

DİPLOİD VE TETRAPLOİD KARPUZ BİTKİLERİNDE MORFOLOJİK VE SİTOLOJİK FARKLILIKLARIN BELİRLENMESİ

İsmail ŞİMŞEK^{1*}

Münevver GÖÇMEN¹

Nebahat SARI²

¹ Antalya Tarım A.Ş., Antalya

² Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana

Alınış Tarihi: 22.11.2011

Kabul Tarihi: 24.05.2013

Özet

Çekirdeksiz karpuz ıslah programında, öncelikle tetraploid karpuz hatlarının ıslahçılar tarafından geliştirilmesi gerekmektedir. Diploid karpuz hatları, kolhisin veya orizalin gibi mutajenik kimyasallarla *in vivo* veya *in vitro* koşullarda muamele edilerek tetraploid hatlar elde edilmektedir. Kimyasal uygulama sonrası oluşan popülasyon içerisinde, tetraploid bitkilerin seçilmektedir. Seleksiyon için morfolojik, sitolojik, izoenzim ve DNA belirteçleri kullanılmaktadır. Kromozom sayımı ve DNA içeriğinin flow sitometreyle ölçülmesi, tetraploid bitkilerin popülasyon içerisinde kesin olarak seçimini sağlamaktadır. Ancak her iki yöntemi uygulamak için laboratuvar altyapısı gerekmekte ve buna bağlı olarak maliyet artmaktadır. Bu çalışmanın amacı, *in vivo* koşullarda kolhisin ve orizalin uygulaması yapılan karpuz popülasyonundan (dört farklı karpuz hattı), tetraploid karpuz bitkilerini M1 aşamasında, morfolojik ve sitolojik incelemelerle belirlemek ve onları seçmektir. Bu çalışmada, dört karpuz hattına ait olan tetraploid ve diploid bitkiler morfolojik ve sitolojik verilerle karşılaştırılmıştır. Morfolojik olarak yaprak eni-uzunluğu (cm), erkek çiçek çapı (mm), yumurtalık çapı ve uzunluğu (mm), dişi çiçek taç yaprak genişliği ve uzunluğu (mm) ölçülmüştür. Sitolojik değerlendirmede, stoma çapı (µm), stoma uzunluğu (µm), stoma yoğunluğu (mm²) ve kloroplast sayımı yapılmıştır. Çalışma sonucunda, tetraploid bitkilerin diploidlere göre yapraklarının ve çiçeklerin daha iri olduğu, kloroplast sayısının arttığı, ancak stoma yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen morfolojik ve sitolojik verilerin birlikte kullanılması sonucu tetraploid bitkilerin oldukça pratik ve ekonomik olarak seçilebileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Karpuz, Tetraploid, Diploid, Sitolojik, Morfolojik

*Sorumlu yazar:ismail.simsek@antalya-tarim.com.tr

DETERMINATION OF MORPHOLOGICAL AND CYTOLOGICAL DIFFERENCES BETWEEN DIPLOID AND TETRAPLOID WATERMELON PLANTS

Abstract

In the seedless watermelon breeding programme, firstly, tetraploid parents must be developed by the breeders. When diploid watermelon lines treated with colchicine and oryzaline *in vivo* and *in vitro* conditions, tetraploid plants could be obtained. The diploid and tetraploid watermelon plants should be selected within the population. For this reason, some markers (morphological, isozyme, cytological and molecular techniques) are needed to separate from diploid and tetraploid plants. Chromosome counts and DNA content of diploid and tetraploid plants as a result of measurement of flow cytometry distinction can be made definitively. However, the laboratory infrastructure required to implement each method, is not economical. The purpose of this study is to select the tetraploid watermelon plants at M1 stage from populations applied colchicine and oryzaline with morphological and cytological investigations in *in vivo* conditions. In this study, tetraploid plants belong to the four watermelon lines and diploid plants compared with the morphological and cytological dates. Morphological dates; width of the leaf-length (cm), male flower diameter (mm), diameter-length of the ovary (mm), the female flower petal width and length (mm) were measured. Cytological assessment of the stoma diameter (μm), stomatal length (μm), stomatal density and chloroplast number were measured. In the present study has shown that the tetraploid plants grow vigorously as compared to diploid plants. Tetraploid plants are the number of chloroplasts increased, but decreased stomatal density were determined. As a result, tetraploid plants could be selected practically and economically by using morphological and cytological data for watermelon plants.

Keywords: Watermelon, Tetraploid, Diploid, Cytological, Morphological

1.GİRİŞ

Karpuz, dünyada ve ülkemizde, üretim alanı, miktarı ve ticari değeri yönünden oldukça önemli bir sebze türüdür. Dünyada, 3.810.535 ha alanda 100.687.056 ton karpuz üretimi yapılmaktadır. Bu üretimin % 67.73'ü Çin'de, % 3.78'si (140 000 ha alanda 3 810 205 ton) Türkiye'de, % 3.05'i İran'da gerçekleşmektedir (FAO, 2009). Karpuz, hava sıcaklığının arttığı yaz aylarında serinletici meyve özelliği olması nedeniyle bol tüketilen bir sebze türüdür. Meyve etine kırmızı rengi veren likopen maddesinin hem antioksidan etkisi nedeniyle insan sağlığı üzerine faydalı olması, hem de kırmızı renginin albeni yaratması, tüketimi olumlu etkilemektedir. Ayrıca şeker oranı % 8-10

civarında olup, bol sulu meyve özelliğini taşıması da tüketici yönünden daha fazla tercih edilmesini sağlamaktadır. Ancak karpuz meyvesinde çekirdeklerin meyve etine dağılmış olması nedeniyle, çekirdekler yeme esnasında çıkarılmaktadır. Tüketicinin sulu bir meyveyi yerken ağızdan çekirdekleri çıkarmak, görüntü olarak rahatsız edici olabilmektedir. Ayrıca meyve suyu olarak tüketilmek istenildiğinde meyve çekirdekleri sorun oluşturulmaktadır. Özellikle çocukların ve yaşlıların çekirdekli karpuz meyvesi yerken daha fazla zorlandıkları aşınadır. Çekirdekli ve diploid yapıdaki karpuz çeşitlerinde bitki, enerjisinin bir kısmını meyve içerisindeki tohumu oluşturmak için harcamaktadır. Oysa çekirdeksiz karpuz çeşitlerinde bitki, tohum oluşturmak için harcayacağı enerjiyi meyve etinde şeker miktarının artırılmasına yönelik kullanmaktadır. Çekirdeksiz karpuzda şeker oranının ve et gevrekliğinin çekirdekli karpuz çeşitlerine göre daha fazla olduğu ortaya konulmuştur (Marr ve Gast, 1991). Çekirdeksiz karpuz çeşitlerinin meyve kalitesinin iyi olması nedeniyle ABD ve İsrail'de her geçen yıl çekirdeksiz karpuz tüketimi artmıştır (Marr ve Gast, 1991). Ülkemizde ise çekirdeksiz karpuz, tüketimin yaklaşık % 5'lik kısmını oluşturduğu tahmin edilmektedir. Ancak, son yıllarda tüketicinin meyve kalitesine önem vermeye başlaması, sosyal yapının değişmesi, çekirdeksiz karpuz talebinin önümüzdeki yıllarda ülkemizde de artacağını göstermektedir.

Çekirdeksiz karpuz, triploid hibrit çeşitler geliştirilerek sağlanabilmektedir. Çekirdekli diploid ($2n=2x=22$) bir hatla, tetraploid ($2n=4x=44$) bir hattın tozlanması ile triploid ($2n=3x=33$) hibrit çeşitler oluşturulabilmektedir. Triploid çeşitler 3 kromozom setine sahip olup, steril yapıdadır (Kihara, 1951; Andrus vd., 1971).

Tetraploid hatlar, diploid karpuz hatlarına kolhisin veya orizalin gibi mutajenik kimyasalların *in vivo* veya *in vitro* koşullarda uygulanması sonucunda oluşmaktadır (Kihara, 1951; Lower ve Johnson, 1969; Li vd., 2002; Koh, 2002; Jaskani vd., 2004; İnan, 2007). Kimyasal uygulama sonrası, bitkilerin bir kısmı kimyasaldan etkilenmeyip diploid halde kalmakta, bir kısmı kimerik yapı oluşturmakta ve sınırlı sayıda bitkide ise kromozom katlanması gerçekleşerek tetraploid yapıya dönüşmektedir (Compton vd., 1994; Jaskani vd., 2004). Tetraploid bitkilerin belirlenmesinde, morfolojik, izoenzimler, sitolojik ve moleküler teknikler kullanılmaktadır (Jaskani vd., 2005). Ploidi seviyesini belirlemede en güvenilir yöntem kromozom sayımıdır (Sarı vd., 1999; Jaskani ve Khan, 2000). Ancak, bu yöntem karpuz kromozom yapısının küçük olması, yalnızca kök meristem hücrelerinde yapılabilir olması nedeniyle pratik olarak kullanılamamaktadır. DNA miktarına göre yaprak dokularından dahi ploidi seviyesinin belirlendiği flow

sitometre ile yapılan ölçümler, tetraploid bitkilerin seleksiyonunda en güvenilir yöntemdir (Dolezel, 1998; Jaskani vd., 2005). Ancak bu yöntemin uygulanması için, pahalı bir alet olan flow sitometreye ve laboratuvar alt yapısına ihtiyaç vardır. Ticari tohum şirketlerinin rutin olarak flow sitometrik analiz yaptırılmaları ekonomik olmamaktadır. Bu nedenle, pratik ve ekonomik olan morfolojik, sitolojik verilerin kullanılması oldukça önemlidir. Morfolojik verilerin tek başına kullanılması, miksploid ve tetraploid bitkilerin ayrılmasında yetersiz kalmaktadır (Dolezel, 1998).

Yapılan bu çalışmada, kolhisin ve orizalin uygulan dört farklı karpuz genotipinde diploid ve tetraploid bitkilerdeki morfolojik ve sitolojik farklılıklar belirlenmiştir. Elde edilen morfolojik ve sitolojik verilerin birlikte kullanılması sonucu tetraploid bitkilerin oldukça pratik ve ekonomik olarak selekte edilebileceği görülmüştür. Ancak, *in vivo* koşullarda tetraploid hatların kesin olarak belirlenmesi, bitkilerde meyve tutumu sağlayarak, tohum elde edilmesi ve hatların bir sonraki yetiştirme döneminde diploid hatlarla melezlenmesi sonucu tamamıyla kesinlik kazanılabilmektedir.

2.MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada bitkisel materyal olarak dört adet karpuz genotipi (AB-54, AT-267, Crimson Sweet ve Sugar Baby) kullanılmıştır. Bu bitkilere kotiledon aşmasında, kolhisin (% 0.2, % 0.3, % 0.4, % 0.5) ve orizalin (20 µM, 35 µM, 50 µM) uygulaması yapılarak (Şimşek ve Sarı, 2010) oluşturulan popülasyondaki bitkilerde inceleme ve ölçümler gerçekleştirilmiştir.

2.1. Bitkisel Materyalin Oluşturulması

Diploid karpuz hatlarının tohumları, torf:perlit (2:1) karışımı bulunan 96'lık vıyollere ekilmiştir. Tohumların çimlenmesi, 28°C'de 48 saatte inkübe edilerek sağlanmıştır. Tohum ekiminden 18 gün sonra, kotiledon aşamasındaki fidelerin büyüme ucu meristem bölgesine 28 Ocak 2010 tarihinde günde 2 defa (sabah 7.00, akşam 16.00) olmak üzere üç gün boyunca kolhisin, dört farklı dozda (% 0.2, % 0.3, % 0.4, % 0.5) birer damla damlatılmıştır. Yine fidenin aynı döneminde, orizalinin üç farklı dozu (20 µM, 35 µM, 50 µM) bir kez (sabah 7.00) bir damla (50 µl) olacak şekilde damlatılmıştır (Li vd., 1999). Günün aynı saatlerinde kontrol olarak, fidelerin büyüme ucuna su damlatılmıştır. Uygulamada her doz için 3 tekrarlı, her tekrarlama 48 bitkiye uygulama yapılmıştır. Kimyasal uygulamadan 35 gün

sonra yapraklarda şekil bozukluğu oluşan veya fide boyu kontrol (uygulama yapılmamış) fidelere göre kısa olan bitkiler 90x50 cm sıra arası ve üzeri mesafelerle cam seraya dikilmiştir. Dikimden 1 ay sonra, halen yaprak bozukluğu ve sürgün boğum arasında kılma devam eden bitkiler çalışmaya konu olmuştur. Normal gelişim gösteren bitkiler sökülerek seradan uzaklaştırılmıştır. Çalışmada her bir bitki ayrı değerlendirilmiştir. Çalışmada, tetraploid 12 bitki ve 4 diploid hat kullanılmıştır (Şekil 1).

2.2. Bitkilerde Morfolojik Ölçümler

Yaprak eni ve uzunluğu: Seraya aktarılan bitkilerde dikimden 36 gün sonra tetraploid bitkiler ile diploid kontrol bitkisinin, sürgün ucundan itibaren 8. yaprakları alınarak yaprak eni ve uzunluğu "cm" olarak ölçülmüştür.

Erkek çiçek çapı: Tetraploid ve diploid bitkilerde dikimden 36 gün sonra erkek çiçeklerin tam açtıkları dönemde çiçek çapı kumpas kullanılarak "mm" olarak ölçülmüştür.

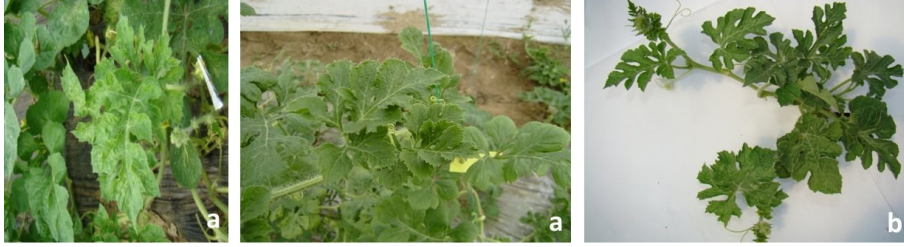
Taç yaprak genişliği ve uzunluğu: Dişi çiçek taç yaprağının tam açtığı dönemde, taç yaprakların (Corollanın bir lobu) genişlik ve uzunlukları kumpas yardımıyla ölçülmüştür.

Yumurtalık çapı ve uzunluğu: Dişi çiçeğin açtığı gün bu ölçümler de kumpas ile gerçekleştirilmiştir.

2.3. Stomatal İncelemeler

Morfolojik olarak tetraploid olduğu belirlenen (Şekil 1) ve kendileme yapılarak meyve tutumu sağlanan bitkiler ile seraya kontrol bitkisi (kimyasal uygulamaya yapılmayan) olarak aktarılan diploid bitkilerde sitolojik değerlendirme yapılmıştır.

Bitkinin büyüme ucundan itibaren 8. yaprak alınarak preparatlar hazırlanmıştır. Yaprakın alt kısmından bir miktar epidermis hücresi lam üzerine konulup, üzerine 1 damla % 1'lik AgNO₃ (Rousselle, 1992; Sarı, 1994) damlatılarak, Licaeica-DM-750 mikroskopunda 40x büyütme objektif ve 10x oküler mikrometre ile 1 mm²'lik alanda kaç adet stoma bulunduğu belirlenmiş, ICC-50 dijital mikroskop kamerasında görüntülenerek kaydedilmiştir. Sayımlarda bir lamel bölgesinde iki bölgeden sayımlar yapılmıştır. Aynı örneklerde stoma eni ve uzunlukları, bekçi hücrelerindeki toplam kloroplast sayıları da belirlenmiştir.



Şekil 1. Morfolojik ve Stomatal inceleme yapılan tetraploid (a) ve diploid (b) karpuz bitkileri

3.BULGULAR VE TARTIŞMA

Karpuzda *in vivo* koşullarda tetraploid hat geliştirmede kolhisin ve orizalinin etkili olduğu görülmüştür. Farklı bitki türlerinde, tetraploid bitki elde etmek için kolhisin ve orizalin, şeker kamışı (Thao vd., 2003), pamuk (Omran ve Mohammad, 2008) ve *Nicotiana alata* (El-Morsy vd., 2009) kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Çalışmanın bitkisel materyalini oluşturan 12 tetraploid karpuz hattı, AB-54 genotipinden 3 hat (kolhisin; % 0.4), AT-267 karpuz hattından 3 hat (kolhisin; % 0.3 ve % 0.5), Crimson Sweet'te 5 hat (kolhisin; % 0.3 ve % 0.5; orizalin 35 µm-50 µm) ve Sugar Baby genotipinde 1 tetraploid (kolhisin; % 0.4) geliştirilerek elde edilmiştir. Kolhisinin % 0.2'lik dozu ile orizalinin 20 µm'lık dozlarından tetraploid hat oluşmamıştır. Kolhisinin % 0.3, % 0.4 ve % 0.5 dozlarından tetraploid hat elde edilirken, orizalin kimyasalı sadece Crimson Sweet genotipinde etkili olmuştur. Kolhisin kimyasalı tetraploid karpuz hatlarının geliştirilmesinde orizaline göre daha başarılı bulunmuştur (Şimşek ve Sarı, 2010). Diploid karpuz genotiplerinin, tetraploid hale dönüşmelerinde kimyasal cinsi doz ve genotip interaksiyonunun etkili olduğu bildirilmiştir (Şimşek ve Sarı, 2010).

3.1. Diploid ve Tetraploid Bitkilerde Morfolojik Ölçümler

Bitkilerde tetraploid gibi ploidi seviyelerinin değiştirilmesi, özellikle süs bitkisi ve yaprağı yenen sebze türlerinde önemli bir ıslah yöntemidir (Petersen vd., 2003). Tetraploid bitkilerin hücre yapıları diploid bitkilere göre daha büyüktür. Bu nedenle tetraploid bitkilerin bazı vejetatif (gövde uzunluğu, yaprak eni ve boyu, yaprak sayısı) ve çiçek özelliği (çiçek sayısı,

stigma uzunluğu, yumurtalık büyüklüğü) diploid bitkilere göre oldukça farklı olduğu bildirilmiştir (El-Morsy, vd., 2009; Vainola, vd., 2000).

Çalışmada, diploid ve tetraploid karpuz bitkileri morfolojik olarak karşılaştırılmıştır. Yaprak eni ve uzunluğu, erkek çiçek çapı, yumurtalık çapı ve uzunluğu, dişi çiçek taç yaprak genişliği ve uzunluğu dört karpuz genotipinin diploid ve tetraploid bitkilerinde ölçülmüştür. Morfolojik ölçüm değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Diploid AB-54 ve Crimson Sweet genotipinde yaprak eni ve uzunluğu 14.50 cm ve 15.00 cm, AT-267 ve Sugar Baby hatlarında 15.00 cm ve 16.50 cm olmuştur.

Çizelge 1. AB-54, AT-267, Crimson Sweet ve Sugar Baby karpuz genotiplerinin diploid ve tetraploid bitkilerin yaprak ve çiçek ölçümleri

Genotipler	Kimyasal Dozları	Yaprak Eni (cm)	Yaprak Uzunluğu	Erkek Çiçek Çapı (mm)	Yumurtalık Çapı (mm)	Yumurtalık Uzunluğu (mm)	Dişi Çiçek Taç Yaprak Eni (mm)	Dişi Çiçek Taç Yaprak Uzunluğu (mm)
**AB-54	%0.0	14.50	15.00	28.67	10.01	11.12	10.02	11.18
*AB-54	%0.4	16.22	17.00	35.76	13.41	14.51	12.41	13.26
*AB-54	%0.4	16.05	17.20	32.16	12.03	13.65	11.21	12.31
*AB-54	%0.4	16.33	17.12	33.28	14.11	15.18	13.02	14.02
**AT-267	%0.0	15.00	16.50	35.32	10.53	12.34	12.17	15.48
*AT-267	%0.3	15.50	16.82	36.53	11.20	13.06	12.41	15.81
*AT-267	%0.5	16.50	17.00	36.65	11.35	12.85	12.51	15.65
*AT-267	%0.5	15.21	16.88	35.93	12.65	13.36	12.23	15.48
**C.Sw	0 µm	14.50	15.00	29.56	10.29	12.18	10.42	11.15
*C.Sw	35 µm	15.50	16.00	35.50	12.92	13.65	12.65	13.16
*C.Sw	50 µm	16.50	17.00	34.12	13.13	13.64	11.23	12.05
**C.Sw	%0.0	14.74	15.25	30.03	12.33	12.11	11.70	11.65
*C.Sw	%0.3	15.50	16.40	31.15	12.75	13.36	12.45	12.89
*C.Sw	%0.5	15.50	16.00	30.85	13.09	13.81	12.00	12.25
*C.Sw	%0.5	15.70	16.80	30.41	14.08	14.53	12.81	14.03
**S.Baby	%0.0	15.50	16.50	30.26	9.68	10.21	9.58	10.02
*S.Baby	%0.4	16.35	17.45	38.34	14.41	14.96	11.85	12.25

*Tetraploid bitki **Kontrol diploid bitkiler

AB-54 genotipindeki tetraploid 3 bitkide ise 16.05-16.33 cm ve 17.00-17.20 cm arasında ölçülmüştür. AT 267 hattının tetraploid bitkilerde ise en az 15.21 cm, en fazla 16.50 cm yaprak eni, 16.82 ile 17.00 cm arasında yaprak uzunluğu olmuştur. Diploid ve tetraploid bitkilerde yaprak eni ve uzunluğu yönünden açık bir farklılık bulunmamıştır. Crimson Sweet'in tetraploid 5 bitkisinde yaprak eninin, en fazla 16.50 cm, en az ise 15.50 cm olduğu ve ortalama yaprak eninin 15.50 cm civarında bulunduğu belirlenmiştir. Yaprak uzunluğu, en fazla 17.00 cm, en az ise 15.25 cm olmuştur. Tetraploid Sugar Baby bitkisinde yaprak eni ve uzunluğu 16.35 cm ile 17.45 cm olmuştur. Tetraploid bitki yapraklarının, diploid bitki yapraklarına göre daha iri olduğu görülürken, doku olarak daha kalın, yaprak kenarında dişliliğin daha fazla olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 1 ve Şekil 2). Diploid bitkilerle tetraploid bitkilerde yaprak özelliklerindeki farklılık, *in vivo* tetraploid bitki elde etme çalışmalarında ilk seleksiyonun yapılmasında önemli bir kriter olmuştur. Ancak, kromozom sayılarında değişiklik meydana gelen (miksooploid) bitkileri yaprak özelliğine bakarak tetraploid olduğuna kesin olarak karar vermek mümkün değildir (Thao vd., 2003; Dahanayeke vd., 2010).

Tetraploid ve diploid bitkilerin çiçek özelliklerini karşılaştırmak için erkek ve dişi çiçekte ölçümler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1). Diploid 4 karpuz hattında erkek çiçek çapları genotip özelliğinden dolayı birbirinden farklı olmuştur. Erkek çiçek çapı en fazla AT-267 genotipinde 35.32 mm, en az ise AB-54 hattında 28.67 mm olmuştur. Tetraploid bitkilerde erkek çiçek çapı 38.34 mm (Sugar Baby) ile 30.03 mm (Crimson Sweet) arasında ölçülmüştür. AB-54 genotipinin tetraploid üç bitkisinde erkek çiçek çapı 32.16, 33.28 ve 35.76 mm olduğu dikkati çekmiştir. Erkek çiçek çaplarının birbirinden farklı olması, her tetraploid bitkinin farklı bir hat olarak değerlendirmek gerektiği düşüncesini oluşturmuştur.

Diploid ve tetraploid bitkiler, dişi çiçek özellikleri yönünden karşılaştırıldığında, tetraploid bitkilerin yumurtalık çapı ve uzunluğu, dişi çiçek taç yaprak eni ve boyu daha büyük olmuştur. Çalışmada kullanılan 4 karpuz genotipinde elde edilen tetraploid 12 bitkide de dişi çiçek özellikleri dikkati çekecek boyutta büyük bulunmuştur (Çizelge 1).



Şekil 2. Tetraploid (a) ve diploid (b) bitkilerin dişi çiçek, erkek çiçek ve yaprak görüntüleri

Tetraploid bitkilerde kendileme yapılarak meyve tutumu sağlanmasına karşılık, morfolojik olarak diploid bitkilerden ayrılan, dişi çiçek açan ancak polen oluşturmayan ve kendileme ile meyve tutmayan bitkilerde oluşmuştur. Bu özellikte olan bitkilerden meyve oluşumu sağlanamadığından tohum elde edilememiştir. Miksoploid yapıda olan bitkilerin, iri yaprak ve çiçek özelliği gösterdiği, morfolojik özelliklerin tetraploid bitkilerin belirlenmesinde tek başına yeterli olmayacağı Jaskani vd. (2005) tarafından da rapor edilmiştir.

Çalışmada ele alınan dört karpuz genotipindeki tetraploid bitkiler arasında yaprak ve çiçek büyüklüklerinin farklı olduğu dikkati çekmiştir. Bu farklılığın genotipten kaynaklandığı, diploid bitkilerdeki yaprak ve çiçek ölçümleri incelendiğinde görülmektedir. Karpuzda ploidi seviyesinin morfolojik farklılıklar ile belirlenmesinde genotipler arasında farklılığın olduğu

Compton vd. (1996) tarafından da bildirilmiştir. Kimyasal uygulama yapılan ve etkilenen bitkilerdeki morfolojik farklılıklar (Şekil 2) bitkinin tetraploid olduğunu kesin olarak göstermemektedir. Ancak morfolojik farklılıkların, kimyasaldan etkilenen bitkilerin ilk seleksiyonunda çok önemli belirteçler olduğu da dikkate alınmalıdır.

3.2. Diploid ve Tetraploid Bitkilerde Stomatal Özellikler

Sera koşullarında morfolojik farklılığı devam eden, çiçeklenme aşamasına gelen ve kendileme yapılarak meyve tutumu sağlanan bitkilerde stomatal incelemeler yapılmıştır. Diploid (% 0.0 doz) ve tetraploid bitkilerde stoma çapı (μm), stoma uzunluğu (μm), stoma yoğunluğu ve kloroplast sayımı gerçekleştirilmiştir. AB-54, AT-267, Crimson Sweet ve Sugar Baby genotiplerinin diploid ve tetraploid bitkilerindeki stoma inceleme sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir. AB-54 genotipinde yapılan stoma incelemelerinde, diploid bitkide stoma çapı 21.15 μm , stoma uzunluğu 28.24 μm olarak ölçülmüştür. Buna karşılık üç tetraploid bitkide ise 24.14 μm ile 26.98 μm arasında stoma çapı, 31.04 μm ile 38.35 μm arasında stoma uzunluğu kaydedilmiştir. Ortalama stoma yoğunluğu diploid bitkide 245.83 adet mm^{-2} , tetraploid bitkilerde 75.47 adet mm^{-2} ile 94.33 adet mm^{-2} arasında değişmiştir. Tetraploid bitkilerde stoma yoğunluğu önemli oranda azalmıştır. Kloroplast sayısı diploid bitkide 13.00 adet, tetraploid bitkilerde ise 18 adet ve üzerinde gerçekleşmiştir. AB-54 genotipinde, diploid ve tetraploid bitkiler stoma yoğunluğu ve kloroplast sayılarına göre kolaylıkla ayrılabilmiştir.

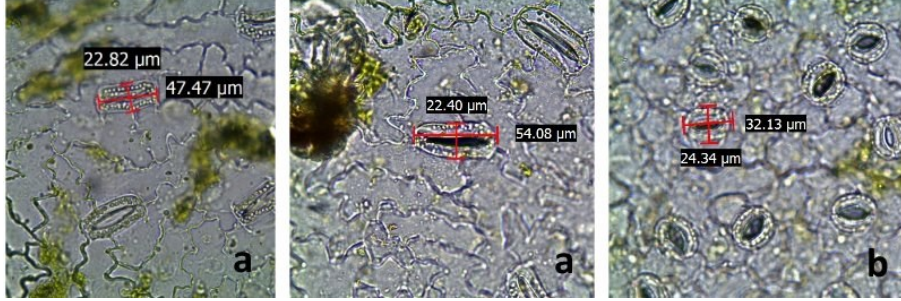
AT-267 genotipinde yapılan stoma incelemelerinde, ortalama stoma çapı en az diploid bitkide (20.82 μm), en fazla ise % 0.3 kolhisin dozunda elde edilen tetraploid bitkide (30.12 μm) tespit edilmiştir. % 0.5 dozunda ise 24.79 μm ile 24.84 μm arasında olduğu dikkati çekmiştir. Ortalama stoma uzunluğu diploid bitkide 26.75 μm , % 0.3 dozunda elde edilen tetraploid de 43.93 μm ölçülmüştür. Ortalama stoma yoğunluğu, beklenildiği gibi diploid bitkide en fazla (264.15 adet mm^{-2}), tetraploid bitkilerde % 0.3 dozunda 113.20 adet, % 0.5 dozunda 81.76 ile 119.49 adet arasında tespit edilmiştir. Kolhisin dozu ile stoma yoğunluğu arasında bir ilişkinin olmadığı görülmüştür. Ortalama kloroplast sayısı en az kontrol bitkisinde (15.00 adet), tetraploid bitkilerde ise % 0.3 dozunda 23 adet, % 0.5 dozunda ise 20 ile 24 adet arasında değişmiştir. Tetraploid bitkilerde stoma yoğunluğu (81.76 adet mm^{-2} ile 119.49 adet mm^{-2}) ve kloroplast sayısına (20 ile 24 arasında) göre kontrol bitkisinden farklı bulunmuştur.

Çizelge 2. Karpuz genotiplerinin diploid ve tetraploid bitkilerinde stoma incelemeleri

Genotip	Doz	Ortalama Stoma Çapı (µm)	Ortalama Stoma Uzunluğu (µm)	Ortalama Stoma Yoğunluğu (adet mm ⁻²)	Ortalama Kloroplast Sayısı (adet)
AB 54	% 0.0	21.15±0.39	28.24±1.24	245.83±0.71	13.00±0.71
AB 54	% 0.4	24.14±2.14	31.04±4.55	75.47±1.41	19.00±0.71
AB 54	% 0.4	24.84±0.84	36.63±1.04	81.76±3.54	19.00±0.71
AB 54	% 0.4	26.98±2.52	38.35±1.53	94.33±0.71	18.00±0.71
AT 267	%0.0	20.82±4.33	26.75±2.79	264.15±1.41	15.00±0.71
AT 267	% 0.3	30.12±3.61	43.93±1.24	113.20±1.41	23.00±0.71
AT 267	% 0.5	24.84±2.55	33.92±1.36	119.49±3.54	20.00±1.41
AT 267	% 0.5	24.79±2.02	44.52±5.24	81.76±0.71	24.00±0.00
C.Sweet	%0.0	22.01±0.20	29.39±0.06	245.28±0.71	12.00±0.00
C.Sweet	35mµ	25.17±3.32	45.47±2.83	75.47±1.41	24.00±0.00
C.Sweet	50mµ	23.68±1.10	34.37±1.48	88.05±0.00	20.00±1.41
C.Sweet	% 0.3	26.35±4.67	48.92±2.49	125.78±1.41	21.00±0.71
C.Sweet	% 0.5	31.03±1.76	49.77±1.68	75.47±0.00	25.00±0.71
C.Sweet	% 0.5	28.53±0.25	52.90±2.35	75.47±1.41	25.00±0.71
S.Baby	%0.0	20.14±0.38	28.41±1.06	257.86±2.12	13.00±0.71
S.Baby	% 0.4	27.36±1.13	35.89±1.78	113.20±1.41	18.00±1.41

Crimson Sweet genotipinde yapılan stoma incelemesinde, stoma çapı ve uzunluğu en az diploid bitkide (22.01 µm ve 29.39 µm), en fazla % 0.5 kolhisin uygulaması sonucu elde edilen tetraploid bitkilerde (31.03 µm ve 52.90 µm) belirlenmiştir. Stoma yoğunluğu, diploid bitkide 245.28 adet mm⁻², tetraploid bitkilerde ise 75.47 adet mm⁻² ile 125.78 adet mm⁻² arasında görülmüştür. Kloroplast sayısı ise diploid bitkide 12.00 adet, tetraploid bitkilerde ise 20 adet ile 25 adet arasında değişmiştir (Çizelge 2).

Sugar Baby genotipinde, ortalama stoma çapı ve uzunluğu, diploid bitkide 20.14 µm ve 28.41 µm, tetraploid bitkide ise 27.36 µm ve 35.89 µm ölçülmüştür. Stoma yoğunluğu kontrol (% 0.0) bitkide 257.86 adet mm⁻², tetraploid bitkide ise 113.20 adet mm⁻² olarak sayılmıştır. Ortalama kloroplast sayısı; kontrol bitkisinde 13, tetraploid bitkide ise 18 adet belirlenmiştir. Diğer üç genotipte olduğu gibi tetraploid bitkide, stoma yoğunluğu daha az, kloroplast sayısı ise daha fazla bulunmuştur (Şekil 3).



Şekil 3. Tetraploid (a) ve diploid (b) bitkide stoma çapı ve stoma uzunluğu (40x büyütme objektif ve 10x büyütme oküler mikrometre yardımıyla 400x büyütülmüştür)

4. SONUÇ

Popülasyon içerisinde bulunan diploid ve tetraploid karpuz bitkilerinin ön seleksiyonu, yaprak ve çiçek özellikleri değerlendirilerek yapılabilmektedir. Ön seleksiyonla seçilen, diploid bitkilerden morfolojik olarak farklı bitkiler, sitolojik analiz ile stoma büyüklüğüne, yoğunluğuna ve bekçi hücrelerdeki kloroplast sayılarına göre tekrar seleksiyon yapılmalıdır. Tetraploid ile mikroploid bitkilerin birbirinden ayrımı ise dişi çiçekte kendileme yapılarak meyve tutumunun sağlanması ile gerçekleştirilebilir.

Mikroploid bitkilerin meyve oluşturmamaları nedeniyle bu bitkiler daha sonra kaybedilmektedir. Tetraploid bitkilerin kesin olarak belirlenmesi, kromozom sayımı ve flow sitometrik analizle yapılabilmektedir. Ancak laboratuvar alt yapısının olmadığı durumlarda, morfolojik ve sitolojik değerlendirmeler ve meyve tutumu ile bir sonraki generasyona gidebilmek, karpuzda tetraploid hat geliştirmeyi M1 aşamasındaki seleksiyonu kolay, uygulanabilir ve ekonomik hale getirmektedir.

Teşekkür

Yazarlar, bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Sanayi ve Ticaret Bakanlığı (Proje No: 00349.STZ.2009-1) ile Antalya Tarım A.Ş.'ye teşekkür eder.

Kaynaklar

- Andrus, C.F., Seshadri, V.S., Grimball, P.C. 1971. Production of Seedless Watermelons. Agricultural Research Service, USDA Technical Bulletin No., 1425.
- Compton, M.E., Gray, D.J., Elmstrom, G.W. 1994. Regeneration of Tetraploid Plants from Cotyledons of Diploid Watermelon. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 107:107-109.
- Compton, M.E., Gray, D.J., Elmstrom, G.W. 1996. Identification of Tetraploid Regeneration from Cotyledons of Diploid Watermelon Cultured *In Vitro*. *Euphytica*, 87:165-172.
- Dahanayeke, N., Chen, X-L., Zhao, F-C., Yang, Y-C., Wu, H., 2010. Separation of Tetraploid and Diploid Plants From Chimeras in *In Vitro* Cultures of Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L.). *Tropical Agricultural Research*, 13(1):11-15.
- Dolezel, J. 1998. Flow Cytometry, Its Application and Potential for Plant Breeding, p. 80-90. In: Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement. (Ed.): T. Lelely. Universitätsverlag, Vienna.
- El-Morsy, Sh. I., Dorra, M.D.M., Abd El-Hady, E.A.A., Hiaba, A.A.A., Mohammed, A.Y. 2009. Comparativen Studies on Diploid and Tetraploid. Levels of Nicotiana alata. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2(3):182-188.
- FAO, 2009. FAOSTAT. Statistic Database. <http://faostat.fao.org>. Erişim Tarihi: 10 Kasım 2012.
- İnan, S. 2007. Karpuz (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum ve Nakai)'da *in vivo* ve *in vitro* Yöntemlerle Tetraploid Bitki Elde Edilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi, Adana, 80 s.
- Jaskani, M.J., Khan, I.A. 2000. Characterization of Interploid Hybrids of Kinnow Mandarin. 9th International. Citrus Congress, pp. 165-166.
- Jaskani, M.J., Khan, S.W., Ko, B.R. 2004. Induction and Characterization of Tetraploid Watermelon. *Korean Society for Horticultural Science*, 45:60-65.
- Jaskani, M.J., Khan, S.W., Dae, H.K. 2005. Flow Cytometry of DNA Contents of Colchicine Treated Watermelon as a Ploidy Screening Method at M1 Stage. *Pakistan Journal of Botany*, 37(3):685-696
- Kihara, H. 1951. Triploid Watermelons. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 58, 217-230.
- Koh, G. 2002. Tetraploid Production of Moodeungsan Watermelon. *Korean Society for Horticultural Science*, 43 (6), 671-676.
- Li, Y., Whitesides J. F., Rhodes B. 1999. In vitro Generation of Tetraploid Watermelon with Two Different Dinitroanilines and Colchicines, Cucurbit Genetics Cooperative Rpt 22:38-40).
- Li L., He, Y., Lu, K. 2002. Chemical Induction Mutation In Yellow Peel Watermelon (*Citrullus lanatus*) and Its Application to Tetraploid Watermelon Breeding. *Chine Vegetables* (No.3), 8-11

- Lower, R.L., Johnson, K.W. 1969. Observation on Sterility of Induce Autotetraploid Watermelon. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 94(4):367-369.
- Marr, C.W., Gast, K.L.B. 1991. Reactions by Consumers in a "Farmers" Market to Prices for Seedless Watermelon and Ratings of Eating Quality. *HortTechnology*, 105-106.
- Omran, A., Mohammad, B. 2008. Polyploidization Effect in Two Diploid Cotton (*Gossypium herbaceum L. and G. arboreum L.*) Species by Colchicine Treatments. *African Journal of Biotechnology*, 7(2):102-108.
- Petersen, K., K., Hagberg P., Kristiansen. K. 2003. Colchicine and Oryzalin Mediated Chromosome Doubling in Different Genotypes of *Miscanthus sinensis*. *Journal of Plant Sciences*, 73(2):137-146.
- Rousselle, F. 1992. Techniques d'Estimation Nombre des Chloroplastes (J.Jahier). Techniques de Cytogénétique Végétale, INRA, Paris, 149-165.
- Sarı, N. 1994. Karpuzda Işınlanmış Polen Uyarımıyla Haploid Bitki Eldesi Üzerine Genotipin ve Mevsimin Etkisi ile Işınlama Yerine Geçebilecek Uygulamalar Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Ç. Ü. Fen Bil. Ens., Adana, 242 s.
- Sarı, N., Abak, K., Pitrat, M. 1999. Comparison of Ploidy Level Screening Methods in Watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. *Scientia Horticulturae*, 82:265-277.
- Şimşek, İ., Sarı, N. 2010. Çekirdeksiz Karpuz (*Citrullus lanatus* Thunb.) Matsum ve Nakai) Çeşitleri Geliştirmeye Yönelik Tetraploid Hatların Elde Edilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 91 s.
- Vainola, A. 2000. Polyploidization and Early Screening of *Rhododendron* Hybrids. *Euphytica*, 112(3):239-244.
- Thao, N.T.P., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki Y., Okubo, H. 2003. Induction of Tetraploids in Ornamental *Alocasia* Through Colchicine and Oryzalin Treatments. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 72(1):19-25.