

# TEKNİK RAPOR

TAEK TR 2009 -5



TÜRKİYE ATOM ENERJİSİ KURUMU

**KAVUN SOLGUNLUK ETMENİ  
FUSARIUM OXYSPORUM F.SP.MELONİS  
IRK 1,2' E KARŞI DOKU KÜLTÜRÜ VE MUTASYON  
TEKNİKLERİ KULLANARAK DAYANIKLI KAVUN  
TİPLERİNİN SEÇİLMESİ  
ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR  
(DEVAM EDEN PROJE)**

TÜRKİYE ATOM ENERJİSİ KURUMU

## TEKNİK RAPOR

**Kavun Solgunluk Etmeni Fusarium oxysporum f.sp.  
melonis ırk 1,2' e Karşı Doku Kültürü ve Mutasyon  
Teknikleri Kullanarak Dayanıklı Kavun Tiplerinin  
Seçilmesi Üzerinde Araştırmalar  
(Devam eden proje)**



2008

## TÜRKİYE ATOM ENERJİSİ KURUMU

2690 sayılı kanun ile kurulmuş olan Türkiye Atom Enerjisi Kurumunun ana görevi; atom enerjisinin barışçıl amaçlarla ülke yararına kullanılmasında izlenecek ulusal politikanın esaslarını ve bu konudaki plan ve programları belirlemek; ülkenin bilimsel, teknik ve ekonomik kalkınmasında atom enerjisinden yararlanılmasını mümkün kılacak her türlü araştırma, geliştirme, inceleme ve çalışmayı yapmak ve yaptırmak, bu alanda yapılacak çalışmaları koordine ve teşvik etmektir.

Bu çalışma TAEK personeli tarafından gerçekleştirilmiş araştırma, geliştirme ve inceleme sonuçlarının paylaşımı amacıyla Teknik Rapor olarak hazırlanmış ve basılmıştır.



Teknik Rapor 2009/5  
Türkiye Atom Enerjisi Kurumu yayınıdır.  
İzin alınmaksızın çoğaltılabilir.  
Referans verilerek kullanılabilir.

TÜRKİYE ATOM ENERJİSİ KURUMU  
Adres : Eskişehir Yolu 9. km 06530 Ankara/Türkiye  
Tel : +90 (312) 295 87 00  
Fax : +90 (312) 287 87 61  
Web : [www.taek.gov.tr](http://www.taek.gov.tr)

## ÖNSÖZ

*Bu çalışmada Orta Anadolu Bölgesi kavun yetiştiriciliğinde büyük zararlara neden olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*' in 1,2 nolu ırkına karşı dayanıklılığın in vitro düzeyde belirlenmesi ve gerek mutasyon yoluyla gerekse hücresel düzeyde doğal tolerans mekanizmasından yararlanılarak dayanıklı bireylerin elde edilebilirliği incelenmektedir. Eğer bu metotla olumlu bir sonuç alınabilirse elimizde var olan genetik materyal hücresel düzeyde selekte edilerek dayanıklı olan hücrelerden bitki rejenerasyonu gerçekleştirilecektir. Böylece elimizdeki genetik materyalin geliştirilmesi ve hastalık etmenine dayanıklı yeni bireylerin ortaya çıkartılması sağlanacaktır. Bu teknik raporda halen devam etmekte olan proje ile ilgili şu ana kadar elde edilen bulgular sunulmuştur.*

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| Tablolar Dizini.....      | i   |
| Şekiller Dizini .....     | ii  |
| Yönetici Özeti.....       | iii |
| Exculsive Summary .....   | v   |
| Kısaltmalar.....          | ix  |
| Terimler.....             | ix  |
| GİRİŞ.....                | 1   |
| 2. KONU.....              | 3   |
| 2.1. Yöntem.....          | 5   |
| 2.2. Çalışma Takvimi..... | 8   |
| 2.3. Bulgular.....        | 8   |
| 3. SONUÇ.....             | 15  |
| 4. KAYNAKÇA.....          | 16  |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                      | Sayfa No |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Tablo 2.3.1.</b> Farklı ışın dozlarına göre kotiledon parçalarının yaşama oranları.....                                           | 9        |
| <b>Tablo 2.3.2.</b> Farklı filitrat uygulamalarına göre elde edilen kallus oranları.....                                             | 11       |
| <b>Tablo 2.3.3.</b> Farklı oranlarda filitrat içeren besin ortamlarından elde edilen kallusların sıvı kültürde yaşama durumları..... | 13       |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

- Şekil 2.1.1.** Filtrat hazırlığı aşamaları(1: 20 günlük spor süspansiyonu, 2: Spor süspansiyonlarının kaba filitreden geçirilmesi, 3: 0,22 µm'lik filitreden süspansiyonun süzülmesi, 4: İn vitro besin ortamlarına filtrat ilavesi) .....6
- Şekil 2.1.2.** İn vitro bitkilerin Co<sup>60</sup> ışın kaynağı ile ışınlanması.....7
- Şekil 2.3.1.** Kallus canlılığı üzerine farklı ışın dozlarının etkisi.....10
- Şekil 2.3.2.** Işınlanmış in vitro bitkilerden alınan kotiledon parçalarının kültürden 3 hafta sonraki gelişim düzeyleri ve kallus renklerindeki farklılaşma.....10
- Şekil 2.3.3.** Kallus canlılığı üzerine farklı filtrat dozlarının etkisi.....11
- Şekil 2.3.4.** A: Farklı filtrat dozları içeren besin ortamlarında kültüre alınan kotiledon parçaları, B: Kültüre alınan kotiledonların filtratlı ortamlarda 3 hafta sonraki gelişimleri.....12
- Şekil 2.3.5.** Farklı oranlarda filtrat içeren ortamlardan elde edilen yaşama yeteneğindeki kalluslardan sıvı besin ortamında hücre kolonisi oluşumu.....13
- Şekil 2.3.6.** Kontrol, 10 ve 20 Gy dozlarda ışınlanan in vitro bitkilerden kültüre alınan bitki parçalarının görünümü.....14

## YÖNETİCİ ÖZETİ

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. Özellikle Orta Anadolu Bölgesi'nde üretimde kullanılan yerli çeşitlerimizin dayanıksız olmaları nedeniyle bitkilerin büyük bir kısmı hasat aşamasına gelemeyen 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. Erzurum ve ark. [14]'nın 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 ırklardan 1,2 nolu ırkın yaygın olduğu belirlenmiş ve bu hastalık sonucu tarlada ürünün  $\frac{3}{4}$ '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. Elde etmiş olduğumuz bu temel verilerden yararlanarak yürütmeyi planladığımız bu araştırmada; bölgemizde yaygın olduğu tesbit 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 belirlenmeye çalışılacaktır. 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 gerçekleştirilebilecektir. Bunun yanı sıra bu metot kullanılarak elde edilecek başarılı sonuçlar sonucunda; damak tadımıza ve tüketim alışkanlıklarımıza uygun olan yerli kavun çeşitlerimizin hastalık etmenine karşı dayanıklı hale getirilmesi sağlanarak ülke ekonomisine ve çiftçiye önemli bir katkıda bulunulacaktır.

Araştırmamızın metot bölümü izolatlardan filitrat eldesi, başlangıç materyalini oluşturacak in vitro bitkilerin ışınlanması, kültürde kullanılacak olan farklı dozlarda filitrat içeren besin ortamlarının hazırlanması, ışınlanmış ve ışınlanmamış bitki parçalarının bu besin ortamlarında kültüre alınması, alt kültür işlemleri, haftalık gözlem, canlı kalan hücreleri belirlemek üzere hücre boyaması ve yaşayan bitki parçalarından, kallus kolonilerinden bitki rejenerasyonu, elde edilen bitkilerin



köklendirilmesi, çoğaltılması, sitolojik gözlemlerinin yapılması ve dış koşullara transfer edilen bitkilerin yeniden hastalık etmeni ile ilgili olarak testlenerek kesin sonuçların belirlenmesi aşamalarını içermektedir.

Bugüne kadar elde etmiş olduğumuz verilerin regresyon analizleri sonucunda belirlenen 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 filtrat uygulamasında ise %6.73'lük uygulamanın kullandığımız farklı bitki parçaları üzerinde olumlu etki yaptığı saptanmıştır. Araştırmanın bundan sonraki aşamaları bu uygulama dozları referans alınarak sürdürülecektir.

## EXCULSIVE SUMMARY

Fusarium wilt is a vascular disease of the Cucurbitaceae family caused by the soil fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM), which is very detrimental to muskmelons (*Cucumis melo* L.). Fusarium wilt of melon is prevalent in temperate and tropical regions and causes a worldwide problem. FOM can survive in the soil for extended periods of time as chlamydospores, and is capable of colonizing crop residues and roots of most crops grown in rotation with melon. The only effective control is the use of resistant varieties. Four races of FOM have been identified, namely 0, 1, 2 and 1.2 [1,2]. Race 1.2 was further subdivided into race 1.2y and 1.2w, which cause yellowing and wilt symptoms, respectively. Two resistance genes (*Fom-1* and *Fom-2*) have been identified in melons [2,3,4]. *Fom-1* confers resistance to FOM races 0 and 2, and *Fom-2* confers resistance to races 0 and 1. These two genes are extensively used in breeding programmes, which can be assisted by marker assisted selection using markers linked to these resistance genes [5,6,7]. No genes have been identified that confer resistance to race 1.2 [8,9]. However, polygenic recessive genes have been found to confer resistance to race 1.2 in Piboule genotypes [1].

Melon production in Turkey is 1,700,000 tons [10] and it is declining the year after year because of Fusarium wilt. Therefore, Fusarium wilt has a high economic importance in the cultivation of muskmelon in Turkey. In some parts of Turkey the prevalent races of this pathogen were determined. Fantino and Zengin [11] isolated race 1.2 from wilted plants showing intensive root rot in Eastern Thrace. In the Aegean region, Yildiz [12] recovered three races of the pathogen, race 1 being the most common (57%), followed by race 1.2 (35%) and race 0 (6%). Yücel *et al.* [13] obtained races 0, and 1-2 in the East Mediterranean region. Erzurum *et al.* [14] isolated the races 0, 1.2 and 2 in Central Anatolia. Based on these results, Fusarium wilt is a wide spread disease over all regions of Turkey. FOM has caused severe losses for farmers as our native cultivars are not resistant to this disease. It is believed our native cultivars will disappear if resistance to FOM is not introduced into the cultivated material. For this reason, many scientists in Turkey are focusing on research to develop new resistant cultivars via conventional and biotechnological breeding methods. *In vitro* techniques became widely spread during the 20<sup>th</sup> century, and their potential to make important contributions to plant breeding was quickly understood. *In vitro* techniques for crop improvement first consisted of micropagation and plant regeneration, and then *in vitro* methods were also found to be useful for eliminating disease and selecting for resistant cells or explants. *In vitro* selection using specific chemical compounds and pathogens is another useful aspect of tissue culture. Selection with phytotoxins and culture filtrates appears to be more effective than the use of the pathogen itself [15]. Researchers now use fungal culture filtrates or toxins to investigate the response of susceptible and

resistant genotypes of different plant species or cultivars to disease factors. The use of *in vitro* methods for the evaluation of resistance is dependent upon a positive correlation between *in vitro* culture filtrate resistance and whole plant disease resistance. Chawla *et al.* [16], Gray *et al.* [17], Connell *et al.* [18], Malepsezy and El-Kazzaz [19], El-Kazzaz and Malepsezy [20] developed protocols for *in vitro* determination of resistance. In comparison with field screening other biotechnological methods, selection techniques are more cost and labour effective and do not require large experimental fields. More recently, *in vitro* techniques were combined to mutation induction for generating genetic variation, including novel disease resistant mutants. Mutation induction can be caused by chemical or physical mutagens that alter the structure of the DNA [21]. Treatment of *in vitro* tissues with physical or chemical mutagens may increase the frequency of genetic variation considerably. The physical mutagens most commonly used are X-rays, gamma rays and UV light, whereas Ethyl Methane-Sulphonate (EMS) is the chemical mutagen most used in crop improvement. Irradiation treatments may be a suitable choice of mutagen for a number of reasons because the application is fast and, in contrast to chemical mutagens, there is no risk that residues remain in the medium. The *in vitro* mutation frequencies are much higher than somaclonal variation. More over somaclonal variation is another important point for *in vitro* plant breeding. You can catch desirable cells or plantlets, which are resistant for disease by this method. Finally, *in vitro* techniques are useful as well in classical mutation breeding programs by vegetative propagation before or after mutagenic treatment, by *in vitro* selection or by clonal propagation of selected mutants. According to Malepsezy and El-Kazzaz [19], *in vitro* selection using FOM filtrates can be effectively used for the selection of cucumber and melon [22]. One of the purposes is to use this method for the selection of various mutants, which are resistant to disease. In this research we are going to determine the resistant cells, which will come from irradiated and non-irradiated explants by using races of *F. oxysporum* f. sp. *melonis* culture filtrates *in vitro* conditions. If we will get successful results by this method we will be able to develop new melon cultivars, which will be resistant to *F. oxysporum* f. sp. *melonis*.

The present work was performed with *in vitro* plantlets obtained from seeds of melon cv. Yuva which is an important commercial cultivar in Turkey. Two types of explants (cotyledon and hypocotyls with leaf and cotyledon explants) were used for callus and suspension culture initiation [23]. In this research we followed the procedure developed by Megnegneau and Branchard [22]. Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) medium were inoculated with FOM isolates which were named (A-1)<sub>4</sub> and (A-6)<sub>4</sub>, which obtained from Ankara University Plant Protection Department in Turkey [14]. Petri dishes were incubated at 26°C in the dark. Fifteen days later, 2 x 10<sup>6</sup> conidia were transferred to 200 ml of liquid Richard medium. Cultures were kept at 26°C in

the dark. After twenty days, fungal cultures were filtered twice through filter paper to remove mycelia. The pH of the filtrate was adjusted to pH 5.7 with 1 N HCl or 0.1 N NaOH. Subsequently, cultures were sterilized through a 0.22  $\mu$ m filter unit attached to a syringe. For filtrate preparation it is very important that to avoid thermal degradation of toxic compounds in the fungal culture filtrate. Therefore, filtrates should be aliquotted and frozen for long-term storage. The working filtrate aliquot can be kept in the refrigerator. Filtrates were added to autoclaved modified MS basal medium. According to Taner [25] and Taner *et al.* [23] non irradiated and irradiated cotyledon and hypocotyls with leaf and cotyledon explants were transferred into petri dishes containing half strength of MS medium with basal salts [24] supplemented with 0.5 mg/l 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.5 mg/l kinetin and 250mg/l casein enzymatic hydrolysate (Sigma) (for cotyledon explants) and MS basal medium, which was supplemented with 0.5 mg/l Indole-3-acetic acid (IAA), 0.5 mg/l 6-Benzylaminopurine (BAP) (hypocotyls with leaf and cotyledon explants), both mediums contain different ratio of filtrate and 15% sucrose. For both media, the pH was adjusted to 5.6 the steps for filtrate preparation are shown in Figure 2.1.1. The different proportions used in this study were 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 % (v/v). Control plates contained only the modified MS basal medium. Figure 2.3.2 shows the steps for the initiation of the callus cultures. Seeds of melon genotypes were surface sterilized, rinsed and germinated *in vitro* as previously described by Çürük [26] and Taner [25]. According to the authors seeds were surface sterilized for 20 minutes in 20% sodium hypochloride solution that was involved tween 20 (1 ml/100ml) and washed three times in sterile distilled water. Seed cover is removed after sterilization. They are planted in magenta b-cap that is contained 0.50ml solid MS medium containing 0.7% Difco agar and 15% sucrose. The cultures maintained at 25°C, under fluorescent illuminance with a light intensity of 10 000 lux, with 16 h photoperiod. For resistance screening, two kinds of non-irradiated and irradiated explants (i.e., cotyledons and hypocotyls containing leaves and cotyledons) were used according to Taner *et al.* [23]. Cotyledon explants were transferred into Petri dishes containing half strength of MS medium with basal salts [24] supplemented with 0.5 mg/l 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.5 mg/l kinetin and 15% sucrose. Hypocotyls with leaf and cotyledon explants were transferred MS basal medium, which was supplemented with 0.5 mg/l Indole-3-acetic acid (IAA), 0.5 mg/l 6-Benzylaminopurine (BAP) and 15% sucrose. For both media, the pH was adjusted to 5.6 with 1 N HCl or 0.1 N NaOH. It is very important that the experiments contain more than 50 explants for each combination. Seven days old *in vitro* plantlets which are containing real leaves and cotyledons irradiated by  $^{60}\text{Co}$  gamma source after seed germination. They are irradiated with  $^{60}\text{Co}$  gamma rays at nine different doses. Irradiation doses and their effects on the plants are known to be genotype-dependent, so every experiment should

start with the determination of the optimal irradiation dose for their genomic material. This is typically calculated as  $LD_{50}$ , which corresponds to the 50% survival dose. Doses weaker or stronger than  $LD_{50}$  may also be used, but too little mutations may be observed or lethality may be too high, respectively. Even for the same genetic material, the optimal dose for mutation induction in vitro is lower than for seed irradiation. In our experiments 25 Gy gamma irradiation dose found an effective dose for in vitro plantlets of Yuva cultivar. After irradiation, it is important to transfer the explants in fresh regeneration medium contain filtrate to avoid any toxicity of the medium components due to the irradiation. The fungal culture filtrate was added to the media at different concentrations as indicated above. Cotyledon cultures were incubated at 26°C in the dark for three weeks. At the end of this three weeks period observations made on explants according to their regeneration capacity. White, yellow callus formation from cotyledon explants determined survival capacity about explants to filtrate. Hypocotyl with leaf and cotyledon explants were incubated under a light period of 16 h at 15 000 lux at 26°C Taner et al. [23]. Regenerated plantlets that showed resistance to the culture filtrate were isolated and sub-cultured every two weeks onto the same medium (these mediums have to contain filtrate for observation of explants survival). Shoot and root regeneration of explants, their growth performance and shoot number are important observation points of our research. The callus cultures obtained from hypocotyl explants with leaves and cotyledons were maintained for three weeks according to Taner and Yanmaz [27]. We transferred calluses to hormone free MS medium that includes filtrate for somatic embryo regeneration. MS medium supplemented with 1.0 mg/l Indole-3-acetic acid (IAA) is proper medium for plantlet formation from shoot cultures and somatic embryos [25]. After that period, the rate of mortality of the explants was estimated. Plantlets are then transferred to greenhouses and advanced to the  $M_2$  generation for further selection and evaluation. According to our observations filtrate and gamma ray treatment have an important effect on tolerant plantlet and callus formation. In this research, we show a method [25,27,23] 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. Hence we will carry out our near future experiments with these determined doses and so that this research can lead to the development of new melon cultivars that will be resistant to Fusarium wilt.

## Kısaltmalar ve Terimler

### Kısaltmalar

|                    |                                            |
|--------------------|--------------------------------------------|
| Co <sup>60</sup>   | : Kobalt 60                                |
| Cs <sup>137</sup>  | : Sezyum 137                               |
| Gy                 | : Gray                                     |
| mg/l               | : Miligram/litre                           |
| mg l <sup>-1</sup> | : Miligram/litre                           |
| IAA                | : Indole-3-acetic acid                     |
| N                  | : Normal                                   |
| NaOH               | : Sodyum hidroksit                         |
| 2,4D               | : 2,4-dichlorophenoxy acetic acid          |
| NAA                | : Naftalen asetik asit                     |
| HCl                | : Hidroklorik asit                         |
| °C                 | : Derece santigrat                         |
| ml                 | : Mililitre                                |
| ED <sub>50</sub>   | : %50 Etkili Doz                           |
| rpm                | : Rate per minute (Dakikada sallanış hızı) |
| µm                 | : Milimikron                               |
| BAP                | : Benzylaminopurine                        |

### Terimler

*In vitro* : Tamamen aseptik koşullarda ve yapay besin ortamlarında canlı materyalle yürütülen kültürel işlemler.

## I. 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 metodlarla 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 fizikse mutagenlerle ( $\text{Co}^{60}$  ya da  $\text{Cs}^{137}$  ışınlaması 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. Özellikle Orta Anadolu Bölgesi'nde üretimde kullanılan yerli çeşitlerimizin dayanıksız olmaları nedeniyle bitkilerin büyük bir kısmı hasat aşamasına gelemeyen 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. Erzurum ve ark. [14]'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 ırklardan 1,2 nolu ırkın yaygın olduğu belirlenmiş ve bu hastalık sonucu tarlada ürünün  $\frac{3}{4}$ '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. Elde etmiş olduğumuz bu temel verilerden yararlanarak yürütmeyi planladığımız bu araştırmada; bölgemizde yaygın olduğu tesbit 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 belirlenmeye çalışılacaktır. 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 gerçekleştirilebilecektir. Bunun yanı sıra bu metot kullanılarak elde edilecek başarılı sonuçlar sonucunda; damak tadımıza ve tüketim alışkanlıklarımıza uygun olan yerli kavun çeşitlerimizin hastalık etmenine karşı dayanıklı hale getirilmesi sağlanarak ülke ekonomisine ve çiftçiye önemli bir katkıda bulunulacaktır.



## 2. KONU

Bu çalışmanın amacı, kavunda *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*'e dayanıklı hücrelerin dolayısıyla bitkilerin seçiminde kallus kültürü yönteminin kullanılıp kullanılamayacağını ortaya koymaktır. Bu amaçla; kallus kültürü çalışmaları sırasında Malepszy ve El-Kazzaz [19] ve Megnegneau ve Branchard [22]'in uygulamış olduğu yöntemden yararlanarak daha önceden izole edilen *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*'in 1,2 nolu ırkına ait izolatın kültür filtratı elde edilmiştir. Elde edilen bu filtrat değişik konsantrasyonlarda besin ortamlarına ilave edilerek [27] ışınlanmış ve ışınlanmamış bitki parçaları bu besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültürlerde hücre bazında hastalığa karşı dayanım düzeyi belirlenmeye çalışılarak, etmene karşı dayanıklı olduğu belirlenen hücre ya da hücrelerde rejenerasyon sağlanarak dayanıklı/toleranslı bitkilerin üretiminin yapılması hedeflenmiştir. Kabakgiller familyasına giren türlerde *Fusarium*'a yönelik tesbit çalışmaları, besin ortamına farklı oranlarda filitrat ilave edilerek dayanıklılığın belirlenmesi ile ilgili olarak kallus ve hücre süspansiyon kültürleri yoluyla gerek embriyo oluşumu gerekse organogenesis üzerinde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Aşağıda bu konularla ilgili olarak yapılan bazı çalışmalar verilmiştir.

Cucumis sativus'a ait Borszczagowski ve Gy-3 çeşitlerinde gerçekleştirilen kallus ve süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (%1-15) vermiş oldukları *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumennum* 'un OG-1, FOCR-1 hatlarına ait kültür filtratlarının hücre canlılığı üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda OG-1'e (%1.25) ve FOCR-1'e (%2.5) dayanıklı, yaşama yeteneğinde olan hücre kolonilerini belirlemişlerdir. Bu hücrelerden %7 oranında rejenerasyonu sağlayan araştırmacılar, elde etmiş oldukları bitkilerin tamamının hastalık etmenine karşı dayanıklı olduklarını belirtmektedirler [19].

Kavunda yürütülen bir başka araştırmada, kotiledon parçalarını in vitro koşullarda farklı düzeylerde (%4, %6 ve %8 v/v) filitrat içeren besin ortamlarında kültüre almışlardır. Kültür sonucunda filitrat yoğunluğu ve ekspalant gelişimi arasında önemli bir korelasyon bulunduğunu tesbit edilmiştir [22]. Cucumis sativus'a ait bitkilerden in vitro koşullarda alınan bitki parçalarından elde ettikleri kallusları, farklı konsantrasyonlarda (%1-15) fusarik asit içeren hücre süspansiyon kültürüne alarak elde edilen hücrelerin yaşama yeteneklerini ve fusarium etmenine dayanıklılık düzeylerini belirlemişlerdir. Hücre süspansiyon kültürü sonucunda fusariuma dayanıklı olan hücreler belirlenmiş ve bunlardan

rejenere edilen bitkiler test edildikten sonra, hepsinin *Fusarium oxysporum*'a %100 dayanıklı olduğunu saptamıştır [20].

Orta Anadolu Bölgesi'nde Ankara, Çankırı, Kırıkkale, Konya ve Yozgat illerinin önemli kavun ekiliş alanlarında 105 tarladan toplanan 504 hasta bitki örneğinden 50 µg/ml streptomycin içeren PDA ortamunda izolasyonlar yaparak elde edilen 226 *Fusarium oxysporum* izolatının Chatantais T kavun çeşidinde patojenitelerini denenmiştir. Patojen bulunan 89 izolat kontrollü koşullarda Charentais T, Charentais Fom 1 ve Charentais Fom 2 kavun çeşitlerine fide kök daldırma yöntemi ile inoküle edilerek bitkilerin 30 gün sonra gösterdikleri reaksiyonlara göre *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*'in ırkları saptanmıştır. Elde edilen 89 *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* izolatının 49'unun ırk 1.2, 22'sinin ırk 0, 16'sinin ırk 1 ve 2'sinin ırk 2 olduğu saptanmıştır. Araştırma sonucunda bu patojenin ırkları bu bölgede ilk defa belirlenmiştir [14].

Yedi kavun çeşidinde (Kırkağaç 637, Hasanbey, Yuva, Ananas, Topatan, Kuşçular ve Vah-arman) kotiledon, 9 kavun çeşidinde ise (Noi Yarok, Revigal, Amarollo Oro, Kırkağaç 637, Yuva, Hasanbey I, Topatan, Kuşçular ve Ananas) hipokotil ucu + yaprak sapı parçalarının rejenerasyon yeteneğini (sürgün oluşturma, kardeşlenme düzeyleri) ve rejenerasyon üzerine yüksek sıcaklık ve ışık yoğunluğunun etkileri incelenmiştir. Araştırma sonucunda; kotiledon, hipokotil ucu + yaprak sapı parçalarının rejenerasyon kapasiteleri üzerinde yüksek sıcaklık ve ışık yoğunluğu gibi çevresel faktörlerin etkili olduğu; hipokotil ucu+ yaprak sapı parçalarından elde edilen sürgünlerin %100 oranında diploid olduğu belirlenmiştir [26]. Yine somatik embriyo ve kallus oluşumu üzerine Kuşçular, Yuva ve Kırkağaç kavun çeşitlerine ait in vitro bitkilerden alınan değişik bitki parçalarının (hipokotil, kotiledon), oksin-sitokinin (2,4-D, NAA – Kinetin) dengesinin ve farklı kuvvetteki MS besin ortamlarının etkileri belirlenmiştir. Araştırma sonucunda kallus üretimi ve somatik embriyo oluşumu üzerine bitkinin genotipinin, kullanılan bitki parçası tipinin, besin ortamı bileşimi ve ortamdaki oksin-sitokinin dengesinin etkili olduğu saptanmıştır. Kallus kültürleri yoluyla elde edilen somatik embriyoların, %93'ü kotiledon, %7'i ise hipokotil parçalarından oluşmuştur. Çeşitlere göre değişmekle birlikte en fazla embriyo oluşumu 1/2 kuvvetli 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> 2,4-D ve 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> kinetin içeren MS besin ortamında %78.3'le Kuşçular kavununda sağlanmıştır. Bu çeşidi %18.6 ile Yuva, %3.1 ile Kırkağaç çeşitleri izlemiştir [27]. *In vitro* mutasyon ıslahına yönelik çalışmalara temel olması için; Yuva kavun çeşidine ait in vitro bitkilerden alınan kotiledon ve yapraklı hipokotil parçalarının MS besin ortamında sürgün oluşturma kapasiteleri üzerine farklı şeker (% 15, 20 ve 25) konsantrasyonlarının ve pH seviyelerinin (5.6, 5.7, 5.8) etkileri incelenmiştir. Araştırma sonucunda kotiledon parçalarından sadece kallus oluşumu sağlanırken, yapraklı hipokotil parçalarından kallus oluşumu ile birlikte sürgün oluşumu meydana gelmiştir. En yüksek oranda ve kaliteli sürgün oluşumu, bitki parçası başına ortalama 4.89 adet

sürgün olacak şekilde %15 şeker içeren ve pH'sı 5.6 olan MS besin ortamında elde edilmiştir [23].

Ülkemizde yetiştirilmekte olan tüm yerel çeşitlerimiz bu hastalık etmenine karşı dayanıksız olup yıllar bazında üretim değerleri incelendiği zaman hastalık dolayısıyla kavun ekilişinde büyük bir azalma olduğu görülmektedir. Bu nedenle var olan çeşitlerimizin en kısa sürede dayanıklı hale getirilmesi ve çiftçinin hizmetine sunulması gerekmektedir. Klasik ıslah metotları çok daha uzun bir sürede sonuç verdiği için laboratuvar koşullarında seleksiyon ve rejenerasyon işlemleri tamamlanarak yeni çeşitlerin geliştirilmesi için bu yöntemlerin metot olarak oturtulmasına yönelik çalışmaların yürütülmesi önem kazanmaktadır.

## 2.1. Yöntem

Materyal olarak Orta Anadolu koşullarında yaygın olarak yetiştirilmekte olan Yuva kavun çeşidine ait tohumlar kullanılmıştır. Filtrat elde etmek için gerekli olan izolatlar Ankara Üniversitesi Ziraat fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden temin edilmiştir.

Araştırmanın metot bölümü izolatlardan filtrat eldesi, başlangıç materyalini oluşturacak in vitro bitkilerin ışınlanması, kültürde kullanılacak olan farklı dozlarda filtrat içeren besin ortamlarının hazırlanması, ışınlanmış ve ışınlanmamış bitki parçalarının bu besin ortamlarında kültüre alınması, alt kültür işlemleri, haftalık gözlem, canlı kalan hücreleri belirlemek üzere hücre boyaması ve yaşayan bitki parçalarından, kallus kolonilerinden bitki rejenerasyonu, elde edilen bitkilerin köklendirilmesi, çoğaltılması, sitolojik gözlemlerinin yapılması ve dış koşullara transfer edilen bitkilerin yeniden hastalık etmeni ile ilgili olarak testlenerek kesin sonuçların belirlenmesi aşamalarını içermektedir. Bu aşamalar aşağıda kısaca özetlenmiştir.

### **İzolatlardan filtrat eldesi:**

1. Kum ortamında gelişen *Fusarium oxysporum f.sp.melonis* ırk 1,2'e ait A1-4 ve bunun dışında virulenslik oranını belirlemek amacıyla (A-26)5 kodlu bir başka izolat A-PDA'ya aşılınmış ve 26°C sıcaklıkta 15 gün karanlıkta inkübe edilmiştir,

2. Bir önceki gelişme raporunda belirtildiği şekilde kontaminasyonu engellemek üzere gram + ve – antibiyotik içeren Richards besin ortamının hazırlanması,

3.  $2 \times 10^7$  konidi içeren 1 ml'lik solüsyonun Richards besin ortamına aktarımı

Spor süspansiyonlarının etüvde 20 günlük inkübasyon sürecini tamamlanmasının ardından yapılan işlemler ise aşağıda sunulmuştur (Şekil 2.1.1):

1. Kaba filitre kağıdı ile spor süspansiyonlarında birinci gelişme raporu döneminde belirlendiği üzere 2 kere ön süzme ve ardından vakum pompası kullanarak mikro filitrelerle filtrat süspansiyonlarının süzülmesi,

2. Spor süspansiyonların pH'sının 5.7'ye ayarlanması,

3. 0,20 mikronluk filitreler kullanılarak vakum pompası yardımıyla süspansiyonların *in vitro* besin ortamlarına transfer edilmeden önce sterilizasyon amaçlı süzülmesi,

4. Otoklavlanmış temel besin solusyonuna (kotiledon ve gerçek sürgün ucu+hipokotil parçalarının rejenerasyonuna elverişli olarak hazırlanan) ve bir önceki gelişme raporunda tarafımızdan uygulanmasına karar verilen % 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ve 44'lik konsantrasyonlarda filtrat içeren süspansiyonunun ilave edilmesi.



**Şekil 2.1.1.** Filtrat hazırlığı aşamaları (1: 20 günlük spor süspansiyonu, 2: Spor süspansiyonlarının kaba filitreden geçirilmesi, 3: 0,22  $\mu\text{m}$ 'lik filitreden süspansiyonun süzülmesi, 4: *In vitro* besin ortamlarına filtrat ilavesi)

Donör bitkilerin *in vitro* olarak elde edilmesi ve ışınlama işlemi: Taner [25]'e göre %15 sakkaroz, %0.7 agar içeren, pH'sı 5.6 olan MS 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 Bölümü'nde bulunan  $^{137}\text{Cs}$  gama ışın kaynağı ile Van Harten [15]'e göre farklı dozlarda (9 dozda) ışınlanmıştır (Şekil 2.1.2). Işınlamayı takip eden 30 gün içinde bitkilerin yaşama yüzdelerine ve gelişmelerine göre  $\text{ED}_{50}$  saptanarak ışınlama için gerekli olan etkili doz belirlenmiştir. Belirlenecek olan dozun %10 alt ve üst değerleri kullanılarak 3 dozda *in vitro* bitkiler ışınlanarak, ışınlama sonrası besin ortamlarında oluşabilecek yapısal değişimler nedeniyle bitkiler hemen taze besin ortamlarına aktarılmıştır



**Şekil 2.1.2.** *In vitro* bitkilerin Co<sup>60</sup> ışın kaynağı ile ışınlanması

Besin ortamlarının hazırlanması, bitki parçalarının besin ortamlarına transferi ve alt kültür işlemi: Araştırmada Taner [25], Taner ve ark. [23], Taner ve Yanmaz [27]'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 Megnegneau ve Branchard [22]'e göre hazırlanan farklı dozlardaki filitrat ve alternatif bir yöntem olarak da Malepszy ve Kazzaz [19]'ın belirttiği şekilde fusarik asit ilavesi yapılması planlanmıştır. Işınlanmış ve ışınlanmamış *in vitro* bitki parçaları (hipokotiledon, kotiledon, gerçek yaprak+hipokotil parçaları) Taner ve ark. [27]'e göre hazırlanarak besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Gerçek yaprak+hipokotil parçaları sürgün oluşumunu ve kardeşlenmeyi teşvik etmek üzere [23] besin ortamına transfer edildikten sonra 16/8 h aydınlatma rejimli iklim odasında  $\pm 26^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta inkübe edilerek kültürlerin sürgün geliştirme kapasiteleri haftalık yapılan sayımlarla belirlenecektir. Kallus oluşumu için kotiledon ve hipokotiledon parçaları  $\pm 26^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta Selecta marka etüvde karanlık koşullarsa 3 hafta süreyle tutulacaktır. Bu süre sonunda kallus oluşum miktar ve kapasiteleri tarafımızdan belirlenmiş olan [25] 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 çoğaltılacak ve köklenme için  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  IAA içeren MS besin ortamına aktararak sağlıklı olarak gelişen *in vitro* bitkiler kademeli olarak dış koşullara alıştırılacaktır.

Dış koşullara alınan bitkilerin testlenmesi: *In vitro* koşullarda hastalık etmenine dayanıklı olduğu tesbit edilen bitkiler ve bu bitkilerden elde edilen tohumlara ait fideler Erzurum ve ark. [14]'nın belirttiği şekilde saksı inokülasyonuna tabi tutularak bitkilerin yaşama oranları tesbit edilecektir. Dayanıklı olduğu belirlenen bitkiler eğer mutasyon sonucu ortaya çıkan farklılık nedeniyle oluşmuşlar ise bu aşamadan sonra klasik ıslah çemberi ve buna entegre olarak yerli çeşitlerimizde uygulanmakta olan double haploidizasyon tekniği kullanılarak başlangıç

materyalinin özellikleri korunarak hastalık etmenine dayanıklı olan hatların mikro ve makro verim denemeleri yapılacaktır.

## 2.2. Çalışma Takvimi

- 2004:** İzolatlardan filitrat eldesi, etkili ışın dozunun belirlenmesi, filitratlı besin ortamlarının hazırlığı, besin ortamlarında ışınlanmış ve ışınlanmamış *in vitro* bitkilerden alınan bitki parçalarının kültüre alınması, filitratlı ortamlara bitki parçalarının reaksiyonlarının belirlenmesi işlemleri gerçekleştirilecektir. Metot oturtmak üzere yapılan bu işlemlerde ortaya herhangi bir aksaklık çıkarsa bu konuda gerekli düzenlemeler yapılması.
- 2005:** Belirlenen dozlarda ışınlanmış materyalin filitratlı ortamlarda kültüre alınması, yaşama yeteneğinde olan bitkilerin *in vitro* mikro çelikleme ile çoğaltılması, sitolojik gözlemlerin yapılması, *in vitro* bitkilerin dış koşullara alıştırılması ve bu bitkilerden tohum elde edilmesi.
- 2006:** Proje yürütücüsü A.B.D'de 10 aylık bir eğitim programına katıldığı için proje bir yıl süreyle dondurulmuştur.
- 2007:** Belirlenen dozlarda ışınlanmış materyalin filitratlı ortamlarda kültüre alınması, yaşama yeteneğinde olan bitkilerin *in vitro* mikro çelikleme ile çoğaltılması, sitolojik gözlemlerin yapılması, *in vitro* bitkilerin dış koşullara alıştırılması ve bu bitkilerden tohum elde edilmesi.
- 2008-2009:** Klasik ıslah yöntemlerinden yararlanarak elde edilen dayanıklı materyalin geriye melezlenmesi ve tescile yönelik olarak çalışmaların yönlendirilmesi. Laboratuvar koşullarında elde edilen tüm verilerin değerlendirilerek proje sonuç raporunun hazırlanması.

## 2.3. Bulgular

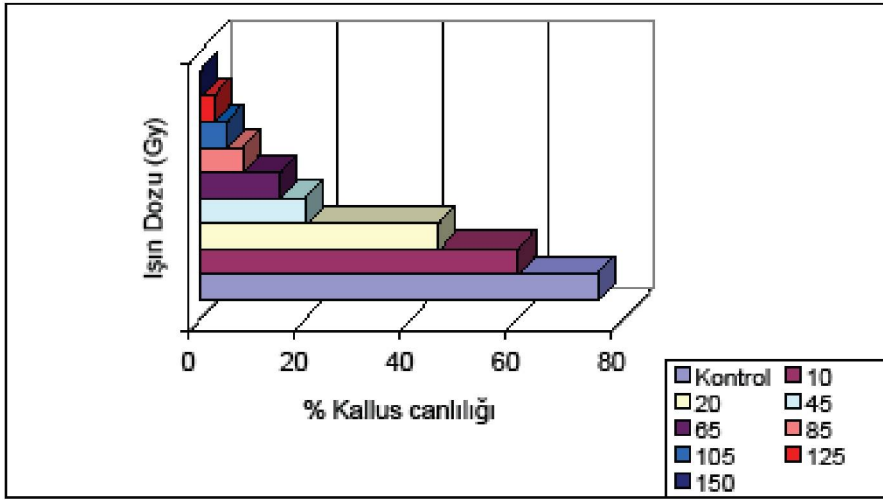
Farklı filitrat dozları içeren kotiledon ve gerçek sürgün ucu+hipokotil parçalarının rejenerasyonunu sağlayacak şekilde hazırlanan besin ortamlarına elde edilen *in vitro* bitkilerden kotiledon ve gerçek sürgün ucu+hipokotil parçalarının dikimi gerçekleştirilmiştir. Dikim sonrası kotiledon parçaları 3 hafta süreyle  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıkta, karanlık koşullarda kallus oluşumunun uyarılması için inkübatörde tutulmuştur. Gerçek sürgün ucu+hipokotil parçalarına ait kültürler ise 1 hafta süreyle  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıkta, karanlık koşullarda tutulduktan sonra, aynı sıcaklıkta ve 16/8 saat aydınlatma rejimindeki iklim odasında inkübasyona bırakılmıştır. Orta Anadolu'da etkili olan (A-26)5 izolatu çalışması sırasında kullanılmış ve bu izolata bitki parçalarının vermiş olduğu reaksiyonların daha belirgin olduğu tarafımızdan saptanmıştır. A1-4 izolatinin virulensliğine göre

(A-26)5 izolatinın daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bunların yanı sıra TAEK SANAEM bünyesi'nde bulunan Co<sup>60</sup> gama ışın kaynağı (Şekil 2.1.2) ile 7 gün yaşlı in vitro bitkicikler 0, 10, 20, 45, 65, 85, 105, 125 ve 150 Gy dozlar kullanılarak ışınlanmıştır (kaynak gücü 0,338 Gy/saniye). Işınlanan bitkilerden alınan kotiledon ve gerçek sürgün ucu+hipokotil parçalarının rejenerasyonunu sağlayacak şekilde hazırlanan besin ortamlarına elde edilen edilen in vitro besin ortamlarına dikimi gerçekleştirilmiştir. Dikim sonrası kotiledon parçaları 3 hafta süreyle 26±1°C sıcaklıkta, karanlık koşullarda kallus oluşumunun uyarılması için inkübatörde tutulmuştur. Gerçek sürgün ucu+hipokotil parçalarına ait kültürler ise 1 hafta süreyle 26±1°C sıcaklıkta, karanlık koşullarda tutulduktan sonra, aynı sıcaklıkta ve 16/8 saat aydınlatma rejimindeki iklim odasında inkübasyona bırakılmıştır. Gerek filitratlı ortamlarda kültüre alınan ışınlanmamış bitki materyalinin gelişim verileri gerekse ışınlanmış bitkilerden kültüre alınan bitki parçalarından elde edilen veriler göz önüne alınarak etkili dozları belirlemek üzere regresyon analizleri yapılmıştır.

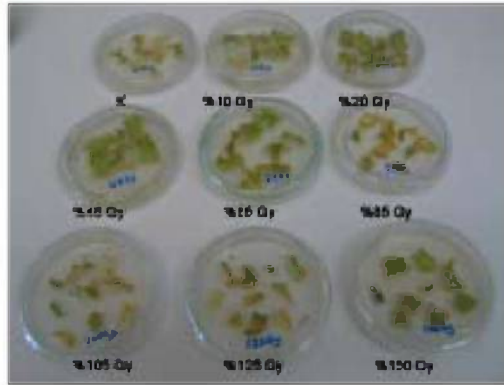
Işınlama sonrası kültüre alınan kotiledon parçalarının kültürden 3 hafta sonra canlılık düzeylerine bakılarak elde edilen verilerle yapılan regresyon analizleri sonucunda (Tablo 2.3.1) 21.75 Gy'lik dozun etkili doz olduğu tesbit edilmiştir. Artan ışın dozuna bağlı olarak kültüre alınan kotiledon parçalarının yaşama ve kallus geliştirme oranlarında oransal olarak azaldığı ve kontrolda %80 oranında kallus oluşumu gerçekleşirken 125 ve 150 Gy'lik dozlarda bu oranın %0'a kadar gerilediği belirlenmiştir. (Şekil 2.3.1). Yine artan dozlarla bağlı olarak elde edilen kallusların renklerinde Şekil 2.3.2'den de izlendiği gibi kirli sarı renkten başlayarak kararma şeklinde bir oluşum olduğu saptanmıştır.

**Tablo 2.3.1.** Farklı ışın dozlarına göre kotiledon parçalarının yaşama oranları  
Canlı kallus (%)=57,44+(-0,48) × Doz, R<sup>2</sup>= 0,828

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



**Şekil 2.3.1.** Kallus canlılığı üzerine farklı ışın dozlarının etkisi



**Şekil 2.3.2.** Işınlanmış *in vitro* bitkilerden alınan kotiledon parçalarının kültürden 3 hafta sonraki gelişim düzeyleri ve kallus renklerindeki farklılaşma

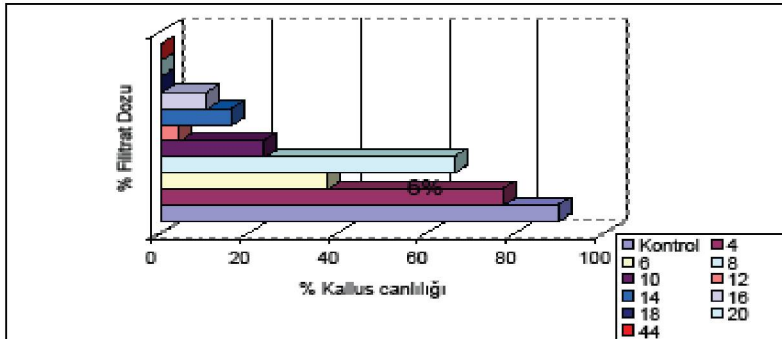
Farklı oranlarda filtrat içeren besin ortamlarında kültüre alınan hipokotiledon parçalarının kallus gelişim kapasitelerine göre kültür başlangıcından 3 hafta sonra yapılan gözlemlerden elde edilen verilerle yapılan regresyon analizi sonucunda (Tablo 2.3.2) etkili filtrat uygulama dozunun %6.73 oranında olduğu belirlenmiştir.



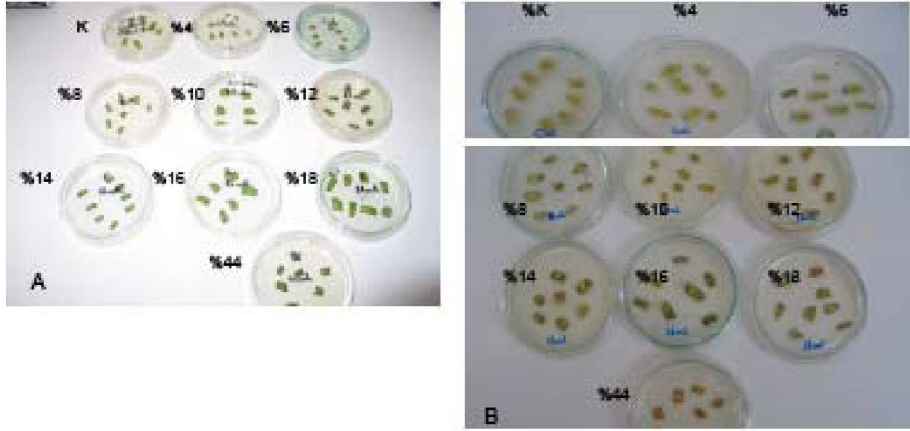
Şekil 2.3.3 ve Tablo 2.3.2'den de izlendiği gibi artan dozlara bağlı olarak kallus oluşum oranının düştüğü ancak %10'luk uygulamada canlılıkta bir atış var gibi görülmekte gelişmeyi takip eden dönemlerde bu kallusların kararak canlılıklarını yitirdikleri belirlenmiştir. Yine %18, 20 ve 44'lük filitrat uygulamalarında kültüre alınan bitki parçalarında kararma olduğu gözlenmiştir. Şekil 2.3.4'da ilk kültür başlangıcındaki bitki parçaları ile 3 haftalık inkübasyon sonrası inkübatörden alınan bitki parçalarının gelişim farklılıkları çok net olarak gözlenebilmiştir.

**Tablo 2.3.2.** 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                        |
| <b>Regresyon Değeri</b> | <b>% 6,73</b>            |



**Şekil 2.3.3.** Kallus canlılığı üzerine farklı filitrat dozlarının etkisi



**Şekil 2.3.4.** A: Farklı filtrat dozları içeren besin ortamlarında kültüre alınan kotiledon parçaları, B: Kültüre alınan kotiledonların filtratlı ortamlarda 3 hafta sonraki gelişimleri

Filtratlı 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 süreci takip eden her iki hafta da bir sıvı kültürler alt kültüre alınarak hücre kolonilerinin çoğaltımına devam edilmiştir (Şekil 2.3.5). İlk ana kültür sonrasında elde edilen sıvı kültürlerle ait veriler Tablo 1'de sunulmuştur. Halen gözlemlere devam edilmekte olup önümüzdeki çalışma dönemi içinde elde edilen hücre kolonilerinin filtratlı sıvı besin ortamlarındaki performansları denenecektir. Bunların dışında rutin olarak filtrat üretimi ile ilgili işlemlere devam edilmektedir.

**Tablo 2.3.3.** Farklı oranlarda filitrat içeren besin ortamlarından elde edilen kallusların sıvı kültürde yaşama durumları

| 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  |

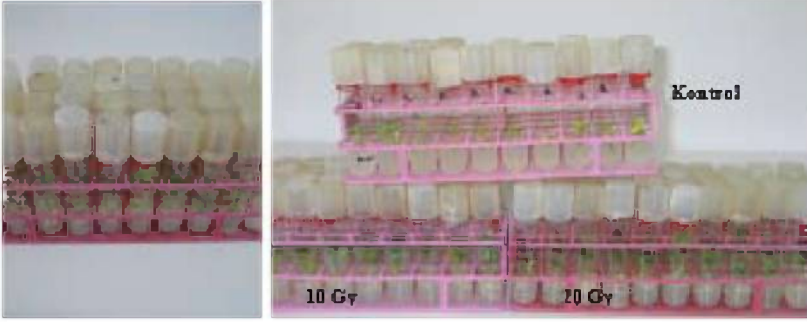
0= Hücre kolonisi oluşumu yok, 1= Hücre kolonisi oluşum oranı zayıf,  
2= hücre kolonisi oluşum oranı orta, 3= Hücre kolonisi oluşum oranı yüksek



**Şekil 2.3.5.** Farklı oranlarda filitrat içeren ortamlardan elde edilen yaşama yeteneğindeki kalluslardan sıvı besin ortamında hücre kolonisi oluşumu

Ara raporlarda belirttiğimiz gibi hipokotil + sürgün ucu içeren bitki parçalarının özellikle kontrol grubu açısından göstermiş oldukları rejenerasyon kapasitesi bizi tatmin etmediği için bu gelişme raporu döneminde besi ortamında modifikasyona gidilerek 0.5 mg<sup>l</sup>-1 IAA ve 60 gl<sup>-1</sup> sakkaroz içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Gerek kontrol gerekse ışınlanmış bitki parçalarının bu yeni besin ortamında bitki gelişim kapasitesi bir önceki besin ortamına göre oldukça başarılı sonuç vermiş (Şekil 2.3.6) olması nedeniyle araştırmanın bundan sonraki aşamalarında modifiye etmiş olduğumuz yeni ortamın kullanımına karar verilmiştir.

Bir önceki çalışma döneminde 30 Gy'lik dozun üzerindeki ışınlamaların rejenerasyon kapasitesi üzerinde olumsuz etkiler yaptığı görüldüğü için *in vitro* bitkileri 10-20 Gy'lik dozlarda ışınlanması gerçekleştirilerek denemeler bu dozlarla devam ettirilmiştir.



**Şekil 2.3.6.** Kontrol, 10 ve 20 Gy dozlarda ışınlanan *in vitro* bitkiciklerden kültüre alınan bitki parçalarının görünümü

### 3. SONUÇ

Bu zamana kadar yürütölen çalışma sonucunda elde etmiş olduğumuz bulgular in vitro mutasyon çalışmaları ile toksitite çalışmalarının beraberce başarılı bir şekilde sürdürölebileceğini göstermiştir. Gerek filitrat uygulamaları ve gerekse ışınlama çalışmaları sonucunda elde edilen verilerle yapılan regresyon analizi sonuçları bundan sonra bu konuda çalışma yapacak araştırıcılar için önemli referans verileri oluşturmaktadır. Dolayısı ile gerek metodolojinin oturtulması ve gerekse klasik mutasyon ıslahı çalışmaları ile birlikte *in vitro* mutasyon tekniklerinin kullanımı sadece kavun türü için değil diğer türlerde de yürütölecek olan araştırmalar ağıısından büyük yarar sağlayacaktır.

#### 4. KAYNAKÇA

1. Risser G, Banihashemi Z, Davis DW (1976) A proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races and resistance genes in *Cucumis melo*. *Phytopathology* 66: 1105-1106
2. Mas P, Molot PM, Risser G (1981) Fusarium wilt of muskmelon. In: Nelson PE, Toussen TA, Cook RJ (eds.) *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*, Pennsylvania State University Press, University Park, USA, pp 169-177
3. Martyn RD, Gordon TR (1996) Fusarium wilt of melon. In: Zitter TA, Hopkins DL, Thomas CE (eds.) *Compendium of Cucurbit Diseases*, APS Press, St Paul, USA, pp 11-13
4. Joobeur T, King JJ, Nolin SJ, Thomas CE, Dean RA (2004) The fusarium wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *The Plant Journal* 39: 283-297
5. Zheng XY, Wolff DW (2000) Randomly amplified polymorphic DNA markers linked to fusarium wilt resistance in diverse melons. *Hortscience* 35: 716-721
6. Wang YH, Thomas CE, Dean R, 2000. Genetic mapping of fusarium wilt resistance gene (Fom-2) in melon (*Cucumis melo* L.). *Molecular Breeding* 6: 379-389
7. Burger Y, Katzir N, Tzuri G, Portnoy V, Saar U, Shriber S, Perl-Treves R, Cohen R (2003) Variation in the response of melon genotypes to *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race 1 determined by inoculation tests and molecular markers. *Plant Pathology* 52: 204-211
8. Zink FW, Thomas CE (1990) Genetics of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races 0, 1, and 2 in muskmelon line MR-1. *Plant Disease* 80: 1230-1232
9. Wechter WP, Whitehead MP, Thomas CE, Dean RA (1995) Identification of a randomly amplified polymorphic DNA marker linked to the Fom-2 Fusarium wilt resistance gene in muskmelon MR-1. *Phytopathology* 85: 1245-1249
10. Anonymous (2005) Provisional 2004 production and production indices data, FAO, [www.fao.org](http://www.fao.org).

11. Fantino MG, and Zengin H (1974) Ricerche sull'agente dell'avvizzimento del cocomero e del melone. *Informatora Fitopatologica* XXIV, 7: 7-10
12. Yıldız M (1977) 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. Thesisi, Ege University of Agricultural Faculty, Department of Plant Protection, pp 112
13. Yücel S, Pala H, Sarı N, Abak K (1994) 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, pp 87-89
14. Erzurum K, Taner KY, Seçer E, Yanmaz R, Maden S (1999) Occurrence of races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* causing wilt on melon in Central Anatolia. *J Turk Phytopathology* 28: 87-97
15. Van Harten AM (1998) Mutation breeding theory and practical applications. Cambridge University Press, ISBN 0521470749. pp 353
16. Chawla HS and Wenzel G (1987) In vitro selection of fusaric acid resistant barley plants. *Plant Breeding* 99: 159-163
17. Gray LE, Guan YQ, Wildholm JM, Gray LE (1986) Reaction of soybean callus to culture filtrates of *Phialophora gregata*. *Plant Sci* 47: 45-55
18. Connell SA, Legg T, Heale JB (1990) Sensitivity of cells and protoplasts of Hop cultivars to cytotoxic components of culture filtrates of *Verticillium albo-atrum* isolates from Hop. *Plant Pathol* 39: 92-101
19. Malepszy S and El-Kazzaz AA (1990) In vitro culture of *Cucumis sativus* L. selection of resistance *Fusarium oxysporum*. *Acta Hort. (In Vitro Culture and Horticultural Breeding)* 280:455-458
20. El-Kazzaz AA and Malepszy S (1992) 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) 121-129
21. Smith M (1985) In vitro mutagenesis. *Annual Review of Genetics*, 19: 423-62
22. Megnegneau B and Branchard M (1991) Effects of fungal culture filtrates on tissue from susceptible and resistant genotypes of muskmelon to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Plant Science* 79: 105-110
23. Taner KY, Yanmaz R, Yazar E, Alper A (2004) The effects of sucrose concentration and pH level on different explant types for *in vitro* organogenesis in melon (*Cucumis melo* L.) *Alatarim Journal* 3: 11

24. Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
25. Taner KY (2002) Plant formation by somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). PhD Thesis. Ankara University Graduated School Of Science, Horticultural Science, Ankara/Turkey p:145
26. Çürük S (1999) Investigations on in vitro plant regeneration and genetic transformation on melon cultivars. Çukurova University Graduated School of Science, Horticultural Science, Adana, Turkey, p 217
27. Taner KY, Yanmaz R (2003) Somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). 4th National Horticulture Congress, September 8-12, Antalya-Turkey, pp 361-364



## 5. TAEK TEKNİK RAPOR FORMATI BİLGİ FORMU

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>Rapor Bilgileri</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>1.Yayın Yılı/No</b><br>2009/5                            |
| <b>2. Rapor Başlığı</b><br>Kavun Solgunluk Etmeni <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.melonis ırk 1,2' e Karşı Doku Kültürü ve Mutasyon Teknikleri Kullanarak Dayanıklı Kavun Tiplerinin Seçilmesi Üzerinde Araştırmalar (Devam eden proje)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>3.Yayın Kurulu Tarih (Gün/Ay/Yıl)-No</b><br>27.05.2008-5 |
| <b>4. Yazarlar</b><br>Dr.Yaprak Kantoğlu, Dr.Emine Seçer, Yard. Doç.Kudret Erzurum, Dr.Burak Kunter, Süreyya Şekerci, Nüket Kayabaşı, Dr.Mustafa Özçoban, Dr.İhsan Tutluher, Dr.Hayrettin Peşkirioğlu, Dr.Zafer Sağel, Prof. Dr.Salih Maden, Prof. Dr.Ruhsar Yanmaz                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <b>5-Yayın Türü</b><br>Teknik Rapor                         |
| <b>6. Çalışmayı Yapan Birim</b><br>TAEK, SANAEM Uygulama Bölümü Tarım Birimi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                             |
| <b>7. Destekleyen veya Ortak Çalışılan Kuruluşlar</b><br>TAEK ve TÜBİTAK tarafından desteklenmekte, Ankara Üniversitesi Ziraat fakültesi ile ortak çalışılmaktadır.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                             |
| <b>8. Özet</b><br>Bu çalışmada Orta Anadolu Bölgesi kavun yetiştiriciliğinde büyük zararlara neden olan <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> ' in 1,2 nolu ırkına karşı dayanıklılığın <i>in vitro</i> düzeyde belirlenmesi ve gerek mutasyon yoluyla gerekse hücresel düzeyde doğal tolerans mekanizmasından yararlanılarak dayanıklı bireylerin elde edilebilirliği incelenecektir. Eğer bu metotla olumlu bir sonuç alınabilirirse elimizde var olan genetik materyal hücresel düzeyde selekte edilerek dayanıklı olan hücrelerden btki rejenerasyonu gerçekleştirilecektir. Böylece elimizdeki genetik materyalin geliştirilmesi ve hastalık etmenine dayanıklı yeni bireylerin ortaya çıkartılması sağlanacaktır. |                                                             |
| <b>9. Anahtar Kelimeler</b><br>Kavun, <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> ırk 1,2, kültür filitratu, kallus kültürü, süspansiyon kültürü                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>10. Gizlilik Derecesi</b><br>Tasnif Dışı                 |

### GİZLİLİK DERECELERİ

**TASNİF DIŞI (UNCLASSIFIED):** İçerdiği konu itibarıyla, gizlilik dereceli bilgi taşımayan, ancak devlet hizmetiyle ilgili bilgileri içeren evrak, belge ve mesajlara verilen en düşük gizlilik derecesidir.

**HİZMETE ÖZEL (RESTRICTED):** İçerdiği konu itibarıyla, gizlilik dereceli konular dışında olan, ancak güvenlik işlemine ihtiyaç gösteren ve devlet hizmetine özel bilgileri içeren evrak, belge ve mesajlara verilen gizlilik derecesidir.

**ÖZEL (CONFIDENTIAL):** İçerdiği konu itibarıyla, izinsiz olarak açıklandığı takdirde, milli menfaatleri olumsuz yönde etkileyecek evrak, belge ve mesajlara verilen gizlilik derecesidir.

**GİZLİ (SECRET):** İzinsiz açıklandığı takdirde, milli güvenliği, milli prestij ve menfaatleri ciddi ve önemli bir şekilde zedeleyecek olan evrak, belge ve mesajlara verilen gizlilik derecesidir.



TÜRKİYE ATOM ENERJİSİ KURUMU