



KAVUN SOLGUNLUK ETMENİ *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP.MELONIS IRK 1,2'E KARŞI DOKU KÜLTÜRÜ VE MUTASYON TEKNİKLERİ KULLANARAK DAYANIKLI KAVUN TİPLERİNİN SEÇİLMESİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Yaprak Kantoğlu^{1*}, Emine Seçer¹, Kudret Erzurum², Burak Kunter¹, Süreyya Şekerci¹,
Nüket Kayabaşı¹, Mustafa Özçoban¹, İhsan Tutluer¹, Hayrettin Peşkirioğlu¹, Zafer Sağel¹,
Salih Maden², Ruhsar Yanmaz³

^{1*} Türkiye Atom enerjisi Kurumu sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi 06983 Kazan, Ankara

^{2*} Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Dışkapı, Ankara

^{3*} Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Dışkapı, Ankara

Ülkemiz sebze üretiminde önemli bir paya sahip olan kabakgil türleri içinde yer alan kavun (*Cucumis melo* L.), son yıllarda zararlı ve hastalık etmenleri ve özellikle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*'in yol açtığı solgunluk hastalığı nedeniyle ekiliş alanı ve üretim potansiyeli açısından gerileme kaydetmeye başlamıştır. Yürütülen bu araştırma ile *in vitro* mutasyon ve hastalık etmenine ait filitrat uygulamaları ile hastalığa karşı toleranslı/dayanıklı yeni varyasyonların oluşturulması hedeflenmiştir. Araştırma sırasında elde edilen bulgulara göre 21.75 Gy'lik ışın dozunun *in vitro* bitkiler için etkili olduğu araştırma boyunca bu dozun %10 alt ve üst sınırlarının kullanılması gerektiği, bunun yanı sıra filitrat uygulamasında ise %6.73'lük uygulamanın kullanılan farklı bitki parçaları üzerinde olumlu etki yaptığı saptanmıştır. Bu teknikler kullanılarak %6.73 dozunda filitrat uygulaması ve mutasyon yolu ile toplam 123 adet toleranslı bitki *in vitro* koşullarda elde edilmiştir. Bu bitkilerden %16.7'si dış koşullarda yaşama yeteneği göstermiş ve bu bitkilerden alınan toplam 381 adet tohumdan elde edilen bitkilerden 4 adedi dayanıklılık testlerinde belli bir süre yaşama yeteneğini korumuştur. Dolayısı ile bu teknik gelecekte diğer türlerde yürütülmesi planlanan dayanıklılık çalışmaları açısından referans bir anlam taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kavun, Mutasyon, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, Işınlama, Filitrat

* yaprak.taner@taek.gov.tr

INVESTIGATION ABOUT SELECTING STRONG TYPE OF MELONS BY USING MELON PALENESS FACTOR *FUSARIUM OXYSPORUM F.SP.MELONIS* AND MUTATION TECHNIQUES

Fusarium wilt is a vascular disease of the Cucurbitaceae family, especially in muskmelon (*Cucumis melo* L.), caused by the soil fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM). This pathogen persists in the soil for extended periods of time, and the only effective control is the use of resistant varieties. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* is a very serious disease factor for farmers in Turkey. In this research, we show a method for mass-selection of melon mutants resistant to Fusarium wilt. *In vitro* selection of resistant cells, which are come from irradiated and non-irradiated explants, is done using culture filtrates of different FOM races. According to our results we determined effective irradiation doses and filtrate treatment dose by "Linear Regression Analysis". According to our results 21.75 Gy is effective dose for *in vitro* Yuva cv. explants to induce mutation and for filtrate treatment 6.73% is the proper dose to select survive calluses and plantlets. We recommended using 10 and 20 Gy gamma ray doses for *in vitro* melon plantlets to induce mutation by our results. We succeed to regenerate 6% plantlets which were obtained and selected from irradiated plantlets and regenerated in *in vitro* medias which were include 6.73 % filtrate. Although 16.7% of resistant or tolerant plantlets can continue their viability in greenhouse conditions after disease inoculation treatment, we observed 4 plants had a surviving capability in a limited time. That is very important for breeding cycle and this research can lead to the development of new melon cultivars that will be resistant to Fusarium wilt.

Keywords: Melon, Fusarium, Irradiation, Filtrate

1.GİRİŞ

Artan dünya nüfusunun ihtiyaçlarını karşılamak, daha az bir alandan yüksek verim ve kaliteye sahip ürün elde etmek, stres koşullarına, artan hastalık yoğunluğuna dayanıklı tür ve çeşitleri geliştirebilmek amacıyla dünyada ve ülkemizde ıslah çalışmaları hızla yürütülmektedir. Ancak klasik metotlarla sürdürülen çalışmaların uzun bir sürede sonuçlanması nedeni ile, günümüzde yapılmakta olan çalışmalar bitki doku kültürü teknikleriyle entegre olarak planlanmaktadır. 1920'li yıllardan itibaren çalışılan bitki doku kültürü tekniklerinden hücre ve kallus kültürü yöntemleri ile hücrelerin totipotansi özelliklerinin ortaya çıkartılması sonucunda, her hücreden ana bitkinin özelliklerini taşıyan yeni bireyler elde edilerek bitkilerde daha önceden çözümlenemeyen bir takım biyolojik olaylara açıklık getirilmiştir. Günümüzde dayanıklılık ıslahı çalışmalarında kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinden yararlanılarak hastalıklara ve bazı çevresel stres faktörlerine dayanıklı hücreleri seçerek bu hücrelerden dayanıklı bitkiler elde edilmektedir. Ayrıca gerek *in vitro* koşullarda besin ortamına ilave edilen kimyasal mutagenlerle gerekse kültür başlangıcını oluşturacak olan *in vitro* donör bitkilere uygulanan fiziksel mutagenlerle (Co^{60} ya da Cs^{137} ışınlanması ile) mutasyon yaratılarak eldeki mevcut varyasyonun genişletilmesi ve bu varyasyon içinden *in vitro* koşullarda hücresel düzeyde seleksiyon yapılarak istenen özelliklere sahip bitkilerin rejenere edilebilmesi de mümkün olabilmektedir. Bu yöntemler günümüzde oldukça popüler olan genetik modifiye bitkilerin elde edilmesine yönelik çalışmalarla kıyaslandığı zaman, çok popüler görünmeseler bile; tüm dünyada tartışma konusu yaratan transgenik bitki eldesine göre daha düşük bir maliyet gerektiren, insan sağlığı açısından herhangi bir dezavantaj yaratmayan ve daha kısa sürede kesin sonuca ulaşmayı mümkün kılan yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Ülkemiz sebze üretiminde önemli bir paya sahip olan kabakgil türleri içinde yer alan kavun (*Cucumis melo* L.), son yıllarda zararlı ve hastalık etmenleri ve özellikle de *Fusarium oxysporum f.sp. melonis*'in yol açtığı solgunluk hastalığı nedeniyle ekiliş alanı ve üretim potansiyeli açısından gerileme kaydetmeye başlamıştır. 2007 yılı itibarı ile Türkiye'nin toplam üretim miktarı 1 700 000 ton'dur [1]. Geçmiş yıllar ile bu değer karşılaştırıldığı zaman yıllara göre değişmekle birlikte üretim miktarında çarpıcı bir azalma olmadığı ancak özellikle örtü altı tarımında ve son yıllarda tarla üretiminde hastalığa dayanıklı yabancı çeşitlerin ağırlıklı olarak kullanılmaya başlandığı görülmektedir. Özellikle Orta Anadolu Bölgesi'nde üretimde kullanılan yerli çeşitlerimizin dayanıksız olmaları nedeniyle bitkilerin büyük bir kısmı hasat aşamasına gelemeden çökmekte bu da üretici açısından önemli bir kayıp oluşturmaktadır. Bu önemli dezavantajı ortadan kaldırmak amacıyla yerli çeşitlerimize yönelik ıslah çalışmalarına önem verilmesi gerekmektedir. Yaşadığımız bölge olan Orta Anadolu'da bu sorun nedeniyle var olan kavun alanları hızla azalmakta üreticiler yeni arayışlar içine girmektedir. Geçmiş dönemlerden zamanımıza kadar yürütülen çalışmalarda Batı Trakya'da hastalığın 1.2 ırkı, Ege Bölgesi'nde 1 ırkının %57, 1.2 ırkının %35 ve 0 ırkının %6 oranında yaygın olduğu Yıldız [14], Batı Akdeniz Bölgesi'nde ise 0 ve 1-2 ırkları Yücel *et al.* [15] tarafından belirlenmiştir. Erzurum ve ark. [5]'nin yapmış oldukları araştırmada (TOGTAG 1585 no'lu proje kapsamında) bu bölgede *Fusarium oxysporum f.sp. melonis*'in 0, 1, 2 ve 1,2 nolu ırklarının bulunduğu, bu ırlardan 1,2 nolu ırkın yaygın olduğu belirlenmiş ve bu hastalık sonucu tarlada ürünün ¾'ünün çöktüğü gözlenmiştir. 1998 yılından itibaren kavunda somatikembriyogenesis yoluyla bitki eldesine yönelik olarak tarafımızdan yürütülen araştırma sonucunda; yörede yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan Kuşçular, Yuva ve Kırkağaç kavun çeşitlerinden organogenesis ve somatik embriyogenesis yoluyla bitki eldesi için gerekli besin ortamı bileşimi, büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonları ve kültür başlangıcında kullanılacak olan bitki parçası

tipleri belirlenerek gelecekte yapılması planlanan ıslah çalışmaları için gerekli olan temel veriler elde edilmiştir [10]. Elde etmiş olduğumuz bu temel verilerden yararlanarak yürütülen bu araştırmada; bölgemizde yaygın olduğu tespit edilen *Fusarium oxysporum f.sp. melonis*'in 1,2 nolu ırkına ait farklı yoğunluktaki kültür filitratları kullanılarak, mutasyona uğratılmış ve herhangi bir uygulama yapılmamış bitkilere ait parçaların kallus oluşturma ve yaşama yetenekleri belirlenmiştir. Yaşama yeteneğinde olan kallus ve hücre kolonilerinden bitki rejenerasyonu sağlanarak, hastalık etmenine dayanıklı /tolerans bitkisel materyal *in vitro* koşullarda belirlenerek klasik ıslah çalışmalarına göre çok daha kısa bir süre içinde çok sayıda materyalin seçimi sağlanarak dayanıklı bireylerin elde edilebilmesi için araştırma yönlendirilmiştir. Bunun yanı sıra bu metot kullanılarak elde edilen başarılı sonuçlar sonucunda; damak tadımıza ve tüketim alışkanlıklarımıza uygun olan yerli kavun çeşitlerimizin hastalık etmenine karşı dayanıklı hale getirilmesine yönelik çalışmalar açısından bu araştırma bir referans niteliği taşımaktadır.

2. DENEYSEL

2.1. Örnek Hazırlama

Materyal olarak Orta Anadolu koşullarında yaygın olarak yetiştirilmekte olan Yuva kavun çeşidine ait tohumlar kullanılmıştır. Filitrat elde etmek için gerekli olan izolatlar Ankara Üniversitesi Ziraat fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden temin edilmiştir. Bu amaçla, TOGTAG 1585 no'lu TÜBİTAK Projesi (Orta Anadolu Bölgesi'nde Kavun Solgunluk Etmeni *Fusarium oxysporum f.sp. melonis*'in Irklarının Belirlenmesi) kapsamında bölgeden toplanarak değerlendirilen ve hastalık açısından etkili bulunan (A-26)₅, A1-4 kodlu izolatlar kullanılmıştır. İzolatların çoğaltımı Erzurum et al [5], filitrat eldesinde ise Megnennau ve Branchard'ın [7] izlediği yol takip edilmiştir.

Taner [10]'e göre %15 sakaroz, %0.7 agar içeren, pH'sı 5.6 olan MS [8] besin ortamında kültüre alınan dış kabuğu çıkarılmış olan tohumlardan elde edilen 7 gün yaşlı *in vitro* bitkiler Türkiye Atom Enerji Kurumu SANAEM Gıda Işınlama ve Sterilizasyon Birimi'nde bulunan ve kaynak gücü 0,338 Gy/saniye olan Co⁶⁰ gama ışın kaynağı ile Van Harten [13]'e göre dokuz farklı dozda (0, 10, 20, 45, 65, 85, 105, 125 ve 150 Gy) ışınlanmıştır. Işınlamayı takip eden 30 gün içinde bitkilerin yaşama yüzdelerine ve gelişmelerine göre ED₅₀ saptanarak ışınlama için gerekli olan etkili doz belirlenmiştir. Belirlenecek olan dozun %10 alt ve üst değerleri kullanılarak 3 dozda *in vitro* bitkiler ışınlanmış, ışınlama sonrası besin ortamlarında oluşabilecek yapısal değişimler nedeniyle bitkiler hemen taze besin ortamlarına aktarılmıştır. Araştırmada Taner [10], Taner ve ark. [12], Taner ve Yanmaz [11]'ün Yuva çeşidi için belirlemiş oldukları modifiye edilmiş farklı oksin/sitokinin kombinasyonları içeren tam ve ½ kuvvette hazırlanan MS besin ortamları kullanılmıştır. Hazırlanan besin ortamlarına Megnennau ve Branchard [7]'e göre hazırlanan farklı dozlardaki filitrat ilavesi gerçekleştirilmiştir. Işınlanmış ve ışınlanmamış *in vitro* bitki parçaları (hipokotiledon, kotiledon, gerçek yaprak+hipokotil parçaları) Çürük [2], Taner ve ark. [11]'e göre hazırlanarak besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Gerçek yaprak+hipokotil parçaları sürgün oluşumunu ve kardeşlenmeyi teşvik etmek üzere [12] besin ortamına transfer edildikten sonra 16/8 h aydınlatma rejimli iklim odasında ±26 °C sıcaklıkta inkübe edilerek kültürlerin sürgün geliştirme kapasiteleri haftalık yapılan sayımlarla belirlenmiştir. Kallus oluşumu için kotiledon ve hipokotil parçaları ±26 °C sıcaklıkta Selecta marka etüvde karanlık koşullarsa 3 hafta süreyle tutulmuştur. Bu süre sonunda kallus oluşum miktar ve kapasiteleri tarafımızdan belirlenmiş olan [10] bir skala yardımıyla değerlendirilerek yaşama yeteneğinde olan kalluslar

rejenerasyonu sağlamak üzere modifiye edilmiş katı MS besin ortamına transfer edilmiştir. Elde edilen bitkiler mikro çelikleme ile çoğaltılarak, köklenme için $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ IAA içeren MS besin ortamına aktarılmış ve sağlıklı olarak gelişen *in vitro* bitkiler kademeli olarak dış koşullara alıştırmıştır. Bunun yanı sıra filitratlı ortamlarda kültüre alınan kotiledon parçalarından elde edilen kallusların yaşama yeteneğinde olanları seçilerek $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4D içeren MS sıvı besin ortamında kültüre alınmıştır. Kalluslar 50 ml sıvı kültürde 2 adet (yaklaşık 5 g) olacak şekilde transfer edildikten sonra, kültürler 135 rpm 'de $26 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ olacak şekilde 16/8 h aydınlatma rejiminde GFL marka 3031 model inkübatörlü çalkalayıcıda inkübasyona alınmıştır. Bu süreyi takip eden her iki hafta da bir sıvı kültürler alt kültüre alınarak hücre kolonilerinin çoğaltımına devam edilmiştir. *In vitro* koşullarda hastalık etmenine dayanıklı olduğu tespit edilen bitkiler ve bu bitkilerden elde edilen tohumlara ait fideler Erzurum ve ark. [5]'nin belirttiği şekilde saksı inokülasyonuna tabi tutularak bitkilerin yaşama oranları tespit edilmiştir.

3. DENEYSEL SONUÇLAR

Araştırma başlangıcında 7 gün yaşlı *in vitro* bitkiler için en uygun ışınlama dozunu belirlemek üzere bir seri uygulama yapılmıştır. Bu amaçla 7 gün yaşlı *in vitro* bitkicikler 0, 10, 20, 45, 65, 85, 105, 125 ve 150 Gy dozlar kullanılarak ışınlanmıştır (kaynak gücü $0,338 \text{ Gy/saniye}$). Işınlanan bitkilerden alınan kotiledon ve gerçek sürgün ucu+hipokotil parçalarının rejenerasyonunu sağlayacak şekilde hazırlanan *in vitro* besin ortamlarına dikimi gerçekleştirilmiştir. Işınlama sonrası kültüre alınan kotiledon parçalarının kültürden 3 hafta sonra canlılık düzeylerine bakılarak elde edilen verilerle yapılan regresyon analizleri sonucunda (Çizelge 3.1) 21.75 Gy'lik dozun etkili doz olduğu tespit edilmiştir. Artan ışın dozuna bağlı olarak kültüre alınan kotiledon parçalarının yaşama ve kallus geliştirme oranlarının oransal olarak azaldığı ve kontrolde %80 oranında kallus oluşumu gerçekleşirken 125 ve 150 Gy'lik dozlarda bu oranın %0'a kadar gerilediği belirlenmiştir. Yine artan dozlara bağlı olarak elde edilen kallusların renklerinde kirli sarı renkten başlayarak kararırma / kahverengileşme şeklinde bir oluşum olduğu saptanmıştır.

Çizelge 3.1. Farklı ışın dozlarına göre kotiledon parçalarının yaşama oranları

$$\text{Canlı kallus (\%)} = 57,44 + (-0,48) \times \text{Doz}, R^2 = 0,828$$

Işın Dozu (Gy)	Canlı kallus miktarı (%)
0	75
10	60
20	45
45	20
65	15
85	8
105	5
125	2,5
150	0
Regresyon Değeri	21,75 Gy

Etkili filitrat uygulama dozunu belirlemek üzere yapılan çalışmalarda filitratlı ortamlarda kültüre alınan ışınlanmamış bitki materyalinin gelişim verileri göz önüne alınarak regresyon analizleri yapılmıştır. Farklı oranlarda filitrat içeren besin ortamlarında kültüre alınan hipokotiledon parçalarının kallus gelişim kapasitelerine göre kültür başlangıcından 3

hafta sonra yapılan gözlemlerden elde edilen verilerle yapılan regresyon analizi sonucunda (Çizelge 3.2) etkili filitrat uygulama dozunun %6.73 oranında olduğu belirlenmiştir. Çizelge 3.2'den de izlendiği gibi artan ışın dozuna bağlı olarak kallus oluşum oranının düştüğü ancak %10'luk uygulamada canlılıkta bir atış var gibi görülmekte gelişmeyi takip eden dönemlerde bu kallusların kararak canlılıklarını yitirdikleri belirlenmiştir. Yine %18, 20 ve 44'lük filitrat uygulamalarında kültüre alınan bitki parçalarında kararma olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.2. Farklı filitrat uygulamalarına göre elde edilen kallus oranları

$$\text{Canlı kallus (\%)} = 57,65 + (-1,912) \times \text{Doz}, R^2 = 0,845$$

Filitrat Dozu (%)	Canlı kallus miktarı (%)
0	89,58
4	77,08
6	37,5
8	66,07
10	23,21
12	4,17
14	16,07
16	10,42
18	0
20	0
44	0
Regresyon Değeri % 6,73	

İlk kültür başlangıcındaki bitki parçaları ile 3 haftalık inkübasyon sonrası inkübatörden alınan bitki parçalarının gelişim farklılıkları çok net olarak gözlenebilmiştir. 30 Gy'lik uygulama dozunun üzerindeki ışınlamaların bitkilerin rejenerasyon kapasitesi üzerinde olumsuz etkiler yaptığı görüldüğü için yüksek doz uygulaması yapılmamıştır. Sürgün gelişimi üzerinde ışın dozunun etkilerini belirlemek üzere yapılan ölçümlerde ortalama sürgün uzunluğunun kontrolde 4.00cm, 10 Gy'lik uygulamada 4.59 cm, 20 Gy için 2.781 cm ve 30 Gy'de ise 1.629 cm olduğu belirlenmiştir. Buna göre 10 Gy'de ortaya çıkan farkın düşük dozlarda yapılan ışınlamanın uyarıcı etki yapmasından dolayı olduğu sonucuna varılmıştır [13]. 10-20 Gy uygulamalarının sürgün gelişimi üzerinde olumlu etkileri olmuştur. Çizelge 3.3'den de izlenebileceği gibi elde edilen veriler üzerinde yapılan LSD testi sonucunda kontrol ve 10 Gy'lik uygulama arasındaki farklılığın 0,01 hata sınırları içinde önemli olmadığı, buna karşılık 20 ve 30 Gy'lik uygulamaların gerek kontrol gerekse 10 Gy'lik uygulama ile aralarındaki farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Farklı ışın dozlarının sürgün gelişimi üzerindeki etkileri arasındaki farklılığın istatistiki olarak önemi (LSD value: 0,9634, $\alpha = 0,01$, Hata kareler ortalaması: 2,10)

Sıra no	Işın Dozu (Gy)	Ortalama (cm)
1	0 (Kontrol)	4,000 A
2	10	4,590 A
3	20	2,781 B
4	30	1,629 C

Bunların yanı sıra 20 ve 10 Gy'lik uygulamaların kök gelişimi üzerinde daha olumlu etkiler yaptığı, 30 Gy'lik uygulamada ise kök sisteminin olumsuz etkilendiği, yapısal bozulmaların meydana geldiği tarafımızdan saptanmıştır. Ayrıca ışınlama ile birlikte sürdürülen filtrat uygulamalarında da sürgün gelişimi ve canlılığının üzerinde her iki uygulamanın etkili olduğu görülmüştür. Tek bir filtrat dozu (%7) kullanılarak dört farklı ışın dozunda *in vitro* bitkilerin performansları değerlendirilmiştir. Buna göre 30 Gy'lik uygulamada gelişim performansı filtratsız uygulamalardaki gibi düşük çıkmıştır (2 cm). Kontrolde bu değer 4cm, 20 Gy'de 3,5 cm olarak karşımıza çıkmaktadır. İstatistiksel anlamda yapılan analiz sonucu aradaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle bu denemelerden gelen bitkilere daha yüksek oranda hastalık etmeni verilerek yaşayan bitkilerin durumu tarafımızdan değerlendirilmiştir. Farklı dozlarda ışınlanmış ve sürgün ucu tekniği ile çoğaltılan *in vitro* bitkilerden elde edilen V1M2 [13] aşamasındaki mutantlara %7 oranında hazırlanarak verilen filtratların bitkilerin yaşama yetenekleri üzerinde yapmış olduğu etki ve bu aşamadaki mutantların göstermiş oldukları farklılıklar Çizelge 3.4'de sunulmuştur. Elde edilen bu mutantlardan kültüre alınan bitkiler içinde dozlara bakmadan toplam 123 adet hastalık etmenine karşı toleranslı olduğu düşünülen bitki elde edilmiştir. Tüm denemede kullanılan bitki sayısına bu oranlandığı zaman kültüre alınan bitkiden %6.73 oranında mutant bitkinin hastalıklı ortamlarda canlı kaldığı belirlenmiştir. 9 adet bitki tarlaya aktarılmış ve bu bitkilerden beş adet meyve hasat edilmiştir. Tohumlardan elde edilen fidelere yapılan hastalık inokülasyonu işlemi sonucunda toplam 318 adet fideden 4 tanesi yaşama yeteneğini koruyarak geri kalan fidelerin tamamı 30. günün sonunda ölmüştür. Gözlem süresince ilk 20 günlük süre içinde tüm bitkiler oldukça güçlü bir gelişme gösterirken son on gün içinde toplu bir çöküş tarafımızdan gözlenmiştir. Geriye kalan 4 fide de 60. gün sonunda ölmüştür.

Çizelge 3.4. Farklı dozlarda ışınlanarak elde edilen mutant poulasyona (V1M2) uygulana %7'lik hastalık filtratına karşı *in vitro* mutant bitkilerin reaksiyonu ve bu bitkilere ait özellikler

Işınlama Dozu (Gy)	0 (Kontrol)	10	20	30
İnokülasyon sonrası yaşama yeteneğini koruyan bitki sayısı	12	30	46	35
Ortaya çıkan bitkisel farklılıklar	1. Kök yapısı zayıf, 2. Kök boğazı bölgesinde kuruma, 3. Uygulamanın 25. gününden itibaren toplu ölüm	1. Yaprak formunda farklılık, 2. Çift sürgün oluşumu, 3. Boğum aralarında kısalma, 4. Kallus oluşturma eğiliminde artış	1. İri yaprak oluşumu, 2. Kallus oluşturma eğiliminde artış, 3. 2-3 adet kardeş sürgünün tek bir ana bitkide oluşumu,	1. Kökte sürgün gelişimi, 2. Zayıf bitki gelişimi, 3. Sürgün ucunda kuruma, 4. Kallus oluşturma eğilimi

Araştırma başlangıcında metot bölümünde de belirtildiği gibi filitratlı ortamlarda kültüre alınan kotiledon parçalarından elde edilen kallusların yaşama yeteneğinde olanları seçilerek 0.5 mg l^{-1} 2,4D içeren MS sıvı besin ortamında kültüre alınmıştır. İlk ana kültür sonrasında elde edilen sıvı kültürlerle ait veriler Çizelge 3.5’de sunulmuştur.

30. alt kültüre kadar sürekli olarak yapılan *in vitro* filitrat uygulamalarının sonucunda Çizelge 4.6’da sunulduğu gibi 10 Gy’lik uygulamadan 4 adet (5M, 13M 14M, 17M kodlu), 20 Gy’lik uygulamadan 5 adet (2M, 4M, 11M, 15M, 26M kodlu, 30 Gy’lik uygulamadan ise 1 adet (24M kodlu) kallus yığını (her petride yaklaşık 200 g olacak şekilde) elde edilmiştir. Alt kültürler sırasında yapılan gözlemlerde kallus renklerinde, sıklıklarında ve yığını oluşturan hücre kolonilerinin iriliklerinde farklılıklar olduğu 30 Gy’den elde edilen kalluslarda rengin daha yeşilimsi sarımsı ve yapının oldukça kof ve kaba olduğu saptanmıştır.

Çizelge 3.5. Farklı oranlarda filitrat içeren besin ortamlarından elde edilen kallusların sıvı kültürde yaşama durumları (İlk kültüre ait sonuçlar)

Filitrat miktarı (%) ve kod numarası	Transfer edilen petri sayısı	Hücre kolonisi oluşturma kapasitesi	Kallus rengi
4 (1.2)	3	0	Kahve rengi
6 (1.8)	6	2	Sarı-yeşil
10 (3)	3	0	Kahve rengi
12 (3.6)	4	2	Sarı-yeşil
13 (4)	3	1	Sarı-kahve
16 (4.8)	1	3	Yeşil
18 (5.4)	3	2	Sarı-yeşil
20 (6)	3	0	Kahve rengi

0= Hücre kolonisi oluşumu yok, 1= Hücre kolonisi oluşum oranı zayıf, 2= hücre kolonisi oluşum oranı orta, 3= Hücre kolonisi oluşum oranı yüksek

4. TARTIŞMA ve YORUM

Yuva kavunu çeşidi için etkili ışınlama dozunun 21,75 Gy olduğu ve sürgün gelişimi üzerinde ise 10 Gy’lik uygulamanın olumlu sonuçlar verdiği artan ışınlama dozuna bağlı olarak özellikle 30 Gy’lik dozun üzerindeki uygulamalarda *in vitro* bitki parçalarının içermiş oldukları su miktarının yüksek olması nedeniyle ışınlama ile bitki bünyesinde oluşan radikaller nedeniyle *in vitro* bitki ve bitki parçalarında kararma ve bunu takiben ölüm olayının meydana geldiği saptanmıştır. Elde etmiş olduğumuz bu bulgular Smith [9] ve Van Harten [13]’in belirttiği bulgularla paralellik göstermektedir. Dolayısı ile bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda bu verilerin kullanılması zaman kaybı ve etkili bir mutant populasyon oluşumunda yararlı olacaktır. Araştırmada etkili filitrat dozu belirlemek amacıyla yürütülen ön çalışmalarda, uygulanan farklı filitrat dozları içinde %6,73’lük oranın etkili olduğu bunun üzerindeki dozların öldürücü etkiye sahip olduğu %12’lik uygulamadan elde edilen bir grup yaşama yeteneğini koruyan kallusun belli bir süre sonunda canlılığını yitirdiği belirlenmiştir. Bu nedenle de yaklaşık olarak %7’lik uygulamaların bu tip bir çalışma için uygun doz olduğu ve elde edilen bu bulgunun Dutrecq [3] ve Megnennau ve Branchard [7] tarafından belirlenen %7-8’lik filitrat dozu uygulamaları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. 20 Gy’lik ışın uygulaması sonrasında *in vitro* bitkilerden alınan sürgün uçları ile elde edilen mutant varyasyonun 10 ve 30 Gy’lik uygulamalara göre çok daha etkili bir

çeşitliliğe sahip olduğu araştırma süresince gözlenmiştir. Bunun yanı sıra 10 ve 20 Gy'lik dozlarda yapılan ışınlama sonrasında *in vitro* bitkilerden alınan kotiledon parçalarının besin ortamlarındaki rejenera olma kapasitelerinin yüksek olduğu ve hastalık etmeni verilen kültürlerde 20 Gy'den elde edilen kallusların yaşama yeteneklerini diğer ışın dozu uygulamalarına karşı daha iyi koruduğu bu dozu 10 Gy'lik uygulamaların izlediği saptanmıştır. Bu bulgu, bu zamana kadar dayanıklılığa yönelik olarak yürütülen ıslah çalışmalarında somaklonal varyasyonların dışında *in vitro* mutagen uygulamalarından elde edilen varyasyonların kullanımının da etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Araştırma sonucunda sürgün ucu kültürlerinden elde edilen mutantlardan kültüre alınan bitkiler içinde dozlara göre ayırım yapılmadan toplam 123 adet hastalık etmenine karşı toleranslı olduğu düşünülen bitki elde edilmiştir. Tüm denemede kullanılan bitki sayısına bu oranlandığı zaman kültüre alınan bitkiden %6.73 oranında mutant bitkinin hastalıklı ortamlarda canlı kaldığı belirlenmiştir. Bu bitkilerden elde edilen tohumlara ait fidelere yapılan hastalık inokülasyonu sonrasında 4 adet fide çok zayıf bir gelişme de gösterebilir de canlılıklarını belli bir süre koruyabilmişlerdir. Elde edilen bu umutvar sonuç daha geniş *in vitro* mutant varyasyonların eldesi ile başarılı sonuçlara ulaşma şansının yüksek olduğunu ve tekniğin kavun için işlerliğini ortaya koymuştur. Kazza ve Malepszy [4] benzer sonucu hıyarda yürüttükleri araştırma da elde ederek %100 dayanıklı olan yeni bir çeşidi elde etmişlerdir. Dolayısıyla elde etmiş olduğumuz tüm bulgular topluca değerlendirildiği zaman, *in vitro* mutasyon çalışmaları ile toksite (filtrat uygulaması) çalışmalarının beraberce başarılı bir şekilde sürdürülebileceği görülmüştür. Özellikle kalluslardan gerçekleştirilecek etkili bitki rejenerasyonu ile elde edilen bitki miktarının artması önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Gerek filtrat uygulaması ve gerekse ışınlama çalışması sonucunda elde edilen verilerle yapmış olduğumuz istatistiksel değerlendirmeler ve bireysel gözlemler sonucunda, *in vitro* mutasyon tekniklerinin kullanımının sadece kavun türü için değil diğer türlerde de yürütülecek olan araştırmalara katkı sağlayabileceği tarafımızdan belirlenmiştir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Anonymous, Provisional production and production indices data, FAO, (2007) www.fao.org/faostat (2007)
- [2] Çürük, S. Investigations on *in vitro* plant regeneration and genetic transformation on melon cultivars. Çukurova University Graduated School Of Science, Horticultural Science, Adana, Turkey, (1999) p 217
- [3] Dutrecq, A.J.E. *In vitro* selection of plants resistant or tolerant to pathogenic fungi. Proceedings of a Symposium on the use of Induced Mutations for improving disease resistance in crop plants. IAEA 31 January-4 February 1977 Vienna. (1977), pp 471-477
- [4] El-kazzaz, a.a. and malepszy, s. Selection of resistant *Cucumis sativus* regenerated plants to *Fusarium oxysporum* via tissue culture. The First Egyptian-Italian Symposium on Biotechnology, Assiut, Egypt (Nov. 21-23) (1992) 121-129
- [5] Erzurum, K., Taner K.Y, Seçer E., Yanmaz R., Maden S. Occurrence of races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* causing wilt on melon in Central Anatolia. J Turk Phytopathology, (1999)28: 87-97
- [6] Malepszy S and El-kazzaz A.A. *In vitro* culture of *Cucumis sativus* XI. selection of resistance *Fusarium oxysporum*. Acta Hort. (*In Vitro* Culture and Horticultural Breeding), (1990) 280:455-458
- [7] Megnegneau B., and Branchard M. Effects of fungal culture filtrates on tissue from susceptible and resistant genotypes of muskmelon to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Plant Science, (1991) 79: 105-110
- [8] Murashige T., and Skoog F.A. revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, (1962) 15: 473-497
- [9] Smith M. *In vitro* mutagenesis. Annual Review of Genetics, (1985) 19: 423-62
- [10] Taner K.Y. Plant formation by somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). PhD Thesis. Ankara University Graduated School Of Science, Horticultural Science, Ankara/Turkey, (2002) p:145
- [11] Taner K.Y., Yanmaz R. Somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). 4th National Horticulture Congress, September 8-12, Antalya-Turkey, (2003) pp 361-364

-
- [12] Taner K.Y., Yanmaz R., Yazar E., Alper A. The effects of sucrose concentration and pH level on different explant types for in vitro organogenesis in melon (*Cucumis melo* L.) Alatarım Journal, (2004) 3: 11
- [13] Van Harten A.M. Mutation Breeding Theory And Practical Applications. Cambridge University Press, ISBN 0521470749. (1998) pp 353
- [14] Yıldız M. Researches on *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races in the Mediterranean region of Turkey and response of some national melon genotypes to the disease (Assoc. Prof. Thesis, Ege University of Agricultural Faculty, Department of Plant Protection, (1977) pp 112
- [15] Yücel S., Pala H., Sari N., Abak K. Determination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races in the East Mediterranean region of Turkey and response of some melon genotypes to the disease. 9th Congress of The Mediterranean Phytopathological Union, Kuşadası-Turkey, (1994) pp 87-89