasyondan dolayı yeni çeşitlerin/genotiplerin elde edilmesi

Mikroçoğaltım aşamaları

- Hazırlık aşaması
- Kültür başlangıç aşaması
- Sürgün çoğaltım aşaması
- Sürgün gelişimi ve köklendirme aşaması
- Dış ortama alıştırma aşamasıdır.



Afrika Menekşesi Bitkisinde Mikroçoğaltım



Yaprak dokusundan adventif sürgün oluşumu



Sürgünlerin geliştirilmesi



Köklendirme (ex vitro)



Toprağa ve dış koşullara aktarma

HASTALIKSIZ BITKİ ÜRETİMİ

- *In vitro* yetiştirilen bitkiler fungal, bakteriyal ve viral hastalıklar ile bulaşık olabilir, zararlı böcekler ve nematodlardan zarar görebilirler.
- Vegetatif çoğaltmada en önemli konu temiz bir başlangıç materyalinin kullanımudur.
- Temiz materyallerin elde edilmesi amacıyla bitki doku kültürü tekniklerinden yararlanılmaktadır.

Doku kültürü teknikleri

- Hastalıklara dayanıklılığı arttırmak
- Dayanıklı bitki genotiplerini korumak
- Bitki hastalıklarına karşı somaklonal dayanıklılık oluşturmak
- Dayanıklı bireyleri seçmek veya dayanıklılığa cevap veren genlerin aktarılmasını kolaylaştırmak ve
- Bitkileri hastalıklardan arındırmak için kullanılmaktadır.

Bitki doku kültürlerinde kontaminasyon

- Etkisiz yüzeysel sterilizasyonun neden olduğu akut kontaminasyon
- Eksplant içinde gizli olan mikroorganizmaların veya alt kültür sırasında yerleşen mikroorganizmaların neden olduğu kontaminasyon
- Uzun bir steril kültür döneminden sonra doğal olarak meydana gelen kronik kontaminasyon

Meristem kültürü

- Meristem kültürü tekniği, bitkilerin primer meristematik dokularının izole edilerek steril koşullarda ve yapay besin ortamları üzerinde yetiştirme ve bu yolla yeni bitkiler elde etme esasına dayanan bir vejetatif mikroçoğaltım yöntemidir.



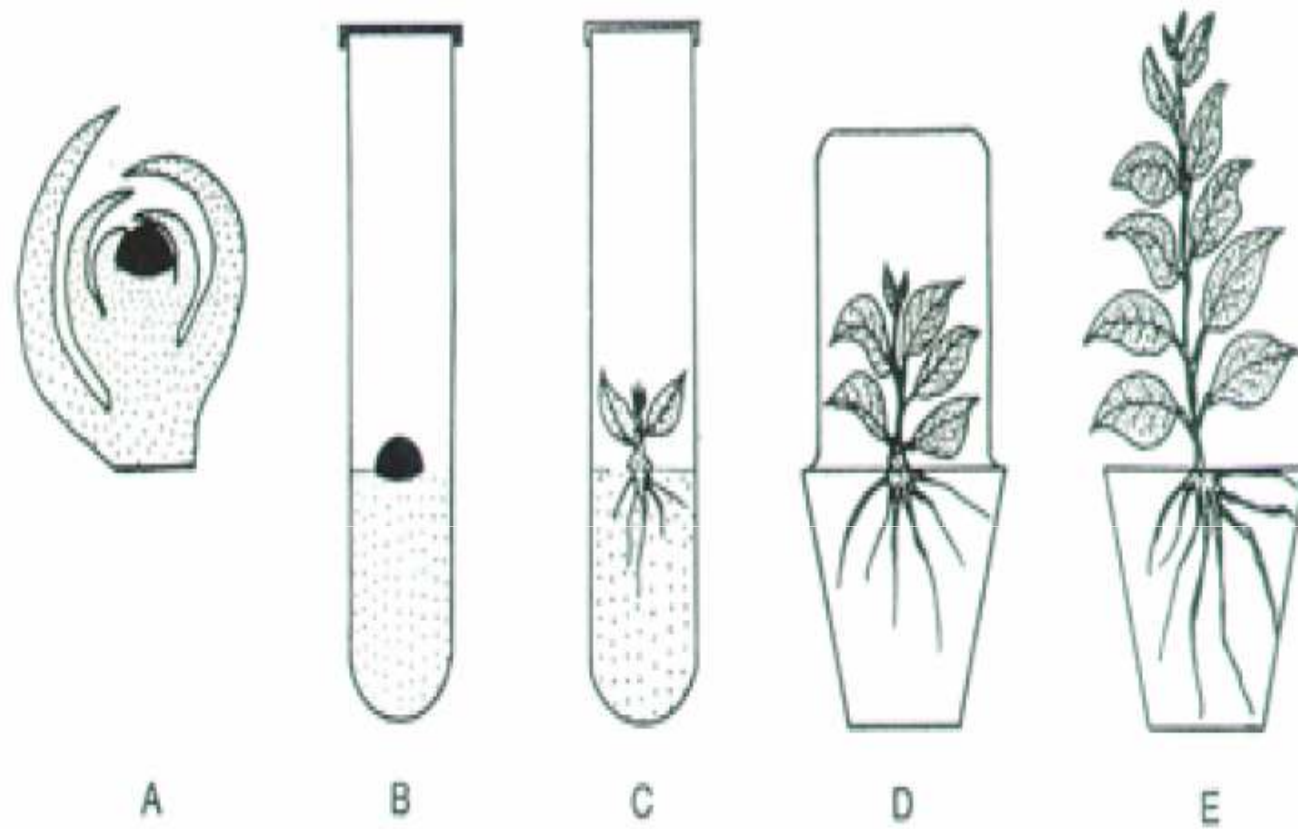
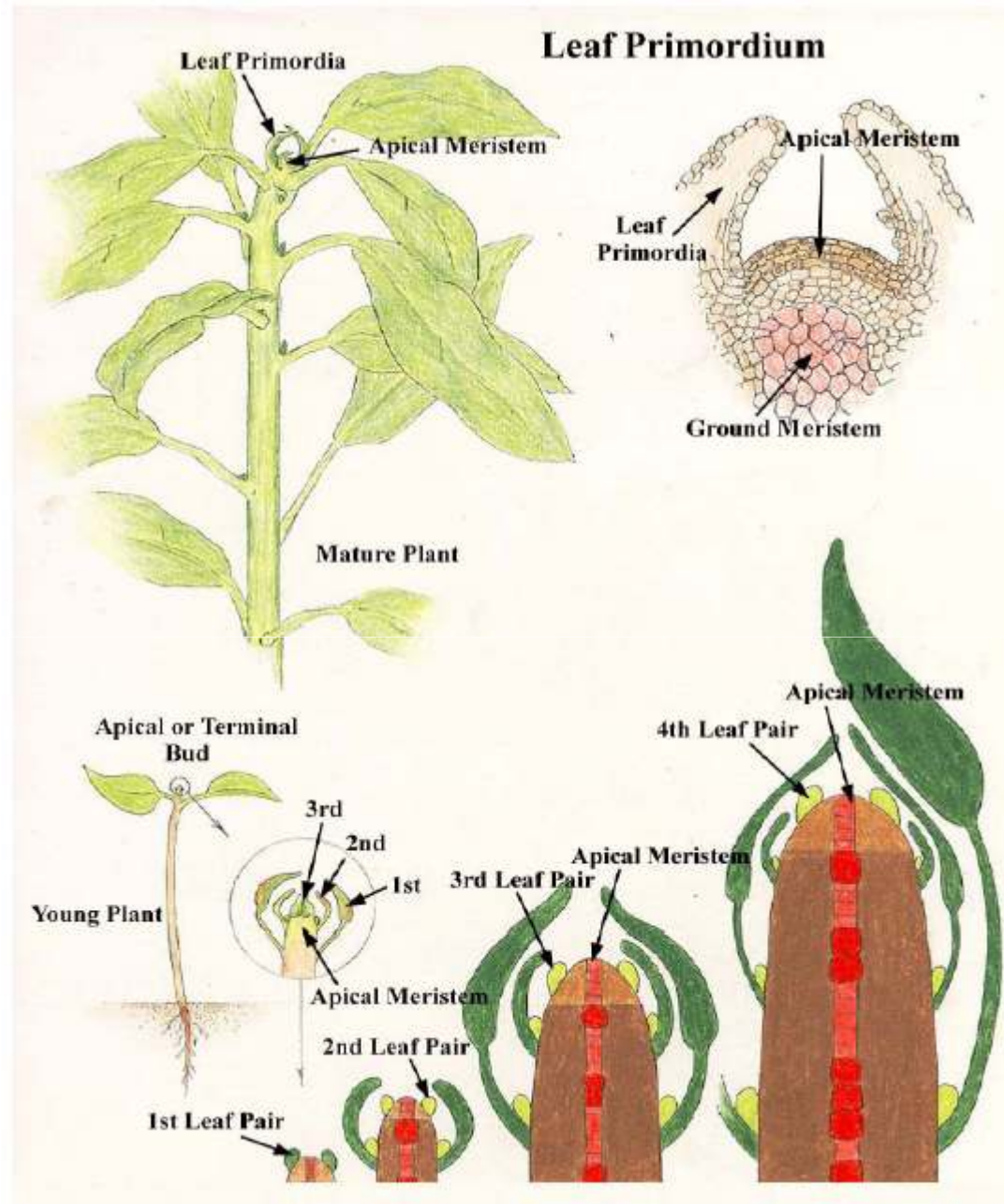


FIG. 8.3. Meristem-tip culture. (A) Apical meristem showing section to be excised. (B) Excised meristem tip cultured on agar medium. (C) Plantlet regenerated from excised meristem tip. (D) Plantlet transferred to sterile soil. (E) Virus-free plant growing in soil.

Meristem ve sürgün ucu kültürlerinin uygulama alanları

- Virüssüz materyal elde etmek
- Mikroçoğaltım
- Germplazm muhafazası
- Genetik transformasyonlar
- Bitki materyallerinin uluslar arası değişimi
- Bakteri ve mantarlardan arı bitkilerin üretilmesi





Meristem Kültürü

Meristem ucu kültüründe başarıyı etkileyen faktörler

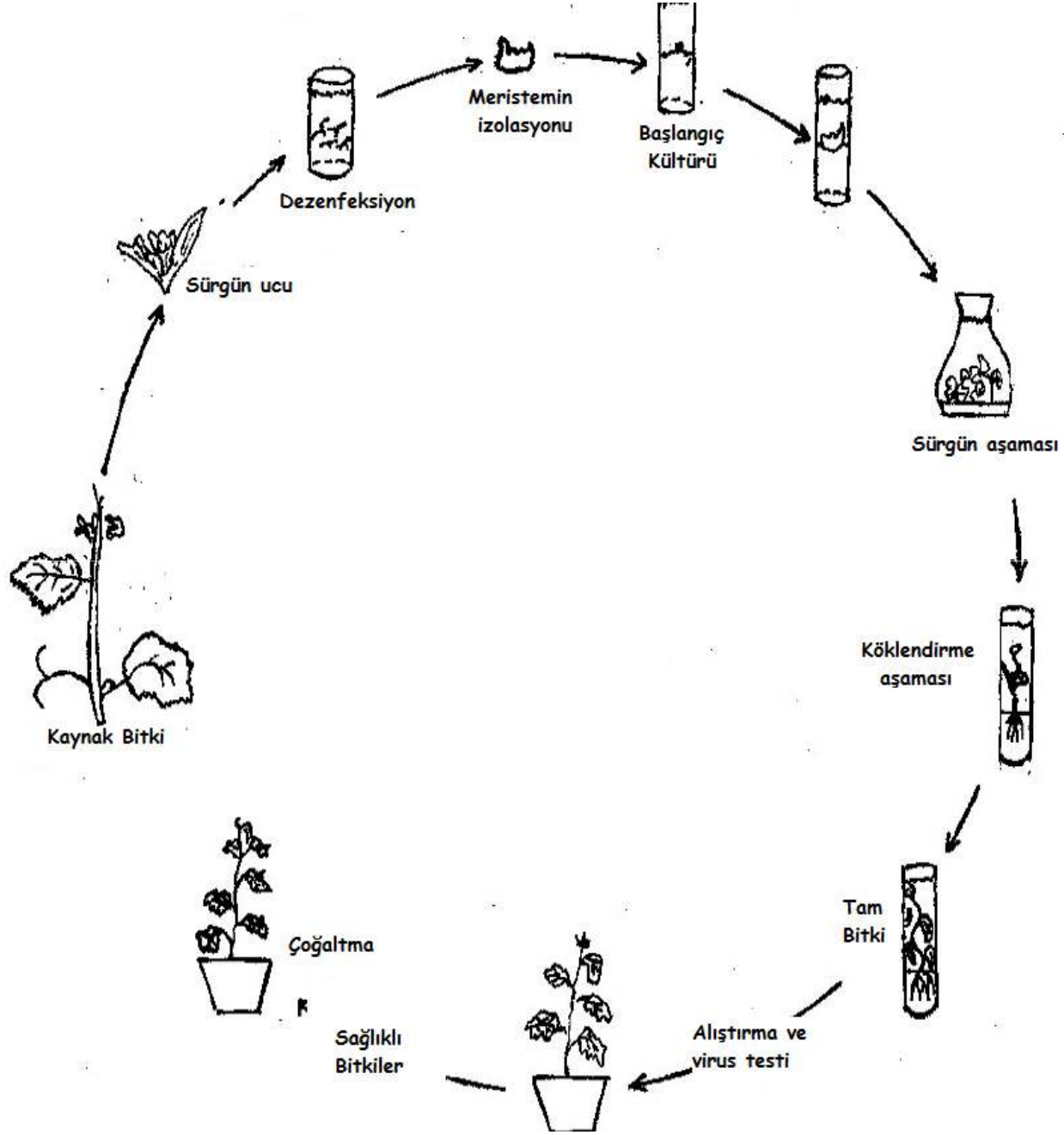
a) Bitki materyali

- ❖ Eksplantın büyüklüğü
- ❖ Donör bitkinin fizyolojik durumu
- ❖ Eksplantın alındığı mevsim
- ❖ Çeşit

b) Kültür ortamı

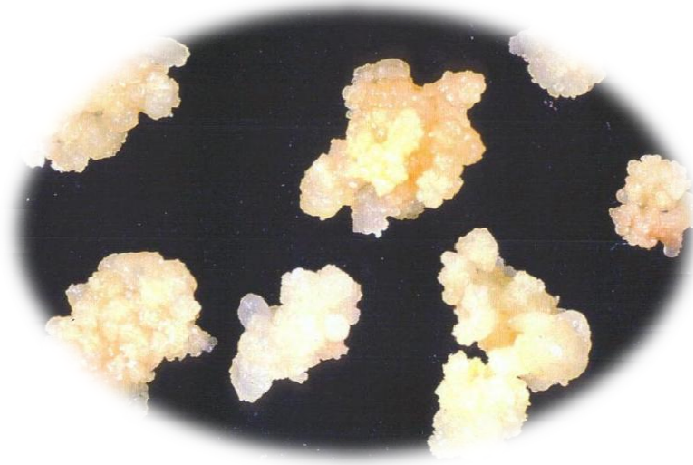
- ❖ Mineral tuzlar
- ❖ Şekerler
- ❖ Agar
- ❖ Büyüme düzenleyiciler

c) Kültür şartları



Eksplantın büyüklüğü

- Büyük eksplantlar daha yüksek canlılık ve rejenerasyon kapasitesine sahip olmasına karşın, küçük eksplantlar virüs eliminasyonunda daha avantajlıdır.



Donör bitkinin fizyolojik durumu

- Meristem ucu eksplantları bitkide vegetatif büyümenin aktif olduğu bir dönemde alınırda kültürde başarı oranı artmaktadır.



Eksplantın alındığı mevsim

- Kullanılan bitki türüne göre, eksplantın alındığı mevsim başarıyı etkilemektedir.



Çeşit

- Bitki doku kültürlerinde, iki genotip aynı kültür koşulları altında her zaman benzer şekilde cevap vermemektedir.
- *In vitro* kültürde, farklı genotipler arasındaki bu önemli farklılığı fizyolojik ve epigenetik faktörler de etkilemektedir.

Mineral tuzlar

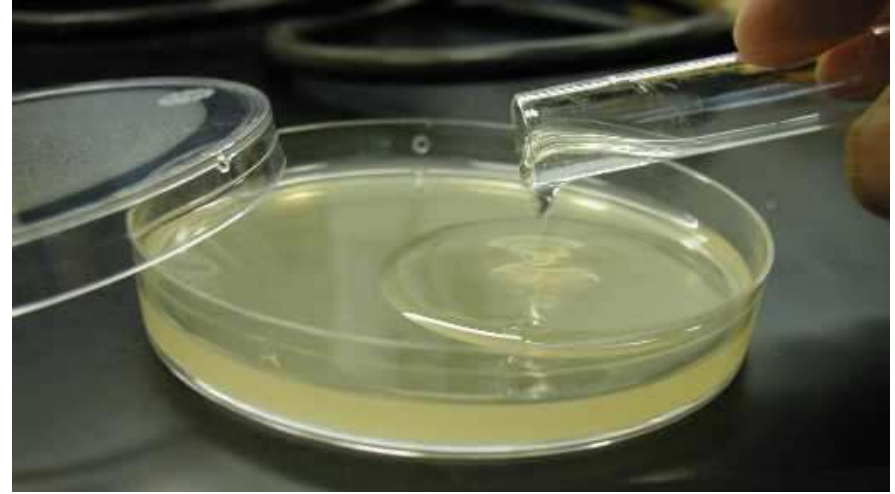
- Eksplantlar genç fidanlardan alındığı zaman MS ortamı uygundur, ancak olgun ağaçlardan alınan eksplantlar için bu ortam toksiktir ve bu eksplantlar için düşük tuz oranına sahip ortamlar daha elverişlidir.

Şekerler

- Karbon kaynağı, meristem ucu kültürü için kullanılan kültür ortamının önemli bir unsurudur.
- Genel olarak tüm besin ortamları karbon kaynağı olarak %1-3 oranında sakkaroz içerir.

Agar

- Çoğunlukla eksplantlar yarı-katı ortamda kültüre alınmakta ve kültür ortamında ortamı katılaştırmak için agar kullanılmaktadır.



Büyüme düzenleyicileri

- Çoğu bitki türlerinde büyümeyi ve meristemin gelişimini destekleyen düşük bir sitokin düzeyi genellikle uygun olmaktadır.
- Oksinler kültürü başlatmak için mutlaka gerekli olmamasına karşın, düşük konsantrasyonlarda ilave edilmesi faydalı bulunmuştur.
- Gicerellinler, sürgün gelişimini ve çoklu sürgün oluşumunu teşvik etmesi nedeniyle kültür ortamına ilave edilebilir.

Kültür şartları

- Işık, sıcaklık, fotoperiyot gibi çevre şartları *in vitro'* da farklılaşmayı etkilemektedir.
- Optimal koşullar her genotip için ayrı ayrı belirlenmelidir.



Meristem ucu kültürü uygulamalarında kullanılan besin ortamları

- En yaygın kullanılan besin ortamı MS (Murashige ve Skoog) ortamıdır.
- Ortamda büyüme düzenleyicilerinin çeşit ve konsantrasyonları türlere göre değişmektedir.

Meristem ucu kültürü uygulamalarında yüzey sterilizasyonu

- % 90'lık etil alkole (10-30 sn) batırma,
- % 0,5-10 sodyum hipoklorit solüsyonunda 15 dk bekletme ve
- steril distile su ile birkaç kez alkalama

Kültür odası koşulları

- Genellikle büyüme odasının sıcaklığı 24-26 °C'ye, aydınlatma ise 4000 lüks'e ayarlanır.

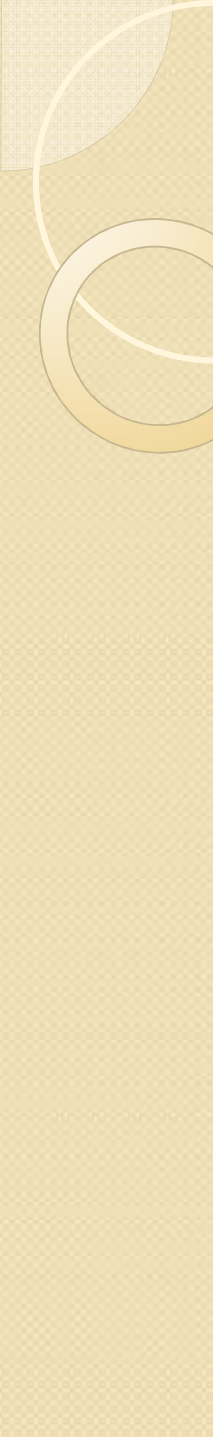


Meristem ucu kültürü metodunun uygulanması

- Eksplantın alınacağı uygun bir donör seçilir. Bitkiden en az bir boğum (nod) içeren sap parçaları kesilir.
- Donör bitkiye uygun sterilizasyon yöntemi belirlenir. Kesilen sap parçalarına uygulanır.
- Bitki materyali binoküler stereomikroskop tablasına yerleştirilir. Tomurcuğun apikal meristemini görmek için öncelikle yapraklar temizlenir sonra genç yaprak taslakları ile apikal kubbe kesilir.
- Ayrılan eksplant kültür ortamına yerleştirilir ve ortamın su kaybını önlemek için kültür kapları parafilm ile kaplanır.

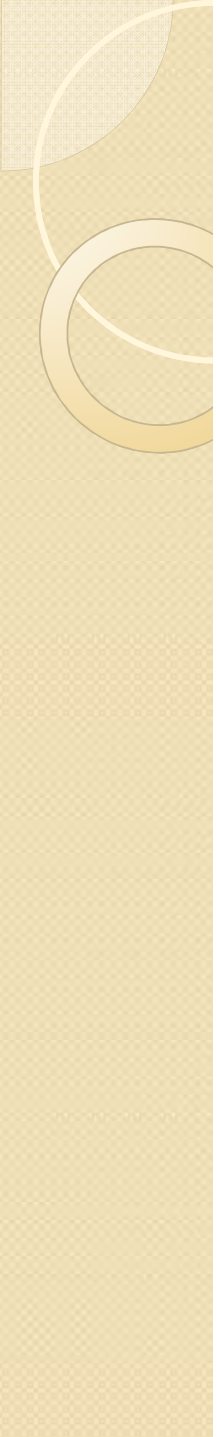
- Kaplar kültür odasına yerleştirilir ve genellikle 25 °C'de 4000 lüks ışıkta 12-16 saat fotoperiyotta bırakılır.
- Eğer eksplant canlılığını devam ettirirse 7-14 gün içerisinde eksplantta bir uzama ve bitkicik gelişimi görülür.



- 
- Gelişen bitkicikler çoğaltım için boğumlarının ayrılabilceği büyüklüğe ulaşıncaya kadar *in vitro*' da gelişmeye bırakılır.
 - *In vitro*'da gelişen bitkicikler steril koşullar altında kültür kaplarından çıkarılır ve boğumlarına ayrılır.
 - Her bir parça, aksiller tomurcuğun büyümesini sağlayacak taze ortama aktarılır.
 - Böylece orijinal bitki virüsten ari olarak çoğaltılabilir.

Meristem ucu kültürü çalışmalarında dikkat edilecek noktalar

- Donör dokular genç kısımlardan ve bitkinin aktif olarak büyüyen bölgelerinden alınmalı.
- Donör bitkilerin damlama sulama ile sulanması enfeksiyon problemlerini azaltmada yardımcı olur.
- Meristem bölgesi etil alkol ile silinmiş binoküler stereomikroskobu altında yatay hava akışlı kabinde çalışarak meristem bölgesi izole edilmelidir.

- 
- Çok küçük eksplantın kültüre alınması halinde gelişme şansı düşüktür.
 - Bu nedenle meristemın yaprak taslakları ile birlikte kültüre alınması başarıyı arttırmaktadır.
 - Kesmenin bir sonucu olarak ortaya çıkan fenolik oksidasyon toksik etki yapabilir.
 - Kararma durumu halinde meristem derhal taze ortama aktarılması ile nlenebilir.

Meristem ucu kültürünün yararları

- En yüksek genetik kararlılık *in vitro* klonal çoğaltımda elde edilmektedir.
- Meristem ucu kültürü ile bulaşık olan bir donör bitkiden viral, bakteriyel ve fungal patojenler uzaklaştırılabilmektedir.
- Meristem ucu, soğukta muhafaza ve küçük olması bakımından çok uygundur.
- Kimera olan bir materyalin aynen çoğaltımı için meristem ucu kültürü çok uygun bir tekniktir.
- Meristem ucu kltrleri, karantina uygulamalarına göre uluslararası taşımda çoğunlukla kabul edilen kltrlerdendir.



Meristem ucu kültürü tekniğinin sınırlamaları

- Virüsten arındırmada eksplant boyutu ile kontaminasyon derecesi arasında negatif bir iliŐki vardır.
- Virüsten arındırılmış bitkilerin elde edilmesinde stok bitkinin fizyolojik durumu etkili olmaktadır.
- Meristem kültürünün virüs eliminasyonunda etkili bir yöntem olarak tanımlanmasına karşın meristemlerin her zaman virüsten arındırılmış olmadığı da unutulmamalıdır.

Virüsten ari bitkilerin üretilmesinde kullanılan yöntemler

- Meristem ucu kültürü
- Sıcaklık uygulaması (termoterapi)
- Meristem kültürü ile birlikte sıcaklık uygulaması
- Kimyasal madde kullanımı (kemoterapi)
- Soğuk uygulaması (krayoterapi)
- Mikroaşılama
- Virüsten ari bitkilerin kallus ve protoplasttan elde edilmesi
- Virüsten ari diğer eksplantların kullanılması

Sıcaklık uygulaması (termoterapi)

- Sıcak uygulaması aktif olarak büyüyen vegetatif materyal üzerinde etkili olmaktadır.
- Sıcaklık uygulaması ile çoğu virüsler ve bazı sistemik bakteriyel hastalıklar elimine olmaktadır.
- Sıcaklık uygulamasında büyüme için gerekli optimum sıcaklığın üzerinde bir sıcaklık seçmek gereklidir.
- Sıcaklık uygulamasında bitki kısımları (çelikler veya soğanlar, yumrular) sıcak suda ya da sıcak havada (50-52 °C) belirli sürelerde (10-30 dk) bırakılmaktadır.

Meristem kültürü ile birlikte sıcaklık uygulaması

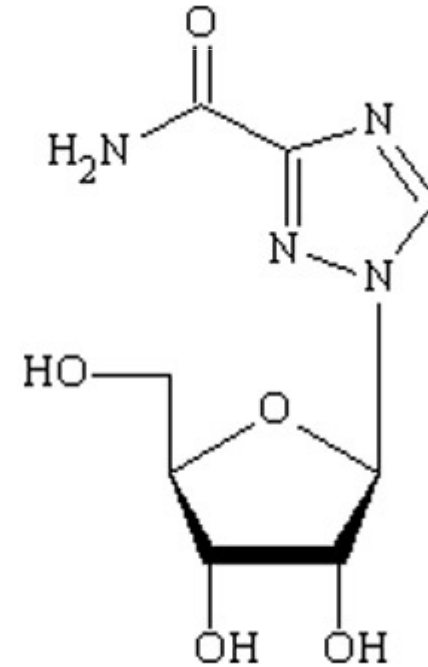
- Sıcaklık uygulaması, çoğunlukla sadece meristem kültürü ile uzaklaştırılması zor olan virüslerin eliminasyonu için kullanılmaktadır.

Sıcaklık uygulaması 3 farklı şekilde yapılmaktadır;

- Bulaşık olan bitkiler önce artan sıcaklıklara maruz bırakılır sonra meristem uçları kültüre alınır.
- Meristemlerin kültüre alınmasından önce *in vitro* sürgünlere yüksek sıcaklık uygulaması yapılır.
- Kültüre alınan meristemlere sıcaklık uygulaması yapılır.

Kimyasal madde kullanımı

- Yaygın olarak ribavirin (virazole-1.β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) kullanılmaktadır.



Soğuk uygulama (kryoterapi)

- Yüksek sıcaklık uygulamaları ile meristem kültürünün kombinasyonuna benzer şekilde meristem ucu kültürü ile birlikte düşük sıcaklık uygulamalarının da virüs eliminasyonu konusunda başarılı olmaktadır.

Mikroaşılama

- Virüsten ari anaçların (çöğür) üzerine meristemlerin aşılması tekniğidir.
- Virüsle bulaşık olmayan tohumlar kök stokları olarak kullanılmaktadır.
- Ya virüsle bulaşık ana bitkiden direkt olarak aseptik ön işlemler ile ayrılan meristem ucu ya da meristem ucunun in vitro kültüründen sonuçlanan küçük bir sürgün ucu virüsten ari anaca aşılacaktır.
- Bu tür mikroaşılama meristem ucu kültürünün başarısız olduğu türlerde virüsten ari stokları üretmek için kullanılmaktadır.

Virüsten ari bitkilerin kallus ve protoplasttan elde edilmesi

- Adventif tomurcuk veya somatik embriyogenesis yoluyla nusellustan kaynaklanan kallustan rejenere olan bitkicikler yüksek derecede virüsten aridir.

Virüsten ari diğer eksplantlar

- Virüsle bulaşık olan bitkilerin yaprakları patojenin penetrasyon yapamadığı yerlerde koyu yeşil alanlara sahiptir.
- Böyle bölgelerden alınan eksplantlardan elde edilen rejenerantların çoğu virüsten ari olmaktadır.

Bakteri ve Mantarlardan Ari Bitkilerin Üretimi

- Meristem kültürü tekniği, donör bitkinin bakteriyal ve fungal patojenler ile enfekte olduğu durumlarda da avantaj sağlamaktadır.
- Bitkide terminal bölgenin vasküler farklılaşma bölgesinin üst kısmı patojenik partikülleri pek içermez.
- Bu nedenle, eğer bulaşık olan bir bitkiden, söz konusu bu bölgeden küçük bir eksplant alınıp in vitro'da başarılı olarak geliştirilirse patojensiz bitki elde edilmesi mümkün olmaktadır.

Sunumun Yayınlandığı siteler

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