



ARAŞTIRMA MAKALESİ/RESEARCH ARTICLE

PROTOPLAST FÜZYONU İLE *Origanum onites* ve *Origanum majorana* ARASINDA SOMATİK HİBRİTLERİN ELDESİ VE BUNLARIN MOLEKÜLER ANALİZLE ONAYLANMASI¹ Banu Aytül EKMEKÇİ^{2,3} Emel SÖZEN²,

ÖZ

Daha fazla kekik yağı üretebileceğimiz yeni bir kekik türü elde etmek için *Origanum onites* (bilyalı kekik) ve *Origanum majorana* (beyaz kekik) türleri arasında protoplast füzyonu yapılmıştır. Protoplastların izolasyonunda CPW + mannitol ve CPW + sukroz karışımı, oluşan protoplastları füzyon ile karıştırmak için CPW + enzim çözeltisi (% 20 selüloz, % 30 driselaz, % 15 pektinaz, % 10 polietilen - glikol (PEG)) kullanılarak başarı sağlanmıştır. Bir ay sonra kallus hücreleri oluşmuştur. Sibritleme hücre grubunun gerçek hibrit olup olmadığını saptamak için iki kekik bitkisinden ve sibritleme hücre grubundan DNA izole edilmiş ve RAPD - PZR analizi yapılmıştır. İki türe ait spesifik DNA bantları sibritleme hücre grubunda tespit edilmiştir. Bu sonuç, protoplast füzyonu sonrasında oluşan sibritleme hücrelerinin hibrit olduğunu kanıtlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bitki doku kültürü, Protoplast füzyonu, RAPD - PZR analizi, *Origanum onites*, *Origanum majorana*.

OBTAINING SOMATIC HYBRIDS BETWEEN *Origanum onites* and *Origanum majorana* by USING PROTOPLAST FUSION AND THEIR APPROVAL WITH MOLECULAR ANALYSIS

ABSTRACT

In order to obtain a new thyme cultivars from which thyme oil can be produced more excessively, protoplast fusion was performed between *Origanum onites* (marble thyme) and *Origanum majorana* (white thyme) species. CPW + mannitol and CPW + sucrose mix were used successively for protoplast fusion, and CPW + enzyme solution (20 % cellulase, 30 % driselase, 15 % pectinase, % 10 (PEG)) was used successively to mix these protoplasts for fusion. Callus cells formed after one month growth. In order to determine whether cybrid cell group is true hybrid, DNA was isolated from two thyme plants and cybrid cell group and RAPD-PCR analysis was undertaken. Specific DNA bands belonging to two species were detected in cybrid cell group. This result proves hybridity of cybrids after protoplast fusion.

Key words: Plant Tissue Culture, Protoplast Fusion, RAPD - PCR analysis, *Origanum onite*, *Origanum majorana*.

¹ Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu desteği ile (Proje no: 11049) gerçekleştirilmiştir.

² Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir

³ E-Posta: baaslana@anadolu.edu.tr

1. GİRİŞ

Kekik ülkemiz ekonomisine önemli katkı sağlayan, gıdalarımızı çeşnilendiren ve sağlığımız için önemli özelliklere sahip bir bitkidir. Kurutulmuş yaprak, çiçek ve tomurcuklarının su buharı ile damıtılması sonucu % 2 ile % 8 oranında elde edilen uçucu yağ, kekiğin kendine has kokusunu taşır ve yakıcı tatdadır. Karvakrol ve timol gibi monoterenik fenollerce zengin olan bu yağ çok güçlü mikrop öldürücü özelliğe sahip olduğundan bakteri ve mantar enfeksiyonlarında etkilidir. Kekik yağının yara iyileştirici etkisinin belirlenmesi için gerçekleştirilen bir çalışma kapsamında NIH 3T3 fibroblast hücreleri ile yapılan deneyler, 1 ve 10 mg/ml karvakrolün fibroblast hücrelerinde çoğalmayı arttırdığını, 100 mg/ml karvakrolün ise, hücreleri zehirleyerek tümünü öldürdüğünü göstermiştir (Zeytinoğlu vd., 1998). Karvakrolün akciğer kanserinde güçlü antikanserijen etkiye sahip olduğu, sıçanlarda yapılan deneylerle gösterilmişse de bu etki henüz klinik deneylerle kanıtlanmış değildir. Bunun yanı sıra karvakrol ve karvakrolce zengin kekik yağlarının gıdaların saklanmasıdaki rolleri çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Zeytinoğlu vd., 1998). Gıdaların bozulmasına yol açan bakteri ve küf mantarları üzerinde güçlü antimikrobiyal etkilere sahip olan bu maddelerin, aflatoxin üreten *Aspergillus* türü mantarlara karşı da etkili oldukları gösterilmiştir. TBAM (Anadolu Üniversitesi, Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi) de yapılan çalışmalar, karvakrolün ayrıca bazı böceklerle karşı insektisit etki, bitki büyümesini önleyici etki, antihistaminik ve antioksidan etkisi olduğunu da ortaya çıkarmıştır (Başer, 2001). Böyle faydalı bitki türleri ile çalışılmaya karar verilmiştir.

Protoplast teknolojisi ile en küçük canlı üniteye ulaşabilmekte, hücre füzyonu, seleksiyonu ve klonlanması ile genetik transformasyona imkan sağlanmaktadır. 1971 yılında Melcher ve ark polietilen-glikol (PEG) denilen etkin bir birleştiricinin kullanılması sonucu ilk somatik hibrit ve sibritle bitkiler elde etmişlerdir. Daha sonra elektrik uyarıları ile protoplastların füzyonunu başarmışlardır. Bunu protoplastların elektroporasyonu sonucu gen transferi yoluyla transgenik bitkilerin elde edilmesi izlemiştir (Babaoğlu ve Özcan, 2001). Bu nedenlerden dolayı protoplast füzyonu yapmaya karar verilmiştir.

Bu çalışma kapsamında %1-5 oranında uçucu yağ ve %50-82 oranında karvakrol içeriği olan *Origanum onites* türü ile, "Beyaz kekik" adıyla bilinen % 5-8 oranında uçucu yağ ve %32-84 oranında karvakrol içeren *Origanum majorana* türü (Başer, 2001) protoplast füzyon tekniği ile birleştirmek, protoplast füzyon tekniği ile elde edilen somatik bitkinin random amplified polimorfik DNA (RAPD) markörleri kullanılarak yapılacak PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizleri ile füzyonun başarıya ulaştığını ve yeni elde edilen somatik bitkinin her iki bitkiye ait özellikleri taşıdığı saptamak amacımız olmuştur.

Bu birleştirme sonucunda daha fazla kekik yağı elde edebileceğimiz yeni bir kekik türü oluşturmak düşüncemizdir. Çalışmamız bu konuda yapılan ilk çalışmadır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

TBAM vasıtası ile İzmir'den getirtilen *Origanum onites* "Bilyalı kekik" (Şekil 1) ve *Origanum majorana* "Beyaz kekik" (Şekil 2) çalışma materyalimizdir. Bu bitkiler kampüsümüzdeki serada büyütülmüş, sonra kullanılmıştır. Materyallerimizin cins (genus) bazında genel özellikleri aşağıda kısaca verilmiştir.



Şekil.1. *Origanum onites* 'in genel görüntüsü. (Skala:1 cm)



Şekil.2. *Origanum majorana* 'nın genel görüntüsü. (Skala:1 cm)

Origanum L.:Lamiaceae (Labiatae) familyasındadır. Uçucu yağ içeren (timol) yarı çalımsı veya otsu çok yıllıkdır. Yapraklar basit, brakteler kiremitvari olarak üstüste dizilmiş, korolla mor, pembe veya beyaz renkte, 2 dudaklı, stamenler 4, alttaki uzun, Akdeniz bölgesinde yayılış gösterir ve yaklaşık 30 türü vardır. Bunlardan *Origanum onites* (İzmir kekiği, bilyalı kekik) ve *Origanum majorana* (bilyalı kekik) kekik yağı açısından zengindirler (Seçmen vd., 1992).

2.2 Metod

2.2.1. Protoplast İzolasyonu ve Protoplast Füzyonu

Çok hücreli dokularda bitki hücreleri birbirlerine hücreler arası bağlarla bağlanırlar. Bir hücrenin duvarı uzaklaştırıldığında geriye kalan kısmına protoplast denir. Protoplastlar izotonik ortamlarda canlılığını sürdürüp, yeni duvar oluşturup, mitozla bölünebilir, yeni hücre grupları (mikrokallus) ve daha sonra da yeni bitkiler oluşturabilirler. İzole edilen protoplastlar yüksek bitkilerde elde edilebilen yegane tekli hücre kaynağını oluştururlar. Başlangıçta protoplastlar mekanik yollarla izole edilmiş fakat denemelerin tekrarlanamaması ve düşük protoplast verimi, bir dokunun hücrelerini birbirinden ayıran ve hücre duvarını eriten enzimlerin keşfedilmesini ve kullanılmasını sağlamıştır (Babaoğlu ve Özcan., 2001). Bu çalışmada Reinert ve Yeoman (1982) 'de kullandığı enzimler kullanılmıştır (Reinert ve Yeoman, 1982).

Explant kaynağı olarak, sürekli olarak homojen ve stabil protoplast verdikleri, renksel olarak ayırında çok avantajlı oldukları için 2 bitki türümüzün yaprak mezofil hücreleri kullanılmıştır (Babaoğlu ve Özcan, 2001).

Her iki türün yapraklarından protoplastların daha kolay ayrılmasını sağlamak için pens ve bistüri yardımı ile üst epidermisleri uzaklaştırılmıştır. Böylece mezofil dokunun CPW karışımı (Tablo 1) ile daha kolay temas etmesi sağlanmıştır. Steril edilen yaprakların kalın epidermis kısımları steril kabin içinde pens ve bistüriler yardımı ile atılmıştır.

Tablo 1. CPW Besin Ortamı İçeriği

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

Her iki türün kalan epidermissiz kısımları 1cm²'lik parçalara ayrılmıştır. Steril koşullarda 100 ml CPW karışımı + % 9 Mannitol + % 10 sukroz olan ayrı ayrı petri kapları içine bu parçalar yerleştirilmiştir (Reinert ve Yeoman, 1982). Daha sonra 16 saat, 20-22°C karanlık içinde inkübe edilmiştir. Bu işlemlerden sonra petri kapları 15 °C'lik açıda tutulmuştur. 60 dakika sonra protoplastlar petrinin altında dibe çökmüştür.

Origanum onites türünü içeren enzim-protoplast karışımları pasteur pipeti kullanılarak 15ml' lik kapak-

lı 6 tane santrifüj tüpünün herbirine 5 ml konulmuş, üzerine 100 ml CPW karışımı + % 9 Mannitol + % 10 sukroz karışımından da petrilerin herbirine 5ml konulmuş, 10 dk 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrar edilmiştir. Aynı işlemler *Origanum majorana* türü için de uygulanarak her iki tür için protoplast izolasyonu yapılmıştır.

İki türün füzyonunu yapmak için 5 ml *Origanum onites*'in enzim protoplast karışımından alınıp boş kapaklı santrifüj tüpüne konulmuştur. Üzerine 5 ml *Origanum majorana*'nın enzim protoplast karışımından konulmuştur. Bunların üzerine 5 ml % 20 selülaz, %30 driselaz, %15 pektinaz, %10 PEG konulmuştur. (Tablo 2) 10 dk 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir (Dods vd., 1993; Gixon vd., 1994). Santrifüjleme 3 kez tekrarlanmıştır .

Tablo 2. M_{prot} Besin Ortamı İçeriği

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

Bir gün önceden hazırlanmış katı MS (Skoog., 1962) + (IAA+ Kin + 2,4 D + NAA) besiyeri (Tablo 3) üzerine füzyonu yapılmış olan (protoplast + enzim karışımı) sıvıdan her petriye 5 ml dökülmüştür. 24 saat karanlıkta, sonra 2 gün boyunca 500 lüx'lük, sonrasında ise 2000 lüx'lük aydınlatma ile iklim dolabında gelişmeleri beklenmiştir (Dods vd., 1985; Gixon vd., 1994).

Tablo 3. (MS) Besin Ortamı İçeriği

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

Heterokaryonlar steril şartlar altında, alttan objektifli bir mikroskop ve mikroenjektör kullanılarak tek tek kültür besiyerine alınmış, kallus oluşturmaları beklenmiştir.

2.2.2. DNA İzolasyonu

DNA, tek bir *Origanum onites* ve *Origanum majorana* bitkisinin genç yapraklarından, ayrıca hibrit hücre yığınlarından (sibrit) Fermentas DNA ekstrasyon kiti kullanılarak üretici firma protokolüne göre elde edilmiştir. Buna göre, yaklaşık 100-500 mg taze ağırlığa sahip kekik yaprakları sıvı azot ile homojenize edildikten sonra eppendorf tübe aktararak 200 µl TE buffer ile karıştırılmıştır. Bu karışıma 400 µl ekstraksiyon buffer eklenmiş, eppendorf tüpü aşağı-yukarı istikamette birkaç kez çevrilerek solüsyonların ve homojenatın iyice karışması sağlanmıştır. Daha sonra su banyosunda 65°C'de 10-15 dk inkübe edilmiştir. Bu işlemin ardından aynı eppendorf tüpüne 600µl kloroform ilave edilerek karıştırılmış ve 5 dk 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

Eppendorf içinde meydana gelen iki fazdan üstteki sulu kısım dikkatli bir şekilde mikropipet yardımı ile yeni bir eppendorfa aktarılmıştır. Üzerine 1ml Fermentas çöktürme solusyonundan ilave edilerek oda sıcaklığında 1-2 dk bekletilmiştir. Bu karışım santrifüjde 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve dipte oluşmuş olan pellet 150 µl 10 M NaCl içinde çözdürülmüştür. DNA'nın çöktürülmesi için bu karışıma 300 µl -20°C'de saklanan % 99'lük etanol ilave edilmiş ve -20°C'de 30 dk bekletilmiştir. Daha

-20°C'de 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek DNA eppendorfun dip kısmında toplanmıştır. Oluşan DNA pelleti % 70'lik -20°C'de soğutulmuş etanol ile yıkanmıştır. DNA pelleti havada kurutularak 50-100µl steril TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) içinde çözdürülmüştür. İzole edilen DNAların miktarları agaroz jel üzerinde bant ağırlıkları bilinen standart DNA marker ile (Mass-Ruler, Fermentas) karşılaştırmak suretiyle belirlenmiştir.

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Qiagen Operon GMBH firmasından temin edilen Kit AB'nin içerdiği 10-mer (10 adet nükleotid dizisinden oluşan) primerlerden 11 tanesi *Origanum onites* ve *Origanum majorana* arasındaki DNA seviyesindeki farklılıkları tesbit edebilmek amacıyla test edilmiştir.

Bu primerlerin nükleotid dizileri Tablo 4'de verilmiştir. PCR amplifikasyonları 25µl'lik reaksiyon volümlerinde gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyon volümü 20-30 ng kalıp DNA, 0.2 mM dNTP karışımı, 10 picomol tek primer, 2 mM MgCl₂, 2.5U Taq DNA polimeraz enzimi ve enzimle beraber temin edilen tampon solüsyon (10 mM Tris-Cl, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 0.2 mg ml⁻¹ jelatin) içermektedir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan Operon RAPD 10-mer primerlerinin nükleotid dizileri.

Primer kod no.	5'-3' nükleotid dizimi
AB1	CCGTCGGTAG
AB2	GGAAACCCCT
AB3	TGGCGCACAC
AB4	GGCACGCGTT
AB7	GTAAACCGCC
AB9	GGGCGACTAC
AB11	GTGCGCAATG
AB14	AAGTGCGACC
AB16	CCCGGATGGT
AB17	TCGCATCCAG
AB20	CTTCTCGGAC

Amplifikasyon işlemi Techgene (Techne Ltd.) PCR aygıtı kullanılarak yapılmıştır. PCR aleti bu amaçla, başlangıç denatürasyon basamağı 92°C'de 5 dk'yı takiben 45 kez 92°C'de 1 dk, 37°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk siklusları ile bir kez 72°C'de 8 dk son uzatma basamağını gerçekleştirmek üzere programlanmıştır.

Amplifikasyon ürünleri yatay elektroforez kiti kullanılarak jel üzerinde ayrıştırılmıştır. Kekik bitkilerinden ve sibritlerden elde edilen DNA'lar % 0.8'lik (w/v) agaroz jellerde, PCR ürünleri ise 1.4 %'lik (w/v) agaroz jellerde mini ve midi yatay elektroforez kitleri (Thermo) kullanılarak analiz edilmiştir.

Agaroz jeller 0.5X TBE tampon solusyonu (0.445 M Tris, 0.445 M Borik asit, 0.01 M EDTA pH 8.0) ile

hazırlanmıştır. Ayrıca her agaroz jeline katılmasından önce $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ oranında etidyum bromid ilave edilmiştir. TBE solüsyonu (0.5X) elektroforez tanklarında tampon olarak kullanılmıştır. DNA ve PCR örnekleri 75V'da 1-2 saat yürütüldükten sonra UV kutusu üzerinde incelenmiştir. Etidyum bromid sayesinde görünür hale gelen DNA bantları Polaroid 665 filmleri kullanılarak UV kutusu üzerinde fotoğraflanmıştır.

3. BULGULAR

Yeni füzyonu yapılan dağılmış protoplast hücrelerinin 10X büyütme ile fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3). Bu fotoğrafların üzerinde protoplast verimi hesaplanmıştır.



Şekil 3. Dağılmış protoplast hücreleri. 10X' lik büyütme. (Skala: 1cm).

Bir hemositometrede her bir kare 0.1 mm^3 veya 10^{-4} cm^3 hacime ve 1 mm^2 alana sahiptir. $1 \text{ cm}^3=1 \text{ ml}$ olduğuna göre 1 ml 'de protoplast konsantrasyonu şu şekilde hesaplanmıştır.

Protoplast / ml = kare başına ortalama protoplast sayısı x sulandırma faktörü x 10^4

Bizim örneğimizde ortalama protoplast sayısı = 28

$28 \times 10^4 : 2.8 \times 10^5$ protoplast/ml dir.

Toplam verim ise=protoplast/ml x orijinal hacim (bu çalışmada 10ml) olarak yani;

$2.8 \times 10^5 \times 10 : 2.8 \times 10^6$ bulunmuştur.

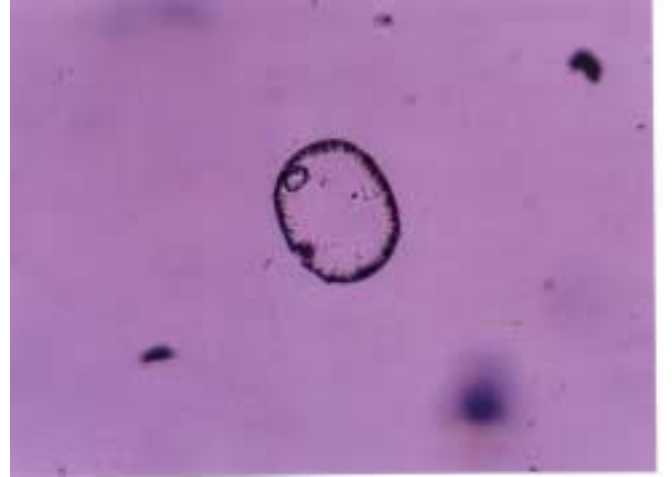
Toplam verim başlangıçtaki 1gr materyalden elde edilen protoplast sayısı olarak ifade edilmiştir.

Kültür sırasında tam yuvarlak olan protoplastların 10 X büyütme ile fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4). Mikroskopun okülerine yerleştirilen mikrometre kullanılarak mezofil hücrelerinin protoplast boyları 20-70 μm arasında bulunmuştur.



Şekil 4. Protoplast hücresi. Florasan filtresi ile ışık mikroskopunda 20X lik büyütmede çekilmiştir. (Skala: 1cm).

24 saat sonra hücreler yavaş yavaş eliptik bir hal almaya başlamıştır. Protoplast kültürü sonrası en önemli devre hücre duvarının oluşumudur, selüloz fibriller yani hücre duvarı 48 saat sonra oluşmaya başlamıştır (Şekil 5).



Şekil 5. 48 saat sonra hücre duvarı oluşmuş protoplast hücresi. Florasan filtresi ile ışık mikroskopunda 20X lik büyütmede çekilmiştir. (Skala: 1cm).

Eksik hücre duvarı rejenerasyonu sonucu, zayıf alanlarda balonlanma olmuştur. Bazı protoplastlar hücre duvarı oluşmadan ölmüştür.

Hücre duvarı oluşan hücreler 8'ci gün sonunda mitotik bölünme göstermeye başlamış (Şekil 6) ve 10'cu gün sonunda tamamen ikiye bölünmüş bir hücre oluşmuştur (Şekil 7). 12'ci günde üçe bölünmeye başlamıştır (Şekil 8). Bundan sonra bölünmeler devam etmiştir. 3 hafta sonunda hücre kolonileri görülmeye başlanmıştır (Şekil 9).



Şekil 6. 8 gün sonunda mitotik bölünmeye başlamış bir protoplast hücresi. 40X'lik büyütme ile. (Skala: 1cm).



Şekil 7. 9.'cu gün Mitotik bölünme gösteren bir protoplast hücresi 20X'lik büyütme ile. (Skala: 1cm).

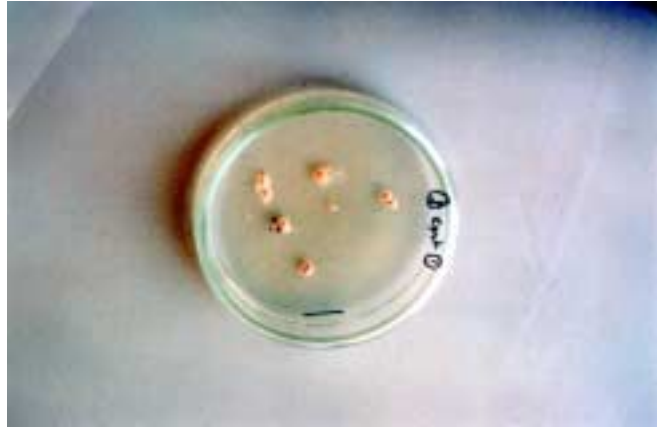


Şekil 8. 12'ci gün sonunda mitotik bölünme gösteren bir protoplast hücresi 20X'lik büyütme ile. (Skala: 1cm).



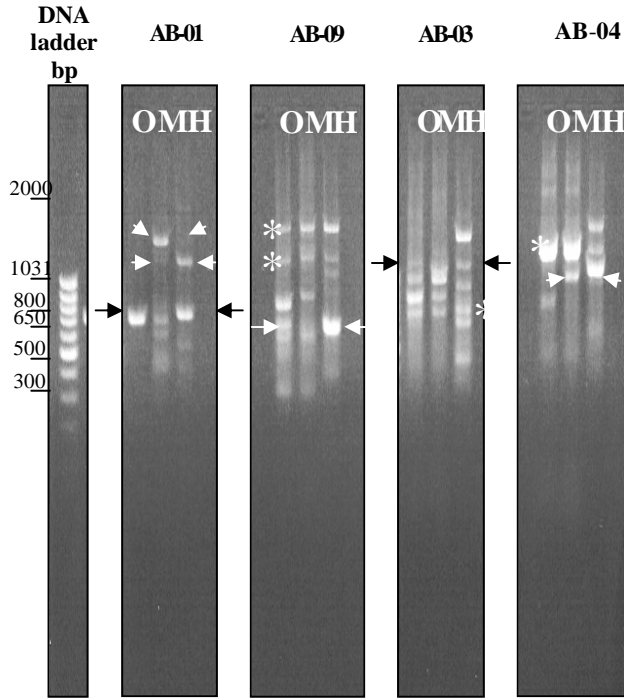
Şekil 9. 21.günde oluşmuş hücre kolonileri 10X büyütme ile (Skala: 1cm).

Bir ay sonunda küçük dokular (proto kalluslar) görülmeye başlanmıştır (Şekil 10). Çalışmamıza bitki oluşturuncaya kadar devam edilecektir.



Şekil 10. 1 ay sonunda protoplastlardan elde edilen proto kalluslar. (Skala: 1cm).

Origanum onites ve *Origanum majorana* bitkileri arasında DNA seviyesindeki farklılıkları açığa çıkarmak amacıyla Operon RAPD 10mer AB kit'ine ait 11 adet primer kullanılmıştır. Kullanılan tüm RAPD primerler *Origanum onites* ve *Origanum majorana* bitkilerinin genomik DNAsından PCR ürünleri oluşturulmuştur. Genel olarak primerlerin oluşturdukları bantların sayısı 1-7, bu bantların büyüklükleri de 0.3 - 1.6 kb arasında değişmektedir. Bu primerler içersinden ebeveyn bitkiler arasındaki DNA polimorfizmini (farklı DNA bantlarının oluşması durumu) en iyi gösteren primerler AB-01, AB-03, AB-04 ve AB-09 olduğundan hibrit analizinde bu primerlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Ebeveyn bitkilerin ve muhtemel hibrit hücre yığınının DNAsı ile bu primerler kullanılarak yapılan PCR analizlerinin sonucu Şekil 11'de sunulmuştur. Buna göre, muhtemel hibritin amplifikasyon profili *Origanum onites* ve *Origanum majorana* bitkilerinin sahip olduğu ortak bantlarla beraber anne ya da baba bitkinin taşıdığı spesifik bantları da (Şekil 11) içermektedir. Dolayısıyla bu sonuç test edilen hibritin protoplast füzyonu sonucu oluşmuş gerçek bir hibrit olduğunu kanıtlamıştır. Bunun yanısıra muhtemel hibritte ne annede ne de babada bulunmayan bantlar da gözlemlenmiştir.



Şekil 11. *Origanum onites*, *Origanum majorana* ve protoplast füzyonu sonrası oluşmuş muhtemel hibritten elde edilen DNA'lar üzerinde RAPD primerler (AB-01, AB-09, AB-03 ve AB-4) kullanılarak yapılan PCR analizleri. PCR ürünlerinin ortalama büyüklükleri 100 bp DNA ladder (Fermentas) kullanılarak saptanmıştır. O, *Origanum onites*; M, *Origanum majorana*; H, muhtemel hibriti temsil etmektedir. Hibritte tesbit edilen *Origanum onites* ve *Origanum majorana*'ya ait spesifik bantlar oklarla gösterilmiştir. Ortak bantlar ise (*) ile işaretlenmiştir.

4. TARTIŞMA

Temel araştırma materyali olarak protoplastların kullanılması birçok türdeki genetik iyileştirmelerde çok faydalı olmuştur. Protoplastların kullanımında en önemli fayda somatik melezlemedir. Eşeyssel melezlemede çeşitli nedenlerle ortaya çıkan uyumsuzlukları aşılarda türler arası gen akışının sağlanması protoplast teknolojisinin en önemli avantajıdır. Bitkilerde hücre duvarı hücre için füzyolojik bir engel değil daha çok mekanik bir sınır ve destek olarak görev yapmakta, ozmotik değişiklikler sonucu hücrenin patlamasını ve mikroorganizmaların hücreyi enfekte etmesini engellemektedir. Protoplastların büyüklüklerinin tesbiti somatik füzyon öncesi ve sonrası heterokaryonların ayrılmasında önemlidir (Babaoğlu ve Özcan, 2001).

Bitkilerimizde yaprak mezofil protoplastlarının boyları 20-70 µm bulunmuştur. Power vd. (1989) yaptıkları bir çalışmada yaprak mezofil protoplastlarının boylarının 10-60µm olması gerektiğini söylemişlerdir. Yine bu çalışmada kare başına ortalama protoplast sayısı 28 bulunmuştur. Toplam verim başlangıçtaki 1 gr materyalden elde edilen protoplast sayısı olarak ifade edilmiştir. Çalışma sonuçlarımız Power vd. (1989)'nin yaptığı çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Kültür sırasında tam yuvarlak olan protoplast (Şekil 8, 9), 24 saat sonra yavaş yavaş eliptik bir hal almaya başlamıştır. Protoplast kültürü sonrası en önemli devre hücre duvarının oluşumudur, çalışmamızda selüloz fibriller yani hücre duvarı 48 saat sonra oluşmaya başlamıştır.

Eksik hücre duvarı rejenerasyonu sonucu, zayıf alanlarda balonlanma olmuştur. Bu durum pektinin hücre duvarında oluşmaması sonucu ortaya çıkmıştır (Babaoğlu ve Özcan., 2001). Bazı protoplastlar hücre duvarı oluşmadan ölmüştür. Zayıf hücre duvarı sentezinde genetik faktörlerin yanısıra besin ortamı özellikleri, hormonlar, uygun olmayan ozmotik dengeleyici konsantrasyonları ve karbon kaynağı etkili olabilir (Evans ve Bravo, 1983; Ochatt ve Power, 1992).

Çalışmamızda hücre duvarı oluşan hücreler 8'ci gün sonunda mitotik bölünme göstermeye başlamıştır (Şekil 6) ve 9'cu gün sonunda tamamen ikiye bölünmüş bir hücre oluşmuştur (Şekil 7). Hücrelerimiz 12'ci günde üçe bölünmeye başlamıştır (Şekil 8). Bundan sonra bölünmeler devam etmiştir. 3 hafta sonunda hücre kolonileri görülmeye başlanmıştır (Şekil 9). Çalışmamızda bir ay sonunda proto kalluslar görülmeye başlanmıştır (Şekil 10).

Çalışmamızda protoplast füzyonu gerçekleşmiş, proto kalluslar meydana gelmiştir. Fakat henüz bitkicikler oluşmamıştır.

Petunia parodii ve *P.hybrida* (Power vd., 1989) ile protoplast kültürü yaparak iki bitkiyi elde etmişlerdir. İzolasyon döneminde bizim çalışmamızda kullanılan enzimleri kullanmışlardır. Pirincin farklı genotipleri protoplast kültürü ile üretilmiştir (Kyoçuka, 1988). Yine *Oriza sativa* 1989 'da protoplast kültürü ile geliştirilmiştir (Lee, 1989). Şeker pıcaarı ile 1986'da Shao, 1993'de Winkelmann Afrika menekşesi ile protoplast izolasyon çalışmaları yapmıştır.

Solanum aethiopicum ile *S.melongena* arasında *Ralstonia solanacearum* bakterisinin neden olduğu hastalığa direnci sağlamak için protoplast füzyonu yapılmıştır. Sonuçta 2 hafta sonunda % 100 yumurta bitki üretilmiş, 8 hafta sonunda % 50 bitki üretilmiştir. Bu çalışmada bizimkinden farklı olarak elektrik füzyonu kullanılmıştır (Collonnier vd., 2001). Bizim çalışmamızda (PEG) kimyasal füzyonu ile protoplastların birleşmesini sağladık. Füzyon geçiren protoplastların kallusa gelişmeleri daha yavaş olmuştur. Bunun nedeni yöntem farklılığı veya türler arasındaki büyüme özelliklerinin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Phytophthora sojai ile *P.capsici* mantarları arasında yapılan protoplast füzyonu çalışmasında izolasyon işleminde driselaz kullanılmıştır. Biz ise mannitol kullandık. Füzyon işlemi ise PEG ve kalsiyum klorür ile gerçekleştirilmiştir, bizim çalışmamızdan farklı olarak 20mM Tris kullanılarak yapılmıştır. Zoosporların hücrelerinin kaynaştığı görülmüştür (Gu ve Ko, 2000).

B.napus ile iki akraba türü *Oryhophragmus violaceus* ve *xinjiang* arasında protoplast füzyonu yapılmıştır (Hu, 1999). Yine bizim çalışmamızdaki gibi PEG füzyonu ile protoplastlar birleştirilmiştir.

Solanaceae grubu bitkilerin hemen hemen tamamında, *Brassica* türlerinde, havuç, yonca, sardunya, çeltik, soya fasülyesi, bezelye, mısır gibi birçok bitki türünde protoplast kültüründen bitki elde edilmesi üzerinde çalışmalar yapılmış ve rejenerasyon sağlanabildiği rapor edilmiştir (Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz, 1998). Bu çalışmalarda bizim çalışmamızla aynı yöntemler kullanılmıştır.

Protoplast füzyonu yönteminin pratik oluşunu sınırlandıran bazı hususlar bulunmaktadır. Füzyonların bir çoğundan euploid veya aneuploid kromozom yapısında bitkiler elde edilebilmektedir (Palavan-Ünsal, 1993).

Her bitki türü için tekrarlanabilir bir şekilde protoplasttan bitki elde etme metodu geliştirilmiş değildir. Heterokaryonların etkin bir şekilde ayırımı yapılamamaktadır. Ayrıca somatik melez bitkiler genellikle steril olmakta, döl verememekte veya fertil olması durumunda çok geniş bir somaklonal varyasyon göstermektedir (Babaoğlu ve Özcan, 2001).

Bu çalışmada bitkicik elde edilmeden önce moleküler olarak füzyonun gerçekleştiğini gösterilmiştir. RAPD markörler hibritlerin nüklear genomlarının karakterizasyonunda çok sıklıkla kullanılan güvenilir materyallerdir. Dominant olarak ekspres edildikleri için anne ve babadan gelen sadece tek polimorfik amplifikasyon ürününün varlığı bile test edilen bitki veya kallus hücre gruplarının hibritliğini isbat etmek için yeterlidir. Bu çalışmada da protoplast füzyonu ile iki farklı kekik bitkisinden (*Origanum onites* ve *Origanum majorana*) somatik hibrit oluşturulabildiği RAPD markörler ile test edilerek gösterilmiştir. Bununla beraber yaptığımız RAPD-PZR sonucunda muhtemel hibritte, anne ve baba bitkide görülen bazı bantlar amplifike olmuş bazı bantlar ise olmamıştır, bu bantların yerine farklı, ne annede ne de babada bulunmayan bantlar oluşmuştur. Bazı durumlarda da, kullanılan primerle sadece baba bitkinin spesifik bandı açık bir şekilde meydana gelirken (AB-03, AB-09, ok işareti ile belirtilen bantlar) diğer bir primerle de sadece anne bitkinin spesifik bandı (AB-04, ok işareti ile belirtilen bant) oluşmuştur. Benzer gözlemler daha önceden *Solanum tuberosum* ve *Solanum brevidens* ile (Pehu vd., 1989) ve *Solanum melongena* ve *Solanum aethiopicum* (Collonnier vd., 2001) ile yapılan protoplast füzyonu ile somatik hibrit üretme çalışmalarında tesbit edilmiştir.

Protoplast çalışmalarında genelde ebeveynlerin tüm kromozomlarının hibrit hücrelerde bulunması beklenir. Dolayısıyla hibritlerin genomu anne ve babanın iki katı büyüklükte olacaktır. Fakat bu durum nadiren oluşur ya da hiç meydana gelmez. Genelde rastlanılan olay protoplast füzyonu ile elde edilen

hibrit hücre gruplarında ya da hibrit bitkide anne ya da babanın kromozomlarının tam olarak karışmadığı, ebeveynlerden birine ait bir kısım yada çoğu kromozomların kaybedildiğidir (Stafford ve Warren, 1991). Bu kayıp özellikle enzim ve PZR ürünlerinin elektroforezinde açığa çıkmaktadır. Füzyon sırasında hangi kromozomların elemine edileceğini belirleyen mekanizma henüz iyice anlaşılmamıştır.

PZR analizi sonuçlarının hibritte, ebeveyn bitkilerden farklı gözlemlenmesinde diğer bir sebep olarak da PZR amplifikasyonu sırasında RAPD primerlerin genom üzerindeki primer bağlanma bölgeleri için rekabet etmeleri gösterilebilir. Özellikle de RAPD-PZR ürünleri yaygın bir sekans homolojisi gösteriyorsa bu durumla karşılaşılacaktır (Collonnier vd., 2001). Örneğin AB-01 primeri ile yapılan PZR analizi sonucu *O. majorana*'da oluşan moleküler ağırlığı en büyük bantın (~1500 bp) hibritte karşılığı belli belirsiz oluşurken, *O. majora*'na bitkisinde silik bir şekilde görülen ikinci sıradaki bant ise (~1300 bp) hibritte belirgin bir şekilde meydana gelmiştir (Şekil 11, AB-01). Bunun yanında, eğer RAPD ürünleri içinde tekrar eden sekanslar varsa, bu durum tekrarlayan sekansların farklı kopyaları arasında heterodupleks oluşumuna neden olarak asıl ürünün amplifikasyonunu durdurabilir. Böyle durumlarda karşılaşıldığında bir yerine birden fazla primer ayrı reaksiyonlarda kullanılarak, bir primerle mesela annenin spesifik bandı elde edildiğinde, diğer primerle de babanın spesifik bandı elde ediliyorsa bu primer çiftleri ayrı ayrı kullanılarak hibritte hem anne hem de baba bitkinin genomunun varlığını tesbit etmekte kullanılmaktadır (Collonnier vd., 2001). Bizim çalışmamızda da kullandığımız AB-09 primeri ile muhtemel hibritte baba bitkide bulunan ~650 bp büyüklüğündeki bant oluşmuş, fakat anne bitkinin ~900 bp büyüklüğündeki spesifik bandı hibritte meydana gelmemiştir. Aynı şekilde AB-03 primeri ile de muhtemel hibritte baba bitkide görülen ~1100 bp büyüklüğündeki bant oluşmuştur. Buna karşın AB-04 primeri ile ise muhtemel hibritte anne bitkide oluşan ~1000 bp büyüklüğündeki bant meydana gelmiştir. Bu bilgilerin ışığında diyebiliriz ki, PZR çalışmamızda kullanılan AB-01 primeri bize protoplast füzyonunun başarılı olduğunu direk olarak göstermiştir. Bununla beraber, primer AB-09 ve AB-03 ile yapılan PZR analizlerinde hibritte sadece babanın spesifik bandı (anne bitkide aynı bant bulunmaz); primer AB-04 ile yapılan analizde de hibritte sadece annenin spesifik bandı (baba bitkide aynı bant bulunmaz) elde edildiğinden bu primerlerden elde edilen sonuçlar birleştirildiğinde bize hibrit bitkinin hem *Origanum onites* (baba bitki) hem de *Origanum majorana*'nın (anne bitki) genomlarını içerdiğini göstermiştir. Bu da protoplast füzyonunun oluştuğuna dair yeterli bir kanıt oluşturmaktadır.

KAYNAKÇA

Babaoğlu, M. ve Özcan, S. (2001). *Bitki Biyoteknolojisi*. 89-135, Selçuk Üniv, Konya.

- Başer, K.H.C. (2001). Kekik, *Bilim ve Teknoloji*. Mayıs, s. 74-77.
- Collonnier, C., Mulya, K., Fock, I., Mariska, A., Servaes, A., Vedel, F., Siljak-Yakovlev, S., Souvannavong, V., Ducreux, G. ve Sihachakr, D. (2001). Source of resistance against *Ralstonia solanacearum* in fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. *Plant Science* 160, 3.
- Dods, J.H. ve Roberts, L.W. (1993). *Plant Tissue Culture*. s. 133-156, New York, USA.
- Dixon, A. R. ve Gonzales. (1994). *Plant Cell Culture*. 27-38, Oxford University Press, England.
- Elliältöğlü, Ş. ve Tıprıdamaz, R. (1998). Doku Kültürlerinin Tuz Stresine Dayanıklılıkta Kullanımı, *Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri*.
- Evans, D.A. ve Bravo, J.E. (1983). Protoplast isolation and culture. *Hand book of plant cell culture*. Eds: Evens, D.A., Sharp, W.R, Ammirato, P.V., Yamada, Y., Vol 1, Techniques for Propagation and Breeding, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company.
- Gilbert, E.J., Shohet S. ve Calligari, P.D.S. (1995). Studies on the effect of protoplast density and genotype mixing on cell regeneration. *Ann. Appl. Biol.* 126, 379-393.
- Gu, Y.H. ve Ko, W.H. (2000). Occurrence of parasexual cycle in *Phytophthora parasitica* following protoplast fusion. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41, 225-230.
- Kyozuka, J.K. (1988). Plant Regeneration From Protoplast Of *Indica* Rice: Genotyp Differences in Culture Response. *Teor. Appl. Genet.* 76, 287-890.
- Lee, L. (1989). Plant Regeneration for *Indica* Rice (*Oryza Sativa*) Protoplast. *Planta* 178, 325-333.
- Melchers, G., Labib, G. ve Takabe, I. (1971). Regeneration of whole plant from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturewissenschaften* 58, 318-320.
- Murashige, T. ve Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant.* 15, 473-497.
- Ochatt, S.J. ve Power, J.B. (1992). Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. *Plant biotechnology*, Eds: Fowler, M.V., Warren, Gs., Moon-Yong, M. Second Supplement, s. 99-127, Pergamon Press.
- Palavan-Ünsal, N. (1993). *Bitki Büyüme Maddeleri*, s. 328-330
- Pehu, E., Karp, A., Moore, K., Steele, S., Dunckley, R. ve Jones, M.G.K. (1989). Molecular, cytogenetic and morphological characterisation of somatic hybrids of diploid *Solanum tuberosum* and diploid *S. brevidens*. *Theor. Appl. Genet.* 78, 696-704.
- Power, J. B., Davery, M. R, Mc Lellan, M. ve Wilson, D. (1989). *Laboratory Manual Plant Tissue Culture* (Revised), Plant Genetic Manipulation Group Department of Life Science, University of Nottingham, UK.
- Reinert, J. ve Yeoman, M.M. (1982). *Plant Cell and Tissue Culture*, Laboratory Manual, ss. 42, New York.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Leblebici, E., Görk, G. ve Bekat, L. (1992). *Tohumlu Bitkiler Sistematiği*, Ege Üniv.Fen.Fak. Kitaplar Serisi., Seri No:116. Bornova, İzmir.
- Stafford, A. ve Warren, G. (1991). *Plant Cell and Tissue Culture*, Open University Press, Milton Keynes.
- Shao, M.W., (1986). Sugarbeet *Research And Extension Reports*. Ol. 17., 175-180.
- Winkelmann, T. (1993). Use of a Protoplast Regeneration System For African Violet Improvement., *Institute for Breeding of Ornamental Species* ss. 46(6), 50-52.



Banu Aytül Ekmekçi, 24 Haziran 1968 Babaeski doğumludur. Bir kızı vardır. İlkokulu 1974-1979 seneleri arasında Sivas Selçuk İlkokulunda, Ortaokul ve Liseyi 1979-1985 yılları arasında Eskişehir Cumhuriyet Lisesinde, Üniversiteyi 1985-1989 yılları arasında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde, Yüksek Lisans eğitimini 1990-1992 yılları arasında Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde tamamlamıştır. Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi'nde 1992-1997 yılları arasında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmıştır. 1997 yılında Aynı Üniversiteye Yardımcı Doçent Dr. olarak atanmıştır. Halen bu görevi sürdürmektedir.



Emel Sözen, 1970 yılında Eskişehir'de doğdu. 1992 yılında Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümünden Lisans, 1995 yılında University of East Anglia'dan Yüksek Lisans, 2000 yılında da Nottingham University'den Doktora derecelerini almıştır. Halen Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümünde öğretim üyesi olarak görev yapmaktadır.