

**DOMATESTE (*Lycopersicon esculentum*
Mill.) PROTOPLAST İZOLASYONU
VE KÜLTÜRÜ**

33894

Mustafa KÜSEK

Ç.Ü.

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ADANA

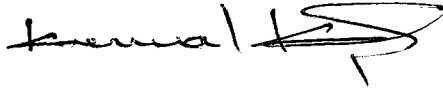
EYLÜL - 1994

Bu Tez Ç.Ü. Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir

Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Doç. Dr. N. Kemal KOÇ



Jüri Üyesi : Doç. Dr. Mehmet BİÇİCİ

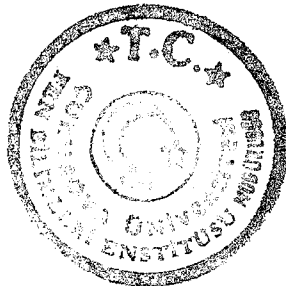


Jüri Üyesi : Yard. Doç. Dr. Ali ERKİLİÇ



Kod No : 882

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu
onaylarım.




Prof. Dr. Ural DİNÇ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÇİZELGE LİSTESİ.....	III
ŞEKİL LİSTESİ.....	IV
RESİM LİSTESİ.....	V
KISALTMALAR.....	VI
ÖZ.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
3. MATERYAL VE METOD.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Bitki Materyali.....	13
3.1.2. Kimyasallar.....	13
3.1.2.1. Kültür Ortamında Kullanılan Kimyasallar.....	13
3.1.2.2. Protoplast İzolasyonu ve Kültüründe Kullanılan Kimyasallar.....	14
3.2. Metod.....	15
3.2.1. <i>In vitro</i> Sürgün Ucu Kültürü ile Domates Bitkilerinin Yetiştirilmesi.....	15
3.2.2. Domates Yapraklarından Protoplast İzolasyonu.....	16
3.2.3. Protoplastların Kültüre Alınması.....	17
3.2.4. Bitki Regenerasyonu.....	18

4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	19
4.1. Bitki Materyallerinin Elde Edilmesi.....	19
4.2. Protoplast İzolasyonu.....	21
4.2. Protoplast Kültürü.....	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	33
ÖZET	39
SUMMARY.....	41
EKLER.....	43
KAYNAKLAR.....	50
TEŞEKKÜR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	60

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No	Sayfa No
Çizelge 1. Sürgün ucu kültüründe kullanılan ortamların bitki gelişimi üzerine etkileri.....	19
Çizelge 2. Domates yapraklarından protoplast izolasyonunda kullanılan iki farklı enzim solusyonunun (ST, DES) değişik zamanlarda protoplast verimliliği üzerine olan etkileri.....	21

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1. Modifiye edilmiş katı TM-2 ortamında ve değişik yoğunluklarda kültüre alınan domates yaprak protoplastlarının zamana bağlı olarak % bölünme oranları.....	24
Şekil 2. Modifiye edilmiş TM-2 ortamında, değişik yoğunluklarda ve petri tabanına katı damla yöntemiyle kültüre alınan domates yaprak protoplastlarının zamana bağlı olarak % bölünme oranları.....	28
Şekil 3. Modifiye edilmiş TM-2 ortamında kültüre alınan domates yaprak protoplastlarının % kaplama etkinliği.....	28
Şekil 4. Farklı hormon kombinasyonları içeren TM-4 ortamının kallus gelişimine etkisi.....	31

RESİM LİSTESİ

Resim No	Sayfa No
Resim 1. <i>In vitro</i> sürgün ucu kültürüyle modifiye edilmiş MS ortamında geliştirilmiş bir domates bitkisi.....	20
Resim 2. Domates bitkisinin yapraklarından izole edilen mezofil protoplastları	23
Resim 3. Domates yaprak protoplastlarının kültüre alınmasından 2 gün sonra hücre duvarı oluşturarak küresel yapıdan oval yapıya dönüşen protoplastlar	26
Resim 4. Modifiye edilmiş TM-2 ortamında kültüre alınan domates yaprak protoplastlarının ilk (a) ve ikinci bölünmeleri (b).....	27
Resim 5. Modifiye edilmiş TM-2 ortamında domates yaprak protoplastlarından gelişmiş mikrokalluslar.....	29
Resim 6. Domates yaprak protoplastlarından gelişmiş mikrokalluslardan hormonsuz (kontrol) (a) ve 0.5 mg/l Zeatin ve 0.5 mg/l GA ₃ içeren TM-4 (b) ortamında gelişen kalluslar.....	32

KISALTMALAR

2,4-D : 2,4-diklorofenoksiasetik asid

IAA : İndol-3-asetik asid

NAA : Naftalin asetik asid

BAP : 6-Benzil amino purine

GA₃ :Giberellik asid

MS : Murashige ve Skoog (1962)

ST : Sakomo ve Taguchi (1991)

DES : Domates Enzim Solüsyonu

ÖZ

Ülkemizde sera ve tarla koşullarında yetiştiriciliği yapılan domatestede birçok hastalık, zararlı ve ekstrem koşullardan dolayı önemli derecede ürün kayıpları meydana gelmektedir. Domatestede hastalık, zararlı ve ekstrem koşullara dayanıklı yeni bitkiler geliştirmede klasik melezlemeye alternatif bir yöntem olan somatik hibridizasyon için gerekli protoplast izolasyonu ve kültürü üzerinde çalışılmıştır.

Protoplast izolasyonu amacıyla *in vitro* sürgün ucu kültürü yöntemiyle modifiye edilmiş MS ortamında geliştirilmiş 3-4 haftalık domates bitkiciklerinin tam gelişmiş yaprakları kullanılmıştır. Protoplast izolasyonunda kullanılan iki farklı enzim çözeltisinden en iyi sonuç DES enzim solüsyonunda elde edilmiştir. En yüksek protoplast bölünmesi (%19.53) ve % kaplama etkinliği (%7.9) 1.0×10^5 protoplast/ml yoğunlukta modifiye edilmiş TM-2 ortamında kültüre alınan protoplastlarda gözlenmiştir.

Kültüre alınan protoplastlardan geliştirilen mikrokalluslardan 0.5 mg/l GA_3 ve 0.5 mg/l Zeatin içeren TM-4 ortamında en yüksek kallus oluşumu gözlenmiştir.

ABSTRACT

Tomatoes are an important crop growing in field and greenhouse in Turkey. However, production suffers from several diseases, pests, and environmental conditions. Protoplast isolation and culture is necessary for somatic hybridization and provide a powerful tool in obtaining resistant line, which is a widely technique used in addition to classical breeding.

Protoplasts were isolated in vitro from mature leaves of 3-4 weeks old tomato plants growing in a modified MS medium. The DES enzyme solution provided the best result in protoplast isolation compared to ST. The highest protoplast dividing rate (19.5%) and the best plating efficiency (7.9%) were observed at a density of 1.0×10^5 protoplasts/ml in the modified TM-2 medium.

The most microcalli developed from protoplasts were obtained using TM-4 medium containing 0.5 mg/l GA_3 and 0.5 mg/l Zeatin.

1. GİRİŞ

Bütün dünyada olduğu gibi, ülkemizde de önemli kültür bitkileri arasında yer alan domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sofralık olarak tüketildiği gibi domates suyu, salça ve ketcap yapımında da kullanılmakta ve 1992 yılı FAO istatistiklerine göre dünyada 2896 bin hektar ekim alanı ve 70443 milyon ton üretimi yapılan önemli bir kültür bitkisidir. Ülkemiz 1992 yılı itibarıyla 165 bin hektar domates ekim alanı olarak dünyada dördüncü, 6400 milyon ton üretimle ikinci ve birim alandan alınan ürün miktarı (38788 kg/ha) bakımından ise 34. sırayı almaktadır (FAO, 1992). Domates yetiştiriciliği yapılan diğer ülkelere göre ülkemizde birim alandan alınan ürün miktarındaki düşüklüğün başlıca nedenleri; kültürel önlemlerdeki eksikliklerin yanısıra fungal, bakteriyal ve viral hastalık etmenleridir.

Adı geçen hastalık etmenlerine karşı (virüsler hariç) kullanılan aşırı pestisit uygulamalarının ekonomik olmaktan çıkması, çevre kirliliği ve insan sağlığı açısından sorun olmaya başlaması nedeniyle özellikle son yıllarda hastalıklara dayanıklı bitki tür ve varyetelerinin geliştirilmesi üzerindeki çalışmalar yoğunluk kazanmıştır.

Klasik ıslah yöntemleri kullanılarak hastalıklara karşı dayanıklı bitkiler ıslah etmede gerekli olan genetik varyabilite kendine döllek olan domatesten sorun olabilmektedir (RICK, 1983; PHILOUZE, 1986). Halbuki yeni domates çeşitleri geliştirebilmek için tarımsal açıdan önemli genetik karakterlere sahip yabani *Lycopersicon* türlerinin özellikle Güney Amerika'da Şili gibi ülkelerde mevcut olduğu bilinmektedir (HOLLE ve ark., 1978). Bu türlerde kahverengi kök çürüklüğü (*Phytophthora nicotianae* var.

parasitica), Septoria yaprak leke hastalığı (*Septoria lycopersici*), Tütün Mozaik Virüsü ve Curly Top Virüsüne karşı dayanıklılık karakterlerinin varlığı saptanmış bulunmaktadır (ALEXANDER, 1971; STEVENS ve RICK, 1985; SOTIROVA ve RODEVA, 1990). Bunun daha da ötesinde bu türlerin düşük sıcaklık ve kuraklığa da tolerant oldukları ortaya konulmuştur (STEVENS ve RICK, 1985; HOLLE ve ark., 1978).

Yabani *Lycopersicon* türlerinde bulunan tarımsal açıdan önemli bu özelliklerin alışlagelmiş ıslah yöntemleri ile kültürü yapılan domates türlerine aktarılmasında ise güçlüklerle karşılaşmaktadır (TAN ve ark., 1987a). Kültür domateslerine yabancı genlerin aktarımı ve seksüel melezleme problemlerine çözüm yollarının açıklanmasına (THOMAS ve PRATT 1981; GRADZIEL ve ROBINSON 1989a,b) rağmen elde edilen hibrid bitkilerde pistil gelişimi olmamaktadır (LEFRANÇOIS ve CHUPEAU, 1993). Bunun yanısıra seksüel hibrid bitkiler sadece melezlemede kullanılan ebeveynlerin genomik karakterlerini taşımaktadır. Oysa *Lycopersicon* türlerinde tarımsal açıdan önemli bazı özelliklerin (herbisitlere dayanıklılık ve sitoplazmik erkek kısırlığı gibi) hücre organellerinde bulunduğu bilinmektedir (SMITH, 1989).

Son yıllarda geliştirilen ve birçok kültür bitkisinde uygulama alanı bulmuş olan protoplast fuzyonu ile somatik hibridizasyon veya sibiridizasyon tekniklerinin klasik melezlemede karşılaşılan güçlüklerin aşılmasında önemli rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (GALUN ve AVIV, 1983; KUMASHIRO ve ark., 1989; THANH ve MEDGYESG, 1989). *Lycopersicon* tür ve çeşitleriyle akraba cinslerinde bulunan hastalık, zararlı ve ekstrem koşullara dayanıklılık karakterlerinin protoplast fuzyonu ve direkt gen transferi (DNA-uptake) ile kültür domatesine aktarılabilmesi için

her bitki türünde protoplast izolasyonu ve kültürü sisteminin geliştirilip rutin hale getirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, ülkemiz ekonomisinde önemli bir yeri olan domateste (*Lycopersicon esculentum* Mill.) somatik hibridizasyon ve direkt gen transferi için ön koşul olan protoplast izolasyonunun gerçekleştirilmesi, değişik kültüre alma şekillerinin hücre bölünmesi ve mikrokallus oluşumuna olan etkinliklerinin saptanması amacıyla bu çalışma yapılmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yüksek verimli hastalık, zararlı ve ekstrem koşullara (tuzluluk, kuraklık, düşük sıcaklık) tolerant veya dayanıklı kültür bitkileri geliştirmek ve üreticinin kullanımına sunmak için alışılmış yöntemlerin yanı sıra protoplast fuzyonu ile somatik hibridizasyon ve gen transferi (transformasyon) gibi yeni tekniklerin kullanımı son yıllarda yoğunluk kazanmıştır.

Bu tekniklerin uygulandığı kültür bitkilerinden birisi de tüm dünya ülkeleri için de önemli olan domatestir. Birçok hastalık ve zararlı dolayısı ile önemli ürün kayıplarının ortaya çıktığı bu kültür bitkisinde, yapılan çalışmaların başlıca amacı verimi sınırlayıcı faktörlere karşı dayanıklı yeni bitkiler geliştirebilmektir. Bu amaç için uygulanan modern tekniklerden biriside yukarıda da belirtildiği gibi protoplast adını verdığımız hücre duvarı enzimlerle yıkılmış hücrelerin fiziksel ve kimyasal yöntemlerle birleştirilerek (somatik hibridizasyon) bir bitkide bulunan bir karakterin diğer bir bitkiye aktarılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda yapılan bir çalışmada (ZAPATA ve ark, 1981) *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Walter, *L. pimpinelifolium* (Jusl.) Mill. ve *L. hirsutum* Humb. ve Bonpl. f. glabratum (C.H. Mull.). Fobes ve Tenksley yaprak mezofil protoplastları enzimatik olarak izole edilmiş ve kültüre alınan protoplastların kallus oluşturmalarında amonyum nitratın (NH_4NO_3) olumsuz etkide bulunduğu, buna karşılık 2,4-diklorofenoksiasetik asid (2,4-D), indolasetik asid (IAA) ve sakkaroz miktarının olumlu yönde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

TABAEIZADEH ve ark. (1984)'nın *Lycopersicon esculentum* ve *L. peruvianum* ile yaptıkları bir çalışmada 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullarda yetiştirilen bitkilere 5 gün boyunca 9 saat ışık

13 saat karanlık koşullar uygulandığında, sürekli 16 saat ışık uygulanan bitkilere göre izole edilen protoplastlarda hücre bölünmesinin daha yüksek olduğunu ve *L. peruvianum* 'da ise bu uygulamanın önemli olmadığını saptamışlardır. Her iki türde de protoplast izolasyonundan önce bitkilere düşük sıcaklık uygulamasının kallus oluşumunda önemli derecede artış sağlandığını ve düşük sıcaklık uygulamasından önce bitkiden yaprakların koparılması bu pozitif etkiyi azaltıcı etkide bulunduğunu bildirmişlerdir.

NIEDZ ve ark. (1985), kontrollü koşullarda yetiştirdikleri 3-4 haftalık 8 domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) kültüvarının yapraklarından protoplast izole etmişlerdir. İzole ettikleri protoplastları modifiye ettikleri 8E ortamında kültüre alarak çapları 0.5 cm'ye varan kalluslar elde etme başarısını göstermişlerdir. Elde edilen kalluslardan ise sadece 6 kültüvardan bitki regenerasyonunu gerçekleştirmişler ve regenere edilen bitkilerin kök oluşturmalarını takiben sera koşullarında topraksız kültürde çiçeklenme aşamasına kadar getirebilmişlerdir.

SHAHİN (1985) tarafından 14 domates kültüvarı üzerinde yapılan bir çalışmada bitki gövde ve kotiledonlarından izole edilen protoplastları kültüre alma aşamasında çeşitler arasında farklılıklar olduğunu ortaya koyulmuş ve çalışmada kaplama etkinliği %50 olarak saptanmıştır. Protoplastların kültüre alınmasıyla elde edilen kalluslardan bitki regenere edilerek toprağa aktarılmıştır.

TAN ve ark. (1987a)'nın dört domates çeşiti üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada protoplast izolasyonunda verimliliği arttırmak için bitkilerin izolasyondan önce 18 saat 25°C'de karanlık koşullarda, ve bunu takibende 6 saat süre ile +4°C'de

tutulmasının gerekliliğini rapor etmişlerdir. Protoplastların izolasyonundan sonra kahverengileşmeyi önlemek için protoplastların çevresinde sıvı kültür ortamı bulunan damla şeklindeki Seaplaque agarose içerisinde veya sadece sıvı ortamda kültüre alınmışlardır. Her iki yöntemde de protoplastların bölünme ve protoplastlardan bitki regenerasyonu oranı arttırılabilmektedir. Sürgün oluşumunun teşviki için bir başka yöntem uygulanmış, bunun için mikro kalluslar önce 0.2 M mannitol ve 7.3 mM sakkaroz içeren daha sonrada sadece 0.5 M sakkaroz içeren ortam üzerinde kültüre alınmışlardır. Bu yöntemle 3 ay içerisinde bitki elde edilebilmiş, ancak araştırmada ele alınan çeşitler arasında farklılıklar görülmüştür.

TAN ve ark. (1987b), *Lycopersicon esculentum* 'un 11 genotipinde yaprak diski ve mezofil protoplastlarının sürgün oluşturma kapasitesini karşılaştırmışlardır. Test edilen genotiplerde sürgün oluşum kapasitesi yönünden doğal hatlar ve bunların hibritleri arasında ve yaprak diski ile protoplasttan bitki regenerasyon kapasitesi arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Domateste protoplastlardan yüksek regenerasyon kapasitesine sahip olan genotipleri, yaprak disklerinden sürgün oluşturma oranına bakarak protoplast izolasyonu için hızlı bir ön seçim yapılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

MONTAGNO ve ark. (1991), yabani bir tür olan *Lycopersicon hirsutum* f. *hirsutum* ile protoplast kültürleri üzerinde yapılan bir çalışmada 3-4 haftalık bitkilerin yaprak mezofil protoplastları modifiye edilmiş *Lycopersicon* Cultur Medium üzerinde kültüre alınmış ve kaplama etkinliği %7.2 ile %25.9 arasında değişmiştir. Oluşan kalluslardan da %60 ile %85 arasında sürgün geliştirebilmişlerdir.

O'CONNEL ve HANSON (1985) tarafından yapılmış olan bir çalışmada *Lycopersicon esculentum* yapraklarından izole edilen protoplastlarla *L. pennellii* hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlar PEG (MW 6000) aracılığı ile fuzyona tabi tutulmuş ve elde edilen bitkilerin DNA seviyesinde yapılan analizlerle hibridizasyonun gerçekleştiğini kanıtlamışlardır.

O'CONNEL ve HANSON (1986), *Lycopersicon esculentum* yaprak mezofil protoplastları ile *Solanum rickii* 'nin hücre süspansiyon kültüründen izole edilen protoplastlarının PEG aracılığı ile fuzyonu sonucu Phosphoglucomutase-2 izozim analizi ile oluşan kalluslardan tek birinin somatik hibrit kallus kolonisi olduğunu belirlemişlerdir. Elde edilen 4 somatik hibrit bitkinin hepsinde yapılan total DNA analizleri sonucunda *S. rickii* 'nin cpDNA'sının kalıtsal olarak kaldığını bildirmişlerdir.

HANDLEY ve ark. (1986), *L. esculentum* yaprak mezofil protoplastları ile *Solanum lycopersicoides* 'in hücre süspansiyon kültürlerinden elde ettikleri protoplastları PEG yardımıyla birleştirerek somatik hibrit bitkiler elde edilmişler ve intergenerik somatik hibrit bitkiler PEG/DMOS fuzyon solüsyonu ile *L. esculentum* protoplastlarının kısmen inhibisyonu ve modifiye edilmiş 8E ortamında *S. lycopersicoides* protoplastlarının bölünememesi üzerine kurulan iki farklı bir seleksiyon sistemi kullanmışlardır. Selektif ortamda hızlı gelişen kalluslar seçilerek bunlardan bitki regenere etmişlerdir. Seçilen 8 bitkide yapılan izozim analizleri sonucu somatik hibrit bitkiler olduğu kanıtlanmış ve 8 somatik hibrit bitkiden 7'sinin kromozom sayısı $2n=4X=48$ 'den $2n=68$ arasında değişmiştir. Hibrit bitkilerin iki tanesinde kök ucu hücrelerinin miksoptoid (48, 53, 54 ve 55) kromozom içerdiğini gözlemişlerdir.

O'CONNELL ve HANSON (1987), *Lycopersicon esculentum* ve *L. pennellii* arasında PEG yardımıyla somatik hibridizasyonu gerçekleştirmişler, bu hibrid hücrelerden bitki regenere edebilmişlerdir. Regenere edilen bitkilerde %20 oranında fertilitenin azaldığını saptamışlardır. Yapılan analizler sonucunda elde edilen bitkilerin kloroplastları her iki ebeveynin genomunu taşıdıkları, ancak daha fazla *L. pennellii* 'nin genomlarının hakim olduğunu ve saptanan 34 somatik kallustan 21'inden sürgün elde edildiğini, bunlardan ise 7 tanesinin tohum oluşturduğunu bildirmişlerdir.

WIJBRANDI ve ark. (1988), kanamisine dayanıklı Bellina domates çeşiti ile gamma ışını ile ışına tabi tutulmuş ve tutulmamış *L. peruvianum* protoplastları ile fuzyonu sonucu simetrik ve asimetrik hibrit bitkiler elde etmişlerdir. Simetrik hibrid kalluslar, *L. peruvianum* protoplastlarından gelişen kalluslar kadar regenerasyon kapasitesine sahip olurken, ışına tabi tutulan *L. peruvianum* protoplastları ile fuzyonu sonucu elde edilen kalluslardan bitki regenerasyonu çok yavaş ve oldukça düşük olduğunu gözlemişlerdir. Kromozom sayılarına bakıldığında simetrik hibrid bitkilerde tetraploid ($2n=48$) veya heksaploid ($2n=72$) olurken asimetrik hibritlerin çok büyük farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir.

JAIN ve ark. (1988), *S. nigrum* 'dan domatese atrazine dayanıklılık genini protoplast fuzyonu ile aktarmak için 4 farklı yöntem kullanmışlardır. 1; *S. nigrum* protoplastları ile domates protoplastlarını, 2; gamma ışını ile ışınlanmış *S. nigrum* protoplastları ile domates protoplastlarını, 3; gamma ışını ile ışınlanmış *S. nigrum* protoplastları ile iodoacetate uygulanmış domates protoplastlarını ve 4; bir somatik hibrid bitkinin

protoplastları ile domatesin protoplastlarını geriye fuzyon yapmışlardır. 1. yöntemde elde edilen 12 somatik hibrid bitkinin 10^{-4} M atrazine dayanıklı olduğunu saptamışlardır. 2. ve 3. yöntemde oluşan 20 bitki atrazine dayanıklı olurken UV ile ışınlamanın *S. nigrum* genomunun somatik hibrid bitkiye aktarımını engellediğini saptamışlardır. 4. uygulamada regenere edilen 18 bitkiden 8'i morfolojik olarak domatese benzerken diğerleri *S. nigrum* ile domates karakteri arasında özellikler gösterdiğini bildirmişlerdir.

WIJBRANDI ve ark. (1990a) tarafından, *L. esculentum* yaprak protoplastları ile farklı dozlarda (50 Gray-300 Gray arasında) gamma ışınıyla ışınlanmış *L. peruvianum* yaprak protoplastlarının fuzyonu ile elde edilen asimetric somatik hibridlerin genom içeriklerini Southern blot analizi ile belirlemişlerdir. Işınlanmış *L. peruvianum* 'un genomu ışın dozuna bağlı olarak %17 ile %69 oranında genleri elemine olduğunu bildirmişlerdir. 2., 4. ve 7. kromozomlarda bulunan 3 *L. peruvianum* lokusu tüm asimetric hibridlerde olduğunu belirlemişler ve seleksiyonda regenerasyon kapasitesi özelliği kullanıldığı için bu bölgelerin regenerasyona etki ettiğini bildirmişlerdir.

WIJBRANDI ve ark. (1990b), *Lycopersicon esculentum* ile yabani bir tür olan *L. peruvianum* arasındaki somatik hibridizasyonu PEG ve elektrik akımı ile gerçekleştirmişler ve elde edilen bitkilerin büyük bir çoğunluğunun tetraploid ($2n=4X=48$) olduğunu belirlemişlerdir. Hibritlerin büyük bir çoğunluğu çiçek açıp tohum oluşturmuş ve RFLP analizi sonucunda, 10 tane hibritten 6'sında 2 genomun *L. esculentum* 'dan, 4 genomun ise *L. peruvianum* 'dan olduğunu saptamışlardır. Ayrıca hexaploid bitkilerin tetraploidlere göre daha az fertil olduğunu da bildirmişlerdir.

SAN ve ark. (1990), 2 kültür domates bitkisi protoplastları ile *L. peruvianum* protoplastlarını elektrofuzyon ve PEG kullanarak 43 fertil tetraploid somatik hibrid bitkiler elde etmişlerdir. Somatik hibrid bitki elde etmede elektrofuzyon yöntemi kimyasal fuzyon yöntemine göre çok daha fazla etkili olduğunu saptamışlardır.

WOLTERS ve ark. (1991), β -glucuronidase (GUS) genini içeren patates çeşiti 50 veya 500 Gray ışını ile ışınlanan ve ışına tabi tutulmayan bitkilerin yaprak mezofil protoplastları ile bir sitoplazmik albino domates çeşitinin protoplastlarının fuzyonu ile hibrid bitkiler elde etmişlerdir. Fuzyon ürünleri yeşil kalluslar oluşturduğundan göreceli olarak diğer kalluslardan ayırmışlar ve bu kallusların hibrid olup olmadığını daha sonra izoenzim analizleri ile kanıtlamışlardır.

DERKS ve ark. (1991), *L. peruvianum* ve *L. esculentum*'un protoplastlarının fuzyonu ile simetrik ve asimetrik hibrid bitkiler elde etmişler ve 73 simetrik ve asimetrik hibrid bitkide yapılan analizler sonucunda yalnız bir bitkide her iki ebeveynin kloroplast genomunu, diğerlerinin ise yalnız bir ebeveynin kloroplast genomunu içerdiğini gözlemişlerdir.

RATUSHNYAK ve ark. (1991) tarafından yapılan bir çalışmada, klorofilsiz *Lycopersicon esculentum* Mill. (Plastoma mutant Pl-alb. I)'un yaprak protoplastları ile *L. peruvianum* var *dentatum* (3767 ve 3772 hatları)'un yaprak protoplastları PEG+Ca⁺² yüksek pH'lı bir solüsyon ile protoplastları birleştirmişler ve interspesifik nükleer ve/veya sitoplazmik hibrid bitkilerin seçimi, gamma ışını ile ışınlanan *L. peruvianum* protoplastlarının bölünmemesi ve *L. esculentum* ile karşılaştırıldığında hibrid protoplastların beyaz renkli mikrokalluslar oluşturmalarına göre seçmişlerdir. Hibridler esterase izozim analizleri, plastid, mitokondrial DNA, mitoz ve

mayoz bölünmelerine göre ve ayrıca yaprak, çiçek ve meyve morfolojilerine bakılarak belirlemişlerdir. Bir vejetasyon dönemi boyunca tarla koşullarında hibrid bitkileri incelediklerinde çok fazla farklılıklar gösterdiğini ve tüm hibrid bitkiler bol çiçekli ve abortif tohumlu meyveler oluşturduğunu bildirmişlerdir.

BONNEMA ve ark. (1991), *L. pennellii* hücre süspansiyonlarına gamma ışınıyla ışınlamış ve *L. esculentum* yaprak mezofil hücrelerine iodoacetamide uygulayarak *L. pennellii* ve *L. esculentum*'un protoplastlarının fuzyonu ile sibirid bitkiler elde etmişlerdir. Sellektif bir ortam kullanmadan elde edilen bitkilerin %19'unun sibirid olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen tüm sibiridlerin domates kloroplast genomu ve değişik miktarlarda *L. pennellii* mitokondrial DNA'ya sahip olduğunu ve sibiridlerin hepsi diploid kromozom ($2n=24$) içerdiği, polen ürettiği ve tohum oluşturduğunu bildirmişlerdir.

GURI ve ark. (1991), *Lycopersicon esculentum* Mill. (domates) X *Lycopersicon pennellii* hibrid bitkinin (EP) mezofil protoplastları ile *Solanum lycopersicoides* Dun. kalluslarından izole edilen protoplastlar modifiye edilmiş PEG/DMSO yöntemi kullanılarak somatik hibridizasyonu gerçekleştirmişlerdir. EP bitkilerine fuzyondan önce *Agrobacterium tumefaciens* tarafından NPTII ve nopaline sentez geni aktarılmıştır. Protoplastlar 10^5 /ml yoğunlukta ve 25 μ l kanamisin içeren modifiye edilmiş KM ortamında 16 gün kültüre almışlardır. Sürgün regenerasyonu esnasında morfolojik olarak aynı 212 somatik hibrid bitkiden rast gele 48 sürgünü seçmişler ve daha sonra bu sürgünlerin yapraklarından phosphoglucosomerase heterodimer izozim analiziyle gerçekten somatik hibrid bitkiler olduğunu belirlemişlerdir. Elde ettikleri bitkilerin hemen hemen hepsinin

polen kısırlığı gösterdiğini bildirmişlerdir.

GAVRILENKO ve ark. (1992), iki domates türünün yaprak protoplastları ile yumru oluşturmayan iki yabancı *Solanum* türünün yaprak protoplastlarının fuzyonu ile intergenerik somatik hibrid bitkiler elde etmişlerdir. 60 somatik hibrit bitkinin kendilenmesi sonucunda 12 bitki dışında tüm bitkiler meyve oluşturmaya rağmen bu meyvelerde abortif tohumlar meydana geldiğini bildirmişlerdir.



3. MATERYAL VE METOD

Araştırma 1992-1994 tarihleri arasında .. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Araştırmada Creon domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) eşitinin sürgün ucu kültürü ile geliştirilen bitkilerin tam gelişmiş yaprakları protoplast izolasyonunda bitki materyali olarak kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasallar

3.1.2.1. Kültür Ortamında Kullanılan Kimyasallar

Sürgün ucu kültüründe MURASHIGE ve SKOOG (1962) (MS), MS makro- mikro elementleri ve Nitsch vitaminleri (NITSCH ve NITSCH, 1969) içeren modifiye edilmiş MS ve TM-1 (SHAHIN, 1985) ortamları kullanılmıştır. Bu ortamların içerdiği kimyasallar ve kullanılan miktarlar Ek 1'de verilmiştir.

3.1.2.2. Protoplast İzolasyonu ve Kùltüründe Kullanılan Kimyasallar

Protoplast izolasyonundan önce yaprak dokularını plazmolizi için %9 (w/v) mannitol içeren CPW tuz solüsyonu (FREARSON ve ark., 1973) (CPW9M) kullanılmıştır (bakınız Ek 2). Hücre duvarını yıkmak için SAKOMOTO ve TAGUCHI (1991) (ST) tarafından kullanılan enzim çözeltisi ve %0.2 (w/v) Macerozyme R-10+ %0.6 (w/v) Cellulase Onozuka R-10+ CPW9M içeren Domates Enzim Solüsyonu (DES) olmak üzere iki farklı enzim solüsyonu kullanılmıştır (bakınız Ek 3). İzole edilen protoplastlardan enzim solüsyonunu ve bitki artıklarını uzaklaştırmak için W5 solüsyonu kullanılmıştır (MENCZEL ve ark., 1981) (bakınız Ek 4). İzole edilen protoplastlar modifiye edilmiş TM-2 (SHAHIN, 1985) ve MS makro-mikro elementleri+ Nitsch vitaminleri+ %7 (w/v) mannitol+ %1 (w/v) sakkaroz+ %0.5 (w/v) glikoz+ 1.0 mg/l naftalin asetik asid (NAA)+ 0.5 mg/l 6-Benzil amino purine (BAP) içeren MS-N ortamlarında kùltüre alınmışlardır (bakınız Ek 5). Modifiye edilmiş TM-2 ortamında kùltüre alınan protoplastlardan gelişen mikrokallusları geliştirmek amacıyla ortamı TM-3 (SHAHIN, 1985) ve mikrokalluslardan kallus gelişimi amacıyla da farklı oranlarda giberellik asid (GA₃) ve Zeatin içeren TM-4 ortamı (SHAHIN, 1985) (bakınız Ek 6), kalluslardan bitki regenerasyonu amacıyla da farklı oranlarda indol-3-asetik asid (IAA) ve Zeatin içeren MS kùltür ortamı kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. *In vitro* Sürgün Ucu Kültürü ile Domates Bitkilerinin Yetiştirilmesi

In vitro sürgün ucu kültürü için gerekli olan domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bitkileri saksılarda 25-26°C'de, 5000 lüks ışık yoğunluğunda ve 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odalarında yetiştirilmiştir. İklim odalarında yetiştirilen 4-5 haftalık domates fidelerinin sürgün uçları alınarak önce %70'lik etil alkol içerisinde 1 dakika bekletildikten sonra %0.1 Tween-20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate) içeren %5'lik ticari sodyum hipoklorid (NaOCl) solüsyonu içerisinde 10 dakika bekletilmiş ve daha sonra bu solüsyondan çıkartılarak üç kez steril destile su ile yıkanmıştır. Daha sonra sürgün uçları petri kutuları içerisindeki steril kurutma kağıtları üzerinde kurutularak *in vitro* sürgün ucu kültürü için hazır hale getirilmiştir. Bu suretle sterilizasyon işlemi tamamlanmış sürgün uçları ayrı ayrı MS, MS+0.01 mg/l NAA, MS makro-mikro elementleri ve Nitsch vitaminlerini içeren modifiye edilmiş MS ve TM-1 ortamlarında 25-26°C'de 2000 lüks ve 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odalarında, içerlerinde 50 ml ortam bulunan 250 ml'lik erlen mayerlerde kültüre alınmışlardır. Ortamlara %2 (w/v) sakkaroz ve %0.7 (w/v) teknik agar ilave edilmiştir. Kültüre alınan sürgünler 4-5 hafta sonra bitki gelişimine göre değerlendirilmiştir.

In vitro'da geliştirilmiş olan 3-4 haftalık domates bitkilerinin yaprakları protoplast izolasyonu için alındıktan sonra, bu bitkilerin sürgün uçları tekrar bitki elde etmek için modifiye edilmiş MS ortamına aktarılmıştır. Böylece sürekli olarak steril bitki materyalinin devamlılığı sağlanmıştır.

3.2.2. Domates Yapraklarından Protoplast İzolasyonu

Modifiye edilmiş MS ortamında sürgün ucu kültürüyle geliştirilmiş olan 3-4 haftalık domates bitkileri iki gün süreyle iklim odası içerisinde, karanlık koşullarda bekletildikten sonra, bu bitkilerin yapraklarından bir parça (250-300 mg) alınarak CPW9M çözeltisinde 60X15 mm'lik petri kutuları içerisinde ince şeritler halinde (1-2 mm kalınlığında) kesilerek $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de yarım saat süre ile plazmoliz edilmiştir. Daha sonra plazmoliz solüsyonu bir steril pipet yardımıyla alınmış ve yerine soğuk steril edilmiş 6 ml ST ve DES enzim solüsyonları ayrı ayrı 60X15 mm'lik petri kutularına ilave edilmiştir. Petri kutuları parafilm ile kapatılarak $28\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de ve 45 rpm'de çalışan çalkalayıcı üzerinde karanlıkta inkübe edilmiştir. Enzim solüsyonu içerisinde inkübe edilen yapraklardan protoplast izolasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini, gerçekleşti ise hangi oranda gerçekleştiğini takip etmek için 5. 6. ve 7. saatlerde örnekler alınmıştır. Ancak zaman içerisinde çalkalayıcının 45 rpm'de çalışmasının protoplast verimliliğine olumsuz etkisi gözlenmiş, bu nedenle de çalkalayıcının devri 25 rpm'e düşürülerek inkübasyon süresi 14-15 saate çıkarılmıştır.

İzole edilen protoplastlardan enzim solüsyonu ve bitki kalıntılarını uzaklaştırmak için önce protoplast-enzim solüsyonu 64 μm çaplı porlara sahip olan naylon elekten geçirilmiştir. Naylon elekten geçen protoplast-enzim solüsyonu bir steril pipet yardımıyla her tüpe 2 ml olacak şekilde steril santrifüj tüplerine aktarılarak 500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra sağlam protoplastlar santrifüj tüpünün dibinde toplanmışlardır. Tüpün üst kısmındaki sıvı kısım alındıktan sonra santrifüj tüpünün dibinde toplanan protoplast pelleti 3 ml W5

solüsyonu ile yavaşca sulandırılarak tekrar 500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrar edildikten sonra santrifüj tüpünün dibinde toplanan protoplast pelleti 1 ml protoplast kültür ortamı ile sulandırılmış ve hemositometre kullanarak 1 ml'de kaç tane protoplast olduğu saptanmıştır. Daha sonra protoplast yoğunlukları 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 ve 4×10^5 protoplast/ml olacak şekilde ayarlanarak değişik yoğunluklarda kültüre alınmışlardır.

3.2.3. Protoplastların Kültüre Alınması

İzolasyonu yapılarak kültüre alınmak üzere değişik yoğunluklara ayarlanmış olan protoplastların kültüre alınmasında ortam olarak MS makro-mikro elementleri+ Nitsch vitaminleri+ %7 (w/v) mannitol+ %1 (w/v) sakkaroz+ %0.5 (w/v) glikoz+ 1.0 mg/l NAA+ 0.5 mg/l BAP içeren MS-N ve modifiye edilmiş TM-2 (ozmotik basınç ayarlayıcıları yerine %7 (w/v) mannitol, %1 (w/v) sakkaroz ve %0.5 (w/v) glikoz kullanılmıştır) kullanılmıştır. Protoplastları kültüre almada kullanılan ortamlara katılaştırıcı olarak %0.6 Seaplaque agarose ilave edilmiştir. Protoplastlar 60X15 mm'lik petri kutularının tabanını kaplayacak şekilde (2 ml kültür ortamı) ve katı damlalar şeklinde $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır. Porotoplastlar kültüre alındıktan 4 gün sonra ve bunu takip eden her üç günde bir bölünen protoplastlar sayılarak değerlendirilmiştir. Kültür ortamının kurumasını önlemek için 3 günde bir TMD (WIJBRANDI ve ark., 1990b) sıvı ortamı ilave edilmiştir. Yaklaşık 3 hafta sonra oluşan mikrokalluslar sayılarak % kaplama etkinliği saptanmıştır.

Katı ortamda kültüre alınan protoplastlardan gelişen mikrokallusların gelişimini hızlandırmak için katı ortam baklava dilimleri şeklinde kesilerek, içinde 2 ml TM-3 ortamı bulunduran yeni petrilere aktarılmıştır. Petrilerin etrafı parafilm ile kapatılarak 1500 luks ışık yoğunluğunda, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de ve 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullarda iklim odalarında kültüre alınmışlardır.

Protoplastların kültüre alınmalarından yaklaşık 5-6 hafta sonra oluşan mikrokallusların gelişimini teşvik etmek için 2-3 mm büyüklüğe ulaşmış olan mikro kalluslar GA_3 (0.2 mg/l ve 0.5 mg/l) ve Zeatin (0.5 mg/l, 1.0 mg/l ve 2.0 mg/l) içeren TM-4 ortamına aktarılmıştır. 1500 luks ışık yoğunluğunda, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de ve 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullarda kültüre alınan mikrokalluslardan yaklaşık bir ay sonra gelişen kallusların tartımları yapılarak uygun kallus ortamı saptanmıştır.

3.2.4. Bitki Regenerasyonu

Domates yaprak protoplastlarından elde edilen kalluslar bitki regenerasyonu için farklı oranlarda IAA (0.0, 0.05, 0.1 ve 0.5 mg/l) ve Zeatin (0.0, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l) ile %2 sakkaroz içeren katı MS ortamında 5 tekerrürlü olarak (her tüp bir tekerrür), 2000 lüks ışık intensitesine (16 saat ışık 8 saat karanlık) sahip iklim odalarında kültüre alınmışlardır. Ortamların pH'sı 1 N KOH ile 5.8'e ayarlamıştır.

Araştırmada kullanılan tüm ortamlar (enzimler haric) 121°C 'de 1 atm basınç altında 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Enzimler ise 0.22 μm por genişliğine sahip milipor filtrelerden geçirilerek soğuk sterilizasyona tabi tutulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bitki Materyallerinin Elde Edilmesi

Protoplast izolasyonunda bitki materyali olarak *in vitro* sürgün ucu kültürüyle geliştirilmiş 3-4 haftalık domates bitkilerinin tam gelişmiş yaprakları kullanılmıştır. *In vitro* bitkiler elde etmek için iklim odalarında yetiştirilen 4-5 haftalık domates bitkilerinin sürgün uçları (1-2 cm) değişik ortamlar üzerinde kültüre alınmışlardır. Sürgün ucu kültürü ile ilgili sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Sürgün ucu kültüründe kullanılan ortamların bitki gelişimi üzerine etkileri

Ortamlar	Bitki Gelişimi
MS	-
MS + 0.01 NAA	+
Modifiye edilmiş MS	++
TM-1	++

- Bitki gelişimi zayıf
- + Yapraklar kırışık
- ++ Yaprak gelişimi iyi

Kültüre alınan sürgün uçlarından modifiye edilmiş MS ve TM-1 ortamındaki sürgünler gelişip bitki oluşturlarken (Resim 1) diğer iki ortam (bazal MS ve MS + 0.01 mg/l NAA) üzerinde kültüre alınan

sürgünler optimum gelişme göstermemişlerdir. MS+0.01 mg/l NAA içeren ortamda sürgün ucu kültürüyle geliştirilen domates bitkilerinin yaprakları kıvrık gelişmiştir. Bazal MS ortamında ise bitkiler çok yavaş bir gelişme göstermiştir. Modifiye edilmiş MS ortamında sürgün ucu kültürüyle geliştirilen domates bitkileriyle TM-1 ortamında gelişen domates bitkileri arasında büyük bir farklılık gözlenmemiştir.



Resim 1. *In vitro* sürgün ucu kültürüyle modifiye edilmiş MS ortamında geliştirilmiş bir domates bitkisi

4.2. Protoplast İzolasyonu

Modifiye edilmiş MS ortamında gelişen 3-4 haftalık domates bitkileri iki gün $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta bekletildikten sonra yapraklarından protoplast izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Protoplast izolasyonunda iki farklı enzim solusyonu kullanılmıştır.

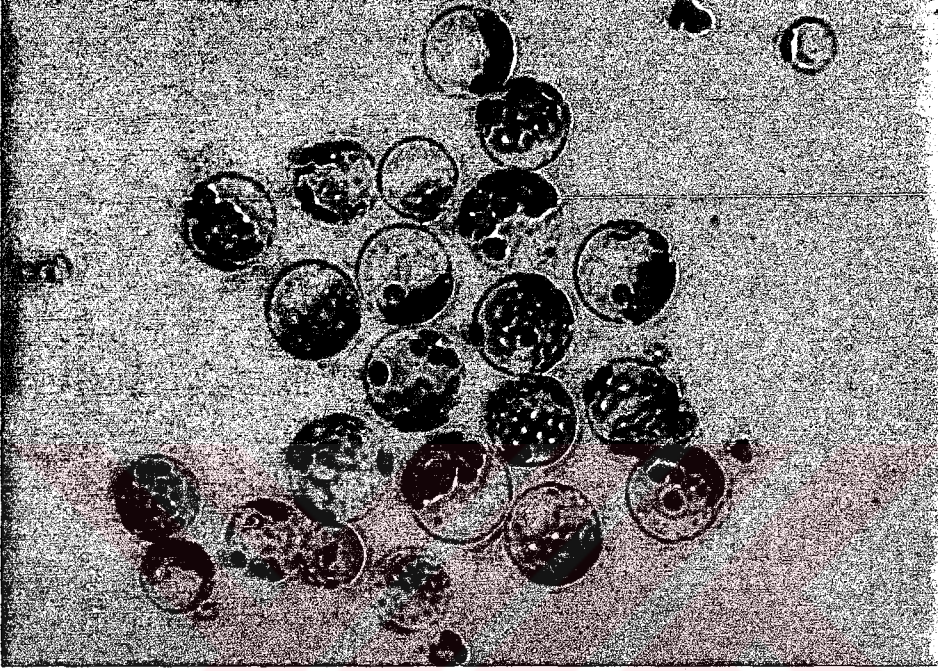
Enzim solusyonu içerisinde, 45 rpm'de çalışan çalkalayıcılar üzerinde, $28\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta inkube edilen yapraklardan protoplast izolasyonunun 5. 6. ve 7. saatlerde örnekler alınarak izolasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, gerçekleşti ise hangi oranda gerçekleştiği takip edilmiş ve alınan sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Domates yapraklarından protoplast izolasyonunda kullanılan iki farklı enzim solusyonunun (ST, DES) değişik zamanlarda protoplast verimliliği üzerine olan etkileri

Zaman (saat)	Enzim Solusyonu	Bir Görüş Alanında Görülen Protoplast Sayısı (X40)
5	ST	35
	DES	20
6	ST	40
	DES	65
7	ST	30
	DES	65

Çizelge 2'de de görüldüğü gibi yaprak parçacıklarının enzim çözeltisi içerisine konulmasını takiben 6. ve 7. saat sonunda DES enzim solusyonu protoplast izolasyonunda olumlu sonuç vermesi üzerine çalkalayıcının hızı 25 rpm'e düşürülmüş ve $28\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlık koşullarda enzim solüsyonunda inkübe edilen 1 g yapraktan bitkinin fizyolojik durumuna bağlı olarak $6-7\times 10^6$ protoplast izole edilebilmiştir. Aynı zamanda protoplast izole edilecek bitkinin protoplast izolasyonunda çok önemli olduğu görülmüştür. En iyi protoplastlar *in vitro* sürgün ucu kültürüyle elde edilen 3-4 haftalık bitkilerin tam gelişmiş yapraklarından izole edilirken, 5 haftalık ve daha yaşlı bitki yapraklarında protoplast izolasyonu gerçekleşmemiştir (Resim 2).

İzolasyon esnasında dipte toplanan protoplastlar 3 ml CPW21S (CPW tuzları+%21 sakkaroz) çözeltisi ile sulandırılarak 500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildiğinde protoplastların tam olarak sıvının üst kısmında toplanmadığı gözlenmiştir. 3 ml yerine 6 ml CPW21S ilave edilerek 500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildiğinde protoplastların sıvının üst kısmında toplandığı gözlenmiştir. CPW21S içerisinde protoplastlar ozmotik basınçtan dolayı parçalanmakta veya büzüşmektedir. Bu nedenle CPW21S ile protoplastları sıvının üstünde toplama yerine sadece W5 solüsyonu kullanarak protoplasların santrifüj tüpünün dibinde toplanması tercih edilmiştir. W5 solüsyonu ile protoplastlar santrifüj tüpünün altında toplanırken 500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildiğinde protoplastlar çok sıkışmakta ve bu nedenle parçalanabilmektedir. W5 solüsyonu ile protoplastların santrifüj tüpünün altında toplamada en iyi sürenin 500 rpm'de 3 dakika olduğu yapılan çalışmada saptanmıştır.

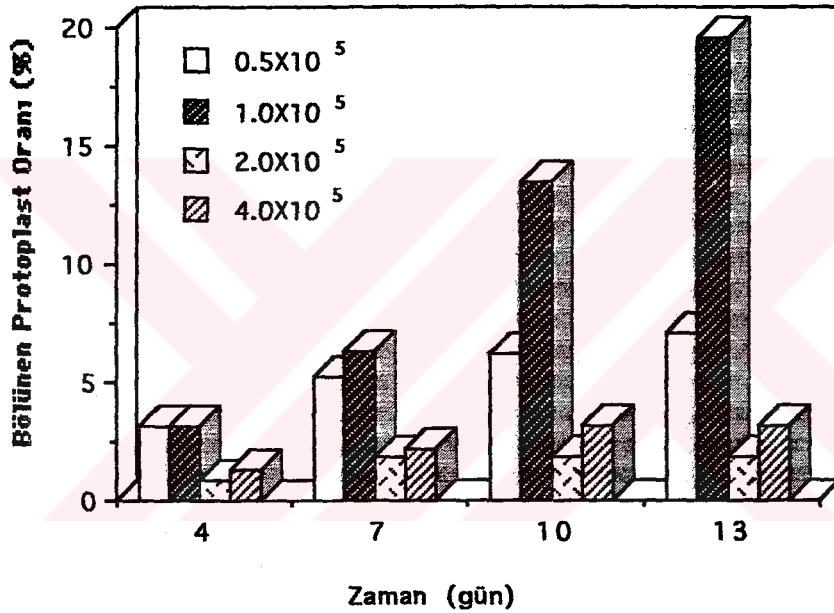


Resim 2. Domates bitkisinin yapraklarından izole edilen mezofil protoplastları

4.3. Protoplast Kùltürù

İzole edilen protoplastlar 4 farklı yoğunlukta, MS-N ve modifiye edilmiş TM-2 ortamında kùltüre alınmışlardır. Katı ve sıvı MS-N ortamında kùltüre alınan protoplastlar 4. günden sonra kahverengileşerek canlılıklarını kaybettikleri gözlenmiştir.

Yapılan araştırmada sıvı modifiye edilmiş TM-2 ortamında hücre bölünmesi gerçekleşmesine rağmen mikrokallus oluşumu gözlenmemiştir. Modifiye edilmiş TM-2 ortamında protoplastlar katı ve katı damlalar olarak iki farklı yöntemde kültüre alınmıştır. Petrinin tabanını kaplayacak şekilde katı ortamda kültüre alınan protoplastların % bölünme oranları Şekil 1'de verilmiştir.

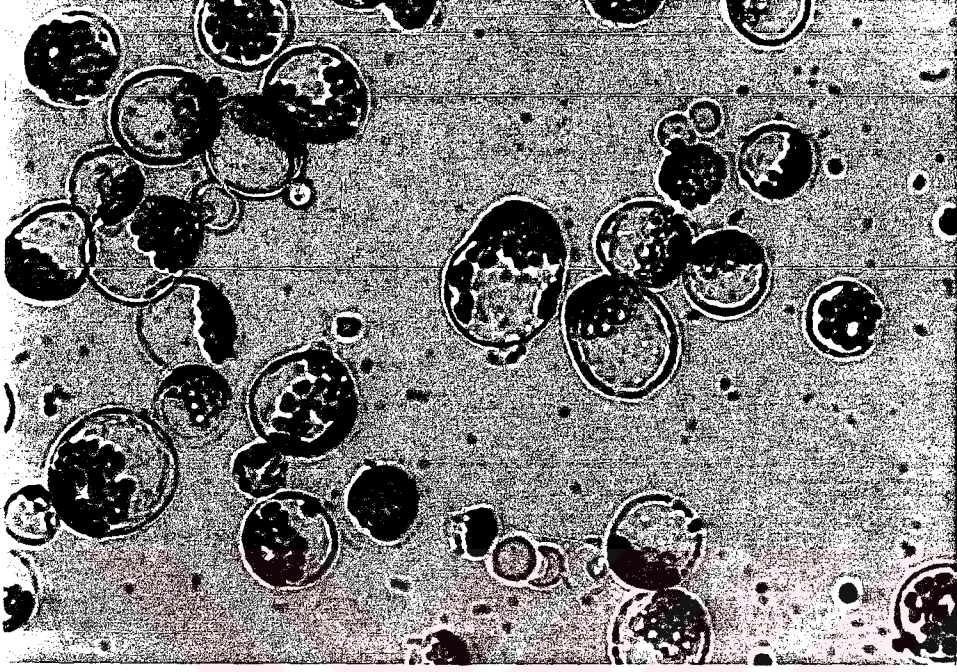


Şekil 1. Modifiye edilmiş katı TM-2 ortamında ve değişik yoğunluklarda kültüre alınan domates yaprak protoplastlarının zamana bağlı olarak % bölünme oranları

Şekil 1'de de görüldüğü gibi en yüksek protoplast bölünmesine (%19.53) 1.0×10^5 protoplast/ml yoğunlukta kültüre alınan protoplastlarda görülmüştür. Protoplast yoğunluğu arttıkça ve azaldıkça protoplast bölünmesinde bir azalma olduğu gözlenmiştir.

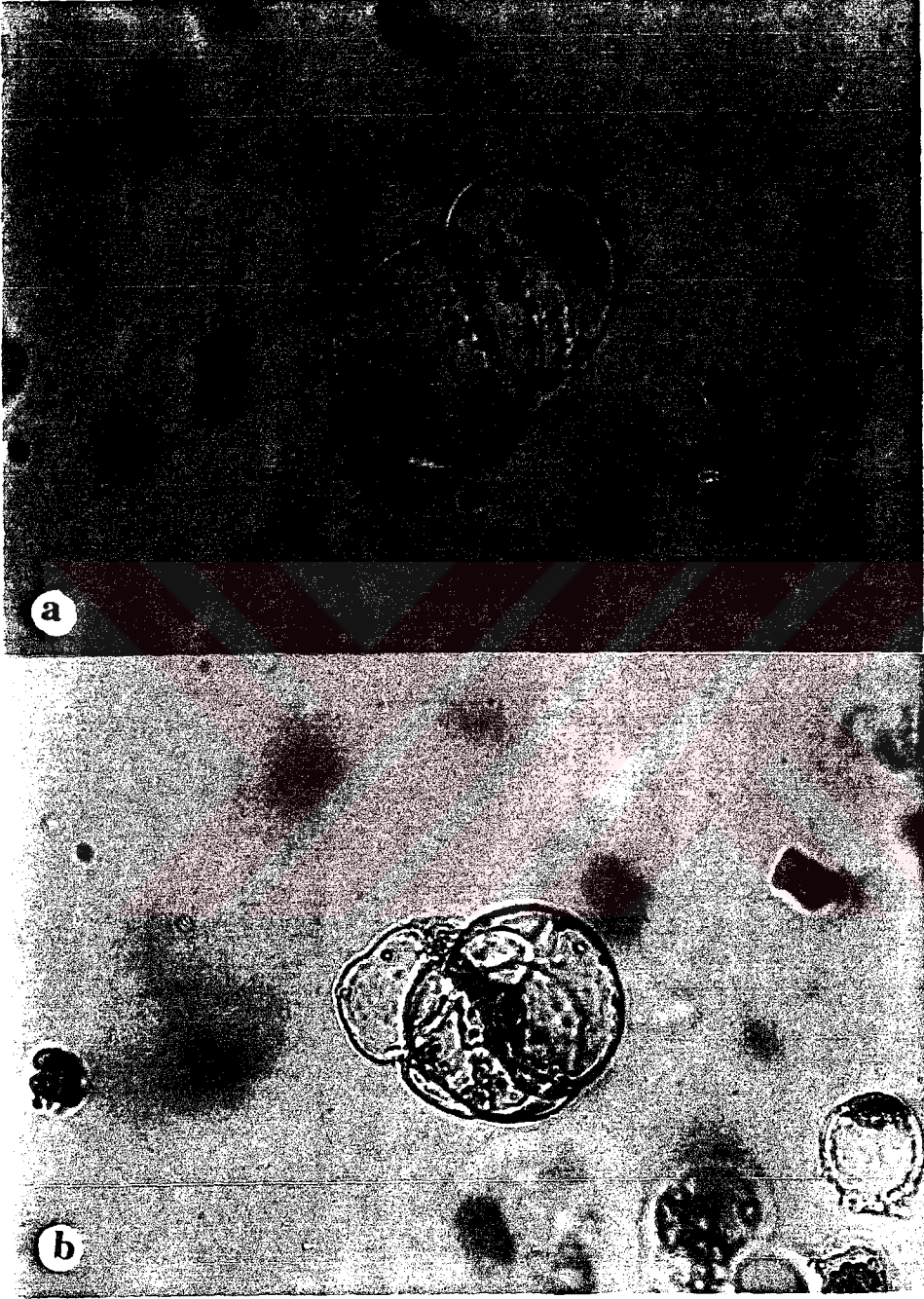
Modifiye edilmiş TM-2 ortamında protoplastlar kültüre alındıktan 2 gün sonra şekilleri küreselden ovale doğru değişmeye (Resim 3) ve 3-4 gün sonra da bölünmeye başladığı gözlenmiştir (Resim 4). 0.5×10^5 ile 1.0×10^5 protoplast/ml yoğunluklarda kültüre alınan protoplastlarda 4. günde aynı oranda (%3.1) bölünme olurken, 7, 10 ve 13. günlerde 0.5×10^5 protoplast/ml yoğunlukta kültüre alınan protoplastların bölünmesinde kısmen bir artış olsada 1.0×10^5 protoplast/ml yoğunlukta kültüre alınan protoplastlardan daha az bölünme (%19.53) göstermiştir. 2.0×10^5 ve 4.0×10^5 protoplast/ml yoğunluklarda kültüre alınan protoplastların bölünmesi 4. günde çok düşük oranda (%0.92-1.3) olmuş, 7 ve 10. günde protoplast bölünmesinde kısmen bir artış olsada bu artış 13. günde sabit kalmıştır.

Katı damlalar şeklinde, değişik yoğunluklarda kültüre alınan protoplastların zamana bağlı olarak % protoplast bölünme oranıyla ilgili sonuçlar Şekil 2'de verilmiştir. Şekil 2'de de görüldüğü gibi 1.0×10^5 protoplast/ml yoğunlukta kültüre alınan protoplastlarda en yüksek oranda (%12.3) hücre bölünmesi gözlenmiştir. 0.5×10^5 protoplast/ml yoğunlukta kültüre alınan protoplastlarda ise hücre bölünmesi gerçekleşmemiştir. 1.0×10^5 protoplast/ml yoğunlukta kültüre alınan protoplastların 4. gündeki bölünme oranı, 2.0×10^5 ve 4.0×10^5 protoplast/ml yoğunlukta kültüre alınan protoplastların bölünme oranının yaklaşık iki katı (%4.07) olmuş ve 7, 10 ve 13. günde aralarındaki fark giderek artmıştır.

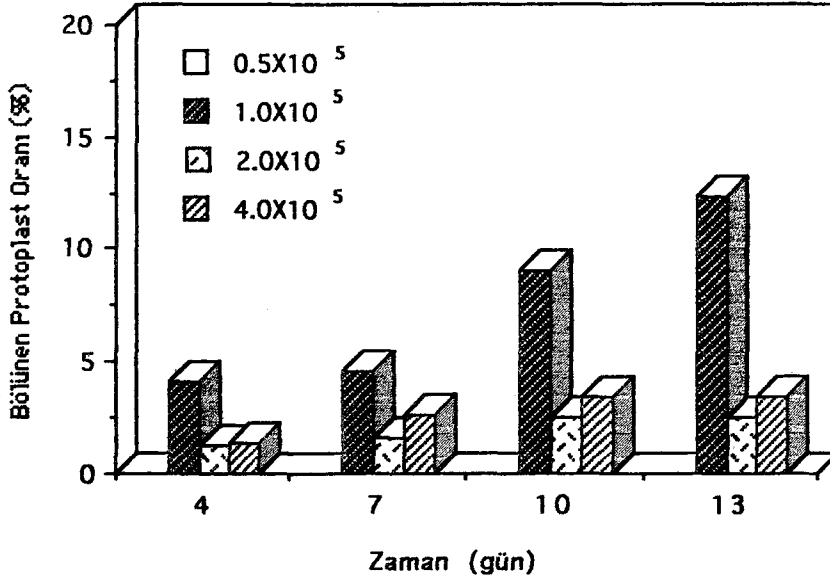


Resim 3. Domates yaprak protoplastlarının kültüre alınmasından 2 gün sonra hücre duvarı oluşturarak küresel yapıdan oval yapıya dönen protoplastlar

Katı damlalar ve petrinin tabanını kaplama yöntemiyle kültüre alınan protoplastların zamana bağlı olarak hücrelerin % bölünme oranı karşılaştırıldığında petrinin tabanını kaplama yönteminin %19.53 ile daha olumlu sonuç verdiği gözlenmiştir. Katı ve katı damla şeklinde kültüre alınan protoplastların 4. günde % bölünme oranları yaklaşık aynı olurken 7, 10 ve 13. günlerde katı kültürdeki protoplastların % bölünme oranı katı damla yöntemiyle kültüre alınan protoplastlara göre daha fazla bir artış göstermiştir.

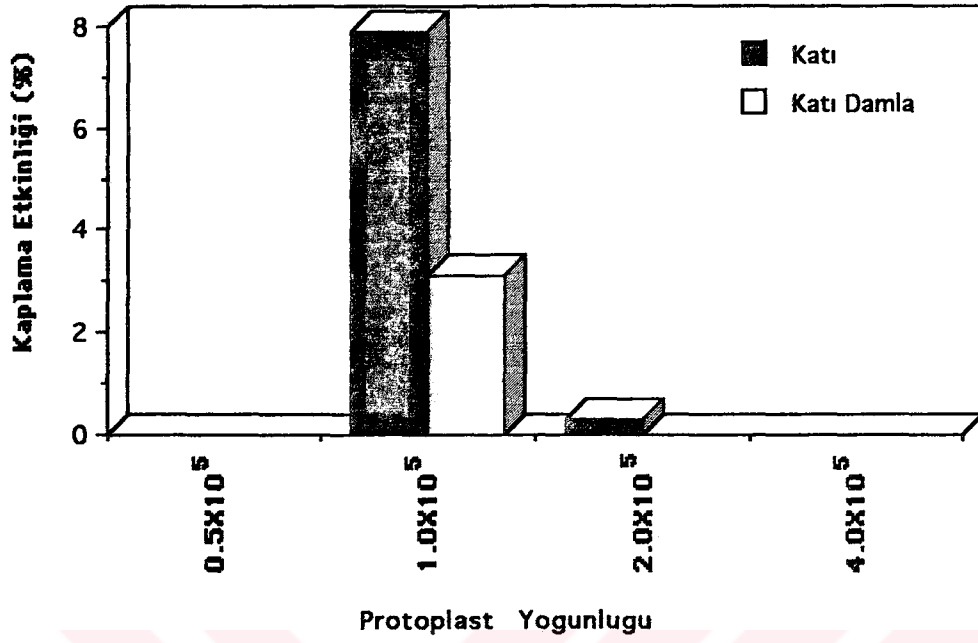


Resim 4. Modifiye edilmiş TM-2 ortamında kültüre alınan domates yaprak protoplastlarının ilk (a) ve ikinci bölünmeleri (b)



Şekil 2. Modifiye edilmiş TM-2 ortamında, değişik yoğunluklarda ve petri tabanına katı damla yöntemiyle kültüre alınan domates yaprak protoplastlarının zamana bağlı olarak % bölünme oranları

Protoplastların kültüre alınmalarından yaklaşık 20 gün sonra protoplastların bölünmesi sonucunda oluşan mikrokallusların sayımı yapılarak % kaplama etkinliği belirlenmiş ve alınan sonuçlar Şekil 3'de verilmiştir. Şekil 3'de de görüldüğü gibi protoplastlardan mikrokallus gelişimi en fazla %7.9 ile petrinin tabanını kaplama yöntemiyle kültüre alınan protoplastlarda gözlenmiştir (Resim 5). Domates protoplastlarını kültüre almada ise en uygun protoplast yoğunluğunun 1.0×10^5 protoplast/ml olduğu saptanmıştır. Petrinin tabanını kaplama yöntemiyle kültüre alınan protoplastlarda 0.5×10^5 ve 4.0×10^5 protoplast/ml yoğunlukta mikrokallus oluşumu gözlenmemiştir. Katı damlalar yöntemiyle kültüre alınan protoplastlarda ise sadece 1.0×10^5 protoplast/ml yoğunlukta mikrokallus oluştuğu gözlenmiştir.



Şekil 3. Modifiye edilmiş TM-2 ortamında kültüre alınan domates yaprak protoplastlarının % kaplama etkinliği



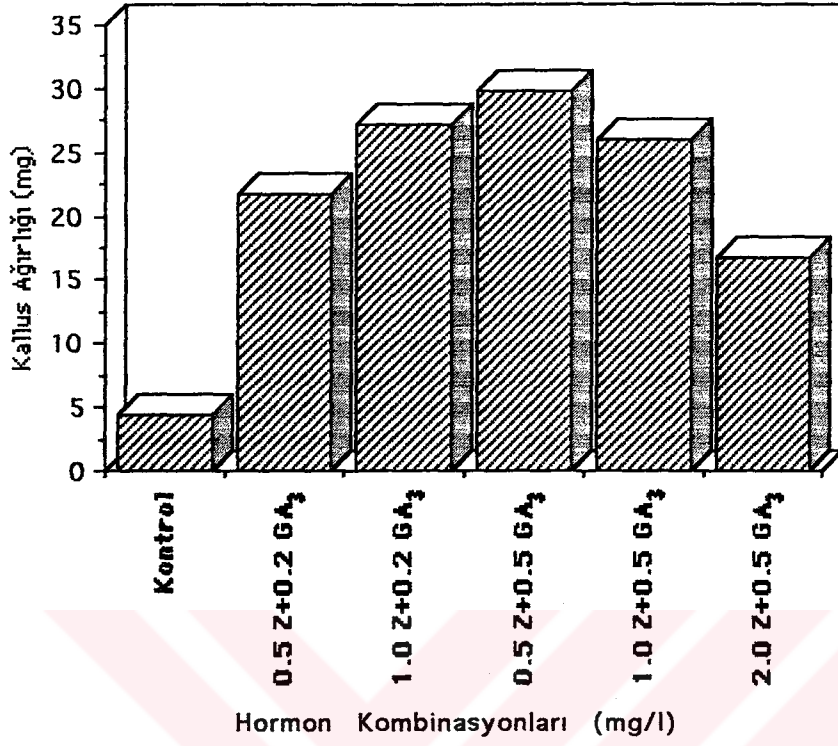
Resim 5. Modifiye edilmiş TM-2 ortamında domates yaprak protoplastlarından gelişmiş mikrokalluslar

Protoplastlar 60X15 mm'lik petri kutularında ince bir tabaka halinde kültüre alındıklarında zamanla ortamda bulunan suyun buharlaşarak ortamın kurumasına neden olmaktadır. Kuruyan ortamlarda protoplastlar bölünüp mikrokallus oluşturmamaktadır. Ortamın kurumasını önlemek ve protoplastların bölünmesini teşvik etmek için protoplastlar kültüre alındıktan üç gün sonra ve mikrokalluslar meydana gelinceye kadar her üç günde bir 0.5 ml TMD ortamı ile sulandırmanın hücre bölünmesini teşvik ettiği gözlenmiştir.

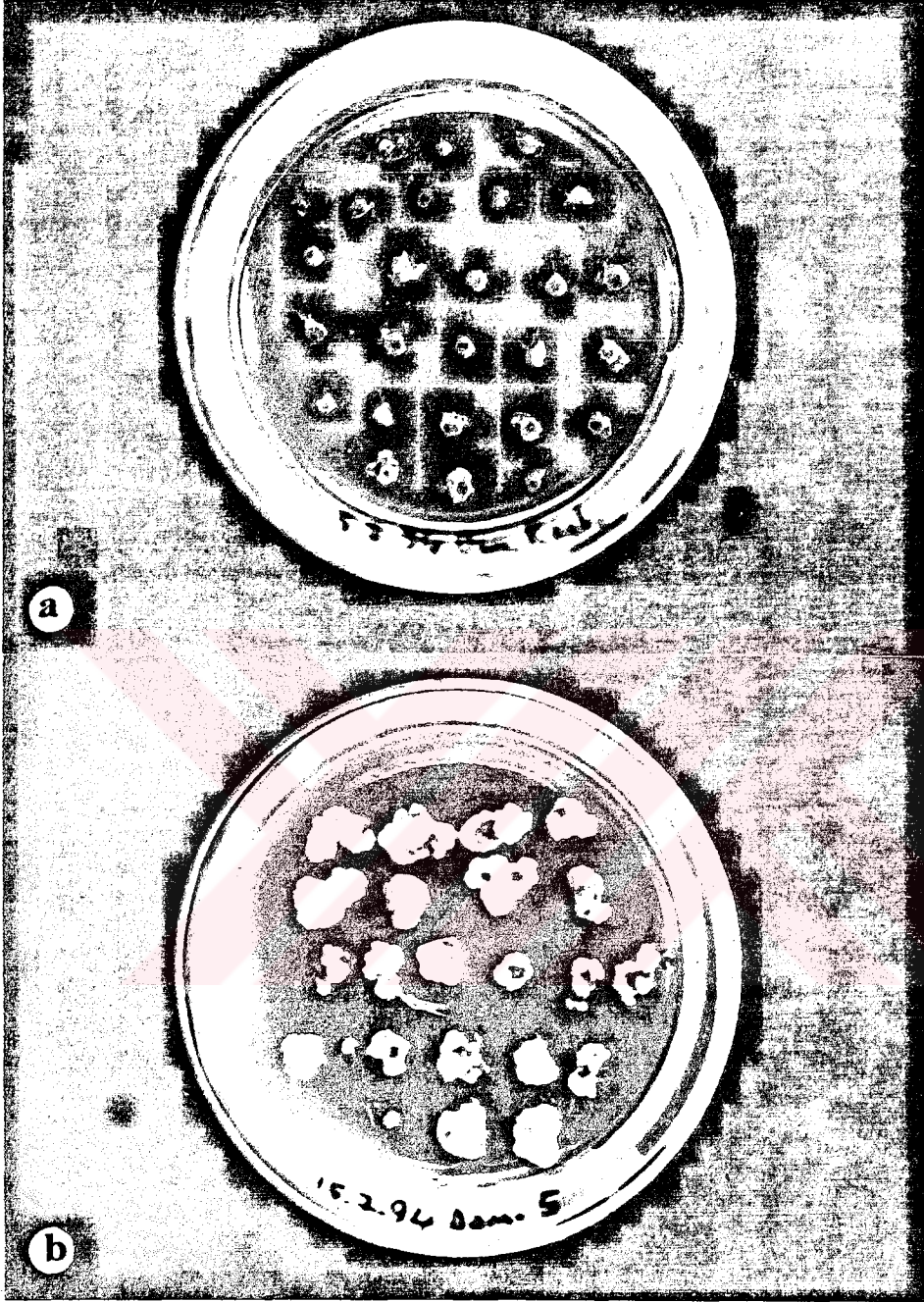
Modifiye edilmiş TM-2 ortamında gelişen mikrokallusların gelişimini hızlandırmak için sıvı TM-3 ortamı kullanılmıştır. TM-3 ortamında mikrokalluslar çok hızlı bir gelişme göstererek 15-20 günde mikrokallusların çapları 1-2 mm'ye ulaşmıştır.

TM-3 ortamında gelişen mikrokalluslar farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda Zeatin ve GA_3 içeren TM-4 ortamına aktarılmıştır. TM-4 ortamında kültüre alınan mikrokalluslardan yaklaşık bir ay sonra gelişen kallusların ağırlığı alınmıştır (Şekil 4). Şekil 4'de görüldüğü gibi hormonsuz TM-4 (kontrol) ortamında kallus gelişimi (Resim 6a) düşük düzeyde (4.5 mg) kalırken 0.5 mg/l Zeatin+0.5 mg/l GA_3 içeren TM-4 ortamında 29.77 mg ile en yüksek kallus gelişimi gözlenmiştir (Resim 6b). 1.0 mg/l Zeatin+0.2 mg/l GA_3 ve 1.0 mg/l Zeatin+0.5 mg/l GA_3 içeren TM-4 ortamında daha az kallus oluşmasına rağmen 0.5 mg/l Zeatin+0.5 mg/l GA_3 içeren TM-4 ortamına göre kallus ağırlığı açısından fazla bir fark saptanmamıştır.

Bitki regenerasyonu amacıyla 15X150 mm'lik cam deney tüplerinde farklı oranlarda IAA ve Zeatin içeren MS ortamında kültüre alınan kalluslardan izlenen bir ay içerisinde hiçbir ortamda embriyogenesis gözlenmemiştir.



Şekil 4. Farklı hormon kombinasyonları içeren TM-4 ortamının kallus gelişimine etkisi



Resim 6. Domates yaprak protoplastlarından gelişmiş mikrokalluslardan hormonsuz (kontrol) (a) ve 0.5 mg/l Zeatin ve 0.5 mg/l GA₃ içeren TM-4 (b) ortamında gelişen kalluslar

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Son yıllarda domates ıslahı alanındaki çalışmalar verimin arttırılması, meyve kalitesinin iyileştirilmesi, yetiştirme zamanının değiştirilmesi, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığın sağlanması üzerinde yoğunlaşmıştır (RICK, 1982). Solanaceae familyasında yer alan bir çok yabancı tür yukarıda sayılan özelliklerden bir veya bir kaçına birden sahip olabilmektedir. Dolayısı ile bu özelliklere sahip domates bitkileri yabancı *Lycopersicon* türleri ile yapılan melezlemeler sonucunda elde edilebilecektir. Ancak yabancı türlerle kültür domatesleri arasında görülen interspesifik uyumsuzluk nedeniyle yabancı türlerde mevcut önemli karakterlerin klasik melezleme yoluyla kültürü yapılan domates türlerine aktarımı engellenmektedir. Bu uyumsuzluk engelini aşmada protoplast fuzyonu ile somatik hibridizasyon veya somatik sibrizasyon teknikleri alternatif bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Yalnız bu teknikleri uygulayabilmek için öncelikle çalışılacak bitki tür veya türlerinde protoplast kültürü sisteminin kurulmuş olması gerekmektedir.

Domateste ilk protoplast izolasyonu 1977'li yıllarda ZAPATA ve ark., (1977) tarafından gerçekleştirilmesine rağmen protoplasttan bitkiye geçiş ancak 1984'lü yıllarda mümkün olabilmıştır. Bunun başlıca nedenlerinden birisi domatesin *in vitro*'da gelişmesinde büyük rol oynayan vitamin ve organik bileşiklerin sağlanmaması olmuştur.

Protoplast kültürü sisteminde başarıya ulaşmada kullanılan bitki materyallerinin fizyolojik durumunun protoplast izolasyonu için uygun olması gerektiğinden iyi koşullarda gelişmiş bitkilere gereksinim duyulmaktadır. Yapılan bu çalışmada doğrultusunda *in*

vivo koşullarında yetiştirilmiş domates bitkilerinin sürgünlerinden, sürgün ucu kültürü ile *in vitro* bitkicikler elde etmek amacıyla bazal MS, 0.01 mg/l NAA içeren MS, modifiye edilmiş MS ve TM-1 kültür ortamlarının kullanıldığı çalışmada en iyi sonucu TM-1 ve Nitsch vitaminlerini içeren modifiye edilmiş MS ortamları vermiştir. SHAHİN (1985) protoplast izolasyonunda kullandığı kaynak domates bitkilerini TM-1 kültür ortamında sürgün ucu kültürüyle geliştirmiştir. Bir başka araştırmacı ise yine aynı amaç için domates bitkilerini T vitaminleri (TEWES ve ark., 1984) ve 10 g/l sakkaroz içeren MS ortamında sürgün ucu kültürüyle elde ettiği bitkileri kullanmıştır (WIJBRANDI ve ark., 1990b). Yapılan bu çalışmada domates sürgün ucu kültüründe modifiye edilmiş MS ve TM-1 ortamlarının başarılı sonuç vermesi adı geçen araştırmacıların yaptıkları çalışmaları desteklemektedir.

Solanum (TAN ve ark., 1987c; HASSANPOUR-ESTAHBANATI ve DEMARLY, 1985) ve *Lycopersicon* türlerinde (TABAEIZADEH ve ark., 1984) düşük ışık intensitesi (1500-2000 lüks) ve kısa ışık periyodunda (6 saat ışık, 18 saat karanlık) yetiştirilen bitkilerde yüksek protoplast verimliliği elde edilmiştir. Domates gibi bitkiler düşük ışık intensitesinde yetiştirildiğinde düşük pectate konsantrasyonu nedeniyle yaprak hücre duvarı daha ince yapıda oluşmaktadır (CASSELS ve BARLASS, 1976). Dolayısı ile bu koşullarda gelişmiş bitkilerin yaprakları düşük konsantrasyonda hücre duvarını yıkan enzimlere ihtiyaç duyacaklarından fazla miktarda protoplastların izole edilmesi mümkün olmaktadır. Bu amaçla çalışmada yapraklarından protoplast izole edilecek bitkiler iki gün karanlık koşullarda bekletilmiştir.

Domates yapraklarından protoplast izolasyonunda, TAN ve ark. (1987a) %0.6 (w/v) Cellulysin R-10 ve %0.1 (w/v) Macerace R-10, NIEDZ ve ark. (1985) %2.0 (w/v) Meicelase P ve %0.1 (w/v) Macerace, SAKOMOTO ve TAGUCHI (1991) %1.0 (w/v) Cellulase Onozuka R-10, %0.5 (w/v) Macerozyme ve %0.1 Pectolyase Y-23 ve TABEIZADEH ve ark. (1984) ise %0.3 cellulase Onozuka R-10 ve %0.15 Macerozyme R-10 enzim kombinasyonlarını kullanmışlardır. Yaptığımız çalışmada SAKOMOTO ve TAGUCHI (1991)'nin kullandığı enzim solüsyonu domates yapraklarından protoplast izolasyonunda iyi sonuç vermemiştir. %0.6 (w/v) Cellulase R-10 ve %0.2 (w/v) Macerozyme R-10 enzim kombinasyonu ise domates yapraklarından protoplast izolasyonunda kullanılan diğer enzim solüsyonlarına göre daha iyi sonuç vermiştir.

Domates yapraklarından protoplast izolasyonunda farklı araştırmacılar tarafından kullanılan farklı enzim kombinasyonlarının iyi sonuç vermesi, bu amaç için kullandıkları bitkinin çeşitine ve yetiştirme koşullarına bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.

Domates yapraklarından protoplast izolasyonunda, yaprakların enzimle inkübasyonu sırasında petri kaplarının sabit bir yerde veya bir çalkalayıcı üzerinde çalkalanmasının etkili olduğu bilinmektedir. Yaprakların enzimle inkübasyonu esnasında petri kapları sabit bir yerde durduğunda 18 saatte (ZAPATA ve ark., 1981), 45 rpm'de çalışan çalkalayıcılar üzerinde 12-14 saatte (NIEDZ ve ark., 1985) ve 60 rpm'de çalışan çalkalayıcılar üzerinde 4-6 saatte (SHAHIN, 1985) protoplast izolasyonunun gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Bizim yaptığımız çalışmada 45 rpm'de çalışan çalkalayıcılar üzerinde 6-7 saatte protoplastlar izole olurken, 25 rpm'de çalışan çalkalayıcılar üzerinde 14-16 saatte protoplastların izole olduğu

saptanmıştır. Yalnız yüksek devirde çalışan çalkalayıcılar üzerinde izole olan protoplastlar petrinin kenarına veya henüz tam olarak parçalanmamış yaprak dokularına çarparak parçalanmakta ve protoplast verimliliği düşmektedir. Bundan dolayı düşük devirde çalışan çalkalayıcılar üzerinde protoplast izolasyonu uzun zaman almasına rağmen tercih edilmiştir.

In vitro 'da modifiye edilmiş MS ortamında geliştirilen 3-4 haftalık bitkilerin yaprakları DES enzim solüsyonu içinde $28\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de, karanlıkta ve 25 rpm'de çalışan çalkalayıcılar üzerinde 14-16 saat inkübasyonundan sonra yaklaşık olarak 1 g yapraktan $6-7\times 10^6$ protoplast izole edilmiştir. Diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda 1 g yapraktan, NIEDZ ve ark. (1985) 1×10^6 , SHAHIN (1985) farklı domates çeşitlerine göre 1.2×10^6 ile 6.6×10^6 protoplast arasında ve TAN ve ark. (1987a) ise 1.7×10^5 ile 2.1×10^5 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada diğer araştırmacılara göre 1 g yapraktan izole edilen protoplast sayısının daha fazla olmasının nedeni kullanılan domates çeşitinin farklı olmasının yanı sıra, protoplast izolasyonunda kullanılan bitkinin aseptik koşullarda yetiştirilmesinin büyük bir etkisi olduğu düşünülmektedir.

Protoplast kültürü çalışmalarında en önemli etkenlerden biri de protoplast kültürü ortamlarıdır. Domates protoplastlarını kültüre alma çalışmalarında ZAPATA ve ark. (1981) amonyum nitrat (NH_4NO_3) içermeyen MS ortamında protoplastların bölünerek çoğaldığını bildirmiştir. Fakat ortamda yeterli miktarda vitamin ve karbon kaynakları olmadığı için protoplasttan bitkiye geçememişlerdir. Domates protoplast kültüründe TM-2 ortamını SHAHIN (1985), modifiye edilmiş 8E ortamını NIEDZ ve ark. (1985), Lycopersicon Culture Medium (LCM) ortamını TAN ve ark. (1987a)

kullanarak protoplasttan bitkiye geçebilmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada MS-N ve modifiye edilmiş TM-2 ortamı kullanılmıştır. MS-N ortamında protoplastlar bölünerek çoğalmamış ve modifiye edilmiş TM-2 ortamında protoplastlar bölünerek mikrokallus oluşturmuştur. Yapılan bu çalışma ile elde edilen sonuçlarda domates yaprak protoplastlarının bölünüp çoğalabilmesinde vitamin çeşitliliği ve miktarlarının etkili olduğu saptanmıştır.

Domates yaprak protoplastlarını kültüre alırken protoplastlar 0.5×10^5 'den 4.0×10^5 protoplast/ml yoğunlukları arasında ayarlanarak kültüre alınmıştır. Domates yaprak protoplastlarının bölünerek mikrokallus oluşturması için en uygun yoğunluğun 1.0×10^5 protoplast/ml olduğu bulunmuştur.

Domates yaprak protoplastları 60X15 mm'lik petri kaplarında 2 ml kültür ortamı ile kültüre alındığından ortam kısa sürede kurumaktadır. Ayrıca domates protoplastlarının ilk bölünmesinde oksinlere gerek duyulmakta ancak bölünmeden sonraki aşamalarda bu oksinler hücrelerin kahverengileşerek ölmesine neden olmaktadır (NIEDZ ve ark., 1985; TAN ve ark., 1987a). Ortamın kurumasını ölemek ve oksin konsantrasyonunu düşürmek için 3 günde bir 0.5 ml sıvı TMD ortamı ile sulandırılmıştır.

Modifiye edilmiş TM-2 ortamında gelişen mikrokallusların gelişimini teşvik etmek için TM-3 ortamına aktarılmıştır. TM-3 ortamında mikrokalluslar 2-3 haftada çok hızlı büyüyerek 1-2 mm çapında mikrokalluslar oluşturmuşlardır. Mikrokalluslar kültüre alındıktan 3 hafta sonra büyümesi yavaşlamıştır. Daha sonra kallusların gelişimini teşvik etmek amacıyla farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda GA_3 ve Zeatin içeren TM-4 ortamına aktarılmıştır.

Bu konuda çalışan diğ er bazı araştışıcılar domates ve yakın akraba türlerde protoplast izolasyonu ve kültürü aşamalarının zor olmasının protoplasttan bitkiye geçişi sınırladığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da domates protoplast izolasyonu ve kültürü başarıyla gerçekleştirmiş olup, proto kalluslar elde edilmiş ancak sürenin yeterli olmaması nedeniyle elde edilen kalluslardan bitki regenerasyonu gerçekleştirilememiştir. Daha sonraki araştışmalarda bu kalluslardan bitki regenerasyonu üzerinde çalışmalar yapılarak protoplasttan bitkiye geçiş süreci tamamlanmış olacaktır. Domateste protoplast-bitki sisteminin kurulmasıyla yabancı *Lycopersicon* türlerinde bulunan tarımsal açıdan önemli sitoplazmik ve nüklear özelliklerin protoplast fuzyonu ile kültür domateslerine aktarımı mümkün olacaktır. Ayrıca kurulan bu sistem sayesinde domates protoplastlarına genlerin aktarımı (DNA-uptake) içinde önkoşul yaratılmış olmaktadır.

ÖZET

Bütün dünyada olduğu gibi, ülkemizde de önemli kültür bitkileri arasında yer alan domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) birçok fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenlerinden önemli ölçüde zarar görmektedir. Hastalık etmenlerine karşı en etkili mücadele yöntemi hastalıklara dayanıklı domates çeşitleri yetiştiriciliğinin yapılmasıdır. Bu özelliklere sahip domates çeşitleri geliştirmek için çeşitli hastalıklara dayanıklılık karakterleri yabani domates çeşitlerinde bulunmasına karşın, kültürü yapılan domates çeşitleri ile yabanileri arasında melezlemeler yapmak klasik melezlemede karşılaşılan sorunlar nedeniyle mümkün olamamaktadır. Son yıllarda bu sorunun somatik hibridizasyon ile çözüm bulacağı ileri sürülmektedir. Ancak bu amaca ulaşmak için aralarında somatik hibridizasyonun yapılması öngörülen her partner için protoplasttan bitkiye geçiş sürecinin deneysel araştırmalarla gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda yapılan bu çalışma ile önce Creon domates çeşitinde protoplast izolasyonu ve kültürü çalışmaları yapılmıştır.

Bunun için *in vitro* sürgün ucu kültürü ile modifiye edilmiş MS ortamında geliştirilen 3-4 haftalık domates bitkilerinin tam gelişmiş yaprakları protoplast izolasyonunda kullanılmıştır. Protoplast izolasyonunda iki farklı enzim çözeltisi kullanılmış, en iyi sonucu %0.2 (w/v) Macerozyme R-10, %0.6 (w/v) Cellulase Onozuka R-10 ve CPW9M içeren enzim solüsyonunda (DES) elde edilmiştir. 6 ml enzim solüsyonu içerisinde 250-300 mg yaprak olacak şekilde, 14-16 saat 25 rpm'de çalışan çalkalayıcılar üzerinde $28\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta inkübe edilmiştir. 1 gr yapraktan bitkinin fizyolojik durumuna bağlı olarak $6-7\times 10^6$ protoplast izole

edilmiştir. İzole edilen protoplastlar farklı yoğunluklarda katı ve sıvı MS-N ve modifiye edilmiş TM-2 ortamında kültüre alınmışlar ve MS-N ortamında kültüre alınan protoplastlarda bölünme gözlenmemiştir. Sıvı modifiye edilmiş TM-2 ortamında ise protoplastlar bölünme göstermiş fakat mikrokallus oluşumu gözlenmemiştir. En fazla protoplast bölünmesi ve %7.9 kaplama etkiliği ile 1.0×10^5 protoplast/ml yoğunlukta katı modifiye edilmiş TM-2 ortamında gözlenmiştir. Katı modifiye edilmiş TM-2 ortamında kültüre alınan protoplastlardan gelişen mikrokallusların gelişimini hızlandırmak için sıvı TM-3 ortamında kültüre alınmışlardır.

Farklı oranlarda GA_3 ve Zeatin içeren TM-4 ortamında kültüre alınan mikrokalluslardan en fazla kallus oluşumu 29.77 mg ile 0.5 mg/l GA_3 ve 0.5 mg/l Zeatin içeren kültür ortamında gözlenmiştir. Hiçbir hormon içermeyen TM-4 ortamında çok az kallus gelişimi gözlenmiştir.

SUMMARY

Tomato, one of the most important horticultural crops in Turkey as in the World, is effected by various fungal, bacterial and virus diseases. Disease resistant improved tomato cultivar is the most effective control method. Although wild tomato species have various disease resistance characteristics to improve new tomato species, classical hybridization methods could not be carried out between cultured tomato cultivars and wild species, because of various known hybridization problems. Recently, it was suggested that this problems could be solved by somatic hybridization. However this aim could only be obtained by empirical studies and somatic hybridization of each partner having to be made as plant developed from protoplast. For that purpose, initially; protoplast isolation and culture studies were done in Creon tomato species.

In other to that intact leaves of 3-4 old week tomato plants, grown in modified MS medium with shoot tips culture in vitro, used in protoplast isolation. In the protoplast isolation two different enzyme solutions were used, the best results was achieved with the enzyme solution (DES) containing 0.2% Macerozyme R-10, 0.6% Cellulase Onozuka R-10 and CPW9M. 6 ml enzyme solution containing 250-300 mg leaves was incubated for 14-16 hours at $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ on shaker at 25 rpm in the darkness. Dependent upon the physiological condition of the plant $6-7 \times 10^6$ protoplast were isolated from 1 g leaves tissue. Isolated protoplast in different concentrations were cultured in solid and liquid MS-N and modified TM-2 medium, no division was observed with the protoplast cultured in MS-N medium. In the medium of liquid TM-2 the protoplasts were divided but no microcalli was observed. The

highest yields in protoplast division and plating efficiency (7.9%) protoplast were achieved with the protoplast concentration of 1.0×10^5 in solid TM-2 medium. In order to speed up the development of microcallus which were obtained from the protoplast cultured in solid TM-2 they were cultured in liquid TM-3 medium.

In the microcallus cultured in TM-4 medium containing GA_3 and Zeatin in different ration the highest callus development (29.7 mg) was achieved with the culture medium of 0.5 mg/l GA_3 and 0.5 mg/l Zeatin. Very low callus development was observed with the TM-4 medium without hormone.



EKLER

Ek 1. Domates sürgün ucu kültürde kullanılan ortamlar

	Ortamlar mg/l		
	MS	Modifiye edilmiş MS	TM-1
Makro Elementler			
KH_2PO_4	170	170	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	440	150
KNO_3	1900	1900	2530
NH_4NO_3	1650	1650	320
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	134
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	250
Mikro Elementler			
KI	0.83	0.83	0.83
H_3BO_3	6.20	6.20	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30	22.30	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60	8.60	8.60
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.80	27.80	13.90
Na_2EDTA	37.30	37.30	18.50
Vitaminler			
Myo-inositol	100.0	100.0	100.0
Nikotinik asit	0.5	5.0	2.5
Piridoksin HCl	0.5	0.5	1.0
Thiamin HCl	0.1	0.5	10.0
Glisin	2.0	2.0	0.5

Folik asit	-	0.5	0.5
Biotin	-	0.05	0.05
D-Ca- pantothenate	-	-	0.5
Choline chloride	-	-	0.1
Kasein hidrolisat	-	-	50.0
L-Cysteine	-	-	1.0
Malik asit	-	-	10.0
Askorbik asit	-	-	0.5
Riboflavin	-	-	0.25
Diğerleri			
Sakkaroz	%2.0	%2.0	%2.0
Agar	7.0g	7.0g	7.0g
pH	5.8	5.8	5.8

Ek 2. Protoplast izolasyonundan önce domates yapraklarını plazmoliz yapmak amacıyla kullanılan CPW tuz solüsyonundaki kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	Miktarı (mg/l)
KH_2PO_4	27.2
KNO_3	101.0
CaCl_2	1480.0
MgSO_4	246.0
KI	0.16
CuSO_4	0.025
pH	5.8

Ek 3. Domates yapraklarından protoplast izolasyonunda kullanılan enzim solüsyonları

Kimyasallar	ST	DES*
Cellulase Onozuka R-10	%1.0	%0.6
Macerozyme R-10	%0.5	%0.2
Pectolyase Y-23	%0.1	-
Mannitol	0.5 M	7.3 M
CaCl ₂ . 2H ₂ O	20 mM	-
pH	5.6	5.6

*CPW tuzlarını içermektedir

Ek 4. İzole edilen domates yaprak protoplastlarından enzim solüsyonunu uzaklaştırmak için kullanılan W5 yıkama solüsyonu

Kimyasallar	Miktarı (mM)
CaCl ₂	125
NaCl	155
KCl	5
Glikoz	5
pH	5.6

Ek 5. Domates yaprak protoplastlarını kültüre almada kullanılan ortamların içerdiği kimyasallar ve kullanılan miktarlar

	Ortamlar mg/l	
	MS-N	TM-2
Makro Elementler		
KH_2PO_4	170	170
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	440
KNO_3	1900	1500
NH_4NO_3	1650	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370
Mikro Elementler		
KI	0.83	0.83
H_3BO_3	6.20	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60	8.60
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.80	13.90
Na_2EDTA	37.30	18.50
Vitaminler		
Myo-inositol	100.0	4600.0
Nikotinik asit	5.0	2.5
Piridoksin HCl	0.5	1.0
Thiamin HCl	0.5	10.0
Glisin	2.0	0.5
Folik asit	0.5	0.5
Biotin	0.05	0.05
D-Ca- pantothenat	-	0.5

Choline chloride	-	0.1
Kasein hidrolisat	-	150.0
L-Cysteine	-	1.0
Malik asit	-	10.0
Askorbik asit	-	0.5
Adenin sülfat	-	40.0
L-Glutamine	-	100.0
Riboflavin	-	0.25

Hormonlar

NAA	1.0	1.0
BAP	0.5	0.5

Diğerleri

Mannitol	%7.0	%7.0
Sakkaroz	%1.0	%1.0
Glikoz	%0.5	%0.5
Sea-plaque agarose	%0.6	%0.6
pH	5.6	5.6

Ek 6. TMd, TM-3 ve TM-4 besi ortamlarının İçerikleri

	Ortamlar mg/l		
	TMd	TM-3	TM-4
Makro Elementler			
KH_2PO_4	170	170	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	440	150
KNO_3	1500	1500	1950
NH_4NO_3	-	-	320
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	134
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	247
Mikro Eelementler			
KI	0.83	0.83	0.83
H_3BO_3	6.20	6.20	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30	22.30	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60	8.60	8.60
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13.90	13.9	13.90
$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	18.50	18.50	18.50
Vitaminler			
Myo-inositol	4600.0	100.0	100.0
Nikotinik asit	2.5	5.0	5.0
Piridoksin HCl	1.0	0.5	0.5
Thiamin HCl	10.0	0.5	0.5
Glisin	0.5	2.5	2.5
Folik asit	0.5	0.5	0.5
Biotin	0.05	0.05	0.05
D-Ca- pantothenat	0.5	-	-

Choline chloride	0.1	0.1	0.1
Kasein hidrolisat	150.0	100.0	-
L-Cysteine	1.0	-	-
Malik asit	10.0	-	-
Askorbik asit	0.5	-	-
Adenin sülfat	40.0	40.0	-
L-Glutamine	100.0	100.0	-
Riboflavin	0.25	-	-
Hormonlar			
NAA	0.1	-	-
BAP	0.5	0.5	-
Zeatin	-	-	1.0
2,4-D	-	0.2	-
GA ₃	-	-	0.2
Diğerleri			
Sakkaroz	%6.8	50.0 g	30.0 g
Agar	-	-	7.0 g
pH	5.6	5.8	5.8

KAYNAKLAR

- ALEXANDER, L.J.; (1971). Host-pathogen dynamics of tobacco mosaic virus (TMV) on tomato. *Phytopathol.* 61, 611-617.
- BONNEMA, A.B., MELZER, J.M., O'CONNELL, M.A.; (1991). Tomato cybrids with mitochondrial DNA from *Lycopersicon pennelli*. *Theor Appl Genet.* 81, 339-348.
- CASSELS, A.C., BARLASS, M.; (1976). Environmentally induced changes in the walls of tomato leaves in relation to cell and protoplast release. *Physiol Plant.* 37, 239-246.
- DERKS, F.H.M., WIJBRANDI, J., KOORNNEEF, M., COLIJN-HOOYMANS, C.M.; (1991). Organelle analysis of symmetric and asymmetric hybrids between *Lycopersicon peruvianum* and *Lycopersicon esculentum*. *Theor Appl Genet.* 81, 199-204.
- FAO; (1992). Yearbook-Production. Vol 46. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FREARSON, E.M., POWER, J.B., COCKING, E.C.; (1973). The isolation and regeneration of petunia leaf protoplasts. *Dev Biol.* 33, 130-137.

- GALUN, E., AVIV, D.; (1983). Cytoplasmic hybridization: genetics and breeding applications. (D.A. EVANS, W.R. SHARP, P.V. AMMIRATO, Y. YAMADA. editörler). Handbook of plant cell culture. Vol 1. Mac Milan, New York. pp. 358-392.
- GAVRILENKO, T.A., BARBAKAR, N.I., PAVLOV, A.V.; (1992). Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* and non-tuberosus *Solanum* species of the *Etuberosa* series. Plant Science. 86, 203-214.
- GRADZIEL, T.M., ROBINSON, R.W.; (1989a). Breakdown of self-incompatibility during pistil development in *Lycopersicon peruvianum* by modified bud pollination. Sex Plant Repord. 2, 38-42.
- GRADZIEL, T.M., ROBINSON, R.W.; (1989b). *Solanum lycopersicoides* gene introgression to tomato, *Lycopersicon esculentum* , through the systematic avoidance and suppression of breeding barriers. Sex Plant Repord. 2, 43-52.
- GURI, A., DUNBAR, L.J., SINK, K.C.; (1991). Somatic hybridization between selection *Lycopersicon* and *Solanum* species. Plant Cell Reports. 10, 76-80.
- HANDLEY, L.W., NICKELS, R.L., CAMERON, M.W., MOORE, P.P., SINK, K.C.; (1986). Somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum lycopersicoides* . Theor Appl Genet. 71, 691-697.

- HASSANPOUR-ESTAHBANATI, A., DEMARLY, Y.; (1985). Plant regeneration from protoplasts of *Solanum pennellii* : effect of photoperiod applied to donor plants. J. Plant Physiol. 121, 171-174.
- HOLLE, M., RICK, C.M., HUNT, D.G.; (1978). Catalogue of green-fruited *Lycopersicon* species and *Solanum pennellii* found in Watersheds of Peru. Rep Tom Gen Coop. 28, 50-78.
- JAIN, S.M., SHAHIN, E.A., SUN, S.; (1988). Interspecific protoplast fusion for the transfer of atrazine resistance from *Solanum nigrum* to tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Plant Cell and Organ Culture. 12, 189-192.
- KUMASHIRO, T., ASAHI, T., NAKAKIDO, F.; (1989). Transfer of cytoplasmic factors by asymmetric fusion from a cross-incompatible species, *Nicotiana repanda* to *N. tabacum* and characterization of cytoplasmic genomes. Plant Sci. 61, 137-144.
- LEFRANÇOIS, C., CHUPEAU, Y.; (1993). Standard conditions for plant regeneration from protoplasts of several wild *Lycopersicon* species. J. Plant Physiol. (in press)
- MENCZEL, L., NAGY, F., KISS, Z.R., MALIGA, P.; (1981). Streptomycin resistance and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana* . Correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. Theor Appl Genet. 59, 191-195.

- MONTAGNO, T.J., JOURDAN, P.S., BERRY, S.Z.; (1991). Plant regeneration from leaf protoplasts of *Lycopersicon hirsutum* f. *hirsutum*. Plant Cell Reports. 9, 680-683.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.; (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15, 473-497.
- NIEDZ, R.P., RUTTER, S.M., HANDLEY, L.W., SINK, K.C.; (1985). Plant regeneration from leaf protoplasts of six tomato cultivars. Plant science. 39, 199-204.
- NITSCH, J.B., NITSCH, C.; (1969). Haploid plants from pollen grains. Science. 163, 85-87.
- O'CONNELL, M.A., HANSON, M.R.; (1985). Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon pennellii*. Theor Appl Genet. 70, 1-12.
- O'CONNELL, M.A., HANSON, M.R.; (1986). Regeneration of somatic hybrid plants formed between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum rickii*. Theor Appl Genet. 72, 59-65.
- O'CONNELL, M.A., HANSON, M.R.; (1987). Regeneration of somatic hybrid plants formed between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. Theor Appl Genet. 75, 83-89.

- PHILOUZE, J.; (1986). Evolution et situation varietale actuelle chez la tomato. (INRA. editör). A.I.C.P.C/A.C.F.E.V./B.R.G.-La diversite des plantes legumieres. pp. 33-42.
- RATUSHNYAK, Y.I., LATYPOV, S.A., SAMOYLOV, A.M., PIVEN, N.M., GLEBA, Y.Y.; (1991). Introgressive hybridization of tomatoes by 'gamma-fusion' of *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dum. protoplasts. Plant Science. 73, 65-78.
- RICK, C.M.; (1982). The potential of exotic germ plasm for tomato improvement. (I.K. VASIL, W.R. SCOWCROFT, K.J. FREY, editörler). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press. New York. pp. 1-28.
- RICK, C.M.; (1983). Tomato (*Lycopersicon*). (S.D. TANKSLEY, T.J. ORTON. editörler). Isozymes in plant genetics and breeding. Part B. Elsevier. Amsterdam. pp.147-165.
- SAKOMOTO, K., TAGUCHI T.; (1991). Regeneration of intergeneric somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum muricatum* . Theor Appl Genet. 81, 509-513.
- SAN, L.H., VEDEL, F., SIHACHAKR, D., REMY, R.; (1990). Morphological and molecular characterization of fertile tetraploid somatic hybrids produced by protoplast electrofusion and PEG-induced fusion between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* Mill. Mol Gen Genet. 221, 17-26.

- SHAHIN, E.A.; (1985). Totipotansy of tomato protoplasts. Theor Appl Genet. 69, 235-240.
- SMITH, S.E.; (1989). Biparental inheritance of organelles and its implications in crop improvement. Plant Breed Rev. 6, 361-393
- SOTIROVA, V., RODEVA, R.; (1990). Sources of resistance in tomato to *Septoria lycopersici* Speg. Arch Phytopathol Pflanzenschutz. 5, 469-471.
- STEVENS, M.A., RICK, C. M.; (1985). Genetic and breeding. (J.G. ATHERTON, J. RUDICH, editörler). The Tomato Crop. Academic Press. New York. pp. 35-109.
- TABAEIZADEH, Z., BUNISSET-BERGOUNIOUX, C., PERENNES, C.; (1984). Enviromental growth conditions of protoplast source plants: effect on subsequent protoplast division in two tomato species. Physiol. Veg. 22(2), 223-229.
- TAN, M.M.C., RIETVELD, E.M., MARREWIJK, G.A.M.V., KOOL, A.J.; (1987a). Regeneration of leaf mesophyll protoplasts of tomato cultivars (*L. esculentum*): factors important for efficient protoplast culture and plant regeneration. Plant cell Reports. 6,172-175.

- TAN, M.M.C., COLIJN-HOOYMANS, C.M., LINDHOUT, W.H., KOOL, A.J.; (1987b). A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato. *Theor Appl Genet* 75, 105-108.
- TAN, M.M.C., BOERRIGTER, H.S., KOOL, A.J.; (1987c). A rapid procedure for plant regeneration from protoplast isolated from suspension cultures and leaf mesophyll cells of three *Solanum* species and *Lycopersicon pennelli*. *Plant Sci. Lett.* 49:63-72.
- TEWES, A., GLUND, K., WALTHER, R., REINBOTHE, H.; (1984). High yield isolation and rapid recovery of protoplast from suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Z. Pflanzenphysiol.* 113, 141-150.
- THANH, M.D., MEDGYESY, P.; (1989). Limited chloroplast gene transfer via recombination overcomes plastome-genome incompatibility between *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum*. *Plant mol Biol.* 12:87-93.
- THOMAS, B.R., PRATT, D.; (1981). Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo callus. *Theor Appl Genet.* 59, 215-219.
- WIJBRANDI, J., VOS, J.G.M., KOORNNEEF, M.; (1988). Transfer of regeneration capacity from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum* by protoplast fusion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 12, 193-196.

- WIJBRANDI, J., ZABEL, P., KOORNNEEF, M.; (1990a). Restriction fragment length polymorphism analysis of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and irradiated *L. peruvianum*: Evidence for limited donor genome elimination and extensive chromosome rearrangements. Mol Gen Genet. 222, 270-277.
- WIJBRANDI, J., CAPELLE, W.V., HANHART, C.J., MARTINET-SCHURINGA, E.P.V.L., KOORNNEEF, M.; (1990b). Selection and characterization of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon peruvianum*. Plant Science. 70, 197-208.
- WOLTERS, A.M.A., SCHOENMAKERS, H.C.H., MEULEN-MUISERS, J.J.M.V.D., KNAAP, E.V.D., DERKS, F.H.M., KOORNNEEF, M., ZELCER, A.; (1991). Limited DNA elimination from the irradiated potato parent in fusion products of albino *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum*. Theor Appl Genet. 83, 225-232.
- ZAPATA, F.J., SINK, K.C., COCKING, E.C.; (1981). Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of three *Lycopersicon* species: *L. esculentum*, c.v. walter, *L. pimpinillifolium* and *L. hirsutum*, f. *glabratum*. Plant Science Letters. 23, 41-46.

ZAPATA, F.J., EVANS, P.K., POWER, J.B., COCKING, E.C.; (1977). The effect of temperature on the division of leaf protoplast of *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon peruvianum* . Plant Sci Lett. 8, 119-124.



TEŞEKKÜR

Ülkemizde son yıllarda girmeye başlayan Protopast İzolasyonu ve Kültürü Teknikleri ile ilgili bu tezi bana veren ve bu tezin yürütülmesinde bilgi, deneyim ve her türlü yardımları ile bana sürekli desteğini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. N. Kemal KOÇ'a ve tezim süresince çok yönlü yardımları için Doktora öğrencisi Mukadder KAYIM'a ve tez süresince bana yardımcı olan tüm arkadaşlara teşekkür ederim.



ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Ayvalık (Yumurtalık/Adana)'da doğdum. Orta öğrenimini Yumurtalık Lisesi'nde (Yumurtalık/Adana) tamamladım. 1986 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünü kazandım. 1991 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden Ziraat Mühendisi olarak mezun oldum. Aynı yıl adı geçen üniversitede Fitopatoloji Ana Bilim Dalı, Doku Kültürü laboratuvarında master yapmaya başladım.

