

Bazı Turunçgil Anaçlarında Farklı Enzim ve Besin Ortamı Konsantrasyonlarının Yaprak Protoplast İzolasyonuna Etkileri

Berken Çimen, Turgut Yeşiloğlu, Bilge Yılmaz, Meral İncesu, Yıldız Aka Kaçar
Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü 01330 Sarıçam, Adana
e-posta: bcimen@cu.edu.tr

Özet

Protoplast füzyonu ile bitki somatik melezlemesi turunçgil çeşit ve anaç ıslah programlarında farklı çeşit, tür ve cinslerle kombinasyon oluşturma olanağı sağlaması bakımından önemli bir araçtır. Protoplast izolasyonu somatik melezlemenin ilk ve en önemli aşaması olmakla birlikte mevcut protokollerin etkinliği kullanılan genotipe bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Bu amaçla, üçer farklı konsantrasyonda enzim solüsyonu ve besin ortamı kullanılarak, turunçgillerde abiyotik ve biyotik stres koşullarına toleransı yüksek, anaç olarak kullanılan Yerli üç yapraklı ile Alanya Dilimli portakalı, *Severinia buxifolia* ve *Eremocitrus glauca* genotiplerinde protoplast izolasyon çalışmaları yürütülmüştür. Farklı izolasyon koşullarının protoplast verimliliğine etkisi hemositometre yöntemi kullanılarak yapılan sayımlarla belirlenmiştir. Genotipler arasında en düşük protoplast verimliliği tüm uygulamalarda *Eremocitrus glauca*’dan, en yüksek ise Alanya Dilimli portakalından elde edilmiştir. En yüksek protoplast miktarı 1.82×10^6 P/ml ile Alanya Dilimli portakalı yapraklarında 4 ml enzim solüsyonu + 8 ml 0.6 M BH3 besin solüsyonu kullanılarak yapılan izolasyonda bulunmuştur. En düşük protoplast verimliliği ise 0.27×10^6 P/ml ile 2 ml enzim solüsyonu + 10 ml 0.6 M BH3 besin solüsyonuyla *Eremocitrus glauca* yapraklarından yapılan izolasyondan elde edilmiştir. Çalışmada farklı turunçgil anaçları için etkin protoplast izolasyon koşullarının belirlenmesi, bu genotipler kullanılarak yapılacak somatik melezleme çalışmaları açısından önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Turunçgil, anaç, somatik melezleme, protoplast izolasyonu

Effects of Different Enzymes and Culture Medium Concentrations on Leaf Protoplast Isolation of Some Citrus Rootstocks

Abstract

Somatic hybridization by protoplast fusion has become an important tool for citrus variety and rootstock breeding programs in respect to generate different recombinations between different cultivars, species and genus. Protoplast isolation from tissues is the first and most important step in somatic hybridization. Besides the efficiency of existing protocols may vary depending on the genotype used. For this purpose, protoplast isolation studies using three different enzymes and culture media conditions were carried out in the leaves of local trifoliolate, Alanya common orange, *Severinia buxifolia* and *Eremocitrus glauca* which are used as citrus rootstocks with high levels of tolerances to abiotic and biotic stress conditions. Effects of different isolation conditions on the efficiency of protoplast number were calculated by using hemocytometer cell counting method. In all different isolation conditions, the lowest protoplast number per ml was observed from the leaves of *Eremocitrus glauca* where as the highest isolation efficiency was recorded in the leaves of Alanya common orange. The highest protoplast yield was recorded from the leaves of Alanya common orange with 1.82×10^6 P/ml under 4 ml enzymatic solution + 8 ml 0.6 M BH3 culture medium. On the other hand the lowest protoplast yield was determined in the leaves of *Eremocitrus glauca* with 0.27×10^6 P/ml under 2 ml enzymatic solution + 10 ml 0.6 M BH3 culture medium. In the present study, determining the efficient protoplast isolation conditions for different citrus rootstock has a great importance for the further somatic hybridization studies that will be conducted using the same genotypes.

Keywords: Citrus, rootstock, somatic hybridization, protoplast isolation

Giriş

Ülkemizin de içerisinde yer aldığı Akdeniz havzasında dünya turunçgil üretiminin %22’si gerçekleştirilmektedir. Ülkemiz turunçgil üretimi 2013 yılında 3.681.158 tona ulaşmış olup, dünya toplam turunçgil meyveleri üretiminin %2.71’ini oluşturmaktadır (Fao, 2015). Turunçgiller her ne kadar bazı vegetatif üretim yöntemleri ile başarıyla çoğaltılabilirse

de toprak, iklim ve hastalıklar gibi nedenlerle anaç kullanma zorunluluğu vardır. Dünyada turunçgil üretim alanlarının artması, beraberinde zaten var olan biyotik ve abiyotik stres koşullarının çeşitlenmesi ve artmasını da beraberinde getirmiştir. Akdeniz ülkeleri turunçgil endüstrisi birçok biyotik ve abiyotik stres koşullarıyla karşı karşıya gelmiştir. Bu durum, Akdeniz ülkeleri ve ülkemiz turunçgil sektöründe, üstün özellikleri nedeniyle anaç

olarak kullanılan genotiplerin yanında yeni anaçların geliştirilmesi için çeşitli ıslah programlarının başlamasına sebep olmuştur (Davies ve Albrigo, 1994; Dambier ve ark., 2011).

Turunçgillerde genetik varyabilitenin artırılmasında kontrollü melezleme çalışmaları en sık başvurulan ve en eski yöntemlerden birisidir. Türler arası ve cinsler arası melezlemeler türler ve cinsler arasındaki genetik karakterlerin aktarılmasıyla elde edilecek yeni türlerin oluşturulmasında önemlidir. Ancak klasik ıslah çalışmalarında, genotiplerin üreme biyolojisine bağlı sorunlar nedeniyle melez bitki elde etmek oldukça güçtür (Grosser ve ark., 1996).

Protoplast füzyonu ile bitki somatik melezlemesi son yıllarda turunçgil çeşit ve anaç ıslah programlarında farklı çeşit, tür ve cinslerle kombinasyon oluşturma olanağı sağlaması bakımından önemli bir araç haline gelmiştir. Bu yöntem klasik turunçgil ıslah programlarında karşılaşılan eşeysel uyumsuzluk, nüseller embriyonu ve erkek veya dişi kısırılık gibi güçlüklerin aşılması bakımından oldukça önemlidir (Grosser ve Gmitter, 2011). Turunçgillerde gerçekleştirilen somatik melezleme çalışmalarında protoplast kaynağı olarak genellikle yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip embriyogenik kallus ve yaprak mezofil hücreleri kullanılmaktadır. Yaprak mezofil hücrelerinden elde edilen protoplastlar, klorofil içermeleri sebebiyle füzyon aşamasında heterokaryonların görsel olarak tanımlanması bakımından önerilmektedir. Protoplast izolasyonu somatik melezlemenin ilk ve en önemli aşaması olmakla birlikte mevcut protokollerin etkinliği kullanılan genotipe bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Protoplast izolasyonundaki başarı, kullanılan dokunun durumu ve kullanılan enzimlerin kombinasyonuyla değişim göstermektedir (Rasheed ve ark., 1990; Saker ve ark., 1999; Chamani ve ark., 2012). Bununla birlikte protoplast eldesi, hücre duvarı kalınlığı, enzimatik sindirme aşamasındaki sıcaklık ve zaman, enzim solusyonunun pH değeri, kullanılan dokunun izolasyon öncesi plazmoliz durumu gibi pek çok faktöre bağlıdır (Frearson, 1973).

Bu amaçla, üç farklı miktarda enzim solüsyonu ve besin ortamı kullanılarak oluşturulan dokuz farklı izolasyon koşullarında,

turunçgillerde anaç olarak kullanılan çeşitli abiyotik ve biyotik stres koşullarına toleransı yüksek Yerli üç yapraklı ile Alanya Dilimli portakalı, *Severinia buxifolia* ve *Eremocitrus glauca* genotiplerinde protoplast izolasyon çalışmaları yürütülmüştür.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Bu çalışmada kullanılan genotipler Çizelge 1’de sunulmuştur. Protoplast izolasyonu denemelerinde yaprak donörü olarak kullanılacak bitkisel materyal hazırlığı için Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Turunçgil Gen Kaynakları parsellerinde bulunan Çizelge 1’deki genotiplerden aşı gözleri alınarak kontrollü sera koşullarında yerli turunç anaçı üzerine aşılanmıştır. Serada aşı gözlerinin sürmesiyle oluşan sürgünlerin üzerindeki 3-4 haftalık henüz gelişmesini tamamlamış genç yapraklar, protoplast izolasyonu çalışmalarında materyal olarak kullanılmıştır.

Yaprak Mezofil Protoplastlarının İzolasyonu

Seradaki bitkilerden alınan yaprak materyali laboratuvara getirilerek yüzey sterilizasyonu öncesinde 1 N HCl’de birkaç saniye tutulmuştur. Daha sonra yapraklar %70 oranındaki etil alkol içerisinde 2 dk, sonrasında 1-2 damla tween 20 içeren %10 ‘luk sodyumhipoklorid çözeltisinde 15 dk bekletilmiş ve 4-5 kez steril saf su ile durulanarak yüzey sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Sterilizasyon işlemi tamamlanan yapraklar pens yardımıyla steril petri kutularına aktararak bistüri yardımıyla ince şeritler halinde kesilmiştir. Her genotipe ait yaprak örnekleri üzerine 6, 8 ve 10 ml olmak üzere 0.6 M BH3 turunçgil protoplast kültür ortamı (Grosser ve Gmitter, 2011) eklenmiştir. BH3 ortamı eklendikten sonra enzimatik sindirmenin gerçekleşmesi için besin ortamı içerisinde bulunan kıyılmış yaprak parçaları üzerilerine hücre duvarını parçalayacak olan filtre sterilizasyonu yapılmış enzim solüsyonundan (0.7 M mannitol, 18.0 mM CaCl₂, 6.0 mM MES tamponu, 1.4 mM NaH₂PO₄, %1 Onozuka RS cellulase, %1 Macerace, %0.2 Pectolase Y-23, pH 5.6) 2, 3 ve 4 ml eklenmiştir. Böylece her genotip için 2, 3 ve 4 ml enzim solusyonuyla 6, 8 ve 10 ml 0.6 M BH3 turunçgil protoplast kültür ortamı kombine edilerek toplamda dokuz farklı izolasyon koşulunda deneme kurulmuştur. Enzim ve protoplast kültürü solüsyonu içerisinde

yaprak örneklerini içeren petri kapları, hücre duvarının parçalanması için inkübatörlü yatay hareketli çalkalayıcıya aktarılmıştır. Petri kapları 15-16 saat boyunca 26°C'de 40 rpm'de çalkalanmıştır.

Protoplastların Saflaştırılması ve Sayımı

Enzimatik sindirme sonrası, petri kapları içerisinde bulunan enzim ve protoplast kültürü solusyonu içerisinde protoplast hücreleri ile birlikte yaprak parçaları da bulunduğu için protoplastları diğer yaprak dokularından ayırmak amacıyla protoplast saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma işleminde filtrasyon ve santrifüj yöntemleri kullanılmıştır. Petri kapları içerisindeki enzimatik sindirme solüsyonu 40 µmesh'lik BD Falcon Cell Strainer (REF352340) filtreden geçirilerek pastör pipet yardımı ile 15 ml'lik steril falcon tüplerine aktarılmış ve 100 g devirde 4 dakika santrifüj edilerek hücrelerin tüpe pellet şeklinde çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra pellet üzerine yavaş bir şekilde 5ml %25 sakkaroz içeren CPW besin çözeltisi (27.2 mg/l KH₂PO₄, 100 mg/l KNO₃, 150 mg/l CaCl₂, 250 mg/l MgSO₄, 2.5 mg/l Fe₂(SO₄)₃.6H₂O, 0.16 mg/l KI, 0.00025 CuSO₄, pH 5.8) eklenerek pellet çözdürülmüştür. Daha sonra 2 ml %13 mannitol içeren CPW besin çözeltisi pastör pipet yardımıyla sakkaroz çözeltisi üzerine eklenmiştir. Böylece falcon tüpünde yoğunluk farkından dolayı iki faz oluşturulmuş ve 10 dakika 100 g'de santrifüjlenerek protoplast hücrelerinin oluşan iki faz arasında toplanması sağlanmıştır. Protoplastlar pastör pipet yardımıyla iki faz arasından alınarak falcon tüplerine aktarılmış ve üzerine 15 ml protoplast yıkama solüsyonu (0.8 M Mannitol, 0.5 mM CaCl₂) eklenerek 4 dakika 100 g'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası protoplastlar pellet halinde dibe çöktürülüp yıkama solüsyonu falcon tüpünden pastör pipet aracılığı ile uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi iki defa gerçekleştirilmiştir (Dambier ve ark., 2011). Yıkama işlemi sonrasında, farklı izolasyon koşullarının protoplast verimliliğine etkisi hemositometre yöntemi kullanılarak yapılan sayımlarla belirlenmiştir. Protoplast sayımları, hemositometriyle üzerine kapatılan lam arasında bulunan sayım haznesine 100-200 µl protoplast karışımı pastör pipetle doldurularak 40 büyütme objektif ve 10 büyütme mikrometre yardımıyla her tekrerde 3 sayım olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Deneme Deseni ve İstatistiksel Analiz

Deneme 4 x 3 x 3 x 3, dört anaç, üç enzim solusyonu, üç besin ortamı, üç tekrerrir düzeninde tesadüf parselleri faktöriyel deneme desenine göre kurulmuştur. Elde edilen veriler SAS istatistiksel paket programı ile (v9.00, SAS Institute Inc., NC 27513-2414, ABD) varyans analizine tabi tutulmuş ve bulgular ortalama ± standart sapma SigmaPlot® (version 11.00, Systat Software, San Jose, CA, ABD) programıyla hesaplanarak grafik şeklinde sunulmuştur. İzolasyon koşulları arasındaki farklılıklar genotip düzeyinde Tukey testi ($\alpha=0.05$) ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada, farklı izolasyon koşullarının bazı turuncgil anaçlarında yaprak mezofil protoplast verimliliğine etkisi hemositometre yöntemi kullanılarak yapılan sayımlarla belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara yapılan varyans analizine göre genotip, enzim solüsyonu miktarı, besin ortamı miktarı ve bunların etkileşimlerinin protoplast miktarı üzerine istatistiksel olarak önemli ($p \leq 0.01$) etkileri saptanmıştır (Çizelge 2). Denemeye alınan genotipler arasında tüm izolasyon koşullarında istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu, kullanılan bu izolasyon koşullarında genotiplerden elde edilen protoplast miktarlarının değişim gösterdiği belirlenmiştir. Assani ve ark. (2001)'da protoplast izolasyonundaki başarının, kullanılan donör materyal, enzim karışımı, besin ortamı ve ortamda büyüme düzenleyicilerin varlığı gibi birçok faktöre bağlı olduğunu bildirmiştir.

Tüm genotip ve besin ortamlarında 4 ml enzim solusyonu kullanılarak oluşturulan izolasyon koşullarında diğer uygulamalara göre daha fazla sayıda protoplast elde edilmiş; en düşük protoplast miktarının ise 2 ml enzim solusyonu kullanılan koşullarda olduğu belirlenmiştir. Elde edilen protoplast miktarı, besin ortamı bakımından incelendiğinde izolasyon aşamasında 8 ml BH3 turuncgil protoplast kültür ortamı kullanılan koşullarda en yüksek, 6 ml BH3 kullanılan koşullarda ise en düşük olduğu saptanmıştır.

Alanya Dilimli portakalı ve Yerli üç yapraklı genotiplerinde en yüksek protoplast sayısı 4 ml ES + 8 ml BH3 ve 4 ml ES + 10 ml BH3 izolasyon koşullarından elde edilmiştir. Bununla birlikte *Severinia buxifolia* ve *Eremocitrus glauca* genotiplerinde 4 ml ES + 8 ml BH3 izolasyon uygulamasında en yüksek

protoplast sayısı elde edilmiştir. İzolasyon koşulu olarak 2 ml ES + 6 ml BH3 kullanılması Alanya Dilimli portakalı, Yerli üç yapraklı ve *Severinia buxifolia*'da en düşük protoplast verimliliğiyle sonuçlanmıştır. *Eremocitrus galuca*'da ise en düşük protoplast miktarı 2 ml ES + 10 ml BH3 izolasyon koşulunda saptanmıştır (Şekil 1). Benzer şekilde, kullanılan farklı enzimlere ve miktarlarına bağlı olarak tütünde (Nagata ve Takade, 1984), lilyumda (Chamani ve ark., 2012), patlıcanda (Saxena ve ark., 1987) ve turuncğillerde (Grosser ve ark., 1996) elde edilen protoplast miktarının değişim gösterdiği bildirilmektedir. Chamani ve ark., (2012) izolasyon karışımında artan enzim miktarına bağlı olarak protoplast verimliliğinin artış gösterdiğini belirtmiştir.

Çalışmada, en yüksek protoplast miktarı 1.82×10^6 P/ml ile Alanya Dilimli portakalı yapraklarında 4 ml enzim solüsyonu + 8 ml 0.6 M BH3 besin solüsyonu kullanılarak yapılan izolasyonda bulunmuştur (Şekil 2). En düşük protoplast verimliliği ise 0.27×10^6 P/ml ile 2 ml enzim solüsyonu + 10 ml 0.6 M BH3 besin solüsyonuyla *Eremocitrus glauca* yapraklarından yapılan izolasyondan elde edilmiştir (Şekil 1).

Sonuç

Farklı enzim ve besin ortamı kombinasyonları kullanılarak somatik melezleme çalışmalarına konu olabilecek önemli nitelikteki turuncğil genotiplerinden en yüksek verimde protoplast izolasyonu elde etmeyi amaçlayan bu çalışmada, protoplast izolasyonunda elde edilen protoplast büyüklüğü ve verim üzerine enzimlerin miktarı, donör bitki materyali, ozmotik şartlar ve plazmolizasyon, pH, sıcaklık gibi pek çok faktörün etki yaptığı saptanmıştır. Tüm genotiplerde 4 ml enzim solüsyonu + 8 ml BH3 kültür ortamı kullanımının, en yüksek protoplast verimliliğini sağladığı belirlenmiştir. Çalışmada farklı turuncğil anaçları için etkin protoplast izolasyon koşullarının belirlenmesi, bu genotiplerin kullanılarak yapılacak somatik melezleme çalışmaları açısından önem taşıdığı düşünülmektedir.

Kaynaklar

Assani, A., Haicour, R., Wenzel, G., Cote, F., Bakry, F., Foroughi-Wehr, B., Ducreux, G., Aguillar, M.E., Grapin, A., 2001. Plant regeneration

from protoplasts of dessert banana cv. 'Grande Naine' (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 20:482-488

Chamani, E., Tahami, S.K., Zare, N., Zakaria, R.A., Mohebodini, M., Joyce, D., 2012. Effect of different cellulase and pectinase enzyme treatments on protoplast isolation and viability in *Lilium ledebourii* Bioss. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 40(2):123-128.

Dambier, D., Benyahia, H., Pensabene-Bellavia, G., Kacar, Y. A., Froelicher, Y., Belfalah, Z., Ollitrault, P., 2011. Somatic hybridization for citrus rootstock breeding: an effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. *Plant Cell Reports*, 30(5):883-900.

Davies, F.S., Albrigo, L.G., 1994. *Citrus*. Redwood Books. Trowbridge, Wiltshire, Great Britain. 254s.

Fao, 2014. Agricultural Statistical Database. <http://www.fao.org>

Frearson, E.M., Power, J.B., Cocking, E.C., 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev. Biol.*, 33:130-137.

Grosser, J.W., Gmitter, F.G. Jr, 2011. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104: 343-357.

Grosser, J.W., Louzada, E.S., Gmitter, F.G., Chandler, J.L., 1994. Somatic hybridization of complementary citrus rootstocks: Five new hybrids. *Hortscience*, 29(7): 812 - 813.

Nagata, T., Takede, H., 1984. Isolation and culture of protoplast tobacco. In: Vasil L (Ed.). *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants*, 328-337. Academic Press, NewYork- London.

Rasheed, J.H., Al-Mallah, M.K., Cocking, E.C., Davey, M.R., 1990. Root hair protoplasts of *Lotus corniculatus* L. (birdsfoot trefoil) express their totipotency. *Plant Cell Rep* 8:565-569.

Saker, S.S., Neuman, K.H., Badawy, E.M., El-bahr, M.K., Taha, H.S., 1999. Isolation and culturing of protoplasts from *Hypericum perforatum* L. Arab. J. Biotech., 2:227-234.

Saxena, P.K., Gill, R., Rashid, A., 1987. Optimal conditions for plant regeneration from mesophyll protoplasts of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Scientia Horticulturae*. 31(3):185-194.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan genotipler ve Latince isimleri

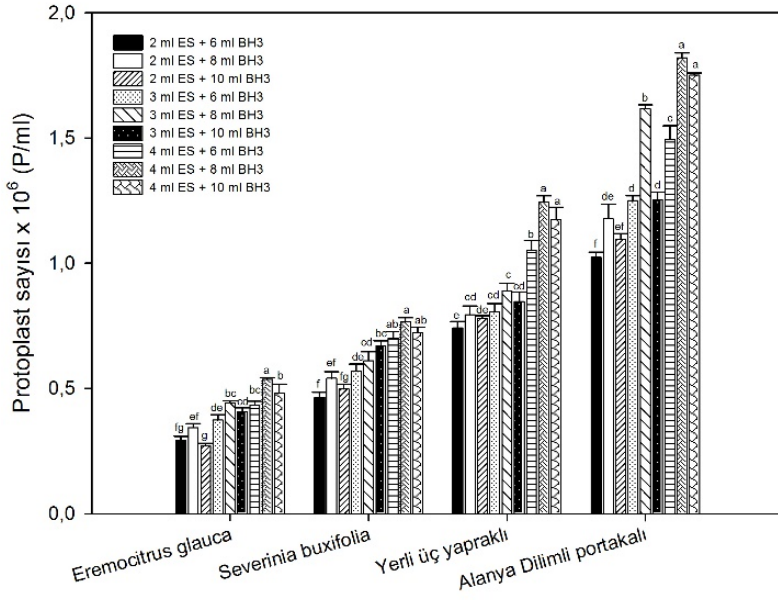
Genotip	Latince adı	Kaynak
Yerli üç yapraklı	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	TGK0633 ^z
Alanya Dilimli portakalı	<i>Citrus sinensis</i> (L) Osbeck	TGK0915
Chinese box orange	<i>Severinia buxifolia</i> (Poir.) Ten.	TGK0964
Australian desert lime	<i>Eremocitrus glauca</i> (Lindl.) Swingle	TGK1076

^zTGK: Turunçgil Genetik Kaynakları'na kayıtlı kod numarasını belirtir.

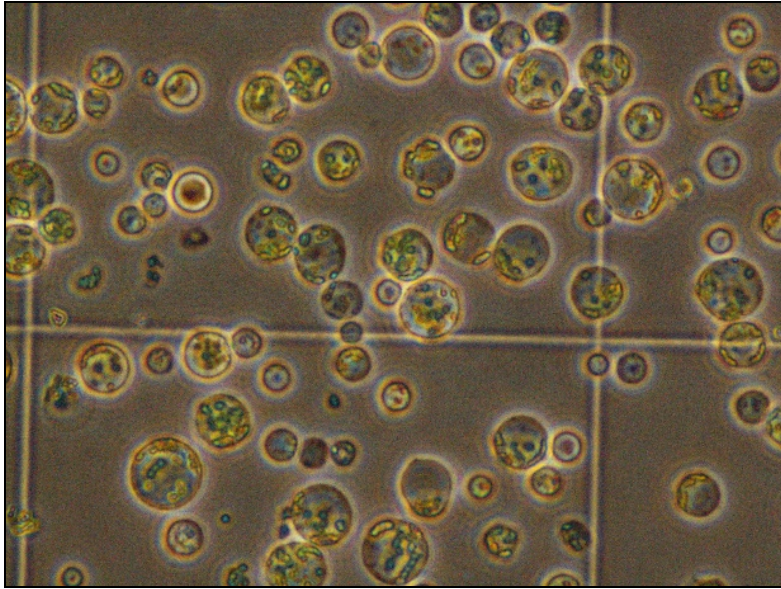
Çizelge 2. İzole edilen protoplast miktarı (protoplast/ml) verilerine uygulanan varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	Df	KT	F	P değeri
Genotip	3	14.89	6382.50	0.0001**
Enzim solusyonu	2	2.18	1402.16	0.0001
Besin ortamı	2	0.31	200.80	0.0001
Genotip x Enzim solusyonu	6	0.52	111.35	0.0001
Genotip x Besin ortamı	6	0.15	32.79	0.0001
Enzim solusyonu x Besin ortamı	4	0.04	11.51	0.0001
Genotip x Enzim solusyonu x Besin ortamı	12	0.11	12.08	0.0001
Hata	72	0.06		

** $P \leq 0.01$ göre önemli



Şekil 1. Farklı seviyelerdeki enzim ve besin ortamlarıyla oluşturulan izolasyon koşullarının bazı turuncğil genotiplerinden yaprak mezofil protoplast izolasyonuna etkileri. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey testi ($\alpha=0.05$) ile karşılaştırılmıştır. Barlar ortalamanın standart hatasını gösterir.



Şekil 2. Alanya Dilimli portakalı yapraklarından 4 ml ES + 8 ml BH3 izolasyon koşullarında elde edilmiş protoplastlara ait sayım aşamasındaki görüntüler.