

Kavunda (*Cucumis melo* L.) poliploid bitki eldesinde farklı eksplantların etkisinin belirlenmesi

Fatma Burcu ÇELİKLİ¹, Esmenur DEMİREL¹, Ahmet Naci ONUS¹

¹Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü ANTALYA

Alınış tarihi: 14 Ekim 2016, Kabul tarihi: 30 Kasım 2016

Sorumlu yazar: Fatma Burcu ÇELİKLİ, e-posta: burcucelikli@akdeniz.edu.tr

Öz

Türkiye 29.3 milyon ton sebze üretimi ile dünyada önemli bir ülke konumundadır. Cucurbitaceae familyasına ait sebze türlerinden biri olan kavun (*Cucumis melo* L.), bu familya içerisinde ülkemizde üretim bakımından 1.72 milyon ton ile karpuz ve hıyardan sonra üçüncü sırayı almaktadır. Sebze türlerinin ekonomik yararları göz önüne alındığında genetik yapılarını değiştirerek iyileştirmeye olanak sağlayan ıslah çalışmaları günümüzde hız kazanmaktadır. Genetik materyal olarak poliploidlerin kullanımı son yıllarda dikkat çekmeye başlamıştır. ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere Ananas tipi kavun eksplantlarından poliploid bitkilerinin eldesi üzerine yapılan bu çalışmada etkili bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Tepe sürgünü, yan sürgün ve direkt tohum ekimi olarak üç farklı uygulama yapılmıştır. Çalışma için tepe ve yan sürgünler 7 gün kolhisin içeren katı besi ortamında muamele edildikten sonra kolhisinsiz + BAP(1 µM) yeni ortama (M2) aktarılmıştır. Direkt tohum uygulamasında ise; tohumların kabukları çıkarıldıktan sonra embriyoları 6 saat kolhisin çözeltisinde bekletilmiş ve sonra kolhisinsiz katı besi ortamına (M1) aktarılmıştır. Deneme sonucunda ploidi seviyeleri stomaların bekçi hücrelerindeki kloroplastlar sayılarak belirlenmiş olup tepe sürgününden %22.6, yan sürgünden %21.1 ve direkt tohumdan %66.0 oranında tetraploid bitkiler elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Kavun, tetraploid, ıslah, *Cucumis melo* L.

A study on determining efficient method to obtain polyploid melon (*Cucumis melo* L.)

Abstract

Turkey is an important vegetable producer country with 29.3 million tons production. Melon (*Cucumis melo* L.), belongs to Cucurbitaceae family, comes third after watermelon and cucumber in Turkey with 1.72 million tons production. Breeding studies based on changing genetic structure of genome have been gaining importance and in recent years and obtaining polyploid plants has a great importance in that sense. Present study was conducted to develop an effective protocol on obtaining polyploid plants in Ananas type melon. To serve the purpose three different explants were practiced by using apical shoots, lateral shoots and direct application to seeds. Apical shoot and lateral shoot explants were cultured in semi-solid media, supplemented with colchicine (M3) (0.01%) for 7 days and then transferred to colchicine free fresh nutrient media (M2) supplemented with BAP (1 µM). For the seed explants, the seed coats were removed then embryos were treated in colchicine solution for 6 hours and then embryos were transferred free colchicine fresh nutrient media (M1). Ploidy levels were determined by counting chloroplast number in guard cells of stomas. Tetraploid plantlet percentages were 22.6%, 21.1% and 66.0% for apical shoot, lateral shoot and direct seeds, respectively.

Key words: Melon, tetraployploid, breeding, *Cucumis melo* L.

Giriş

İslah programlarında genetik çeşitliliğin dar olması bazı ürünlerden beklenen genetik ilerleme oranını sınırlandırmaktadır (Ulukapı ve Onus, 2013). Poliploid bitkilerde gen sayısının artması ile genetik varyasyon artmakta ve yeni kombinasyonlar ortaya çıkmaktadır. Yeni kombinasyonların artması ile birlikte hastalıklara, herbisitlere, soğuğa, sıcağa, tuz ve su stresine karşı daha tolerant ya da dayanıklı hatların elde edilebilme imkanı doğmaktadır. Poliploid bitkiler Cucurbitlerde özellikle karpuzda triploid (tohumsuz) meyve eldesi için kullanılmaktadır. Poliploid bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar triploid hatların birtakım hastalık ve zararlılara daha dayanıklı olduğu sonucuna varmışlardır. Batra (1952)'nin da belirttiği üzere, Blakeslee ve Shifriss (1941) araştırmacılarının yapmış oldukları çalışmalarında tetraploid sebzelelerin yaşam gücünün daha yüksek olduğunu ve daha yüksek verimde daha büyük meyveler üretilebildiğinden bahsetmişlerdir. Yani poliploidler biyotik (canlı) veya abiyotik (cansız) stres koşullarına daha dayanıklı hatların elde edilmesi dışında daha iri meyveli daha kaliteli bitkilerin elde edilmesine de olanak sağlamaktadır. Bunlara ek olarak süs bitkilerinde daha iri çiçekler elde edilmek için de kullanılabilir (Chen ve Goeden-Kallemeyn, 1979; Chen ve ark., 2006).

Bitkilerde poliploid oluşumu geleneksel olarak kolhisinin kullanılması ile elde edilir. Kolhisinin mitozun anafaz aşamasında iğ ipliklerinin oluşumunu engellediği bilinir (Hancock, 1997). Kromozom katlanır ama hücre bölünmesi engellendiğinden poliploid hücreler oluşur (Chen ve ark., 2006). Bu çalışmanın amacı islah çalışmalarında kullanılmak üzere poliploid bitkiler elde edilmesinde in vitro koşullarda farklı Ananas tipi kavun eksplantlarının etkilerini araştırmaktır.

Materyal ve Yöntem

Araştırmada bitkisel materyal olarak Ananas tipi kavun tohumları ve bu tohumlardan elde edilen bitkicikler kullanılmıştır.

Bitki materyali

Çalışmada her üç eksplant için 3 tekrarlı deneme kurulmuştur. Her bir denemede tepe sürgünü, yan sürgün ve direkt tohum için 20'şer adet kavun tohumu kullanılmıştır. Tohumlar %20'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 25-30 dk tutulup 3 kere distile suyla durulanarak dezenfekte edilmiştir. Dezenfekte edilen tohumlar steril filtre kağıdı üzerine konularak kurutulmuştur. Tohumlar ilk olarak MS besi ortamına koyulmuş ve 28°C de inkübe edilerek çimlenmeleri sağlanmıştır. Çimlenen bitkiciklerden elde edilen tepe ve yan sürgünler araştırma için eksplant olarak kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Bitki eksplantları; a) tepe sürgünü, b) yan sürgün, c) kolhisin uygulanan tohumdan çimlenen bitkicikler

Kullanılan ortamlar ve içerikleri

M1: Murashige and Skoog (1962) (MS)besi ortamı

M2: MS + BAP (1 µM)

M3: MS+ BAP (1 µM) + Kolhisin (%0.01)

Besi ortamları Raza ve ark. (2003)'nın çalışmasındaki konsantrasyonlar göz önüne alınarak belirlenmiştir. Şişe içerisindeki besi ortamları otoklavlandıktan sonra BAP ve kolhisin filtre sterilizasyonu sonrası eklenmiştir. .

Yöntem**1. Uygulama: Tepe sürgününün alınması**

20 adet tohumdan yaklaşık 20 bitkicik oluşmuştur. Her bitkicikten bitkicik sayısı kadar tepe sürgünü meydana gelmiştir. Tepe sürgünleri 1 µM BAP ve %0.01 oranında kolhisin M3 besi ortamına dikilerek 7 gün muamele edilmiştir. 7 günün sonunda eksplantlar M2 ortamına aktarılmıştır.

2. Uygulama: Yan sürgünün alınması

Oluşan tepe sürgünü sayısının ortalama 2 katı kadar yan tomurcuk meydana gelmiştir. Yan sürgünler de tepe sürgünlerinde olduğu gibi önce M3 besi ortamında 7 gün bekletilmiş daha sonra M2 besi ortamına aktarılmıştır.

3. Uygulama: Tohumlara kolhisin uygulanması

20 adet tohum %20'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 25-30 dk tutulup 3 kere distile suyla durularak dezenfekte edilmiştir. Daha sonra tohumlar steril filtre kağıdı üzerine koyularak kurumaları sağlanmıştır. %0.01 oranındaki kolhisin çözeltisinde 24 saat muamele edilmiştir. Kolhisin uygulanan tohumlar M1 ortamına ekilmiştir. Fakat tohum kabuğundan kaynaklanan enfeksiyondan dolayı hiçbir bitki elde edilememiştir. Bu nedenle tohum kabuğu uzaklaştırılarak embriyolar çıkarılmış ve materyal olarak kullanılmıştır. Tohum sterilizasyonu için 100 ml beher kap içerisine %20'lik sodyum hipoklorit çözeltisi, 20 adet tohum ve bir adet mıknaşlı balık koyularak vortex üzerinde 30 dk karıştırılmıştır. Süre sonunda beher steril kabin içerisine alınıp 2 kere otoklavlanan distile su ile 3 kere durulanmıştır. Tohumlar steril filtre kağıdının üzerine alınıp, steril pens ve bistürü yardımı ile kabukları uzaklaştırılmıştır. Embriyoları % 0.01 lik kolhisin çözeltisinde 6 saat muamele

ettikten sonra distile su ile durulanmıştır. Filtre kağıdı üzerinde kurutulan embriyolar M1 besi ortamına ekilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

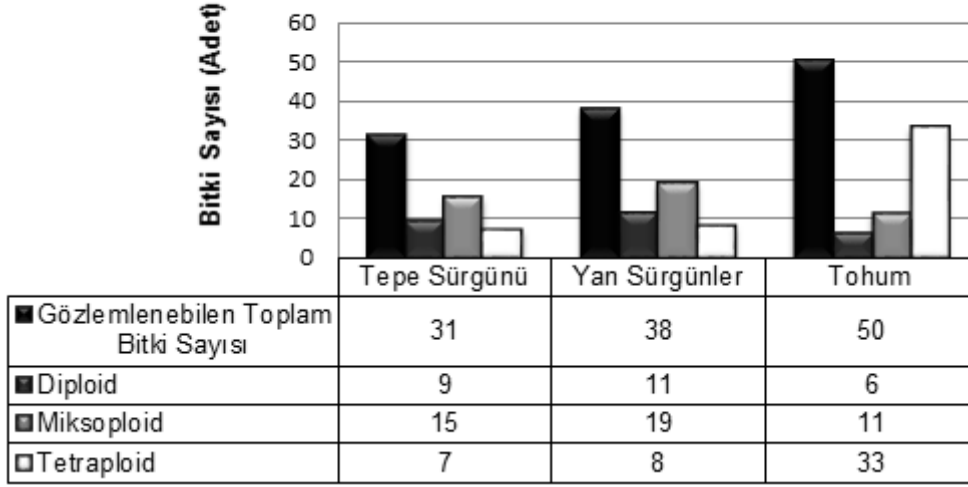
Bulgulara göre her bir eksplant türü (tepe sürgünü, yan sürgün, direkt tohum) için 60 örnek ile üç deneme kurulmuştur. Tepe sürgünü ve yan sürgünleri için kullanılan 60 adet tohum M1 besi ortamına ekilmiştir. Çimlenen ve yaklaşık olarak 3 boğum arası oluşturacak kadar uzayan bitkiciklerden ancak 37 adeti işleme tabii tutulmuştur. Enfeksiyon ve çimlenememe problemlerinden dolayı kayıplar yaşanmıştır. Kolhisin ilave edilmiş M3 ortamında 7 gün tutulduktan sonra, M2 ortamına aktarılan tepe sürgünlerinden 31 adeti kurtarılabildiği görülmüştür.

Yan sürgün için ise toplamda 60 adet tohum ekilmiştir. Fakat herbiri 3 boğum arası oluşturacak kadar uzayamadığından ya da enfeksiyondan dolayı eksplant sayısı tahmin edilen düzeyde olmamıştır. Bu nedenle 64 adet yan sürgün denemede kullanılabildiği görülmüştür. Sürgünler tepe sürgününde olduğu gibi önce M3 besi ortamına 7 gün sonra M2 besi ortamına aktarılmıştır. Yan sürgünlerden bitkiye dönüşenlerin sayısı ise 38 adettir.

Tohum uygulamasında %0.01 oranında kolhisin çözeltisi içerisinde önce 24 saat olarak belirlenen süre tohum kabuklarının uzaklaştırılmasından sonra direk olarak embriyolar için 6 saat olarak belirlenmiştir. 6 saat sonrası 3 kere distile edilmiş su ile durulanan 60 adet tohumdan 50 adeti çimlenerek bitkiciğe dönüşmüş ve uygulama değişikliği sonrası hiçbir enfeksiyon problemi yaşanmamıştır.

Stoma sayımı yapılan 31 adet tepe sürgününden gelişen bitkilerden 9'u diploid, 15'i miksoptloid ve 7'si tetraploid olarak belirlenmiştir. 38 adet yan sürgünden bitkiye dönüşen diploid bitki sayısı 11, miksoptloid 19 ve tetraploid 8 adettir. Kolhisin çözeltisinde 6 saat bekletilen embriyolardan gelişen 50 adet bitkicikten 6 adeti katlanmamış yani diploid, 11'i miksoptloid ve 33'ü tetraploidtir (Şekil 2). Çalışmada tepe sürgününden %22.6, yan sürgünden %21.1 ve direkt tohumdan %66 oranında tetraploid bitkicik elde edilmiştir.

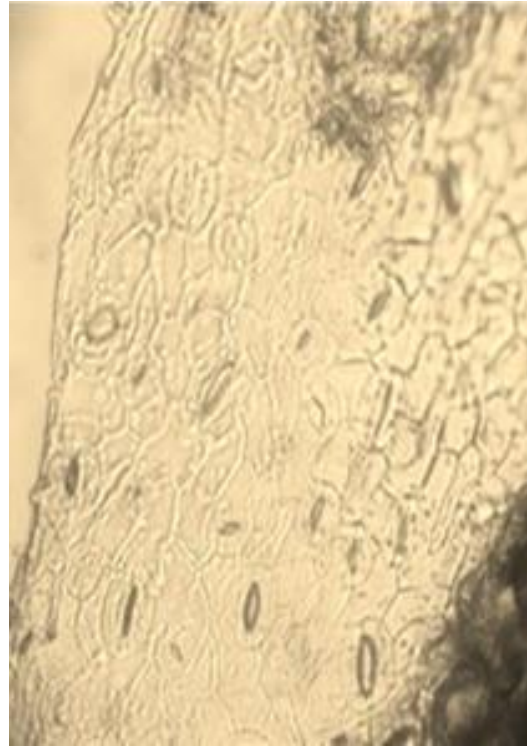
Eksplant Türüne Göre Ploidi Seviyesi



Şekil 2. Üç uygulama sonucunda elde edilen bitkiciklerin ploidi durumu.

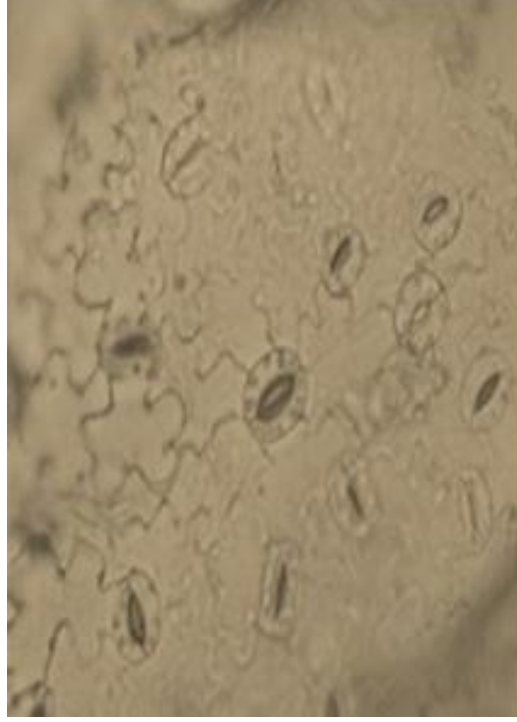
Tepe ve ark. (2002) belirttiğine göre Bugaenko ve ark. (1988) nin yaptıkları çalışmada poliploidlerin başlangıç bitkilerine göre morfolojik olarak farklılıklara sahip olduğunu, çiçeklerinin tüylülük durumunun, stoma bekçi hücreleri büyüklüğünün, yapraklardaki pigment yoğunluğunun farklılık gösterdiği bildirmişlerdir. Stomalarında bulunan kloroplast sayısına göre ploidi seviyesi

belirlenmiştir. Ploidi seviyelerine göre stoma yapılarındaki farklılık Şekil 3'te gösterilmiştir. Çalışmada in vitro ortamda gelişen bitkiciklerde katlanan tetraploid bitkilerin yaprakları diploid ve miksoploidlere göre daha tüylü olduğu, erken dönemde sülük oluştuğu ve gövdelerinin daha kalın olduğu gözlemlenmiştir.



(a)

Şekil 3. Eksplantların stomaları; a) mixoploid stoma, b) diploid stoma, c) tetraploid stoma.



(b)

Şekil 3. Eksplantların stomaları; a) mixploid stoma, b) diploid stoma, c) tetraploid stoma (devamı).



(c)

Şekil 3. Eksplantların stomaları; a) mixploid stoma, b) diploid stoma, c) tetraploid stoma

Sonuç

Araştırmada üç ayrı uygulama içerisinde tetraploid bitki elde edilmiştir. Araştırmada diğer iki uygulamada mikroploid oranının daha yüksek olduğu ve kolhisin eklenmiş MS besi ortamında bekleme süresinin birkaç saat daha uzatılabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Batra, S., 1952. Induced Tetraploidy In Muskmelons. The Journal Of Heredity, 43 (3): 141-148.
- Blakeslee, A. F., 1941. American Naturalist 75:117-135.
- Bugaenko, L.A., Davydova, O.A., Rodov, V.S., Gladun, S.M., 1988. Production Poliploid Plants of Mint Using In vitro. Biologiye Kul' Tiviruemkh Letok I Biotekhnologiya, 1 (Ed: Butenko, R. G. J. 1988, 91, Novosibirsk, Ussr)
- Chen C.H., Goeden-Kallemeyn, Y. C., 1979. In Vitro Induction of Tetraploid Plants from Colchicine-Treated Diploid Daylily Callus. Euphytica, 28 (1979): 705-709.
- Chen, L., Wang Y., Zhao, M., 2006. In vitro Induction and Characterization of Tetraploid *Lychnis senno* Siebold Et. Zucc. Hortscience, 41 (3) : 759-761.
- Hancock, J., 1997. The Colchicine Story. Hortscience, 32: 1011-1012.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth And Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Raza, H., Jaskani, M.J., Khan M.M., Malik, T.A., 2003. In vitro Induction of Polyploids In Watermelon and Estimation Based on Dna Content. International Journal of Agriculture & Biology, 05 (3): 298-302.
- Tepe, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., Yenice, N., Tıprıdamaz, R., 2002. In vitro Kolhisin Uygulaması ile Poliploid Nane (*Mentha longifolia* L.) Bitkilerinin Elde Edilmesi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 15 (2): 63-69.
- Ulukapı K., Onus A. N., 2013. Selekte Edilmiş Bazı Yerel Taze Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotiplerinin Moleküler Karakterizasyonu. Tarım Bilimleri Dergisi, 18 (2012): 277-286.