

KAVUN (*Cucumis melo* L.)'DA FARKLI BİTKİ KISIMLARININ VE ORTAM BİLEŞİMİNİN SOMATİK EMBRİYO OLUŞUMUNA ETKİLERİ^{1,2}

K.Yaprak TANER¹, Ruhsar YANMAZ²

ÖZET: Bu araştırmada kavunda somatik embriyo oluşumu üzerine *in vitro* koşullarda kullanılan farklı eksplantların ve değişik bileşimdeki besin ortamlarının etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda 1/2 kuvvetinde hazırlanan 2,4 D (0.5 mg l⁻¹) ve kinelin (0.5 mg l⁻¹) içeren MS besin ortamında kültüre alınan kotiledon eksplantlarından somatik embriyo elde edilebilmiştir. Embriyo rejenerasyon oranı %1.5 olarak belirlenmiş ve bu embriyoların %3.3'ü bitkiye dönüşmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kavun, *Cucumis melo* L., Somatik embriyogenesis

THE EFFECTS OF DIFFERENT EKSPANT TYPES AND MODIFIED MS MEDIA ON SOMATIC EMBRYO FORMATION IN MELON (*Cucumis melo* L.)

ABSTRACT: In this research, the effects of different explant types and modified MS media on somatic embryo formation in *Cucumis melo* L. were investigated. According to results half strength MS media supplemented with 2,4 D (0.5 mg l⁻¹) and kinetin (0.5 mg l⁻¹) gave best results for somatic embryo induction from cotyledon explants. Embryo regeneration ratio was determined 1.5% and 3.3% of them regenerated as plant.

Keywords: Melon, *Cucumis melo* L., Somatic embryogenesis

GİRİŞ

Kabakgiller familyasında yer alan kavun (*Cucumis melo* L) gerek ülke genelinde gerekse yaşadığımız bölge olan Orta Anadolu Bölgesinde oldukça önemli ekiliş alanına sahip olan bir sebze türüdür. Ancak yabancı tozlanmaya açık bir tür olması yürütülmekte olan klasik ıslah çalışmalarını sınırlandırmaktadır. Bunun dışında son yıllarda ekiliş alanlarında ciddi anlamda sorun yaratan *Fusarium* solgunluğu etmeni nedeniyle; üretiminde sorunlarla karşılaşan bir tür olarak da karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle bu türle ilgili olarak yürütülmekte olan ıslah çalışmalarının süresini kısaltabilmek ve bu çalışmaların etkinliğini artırabilmek amacıyla özellikle dünyada son

20 yıllık süreç içinde ülkemizde ise son yıllarda *in vitro* tekniklerden yararlanılmaya çalışılmaktadır. Araştırmacılar tarafından bitki hücrelerinin totipotensi özelliğinin ortaya çıkarılması sonucunda embriyo oluşumu için mutlaka reproduktif bir sürece gerek kalmadan uygun besin ortamlarında kültüre alınan farklı bitki parçalarından embriyo oluşumu ve bunlardan da tam anlamıyla bitki eldesinin mümkün olduğu görülmüştür (Bhojwani ve Razdan 1983).

Tamamen somatik hücrelerden oluşan bu yapılara somatik embriyo adı verilmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda ilk olarak *in vitro* koşullarda somatik embriyo oluşumu *Daucus carota* L.'da gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda yürütülen çalışmalar sonucunda bugün 33 farklı familyaya üye 80

¹T.C. Atom Enerjisi Kurumu ANTHAM Radyobioloji Bölümü İstanbul Yolu, Saray 06983-Ankara

²Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü 06110-Ankara

^{*}Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmektedir

^{**}Doktora tez çalışması

türde somatik embriyo eldesi sağlanmıştır (Bhojwani ve Razdan 1983). Bu familyalardan biri olan Kabakgiller familyasında somatik embriyo eldesine yönelik çalışmalar familyaya üye olan kabak, hıyar ve kavunda yoğun olarak yürütülmektedir. Bu türlerde kallus ve hücre süspansiyon kültürleri yolu ile somatik embriyolar elde edilebilmektedir (Chee 1992, Ladyman ve ark. 1992, Oridate 1992, Gray ve ark. 1993, Kintzios ve ark. 1997). Özellikle son yıllarda bitki ıslahında çığır açan transgenik bitki eldesinde somatik embriyogenesiz önemli bir kaynak olarak karşımıza çıkmaktadır. Böylelikle ıslah çalışmaları için önemli olan somaklonal varyasyonların eldesi mümkün olabilmektedir (Debejon ve Branchard 1993). Özellikle dayanıklılık ıslahına yönelik çalışmalarda kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinden yararlanarak hastalıklara, bazı çevresel streslere karşı dayanıklı hücreleri seçmek ve bu hücrelerden dayanıklı bitkileri elde etmek mümkün olabilmektedir (Gonsalves ve ark. 1994). Bitkilerin somatik embriyo oluşturma yetenekleri tür ve çeşitlere göre farklılık göstermekte olduğu için (Debeaujon ve Branchard 1993) bu tip çalışmalarda kullanılacak eksplant kaynağının belirlenmesi önemli bir nokta olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, kavunda (*Cucumis melo L.*) ileride yapılması planlanan dayanıklılık ıslahı çalışmalarında somatik embriyogenesisten yararlanmak için, somatik embriyo ve bunlardan bitki eldesi üzerine etkili olan en uygun eksplant tipi, besin ortamı bileşimi ve oksin sitokinin dengesini belirlemektir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada Orta Anadolu koşullarında yaygın olarak yetiştirilmekte olan Kuşçular kavun çeşidine ait tohumlar ve bu tohumlardan *in vitro* koşullarda elde edilen bitkilere ait kotiledon, hipokotil, gerçek yaprak, sürgün ve kök parçaları kullanılmıştır.

Eksplant kaynağı bitkileri *in vitro* koşullarda elde etmek için tohumlar %30'luk sodyum hipoklorit solusyonu ile 20 dakika süreyle dezenfekte edilmiş, dezenfeksiyon sonrası 3

kere steril saf su ile çalkalanan tohumlar steril kabinde tohum kabuklarından ayrıldıktan sonra, hormonsuz Murashige ve Skoog (1962) besin ortamı içeren magentalarda (60ml/magenta) her magentada 4 tane tohum olacak şekilde kültüre alınmıştır. Kùltürler 26±1°C'de 16 h gün uzunluğu olacak şekilde iklim odasında tutulmuştur. Kùltürlerin kurulmasından 10 gün sonra bitkiciklerden ayrılan hipokotil ve kotiledon parçaları Singh ve ark. (1990), Burza ve Malepsezy (1995)'in önerileri göz önüne alınarak tam ve 1/2 kuvvetinde, 250 mg⁻¹ edamin (casein hydrolystate), 2,4 D/Kinetin, NAA/Kinetin (0/0, 0/0.5, 0/1, 0.5/0, 0.5/0.5, 0.5/1, 1/0, 1/0.5, 1/1 mg⁻¹) içeren MS besin ortamında her petride 10 adet eksplant olacak şekilde kültüre alınmıştır. Yine kùltürlerin kurulmasından 20 gün sonra alınan yaprak, sürgün ve kök parçaları Gray ve ark. (1993)'ün verileri dikkate alınarak bileşiminde KNO₃ bulunmayan ancak 1.7 kuvvetinde NH₄NO₃ ve 250 mg⁻¹ edamin (casein hydrolystate), 2,4 D/Kinetin, NAA/Kinetin (0/0, 0/0.5, 0/1, 0.5/0, 0.5/0.5, 0.5/1, 1/0, 1/0.5, 1/1 mg⁻¹) içeren MS besin ortamında her petride 10 adet eksplant olacak şekilde kültüre alınmıştır. Denemeler faktöriyel deneme tertibinde iki tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Kùltüre alınan kotiledon, hipokotil, yaprak, sürgün ve kök parçaları 3 hafta süre ile kallus oluşumunu sağlamak için karanlık koşullarda 26±1°C'lik etüvde tutulmuştur. 3 hafta sonunda eksplantlardan elde edilen kalluslarda Çizelge 1'de sunulan skala göz önüne alınarak çap ve ağırlık ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 1. Kallusların değerlendirilmesinde kullanılan kalite değerleri

Renk	Yapı	Puan
Yeşil	Sıkı	0
Yeşil	Gevşek	1
Beyaz	Sıkı	1
Beyaz	Gevşek	3
Krem	Sıkı	2
Krem	Gevşek	3

Karanlık koşullardan çıkarılan kalluslar 16h gün uzunluğu olacak şekilde 26±1°C sıcaklıktaki iklim odalarında inkübe edilmiş-

tir. Eksplantlardan embriyo oluşumu gözlemlendikten sonra binoküler altında incelenerek oluşan embriyoların sayısı ve tipi belirlenmiştir. İnkübasyon sırasında eksplantlardan oluşan somatik embriyoların bitkiye dönüşmesini sağlamak için 0, 0.1, 0.5 ve 1 mg^l⁻¹ IBA, %0.7 agar, % 1.5 sakkaroz içeren MS besin ortamında eksplantlardan ayrılan embriyolar kültüre alınmıştır. Sürgün gelişimi görülen bitkicikler hormonsuz MS besin ortamına aktararak gelişimleri sağlanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu araştırmada Kuşçular kavun çeşidine ait farklı bitki parçalarının modifiye edilmiş ve farklı dozlarda oksin/sitokinin içeren besin ortamlarında kallus ve somatik embriyo oluşturma durumları incelenmiştir. Sürgün, yaprak ve kök eksplantlarından yeterli düzeyde kallus gelişimi sağlanamamıştır. Buna karşılık kotiledon ve hipokotil parçalarında olumlu sonuçlar alınmış ve denemeye bu iki eksplant tipiyle devam edilmiştir. Bu iki eksplant tipinde de kallus miktar ve niteliği üzerine ortam bileşimi, oksin-sitokinin dengesinin önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2 ve Çizelge 3). 0.5 mg^l⁻¹ NAA/0.5 mg^l⁻¹ kinetin içeren tam MS besin ortamında kültüre alınan kotiledon eksplantlarında kallus oluşumu (0.6873 g/eksplant) en yüksek düzeyde sağlanırken elde edilen kallusların kalite değeri de en yüksek değer

olan 3 olmuştur. Buna karşın hipokotillerde en iyi sonuç (0.8386 g/eksplant) 1mg^l⁻¹ NAA/0 mg^l⁻¹ kinetin içeren ve 1/2 kuvvetinde hazırlanan MS besin ortamında elde edilmiştir. Kinetinin 0 mg^l⁻¹ düzeyinde kullanıldığı 1/2 kuvvetinde hazırlanan ortamlarda kültüre alınan kotiledon parçalarında ise kallus oluşumu sağlanamamıştır. Sonuç olarak kinetin 0 mg^l⁻¹ olduğu kombinasyonlarla daha yüksek düzeylerde olan kombinasyonlar karşılaştırıldığı zaman artan dozların özellikle kotiledon eksplantlarının kallus oluşturma yetenekleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür. 2,4D/Kinetin kombinasyonlarının kallus oluşumu üzerindeki etkileri 0.05 hata sınırları içinde ve kalite değerlerine paralel olarak değerlendirildiği zaman 2,4D'nin kinetin 0 mg^l⁻¹ olarak kullanıldığı kombinasyonlarda kallus oluşumu üzerinde daha etkili olduğu ve elde edilen kallusların kalite değerlerinin ise 2 ila 3 arasında değiştiği, istenilen tipte kallusların oluştuğu belirlenmiştir. Oksin olarak kullanılan 2,4D ile NAA birbirleri ile karşılaştırıldığı zaman 2,4D'nin kallus oluşumu üzerinde NAA'ya göre daha etkili olduğu saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu veriler Dixon (1985) ve Murray (1993)'ün bulguları ile paralellik göstermektedir. Kotiledon ve hipokotil parçalarının modifiye edilmiş ve değişik oranda oksin/sitokinin içeren MS besin ortamlarında somatik embriyo oluşturma yetenekleri incelendiği zaman, en iyi sonuç kotiledon

Çizelge 2. Farklı düzeylerde NAA ve kinetin içeren ortamlarda kültüre alınan bitki parçalarının ortalama kallus ağırlıkları ve kalite değerleri

DOZ(mg ^l ⁻¹)		Kotiledon				Hipokotil			
NAA	K	1/2 MS	K	Tam MS	K	1/2 MS	K	Tam MS	K
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	0.1559 lgh	2	0.2584 defgh	2	0.1861 elgh	2	0.2782 cdefgh	2
	1	0.2532 defgh	2	0.3062bcdefgh	2	0.3104 bcdefgh	2	0.3635 bcdefgh	3
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0.4181 abcdef	2
	0.5	0.3860abcdefg	2	0.6387 abc	3	0.5565 abcde	3	0.1893 elgh	0
	1	0.3101bcdefgh	2	0.3122bcdefgh	2	0.4609 abcdef	3	0.7214 ab	3
1	0	0	0	0.0778 hi	2	0	0	0.8386 a	3
	0.5	0.2377 defgh	2	0.2459 defgh	0	0.1004 gh	3	0.5990 abcd	0
	1	0.2830 cdefgh	0	0.3072bcdefgh	0	0.4498 abcdef	0	0.5438 abcde	3

K: Kalite değeri

Çizelge 3. Farklı düzeylerde 2.4D ve kinetin içeren ortamlarda kültüre alınan bitki parçalarının ortalama kallus ağırlıkları ve kalite değerleri

DOZ(mgl ⁻¹) 2,4D	K	Kotiledon				Hipokotil			
		1/2 MS	K	Tam MS	K	1/2 MS	K	Tam MS	K
0	0	0 e	0	0e	0	0 e	0	0 e	0
	0.5	0.1596 bcd	2	0.1601 bcd	2	0.1381 cd	2	0.2837 abc	0
	1	0.1601 bcd	2	0.1053 d	2	0.2837 abc	2	0.2006 abcd	3
0.5	0	0.3269 ab	2	0.2523 abcd	2	0.2837 abc	2	0.3080 abc	2
	0.5	0.2841 abc	0	0.2068 abcd	0	0.3052 abc	1	0.1732 bcd	0
	1	0.2151 abcd	0	0.2929 abc	0	0.3176 ab	0	0.1945 bcd	2
1	0	0.1811 bcd	3	0.1979 abcd	3	0.3170 ab	3	0.2874 abc	2
	0.5	0.1555 bcd	0	0.1783 bcd	2	0.3976 z	1	0.2730 abcd	3
	1	0.1352 cd	0	0.2281 abcd	2	0.2334abcd	0	0.2474 abcd	2

K: Kalite değeri

parçalarından alınmıştır (Çizelge 4). 1/2 kuvvetinde hazırlanan ve 0.5 mg⁻¹ 2.4D/0.5 mg⁻¹ kinetin içeren besin ortamında kültüre alınan kotiledon parçalarının %20'sinde globüler ve baston şeklinde embriyo oluşumu belirlenmiştir. Eksplant başına embriyo rejenerasyonu %1.5 oranında gerçekleşmiştir ve bu embriyoların %3.3'ü bitkiye dönüşmüştür. Ancak oluşan bitkilerin %85'i anormal bir gelişme gösterirken %15'i sağlıklı olarak gelişmiştir. Elde edilen somatik embriyoların bitkiye dönüşümlerini sağlamak için araştırmada farklı düzeylerde (0, 0.1, 0.5 ve 1 mg⁻¹) IBA içeren MS besin ortamlarında embriyolar kültüre alınmıştır.

Çizelge 4. Farklı eksplantların kallustan embriyo oluşturma düzeyleri

1/2 MS 2.4D/Kinetin	Kotiledon	Hipokotil
0	-	-
0	0.5	-
	1	-
	0	-
0.5	0.5	30
	1	-
	0	-
1	0.5	-
	1	-
Toplam embriyo	30	-

Çalışma sonucunda en iyi bitki gelişimi 0.5 mg⁻¹ IBA içeren MS besin ortamında sağlanırken diğer 3 dozda olumlu bir gelişme kaydedilememiştir. Araştırma sonucunda elde edilen bulguların Dixon (1985), Murray (1993), Deaubajon ve Branchard (1993) gibi

araştırmacıların kavunda yapmış oldukları çalışmalardan elde ettikleri sonuçlarla paralel olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda Kuşçular kavun çeşidinde kallustan somatik embriyo oluşumunu sağlamak için eksplant olarak kotiledon parçalarının kullanılması uygun görülmüştür. Ancak bu eksplant tipinden daha yüksek oranda embriyo oluşumunu sağlamak amacıyla bundan sonraki çalışmalarda diğer araştırmacıların veri ve önerileri (Debeajon ve Branchard 1993) dikkate alınarak kullanılan besin ortamının pH, sakkaroz ve agar düzeyleri üzerinde modifikasyonların yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir. Hipokotil eksplantlarından ise elde edilen kalluslardan embriyo elde edilememesine rağmen, elde edilen kallus kalitesinin kotiledonlardan elde edilenlerden daha iyi olması, bu kalluslardan süspanسیون kültürlerinde yararlanılabileceğini göstermektedir. Ancak Debeaujon ve Branchard (1993)'ın belirttiği gibi her türün ve o tür içinde yer alan çeşitlerin gerek kallus gerekse somatik embriyo oluşturmaları üzerinde genomik yapılarına bağlı olarak kullanılan besin ortamı, hormon tipi ve düzeylerine karşı göstermiş oldukları reaksiyonlar farklılık göstermektedir. Bu nedenle ileride yapılacak çalışmalarda başarılı sonuçlara ulaşabilmek için tür ve çeşit bazında uygun besin ortamı bileşimlerinin ve oksin/sitokin kombinasyonlarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- BHOJWANI, S.S., RAZDAN, M.K. 1983. Developments in crop science (5). Plant tissue culture, theory and practice. Elsevier Amsterdam, p:91-111.
- BURZA, W. and MALEPSZY, S. 1995a. Direct plant regeneration from leaf eksplants in cucumber (*Cucumis sativus* L.) is free of stable venetic variation. Plant Breeding 114, 341-345.
- CHEE, P.P. 1992. Initiation and maturation of somatic embryos of squash (*Cucurbita pepo*). HortScience 27(1):59-60.
- DEBEAUJON, I., BRANCHARD, M. 1993. Somatic embriyogenesis in *Cucurbitaceae*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34:91-100.
- DIXON, R.A. 1985. Plant cell culture. A practical approach. Irlpress, Oxford, Washington DC. p:90-104
- GRAY, D.J., McCOLLEY, D.W. and COMPTON, M.E. 1993. High frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* L. cultivars. J.Amer.Soc.Hort.Sci. 118(3): 425-432.
- GONSALVES, C., XUE, B., YEPES, M., FUCHS, M., LING, K., NAMBA, S., CHEE, P., SLIGHTOM, L.J., GONSALVES, D. 1994. Transferring cucumber mosaic virus-white leaf strain coat protein gene into *Cucumis melo* L. and evaluating transgenic plants for protection against infections. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119 (2) : 345-355
- KINTZIOS, S.E., TARAVIRA, N. 1997. Effects of genotype and light intensity on somatic embryogenesis and plant regeneration in melon (*Cucumis melo* L.). Plant Breeding 116, 359-362.
- LADYMAN, J.A., GIRARD, B. 1992. Cucumber somatic embryo development on various gelling agents and carbohydrate sources. HortScience 27(2):164-165.
- MURASHIGE ,T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- ORIDATE, T., ATSUMI, H., ITO, S., ARAKI, H. 1992. Genetic difference in somatic embryogenesis from seeds in melon (*Cucumis melo* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29:27-30.
- SINGH, M.N., KATHAL, R., BHATNAGAR, S.P. 1990. Regeneration of plants from hypocotyl and cotyledon cultures of *Cucumis melo* cv. Pusa Madhuras. Horticultural Abst. Vol.64, No:1, 0018-5280.