

PROTOPLAST KÜLTÜRÜ VE SOMATİK MELEZLEME

Doç.Dr. Yıldız AKA KAÇAR

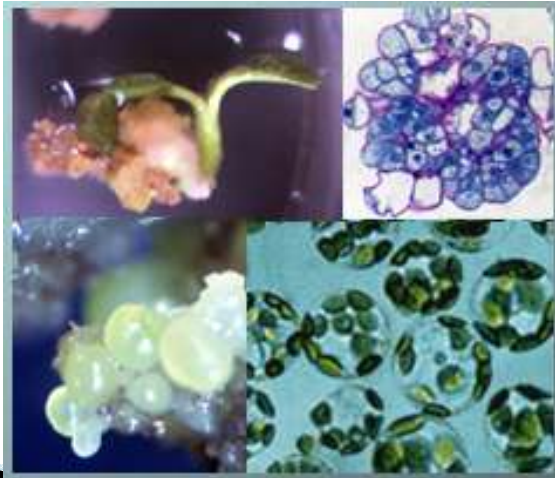
PROTOPLAST KÜLTÜRÜ

- ▶ Selülozik yapıdaki hücre çeperleri, mekanik ya da enzimatik yollarla çıkarılmış olan hücrelere "protoplast" denilmektedir.
- ▶ Protoplast kültürü ise, izole edilen protoplastların, hücre modifikasyonu ve somatik hibridizasyon yöntemleriyle, bitki tür ve çeşitlerinin geliştirilmesi amacıyla yönelik olarak, uygun besin ortamlarında kültüre alınmasıdır.

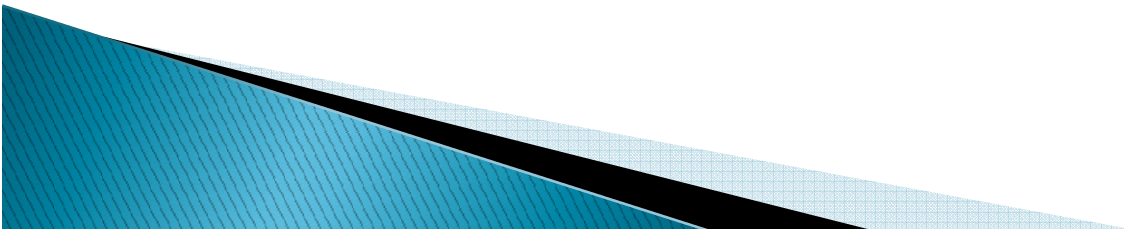


Protoplastların canlılığı üzerine etki eden faktörler;

- ▶ Enzimin saflığı
- ▶ Kültür ortamının ozmotik basıncı

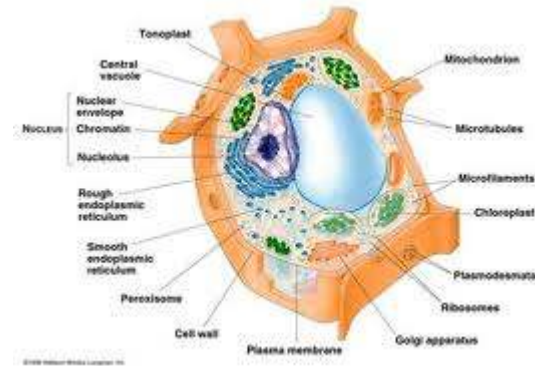
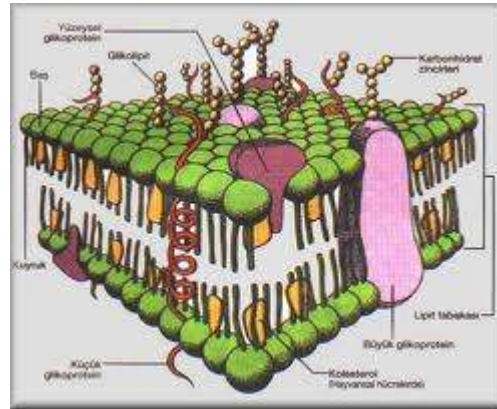


- ▶ Bir bitkinin hücre, doku, organ, meristem veya embriyo gibi çeşitli parçalarından yeni bitki veya bitkiler elde edilmesine **bitki rejenerasyonu** denir.
- ▶ *In vitro* şartlarda tek hücreden yeni bitki elde edilmesine **totipotansi**, böyle bir hücreye de **totipotent hücre** denir.

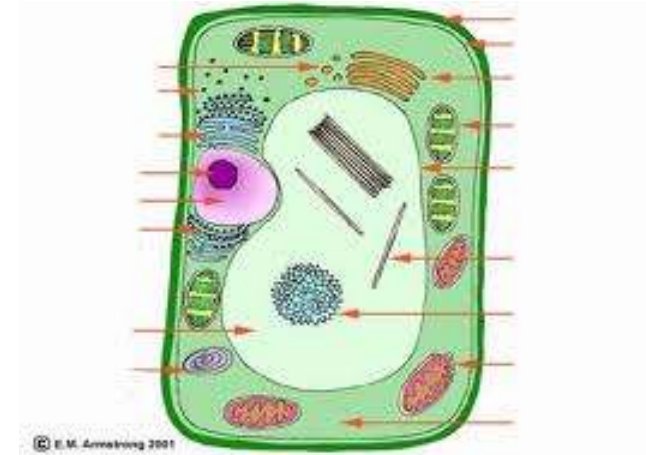
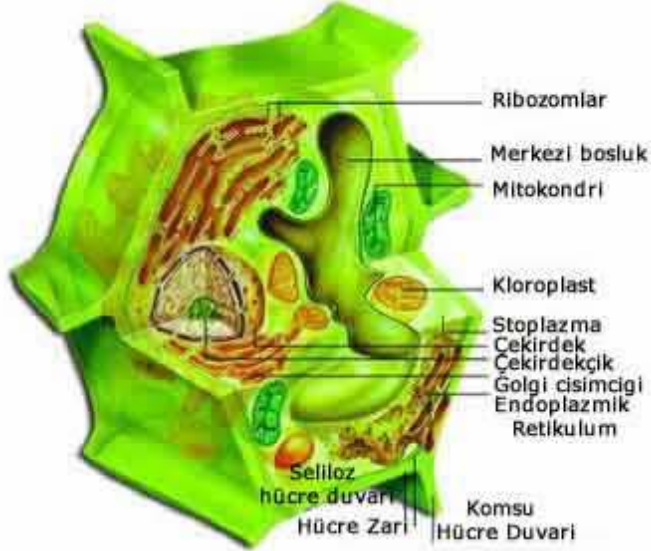


Bitkilerde hücre duvarı kompozisyonu

- ▶ Bitkilerde hücre duvarı hücre için mekanik bir sınır ve destek olarak görev yapmakta, ozmotik değişiklikler sonucu hücrenin patlamasını ve mikroorganizmaların hücreyi enfekte etmesini engellemektedir.



- ▶ Hücre duvarı hücrenin büyüklüğünü, şeklini ve dengesini belirler.



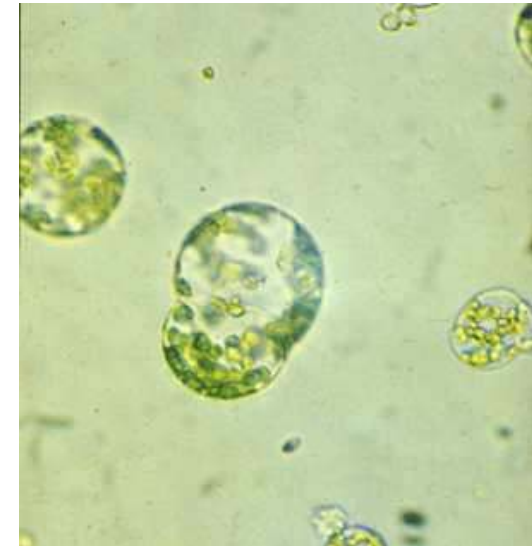
Bitki hücre duvarının 3 ana unsuru;

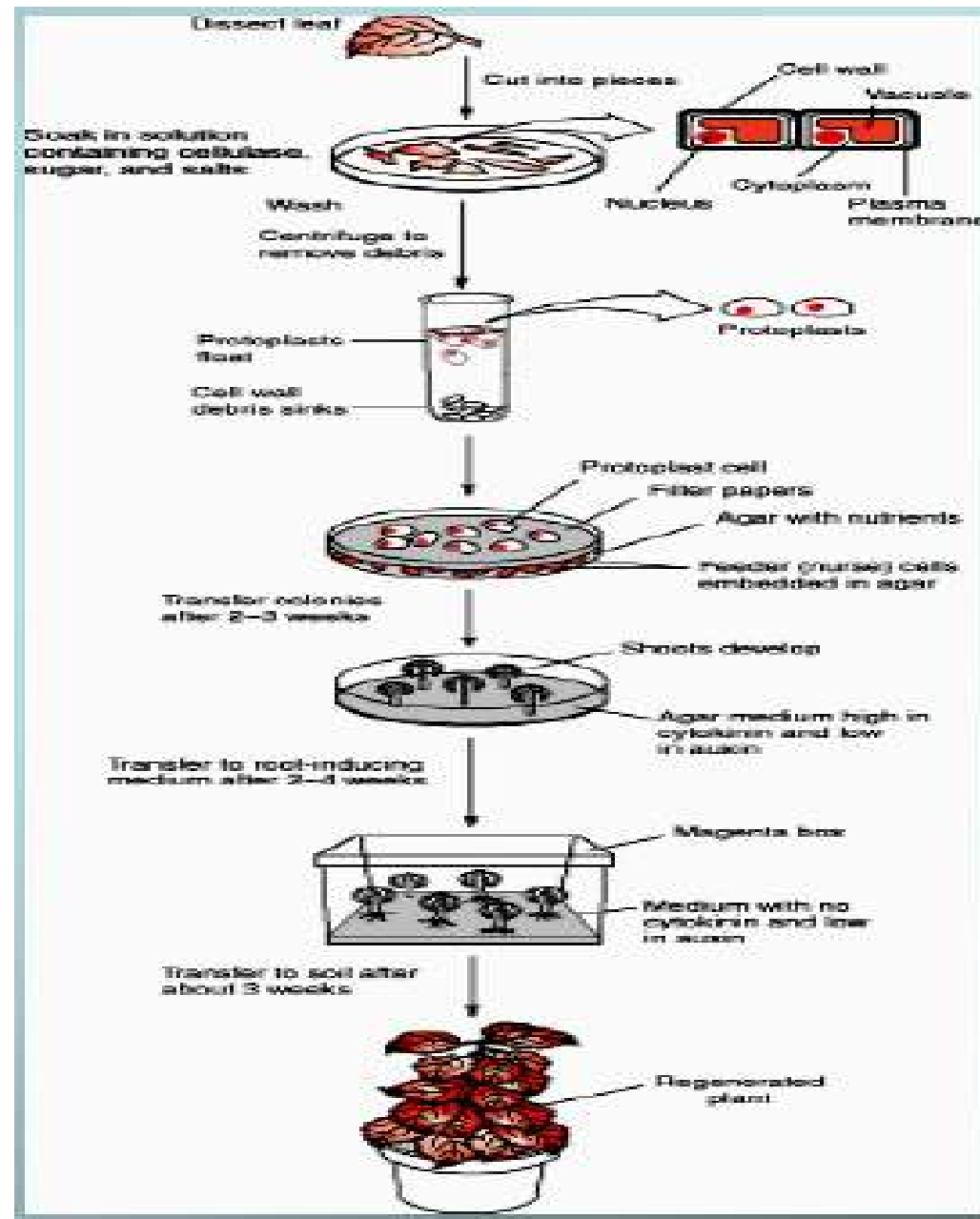
- ▶ Selüloz
- ▶ Hemiselüloz
- ▶ Pektik maddeler



Protoplast izolasyonu

- ▶ Eksplant kaynakları
- ▶ Donör bitki materyalinin ön muamelesi ve yetiştirme şartları
- ▶ Protoplast izolasyonunda kullanılan yıkama solüsyonları, enzimler ve enzim karışımları
- ▶ Ozmotik şartlar ve plazmolizasyon
- ▶ Enzim inkübasyonu
- ▶ Protoplastların yıkanması ve saflaştırılması
- ▶ İzolasyon sonrası uygulanan testler

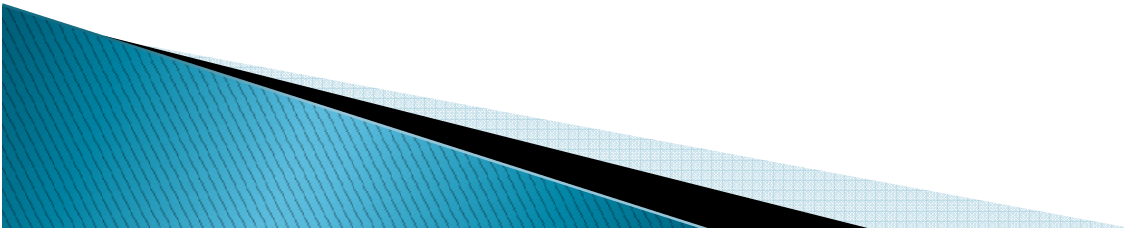




Protoplast kültürü yapılışı

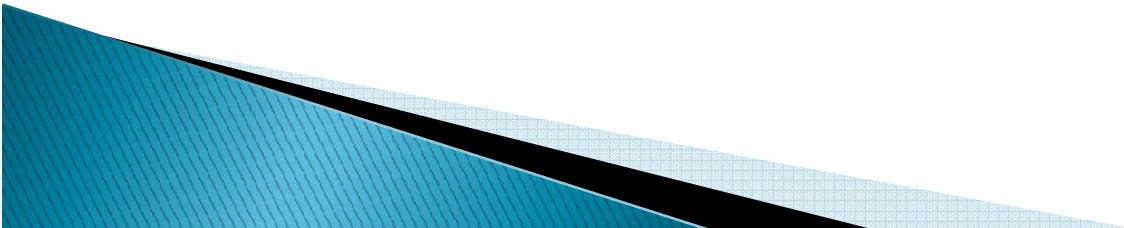
Eksplant kaynakları;

- ▶ **Yaprak mezofil hücreleri** (klorofil içerdiklerinden somatik melezlemede yapılan renksel ayırimda avantajlıdır)
- ▶ **Embriyonik hücreler** (daha hızlı gelişme ve bölünme gösterirler)
- ▶ **Genç bitki dokuları**
- ▶ **Henüz olgunlaşmamış bitki doku ve organları** (embriyo, kotiledon, meyve kabuğu)
- ▶ **Meristematik hücreleri içeren dokular** (gövde apikal meristemi, yan ve kök ucu meristemleri)
- ▶ **Özel protoplast kaynakları** (polen tanesi, skutellum, stoma hücreleri vb.)



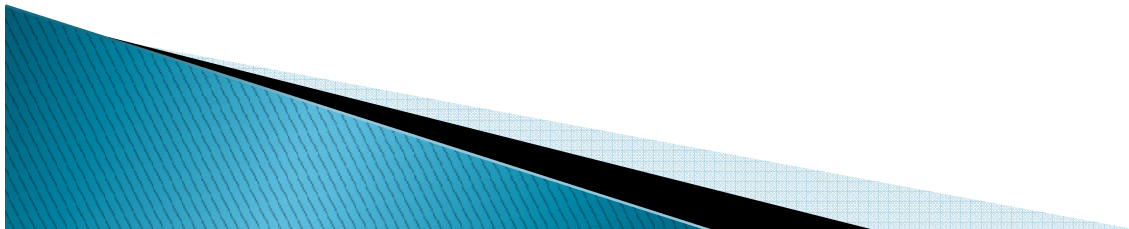
Donör bitki materyalinin ön muamelesi ve yetiştirme şartları;

- ▶ Eksplantın alındığı bitkinin gelişme devresi ve şartları
- ▶ Kültür ortamı komponentleri
- ▶ Sıcaklık
- ▶ Işık



Protoplast izolasyonunda kullanılan yıkama solüsyonları, enzimler ve enzim karışımları;

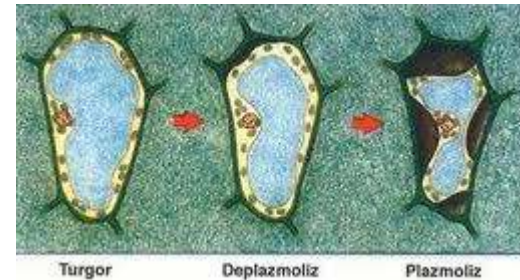
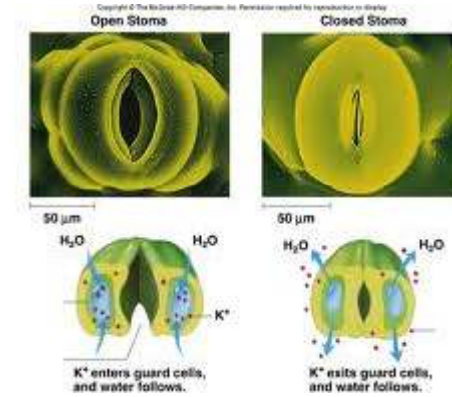
- ▶ Yıkama solüsyonları;
CaCl₂, manitol, CPW
- ▶ Enzimler;
Selülaz, hemiselülaz, pektinaz



Ozmotik şartlar ve plazmolizasyon;

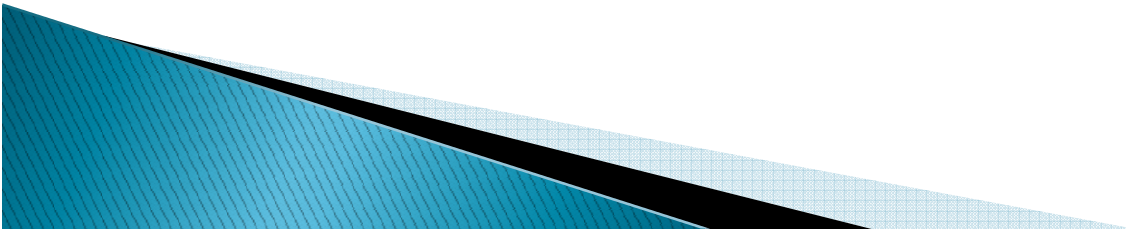
Ozmotik basıncı ayarlamak için;

- ▶ Manitol
- ▶ Sorbitol
- ▶ Glikoz
- ▶ Sakkaroz
- ▶ KCl
- ▶ CaCl_2 kullanılır.



Enzim inkübasyonu;

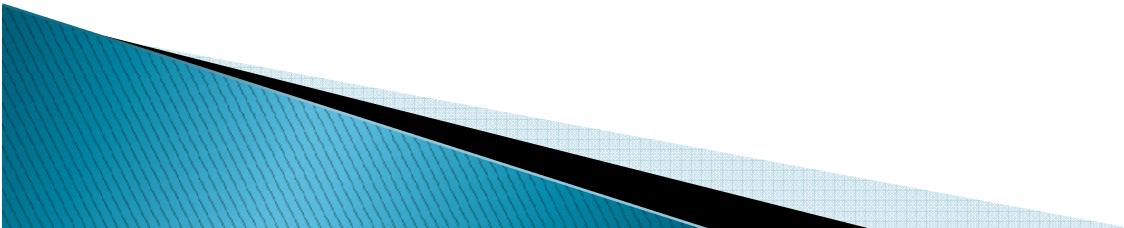
- ▶ İnkübasyon süresi kısa tutulmalıdır.
- ▶ Sıcaklık arttıkça inkübasyon süresi kısalır.



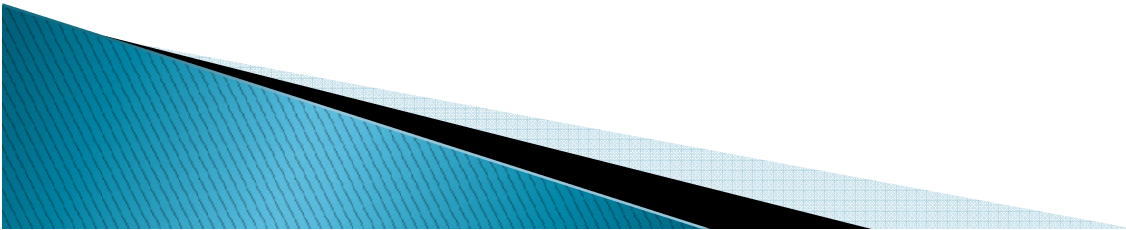
Protoplastların yıkanması ve saflaştırılması;

En çok kullanılan saflaştırma metodları;

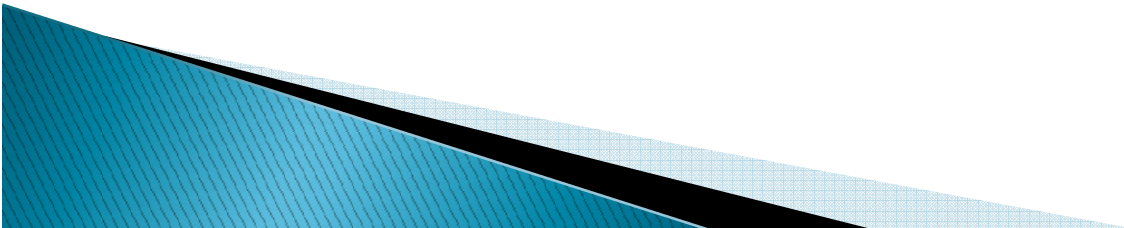
- ▶ Filtrasyon
- ▶ Santrifüj
- ▶ Karışık metod
- ▶ Daha yoğun bir çözelti içinde yüzdürme



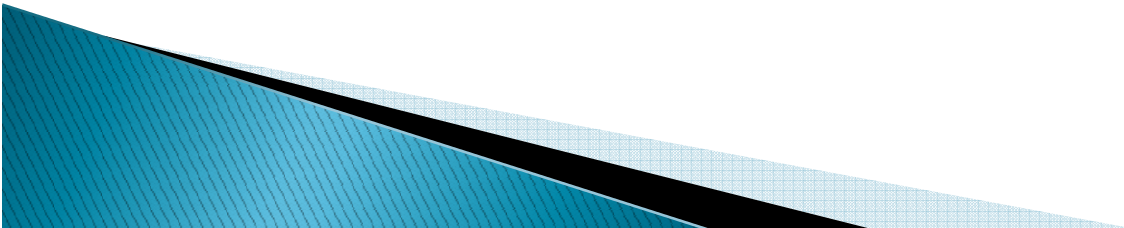
- ▶ **Filtrasyon metodunda,** ortalama protoplast çapına göre değişen ve azalan porozitede bir seri filtreden protoplastlar geçirilir ve az sayıda santrifüj işlemi uygulanır.



- ▶ En çok kullanılan teknik filtrasyon ve santrifüj işleminin birlikte uygulanmasıdır.
- ▶ İlk önce protoplast karışımı bir filtreden geçirilir, daha sonra 5-10 dk santrifüj edilir.

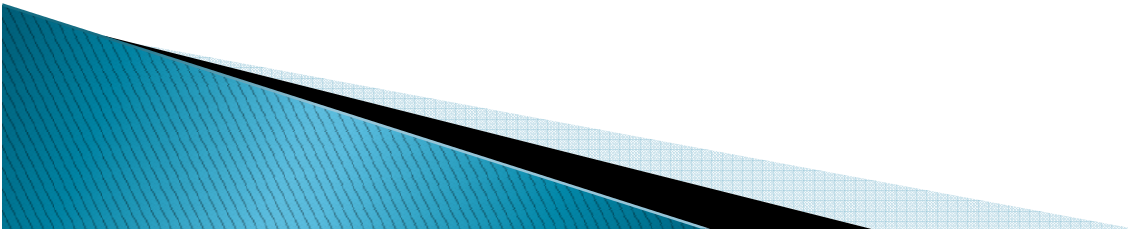


- ▶ Bazı durumlarda protoplastlar sakkaroz çözeltisinde düşük devirde santrifüj edilir. Sakkaroz çözeltisi protoplastlardan daha fazla yoğun olduğu için protoplastlar çözelti üzerinde toplanırlar ve pipetle çekilerek uzaklaştırılırlar. Buna **yüzdürme metodu** denir.



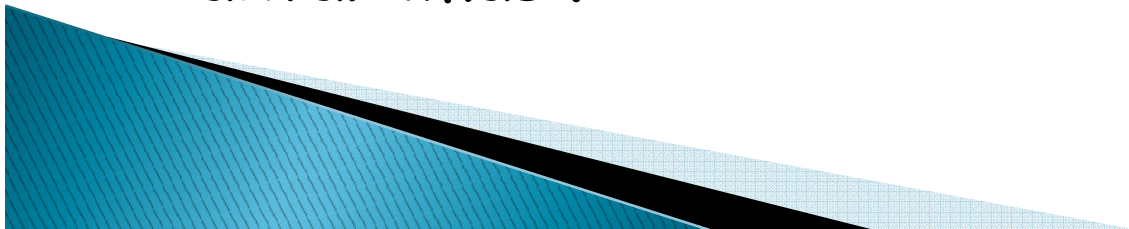
İzolasyon sonrası uygulanan testler;

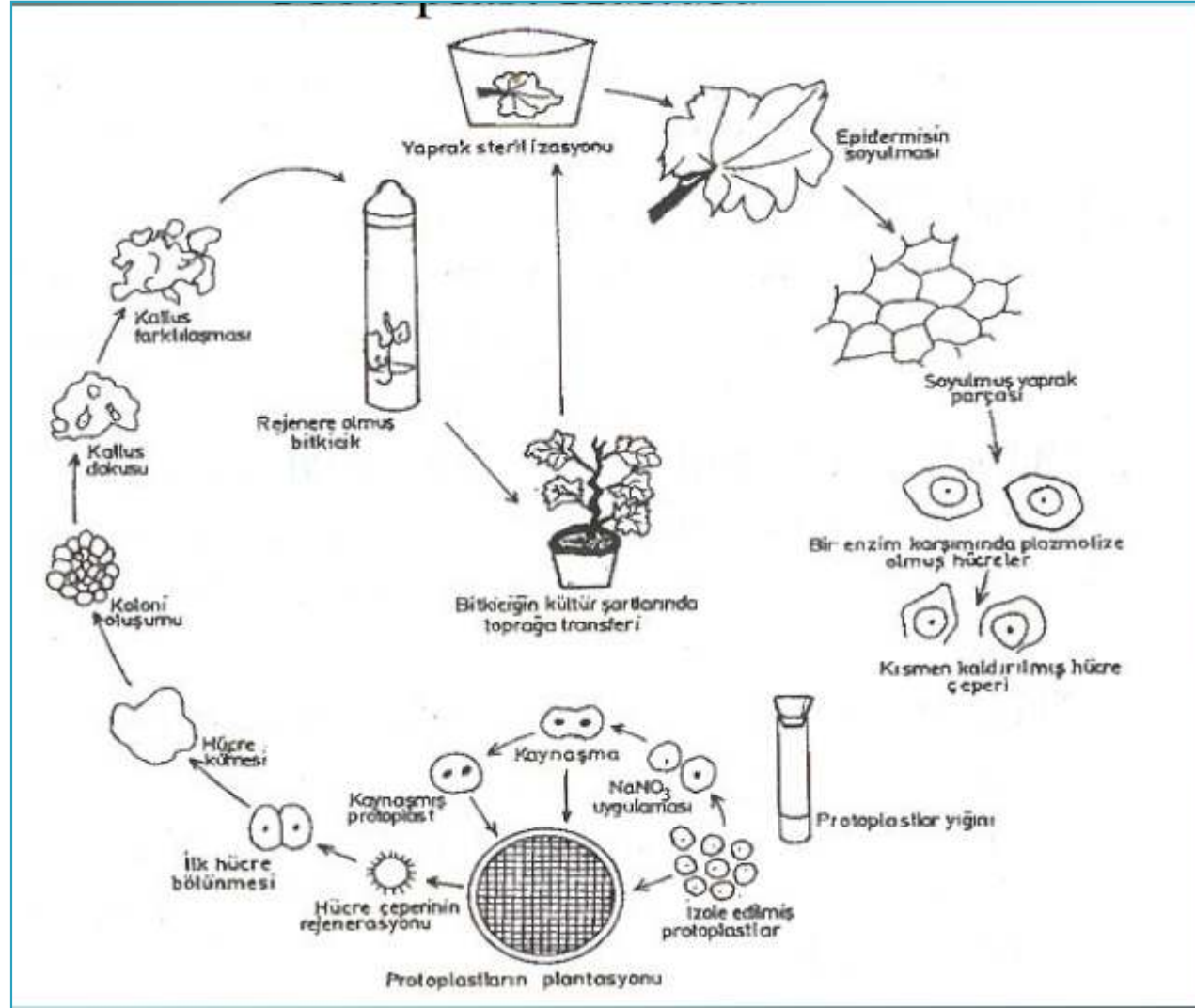
- ▶ Hücre duvarı kalıntısının tespiti
- ▶ Canlılık testleri
- ▶ Protoplast büyüklüğü ve verim tespiti



Protoplast Kùltürün Kullanım Amaçları

- ▶ Somoklonal varyasyon yaratılarak, bunlar arasından amaca uygun fertlerin seçilmesi,
- ▶ Melezlenmeleri mümkün olmayan türlerin protoplast füzyonu ile melezlenebilmeleri,
- ▶ Protoplastlar bünyelerine makro moleküller, organeller ve hatta hücre çekirdekleri de alabildiğinden, istenilen bilgilerin yeni bitkilere aktarılması.





Protoplast Kültürü

Protoplast kültür teknikleri;

Sıvı damla kültürleri tekniği

Sıvı kültür tekniği

Agar içinde kültür tekniği

Agar üzerinde sıvı kültür tekniği

Agaroz ortamı kültürü tekniği

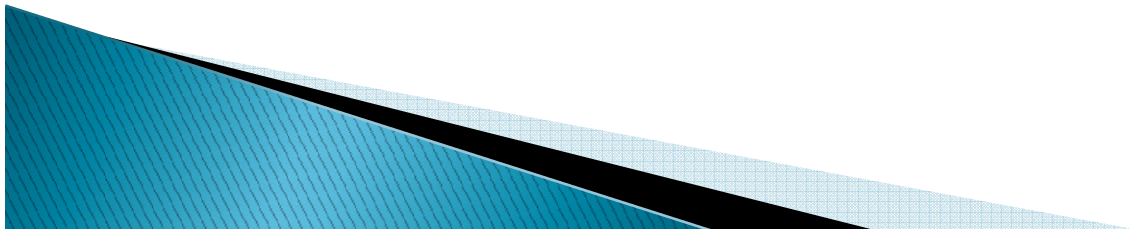
Agaroz blokları kültürü tekniği

Agaroz damla kültürü

Asılı veya oturan damla kültürü

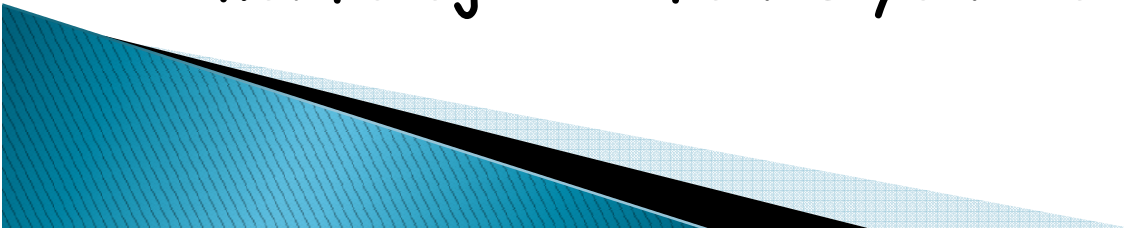
Protoplastların tutuklanması

Nörs kültürleri ve besleyici hücreler

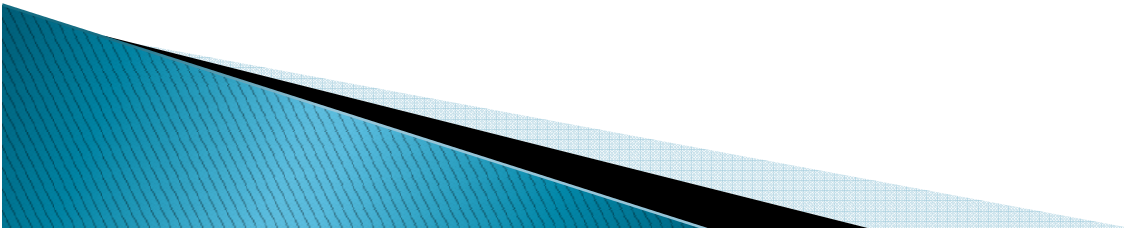


Protoplastların kültür sonrası davranışları

- ▶ **Strese tepki:** enzim etkisi sonucu bitki hücrelerinin kendi savunma mekanizmasını geliştirmesi
- ▶ **Tamir mekanizması:** hücre zarında ve zar proteinlerinde oluşan zararın giderilmesi, yeni zarın oluşturulması
- ▶ **Adaptasyon:** organellerin ve sitoplazmanın morfolojik ve fonksiyonel olarak adaptasyonu



- ▶ **Hücre bölünmesi:** hücre hayat döngüsünün yeniden başlaması, hücre bölünmesi ve kallus oluşumu
- ▶ **Morfogenesis:** organize hücre gelişmesi, bölünmenin uyarılması ve değişimin başlayarak organize doku ve daha sonra bitkilerin oluşturulması



Somatik Hücreseller Arası Melezleme (Protoplast Füzyonu)

- ▶ Protoplast füzyonu ve somatik melezleme, pre-zigotik eseysel uyusmazlıklar nedeniyle, klasik melezleme ile elde edilemeye hibritlerin elde edilmesinde kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılarak uygulanan bir tekniktir.



Somatik hibridizasyon



Figure 2. Characterization of somatic hybrid between 'Hamlin' sweet orange and 'Singapura' selected pummelo seedling. a) Mitotic metaphase of a somatic hybrid plant showing $2n=4x=36$ chromosomes (bar = 1 μm); b) Leaf morphology of *Citrus sinensis* (left), somatic hybrid (center) and *C. grandis* (right); c) RAPD fragments of the parental lines 'Hamlin' (lanes 1, 4, 7 and 10) and 'Singapura' selected pummelo seedling (lanes 3, 6, 9 and 12) and their somatic hybrid (lanes 2, 5, 8 and 11), amplified with primers OPAA1 (lanes 1-3), OPAA2 (lanes 4-6), OPAA7 (lanes 7-9) and OPAA10 (lanes 10-12). P = 1.0 kb ladder.



Solda patates,
en sağda
yabani bir
patates türü,
ortada somatik
hibrid (cybrid)



- ▶ **Somatik melezleme**, iki protoplastın çekirdek, sitoplazma veya her ikisinin de birbirleriyle belirli ortam ve şartlarda birleştirilmesidir. Füzyon sonucu oluşan yapılara **füzyon ürünleri** veya **heterokaryonlar** denir.



M. sativa x M. coerulea somatik hibridine
ait çiçekler

Protoplast füzyonu aşamaları

- ▶ Füzyonu olacak her iki cins veya türden tekrarlanabilir bir şekilde protoplastlar elde edilir
- ▶ Protoplastlar çeşitli metodlarla birleştirilir (füzyon)
- ▶ Füzyon ürünlerinin seçimi yapılır
- ▶ Heterokaryonların kültürü sonucu önce kallus sonra sürgün rejenerasyonu yoluyla bitkiler elde edilir
- ▶ Somatik melezler seleksiyona tabi tutulur
- ▶ Somatik melez bitkiler ebeveynlerle karşılaştırmalı olarak analiz edilir
- ▶ Verim ve tarla denemeleri yapılır
- ▶ Tohum üretimi ve tescil işlemi yapılır.

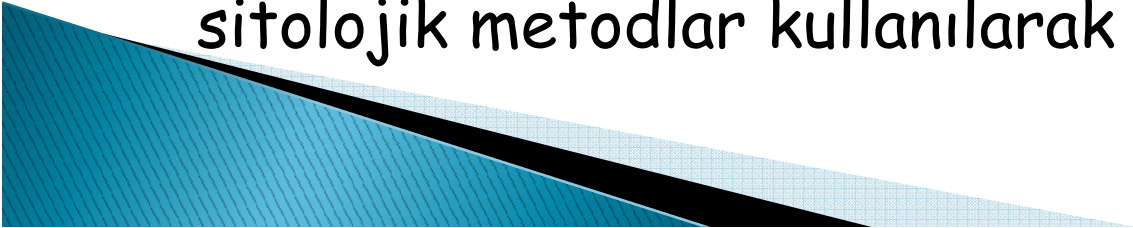


Protoplast füzyonunda;

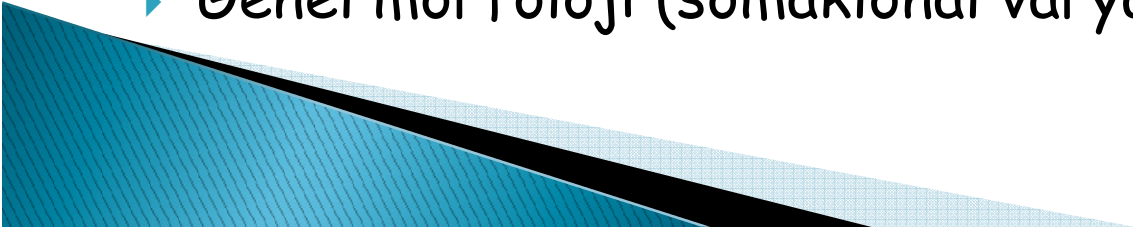
- ▶ Polietilen glikol (PEG) ile füzyon ve
- ▶ Elektrofüzyon metodları kullanılmaktadır.



Somatik hibrit bitkilerin analizi

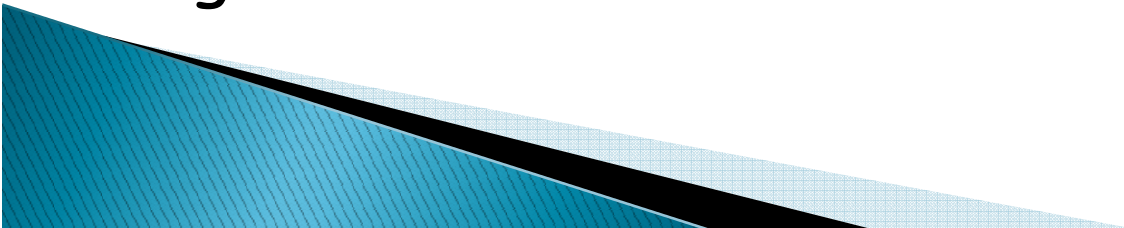
- ▶ RAPD profilleri
 - ▶ Kromozom sayımı
 - ▶ Southern analizi
 - ▶ Flow Sitometri
 - ▶ RFLP
 - ▶ *In situ* genomik melezleme gibi biyokimyasal ve sitolojik metodlar kullanılarak yapılır.
- 

Ebeveynlerle, F_1 hibrit ve somatik hibrit bitkilerin karşılaştırılmasında;

- ▶ Fraksiyon I protein analizi
 - ▶ Kromozom sayısı ve karyotipi
 - ▶ İzozimler
 - ▶ Mitokondriyel DNA miktarının tespiti
 - ▶ Kloroplast DNA miktarının tespiti
 - ▶ Nükleer DNA miktarının tespiti
 - ▶ Genel morfoloji (somaklonal varyasyon)
- 

Protoplast Kùltürünün Dezavantajları

- ▶ Her bitki türü için tekrarlanabilir bir şekilde protoplasttan bitki elde etme metodu geliştirilmiş değildir.
- ▶ Heterokaryonların etkin bir şekilde ayırımı yapılamamaktadır.
- ▶ Somatik melez bitkiler genellikle steril olmakta, döl vermemekte veya fertil olması durumunda çok geniş bir somaklonal varyasyon göstermektedir.



Sunumun Yayınlandığı Siteler

www.bahcebitkileri.org

www.bahcebitkileri.org/bitkibiyoteknolojisi

