



TR0100023

## TEK BOĞUM KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE BAZI F<sub>1</sub> HİBRİD DOMATES ÇEŞİTLERİNDE KLON ÇALIŞMALARI

Rıfat KARAKURT\*

### 1. GİRİŞ

Tomurcukların izole edilerek, elde edilen sürgünlerin birbirini takip eden işlemlerle köklendirilmesi konusunda domateste yapılan ilk çalışma Pierik ve ark. (1988a), daha sonraki çalışmalar ise Polevaya ve ark. (1988), Gorbatenko (1990), Fari ve ark. (1991), Kappel ve Butenko (1991) tarafından yapılmıştır.

Kültürün ilk gelişme aşamasında nodal explantların üzerindeki apikal dominansi etkisi kaldırılarak, bunların çoğul-sürgün oluşumu doğrultusunda indüklenmeleri sözkonusudur. Bu indüklenme genel olarak sitokinin uygulanması ile sağlanmaktadır. Fakat çalışmaların, nodal dokularla düzenlenmesi durumunda materyalin hormon üretim ve dağıtımını yapabilecek yeterli bir organizasyona sahip olmasından dolayı büyümeyi düzenleyici madde gereksinimi ortadan kalkmaktadır.

Sürgün oluşturma aşamasında amaç, maksimum sayıda sürgün elde etmektir. Warren (1991), ilk indüklenme için nodal dokuların hormon üretim ve dağıtımını yapabilecek yeterli bir organizasyona sahip olmalarından dolayı sitokinin kullanımına gerek olmadığını belirtmektedir. Fakat, ilk aşamadaki içsel indüklenmenin sürgün oluşturmaya yeterli olmadığı, özellikle in vivo koşullarda tek bir sürgün gelişmesine yeterli olabilecek hormon üretiminin çoğul-sürgün oluşumunun gereksinimini karşılayamayacağı dikkate alınmalıdır.

Yan koltuk sürgünü oluşturmada sürgünlerdeki apikal dominansi etkisini ortadan kaldırmak için sitokinin kullanılmaktadır. Bu amaca en uygun sitokinin Zip'tir. Zorzoli ve ark. (1988) MS ortamına 1 mg/l BA + 1 mg/l IAA ilavesinin domateste sürgün oluşturmada oldukça etkili olduğunu belirtmektedir. Schnapp ve Preece (1986)'in yaptıkları bir çalışmada 5 mg/l BA içeren MS ortamında fantastik domates çeşidinde başarılı bir sürgün oluşumu sağlanmıştır.

Warren (1991)'e göre dışsal oksin uygulaması koltuk altı sürgün oluşumunu etkilememekle birlikte, oksin varlığı ile kültür daha iyi gelişmektedir. Ayrıca, sürgün oluşumu da genel olarak sitokinin /oksin oranı ile ilişkili olup, Polevaya ve ark. (1988) domateste sürgün oluşturma ortamında BA ile birlikte IAA kullanımının iyi sonuç vereceğini belirtmektedir.

Kök oluşturma aşamasında, II. Aşamada elde edilen sürgünler köklendirilerek tam bitkiler oluşturulmaktadır. In vitro tek boğum kültür yöntemi ile elde edilen "bitkicik frekansı" explant başına elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinden sonra elde edilen köklü sürgün veya bitkicik sayısıdır. Çoğaltma süresi ise bitkicik elde edilinceye kadar geçen süredir. Bu süre genotip ve kültür koşullarına bağlı olmak üzere 9-15 haftalık bir dönemi kapsayabilir. Gorbatenko (1990) domatesin 472 ve 1251 hatlarında, tek boğum explantlarını kullanarak % 22 ve % 24'lük bir bitkicik oranı elde ettiğini belirtmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Z.K.Ü. Bartın Meslek Yüksekokulu Seracılık Programı BARTIN

Polevaya ve ark. (1988) domateste apikal ve tek boğum explantlarını kullanarak 9-12 haftalık bir dönemde toplam olarak 100 bitkicik elde etmiştir. Pierik ve ark. (1988 a) ise 8-9 haftalık bir dönemde tek bir nodal explanttan 4-5 tane yeni bitkicik elde edildiğini bildirmektedir. Domates ve patlıcanda nodal explantları kullanarak, Fari ve ark. (1991) elde ettikleri bitkicik sayısı/explant kaynağı fide oranının 3-30 arasında değiştiğini, ayrıca Koppel ve Butenkol (1991) Moskovski oseni kısmen steril domates hattına ait meristematik explantları yaptıkları klonal mikro çoğaltım çalışmasında 80-90 günlük bir çalışma dönemi sonunda 3 defa sürgün elde ederek bir explanttan 90-120 bitki elde ettiklerini bildirmektedir.

## 2. MATERYAL VE METOD

1992- 1994 yıllarında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde yürütülen bu çalışmada 5811, 5219, Dianapeel, Novapeel ile Pampas F<sub>1</sub> hibrid domates çeşitlerine ait nodal dokular kullanılmıştır.

Bu çalışmada tek boğum kültür yöntemi ile yüksek frekansta bitkicik elde etmek amacıyla birbirini takip eden ve birbirinin sonuçlarına bağlı aşağıdaki 4 farklı deneme kurulmuştur.

I. Deneme, kullanılan 5 çeşidin apikal dominansı şiddetini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Bu denemede ilk indüksiyon ortamlarında MS temel besin ortamına ilave edilen sitokinin + oksin kombinasyonu organogenetik süreci inhibe etmiştir.

II. Denemede, kültürün ilk indüksiyon ortamları (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>) MS'in modifiye şekilleri olarak alınarak KIN ve GA<sub>3</sub> ile takviye edilmiştir. İlk indüksiyon ortamından sürgün çoğaltma ortamına transfer arasındaki dönem 30-35 gün olarak tutulmuştur.

III. Denemede, MS makro ve mikro tuzlar 1 kat olarak alınırken, sürgün çoğaltma ortamında KIN yerine 2ip kullanılmıştır. Ayrıca, sürgün oluşturma ortamı 1 mg/l 2ip ile takviye edilmiştir.

IV. Denemede, M<sub>3</sub> besin ortamı makro ve mikro tuz konsantrasyonu düşürülerek bu denemenin M<sub>3</sub> ilk indüksiyon ortamında 1 mg/l GA<sub>3</sub> + % 7 sakkaroz kullanılmıştır. İlk indüksiyon ortamında kısa bir süre tutulan explantlar (10-15) daha sonra 1 mg/l 2ip + 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> + % 5 sakkaroz içeren sürgün çoğaltma ortamına transfer edilmişlerdir. Köklenme ise 1 mg/l IAA + % 4 sakkaroz içeren MS ortamında sağlanmıştır.

Explant izolasyonu, fidelerden 6 adet kapalı koltuk altı tomurcuğu elde edilebilecek bir dönemde yapılmıştır. Explantın sterilizasyonunda Pierik (1987) 'e uyularak % 3-4 'lük NaClO' den yararlanılmıştır. Explant dikimi ise tomurcukların bir miktar gövdeli olarak kesilmesi ve 0.4-0.6 cm'lik bir büyüklük ile yapılmıştır.

## 3. BULGULAR

I. Denemede M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> besin ortamlarında dikimi yapılan tüm çeşitlerde BA+ NAA veya tek başına kullanılan BA varlığından dolayı organogenetik sürecin inhibe olması sonucunda, dallanma bozukluğu görülmüş ve bitkicik eldesi sağlanamamıştır. Bu deneme sonucu ile 5811, 5219, Dianapeel, Novapeel ve Pampes çeşitlerinde apikal dominansı varlığı ortaya çıkmış ve domatesin meristematik nodal dokularında hormon üretim ve dağıtım yeteneğinin varlığı tesbit edilmiştir.

II. Denemede, ilk indüksiyon ortamlarında M<sub>3</sub> ortamı indüklü Dianapeel çeşidinde % 78.5 oranında bitkicik elde edilirken aynı ortam indüklü Novapeel çeşidinde bu oran % 54.5 olmuştur.

III. Denemede, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> indüksiyon ortamlarında elde edilen bitkicik oranlarına bakıldığında Novapeel çeşidinin M<sub>2</sub> ortamı indüklü explantlarında bu oranın % 55.5, Dianapeel çeşidinde ise % 50 olduğu görülmektedir. III. Denemede M<sub>2</sub> ortamı M<sub>1</sub> ortamına göre % 1'lik bir şeker konsantrasyonu fazlalığına sahiptir.

IV. Denemede, ilk indüksiyon ortamından sürgün çoğaltma ortamına transfer arasındaki dönem 20-25 gün olup diğer denemelere göre bu dönem oldukça kısadır. Ayrıca bu denemenin M<sub>3</sub> ortamında 1 mg/l GA<sub>3</sub> kullanılmış ve şeker miktarının biraz daha fazla tutulması ile diğer denemelere göre oldukça yüksek bir bitkicik oranı elde edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. IV. Denemede Çeşit- Besin Ortamları İlişkileri

ÇEŞİT	ORTAM	DİK.	UYR.	SÜR.	SÜR/	ALT	GEL.	KÖK.	O. AL.S.		OL. BIT. OR. (%)
		EKS. SAY.	EKS. SAY.	Ç. ORT.	EKS. DEĞ.	KÜL.	SÜR. SAY.	SAY.	I.K.	II.K.	
5811	M <sub>1</sub>	15	10	9	—	—	—	—	—	—	—
	M <sub>2</sub>	15	11	11	—	—	—	—	—	—	—
	M <sub>3</sub>	15	10	10	1.0	—	—	—	—	—	—
5219	M <sub>1</sub>	15	13	11	1.5	9	11	11	7	—	53.8
	M <sub>2</sub>	15	12	12	1.5	11	14	12	7	—	58.3
	M <sub>3</sub>	15	13	12	1.7	12	18	16	10	—	76.9
Dianapeel	M <sub>1</sub>	15	11	9	2.1	6	8	7	6	—	54.5
	M <sub>2</sub>	15	12	11	2.1	10	15	14	11	—	91.6
	M <sub>3</sub>	15	14	12	2.3	11	22	20	19	—	135.7
Novapeel	M <sub>1</sub>	15	11	9	1.6	6	7	7	6	—	54.5
	M <sub>2</sub>	15	12	9	1.6	8	11	10	8	—	66.6
	M <sub>3</sub>	15	12	11	1.8	9	14	13	11	—	91.6
Pampas	M <sub>1</sub>	15	10	8	1.4	8	5	3	4	—	40.0
	M <sub>2</sub>	15	10	9	1.4	9	7	7	5	—	50.0
	M <sub>3</sub>	15	11	9	1.4	9	7	6	5	—	45.4

Dianapeel çeşidinin M<sub>3</sub> ortamı indüklü 14 adet explantından 12 tanesi sürgün çoğaltma ortamına aktarılmış ve bunların ortalama sürgün/ explant değeri 2.3 olmuştur. Bu explantlardan gelişen 22 adet sürgünden köklenme ortamına aktarılan 20 adet sürgünden 20 tanesi köklendirme ortamına aktarılmış ve 19 tanesi tam köklü bitkicik oluşturmuştur. Bu çeşide ait ortalama bitkicik frekansı ise % 135.7 olarak gerçekleşmiştir.

5811 çeşidinde tüm denemelerde sürgün / explant oranı beirsizliği ve orgogenetik gelişimin tam bitki oluşumu doğrultusunda ilerlememesi sonucunda bitkicik eldesi sağlanamamıştır.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Domatesin meristematik nodal dokularının hormon üretim ve dağıtım yeteneği tek boğum kültür yöntemini klon oluşturmada önemli bir vasıta haline getirmektedir. Tek boğum kültür yönteminde bir kalıtus fazının olmaması genetik stabilitenin korunmasında yardımcı olmakta ve eldeki materyalin güvenilir bir şekilde çoğaltılmasını sağlamaktadır.

İlk indüksiyon veya başlangıç ortamının prensip olarak büyümeyi düzenleyici madde içermemesi organogenetik sürecin inhibe olmasını engellemekte; fakat içsel sitokinin düzeyinin çoğul sürgün gelişmesinin gelişkin sürgünlere dönüşümünü tamamlıyamayacağı ortaya çıkmaktadır. Bu sonuçlar Warren (1991) ile uyum içerisinde görülmekte aynı araştırmacı da çoğul sürgün gelişmesinin yüksek frekanslı bitkicik eldesi ile sonuçlanabilmesi için sürgün çoğaltma ortamının sitokinin veya sitokinin/oksin kombinasyonu ile desteklenmesi gereği konusuna dikkat çekmektedir.

Ayrıca çoğul sürgün gelişmesinin ilerleyebilmesi sitokinin desteğinin uygun bir devrede yapılması ile ilişkili olup, çalışmamızın IV. Denemesinde elde edilen sonuç bu noktayı çarpıcı bir şekilde ortaya koymaktadır. Diğer denemelere göre bu denemede sürgün çoğaltma ortamına transfer 10-15 gün daha erken bir devrede yapılmış, böylece çoğul sürgün gelişmesine dışsal sitokinin desteği oldukça erken sağlanmıştır. Bu uygulama ile Dianapeel çeşidinde % 135.7 ve Novapeel çeşidinde % 91.6 'lık bir değer elde edilmiştir.

Tek boğum kültür yönteminde kültürdeki başarı üzerinde fizyolojik olgular kadar genotipik kapasite faktörü de etkilidir. Nitekim 5811 çeşidi tüm denemelerde benzer reaksiyon göstermiş ve bitkicik eldesi sağlanamamıştır. Aynı şekilde, IV. Denemede alınan öntemlerle en iyi netice Dianapeel çeşidinde elde edilirken, Pampas çeşidinin fazla bir performans ortaya koyamadığı görülmüştür.

Bu çalışmamın ortaya koyduğu olgular gözönüne alınarak apikal dominansiye sahip türlerde klonlama programı düzenlenmek istendiğinde aşağıdaki faktörler dikkate alınmalıdır:

– Kültürün ilk aşamasında sitokinin kullanılmadan kaçınılmakla birlikte, çoğul sürgün oluşumu doğrultusunda indüklenmiş materyalin oldukça erken bir devrede sürgün çoğaltma ortamına transferi sağlanmalı,

– Sürgün çoğaltma ortamında sürgün/explant değeri belirlendikten sonra sitokinin yönüyle benzer bir ortamda alt kültür işlemine gidilmesi,

– Çok sayıda sürgün taşıyan explantların üzerindeki gelişmiş sürgünler köklendirme ortamına alınırken gelişmesini tamamlamamış veya köklendirme ortamına alılabilecek büyüklüğe ulaşamayan sürgünlerin taze bir sürgün geliştirme ortamına transferi sağlanmalıdır.

Bu yöntemden, F<sub>1</sub> hibritleri üzerinde yapılacak fizyolojik ve sitolojik çalışmalarda yararlanılabileceği gibi ayrıca ebeveyn hatların ve bunlardan elde edilen F<sub>1</sub> hibritlerinin vejetatif performans çalışmalarından da yararlanılabilir.

## KAYNAKLAR

- Fari, M. Banki-Peredi, A. Toht-cysani, M. 1991. Highly efficient in vitro shoot regeneration system in tomato and eggplant seedling decapitation methods (SMD). *Acta Horticulturae*. 289:111.
- Gorbantenko, I. Yu. 1990. Micropropagation of the different tomato genotypes in vitro. *Doklady Vsesoyuznoi orriena lenina ordera Trudovo Krasnogoznameni Akademia* 52: 18-22
- Koppel, L.A. Butenko, R.G. 1991. Clonal Micropropagation of a mutant line of tomato with low seed yield. *Doklady Vsesoyuznoi Ordena Lenina Ordena Tundovugo krasnogo Znameni Akademia* 10:9-12.
- Pierik, R.L.M. 1987. In vitro culture of higher plants. Agricultural Faculty Department of Horticulture. Wageningen, 308 s.
- Pierik, R.L.M., Silvertand, B.C.H.J. Jongejan H.W. Kraan, C.W.S. 1988a. Propagation on nutrient media instead of sowing. *Groentenen-Fruit*. 44 (23):38-39.
- Polevaya, V.S., Yashina, S.G., Oleinikova, T.A. 1988. In vitro propagation of tomato regenerants derived from isolated meristems. *Fizilogiya Rastanii*. 35 (3):612-617.
- Schnapp, S.R., Preece, J.E. 1986. in vitro growth reduction of tomato and carnation microplants. *Plant cell, tissue and organ culture*, 6(1): 3-8.
- Warren, G. 1991. The regeneration of plants cultured cells and tissues. (Ed. A. Stafford, G. Warren. In *Plant cell and tissue culture*) Chapter 4:82-100.
- Zorzoli, R., Cointry, E.L., Prado, E.A., Mraginski, L.A., Picardi, L.A. 1988. Shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by in vitro culture of leaflets. *Turialba* (38)4:332-336