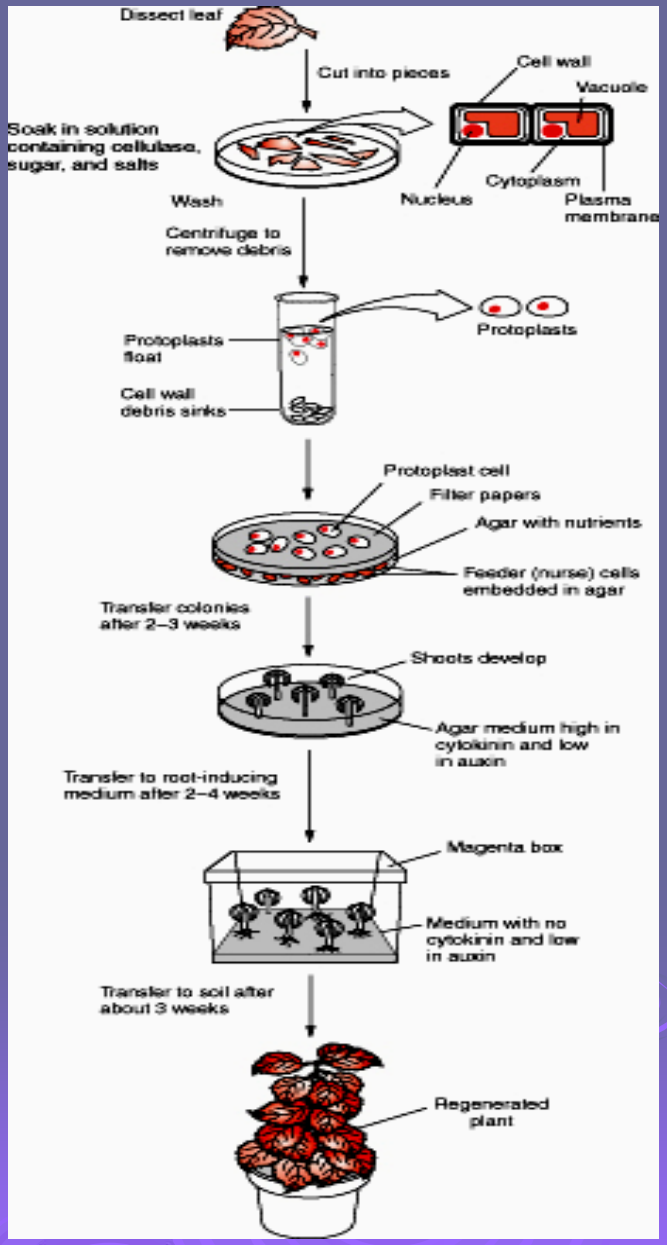
7. PROTOPLAST KÜLTÜRÜ

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

Protoplast Kültürü Yapılışı

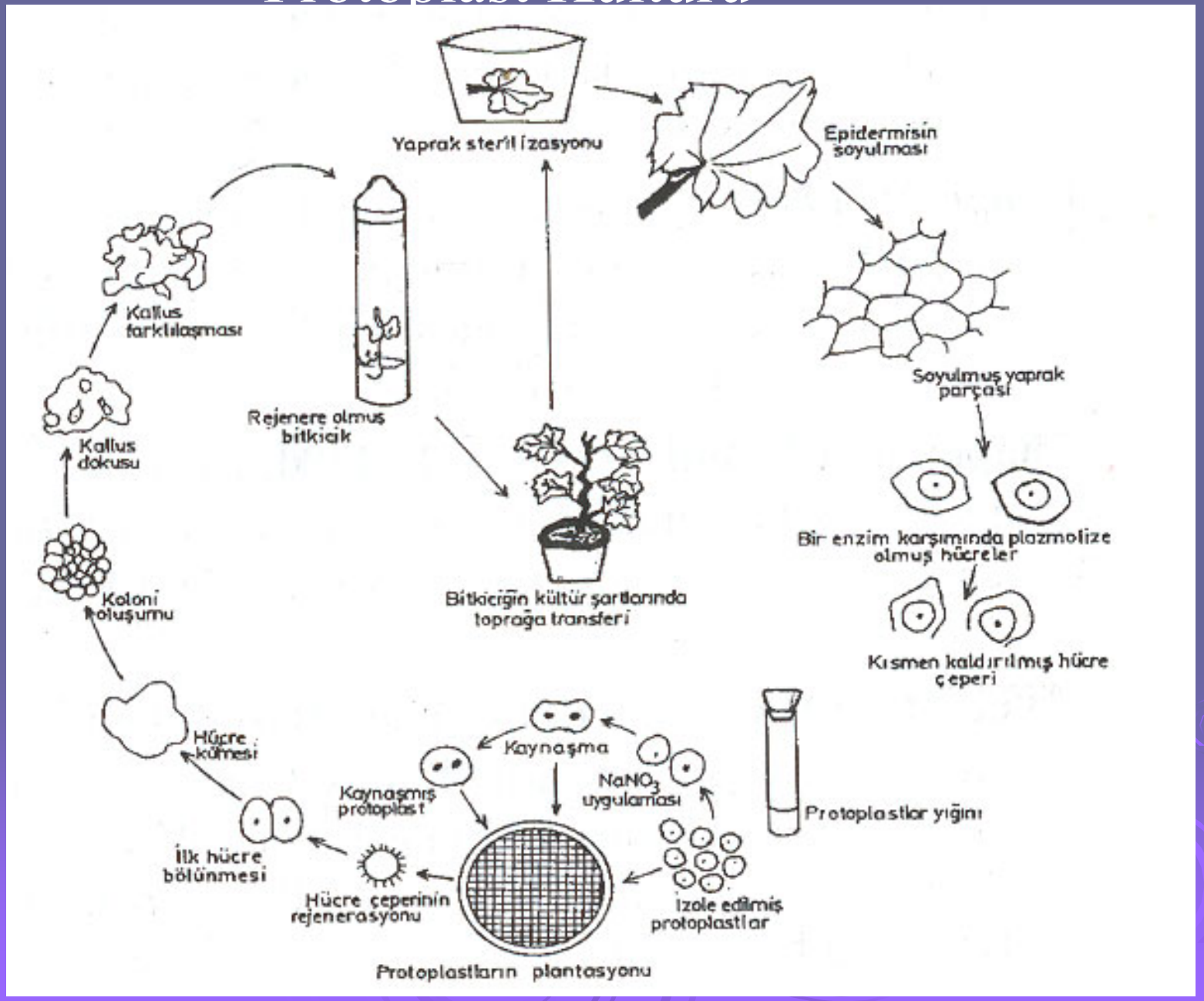
1. Yaprak sterilizasyonu
2. Epidermisin Soyulması
3. Enzim uygulanması ve inkübasyonu
4. Protoplastların izolasyonu ve kültüre alınması



Protoplast Kültürün Kullanım Amaçları

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

Protoplast Kültürü



Somatik Hücreler Arası Melezleme (Protoplast Füzyonu)

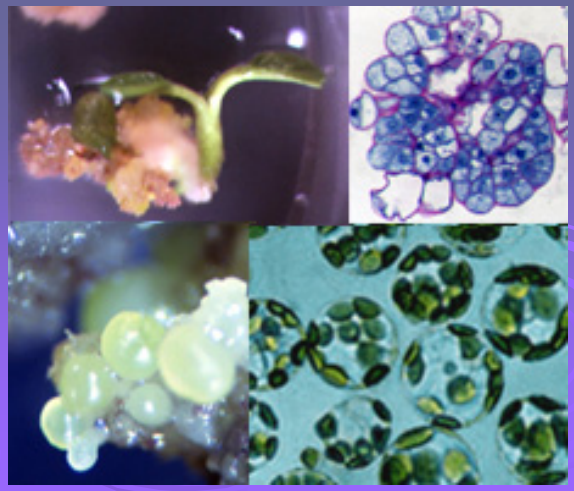
- Protoplast füzyonu ve somatik melezleme, pre-zigotik eşeysel uyuşmazlıklar nedeniyle, klasik melezleme ile elde edilemeyen hibritlerin elde edilmesinde kimyasal ve fiziksel yöntemlen kullanılarak uygulanan bir tekniktir.



Somatik hibridizasyon



M. sativa x *M. coerulea* somatik hibridine ait çiçekler







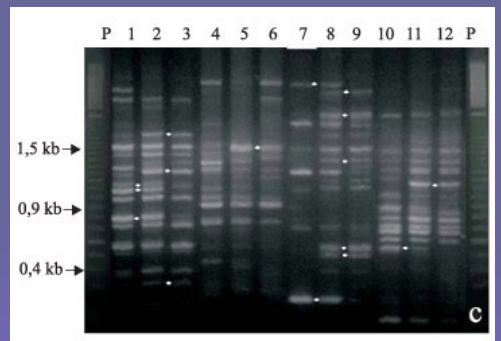


Figure 2. Characterization of somatic hybrid between 'Hamlin' sweet orange and 'Singapura' selected pummelo seedling. a) Mitotic metaphase of a somatic hybrid plant showing 2n=4x=36 chromosomes (bar = 1 μm); b) Leaf morphology of *Citrus sinensis* (left), somatic hybrid (center) and *C. grandis* (right);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



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



Protoplast Kültürünün Dezavantajları

1)Her bitki türü için tekrarlanabilir bir şekilde protoplasttan bitki elde etme metodu geliştirilmiş değildir.

2)Heterokaryonların etkin bir şekilde ayırımı yapılamamaktadır.

3)Somatik melez bitkiler genellikle steril olmakta, döl vermemekte veya fertil olması durumunda çok geniş bir somaklonal varyasyon göstermektedir.

8. ANTER KÜLTÜRÜ

- İçerisinde olgunlaşmamış çiçek tozlarını (mikrospor) bulunduran anterlerin tomurcuklardan izole edilerek *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına alınması ve burada mikrosporlardan haploid embriyoların elde edilmesine anter kültürü adı verilmektedir.

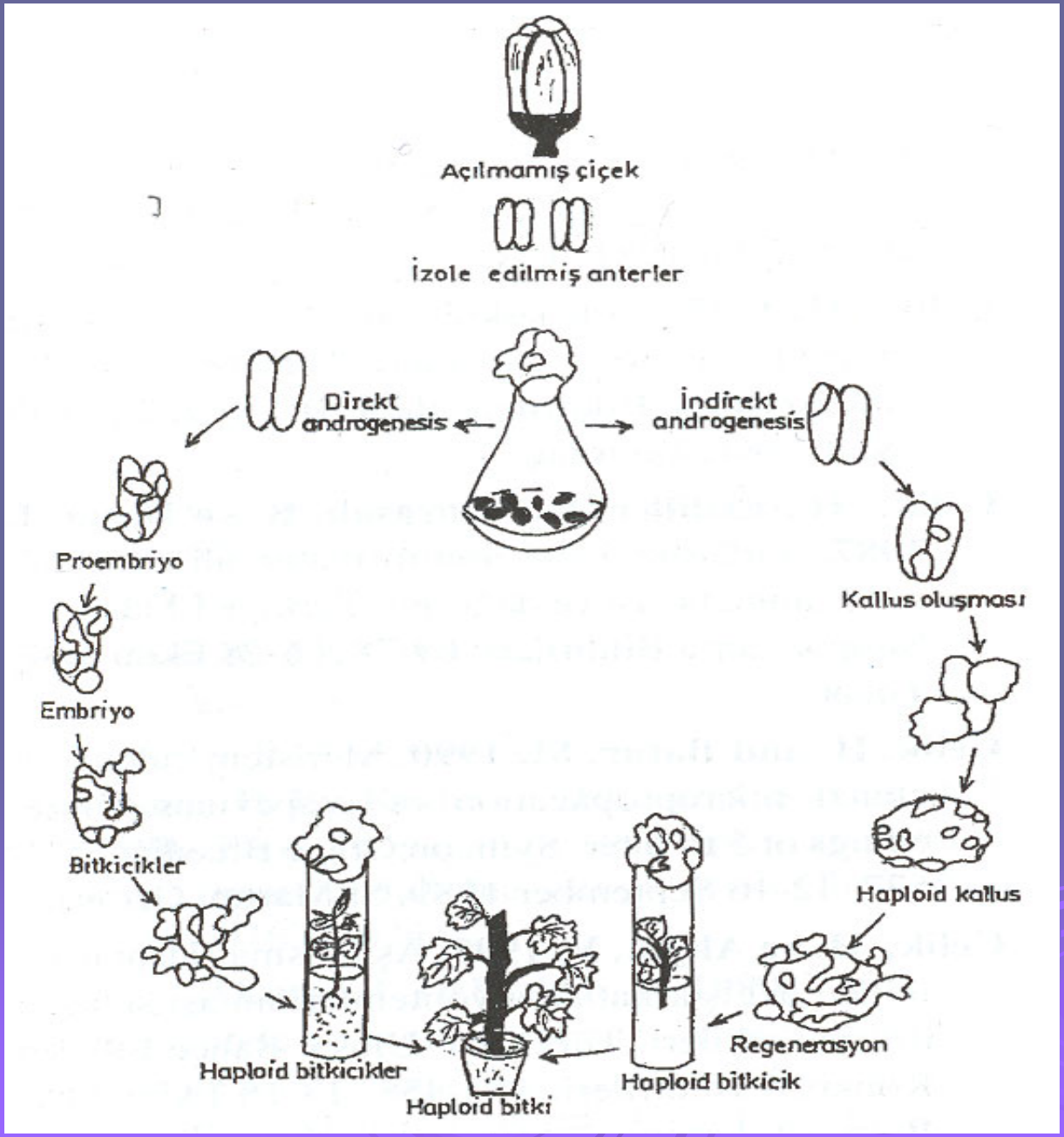
Kültüre Alınan Bir Anterden Embriyo Çıkışı



ANTER KÜLTÜRÜ

Islah yönünden önem taşıyan bu teknikle, haploid bitki elde etmek amacıyla, diploid bitkilerden izole edilen anterler, *in vitro* koşullarda geliştirilmektedir. Böylece geleneksel yöntemlerle elde edilmesi uzun yıllar alan homozigot hatlar, anter kültürü ile birkaç ay gibi kısa bir sürede elde edilebilmektedir. Anter kültürü ile elde edilen haploid bitkilere kolhisin uygulamasından sonra, %100 homozigot saf bitki hatları elde edilebilmektedir.

Anter Kültürü

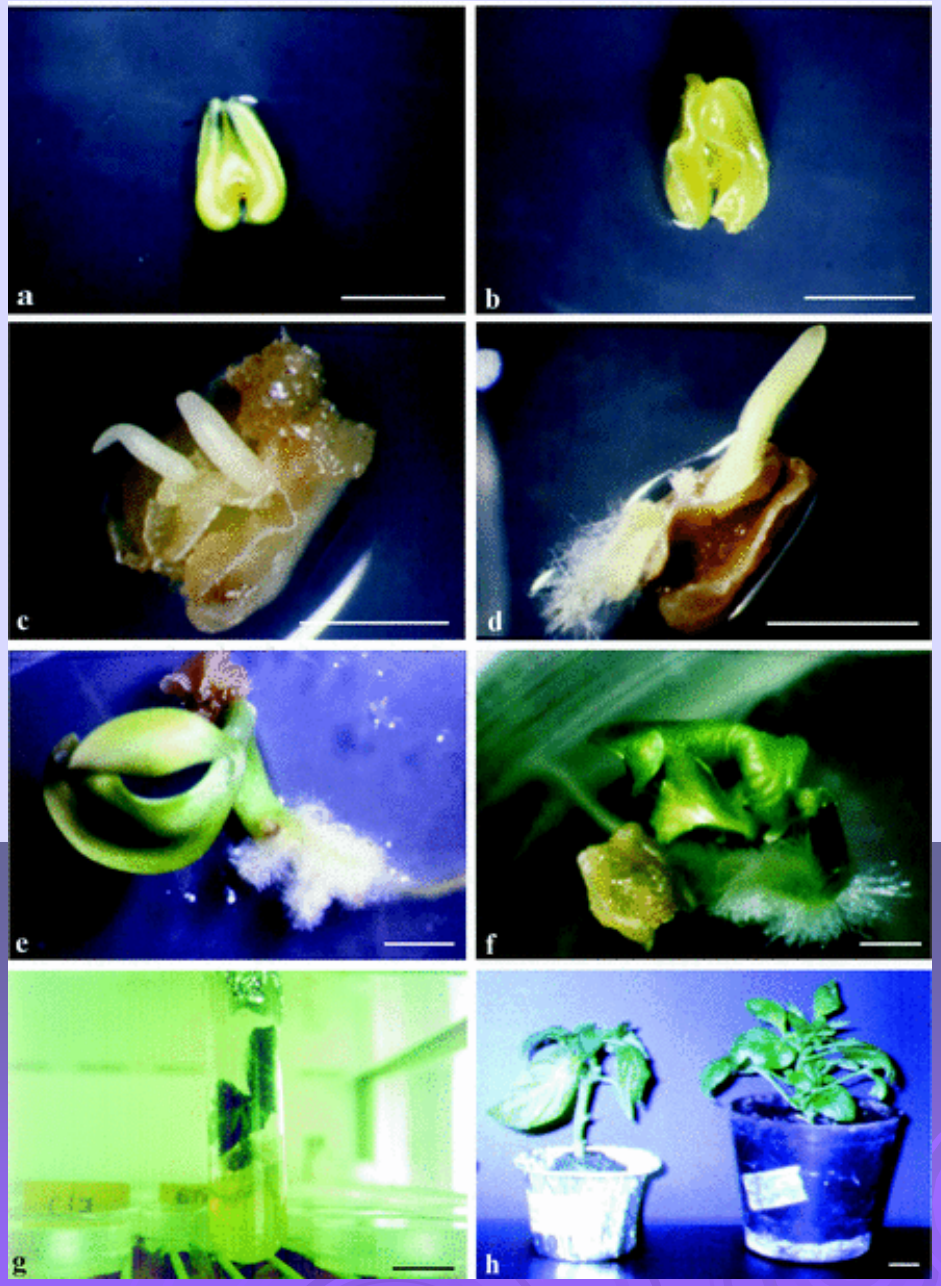




Biber anterlerinin besin ortamına yerleştirildikten sonraki durumu



Biber anterlerinden embriyo çıkışı


a
b
c
d
e
f
g
h

ANDROGENEZİSİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

1. **Anter verici (donör) bitki**

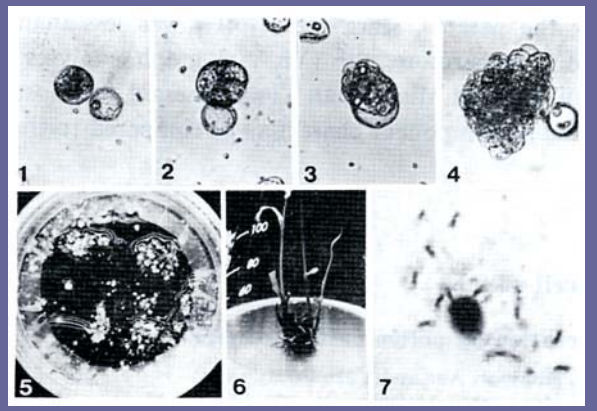
a. Genotip
b. Donör bitkinin yetişme koşulları

2. **Anter kültürü**

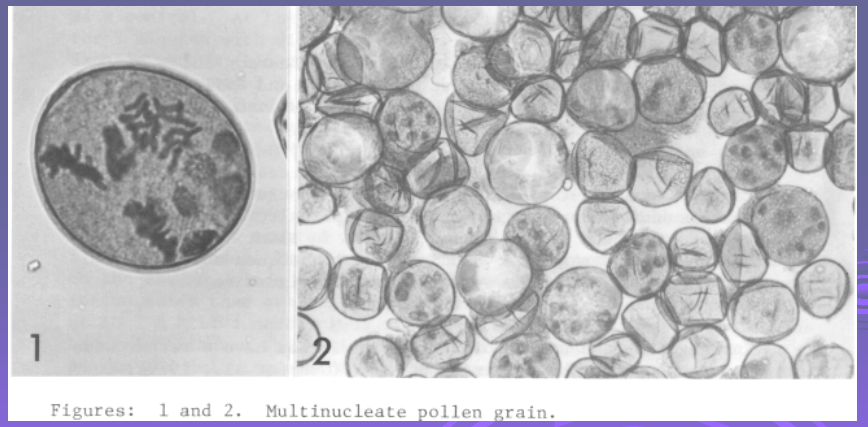
a. Anterlerin gelişme dönemi
b. Anterlere yapılan ön uygulamalar
c. Besin ortamının yapısı ve bileşimi
d. Kültür koşulları

MİKROSPOR KÜLTÜRÜ

Haploid embriyo ve bitki oluşumu amacıyla olgunlaşmamış mikrosporların aseptik koşullarda anter içerisinden izole edilerek yapay besin ortamları üzerinde alındığı *in vitro* tekniktir. Polen kültürü olanak da adlandırılır. Anter kültürüne göre daha komplike bir tekniktir.



Çeltikte polen kültürü aşamaları



Arpada çok çekirdekli polenler (bölünmeye başlamışlar)

Mikrospor Kültürünün Avantajları

1-Anter kültüründe anterlerin diploid yapıdaki dokulardan da embriyo oluşabilmekte ve bu embriyolar haploid embriyolar ile rekabete girebilmektedirler. Oysa mikrospor kültüründe oluşan embriyolar tamamen haploiddir.

2-Mikrospor kültüründe besin ortamı ile doğrudan temas halinde oldukları için mikrosporlar besin maddelerini daha iyi alabilmektedir.

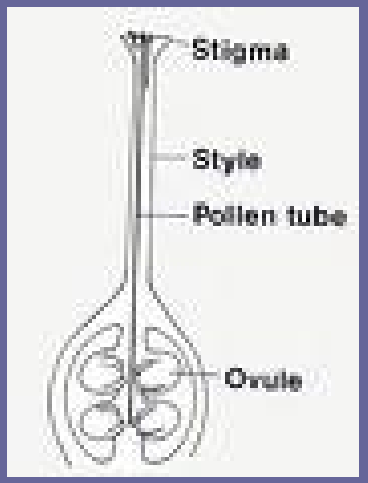
3-Anter dokusunda bulunan engelleyici maddeler anterle birlikte uzaklaştırıldığından sorun olmaktan çıkmaktadır.

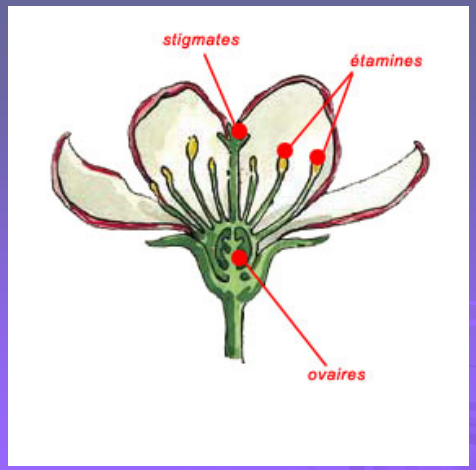
4-Tek bir mikrospordan embriyo oluşumu sağlandığı için genetik monüplasyonlar, mutasyon, biyolojik testler vb. çalışmalar için uygun bir tekniktir.

5-Kolzada olduğu gibi haploid embriyo verimi bu teknikte daha yüksektir.

9. OVÜL VE OVARYUM KÜLTÜRLERİ

Haploid embriyo ve bitki oluşumu amacıyla döllenmiş yumurta hücresinin ya da yumurtalığın aseptik koşullarda yapay besin ortamları üzerinde kültüre alındığı in vitro tekniktir.







Pikan cevizi ovulü

Ovül ve Ovaryum Kültürünü Etkileyen Faktörler

1-Genotip
2-Donör bitkilerin yetiştirildiği koşullar.
3-Yumurtalığın gelişme dönemi
4-Çiçek tomurcuklarına yapılan ön uygulamalar
5-Besin ortamlarının bileşimi
6-İnkübasyon koşulları

Zeynep Deniz Koçak, Zeynep Uysal, Özge Özüpek, Didem Bilgin ve Nurten Lökoğlu'nun

"Bitki Doku Kültürleri I" dersi kapsamında hazırladıkları ödevlerin birleştirilmesi ve revizyonu ile hazırlanmıştır.