6. EMBRİYO KÜLTÜRÜ

Yüksek bitkilerin tohumlarından ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek belli ortamlarda kültüre alınması embriyo kültürü olarak tanımlanmaktadır. Bitki embriyoralının kültürü ile ilgili ilk çalışma, Hanning (1904) tarafından olgun embriyoların (2 mm) mineral tuz ve şeker içeren basit bir ortamda kültüre alınması ve bitkicik geliştirmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra çok değişik bitki türlerinin embriyoları kontrollü koşullarda geliştirilmiştir.Bu çalışmalarda embriyoların besin ihtiyaçları, büyüme ve farklılaşmaları vb. konular incelenmiş ve embriyo kültürüne ilişkin bazı metotlar ortaya konulmuştur.

İki tip embriyo kültürü bulunmaktadır:

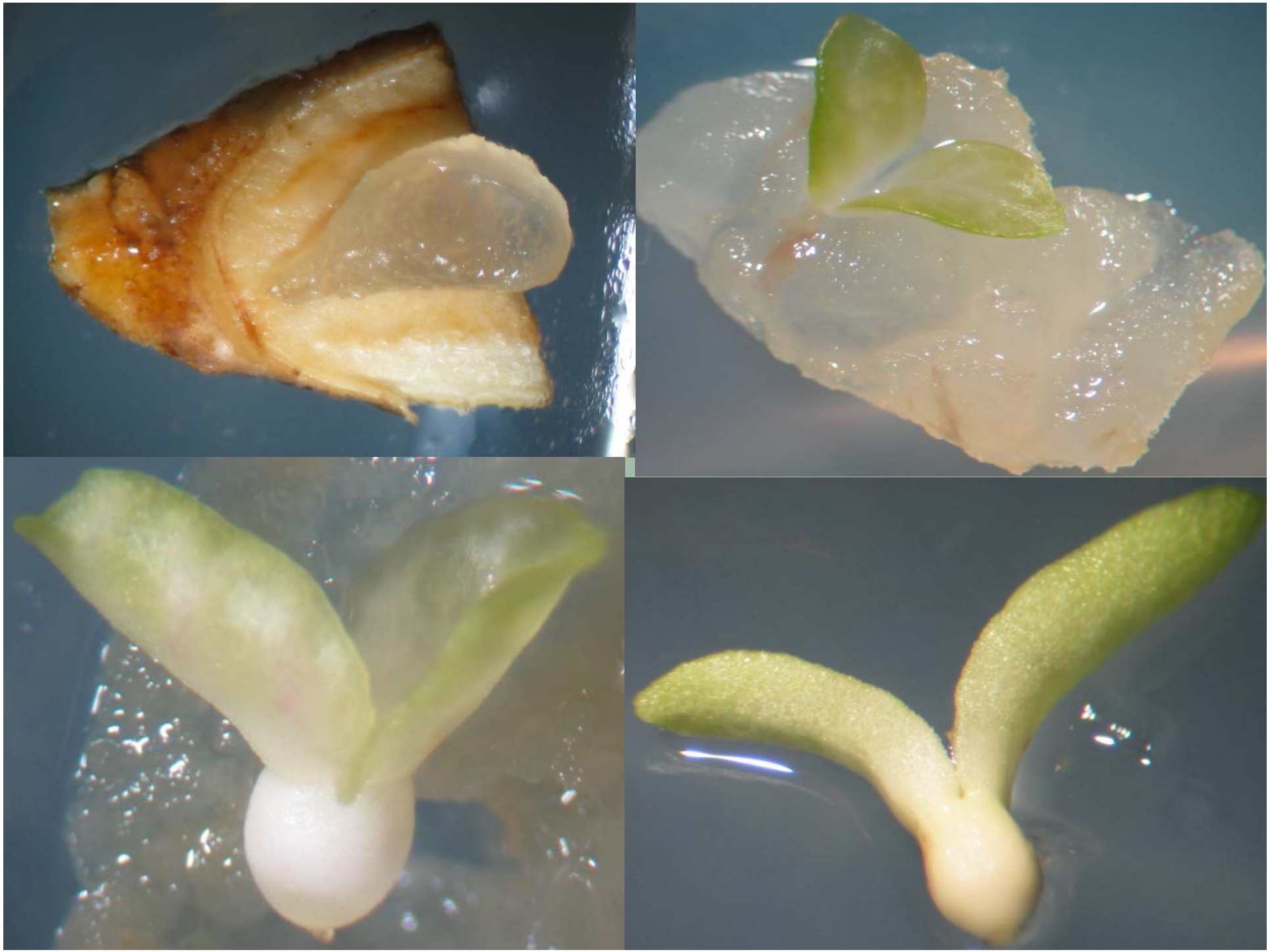
1.Olgun tohum embriyolarının kültürü: Bu kültür oldukça kolaydır ve basit bir kültür ortamı ile başarılı sonuç alınmaktadır. Böylece embriyonik büyümeyi incelemek ve büyüme dönemlerini ortaya koymak, dormansi ve çimlenmenin metabolik ve biyokimyasal ayrıntılarını analiz etmek mümkün olmaktadır.

2.Olgunlaşmamış erken bölünme fazındaki proembriyoların kültürü: Bu tip kültür erken embriyo dönemlerinden itibaren embriyoların besin ihtiyaçlarının ortaya konulmasını ve faklılaşmasını sağlamaktadır. Embriyoların izolasyonu oldukça zor bir iştir bu nedenle güç olan bir kültür yöntemidir. Embriyo kültürünün zor olması nedeniyle embriyo kültürüne bir alternatif olarak tozlaşmış yumurtalık (ovaryum) kültürü ve olgunlaşmamış tohum taslağı (ovül) kültürü de denilmektedir. Embriyo kültüründe, gelişen tohumdan veya tohum taslağından olgun döneme yakın bir dönemdeki embriyolar izole edilirse bu embriyolar ototrofiktir ve enerji kaynağı içeren basit bir inorganik ortamda gelişebilir. Olgunlaşmamış embriyoları kültüre almada ise onların büyüme ve gelişmesine destek olabilecek bir kültür ortamı belirlemek çok önemli olmaktadır.

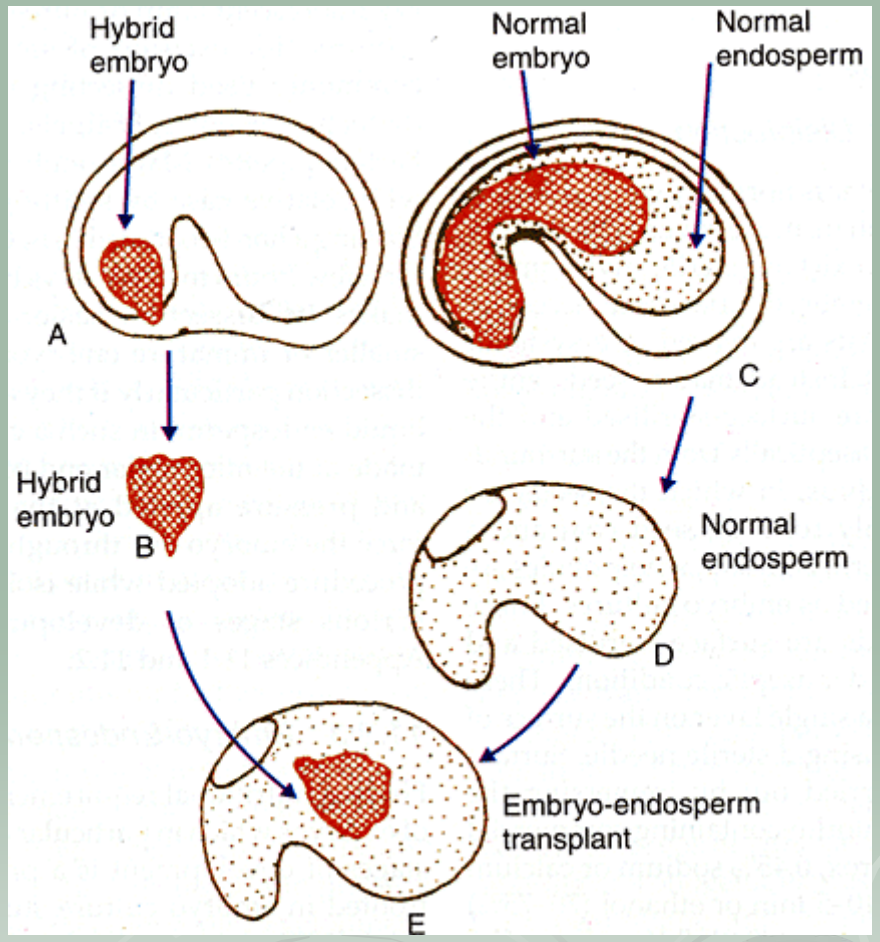
Zigotik embriyolar bitki doku kültürlerinde eksplantolarak sık sık kullanılmaktadır. Örneğin kallus kültürlerini başlatmada embriyolar çok yoğun olarak kullanılmakta ve bazı melezlerde uyuşmazlık engelini aşmak için de embriyo kültürü uygulanmaktadır. Doğada eşeysel melezlerin elde edilmesini sınırlayan ve kısırlıkla sonuçlanan uyuşmazlıklar söz konusudur. Bunlar;

1. Pre-zigotik uyuşmazlık: Polen çimlenmesi ve/veya polen tüpü büyümesi önlenir. Bu durumda zigot asla meydana gelmez. Bu uyuşmazlık laboratuvarda *in vitro* tozlama olarak isimlendirilen tekniğin kullanılması ile aşılabilmektedir.

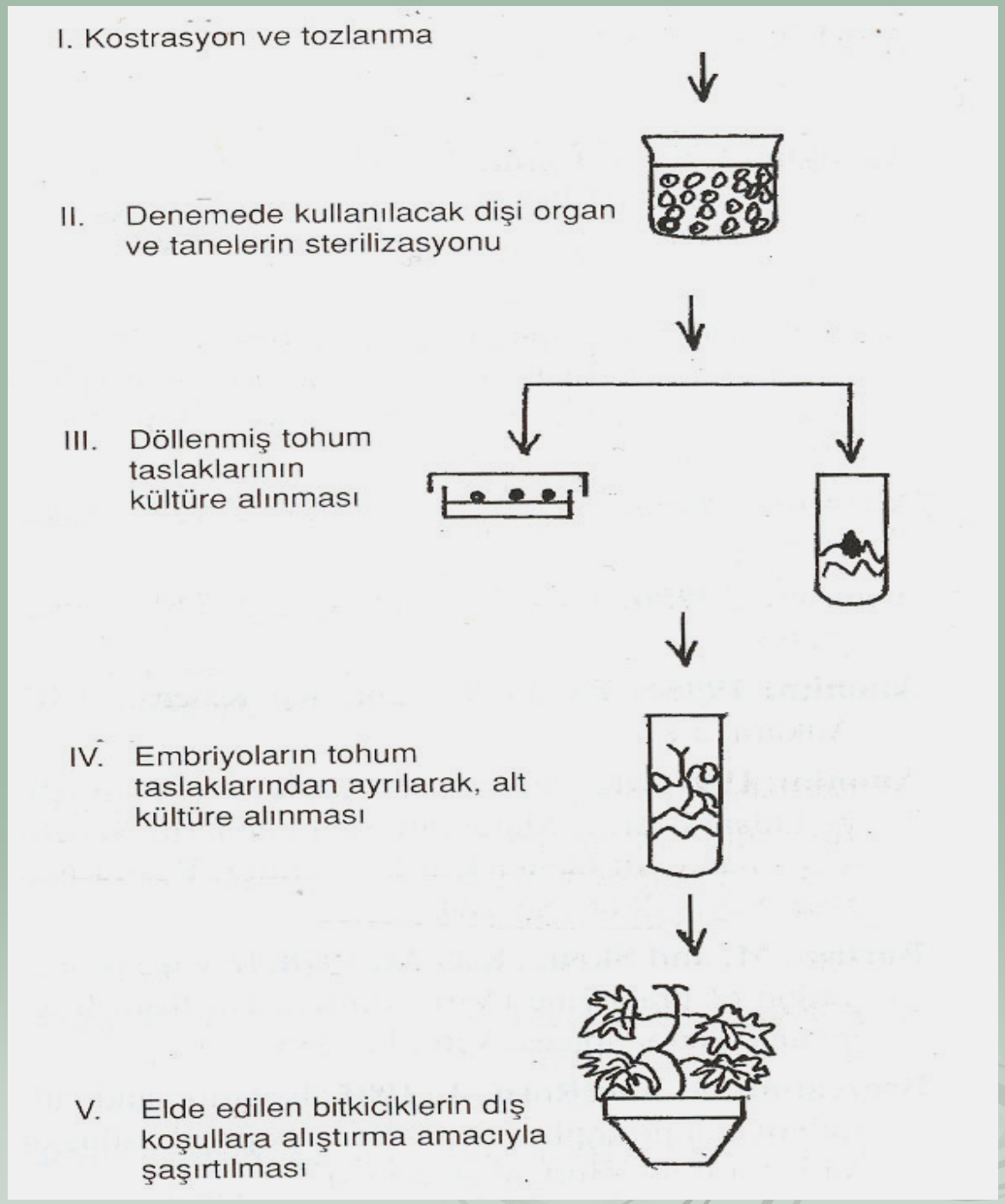
2. Post-zigotik uyuşmazlık: Zigot meydana gelir fakat endosperm tarafından kabul edilmez. Böyle bir durumda embriyo beslenemez ve düşer. Bu sorun hibrit embriyonun in vitro kültürü ile birçok bitki türlerinde giderilebilmektedir. Bu sorunun giderilmesine yönelik olarak kullanılan embriyo kültürü "embriyo kurtarma" olarak belirtilmektedir. Embriyo kültürünün en önemli uygulama alanlarından biri de bu şekilde embriyo kurtarma tekniğidir.



Embriyo transplantasyonu



Embriyo Kültürü



Embriyo Kültürünün Uygulama Alanları

Zigotik embriyo kültürünün en yararlı ve güncel uygulama alanı istenen özellikleri taşıyan nadir bitkilerin yetiştirilebilmesidir. Embriyo kültürünün uygulama alanları aşağıda verilmiştir.

1.Biyolojik Temel Çalışmalarda Embriyo Kültürü

a. Embriyo kültürü temel embriyogenesisi çalışmak için iyi bir olanaktır. Embriyogenesisdeki çeşitli dönemler bu yolla analiz edilebilmektedir.

b. Embriyo kültürü ile embriyonal büyüme ihtiyaçları belirlenmektedir. Kısaca embriyo kültürü, normal embriyogenesis için uygun besin isteklerini belirlemek, beslenmenin ve fitohormonların etkisini ortaya koymak için iyi bir araçtır.

c. Zigotik embriyoların kültürü, hotum taslağındaki embriyonun büyümesindeki koşulları belirlememizi sağlamaktadır

2.Tohumun Çimlenmemesi Durumunda Embriyo Kültürü

Tohum dormansisi ve tohum sterilitesi embriyo kültürü ile kırılabilmektedir. Bazı türlerdeki tohum dormansisi embriyoyu çevreleyen yapıda var olan kimyasal engelleyiciler veya mekaniksel dayanıklılık nedeniyledir. Böyle durumda embriyoların izole edilip besin ortamında kültüre alınması ile dormansi ortadan kaldırılmaktadır. Tohum sterilitesi embriyoyu çevreleyen yapıların uyuşmazlığı nedeni ile olabilir. Böyle durumlarda da embriyo kültürü ile canlı fideler elde edilmektedir. Çimlenme için parazitlerin gerekli olduğu durumlarda da in vitro'da parazite gerek olmadan çimlenme gerçekleşebilmektedir.

3. Islah süresini Kısaltmada Embriyo Kültürü

Bahçe bitkilerinde nadiren de olsa ıslah çalışmaları tohumların dormansi periyotları nedeniyle uzamaktadır. Embriyoların besin ortamında geliştirilmesi ile bu süre kısaltılabilmektedir. Dormansiye sebep olan faktörler, tohum kabuğu ve endosepermdeki endogen inhibitörler, düşük sıcaklık, özel ışık gereksinimleri gibi faktörler ise embriyonun kültüre alınması ile bunlar giderilmektedir. Sert tohum kabuğu nedeniyle çimlenmenin geciktiği durumlarda da embriyo kültürü ile çimlenme hızlandırılmaktadır.

Olgun olmayan embriyoların izolasyonu ve kültürü ile de ıslah programı kısaltılmaktadır.

4. Poliembriyonik türlerde nüsellar embriyolar tarafından baskılanan zigotik embriyonun yaşatılmasında Embriyo Kültürü

Citrus türlerinde embriyo kesesinin içinde sadece zigotik embriyo değil, nusellar dokudan oluşan nusellar embriyolar da bulunabilmektedir.
Poliembriyoni adı verilen bu durumda tohum çimlendiğinde birden fazla bitkicik gelişir, genelde de zigotik embriyonun yaşama şansı azalır. Embriyo kültürü sayebinde embriyolar tohumun içinde ayrı ayrı alınabilir ve zigotik embriyoyu elde etmek mümkün olur. Islah çalışmaları açısından zigotik embriyonun önemi büyüktür.



Citrus tohumunun içindeki nusellar embriyolar ve tohumun çimlenmesiyle birlikte bir tohumdan çıkan birden fazla sayıda bitkicik.

4. Yaşamayan Embriyoların Kurtarılmasında Embriyo Kültürü

a. Embriyolanın yetersiz gelişmesi: Meyvenin çok hızlı olarak olgunlaşması ve embriyonun tam olarak gelişmesini sağlayamadığı durumdur. Böyle meyvelerin tohumlarından embriyolar çıkarılıp in vitro kültüre alındığı zaman çimlenir ve normal bitkiler üretilir.

b. Hibrit embriyoların yaşayamaması : Uzak akraba olan türler arası melezler çoğunlukla başarısızdır, döllenme olmakla beraber hibrit embriyonun yaşamadığı görülmektedir. Bu duruma embriyo düşmesi veya aborsiyon denilmektedir. Bunun sebeplerinden biri endospermin gelişmemesi veya dejenere olmasıdır. Bu durumda embriyo beslenemediğinden dolayı ölür ve çimlenebilir tohumlar meydana getirmez. Hibrit embriyonun izolasyonu ve kültüre alınması ile yapay besin ortamı endospermin yerine geçebilmekte böylece hibrit embriyolar yaşatılmaktadır.

Böyle başarısız melezlerde embriyonun potansiyel olarak normal büyüme yeteneğinde olduğunu, tam hibrit embriyoların düşme olayının başlamasından önce izole edilerek besin ortamında kültüre alınması ile yaşatılabileceğini ve hibrit bitkilerin elde edilebileceğini göstermesi tarıma önemli katkılarda bulunmuştur. O zamandan bu yana embriyo kültür tekniği melezlemelerde döllenme sonrası engeller yüzünden normal olarak başarısız olan melezlerden hem tarımsal bakımdan önemli bitkileri elde etme hem de bahçe bitkilerini üretmek amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır.

5. Embriyo Kültürü ile Haploid Bitkilerin Üretilmesi

Embriyo kültürünün diğer bir avantajı uzak türler arası veya cinsler arası melezlemelerde döllenmeden sonra melez embriyonun gelişmesi sırasında ebeveynlerden birine ait kromozomların eliminasyonu yolu ile haploidlerin üretimidir. Bu yönteme bulbosum yöntemide denir. Hordeum vulgare ile Hordeum bulbosum türleri arasında yapılan melezlemeden sonra bulbosum türüne ait kromozomlar elimine olur.

6. Embriyo Kültürü ile Tohum Canlılıklarının Hızlı Test Edilmesi

Embriyonun çimlenmesi ile gerçekleştirilen bu tohum canlılık testine diğer metotlara göre daha doğru ve güvenilir olarak bakılmaktadır.

7. Embriyo Kültürü ile Ender Bitkilerin Çoğaltılması

Ticari muzun yabani bir akrabası olan Musa balbisinana tohumları doğada çimlenememektedir. Bununla birlikte fideler embriyoların kültüre alınması ile kolayca elde edilebilmektedir. Bazı Hindistan cevizlerinde sıvı endosperm yerine yumuşak ve yağlı bir doku gelişmektedir. Bu tip Hindistan cevizleri "makopuno" olarak adlandırılır ve bunların tohumları normal koşullar altında çimlenmede başarısız olmaktadır. In vitro kültür tekniği kullanılarak makapuno embriyolarından bitkicikler yetiştirilmiştir. Bu yolla embriyo kültürü ile elde edilip tarlada yetiştirilen bitkilerin % 85'i makapuno cevizleri oluşturmuştur.



Zigotik embriyo; somatik embriyo oluşumu için en iyi eksplant kaynaklarından birisidir. Özellikle klon elde edilmesi zorunlu olmayan endemik bitki türlerinin hızlı çoğaltımı söz konusu olduğunda zigotik embriyolardan somatik emriyogenezis elde edilmesi, pratik bir çözüm olabilmektedir.

Embriyo Kültürünün Uygulanması

Embriyo kültürünün prensibi; embriyorun steril koşullarda tohumdan izole edilmesi ve bu embriyoların uygun besin ortamına yerleştirilerek optimum koşullarda kültür edilmesinden oluşur. Embriyolar tohum içinden steril bir ortamda bulunmaları nedeniyle bunları bunları steril olarak izole etmek oldukça kolaydır. Tohum veya kapsüller sterilize edildikten sonra, embriyolar steril koşullarda kendilerini çevreleyen dokulardan izole edilir. Sert tohumlu bitkilerde tohum sterilize edildikken sonra birkaç saat veya birkaç gün su içinde bırakılır. Daha sonra embriyolar tohumlardan izole edilir. Küçük embriyolu bitkilerde izolasyon sırasında embriyoların zarar görmemesine dikkat edilmesi gerekir. Böyle durumlarda izolasyon işleminin mikroskop altında yapılması gerekir. İzole edilmiş olan embriyolar uygun besin ortamlarında ve optimum fiziksel koşullarda kültüre alınırlar. Kültür sırasında bu embriyolardan tam teşekküllü bitkiler oluşur.

Embriyo Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler

Embriyo kültürü çaşımalarında başarıyı etkileyen bazı faktörler şunlardır.

- **Genotip:** Diğer doku kültürü çalışmalarında olduğu gibi embriyo kültüründe de genotip etkisi söz konusudur. In vitro kültürde bazı türlerin embriyolarının gemişmesi çok kolay olurken bazı türlerde oldukça zordur.

- **Embriyonun kültüre alındığı dönem:** Çok küçük embriyoların in vitro gelişmesi zordur. Embriyo in vivo'da ne kadar gelişmiş ise in vitro'daki gelişimi de ol ölçüde daha kolay olmaktadır.
- **Besin Ortamının Bileşimi :** Olgun embriyolar basit bir ortamda gelişirken erken gelişme dönemindeki embriyolar daha komplike bir ortama gerek duymaktadır. Embriyo kültürü için geliştirilmiş çeşitli ortamlar bulunmaktadır. Bununla beraber hem olgunlaşmamış hem de olgun embriyoların in vitro kültüründe besin ortamı makro ve mikro elementleri ve şeker içermelidir. Genellikle pH'sı 5-6 arasında değişen katı ortamlar kullanılır.

Embriyo kültürü için çok değişik mineral besin ortamları kullanılmaktadır. Embriyolar mineral solüsyonlara çok hassas olup, büyümeyi teşvik eden mineral solüsyonlar embriyolarda toksik etki yapabilmekte, toksik etki yapmayan mineral solüsyonlar ise embriyoların normal farklılaşmasını sağlamamaktadır. Bu nedenle embriyo kültürü için kullanılan mineral solüsyonlarda bu durumların dikkate alınması gerekir. Embriyo kültüründe şeker kaynağı olarak genellikle sakaroz kullanılır. Bazen fruktoz ve glikoz daha iyi sonuç verebilmektedir. Gelişmesini tamamlamış embriyoların kültüründe genellikle besin ortamına % 2-3 sakkaroz ilave edilir. Olgunlaşmamış embriyoların kültüründe ise sakarozun % 8-12 konsantrasyonları kullanılır. Genellikle embriyo büyüklüğü arttıkça şeker gereksinimi azalır. Agarın genellikle % 0.6-0.8 konsantrasyonları kullanılır. Yüksek ağar konsantrasyonları embriyo büyümesini engeller. Embriyo kültüründe çoğu kez büyüme düzenleyicilerine gereksinim duyulmaz. Fakat bazı durumlarda besin ortamına ilave edilen düşük dozdaki (0.5 mg/l) IAA'nın embriyo büyümesini olumlu yönde etkilediği saptanmıştır. Kural olarak, doğal olarak oluşan endospermlerin hormonlar içerdiği ve bu hormonların embriyonun büyüme ve gelişmesini etkilediği, endosperm gelişmesinin normal olmadığı durumlarda besin ortamının büyüme düzenleyicileri içermesi gerektiği söylenebilir.

Başarılı bir embriyo kültürü için mutlak gerekli olmamakla beraber, genellikle besin ortamına biotin, thiamin, pantothenik asit, nikotinik asit, askorbik asit, inositol ve pyroxidin ilave edilir. Embriyo kültüründe besin ortamına Hindistan cevizi sütü, meyve ve sebze püreleri ve kazein hidrolizat gibi maddelerin ilavesi bazı durumlarda embriyo büyüme ve gelişmesini olumlu yönde etkileyebilir. Amino asitler embriyo kültüründe sık olarak kullanılırlar.

- **Kültür koşulları :** Embriyo kültüründe oksijen önemli bir faktördür. Bazı türlerin embriyo kültürlerinin önce karanlıkta inkübe edilmesi sonra aydınlığa alınması uygun olmaktadır. Kültürde optimum sıcaklık bitki türüne göre değişmektedir. Ayrıca, dormasiyi kırmak için soğuk uygulaması gerekebilir.

- **Embriyoların izolasyonu :** Embriyoyu zedelemeden izole etmek özellikle erken gelişme dönemindeki embiryoların zarar görmemesi başarı için önemlidir.