

**Bu kitaba sığmayan
daha neler var!**



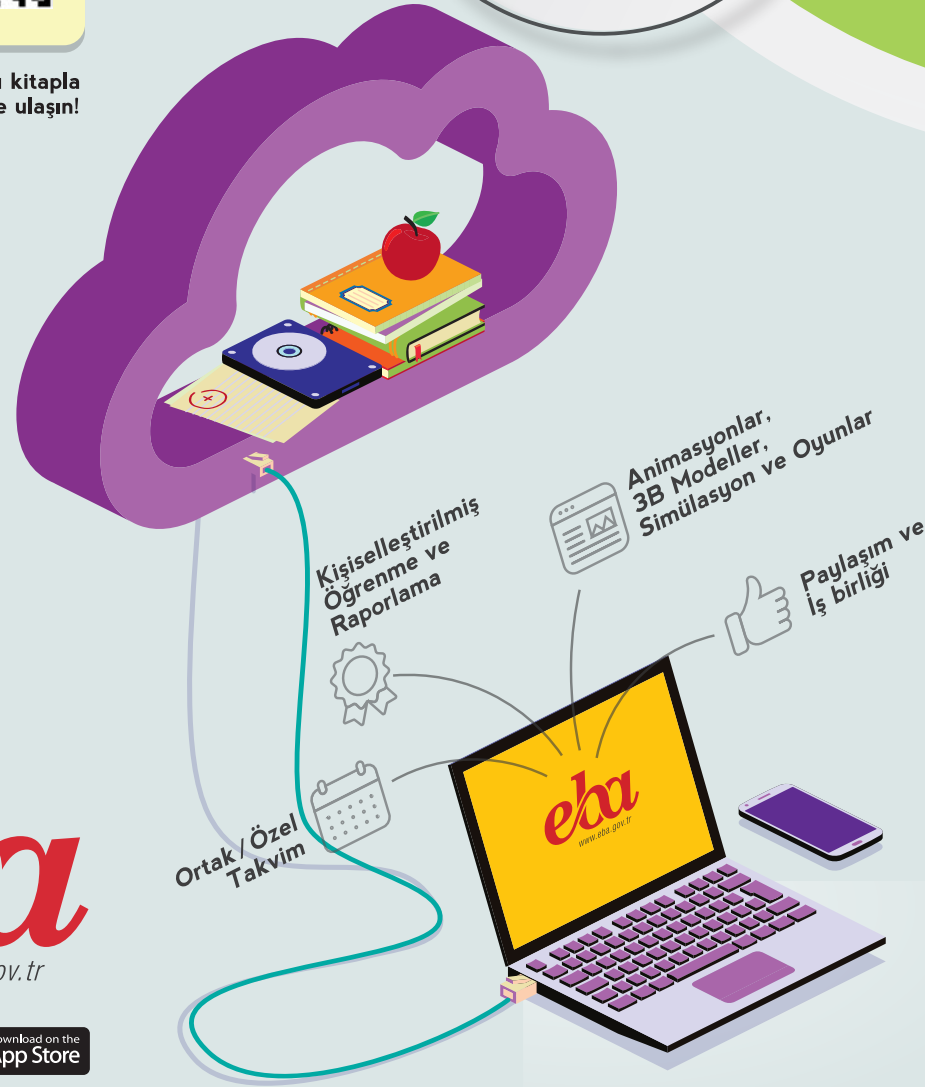
Karekodu okutun, bu kitapla ilgili EBA içeriklerine ulaşın!

ÖDS

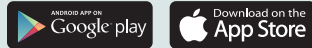
**ÖĞRENCİ/ÖĞRETMEN
DESTEK SİSTEMİ**

<https://ods.eba.gov.tr>

- Konu Anlatımlı Ders Videoları
- Soru Çözüm Videoları
- Ders Anlatım Videoları
- Çoktan Seçmeli Sorular



eba
www.eba.gov.tr



40181 700982

**BU DERS KİTABI MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞINCA
ÜCRETSİZ OLARAK VERİLMİŞTİR.
PARA İLE SATILAMAZ.**

ISBN: 978-975-11-6976-1

Bandrol Uygulamasına İlişkin Usul ve Esaslar Hakkında Yönetmelik'in 5'inci Maddesinin İkinci Fıkrası Çerçevesinde Bandrol Taşınması Zorunlu Değildir.

LABORATUVAR HİZMETLERİ ALANI

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ İLE ÇOĞALTMA

11-12

DERS MATERYALİ

MESLEKİ VE TEKNİK ANADOLU LİSESİ
LABORATUVAR HİZMETLERİ ALANI

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ İLE ÇOĞALTMA

11-12
DERS MATERYALİ



MESLEKİ VE TEKNİK ANADOLU LİSESİ
LABORATUVAR HİZMETLERİ ALANI

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ İLE ÇOĞALTMA

11-12 DERS MATERYALİ

YAZARLAR

Ali TEKİN
Gülnur ATÇEKEN



MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI YAYINLARI: 8409
YARDIMCI VE KAYNAK KİTAPLAR DİZİSİ: 2301

Her hakkı saklıdır ve Millî Eğitim Bakanlığına aittir. Ders materyalinin
metin, soru ve şekilleri kısmen de olsa hiçbir surette alınıp yayımlanamaz.

HAZIRLAYANLAR

DİL UZMANI	Besime Beste KEÇECİ
PROGRAM GELİŞTİRME UZMANI	Mine ERÇİN
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME UZMANI	Neslihan KOSER
REHBERLİK UZMANI	Feyza SÜNBÜL
GÖRSEL TASARIM UZMANI	Canan SARIOĞLU AKBULUT

ISBN: 978-975-11-6976-1

Millî Eğitim Bakanlığının 24.12.2020 gün ve 18433886 sayılı oluru ile
Meslekî ve Teknik Eğitim Genel Müdürlüğünce ders materyali olarak hazırlanmıştır.



İSTİKLÂL MARŞI

Korkma, sönmez bu şafaklarda yüzen al sancak;
Sönmeden yurdumun üstünde tüten en son ocak.
O benim milletimin yıldızıdır, parlayacak;
O benimdir, o benim milletimindir ancak.

Çatma, kurban olayım, çehreni ey nazlı hilâl!
Kahraman ırkıma bir gül! Ne bu şiddet, bu celâl!
Sana olmaz dökülen kanlarımız sonra helâl.
Hakkıdır Hakk'a tapan milletimin istiklâl.

Ben ezelden beridir hür yaşadım, hür yaşarım.
Hangi çılgın bana zincir vuracakmış? Şaşarım!
Kükremiş sel gibiyim, bendimi çiğner, aşarım.
Yırtarım dağları, enginlere sığmam, taşarım.

Garbın âfâkını sarmışsa çelik zırhlı duvar,
Benim iman dolu göğsüm gibi serhaddim var.
Ulusun, korkma! Nasıl böyle bir imanı boğar,
Medeniyet dediğin tek dişi kalmış canavar?

Arkadaş, yurduma alçakları uğratma sakın;
Siper et gövdeni, dursun bu hayâsızca akın.
Doğacaktır sana va'dettiği günler Hakk'ın;
Kim bilir, belki yarın, belki yarından da yakın.

Bastığın yerleri toprak diyerek geçme, tanı:
Düşün altındaki binlerce kefensiz yatanı.
Sen şehit oğlusun, incitme, yazıktır, atanı:
Verme, dünyaları alsan da bu cennet vatanı.

Kim bu cennet vatanın uğruna olmaz ki feda?
Şüheda fışkıracak toprağı sıksan, şüheda!
Cânı, cânânı, bütün varımı alsın da Huda,
Etmesin tek vatanımdan beni dünyada cüda.

Ruhumun senden İlahî, şudur ancak emeli:
Değmesin mabedimin göğsüne nâmahrem eli.
Bu ezanlar -ki şehadetleri dinin temeli-
Ebedî yurdumun üstünde benim inlemeli.

O zaman vecd ile bin secde eder -varsa- taşım,
Her cerâhamdan İlahî, boşanıp kanlı yaşım,
Fışkırır ruh-ı mücerret gibi yerden na'sım;
O zaman yükselerek arşa değer belki başım.

Dalgalan sen de şafaklar gibi ey şanlı hilâl!
Olsun artık dökülen kanlarımın hepsi helâl.
Ebediyyen sana yok, ırkıma yok izmihlâl;
Hakkıdır hür yaşamış bayrağımın hürriyyet;
Hakkıdır Hakk'a tapan milletimin istiklâl!

Mehmet Âkif Ersoy

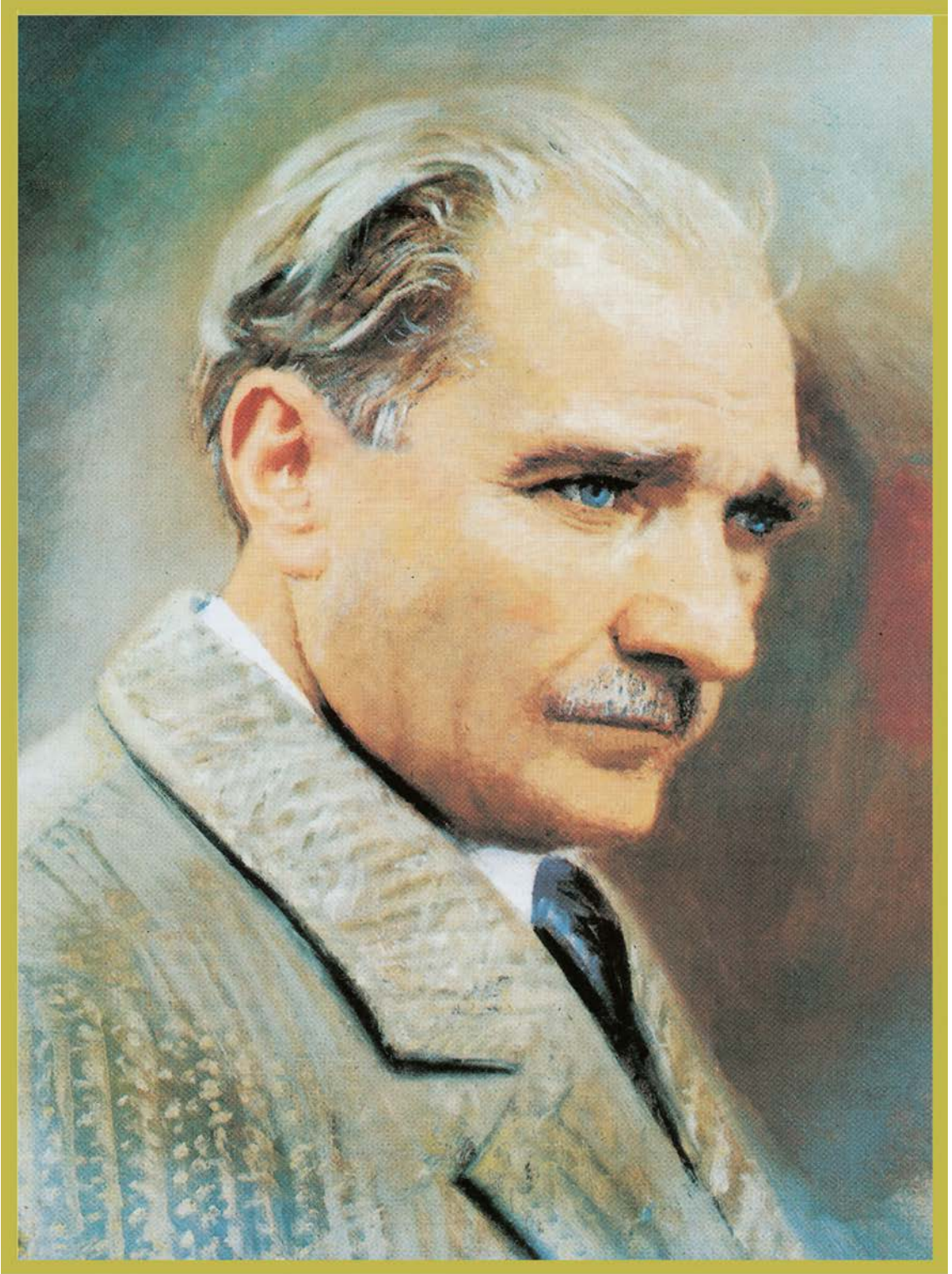
GENÇLİĞE HİTABE

Ey Türk gençliği! Birinci vazifen, Türk istiklâlini, Türk Cumhuriyetini, ilelebet muhafaza ve müdafaa etmektir.

Mevcudiyetinin ve istikbalinin yegâne temeli budur. Bu temel, senin en kıymetli hazinendir. İstikbalde dahi, seni bu hazineden mahrum etmek isteyecek dâhilî ve hâricî bedhahların olacaktır. Bir gün, istiklâl ve cumhuriyeti müdafaa mecburiyetine düşersen, vazifeye atılmak için, içinde bulunacağın vaziyetin imkân ve şeraitini düşünmeyeceksin! Bu imkân ve şerait, çok namüsaid bir mahiyette tezahür edebilir. İstiklâl ve cumhuriyetine kastedecek düşmanlar, bütün dünyada emsali görülmemiş bir galibiyetin mümessili olabilirler. Cebren ve hile ile aziz vatanın bütün kaleleri zapt edilmiş, bütün tersanelerine girilmiş, bütün orduları dağıtılmış ve memleketin her köşesi bilfiil işgal edilmiş olabilir. Bütün bu şeraitten daha elîm ve daha vahim olmak üzere, memleketin dâhilinde iktidara sahip olanlar gaflet ve dalâlet ve hattâ hıyanet içinde bulunabilirler. Hattâ bu iktidar sahipleri şahsî menfaatlerini, müstevlîlerin siyasî emelleriyle tevhit edebilirler. Millet, fakr u zaruret içinde harap ve bîtap düşmüş olabilir.

Ey Türk istikbalinin evlâdı! İşte, bu ahval ve şerait içinde dahi vazifen, Türk istiklâl ve cumhuriyetini kurtarmaktır. Muhtaç olduğun kudret, damarlarındaki asil kanda mevcuttur.

Mustafa Kemal Atatürk



MUSTAFA KEMAL ATATÜRK

İÇİNDEKİLER

DERS MATERYALİNİN TANITIMI	11
----------------------------------	----

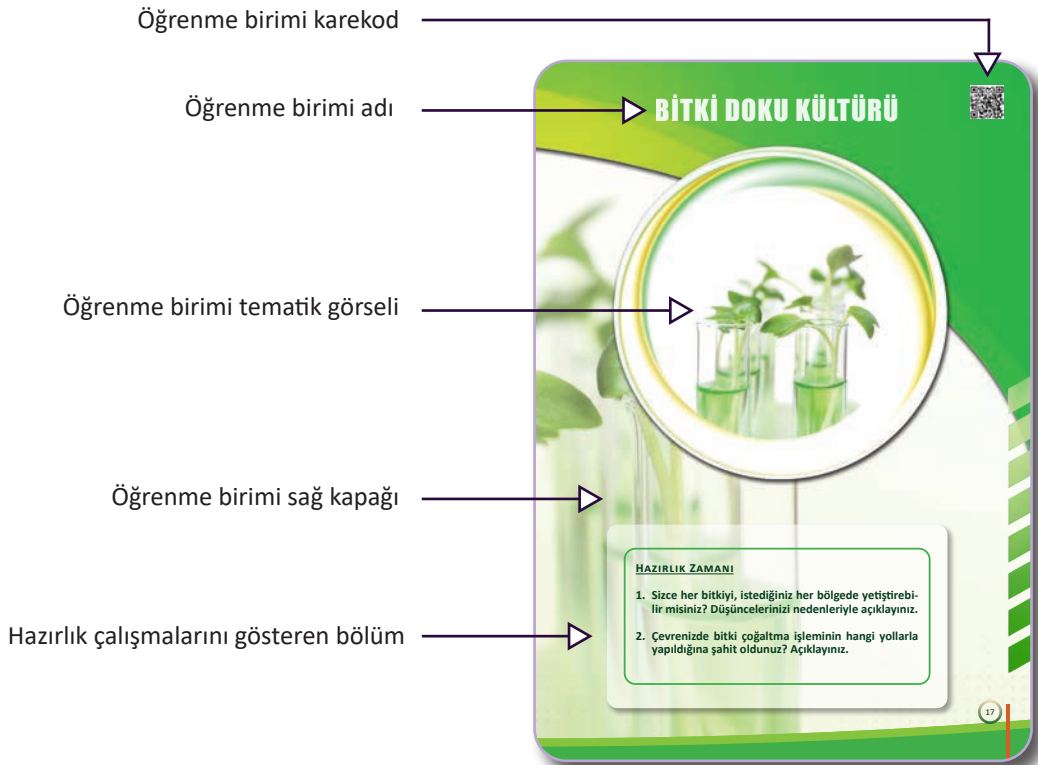
1. ÖĞRENME BİRİMİ: BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

1.1. DOKU KÜLTÜRÜ VE TERİMLERİ	18
1.1.1. Laboratuvar Organizasyonu	21
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 1 - DOKU KÜLTÜRÜ VE TERİMLERİ	22
1.2. DOKU KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN CİHAZ, ALET VE EKİPMANLAR	24
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 2 - DOKU KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN CİHAZ ALET VE EKİPMANLAR	25
1.3. BESİN ORTAMLARI	27
1.3.1. Besin Ortamının Hazırlanması	30
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 3 - BESİN ORTAMLARI HAZIRLAMA	32
1.4. BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİ İÇİN KULLANILAN BİTKİ KISIMLARI	34
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 4 - DOKU KÜLTÜRÜNDE KULLANILACAK BİTKİ KISIMLARINI HAZIRLAMA	36
1.5. YÜZEY STERİLİZASYONU	38
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 5 - YÜZEY STERİLİZASYONU YAPMA	42
1.6. DOKULARI KÜLTÜRE ALMA	44
1.6.1. Çevresel Faktörler	44
1.6.2. Bitki Doku Kültürünün Genel Tekniği	45
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 6 - DOKULARI KÜLTÜRE ALMA İŞLEMİNİ YAPMA	47
1.7. ALT KÜLTÜRE ALMA	49
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 7 - ALT KÜLTÜRE ALMA	53
1.8. BİTKİYİ DIŞ KOŞULLARA ALIŞTIRMA	55
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 8 - BİTKİYİ DIŞ KOŞULLARA ALIŞTIRMA	56
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	58

2. ÖĞRENME BİRİMİ: BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ

2.1. DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ	62
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 1 - DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ	63
2.2. KALLUS KÜLTÜRÜ	65
2.2.1. Kallus Kültürü İçin Gerekli Besin Ortamı Bileşimi	66
2.2.2. Kallus Kültüründe İhtiyaç Duyulan Kültür Koşulları	67
2.2.3. Kallus Kültürü Uygulaması	68
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 2 - KALLUS KÜLTÜRÜ	71
2.3. MERİSTEM KÜLTÜRÜ	73
2.3.1. Meristem Kültürü İçin Gerekli Besin Ortamı Bileşimi	74
2.3.2. Meristem Kültüründe İhtiyaç Duyulan Kültür Koşulları	75
2.3.3. Meristem Kültürü Uygulaması	75
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 3 - MERİSTEM KÜLTÜRÜ	76
2.4. EMBRİYO KÜLTÜRÜ	78
2.4.1. Embriyo Kültürü İçin Gerekli Besin Ortamı Bileşimi	81
2.4.2. Embriyo Kültüründe İhtiyaç Duyulan Kültür Koşulları	81
2.4.3. Embriyo Kültürü Uygulaması	82
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 4 - EMBRİYO KÜLTÜRÜ	84
2.5. MİKROÇOĞALTIM	86
2.5.1. Mikroçoğaltım Aşamaları	87
2.5.1.1. Hazırlık Aşaması	87
2.5.1.2. Kültür Başlangıç Aşaması	88
2.5.1.3. Sürgün Çoğaltım Aşaması	90
2.5.1.4. Sürgün Gelişimi ve Köklendirme Aşaması	92
2.5.1.5. Dış Ortama Alıştırma Aşaması	92
2.5.2. Mikroçoğaltım Uygulaması	93
UYGULAYALIM ÖĞRENELİM 5 - MİKROÇOĞALTIM YAPMA	94
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	96
SÖZLÜK	98
KAYNAKÇA	101
GENEL AĞ VE GÖRSEL KAYNAKÇASI	101
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME CEVAP ANAHTARI	102


DERS MATERYALİNİN TANITIMI



2. ÖĞRENME BİRİMİ

2.5. MİKROÇOĞALTIM

Yeni bir bitki oluşturma potansiyeline sahip embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallos, polen tanesi gibi bitki kısımlarından yapay besin ortamında, aseptik koşullar altında yeni bitki elde edilmesine **mikroçoğaltım** (klonal çoğaltım) denir (Görsel 2.19). Bu yöntemle geleneksel yöntemlere göre kısa sürede, daha az bir alanda, mevsime bağı kalmadan, çok sayıda hastaliksız bitki üretimi yapılabilmektedir. Mikroçoğaltım, klon anaçları ve virüsün arındırılmış çeşitlerin çok miktarda üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna karşın doku kültürü ile bitkilerin çoğaltılması pahalı olmasına rağmen özellikle çiğirinci azotlu tek-nikler kullanıldığında kısa sürede çok sayıda bitki üretilebilmektedir. Uygun kültür koşulları, gerekli besin ortamı ve hormon istekleri sağlandığında tüm bitki türlerini mikroçoğaltıma üretmek mümkündür. Özellikle ekonomik değeri yüksek olan süs bitkilerinde mikroçoğaltım geleneksel yöntemlerden daha iyi sonuç vermektedir.



Görsel 2.19: Mikroçoğaltım

Mikroçoğaltım, bazı doku kültürü teknikleri kullanılarak yapılan bir çoğaltım olup kullanılan eksplantın özelliklerine göre adlandırılır. Örneğin kullanılan eksplant embriyo ise embriyo kültürü, meristem ise meristem kültürü olarak isimlendirilir.

Mikroçoğaltımın geleneksel yöntemlere göre avantajları:

- Hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi
- Kitleleşme üretimi için yararlılığı
- Üretilen bitkilerde homojenite (genotip ve fenotip benzerlik) sağlanması
- Kısa sürede ve daha az bir alanda çok sayıda bitki üretimi
- Klasik yöntemlerle üretimi zor olan türlerin daha kolay üretimi
- Seçilmiş veya üstün özelliklere sahip çeşitlerin daha hızlı üretilmesi
- Az anaç kullanılması
- Yıl boyunca anaç ve yeni bitki üretilmesi
- Yeni çeşitlerin elde edilebilmesi

86

Sayfa yanlarında öğrenme biriminin numarasının hatırlatıldığı bölüm

Konu başlıklarını ve numarasını gösteren bölüm


Görsellerin sunulduğu bölüm

Görsel altı açıklamaları

Önemli bilgilerin ve uyarıların olduğu bölüm

2.5.1. Mikroçoğaltım Aşamaları

Mikroçoğaltım genel olarak beş aşamada gerçekleştirilir. Bu aşamalarda yapılacak uygulamalar mikroçoğaltımın başarısını etkiler. Eksplantın alındığı anaç bitkinin genotipi, sağlık durumu ve beslenme, bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulaması, ışık, sıcaklık gibi yetiştirme koşulları mikroçoğaltımda başarıyı etkileyen en önemli faktörlerdir.



Şema 2.2: Mikroçoğaltım aşamaları

2.5.1.1. Hazırlık Aşaması

Hazırlık aşaması anaç bitkilerin hijyenik koşullarda yetiştirilmesidir. Bu aşamada bakteriyel kontaminasyonu önlemek için anaç bitkiler kontrolü sera koşullarında yetiştirilmelidir. Ortamın en yüksek sıcaklığı 25 °C ve bağı nem en düşük %70 olmalıdır. Sakta toprağı steril edilmeye ortamında değıtirilmesi ve virüsleri yok etmek için toprağı sıcaklık uygulaması (36-37 °C) yapılmalıdır. Kontaminasyon riski nedeniyle bitkilere yağmurlama gibi üstün sulama yapılmamalıdır. Damlama sulama ya da ortamın nemlendirilmesiyle sulama yapılması daha uygundur.

Anaç bitkilerin fizyolojik durumlarını etkileyen önemli faktörler ışık, sıcaklık ve hormonlardır. Yıl boyunca standart eksplant elde etmek için seradaki fotoperiyot kontrol edilmeli ve kullanılan anaç uygun koşullar sağlanmalıdır.

87

Konu alt başlıklarını ve numaralarını gösteren bölüm

Sayfa yanlarında öğrenme biriminin adının hatırlatıldığı bölüm

Metinlerin bulunduğu bölüm

Bilgi köşesinin bulunduğu bölüm

BİTKİ GEN MERKEZLERİ

Doğada bulunan bitkisel kaynaklar üretimin amaçlarına göre kültüre alınmış ve günümüzde kullanılan çeşitler geliştirilmiştir. Bitki türlerindeki genetik çeşitliliğin ilk kez ortaya çıktığı, yoğun olarak bulunduğu ve dünyaya yayıldığı yerlere **bitki gen merkezi** denir. Bitki gen merkezlerinin dünyadaki coğrafik dağılımı konusundaki ilk bilimsel çalışmaları ünlü Rus Bitki Genetikçisi Nikolay Ivanovich Vavilov (1887-1943) yapmıştır. Vavilov'a göre dünyada yedi bitki gen merkezi vardır. Bunlar; Doğu Asya-Gün. Güney Asya-Hindistan, Orta Asya, Yakın Doğu, Akdeniz, Etyopya, Orta Amerika ve Güney Amerika'dır. Bu yedi bitki gen merkezinden iki tanesi ülkemizedir. Türkiye, Akdeniz ve Yakın Doğu Gen Merkezleri üzerinde yer almaktadır.

Ülkemizde yaklaşık 10 bin bitki türü bulunmakta ve bunlardan 1890 adedi ise endemik (yöreye özel, belli bir bölgede yetişen) özellik göstermektedir. Toros Dağları, Amanos Dağları, Kaz Dağları, Kuzey Geçit Bölgesi, Doğu Anadolu'nun kuzey ve güneyi ile Tuz Gölü civarı endemik bitki türünün en fazla yer aldığı yörelerimizdir.

Ülkemizde kültür bitkilerinde gen kaynağı belirleme ve toplama çalışmaları Mirza Gökşöl tarafından başlatılmıştır. Araştırmacı, buğday, çavdar ve patates gibi türler üzerinde çalışmış ve çok sayıda herbarium örneği toplamıştır. Gökşöl'ün topladığı örneklerin büyük bir kısmı İzmir Menemen'de bulunan Bitki Gen Kaynakları Araştırma Enstitüsü bünyesindeki Ulusal Gen Bankası herbariumunda yer almaktadır. Görsel 1.10'da herbarium örneği verilmiştir.



Görsel 1.10: Herbarium

10


Karekod, genel ağ ve görsel kaynakçasını gösteren bölüm

KAYNAKÇA

- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (2002). Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, 2. Baskı Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Gönülşen, N. (1987). T.C. Tarım Orman ve Köylere Bakanlığı, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Bitki Doku Kültürleri, Yöntemleri ve Uygulama Alanları. İzmir.
- Er, C. ve Canpolat, N. (1992). T.C. Tarım ve Köylere Bakanlığı, Bitki Islahında Doku Kültürleri, Ankara: Ankara Üniversitesi.
- Türneç, A. ve Turan, Z. M. (1992). Doku Kültür Yöntemleri ve Bitki Islahında Kullanım Olanakları. Uludağ Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi, Sayı: 9, 237-246.
- T.C. Millî Eğitim Bakanlığı, Mesleki ve Teknik Eğitim Genel Müdürlüğü. (2020). Laboratuvar Hizmetleri Alanı, Bitki Doku Kültürü ile Çoğaltma Dersi, ÇÖP ve Ders Bilgi Formu. Ankara: MEB.
- TDK. (2012). Yabancı Kelime. Ankara: Türk Dil Kurumu Yayınları.
- TDK. (2017, Haziran 09). Sözlük. TDK: <http://www.tdk.gov.tr>

GENEL AĞ VE GÖRSEL KAYNAKÇASI

Aşağıdaki kod aracılığı ile genel ağ kaynakçası ve görsel kaynakçaya ulaşabilirsiniz.



<http://kitap.uba.gov.tr/kitap/kaynak.php?KOD=1290>

101

3. UYGULAYALIM ÖĞRENELİM **BESİN ORTAMLARI HAZIRLAMA**

Bu çalışmanın amacı doku kültüründe kullanılacak besin ortamlarını hazırlamaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak doku kültüründe kullanılacak besin ortamını hazırlamanız beklenmektedir.

- Yapıştığımız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ VE KİMYASALLAR

- Stok solüsyonlar
- Agar
- Su banyosu
- pH metre
- Distile su
- Otoklav
- Cam malzemeler (petri kutusu, deney tüpü vb.)

İŞLEM BASAMAKLARI

1. Analiz öncesi hazırlıkları yapınız.
 - Çalışma ortamınızı ve kullanacağınız araç gereci hazırlayınız.
 - Araç gerecin temiz olmasına dikkat ediniz.
2. 2 litrelik bir kaba 500 ml distile su alıp üzerine 30 g sakkaroz ilave ediniz.
 - Sakkaroz eriyinceye kadar çözeltiyi karıştırınız.
3. 100 mg myo-inositol, 0,1 mg tiamin-HCl, 0,5 mg pridoksin-HCl, 2 mg glicin, 0,5 mg nikotinik asit tartarak çözeltiye ilave ediniz.
 - Tartımlarda dikkatli olunuz.
4. Daha sonra çözeltiye Tablo 1.3'te verilen stok A, B ve G solüsyonlarının her birinden 20 ml ekleyiniz.
 - Ölçümleri dikkatli yapınız.
5. Çözeltiye stok C, D, E, ve F solüsyonlarının her birinden 5 ml ekleyiniz.
 - Her bir stok solüsyondan eklemeyi unutmayınız.

Uygulamanın numarası

Uygulamanın adı

Uygulamanın amacının ve güvenlik önlemlerinin belirtildiği bölüm

Uygulamada kullanılacak araç gereç ve kimyasalların belirtildiği bölüm

Uygulamaya ilişkin iş ve işlemlerin belirtildiği bölüm

6. Uygun konsantrasyonda oksin ya da sitokinin ilave ederek çözeltiyi 900 ml'ye tamamlayınız.

- Amacınıza göre oksin ya da sitokinin ekleyiniz.

7. Çözeltinin pH değerini 5,8'e ayarlayarak elde ettiğiniz çözeltiyi dereceli silindire aktarıp distile su ile hacmi 1 litreye tamamlayınız.

- Otoklavlama işleminin önce besin ortamına bir miktar NaOH veya HCl asit ilave ederek pH değerini ayarlayınız.

8. Hazırlanan besin ortamını tüp, petri kabi gibi kültürün yapılacağı kaplara dağıtıp otoklavda 120 °C'de 15 dakika bekleterek sterilize ediniz.

- İki nedenden dolayı bu şekilde otoklavdan sonra eklemeyi unutmayınız.

9. Eğer katı besin ortamı hazırlanacaksa çözeltiyi 2 litrelik erlene aktarıp içine 8 g agar ilave ederek su banyosunda 100 °C'de eritiniz.

- Besin ortamının buza kıvamına gelmesine dikkat gösteriniz.

UYGULAMAYA İLİŞKİN DEĞERLENDİRME

Uygulamanız aşağıda verilen ölçütlere göre 100 puan üzerinden değerlendirilecektir.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	Çok İyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1. Besin ortamı için gerekli organik bileşikleri distile su içerisinde çözündürdünüz.				
2. Çözelti içerisinde stok solüsyonları gerekli miktarlarda eklediniz.				
3. Besin ortamının pH değerini ayarladınız.				
4. Hazırlanan besin ortamını tüp, petri kabı gibi kültürün yapılacağı kaplara dağıtıp otoklavda sterilize ettiniz.				
5. Besin ortamına katı besin için gerekli miktarda agar ekleyerek su banyosunda erittiniz.				
TOPLAM PUAN				

Değerlendirme formundan en az 70 puan aldıysanız bu uygulamaya için başarı düzeyinizi yeterli demektir. Eksik olduğunuz öğrenmeleri tekrar etmeniz önerilmektedir.

Uygulamaya ilişkin yapılacak değerlendirme bölümü

Öğrenme birimi sonunda ölçme ve değerlendirme çalışmalarının yer aldığı bölüm

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

A Aşağıdaki cümlelerde boş bırakılan yerlere doğru sözcükleri yazınız.

1. Bitkiden doku kültüründe kullanılmak amacıyla alınan bitki parçasına denir.
2. Yapay besin ortamında bir eksplanttan yeni bitki veya doku üretimesine denir.
3. Doku kültürü laboratuvarında , kültür hazırlama odası ve inkübasyon odası olmak üzere başlıca üç ana bölüm bulunur.
4. Bitkinin hücre, doku ve organlarının alt oldukları canlı organizma dışında steril yapay ortamlarda yetiştirilmesi veya bulunması olarak ifade edilir.
5. Kültüre alınan eksplantın yüzeyine yapılan sterilizasyona denir.
6. Dış koşullara alışma aşamasında kültür kaplarının kapakları periyodun son gününü yarım açılır.

B Aşağıdaki soruları okuyarak doğru olan seçeneği işaretleyiniz.

7. Aşağıdakilerden hangisi bitki doku kültüründe farklılaşmanın tanımıdır?
A) Canlı hücrelerin çoğalması için kullanılan kültür ortamıdır.
B) Bitkinin bir günlük zaman diliminde yaşa maruz kalma süresidir.
C) Kallus üretmek için meristematik duruma geri dönen olgun hücre olayıdır.
D) Kallus üretmek için meristematik duruma geri dönen olgun hücre olayıdır.
E) Meristematik özellik gösteren organize olmamış ve farklılaşmamış hücre kütesidir.
8. Aşağıdakilerden hangisi bitki doku kültürünün yapıldığı amaçlardan değildir?
A) Hastalıklara karşı dayanıklılığın artırılması
B) Bitkilerin hızlı çoğaltılması
C) Yeni çeşitlerin geliştirilmesi
D) Patojen içeren bitkisel materyali üretmesi
E) Çevresel koşullara dayanıklı bitki üretmesi

58

Ölçme tekniklerinin yer aldığı bölüm

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

9. Aşağıdakilerden hangisi bitki doku kültürü laboratuvarında bulunan cihazlardan değildir?
A) Tulum sayısı
B) Su banyosu
C) Elotr
D) Çalışma kabini
E) pH metre
10. Aşağıdakilerden hangisi besin ortamlarında kullanılan organik bileşiklerdendir?
A) Azot
B) Su
C) Amino asitler
D) Mineral tuzlar
E) Karbon
11. Aşağıdakilerden hangisi bir besin ortamını oluşturan maddelerden değildir?
A) Su
B) Toprak
C) İnorganik bileşikler
D) Organik bileşikler
E) Doğal bileşikler
12. Aşağıdaki bitki büyüme düzenleyicilerden hangisi olgunlaşma hormonu olarak kullanılır?
A) Etilen
B) Gibberellin
C) Sitokinin
D) Absisik asit
E) Oksin
13. Aşağıdakilerden hangisi bitki doku kültüründe çevresel faktörler içinde yer almaz?
A) Işık yoğunluğu
B) Aydınlanma süresi
C) Sıcaklık
D) Nem
E) Besin ortamı

C Aşağıda verilen soruları yanıtlayınız.

14. In vitro koşullarda bitki doku kültüründe sterilizasyon işleminin önemi ve yapıldığı açıklayınız.
15. Bir eksplanttan yeniden tam bir bitki elde edilmesini için uygulanan temel adımlar nelerdir? Kısaça açıklayınız.
16. Doku kültürü çalışmalarında kültürler neden alt kültüre alınır? Açıklayınız.

59

Bu ders materyalinde ölçü birimlerinin uluslararası kısaltmaları kullanılmıştır.

1 Öğrenme Birimi

KONULAR

- 1.1. DOKU KÜLTÜRÜ VE TERİMLERİ
- 1.2. DOKU KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN CİHAZ ALET VE EKİPMANLAR
- 1.3. BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİ İÇİN BESİN ORTAMLARI
- 1.4. KULLANILAN BİTKİ KISIMLARI
- 1.5. YÜZEY STERİLİZASYONU
- 1.6. DOKULARI KÜLTÜRE ALMA
- 1.7. ALT KÜLTÜRE ALMA
- 1.8. BİTKİYİ DIŞ KOŞULLARA ALIŞTIRMA

NELER ÖĞRENECEKSİNİZ?

- Doku kültürü ve terimleri
- Doku kültüründe kullanılan cihaz, alet ve ekipmanları
- Bitki doku kültüründe kullanılan sıvı ve katı besin ortamları ile kimyasalları
- Doku kültüründe kullanılacak bitki kısımlarını
- Yüzey sterilizasyonu
- Dokuları kültüre alma işlemi
- Alt kültürlerde amaca uygun kültür gelişimi
- Bitkiyi dış koşullara alıştıurma işlemi

TEMEL KAVRAMLAR

eksplant, rejenerasyon, fotoperiyot, kallus, meristem, farklılaşma, in vitro, hücre kültürü, süspansiyon kültürü, aseptik ortam, mikroçoğaltım, anter, embriyo, inkübasyon, varyabilite, alt kültür, hormon

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ



HAZIRLIK ZAMANI

1. Sizce her bitkiyi, istediğiniz her bölgede yetiştirebilir misiniz? Düşüncelerinizi nedenleriyle açıklayınız.
2. Çevrenizde bitki çoğaltma işleminin hangi yollarla yapıldığına şahit oldunuz? Açıklayınız.

1.1. DOKU KÜLTÜRÜ VE TERİMLERİ

Dünyadaki tüm insanların yeterli ve dengeli beslenmesi için tarımsal üretimin artırılması gerekmektedir. Bu amaçla tarımı yapılan bitkilerin daha verimli olması ve bitkilerden kaliteli ürün elde edilebilmesi için bitkiler kontrollü olarak üretilmektedir. Bu çalışmalar sayesinde birçok ürünün kalitesi artırılmış ve tarımsal özellikleri iyileştirilmiştir.

Bitkilerin iyileştirilmesi veya istenen özellikte yeni bitki elde edilmesi amacıyla genellikle vejetatif ve genratif üretim yöntemleri kullanılmaktadır. Klasik yöntemlere göre daha kısa zamanda sonuç vermesi sayesinde bitki doku kültürü en çok tercih edilen vejetatif üretim yöntemlerindedir. **Bitki doku kültürü**; hücre, doku veya organ gibi çeşitli bitki kısımlarının (eksplant), aseptik koşullarda yapay bir besin ortamında geliştirilerek yeni bitki, doku veya bitkisel ürünlerin üretilmesi işlemidir. Doku kültüründe bitkilerden alınan hücre, doku veya organlardan yeni doku, bitki ya da bitkisel ürünler üretilir (Görsel 1.1). Bitki doku kültürü ve genetik iyileştirme çalışmalarında bitkilerin rejenerasyonundan yararlanır. **Rejenerasyon** bazı doku ve hücrelerin yenilenebilme özelliğidir.



Görsel 1.1: Bitki parçasından yeni bitki üretimi

Bitki doku kültürünün yapılış amaçları:

- Yeni çeşitler geliştirmek veya mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak.
- Bitki gen kaynaklarını korumak.
- Hastalıklardan ve patojenlerden arındırılmış bitkisel materyal elde etmek.
- Geleneksel yöntemlerle çoğaltılması zor olan bitkileri üretmek.
- Hastalıklara karşı dayanıklılığı artırmak.
- Çevresel koşullara dayanıklı bitki genotiplerini korumak, seçmek ve dayanıklılığa cevap veren genlerin aktarılmasını sağlamak.
- Bitkileri hızlı çoğaltmak ve biyokimyasal ürünler elde etmek.

Bitki doku kültürü, ekonomik öneme sahip bitkilerin geliştirilmesine, büyümesine ve metabolizma faaliyetlerinin anlaşılmasına katkı sağlar. Doku kültürü ile bitki üretiminin vejetasyon dönemine bağlı olmaması, sınırsız bir şekilde üretme olanağı vermesi ve gen bankaları (doku bankaları) kurma gibi yararları vardır. Ayrıca doku kültürü; genetik çalışmalarda, seçilmiş genotiplerin değerlendirilmesinde, hızlı büyüyen fertlerin ortaya çıkarılmasında, dayanıklı bireylerin seçilmesinde kullanılmaktadır.

Eksplantların alındığı anaç bitkinin genotipi, sağlık durumu ve yetiştirme koşulları (beslenme, ışık, sıcaklık, vb.) mikroçöğaltimin başarısını etkilemektedir.

Doku kültürü çalışmalarında bilinmesi gereken bazı terimler:

Besin Ortamı: Canlı hücrelerin çoğalması için kullanılan kültür ortamıdır.

Fotoperiyot: Bitkinin bir günlük zaman diliminde ışığa maruz kalma süresidir.

Meristem Doku: Bitkilerde sürekli bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerin oluşturduğu embriyonik dokuya **meristem doku** denir.

Kallus Doku: Meristematik özellik gösteren organize olmamış ve farklılaşmamış hücre kütesine **kallus doku** veya **yara doku** adı verilir (Görsel 1.2).



Görsel 1.2: Kallus doku kültürü

Farklılaşma: Kallus üretmek için meristematik duruma geri dönen olgun hücre olayına **farklılaşma** denir.

Yeniden Farklılaşma: Kallus hücrelerinin bir bitki organına veya bütün bir bitkiye farklılaşma durumudur.

Eksplant: Doku kültüründe kullanılmak amacıyla kesilen bitki parçasına **eksplant** denir. Embriyo, genç yaprak, tomurcuk, kök, gövde gibi bitkinin herhangi bir kısmı eksplant olarak kullanılabilir.

İn Vitro: Bitkinin hücre, doku ve organlarının ait oldukları canlı organizma dışında steril yapay ortamlarda (laboratuvar, petri kabı, tüp vb.) yetiştirilmesini veya bulunmasını ifade eder.

Hücre Kültürü: Tek veya birkaç hücrenin in vitro kültürüne **hücre kültürü** denir.

Süspansiyon Kültürü: Sıvı bir ortamda süspansiyon edilen hücre ve hücre kümelerinin kültürüne **süspansiyon kültürü** denir.

Aseptik Ortam: Herhangi bir mikroorganizma türünden arındırılmış ortamdır (Görsel 1.3).

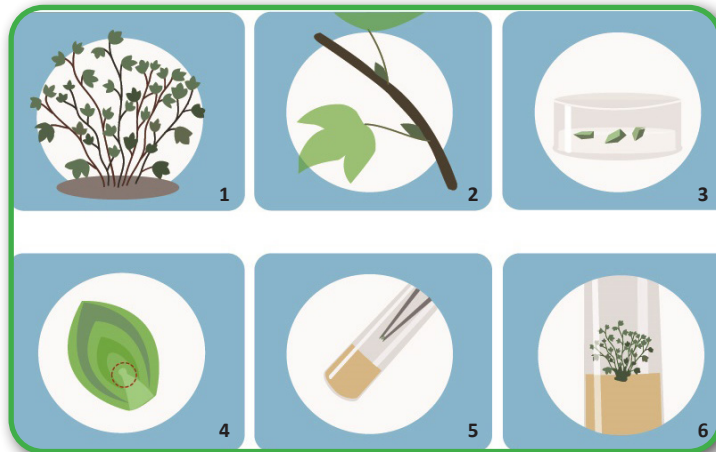


Görsel 1.3: Aseptik çalışma ortamı

Mikroçoğaltım: Bir bitkiden alınan tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından, yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullarda yeni bitkilerin elde edilerek çoğaltılmasına **mikroçoğaltım** denir.

Tanımdan da anlaşıldığı gibi bitki doku kültürleri tekniği üç ana kısımdan oluşur:

- Kültürün gelişmesi için gerekli organik ve inorganik maddeleri içeren steril bir besin ortamının hazırlanması
- Kültüre alınacak bitki parçasının (explant) orijinini oluşturan ana materyalin dezenfekte edilmesi (bakteri, mantar vb. temizlenmesi)
- Ana bitkiden istenen explantın (meristem, anter, embriyo, yaprak ucu vb. bitki parçasının) alınarak steril besin ortamına, steril şartlarda konulması ve gelişmesi için uygun çevre şartlarına yerleştirilmesi (Görsel 1.4)



Görsel 1.4: Bir bitkiden eksplant alınarak in vitroda yeni bitki yetiştirme

1.1.1. Laboratuvar Organizasyonu

Doku kültürü çalışmalarının her aşamasında sterilizasyon işlemi büyük önem taşımaktadır. Bitki kültürünün gelişmesi için kullanılan besi yerleri aynı zamanda bakteri ve mantarların gelişmesine de uygun ortamlardır. Gelişen bazı mikroorganizmaların çok hızlı çoğalması yavaş büyüyen bitki dokularını olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle bitki doku kültürü laboratuvarı, sterilizasyona uygun şekilde organize edilmelidir. Doku kültürü laboratuvarı; ön hazırlık, kültür hazırlama odası ve inkübasyon odası olmak üzere başlıca üç ana bölümden oluşur.

Ön Hazırlık Odası: Bitkinin temizlenip sterilize edildiği, besi yerlerinin hazırlandığı, çalışmalarda kullanılan kap ve malzemelerin yıkanıp temizlendiği odadır.

Ön hazırlık odasında hassas terazi, pH metre, otoklav, etüv ve buzdolabı olmalıdır. Ayrıca lavabo, çalışmaların yapılacağı masa, gaz ocağı ve kimyasal maddeler ile cam malzemelerin konulacağı dolaplar da olmalıdır.

Kültür Hazırlama Odası (Kesim Odası): Kültürün hazırlandığı steril kabinlerin yer aldığı ve bitkilerin yapay besin ortamlarına alındığı bölümdür. Kültür hazırlama yeri tamamen bağımsız steril odalar olabileceği gibi yalnızca bir bankonun üzerine yerleştirilecek steril kabinler de bu amaçla kullanılabilir. Kültür hazırlamada steril kabin kullanmak pratik ve ucuzdur. Bu amaçla tek kişinin çalıştığı küçük kabinler olduğu gibi iki veya daha çok kişinin rahatlıkla çalışabileceği çeşitli büyüklükte kabinler de bulunmaktadır.

Kültür hazırlama yeri olarak düzenlenecek odalar temiz olmalı, odalarda hava akımı olmamalıdır. Odaların penceresiz, iç yüzeyleri tamamen düz, yıkanabilir özellikte; sıcaklığı termostatla ayarlanabilen ve sterilizasyonu sağlanmış odalar olması gerekir. Burada çalışanlar maske kullanmalı, steril ayakkabı ve laboratuvar önlüğü giymelidir.

İnkübasyon Odası (Kültür Geliştirme Odası veya İklim Odası): Bitkiler yapay besin ortamlarına alındıktan sonra gelişebilmek için farklı çevre koşullarına ihtiyaç duymaktadır. Bazı bitki kültürleri sabit sıcaklık ve ışıklı ortamlarda gelişirken bazıları karanlıkta daha iyi gelişebilmektedir. Bu nedenle sıcaklık ve ışık, bitki gereksinimine göre planlanmaktadır.

Sıcaklığı istenilen düzeyde tutulabilen ve zaman ayarıyla ışıklandırması ayarlanabilen bir oda ya da inkübatörler kültür geliştirme odası olarak kullanılabilir (Görsel 1.5). Aydınlanma suni olarak floresan lambaları ile sağlanır. Işık isteyen kültürler için ışığın yoğunluğu kültürlerin lambalara olan uzaklıkları ile ayarlanabilir. Karanlık ortamda iyi gelişen bitki kültürleri için ise sadece sıcaklığı ayarlanabilen karanlık odalar kullanılabilir. Bunun mümkün olmadığı durumlarda, ışıklandırılan iklim odalarında kültürlerin üzeri alüminyum folyo veya başka materyallerle kapatılarak karanlık ortam elde edilebilir.



Görsel 1.5: İnkübatör

1. UYGULAYALIM ÖĞRENELİM

DOKU KÜLTÜRÜ VE TERİMLERİ



Bu çalışmanın amacı doku kültürü ve doku kültüründe kullanılan terimlerin tanıtımını yapmaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak doku kültürü ve doku kültüründe kullanılan terimlerin tanıtımı ile ilgili sunu hazırlamanız beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ

- Bilgisayar
- Akıllı tahta, projeksiyon makinesi vb.
- İnternet
- Diğer kaynaklar (kitap vb.)

İŞLEM BASAMAKLARI

1. Yapılacak sunu ile ilgili planlama yapınız.

- Çalışmalarınızı zamanında ve eksiksiz yerine getiriniz.
- Çalışma ortamınızı ve kullanacağınız araç gereci hazırlayınız.

2. Kaynak araştırması yapınız.

- Edindiğiniz kaynaklardan uygun olanlarını kullanınız.

3. Elde ettiğiniz bilgilerden sunu hazırlayınız.

- Sunu hazırlama kurallarına dikkat ediniz.
- Hazırlayacağınız sununun 20 sayfayı geçmemesine özen gösteriniz.

4. Hazırladığınız sunuyu sınıfta arkadaşlarınızla paylaşınız.

- Sununuzu verilen sürede tamamlamaya özen gösteriniz.

1.2. DOKU KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN CİHAZ, ALET VE EKİPMANLAR

Doku kültürü laboratuvarının tavanı, duvarları ısı ve su yalıtımlı; pencereleri çift camlı olmalıdır. Laboratuvarın iç yüzeyi, yanmaz materyalle veya fayansla kaplanmalıdır. Elektrik tesisatı topraklı, kablolar duvara gömülü olmalı; yeterli sayıda priz bulunmalıdır. Ayarlanabilir ısıtma sistemi, temiz ve atık su tesisatı olmalıdır. Genellikle bitki doku kültüründe en önemli konu temizlik olduğundan laboratuvar, aseptik şartları sağlayacak nitelikte olmalıdır. Doku kültürü laboratuvarlarında kontaminasyon kaynaklı kültür kayıpları %1-50 arasında değişmektedir. Bu nedenle yapılacak rutin laboratuvar temizliği ve aseptik şartlar kültür kayıplarını en aza indirecektir.

Laboratuvarda; sera, görüntüleme işlemlerinin yapılacağı bir bölüm, ofis, ön temizleme odası, besin ortamı hazırlama odası, steril transfer odası, inkübasyon ve kültür odası olmalıdır. Serada kontrollü sıcaklık, nem ve ışık sistemi bulunmalıdır. Serada bütün ekim ve dikimler saksılara yapıldığından saksılarda kullanılan toprak, torf, kompost gibi materyaller kullanım sonrasında ortamdaki uzaklaştırılmalıdır.

Genellikle laboratuvarlarda kullanılan cam malzemeler bitki doku kültürü laboratuvarında da kullanılmaktadır. Geniş ağızlı erlenler, farklı boyutlarda deney tüpleri, petri kapları, kapaklı saklama şişeleri doku kültürü yapımında sıklıkla kullanılan cam malzemelerdir. Besin ortamı hazırlığında veya stok ortamların depolanması için farklı hacimlerde dereceli ölçü silindirleri, pipetler, beherler ve büyük hacimlerde erlenler kullanılmaktadır. Cam malzemeler sterilizasyon açısından borosilikat camdan yapılmış ve otoklavlanabilir olmalıdır.

Bitki doku kültürü laboratuvarında bulunması gereken araç gereç ve ekipmanlar: Beher, erlen, dereceli silindir, cam kavanozlar, cam şişeler, çeşitli ölçülerde ayarlanabilen mikro pipetler, pastör pipetleri, farklı hacimlerde petri kapları, pipet ve pipet pompaları, pipet yıkayıcı, farklı hacimlerde deney tüpleri, fide dikim kapları, bisturi, pens ve spatül (Görsel 1.6), bek alevi, analitik terazi, aspiratör, basınçlı hava kaynağı (kompresör), buhar banyosu (100 °C'ye kadar ayarlanabilen), derin donduruculu buzdolabı, etüv, ısıtıcı manyetik karıştırıcı, laminar hava akışlı çalışma kabini (HEPA filtreli), mikrodalga fırın, stereo mikroskoplar, otoklav, pH metre, saf su cihazı, yatay çalkalayıcı, santrifüj, vakum pompası, görüntüleme araçları (fotoğraf makinesi vb.).



a



b



c

Görsel 1.6: Bisturi (a), pens (b), spatül (c)

2. UYGULAYALIM ÖĞRENELİM

DOKU KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN CİHAZ, ALET VE EKİPMANLAR



Bu çalışmanın amacı doku kültüründe kullanılan cihaz, alet ve ekipmanların tanıtımını yapmaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak doku kültüründe kullanılan cihaz, alet ve ekipmanların tanıtımını yapmanız beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ

- Doku kültürü laboratuvar ortamı
- Cam malzemeler (petri kutusu, deney tüpü vb.)
- Metal malzemeler (pens, bisturi vb.)
- Cihazlar (büyüme kabini, otoklav vb.)

İŞLEM BASAMAKLARI

1. Doku kültürü laboratuvarında bulunan bölümlerin tanıtımını yapınız.

- Bölümlerin ne amaçla kullanıldığını açıklayınız.

2. Doku kültürü laboratuvarında bulunan cihazların tanıtımını yapınız.

- Cihazların kullanma talimatına göre nasıl çalıştırılması gerektiğini anlatınız.
- Cihazların ne amaçla kullanıldığını anlatınız.

3. Doku kültürü laboratuvarında bulunan aletlerin tanıtımını yapınız.

- Aletlerin ne amaçla kullanıldığını anlatınız.

4. Doku kültürü laboratuvarında bulunan ekipmanların tanıtımını yapınız.

- Doku kültürü laboratuvarında bulunan ekipmanların ne amaçla kullanıldığını anlatınız.

5. Doku kültürü laboratuvarında bulunan cihazları kapatıp, alet ve ekipmanları kontrollerini yaparak yerine yerleştiriniz.

- Doku kültürü laboratuvarında bulunan cihazları kapatınız.
- Doku kültürü laboratuvarında bulunan alet ve ekipmanları kontrollerini yaparak yerlerine düzgünce yerleştiriniz.

1.3. BESİN ORTAMLARI

Bitki hücre, doku ve organları doğal olarak kendine uygun besin maddelerini içeren ortamlarda gelişir (Görsel 1.7). Bu amaçla çeşitli araştırmacılar tarafından hazırlanmış ve onların adları ile anılan birçok besin ortamı bulunmaktadır. İnorganik maddeler, organik maddeler, bitki büyüme düzenleyicileri ve doğal kompleksler besin ortamının temel içeriklerindedir. Ancak doku kültürü uygulamalarında kullanılan besin ortamı bileşimi bitki türlerine ve bitkiden alınan eksplanta göre bazı farklılıklar gösterebilir. Bu nedenle besin ortamı amaca ve kültüre alınan bitki materyaline uygun seçilmeli veya buna göre değiştirilmelidir.



Görsel 1.7: Besin ortamı

Doku kültüründe kullanılan bazı besin ortamları:

MS Ortamı: Tütün bitkisinin doku kültürleri için geliştirilmiş olup yüksek tuz içeriğine sahip besin ortamıdır. Farklı konsantrasyonlarda birçok bitki türündeki köklendirme çalışmalarında kullanılmaktadır.

B5 Ortamı: Soya bitkisi kallus kültürleri için geliştirilmiş nitrat azotu yüksek bir besin ortamıdır.

LS Ortamı: MS ortamının organik bileşimler tarafından geliştirilmiş farklı bir şeklidir.

WH Ortamı: Domates köklerinin kültürü için geliştirilmiş düşük tuz içeriğine sahip besin ortamıdır.

SH Ortamı: Hem monokotiledon hem de dikotiledonlar için uygun bir besin ortamıdır.

NN Ortamı: Anter kültürü için geliştirilen besin ortamıdır.

Bir besin ortamını oluşturan maddeler su, inorganik bileşikler, organik bileşikler ve doğal bileşikler olmak üzere başlıca 4 grupta toplanabilir.

Su: Besin ortamının yaklaşık %97'sini oluşturur. Besin ortamı hazırlarken saf su kullanılmalıdır.

İnorganik Bileşikler: Aktif olarak gelişen bitki dokuları bazı elementlere ve mineral tuzlara ihtiyaç duyar. Bitki materyaline ve kültür amacına göre değişmekle birlikte en fazla istenilen elementler karbon, oksijen ve hidrojenidir. Azot genellikle nitrat ve amonyum şeklinde, fosfor fosfat ve kükürt sülfat olarak kullanılırken potasyum ana katyon olarak besin ortamında yer alır. Demir ise demir tartarat, şelat (NaFe EDTA), demir klorür veya demir sülfat gibi inorganik demir bileşikleri şeklinde ilave edilebilir. Ayrıca kalsiyum, magnezyum, sodyum ve klor da az miktarlarda besin ortamına eklenmektedir. Tablo 1.1'de çeşitli besin ortamlarında bulunan makro inorganik bileşikler verilmiştir.

Tablo 1.1: Çeşitli Besin Ortamlarında Bulunan Makro İnorganik Bileşikler (mg/l)

BİLEŞİKLER	HELLER (1953)	REINERT VE WHITE (1956)	MURASHIGE VE SKOOG (1962)	WHITE (1963)	GAMBORG VE ARKADAŞLARI (1968)	SCHEK VE HILLDEBRANDT (1972)
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	-	-	-	-	134	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	360	370	720	500	400
Na_2SO_4	-	200	-	200	-	-
KCl	750	65	-	65	-	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	75	-	440	-	150	200
NaNO_3	600	-	-	-	-	-
KNO_3	-	80	1900	80	3000	2500
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	200	-	300	-	-
NH_4NO_3	-	-	1650	-	-	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	125	16,5	-	16,5	150	-
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	-	-	-	300
KH_2PO_4	-	-	170	-	-	-

Organik Bileşikler: Besin ortamlarında farklı organik bileşikler kullanılmakta olup karbonhidratlar, vitaminler, büyüme düzenleyiciler, amino asitler ve diğer azotlu bileşikler bu grupta yer alır.

Enerji kaynağı olarak %2-3 oranında ilave edilen sakkaroz en fazla kullanılan karbonhidrattır. Bazı durumlarda fruktoz ve glikoz da kullanılabilir.

Bitkiler normal şartlarda büyüme ve gelişmeleri için ihtiyaç duydukları vitaminleri kendileri sentezler. Ancak kültür şartlarında bazı vitaminler sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle bunların besin ortamına eklenmesi gerekmektedir.

Büyüme düzenleyiciler çok düşük konsantrasyonlarda kullanılmasına rağmen kültürün büyüme ve gelişmesinde etkili olan bileşiklerdir. Bitki çoğaltmada kullanılan en önemli büyüme hormonları oksin ve sitokinlerdir. Oksinler yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidir. Sitokinler ise bitkide hücre bölünmesini ve özelleşmemiş genç hücrelerde farklılaşmayı sağlar. Taze bitki parçacıkları besin ortamında oksin ve sitokin olduğunda kök ve gövde oluşumunu hızlandırır. Besin ortamında iki hormonun orta düzeyde olması ile adventif gövde gelişmesi meydana gelir. Sitokin fazla olması yan sürgünlerin gelişmesi için ve oksinin fazla olması ise kök oluşumu için gereklidir.

Tablo 1.2'de bazı besin ortamlarında bulunan organik bileşikler verilmiştir.

Tablo 1.2: Bazı Besin Ortamlarında Bulunan Organik Bileşikler (mg/l)

BİLEŞİKLER	HELLER (1953)	REINERT VE WHITE (1956)	SCHENK VE HILLDEBRANDT (1972)
Sakkaroz	20	-	30
Myo-inositol	-	100	1000
Nikotinic asit	-	0,5	0,5
Piridoksin HCl	-	0,1	0,5
Thiamine HCl	1	0,1	5
Ca pentotemat	-	0,1	-
Biotin	-	0,01	-
Sistenik HCl	10	3	-

Doğal Bileşikler: Kullanılan kimyasal maddelerden olumlu sonuç alınmadığı durumlarda besin ortamlarına değişik doğal bileşiklerin ilave edilmesi fayda sağlamaktadır. Besin ortamlarında en çok kullanılan doğal bileşikler:

- Hindistan cevizi ve mısırın endospermeleri
- Muz, portakal ve domatesin meyve pulp veya suları
- Kazein, laktalbumin gibi hidrolize proteinler
- Malt ve bira mayası
- Balık yağı gibi hayvansal ürünler

Fumarik asit, malik asit, sitrik asit ve sodyum pirüvat da besin ortamlarında kullanılan organik asitlerdir. Ayrıca agar, agoroz, aljinat, silikajel, jelatin ve nişasta ise besin ortamlarında yarı katılaştırıcı olarak kullanılmaktadır. Diğer yandan bazı antibiyotikler de besin ortamlarına ilave edilebilmektedir. Ancak çok hassas ve kolayca bozulabilen maddeler olduklarından otoklavlama işleminden sonra besin ortamına eklenmelidir.

1.3.1. Besin Ortamının Hazırlanması

Besin ortamının katı veya sıvı olması kültürdeki başarıyı etkilemektedir. Örneğin bazı orkide türleri sıvı ortamda olumlu sonuç verirken kuşkonmaz katı ortamda iyi gelişmektedir. Ayrıca aynı kültürün başlangıç döneminde istediği besin ortamı ile sürgün veya kök oluşma devrelerinde istediği ortam tipleri farklı olabilmektedir. Bazı bitkilerde kallus kültüründe sürgün oluşabilmesi için katı besin ortamına ihtiyaç varken aynı kültürün daha sonra sıvı ortama transfer edilmesi gerekebilir (Görsel 1.8).



Görsel 1.8: Sıvı besin ortamı

Katı besin ortamlarında köklerin zayıf gelişmesi, agarın kuruması, kültürün transferinde zorluklar olabilmektedir. Bu nedenle genellikle meristem kültürleri için sıvı ortam daha uygundur. Diğer yandan sıvı besin ortamı kullanıldığında kültürün oksijensiz kalması söz konusu olabilmektedir. Bu nedenle yapılan kültür çalışmalarının amacına uygun besin ortamlarının seçilmesi çalışmanın başarısı açısından oldukça önemlidir.

Katı besin ortamında kullanılan agarın konsantrasyonu ve kalitesi de oldukça önemlidir. Örneğin agarın fazla konsantrasyonu sert bir ortam oluşmasına neden olmakta ve bu durum bitki dokularının gelişmesini engellemektedir. Genellikle katı ortam için litreye 6-8 gram agar yeterlidir. Ayrıca besi ortamının pH değeri önemli bir faktör olup genellikle 5,5-5,8 arasında olması birçok bitki kültürü için uygundur. Hazırlanan besin ortamının asidik veya bazik olmasına göre otoklavlama işleminden önce ortama bir miktar NaOH veya HCl asit ilave edilerek pH değeri ayarlanmalıdır.

Kullanılacak besin ortamında bulunan inorganik bileşiklerin birim hacimdeki miktarları fazla ise maddelerin her biri hassas terazide tartılarak ortam hazırlanabilir. Ancak sıkça kültür yapılan ve kullanılan bitki materyaline göre değişik besin ortamlarının kullanıldığı durumlarda stok solüsyonların hazırlanarak buzdolabında muhafaza edilmesi gerekir.

1 Litre MS Besin Ortamının Hazırlanması: 2 litrelik bir kaba 500 ml distile su alınır, üzerine 30 g sakkaroz ilave edilip sakkaroz eriyinceye kadar çözelti karıştırılır. Çözeltiye myo-inositol (100 mg), tiamin-HCl (0,1 mg), pridoksin-HCl (0,5 mg), glisin (2 mg), nikotik asit (0,5 mg) ilave edilir. Daha sonra çözeltiye Tablo 1.3'te verilen A, B ve G stok solüsyonlarının her birinden 20 ml, C, D, E, F stok solüsyonlarının her birinden de 5 ml eklenir. Uygun konsantrasyonda oksin ya da sitokinin ilave edilerek çözelti 900 ml'ye tamamlanır ve pH değeri 5,8'e ayarlanır. Elde edilen çözelti dereceli silindire aktarılarak distile su ile hacmi 1 litreye tamamlanır. Hazırlanan besin ortamı tüp, petri kabı gibi kültürün yapılacağı kaplara dağıtılıp otoklavda 120 °C'de 15 dakika bekletilerek sterilize edilir. Isı nedeniyle bozulabilecek maddeler otoklavdan sonra eklenmelidir. Eğer katı besin ortamı hazırlanacaksa çözelti 2 litrelik erlene aktarılarak içine 6-8 g agar ilave edilir ve su banyosunda 100 °C'de eritilir. Hazırlanan besin ortamı ihtiyaç duyuldukça daha önce sterilize edilmiş kültür kaplarına steril kabin içinde aktarılmalıdır.

Tablo 1.3: Stok Solüsyonlarla MS Besin Ortamının Hazırlanması (George, 1993)

SOLÜSYON KODU	SOLÜSYONUN BİLEŞENLERİ	MİKTAR (g/l)
Stok solüsyon A	NH ₄ NO ₃	82,5
Stok solüsyon B	KNO ₃	95
Stok solüsyon G	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	1,865
	FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39
Stok solüsyon C	CaCl ₂ .2H ₂ O	88
Stok solüsyon D	KH ₂ PO ₄	34
Stok solüsyon E	H ₃ BO ₃	1,24
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005
	KI	0,166
Stok solüsyon F	MnSO ₄ .H ₂ O	3,38
	MgSO ₄ .7H ₂ O	74,0
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,725

3. UYGULAYALIM
ÖĞRENELİM

BESİN ORTAMLARI HAZIRLAMA



Bu çalışmanın amacı doku kültüründe kullanılacak besin ortamlarını hazırlamaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak doku kültüründe kullanılacak besin ortamını hazırlamanız beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ VE KİMYASALLAR

- Stok solüsyonlar
- Agar
- Su banyosu
- pH metre
- Distile su
- Otoklav
- Cam malzemeler (petri kutusu, deney tüpü vb.)

İŞLEM BASAMAKLARI

1. Analiz öncesi hazırlıkları yapınız.

- Çalışma ortamınızı ve kullanacağınız araç gereci hazırlayınız.
- Araç gerecin temiz olmasına dikkat ediniz.

2. 2 litrelik bir kaba 500 ml distile su alıp üzerine 30 g sakkaroz ilave ediniz.

- Sakkaroz eriyinceye kadar çözeltiyi karıştırınız.

3. 100 mg myo-inositol, 0,1 mg tiamin-HCl, 0,5 mg pridoksin-HCl, 2 mg glisin, 0,5 mg nikotinic asit tartarak çözeltiye ilave ediniz.

- Tartımlarda dikkatli olunuz.

4. Daha sonra çözeltiyi Tablo 1.3'te verilen stok A, B ve G solüsyonlarının her birinden 20 ml ekleyiniz.

- Ölçümleri dikkatli yapınız.

5. Çözeltiyi stok C, D, E, ve F solüsyonlarının her birinden 5 ml ekleyiniz.

- Her bir stok solüsyondan eklemeyi unutmayınız.

6. Uygun konsantrasyonda oksin ya da sitokinin ilave ederek çözeltiyi 900 ml'ye tamamlayınız.

- Amacınıza göre oksin ya da sitokinin ekleyiniz.

7. Çözeltinin pH değerini 5,8'e ayarlayarak elde ettiğiniz çözeltiyi dereceli silindire aktarıp distile su ile hacmi 1 litreye tamamlayınız.

- Otoklavlama işleminden önce besin ortamına bir miktar NaOH veya HCl asit ilave ederek pH değerini ayarlayınız.

8. Hazırlanan besin ortamını tüp, petri kabı gibi kültürün yapılacağı kaplara dağıtıp otoklavda 120 °C'de 15 dakika bekleterek sterilize ediniz.

- Isı nedeniyle bozulabilecek maddeleri otoklavdan sonra eklemeyi unutmayınız.

9. Eğer katı besin ortamı hazırlanacaksa çözeltiyi 2 litrelik erlene aktarıp içine 8 g agar ilave ederek su banyosunda 100 °C'de eritiniz.

- Besin ortamının boza kıvamına gelmesine özen gösteriniz.

UYGULAMAYA İLİŞKİN DEĞERLENDİRME

Uygulamanız aşağıda verilen ölçütlere göre 100 puan üzerinden değerlendirilecektir.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	Çok İyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1. Besin ortamı için gerekli organik bileşiklere distile su içerisinde çözüldü.				
2. Çözelti içerisine stok solüsyonları gerekli miktarlarda ekledi.				
3. Besin ortamının pH değerini ayarladı.				
4. Hazırlanan besin ortamını tüp, petri kabı gibi kültürün yapılacağı kaplara dağıtıp otoklavda sterilize etti.				
5. Besin ortamına katı besi yeri için gerekli miktarda agar ekleyerek su banyosunda eritti.				
TOPLAM PUAN				

Değerlendirme formundan **en az 70** puan aldıysanız bu uygulama için başarı düzeyiniz yeterli demektir. Eksik olduğunuz öğrenmeleri tekrar etmeniz önerilmektedir.

1.4. BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİ İÇİN KULLANILAN BİTKİ KISIMLARI

Bitki doku kültürü çalışmasında kültürü yapılacak bitki parçasının (eksplant) fizyolojik yaşı, alındığı mevsim, eksplantın büyüklüğü, ana bitkinin kalitesi ve fizyolojik durumu önemlidir. Ana bitkinin sağlıklı ve aktif büyüme başlangıcında olması gerekmektedir. Örneğin uyku (dormant) veya yarı dormant dönemdeki bitkilerden alınan eksplantlardan yapılan kültürlerde iyi sonuçlar elde edilemez. Kültür çalışmasının başarı düzeyi ana bitki ve o bitkiden alınacak bitki parçasının yerine göre değişir. Bu nedenle kültürde kullanılacak bitki parçasının alınacağı yer her bitkide farklılık gösterir. Örneğin karanfilde sürgün ucu, marulda kotiledon yaprakları, bazı orkide türlerinde ise yaprak uçları üretim için en iyi bitki kısımlarıdır (Görsel 1.9).



Görsel 1.9: Eksplant seçimi

Ana bitkiden alınan bitki parçasının fizyolojik yaşı ve hücre yapılarındaki değişiklikler de kültürün gelişmesinde farklılıklara sebep olmaktadır. Bazı bitkilerin genç yaprakları ile yapılan kültürlerde yalnız kök, yaşlı yapraklardan ise sadece sürgün oluşmaktadır. Buna karşın orta yaştaki yapraklardan ise hem kök hem de sürgün oluşabilmektedir.

Explantın rejeneratif karakteri üzerinde alındığı mevsimin etkisi büyüktür. Örneğin Japon zambağı bitkisinde soğan yapraklarıyla ilkbahar ve sonbaharda yapılan kültürlerde başarılı sonuç alınmış oysa kış ve yaz kültürlerinde çoğalmanın çok zor olduğu saptanmıştır. Yine patates bitkisi ile yapılan kültürlerde aralık ve nisan aylarında yapılan kültürlerde başarılı sonuç alınırken şubat, mart veya mayıs, kasım aylarında yapılan kültür çalışmaları sonuçları istenen düzeyde olmamıştır.

Alınacak bitki parçasının büyüklüğü de kültürdeki başarıyı etkilemektedir. Örneğin meristem kültüründe çok küçük bir explant başlangıcı olduğundan meristem kültürü ile hızlı üretim zordur. Diğer yandan izole edilen explantın boyutları arttığında mikroorganizma bulaşma olasılığı da artmaktadır.



BİLGİ KÖŞESİ

BİTKİ GEN MERKEZLERİ

Doğada bulunan bitkisel kaynaklar tüketim amaçlarına göre kültüre alınmış ve günümüzde kullanılan çeşitler geliştirilmiştir. Bitki türlerindeki genetik çeşitliliğin ilk kez ortaya çıktığı, yoğun olarak bulunduğu ve dünyaya yayıldığı yerlere **bitki gen merkezi** denir. Bitki gen merkezlerinin dünyadaki coğrafik dağılışı konusundaki ilk bilimsel çalışmaları ünlü Rus Bitki Genetikçisi Nikolay Ivanovich Vavilov (1887-1943) yapmıştır. Vavilov'a göre dünyada yedi bitki gen merkezi vardır. Bunlar; Doğu Asya-Çin, Güney Asya-Hindistan, Orta Asya, Yakın Doğu, Akdeniz, Etiyopya, Orta Amerika ve Güney Amerika'dır. Bu yedi bitki gen merkezinden iki tanesi ülkemizdedir. Türkiye, Akdeniz ve Yakın Doğu Gen Merkezleri üzerinde yer almaktadır.

Ülkemizde yaklaşık 10 bin bitki türü bulunmakta ve bunlardan 1890 adedi ise endemik (yöreye özgü, belli bir bölgede yetişen) özellik göstermektedir. Toros Dağları, Amanos Dağları, Kaz Dağları, Kuzey Geçit Bölgesi, Doğu Anadolu'nun kuzey ve güneyi ile Tuz Gölü civarı endemik bitki türünün en fazla yer aldığı yörelerimizdir.

Ülkemizde kültür bitkilerinde gen kaynağı belirleme ve toplama çalışmaları Mirza Gökgöl tarafından başlatılmıştır. Araştırmacı; buğday, çavdar ve patates gibi türler üzerinde çalışmış ve çok sayıda herbarium örneği toplamıştır. Gökgöl'ün topladığı örneklerin büyük bir kısmı İzmir Menemen'de bulunan Bitki Gen Kaynakları Araştırma Enstitüsü bünyesindeki Ulusal Gen Bankası herbariumunda yer almaktadır. Görsel 1.10' da herbarium örneği verilmiştir.



Görsel 1.10: Herbarium

4. UYGULAYALIM ÖĞRENELİM

DOKU KÜLTÜRÜNDE KULLANILACAK BİTKİ KISIMLARINI HAZIRLAMA



Bu çalışmanın amacı doku kültüründe kullanılacak bitki kısımlarını hazırlamaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak doku kültüründe kullanılacak bitki kısımlarını hazırlamanız beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ VE KİMYASALLAR

- Kullanılacak bitki materyali
- Bisturi
- Saklama kabı
- Cam malzemeler (petri kutusu, beher vb.)
- Eldiven
- Saf su

İŞLEM BASAMAKLARI

1. Çalışma öncesi hazırlıkları yapınız.

- Çalışma ortamınızı ve kullanacağınız araç gereci hazırlayınız.
- Araç gerecin temiz olmasına dikkat ediniz.

2. Çalışacağınız bitkiyi seçiniz.

- Bitkinin yaşı ve yetiştirme ortamı gibi durumların başarıyı etkilediğini unutmayınız.
- Eğer dış koşullardan bitki seçerseniz seçtiğiniz bitki kısmını toz, kir parçacıklarından arındırmak için saf su kullanınız.

3. Seçtiğiniz bitkiden doku uygulamasında kullanacağınız kısmı belirleyiniz.

- Seçtiğiniz bitkiden alacağınız doku kısmının seçiminde dikkatli olunuz (yaprak, tomurcuk vb.).
- Eksplantı ana bitkinin üst kısımlarından seçmeye özen gösteriniz.

4. Belirlediğiniz eksplantı bir bisturi yardımıyla ana bitkiden ayırınız.

- Bisturiyi kullanırken dikkatli olunuz.
- Eksplantı alırken bitki dokusunun hasar görmemesine özen gösteriniz.

5. Aldığınız eksplantta kullanacağınız doku kısmının etrafındaki diken, yaprak gibi kısımları temizleyiniz.

- Kullanacağınız dokuya zarar vermemeye özen gösteriniz.
- Eğer eksplant hemen kullanılmayacaksa saklama kabına alıp uygun koşullarda saklayınız.

6. Temizlenen eksplanttan doku kültürüne alacağınız kısımları ayırınız.

- Kültüre alınacak dokulara zarar vermemeye özen gösteriniz.

1.5. YÜZEY STERİLİZASYONU

Doku kültürü çalışmalarında arazi veya sera koşullarında yetiştirilen bitkilerden doku kültüründe kullanılmak için alınan bitki parçaları steril değildir. Bundan dolayı öncelikle bu materyalin sterilizasyonu yapılmalıdır. Eksplantın sterilizasyonunda sterilize edilmiş malzemeler kullanılmalıdır. Sterilizasyon işlemi süresince steril kabin içerisinde çalışılmalıdır. Steril saf su ile durulanan bitkiler yine steril olan kurutma kağıdında bekletildikten sonra besin ortamına aktarılmalıdır.

Explant bitkiden izole edilmeden önce bitki yüzeyinin steril hâle getirilmesi gerekir. Bunun için çalışılan bitki materyaline göre en iyi sterilant madde konsantrasyonu ve uygulama süresi belirlenir. Kültür çalışmalarında kalsiyum ve sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonları, hidrojen peroksit, gümüş nitrat, etil alkol, cıva klorür sterilizasyon için kullanılabilir. Sterilizasyonun tam sağlanabilmesi için ana bitkiden izole edilen bitki parçası %70'lik etanole 30 saniye daldırılıp çıkarılmalı, daha sonra kullanılacak sterilant solüsyon içinde uygun süre bekletilmelidir. Sterilant solüsyonda tutulan bitki parçaları solüsyon içinden alınarak üç kez steril saf su ile çalkalanmalıdır (Görsel 1.11). Böylece bitki parçalarından sterilant madde uzaklaştırılmış olur.



Görsel 1.11: Saf su ile durulama

Bitki doku kültüründe en yaygın kontaminasyon kaynağı bakterilerdir (agrobacterium, basillus, lactobacillus vb.). Mikroorganizmalar genellikle bitki materyali ile gelir ve yüzey sterilizasyonu iyi yapılmadığında yayılır. Besin ortamında beyaz, krem, pembe veya sarı renkte çoğunlukla şeffaf koloniler oluştururlar. Funguslar da bitki materyali ile gelebilir ve beyaz, gri, mavi renkte, lifli görünümde besin ortamının üzerini kaplar. Virüsler çoğunlukla tespit edilemez. İn vitro koşullarda bitki doku kültüründe en önemli konu sterilizasyon işlemi olup tüm laboratuvar için geçerlidir. Sterilizasyon işlemi üç ana kısımda ele alınır:

1. Bitki materyalinin sterilizasyonu
2. Çalışma ortamının sterilizasyonu
3. Kullanılacak araç gereç ve besin ortamının sterilizasyonu

Materyal Sterilizasyonu: Kültüre alınan bitki materyalinin sterilizasyonudur. Bitki materyalinin yüzeyinde olabilecek mantar sporları ve bakterileri yok etmek için sterilizasyon yapılır (Görsel 1.12). Eksplantlar kış sonunda veya erken ilkbaharda alındığında bu enfeksiyonlar en az düzeyde olmaktadır. Doku kültüründe en uygun eksplant kaynağı önceden sterilize edilmiş tohumlardan elde edilen aseptik fidelerdir. Bu şekildeki fidelerde sterilizasyona gerek yoktur. Ancak tarla, bahçe vb. dış ortamlardan alınan eksplantların (tohum, yumru, yaprak, gövde, sürgün ucu, çelik vb.) öncelikle musluk suyunda en az yarım saat tutulması gerekir. Ayrıca tohum ve yumru gibi kaba eksplantlar 1-20 saniye alkol içinde de bekletildikten sonra uygun yüzey sterilizasyon ortamına konulmalıdır.



Görsel 1.12: Eksplantın sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonu için en çok kullanılan maddeler: Etil alkol, sodyum hipoklorit (çamaşır suyu), kalsiyum hipoklorit, cıva klorür, gümüş nitrat ve hidrojen peroksittir (Tablo 1.4).

Tablo 1.4: Doku Kültüründe Kullanılan Bitki Parçasına Göre Materyal Sterilizasyon Şekilleri

EKSPLANT	ÖN STERİLİZASYON	STERİLİZASYON
Tohum	10 sn. saf alkolle muamele ve steril saf su ile durulama	20-30 dakika %10-20'lik NaOCl solüsyonu içinde karıştırılarak tutulduktan sonra en az üç defa steril saf su ile durulama ve steril filtre kâğıdı üzerinde kurutma
Meyve, bakla	Kısa süreli saf alkolle muamele	10-15 dakika %10'luk NaOCl solüsyonu içinde karıştırılarak tutulduktan sonra en az üç defa steril su ile durulama
Gövde, hipokotil, petiyol	Yarım saat musluk suyu altında tutma	10-20 dakika %15'lik NaOCl solüsyonu içinde karıştırılarak tutulduktan sonra en az üç defa steril su ile durulama
Yaprak	Yarım saat musluk suyu altında tutma	15 dakika %10'luk NaOCl solüsyonu içinde karıştırılarak veya %0,1-0,25 HgCl ₂ solüsyonunda 2-5 dakika çalkalandıktan sonra en az üç defa steril su ile durulama
Depo organları	Musluk suyunda yıkama	20-30 dakika %15-20'lik NaOCl solüsyonu içinde karıştırılarak tutulduktan sonra en az üç defa steril su ile durulama ve steril filtre kâğıdı üzerinde kurutma

Çalışma Ortamının Sterilizasyonu: Steril kabin içi, kullanımdan en az 10-15 dakika önce %10'luk ticari sodyum hipoklorit solüsyonu veya %70'lik alkolle silinir. Kabin içinde UV lambası varsa açılır ancak kabin içinde hiçbir iş yapılmaz, bitki materyali bulundurulmaz. Çalışmada kullanılacak bisturi, pens vb. aletler kullanım öncesinde alkole (etil veya metil alkol) batırıldıktan sonra aleve tutularak steril hâle getirilir.

Eksplantların kesim işleminde, alüminyum folyoya sarılarak otoklav edilmiş fayanslar kullanılabilir. Bu durumda fayanslar, kabin içinde ve fayansın yüzeyine dokunulmadan açılmalıdır. Eksplantlar sterilize edilen aletlerle bu fayanslar üzerinde kesilerek kültüre alınmalıdır. Kültür kapları açıldıktan sonra aleve tutulmalıdır. Geriye kalan parçalar tekrar alüminyum folyoya sarılarak ortamdan uzaklaştırılır ve otoklavdan sonra fayanslar yıkanarak tekrar kullanılır.

Kullanılacak Araç Gereç ve Besin Ortamının Sterilizasyonu: Kullanılacak araç gereç ve besin ortamlarının sterilizasyonunda; otoklav ve sıcak hava sterilizasyonu, filtre sterilizasyonu, mikrodalga sterilizasyonu yöntemleri kullanılır.

Bitki parçalarının kültüre alınmasında kullanılacak olan bisturi, pens, cam malzemeler ve diğer kuru materyaller ağızları alüminyum folyo ile kapatılarak ya da uygun metal konteynerler içine konularak etüvde 200 °C'de 1-4 saat tutulup sterilize edilir. Bu malzemeler steril kabin içerisinde açılarak kullanılmalıdır. Plastik malzemeler otoklav veya etüvde sterilize edilmez. Besin ortamları genel olarak 121 °C'de 15 dakika otoklavda tutularak sterilize edilir (Görsel 1.13).



Görsel 1.13: Otoklav

300 ml'den fazla besin ortamı içeren şişelerin kapakları gevşek tutulmalıdır. Otoklav sonrası kapaklar sıkılmalıdır. Glikoz gibi bazı besin maddelerini içeren kapların sterilizasyonunda sıcaklık kademeli artırılmalıdır. Böyle durumlarda besin ortamlarının 30 dakika 116 °C'de tutulması iyi sonuçlar vermektedir. Bütün ortamlar otoklav edildikten sonra 1-2 saat dışarıda bekletilmeli ve soğuduktan sonra yoğunlaşmayı önlemek için kullanılıncaya kadar karanlık dolaplarda saklanmalıdır. Tüm ekipmanlar otoklavda veya sıcak hava fırınında (etüvde) sterilize edilebilir. Alet ve boş kaplar ise otoklav poşetler içine konulup ağızları kapatılarak otoklav bandı ile yapıştırılıp sterilize edilir.

Farklı hacimlerdeki besin ortamlarının sterilizasyon süreleri Tablo 1.5'te verilmiştir.

Tablo 1.5: Farklı Hacimlerdeki Besin Ortamlarının Otoklavda Minimum Sterilizasyon Süreleri

ORTALAMA HACİM (ml)	OTOKLAVIN 121 °C'YE ULAŞMA SÜRESİ (dk.)	MİNİMUM STERİLİZASYON SÜRESİ (dk.)
20-25	9	24
50	11	26
100	13,5	28,5
250	16,5	31,5
500	20	35
1000	25	40
2000	33	48
4000	48	63

Hormonlar, vitaminler gibi çabuk bozulabilen maddeleri içeren ortamlar, duruma göre en kısa sürede kullanılmalıdır. Kolayca bozulabilen maddeleri içermeyen besin ortamları 3-4 ay içerisinde kullanılabilir.

Genellikle sıvı besin ortamları ve ısı ile bozulabilen maddelerin stok solüsyonları için filtre sterilizasyonu kullanılır. Tek kullanımlık selüloz nitrattan yapılmış membran filtreler kullanılabilir. Filtre ile sterilize edilmiş besin ortamlarını kontaminasyondan korumak için besin ortamları 4-5 gün dolapta tutulduktan sonra kullanılmalıdır.

Otoklavla sterilizasyon uzun zaman almakta ve malzemelere zarar verebilmektedir. Filtre sterilizasyonu ise çok miktardaki besin ortamları için uygun değildir ve pahalıdır. Buna karşın %3 sakkaroz içeren 100 ml besin ortamı 5 dakikada, 250 ml besin ortamı 10 dakikada ve 1 litre besin ortamı ise 15 dakikada mikrodalga fırın ile sterilize edilebilmektedir. 50 ml agar içeren besin ortamları da yine 15 dakika gibi kısa sürede sterilize edilebilmektedir.

5. UYGULAYALIM
ÖĞRENELİM

YÜZEY STERİLİZASYONUNU YAPMA



Bu çalışmanın amacı doku kültüründe yüzey sterilizasyonunu yapmaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak doku kültüründe (yaprak) yüzey sterilizasyonunu yapmanız beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ VE KİMYASALLAR

- %0,1-0,25 HgCl₃ solüsyonu veya %10'luk NaOCl solüsyonu
- Beher
- Saf su
- Baget

İŞLEM BASAMAKLARI

1. Çalışma öncesi hazırlıkları yapınız.

- Çalışma ortamınızı ve kullanacağınız araç gereci hazırlayınız.
- Araç gerecin steril olmasına dikkat ediniz.

2. Eksplant olarak kullanacağınız yaprakları uygun bir steril kap içerisine koyunuz.

- Yaprakların hasar görmemesine dikkat ediniz.

3. Yaprakları akan musluk suyu altında en az yarım saat tutunuz.

- Süreye uyunuz.

4. Yaprakları 15 dakika %10'luk NaOCl solüsyonu içinde karıştırınız veya %0,1-0,25 HgCl₃ solüsyonunda 2-5 dakika çalkalayınız.

- Kullandığınız solüsyonlara göre sürelere dikkat ediniz.

5. Solüsyondan çıkardığınız yaprakları en az üç defa steril saf su ile durulayınız.

- Yaprakların iyice durulandığından emin olunuz.

1.6. DOKULARI KÜLTÜRE ALMA

Doku kültürü çalışması birbirini izleyen **üç aşamada** gerçekleşir. **Birinci aşamanın** amacı aseptik koşulları oluşturmak ve eksplantın büyümesini sağlayarak ikinci aşamaya hazır duruma getirmektir. Birinci aşamada en önemli sorun ortamın enfekte olması ve kültür kayıplarıdır. Bunu önlemek için ortama bazı antibiyotikler, fungusitler ve antioksidantlar ilave edilebilir. Birinci aşama sonunda kültüre alınan eksplantlar bir veya daha fazla adventif gövde sürgünü oluşturmalı, birkaç tane somatik embriyo gelişmeye başlamalı ve önemli miktarda kallus oluşmalıdır. **İkinci aşamada** seri hâlde alt kültür yapılmalıdır. Yani ana kallustan yeni bitki parçacıkları elde edilmelidir. Bu devrede bitkiler besin maddesi yönünden oldukça hassastır. Büyüme ortamına az miktarda kömür tozu koymak yararlı olacaktır. **Üçüncü aşamada** ise bitkilerin kültür ortamına transfer işlemi başlar. Burada önemli olan toprağa taşınacak bitkilerde kökün bulunması ve bitkinin yaşamını sürdürebilmesidir. Üçüncü aşamada ışık intensitesi 3-10 kat artırılarak köklenme sağlanabilir. Ayrıca ortama az miktarda oksin eklenerek köklendirme hızlandırılır. Toprağa taşınan veya saksıya alınan bitkiler belli bir süre steril seralarda optimum sıcaklık, nem ve ışıklandırma altında bekletilmelidir.

1.6.1. Çevresel Faktörler

Doku kültüründe ışık ve sıcaklık en önemli çevre faktörleridir. Bitki doku kültüründe kullanılan ışığın yoğunluğu, aydınlanma süresi ve kalitesi önemlidir. Ortam sıcaklığının bitkinin doğal büyüme ortamındaki optimum sıcaklıkta olması gerekir. Bu nedenle kültürlerin istenen şekilde gelişmesi için sıcaklık ve ışığı ayarlanabilen inkübasyon odalarına veya inkübatörlere ihtiyaç vardır (Görsel 1.14).



Görsel 1.14: İklim odası

Kültür kapları içinde genellikle %100'e varabilen yüksek bir nem sağlanmaktadır. Bu nedenle çoğunlukla kültürün geliştiği çevrede nemin ayarlanmasına ihtiyaç yoktur. Fakat çok kurak bölgelerde hazırlanan kültür ortamının çabuk kuruması ya da nemli ortamlarda küf mantarları gelişmesi söz konusu olabilmektedir. Bu gibi koşullarda nemin ayarlanması gerekir.

Explantın ihtiyaç duyduğu karbonhidrat, kültür ortamında bulunduğu için kültürün son devresine kadar fotosentez yapması gerekmez. Dolayısıyla ışığa ihtiyacı yoktur. Ancak kültürde sürgün oluşması, kök oluşması veya aseksüel embriyogenesis gibi olaylar için ışık gereklidir. Özellikle bitkinin gelişmesi sırasında büyüme ve hücre farklılaşmasıyla özel şeklini almasını düzenlemek için ışığa ihtiyaç vardır.

Işık Yoğunluğu: Işık yoğunluğu; kullanılan bitki türüne, bitkiden izole edilen bitki parçasının cinsine ve besin ortamına bağlı olarak değişir. Genel olarak bitki doku kültürlerinde 300-10000 lüks arasında değişen ışık yoğunluğuna gereksinim vardır. Örneğin yer elması yumrularından alınan kesitlerle oluşturulan kültürler 5000 lüks ışık yoğunluğuna ve 12 saatlik aydınlanma süresine ihtiyaç duyar. Diğer yandan kuşkonmaz ile yapılan kültürde ise başlangıçta 1000 lüks ışık yoğunluğu yeterlidir. Ancak aynı kültürün son devresinde 3000-10000 lüks arasında ışık yoğunluğu gereklidir.

Günlük Aydınlanma Süresi: Günlük aydınlanma süresi; bitki doku kültürlerinde kullanılan bitki türüne, ışığın kalitesine ve kültürün amacına göre değişmektedir. Örneğin yer elması yumru kültüründe köklenme için 12 saatlik bir aydınlanma süresi yeterlidir. Buna karşın kuşkonmazın sürgün ucu kültüründe kök ve sürgün oluşması için 1000 lüks ışık yoğunluğu ile günde 6 saatlik aydınlanma gereklidir. Genellikle birçok bitki kültürü için 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot uygulanır.

Işık Kalitesi: Ortamda yeterince besin maddesi bulunduğu bile bitki parçacıkları büyümüyorsa bunun en önemli nedeni ışığın istenilen nitelikte olmamasıdır. Işığın kalitesi kültürde organ ve organ sistemlerinin gelişimi üzerine etkilidir. Işıklandırmada genellikle floresan lamba kullanılır. Ortalama 16 saat ve 100 lüks intensiteli lambalar yeterlidir. Ancak kök oluşumunun son safhasında ışığın 3000-10000 lükse çıkarılması gerekir.

Sıcaklık İsteği: Genellikle kültürler için kullanılan sıcaklık 25 °C'dir. Ancak bir bitki normal şartlarda gelişmesini sürdürürken günlük ve mevsimlik sıcaklık değişikliklerine maruz kalır. Bu nedenle kültürün geliştiği ortamda periyodik olarak değişen sıcaklık etkilerini incelemek gerekir. Örneğin çengel sakızı kök kültüründe gündüz 21-27 °C, gece ise 16-22 °C arasında değişen sıcaklıklar uygulandığında fazla miktarda adventif sürgünler oluşurken devamlı olarak 25 °C sıcaklık uygulandığında aynı başarı elde edilememektedir.

1.6.2. Bitki Doku Kültürünün Genel Tekniği

Bitki doku kültürünün uygulanması farklı bitki materyalleri için küçük değişiklikler gösterse de hemen hemen aynıdır. Doku kültürü materyalin alınması ve besin ortamı içine atılmasını kapsar. Petri kapları veya tüpler içerisinde bulunan besin ortamına dezenfekte edilmiş materyal yerleştirilir (Görsel 1.15). Ortamlara yerleştirilen bitkiler sabit sıcaklık ve ışık koşullarına sahip iklim dolaplarında büyüme, gelişme ve çoğalmaya bırakılır.



Görsel 1.15: Tüpe alınmış ekplant

Bir eksplanttan yeniden tam bir bitki elde edilmesi için temel adımlar şunlardır:

Eksplantın Seçimi ve Sterilizasyonu: Uygun eksplant seçilir ve daha sonra ana bitkiden kesilir. İzole edilen eksplant, dezenfektanlar kullanılarak sterilize edilir.

Besin Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu: Kültürün amaçlarına ve kültürlenecek eksplantın türüne uygun bir besin ortamı hazırlanır. Hazırlanan besin ortamı sterilize edilmiş kaplara aktarılır ve otoklavda sterilize edilir.

Aktarma (Aşılama): Sterilizasyon işlemi gerçekleştirilen eksplant aseptik koşullar altında kültür kapları içerisinde bulunan farklı özelliklere sahip besin ortamına aktarılır. Kültür odasında kültürler inkübe edilir.

Kuluçka: Bitki materyalinin doku kültüründe gelişebilmesi için en önemli çevresel faktörler sıcaklık ve ışıktır. Kültür kaplarının kapalı olması nedeniyle genellikle bitkilerin ihtiyaç duyduğu nem sağlanmaktadır. Bitki türüne göre değişmekle birlikte çoğunlukla 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık uygundur. Aynı şekilde 24 °C'lik sıcaklık ve 2000-3000 lüks ışık yoğunluğu yeterli olmaktadır. Aktarma işleminden sonra başarılı kültürlenme için uygun ışık, sıcaklık ve nem koşullarının sağlandığı kültür odalarında sıcaklık kullanım amacına göre 18,22 ve 25 °C olmalıdır. Nem ise %50-70 arasında olmalı ve ışık beyaz serin floresan lambalarıyla sağlanmalıdır.

Alt Kültürleme: Kültürlenmiş hücreler, bitkicikler elde etmek için yeni bir besin ortamına aktarılır.

Köklendirme Aşaması: Besi ortamının büyümeyi düzenleyici madde içeriği değiştirilerek sürgünler köklendirme ortamında kültüre alınır (Görsel 1.16). Kullanılan materyale göre besin ortamı kuvveti de belirli oranlarda azaltılabilir.



Görsel 1.16: Köklendirme yapılmış eksplant

Bitkilerin Transferi: Elde edilen bitkicikler sertleştirme işleminden yani çevreye alıştırdıktan sonra seraya veya saksılara aktarılır. Kullanılan yöntemeye göre geliştirilen veya çoğaltılan bitkiler amaç üretim ise köklendikten sonra sera koşullarına torf+perlit içeren saksı veya viyollere aktarılarak dış koşullara alıştırılır.



Bu çalışmanın amacı dokuları kültüre alma işlemi yapmaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak dokuları kültüre almanız beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ VE KİMYASALLAR

- MS besin ortamı
- Petri kutusu
- Otoklav
- %10'luk NaOCl solüsyonu
- Agar
- Pens
- Çalışma kabini
- %70 etil alkol
- Bisturi
- Cam kavanoz
- İnkübasyon kabini
- Saf su

İŞLEM BASAMAKLARI

1. Analiz öncesi hazırlıkları yapınız.

- Çalışma ortamınızı ve kullanacağınız araç gereci hazırlayınız.
- Araç gerecin steril olmasına dikkat ediniz.
- Aseptik çalışma ortamı sağlayınız.

2. Uygun eksplant seçiniz ve ana bitkiden ayırınız.

- Amacınıza uygun eksplant seçmeye özen gösteriniz.
- Bitkiden ayırma işlemi yaparken dokulara zarar vermemeye özen gösteriniz.

3. Ayırdığınız eksplantın uygun solüsyonlarla yüzey sterilizasyonunu yapınız.

- Solüsyonlarda bekleme sürelerine uyunuz.

4. Eksplantın türüne uygun bir besin ortamı hazırlayınız.

- Amacınıza ve eksplantın özelliğine uygun besin ortamı seçiniz.

5. Hazırladığınız besin ortamını sterilize edilmiş kaplara aktarıp otoklavda sterilize ediniz.

- Isıdan etkilenen maddeleri otoklavdan sonra besin ortamına ekleyiniz.

6. Sterilize edilmiş eksplantı aseptik koşullarda kültür kapları içerisinde bulunan besin ortamına aktarınız.

- Aktarma işlemi çalışma kabini içerisinde yapınız.

7. Aktarma işleminden sonra uygun ışık, sıcaklık ve nem koşullarının sağlandığı kültür odalarında kültürü inkübasyona bırakınız.

- Sıcaklığı (18, 22 veya 25 °C) kullanım amacına göre ayarlayınız.
- Nemin %50-70 arasında olmasına dikkat ediniz.
- Eksplantın özelliğine göre ışık ayarı yapınız.

UYGULAMAYA İLİŞKİN DEĞERLENDİRME

Uygulamanız aşağıda verilen ölçütlere göre 100 puan üzerinden değerlendirilecektir.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	Çok İyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1. Doku kültürü çalışması için gerekli aseptik ortamı sağladı.				
2. Seçilen eksplantı ana bitkiden ayırıp yüzey sterilizasyonunu yaptı.				
3. Eksplantın türüne uygun besin ortamı hazırladı.				
4. Sterilize edilmiş eksplantı aseptik koşullarda steril besin ortamına aktardı.				
5. Kültürü, kültür odasında inkübasyona bıraktı.				
TOPLAM PUAN				

Değerlendirme formundan **en az** 70 puan aldıysanız bu uygulama için başarı düzeyiniz yeterli demektir. Eksik olduğunuz öğrenmeleri tekrar etmeniz önerilmektedir.

1.7. ALT KÜLTÜRE ALMA

Materyalin kültüre alınımından sonra çoğaltımda kullanılan bitki tür ve çeşidinin çoğalabilme özelliğine bağlı olarak yeni sürgünler meydana gelmektedir. Bu sürgünler ayrılarak daha geniş kaplar içerisinde alt kültür- lere alınır. Köklendirme aşamasına geçilene kadar alt kültüre devam edilir.

Bitkilerin büyüüp gelişebilmeleri için hücreler arası kimyasal iletişime ihtiyacı vardır. Bitkiler bu iletişimi kendi ürettikleri bitki büyüme düzenleyicileri ile sağlar. Bitkilerde doğal olarak sentezlenen, büyümeyi ve fizyolojik olayları kontrol eden, üretildikleri yerden diğer kısımlara taşınarak taşındığı bölgede de etkin olabilen organik moleküllere **bitki büyüme düzenleyicileri (hormon)** adı verilmektedir. Bu bileşiklerin bir kısmı doğal olarak meydana geldiği gibi bir kısmı da sentetik olarak elde edilmektedir (Görsel 1.17). Sentetik hormonlar doğal hormonlarla benzer etki göstermekte hatta bazı durumlarda daha fazla etkiye sahip olabilmektedir.



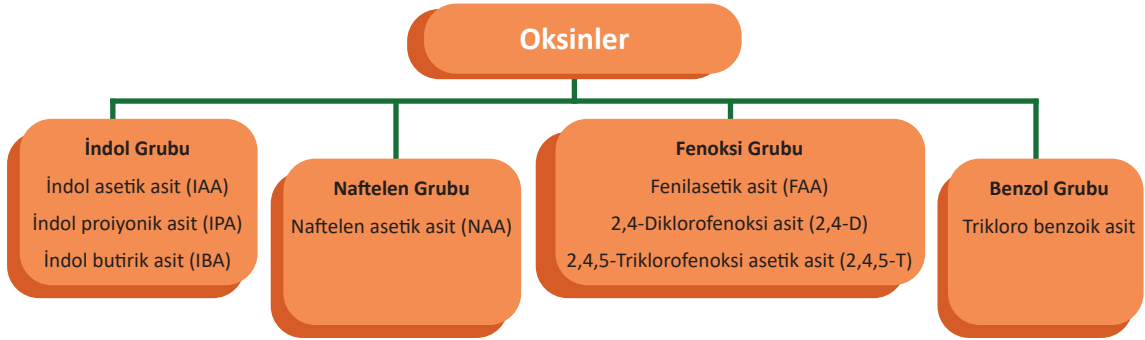
Görsel 1.17: Bitki büyüme düzenleyici ekleme

Bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanım alanları:

- Olgunlaşmayı hızlandırmak.
- Çelikle çoğaltmayı sağlamak.
- Tohumların çimlenme gücünü artırmak.
- Çiçeklenmeyi teşvik etmek veya geciktirmek.
- Soğuğa dayanıklılığı artırmak.
- Meyvelerde tohum oluşumunu artırmak.
- Meyve iriliğini artırmak.
- Meyve muhafaza süresini uzatmak.
- Bitkilerin hastalık ve zararlılara dayanıklılığını artırmak.
- Yabancı ot kontrolünü sağlamak.
- Hasat öncesi meyve dökülmesine engel olmak.
- Makineli hasadı kolaylaştırmak.
- Dormansiyi kırmak.
- Doku kültürü çalışmalarında kök, sürgün ve yumru oluşumunu teşvik etmek.

Bitki büyüme düzenleyicileri farklı gruplar altında toplanmıştır. Oksinler, giberellinler ve sitokininler büyüme teşvik edicilerdir. Absisik asit engelleyici ve etilen ise olgunlaştırıcı olarak gruplandırılmaktadır. Büyüme ve gelişme döneminde büyümeyi teşvik eden maddeler bitkide hâkimken, olgunlaşma veya büyümenin sonuna doğru absisik asit hâkim olmakta ve büyüme kontrol altına alınmaktadır.

Oksinler: Bu hormonlar hücrelerin uzamasını ve bölünmesini artırarak büyümeyi teşvik etmektedir. Oksinler yapraklar, tepe tomurcukları ve çiçekler gibi meristematik dokularda sentezlenmekte ve taşınması yukarıdan aşağıya doğru olmaktadır. Oksinler; indol, naftelen, fenoksi ve benzol grubu olmak üzere dört grupta incelenmektedir (Şema 1.1).



Şema 1.1: Oksin grupları

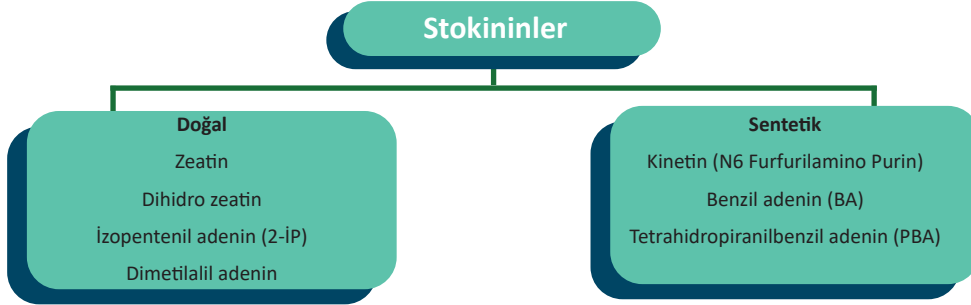
Oksinler doku kültürlerinde tek başlarına kullandıklarında hücre süspansiyonlarının elde edilmesini kallus ve somatik embriyo oluşumunu sağlar. Sitokininlerle birlikte kullanıldıklarında kallus oluşumunda sürgün rejenerasyonunda ve somatik embriyo oluşumunda etkilidir. Oksinlerin büyümeyi artırıcı etkileri iki mekanizma ile gerçekleşmektedir:

1. Oksinler, hücre çeperinde H^+ iyonu taşımını artırarak hücre çeperinin esnekliğini artırır. Böylece hücre çeperinden daha çok su alınarak hücre şişer ve büyür.
2. Büyümenin aynı hızda olabilmesi için gerekli mRNA'ların sentezini uyarır.

Oksinlerin bitkilere etkileri şu şekildedir:

- Çeliklerin kök oluşumunu teşvik etmek.
- Partenokarpik meyve tutumunu sağlamak.
- Adventif kök oluşumunu sağlamak.
- Meyve ve yaprak dökümünü engellemek.
- Meyve tutumunu arttırmak.
- Tomurcukların daha erken çiçek açmasını sağlamak.
- Yabancı ot gelişimini engellemek.

Sitokininler: Sitokinin, bitkide aktif hücre bölünmesine sahip tüm dokularda yüksek miktarda bulunur. Özellikle kök meristemlerinde sentezlenip bitkinin yeşil aksamlarına taşınır. Doku kültürü ortamında oksinlerin kök oluşumunu teşvik etmesine karşın sitokininler sürgün oluşumunu teşvik eder. Sitokininler doğal olarak sentezlendikleri gibi sentetik yollarla da elde edilmektedir (Şema 1.2).



Şema 1.2: Sitokininler

Doku kültürü ortamında oksin, sitokinin oranı yüksek olduğunda köklenme; sitokinin, oksin oranı yüksek olduğunda ise sürgün oluşumu görülür. Besin ortamında oksin, sitokin oranı dengelendiğinde hücre büyümeyi sürdürür ancak farklılaşmayıp küme oluşturur. Farklılaşmamış bu hücre kümesine **kallus** adı verilir.

Bütün bitkiler için kök ve sürgün oluşmasının kontrolü sitokinin ve oksin dengesine bağlı olarak gerçekleşir. Ancak uygun dokunun alınmaması veya hormon içeren besin ortamının kullanma süresi istenen sonuca etki etmektedir. Örneğin N. glauca bitki gövdesinden alınan parçalarla yapılan organ kültüründe, IAA ve kinetin değişik konsantrasyonlarında adventif sürgünler elde edilemezken aynı ortamda sürgün uçlarıyla yapılan kültürlerde sürgün ve kök oluşmuştur.

Sitokininlerin bitkilere etkileri şu şekildedir:

- Organ oluşumunu ve gelişimini teşvik etmek.
- Hücre bölünmesini sağlamak.
- Özelleşmemiş genç hücrelerde farklılaşmayı sağlamak.
- Klorofilin ve hücre proteininin bozulmasını yavaşlatıp RNA sentezini artırmak.

Giberellinler: Oksin ve sitokininler kadar olmasa da bazı durumlarda kültür ortamlarında giberellinlerin de kullanılması gerekmektedir. Giberellinler büyümeyi ve gelişmeyi teşvik edici hormonlardır. Bitkilerde, tomurcuklarda, embriyolarda, köklerde, genç yapraklarda, çiçeklerde ve meyvelerde fazla miktarda giberellin bulunur. Ayrıca giberellinler çimlenme esnasında amilaz enziminin oluşumunu sağlayarak tohumda depo nişastanın embriyo tarafından kullanılabilen şekere dönüşümüne yardımcı olur. Çok sayıda giberellin bulunmasına rağmen en yaygın kullanılanı giberellik asit (GA)'tir.

Giberellinler:

- Gövdenin uzamasında
- Hücre bölünmesinin uyarılmasında
- Tohum ve tomurcuk dormansisinin kırılmasında
- Bodurluğun ortadan kaldırılmasında
- Partenokarpik meyve tutumunda
- Çimlenmeyi teşvik etmede etkilidirler.

Absisik Asit (ABA): Bitkilerde gelişimi teşvik edici doğal maddelerin yanı sıra engelleyici doğal maddeler de bulunmaktadır. Bu maddelerden en önemlisi absisik asittir (ABA). Absisik asit bitkilerin her organında bulunur ancak en fazla yeşil yapraklardadır. ABA'nın sentetik üretimi pahalı olduğundan ve UV ışığı altında stabil kalamadığından pratikte çok yaygın bir kullanım alanı yoktur.

ABA, bitkilerde dormansi hâldeki tomurcuk ve tohumlarda yüksek miktarlarda bulunarak dormansinin sürmesine neden olur. Bitkilerdeki ABA konsantrasyonu, çevre koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Stres koşullarında ABA miktarı artar ve hızlıca bitkinin diğer bölgelerine taşınır. Örneğin bitkilerde su stresi, stomaların anında kapanmasına neden olmakta ve protein sentezini yavaşlatmaktadır.

Absisik asit:

- Şekerlerin ve amino asitlerin taşınmasında
- Tohum, tomurcuk ve yumru gibi depo organlarında dormansinin sürmesinde
- Tohumlarda protein depolanmasında
- Depo maddelerinin sentezinde etkilidir.

Etilen: Olgunlaştırma hormonu olarak da bilinen etilen (C_2H_4) gaz hâlde bulunan tek hormondur. Etilen bahçe bitkileri ürünlerinin tat, renk, doku ve yapısında oldukça etkilidir. Bitkinin tüm organlarından sentezlenebilir ancak daha çok stres altındaki olgun ve yaşlanan dokulardan sentezlenir. Örneğin yapraklar solma ve dökülme öncesi dönemde yüksek miktarda etilen sentezler. Kuraklık, su baskını, soğuk veya rüzgâr gibi stres koşullarında bitkiler etilen sentezini artırır.

Muz, narenciye, armut, domates, kavun, ananas gibi meyve türlerinin olgunlaştırılması ve sarartılmasında etilen gazı kullanılır. Etilenin meyveyi uyarması ile meyve yumuşaması, meyve kokusunu oluşturan uçucu bileşiklerin sentezlenmesi, solunumun hızlanması ve nişastanın şekere dönüşmesi gibi metabolik olaylar meydana gelmektedir.

Etilenin bitkilere etkisi şu şekildedir:

- Dormansiyi kırmak.
- Yaprak ve meyvelerde döküm
- Bazı bitkilerde çiçeklenmeyi teşvik
- Adventif kök oluşumunu uyarmak.
- Monoik bitkilerde dişi çiçek oluşumunu teşvik etmek.
- Absisyonu teşvik ederek mekanik hasadı kolaylaştırmak.
- Yaprakların kalınlaşmasını sağlamak.



Bu çalışmanın amacı alt kültürlerde amaca uygun kültür gelişimi yapmaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak doku kültüründe alt kültüre alma işlemini yapmanız beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ VE KİMYASALLAR

- Çalışma kabini
- MS besin ortamı
- Etil alkol
- Cam malzemeler (petri kutusu)
- Pens
- Bek alevi

İŞLEM BASAMAKLARI

1. Analiz öncesi hazırlıkları yapınız.

- Çalışma ortamınızı ve kullanacağınız araç gereci hazırlayınız.
- Araç gereci etil alkolden geçirerek steril ediniz.
- Aseptik çalışma ortamı sağlayınız.

2. Doku kültüründe sürgün oluşumunu kontrol ederek sürgünleri aseptik ortamda steril bir petri kabına aktarınız.

- Yeterince sürgün oluşumu sağlandığından emin olunuz.
- Aktarma işleminde kullandığınız pensi alevden geçiriniz.

3. Sürgünleri aynı besin ortamının bulunduğu kaplara hızlıca aktarınız.

- Aktarma işleminde sürgünlere zarar vermemeye özen gösteriniz.
- Sürgün oluşumu için besin ortamına yeterince sitokinin ilave ediniz.

4. Aktarma işleminden sonra kapların ağzını kapatınız ve inkübasyon için iklim odasına bırakınız.

- Kullandığınız eksplanta uygun çevre koşullarını oluşturunuz.

5. İstenilen sayıda sürgün oluşumu sağlandığında köklendirme için eksplantları başlangıçta kullanılan besin ortamına aktarınız.

- Köklendirme için besin ortamına yeterince oksin ilave ediniz.
- Aseptik koşullarda çalışınız.

UYGULAMAYA İLİŞKİN DEĞERLENDİRME

Uygulamanız aşağıda verilen ölçütlere göre 100 puan üzerinden değerlendirilecektir.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	Çok İyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1. Çalışma için gerekli aseptik koşulları sağladı.				
2. Sürgün oluşan eksplantları petri kutusundan yeni besin ortamına aktardı.				
3. Besin ortamına amacına uygun bitki büyüme düzenleyicisi ekledi.				
4. Alt kültürleri, uygun çevre koşullarında inkübasyona bıraktı.				
5. Alt kültürleri, köklendirme için yeni besin ortamına aktardı.				
TOPLAM PUAN				

Değerlendirme formundan **en az** 60 puan aldıysanız bu uygulama için başarı düzeyiniz yeterli demektir. Eksik olduğunuz öğrenmeleri tekrar etmeniz önerilmektedir.

Not alınız.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

1.8. BİTKİYİ DIŞ KOŞULLARA ALIŞTIRMA

Dış koşullara alıştırma, kültürde elde edilen bitkilerin in vitro koşullardan alınarak dış koşullara taşındığı aşamadır. İn vitro koşullarda besin bitkiye hazır verilirken dış koşullarda bitkiler kendi besinini kendi sentezler. Bu nedenle de bitkilerin aktif gelişme durumunda olması gerekir.



Görsel 1.18: Bitkiyi dış koşullara alıştırma

Bitkiler in vitro koşullarda yaklaşık %100 nemli bir ortamda geliştiklerinden önce seralarda yüksek nem altında tutulmalı daha sonra hava nemine yavaş yavaş alıştırmalıdır. Bitkiler dış koşullara çıkarıldığında düşük neme maruz bırakılırlarsa uyum sağlayamaz. Köklendirme ortamındaki bitkilerin kültür periyodunun sonuna doğru (son üç günü) kültür kaplarının kapakları yarım açılır. Bu şekilde kapların içerisindeki nem oranı kabinin nispi nem oranı olan %65 seviyesine çekilir. Daha sonra bitkiler, içinde toprak veya torf toprağı bulunan saksılara aktarılır ve saksılara şeffaf poşetler geçirilir (Görsel 1.18). Bitkilerin dış ortam nemine (%37-39) adaptasyonu için poşetlerin üst köşe kısımları kesilir. Böylece dış ortama çıkarılan bitkinin aniden su kaybetmesi önlenir ve bitkiler yavaş yavaş dış ortama alıştırmış olur. Birçok bitki için dış koşullara alıştırma süresince 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyot uygulaması yapılır. Dış koşullara alıştırmış bitkiler doku kültürünün amacına uygun olarak bahçe ya da tarlaya aktarılır.

8. UYGULAYALIM
ÖĞRENELİM

BİTKİYİ DİŞ KOŞULLARA ALIŞTIRMA



Bu çalışmanın amacı bitkiyi dış koşullara alıştırmaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak doku kültüründe bitkiyi dış koşullara alıştırmayı beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ VE KİMYASALLAR

- Saksı
- Toprak veya torf
- Makas
- Pens
- Şeffaf poşet
- İklim odası

İŞLEM BASAMAKLARI

1. Analiz öncesi hazırlıkları yapınız.

- Çalışma ortamınızı ve kullanacağınız araç gereci hazırlayınız.
- Araç gereci etil alkolden geçirilerek steril ediniz.

2. Uygun büyüklükte ve sayıdaki saksıya toprak ya da torf hazırlayınız.

- Saksılarda kullandığınız toprağın steril olduğundan emin olunuz.

3. Alt kültürleri kontrol edip köklenen bitkilerin her birini ayrı saksılara aktarınız.

- Aktarma yaparken bitkilerin zarar görmemesine özen gösteriniz.

4. Saksılara nem kaybını önlemek için şeffaf poşetler geçirin ve poşetleri üst köşelerinden kesiniz.

- Nem kaybını önlemek için alternatif olarak bitkileri sera koşullarında veya iklim odasında bekletebilirsiniz.

5. Dış koşullara alıştırmaya bitkileri, amaca uygun olarak bahçe veya tarlaya aktarınız.

- Bitkileri aktarırken dikkatli olunuz.



ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

A

Aşağıdaki cümlelerde boş bırakılan yerlere doğru sözcükleri yazınız.

1. Bitkiden doku kültüründe kullanılmak amacıyla alınan bitki parçasına denir.
2. Yapay besin ortamında bir eksplanttan yeni bitki veya doku üretilmesine denir.
3. Doku kültürü laboratuvarında, kültür hazırlama odası ve inkübasyon odası olmak üzere başlıca üç ana bölüm bulunur.
4. Bitkinin hücre, doku ve organlarının ait oldukları canlı organizma dışında steril yapay ortamlarda yetiştirilmesi veya bulunması olarak ifade edilir.
5. Kültüre alınan eksplantın yüzeyine yapılan sterilizasyona denir.
6. Dış koşullara alıştırmaya aşamasında kültür kaplarının kapakları periyodun son günü yarım açılır.

B

Aşağıdaki soruları okuyarak doğru olan seçeneği işaretleyiniz.

7. Aşağıdakilerden hangisi bitki doku kültüründe farklılaşmanın tanımıdır?
 - A) Canlı hücrelerin çoğalması için kullanılan kültür ortamıdır.
 - B) Bitkinin bir günlük zaman diliminde ışığa maruz kalma süresidir.
 - C) Kallus üretmek için meristematik duruma geri dönen olgun hücre olayıdır.
 - D) Kallus üretmek için meristematik duruma geri dönen olgun hücre olayıdır.
 - E) Meristematik özellik gösteren organize olmamış ve farklılaşmamış hücre kütesidir.
8. Aşağıdakilerden hangisi bitki doku kültürünün yapılış amaçlarından değildir?
 - A) Hastalıklara karşı dayanıklılığın artırılması
 - B) Bitkilerin hızlı çoğaltılması
 - C) Yeni çeşitlerin geliştirilmesi
 - D) Patojen içeren bitkisel materyal üretilmesi
 - E) Çevresel koşullara dayanıklı bitki üretilmesi

9. Aşağıdakilerden hangisi bitki doku kültürü laboratuvarında bulunan cihazlardan değildir?

- A) Tohum sayıcı
- B) Su banyosu
- C) Etüv
- D) Çalışma kabini
- E) pH metre

10. Aşağıdakilerden hangisi besin ortamlarında kullanılan organik bileşiklerdendir?

- A) Azot
- B) Su
- C) Amino asitler
- D) Mineral tuzlar
- E) Karbon

11. Aşağıdakilerden hangisi bir besin ortamını oluşturan maddelerden değildir?

- A) Su
- B) Toprak
- C) İnorganik bileşikler
- D) Organik bileşikler
- E) Doğal bileşikler

12. Aşağıdaki bitki büyüme düzenleyicilerden hangisi olgunlaştırma hormonu olarak kullanılır?

- A) Etilen
- B) Giberellin
- C) Sitokinin
- D) Absisik asit
- E) Oksin

13. Aşağıdakilerden hangisi bitki doku kültüründe çevresel faktörler içinde yer almaz?

- A) Işık yoğunluğu
- B) Aydınlanma süresi
- C) Sıcaklık
- D) Nem
- E) Besin ortamı

C

Aşağıda verilen soruları yanıtlayınız.

14. İn vitro koşullarda bitki doku kültüründe sterilizasyon işleminin önemini ve yapılışını açıklayınız.

15. Bir eksplanttan yeniden tam bir bitki elde edilmesi için uygulanan temel adımlar nelerdir? Kısaca açıklayınız.

16. Doku kültürü çalışmalarında kültürler neden alt kültüre alınır? Açıklayınız.

2. Öğrenme Birimi

KONULAR

- 2.1. DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ
- 2.2. KALLUS KÜLTÜRÜ
- 2.3. MERİSTEM KÜLTÜRÜ
- 2.4. EMBRİYO KÜLTÜRÜ
- 2.5. MİKROÇOĞALTIM

NELER ÖĞRENECEKSİNİZ?

- Doku kültürü teknikleri
- Kallus kültürü
- Meristem kültürü
- Embriyo kültürü
- Mikroçoğaltım

TEMEL KAVRAMLAR

kallus kültürü, meristem kültürü, embriyo kültürü, meristem ucu, sürgün ucu, apikal, interkalar, lateral, germplazm, endemik, donör bitki, anaç bitki, adventif tomurcuk, aksiller tomurcuk, fitotoksik, fenotip, genotip, klon, perlit, sitoloji, varyasyon

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ



HAZIRLIK ZAMANI

1. Sizce doku kültürü ile bitki çoğaltma yöntemi, tarımsal üretime ne gibi faydalar sağlar? Düşüncelerinizi nedenleriyle açıklayınız.
2. Bitkileri çoğaltırken niçin farklı yöntemler uygulanır?

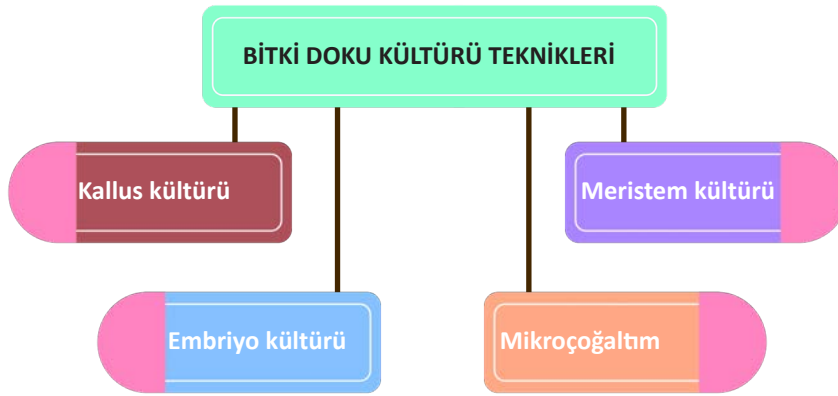
2.1. DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ

Doku kültürüyle yapılan üretim sonucunda yeni bitki, doku veya bitkisel ürünler elde etmek amaçlanmaktadır. Bu üretim yönteminde, bitkinin büyüme süreci boyunca gerçekleşen gelişim aşamaları ve çevresel etkenler olabildiğince kontrol altındadır. Bu nedenle geleneksel üretim yöntemlerinden farklılık gösterir. Böylece daha kısa sürede ve istenilen özelliklere uygun bitki üretimi gerçekleştirilmiş olur.

Bitki doku kültürleri, var olan çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak ve yeni çeşit geliştirmek için sıklıkla kullanılır. Bunların dışında hastalıktan arınmış bitki üretiminde, yok olma tehlikesi altındaki türlerin korunması veya çoğaltılması zor olan türlerin çoğaltılmasında rutin olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bitki doku kültürü; çok sayıda bitki üretiminde zaman, yer ve anaç bitki materyalinden tasarruf sağlaması bakımından önemlidir.

Bitki doku kültüründe üretim amacına uygun tekniklerin seçilmesi doku kültürünün başarısını etkilemektedir. Kullanılan doku kültürü tekniklerinin her birinin kendine özgü bazı özellikleri vardır. Örneğin türler arası melezlemelerde embriyo kültürü, mutasyon ıslahında ise kallus kültürü uygulanarak başarılı sonuçlar alınmıştır. Yine hastalıklardan arınmış bitki üretiminde meristem kültür ve genetik kaynakların korunmasında mikroçoğaltım tekniği sıklıkla kullanılmaktadır.

Bitki doku kültüründe sıkça kullanılan dört yöntem aşağıda verilmiştir (Şema 2.1).



Şema 2.1: Bitki doku kültürü teknikleri

Bitki doku kültürünün başlangıç aşamasında eksplantlar besin ortamına yerleştirilir. Besin ortamına sürgün oluşumunu sağlamak amacıyla 0,05-10 μM (mikromolar) sitokinin ve 0,05-5 μM dozlarında oksin ilave edilir. İstenilen sayıda sürgün oluşumu gerçekleştiğinde sürgünler çoğaltma ortamına aktarılır. Sürgün çoğaltma aşamasında başlangıçta elde edilen sürgünlerden bol miktarda çoğaltma amaçlanmaktadır. Bu aşamada in vitro sürgünler 3-4 hafta aralıklarla aseptik koşullarda alt kültürlerle alınır. Besin ortamına başlangıç aşamasında olduğu gibi aynı miktarlarda sitokinin ve oksin ilave edilerek sürgün çoğaltımı sağlanır. Yeterli sayıda sürgün çoğaltıldığında sürgünler in vitro koşullarda köklendirilir. Köklendirme aşamasında temel besin ortamına 0,1-10 μM dozlarında NAA, IBA, IAA gibi oksinler eklenerek sürgünlerin köklenme oranı yükseltilir. Kullanılan materyale göre değişmekle birlikte sürgünlerin köklenmesi 1-2 ay sürebilmektedir.

1. UYGULAYALIM ÖĞRENELİM

DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ



Bu çalışmanın amacı doku kültüründe kullanılan tekniklerin tanıtımını yapmaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak doku kültürü ve doku kültüründe kullanılan tekniklerin tanıtımı ile ilgili sunu hazırlamanız beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ

- Bilgisayar
- Akıllı tahta, projeksiyon makinesi vb.
- İnternet
- Diğer kaynaklar (kitap vb.)

İŞLEM BASAMAKLARI

1. Hazırlayacağınız sunu ile ilgili planlama yapınız.

- Çalışmalarınızı zamanında ve eksiksiz olarak yapınız.
- Çalışma ortamınızı ve kullanacağınız araç gereci hazırlayınız.

2. Kaynak araştırması yapınız.

- Edindiğiniz kaynaklardan uygun olanlarını kullanınız.

3. Elde ettiğiniz bilgilerden sunu hazırlayınız.

- Sunu hazırlama kurallarına dikkat ediniz.
- Hazırlayacağınız sununun 20 sayfa geçmemesine özen gösteriniz.

4. Hazırladığınız sunuyu sınıfta arkadaşlarınızla paylaşınız.

- Sununuzu verilen sürede tamamlamaya özen gösteriniz.

2.2. KALLUS KÜLTÜRÜ

Doku kültürü genel olarak kallus üretimiyle başlar. Bitkilerde kallus farklılaşmamış ince çeperli parankima hücrelerinin bölünmesi sonucunda meydana gelir. **Kallus** düzenli olmayan hücrelerin oluşturduğu bir yara dokusudur. Bazı bitki türlerinde mekanik yaralamalar sonucu kallus dokusu meydana gelebilir.

Kallus kültürü bitkiden alınan eksplantlardan uygun bir besin ortamında kallus dokusunun oluşturulmasıdır (Görsel 2.1). Başka bir deyişle izole edilmiş hücre yığınlarının steril kültürüdür. Bitkinin bölünebilme özelliğine sahip hücrelerinin bulunduğu bitki kısımları kallus kültürü oluşturmada kullanılır. Bitki türlerine göre değişmekle birlikte yaprak, kök, sap, sürgün dâhil çok sayıda farklı doku kallus kültürü için eksplant kaynağı olarak kullanılır. Doku kültürlerinde yapılan çalışmaların çoğunda bir kallus safhasından geçilerek başarıya ulaşılır. Kallus dokusu, in vitro şartlar altında eksplantlar üzerinde yaralanmaya karşı ve büyüme hormonlarının besin ortamına katılmasına yanıt olarak çoğalır.



Görsel 2.1: Kallus kültürü

Bitkilerin çok farklı organlarından kallus kültürü yapılabilir ancak bazı dokuları kültüre almak oldukça güçtür. Genelde gövde ve köklerin iletim alanlarının yakınındaki dokular kallus kültüründe daha iyi sonuç vermektedir. Ayrıca meyve, endosperm, polen veya embriyo da kallus kültürü için başlangıç materyali olarak kullanılabilir.

Kallus kültürünün kullanım amaçları:

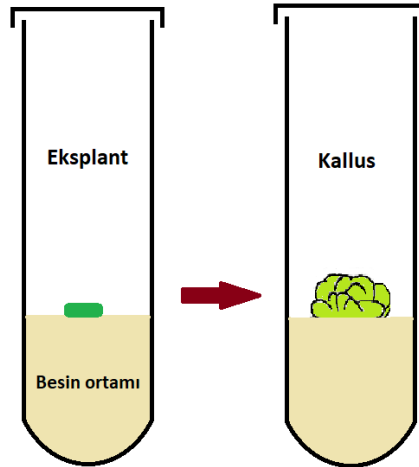
- Hücre kültürlerinin oluşturulması
- İn vitro çoğaltım
- Kallus kültüründe ortaya çıkan somoklonal varyasyondan amaca uygun yeni çeşit geliştirme ve iyileştirmelerde kullanma
- Virüslerle bulaşık olmayan kallus hücrelerini izole ederek virüssüz bitkilerin elde edilmesi
- Fizyolojik araştırmaların yapılması

Kallus kültürünün başarılı bir şekilde başlatılması için bitki materyalinin aseptik olarak hazırlanması, besin ortamına uygun oranda bitki büyüme düzenleyicilerin eklenmesi ve uygun kültür koşullarında inkübasyona bırakılması gerekir. Kallus kültürleri düzenli aralıklarla büyüdüklerinden alt kültürlerle alınmalıdır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin besin ortamına ilavesiyle eksplantın in vitro kallus oluşturması ve kontrolü sağlanır.

Kültüre başlamadan önce eksplantın alınacağı bitki organı (havuç kökü, patates yumrusu vb.) sterilize edilmelidir. Eğer kültüre alınacak eksplant fideden izole edilecekse ekimden önce tohum sterilize edilmeli ve aseptik şartlarda çimlendirilmelidir. Çimlenmeden sonra uygun bir evrede kotiledon, hipokotil veya kök gibi bir organ fideden izole edilerek besin ortamına yerleştirilir.

Bitki parçalarında bakteri, mantar vb. gibi yüzey kaynaklı mikroorganizmalar bulunabilir. Bu nedenle kültürlenecek bitki parçalarının yüzey sterilizasyonu yapılmalıdır. Bunun için eksplantlar öncelikle akan musluk suyuyla ve ardından sıvı deterjanla yıkanır. Daha sonra eksplantlar uygun kimyasal çözeltilerde (%0,1'lik HgCl ya da %1,6 Cl) 10-15 dakika bekletilir. Bu işlemlerden sonra eksplantlar distile suyla birkaç kez durulanır.

Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış bitki materyali aseptik koşullarda 1-2 mm uzunluklara parçalanır. Eksplantların büyüklüğü kallus dokusunun uyarılması için önemli etkindir. Kesilen eksplantlar katı veya yarı katı besin ortamına aseptik olarak aktararak kallus kültürü başlatılır (Görsel 2.2). Kallus kültürünün iyi bir şekilde gelişmesi için besin ortamına bitki büyüme hormonları eklenmelidir.



Görsel 2.2: Kallus kültürünün başlatılması

2.2.1. Kallus Kültürü İçin Gerekli Besin Ortamı Bileşimi

Birçok bitki türünün ve bu bitki türlerinden alınan farklı dokuların besin ihtiyaçları değişiklik gösterir. Bu nedenle makro ve mikro elementlerinin dengeli bir şekilde bulunduğu besin ortamları kullanılmalıdır. RW, LS, MS besin ortamları kallus kültüründe yaygın olarak kullanılan besin ortamlarıdır. Ancak iyi bir kallus oluşumu için besin ortamlarına vitamin, karbon kaynağı, organik büyüme faktörleri (amino asitler, üre ve peptonlar), bitki hormonları gibi çeşitli maddelerin eklenmesi gerekir.

Besin ortamında karbonhidrat olmadığına kallus dokuları iyi gelişemez. Genellikle karbon kaynağı olarak sakkaroz ve glikoz, kallus dokularının gelişiminde etkilidir. Hücre bölünmesi, kallus oluşumunun uyarılması ve iyi bir gelişme için besin ortamında oksin ve sitokininlerin bulunması gerekir. Kinetin ve benziladenin en çok kullanılan sitokininlerken oksin olarak çoğunlukla IAA, NAA ve 2,4-D kullanılmaktadır. Kullanılması gereken oksin ve sitokinin konsantrasyonu kallusun orijinine göre değişmektedir. Genellikle 0,01-15,0 mg/l arası oksin ve 0,1-10,0 mg/l arasında kinetin kullanımı kallus kültürü için yeterli olmaktadır. Bazı bitkilerin doku kültürlerinden devamlı alt kültür üretimi yapıldığında bu kültürlerin ortam şartlarındaki isteklerinde değişiklikler olabilmektedir. Örneğin başlangıçta kültür ortamına dışarıdan oksin ilavesi gerekirken bu kültürden elde edilen alt kültürlerde buna ihtiyaç duyulmamaktadır.

Kallus kültüründe yığın hâlinde bulunan hücreler, 3-8 hafta içinde ufak parçalara bölünerek transfer edilebilecek iriliğe ulaşır. Bu nedenle istenilen miktarda kallus elde etmek için yaklaşık 4 haftada bir, kallus parçalanarak taze besin ortamına transfer edilmelidir.

2.2.2. Kallus Kültüründe İhtiyaç Duyulan Kültür Koşulları

Kallus kültürleri için genellikle 25 °C sıcaklık ve düşük ışık yoğunluğu uygundur. Ancak bazı bitki materyallerinde kallus dokusunun başlaması ve büyümesi için 16 saat aydınlık 8 saat karanlık şeklinde bir fotoperiyot gerekli olmaktadır. Genel olarak 2.000-3.000 lüks yapay ışık yoğunluğu yeterlidir. Işık sağlamak için soğuk, beyaz floresan lambalar uygundur. Kültür odasında genellikle %55-60 bağıl nem kallus kültürünün gelişmesi için yeterlidir. Kallusun gelişme durumu; kallusun taze veya kuru ağırlığını ölçerek, hücre sayısı ve kültür hacminin artış miktarı saptanarak belirlenmektedir.

Kallus kültüründe dış görünüş ve tekstür (hücre sel kompozisyon) bakımından oldukça farklı durumlar gözlenebilmektedir. Bazı kallus dokuları birbirlerine bitişik hücrelerden oluşmuş oldukça kompakt bir yapıya sahiptir. Bazı kalluslar ise birbirlerine çok az temas eden hücrelerin oluşturduğu gevşek bir durum gösterir.

Besin ortamı ve ışık gibi çevre faktörlerinin de etkisiyle pek çok kallus pigment içermez. Ancak bazıları soluk yeşil (klorofil), sarı (karotenoid veya flavonoidler) ya da mor (antosiyanın) renkli olabilmektedir (Görsel 2.3).



Görsel 2.3: Soluk yeşil renkte kallus kültürü

Kallus dokularının heterojen bir yapıya sahip olmalarında kültürün orijini, yaşı ve besin ortamının yapısı etkili olmaktadır. Kallus dokusunda bölünebilir hücreler, kallusun dış tarafında ya da her tarafına dağılmış olarak bulunur. Aktif olarak büyüyen kallus kültürleri genellikle küre şeklindedir.

Kallus kültürünün uzun süre devam ettirilmesi sonucunda poliploidi, kromozom sayılarındaki azalmalar, kromozomal kırılmalar gibi sitolojik değişimler olabilmektedir. Bu değişiklikler kültürün yaşı ile doğru orantılı olarak artmakla birlikte türden türe farklılık göstermektedir. Örneğin havuç kallus kültürlerinde poliploidi birkaç ay içinde oluşurken ayçiçeği kültüründe uzun yıllar sitolojik açıdan değişim olmamaktadır.

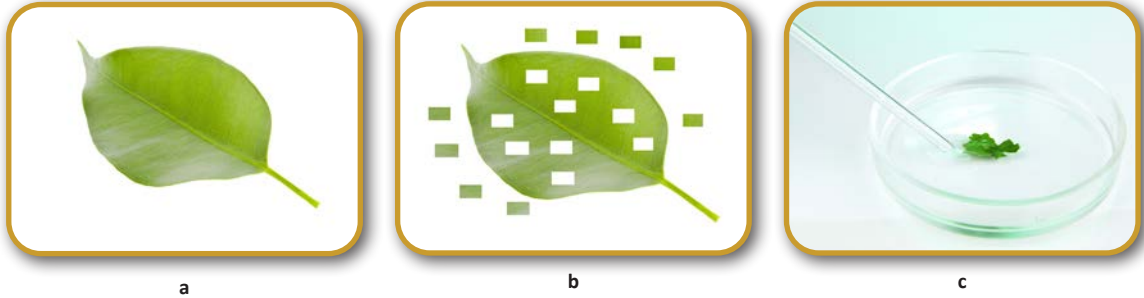
2.2.3. Kallus Kültürü Uygulaması

Yapraktan Kallus Kültürü Elde Etme: Genç bir bitkiden taze yapraklar alınarak akan musluk suyunda yıkanır. Daha sonra 10 dakika boyunca %5'lik sıvı deterjanda bekletilir. Yüzey sterilizasyonu için 10 dakika boyunca sodyum hipoklorit solüsyonunda bekletilen eksplantlar daha sonra distile su ile birkaç kez durulanır (Görsel 2.4).



Görsel 2.4: Yüzey sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonu tamamlanan yapraklar aseptik koşullarda steril bir bisturi ile küçük parçalara ayrılarak her bir parça, içinde besin ortamı bulunan petri kaplarına aktarılır (Görsel 2.5).



Görsel 2.5: a) Eksplant b) Eksplantın parçalara ayrılması c) Eksplantın besin ortamına yerleştirilmesi

Ağızları kapatılan petri kapları, karanlıkta 25 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. Besin ortamına 2,4-D eklenmiş eksplantlar 3-4 hafta sonra çok sayıda kallus oluşturur (Görsel 2.6). Elde edilen kalluslar birkaç parçaya ayrılır ve her bir parça başlangıç besin ortamını içeren yeni kaplara alınarak kallus çoğaltılır.



Görsel 2.6: Kallus oluşumu

Çoğaltma işlemi tamamlananlar sürgün için uygun ortamlara aktarılarak inkübasyona bırakılır. Sürgün gelişiminden sonra kalluslar köklendirme için içeriğinde kök gelişimine teşvik edici bitki büyüme düzenleyicilerin olduğu besin ortamına transfer edilir ve inkübasyona bırakılır (Görsel 2.7).



Görsel 2.7: İnkübasyondaki kalluslar

Yeterince köklenme sağlandığında elde edilen bitkiler saksılara aktarılır. Nem kaybını önlemek için her biri naylonla kapatılarak bir süre dış ortama alıştırılır. Daha sonra bitkiler bahçede serbest iklim koşullarına aktarılır (Görsel 2.8).



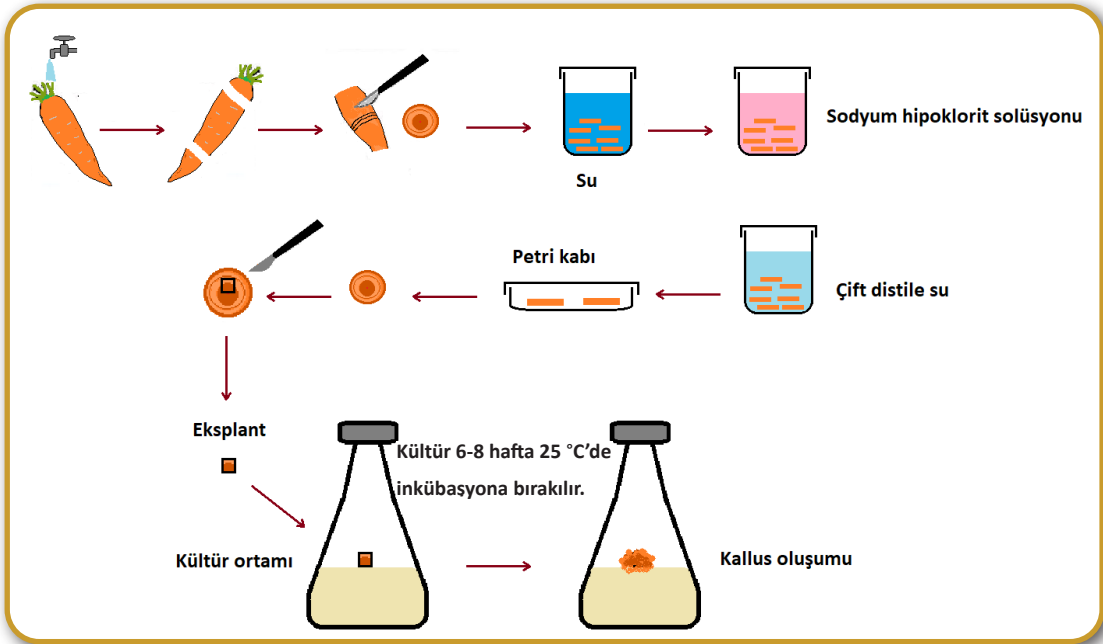
Görsel 2.8: Dış koşullara aktarılan bitki

Havuçtan Kallus Kültürü Elde Etme: Taze havuç kökü alınıp akan musluk suyu altında iyice yıkanır. Daha sonra 10 dakika boyunca %5'lik sıvı detarjana daldırılır ve saf su ile yıkanır. Yıkanan havuç kökünün üst ve alt kısmı steril bir bisturi yardımıyla kesilerek atılır.

Orta kısımdan 1 mm kalınlığında bir dizi enine dilim kesilir. Kesilen her bir parça başka bir steril petri kabına aktarılır. Her bir dilim havuç kesiti özün etrafında beyazımsı dairesel bir kambiyum halkası içerir. Havuç kökünden alınan kesitler %70'lik etil alkolde (etanol) 60 sn. tutulur. Etanolden çıkarılan kesitler 20-25 dakika boyunca %0,8'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içine daldırılarak yüzey sterilizasyonu yapılır. Eksplant yüzeyinden hipokloriti tamamen uzaklaştırmak için kök birkaç kez steril distile su ile iyice yıkanır. Alınan kesitler daha sonra içinde filtre kâğıdı olan sterilize edilmiş bir petri kabına aktarılır. Daha sonra her bir havuç diliminden kambiyum boyunca yaklaşık 4 mm'lik bir alan kesilir. Bu şekilde kesilen her bir küçük parça floem, kambiyum ve ksilem kısımlarını içermiş olur. Kesilen eksplantların boyutu ve kalınlığı tek tip olmalıdır. Her bir işlemde sonra daima petri kabının kapağı değiştirilmelidir.

İçinde besin ortamı bulunan erlenin ağız kısmının yaklaşık 20 mm'si alevden geçirilir. Daha sonra erlen 45°lik bir açıyla tutularak agarlı besin ortamı yüzeyine bir eksplant aktarılır. Kullanılacak besin ortamı 0,5 mg/l 2,4-D ile takviye edilmiş B5 besin ortamı veya MS olabilir. Eksplant aktarılan tüpün kapağı hemen kapatılır. Aktarma işleminde kullanılan pens her kullanımdan önce ve sonra alevden geçirilmelidir. Erlenin üzerine kültürün yapıldığı tarih, besi yeri ve bitkinin adını içeren bilgiler yazılmış etiket yapıştırılır.

Kültür kapları inokülasyondan (aşılamadan) sonra kültür odasına alınır ve karanlıkta 25 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. İnkübasyona bırakılan eksplantlar genellikle 4 hafta sonra çok sayıda kallus oluşturur. Meydana gelen tüm kallus kütlesi steril bir petri kabına aseptik olarak alınır. Bu kallus kütlesi iki veya üç parçaya bölünür. Elde edilen her bir kallus parçası aynı besin ortamını içeren yeni bir erlene aktarılır. Uzun süreli havuç dokusu kültürü çok sayıda kallus üretir. Böylece istenen sayıda kallus dokusu elde edilir (Görsel 2.9).



Görsel 2.9: Havuçtan kallus oluşturma aşamaları



Bu çalışmanın amacı kallus kültürü tekniğini uygulamaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak kallus kültürünü yapmanız beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ VE KİMYASALLAR

- Doku kültürü laboratuvar ortamı
- Cam malzemeler (petri kutusu, erlen vb.)
- Etil alkol (%70)
- Büyüme kabini, otoklav vb.
- Distile su
- Bisturi, pens vb.
- Sodyum hipoklorit çözeltisi (%0,8)
- Havuç kökü
- Besin ortamı
- Sıvı deterjan (%5)

İŞLEM BASAMAKLARI

- 1. Öncelikle taze havuç kökünü akan musluk suyunda yıkayıp %5'lik sıvı deterjana daldırınız ve saf su ile iyice durulayınız.**
 - Dokuların özelliğini kaybetmemesi için süreye uyunuz.
- 2. Yıkanan havuç kökünün üst ve alt kısmını bir bisturi ile keserek atınız. Kökün orta kısmından 1 mm kalınlığında enine dilimler kesiniz ve kesitleri saf su içerisine koyunuz.**
 - Kullandığınız bisturinin steril olduğundan emin olunuz.
 - Kesme işlemi yaparken dikkatli olunuz.
- 3. Aldığınız kesitleri saf sudan çıkararak %70'lik etil alkolde 60 saniye bekletiniz.**
 - Eksplantların etil alkolde uzun süre kalmamasına özen gösteriniz.
- 4. Etil alkolden çıkarılan kesitleri %0,8'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda 20-25 dk. bekletiniz. Daha sonra kesitleri distile su ile birkaç kez çalkalayarak iyice yıkayınız.**
 - Eksplantta herhangi bir kimyasal madde kalmamasına özen gösteriniz.
- 5. Yüzey sterilizasyonu yapılmış kesitleri, içinde filtre kâğıdı olan sterilize edilmiş petri kabına aktarınız.**
 - Aktarma işlemini yaparken kullandığınız pensin steril olduğundan emin olunuz.

6. Her bir havuç diliminden kambiyum boyunca yaklaşık 4 mm'lik bir alan kesiniz.

- Kesilen eksplantların boyutunun ve kalınlığının tek tip olmasına özen gösteriniz.
- Her bir işlemden sonra daima petri kabının kapağını değiştiriniz.
- Her bir parçayı floem, kambiyum ve ksilem kısımlarını içerecek şekilde kesiniz.

7. İçinde besin ortamı bulunan erlenin ağız kısmını alevden geçiriniz. Daha sonra erleni 45°lik bir açıyla tutarak agarlı besin ortamı yüzeyine bir eksplant aktarınız.

- Eksplant aktarılan erlenin kapağını hemen kapatınız.
- Aktarma işleminde kullandığınız pensi her kullanımdan önce ve sonra alevden geçiriniz.
- Erlenin üzerine kültüre ait bilgilerin yer aldığı bir etiket yapıştırınız.

8. Kültür kaplarını inokülasyondan sonra karanlıkta, 25 °C sıcaklıkta 4 hafta boyunca inkübasyona bırakınız.

- Bitkilerin aşırı nem kaybetmemesine özen gösteriniz.

9. İnkübasyon sonunda oluşan kallus kütlelerini steril bir petri kabına aseptik olarak alınız. Bu kallus kütlelerini iki veya üç parçaya bölünüz. Elde edilen her bir kallus parçasını aynı besin ortamını içeren yeni bir erlene aktarınız.

- Parçalara ayırma ve aktarma işlemini yaparken kullandığınız malzemelerin steril olmasına özen gösteriniz.

UYGULAMAYA İLİŞKİN DEĞERLENDİRME

Uygulamanız aşağıda verilen ölçütlere göre 100 puan üzerinden değerlendirilecektir.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	Çok İyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1. Kallus kültürü için eksplanta yüzey sterilizasyonu yaptı.				
2. Eksplanttan 4 mm kalınlığında kesitler aldı.				
3. Aldığı kesitleri aseptik koşullarda besin ortamına aktardı.				
4. Kültür kaplarını uygun koşullarda inkübasyona bıraktı.				
5. Kallus kütlelerini parçalara ayırıp yeni besin ortamına aktardı.				
TOPLAM PUAN				

Değerlendirme formundan **en az** 70 puan aldıysanız bu uygulama için başarı düzeyiniz yeterli demektir. Eksik olduğunuz öğrenmeleri tekrar etmeniz önerilmektedir.

2.3. MERİSTEM KÜLTÜRÜ

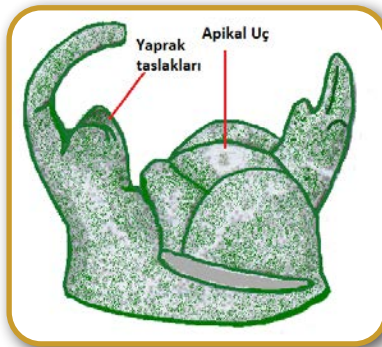
Bitkilerin büyüme konileri veya büyüme konileri yanındaki yaprak taslağının, steril koşullarda yapay besin ortamında kültüre alınarak virüsten arındırılmış bitkilerin elde edildiği tekniğe **meristem kültürü** denir. Hastaliksız bitkiler elde etmek üzere geliştirilmiş ve meristematik hücreler kullanılarak gerçekleştirilen meristem kültürü yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Vegetatif olarak üretilen pek çok bitki virüslerle bulaşmıştır. Bir bitkinin virüs yükü hücreden hücreye farklılık gösterir. Özellikle apikal sürgün ve kök meristemi hücrelerinin virüs içermesi olasılığı oldukça düşüktür. Bu nedenle meristem kültürlerinden virüsten arındırılmış bitki etmek mümkün olmaktadır. Ancak bu, meristemlerin her zaman virüs içermeyeceği anlamına gelmez. Meristem kültüründe virüs eliminasyonu için kullanılan eksplantlar **meristem ucu**, 1 mm'den büyük eksplantlar ise **sürgün ucu** olarak ifade edilir (Görsel 2.10).



Görsel 2.10: Meristem kültürü için eksplant

Meristem dokular bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerin oluşturduğu dokulardır. Bu dokular sayesinde bitkiler yeni hücre ve organlar oluşturarak büyür. Bitkide buldukları bölgelere göre meristem dokular başlıca üç grupta toplanabilir.

Apikal (Uç): Kök, gövde veya bunların yan organlarının uçlarında bulunan ve bu organların boyca büyümesini sağlayan meristem dokulardır. Apikal koni yaprak taslaklarının belirlediği kısmın üst tarafında kalan meristematik kitle olarak kabul edilmektedir. Tam ortadan geçen boyuna kesitte tam konveks görünümlü bir kubbe gibidir (Görsel 2.11).



Görsel 2.11: Gelişmiş bir bitkide apikal koni

İnterkalar (Ara): Dokular arasında kalan ve bulunduğu organların boyca büyümesini sağlayan meristem dokulardır.

Lateral (Yanal): Çevreye paralel bölünerek organların enine büyümesini sağlayan meristem dokulardır.

Meristem kültürünün kullanım amaçları:

- Virüssüz bitkisel materyal elde etmek
- Mikroçoğaltım (bitkilerin hızlı klonal çoğaltımı)
- Germplazm korunması (bitkisel gen kaynakları)
- Bitki ıslahında gen transferiyle genetik transformasyonlar
- Bitki materyallerinin uluslararası değişimi
- Bakteri ve mantarlardan arındırılmış bitkilerin üretilmesi

Meristem kültüründe meristem ucu ile yaprak taslağından oluşan ve 0,1 mm'den daha küçük bir eksplantın izole edilmesi gerekir ancak bu kadar küçük bir eksplantın izole edilmesi oldukça zordur. Ayrıca bu şekilde elde edilen kültürün sürme gücü de zayıftır. Bu nedenle özellikle vegetatif üretim yöntemleri ile üretimi zor veya yavaş olan bitkilerin hızlı üretimi için 3-10 mm boyunda sürgün uçları kullanılmaktadır. Bu yöntemle elma, çilek, erik, üzüm, kestane, şeftali, domates, karanfil, gül ve orkide üretimi yapılabilmektedir.

Meristem kültürlerinde eksplantın alındığı bitkinin yaşı, içinde bulunduğu fizyolojik durum, eksplantın alındığı kaynak ve mevsim başarıyı etkilemektedir. Büyük eksplantlar daha yüksek canlılık ve rejenerasyon özelliğine sahiptir. Eksplantların 0,2-0,5 mm arasında olması virüs eliminasyonunda başarıyı artırmaktadır. Meristem eksplantları bitkide vegetatif büyümenin aktif olduğu dönemde alınmalıdır. Genç fidanlardan alınan eksplantlar, olgun bitkilerden alınanlara göre daha fazla başarı oranına sahiptir. Birçok bitkide uç meristemi kadar yan dalların koltukaltlarından izole edilen meristemler de iyi sonuçlar vermektedir.

2.3.1. Meristem Kültürü İçin Gerekli Besin Ortamı Bileşimi

Meristem ucu kültürleri için genellikle MS ortamı uygundur. Ancak olgun bitkilerden eksplant alındığında daha az tuz oranına sahip besin ortamına ihtiyaç vardır. Genellikle besin ortamları karbon kaynağı olarak %1-3 oranında sakkaroz içermektedir. Meristem kültürlerinde de %3 oranında sakkaroz önerilmektedir. Kültürler için gerekli bitki büyüme düzenleyicilerin çeşidi ve konsantrasyonu bitki türüne ve kültürün gelişme safhasına göre değişmektedir. Çoğu bitki türünde düşük oranda sitokin düzeyi bitkinin büyümesini ve meristemin gelişimini destekler.

Meristem kültürlerinde çoğunlukla eksplantlar yarı katı ortamlarda kültüre alınmaktadır. Yarı katı ortamlarda agarın %0,8-1,0 oranında kullanılması yeterlidir. Ancak patates gibi bazı bitki türlerinden alınan eksplantlar, sıvı ortamlarda daha iyi gelişmektedir. Sıvı ortamlar, kültür kaplarında kâğıt köprüler veya lif desteklerle kullanılır.

Başlangıçta hazırlanan besin ortamı; demir-şelat bileşimi, karbon kaynağı (glukoz, fruktoz veya sakkaroz), gerekli vitaminler ve çeşitli hormonları içermelidir. Genel olarak besin ortamı pH değerinin 5,5-5,8 olması meristem kültürünün gelişiminde etkilidir.

2.3.2. Meristem Kültüründe İhtiyaç Duyulan Kültür Koşulları

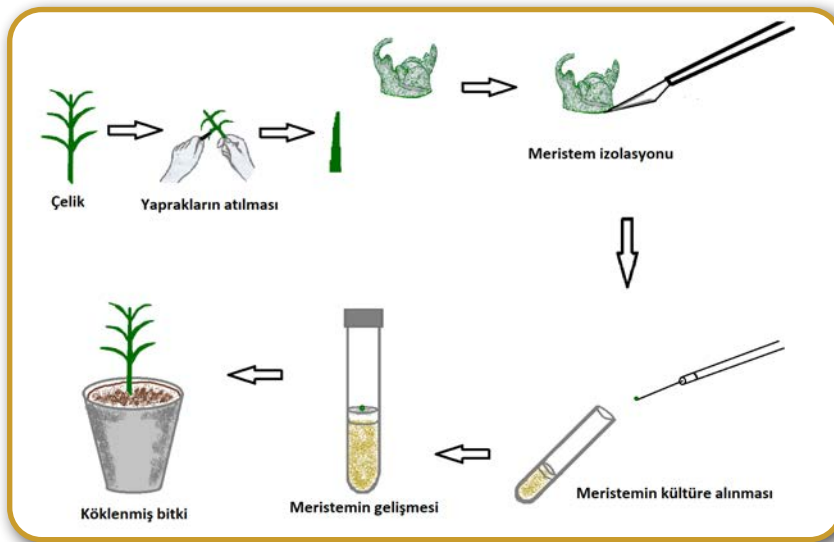
Meristem kültürlerinin çoğunda kullanılan kültür ortamı bileşimi, yüzeysel sterilizasyon yöntemi ve kültür odası koşulları benzerdir. Işık, sıcaklık ve fotoperiyot gibi çevresel etkenler in vitroda farklılaşmayı etkilemektedir. Meristem kültüründe genellikle kültür odalarında 25 °C sıcaklık, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık uygulaması ve 4.000 lüks değerinde aydınlatma kullanılması yeterlidir. Ancak bitki türüne ve kültürün safhasına göre bu şartlar değişmektedir. Örneğin bir çilek çeşidinde 28 °C optimum sıcaklık ve meristem kültürün safhasına göre kültüre almada 4.000, sürgün çoğaltımı için 6.000 ve köklendirme için ise 7.000 lüks ışık uygun olmaktadır.

2.3.3. Meristem Kültürü Uygulaması

Eksplantın alınacağı donör bitkiden en az bir boğum içeren sap kesilir. Eksplantın alındığı bitkiye uygun sterilizasyon yöntemi, kesilen sap parçalarına uygulanır. Bunun için sürgün kısımları, sterilizasyon için öncelikle akan musluk suyunda yıkanır. Daha sonra %90'lık etil alkole 10-30 saniye batırılır, %0,5-10 sodyum hipoklorit solüsyonunda 10 dakika bekletilip distile su ile birkaç kez çalkalanır. Eğer doku yüzeylerinde mumsu tabaka varsa veya yüzey tüylerle kaplıysa hipoklorit solüsyonuna deterjan ilave edilmelidir.

Meristem ucu çıkarılacak bitki materyali stereo mikroskop tablasına yerleştirilir. En az 15x büyütmede tomurcuğun apikal meristemini görmek için materyalden önce yapraklar temizlenir. Daha sonra genç yaprak taslakları ile apikal kubbe kesilir. Ayrılan meristem ucu kültür ortamına yerleştirilir. Ortamın su kaybını önlemek için kaplar parafin ile kapatılır. Daha sonra kültür kapları kültür odasına yerleştirilir. Sıcaklık 25 °C'ye aydınlatma ise 4.000 lükse ayarlanır ve kültür ışıkta 12-16 saat fotoperiyota bırakılır.

Eksplant canlılığını devam ettirirse 7-14 gün içerisinde eksplantta uzama ve bitki gelişimi olur. Gelişen bitkiler çoğaltım için boğumlarının ayrılabilceği büyüklüğe ulaşıncaya kadar in vitroda gelişmeye bırakılır. İn vitroda gelişen bitkiler, steril koşullar altında kültür kaplarından çıkarılır ve tomurcuğun bulunduğu her bir parçaya ayrılır. Bu parçalar tomurcuğun büyümesini sağlayacak taze ortama aktarılır. Bu şekilde ana bitki virüsten arındırılmış bir şekilde çoğaltılır (Görsel 2.12).



Görsel 2.12: Meristem kültürün uygulanış aşamaları

3. UYGULAYALIM
ÖĞRENELİM

MERİSTEM KÜLTÜRÜ



Bu çalışmanın amacı meristem kültürü tekniğini uygulamaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak meristem kültürünü yapmanız beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ VE KİMYASALLAR

- Doku kültürü laboratuvar ortamı
- Sodyum hipoklorit çözeltisi (%0,5-10)
- Etil alkol (%90)
- Saksı
- Besin ortamı
- Stereo mikroskop
- Sera
- Bisturi, pens vb.
- Cam malzemeler (petri kutusu, deney tüpü vb.)
- Parafin
- Büyüme kabini, otoklav vb.
- Distile su
- Streç film
- Donör bitki

İŞLEM BASAMAKLARI

- 1. Eksplantın alınacağı donör bitkiyi belirleyerek en az bir boğum içeren sap kesiniz.**
 - Kesme işleminde dikkatli olunuz.
- 2. Kesilen sürgün kısımlarını öncelikle akan musluk suyunda yıkayıp ardından %90'lık etil alkolle batırarak 10-30 saniye bekletiniz.**
 - Dokuların özelliğini kaybetmemesi için süreye uyunuz.
- 3. Eksplantı %0,5-10 sodyum hipoklorit solüsyonunda 10 dakika bekletip sonra distile su ile birkaç kez çalkalayarak iyice yıkayınız.**
 - Eksplantta herhangi bir kimyasal madde kalmamasına özen gösteriniz.
 - Doku yüzeyinde tüyler varsa veya mumsu tabaka bulunuyorsa hipoklorit solüsyonuna deterjan ilave ederek sterilizasyon yapınız.
- 4. Yüzey sterilizasyonu yapılmış bitki materyalini stereo mikroskop tablasına yerleştirerek dış yaprakları temizleyip meristem ucunu kesiniz.**
 - Mikroskopta en az 15x büyütme yapınız.
 - Tomurcuğun apikal meristemini tespit etmek için bitki materyalinden önce yaprakları temizleyiniz.
 - Meristeme zarar vermemek için kesme işleminde dikkatli olunuz.

5. Bitki materyalinden izole ettiğiniz meristem ucunu önceden hazırlanmış başlangıç kültür ortamına yerleştiriniz.

- Besin ortamında su kaybını önlemek için kültür kaplarını parafinle ya da streç filmle kapatınız.

6. Kültür kaplarını kültür odasına veya büyütme kabinine yerleştirip sıcaklığı 25 °C'ye ayarlayıp ışıkta 12-16 saat inkübasyona bırakınız.

- Kültürleri 7-14 gün bu kültür koşullarında inkübasyonda tutarak günlük kontrol ediniz.

7. Uygun büyüklüğe ulaşan bitkileri aseptik koşullar altında çıkarıp tomurcuğun bulunduğu yerden parçalara ayırarak taze besin ortamına yerleştiriniz.

- Tomurcuğun zarar görmemesine özen gösteriniz.
- Kök gelişimi için uygun oranda bitki büyüme düzenleyiciler kullanınız.

8. Sürgün ve kök gelişimi tamamlanan bitkileri dış ortama alıştırıp sera koşullarına alınız.

- Bitkilerin aşırı nem kaybetmemesine özen gösteriniz.

UYGULAMAYA İLİŞKİN DEĞERLENDİRME

Uygulamanız aşağıda verilen ölçütlere göre 100 puan üzerinden değerlendirilecektir.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	Çok İyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1. Meristem kültürü için eksplanta yüzey sterilizasyonunu yaptı.				
2. Mikroskop altında meristem ucu belirleyerek eksplanttan izole etti.				
3. Meristem ucunu aseptik koşullarda besin ortamına aktararak inkübasyona bıraktı.				
4. Sürgün çoğaltma ve köklendirme işlemlerini yaptı.				
5. Gelişen bitkileri uygun şekilde dış koşullara alıştırıp sera ortamına aldı.				
TOPLAM PUAN				

Değerlendirme formundan **en az 70** puan aldıysanız bu uygulama için başarı düzeyiniz yeterli demektir. Eksik olduğunuz öğrenmeleri tekrar etmeniz önerilmektedir.

2.4. EMBRİYO KÜLTÜRÜ

Bitkilerin tohumlarından veya tohum taslaklarından embriyoların aseptik koşullarda izole edilerek uygun besin ortamlarında kültüre alınmasıyla yeni bitki elde edilmesi işlemine **embriyo kültürü** denir. Embriyo kültürü tekniği ilk olarak 1904 yılında Hanning (Haning) tarafından uygulanmıştır.

Normal olarak bitki üzerinde embriyo gelişiminin izlenmesi oldukça zordur. Ancak bir yumurtalığın kültüre alınmasıyla zigot evresinden embriyonun olgunlaşmasına kadar geçen sürede meydana gelen değişiklikler rahatlıkla izlenebilmektedir. Embriyo kültürü, embriyonun büyüme ve farklılaşmasında besinlerin, bitki büyüme düzenleyicilerinin, diğer kimyasal ve fiziksel faktörlerin etkilerini incelemek için elverişli bir yöntemdir. Yine doğal olarak yetiştirilemeyen bitkilerin yetiştirilmesinde embriyo kültüründen yararlanılmaktadır. Diğer yandan tehlikede olan türlerin korunması, tohum dormansisini kırmak için de embriyo kültürü kullanılır. İslah çalışmalarında klasik metotlara kıyasla embriyo kültürü ile daha kısa sürede başarılı sonuçlar alınabilmektedir. Ayrıca yaşama yeteneğine sahip olmayan embriyoların kurtarılması, haploid bitki geliştirme ve tohum dışında embriyonun gelişiminin incelenmesi gibi çalışmalarda kullanılmaktadır. Embriyo kültürü ile bir yılda iki generasyon üretilebilmektedir. Örneğin dağ elmasında toprağa ekilen tohumların çimlenmesi 9 ay iken embriyo kültüründe çimlenme 48 saatle başlamakta ve 4 haftada yeterince büyük fideler elde edilmektedir.

Embriyo kültürünün kullanım amaçları:

- Temel biyolojik çalışmalarda
- Çimlenmesi çok zor olan tohumların çimlendirilmesinde
- Bitki yetiştirme ve ıslahında süresinin kısaltılmasında
- Yeterince gelişmemiş embriyoların kurtarılması ve hibrit embriyoların yaşatılmasında
- Haploid bitki üretilmesinde
- Hastalısız bitki üretiminde
- Tohum canlılıklarının test edilmesinde
- Embriyo gelişiminin deneysel olarak incelenmesinde
- Tohumla üretimi zor olan bitkilerin üretiminde
- Endemik bitkilerin çoğaltılmasında

Tohum dormansisi ve tohum sterilitesi nedeniyle tohumların çimlenemediği durumlarda, embriyoların izole edilerek kültüre alınmasıyla dormansi ortadan kaldırılabilir (Görsel 2.13).



Görsel 2.13: Tohumdan embriyonun izole edilmesi

Embriyo kültürü yapmak amacıyla kullanılacak donör bitkiler genellikle serada yetiştirilir (Görsel 2.14) ancak tarla koşullarında yetiştirilen bitkiler de embriyo kültüründe donör olarak kullanılabilir. Donör bitkilerin büyüme koşullarının iyileştirilmesi, endosperm gelişmesinin daha iyi olmasını ve embriyoların daha iyi büyümesini sağlar.



Görsel 2.14: Serada yetiştirilen donör bitkiler

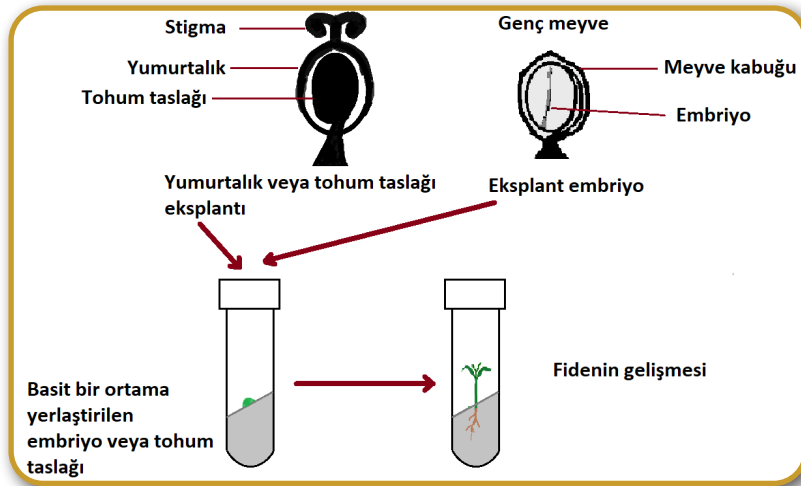
Embriyo kültürünün esası; çalışılan bitki ve konuya göre değişmekle birlikte tohum içinde bulunan ve belirli bir gelişme devresinde olan embriyoların aseptik koşullarda tohumdan çıkarılması ve uygun bir besin ortamında aktarılarak yeni bitkilerin geliştirilmesidir. Embriyo kültürü iki şekilde yapılmaktadır.

Olgun Embriyoların Kültürü: Gelişmesini tamamlamış tohumlardan olgun embriyoların izole edilerek basit bir kültür ortamına aktarılmasıdır (Görsel 2.15). Olgun embriyolar özellikle tohumun çimlenmesini engelleyen dormansiyi ortadan kaldırmak amacıyla kültüre alınır. Olgun embriyoların kültürü ile embriyonik büyüme incelenerek embriyonun büyüme dönemleri belirlenir.



Görsel 2.15: Embriyo kültüründe kullanılacak olgun tohumlar

Olgunlaşmamış Embriyo Kültürü: Olgunlaşmamış embriyoların kültürü, normal koşullarda gelişimini tamamlayamayan embriyolardan yaşama gücündeki bitkilerin elde edilmesi amacıyla yapılır. Olgunlaşmamış embriyoların izolasyonu zor olduğundan bu tür kültürlerin uygulanması da oldukça güçtür. Bu nedenle embriyo kültürüne alternatif olarak tozlaşmış yumurtalık (ovary) kültürü ve olgunlaşmamış tohum taslağı (ovül) kültürü kullanılmaktadır (Görsel 2.16).



Görsel 2.16: Yumurtalık ve embriyo kültürü

Embriyo kültürü çalışmalarında en önemli noktalardan biri embriyonun sterilizasyonudur. Embriyo kültürü çalışmasında embriyonun sterilizasyonu başlıca iki yolla yapılır:

1. Önce meyve uygun bir maddeyle sterilize edilir. Sonra meyve steril bir aletle kesilerek tohum veya yumurtalık çıkarılır. Daha sonra embriyo izole edilerek kültür ortamına aktarılır.
2. Öncelikle tohum meyveden çıkarılır. Daha sonra çıkartılan tohum sterilize edilir. Bundan sonra ise embriyo izole edilip kültüre alınır.

2.4.1. Embriyo Kültürü İçin Gerekli Besin Ortamı Bileşimi

Embriyo kültürü ile kültüre alınan embriyoların gelişimlerini destekleyici bir besin ortamının belirlenmesi gerekir. Embriyo kültürlerinin en iyi geliştiği besin ortamları MS ve B5 olarak bilinmektedir. Ancak elde edildikleri bitkiye veya gelişim durumuna göre embriyoların besin ihtiyaçları değişmektedir. Örneğin olgunlaşmamış embriyolar, olgun embriyolara göre daha kompleks besin ortamlarına ihtiyaç duyar. Bu besin ortamlarında mineral tuzlar, organik besinler, büyüme düzenleyiciler, makro ve mikro elementler ile şeker bulunur.

Embriyo kültüründe hem ozmotik basıncı koruması hem de enerji kaynağı olması bakımından sakkaroz yaygın olarak kullanılır. Sakkarozun optimum konsantrasyonu embriyonun gelişim dönemine göre değişir. Olgun embriyolar besin ortamında %2 sakkarozda oldukça iyi büyüme gösterirken genç embriyolar daha yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyar.

Bitki büyüme düzenleyicileri; embriyoların kallus oluşturmaları, kök ve sürgün gelişimi için gerekli olabilmektedir. Oksinler düşük konsantrasyonlarda uygulandığında kök gelişiminde etkilidir. Gibberellinlerin, sitokininlerin embriyo kültüründe bitkilerin büyüme ve gelişmesini teşvik ettiği ve tohumlardaki dormansinin giderilmesinde etkili olduğu bilinmektedir.

Embriyo kültüründe genellikle pH değeri 5-6 arasında değişen ve %0,6-0,8 konsantrasyonda agar kullanımı uygundur. Yüksek agar konsantrasyonları embriyonun büyümesini engeller.

2.4.2. Embriyo Kültüründe İhtiyaç Duyulan Kültür Koşulları

Embriyo kültüründe büyüme odası sıcaklığı ve aydınlatma, seçilen bitki türüne göre değişir ancak embriyolar genellikle 22-28 °C'de kültür edilir. İzole edilmiş embriyolar 7-14 gün süreyle karanlık koşullara ihtiyaç duyar. Bu karanlık dönemden sonra ışık koşullarında klorofil oluşumu gerçekleşir. Embriyoların oksijen gereksinimi normal havanın oksijen içeriğinden daha fazla olabilir. Kullanılan kültür kapları gözlem yapılabilmesi için cam olmalı ve kaplar otoklavda 115 °C'de 20 dakika sterilize edilmelidir.

Çok küçük embriyoların in vitro ortamda gelişmesi zorken gelişmiş embriyoları üretmek kolaydır. Embriyolar, gelişen tohum taslağından olgun döneme yakın bir zamanda izole edildiğinde basit inorganik ortamda kolayca gelişir. Ancak olgunlaşmamış embriyoların in vitro kültürde geliştirilmesi ve bunlardan bitki elde edilmesi oldukça zordur. Olgunlaşmamış embriyolar kültüre alındığında ona uygun olarak büyüme ve gelişmesine yardımcı olacak bir kültür ortamı da belirlenmelidir. Özellikle erken dönemdeki embriyoların zarar görmeden izole edilmesi gelişebilmesi için çok önemlidir.

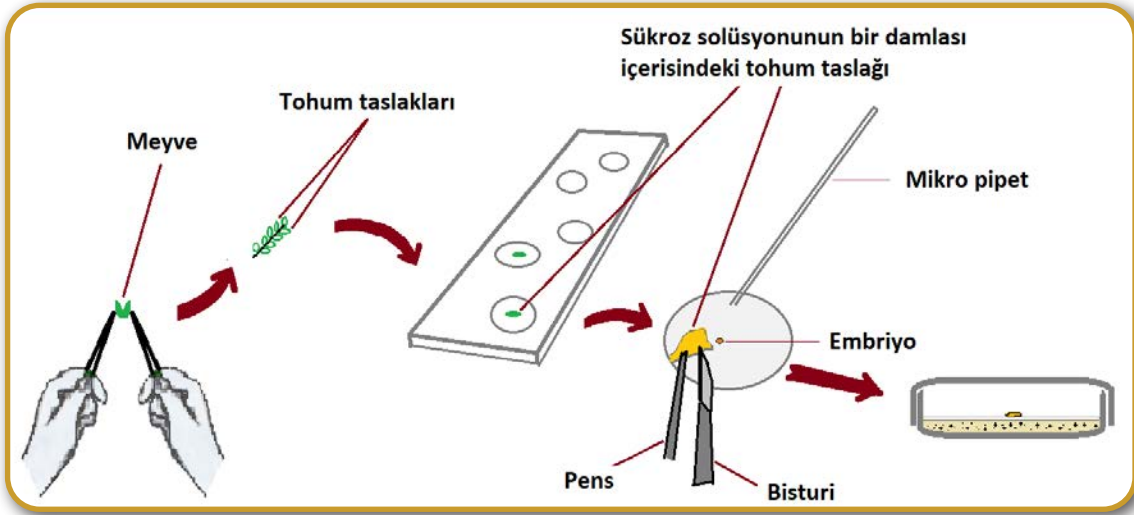
2.4.3. Embriyo Kültürü Uygulaması

Tohum dormansisinin giderilmesi amacıyla çobanpüskülü bitkisinde yapılan uygulama:

Tohumu Yıkama: Plastik bir kafes içine konan çobanpüskülü meyveleri, akan su altında yıkanır. Tohumlar meyve etinden ayrılır.

Sterilizasyon: Meyve etinden ayrılan tohumlara %0,5 sodyum hipoklorit çözeltisinde 5 dakika yüzeysel sterilizasyon yapılır. Bu işlemden sonra tohumlar birkaç kez steril distile su ile çalkalanır. Tohumlar embriyo ayırma işlemine kadar steril distile su içerisinde bekletilir.

Embriyo İzolasyonu: Filtre kâğıdı üzerine alınan tohumdan stereo mikroskop altında embriyo ayırma işlemi yapılır. Embriyo mikropolar açıklığı yerleştiğinden öncelikle tohumda mikropolar açıklık kısmı belirlenir. Steril bir bisturi ile tohum yarılr. Steril bir şekilde embriyo izole edilerek besin ortamının yüzeyine transfer edilir (Görsel 2.17).



Görsel 2.17: Embriyoların inokülasyonu

Kültürler ilk hafta karanlıkta inkübe edildikten sonra aydınlık ortama alınır. Kültürler 4 hafta boyunca haftalık olarak stereo mikroskop altında gözlemlenir. İn vitro embriyonik gelişmeyle ilgili veriler kalp şekilli, geç kalp şekilli safha, topedo, linear olgun dönem ve çimlenme dönemleri olarak kaydedilir. Bunlar dışında deforme olan kotiledonlar veya kallus oluşumu gibi gelişim anormallikleri gösteren embriyoların oranı belirlenir.

Çimlenmeden sonra fide gelişim verileri gözlenerek kaydedilir. Belirli bir gelişim evresine ulaşan fideler toprak karışımı saksılara aktarılır. Saksılara aktarılan fideler alıştırma işlemi için önce sera içerisinde dış koşullara alıştırlır. Alıştırma işleminden sonra saksılar sera dışına alınır. Dış çevrede fidelerin canlı kalma oranları kaydedilir. Her ayın sonunda normal fide oranları belirlenerek kayıt altına alınır.



BİLGİ KÖŞESİ

ENDEMİK BİTKİ NEDİR?

Endemik kelimesi Yunanca endomos (indigenous) kelimesinden gelir. Yerli, o yere ait demektir. Yeryüzünün yalnızca belirli bölgelerinde yayılış gösteren bitki türlerine **endemik bitki** denir.

İnsan beslenmesinde kullanılan buğday, nohut, mercimek, incir, kiraz, badem, kayısı gibi bitkilerin birçoğunun kökeni Anadolu'dur. Bunların dışında lale, kardelen, orkide, safran ve çiğdem gibi daha birçok bitki türü bulunmaktadır. Bitkiler besin maddesi olması dışında süs bitkisi olarak kullanıldığı gibi çeşitli bitki türleri; tıp ve eczacılık alanlarında birçok hastalığın tedavisinde aynı zamanda ilaç yapımında kullanılmaktadır. Örneğin çiğdem bitkisinden kolşisin maddesi elde edilmekte ve Akdeniz ateşi, gut, Behçet hastalığı gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Görsel 2.18).



Görsel 2.18: Çiğdem



4. UYGULAYALIM
ÖĞRENELİM

EMBRYO KÜLTÜRÜ



Bu çalışmanın amacı embriyo kültürü tekniğini uygulamaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak embriyo kültürünü yapmanız beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ VE KİMYASALLAR

- Doku kültürü laboratuvar ortamı
- Sodyum hipoklorit çözeltisi
- Saksı
- Büyüme kabini, otoklav vb.
- Distile su
- Sera
- Bisturi, pens vb.
- Cam malzemeler (petri kutusu, deney tüpü vb.)
- Filtre kâğıdı
- Besin ortamı
- Stereo mikroskop
- Donör bitki (çobanpüskülü)

İŞLEM BASAMAKLARI

- 1. Embriyo kültürü için kullanacağınız bitkiden çobanpüskülü meyvelerini seçiniz.**
 - Bitkilerin uygun dönemde olup olmadığına dikkat ediniz.
- 2. Çobanpüskülü meyvelerini akan su altında yıkayıp tohumları meyve etinden ayırınız.**
 - Meyveleri kolayca yıkamak için plastik bir kafes içine koyunuz.
 - Meyvelerin iyice yıkandığından emin olunuz.
- 3. Tohumlara %0,5 sodyum hipoklorit çözeltisinde 5 dakika yüzeysel sterilizasyon yapınız.**
 - Tohumları çözeltide uzun süre tutmamaya özen gösteriniz.
- 4. Yüzey sterilizasyonu yaptığınız tohumları önce birkaç kez steril distile su ile çalkalayıp daha sonra embriyo ayırma işlemine kadar steril distile su içerisinde bekletiniz.**
 - Bu işlemleri yaparken tohumların zarar görmemesine özen gösteriniz.
- 5. Tohumları filtre kâğıdı üzerine yerleştirerek stereo mikroskop altında embriyoları ayırınız.**
 - Tohumda mikropolar açıklık kısmını belirleyerek steril bir bisturi ile tohumu yarıңыз.
 - İşlem sırasında acele etmeyiniz ve sabırlı olunuz.
 - Steril bir şekilde embriyoyu izole ederek besin ortamının yüzeyine transfer ediniz.

6. Besin ortamına yerleştirdiğiniz embriyo kültürlerini ilk hafta karanlıkta inkübe edip sonra aydınlık ortama alınız.

- Kültürlerin karanlık ve aydınlık ortamlarda kalma sürelerine uyunuz.
- Kültürleri 4 hafta boyunca haftalık olarak stereo mikroskop altında gözlemleyiniz.

7. Çimlenmeden sonra köklendirme işlemlerini yapınız.

- Çimlenme ve köklenme verilerini gözlemleyerek kaydediniz.

8. Belirli bir gelişim evresine ulaşan fideleri toprak karışımı saksılara aktarıp dış koşullara alıştırmak için sera içerisinde bekletiniz.

- Fidelerin nemini kaybetmemesine dikkat ediniz.

9. Dış koşullara alıştırma işleminden sonra saksıları sera dışına alınız.

- Dış çevrede fidelerin canlı kalma oranları kaydediniz.

UYGULAMAYA İLİŞKİN DEĞERLENDİRME

Uygulamanız aşağıda verilen ölçütlere göre 100 puan üzerinden değerlendirilecektir.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	Çok İyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1. Embriyo kültürü için tohumlara yüzey sterilizasyonunu yaptı.				
2. Tohumdan embriyo izolasyonunu yaptı.				
3. Embriyoları aseptik koşullarda besin ortamına aktarıp inkübasyona bıraktı.				
4. Çimlenmeden sonra köklendirme işlemini yaptı.				
5. Saksılara aldığı fideleri serada bekletip dış koşullara aldı.				
TOPLAM PUAN				

Değerlendirme formundan **en az** 70 puan aldıysanız bu uygulama için başarı düzeyiniz yeterli demektir. Eksik olduğunuz öğrenmeleri tekrar etmeniz önerilmektedir.

2.5. MİKROÇOĞALTIM

Yeni bir bitki oluşturma potansiyeline sahip embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, polen tanesi gibi bitki kısımlarından yapay besin ortamında, aseptik koşullar altında yeni bitki elde edilmesine **mikroçoğaltım** (klonal çoğaltım) denir (Görsel 2.19). Bu yöntemle geleneksel yöntemlere göre kısa sürede, daha az bir alanda, mevsime bağlı kalmadan, çok sayıda hastaliksız bitki üretimi yapılabilmektedir. Mikroçoğaltım, klon anaçların ve virüsten arındırılmış çeşitlerin çok miktarda üretilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna karşın doku kültürü ile bitkilerin çoğaltılması pahalı olmasına rağmen özellikle iş gücünü azaltan teknikler kullanıldığında kısa sürede çok sayıda bitki üretilmektedir. Uygun kültür koşulları, gerekli besin ortamı ve hormon istekleri sağlandığında tüm bitki türlerini mikroçoğaltımla üretmek mümkündür. Özellikle ekonomik değeri yüksek olan süs bitkilerinde mikroçoğaltım geleneksel yöntemlerden daha iyi sonuç vermektedir.



Görsel 2.19: Mikroçoğaltım

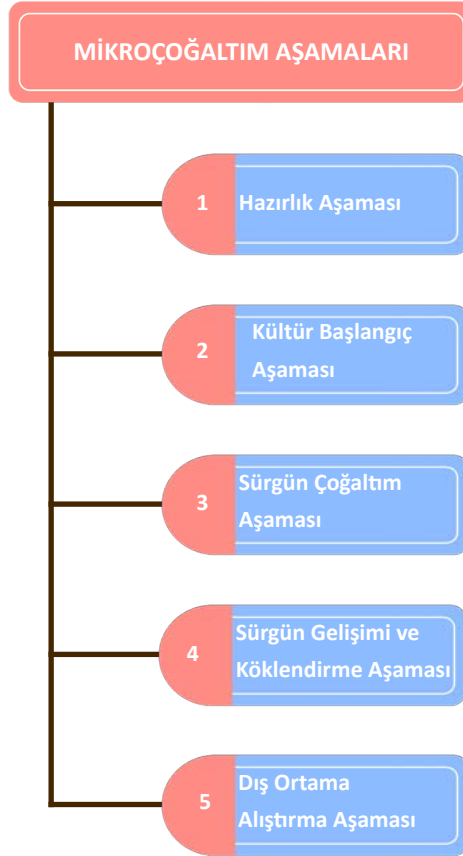
Mikroçoğaltım, bazı doku kültürü teknikleri kullanılarak yapılan bir çoğaltım olup kullanılan eksplantın özelliğine göre adlandırma yapılır. Örneğin kullanılan eksplant embriyo ise embriyo kültürü, meristem ise meristem kültürü olarak isimlendirilir.

Mikroçoğaltımın geleneksel yöntemlere göre avantajları:

- Hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi
- Kitlesel üretimdeki yararlılığı
- Üretilen bitkilerde homojenite (genotip ve fenotip benzerlik) sağlanması
- Kısa sürede ve daha az bir alanda çok sayıda bitki üretilmesi
- Klasik yöntemlerle üretilmesi zor olan türlerin daha kolay üretilmesi
- Seçilmiş veya üstün özelliklere sahip çeşitlerin daha hızlı üretilmesi
- Az anaç kullanılması
- Yıl boyunca anaç ve yeni bitki üretilmesi
- Yeni çeşitlerin elde edilebilmesi

2.5.1. Mikroçoğaltım Aşamaları

Mikroçoğaltım genel olarak beş aşamada gerçekleştirilir. Bu aşamalarda yapılacak uygulamalar mikroçoğaltımın başarısını etkiler. Eksplantın alındığı anaç bitkinin genotipi, sağlık durumu ve beslenme, bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulanması, ışık, sıcaklık gibi yetiştirme koşulları mikroçoğaltımda başarıyı etkileyen en önemli faktörlerdir. Mikroçoğaltım aşamaları Şema 2.2 'de verilmiştir.



Şema 2.2: Mikroçoğaltım aşamaları

2.5.1.1. Hazırlık Aşaması

Hazırlık aşaması anaç bitkilerin hijyenik koşullarda yetiştirilmesidir. Bu aşamada bakteriyel kontaminasyonu önlemek için anaç bitkiler kontrollü sera koşullarında yetiştirilmelidir. Ortamın en yüksek sıcaklığı 25 °C ve bağıl nemi en düşük %70 olmalıdır. Saksı toprağı steril edilmiş ortamda değiştirilmeli ve virüsleri yok etmek için toprağı sıcaklık uygulaması (36-37 °C) yapılmalıdır. Kontaminasyon riski nedeniyle bitkilere yağmurlama gibi üstten sulama yapılmamalıdır. Damlama sulama ya da ortamın nemlendirilmesiyle sulama yapılması daha uygundur.

Anaç bitkilerin fizyolojik durumlarını etkileyen en önemli faktörler ışık, sıcaklık ve hormonlardır. Yıl boyunca standart eksplant elde etmek için seradaki fotoperiyot kontrol edilmeli ve kullanılan anaca uygun koşullar sağlanmalıdır.

Mikroçoğaltımda başarıyı etkileyen bir başka faktör anaç bitkinin vejetatif gelişme evresinde olmasıdır. Bu nedenle anaç bitkide sürgün gelişiminin hızlı olduğu ve aktif büyümenin bulunduğu dönemler kültür için en uygun zamanlardır. Kültür başlangıç aşamasında eksplant rejenerasyonu; anaç bitkilere, eksplantın alındığı dokulara ya da direk olarak eksplantın kendisine belirli bir miktar hormon uygulanması ile kontrol edilebilir.

2.5.1.2. Kültür Başlangıç Aşaması

Eksplantların Seçimi: Mikroçoğaltımda eksplant olarak bitkiden farklı organlar seçilebilmektedir ancak genellikle tepe (apikal) ve koltukaltı (aksiller) tomurcuklar eksplant olarak kullanılmaktadır (Görsel 2.20). Sürgün ucundan alınan eksplant, yeni bir bitki oluşturabilme yeteneğini yitirmeyecek kadar küçük ancak virüsten arınmış olacak kadar büyük olmalıdır. Küçük sürgün ucu eksplantlar, düşük canlılık oranına ve başlangıçta yavaş gelişme özelliğine sahiptir. Terminal çelikler ve bütün hâldeki tomurcuklar 0,5-1 mm'lik sürgün uçlarına göre daha çok kontaminasyon riski taşımaktadır.



Görsel 2.20: Mikroçoğaltım için alınan eksplant

Mikroçoğaltımda eksplant seçiminde dikkat edilmesi gereken noktalar:

- Bitkilerin toprak üstü organları ve bitki içi parçaları daha az kontamine özelliktedir.
- Eksplant ne kadar küçük ise o kadar az kontaminasyon riski vardır.
- Eksplantın rejenerasyon yeteneğine, büyüklüğüne ve yaşına bağlı olarak değişir.
- Eksplant gelişme mevsiminin başlangıcında aktif büyüyen sürgünlerden alınmalıdır.
- Anaç bitkinin yaşı, yetiştirme koşullarındaki eksplantın büyüme ve gelişme başarısını etkiler.

Sterilizasyon: Sterilizasyon, anaç bitkinin yetiştiği ortama ve eksplantın alındığı organa göre değişiklik gösterse de kullanılacak eksplantların aseptik ortama konulmadan önce tam olarak sterilize edilmesi gerekir.

Sterilizasyon aşamaları:

1. Ön yıkama işleminde eksplant sadece musluk suyu ile yıkanır. Ancak gerekli ise eksplant önce az sabunlu su ile yıkanıp musluk suyu ile durulanır.
2. Ön yıkamadan sonra eksplant %70-95'lik etil alkol içerisinde birkaç saniye tutulur.
3. Steril kabin içerisinde eksplant birkaç damla deterjan içerisinde 10-30 dakika bekletilir. Daha sonra en az 3-4 defa steril su ile çalkalanarak durulanır.

Kullanılacak eksplantın özelliğine göre yukarıda belirtilen işlemlere ek uygulamalar gerekebildiği gibi dezenfektan maddenin cinsi, konsantrasyonu ve uygulama süresi de değişebilmektedir.

Başlangıç Ortamları: Genellikle her bitki için kullanılan besin ortamları, benzer maddeleri içerir. MS besin ortamı mikroçoğaltımda kullanılan çoğu bitki türü için hem kültür başlangıcında hem de sürgün çoğaltım aşamasında kullanılabilir. Ancak MS besin ortamındaki tuzların oranı bazı bitkiler için toksik olabilir. Bu durumdaki bitkiler için WPM gibi besin ortamları kullanılabilir.

Başlangıç besin ortamında bulunması gereken maddeler:

- İnorganik maddeler (makro ve mikro besin elementleri)
- Organik maddeler (myo-inositol, tiamin-HCl, adenin sülfat, pridoksin-hcl, nikotinic asit)
- Bitki büyüme düzenleyicileri (sitokininler, oksinler, giberellinler)
- Diğer maddeler (şeker, agar)

Besin ortamı bileşimindeki maddelerin konsantrasyonları, eksplant olarak kullanılacak bitkinin özelliğine ve yapılacak kültürün amacına göre değişmektedir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Başlangıç Ortamlarında Kullanılan Maddeler (Werbrouck ve Debergh, 1994)

Tuzlar	Murashige ve Skoon (MS) Woody Plant Medium (WPM) Lepoivre
Vitaminler	Thiamin-HCl (0,4 mg/l)
Myo-inositol	100 mg/l
Sakkaroz	%2 (a/h)
Katılaştırma maddesi	Agar (%0,6 a/h) Gelrite (%0,1 a/h)
pH	5,8
Bitki büyüme düzenleyicileri	Sitokininler: 0-10 mg/l düzeyinde 2-ip, BAP, Kinetin, Zea, TDZ (konsantrasyonlar aksiller ya da adventif tomurcuk oluşturma isteğine bağlıdır.) Oksinler: 0-1 mg/l düzeyinde aksiller tomurcuklar için IAA, adventif tomurcuklar için ise NAA veya IBA. Gibberellinler: 0-1 mg/l düzeyinde ve filtrasyon ile steril edilmiş GA ₃

Çevresel Faktörler: Kültür odasının ışık, sıcaklık ve nem durumu mikroçoğaltımda kullanılan bitki türünün isteğine göre kontrol altında tutulmalıdır. Birçok bitki türü için kültür odası sıcaklığının 18-28 °C arasında ve optimum 23 °C olması uygundur. Gece sıcaklığı ise bu sıcaklıktan 1-2 °C düşük olabilir. Işık kaynağı olarak çoğunlukla beyaz floresan lambalar kullanılır (Görsel 2.21). Genellikle 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık uygulaması çoğu bitki için uygundur. Kültür ortamının bağıl nemi %70'ten az olmamalıdır.



Görsel 2.21: Kültür ortamında beyaz floresan ışık

2.5.1.3. Sürgün Çoğaltım Aşaması

Besin Ortamı: Genellikle başlangıç için kullanılan besin ortamları çoğaltım aşamasında da kullanılmaktadır ancak kültürün amacına ve bitkinin özelliğine göre değişiklik yapılabilmektedir. Bitki dokularında organ farklılaşmasında sitokin ve oksinler etkili olmaktadır. Bu nedenle sitokin / oksin oranları önem taşımaktadır. Sitokin / oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu olumlu yönde etkiler (Görsel 2.22). Diğer yandan oksin / sitokin oranının yüksek olması ise kök oluşumunu artırır. Besin ortamında oksin ve sitokin oranlarının eşit olması durumunda ise kallus oluşumu hızlanmaktadır. Mikroçoğaltım uygulamasında besin ortamlarında BAP sıklıkla kullanılan sitokinidir. Genellikle 1-2 mg/l sitokin birçok bitki için yeterlidir. Bu miktardan daha fazla kullanılması durumunda adventif sürgün oluşumu artmaktadır. Besin ortamında NAA ve IBA en çok kullanılan oksinlerdir. Bu oksinleri sürgün çoğaltım aşamasında 0,1-1,0 mg/l kullanmak yeterlidir. Kallus oluşumunu artırdığından 2,4-D'nin kullanımından kaçınılmalıdır.



Görsel 2.22: Sürgün oluşumu

Kallus Oluşumu: Bir bitkinin çok hızlı çoğaltılması onun tek hücreden yeni bir bitki meydana getirme özelliğine bağlıdır. Kültüre alınan bitkilerin farklılaşması sürgün-kök oluşumu ile veya somatik embriyogenesis ile meydana gelir. Kallustan sürgün çoğaltılması en hızlı yöntemdir (Görsel 2.23) ancak başta hücreler stabil olmadığından bitkilerin klonlanmasında sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca dokunun başlangıçtaki yeni bitki oluşturma kapasitesi zamanla alt kültürlerde azalmakta hatta yok olmaktadır. Diğer yandan kallus evresini içeren sürgün çoğaltımı birçok bitki türü için uygulanamamaktadır.



Görsel 2.23: Kallus oluşumu

Adventif Tomurcuk Oluşumu: Yaprak, koltukaltı ya da sürgün tepelerinin dışında herhangi bir yerde oluşan tomurcuklar **adventif tomurcuk** olarak ifade edilir. Kalluslardan sürgün farklılaşması da adventif tomurcuk olarak değerlendirilir. Ancak bu tomurcuklar kallus evresine gerek kalmadan doğrudan bir organ veya organ parçasından da oluşabilmektedir. Birçok bitki in vivo şartlarda değişik organlardan adventif sürgün oluşturabilmektedir. Bitkilerin bu özelliklerinden yararlanılarak üretimleri yapılmaktadır.

Kültür koşullarında adventif tomurcuk gelişimi artırılabilir. Ayrıca vejetatif olarak çoğaltılmayan bitkilerde uygun konsantrasyondaki hormon kombinasyonları ile yaprak ve gövde çeliklerinden adventif tomurcuk oluşumu sağlanabilmektedir. Bitkilerin mikroçoğaltımında organlardan doğrudan adventif sürgün oluşumu kallus yönteminden daha iyi sonuç vermektedir.

Aksiller Tomurcuk Oluşumu: Aksiller tomurcuklar genellikle yaprak koltukaltılarında bulunur. Bu tomurcukların her biri sürgün oluşturma yeteneğine sahiptir. Aksiller tomurcuklar bitkilerin gelişme dönemlerine bağlı olarak dinlenme hâindedir. Uygun konsantrasyonda sitokin içeren besin ortamında aksiller dallanmayla sürgün çoğalması sağlanır. İn vitro şartlarda oluşan sürgünler, taze ortamlara aktarılarak aksiller dallanma ile sürgün çoğalması sürdürülebilir. Bu şekilde bir anaç bitkiden bir yıl içerisinde çok sayıda yeni bitki elde edilir.

Kallus ve adventif tomurcuk oluşumuna kıyasla aksiller dallanma ile sürgün oluşumu başlangıçta daha yavaştır. Ancak her alt kültürde sürgün sayısı giderek artar ve bir yıl içinde çok sayıda sürgün sağlanır. Bu yöntem üretilen bitkilerde genotip değişikliklerin çok az olması nedeniyle ticari olarak yaygın bir şekilde kullanılır.

2.5.1.4. Sürgün Gelişimi ve Köklendirme Aşaması

Sürgün gelişim ortamında bulunan sitokinin, köklenmeyi engeller. Elde edilen sürgünler mevcut sürgün geliştirme ortamından farklı hormonal kompozisyon içeren yeni bir besin ortamına aktarılır. Bu nedenle belirli bir uzunluğa erişen sürgünler köklendirme amacıyla köklendirme ortamına alınır (Görsel 2.24).

Bazı bitkilerde sürgünler standart köklenme tozları ya da IBA uygulandıktan sonra toprağa dikilerek köklendirilebilmektedir. Birçok bitki türünde köklendirmeyi desteklemek için besin ortamına 0,1-1 mg/l oranında NAA ya da IBA kullanılması uygundur. Bunun yanı sıra yüksek şeker konsantrasyonları da köklenmeyi ve bitki kalitesini artırmaktadır. Köklendirmede kullanılan başka bir yöntem de çift tabaka tekniği ile in vitro şartlardaki mevcut kültür üzerine sıvı besin ortamının dökülmesidir.



Görsel 2.24: Köklendirilmiş bitki

2.5.1.5. Dış Ortama Alıştırma Aşaması

Kültüre alınmış bitkiler; steril koşullarda, gerekli besin maddelerinin bulunduğu, düşük ışık yoğunluğu ve yüksek nem içeren bir ortamda geliştirilmektedir. Bu şekilde geliştirilen bitkilerin daha düşük nem, daha yüksek ışık düzeyine sahip ve aynı zamanda steril olmayan dış ortama aktarılması işlemi aşamalı olarak yapılmalıdır. Bu işleme bitkiler in vitro ortamdayken üstten soğutma ile kültür kaplarının üzerindeki nemin azaltılmasıyla başlanır. Besin ortamından çıkarılmadan önce bitkiler, serada kültür kaplarının içinde bir haftadan fazla olmamak üzere bir süre tutulur. Bitkiler serada kapların ağzı açık şekilde uzun süre bekletilirse kontaminasyon riski artar.

İn vitroda gelişen bitkilerin dış ortama aktarıldıktan sonraki birkaç gün içerisinde yüksek nem içeren bir ortamda tutulmaları bitkilerin yaşamaları için önem taşır. Yeni bitkilerin su kaybını azaltmak için ticari işletmeler otomatik çiseleme ya da sisleme kullanabilir ancak çiseleme bitkilerde mantar ve bakterilerin gelişimine yol açabilir. Bitkilerdeki su kaybını önlemede kullanılacak başka bir yöntem de nemlendirici kullanımı ve bitkilerin su buharını tutacak kapalı mekânlara yerleştirilmesidir (Görsel 2.25).



Görsel 2.25: Kapalı mekânda tutulan bitkiler

Dış ortama alıştırma sırasında kullanılan nem kaybını engelleyen bileşikler, fitotoksik etkilere sahip olduğundan birtakım sorunlara yol açabilmektedir. Bu nedenle agarlı besin ortamı iyice yıkanarak tamamen bitkilerden uzaklaştırılmalıdır. İn vitroda köklenmiş sürgünlerin aktarma işleminde yaralamalardan kaçınmak için özenli olunmalıdır. Kökler yeni oluşmaya başladığından sürgünler aynı çelik gibi doğrudan dikilmelidir. Kökler oluşmamış ise dikim öncesi köklenmeyi destekleyecek toz ya da solüsyona daldırmak köklendirmede etkili olmaktadır.

Bitkilerin dış ortama aktarılmasında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta yüksek nemdir. Bu nedenle ilk 10-15 gün bitkiler temiz bir plastik ile kaplanmalıdır. Bundan sonra aşamalı olarak plastiklerde küçük delikler açılarak hava sirkülasyonu sağlanmalıdır. Daha sonra bitkiler seradaki özel alanlara taşınarak birkaç gün gölgede tutulmalıdır. Ortalama 4-6 hafta süren bu çalışmalar sonunda bitkiler, normal sera koşullarında yetiştirilmeye hazır duruma gelir (Görsel 2.26).



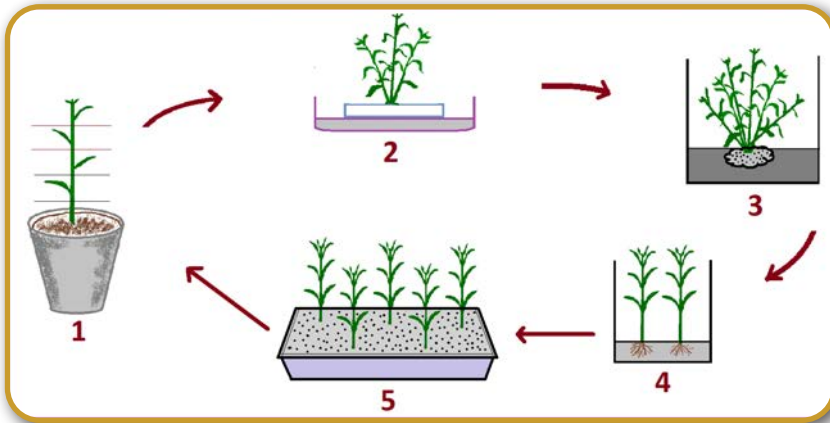
Görsel 2.26: Toprağa dikilmiş bitkiler

2.5.2. Mikroçoğaltım Uygulaması

Ana bitkiden alınan tek boğumlu gövde veya dal parçası, öncelikle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulur. Bunun için eksplant öncelikle musluk suyu ile yıkanır. Daha sonra %70-95'lik etil alkol içerisinde birkaç saniye tutulur. Bu işlemin ardından içerisinde birkaç damla deterjan bulunan su içerisinde 10-30 dakika bekletilir. Son olarak eksplant 3-4 defa steril su ile çalkalanarak durulanır. Yüzey sterilizasyonu yapılmış eksplant uygun besin ortamında kültüre alınır. Besin ortamına bitki büyüme düzenleyicileri eklenir. Kültürler yaklaşık 23 °C sıcaklıkta beyaz floresan ışık kullanılarak 16 saat aydınlık, 8 saat karanlıkta inkübasyona bırakılır. Bir süre sonra eksplant bir ya da birden fazla sürgün meydana getirir. Oluşan tekli sürgünler ayrılarak taze sürgün çoğaltım ortamına aktarılır. Burada 3-6 hafta içerisinde çok sayıda yeni sürgün elde edilir. Yeterli sayıda sürgün elde edilince sürgünlerin bir kısmı köklendirme ortamına konular, diğer kısmı ile çoğaltım işlemi devam ettirilebilir.

Köklendirme ortamında yeterli kök sistemi geliştikten sonra bitki saksı toprağına aktarılır. Burada ilk 10-15 gün yüksek nem altında tutulur. Böylece yeni bitkinin gelişmesi sağlanır. Gelişmesini tamamlayan ve dış ortama alıştıran bitkiler bahçe veya tarla koşullarına dikilir.

Görsel 2.27'de aksiller dalları kullanarak mikroçoğaltım aşamaları verilmiştir.



Görsel 2.27: Aksiller dalları kullanarak mikroçoğaltım

5. UYGULAYALIM
ÖĞRENELİM

MİKROÇOĞALTIM YAPMA



Bu çalışmanın amacı mikroçoğaltım yöntemini uygulamaktır. Bu doğrultuda sizden aşağıdaki işlem basamaklarını uygulayarak mikroçoğaltımla çok sayıda bitki üretmeniz beklenmektedir.

- Yaptığınız uygulamada iş sağlığı ve güvenliği kurallarına uyunuz.
- Cihaz kullanım talimatlarına uyunuz.

KULLANILACAK ARAÇ GEREÇ VE KİMYASALLAR

- Doku kültürü laboratuvar ortamı ve sera
- Büyüme kabini, otoklav vb.
- Sodyum hipoklorit çözeltisi (%0,5-10)
- Saksı
- Distile su
- Bisturi, pens vb.
- Cam malzemeler (petri kutusu, deney tüpü vb.)
- Etil alkol (%70-95)
- Besin ortamı
- Deterjan

İŞLEM BASAMAKLARI

1. Eksplantın alınacağı ana bitkiyi belirleyerek bitkiden tek boğumlu gövde veya dal parçası alınız.
• Eksplantı alırken dikkatli olunuz.
2. Bitki materyalini musluk suyu ile yıkayıp %70-95'lik etil alkol içerisinde birkaç saniye tutunuz.
• Eksplantı etil alkol içerisinde uzun süre tutmayınız.
3. Eksplantı birkaç damla deterjan bulunan su içerisinde 10-30 dakika bekletip süre sonunda 3-4 defa steril su ile çalkalayarak iyice durulayınız.
• Süreye uyunuz.
• Eksplantı iyice duruladığınızdan emin olunuz.
4. Yüzey sterilizasyonu yapılmış eksplantı uygun besin ortamına aktarıp bitki büyüme düzenleyicileri ekleyiniz.
• Bitki büyüme düzenleyicilerinin oranlarına dikkat ediniz.
5. Kültürleri yaklaşık 23 °C sıcaklıkta 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olacak şekilde inkübasyona bırakınız.
• Beyaz floresan ışık kullanınız.
• Belirli aralıklarla kültürleri kontrol ediniz.

6. Kültür ortamında oluşan tekli sürgünleri ayırarak taze sürgün çoğaltım ortamına aktarınız.

- Sürgünleri sürgün çoğaltım ortamına aseptik koşullarda aktarınız.

7. Sürgün çoğaltım ortamında yeterli sayıda sürgün elde edilince sürgünlerin bir kısmını köklendirme ortamına alınız.

- Sürgünleri aseptik koşullarda köklendirme ortamına aktarınız.
- Kalan sürgünlerle çoğaltım işlemini sürdürünüz.

8. Yeterli kök sistemi gelişen bitkileri saksı toprağına aktarıp dış koşullara alıştırınız.

- Bitkileri saksılara alırken zarar görmemesine dikkat ediniz.
- Bitkileri ilk 10-15 gün yüksek nem altında tutunuz.

9. Dış ortama alıştıran bitkileri bahçe veya tarla koşullarına dikiş.

- Bitkilerin dikimini yaparken dikkatli olunuz.

UYGULAMAYA İLİŞKİN DEĞERLENDİRME

Uygulamanız aşağıda verilen ölçütlere göre 100 puan üzerinden değerlendirilecektir.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	Çok İyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1. Mikroçoğaltıma alınacak eksplanta yüzey sterilizasyonunu yaptı.				
2. Eksplanti aseptik koşullarda besin ortamına aktarıp bitki büyüme düzenleyicileri ekledi.				
3. Kültürleri uygun yetiştirme koşullarında inkübasyona bıraktı.				
4. Sürgün çoğaltma ve köklendirme işlemlerini yaptı.				
5. Gelişen bitkileri uygun şekilde dış koşullara alıştırıp bahçe ortamına aldı.				
TOPLAM PUAN				

Değerlendirme formundan **en az** 70 puan aldıysanız bu uygulama için başarı düzeyiniz yeterli demektir. Eksik olduğunuz öğrenmeleri tekrar etmeniz önerilmektedir.



ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

A

Aşağıdaki cümlelerde boş bırakılan yerlere doğru sözcükleri yazınız.

1. Düzenli olmayan hücrelerin oluşturduğu yara dokusuna denir.
2. Hücre bölünmesi ve kallus oluşumunun uyarılması için besin ortamında ve sitokinin bulunmalıdır.
3. Meristem kültüründe kullanılan 1 mm'den büyük eksplantlar olarak ifade edilir.
4. Bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerin oluşturduğu dokulara denir.
5. Embriyo kültüründe hem ozmotik basıncı koruması hem de enerji kaynağı olması bakımından yaygın olarak kullanılır.
6. Yaprak koltukaltı ya da sürgün tepelerinin dışında oluşan tomurcukla olarak ifade edilir.

B

Aşağıdaki soruları okuyarak doğru olan seçeneği işaretleyiniz.

7. Aşağıdakilerden hangisi bitki doku kültürü tekniklerinden değildir?
 - A) Kallus kültürü
 - B) Kök kültürü
 - C) Meristem kültürü
 - D) Embriyo kültürü
 - E) Mikroçoğaltım
8. Aşağıdakilerden hangisi meristem kültüründe ihtiyaç duyulan kültür koşullarındandır?
 - A) %10 nem
 - B) 8 saat aydınlık
 - C) 16 saat karanlık
 - D) 1000 lüks aydınlatma
 - E) 25 °C sıcaklık

9. Mikroçoğaltımın hazırlık aşamasında ortamın bağıl nemi en az yüzde kaç olmalıdır?

- A) 70
- B) 60
- C) 50
- D) 40
- E) 30

10. Aşağıdakilerden hangisi mikroçoğaltımın avantajları arasında yer almaz?

- A) Yeni çeşitlerin elde edilmesi
- B) Az anaç kullanılması
- C) Mevsimden bağımsız olması
- D) Fenotip farklılıklar sağlaması
- E) Hastalısız bitkiler üretilmesi

11. Mikroçoğaltımda eksplant seçimi için aşağıdakilerden hangisi doğrudur?

- A) Eksplantlar büyük seçilmelidir.
- B) Bitkilerin dış parçaları eksplant olarak seçilmelidir.
- C) Anaç bitkinin yaşı genç olmalıdır.
- D) Herhangi bir mevsimde eksplant seçilebilir.
- E) Sadece aksiller tomurcuk seçilmelidir.

C

Aşağıda verilen soruları yanıtlayınız.

12. Mikroçoğaltım aşamalarını kısaca açıklayarak yazınız.

13. Aksiller tomurcuk oluşumunun diğer tekniklere göre avantajları nelerdir?

SÖZLÜK

A

- adventif** : 1. Kallustan sürgün ve kök çıkması veya zigottan başka bir kaynaktan embriyo oluşması gibi doğal yerinden başka yerde gelişme. 2. Hücre kültürlerini bulaştıran etkenler.
- anter** : Bitkilerde erkek organın başcığı, çiçek tozu keseleri, polenlerin oluştuğı bölüm.
- aseptik** : Her türlü mikroptan arınmış.
- aseksüel** : Üreme için erkek ve dişi gamete gerek göstermeyen, döllenmeksizin üreyen.

B-C-Ç

- biyokimyasal** : Biyokimya ile ilgili.
- çeper** : Zar.

D-E-F

- doku** : Bitki ve hayvan organlarını meydana getiren, aynı görevi yapmak üzere bir arada bulunan, ortak yapı ve işleve sahip hücreler grubunun oluşturdukları yapı.
- embriyonik** : Embriyo ile ilgili.
- fitotoksik** : Bitkilerin büyümesini önleyen ve toksik etki gösteren madde.
- fizyolojik** : Organizmanın normal çalışması ile ilgili.
- floem** : 1. Bitkilerde besin iletilmesi ve depolanmasında rol oynayan kalburlu hücreler ile kalburlu boru element-lerinden oluşan, destek görevi gören doku. 2. Soymuk boruları.
- fotoperiyot** : 1. Gün ışığına maruz kalma süresi. 2. Bir organizmanın ideal faaliyeti için gerekli günlük süre.

G-Ğ-H

- generatif üretim** : Dişi ve erkek eşey hücrelerinin birleşmesi sonucu tohum oluşması ve yeni bir bireyin ortaya çıkması, eşeyli üretim.
- genotip** : 1. Bir bireyin sahip olduğu genler toplamı veya aynı genetik yapıyı paylaşan tüm bireyler topluluğı. 2. Bir organizmanın genetik yapısı.
- haploid** : Homolog kromozom çiftlerinden yalnızca birer tanesine sahip birey veya hücre.
- hibrit** : 1. İki farklı türün çaprazlanması ile elde edilen bitki veya hayvan. 2. Melez.

hormon : 1. İç salgı bezlerinden kana geçen ve organların işlemlerini düzenleyen adrenalin, insülin, tiroksin vb. fizyolojik etkisi olan maddelerin genel adı. 2. Bu maddelerin işlevini yerine getirecek özellikte yapay madde.

hücre : Organizmanın canlılığını kendi başına sürdürebilen, bölünüp çoğalabilen ve dışarıdan aldığı maddeleri özümleyebilen en küçük canlı birimi.

I-İ-J

inkübasyon : Canlı doku parçasının besin ortamında geliştirilmesi, kuluçka.

inorganik : Organik olmayan, yapısında karbon içermeyen, cansız, anorganik.

K-L

kambiyum : Bitkilerin iletim demetlerinde, bir ya da birkaç sıra meristematik hücre tabakasından oluşan, ikincil kalınlaşmayı ve enine büyümeyi sağlayan doku.

klasik : 1. Alışılmış. 2. Üzerinden çok zaman geçtiği hâlde değerini yitirmeyen, türünde örnek olarak görülen eser.

klon : Eşeysiz üremeyle bir hücreden veya organizmadan çoğaltılan, genetik olarak birbirinin aynı olan hücre veya canlı grubu.

kontaminasyon : Bulaşma.

konveks : Dışbükey.

kromozom : Her organizmada belirli sayıda bulunan, hücre çekirdeğinde DNA iplikçığı içeren, RNA ve histonlarla birlikte bulunan, kalıtsal bilgiyi bir sonraki nesle aktaran yapı.

ksilem : 1. Yüksek bitkilerde su ve minerallerin iletilmesinde rol oynayan trake ve trakeitlerden oluşan doku. 2. Odun boruları.

M-N

maruz kalma : Fiziksel veya kimyasal bir etmenin değişik yollardan farklı düzeylerde vücuda girmesi.

materyal : Gereç, madde.

metabolizma : Canlı organizmada veya canlı hücrelerde hareketi, enerjiyi sağlamak için oluşan, biyolojik ve kimyasal değişimlerin bütünü.

mikroorganizma : Bakteri, mantar, protozoa ve mikroskobik algleri içeren, mikroskobik canlılar.

mineral madde : Normal sıcaklıkta doğada katı durumda bir takım maddelerle karışık veya birleşik olarak bulunan veya kimyasal yollarla elde edilen inorganik madde.

O-Ö

- organ** : 1. Canlı bir vücudun, belirli bir görev yapan ve sınırları kesin olarak belirlenmiş bölümü, uzuv, örge. 2. Bir görevi, bir işi yerine getirmekle yükümlü kuruluş.
- organik** : 1. Canlı organizmadan elde edilen, yapısında karbon içeren. 2. Organlardan oluşmuş yapı gösteren.

P-S-Ş

- patojen** : Hastalık yapan herhangi bir madde veya mikroorganizma.
- perlit** : Erimiş sodyum, potasyum, alüminyum silikattan ibaret olan cam gibi bir volkanik kayadan patlatılarak pudra hâline getirilmiş bulunan, hazır siva, hafif levha yapımında, izolasyon işinde, yem maddelerinin preslenmesinde kullanılan yardımcı bir madde.
- polen** : 1. Tohumlu bitkilerde üreme organı olan stamenlerde mayoz bölünme ile meydana gelen erkek üreme hücreleri; çiçek tozu. 2. Mikrospor.
- sitoloji** : Hücre bilimi.
- solüsyon** : Çözelti.
- somatik** : Vücut yapısıyla ilgili.
- süspansiyon** : 1. Çok küçük zerrele ayrılmış olan katı parçacıkların bir sıvı içerisindeki dağılımı. 2. Suda erimeyen maddeleri içeren preparat.

T-U-Ü

- toksik** : 1. Sağlığa zararlı 2. Zehirli. 3. Toksik maddeye bağlı olan.
- torf** : Su birikmesi sonucu havasızlıktan çürüyen bitki.

V-Y-Z

- varyabilite** : Değişiklik gösterme niteliği, değişkenlik.
- varyasyon** : 1. Ortak atalara sahip canlıların gösterdiği farklılık, değişim. 2. Değişik biçim, varyete.
- vejetasyon** : Herhangi bir yörede, ayırt edici yapısal özellikleri nedeniyle ayrıca adlandırılacak bitki toplulukları.
- vejetatif üretim** : Bitki parçalarından yararlanılarak üretim yapılması işlemi, eşeysiz üretim.
- viyol** : Atık malzemedен yapılmış özel kap.

KAYNAKÇA

- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (2002). Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları. 2. Baskı Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Gönülşen, N. (1987). T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Bitki Doku Kültürleri, Yöntemleri ve Uygulama Alanları. İzmir.
- Er, C. ve Canpolat, N. (1992). T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Bitki Islahında Doku Kültürleri. Ankara: Ankara Üniversitesi.
- Türkeç, A. ve Turan, Z. M. (1992). Doku Kültür Yöntemleri ve Bitki Islahında Kullanım Olanakları. Uludağ Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi, Sayı: 9, 237-246.
- T.C. Millî Eğitim Bakanlığı, Meslekî ve Teknik Eğitim Genel Müdürlüğü. (2020). Laboratuvar Hizmetleri Alanı, Bitki Doku Kültürü İle Çoğaltma Dersi, ÇÖP ve Ders Bilgi Formu. Ankara: MEB.
- TDK. (2012). Yazım Kılavuzu. Ankara: Türk Dil Kurumu Yayınları.
- TDK. (2017, Haziran 09). Sözlük. TDK: <http://www.tdk.gov.tr>.

GENEL AĞ VE GÖRSEL KAYNAKÇASI

Aşağıdaki kod aracılığı ile genel ağ kaynakçası ve görsel kaynakçaya ulaşabilirsiniz.



<http://kitap.eba.gov.tr/karekod/Kaynak.php?KOD=2870>

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME CEVAP ANAHTARI

1. ÖĞRENME BİRİMİ

A Bölümü Cevapları

1. eksplant
2. bitki doku kültürü
3. ön hazırlık
4. in vitro
5. materyal sterilizasyonu
6. üç

B Bölümü Cevapları

7. C
8. D
9. A
10. C
11. B
12. A
13. E

2. ÖĞRENME BİRİMİ

A Bölümü Cevapları

1. kallus
2. oksin
3. sürgün ucu
4. meristem doku
5. sakkaroz
6. adventif tomurcuk

B Bölümü Cevapları

7. B
8. E
9. A
10. D
11. C