



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IN VITRO ŞARTLARDA YETİŞTİRİLEN
NOHUT (*Cicer arietinum* L.) VE MÜRDÜMÜK
(*Lathyrus* sp.) TÜRLERİ İLE YAPILAN
PROTOPLAST KÜLTÜRÜNÜN
ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Ramazan KOYUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bitki Islahı ve Genetik Anabilim Dalı

Mart-2023
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Ramazan KOYUN tarafından hazırlanan “*In Vitro* Şartlarda yetiştirilen Nohut (*Cicer arietinum* L.) ve Mürdümük (*Lathyrus* sp.) Türleri ile Yapılan Protoplast Kültürünün Etkinliğinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 16/03/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Islahı ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Ercan CEYHAN

Danışman

Prof. Dr. Ercan CEYHAN

Üye

Doç. Dr. Rahim ADA

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Çetin PALTA

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ömer Faruk YÜKSEL
FBE Müdürü

Bu tez çalışması S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 20201057 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Ramazan KOYUN

Tarih: 16.03.2023

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IN VITRO ŞARTLARDA YETİŞTİRİLEN NOHUT (*Cicer arietinum* L.) VE MÜRDÜMÜK (*Lathyrus* sp.) TÜRLERİ İLE YAPILAN PROTOPLAST KÜLTÜRÜNÜN ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Ramazan KOYUN

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Islahı ve Genetik Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Ercan CEYHAN

2023, 20 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Ercan CEYHAN

Doç. Dr. Rahim ADA

Dr. Öğr. Üyesi Çetin PALTA

Nohut (*Cicer arietinum* L.) tarımında önemli ekonomik zarara neden olan antraknoz (*Ascochyta rabiei* Labr.) hastalığı ülkemizde özellikle bölgemiz olan İç Anadolu bölgesinde yaygın olarak görülmektedir. Yapılan kaynak araştırmaları sonucu, mürdümük (*Lathyrus* sp.) türlerinin bu hastalığa karşı değerli bir tolerans kaynağı olduğu ifade edilmektedir. Bu iki türün doğal melezlemeleri sonuçsuz kaldığından, bu çalışmada protoplast kültürü ile bitkilerin hücresel melezleme yönteminin başarısı belirlenmesi amaçlanmaktadır. İn vitro koşullarında 4 farklı nohut çeşidi (Azkan, Aksu, Göktürk ve Bahadır) ve üç farklı *Lathyrus* sp. genotipin çimlendirilmiştir. Bu çalışmada, bu iki cinsin Radikula, plumula ve Radikula + plumula şeklinde farklı eksplant kaynaklarındaki protoplast verimleri gözlemlenerek metodun uygunluğu incelenmiştir.

Yapılan gözlemler sonucunda en iyi protoplast verimi melezlerde *L. cicera* X Göktürk nohut çeşidinde 25×10^5 protoplast g^{-1} bulunurken, en az protoplast verimi *L. sativus* (S) X Aksu nohut çeşidinde $2,5 \times 10^5$ protoplast g^{-1} sayımı gerçekleştirilmiştir. Eksplant türüne göre yapılan gözlemlerde, en iyi protoplast verimi *Lathyrus* sp. ve *Cicer* sp. cinslerinin her ikisi içinde eksplant kaynağı olarak ise Radikula+ Plumula olarak kullanılan materyallerde $23,8 \times 10^5$ protoplast g^{-1} , en düşük verim her iki cins içinde Radikula kullanılan materyallerde $2,5 \times 10^5$ protoplast g^{-1} tespit edilmiştir. Bu değerlere göre genel bir ifadeyle eksplant kaynağı olarak Radikula+ Plumula kullanımı, protoplast verimini artırması ile oluşacak yapılarda istenilen özelliklerdeki heterokaryonların elde edilebilme ihtimalini yükselteceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Cicer arietinum*, *In vitro*, *Lathyrus* sp., Protoplast Kültürü

ABSTRACT

MS THESIS

THE DETERMINATION OF PROTOPLAST CULTURE'S EFFICIENCY WITH CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) AND GRASS PEA (*Lathyrus* sp.) SPECIES GROWN IN *IN VITRO* CONDITIONS

Ramazan KOYUN

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN PLANT BREEDING AND GENETIC**

Advisor: Prof. Dr. Ercan CEYHAN

2023, 20 Pages

Jury

Prof. Dr. Ercan CEYHAN

Assoc. Prof. Dr. Rahim ADA

Assist. Prof. Dr. Çetin PALTA

Anthracnose (*Ascochyta rabiei* Labr.) disease, which causes significant economic damage in chickpea (*Cicer arietinum* L.) agriculture, is common in our country, especially in our region, Central Anatolia. As a result of the literature research, it has been seen that *Lathyrus* sp. is a valuable source of tolerance against this disease. Since the natural hybridization of plants is inconclusive, this study it is aimed to determine the success of the cellular hybridization method of plants with protoplast culture. Four different chickpea varieties (Azkan, Aksu, Göktürk, and Bahadır) germinated in vitro, and three different *Lathyrus* sp. The method's suitability was investigated by observing the variety and protoplast yields of these two genera in various explant sources: the radicle, plumule, and radicle + plumule.

As a result of the observations, the best protoplast yield was found in *L. cicera* X Göktürk chickpea cultivar with 25×10^6 protoplast g^{-1} counts. In comparison, the lowest protoplast yield was 2.5×10^6 protoplast g^{-1} counts in *L. sativus* (black genotype) X Aksu chickpea cultivar. In the observations made according to the explant type, the best protoplast yield was determined as 23.8×10^6 protoplast g^{-1} in the materials used as radicle + plumule, and the lowest yield was 2.5×10^6 protoplast g^{-1} in the materials used as radicle in both *Lathyrus* sp. and *Cicer* sp. genera. According to these values, in general terms, it is predicted that the use of Radicle+ Plumula as an explant source will increase the protoplast yield and increase the probability of obtaining heterokaryons with the desired properties in the structures to be formed.

Keywords: Protoplast Culture, *Cicer arietinum*, *Lathyrus* sp., *In vitro*

ÖNSÖZ

Ülkemizde nohut tarımını olumsuz etkileyen antraknoz hastalığı, çevre faktörü ile oluşma riski artmakta olup hastalık etmenine karşı alınan klasik tedbirler ile klasik ıslah çalışmaları yetersiz kalmaktadır. Çalışmamızda hastalık etmenine karşı toleranslı varyasyon kaynaklarını oluşturmak amacıyla biyoteknolojik yöntemlerin ilk defa kullanılması çalışmamızı özgün kılmakta ve tez çalışmamız ilerideki çalışmalara temel oluşturması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada emeği geçen başta tez danışmanım Prof. Dr. Ercan CEYHAN' a, tezin ilk aşamasından son aşamasına kadar desteğini esirgemeyen eşim Dr. Öğr. Üyesi Nur KOÇ KOYUN' teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca mikroskop çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Emel ATMACA' ya, Yüksek Ziraat Mühendisi Ayşegül KORKMAZ' a, Yüksek Ziraat Mühendisi İbrahim ÇAKIR' a, Yüksek Lisans Öğrencisi Havva ÇAĞLAR' a katkılarından dolayı teşekkürü borç bilirim.

Araştırmamızda laboratuvar alt yapısını ve teknik imkanlarını sağlayan Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR, Dr. Öğr. Üyesi Emine ATALAY ve Dr. Öğr. Üyesi Münire TANUR ERKOYUNCU' ya, doku kültürü çalışmaları ile ilgili pratik bilgileri öğreten Arş. Gör. H. Ekrem SOYDEMİR' e ve bu çalışmanın finansal desteklenmesinde S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (20201057) ve son olarak, desteğini esirgemeyen tüm aile bireylerime de şükranlarımı sunarım.

Ramazan KOYUN
KONYA-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	6
3.1. Materyal	6
3.1.1. Tohum.....	6
3.1.2. Laboratuvar araç-gereçleri ve kimyasallar	6
3.2. Yöntem.....	6
3.2.1. <i>In vitro</i> çimlendirme için yapılan ön hazırlıklar	6
3.2.2. Protoplast kültürü.....	8
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	13
4.1. Mikroskop Görüntülerinin İncelenmesi	13
4.2. Protoplast Verimi	15
4.3. Tartışma.....	16
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	18
KAYNAKLAR	19

1. GİRİŞ

Dünya’da değişen iklim şartları ile her geçen gün tarımda verimi kısıtlayan stres faktörlerin etkisi artmaktadır. Tarımsal üretimi kısıtlayan bu faktörlerin etkisi altında, artan dünya nüfusunun beslenme ihtiyacının karşılanması her geçen gün zorlaşmakta olup insanların dengeli ve sağlıklı beslenmesini olumsuz yönde etkilemektedir. İnsan beslenmesinde sağlıklı bir diyet için günde toplam 70 g proteine ihtiyaç duymakta olup bunun 40 g’ı bitkisel kökenli olması gerekir (Akçin, 1988). Yemeklik tane baklagiller bitkisel kökenli protein kaynakları arasında esansiyel amino asitleri diğer bitkilere göre daha dengeli içermesi nedeniyle ön plana çıkmaktadır.

Yemeklik tane baklagiller içerisinde yer alan nohut (*Cicer arietinum* L.) %19 protein oranı ile bakımından diğer yemeklik tane baklagillere göre düşük proteine içeriğine sahip olmasına rağmen tanelerinin sahip olduğu lysine ve methionine gibi esansiyel amino asitleri açısından ise yüksek değerlere sahiptir. Ayrıca nohut vitamin, mineral değerleri ile dengeli ve besleyici bir gıda olma özelliği taşımaktadır (Pekşen ve Artık, 2005).

Nohudun agronomik özellikleri incelendiğinde ise gerek kök yapısının gelişmiş olması gerek de köklerindeki *Rizobium* bakterileri ile simbiyotik yaşamı nedeniyle, kuru tarım sisteminde çok önemli bir yeri bulunmaktadır. Ayrıca kendinden sonra temiz bir tarla bırakması, kurağa ve tuzluluğa karşı toleranslı olması ile göstermesi son zamanlarda görülen tarımsal sorunların çözümünde önemi gittikçe artmaktadır.

Dünya’da 2020 yılında Nohut ekilen alan 14.8 milyon ha (14 841 940 ha) olup, bu alandan yaklaşık 15 milyon ton (15 083 871 ton) ürün elde edilmiştir (FAO, 2022). Aynı yıl Türkiye’de 511 560 ha alanda nohut ekimi yapılmış, bu alandan 630 bin ton ürün elde edilmiştir. Ülkemizin nohut verimi 123 kg da⁻¹ olup dünya veriminin (101.6 kg da⁻¹) üzerinde bir değere sahip olduğu ifade edilebilir (TÜİK, 2022). Ancak 2021 yılında ülkemizdeki nohut ekim alanı 487 885 ha’a kadar gerilemiş olup bu azalmaya nohutta ekonomik zarara neden olan iklim değişikliğinin neden olduğu çevre baskısı ile artan hastalık ve zararlılar olarak yorumlanabilir.

Ülkemizde nohut yetiştiriciliğini kısıtlayan en önemli hastalık Antraknoz (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.) olarak ifade edilebilir. Hastalık nohutta %90’ lara varan verim kayıplarına neden olmakta olup, ülkemizde özellikle de İç Anadolu bölgesinde bazı yıllarda hiç nohut hasat edilemeyen bölgelere neden olabilmektedir. Kültürel yöntemlerle yapılan mücadeleler yeterli seviyede olmadığı için antraknoz hastalığına

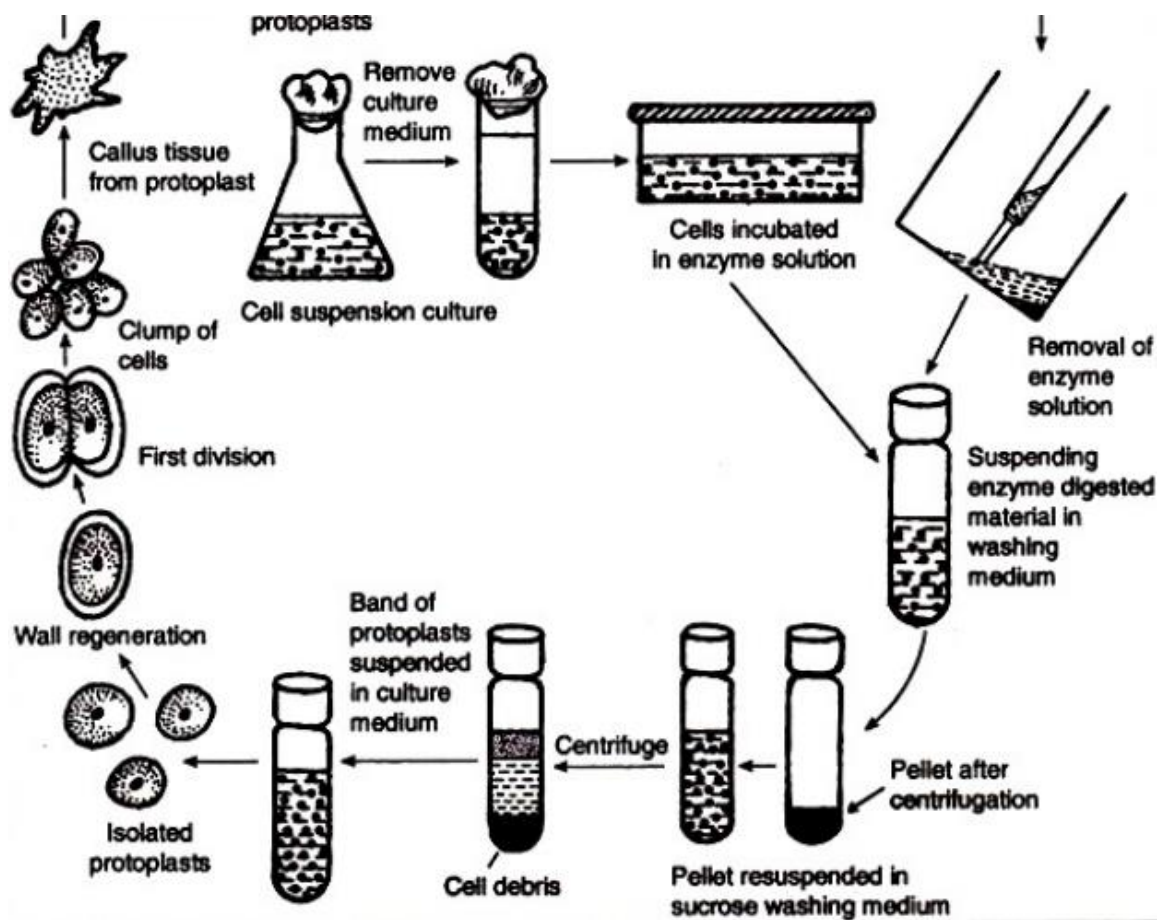
karşı toleranslı çeşit ile sürdürülebilir nohut tarımı gerçekleştirilebilir (Toker ve Çağırğan, 1996; Azkan ve ark., 1999; Akdağ, 2001).

Türkiye'nin *Cicer* cinsinin gen merkezinden olması nedeniyle Türkiye Florasında doğal olarak 10 farklı tür ve çok sayıda alt türün bulunduğu ifade edilebilir (TÜBİVES, 2022). Ancak ülkemizde farklı tiplerinin olmasına rağmen bu türlerde antraknoz hastalığına karşı toleransa sahip oldukları bildirilmemiştir.

Antraknoz (*Ascochyta* sp.) hastalığı sadece nohutta değil diğer yemeklik tane baklagilleri için de verimde azalmaya ve bitkilerin kaybına neden olmaktadır. Bezelyede antraknoza karşı tolerans çalışan McCutchan (2001), *Lathyrus* cinsinin antraknoz (*Ascochyta* sp.) hastalığına karşı değerli bir tolerans kaynağı olduğunu vurgulamıştır. Bununla beraber, klasik ıslah yöntemlerinden melezleme ile nohut bitkisine bu toleransı sağlayan genlerin aktarılması zor olmakta ve bazen hiç mümkün olmamaktadır. Ayrıca klasik ıslah çalışmaları, uzun yıllar almakta ve kazandırılan bu tolerans çok çabuk kaybolmaktadır. Bitki ıslahında klasik ıslah yönteminin tamamlayıcısı olarak kullanılan biyoteknolojik yöntemler ile nohutta (*Cicer arietinum*) Antraknoza (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.) toleransın kazandırılması için protoplast kültürünün kullanılması sürecin kısılmasına ve daha etkili sonucun alınması açısından son derece önemli olduğu ifade edilebilir. İlk kez yapılan bu çalışma ile bölgemizde yetişen nohut genotipleri ve *Lathyrus* sp. türlerinin protoplast kültürü ile ülkemizde nohutta antraknoz hastalığına karşı toleranslı çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılabilecek yöntemin ve eksplant kaynağının uygunluğunun denenmesi ile varyasyon kaynaklarının oluşturulması amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Protoplast kültürü, duvarları farklı yöntemlerle uzaklaştırılmış hücre zarı bırakılarak işlem yapılmış hücrelerin kültürüdür. Hücrenin çeperi yok edildiğinde kalan yapıya protoplast denir. Protoplastlar uygun ortamlarda canlılığını devam ettirirken, yeniden çeper oluşturup, mitozla bölünmeye devam edebilir, yeni kalluslar, dokular ve sonra yeni bitkicikler oluşturabilirler (Babaoğlu ve Özcan, 2002; Bozdoğan ve ark., 2013). Aşağıda verilen Şekil 2.1’de protoplast kültürü aşamaları verilmiştir (Anonymous, 2022).



Şekil 2.1. Protoplast kültüründe yapılan işlemlerin şematik görüntüsü (Anonymous, 2022).

Babaoğlu (2000), protoplast kaynağı olarak olgun eksize embriyolar, olgunlaşmamış kotiledonlar, fide kotiledonları, hipokotiller, epikotiller ve fide kök uçlarının kullanılabileceğini ifade etmiş ve çalışmasında *Lupinus mutabilis* bitkisinden protoplast izolasyonunda optimum eksplant kaynağını belirlemeyi hedeflemiştir. Çalışmasında eksplant kaynakları arasında sürgün ucu protoplast kaynağı yaş ağırlıkta

4,81 x10⁶ protoplast g⁻¹ ile en yüksek protoplast verimi elde edilen kaynak olduğu ifade edilmiştir.

Protoplast izolasyonunda kaynak materyali olarak embriyo, kök, polen gibi farklı organlarından faydalandığı belirlenen Géomez-Maldonado ve ark. (2001), yaptığı çalışmada *Pinus pinaster* bitkisi için ilk defa fide gövdesini eksplant kaynağı olarak kullanmıştır. Çalışmada protoplast canlılığını %80-90 olarak belirlemiş ve geliştirdiği metodunda santrifüj işleminin protoplastları bozduğunu ifade etmiştir.

McCutchan (2001), bezelye ve mürdümüğün doğal melezlemelerinde başarı sağlanamadığı için biyoteknolojik yöntemlerle bu bitkilerin somatik hibridizasyon yöntemi kullanılarak antraknoz hastalığına karşı toleranslı bitki üretilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada, *Pisum* sp. ve *Latyrhus* sp. türlerinden seçilen genotipler için uygun mikro çoğaltım ve protoplast yöntemleri geliştirilmiştir. Çalışmada, ardından organogenez ve somatik embriyogenez protokolleri bu bitkiler için yenilenmiştir. *Pisum* sp. ve *Latyrhus* sp. protoplastları elektro-füzyon yöntemi ile asimetrik somatik melez elde edilmiş ve bezelyede moleküler markörler kullanarak antraknoz hastalığına karşı dayanıklı olan tipler belirlenmiştir.

Yan ve ark. (2004), çeltik için yeni bakteriyel yanıklık direnç genleri, bir japonica çeltik çeşidine (*Oryza sativa* cv. 8411), direnç genlerinin donörü olarak yabancı pirinç *O. meyeriana* kullanılarak somatik hibridizasyon yoluyla aktarıldığı ifade edilmektedir. Somatik olarak melezlenmiş bitkilerinden yirmi dokuz projeni elde edildi. Yedi somatik melezleştirilmiş bitki ve ebeveynleri, 8 primer çifti kullanılarak AFLP moleküler markörü kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, bu bitkilerin her iki ebeveynin karakteristik bantlarını içeren somatik melezler olduğunu doğrulamıştır. Morfolojisi rejenere çeltik hem *O. sativa* hem de *O. meyeriana* karakterlerini göstermiş ve iki somatik melez en yüksek bakteriyel yanıklık göstermiştir. Bakteriyel yanıklık direncinin iyileştirilmesi için çeltik yetiştirme programında 8 bitki orta düzeyde direnç göstermiştir.

Protoplast kültürü farklı bitki türlerinde sadece hastalıklara dayanım/ tolerans için değil, bitkilerde verimin artırılması amacıyla da kullanılmaktadır. Ekmekçi ve Sözen (2005), daha fazla kekik yağı üretebileceğimiz yeni bir kekik türü elde etmek için *Origanum onites* (bilyalı kekik) ve *O. majorana* (beyaz kekik) türleri arasında protoplast füzyonu yapılmıştır. Sonuç, protoplast füzyonu sonrasında oluşan sibritlerin hibrit olduğunu kanıtlamaktadır.

Protoplast verimi bitki türlerine ve yöntemlere göre değişkenlik gösterdiğini ifade eden Zhou ve ark. (2019), *Platycladus orientalis* bitkisinde genç yapraklardan elde dokularla farklı yöntemler kullanılarak yaptıkları protoplast izolasyonu çalışmasında yaş ağırlıkta 1×10^{-4} ile 8.2×10^4 protoplast g^{-1} arasında protoplast verimine ulaşmışlardır. Aynı çalışmada yapılan yöntemle seçilen bitki türlerinin uyum gösterdiği ifade edilmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tohum

Bu çalışmada, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesinden temin edinilen 4 adet tescilli (*Cicer arietinum* L. cv. Göktürk, Azkan, Bahadır, Aksu) nohut çeşitleri ile nohut mürdümüğü (*Lathyrus cicera* Hauman) popülasyonu ve mürdümüğe (*L. sativus* L.) ait siyah [*L. sativus* (S)] ve beyaz [*L. sativus* (B)] tohum kabuğu rengine sahip 2 farklı mürdümük genotipi, toplamda 3 farklı *Lathyrus* sp. çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.2. Laboratuvar araç-gereçleri ve kimyasallar

Çalışma Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüş olup, çalışmada eppendorf tüpleri, mikropipetler ve uçları, otoklav, laminar kabin, pens, bistüri, alev lambası, cam petri, magenta, kavanoz, steril eldiven, fayans, maske, gözlük, mikroskop ve sterilizasyon için kullanılan hipoklorik asit fakültemiz alt yapısından temin edilerek kullanılmıştır.

Steril bitkiler elde edilmesi aşamasında ve diğer aşamalarda kullanılan MS besin ortamı, agar, sukroz ve diğer kimyasallar BAP projesi kapsamında temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. *In vitro* çimlendirme için yapılan ön hazırlıklar

3.2.1.1. Alet ve ekipman sterilizasyonu

Çalışmamızda, alet ve ekipman sterilizasyonu 0.22 µm porozitede hepa filtreye sahip yatay hava akışlı (laminar air flow) kabin içinde gerçekleştirilmiştir. Steril çalışmalar başlamadan önce laminar kabinin içi % 96'lık etil alkolle temizlenmiş ve kabin içi 20 dk süreyle açık bırakılan ultraviyole (UV-C) lamba ile sterilize edilmiştir. Çalışmalarda kullanılacak aletler (bisturi, pens vb.) öncelikle %70'lik ticari alkol ile muamele edilip alev lambasında yakılarak steril edilmiştir.

Eksplantların kesimi, alüminyum folyo içine sarılarak otoklav edilmiş 10x15 cm boyutlarındaki fayanslar üzerinde yapılmıştır. Denemelerde kullanılan Magenta GA7, cam kavanozlar, cam petriler, eppendorf tüpler, mikro pipet uçları ise, otoklavda 1.02 atm basınç altında, 121°C’de 20 dk süreyle sterilize edilmişlerdir.

3.2.1.2. Besin ortamlarının hazırlanması

Çimlendirme besin yeri için ½ MS hazırlanmıştır. Tüm çalışmalarda hazır MS besin ortamı kullanılmıştır. Besin ortamlarına, karbon kaynağı olarak %3 (a/h) sakkaroz ilave edilmiş, tamamen çözündükten sonra ortamın pH’sı 0.1-1 N KOH ya da 0.1-1 N HCl ile pH 5.8’e ayarlanıp saf su ile istenilen hacme tamamlanmıştır. %0.8 (a/h) agar içeren otoklav şişesine boşaltılıp, otoklavda 1.02 atm basınçta 121°C’de sterilizasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra her magentaya 25 ml ortam aktarılmıştır.

3.2.1.3. Tohumların yüzey sterilizasyonu ve çimlendirilmesi

Çalışmamızda kullandığımız tohumlar ön sterilizasyon amacıyla 5 dakika akan çeşme suyunda ön sterilizasyona tabi tutulmuştur. Ardından %70’lik etil alkolde 1 dakika ve %20’lik ticari sodyum hipoklorik çözeltisinde 3 dakika bekletildikten sonra her biri beşer dakika olmak üzere 3 kez steril saf su ile durulanarak yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlar, daha önce hazırlanmış olan MS besin ortamı içeren kültür kaplarına ekimi yapılmıştır. Kültür kaplarına ekilen tohumlar 24 ±2°C sıcaklık, %65 nem, 5 LS ışık şiddeti, 16/8 saat aydınlık fotoperiyot süresi olacak şekilde kontrollü şartlar altında tutulan iklim odasında bekletilmiştir. (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. İklim odasında tohumların yetiştirilmesi

3.2.2. Protoplast kültürü

In vitro koşullarda yetiştirilen (2-3 haftalık) fidelerin Radikula ve Plumula organlarının üç farklı kombinasyonu (Radikula, Plumula ve Radikula+ Plumula) eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır (Şekil 3.2). Bu organların meristematik dokularındaki mitoz bölünme hızları ve taze hücrelerden elde edilecek protoplastların füzyon mekanizmasının çalışmasını kolaylaştırılacağı planlanarak çalışmaya yön verilmiştir. Çalışmamızda Ekmekçi ve Sözen (2005), tarafından geliştirilen metot düzenlenerek kullanılmıştır.

Şekil 3.2. *In vitro* şartlarda yetiştirilen fidelerin görüntüsü

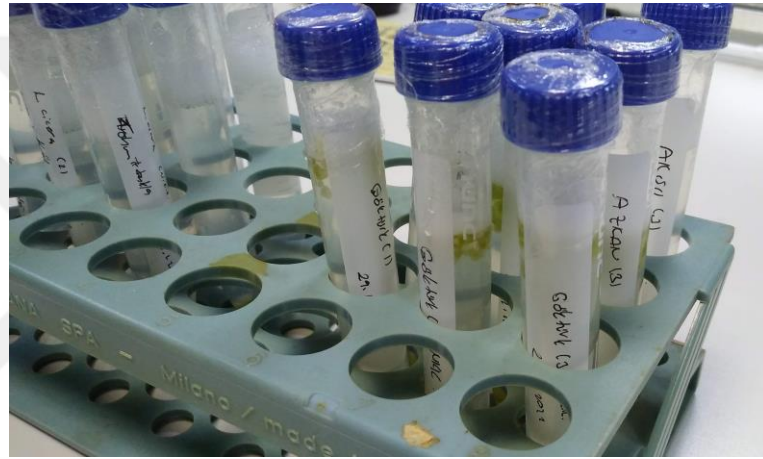
Çizelge 3.1. CPW Besin Ortamı İçeriği

Makro Elementler	mg/l	Mikro Elementler	mg/l	Enzim Karışımı	%
CaCl ₂ 2H ₂ O	1480	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	Pektinaz	0.5
KH ₂ PO ₄	27	KI	0.16	Selüloz	2
KNO ₃	1012	pH	5.8	Driselaz	0.1
MgSO ₂ 7H ₂ O	246				

Çalışmada ilk olarak Çizelge 3.1’de verilen CPW çözeltisi, Çizelge 3.2’te verilen Mprot Besin ortamı ve Çizelge 3.3’te verilen MS besin ortamı hazırlanmış ve otoklavda 1.5 atm basınçta 121°C’de sterilizasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra, her iki türün farklı organlarından alınan eksplantları 1 cm²’lik parçalara ayrılmıştır (Şekil 3.3). Steril koşullarda 100 ml CPW karışımı + % 9 Mannitol + % 10 sukroz olan ayrı ayrı 15 ml’lik steril falkon tüplerine parçalar yerleştirilmiştir (Şekil 3.4) (Reinert ve Yeoman, 2012). Ardından, 16 saat, 20- 22 °C karanlık içinde inkübe edilmiş ve 200 rpm de 2-3 dakika çalkalama yapıp 1 saatin sonunda protoplastlar tüpün altında dibe çökmüştür.



Şekil 3.3. Eksplantların bisturi yardımıyla parçalara ayrılması



Şekil 3.4. Kesilen parçaların falkon tüplere yerleştirilmesi

Türleri içeren enzim-protoplast karışımları mikropipet kullanılarak 1,5 ml' lik eppendorf tüpünün her birine 750 µl konulmuş, üzerine 100 ml CPW karışımı + % 9 Mannitol + %10 sukroz karışımından da tüplere 750 µl konulmuş, 10 dk 1000 rpm'de 3 defa santrifüj edilmiştir. Sonra her iki tür için protoplast izolasyonu yapılmıştır.

Çizelge 3. 2. Mprot Besin Ortamı İçeriği

Makro Elementler	mg/l	Mikro Elementler	mg/l	Organik Bileşikler	mg/l	Organik Bileşikler	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650	H ₃ BO ₃	6.2	Sukroz	30000	Driselaz	1
KNO ₃	1800	MnSO ₄ ·H ₂ O	22.3	Glycine	2	Pektinaz	1
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	ZnSO ₄ ·H ₂ O	8.6	Inositol	100	IAA	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	KI	0.86	Nikotinik Asit	0.5	2-4, D	1
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	Pridoksin-HCl	0.5	Zeatin	1
Na ₂ Edta	37.5	CuSO ₄ ·H ₂ O	0.025	Thiamin-HCl	0.1	IBA	1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	Sellülaz	1	NAA	1

İki türün füzyonunu yapmak için 600 µl ilk türün enzim protoplast karışımından alınıp boş kapaklı santrifüj tüpüne konulmuştur. Üzerine 600 µl ikinci türün enzim protoplast karışımından konulmuştur. Bunların üzerine 600 µl %20 selüloz, %30 driselaz, %15 pektinaz, %10 PEG konulmuştur (Çizelge 3. 2). 10 dk 1000 rpm’de 3 defa santrifüj edilmiştir (Dods ve Roberts, 1993; Dixon ve Gonzales, 1994).



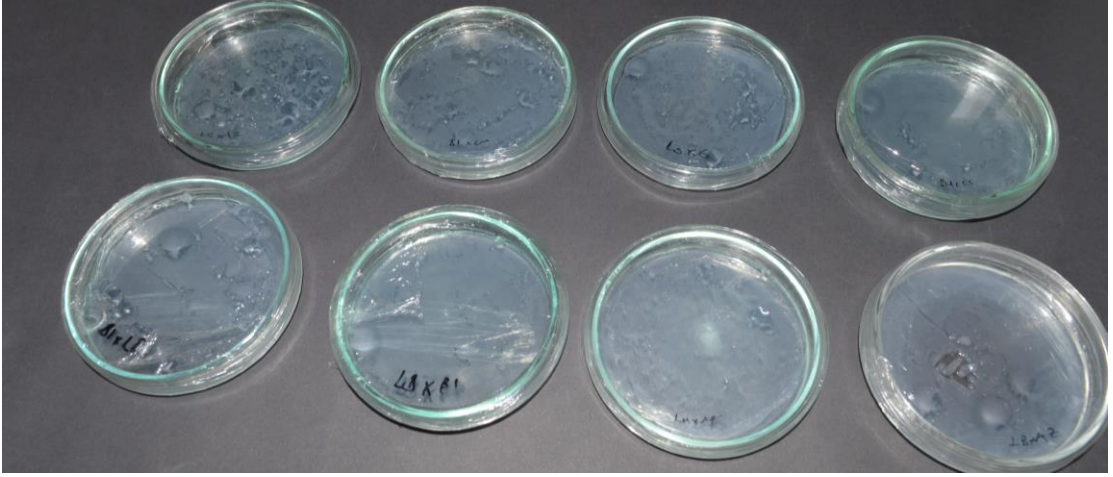
Şekil 3.5.Solda: Minispin’de santrifüj işlemi, Sağda: 1,5’luk eppendorf tüpünde enzim protoplast karışımının görüntüsü

Çizelge 3. 3. MS Besin Ortamı İçeriği

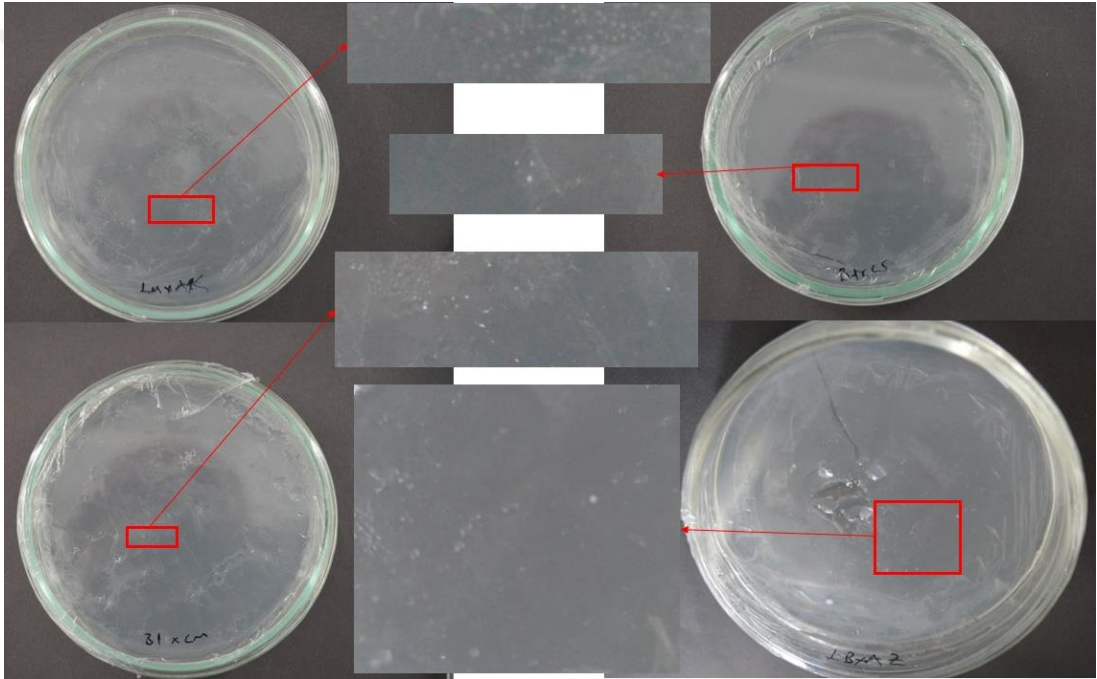
Makro Elementler	mg/l	Mikro Elementler	mg/l	Organik Bileşikler	mg/l	Organik Bileşikler	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650	H ₃ BO ₃	6.2	Sukroz	30000	Kinetin	1
KNO ₃	1800	MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3	Agar	10000	NAA	0.5
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	ZnSO ₄ 4H ₂ O	8.6	Glycine	2	2-4, D	0.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	KI	0.86	Inositol	100	IAA	0.5
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	Nikotinik Asit	0.5		
Na ₂ EDTA	37.5	CuSO ₄ 7H ₂ O	0.025	Pridoksin-HCl	0.5		
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	Thiamin-HCl	0.1		

Belirli süre önce hazırlanmış katı MS (Murashige ve Skoog, 1962) + (IAA+ Kin + 2,4 D + NAA) mediumlar (Çizelge 3.3.) üzerine füzyonu yapılmış olan (protoplast + enzim karışımı) sıvıdan her petriye 5 ml dökülmüştür. 24 saat karanlıkta, sonra 2 gün boyunca 500 lüx’lük, sonrasında ise daha fazla aydınlatma ile iklim dolabında gelişmeleri izlenmiştir (Dods ve Roberts, 1993; Dixon ve Gonzales, 1994).

Katı besi yerine aktarılmış protoplast+enzim karışımlarının görüntüleri Şekil 3.6’da, aktarıldıktan 60 gün sonra oluşmaya başlayan kallus görüntüleri ise Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.6. Katı besi yerine aktarılan protoplast + enzim karışımları



Şekil 3.7. Aktarımdan 60 gün sonra oluşmaya başlayan kallus görüntüleri (sol üst: *L. cicera* x Aksu melezi, sol alt: *L. cicera* x Bahadır melezi, sağ üst: *L. sativus* (S) x Bahadır melezi, sağ alt: *L. sativus* (B) x Azkan melezi)

3.2.2.1. Protoplast verimi ve istatistiki analizler

Araştırmada oluşan protoplast ve füzyon mekanizmaları mikroskop (Novex Microscopy, Holland) altında gözlemlenerek, protoplast verimlerini farklı eksplant kaynağı ve kullanılan türlerin çeşitlerine göre incelenmiştir. Protoplastların mikroskopta gözlemlenebilmesi için tripan mavisi ile boyama yapılmış ve hemisitometre yöntemi ile protoplast verimi incelenmiştir.

Protoplast verimi; 1 g taze bitki numunesinden ne kadar protoplast elde edildiğini ifade etmekte olup aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır. Bu çalışmada toplam protoplast verimi hesaplanmıştır (Ekmekçi ve Sözen 2005).

$$\text{Protoplast / ml} = \text{kare başına ortalama protoplast sayısı} \times \text{sulandırma faktörü} \times 10^4$$

$$\text{Toplam verim ise} = \text{protoplast/ml} \times \text{orijinal hacim}$$

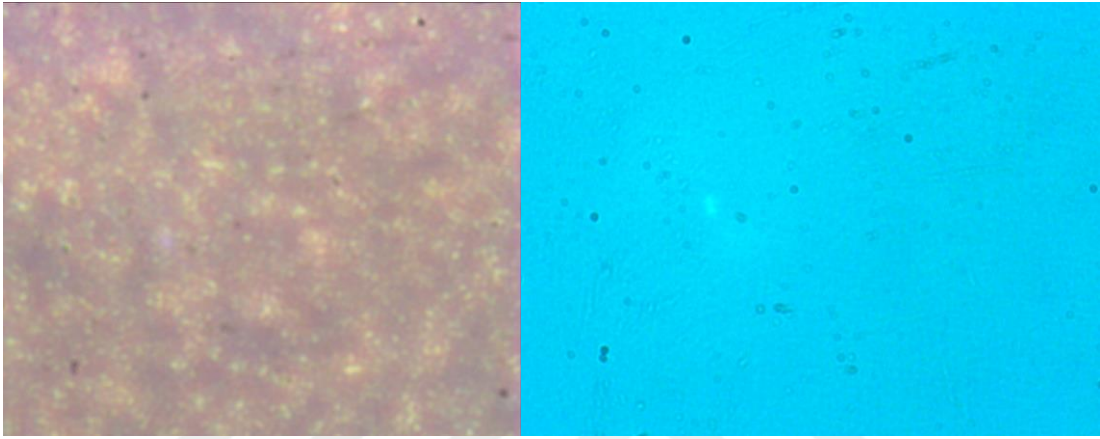
Elde edilen veriler üzerinde JMP 7 paket programı kullanılarak tanıtıcı istatistikleri yapılmıştır. Ayrıca mikroskop görüntüleri CellProfiler 4.2.5 paket programı ile “Image processing” işlemlerine tabi tutularak görüntü kalitesi artırılmıştır (Stirling ve ark., 2021).



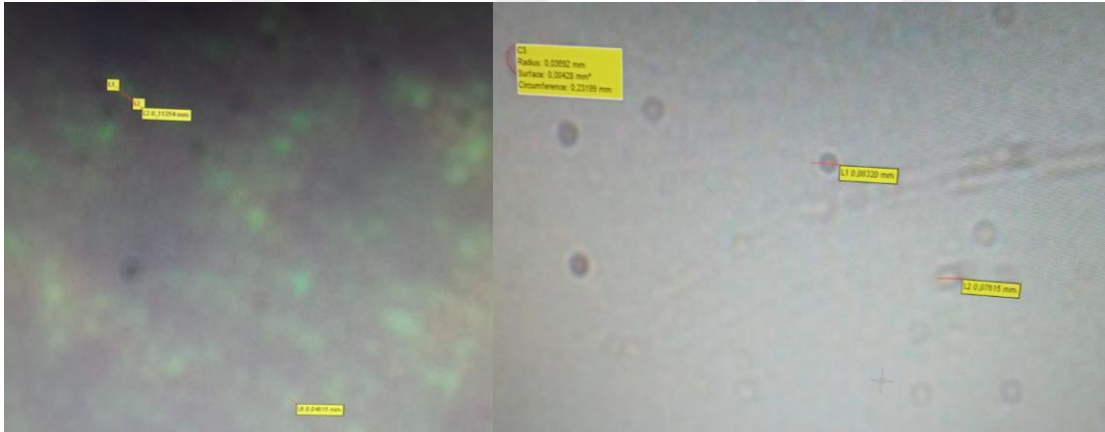
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Mikroskop Görüntülerinin İncelenmesi

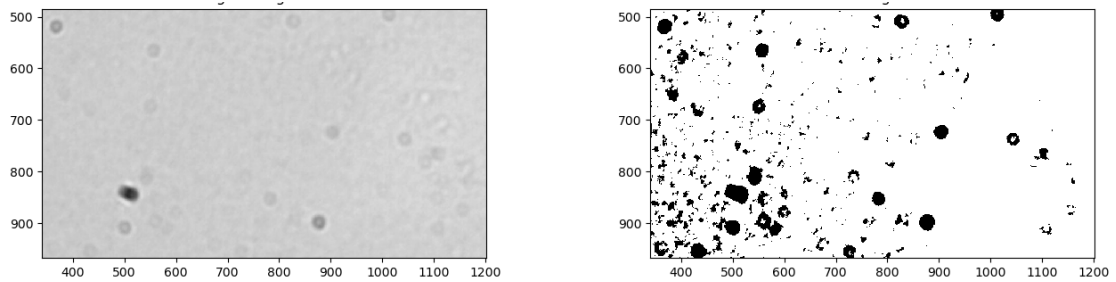
Mürdümük ve nohut üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* koşullarda protoplast kültüründe elde edilen mikroskop görüntüleri Şekil 4.1 verilmiş olup çalışmada elde edilen hücreler, 40 μm ile 110 μm arasında değiştiği saptanmıştır (Şekil 4.2).



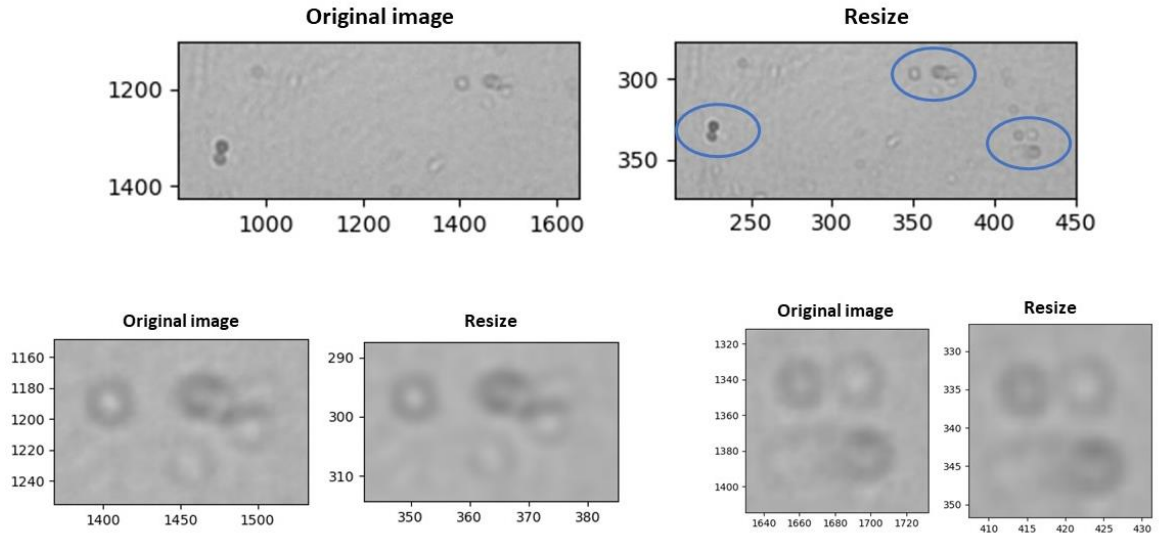
Şekil 4.1. Protoplast füzyonuna ait ışık mikroskopu altında görüntüsü (solda x400; sağda x1000)



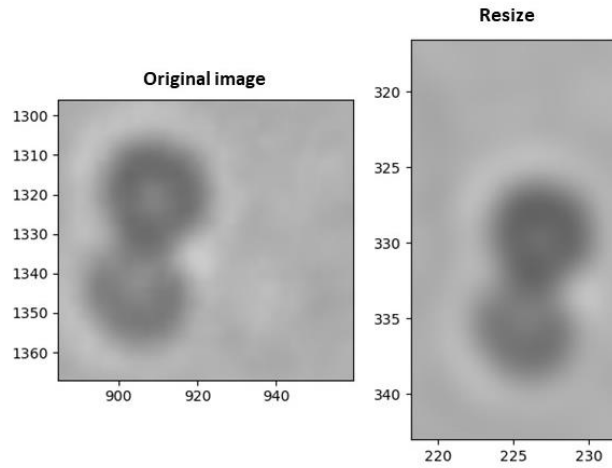
Şekil 4.2. Protoplast füzyonuna ait ışık mikroskopu altında görüntüsü (solda x400; sağda x1000)



Şekil 4.3. Işık mikroskopunda (x1000) elde edilen orijinal görüntü (solda) ve CellProfiler 4.2.5. programında elde edilen “threshold” görüntüsü



Şekil 4.4. Işık mikroskopunda (x1000) elde edilen orijinal görüntünün CellProfiler 4.2.5. programında elde edilen “resize” görüntüsü ve büyütülmüş çoklu füzyon görüntüsü



Şekil 4.5. Işık mikroskopunda (x1000) elde edilen orijinal görüntünün CellProfiler 4.2.5. programında elde edilen “resize” görüntüsü ve büyütülmüş füzyon görüntüsü

Araştırma sonucunda, tüm somatik melez gruplarında hücresel birleşme görülmüş olup, bu birleşmeler iki hücre birleşmesi olduğu gibi çoklu birleşmelere de rastlanılmıştır (Şekil 4.4-5).

4.2. Protoplast Verimi

Çalışmamızda ayrıca kullandığımız protoplast kültürü yönteminin, *Lathyrus* sp. ve *Cicer* sp. türleri için uyumluluğunu belirlemek amacıyla incelediğimiz protoplast verimleri Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2 de verilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda en iyi protoplast verimi melezlerde *L. cicera* X Göktürk nohut çeşidinde yaş ağırlıkta 25×10^5 protoplast g^{-1} bulunurken, en az protoplast verimi *L. sativus* (siyah genotipi) X Aksu nohut çeşidinde yaş ağırlıkta $2,5 \times 10^5$ protoplast g^{-1} sayımı gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1. Kullanılan türlere göre protoplast verimi (proplast g^{-1})

<i>Lathyrus</i> sp.	Nohut Çeşidi	Protoplast Verimi ($\times 10^5$)
<i>L. cicera</i> X	Bahadır	7,5
	Göktürk	25,0
	Azkan	22,5
	Aksu	17,5
<i>L. sativus</i> (B)	Bahadır	15,0
	Göktürk	20,0
	Azkan	17,5
	Aksu	7,5
<i>L. sativus</i> (S)	Bahadır	11,25
	Göktürk	12,5
	Azkan	7,5
	Aksu	2,5
Standart Sapma		6,9
Genel Ortalama		13,9

Çizelge 4.2. Kullanılan eksplant kaynaklarına göre protoplast verimi ($\times 10^5$ protplast g^{-1})

<i>Lathyrus</i> sp. Donör Materyali	<i>Cicer</i> sp. Donör Materyali			Ortalama
	Radikula	Plumula	Radikula+ Plumula	
Radikula	2,5	11,3	10,0	7,9
Plumula	7,5	15,0	18,8	13,8
Radikula+ Plumula	17,5	7,5	23,8	16,3
Standart Sapma	7,6	3,8	7,0	4,3
Ortalama	9,2	11,3	17,5	12,6

Eksplant türüne göre yapılan gözlemlerde *Lathyrus* sp. ve *Cicer* sp. cinslerinin her ikisinde ise en iyi protoplast verimi Radikula + Plumula olarak kullanılan materyallerde yaş ağırlıkta $23,8 \times 10^5$ protoplast g^{-1} , en düşük verim Radikula olarak kullanılan materyallerde yaş ağırlıkta $2,5 \times 10^5$ protoplast g^{-1} tespit edilmiştir.

4.3. Tartışma

Protoplast, hücre duvarları farklı yöntemlerle uzaklaştırılmış yapılar olup, iki farklı protoplast uygun şartlar altında hatta yeni bitkiler meydana getirebilmektedir. Somatik melezleme günümüzde bitki ıslahında verim, kalite veya hastalıklara dayanıklılık gibi farklı ıslah amaçlarını konu alan çeşitli araştırmalar (Bozdoğan ve ark., 2013). Yan ve ark. (2004) çeltikte bakteriyel yanıklık hastalığına karşı toleranslı bitki geliştirmede, McCutchan (2001) bezelyede antraknoz hastalığına tolerans için, Ekmekçi ve Sözen (2005) kekikte kalite artışı için bu somatik melezleme ile bitki elde etmişlerdir.

In vitro şartlarda yetiştirilen aksenik sürgün kültürleri, yüzey sterilizasyonu sırasında eksplantın zarar görmesi engellemesi veya bazı maddelerin kalıntısı maruz kalmaması nedeniyle protoplast kültüründe iyi bir başlangıç materyali olarak tanımlanmaktadır (Babaoğlu ve Özcan 2002).

Babaoğlu (2000), protoplast kaynağı olarak olgun eksize embriyolar, olgunlaşmamış kotiledonlar, fide kotiledonları, hipokotiller, epikotiller ve fide kök uçlarının kullanılabileceğini ifade etmiş ve çalışmasında *Lupinus mutabilis* bitkisinden protoplast izolasyonunda optimum eksplant kaynağını belirlemeyi hedeflemiştir. Çalışmasında eksplant kaynakları arasında sürgün ucu protoplast kaynağı yaş ağırlıkta $4,81 \times 10^6$ protoplast g^{-1} ile en yüksek protoplast verimi elde edilen kaynak olduğu ifade edilmiştir. Babaoğlu (2000)'in önerdiği protoplast kaynağına ek olarak, protoplast izolasyonunda kaynak materyali olarak embriyo, kök, polen gibi farklı organlarından faydalandığı belirten Gomez- Maldonado ve ark. (2001), yaptığı çalışmasında *Pinus pinaster* bitkisi için ilk defa fide gövdesini eksplant kaynağı olarak kullanmıştır. Geliştirdiği metodunda santrifüj işleminin protoplastları bozduğunu ifade etmiştir. Bununla birlikte, Jia ve ark. (2016), farklı hızlarda yapılan santrifüjlerin buğdayın yaprak mezofil hücrelerinden elde edilen protoplast verimlerine etkisini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, 0.4 M Manntiol içeren enzim solüsyonlarında ve 1000 rpm santrifüj hızında yaş ağırlıkta $7,31 \times 10^6$ protoplast g^{-1} ile en yüksek protoplast verimi

elde edildiği ifade edilmiştir. Gomez-Maldonado (2001)'in aksine Jia ve ark. (2016) santrifüj hızındaki artışın protoplast verimi ve canlılığı üzerine olumlu etkisi olduğunu bildirmiştir.

Araştırmamızda yöntem kullandığımız Ekmekçi ve Sözen (2005)'in çalışmasında da santrifüj işlemleri yer almakta olup farklı kekik türlerinde yaptıkları çalışmada protoplast verimini yaş ağırlıkta $2,8 \times 10^6$ protoplast g^{-1} olarak tespit etmiş ve çalışmada özellikle füzyon aşamasında santrifüjün yeri vurgulanmaktadır. Farklı bir füzyon metodu ile araştırmasını yürüten McCutchan (2001), yaptığı çalışmada bezelye ve mürdümük arasında elektrofüzyon yöntemiyle protoplast kültüründe protoplast verimini yaş ağırlıkta 2.0×10^5 protoplast g^{-1} olarak bulmuştur.

Protoplast verimi bitki türlerine ve yöntemlere göre değişkenlik gösterdiğini ifade eden (Zhou ve ark., 2019), *Platycladus orientalis* bitkisinde genç yapraklardan elde dokularla farklı yöntemler kullanılarak yaptıkları protoplast izolasyonu çalışmasında, optimum şartlarda en yüksek yaş ağırlıkta $4,8 \times 10^6$ protoplast g^{-1} protoplast verimine ulaşmışlardır. Yapılan kaynak araştırmaları ile bizim sonuçlarımız arasındaki farklılıklar kullanılan bitki türleri, füzyon mekanizmaları, kullanılan enzim solüsyonları, diğer bir ifade ile kullanılan yöntemler arasındaki farklılıklardan kaynaklanabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada nohut ve mürdümük bitkileri arasında protoplast kültürü füzyon yöntemi denenerek türlerin arasında melezleme yapılmıştır. Füzyon ile hücrel melezleme tekniğinin türlere uyumu ve füzyon başarısı gözlemlenmiştir.

Kullanılan türlere göre protoplast verimi ortalaması yaş ağırlıkta $13,9 \times 10^5$ protoplast g^{-1} olarak tespit edilirken, Kullanılan eksplant kaynaklarına göre protoplast verimi ortalaması yaş ağırlıkta $12,6 \times 10^5$ protoplast g^{-1} şeklinde tespit edilmiştir. Bu değerlere göre genel bir ifadeyle eksplant kaynağı olarak Radikula+ Plumula kullanımı ile protoplast veriminin artırmasıyla oluşacak yapılarda istenilen özelliklerdeki heterokaryonların elde edilebilme ihtimalini yükselteceği öngörülmektedir.

Elde edilen veriler doğrultusunda türlerin arasında hücrel melezlemenin başarılı bir şekilde yapılabildiği görülmüştür. Mikroskopik incelemelerde füzyon takibi ve protoplast verimleri incelenmiş olup, oluşan yapıları mediumlarda gelişimi takip edilmek üzere çalışma tamamlanmıştır.

Farklı türler arasında yapılacak olan protoplast kültürü çalışmaları tarımsal anlamda birçok hastalık etmenine karşı tolerans ve çevre şartlarına dayanım konusunda önemli etkileri söz konusudur. Bu açıdan incelerken yabani türlerin barındırdığı tolerans ve dayanım mekanizmaları aynı türden olmayan diğer bitkilere de aktarılmasında katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Akçin, A., 1988, Yemeklik dane baklagiller, *Selçuk Üniversitesi Yayınları*, 43, 307-367.
- Akdağ, C., 2001, Tokat'ta yüksek verim sağlayacak nohut çeşitleri ile ekim zamanlarının belirlenmesi, *GOÜ Ziraat Fakültesi Yayınları* (59).
- Anonymous, 2022, <https://www.plantcelltechnology.com/blog/protoplast-culture-çizolatçizlon-and-culture-methods-part1>, 27.12.2022 17:18 *Protoplast Culture: Isolatçizlon and Culture Methods (Part-1) - Plant Cell T echnology | Y our partner çizn plant t çizssue culture.*
- Azkan, N., Kaçar, O., Doğangüzel, E., Sincik, M. ve Çöplü, N., 1999, Bursa ekolojik koşullarında farklı ekim zamanlarının nohut hat ve çeşitlerinde verim ve verim öğeleri üzerine etkisi, *Türkiye*, 3, 15-18.
- Babaoğlu, M., 2000, Protoplast isolation in lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet): determination of optimum explant sources and isolation conditions, *Turkish Journal of Botany*, 24 (3), 177-186.
- Babaoğlu, M. ve Özcan, S., 2002, Protoplast kültürü ve somatik melezleme, *Bitki Biyoteknolojisi I*, 89-136.
- Bozdoğan, Ş. G., İşlek, C., Recep, K. ve Tülay, E., 2013, Briyofitlerde Doku Kültürü, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* (2), 124-130.
- Dixon, R. A. ve Gonzales, R. A., 1994, Plant cell culture: a practical approach, 145, IRL press, p.
- Dods, J. ve Roberts, L., 1993, Plant Tissue Culture, New York, USA.
- Ekmekçi, B. A. ve Sözen, E., 2005, Protoplast Füzyonu ile *Origanum Onites* ve *Origanum Majorana* Arasında Somatik Hibritlerin Eldesi ve Bunların Moleküler Analizle Onaylanması.
- FAO, 2022, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/LC>
- Géomez-Maldonado, J., Crespillo, R., éAvila, C. ve Céanovas, F. M., 2001, Efficient preparation of maritime pine (*Pinus pinaster*) protoplasts suitable for transgene expression analysis, *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 361-366.
- McCutchan, J. S., 2001, Transferring ascochyta blight resistance from *Lathyrus* sp. into field pea (*Pisum sativum* L.) via protoplast fusion (somatic hybridisation), University of Melbourne, Institute for Land and Food Resources, p.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum*, 15 (3), 473-497.
- Pekşen, E. ve Artık, C., 2005, Antibesinsel maddeler ve yemeklik tane baklagillerin besleyici değerleri, *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 20 (2), 110-120.
- Reinert, J. ve Yeoman, M. M., 2012, Plant cell and tissue culture: a laboratory manual, Springer Science & Business Media, p.
- Stirling, D. R., Swain-Bowden, M. J., Lucas, A. M., Carpenter, A. E., Cimini, B. A. ve Goodman, A., 2021, CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability, *BMC bioinformatics*, 22, 1-11.
- Toker, C. ve Çağırgan, M. İ., 1996, Kışlık Nohut (*Cicer arietinum* L.) Ekimi ve Islah Yaklaşımları, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9 (1), 123-137.

TÜBİVES, 2022, http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=hizli_ara.

TÜİK, 2022, [https://www.tuik.gov.tr/\(15.11.2022\)](https://www.tuik.gov.tr/(15.11.2022))

Yan, C.-q., Qian, K.-x., Xue, G.-p., Wu, Z.-c., Chen, Y.-l., Yan, Q.-s., Zhang, X.-q. ve Wu, P., 2004, Production of bacterial blight resistant lines from somatic hybridization between *Oryza sativa* L. and *Oryza meyeriana* L, *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A*, 5 (10), 1199-1205.

Zhou, Q., Jiang, Z., Li, Y., Zhang, T., Zhu, H., Zhao, F. ve Zhao, Z., 2019, Mesophyll protoplast isolation technique and flow cytometry analysis of ancient *Platycladus orientalis* (Cupressaceae), *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 43 (3), 275-287.

