

Bitki hücre, doku ve organ kültüründe ana parametreler

1. Besiyeri

2. Eksplant

3. Kültür çevresi

Bu faktörlerle oynayarak büyüme ve gelişmeyi etkileyebiliriz.

1. Besiyeri

- I. İnorganik tuzlar/mineraller
 - A. Bileşim, ana mikro- ve makroelementler*
 - B. Miktar ve biçim
 - C. optimizasyon
- II. Organik bileşenler
 - A. Karbon kaynağı
 - B. Büyüme düzenleyicileri
 - C. Vitaminler
 - D. Heksitoller
 - E. Diğerleri
- III. Doğal kompleksler
- IV. Fiziksel taşıma maddeleri
- V. Besiyeri hazırlığı

Esansiyel elementler

Makroelementler- C, H, O, P, K, N, S, Ca, Mg

Mikroelementler Fe, Mn, Zn, Cu, B, Cl, Mo

Na, Se ve Si bazı bitkiler için esas elementtirler.

- B. Miktar ve biçim - (White's vs MS),
form (N, Gautheret (NO_3^-) vs MS (NO_3^- & NH_4^+))**
- C. Optimizasyon - pH, stabilite, fizyoloji**

- i. Nitrogen formu - e.g. NH_4^+ organogenezi stimule eder ve NO_3^- embryogenezi, pH ve kök oluşumu etkilenir (NH_4^+ - pH↓, NO_3^- - pH↑)
- ii. Demir stabilitesi – kelatlar daha stabil
- iii. K^+ absorpsiyonu - Na^+ ile inhibe olur ve uyaran Ca^{2+}

Miktar

Table 1. *Macronutrient composition of some plant tissue culture media.*

Medium	Element (Concentrations in millimoles per liter of medium)								
	N	K	Ca	Mg	S	P	Cl	Na	Fe
White (1943) ¹	3.2	1.7	1.2	3.0	4.4	0.14	0.9	3.0	0.013
Gautheret ¹	5.5	2.2	2.1	0.5	0.5	0.9	—	—	0.125
Hildebrandt <i>et al.</i> ¹ (Tobacco)	4.2	1.7	1.7	0.7	6.4	0.24	0.9	11.7	0.143
Hildebrandt <i>et al.</i> ¹ (Sunflower)	8.4	3.3	3.4	2.9	3.6	1.0	1.8	1.7	0.018
Burkholder & Nickell ¹ ..	8.0	12.0	6.0	2.0	1.0	8.0	10.0	—	0.009
Heller ¹ .. →	7.1	10.0	0.51	1.0	1.0	0.9	11.0	8.0	0.004
Nitsch & Nitsch ² ..	19.8	39.9	0.23	1.8	1.0	1.8	0.5	1.8	—
Basal Medium	12.0	1.76	0.61	0.29	0.32	0.092	0.87	0.1	0.053
1 × Level	(169)	(68.8)	(24.4)	(7.10)	(10.6)	(2.85)	(30.9)	(2.3)	(2.94)
Revised	60.0	20.0	3.0	1.5	1.6	1.25	6.0	0.2	0.100
Medium	(840)	(782)	(121)	(36.8)	(52.3)	(39.0)	(212)	(4.6)	(5.57)

¹ Data from Heller's compilation (1953). ² Data from Nitsch and Nitsch (1956). Data in parenthesis are mg/l of medium.

Miktar

Table 2. *Micronutrient compositions of plant tissue culture media.*

Medium	Element (Concentrations in micromoles per liter of medium)										
	B	Mn	Zn	I	Cu	Mo	Co	Ni	Te	Be	Al
White (1943) ¹	25	30	10	4.5	—	—	—	—	—	—	—
Gautheret ¹	0.4	4.5	0.2	1.5	0.1	—	0.1	1.0	1.0	0.3	—
Hildebrandt <i>et al.</i> (Tobacco)	6	20	2.2	8	—	—	—	—	—	—	—
Hildebrandt <i>et al.</i> (Sunflower)	50	20	1.0	2.2	—	—	—	—	—	—	—
Burkholder & Nickell ¹	10	2	4.6	—	1.6	1.0	—	—	—	—	—
Heller ¹	16	4.5	3.5	0.06	0.12	—	—	0.13	—	—	0.23
Nitsch & Nitsch ²	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Basal Medium	26	29	9.4	4.5	—	—	—	—	—	—	—
1 × Level	(0.28)	(1.60)	(0.62)	(0.58)	—	—	—	—	—	—	—
Revised	100	100	30	5.0	0.10	1.0	0.10	—	—	—	—
Medium	(1.08)	(5.50)	(1.92)	(0.64)	(0.0064)	(0.096)	(0.006)	—	—	—	—

¹ Data from Heller's compilation (1953). ² Data from Nitsch and Nitsch (1956).

Concentration in mg/l is illustrated in parenthesis.

Physiol. Plant. 15:473-497 (1962).

II. Organik Bileşenler

A. Karbon kaynağı - **Sukroz, veya glukoz + fruktoz -**
20 to 60 g/L

Galactoz ve riboz -

Fotoautotrofik hücreler - 1-2% CO₂ (100 μE m⁻² S⁻¹ vs 25 μE m² S⁻¹),

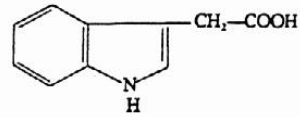
II. Organik Bileşikler

B. Büyüme düzenleyicileri - oksin (Hücre uzaması ve genişlemesi) ve sitokinin (hücre bölünmesi).

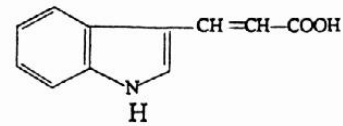
1. Oksinler – IAA, (Doğal oksinler) **IBA** (indol türevi) - 0.1 ve 10.0 mg/L (etkin konsantrasyonlar)

ve 2,4-D, Dikamba, Pikloram (fenolic oksinler , herbisidler) ve NAA (naftalene asetik asit) - 0.001 to 10.0 mg/L,

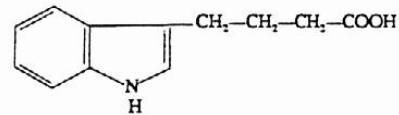
Nisbi aktivite - 2,4-D > NAA > IBA > IAA;



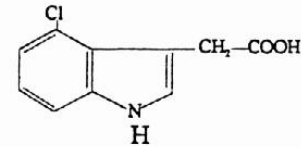
Indolyl-3-acetic acid (IAA)
(0.1 - 10.0 mg/L)



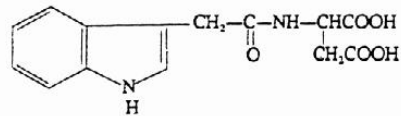
Indolyl-3-acrylic acid (IAcRA)



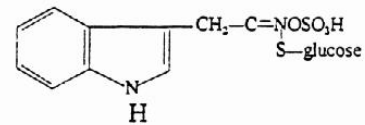
Indolyl-3-butyric acid (IBA)
(0.1 - 10.0 mg/L)



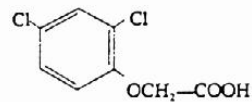
4-Cl-indolyl-3-acetic acid (4-Cl-IAA)



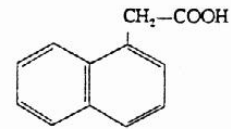
Indolyl-3-acetylaspartate



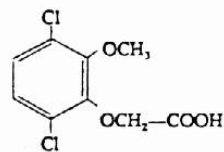
Glucobrassicin



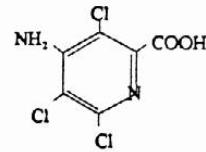
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
(0.001 - 10)



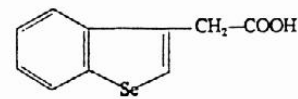
1-Naphthaleneacetic acid (NAA)
(0.001 - 10.0)



Dicamba
(0.001 - 10.0)



Pichloram



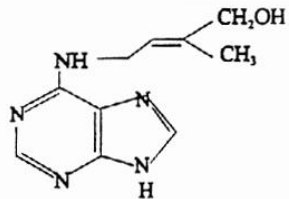
Benzo(b)selenienyl-3 acetic acid
(BSAA)

2. Sitokininler - adenine - 0.03 to 30.0 mg/L

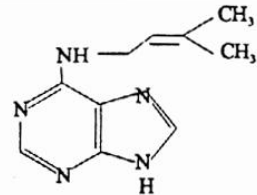
a. adenine türevi sitokininler- zeatin, 2iP, kinetin ve benziladenin.

b. fenilurea türevi cytokinins – thidiazuron, difenilurea

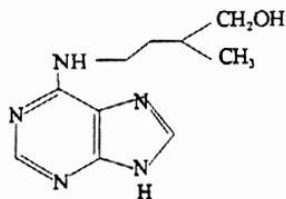
nisbi aktivite - zeatin>2-iP/fenilurea>BA>kinetin



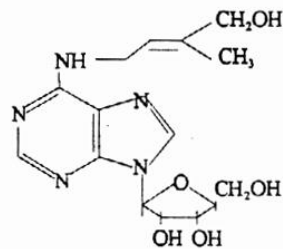
trans-Zeatin



2-iP
N⁶-(2-isopentyl)adenine

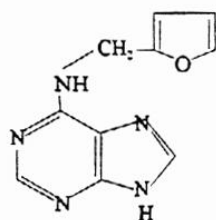


dihydro-Zeatin

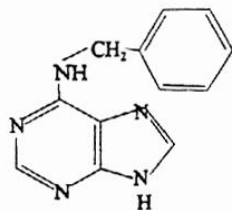


Zeatin riboside

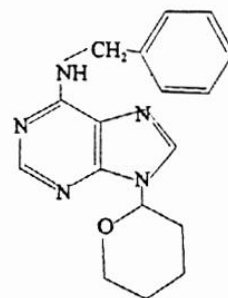
0.03 to 30.0 mg/L



Kinetin
6-furfurylaminopurine



BA
6-benzylaminopurine
or benzyladenine

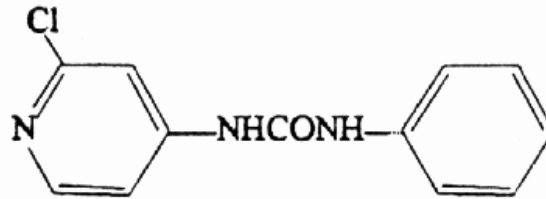


PBA
6-(benzylamino)-9-(2-tetrahydropyranyl)-9H-purine

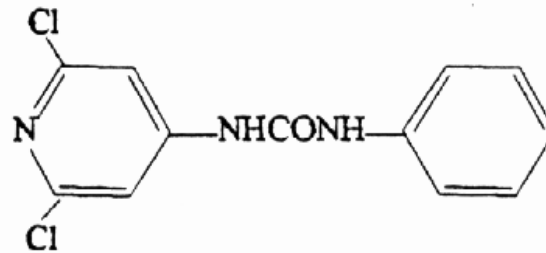
FIG. 2. Some natural and synthetic cytokinins.



1,3-diphenylurea



2 Cl-4PU or PPU
N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea



2,6 Cl-4PU
N-(2,6-dichloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea



Thidiazuron (TDZ)
N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea

Fenilurea

3. Gibberellinler - 0.01 to 1.0 mg/L, GA₃, gibberellinler₄₋₇

C. Vitaminler –

1. Thiamine-HCl - 0.1 to 1.0 mg/L

2. Diğerleri- nikotinik asid, pridoksin-HCl

D. Amino asidler/amidler - 100 mg/L

Tirosin – gövde oluşumu

Glutamin/asparagin/prolin – tahıl embiryogenesi

Serin – kök kültürleri

E. Heksitoller - 10 to 100 mg/L

myo-inositol -

Sorbitol/mannitol - osmotic stabilizer

F. Diğerleri

Purinler/pirimidinler - 50 mg/L

Organik asidler (antioksidantlar) - 50 mg/L

Tamponlar (pH)

Adsorbantlar (PVP, charcoal) - .03 to 1.0%

III. Natural Kompleksler (100 to 20000 mg/L)

Hindistancevizi endospermi

Protein hidrolizatları

Meyve ekstraları

IV. Fiziksel Destek Maddeleri

A. Jell maddeleri - (2 to 12 g/L) – agar

B. Structural destek - Filtre kağıdı vb.,

- Agar : Ortamın sertleştirilmesi için kullanılır toz halindedir. Doğu Asya deniz alglerinden elde edilen polisakkarittir.
- Ortam asitliği(PH):5,5-6 arasında değişir.
- Su olarak deiyonize, destile steril su kullanılır.

Besiyeri hazırlığı

A. deionize distile su

B. pH - pH 5.0 - 6.0

D. Sterilizasyon

- 1. Isı sterilizasyonu** - 121 C, 15 lbs/in², 15 - 20 dak
Considerations:
- 2. Filtre sterilizasyonu** - 0.22 or 0.45 μm mesh membranlar, antibiotics
- 3. Radiosterilizasyon** - gamma irradiationu
- 4. Gaz sterilizasyonu** - ethylene oksid

2. Eksplant hazırlığı

Eksplant -

I. Mikroplardan arındırma

A. Yüzey sterilizasyonu -

B. İçsel dekontaminasyon -

II. Asepsis: (0.3 μm HEPA filters)

Bitkilerde sterilizasyon için kullanılan maddeler

<u>Madde</u>	Konsantrasyon	<u>Fitotoksisite</u>	<u>Zaman (dak)</u>
Na hipoklorit	0.25-1%	İlımlı	5-20
Ca hipoklorit	9-10%	İlımlı	5-20
H ₂ O ₂	3-10%	Yüksek	5-20
Alkol (etanol veya isopropanol)	70%	Yüksek	<30 san.

2. Eksplant hazırlığı

Eksplant – Kültüre alınacak kısım

- I. Mikroplardan arındırma
 - A. Yüzey sterilizasyonu
 - B. İçsel sterilizasyon -
- II. Laminar Flow - (0.3 μm HEPA filtreler)

3. Kültür çevresi

I. Isı –

A. - 22-28°C

B. Günlük

C. Mevsimsel

II. Işık

A. Kalite -

B. Şiddet - 1000 lux veya 20 $\mu\text{E m}^{-1}\text{s}^{-2}$

C. Fotoperiod - 16 saat/gündüz

III. Nem

IV. Atmosferik gazlar

Doku Kùltürü

- Küçük hücre,doku veya organ parçalarını veya organları bitkilerden ayıran ve aseptik koşullar altında sentetik beslenme ortamlarında (besiyeri) kùltüre alan bir üretme tekniğidir.



Doku Kültürü

Genel Fidan Üretimi



Generatif üretim

Vejetatif üretim



*Heterovejetatif üretim
(Aşı)*

Autovejetatif üretim





*Mikrovejetatif üretim
(Doku kültürü, invitro)*

*Makrovejetatif üretim
(Çelik)*

Doku kültürü ile üretme çeşitleri

- Kallus kültürü
- Hücre (süspansiyon) kültürü
- Embriyo kültürü
- Protoplast kültürü(Zarsız hücre):
- Organ kültürü(Tomurcuk, yaprak, kök ucu, anter, vb):

En çok kullanılan besiyerleri

- Murashige ve Skoog  (MS)
- Llyod ve McCrown  WPM
(Woody Plant Medium)

Doku Kültürü

- MS ve WPM Ortamlarının Hazırlanmasında Kullanılan Stok Eriyikler

MS		WPM	
Besin Maddeleri	Miktarı (mg/l)	Besin Maddeleri	Miktarı (mg/l)
MAKRO STOK		MAKRO STOK I	
NH ₄ NO ₃	16500	NH ₄ NO ₃	4000
KNO ₃	19000	Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	5560
CaCl ₂	3320	KH ₂ PO ₄	1700
MgSO ₄	1800	MgSO ₄	1800
KH ₂ PO ₄	1700		
		MAKRO STOK II	
MİKRO STOK		H ₂ SO ₄	9900
H ₃ BO ₃	620		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2230	MİKRO STOK III	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	860	H ₃ PO ₃	620
KI	83	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	25
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	25		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.5	MİKRO STOK IV	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.5	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2240
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	860
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	25

Doku Kùltürü

– MS Vitamin Stok ve NaFeEDTA İçeriđi

<i>MS Vitamin Stok</i>	<i>Miktarı (mg/l)</i>	<i>NaFe EDTA Stok</i>	<i>Miktarı (mg/l)</i>
Nicotinic Asit	50	NaFe EDTA	390
Pyridoxin HCl	50		
Thiamine HCl	10		
Glycine	200		

D. Sterilizasyon

- 1. Isı sterilizasyonu** - 121 C, 15 lbs/in², 15 - 20 dak
- 2. Filtre sterilizasyonu** - 0.22 or 0.45 μm mesh membranlar,
antibiotics
- 3. Radiosterilizasyon** - gamma irradiationu
- 4. Gaz sterilizasyonu** - ethylene oksid

Eksplant hazırlığı

Eksplant -

- I. Mikroorganizmalardan arındırma
 - A. Yüzey sterilizasyonu -
 - B. İçsel dekontaminasyon -
- II. Asepsis: (0.3 μm HEPA filters)

Bitkilerde sterilizasyon için kullanılan maddeler

<u>Madde</u>	Konsantrasyon	<u>Fitotoksisite</u>	<u>Zaman (dak)</u>
Na hipoklorit	0.25-1%	İlımlı	5-20
Ca hipoklorit	9-10%	İlımlı	5-20
H ₂ O ₂	3-10%	Yüksek	5-20
Alkol (etanol veya isopropanol)	70%	Yüksek	<30 san.

Doku kültüründe sterilizasyon çok önemlidir. Steril çalışılmazsa bakteri ve mantar tüm emekleri yok edebilir.

- A-Yüzeysel sterilizasyon
- B-Besiyeri sterilizasyonu:

Doku Kültürü

- **A-Yüzeysel sterilizasyon (Materyal sterilizasyonu)**

Kültüre alınan materyalin sterilizasyonudur. Materyalin yüzeyinde mantar sporları ve bakteriler olabilir. Bunları öldürmek için sterilizasyon yapılır.

Eksplantlar kış sonunda veya erken ilkbaharda alınır bu enfeksiyonlar en az düzeyde olmaktadır. Önce küçük dal parçaları bol su ile yıkanır. Yüzeysel sterilizasyonda %3'lük NaHCl(Çamaşır suyu) %70'lik alkol (etanol) ve saf steril su kullanılmaktadır.

- Eksplant: Kültüre alınan doku parçalarına denir.

Doku Kùltürü

Çeşme suyu



%3 Na HCl



%70 alkol



steril saf su

Yüzeysel sterilizasyon

- **B-Besiyeri sterilizasyonu**

Besiyerlerin sterilizasyonu için otoklav kullanılır.

Besiyer 121°C, 1,1 atm basınç altında 15-20 dakika tutulur.

3. Kültür çevresi

I. Isı –

A. - 22-28°C

B. Günlük

C. Mevsimsel

II. Işık

A. Kalite -

B. Şiddet - 1000 lux veya 20 $\mu\text{E m}^{-1}\text{s}^{-2}$

C. Fotoperiod - 16 saat/gündüz

III. Nem

IV. Atmosferik gazlar

Kültür koşulları:

- Işık: 500-1000 lüks 16 saat
- Genel olarak $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ optimaldir.
- Nem: Doyma noktasına gelmeyecek kadar nem olmalıdır. Fazla olursa çürüme, az olursa kuruma olur.

Laboratuvar organizasyonu:

- **Ön hazırlık odası:** Besiyerlerin hazırlandığı, kültüre alınacak materyalin kabaca temizlenip steril edilecek duruma getirildiği, kullanılan kap ve malzemenin yıkanıp temizlendiği odadır.

- **Kültür hazırlama odası:** Kültürün yapılacak olduğu odadır. Temiz ve hava akımının olmadığı bir yer olması gerekir. Bu odalar tamamen bağımsız, steril odalardır.



- **Kültür geliştirme** : Çoğu bitki kültürleri sabit sıcaklık ve ışığı olan bir ortamda daha iyi gelişmektedir. Termostat yardımıyla sıcaklık ayarlanır. Işılandırma floresan lambalarla gerçekleştirilir.



Doku Kùltürü ile Üretmenin Yararları:

- Kısa sürede üretim
- Vejetasyon süresine bađlı deđil
- Çiçeklenmeye bađlı deđil
- Plaiçrotop büyüme engellenir.
- Mutant elde edilebilir
- Poliploid elde edilebilir
- Gen konservasyonu yapılabilir

Doku Kùltürü

- Çelikle üretilmesi zor olan türler bu yolla üretilebilir
- Az alana ihtiyaç vardır
- Gen transferi yapılabilir
- Vejetatif melezleme yapılabilir
- Yaşlı ağaçlardan elde edilen materyalin yeniden gençleştirme olanağı vardır.
- Virüssüz bitki üretilebilir
- Çeşitli zararlılara karşı dirençli bitki üretilebilir

Doku Kùltürü

Doku Kùltürü ile Üretmenin Sakıncalı Yanları:

- Az materyal kullanıldığı zaman gen fakirliğine yol açar. Bunu engellemek için çok sayıda ağaçtan yaralanmak gerekir.
- Pahalı bir yöntemdir.

