

Sebzelerde Abiyotik Streslere Tolerans Çalışmaları: Karnabahar Örneği

Fatih Hancı¹, Esra Cebeci¹, Hail Rihan², Fadil Al-Swedi², Mick Fuller²

¹Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, 77102, Yalova

²Plymouth University, School of Biological Sciences, Plymouth, United Kingdom

e-posta: tanerfatih@gmail.com

Özet

Bahçe bitkileri ıslahı, geleneksel olarak hastalık ve zararlılara dayanıklılık/tolerans üzerine yoğunlaşmıştır. Bunun neticesi olarak, çok sayıda dayanıklı/tolerant çeşit veya germplazm ortaya çıkmış ve kullanılmaya başlanmıştır. Oysa abiyotik streslere (yüksek sıcaklık, soğuk, kuraklık, tuzluluk vb.) tolerans ile ilgili çalışmalar gerekli ilgiliyi görememiştir. Ancak bu durum, küresel ısınmayla ilgili ortaya konan gerçekler ve kamuoyunun bilinçlenmesi sonucu giderek değişmeye başlamıştır. Hazırlanan bu çalışmada, Plymouth Üniversitesi'nde (İngiltere), "Sebzelerde Abiyotik Streslere Tolerans Islahı" konulu uygulamalı eğitim kapsamında bizzat yer aldığımız çeşitli projeler hakkında bilgiler verilmiştir. Model bitki olarak karnabaharın kullanıldığı bu çalışmalar, ağırlıklı olarak moleküler temelli ve laboratuvar koşullarında yürütülmüştür. Soğuk stresi ile ilgili molibden uygulamalarının etkileri, gen aktarımı, gen ekspresyonu ve suni tohum üretimi çalışmaları ana konuları içermektedir.

Anahtar kelimeler: Abiyotik stres, sebze, tolerans, ıslah

The Studies to Abiotic Stress Tolerance on Vegetables: Example of Cauliflower

Abstract

The breeding of horticultural crops has traditionally focused on enhancing a plant's ability to resist diseases or insects. As a result of this situation, large number of disease-or insect-resistant cultivars or germplasm released and used. Whereas, research on crop resistance or tolerance to abiotic stresses (heat, cold, drought, salt, etc.) has not received much attention. However, that is increasingly changing because of the facts and publicity of global warming. In this study, information is given about the various project as part of practical course: "Breeding for abiotic stress tolerance on vegetables-Plymouth University-United Kingdom". This studies which cauliflower was used as model plant, were held molecular based and under laboratory conditions. The main topics were the effect of molybdenum on cold stress, genetic transformation, artificial seed production.

Keywords: Abiotic stress, vegetable, tolerance, breeding

Giriş

Modellenmesi ve gidişatı üzerine farklı görüşler ortaya konmuş olmasına rağmen, küresel ısınma, geniş kitleler tarafından kabul edilmiş bir gerçek haline gelmiştir. Bu şekilde dengesi bozulmuş bir iklim, bir çok bahçe bitkisi için, özellikle de serin iklim sebzelerine tehdit oluşturmaktadır. Küresel ısınma, uniform yapıda değildir ve bazı durumlarda ekterm sıcaklık değişiklikleri anlamına da gelebilmektedir. Genel anlamda küresel ısınma sıcaklık ortalamalarındaki artış olarak algılsa da, bazı bölgeler veya bazı mevsimler için, bugüne kadar kaydedilmemiş düşük sıcaklıklar da görülebilmektedir. Küresel ısınmaya bağlı olarak, nispeten daha ılık geçen ilkbahar günlerinin bitki gelişimini hızlandırdığı dönemde yaşanan ani sıcaklık düşüşleri, bitkilerde şiddetli zararlanmalara yol açabilmektedir. Bu nedenle düşük sıcaklık

birçok ürün için önemli bir stres kaynağı olarak kabul edilmektedir (Mou, 2011).

Bitkiler yetiştirme dönemleri boyunca değişik stres koşulları ile karşılaşılır. Stres altında bitkilerin gelişimleri, metabolizmaları ve verimleri önemli ölçüde etkilenir. Kuraklık, yetersiz beslenme, besin maddesi fazlalığı, tuzluluk, düşük ve yüksek sıcaklık, toprak ve atmosfer kirliliği ve radyasyon bitkisel üretimde verimi sınırlandıran temel abiyotik streslerdir (Lawlor ve Cornic, 2002).

Tarımsal üretimde, soğuk stresinin önemi giderek artmış ve bunun bir neticesi olarak araştırmacılar tarafından kapsamlı şekilde ele alınmaya başlanmıştır. Amacı, bitkilerde soğuk stresine toleransı arttırmak olan, klasik yöntemlerle veya moleküler uygulamaları kapsayan, farklı türlerde bir çok bilimsel çalışma uygulanmaya konmuştur (Szalai ve ark., 2001). Soğuk iklimasyonu süresince oluşan biyokimyasal değişimler, bitki özyuvarında

çözünebilen maddelerin değişimi, membran lipit bileşimindeki, protein miktarında, enzim aktivitesinde, antioksidant sisteminde değişim ve bitki besin elementi içeriğinde meydana gelen biyokimyasal değişimler bitkilerin düşük sıcaklığa dayanıklılık mekanizmalarında oldukça önemli olduğu bildirilmektedir (Aslantaş ve ark., 2010).

Latince *Caulis* ve *flower* kelimelerinden oluşan karnabahar (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) *Brassicaceae* familyasına ait iki yıllık bir sebze türü olup, sarımsıtrak beyaz, beyaz ve nadiren mor renkli çiçek tablaları için yetiştirilir. Düşük yağ içeriği nedeniyle önemli bir diyet sebzesidir. A ve C vitaminlerinin yanı sıra, fitokimyasal bileşiklerce de zengin içeriği sayesinde insan sağlığı ve beslenmesi açısından, önemli türlerden biridir (Vural ve ark., 2000; Kirsh ve ark., 2007). Karnabaharın ana vatanı Akdeniz Bölgesi olarak kabul edilmektedir. Buradan Atlantik kıyıları boyunca yayılmıştır. Akdeniz Bölgesinde M.Ö. 600 yıllarında insanlar tarafından tüketildiği tahmin edilmektedir (Thomson, 1976). Karnabahar iklim istekleri bakımından kışık sebzeler arasında yer almaktadır. Ancak karnabahar yetiştiriciliğinde sıcaklığın önemi ılık ve neme göre çok fazladır. Karnabaharın gelişimi ve taçların oluşumu üzerine ışığın etkileri bilinmemektedir. Bu nedenle karnabahar bitkisi nötr gün bitkisi olarak kabul edilir (Günay, 1984). Fide döneminde sıcaklığın yükselip azalması bitkilerde taçların kalitesinin bozulması yönünde etkili olur. Bu koşullarda yetiştirilen bitkilerin gelişmesi yavaşlar, yaprakları küçülür ve taçlar dağınık olarak gelişirler. Sonbahar ve kış dönemi dikimlerinde sıcaklığın 0°C'nin altına düşmesi ile bitkilerde büyüme ucu zarar görür ve bitkiler sadece yaprak meydana getirirler. Bunun yanında fideler birkaç yapraklı iken sıcaklık düşerse bitkilerin büyüme ucu kaybolur. Bu bitkilere kör bitki adı verilmektedir. Kör bitkilerin yaprakları karbonhidrat depolanması nedeniyle normal yapraklardan daha kalın ve sert yapılı olurlar. Hasat dönemine gelmiş bitkiler, fidelere göre düşük sıcaklıklara karşı daha duyarlıdır. Taçlar pazar olgunluğu dönemine geldiğinde sıcaklığın 0°C'nin altına düşmesi taç yüzeyinde havlı bir yapının oluşmasına neden olur. Düşük sıcaklığın devam etmesi halinde taçlarda morlaşma

meydana gelmekte ve bu taçların pazar değeri düşmektedir (Vural ve ark., 2000).

Bu çalışmada, 14.06.2005 tarih ve 25845 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanarak yürürlüğe giren, "Yetiştirilmek Amacıyla Yurt Dışına Gönderilecek Devlet Memurları Hakkında Yönetmelik" ve 30.10.2005 tarih ve 25981 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan ve 28.09.2008 tarih ve 27011 sayılı Resmi Gazete'de değişikliği yayımlanan, "Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Memurlarının Yetiştirilmek Amacıyla Yurt Dışına Görevlendirilmesi Hakkında Yönetmelik" doğrultusunda, 2011 yılında Plymouth Üniversitesi-İngiltere'de düzenlenen, Sebzelerde Abiyotik Streslere Tolreanslılık Islahı" konulu eğitimde üzerinde çalışılan konular hakkında bilgiler paylaşılmıştır.

Eğitime Ait Uygulama Konuları

Kurs çalışmaları 3 farklı başlık altında eş zamanlı olarak yürütülmüştür:

a) Karnabaharda *in vitro* koşullarda mikrosürgün oluşturma çalışmaları (Rihan ve ark., 2011a).

b) Karnabaharda gen aktarımı çalışmaları (Al-Swedi, 2013).

c) Karnabaharda yapay tohum üretimi (Rihan ve ark., 2011b).

Tüm bu çalışmalarda ortak hedef, karnabahar bitkisinde abiyotik streslere, özellikle de soğuk stresine toleransı artırmak şeklinde belirlenmiştir.

Karnabaharda *in vitro* koşullarda mikrosürgün oluşturma çalışmaları

Bu kurs uygulamasında İngiltere'nin güney batı bölgesinde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan 'White Cloud' çeşidi kullanılmıştır. 16 gün boyunca sıvı besi ortamında yetiştirilmiş mikrosürgünler, eğitim uygulamasında kullanılmıştır. Bunun için hasat olgunluğuna gelmiş karnabahar başları, hava akımlı streil kabin içinde, yaklaşık 15-20 gr lık parçalara ayrılmış, daha sonra bu parçalar %10'luk hipoklorit (%0.06) çözeltisinde 15 dakika bekletilmiş, daha sonra üst doku bistüri vasıtasıyla soyularak uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan kısımlar daha derin olarak kesilmiş ve blendır kullanılarak iyice parçalanmıştır. Elde edilen sıvı, 212, 300 ve 600 µm çapındaki eleklerle süzölmüş, son kalan eksplant kaynağından 100 µl örnek, 30 ml hacmindeki

sıvı besisi ortamına aktarılmıştır (2 mg/L Kinetin, 1 mg/L IBA ve 1 ml/L of PPM (plant preservative mixture) ve 1 mg/L 2,4D). bu aşamada, besisi kaplarının bir kısmına 15 ppm oranında Molibden (Mo) uygulanmıştır. Ağzıları kapatılan steril kaplar, dakikada 150 devir ile yarım dönüş yapan çalkalayıcı üzerine dizilmiştir. Çalkalayıcı, 20°C ortam sıcaklığı ve 16 saat aydınlık (80 µmol m²) ortamda bekletilmiştir (Rihan ve ark., 2012). 16 gün boyunca gelişmesi beklenen mikrosürgünler, -2, -4, -6, -8, -10 ve -12°C' de 2 saat süreyle bekletilmiş, bu sürenin sonunda ortamların elektriksel iletkenlik seviyeleri (EC₁) ölçülmüştür. Ölçüm işleminin ardından tüm örnekler otoklavlanmış, soğumayı takiben tekrar elektriksel iletkenlik ölçümleri yapılmıştır (EC₂). EC₁ ve EC₂ değerleri kullanılarak uygulamalar arasında fark olup olmadığı anlaşılmaya çalışılmıştır. EC₁/EC₂ oranı ile tolerans seviyesi arasında negatif korelasyon olduğu kuralına istinaden, molibden uygulamalarının, -2, -4, -6, -8°C'de mikrosürgünlerin canlılıklarını korumalarına sebep olduğu anlaşılmıştır.

Gen aktarımı çalışmaları

Sürgün içeren meristematik dokular, bir önceki eğitim uygulamasında olduğu gibi sıvı besisi ortamında büyütülmüş böylece aseptik eksplantlar elde edilmiştir. Daha sonra bu eksplantlar, çeşitli oranlarda (2 mg/L kinetin ve 1 mg/L IBA) büyüme düzenleyici ihtiva eden Murashige ve Skoog (MS) besisi ortamlarında sürgün elde etmek amacıyla inkübasyona alınmıştır. Gen aktarımı çalışmalarında *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin EHA105 ırkı kullanılmıştır. Vektör olarak antioksidant geni Ascorbate peroxidase (APX) içeren pPRTL2 plasmidi kullanılmıştır. Çalışmada, kanamycine resistant neomycin phosphotransferase II (*npII*) markır geni ve glucuronidase (GUS) reporter geni kullanılmıştır. Pozitif seleksiyon ortamı olarak 50 mg/L kanamycin antibiyotiği içeren MS ortamı kullanılmış, hayatta kalan dokular GUS testlemesine alınmıştır. Aktarım işleminin tamamlanmasının ardından, ortamdaki *A. tumefaciens*' lerin elemine edilmesi için, carbenicillin ve cefotaxime kullanılmıştır.

Karnabaharda yapay tohum üretimi

In vitro koşullarda bir bitki oluşturabilme kabiliyetine sahip ve depolanabilen somatik embriyo, sürgün tomurcukları, hücre agregatları

veya herhangi bir bitki dokusunun yapay olarak kaplanmasına sentetik tohum denir (Redenbaugh ve ark., 1984). Bu eğitim çalışmasında bitkisel materyal olarak 16 günlük karnabahar mikrosürgünleri kullanılmıştır. İlk eğitim konusunda bahsedilen protokole göre elde edilmiş mikrosürgünler, %2' lik sodyum aljinat (C₆H₇NaO₆) kullanılarak kapsül içine alınmıştır. Sodyum aljinat kullanılmasının en önemli sebebi, uzun süre saklanabilmesi, hızlı jelleşme ve CaCl₂ ile damla formunda yapı oluşturabilmesidir. Bu işlem için sıvı MS ortamı kullanılmıştır. Ardından mikro sürgünler geniş ağızlı pipet kullanılarak 15 g/L dehydrate kalsiyum klorid ile 20 dakika boyunca muamele edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan sentetik tohumlar, farklı abiyotik stres koşulları altında (özellikle kuraklık ve tuzluluk) çıkış performanslarının belirlenmesi amacıyla testlemelere alınmıştır.

Sonuç

Bitki yetiştiriciliği için abiyotik stres kaynakları, oldukça çeşitlilik göstermektedir. Bu nedenle, dünya'nın farklı iklim koşullarında yer alan birçok araştırma grubu, değişik stres koşulları için çalışma programları uygulamaya koymaktadır. İngiltere gibi, yıl boyu belli sınırlar içerisinde ılıman iklime sahip, neredeyse tüm tarım alanlarının yıllık yağış ortalamaları yüksek olan ülkelerde dahi, küresel ısınmanın giderek artan olumsuz etkileri gözlenebilmektedir. Özellikle, düşük sıcaklık, aşırı toprak nemi ve yaz aylarında yaşanan ani ve alışılmadık sıcaklık yükselmeleri, eğitimin yapıldığı güneybatı İngiltere için güncel problemleri oluşturmaktadır. Burada bahsedilen araştırma faaliyetleri, Plymouth Üniversitesi, Biyoloji Bilimleri Fakültesi'nde yürütülmekte olup, diğer Üniversiteler, Araştırma Kuruluşları ve Çiftçi Örgütleriyle de ilişkileri mevcuttur.

Teşekkür

Bahsedilen eğitim faaliyeti ile ilgili olarak T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü ve Avrupa Birliği ve Dış İlişkiler Genel Müdürlüğü idareci ve personeline teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Al-Swedi, 2013. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis) using agrobacterium tumefaciens as a vector for improved stress resistance. Doctoral Thesis. Faculty of Science and Technology, University of Plymouth. <http://hdl.handle.net/10026.1/1531>
- Aslantaş, R., Karakurt, H., Karakurt, Y., 2010. Bitkilerin düşük sıcaklıklara dayanımında hücresel ve moleküler mekanizmalar. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 41 (2): 157-167.
- Günay, A., 1984. Özel Sebze Yetiştiriciliği. Cilt III. A.Ü. Ziraat Fakültesi Çağ Matbaası. Ankara.
- Kirsh, V.A., Peters, U., Mayne, S.T., Subar, A.F., Chatterjee, N., Johnson, C.C., Hayes, R.B., 2007. Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer. Journal of the National Cancer Institute 99 (15): 1200-9.
- Lawlor, D.W., Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. Plant Cell Environ., 25:275-294.
- Mou, B., 2011. Improvement of Horticultural Crops for Abiotic StressTolerance: An Introduction Hortscience Vol. 46(8).
- Redenbaugh, K., Nichol, J., Kossler, M.E., Paasch, B., 1984. In vitro, 20:256- 257.
- Rihan, H.Z., Al Shamari, M., Fuller, M.P., 2011a. The production of cauliflower microshoots using curd meristematic tissues and hypocotyl-derived callus. In VII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 961. pp. 427-434
- Rihan, H. Z., Al-Issawi, M., Burchett, S., Fuller, M.P., 2011b. Artificial seed production from encapsulated microshoots of cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). In VII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 961 pp. 419-425.
- Szalai, G., Jvea, T., Paldi, E., Dubacq, J.P., 2001. Changes in the fatty acid unsaturation after hardening in wheat chromosome substitution lines with different cold tolerance. J. Plant Physiol., 158: 663-666.
- Thomson, K.F., 1976. Cabbages, Kales, etc. In: Simmonds, N.W (Ed.) Evaluation of Crop Plants. Longman, London. pp.49-52.
- Vural H., Duman, İ., Eşiyok D., 2000, Kültür Sebzeleri, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir.