

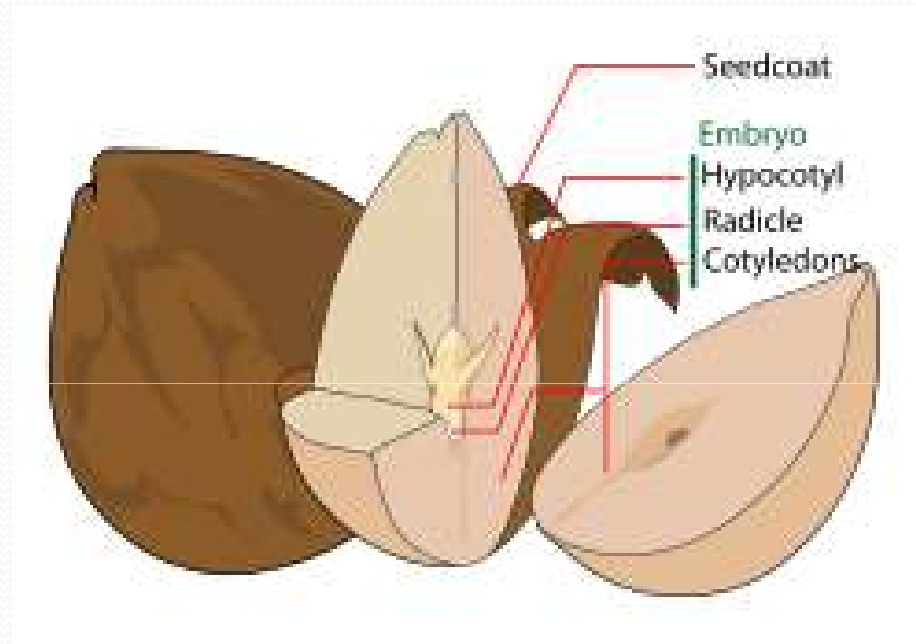
EMBRIYO KÜLTÜRÜ VE EMBRIYO KURTARMA

Doç.Dr. Yıldız AKA KAÇAR

EMBRIYO KÜLTÜRÜ

Yüksek bitkilerin tohumlarından ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek belli ortamlarda kültüre alınmasına **embriyo kültürü** denir.

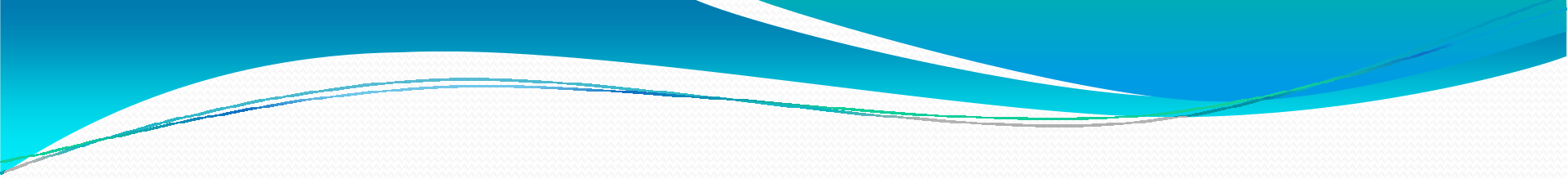
Bitki embriyolarının kültürü ile ilgili ilk çalışma, Hanning (1904) tarafından olgun embriyoların (2 mm) mineral tuz ve şeker içeren basit bir ortamda kültüre alınması ve bitkicik geliştirmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir.



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 farklılaşmasını sağlamaktadır. Embriyoların izolasyonu oldukça zor bir iştir bu nedenle güç olan bir kültür yöntemidir.



Embriyo kültüründe, geliŐen tohumdan veya tohum taslağından olgun döneme yakın bir dönemdeki embriyolar izole edilirse bu embriyolar ototrofiktir ve enerji kaynağı iÇeren basit bir inorganik ortamda geliŐebilir.

Olgunlaşmamış embriyoları kültüre almada ise onların büyüme ve geliŐmesine destek olabilecek bir kültür ortamı belirlemek çok önemlidir.

- Zigotik embriyolar bitki doku kùltùrlerinde eksplant olarak sık sık kullanılmaktadır. Örneđin kallus kùltùrlerini başlatmada embriyolar çok yoğun olarak kullanılmakta ve bazı melezlerde uyuşmazlık engelini aşmak için de embriyo kùltürü uygulanmaktadır.



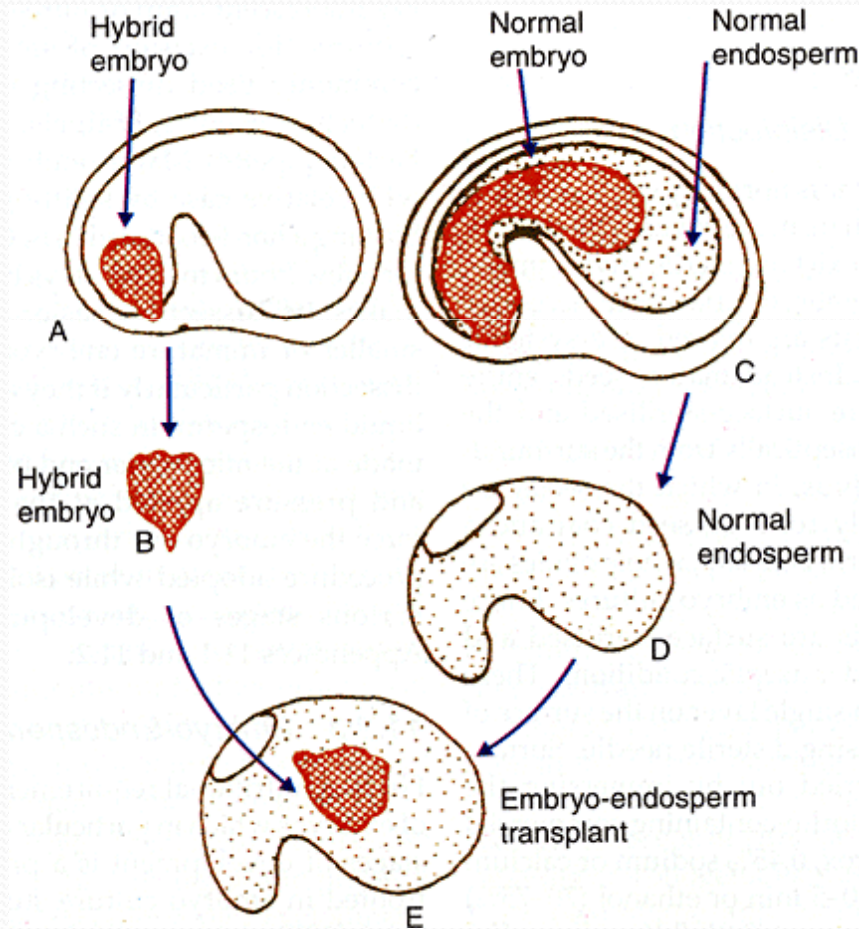
Doğada eşeyssel melezlerin elde edilmesini sınırlayan ve kısırlıkla sonuçlanan uyuşmazlıklar söz konusudur. Bunlar;

1. **Pre-zigotik uyuşmazlık:** Polen çimlenmesi ve/veya polen tüpü büyümesi önlenir. Bu durumda zigot asla meydana gelmez. Bu uyuşmazlık laboratuvarında 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.

- Zigotik embriyo kültürünün en yararlı ve güncel uygulama alanı istenen özellikleri taşıyan nadir bitkilerin yetiştirilebilmesidir.



Embriyo Transplantasyonu

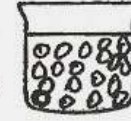


Embriyo Kùltürü

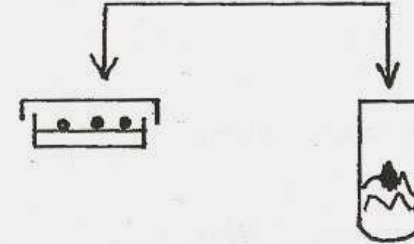
I. Kostrasyon ve tozlanma



II. Denemede kullanılacak diő organ ve tanelerin sterilizasyonu



III. Döllenmiő tohum taslaklarının kùltüre alınması



IV. Embriyoların tohum taslaklarından ayrılarak, alt kùltüre alınması

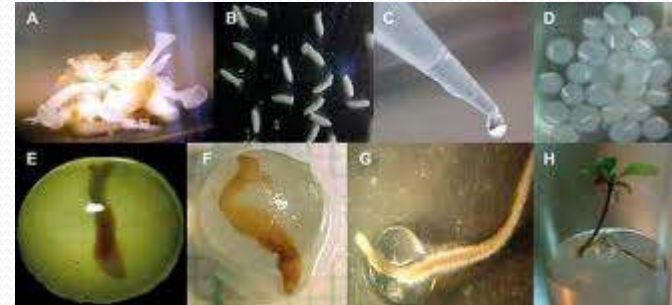


V. Elde edilen bitkiciklerin diő koőullara alištırma amacıyla Őaşırtılması



Embriyo Kùltürü İçin Gereksinimler

- Besin ortamı bileşimi
 - ❖ mineral maddeler
 - ❖ karbonhidrat ve osmatik basınç
 - ❖ aminoasit ve vitaminler
 - ❖ doğal bitki ekstraktları
 - ❖ bitki büyüme düzenleyicileri
- Kùltür koşulları



Embriyo Kùltürünün Uygulama Alanları

1. Biyolojik Temel Çalışmalarda Embriyo Kùltürü
2. Tohumun Çimlenmemesi Durumunda Embriyo Kùltürü
3. Islah süresini Kısaltmada Embriyo Kùltürü
4. Yaşamayan Embriyoların Kurtarılmasında Embriyo Kùltürü
5. Embriyo Kùltürü ile Haploid Bitkilerin Üretilmesi
6. Embriyo Kùltürü ile Tohum Canlılıklarının Hızlı Test Edilmesi
7. Embriyo Kùltürü ile Ender Bitkilerin Çoğaltılması

Biyolojik Temel Çalışmalarda Embriyo Kültürü

- a) Embriyo kültürü temel embriyogenesi çalışmak için iyi bir olanaktır. Embriyogenesisteki 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.

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 durumlarda da 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.



Islah süresini Kısaltmada Embriyo Kültürü

Bahçe bitkilerinde nadiren de olsa islah çalışmaları tohumların dormansi periyotları nedeniyle uzamaktadır. Embriyoların besin ortamında geliştirilmesi ile bu süre kısaltılabilmektedir. Dormansiye sebep olan faktörler, tohum kabuğu ve endosepermdaki endogen inhibitörlerdir.

Sert tohum kabuğu nedeniyle çimlenmenin geciktiği durumlarda da embriyo kültürü ile çimlenme hızlandırılmaktadır. Olgun olmayan embriyoların izolasyonu ve kültürü ile de islah programı kısaltılmaktadır.

Poliembriyonik Türlerde Nusellar 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 sayesinde embriyolar tohumun içinde ayrı ayrı alınabilir ve zigotik embriyoyu elde etmek mümkün olur. İslah çalışmaları açısından zigotik embriyonun önemi büyüktür.



Yaşamayan Embriyoların Kurtarılmasında Embriyo Kültürü

- a) **Embriyoların 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 **abortus** 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.

Embriyo Kùltürü ile Haploid Bitkilerin Üretilmesi

Embriyo kùltürünün diğer bir avantajı uzak türler arası veya cinsler arası melezlemelerde döllemeden sonra melez embriyonun gelişmesi sırasında ebeveynlerden birine ait kromozomların eliminasyonu yolu ile haploidlerin üretimidir. Bu yöntemle **bulbosum** yöntemide denir.



Embriyo Kùltürü ile Tohum Canlılıklarının Hızlı Test Edilmesi

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



Embriyo Kùltürü ile Ender Bitkilerin Çoğaltılması

Ticari muzun yabancı bir akrabası olan *Musa balbisinana* tohumları doğada çimlenememektedir. Bununla birlikte fideler embriyoların kùltüre 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 kùltür tekniğı kullanılarak makopuno embriyolarından bitkicikler yetiştirilmiştir. Bu yolla embriyo kùltürü ile elde edilip tarlada yetiştirilen bitkilerin % 85'i makopuno cevizleri oluşturmuştur.

Embriyo Kùltürünün Uygulanması

- Embriyo kùltürünün prensibi; embriyoyun steril koşullarda tohumdan izole edilmesi ve bu embriyoların uygun besin ortamına yerleştirilerek optimum koşullarda kùltür 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.
- 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 kùltüre alınırlar. Kùltür sırasında bu embriyolardan tam teşekküllü bitkiler oluşur.

Embriyo Kùltüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler

- ❑ **Genotip:** Diğer doku kùltürü çalışmalarında olduğu gibi embriyo kùltüründe de genotip etkisi söz konusudur. *In vitro* kùltürde bazı türlerin embriyolarının gemişmesi çok kolay olurken bazı türlerde oldukça zordur.
- ❑ **Embriyonun kùltüre alındığı dönem:** Çok küçük embriyoların *in vitro* gelişmesi zordur. Embriyo *in vivo*'da ne kadar gelişmiş ise *in vitro*'daki gelişimi de o ölçüde daha kolay olmaktadır.
- ❑ **Besin Ortamının Bileşimi:** Olgun embriyolar basit bir ortamda gelişirken erken gelişme dönemindeki embriyolar daha komplike bir ortama gerek duymaktadır.

□ **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, dormansiyi kırmak için soğuk uygulaması gerekebilir.

□ **Embriyoların izolasyonu:** Embriyoyu zedelemekten izole etmek özellikle erken gelişme dönemindeki embriyoların zarar görmemesi başarı için önemlidir.

Sunumun Yayınlandığı Siteler

www.bahcebitkileri.org

www.bahcebitkileri.org/bitkibiyoteknolojisi