

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BETA TÜRLERİ OLAN *Beta vulgaris* Var. *saccharifera*,
Beta vulgaris Var. *rapacea* ve *Beta vulgaris* Var. *cicla*
ARASINDA SOMATİK HİBRİDİZASYON VE
PROTOPLAST KÜLTÜRÜ**

**Hazırlayan
Özgür ÖZMEN**

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet ARSLAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2018
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BETA TÜRLERİ OLAN *Beta vulgaris* Var. *saccharifera*,
Beta vulgaris Var. *rapacea* ve *Beta vulgaris* Var. *cicla*
ARASINDA SOMATİK HİBRİDİZASYON VE
PROTOPLAST KÜLTÜRÜ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Özgür ÖZMEN**

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet ARSLAN**

**Ocak 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

4 11
Özgür ÖZMEN



YÖNERGEYE UYGUNLUK

“ *Beta* Türleri olan *Beta vulgaris* Var. *saccharifera*, *Beta vulgaris* Var. *rapacea* ve *Beta vulgaris* Var. *cicla* Arasında Somatik Hibridizasyon ve Protoplast Kültürü” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Özgür ÖZMEN

Danışman

Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

Prof. Dr. Mehmet ARSLAN danışmanlığında **Özgür ÖZMEN** tarafından hazırlanan “**Beta türleri olan *Beta vulgaris* Var. *saccharifera*, *Beta vulgaris* Var. *rapacea* ve *Beta vulgaris* Var. *cicla* arasında somatik hibridizasyon ve protoplast kültürü**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

04.01/2018

JÜRİ:

Başkan : Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

Üye : Doç. Dr. Satı UZUN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ufuk DEMİREL

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 16/01/2018 tarih ve 2018/03-06 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



...16/01/2018

Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ /TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca beni yönlendiren ve desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Mehmet ARSLAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca Genom ve Kök Hücre Merkezi Bitki Biyoteknolojisi Birimi Doku Kültürü Laboratuvarındaki imkanları ve desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Kahraman GÜRCAN ve Ziraat Mühendisi Anıl Mehmet BALTACI, Arş. Gör. Ahmet SAY çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilir, saygılarımı sunarım.

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olup beni destekleyen ve bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özgür ÖZMEN

Kayseri, 2018

BETA TÜRLERİ OLAN *Beta Vulgaris* Var. *saccharifera*, *Beta vulgaris* Var. *rapacea* ve *Beta vulgaris* Var. *cicla* ARASINDA SOMATİK HİBRİDİZASYON VE PROTOPLAST KÜLTÜRÜ

Özgür ÖZMEN

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2018
Danışman: Prof. Dr. Mehmet ARSLAN**

ÖZET

Yapılan bu çalışmada farklı Beta varyeteleri arasında protoplast füzyonu gerçekleştirerek ıslah çalışmaları için farklı genetik varyasyonlar elde etmek ve protoplast izolasyonu, yaparak protoplast füzyonunu açısından Beta türlerinde uygulanabilir pratik bir protokol oluşturmak hedeflenmiştir. Bu çalışmada in vivo koşullarda yetiştirilmiş şeker pancarı (*Beta vulgaris* Var. *saccharifera*), hayvan pancarı (*Beta vulgaris* Var. *rapacea*) ve pazı (*Beta vulgaris* Var. *ruba*) yapraklarından protoplast izolasyonu ve füzyonu gerçekleştirilmiştir. Yüzey sterilizasyon denemeleri sonucunda, yaprak eksplantlarında % 0.1 HgCl₂ sterilizasyon yöntemiyle, % 100 oranında sterilizasyon başarıları sağlanmıştır. Şeker pancarı eksplantlarında en yüksek canlı protoplast sayısı 16 saatlik enzim inkübasyonundan elde edilmiştir. Hayvan pancarı ve pazıda ise 12 saat'lik inkübasyon sonucunda elde edilmiştir. Elde edilen protoplastlar ile füzyon çalışması yapabilmek için PEG6000'nin üç farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. Şeker pancarı x pazı ve şeker pancarı x hayvan pancarı arasında en yüksek ikili füzyon (59 adet ve 62 adet ile) elde edilen uygulama 20 dk % 20 PEG6000 uygulamasıdır. Elde edilen füzyon ürünleri mikrokallus oluşumu için farklı büyüme düzenleticiler içeren Murashige ve Skoog (MS) süspansiyon ortamına aktarılmıştır. Araştırma sonucunda da en iyi mikrokallus oluşumu 2 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP ve 0.2 mg/L 2,4 D içeren süspansiyon ortamından elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Şeker pancarı (*Beta vulgaris saccharifera*), Hayvan Pancarı (*Beta vulgaris rapacea*), Pazı (*Beta vulgaris cicla*), protoplast izolasyonu, PEG (Polietilen glikol), protoplast füzyonu

**SOMATIC HYBRIDIZATION AND PROTOPLAST CULTURE
BETWEEN *Beta vulgaris* Var. *saccharifera*, *Beta vulgaris* Var. *rapacea*
and *Beta vulgaris* Var. *cicla* WITH BETA VARIETIES**

Özgür ÖZMEN

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M.Sc. Thesis, January 2018

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

ABSTRACT

In this study, it was aimed to create genetic variations by protoplast fusion between different Beta varieties for breeding studies and to establish a practical protoplast isolation and fusion protocol. In this study protoplast isolation and fusion were performed from leaves of *Beta vulgaris* Var. *saccharifera*, *Beta vulgaris* Var. *rapacea* and *Beta vulgaris* Var. *ruba* grown in vivo conditions. As a result of surface sterilization experiments, 100% sterilization success was achieved in leaf explants by STR1 sterilization method. The highest live protoplast number for sugar beet explants was obtained from 16 hours of enzyme incubation. The highest live protoplast number for fodder beet and explants was obtained from 16 hours of enzyme incubation. To obtain protoplast fusion three different concentrations of PEG6000 were used. The highest double fusion between sugar beet and chard (59 double fusion) and between sugar beet and fodder beet (62 double fusion) were obtained with 20% PEG6000 20 min application. Micro callus formation was obtained by taking the fusion products in MS suspension culture. The best micro callus formation was obtained from 2 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP and 0.2 mg/L 2,4 D application.

Key words: *Beta vulgaris saccharifera*, *Beta vulgaris rapacea*, *Beta vulgaris cicla*, Protoplast isolation, PEG (polyethylene glycol), protoplast fusion

İÇİNDEKİLER

BETA TÜRLERİ OLAN *Beta vulgaris* Var. *saccharifera*, *Beta vulgaris* Var. *rapacea* ve *Beta vulgaris* Var. *cicla* ARASINDA SOMATİK HİBRİDİZASYON ve PROTOPLAST KÜLTÜRÜ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL ONAY	iii
ÖNSÖZ /TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Protoplast Füzyonu ve Somatik Hibridizasyon.....	5
1.1.1. Mekanik Füzyon	5
1.1.2. Spontan Füzyon	5
1.1.3. Uyarılmış Füzyon	5
1.1.4. Elektrofüzyon.....	6
1.1.5. Polietilen Glikol (PEG) İle Füzyon	6
1.2. Yapılan Çalışmalar	6

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitkisel Materyal	28
------------------------------	----

2.2. YÖNTEM.....	29
2.2.1. Deneme Alanı.....	29
2.2.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	29
2.2.3. Yaprak Yüzey Sterilizasyonu	29
2.2.4. Protoplast İzolasyonu Öncesi Ön İşlem.....	31
2.2.5. Enzim Solüsyonunun Hazırlanması.....	31
2.2.6. Protoplast Saflaştırma	33
2.2.7. İzole Edilen Protoplastların Sayımı ve Canlılıklarının Belirlenmesi	34
2.2.8. Hemositometri Camı ile Protoplast Sayımı.....	34
2.2.10. PEG 6000 Hazırlanması.....	36
2.2.11. Mikrokallus Oluşumu	37
2.2.12. Verilerin Değerlendirilmesi	38

3. BÖLÜM

ARAŞTIRMA ve BULGULAR

3.1. Yaprak Yüzey Sterilizasyonu.....	39
3.2. <i>In Vivo</i> Kökenli Şeker Pancarı, Hayvan Pancarı, Pazı Protoplast İzolasyonu ve Mikrokallus Oluşumu	40
3.2.1. Protoplast İzolasyonu.....	40
3.2.2. Elde Edilen Protoplastların Füzyonu	43
3.2.3. Protoplast Füzyon Ürünlerinden Mikrokallus Elde Edilmesi	44

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ.....	59

KISALTMALAR ve SİMGELER

<u>Sembol</u>	<u>Anlamı</u>
2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
BAP	6-Benzilaminopürine
BA	Benziladenin
g, mg	gram, miligram
IAA	Indol 3 asetik asit
IBA	Indol 3 bütirik asit
l, ml, µl	Litre, mililitre, mikrolitre
mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog
NAA	α-Naftalenasetik asit
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
NaOH	Sodyum hidroksit
°C	Santigrad derece
AgNO ₃	Gümüş nitrat
KIN	Kinetin
SD	Serbestlik Derecesi
PEG	Polietilen Glikol

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Türkiye'de il bazında şeker pancarı üretimi TÜİK 2016	2
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan eksplant örneklerinin yüzey sterilizasyonu için HgCl ₂ oranı denemesi.....	30
Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan enzim solüsyonunun içeriği.....	31
Tablo 2.3. CPW yıkama solüsyonu içeriği.	33
Tablo 2.4. Füzyon ürünlerinin aktarıldığı süspansiyon ortamları.	37
Tablo 2.5. Çalışmada kullanılan, MS ortamı (Murashige ve Skoog, 1962) makro ve mikro elementler ve miktarları [63].	37
Tablo 3. 1. Farklı HgCl ₂ uygulamalarının canlı doku oranına ait varyans analiz tablosu	39
Tablo 3.2. Farklı HgCl ₂ uygulamalarının canlı doku oranı üzerine etkisi (%).....	39
Tablo 3.3. Şeker pancarı, hayvan pancarı ve pazı bitkilerinde enzim inkübasyon sürelerine göre bir mililitredeki canlı protoplast sayıları	40
Tablo 3.4. Şeker pancarı, Hayvan Pancarı ve Pazı bitkilerinde enzim inkübasyon sürelerine göre in vivo kökenli izole edilen ölü protoplastların 1ml'deki sayıları	41
Tablo 3.5. Füzyon sonrası elde edilen ikili ve çoklu füzyon sayısı.....	43
Tablo 3.6. Şeker pancarı x hayvan pancarı füzyonlarından oluşan mikrokallus süspansiyon ortamlarının varyans analiz tablosu	46
Tablo 3.7. Şeker pancarı x hayvan pancarı füzyon ürünleri mikrokallus oluşum oranı (%).....	46
Tablo 3.8. Şeker pancarı x pazı füzyonlarından oluşan mikrokallus süspansiyon ortamlarının varyans analiz tablosu.....	47
Tablo 3.9. Şeker pancarı x hayvan pancarı füzyon ürünleri mikrokallus oluşum oranı (%).....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Sera ve büyüme odasında yetiştirilen 4-6 haftalık şeker pancarı, hayvan pancar ve pazı bitkileri	30
Şekil 2.2. Eksplant olarak kullanılan taze şeker pancarı yaprakları	30
Şekil 2.3. Yaprak eksplantları bistirü ile kesilerek 1 mm kalınlıkta yaprak parçalarının elde edilmesi ve 14 saat sonra yaprak parçalarının enzim solüsyonunda parçalanması	32
Şekil 2. 4. Enzim inkübasyonu sonunda 35 µm por çaplı nylon mesh filtre ile süzülerek yaprak parçalarının uzaklaştırılması.	32
Şekil 2.5. Santrifüj sonrası dibe çöken protoplastlar	33
Şekil 2.6. Hemositometri camı altında trypan blue boyası kullanarak canlı ve ölü protoplast sayımı	34
Şekil 2.7. Hemositometri camı üzerindeki kareler	35
Şekil 2.8. Füzyon Sonrası ikili ve çoklu füzyon ürünlerinin sayılması.....	36
Şekil 3.1. Farklı HgCl ₂ uygulamalarında canlı ve ölü dokular	40
Şekil 3.2. Şeker pancarı, Hayvan pancarı ve Pazı'dan izole edilen canlı protoplast sayısı (10 ⁶).....	42
Şekil 3.3. Şeker pancarı, Hayvan pancarı ve Pazı'dan izole edilen ölü protoplast sayısı (10 ⁶).....	42
Şekil 3.4. Çevresinde hücre duvarı oluşan protoplastlar.	44
Şekil 3.5. Oluşan hücrelerin çoğalarak hücre kolonilerinin oluşumu	44
Şekil 3.6. 40x mikroskop altında gözlemlenen mikrokalluslar	45
Şekil 3.7. 4x mikroskop altında on dört günlük mikrokalluslar	45

GİRİŞ

Beta vulgaris Var. *saccharifera*, *Beta vulgaris* Var. *rapacea* ve *Beta vulgaris* Var. *cicla*, *Amaranthaceae* (Ispanakgiller) familyasının sahip olduğu 2400 tür içerisinde ticari öneme sahip olan üç alt türdür. *Beta* genusu 8 türe sahiptir ve *Beta vulgaris* Var. *saccharifera*, *Beta vulgaris* Var. *rapacea*, *Beta vulgaris* Var. *cicla* *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* türü içerisinde yer almaktadır[1].

Beta vulgaris subsp. *vulgaris* türü sekiz alt türe sahiptir. Bunların içerisinde dünya genelinde ekonomik önemi olan alt türleri *Beta vulgaris* Var. *saccharifera*, *Beta vulgaris* Var. *rapacea* ve *Beta vulgaris* Var. *cicla*'dır. Batı akdeniz kıyıları ve Macaronesian adaları *Beta vulgaris* Subsp. *vulgaris* türünün doğal akrabalarının bulunduğu bölgeler arasında avrupadaki en yaygın biyoçeşitliliğe sahip olan noktalardandır[2].

Şekerpancarı, depo kökünden şeker üretilen, ıspanakgiller familyasına ait 2 yıllık endüstriyel bir bitkidir. Birinci yıl vejetatif organları, sonraki yıl ise generatif organları gelişir. Tohumları monogerm veya poligerm halde bulunur. Bitki boyu yetiştiği toprak koşullarına, iklime ve türüne göre 85-180 cm arasında değişmektedir. Şeker pancarının yapısı %4-5 hücre dokusu, %4-5 kimyasal bağlı su, %90-95 öz suyu'ndan oluşmaktadır. Pancar öz suyunun bileşimi ise %12-21 şeker (sakkaroz), %1.0-1.6 diğer şeker dışı organik maddeler, %0.8 anorganik tuzlardan oluşmaktadır[3].

Dünyada şeker üretiminin %30'u şeker pancarından elde edilir. Dünyada en çok şeker pancarı yetiştiren ilk üç bölge Avrupa Birliği, ABD ve Rusya'dır. Avrupada en çok şeker pancarı üretimi iklimin şeker pancarı gelişimine uygun olduğu avrupanın kuzey yarısında yapılmaktadır. En çok üretim yapan alanlar Fransa, Almanya, Birleşik Krallık ve Polonya'dır.

Türkiyede ise şeker pancarı üretiminde en çok rol oynayan iller iç anadolu bölgesinde yer almaktadır. Bu kadar önemli bir gelir kaynağı olan bir ürünün tohum üretimi ülkemizde yapılmamaktadır. Bunun nedeni ise genellikle şeker pancarı ıslahının zor olması ve ıslahçıların ellerinde yeterli genetik popülasyonun olmadığı öngörülmektedir.

Tablo 1.1. Türkiye’de il bazında şeker pancarı üretimi TÜİK 2016

İl	Üretim(ton)	Verim(kg/da)
Konya	5.614.078	6.957
Yozgat	1.789.001	5.962
Eskişehir	1.238.296	5.825
Aksaray	1.122.669	6.879
Kayseri	1.011.666	5.327
Afyon	824.812	6.282
Karaman	721.788	6.841
Sivas	645.855	5.271
Tokat	636.075	5.812
Kahramanmaraş	566.000	7.145

Beta vulgaris, *Trifolium pratense*, *T. repens*, *Prunus avium*, *Parthenium argentatum* ve *Brassica sp.* gibi türleri kapsayan çok önemli kültür bitkileri iyi bilinen bir uyuşmazlık sistemine sahiptir. *Beta vulgaris* türünde gametofitik bir uyuşmazlık vardır. Gametofitik uyuşmazlıkta poelenin dölleme konusunda göstereceği tepki mayoz bölünmeden sonra ortaya çıkar. Gametofitik kısırılığın yapısında bir çok lokus yer alır. Bu kısırılıktan sorumlu genin sayısı ikiden fazladır, örneğin bazı çalışmalarda lahanda bu sorumlu genin 50-70 adet allelinin olduğu kabul edilir. Gametofitik durumda polen dişicik tepesinde çimlenebilir fakat polen borusunun oluşması kimyasal tepkiler nedeniyle yavaşlatılır ve polen borusu ovüldeki yumurta hücrelerine ulaşamaz[4].

Klasik ıslah çalışmaları kullanılarak yeni genotipik karakterlere sahip bitkilerin daha az maliyetli ve daha kısa zamanda geliştirilme olasılığı yüksektir[5]. Bu durumu göz önünde buldurularak *Beta vulgaris* türünde; intraspesifik (tür içi) hibridizasyon kullanarak yeni genotiplerin bulunması mümkünken, interspesifik (türler arası) ve

intergenerik (cinsler arası) hibridizasyonda henüz kullanılabilir bir durumda olan yöntem başarılı bir şekilde gerçekleştirilememiştir[6].

Şeker pancarı ıslahı çalışmalarında en önemli sorunlardan birisi ise kendine uyumsuzluk olmasıdır. Şeker pancarındaki kendine uyumsuzluk mekanizması istenilen genlerin bir araya getirilerek istenilen çeşidin oluşturulması sağlanamamaktadır. Ancak bitki biyoteknolojisindeki yeni gelişmeler, Beta vulgaris türlerinin genotiplerinin yeni tekniklerle geliştirilmesini olağan duruma getirmektedir. Bu yeni uygulamalar arasından somatik hibridizasyon ve genetik transformasyon ön plana çıkmaktadır. Fakat bu uygulamalar için verimli bir protoplast kültürü ve transformasyonu gerekmektedir[7].

Bitki protoplastları, farklı bir ifadeyle “çıplak hücreler”, modern biyoteknolojiye tek hücreli sistemlere dayalı farklı yaklaşımlar sunmaktadırlar. Genomiks, proteomiks ve metabolomikslerdeki gelişmeler; ozmotik özelliğe sahip, kırılğan ve çepersiz hücrelerin önemini ortaya çıkartarak bu hücelere olan ilgiyi arttırmıştır[8].

Protoplastlar, somatik hücrelerin füzyonu ile oluşturulan somatik hibrit çalışmalarından gen transformasyonu çalışmalarına kadar pek çok yaygın çalışma alanına sahip bir kullanım alanına sahiptirler[9]. Protoplast kültürlerinin öncelikli uygulama alanları; temel araştırmalar (histolojik, sitolojik, morfolojik, fizyolojik, metabolik, genetik, moleküler vb.) protoplast füzyonu kullanılarak somatik melezleme sonucu somatik hibritlerin ve sibritlelerin elde edilmesi; çekirdek, organel, kromozom ve DNA parçalarının aktarımı; totipotensi özelliğinden kullanarak protoplastlardan tam bitkinin elde edilmesi; protoplastlar kullanılarak oluşturulan hücre süspansiyon kültürleri veya kallus kültürleri yardımıyla organ veya embriyo rejenerasyonlarının oluşturulması; asimetric hibrit bitkilerinin elde edilmesi; somaklonal varyabilitenin oluşturulması; gen aktarım teknikleri kullanılarak genetiği değiştirilmiş bitkilerin elde edilmesi; klasik ıslah yöntemleri ile türler arası ve cinsler arası melezlemelerde meydana gelen sorunların aşılması; tek hücre klonlarının elde edilmesi; *in vitro* seleksiyon tekniğinin uygulanması; mutajen ajanlar kullanılarak elde edilen mutant hücrelerin belirlenmesi; bitki patolojisi ile ilgili çalışmalara uygulanması; agar üzerinde sıvı kültür, agaroz blokları kültürü, ince aljinat tabaka kültürü ve immobilize kültürler gibi çeşitli protoplast kültür tekniklerinin oluşturulması olarak sayılabilir[10].

Protoplast füzyonu üreme hücreleri birleşmeksizin iki hücre arasında füzyon gerçekleşerek poligenik özelliklerin bulunduğu yeni organizma oluşturabilmemizi sağlamaktadır. Bu yöntem ile sadece çekirdekteki genleri değil protoplast içerisindeki bulunan diğer genetik materyalleri de aktarmış oluruz. Protoplast füzyonu ve bu yolla elde edilen rejenerasyonların genomik DNA'ları dışında mitekondriyal ve kloroplast DNA'larının transferine imkan sağlamaktadır. Bu nedenle protoplast füzyonu bitki ıslahı ve geliştirilmesi için büyük öneme sahip bir methoddur[11]. Protoplast füzyonu yeni yetenekler kazandırılmış birleştirilen hücrelerin konvensiyonel ıslahta veya geleneksel ıslah methodlarında daha hızlı bir alternatif sağlamasıyla ilgilidir. Farklı Beta türleri olan *Beta vulgaris* Var. *saccharifera*, *Beta vulgaris* Var. *rapacea* ve *Beta vulgaris* Var. *cicla* arasında somatik hibridizasyon ve protoplast kültürü adlı bu tezimde şeker pancarı ıslah çalışmalarında kullanılacak yeni genetik varyantlar elde etmektir. Beta türleri arasındaki uyumsuzluğu somatik hibridizasyon yöntemi kullanarak aşmak ve yeni genetik varyantlar elde edilmesini sağlamaktır. Somatik hibridizasyon yöntemi gen transformasyon yöntemlerine alternatif bir yöntem olarak gösterilmektedir ve gen transformasyon yöntemlerinin son zamanlardaki dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda somatik hibridizasyon yönteminin önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Protoplast Füzyonu ve Somatik Hibridizasyon

Belirli uygun koşullar sağlandığında iki değişik kaynaktan alınan protoplastların ve çekirdeklerin uygun yöntemler ile birleştirilmesi sonucunda (füzyon) elde edilen hücreye somatik hibrit hücre adı verilir. Somatik hibrit ibaresi, eşeyli bir şekilde çoğalan hücreler (sper, yumurta) yerine somatik (vejetatif) hücrelerin birleşerek oluşması sonucu hibrit hücre meydana gelmesi olarak tanımlanmaktadır[12].

Somatik hibrit hücreleri elde edebilmede kullanılan birden fazla yöntem vardır.

1.1.1. Mekanik Füzyon

Bu prosedürde protoplastların füzyonu için rastgele bir kaynaştırıcı ajana gerek duyulur, protoplastlar mekanik bir etkileşim ile iki hücre füzyon olarak birleşmesi sağlanır[13].

1.1.2. Spontan Füzyon

Bu tür hücre birleştirme prosedürlerinde genellikle farklı türlere ait protoplastların aynı enzim karışımı içerisinde izole ederken karşılaşılır. Enzim solüsyonu içinde bulunan farklı türlerdeki hücreler, özellikle genö yapraklardan alınan hücreler kolay bir şekilde birleşebilirler[13].

1.1.3. Uyarılmış Füzyon

Yapay deniz suyu, lizozim, polietilen glikol (PEG), yüksek pH/Ca⁺⁺, polivinil alkol dektran, elektriksel akım ve dekstran sülfat kullanılarak protoplastların uyarılması ile füzyona uğratılmasını sağlayan methodtur[13].

1.1.4. Elektrofüzyon

Kullanılan bu methodta protoplast örnekleri değişik akımlardaki elektriksel yüke maruz bırakılarak füzyonu sağlanmaktadır[14]. Bu yöntemin avantajı diğer yöntemlere göre daha seçici bir füzyon oluşturmastır. Bunun yanı sıra kullanılan diğer yöntemlerdeki uyarıcılar oluşturabileceği sitotoksik etkiler görülmemektedir[13].

1.1.5. Polietilen Glikol (PEG) İle Füzyon

Polietilen glikol kullanılarak yapılan füzyon methodu elektrofüzyon methoduna göre daha yaygın olarak kullanılmaktadır[13]. Bu kullanılan methodta uygun iyon kombinasyonunda ve konsantrasyonunda (P⁺, Ca⁺⁺ vb.) ve PEG solüsyonunun içerisinde protoplastların adhezyonlarını yükselterek birirleri arasında kaynaşması ve füzyonunu gerçekleştirir[14]. Füzyon solüsyonundaki PEG konsantrasyonu oldukça önemlidir. Düşük oranda PEG'nin etkisi füzyon başarısını, yüksek oranda ise hücrelerin canlılık ve rejenerasyon miktarını negatif yönde etkilemektedir.

1.2. Yapılan Çalışmalar

Kao vd. farklı cinslerin füzyonu ve gelişimi adlı çalışmalarında; kimyasal yöntem olan PEG kullanmışlardır. Bu çalışmada PEG1500 ve PEG 4000 olarak iki farklı yoğunlukta PEG oranları denenmişlerdir. Maksimum heterokaryotik şekillenme *V. hajastana* *Grossh-soya* fasulyesi (*Glycine max L.*) ve arpa (*Hordeum vulgare L.*)-soya fasulyesi % 23, bezelye (*Pisum sativum L.*)-soya fasulyesi % 35, bezelye-*V. hajastana* % 20, mısır (*Zea mays L.*)-soya fasulyesi %14 ve *V. villosa* -*V. Hajastana* % 10 olarak tespit etmişlerdir. Arpa-soya fasulyesi, mısır-soya fasulyessi ve bezelye-soya heterokaryonlarının % 40'ı en az bir kez bölündüğünü tespit etmişlerdir. İki haftada 100 hücreye kadar kümelenmelerin olduğu ve pek çok kez bölündüğünü gözlemlemişlerdir. *V. hajastana*-soya fasulyesi, pea-soya fasulyesi, mısır-soya fasulyesi ve arpa-soya fasulyesi kendi aralarında mitoz bölünme ile oluşan heterokaryonları çekirdek boyama işlemi kullanarak tespit etmişlerdir. Çekirdek füzyonu ve doğrudan

hibrit formasyonu genellikle protoplast füzyonundan sonra ilk mitotik bölünme boyunca ortaya çıktığını gözlemlemişlerdir. Arpa-soya fasulyesi arasındaki hibrit oluşumunu üçüncü bölünmede ortaya çıktığını belirlemişlerdir. Çekirdek füzyonunda gözlemlenen heterokaryonların sıklığını belirleyememişlerdir. Aynı zamanda çok kutuplu şekillenmeler ve kimerik hücrelerin olduğunu belirlemişlerdir[15].

Dudits vd. protoplast füzyonu ile *Daucus carota* ve *D. Capillifolius* arasında somatik hibridizasyon çalışması gerçekleştirmişlerdir. Albino havuç (*Daucus carota*) ve yeşil *D. eapillifolius* bitkileri kullanarak elde ettikleri hücre kültüründen izole yaparak, elde ettikleri protoplastları polietilen glikol ile füzyonunu gerçekleştirmişlerdir. Somatik hibrit bitkilerin seçimini hibritlerde fotosentetik fonksiyonların restorasyonunu temel alarak yapmışlardır. Embriyo kültüründen seçtikleri yeşil küçük bitkileri yaprak morfolojisi ile tespit etmişlerdir. Türler arası protoplast füzyonunun ebeveynler arasında yakınlığın olduğu yapraklar ile yeşil bitki oluşarak sonuçlandığını gözlemlemişlerdir. Turuncu köklü havuç varyetesi ve uzun beyaz köklü *D. Eapillifolius* arasındaki somatik embriyoların uzun, beyaz ve etli kökler ürettiğini belirlemişlerdir. Paraseksüel hibritlerin sitolojik analizinde 34 ve 54 kromozom sayıları arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Kromozom sayılarının ise çoğunlukla $2n=36$ olduğunu belirlemişlerdir. Hibritlerin aynı zamanda bazılarında 34 ve 35 kromozoma sahip olduğunu da belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalarda somatik hibritlerin aynı yaprak peroksidaz enzimi örneği taşıdığını belirlemişlerdir[16].

Fowke vd. protoplast füzyonuyla havuç hücresi içerisine *Alga Chlamydomonas reinhardii* (Yeşil alg) organellerinin transferi çalışmalarında; hücre duvarı olmayan mutant bir yeşil alg, polietilen glikol kullanarak füzyon çalışması yapmışlar ve füzyon ürünlerini kültüre almışlardır. Füzyonda yeşil alg ve havuç membranları birleşmesinin sağlamışlar ve havuç sitoplazmasının içerisine yeşil algin organellerini göndermişlerdir. Yeşil alglerin bazal organellerin füzyon ürünlerinde var olduğunu belirlemişlerdir. Kültüre alınan füzyon ürünlerinin hücre duvarlarını rejenere ettiğini gözlemlemişlerdir ve çoğu yeşil alg organelleri kültür sürecinde dejenere olduğunu belirlemişlerdir. Fakat havuç kloroplastı 10 gün sonra hala tanımlanabilir halde olduğunu gözlemlemişlerdir [17].

Wetter vd. *Nicotiana glauca* ile *Glycine max-Nicotiana glauca* hibrit hücrelerinin protoplast füzyonundan elde edilen heterokaryonlarını kromozom ve izoenzim çalışmasında; *Glycine max (L)Merr.- Nicotiana glauca Grah.* Somatik hibritleri *N. glauca* kromozomlarının öncelikli bir kaybını belirlemişlerdir. Bu tür hibrit hücrelerden elde edilen protoplastlar *N. Glauca* protoplastlarına iki defa geri füzyon yapıldığı zaman, *N. Glauca* kromozomlarında kayda değer bir artış gözlemlemişlerdir. Yaptıkları aspartat aminotransferaz jel elektroforez çalışmalarında bu enzimlerden sorumlu kromozomların hibrit hücre hatlarında geri füzyon çalışmasında stabilize edildiğini göstermişlerdir. Elde edilen bilgide somatik hibrit stabilizasyonunun hedeflendiği bu çalışmada geri füzyon çalışmalarını tanımladığını göstermişlerdir[18].

Gleba vd. *Atropa belladonna (X) Nicotiana chinensis* bitkilerinden elde edilen protoplastlarla yapılan füzyon sonucu elde edilen somatik hibrit hücre hatları çalışmasında; mekanik izolasyon ile *Atropa belladonna*'da yaprak mezofillerinden ve *Nicotiana chinensis*'de kallustan protoplast izolasyonu yapıldıktan sonra füzyona uğratıldığında, heteroplazmik hibrit ürünleri elde etmişler ve 13 adet hücre kolonisi gözlemlemişlerdir. Hibrit hücre hatlarında kromozom ve izoenzim şekilleri çalışması hibridizasyondan altı ay sonra kromozom eliminasyonunun bir belirtisi olmaksızın her iki örnek bitki genomlarının var olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Tomurcuklanma ve küçük bitki oluşumu dört adet hücre kolonisinde organogenesis ortamında elde etmişlerdir. Elde ettikleri bilgiyi seksüel melezleme yapılamayan tür içi ve türler arası üretim için seksüel hibridizasyon olmadan mümkün olduğunun yeni bir kanıtı olarak yorumlamışlardır. Bu çalışma sonucunda *Atropa (X) Nicotiana* genetik uyumsuz bitkilerde melezlemede model bir çalışma için kullanılabileceğini göstermişlerdir [19].

Oghwara vd. *Citrus sinensis* ve *Poncirus trifoliata* arasında protoplast füzyonuyla somatik hibrit bitki elde etme çalışmalarında; *C. Sinensis*'in embriyonik hücrelerinden *P. trifoliata*'nın ise yaprak mezofil hücrelerinden protoplast elde etmişlerdir ve yüksek şeker konsantrasyonunda füzyon ürünleri için hibrit ürünleri seçmede temel gereklilik olduğunu belirtmişlerdir. Yeşil globüler embriyoların *P. trifoliata*'dan elde ettikleri protoplastlardan oluşan rejenerasyonla meydana geldiğini belirlemişlerdir. Bu bitkilerin diğer morfolojik karakterlerinin her iki bitki arasında eşit olduğunu belirlemişlerdir. Hibrit bitkilerin birinde, kromozom sayısı *Citrus sinensis* ($2n=18$) ve *Poncirus*

trifoliata(2n=18) olan iki bitkin toplamı olarak 36 adet kromozom tespit etmişlerdir. rDNA'dan yaptıkları EcoRI restriksiyon analizinde de hibrit bitkilerin ebeveyn bitkilerdeki DNA'ları taşıdıklarını göstermişlerdir[20].

Kanchanapoo vd. protoplast füzyonunu gözlemek için yeni bir method çalışması yapmışlardır. İki adet floresan bileşeni, skolpoletin maddesi ve karboksifloroskin yaprak mezofil hücreleri ve protoplastları etiketlemek için kullanmışlardır. Bileşenin vakuole yerleşmesi yaklaşık 15 saat sürdüğünü belirlemişlerdir. Hücre duvarı parçalanması aşamasında vakuole tutundu ve floroskenik maddenin protoplastlar serbest kaldıktan birkaç saat sonra gözlemlenebilir olduğunu belirlediler. Floroskenik maddeye bir gün boyunca maruz kalan protoplastların ve hücrelerin gelişiminde hiçbir zararının olmadığını gözlemlədiler. Morfolojik olarak ayırt edilemeyen protoplastlar etiketlenip muamele edildiği zaman, renklendirici floroskenik madde gözlemlenebilir hale getirdiğini belirlemişlerdir. Bu floroskenik bileşiğin bütün bitki hücrelerinde ve protoplast çalışmalarında kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir[21].

Bates *Nicotiana*'da protoplastların elektrofüzyon yöntemini kullanarak kültürde heterokaryonların şekillerini maksimize etmek için çalışma yürütmüştür. *Nicotiana tabacum* L. mezofil protoplastları ve *N. plumbaginifolia Viviani* hücre süspansiyonu protoplastlarının heterokaryonlarını canlı materyalin yanı sıra uygun ve boyanmış olarak tespit etmiş ve böylece kantitatif bir füzyon indeksi geliştirmiştir. Çeşitli elektriksel alanlar ve füzyon çemberinin değişkenliğini bu indeks ile belirlemiştir. En uygun füzyonun 150 V/cm alternatif akım dalgası ve 1000 V/cm dalga alanı doğru akımı ile elde ettiğini belirtmiştir. Yeni bir geniş skala füzyon çemberinin 5.10^5 protoplastın (0.5 ml'de 10^6 hücre) % 40 etkinlik ile 5-7 dk içerisinde füzyona uğratabildiğini tanımlamıştır. Füzyon ürünlerinin yarısının heterokaryonlar olduğunu göstermiş ve böylece füzyonun rastgele olduğunu da belirtmiştir. Füzyon ürünlerinin % 60'ı iki çekirdekli veya üç çekirdekli çıkmıştır. Bu prosedür ile rejenere edilen canlı somatik hibritler keşfetmişlerdir[22].

Adams vd. *Lycopersicon Peruvianum* ve *L. Pennellii* arasındaki somatik hibridizasyon ile elde ettikleri somatik hibritlerin seleksiyon sistemi olarak rejenerasyon yeteneklerini ve antinbiyotiğe karşı dayanıklılıklarını test etmişlerdir. *Lycopersicon peruvianum*'un yaprak protoplastları ve *L. Pennellii*'nin hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilen

proplastları polietilen glikol ile füzyona uğratmışlardır. Füzyon ürünleri için iki farklı seleksiyon şeması kullanılmıştır. Bunlardan ilki *Lycopersicon peruvianum*'un rejenerasyon yeteneğini temel alan ikincisi ise *L. Pennellii*'nin hücrelerinin G418 (2-deoxystreptamine) antibiyotiğine karşı dayanıklılığı temel alınmıştır. İki *L. pennellii* protoplastı ve bir adet *L. peruvianum* protoplastının füzyona uğramasıyla heksaploid hibritler ortaya çıkabileceğini öngörmüşlerdir. Hibritleri izoenzimler (lokus Prx-1, Prx-2, Prx-4, Prx-6, Prx-7, Pgi-1 ve Mdh-1), yaprak, çiçek morfolojisi ve epidermal tüyler temel alınarak belirlemişlerdir. Hibritlerdeki antibiyotiğe dayanıklılık ve rejenerasyon yeteneklerin ifadesinin bunların dominant veya kodominant özellikler olduğunu göstererek belirlemişlerdir. Sonuçlanan hibritlerin siterilitesi ve canlılığı *Lycopersicon*'da yararlı bir ıslah yaklaşımı olarak somatik hibridizasyon değerinin şüpheli bir durumda olduğunu göstermişlerdir[23].

Grosser vd. somatik hibridizasyonda kullanılması için *Citrus*, *Poncirus*, *Citrus*×*Poncirus* hibridi ve *Severinia* bitkilerinden aseptik yaprak protoplast izolasyonu çalışması yürütmüşlerdir. Citrus ve citrus'un yakın akrabağlarından aseptik yaprak protoplast izolasyonunu başarılı bir şekilde gerçekleştirmişlerdir. Kalıcı ve yüksek verimli yaprak protoplastları ($2-6 \times 10^7$ protoplast/g taze yaprak dokusundan) bir gelişim çemberinde sürdürülebilir etkili bir şekilde gelişen bitkilerden alınan yeni yapraklardan izole etmişlerdir. Protoplast izolasyonunda yaprak dekontaminasyonu, enzim içeriğinin düzenlenmesi, filtrasyonda kullanılan ekipmanlar, inkübasyon ve temiz bir ortam gibi farklı parametreler ile etkilendiğini belirlemişlerdir. Embriyonik kalluslardan izole edilen protoplastlar ile yaprak protoplastlarının füzyona uğratılması heterokaryonların gözlemlenmesi için gerekli ortamı sağladığını ve somatik hibridizasyon seleksiyonunda fizyolojik parametrelerin kullanımını mümkün kıldığını göstermişlerdir. Dahası *citrus* füzyon çalışmalarında kullanılabilen çok sayıda genotipin büyük oranda artırıldığını bu çalışma ile göstermişlerdir[24].

Vasıl vd. buğdaygillerde somatik hibridizasyon çalışması yapmışlardır. Somatik hibrit kallus hatlarını S-2-amino- etil-L-syntaz'a (AEC) dayanıklı *Pennisetum americanum*'un embriyonik bir kültürünün inaktive edilmiş protoplastları iodoasetik asit ile *Triticum monococcum*'un embriyonik olmayan süspansiyon kültüründen protoplast füzyonunu takiben ortaya çıkarmışlardır. AEC içeren seleksiyon ortamında 100 hücre kolonisinden

çok daha fazlasının geliştiğini gözlemlemişlerdir. Bu hatların ikisinde 6-fosfoglikonat dehidrojeaz dimerik enzimi ve ribozomal DNA probunda kullanılan restriksiyon uzunluk polimorfizmi kullanımıyla somatik hibrit olarak belirlemişlerdir[25].

Kobayashi vd. satsuma mandalini (*Citrus unshiu*) ve washington portakalı (*Citrus sinensis*) arasında protoplast füzyonuyla somatik hibrit bitki elde etmişlerdir. Portakalda çekirdek kallusundan elde ettikleri protoplastlar ve mandalinde yapraklarından elde ettikleri protoplastlarını PEG methodunu kullanarak füzyona uğratmışlardır. Füzyon ürünlerini 0.6 M sukroz içeren Murashige & Tucker ortamında kültüre almışlardır. Bu ortamda bazı kolonileri embriyogenesis yoluyla bütün bitkilere dönüştürmüşlerdir. Rejenere olan bitkilerden birini ribozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi methodunu kullanarak ispatlanan bir hibrit olduklarını belirlemişlerdir. Her iki ebeveyninde $2n=18$ kromozomu varken hibrit hücrelerde $2n=36$ kromozom olduğunu tespit etmişlerdir[26].

Sacristán vd. *Brassica nigra*'da higromisine dayanıklılığın aktarılması ve bu dayanıklılığın *Brassica napus*'a asimetric protoplast füzyonu yoluyla transferi çalışmasını yapmışlardır. *Brassica nigra* ve *Brassica napus* arasında asimetric somatik hibritler için bir seleksiyon sistemi geliştirme düşüncesi ile marker gen higromisine dayanıklılık *Agrobacterium tumefaciens*'in C58 pGV 3850 HPT hattında zararsız hale getirilmesi ile protoplast transformasyonu yöntemi kullanarak en son türlerde ortaya koymuşlardır. Transformasyon için kullanılan *B. nigra* hatlarını iki önemli kolza patojenine (*Phoma lingam*, *Plasmodiophora brassicae*) dayanıklılık için öncelikli olarak seçmişlerdir. Asimetric somatik hibritlerini füzyon ürünleri için seleksiyon markerı olarak higromisin dayanıklılığını kullanarak *B. napus*'un bozulmamış protoplastları ile donör olarak transforme edilen hatlardan *B. nigra* protoplastları X-ray ışınlarıyla füzyona uğratılarak elde etmişlerdir. Elde ettikleri somatik hibritler higromisin fosfotransferaz ve nopalin sentaz genlerinin her ikisinde ifade ettiğini göstermişlerdir. Bu çalışma ile üretilen hibritlerin asimetric protoplast füzyonu yoluyla çeşitli agronomik karakterleri transfer etmek için olanak sunan değerli bir materyal olduğunu göstermişlerdir[27].

Sikdar vd. *Eruca sativa* Lam. ve *Brassica juncea* (L.) Czern. Arasında protoplast füzyonu yoluyla intergenik fertil somatik hibrit "Erussica" elde etmek için bir çalışma

yapmışlardır. Temel bir yağlık tohumu olan *Brassica juncea* (2n=36)'nin iki çeşidinin hipokotil kaynaklı kallus protoplastları *Eruca sativa* (2n=22)'nin γ -ışını ile muamele edilmiş mezofil protoplastları ile füzyonunu gerçekleştirmişlerdir. *Eruca* füzyon partnerinin ışınlanması kaplama yeteneğini artırdığını gözlemlemişler ve ek olarak normal füzyon üzerinde füzyon ürünlerinin morfolojik potansiyelini artırdığını göstermişlerdir. Böylesi füzyon ürünlerinden fertil bitkilerin rejenere edilebileceğini göstermişlerdir. Analiz ettikleri 181 rejenere bitkiden 63'ü 11 somatik hibridin (2n=58) ve 10 adet kısmi somatik hibridin (kromozom sayıları 50 ila 56 arasında değişen) elde edildiğini belirlemişlerdir. Hibritlerin polen canlılığı (% 0 - % 82.9) ve tohum oluşturmaları (% 0 - % 50) gelecekteki çalışmalar için yararlı olacağı sonucunu çıkarmışlardır[28].

Sakai vd. sitoplazma-protoplast füzyonu yoluyla *Raphanus sativus* (cms hattı) ve *Brassica napus* arasında sitoplazmik erkek kısırlığının intergenik transferi üzerine çalışmalarında; aşamalı mannitol kullanımıyla ultra santrifüjleme yöntemiyle *Raphanus sativus* cv Kosena (cms hattı)'un hipokotil protoplastlarından izole edilen sitoplazmalar iodoacetamide (IOA) uygulayarak *Brassica napus* cv Westar'ın protoplastları ile füzyona uğratmışlardır. On yedi rast gele seçilen rejenere olmuş bitki morfoloji ve kromozom sayısı tespit etmek için karakterize etmişlerdir. Rejenere olan bitkilerin hepsi *B. napus*'un diploid kromozom sayısına sahip olduklarını ve *B. napus*'a morfolojik benzerliğe sahip olduğunu belirlemişlerdir. Geriye kalan bitkiler kimerik veya anöplid kromozom sayısına sahip olduğunu görmüşlerdir. *B. napus*'un diploid kromozom sayısına sahip olan on füzyon ürünüde mitokondriyal genomu Southern hibridizasyon analizi kullanarak incelemişlerdir. On bitkinin dördünün mitokondriyal DNA içerdiğini belirlemişlerdir. Bu dört bitkinin biri erkek kısır ve üçü fertil bitkiler olduğunu gözlemlemişlerdir[29].

Serraf vd. diploid bir patates çeşidi olan BF15 ve onun yumru köklü bir doğal akrabası olan *Solanum berthaultii* arasındaki somatik hibrit bitkilerinin patates hatlarındaki bitkilerde oluşan tüylerle ilişkilendirilen böcek direncinin aktarılmasının belirginliği ile protoplast elektrofüzyonu sonrasında ortaya koymuşlardır. Tahmini hibritlerin ilk seçiminde parental davranışları ve hibrit kalluslarını temel almışlardır. Aynı zamanda, bu seçimde morfolojik markerlardan da yararlanmışlardır. Toplam 25 somatik hibrit bitkiyi seçilen 70 kallustan rejenere etmişlerdir. Rejenere edilen bitkilerde güçlü melez

canlılığını gözlemlemişlerdir ve bu bitkilerin her iki ebeveyn bitkinin yaşam alanlarda bazı morfolojik orta düzey özelliklere sahip olduklarını belirlemişlerdir. Flow sitometri yönteminde hibrit bitkilerin DNA'larını kullanarak bun hibrit bitkilerin 14'ünden 1 tanesi anöplid, 8 tanesi hekzaploid ve 2 tanesi miksaploid hatlar olduğunu ortaya çıkarmışlardır. 25 bitkinin hibrit olduklarını esteraz ve peroksidaz izoenzimlerinin şekillerini inceleyerek belirlemişlerdir. Agronomik özelliklerin ön değerlendirmesini yapmak için, özellikle dört loblu glandüler tüylerden kahverengileşmeyi sağlayan enzim aktivitesinin analizi yoluyla böcek direncinin ve yumru kök özelliklerinin belirlenmesi için, on beş tane somatik hibrit bitkiyi bir plastik viol içerisinde toprağın altına aktarmışlardır. Seçilen somatik melezleri kararma miktarının artışına göre dört gruba ayırmışlardır. Hekzaploid olan birinci grup somatik melezler BFI5 ile karşılaştırılabilir bir kararma aktivitesi gerçekleştirdiğini gözlemlemişlerdir. Bu birinci grubun fenotipi ve yumru özellikleri BFI5 patatesine çok yakın olduğunu belirlemişlerdir. üçüncü ve dördüncü grupların bütün somatik hibritlerinin arasında yalnızca bir tanesi tetraploid çıkmıştır. Bu guruplar doğal türlerden daha yüksek seviyede kararma aktivesi göstermişlerdir. Bu melezlerin bazılarının çok yüksek verimli olduğu ortaya çıkmıştır ve *Solanum berthaultii*'nin özelliklerine çok yakın özellikler olduğunu da gözlemlemişlerdir. Somatik hibritlerdeki bu özellikler bitki morfolojisi ve yumru özellikleri de dahil olmak üzere kültüre alınan patates çeşidinin fenotipik ve ekspresyon ifadelerinin ilişkilendirmelerini yapmışlardır. Çalışmada yapılan çoğu somatik melez bitkilerde canlı ve fertil tohumlar elde etmişlerdir[30].

Christey vd. sitoplazmik erkek kısır *Brassica oleracea* ve atrazine dayanıklı *Brassica campestris* arasında protoplast füzyonu yoluyla sitoplazmik erkek kısır atrazine dayanıklı brokoli elde etmişlerdir. Sitoplazmik kısır *B. nigra* petali ile brokoliden yaprak protoplastları atrazine dayanıklı olan *B. campestris* Var. *oleifera*'nın hipokotil protoplastları ile füzyona uğratmışlardır. Rejenere edilen 19 adet hücre kolonisinden oluşan bitkilerdeki fenotipik tüy özelliklerinin brokoliye benzediğini belirlemişleridir. Bir kolonide rejenere edilen 4 adet tomurcuğa 25 µM atarizin verildiğinde bulduğu ortamda hala yaşamını sürdürdüğünü gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda yapraklarından alınan bitki parçaları ile bu bitkilerin atarizine dayanıklı olduğunu göstermişlerdir. Moleküler analizler sonucunda oluşan somatik hibrit bitkilerin *B. campestris* ebeveyninin kloroplastını ve *B. nigra* ebeveyninin mitokondrisini taşıdığı sonucunu ortaya

koymuşlardır. Füzyon ürünlerindeki mitokondriyal DNA'ların hiçbir rekombinasyon yada yeniden düzenlenmesinin yapılmadığını tespit etmişlerdir[31].

Schlangstedt vd. şeker pancarı (*Beta vulgaris L.*) protoplastlarından başarılı bir kültür için gerekli şartları araştırmışlardır. Mezofil kaynaklı protoplastları aljinata (Sigma, düşük viskozite %1) ekledikleri zaman bölünmenin olduğunu gözlemlemişlerdir. Ve bu ortamda hücre duvarları oluşmuştur. Daha sonra şeker pancarı hücre süspansiyonunun eklendiği 1.5 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic asit, 0.3 mg/L 6-benzylaminopürin, 0.1 mg/L 1-naphthalinasetik acid ve 0.4 M glikoz olan modifiye edilmiş Schenk ve Hildebrandt (SH) ortamında kültüre alınmışlardır. Protoplastlar 8 C°'de 20 dk tuz solüsyonunda bırakıldığı zaman protoplastların kaplanmasında % 3.7 artış gözlemlemişlerdir. Mezofil protoplastlarından oluşan hücre kolonileri 1-naftelinasetik asit, 6-benzilaminopürin veya tri-iodobenzoik acid içeren ortamlarda kök organogenesisi sağladıklarını belirlemişlerdir[32].

Rambaud vd. hindiba (*Cichorium intybus L. Var. Magdebourg*) yapraklarından elde ettikleri protoplastları füzyona uğratarak geleneksel kolçisin ile katlama tekniğine karşılaştırma olarak tetraploid bitkilerin çok daha yüksek sayıda elde edildiğini ortaya koymuşlardır. Füzyon tekniği çalışmasında PEG karışımı, DMSO ve CaCl₂ (pH 10.5) kullanarak elde ettikleri bitkilerin % 25'i 2n=36 kromozumlu karahindiba tetraploid bitkiler olduğunu gözlemlemişlerdir. 167 rejener bitki arasında sadece bir adet 2n=33 kromozumlu anöloid bitki belirlemişlerdir[33].

Gavrilenko vd. *Etuberosa*'nın *Lycopersicon esculentum* ve *tuberosus* olmayan *Solanum* türleri arasında somatik hibridizasyon çalışması gerçekleştirmişlerdir. İntergenik olan somatik melez bitkiler, iki ebeveynden elde edilen mezofil protoplastlar arasında füzyona uğratarak elde etmişlerdir. *Solanum* cinsi *Etuberosa*'nın iki alt cinsi (*S. etuberosum* ve *S. Brevidens* x *S. etuberosum*) domates (PI- alb I) ebeveynlerinden füzyon için mezofil protoplast izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Hibritlerin seçim şemasında hibrit kalluslar ve hibrit rejeneratların morfolojik karakterlerine ve ebeveyn kalluslar ile karşılaştırılmasından temel almışlardır. Hücrelerin füzyona uğramasını morfolojik ve sitolojik karakterler olan esteraz ve peroksidaz izoenzimleri ile doğrulamışlardır. Somatik hibritleri aynı zamanda, domatesteki 5,3 kb mitotik geninin probu kullanılarak southern hibridizasyonu ile karakterize etmişlerdir. Kendileme

sonrası meyveleri oluşan atmış hibridin on ikisi kısır tohumlara sahip olduğunu belirlemişlerdir. İntergenik somatik embriyoların kendilenmesinden sonra embriyo kültüründe üç adet fertil bitki elde etmişlerdir[34].

Creemers-Molenaar vd. *Lolium perenne*'de sibrit bitkiler üretmek için bir çalışma yapmışlardır. Gama ışını muamelesi ile sitoplazmik erkek kısır hale getirilmiş ıslah hattı olan Ryegrass (B200) yembitkisini fertil ıslah hattı olan Jon 401'in protoplastları iodoasetamid-triat kullanılarak füzyona uğratmışlardır. Daha sonra yirmi beş adet sibrit olduğu kabul edilen kallus mitokondriyal ve çekirdek genomlarını belirlemek için karakterize etmişlerdir. Fosfoglucoizomeraz izoenzim profili analizi ve flow sitometri ploidi seviyesini belirleme yöntemleri ile test edilen kallusların esas olarak fertil hatların çekirdeğini içerdiğini belirlemişlerdir. bununla birlikte sitoplazmik kısır hattan gelen çekirdek DNA'sını uzaklaştıramamışlardır. Ebeveyn hatların ve sibrit olduğu varsayılan hatların total DNA'sından *cox1* ve *atp6* probunu kullanarak yapılan southern blot analizinde kallus mitokondrisinin 5 adet fertil kallus, 5 adet sitoplazmik kısır kallus ve her iki ebeveyninde olduğu 15 kallus ortaya çıktığını belirlemişlerdir[35].

Pedersen vd. *Beta vulgaris* ve *B. maritima* protoplastları izolasyonları için eksplant kaynağı olarak petiolleri kullandıkları çalışmalarında; petiollerden pancar protoplastlarının izolasyonu ve kültürü için methodları belirlemişlerdir. Petiol protoplastlarının yayılması yaprak protoplastları ile karşılaştırıldığında 14 kat daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Ek olarak hücre bölünmesi, protoplast ortamına uygun şartlar sağlanarak % 25 daha fazla olmasının sağlanabileceğini belirtmişlerdir. Bu şartların sağlanması protoplast yoğunluğunu (15.6×10^3) pozitif yönde etkilemiştir ve bu şartların sağlanmadığı kültür ortamlarına göre on dokuz kat daha fazla protoplast elde ettiklerini göstermişlerdir. Aynı zamanda protoplast elde edilen donör bitkinin gelişim şartları protoplast yoğunluğunu etkilediğini kanıtlamışlardır. Bitkilerin gaz salgılamalarıyla daha az nemli şartlar altında yetiştirildiği zaman daha hızlı daha yeşil yapraklar oluşturduklarını ve daha uzun petioller elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bu bitkilerden elde edilen protoplastların kontrol grubuna göre iki kat daha yüksek yoğunlukta olduğunu tespit etmişlerdir. Yaprak protoplastları en optimal şartlarda bile kültüre alınsa da protoplast yoğunluğunun değeri yalnızca % 0.5 olurken bu değer petiol protoplastlarında %12-15'lere kadar yükseldiğini kanıtlamışlardır. Bu eksplant seçimin

tek dezavantajı sürgün rejenerasyonunun yapılamadığı periol organından izole edilmesidir. Petiolden elde edilen protoplastlardan kaliteli bir kallus verimi elde edilsede sadece *Beta vulgaris*'in yaprak protoplastlarından bitki elde edilebildiğini belirlemişlerdir[36].

Cardi vd. dona dayanıklı *Solanum commersonii* ve *Solanum tuberosum* arasında somatik hibridizasyon çalışması yapmışlardır. Dona dayanıklı olan *Solanum commersonii*'nin mezofil protoplastını hem diploid hemde tetraploid *S. tuberosum* ile füzyona uğramışlardır. Protoplastların füzyonunu alternatif akım, polietilen glikol ve direkt akım kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Polietilen glikol ve doğru akım uygulamalarının heterofüzyon sıklığı ve canlılık miktarının düşük olduğunu belirlemişlerdir. diğer yandan alternatif akım ve doğrudan akım uygulamaları protoplast yoğunluğunun artışına yönelik olarak optimize etmişlerdir ve bu uygulamada alternatif akım ve doğrudan akım ile birlikte CaCl_2 'de eklemişlerdir. Yoğunluğu ml^{-1} 4.8×10^5 protoplastlar 0.2 mM Ca^{++} , alternatif akım/direkt akım uygulamalarını içeren ortamda füzyona uğratıldığı zaman protoplastlar yaklaşık %3-10 çoğalma etkinliği ve heterofüzyon frekansı gösterdiğini saptamışlardır. Daha sonra füzyona uğratılan heterokaryonları rejenerasyon ortamına aktarmışlardır. Heterokaryonların ebeveynleri ile karşılaştırıldıklarında onlar kadar sağlıklı olduklarını belirlemişlerdir. Heterokaryonların hibrit olup olmadıklarını belirlemek için ise izoenzim analizi temelli bir yöntem uygulamışlardır[37].

Schlangstedt vd. şeker pancarını da (*Beta vulgaris L.*) protoplast kaynağı olarak petiolün önemi gösterdiği bir çalışma yürütmüştür. İn vitro sürgünlerin petiollerini şeker pancarı protoplast izolasyonu için potansiyel kaynak olarak denemişlerdir. Kullanılan genotipin ne olursa olsun, petiol protoplastlarının Kao ve Michayluk (K8p) ortamına ek olarak Schenk ve Hildebrandt (SH) içeriğinde bulunduğu aynı kültür şartlarında mezofil protoplastlarına göre çok daha yüksek çoğalma gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca DNA histogramlarında petiol protoplast popülasyonlarının hücre döngününün G2/M evresinde yüksek oranda DNA katlanması miktarına sahip olduğunu çalışmalarında belirlemişlerdir[38].

Narasimhulu vd. *Brassica carinata* ve *Camelina sativa* farklı cinsler arasındaki protoplast füzyonu çalışmasını yürütmüşlerdir. *Camellina sativa*'nın daha önceki

yapılan çalışmalarda *Alternaria* fungusuna dayanıklı olduğunu incelemişlerdir. *Brassica carinata*'nın petiol ve hipkotillerinden, *Camellina sativan*'nın ise yaprak mezofil hücrelerinden elde edilen protoplastları polietilen glikol kullanarak füzyona uğratmışlardır. Ortalama % 6.8 heterokaryon elde etmişlerdir. Tek bir hibrit kallus oluşumundan üç adet meristem elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bu meristemlerden köklenmede başarısız olmuşlardır. Bu füzyon sonucunda elde edilen meristemlerin hibrit olduklarını belirlemek için hem oluşan *in vitro* yapraklarda kromozom sayımı yapılmış hemde rDNA probu kullanarak da restriksiyon fragment polimorfizmi yöntemini de kullanmışlardır. Organel yapısını incelemek için yapılan RFLPs hibritlerin kloroplastlarını doğal formundaki bitkiden aldıklarını ve mitokondrilerini ise kültüre alınan normal *Brassica* türlerinden aldığını gözlemleyerek belirlemişlerdir[39].

Milliam vd. patates ıslahı için materyal kaynağı olarak protoplast füzyonunun gelişimi ve problemleri hakkında bir inceleme yapmışlardır. Bu incelemelerine patatesin genetik ve agronomik gelişimine protoplast füzyonun etkilerini araştırmışlardır. *Solanum tuberosum*'da yapılan protoplast füzyonu çalışmalarını doğal akrabaları ile yapılan füzyonlar, diploid füzyonlar ve asimetrik stratejiler olmak üzere üç kategoride toplamışlardır. Somatik materyal olduğu kabul edilen somatik hibritlerin seleksiyonu ve karakterizasyonu bu süreçte kritik bir aşama olarak belirlendiği ve bu teknolojinin belirli spesifik durumlarının olduğunu belirlemişlerdir. ıslah programları için bu tekniğin daha iyi anlamak için ve tamamlanması için gelecek beklentilerinin aynı zamanda tartışmalı bir durumda olduğunu göz önüne sermişlerdir[40].

Jarl vd. kavun ve hıyar arasında protoplast füzyonu ve rejenerasyonu çalışması gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada kavun hıyar ıslahı çalışmaları için uygun bir protokol geliştirmeyi amaçlamışlardır. Ticari kavun hatlarının füzyona uğramamış protoplastlarından bitki rejenerasyonu için etkili methodu belirlemişler ve bunu yayınlamışlardır. Protoplastlardan rejenere edilen bitlilerin ploidi seviyelerini analiz etmişlerdir. Kavun protoplastları ışınlanmış hıyar protoplastları ve ışınlanmamış hıyar protoplastları ile elektro füzyon kullanılarak füzyona uğratmışlardır. Başlangıçta protoplast yayılması yüksek olmasına rağmen, gelimin birkaç bölünme sonra durduğunu gözlemlemişlerdir. Kontrol uygulamalarındaki meristemleri yüksek derecede rejenere etmişlerdir. Sadece iki adet füzyon örneğinin gelişine devam edip kallus oluşturduğunu

gözlemlemişlerdir, fakat bundan fazla bir gelişim gözlenememiştir. Belirli primerler kullanılarak PCR ile analiz edildiği zaman, bu callusların DNA'sı kavun ile aynı çıkmıştır. Fakat bunun dışındaki yaptıkları bazı incelemelerde bu kalluslarda sadece hıyara ait olan spesifik bantlar gözlemlemişlerdir. Bazı seksüel uyumsuzlıklardan dolayı kavun ve hıyar arasında tozlanma gerçekleşmemektedir fakat bu çalışmada gözlemlenen sonuçlara göre protoplast füzyonu ile bu engel ortadan kaldırılabilceğini belirlemişlerdir[41].

Akagi vd. asimetrik protoplast füzyonu yöntemiyle sitoplazmik kısır olarak bilinen özelliğin aktarılması ve bitkinin kalıtsal olarak ıslahta kullanılabilir hale getirilmesi hakkında çalışma yürütmüşlerdir. Donör-alıcı protoplast füzyonu yöntemini sitoplazmik kısır olan MTC-5A ve MTC-9A'dan bir Japon çeşidi fertil çeltiğe transfer etmek ve sibrit bitkiler üretmek için çalışma yürütmüşlerdir. Sitoplazmik kısırılık sibrit bitkilerde eksprese edilir ve başka bir bitkiden toz aldıklarında bu özellik aynen bir sonraki döle aktarılır. Çalışmada özellikle mitokondriyal DNA'lar olan sitoplazmik kısır hatların sadece sitoplazmaları fertil çeltik hatları hücrelerinin içine aktarılmıştır. Bunun neticesinde % 80'den fazla sibrit bitki tohumunun kendine tozlanmasında tohum vermediklerini gözlemlemişlerdir. Kısır sibrit bitkilerin sadece fertil bitkiler ile tozlandığında tohum oluşturduklarını gözlemlemişlerdir. Bu oluşan tohumlarda da sitoplazmik kısırlığın devam ettiğini belirlemişlerdir. Sibrit bitkilerin sitoplazmik kısırılık özelliğinin fertilitiyi düzenleyen tekli dominant Rf-1 genine sahip olan MTC-10R ile çaprazlanarak tamamen düzenlenebileceğini belirtmişlerdir. Bu sonuçların protoplast füzyonu yöntemiyle mitokondriyal DNA'nın uyarılmasıyla ortaya çıktığını rapor etmişlerdir. Bu uyarılmış sitoplazmik kısırılık en az sekiz nesil boyunca devam ettiğini belirmişlerdir. Bu çalışmada çıkardıkları sonuç ile çeltikteki ıslah çalışmalarında sitoplazmik kısır bitkilerin elde edilmesi için bu methodun kullanılabilir olduğunu göstermişlerdir[42].

Zhao vd. polietilen glikol ve elektrofüzyon yöntemi kullanarak *Coprinus cinereus* ve *Schizophyllum commune* arasında interspesifik protoplast füzyon çalışması yürütmüşlerdir. Yapılan bu çalışmada iki farklı mantar cinsi arasında elde edilen interspesifik füzyon ürünlerini belirlemek için indoasetamid ve dietilprokarbonat kullanmışlardır. İndoasetamid hücrelere daha az zarar verdiği için en uygun füzyon

ürünü tespit etme indikatör olduğunu belirlemişlerdir. Polietilen glikol ve elektro füzyon yöntemi ile yaptıkları füzyon çalışmasındaki karşılaştırmada polietilen glikolün % 16.7-50.0 arasında olduğunu ve elektro füzyon ile yapılan yöntemde ise % 6.9-8.4 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Çalışmadaki büyük füzyon ürünlerinin heterokaryon (dikaryonlar) olduğunu ve birbirleri ile bağlantılı olduğunu göstermişlerdir. Eşleşme ile oluşturulan heterokaryonların ve füzyon soyunda morfolojik ve tohum oluşturmada hiçbir farklılık olmadığını belirlemişlerdir[43].

Guangmin vd. *Triticum aestivum* L. Ve *Leymus chinensis* arasında intergenik somatik hibridizasyondan bitki rejenerasyonu çalışması gerçekleştirmişlerdir. Jinan 177 isimli buğdayın protoplastlarını içeren süspansiyonu *Legmus chinensis*'in ⁶⁰Co gama ışını ile ışınlanmış protoplastları ile füzyona uğratmak için bir alıcı olarak kullanmışlardır. Işın uygulanan ve uygulanmayan kalluslardan elde edilen protoplastların her ikisi de bu uygulamanın şartları altında çoğalma gösterememişler. Fakat bu füzyon ürünleri yinede gelişim sürecini devam ettirmişler ve skromozom, izoenzim ve morfolojik olarak yapılan analizlere göre hibrit rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu belirlenen bütün bitkilere dönüşmüşlerdir. Her iki ebeveyninde kaybolan rejenerasyon kapasitesinin somatik hibridizasyon yoluyla düzenlenebileceğini belirmişlerdir[44].

Heath vd. protoplast füzyonuyla düşük linoleik asite sahip kanola (*Brassica napus* L.) sentezi çalışması yürütmüşlerdir. Tohumlarında düşük indol asetik asit (18:3) içeren *Brassica napus* somatik hibritleri düşük linoleik asit içeriğine sahip 18:3 olarak aranan füzyon ebeveynlerini kullanarak üretmişlerdir. Bir adet somatik hibrit ebeveynlerin ortalamasının altındaki bir seviyede olan 18:3 yağ içeriğine sahip % 3.5'inin içerdiğini belirlemişlerdir. R₁ generasyonunda düşük yağ içeriğine sahip olduklarını göstermişlerdir. En düşük yağ içeriği seleksiyonu 18:3 R₀ generasyonunda % 29.3 ortalamadan bir adet R₁ hattında %36'ya arttığını rapor etmişlerdir. R₁'in arazi popülasyonu aynı zamanda kırılmaya daha dayanıklı olduğunu gözlemlemişlerdir[45].

Guangmin vd. genel buğday ve ultraviole ışınına tabi tutulmuş *Haynaldia villosa* arasında asimetrik somatik hibridizasyon çalışması gerçekleştirmişlerdir. *Haynaldia villosa*'nın kalluslarından elde edilen genç embriyolardan UV ışınına maruz bırakılmış protoplastları polietilen glikol ile *Triticum aestivum* cv. 24-2 kalluslarından elde edilen anterlerden elde edilmiş protoplastlar ile füzyona uğratmışlardır. İlk aşamada şekillenen

hücre klonları bunların çekirdek hibriti olup olmadıklarını belirlemek için onların hibrit doğası, kromozom hesaplaması ve izoenzim analizi ile incelenerek göstermişlerdir. Bunların yanı sıra hibrit yapısı füzyon ürünlerinde hibrit doğasının belirlenmesini sağlayan in situ hibridizasyon (ISH) ve RAPD analizi teknikleri kullanarak hibrit hücrelerin varlığını kesin olarak göstermişlerdir. Buldukları sonuçlarda UV'nin asitmetrik hibridizasyon yoluyla alıcı hücre içerisine yabancı kromotinlerin yerleşmesini garantilediğini ve donör kromozomların kırılmasında önemli bir rol oynadığını belirlemişlerdir. Başarısız somatik hibrit bitki rejenerasyonun sebeplerinin daha fazla araştırılması gerektiğini öngörmüşlerdir[46].

Rasmussen vd. iternspesifik dihaploid protoplast füzyonuyla yaprak ve yumruda sonradan çıkan küf hastalığına dayanıklılığın kombinasyonunun oluşturulmasına yönelik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Yaprakta ve yumruda patates küf hastalığına (*Phytophthora infestans*) poligenik ve atasal olarak dayanıklılığın farklı seviyelerini bulduran beş adet dihaploid *Solanum tuberosum* genotipini dört farklı protoplast füzyonu kombinasyonunda kullanmışlardır. Elektrofüzyondan dört hafta sonra tahmin edilen somatik hibridizasyonların seçimi yapmışlardır. Sağlam bitkilerin seçilen kallusların % 6'sından rejenere olduğunu saptamışlardır. Hibridizasyonun doğruluğu rejenere olan bitkilerin % 53'ünün doğru somatik hibrit olmasını gösteren RAPD analizinin kullanımıyla belirlemişlerdir. Farklı füzyon kombinasyonlarında doğru somatik hibritlerin skoru % 100-21 arasında değiştiğini gözlemlemişlerdir. Daha sonra bir arazi denemesine somatik hibrit bitkileri yumru ve yaprak için dayanıklılığı sağlanan küf hastalığına karşı denemesini yapmışlardır. Somatik hibritler arasında yaprak ve yumru küf hastalığına karşı dayanıklılığın farklı seviyelerde olduğunu görmüşlerdir. Bazı hibritlerinde yumru ve yaprak küf hastalığına karşı yüksek derecede dayanıklı olduğunu gözlemlemişlerdir. Fakat bazı hibritlerde ise ebeveynlerle kıyaslandığında dayanıklılığını kaybettiğini belirlemişlerdir[47].

Bordas vd. mutant albino bir *Cucumis melo* L. ve *Cucumis mtiocarpus* Naud. Arasında somatik hibridizasyon çalışması yürütmüşlerdir. Albino *Cucumis melo* L.'nin kotiledon kaynaklı protoplastları *Cucumis mtiocarpus* Naud.'un protoplastları ile elektrofüzyona uğratmışlardır. Tahmini somatik hibritleri albino özelliği gösterilmesi ve kültür ortamının kesin bir dizisinde ebeveyn türlerin protoplast kaynaklı hücrelerin farklı

davranışları temel alınarak belirlemişlerdir. Somatik hibritleri moleküler seviyede karakteriz etmişlerdir ve füzyonun interspesifik hibritleri olduktan sonra yeşil kallusların bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Mutant albino *C. melo* ve *C. myriocarpus* genomlarını belirleyen RFLP desenlerinin Sau3A endonükleazı ile 18S-25S ribozomal DNA kesim bölgesi içeren PCR temelli DNA fragmentlerini içermesinin parçalanmasıyla elde edilebileceğini belirlemişlerdir. Bu prosedür Sau3A restriksiyon enzimini büyük ilk somatik hibritlere uygulamışlar ve içlerinden sadece bir tanesi hem *C. melo* hem de *C. Myriocarpus*'un RFLP desenlerini gösterdiğini tespit etmişlerdir. Seçilen kallusların hibrit olduğunu belirlemek için spesifik bir MYR2 oligonükleotidi *C. melo* ve *C. myriocarpus* internal transkript boşluk(ITS) bölgesini içeren yaygın dizisine göre tasarlamışlardır. ITS1 ve MYR2 primerleri *C.myriocarpus*'dan 457 bp rDNA bölgesinde kullanmışlardır. Bu kalluslarda yapılan RFLP desenlerinin sonuçlarına göre elde ettikleri hibritlerin her iki ebeveyninde kombinasyonunu içerdiğini belirlemişlerdir[48].

Kito vd. *Monostroma nitidum* ve *Porphyra yezoensis* arasında yaptıkları protoplast füzyonunda hibrit bitkilerin gelişimini incelemişlerdir. *Monostroma nitidum* ve *Porphyra yezoensis*'den elde ettikleri protoplastları polietilen glikol kullanarak füzyona uğratmışlardır. Heterokaryonları hibrit hücrelerin renklerindeki farklılığını kullanarak kolay bir şekilde ayırabilmişlerdir. Farklı protoplastlar arasındaki füzyon frekansının % 1.4 olduğunu belirlemişlerdir. Heterokaryonları ES ortamı içerisine transfer etmişlerdir. Otuz gün sonrasında heterokaryonların hayatta kalma oranını %2-7 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. İki adet bitkinin ebeveynlerinden karşılaştırma yapabilmek için belirledikleri DNA fragmentleri ile uyuştuğunu belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra bitkilerin birinde de hem *Monostroma nitidum* hemde *Porphyra yezoensis*'de farklı olan karakteristik yağ asitlerinin her ikisini de içerdiğini belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmadan çıkardıkları sonuçta bu iki genus arasında genetik rekombinasyonun mümkün olduğunu ön görmüşlerdir. Bu şekilde elde ettikleri bitkiler ile yapılan ıslahta genetik kaynak olarak faydalanılabileceğini göstermişlerdir[49].

Wei vd. *Aeleuopus littoralis sinensis*'den buğdaya (*Triticum aestivum L.*) asimetrik somatik hibridizasyon yolu ile tuzluluk tolerans karakterinin aktarılma çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Jinan 177 buğday çeşidinin protoplastlarını tuzlu ortama toleranslı

olan *Aeleuopus littoralis*'in ultra viole ışını uygulanmış protoplastları ile polietilen glikol kullanarak füzyona uğratmışlardır. İlk elde ettikleri rejenere klonları kromozom, izoenzim ve RAPD analizi yöntemleriyle belirlemişlerdir. Elde ettikleri rejenere klonların tuzluluk tolerans karakterini Na^+/K^+ ve prolin stresi uygulayarak ebeveynleri ile karşılaştırmışlardır. Bunun sonucunda elde edilen hibritlerin buğdaya göre tuza çok daha toleranslı olduğunu gözlemlemişlerdir. Buradan da füzyon sırasında bazı tuza tolerans genlerinin mezlere geçtiğini belirlemişlerdir. Fakat hibrit bitkilerin sadece albino bitkilere dönüşebildiklerini gözlemlemişlerdir[50].

Fengning vd. yaygın buğday (*Triticum aestivum* L.) ve *Avena sativa* L. arasında somatik hibridizasyonda ultrviole ışın dozajının etkisini araştırmışlardır. 30 s, 1 dk, 2 dk, 3 dk ve 5dk sürelerinde ve 300 mW/cm² dalga boyundaki ultraviole ışını uyguladıkları *Avena sativa* L. protoplastlarını kültürel olarak kullanılan Jinan 177 ve Hesheng 3 buğday çeşitleri ile proetilen glikol kullanarak füzyona uğratmışlardır. Jinan 177'den protoplast izole etmek için iki farklı materyal kaynağı kullanmışlardır. Birinci tip materyal (T1)'i jinan 177'nin süspansiyon ortamında rejenere olmamış hücreleri kullanmışlardır. İkinci tip materyalde (T2) ise rejenerasyon kapasitesine sahip embriyonik kallusları kullanmışlardır. Diğer bir çeşit Hesheng 3'ün ise yüksek oranda rejenerasyona sahip bir çeşit olduğunu belirtmişlerdir. Bütün füzyon kombinasyonlarından rejenere klonlar elde ettiklerini belirtmişlerdir fakat sadece 1 dk ve 2 dk uygulamalarındaki rejenere klonlar albinoya dönüşmüşlerdir. Elde ettikleri klonların sitolojik, izoenzim, RAPD ve 5S rDNA sekans analizi yöntemleri ile incelendiklerinde hepsinin hibrit olduğunu göstermişlerdir[51].

Xu vd. somatik hibridizasyon yoluyla buğday genomunun içerisine mısırın çekirdek ve mitokondriyal DNA'sını aktarmak için çalışma gerçekleştirmişlerdir. Buğday ve örneklerinden protoplastları izole ederek polietilen glikol ile füzyonunu gerçekleştirmişlerdir. Işına maruz bırakılan mısır protoplastlarından elde edilen kallusların ve yeşil bitkilerin rejenere olduklarını belirlemişlerdir. Füzyon sonucunda elde edilen heterokaryonların morfolojik, izoenzim ve çeşitli genetik markerlar kullanarak bunların melez protoplast olduğunu ortaya koymuşlardır. Mısırın genetik materyalini taşıyan rejenerantların genomik in situ hibridizasyonunda buğday genomu içerisinde bazı mısır kromotinlerinin ortaya çıktığını göstermişlerdir. Rejeneratlarda

yaptıkları RFLP ve SSR uygulamaları ile buğday içerisinde mısırın hem çekirdek hem de mitokondriyal DNA'sının olduğunu göstermişlerdir. Buradan yola çıkarak buğdayda her iki ebeveynin mitokondrisinin olduğunu yada rekombinant bir mitokondrinin ortaya çıktığını öngörmüşlerdir. Kloroplast genomu ile ilgili olarak da, mısırdan herhangi bir intresyon varlığına dair bir belirti gözlemlenmemişlerdir[52].

Sun vd. protoplast füzyonu yöntemiyle *Gossypium hirsutum* + *G. bickii* ve *G. hirsutum* + *G. stockii* via bitkileri aralarında fertil somatik hibrit elde edilmesi ve üretimi hakkında bir çalışma yürütmüşlerdir. Fertil somatik hibritleri tetraploid pamuk (*G. hirsutum* cv. Coker 201, AD genomu), diploid doğal pamuk *G. bickii* (G genomu) ve *G. stockii* (E genomu) bitkilerinin hibridizasyonu ile elde etmişlerdir. Somatik hibritlerin incelemesini morfolojik, flow sitometri analizi, kromozom hesaplaması ve RAPD yöntemleriyle yapmışlardır. Rejenerantların sitolojik araştırmasını yaparken metafaz safhasında 78 adet kromozomunun olduğunu gözlemlenmişlerdir. Flow sitometri analizinde rejenerantların toplam DNA'sının ebeveyn DNA'ları ile yakınlık gösterdiğini belirlemişlerdir. RAPD analizinde hibritlerin her iki ebeveyne özel bantlara da sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Morfolojik gözlem de ise hibritlerin her iki ebeveyne de eşit benzediğini ortaya koymuşlardır. Hibrit bitkileri toprağa aktardıklarında, bitkilerin çiçek açtıklarını ve tohum oluşturdıklarının sonucuna varmışlardır. Yapılan protoplast füzyonunun Elit *G. Hirsutum* genotipleri ile geri çaprazlama yöntemiyle pamuk ıslahına katkıda bulunacağını belirtmişlerdir[53].

Wu vd. çekirdeksiz triploid *Citrus*'dan protoplast füzyonu yaprak allotetraploid bitkiler üretebilmek için çalışma yürütmüşlerdir. Protoplast füzyonunu bu çalışmada çekirdeksiz, kabuğu kolay soyulan triploid ıslah hatları üretmek için diploid hatları ile çaprazlanmasında ebeveyn olarak kullanılması için yeni nesil allotroploid hibritleri üretmek için kullanmışlardır. Her bir donör ebeveyn protoplastlarının embriyonik kallustan izole edilen mandalina (Encore) X tatlı portakal (Valencia) ve mandalina (Encore) X (Caffin) klementin protoplastları aralarında füzyona uğratarak 43 adet bitki elde etmişlerdir. Bu 43 bitkinin 40 tanesini flow sitometri ve sitolojik yöntemler kullanarak tetraploid olduklarını tespit etmişlerdir. Rejenerantların % 10'undan daha azının hibridize olmayan bitkiler olduklarını belirlemişlerdir. DNA markör yöntemlerini kullanarak hibrit bitkileri test ettiklerinde her iki ebeveynden de genleri taşıdıklarını

belirlemişler ve bu bitkilerin allotetraploid oldukları kanısına varmışlardır. Allotetraploid hibritleri diploid “Encore” madalin hatları ile çaprazlama kullanacaklarını belirlemişlerdir. Allotetraploid hibritleri aynı zamanda “Clementine” hatları ile çaprazlayarakta kabuğu kolay soyulan, çekirdeksiz triploid hatlar elde etmeyi planlamışlardır[54].

Sun vd. protoplast füzyonu yoluyla *Gossypium hirsutum* L. (4×) ve *G. davidsonii* Kellog (2×) arasında somatik hibrit bitki üretmek için çalışma oluşturmuşlardır. Tetraploid *Gossypium hirsutum* L. (4×) süspansiyon kültürlerinden ve diploid *G. davidsonii* Kellog (2×) embriyonik kalluslarından elde ettikleri protoplastları elektrofüzyona uğratarak çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Somatik hibritleri ilk aşamada RAPD markörü kullanarak belirlemişlerdir. Daha sonrasında kromozom sayımı, SSR ve morfolojik yöntemler ile somatik hibritleri kesin olarak belirlemişlerdir. Hücrelerin sitolojik hesaplamasında kromozom sayımını somatik hibritlerde 74 ve 84 arasında tespit etmişlerdir. Bu sayılarında arasında istedikleri 76 kromozomluk somatik hibritlerin de var olduğunu belirlemişlerdir. SSR markör ile yaptıkları inceleme de somatik hibritlerin her iki ebeveyninden de karakterler taşıdıklarını göstermişlerdir. Somatik hibrit bitkilerin morfolojik yapısının da her iki ebeveyne de eşit miktarda benzediğini gözlemlemişler[55].

Guan vd. kimyasal protoplast füzyonu yöntemiyle zencefilde somatik hibrit rejenerantlar elde etmeye yönelik çalışma gerçekleştirmişlerdir. Zencefil (*Zingiber officinale* Rosc.)’de somatik hibridizasyonu polietilen glikol kullanarak kimyasal yöntem ile yapmışlardır. Üç farklı zencefil çeşidinde embriyonik süspansiyon kültüründen protoplast izolasyonu gerçekleştirerek bu protoplastları da kendi aralarında füzyona uğratmışlardır. En yüksek füzyon oranı % 13.5’lik bir oranı Lushan Zhan-gliang jiang + Chenggu Huang Jiang çeşitleri arasında PEG 6000’i %30 oranında 15dk’da elde etmişlerdir. Kullandıkları diğer üç farklı füzyon oranlarında da mikrokoloniler oluşturmuşlardır fakat yalnızca Chenggu Huang Jiang + Sichuan Zhugen Jiang arasında rejenerant bitkiler elde edebilmişlerdir. Lushan Zhan-gliang jiang + Chenggu Huang Jiang hatları arasındaki rejenerasyondan bütün bitki oluşumunun yaklaşık 15 ay sürdüğünü belirlemişlerdir. RAPD ve flow sitometri yöntemleri ile

yaptıkları analizlerde üç adet melez bitkinin bulunduğunun ve bunlarında diploid olduklarının sonucuna varmışlardır[56].

Tarwacka vd. *Phytophthora infestans* fungal hastalığına karşı dayanıklılık için *Solanum villosum* (+) *S. tuberosum* arasında intersipsifik(türler arası) somatik hibrit bitki üretebilmek için çalışma yürütmüşlerdir. 4n kromozomlu *S. villosum* (+) 2n kromozomlu *S. tuberosum* klonunun sitolojik ve moleküler çalışmalarını yaparak kromozomlarını doğru türlere ait olup olmadığını saptamışlardır. Füzyon sonucunda elde ettikleri bitkilerin her iki ebeveyne de eşit miktarda benzediğini saptamışlardır. Elde edilen rejenerantlardaki ploidi seviyesinin 6n kromozomlu olmasını beklemişler fakat hibritlerin gerçek ploidi seviyesini öploid ve annöloid seviyeleri arasında değiştiğini gözlemlemişlerdir. Rejenerantların hibrit olup olmadıklarını RAPD moleküler marker yöntemiyle belirlemişlerdir. Ploidideki tespit ettikleri değişkenliğe rağmen RAPD analizi ve genomik in situ hibridizasyon yöntemleri ile gerçekleştirdikleri analizlerde melezlerin her iki ebeveynden de eşit miktarda etkilendiğini göstermişlerdir. Elde ettikleri somatik hibrit bitkilerin *Phytophthora infestans* fungal hastalığına karşı test ettiklerinde yüksek oranda dayanıklı çıktığını gözlemlemişlerdir[57].

Juan vd. *Brassica napus* ve *Sinapis alba* arasında somatik hibridizasyon yöntemini kullanarak yeni bir sitoplazmik erkek kısır kolza tohumu elde etmeye çalışmışlardır. Somatik hibridizasyon yöntemini sitoplazmik kısır bitki elde etmek için önemli bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Bu yöntemde sitoplazmik kısırlığa neden olan sebep olan genlerin hem donör ebeveynlerin füzyonu sonucunda mitokondriyal genomda kısırlık genlerinin aktarılmasından hem de protoplast füzyonu sürecinde biparent durumundan kaynaklı rekombinasyonlardaki yeni kısırlık genlerinin üretiminden kaynaklı olabileceğini belirtmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada SaNa-1A isimli yeni bir sitoplazmik kısır hat elde etmişlerdir. SaNa-1B sürdürücü hattının morfolojik normal polen gelişimi ve SaNa-1A erken polen süreci fenotipik gözlem ve mikrotom bölümleri karşılaştırarak belirlemişlerdir. Kısır SaNa-1A hattının çiçek organları kısalmış bir filament ve uç kısmı düşmüş anter ile kısır olduğunu morfolojik olarak belirlemişlerdir. Siteril anterlerde hiçbir polen olmadığını gözlemlemişlerdir[58].

Tomiczak vd. *Gentiana kurroo* R. ve *G. cruciata* L. türleri arasında genetik kompozisyon ve genetik stabilizenin somatik hibridizasyonu ile protoplast füzyonunun gerçekleştirilmesini sağlamışlardır. Yapılan bu çalışmada somatik hibritleri *Gentiana kurroo* R.'nin hücre süspansiyon kültüründen ve *G. cruciata* L.'nin yaprak mezofil hücrelerinden elde ettikleri protoplastları elektro füzyona uğratarak hibridizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları füzyon sonucunda elde ettikleri rejenerantların somatik hibrit olup olmadıklarını belirlemek için çeşitli moleküler yöntemler kullanmışlardır. Kullandıkları AFLP ve ISSR yöntemlerinde elde ettikleri rejenerantların yirmi birinin hibrit olduğunu ve üç adet kallus hattının da *G. Kurroo*'dan daha çok *G. Crucciata*'ya daha çok benzediklerini gözlemlemişlerdir. CAPS markerları ile yapılan kloroplast DNA analizi yöntemine göre elde ettikleri somatik hibritlerin kloroplastlarını, mezofil hücrelerinin kullanıldığı ebeveyn olan *G. Crucciata*'dan aldıklarını belirlemişlerdir. Flow sitometri analizine göre somatik hibritlerde poliploidleşmenin ortaya çıktığını göstermişlerdir ve bu olayın muhtemelen füzyon sonrası ilk aşamada ortaya çıktığını tahmin etmişlerdir. Sonuç olarak da çekirdek DNA'sının aşamalı eliminasyonu miksploidi ve yüksek derecedeki genetik stabilizasyonluğunu çoğu hibritlerde belirlemişlerdir ve kallus aşamasının sonraki dört yılda bekleme süresinin arttığını bildirmişlerdir. [59].

Bruznican vd. *Apium graveolens* L.'de protoplast kaynaklı hücre süspansiyon kültürü rejenerasyonu gerçekleştirmişlerdir. Protoplast füzyonu ve rejenerasyonu ile elde edilen sitoplazmik kısırlığın kereviz (*Apium graveolens*)'deki ıslah çalışmalarında çok önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Bu nedenle de yaptıkları çalışmada ilk olarak üç farklı ticari kereviz hattı için etkili ve pratik protoplast izolasyonu ve protoplast rejenerasyonu protokolü geliştirmişlerdir. Açık tozlanmış kültür çeşitleri ve bu kültür çeşidinin yakın akrabalarının hücre süspansiyonlarını protoplast kaynağı olarak kullanmışlardır. Karşılaştırmalı olarak yaptıkları analizler sonucunda 0.3 mg L⁻¹ 2,4-D içeren modifiye edilmiş sıvı Kao ve Michayluk ortamında en başarılı sonucu elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sitokininlerin (TDZ veya zeatin) rejenerasyona hiçbir etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir. Protoplast izolasyonundan sonra 15 gün ile 5 hafta arasında mikrokallusları elde etmişlerdir. Kültür ortamının değiştirilmesi ile mikrokolonilerin yapısında % 25 değişim gözlemlemişlerdir. İki ay sonra rejenerasyondan tam bitkileri elde etmişlerdir ve bunların diploid olduklarını ortaya çıkarmışlardır. Kültür

ortamındaki rejnerasyon temel olarak kültür çeşitlerindeki genetik yapıya bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Yakın akraba hatlarda rejnerasyon elde edememişler fakat tozlanabilen normal kültür hatlarından rejnerasyonu gerçekleştirebilmişlerdir[60].



2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitkisel Materyal

Materyal olarak Türkiye’de yetiştirilmekte olan KWS firmasına ait Valentina şeker pancarı (*Beta vulgaris* Var. *Saccharifera*) çeşidi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bu bitki materyali Kayseri Şeker Fabrikası Araştırma Enstitüsü’nden temin edilmiştir. Kullanılan bu şeker pancarı çeşidine ait bazı çeşit özellikleri, aşağıda verilmiştir.

- a) Dozer şeker pancarı çeşiti Syngenta firması tarafından geliştirilen bir çeşittir.
- b) *Rhizoctonia* (kök çürüklüğü), *Erysiphe betae* (külleme)
- c) Şeker oranı - çok yüksek
- d) Kök verimi – yüksek
- e) Makineli hasat için uygun

Çalışmada kullanılan bir diğer bitki materyali hayvan pancarı (*Beta vulgaris* Var. *rapacea*). Kayseri bölgesinde yerel çiftçilerin hayvan yemi elde etmek için kullanmakta olduğu ve her yıl kendi tohumlarını ürettikleri çeşittir. Bu hayvan pancarının genel özellikleri;

- a) Yüksek oranda protein içeriği
- b) Normal oranda şeker içeri
- c) Hayvanların beslenmesinde etkili bir besi materyali

Çalışmada kullanılan diğer bitki materyali de pazı (*Beta vulgaris* Var. *cicla*). Çalışmada arzuman tohum şirketinin pazı tohumları kullanılmıştır.

- a) Çoğunlukla Akdeniz ve Ege bölgesinde ekilmektedir.
- b) Soğuk hava şartlarına karşı diğer pancarlara göre biraz daha dayanıklı olduğu için ekimi Karadeniz bölgesinde de yapılmaktadır.

2.2. YÖNTEM

Yapılan bu çalışmada tesadüf parselleri deneme deseni uygulanmıştır. Denemede 3 farklı Beta türü kullanılmıştır. Ayrıca izolasyon süresi olarak farklı uygulamalar ve füzyon ajanı olarak PEG6000'nin farklı oranları uygulanmıştır. Çalışmada protoplast kaynağı olarak çeşitlerdeki yaprak mezofil hücreleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmaların neticesinde elde edilen protoplastların sayısı, füzyon ajanının etki ettiği ikili ve çoklu hücre sayısına ait veriler SAS istatistik programı kullanılarak varyans analizi yapılmış, uygulamalar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde LSD kullanılmıştır.

2.2.1. Deneme Alanı

Araştırma, Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (Gen-Kök) Laboratuvarında yürütülmüştür.

2.2.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Tez kapsamında, şeker pancarı (*Beta vulgaris* Var. *saccariferia*) Valentina, hayvan pancarı (*Beta vulgaris* Var. *rapacea*) ve pazı (*Beta vulgaris* Var. *cicla*) türlerine ait tohumlar içleri torfla doldurulan 3 litrelik saksılara ekilerek 12000 lüks ışık şiddetinde 16 saat gündüz 8 saat gece fotoperiyotta, 25 C° iklim odasında geliştirilmiştir (Şekil 2.1). Her saksıya 3 adet tohum ekilmiştir. Tohumların çimlenmesinden sonra her saksıda bir bitki olacak şekilde seyreltme yapılmıştır. Saksılardaki bitkilerin ihtiyaç durumlarına göre sulama yapılmıştır. Bitkiler 8-10 yapraklı dönemde yapraklardan örnekler kesilerek protoplast elde etmek amacı ile eksplant olarak kullanılmıştır (Şekil 2.2).

2.2.3. Yaprak Yüzey Sterilizasyonu

Saksıda yetiştirilen pancar varyetelerinin genç yapraklarından kesilerek alınan eksplantları % 0.1, 0.2, 0.4 ve 0.8 civar klorür (HgCl₂) içerisinde 20 dakika sterilize ettikten sonra iki dakika süre ile üç defa saf sudan geçirilerek durulanmıştır. Daha

sonrasında her bir türden yaprak parçaları alınarak % 0.8 (w/v) agar, % 3 (w/v) sukroz ve MS içeren ortamda canlılıkları gözlenmiştir.



Şekil 2.1. Sera ve büyüme odasında yetiştirilen 4-6 haftalık şeker pancarı, hayvan pancarı ve pazı bitkileri



Şekil 2.2. Eksplant olarak kullanılan taze şeker pancarı yaprakları

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan eksplant örneklerinin yüzey sterilizasyonu için $HgCl_2$ oranı denemesi.

Eksplant Kaynağı	$HgCl_2$ (w/v)			
	% 0.1	% 0.2	% 0.4	% 0.8
Şeker Pancarı	20 dk	20 dk	20 dk	20 dk
Hayvan Pancarı	20 dk	20 dk	20 dk	20 dk
Pazı	20 dk	20 dk	20 dk	20 dk

2.2.4. Protoplast İzolasyonu Öncesi Ön İşlem

Saksılarda yetiştirilen Beta varyetelerinden 2-3 haftalık aşamaya gelmiş yapraklar kesilerek alınıp yüzeysel sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra bu yapraklardan 1 gram tartılıp siteril 22 mm çapındaki petri içerisine alınarak yaprakların üst epidermisi ve yaprak orta damarı uzaklaştırılmıştır. Üst epidermis ve yaprak orta damarı uzaklaştırılan yaprak parçaları bisturi ile yaklaşık 1 mm kalınlığındaki parçalara ayrılmıştır.

2.2.5. Enzim Solüsyonunun Hazırlanması

Ön uygulama aşamasında protoplast izolasyonu için enzim karışımı hazırlanmıştır. Enzim solüsyonu içerisinde; % 2 (w/v) Selülaz (Sigma, from *Aspergillus niger*), % 1 (w/v) Pektinaz (Sigma, from *Aspergillus niger*), % 1 (w/v) hemiselülaz (Sigma, from *Aspergillus niger*) ve % 7 (w/v) (Sigma) mannitol içermektedir ve bu solüsyonun pH'sı 5.7 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan enzim solüsyonunun içeriği.

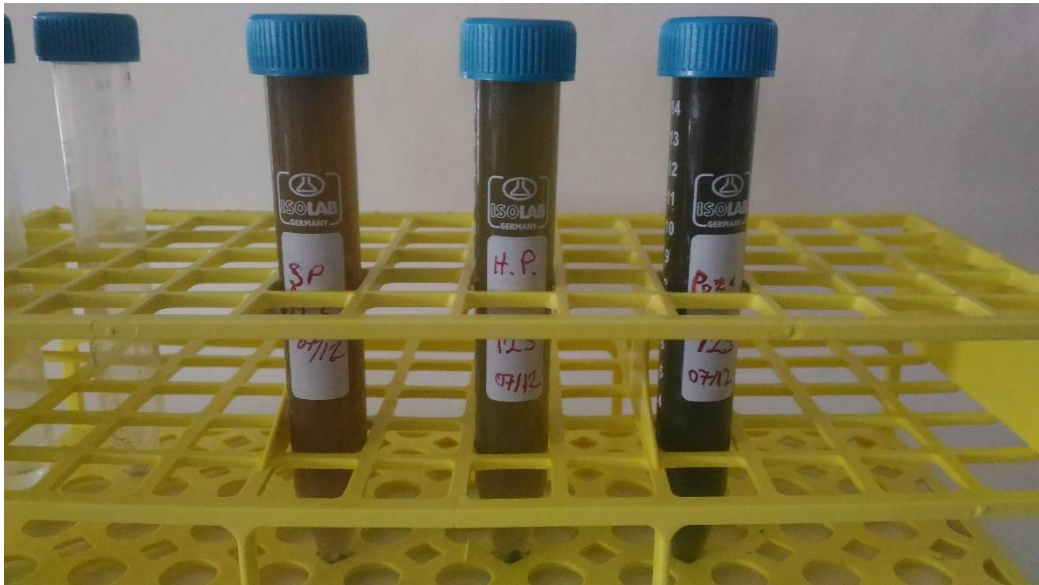
Enzim ve Kimyasal Çeşitleri	Miktar (W/V)
Selülaz (Sigma)	% 2
Pektinaz (Sigma)	% 1
Hemiselülaz (Sigma)	% 1
Mannitol (Sigma)	% 7

Petri içerisinde hazırlanan yaprak eksplantlarının üzerine enzim solüsyonu 0.2 µM (Sartorius Stedim, Minisart® Hydrophilic Syringe Filter) por çaplı filtreden şırınga (Omnifix®) kullanılarak geçirerek 10 ml enzim solüsyonunu sterilize ettikten sonra eklenmiştir. Daha sonrasında ise bu enzim solüsyonunda 12, 14 ve 16 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda 50 rpm'de çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bu süreçte eksplant içerisindeki yaprak hücrelerinin selüloz içerikli hücre duvarı parçalanarak protoplastlar açığa çıkmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Yaprak eksplantları bistirü ile kesilerek 1 mm kalınlıkta yaprak parçalarının elde edilmesi ve 14 saat sonra yaprak parçalarının enzim solüsyonunda parçalanması.

12, 14 ve 16 saat enzim solüsyonu içerisinde bekletilen yaprak eksplantları daha sonrasında 15 dk 121 C⁰'de otoklavda siterilize edilen 15 ml'lik falkon tüplerin içerisine siteril 35 µM nylon mesh'den geçirilerek solüsyon içerisinde kalan yaprak parçaları uzaklaştırılmıştır (Şekil2.4).



Şekil 2. 4. Enzim inkübasyonu sonunda 35 µm por çaplı nylon mesh filtre ile süzülerek yaprak parçalarının uzaklaştırılması.

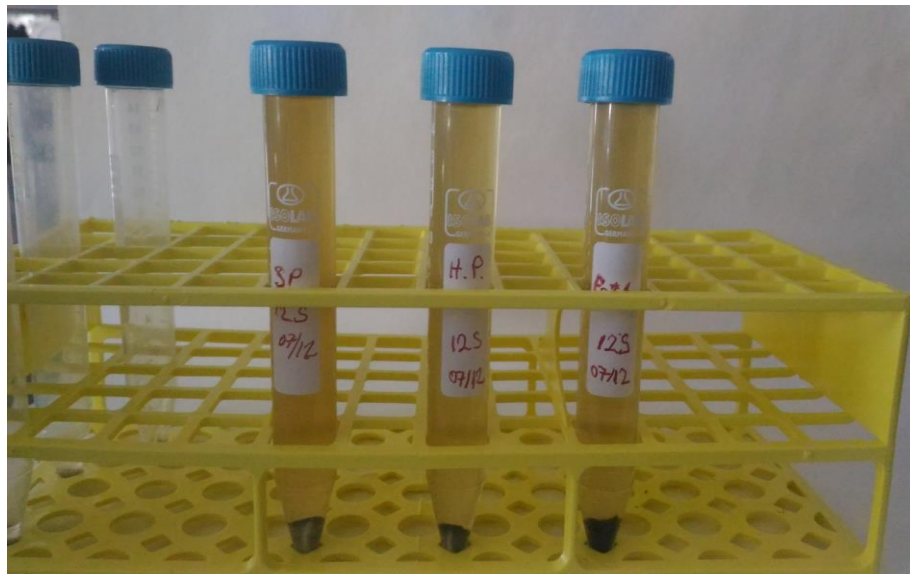
2.2.6. Protoplast Saflaştırma

pH'sı 5.7 olarak ayarlanıp otoklavda sterilize edilmiş %5 Mannitol (w/v) solüsyonu enzim solüsyonu içeren eksplantların olduğu falkon 15 ml'ye tamamlanarak protoplast süspansiyonu 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek, protoplastların falkon tüpünün dibine çökmeleri sağlanmıştır. Dibe çökerek pelet oluşturan protoplastların üzerindeki sıvı (süpernatant) pipet yardımıyla alınmış ve üzerine yıkama solüsyonu olarak adlandırılan CPW (Cell and Protoplast Washing) solüsyonu (Tablo 2.3) ilave edilmiştir[61].

Tablo 2.3. CPW yıkama solüsyonu içeriği.

CPW BİLEŞİKLERİ	KONSANTRASYON (mg/L)
KNO ₃	101
CaCl ₂ H ₂ O	1.480
MgSO ₄ H ₂ O	2461
KH ₂ PO ₄	27.2
KI	0.16
Mannitol	7000

CPW solüsyonu, falkon tüpündeki peletin üzerine 15 ml'ye tamamlanacak şekilde eklenerek 1000 rpm'de 10 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra protoplastlar falkonun dibine çökerek pellet oluşturmuştur (Şekil 2.5).



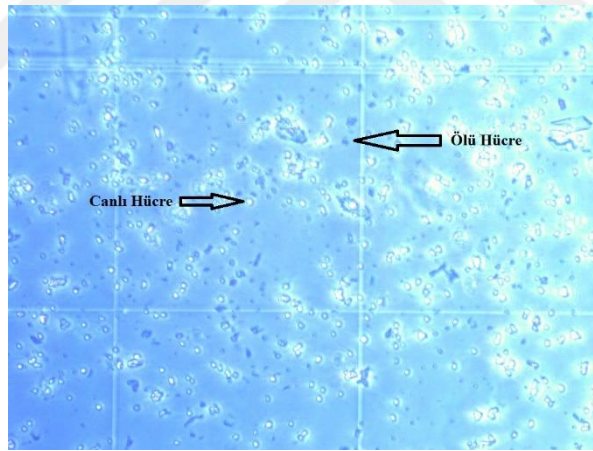
Şekil 2.5. Santrifüj sonrası dibe çöken protoplastlar.

Pelleti sarmsadan ve hareket ettirmeden, supernatan siteril mikropipet (1000 μ l) yardımıyla alınmıştır (Şekil 2.5). Daha sonrasında %5'lik Mannitol (w/v) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yine 15 mL'ye tamamlayacak şekilde ilave edilen %5'lik Mannitol (w/v), 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Mannitol ile yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır.

2.2.7. İzole Edilen Protoplastların Sayımı ve Canlılıklarının Belirlenmesi

Mannitol ile yapılan en son yıkama sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve dipte kalan pelet süspanse edildikten sonra 30 μ L protoplast örneği alınarak ependorf içerisine koyulmuştur.

Daha sonra bunun üzerine % 0.4 (w/v) trypan blue (sigma) boyası eklenerek ölü protoplastlara boyanın nüfuz edebilmesi için on dakika beklenmiştir. Bunun ardından hazırlanan örnek pipetle alınarak 0.1mm'lik Neubauer hemositometrisi altında incelenmiştir.



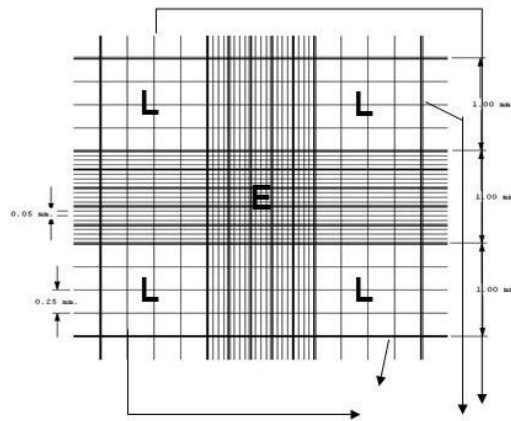
Şekil 2.6. Hemositometri camı altında trypan blue boyası kullanarak canlı ve ölü protoplast sayımı

Bu inceleme neticesinde izole edilen protoplastlardan 1 ml'de toplam ne kadar canlı ve ölü protoplast olduğunu hesaplanmıştır(Şekil 2.6).

2.2.8. Hemositometri Camı ile Protoplast Sayımı

In vivo alınan yaprakların sterilizasyon işleminden sonra üzerlerine enzim süspansiyonu eklenerek farklı sürelerde inkkübasyona bırakılmıştır. Bu sürelerin sonunda elde edilen protoplastların izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrasında elde edilen

protoplastların ölçümü traypan blue (sigma) boyası kullanılarak yapılmıştır. Protoplast örneğinden alınan 30 µl protoplast örneğin üzerine %0.4'lük 30 µl traypan blue eklenmiştir. Sonrasında boyanın ölü protoplastlara daha iyi tutanabilmesi için 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hazırlanan örnek hemositometri camına koyularak hemositometri camının üzerinde Şekil 3.4 gösterilen beş adet kare içerisinde kalan protoplastlar sayılmıştır.



Şekil 2.7. Hemositometri camı üzerindeki kareler

Hemositometri camında sayılan bu toplam beş karedeki protoplast sayısına toplam protoplast sayısı denilmektedir. Toplam protoplast sayısını kare sayısına böldüğümüzde ortalama protoplast sayısı bulunur. Bunun ardından sulandırma miktarı hesaplanır. Buda Trypan blue ile hazırlanan örnektir. Bizim eklediğimiz protoplast örneği 30 µl'idi ve buna 30 µl Trypan blue eklendi toplam hacim 60 µl oldu. Toplam hacim koyulan örneğin hacmine bölündüğünde ise sulandırma miktarı bulunur. En son genel olarak kullanılan formül yardımıyla 1 ml'de toplam ne kadar protoplast olduğu hesaplandı. Bu formülde; Ortalama Protoplast Sayısı x Sulandırma miktarı x 10^4 =1 ml'deki toplam protoplast miktarı.

2.2.9. Protoplast Füzyonu

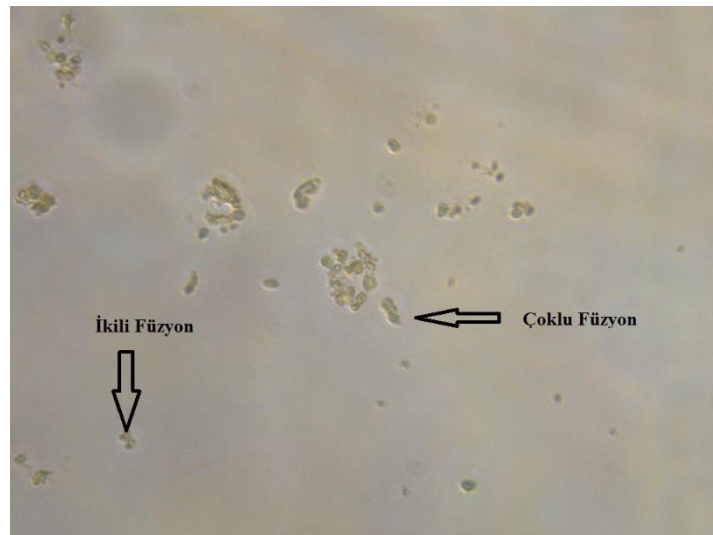
Protoplast saflaştırması yapıldıktan sonra yaprak mezofil hücrelerinden elde edilen protoplastlar füzyona uğratılmadan önce her iki ebeveyn hattın da 5×10^3 miktarında protoplast içeren süspansiyon oluşturulmuştur. Daha sonrasında protoplast karışımları PEG (Polietilen Gilikol) 6000 kullanılarak kimyasal füzyona uğratılmıştır. Her iki çeşit

denemesinde de 15 ml'lik falkon tüp içerisinde eşit (5×10^3) miktarda protoplast olacak şekilde üzerlerine 8 ml hazırlanan PEG6000 solüsyonu eklenmiştir. PEG6000 solüsyonunun etkin çalışma mekanizmasını bulabilmek farklı yüzde de (% 15, % 20 ve %25) ve farklı sürelerde (10 dk ve 20 dk) PEG denemesi yapıldı.

PEG6000'ye maruz bırakılan sürenin sonunda protoplastlar füzyona uğramışlardır. Sürenin sonunda 8 ml protoplast ve PEG6000 solüsyonu protoplast izolasyonunda kullanılan CPW solüsyonu ile 15 ml'ye tamamlanmıştır ve 1000 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edilerek yıkanmıştır. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılıp peletin üzerine 15 ml % 5'lik mannitol solüsyonu eklenmiştir. Bu işlemten sonra tekrar 1000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılmış ve falkonun dibinde kalan protoplastların üzerindeki mannitol solüsyonu pipet ile uzaklaştırılmıştır. Elde ettiğimiz peleti süspansiyon ettikten sonra 50 µl örnek alarak bunun içerisinde ne kadar ikili ve çoklu füzyon ürününün olduğu sayılarak PEG etkin düzeyi belirlenmiştir(Şekil 2.7).

2.2.10. PEG 6000 Hazırlanması

%15, 20 ve 25 (w/v) PEG 6000 tartılmış 10 ml su içerisinde çözündürülmüş ve 66 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.97 g) ve 0.3 M Glukoz (5.41 g) karışımı eklenmiştir. Bu karışım saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır ve 15 dk 121 C^0 'de otoklavlanmıştır[62].



Şekil 2.8. Füzyon Sonrası ikili ve çoklu füzyon ürünlerinin sayılması

2.2.11. Mikrokallus Oluşumu

In vivo koşullarda oluşturulan şeker pancarı, hayvan pancarı ve pazı yapraklarından izole edilen protoplastın mikrokallusunun teşvik edildiği ortamlar bitki büyüme düzenleyici hormonlarla desteklenen MS süspansiyon ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamların içerisine füzyonu gerçekleştirilen mililitrede 5×10^3 sayıda hücre içeren örnekler eklenmiştir. Dördüncü hafta sonunda süspansiyon ortamlarında bekletilen her bir petri içerisindeki mikrokalluslar sayılmış ve tesadüf parselleri deneme desenine uygun olarak SAS istatistik programında süspansiyon ortamlarının önem derecesi incelenmiştir.

Tablo 2.4. Füzyon ürünlerinin aktarıldığı süspansiyon ortamları.

Ortam Kodu	Temek Ortam	Sukroz	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)			Agar
			NAA	BAP	2,4 D	
ORT1	MS	30 g/L	0.8 mg/L	0.5 mg/L	-	-
ORT2	MS	30 g/L	0.8 mg/L	-	0.2 mg/L	-
ORT3	MS	30 g/L	1 mg/L	0.5 mg/L	0.2 mg/L	-

Tablo 2.5. Çalışmada kullanılan, MS ortamı (Murashige ve Skoog, 1962) makro ve mikro elementler ve miktarları [63].

Bileşik	Konsantrasyon (mg/l)
Makro Elementler (MS, 1962)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
NH ₄ NO ₃	1900
KNO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Mikro Elementler (MS, 1962)	
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .H ₂ O	15.6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
KI	0.8
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3

2.2.12. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma süresince yapılan uygulamalar, tesadüf parselleri deneme deseni esas alınarak SAS istatistik programında analizi yapılmıştır.



3. BÖLÜM

ARAŞTIRMA ve BULGULAR

3.1. Yaprak Yüzey Sterilizasyonu

Yaprak eksplantları HgCl₂'nin farklı dozlarında tesadüf parselleri deneme desenine göre beş tekerrürlü olarak test edildiğinde dokularda ölü olanlar ve canlı kalanlar (Şekil 3.1) tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar SAS istatistik programında incelenerek varyans analiz tablosu ve LSD tablosu oluşturulmuştur (Tablo 3.2, Tablo 3.3).

Tablo 3. 1. Farklı HgCl₂ uygulamalarının canlı doku oranına ait varyans analiz tablosu

Varyasyon	S.D.	Hata Kareler	Hata Kareler	F Değeri
Ortam	3	37.80	12.60	63**
Hata	16	3.2	0.2	
Genel Toplam	19	41		

** : %0.01 düzeyinde önemli

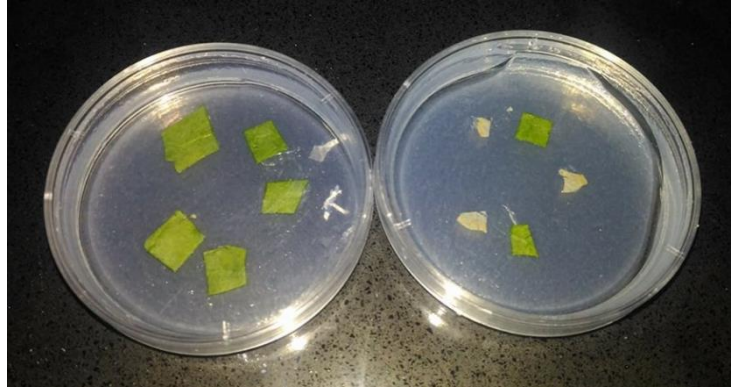
Farklı HgCl₂ uygulamalarının canlı doku oranına ait varyans analiz tablosu incelendiğinde uygulamalar arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu görülmektedir (Tablo 3.1.) Varyans analiz sonuçlarına göre HgCl₂'ün eksplant canlılığı üzerine çok önemli bir etkisi olduğu ortaya çıkmıştır.

Tablo 3.2. Farklı HgCl₂ uygulamalarının canlı doku oranı üzerine etkisi (%)

HgCl ₂ (%)	Canlı doku oranı (%)
0.1	100 A
0.2	88 B
0.4	64 C
0.8	28 D

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan HgCl₂ eksplantların canlılığı üzerine önemli etkide bulunmuştur. Farklı HgCl₂ dozları ortalama canlı doku oranı üzerine etkileri incelendiğinde bir birinden önemli derecede dört farklı grup oluştuğu görülmektedir (Tablo

3.2.) Anılan karakter yönünden en iyi sonuçlar % 0.1 HgCl₂ oranından elde edildiği görülmektedir. Artan HgCl₂ dozları eksplant canlılığını önemli derecede azaltmıştır.



Şekil 3.1. Farklı HgCl₂ uygulamalarında canlı ve ölü dokular

3.2. *In Vivo* Kökenli Şeker Pancarı, Hayvan Pancarı, Pazı Protoplast İzolasyonu ve Mikrokallus Oluşumu

3.2.1. Protoplast İzolasyonu

In vivo alınan yapraklar, protoplast izolasyonu için 22m steril petrilere 1'er g olacak şekilde gruplandırılmıştır. Petrilere konulan yapraklar bistüri ve pens yardımıyla ince ince kıyılarak bir gram izolasyon doğrudan enzim solüsyonuna maruz bırakılarak inkübasyon süreci başlatılmıştır. Bütün petrilere % 1 Pektinaz, %2 Hemiselülaz %1 Selülaz ve %7'lik Mannitol(w/v) içerikli enzim solüsyonundan ilave edilmiştir. Enzim inkübasyon süreci için 12, 14 ve 16 saatlik denemeler kurulmuştur. Bu denemelerin hepsi karanlık bir ortamda ve çalkalayıcıda 50 rpm'de gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3. Şeker pancarı, hayvan pancarı ve pazı bitkilerinde enzim inkübasyon sürelerine göre bir mililitredeki canlı protoplast sayıları

Canlı Protoplast Sayımı	12 Saat	14 Saat	16 Saat
Şeker Pancarı	9.4x10 ⁶	8.86x10 ⁶	15.68x10 ⁶
Hayvan Pancarı	18.16x10 ⁶	15.37x10 ⁶	6.55x10 ⁶
Pazı	12.29x10 ⁶	10.57x10 ⁶	2.09x10 ⁶

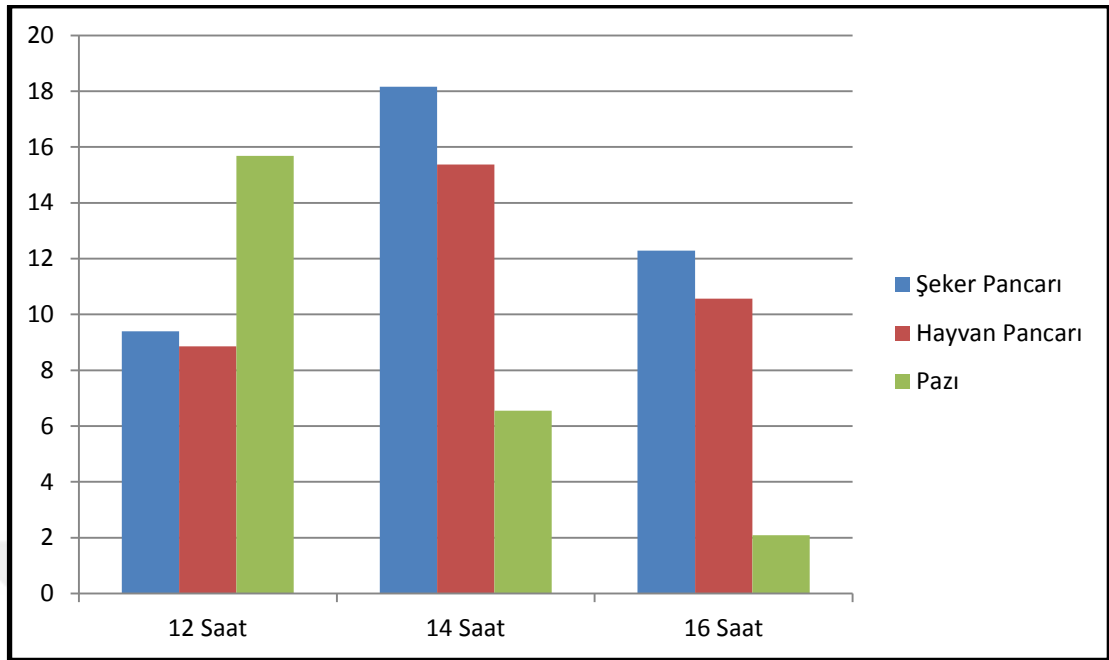
Tablo 3.4. Şeker pancarı, Hayvan Pancarı ve Pazı bitkilerinde enzim inkübasyon sürelerine göre *in vivo* kökenli izole edilen ölü protoplastların 1ml'deki sayıları

Ölü Protoplast Sayımı	12 Saat	14 Saat	16 Saat
Şeker Pancarı	5×10^6	9.78×10^6	9×10^6
Hayvan Pancarı	9.97×10^6	10.32×10^6	8.92×10^6
Pazı	1.6×10^6	11.94×10^6	4.14×10^6

In vivo'da üretilen şeker pancarından alınan yaprak eksplantlarından en yüksek protoplast izolasyonu 16 saatlik enzim inkübasyon sürecinin ardından mililtrede $15,68 \times 10^6$ sayıda protoplast olarak elde edilmiştir(Tablo 3.3.). Hayvan pancarında *in vivo* alınan yaprak örneklerinde elde edilen en yüksek 12 saat $18,16 \times 10^6$ sayıda canlı protoplast elde edilmiştir(Tablo 3.3). Pazıda *in vivo* elde edilen yaprak örneklerinin enzim inkübasyonundan sonra en yüksek 12 saat $12,29 \times 10^6$ sayıda canlı protoplast elde edilmiştir(Tablo 3.3.).

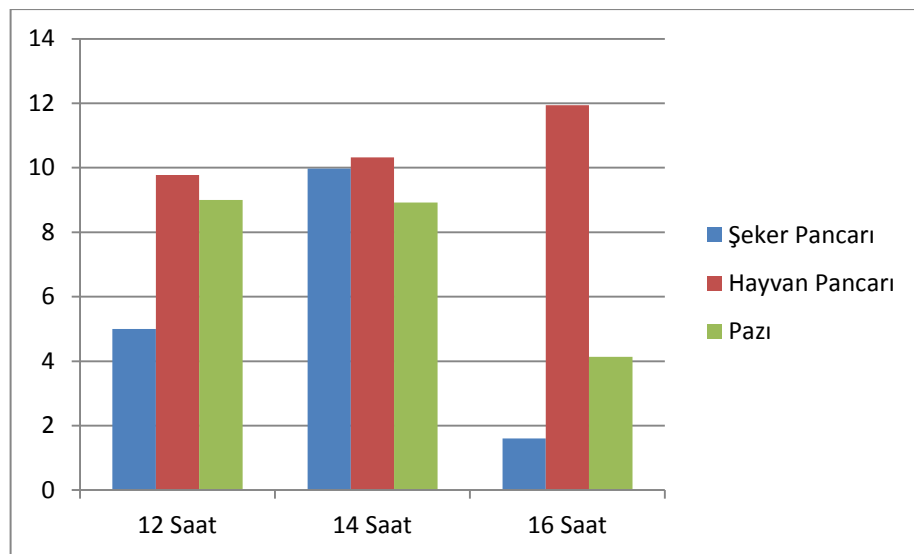
In vivo şeker pancarı, hayvan pancarı ve pazı yapraklarında en fazla ölü protoplast eldesi sırayla; 14 saat $9,78 \times 10^6$, 14 saat $10,32 \times 10^6$ ve 14 saat $11,94 \times 10^6$ olarak belirlenmiştir(Tablo 3.4.).

In vivo üretilen şeker pancarı, hayvan pancarı ve pazı yapraklarından alınan eksplantlara doğrudan enzim inkübasyonu başlatıldığında, Şekilde 3.2'de gösterildiği üzere en yüksek izole edilmiş protoplast sayısı sırasıyla 16, 12 ve 12 saatlik inkübasyon sürecinin ardından elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Şeker pancarı, Hayvan pancarı ve Pazu'dan izole edilen canlı protoplast sayısı (10⁶).

In vivo üretilen şeker pancarı, hayvan pancarı ve pazı yapraklarından alınan eksplantlara doğrudan enzim inkübasyonu başlatıldığında, Şekilde 3.3'de gösterildiği üzere en fazla izole edilmiş ölü protoplast sayısı bütün bitkilerde 14 saatlik inkübasyon sürecinin ardından elde edilmiştir.



Şekil 3.3. Şeker pancarı, Hayvan pancarı ve Pazu'dan izole edilen ölü protoplast sayısı (10⁶).

3.2.2. Elde Edilen Protoplastların Füzyonu

Her türde mililitrede protoplast sayısı belirlendikten sonra, şeker pancarı X hayvan pancarı ve şeker pancarı X pazı arasında her bir ebeveyn hattan ml'de 5×10^3 protoplast olacak şekilde bir steril ependorfun içerisine alınmıştır. Bunun ardından daha önceden hazırlanan % 15, 20 ve 25 lik polietilen glikol (sigma) içerisine bırakılmış ve farklı sürelerde (10 dk ve 20 dk) füzyonun gerçekleşmesi beklenmiştir.

Belirlenen sürelerde protoplastlar bekletildikten sonra mikroskop altında $50 \mu\text{l}$ 'de ne kadar ikili ve çoklu füzyon ürünü olduğu belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda şeker pancarı X pazı arasında en iyi ikili füzyon sayısı elde edilen uygulama 59 adet ile (Tablo 3.5.) % 20 PEG6000 20 dakika uygulaması belirlenmiştir. Şeker pancarı x hayvan pancarı arasında en fazla ikili füzyon sayısı elde edilen uygulama 62 adet ile yine % 20 PEG6000 20 dakika uygulaması olmuştur.

Tablo 3.5. Füzyon sonrası elde edilen ikili ve çoklu füzyon sayısı

Protoplast Kaynağı	PEG Oran %	Süre (dk)	Çoklu Füzyon	İkili Füzyon
Ş-P	15	10	42	37
		20	51	55
Ş-H	15	10	40	41
		20	53	52
Ş-P	20	10	72	43
		20	80	59
Ş-H	20	10	75	40
		20	83	62
Ş-P	25	10	102	45
		20	203	35
Ş-H	25	10	112	47
		20	198	32

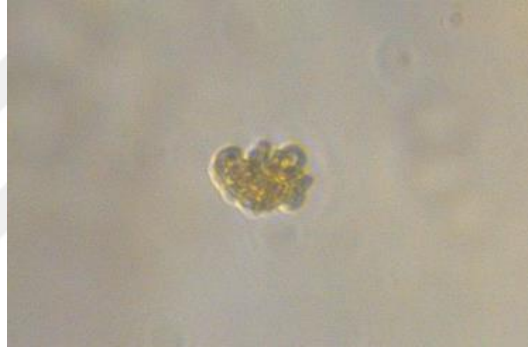
(Ş: Şeker pancarı, H: Hayvan pancarı, P: Pazı)

3.2.3. Protoplast Füzyon Ürünlerinden Mikrokallus Elde Edilmesi

Uygun protoplast füzyonu yöntemi belirlendikten sonra mililitrede 5×10^3 protoplast olacak şekilde ölçülüp 10 ml ortamlara eklenmiştir. Bu aşamada üç farklı ortam denenmiştir. Ortamlarda MS bazal ortamı kullanılmış ve buna ek olarak % 3 sukroz, bitki büyüme düzenleyicileri eklenmiştir.

Protoplastlar kültüre alındıktan sonra 2. günde hücre duvarlarının oluştuğu gözlemlenmiştir

Beşinci günde kültür ortamındaki protoplastların hücre kolonileri oluşturdukları gözlemlenmiştir(Şekil 3.4;3.5).

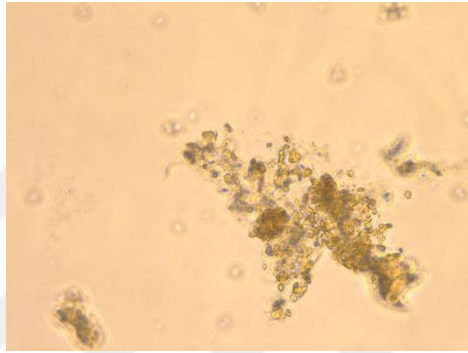


Şekil 3.4. Çevresinde hücre duvarı oluşan protoplastlar.



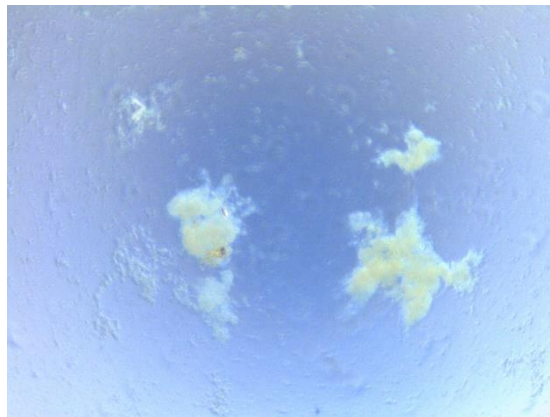
Şekil 3.5. Oluşan hücrelerin çoğalarak hücre kolonilerinin oluşumu

Yedinci günde mikrokallus oluşumları mikroskop altında gözlemlenebilir hale gelmiştir (Şekil 3.6.). Bu aşamada protoplastların hücre duvarlarının oluşmuş, hücre kolonilerini tamamlamış ve artık bunların çoğalarak kallus yapısını oluşturmaya başladıkları gözlemlenmiştir. Bu yapıların her gün kontrolü yapılarak değişim oranları incelenmiştir. Yedinci günün sonunda petrilere iki mililitre taze ortamlar eklenmiştir. Bu yapılan işlem ile ortamların içerisindeki sukroz, MS ve bitki büyüme düzenleyicilerinin yetersiz hale gelmesinin önüne geçilmiştir. Bu aşamada protoplastların mikrokalluslara dönüşebilmesi için bitki büyüme düzenleyicileri çok önemli bir rol taşımaktadır.



Şekil 3.6. 40x mikroskop altında gözlemlenen mikrokalluslar

Kültür ortamındaki protoplastlardan 14 gün sonunda mikrokallus sayımı yapılmıştır(Şekil 3.7). On dördüncü günün sonunda mikrokalluslar çıplak gözle gözlemlenebilir hale gelmişlerdir.



Şekil 3.7. 4x mikroskop altında on dört günlük mikrokalluslar

Yapılan çalışmada kullanılan üç farklı ortamda altı tekerrür uygulanıp tesadüf parsellerine göre hesaplanmıştır.

Tablo 3.6. Şeker pancarı x hayvan pancarı füzyonlarından oluşan mikrokallus süspansiyon ortamlarının varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D.	Hata Kareler Toplamı	Hata Kareler Ortalaması	F Değeri
Ortam	2	2545.4	1272.72	374.33**
Hata	15	51	3.4	
Genel Toplam	17	2596.4		

** : %0.01 düzeyinde önemli

Şeker pancarı x hayvan pancarı füzyonları arasında oluşan mikrokallusların sayısı her ortama göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir(Tablo 3.7.). SAS istatistik programı ile yapılan LSD ve varyans analizi incelemelerinde (Tablo 3.6.) 1mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP ve 0.2 mg/L 2,4 D bitki büyüme düzenleyicisi içeren ORT3 süspansiyon ortamında elde edilmiştir(Tablo 3.7.).

Tablo 3.7. Şeker pancarı x hayvan pancarı füzyon ürünleri mikrokallus oluşum oranı (%)

Ortam	Mikrokallus oranı (%)
ORT3	52.66 A
ORT1	41.83 B
ORT2	23.83 C

Şeker pancarı x pazı füzyonları arasında oluşan mikrokallusların sayısı süspansiyon ortamları arasında farklılık olduğunu göstermiştir(Tablo 3.9.). SAS istatistik programı ile yapılan LSD ve varyans analizi sonuçlarına göre (Tablo 3.8.) 1mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP ve 0.2 mg/L 2,4 D bitki büyüme düzenleyicisi içeren ORT3 süspansiyon ortamında en iyi sonuç elde edilmiştir(Tablo 3.9.).

Tablo 3.8. Şeker pancarı x pazı füzyonlarından oluşan mikrokallus süspansiyon ortamlarının varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D.	Hata Kareler Toplamı	Hata Kareler Ortalaması	F Değeri
Ortam	2	3241	1620.5	422.74**
Hata	15	57.5	3.83	
Genel Toplam	17	3298.5		

** : %0.01 düzeyinde önemli

Tablo 3.9. Şeker pancarı x hayvan pancarı füzyon ürünleri mikrokallus oluşum oranı (%)

Ortam	Mikrokallus oranı (%)
ORT3	52.66 A
ORT1	43.16 B
ORT2	20.66 C

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışmada öncelikle, eksplantların sterilizasyon çalışması esas alınmış ve en uygun şekilde canlı kalan eksplantlar için sterilizasyon yöntemi belirlenmiştir. Sterilizasyon protokolü oluşturulduktan hemen sonra şeker pancarı, hayvan pancarı ve pazıda yaprak örnekleri alınıp sterilize edilerek enzim inkübasyonunda protoplastlar izole edilip gerekli uygulamalar yapılmış ve protoplastlar füzyona uğratılıp ikili ve çoklu füzyon ürünleri elde edilmiştir.

In vivo ortamdan alınan yapraklar için dört farklı sterilizasyon denemesi uygulandı. Bunların içerisinde hayatta kalan eksplant sayısı en iyi olan yöntem STR1 istatistiki olarak belirlendi. Daha önceki yaprak yüzey sterilizasyonunda gözlemlediğimiz kadarıyla şeker pancarının yapraklarında kararmalar oldukça fazla olmaktaydı. Bizde alternatif bir yöntem olarak $HgCl_2$ kullandık ve olumlu sonuçlar elde ettik. Daha önce yapılan protoplast izolasyon çalışmalarında ise genellikle $NaClO$ kullanmışlardır [22][29][31][32].

Yapmış olduğumuz çalışmada % 0.1 $HgCl_2$ 'nin 20 dk uygulanması ile yapılan sterilizasyonda yaprakların herhangi bir zarara uğramadan ve bulaşıklık oluşturmadan kullanılabilceği gözlemlenmiştir. Bu yöntem $NaClO$ uygulaması yöntemine alternatif bir yöntem olması oldukça olasıdır.

Yaprakların % 2 selülaz, % 1 pektinaz, % 1 ve % 7 mannitol içeren enzim solüsyonunda inkübe edilmesi ile üç farklı varyantımızda farklı saatlerde farklı miktarlarda protoplastlar elde edilmiştir. Yaptığımız çalışmada şeker pancarı 16 saat inkübe edildiğinde mililitrede en yüksek protoplast miktarı elde edilmiştir. Hayvan pancarı ve pazıda ise 12 saatlik bir inkübasyon sonucunda mililitrede en fazla protoplast sayısı elde edilmiştir.

Tarafımızdan yapılan bu çalışmada, *in vivo*'dan yetiştirilmiş şeker pancarı, hayvan pancarı ve pazı yapraklarından protoplast izolasyonları gerçekleştirilmiştir. *In vivo*'dan alınan yaprak eksplantları STR1 sterilizasyon yöntemiyle sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra protoplast izolasyonu tamamlanmıştır. *In vitro* alınan *Beta* ürlerinin yapraklarındaki mezofil hücrelerinden, protoplast izolasyon yöntemiyle protoplastlar elde edilmiştir. Bu çalışmada enzim inkübasyon sürelerine göre protoplast izolasyon verimliliği araştırılmıştır. Yapılan tüm bu denemeler sonucunda, *in vivo*'dan alınan *Beta* ürlerinin yaprak eksplantlarından en yüksek protoplast izolasyonları şeker pancarından en yüksek protoplast izolasyonu 16 saatlik enzim inkübasyon sürecinin ardından mililitrede 15.68×10^6 sayıda protoplast hayvan pancarında 12 saatlik inkübasyonda mililitrede 18.16×10^6 protoplast ve pazı yapraklarından 12 saat inkübasyondan mililitrede 12.29×10^6 protoplast elde edilmiştir.

Shlangstedt vd. yaptıkları çalışmada şeker pancarının petiollerinden protoplast elde etmek için çalışma yürütmüş ve çalışmasında petiol eksplantını inkübe etmek için Selülaz TC (% 1, Serva), Pektinaz (% 1.5, Serva), selülizin (% 0.2, Calbiochem), Selülaz Onozuka R10 (0.1 %, Serva), Makerozym R10 (% 0.2, Serva) ve Driselaz (% 0.075, Fluka) enzim süspansiyonunu kullanmışlardır. Yaptıkları bu inkübasyon neticesinde mililitrede 1×10^4 ve 5×10^5 arasında bulmuşlardır[42]. Pedersen vd. CPW tuzları, % 9 (w/v) mannitol, 0.1 mM n-propyl-gallate (nPG), % 1 (w/v) selülaz TC (Serva), % 1 (w/v) selülaz Onozuka R10 (Yakult), % 0.5 (w/v) makerozym Onozuka R 10 (Yakult) ve % 0.05 driselaz (Sigma) enzim kombinasyonunu kullanarak şeker pancarı (*Beta vulgaris sacharifieria*) ve *Beta martima* yapraklarında yaklaşık mililitrede 4×10^6 ve petiollerinde ise 2.05×10^6 protoplast elde etmişlerdir [32].

Yapılan bu çalışmalar neticesinde elde edilen protoplastların sayılarındaki bu farklılık enzim kombinasyonları ve genetik farklılıktan kaynaklı olduğu tahmin edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada füzyon ürünü olarak kimyasal yöntem yani polietilen glikol 6000 kullanılmıştır. Polietilen glikol farklı sürelerde ve farklı dozajlarda uygulanarak ikili ve çok füzyon ürünlerini ne kadar ürettikleri test edilmiştir. Polietilen glikol 6000 % 15, 20 ve 25 dozajında 10 dk ile 20 dk sürelerde uygulanmıştır. Şeker pancarında, hayvan pancarında ve pazıda en iyi ikili füzyon ürünleri % 20 PEG ve 20 dk uygulamasından elde edilmiştir.

Bates yaptığı çalışmada *Nicotiana* yapraklarının mezofil hücrelerinden elde edilen protoplastları kullanarak füzyon çalışması yapmıştır. Yaptığı çalışmada füzyon işlemini gerçekleştirmek için hem kimyasal PEG yöntemi hemde elektrofüzyon yöntemini gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak da polietilen glikol ile % 10 çoklu füzyon, %3 ikili füzyon ve elektrofüzyon yöntemi ile de % 19.5 çoklu füzyon, % 5.4 ikili füzyon elde etmişlerdir [22].

Elde ettiğimiz bu çalışmadaki füzyon ürünlerini hem şeker pancarı x hayvan pancarı hemde şeker pancarı x pazı arasında mikro kallus oluşumu için MS temel ortamında, % 3 sukroz ve üç farklı (0.8 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP – 0.8 mg/L NAA, 0.2 mg/L 2,4 D – 1 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP, 0.2 mg/L 2,4 D) hormon konsantrasyonunu içeren süspansiyon ortamlarında kültüre alınmıştır. Bunun neticesinde şeker pancarı x hayvan pancarı arasındaki füzyonların süspansiyonunda ORT3 ortamında ortalama % 52.66, ORT2 ortamında % 23.83 ve ORT1 ortamında % 41,83 mikro kallus oluşumunu gözlemledik. Bunun yanı sıra şeker pancarı x pazı arasındaki elde edilen füzyon ürünlerinin süspansiyon ortamındaki mikro kallus oluşumunda ORT3 ortamında % 52.66, ORT1 ortamında % 43.16 ve ORT2 ortamında ise % 20.66 mikro kallus oranı elde edildiği tespit edilmiştir.

Schlangstedt vd. şeker pancarı yapraklarından ve petiollerinden protoplast izolasyonu gerçekleştirerek kimyasal yöntem polietilen glikol ile füzyonu gerçekleştirmişlerdir. Füzyon neticesinde elde ettikleri füzyon ürünlerini % 1 aljinat(sigma), SD temel besin içerikli % 3 sukroz ve 1 mg/L, 1.5 mg/L, 2 mg/L 2,4 D bitki besin düzenleyicisi içeren ortamda mikrokallus oluşumu test etmişlerdir. Bu denemenin neticesinde 1 mg/L 2,4 D içeren ortamda % 42, 1.5 mg/L 2,4 D içeren ortamda % 41 ve 2 mg/L 2,4 D içeren ortamda ise % 23 mikrokallus oluşumu belirlemişlerdir [26].

Schlangstedt vd.'nin yaptığı çalışmadan anlaşılacağı üzere 2,4 D bitki büyüme düzenleyicisinin 2 mg/L'ye kadar olumlu etkisi bulunmaktadır. Ayrıca ortamda aljinatın etkisi ise yaptığımız süspansiyon ortamı ile karşılaştırıldığında önemli bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada, *in vivo* koşullarda yetiştirilmiş şeker pancarı (*Beta vulgaris saccharifera*), hayvan pancarı (*Beta vulgaris rapacea*) ve pazıda (*Beta vulgaris ruba*)

protoplast izolasyonu ve füzyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler, Beta varyetelerinde yapılacak daha sonraki füzyon çalışmalarında kullanılabilir.

Bundan sonraki çalışmalarda; füzyona uğratılan protoplastların genetik analizleri yapılarak hibrit ya da sibrit tespitine gidilmelidir. Tespit edilen hibrit ya da sibritlerin mikrokallus oluşturmalarının ardından bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmeleri sağlanarak, füzyon sonucu elde edilen Beta varyetelerinde herhangi bir fizyolojik ve morfolojik farklılıklar araştırılabilir.

In vivo koşullarda yetiştirilen Beta varyetelerinde çalıştığımız protoplast izolasyonu ve füzyonu ile ilgili elde edilen yeni bilgiler doğrultusunda bu protokoller geliştirilerek daha verimli, hızlı ve düşük maliyetli çalışmalar gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR

1. Romeiras, M. M., Vieira, A., Silva, D. N., Moura, M., Santos-Guerra, A., Batista, D., .M. C., Paulo, O. S. 2016. Evolutionary and Biogeographic Insights on the Macaronesian *Beta-Patellifolia* Species (*Amaranthaceae*) from a Time-Scaled Molecular Phylogeny. **PloS one**, **11**(3), e0152456.
2. Leila M., 2003. In: Flora of North America Editorial Committee (eds.): Flora of North America North of Mexico, Volume 4: **Magnoliophyta: Caryophyllidae**, part 1., Oxford University Press, New York, ISBN 0-19-517389-9.
3. Anonymous Er, C., Uranbey, S., 1998. Nişasta ve Şeker Bitkileri Ders Kitabı: 458 (195,212) Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü.
4. KARAAĞAÇ, O., KAR, H., 2016. F1 Hibrit Sebze Tohumu Üretiminde Kendine Uyuşmazlık Sisteminin Kullanılması. **alatarım**, 45.
5. Senevriatne, K., Wijesundara, D., 2007. First African violets (*Saintpaulia ionantha*, H.Wendl.) with a changing colour pattern in induced by mutattion. **American Journal of Plant Physiology**, **2**(3), 233-236pp.
6. Coons, G. H., 1975. Interspecific hybrids between *Beta vulgaris* L. and the wild species of Beta. **J Am Soc Sugar Beet Technol**, **18**, 281-306.
7. Hoshino, Y., Nakano, M., Mii, M., 1995. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Saintpaulia ionantha* Wendl. **Plant Cell Reports**, 341-344pp.
8. Badr-Elden, A. M., Nower, A. A., Nasr, M. I., Ibrahim, A. I., 2010. Isolation and fusion of protoplasts in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Sugar Tech**, **12**(1), 53-58.
9. Jain, S., 1997. Micropropogation of selected somaclones of Begonia and Saintpaulia. **J.Biosci.**, **22**(5), 585-592pp.
10. Kolehmainen, J., 2008. Ecology, population genetics and conservation of the African violet (*Saintpaulia*, *Gesneriaceae*). University of Helsinki, Finland.

11. Koç, N., Kayım, M., Çınar, A. 1999. Protoplast Fuzyonu (Somatik Hibridizasyon) ile Limonda Uçkurutan Hastalığına (*Phoma tracheiphila* Kanc. et Ghik.) Dayanıklı Bitkiler Elde Etme Olanaklarının Araştırılması. **Tr. J. of Agriculture and Forestry**, **23**, 157-168.
12. Hopkins, WG. 2007. Plant biotechnology. **Infobase Publishing**, Philadelphia, pp 1–153
13. Gurel, A., Cakin, I., 2013. *In vitro* shoot regeneration from protoplasts and selection of somaclones in African violet (*Saintpaulia ionantha*). **Vth Bioengineering Congress Abstract Book**. Kuşadası.
14. Verma, N., Bansal, M. ve Kumar , V. 2008. Protoplast fusion technology and its biotechnological applications. **Chemical Engineering Transactions**.
15. Kao, K. N., Constabel, F., Michayluk, M. R., Gamborg, O. L. 1974. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. **Planta**, **120**(3), 215-227.
16. Dudits, D., Hadlaczky, G. Y., Lévi, E., Fejér, O., Haydu, Z., Lazar, G. 1977. Somatic hybridisation of *Daucus carota* and *D. capillifolius* by protoplast fusion. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, **51**(3), 127-132.
17. Fowke, L. C., Gresshoff, P. M., Marchant, H. J. 1979. Transfer of organelles of the alga *Chlamydomonas reinhardtii* into carrot cells by protoplast fusion. **Planta**, **144**(4), 341-347.
18. Wetter, L. R., Kao, K. N. 1980. Chromosome and isoenzyme studies on cells derived from protoplast fusion of *Nicotiana glauca* with *Glycine max-Nicotiana glauca* cell hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, **57**(6), 273-276.
19. Gleba, Y. Y., Kanevsky, I. F., Cherep, N. N. 1985. Transmission genetics of *Nicotiana* hybrids produced by protoplast fusion. **Plant cell, tissue and organ culture**, **4**(1), 19-27.
20. Ohgawara, T., Kobayashi, S., Ohgawara, E., Uchimiya, H., Ishii, S. 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. **Theoretical and Applied Genetics**, **71**(1), 1-4.

21. Kanchanapoom, K., Brightman, A. O., Grimes, H. D., Boss, W. F. 1985. A novel method for monitoring protoplast fusion. **Protoplasma**, **124**(1), 65-70.
22. Bates, G. W. 1985. Electrical fusion for optimal formation of protoplast heterokaryons in *Nicotiana*. **Planta**, **165**(2), 217-224.
23. Adams, T. L., Quiros, C. F. 1985. Somatic hybridization between *Lycopersicon peruvianum* and *L. pennellii*: regenerating ability and antibiotic resistance as selection systems. **Plant science**, **40**(3), 209-219.
24. Grosser, J. W., Chandler, J. L. 1987. Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus*, *Poncirus*, *Citrus X Poncirus* hybrids and *Severinia* for use in somatic hybridization experiments. **Scientia horticulturae**, **31**(3-4), 253-257.
25. Vasil, V., Ferl, R. J., Vasil, I. K. 1988. Somatic hybridization in the Gramineae: *Triticum monococcum* L.(Einkorn)+ *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum.(pearl millet). **Journal of plant physiology**, **132**(2), 160-163.
26. Kobayashi, S., Ohgawara, T., Ohgawara, E., Oiyama, I., Ishii, S. 1988. A somatic hybrid plant obtained by protoplast fusion between navel orange (*Citrus sinensis*) and satsuma mandarin (*C. unshiu*). **Plant cell, tissue and organ culture**, **14**(2), 63-69.
27. Sacristan, M. D., Gerdemann-Knörck, M., Schieder, O. 1989. Incorporation of hygromycin resistance in *Brassica nigra* and its transfer to *B. napus* through asymmetric protoplast fusion. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, **78**(2), 194-200.
28. Sikdar, S. R., Chatterjee, G., Das, S., Sen, S. K. 1990. "Erussica", the intergeneric fertile somatic hybrid developed through protoplast fusion between *Eruca sativa* Lam. and *Brassica juncea* (L.) Czern. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, **79**(4), 561-567.
29. Sakai, T., Imamura, J. 1990. Intergeneric transfer of cytoplasmic male sterility between *Raphanus sativus* (cms line) and *Brassica napus* through cytoplasm-protoplast fusion. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, **80**(3), 421-427.

30. Serraf, I., Sihachakr, D., Ducreux, G., Brown, S. C., Barghi, N., Rossignol, L. 1991. Interspecific somatic hybridization in potato by protoplast electrofusion. **Plant Science**, **76**(1), 115-126.
31. Christey, M. C., Makaroff, C. A., Earle, E. D. 1991. Atrazine-resistant cytoplasmic male-sterile-nigra broccoli obtained by protoplast fusion between cytoplasmic male-sterile *Brassica oleracea* and atrazine-resistant *Brassica campestris*. **Theoretical and applied genetics**, **83**(2), 201-208.
32. Schlangstedt, M., Hermans, B., Zoglauer, K., Schieder, O. 1992. Culture of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts in alginate—callus formation and root organogenesis. **Journal of plant physiology**, **140**(3), 339-344.
33. Rambaud, C., Dubois, J., Vasseur, J. 1992. The induction of tetraploidy in chicory (*Cichorium intybus* L. Var. *Magdebourg*) by protoplast fusion. **Euphytica**, **62**(1), 63-67.
34. Gavrilenko, T. A., Barbakar, N. I., Pavlov, A. V. 1992. Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* and non-tuberous *Solanum* species of the *Etuberosa* series. **Plant Science**, **86**(2), 203-214.
35. Creemers-Molenaar, J., Hall, R. D., Krens, F. A. 1992. Asymmetric protoplast fusion aimed at intraspecific transfer of cytoplasmic male sterility (CMS) in *Lolium perenne* L. **Theoretical and applied genetics**, **84**(5-6), 763-770.
36. Pedersen, C., Hall, R. D., Krens, F. A. 1993. Petioles as the tissue source for isolation and culture of *Beta vulgaris* and *B. maritima* protoplasts. **Plant Science**, **95**(1), 89-97.
37. Cardi, T., Puite, K. J., Ramulu, K. S., D'Ambrosio, F., Frusciante, L. 1993. Production of somatic hybrids between frost tolerant *Solanum commersonii* and *S. Tuberosum*: Protoplast fusion, regeneration and isozyme analysis. **American Potato Journal**, **70**(11), 753-764.
38. Schlangstedt, M. A. R. I. O. N., Zoglauer, K., Lenzner, S., Hermans, B., Jacobs, M. 1994. Improvement of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) protoplast culture: leaf petioles as a protoplast source. **Journal of plant physiology**, **143**(2), 227-233.7

39. Narasimhulu, S. B., Kirti, P. B., Bhatt, S. R., Prakash, S., Chopra, V. L. 1994. Intergeneric protoplast fusion between *Brassica carinata* and *Camelina sativa*. **Plant cell reports**, **13**(11), 657-660.
40. Millam, S., Payne, L. A., Mackay, G. R. 1995. The integration of protoplast fusion-derived material into a potato breeding programme—a review of progress and problems. **Euphytica**, **85**(1), 451-455.
41. Jarl, C. I., Bokelmann, G. S., De Haas, J. M. 1995. Protoplast regeneration and fusion in Cucumis: melon× cucumber. **Plant cell, tissue and organ culture**, **43**(3), 259-265.
42. Akagi, H., Taguchi, T., Fujimura, T. 1995. Stable inheritance and expression of the CMS traits introduced by asymmetric protoplast fusion. **Theoretical and applied genetics**, **91**(4), 563-567.
43. Zhao, J., Chang, S. T. 1995. Intraspecific hybridization between *Coprinus cinereus* and *Schizophyllum commune* by PEG-induced protoplast fusion and electrofusion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **11**(5), 585-590.
44. Guangmin, X., Huimin, C. 1996. Plant regeneration from intergeneric somatic hybridization between *Triticum aestivum* L. and *Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel. **Plant Science**, **120**(2), 197-203.
45. Heath, D. W., Earle, E. D. 1997. Synthesis of low linolenic acid rapeseed (*Brassica napus* L.) through protoplast fusion. **Euphytica**, **93**(3), 339-343.
46. Guangmin, X., Zhongyi, L., Suling, W., Fengning, X., Jinyuan, L., Peidu, C., Dajun, L. 1998. Asymmetric somatic hybridization between haploid common wheat and UV-irradiated *Haynaldia villosa*. **Plant Science**, **137**(2), 217-223.
47. Rasmussen, J. O., Nepper, J. P., Kirk, H. G., Tolstrup, K., Rasmussen, O. S. 1998. Combination of resistance to potato late blight in foliage and tubers by intraspecific dihaploid protoplast fusion. **Euphytica**, **102**(3), 363-370.
48. Bordas, M., González-Candelas, L., Dabauza, M., Ramón, D., Moreno, V. 1998. Somatic hybridization between an albino *Cucumis melo* L. mutant and *Cucumis myriocarpus* Naud. **Plant science**, **132**(2), 179-190.

49. Kito, H., Kunimoto, M., Kamanishi, Y., Mizukami, Y. 1998. Protoplast fusion between *Monostroma nitidum* and *Porphyra yezoensis* and subsequent growth of hybrid plants. **Journal of applied phycology**, **10**(1), 15-21.
50. Wei, Y., Guangmin, X., Daying, Z., Huimin, C. 2001. Transfer of salt tolerance from *Aeluropus littorulis sinensis* to wheat (*Triticum aestivum L.*) via asymmetric somatic hybridization. **Plant Science**, **161**(2), 259-266.
51. Fengning, X., Guangmin, X., Huimin, C. (2003). Effect of UV dosage on somatic hybridization between common wheat (*Triticum aestivum L.*) and *Avena sativa L.* **Plant science**, **164**(5), 697-707.
52. Xu, C., Xia, G., Zhi, D., Xiang, F., Chen, H. 2003. Integration of maize nuclear and mitochondrial DNA into the wheat genome through somatic hybridization. **Plant science**, **165**(5), 1001-1008.
53. Sun, Y., Zhang, X., Nie, Y., Guo, X. 2005. Production of fertile somatic hybrids of *Gossypium hirsutum*+ *G. bickii* and *G. hirsutum*+ *G. stockii* via protoplast fusion. **Plant cell, tissue and organ culture**, **83**(3), 303-310.
54. Wu, J. H., Ferguson, A. R., Mooney, P. A. (2005). Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid *Citrus* breeding. **Euphytica**, **141**(3), 229-235.
55. Sun, Y., Nie, Y., Guo, X., Huang, C., & Zhang, X. 2006. Somatic hybrids between *Gossypium hirsutum L.*(4×) and *G. davidsonii* Kellog (2×) produced by protoplast fusion. **Euphytica**, **151**(3), 393-400.
56. Guan, Q., Guo, Y., Wei, Y., Meng, F., Zhang, Z. 2010. Regeneration of somatic hybrids of ginger via chemical protoplast fusion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, **102**(3), 279-284.
57. Tarwacka, J., Polkowska-Kowalczyk, L., Kolano, B., Śliwka, J., Wielgat, B. 2013. Interspecific somatic hybrids *Solanum villosum* (+) *S. tuberosum*, resistant to *Phytophthora infestans*. **Journal of plant physiology**, **170**(17), 1541-1548.

58. Juan, W. A. N. G., GAO, Y. N., Kong, Y. Q., JIANG, J. J., LI, A. M., ZHANG, Y. T., WANG, Y. P. 2014. Abortive process of a novel rapeseed cytoplasmic male sterility line derived from somatic hybrids between *Brassica napus* and *Sinapis alba*. **Journal of Integrative Agriculture**, **13**(4), 741-748.
59. Tomiczak, K., Sliwinska, E., Rybczyński, J. J. 2017. Protoplast fusion in the genus *Gentiana*: genomic composition and genetic stability of somatic hybrids between *Gentiana kurroo* Royle and *G. cruciata* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 1-14.
60. Bruznican, S., Eeckhaut, T., Van Huylenbroeck, J., De Clercq, H., Geelen, D. 2017. Regeneration of cell suspension derived *Apium graveolens* L. protoplasts. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, **131**(1), 163-174.
61. Bilkey, P., Davey, M. Cocking, E. 1982. A non-enzymatic method for the isolation of protoplast from callus of *Saintpaulia ionantha* (African violet). **Zeitschrift Pflanzenphysiologie**, **15**, 285-286pp.
62. Davey, M. R., Anthony, P. 2010. **Plant cell culture: essential methods**. John Wiley & Sons.
63. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, **15**(3), 473-497.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Özgür ÖZMEN

Uyruğu : Türkiye (TC)

Doğum Yeri : KAYSERİ

e-mail : ozgur.ozmen.tbt@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Fen Bilimler Enstitüsü	2018
Lisans	OMÜ Ziraat Fakültesi, TBT	2014

YABANCI DİL

İngilizce