



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**Yazlık Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Ovaryum
Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Edilmesi**

Özgül ERGİN YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KAHRAMANMARAŞ
Şubat-2005



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**Yazlık Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Ovaryum
Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Edilmesi**

Özgül ERGİN YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KAHRAMANMARAŞ
Şubat-2005

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
ÖNSÖZ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
3. MATERYAL ve METOT	16
3.1. Materyal	16
3.2. Metot	16
3.2.1. In Situ Çalışmaları	16
3.2.2. In Vitro Çalışmaları	18
3.2.2.1 Embriyo Teşvik Ortamlarının Hazırlanması	18
3.2.2.2. Ovaryumların Dezenfeksiyonu	20
3.2.2.3 Ovaryumların Besin Ortamında Kültüre Alınması	20
3.2.2.3. Embriyo Teşvik Aşamasında Kültür Koşulları	21
3.2.2.5. Rejenerasyon Ortamının Hazırlanması	22
3.2.1.5.Rejenerasyon Aşamasında Kültür Koşulları	23
3.3.1.Araştırma Süresince Yapılan Ölçüm, Sayım ve Gözlemler	23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	24
4.1. 2003 Yılı Embriyo Teşvik Bulguları	24
4.1.1. Sakız Çeşidinde Embriyo Teşvik Bulguları	24
4.1.2. Zeybek F₁ Çeşidinde Embriyo Teşvik Bulguları	25
4.2. 2003 Yılı Rejenerasyon Bulguları	28
4.3. 2004 Yılı Embriyo Teşvik Bulguları	31

4.3.1. Sakız Çeşidinde Embriyo Teşvik Bulguları	32
4.3.2. Zeybek F ₁ Çeşidinde Embriyo Teşvik Bulguları	35
4.4. 2004 Yılı Rejenerasyon Bulguları	38
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	57

**UNIVERSITY OF KAHRAMANMARAS SÜTÇÜ İMAM
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURE**

MSc THESIS

ABSTRACT

**OBTENTION OF HAPLOID PLANT WITH OVARIUM CULTURE IN
SUMMER SQUASH (*Cucurbita pepo* L.)**

ÖZGÜL ERGİN YILMAZ

Supervisor: Prof. Dr. Gülat ÇAĞLAR

Year: 2005 Pages: 57

**Jury: Prof. Dr. Gülat ÇAĞLAR
: Prof. Dr. Kazım ABAK
: Prof. Dr. Semih ÇAĞLAR**

The objective of this study was to obtain haploid embryos from unfertilized ovariums as well as haploid plants from these haploid embryos in Summer squash (*Cucurbita pepo* L.) The unfertilized ovaries of two summer squash cultivars (Sakız and Zeybek F₁) were collected one day before, at anthesis or one day after anthesis. The ovaries were surface-sterilized and their outer scales were removed under steril condition. The ovaries were sliced into 4, 6 or 8 parts and placed on the embryo induction media (CBM) which supplemented with different concentrations of TDZ (0.01, 0.1 and 1.0 mg/l) and kept under dark conditions for a week. The ovules from embryos which were collected one day before anthesis or at anthesis developed in a media that included 0.1 mg/l TDZ. Also, some of the ovules were cut in as a disk shape or sliced in lenght. The developing explants in the embryo induction medium were then transferred into regeneration medium after 7 to 14 days. The regeneration medium supplemented with 0.01, 0.05, 0.1 and 0.5 mg/l NAA in combination with 0.1, 0.5 and 1 mg/l BA. Some explants in the regeneration media showed a kind of development, i.e. ovules were swelled, while the others had only callus development, however, no explant was turned into plantlets.

Key Words : Summer squash, *Cucurbita pepo* L., *in vitro*, ovule-ovary culture

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YAZLIK KABAKTA (*Cucurbita pepo* L.) OVARYUM KÜLTÜRÜ YOLUYLA
HAPLOİD BİTKİ ELDE EDİLMESİ

ÖZET

ÖZGÜL ERGİN YILMAZ

DANIŞMAN: Prof. Dr. Gülat ÇAĞLAR

Yıl: 2005 Sayfa: 57

Jüri: Prof. Dr. Gülat ÇAĞLAR

: Prof. Dr. Kazım ABAK

: Prof. Dr. Semih ÇAĞLAR

Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) döllenmemiş ovaryumlardan haploid embriyoların elde edilmesi ve bunların bitkiye dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Sakız ve Zeybek F₁ çeşitlerinin döllenmemiş ovaryumları anthesisten 1 gün önce, anthesis dönemi ve anthesisten 1 gün sonraki dönemlerde toplanmıştır. Yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra steril koşullarda dış kabukları soyulan ovaryumlar 4, 6, 8 dilime bölünerek 0.01 TDZ, 0.1 TDZ ve 1 TDZ ilave edilmiş embriyo teşvik ortamlarına (CBM) dikilmiştir. Karanlık koşullarda yaklaşık 3 hafta bekletilmiştir. 0.1 TDZ içeren ortamlarda anthesisten 1 gün önce ve anthesis döneminde alınan ovaryumlardaki ovüllerde gelişme görülmüştür. Daha sonraki denemelerde ovaryumlar enine disk şeklinde ve boyuna dilim şeklinde kesilmiştir. Embriyo teşvik ortamında gelişme gösteren görülen eksplantlar 7–14 gün sonra NAA'nın 0.01 mg/l, 0.05 mg/l, 0.1 mg/l ve 0.5 mg/l konsantrasyonları ile 0.1 mg/l, 0.5 mg/l ve 1 mg/l BA'nın farklı konsantrasyonlarının ilave edildiği Rejenerasyon ortamlarına transfer edilmiştir. Rejenerasyon ortamında bazı eksplantlarda ovullerin şişmesi şeklinde gelişme devam ederken bazılarında kallus gelişimi görülmüş, ancak bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir.

Anahtar kelimeler: Yazlık kabak, *Cucurbita pepo* L., *in vitro*, ovul-ovaryum kültürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım esnasında gerek ders gerekse tez döneminde her türlü maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarımın her aşamasında desteğini aldığım özverili, çalışkan, sabırlı ve şefkatli saygıdeğer hocam sayın Bahçe Bitkileri Bölüm Başkanı Prof. Dr. Gülat ÇAĞLAR' a, en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımın esnasında yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Semih ÇAĞLAR' a, Yrd. Doç. Dr. İ. Ersin AKINCI' ya, tüm Bahçe Bitkileri Öğretim üyelerine ve öğrencilerine, çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli dostlarım; Araş. Gör. Manolya YARIMOĞLU, Araş. Gör. Hasibe ALTUNBEY, Araş. Gör. Gülden HASPOLAT, Araş. Gör. Kamil MENCİK ve Araş. Gör. Nazan ERGÜN' e, lisans ve yüksek lisans dönemi boyunca beni hiç yalnız bırakmayan ve çok şey borçlu olduğum Araş. Gör. Olgu ERDOĞAN ÖNGEL' e sonsuz teşekkürler ederim.

Verdikleri destek ve hoşgörüyü tezimin her aşamasında hissettiğim ve bu günlerimi borçlu olduğum değerli aileme; yüksek lisans çalışmamı başarılı bir şekilde tamamlamamda pay sahibi olan ve manevi desteğini eksik etmeyen değerli eşim Araş. Gör. C. Hakan YILMAZ' a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Şubat, 2005
Kahramanmaraş

Özgül ERGİN YILMAZ

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Bazı önemli kabak üreticisi ülkelerin ve dünya toplam kabak Üretim miktarları.....	1
Çizelge 1.2. <i>Cucurbita</i> cinsi içerisine giren önemli türlerin tanımlama anahtarı	2
Çizelge 3.1. <i>In vitro</i> embriyo teşvik aşamasında kullanılan CBM besin ortamı bileşimi	19
Çizelge 3.2. <i>In vitro</i> rejenerasyon aşamasında kullanılan CBM besin ortamı bileşimi	22
Çizelge 4.1. Sakız çeşidinde farklı dönemlerde alınan ovaryumların ovul geliştirme veya kallus oluşturma durumu	24
Çizelge 4.2. Farklı TDZ konsantrasyonlarının ilave edilen embriyo teşvik ortamlarında kültüre alınan Sakız çeşidinde ovul geliştirme veya kallus oluşturma durumu	25
Çizelge 4.3. Zeybek F ₁ çeşidinde farklı dönemlerde alınan ovaryumların ovul geliştirme veya kallus oluşturma durumu	26
Çizelge 4.4. Farklı TDZ konsantrasyonları ilave edilen embriyo teşvik ortamlarında kültüre alınan Zeybek F ₁ çeşidinde ovul geliştirme veya kallus oluşturma durumu.....	27
Çizelge 4.5. Sakız ve Zeybek F ₁ çeşidinde farklı gelişim dönemlerinde kültüre alınan ovaryumların farklı TDZ konsantrasyonları içeren CBM ortamı üzerinde ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumu	28
Çizelge 4.6. Sakız çeşidi ve Zeybek F ₁ çeşidine ait ovaryumların rejenerasyon ortamındaki gelişimleri	31
Çizelge 4.7. Sakız çeşidinde anthesisten 1 gün önce alınan ovaryumların farklı dilimleme şekline göre ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumu	32
Çizelge 4.8. Sakız çeşidinde anthesis döneminde alınan ovaryumların farklı dilimleme şekline göre ovul ve kallus oluşturma durumu	33

Çizelge 4.9. Sakız çeşidinde anthesis döneminden 1 gün sonra alınan ovaryumların farklı dilimleme şekline göre ovul ve kallus oluşturma durumu	33
Çizelge 4.10. Sakız çeşidinde toplam disk ve dilim şeklinde ki ovaryumlarda ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumları	34
Çizelge 4.11. Zeybek F₁ çeşidinde anthesisten 1 gün önce alınan ovaryumların farklı dilimleme şekline göre ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumu.....	35
Çizelge 4.12. Zeybek F₁ çeşidinde anthesis döneminde alınan ovaryumların farklı dilimleme şekline göre ovul ve kallus oluşturma durumu	36
Çizelge 4.13. Zeybek F₁ çeşidinde anthesisten 1 gün sonra alınan ovaryumlarda farklı dilimleme şekline göre ovul ve kallus oluşturma durumu	37
Çizelge 4.14. Zeybek F₁ çeşidinde toplam disk ve dilim şeklinde ki ovaryumlarda ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumları	38
Çizelge 4.15. Sakız ve Zeybek F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında ovullerin gelişimleri ve kallus oluşumları	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Kabak fidelerinin genel görünümü	17
Şekil 3.2. Dişi çiçeklerin pensle kapatılması	17
Şekil 3.3. Sakız çeşidine ait farklı gelişme dönemlerindeki dölleme izin verilmeden toplanan dişi çiçekler	18
Şekil 3.4. Zeybek F ₁ çeşidine ait farklı gelişme dönemlerindeki dölleme izin verilmeden toplanan dişi çiçekler.....	18
Şekil 3.5. Boyuna dilimlenerek embriyo teşvik ortamına dikilen eksplantlar.....	20
Şekil 3.6. Enine disk şeklinde dilimlenerek embriyo teşvik ortamına dikilen eksplantlar.....	20
Şekil 3.7.a. Disk şeklinde dilimlenmiş ovaryumlardan gelişme gösteren ovullerin çıkarılması (I. Aşama).....	21
Şekil 3.7.b. Disk şeklinde dilimlenmiş ovaryumlardan gelişme gösteren ovullerin çıkarılması (II. Aşama).....	21
Şekil 3.7.c. Dilim şeklindeki ovaryumlardan gelişen ovullerin çıkarılma işlemi	22
Şekil 4. 1. Rejenerasyon ortamına transfer aşamasındaki ovaryumların görünümü	29
Şekil 4.2. Rejenerasyon ortamında gelişme gösteren ovullerin görünümü	29
Şekil 4.3. Rejenerasyon ortamında ovaryumlarda kallus oluşumunun görünümü ...	30

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- DH : Dihaploid**
°C : Santigrad Derece
BA : Benzyl Adenine
NAA : Naftalen asetik asit
TDZ : Thidiazuron
mg/l : miligram/litre
ED : Enine disk şeklinde dilim
BD : Boyuna dilim

1. GİRİŞ

Kabakgiller kavun, karpuz, hıyar ve kabak gibi dünyada en çok yetiştirilen sebze türlerini içerisinde bulunduran önemli bir gruptur. Toplam 843.958.131 ton olan dünya sebze üretiminin 177.635.253 ton ile %21'ini karpuz, hıyar, kavun ve kabağı içine alan kabakgil türleri oluşturmaktadır (Anonim, 2003). Türkiye'nin toplam sebze üretimi 25.671.517 ton olup, bunun 7.658.000 tonunu kabakgil türleri teşkil etmektedir. Bu üretim miktarı ile kabakgiller Türkiye'nin toplam sebze üretiminin % 31'ini sağlamaktadır. Kabak üretimi ise 340.000 ton ile Türkiye toplam sebze üretimi içerisinde % 1.3'lük paya sahiptir (Anonim, 2003). Türkiye kabak üretimi bakımından dünyada 7. sırada yer almakta ve yıllık üretim 300- 400 bin ton arasında değişmektedir (Çizelge 1.1). Ülkemizde özellikle yazlık kabak üretimi son yıllarda örtü altında yapılan yetiştiricilik ile kış ayları da dahil olmak üzere bütün yıl boyunca yapılabilmektedir.

Çizelge 1.1. Bazı önemli kabak üreticisi ülkelerin ve dünya toplam kabak üretim miktarları (Anonim, 2003)

ÜRETİCİ ÜLKELER	ÜRETİM MİKTARLARI (milyon ton)					
	1998	1999	2000	2001	2002	2003
ÇİN	3.13	3.35	3.59	3.79	5.10	5.60
HİNDİSTAN	3.35	3.40	3.45	3.50	3.50	3.50
UKRAYNA	1.01	0.78	0.89	0.90	0.88	0.90
İRAN	0.66	0.71	0.52	0.45	0.50	0.50
MISIR	0.61	0.64	0.71	0.70	0.70	0.70
MEKSİKA	0.47	0.50	0.53	0.56	0.47	0.56
TÜRKİYE	0.32	0.33	0.33	0.38	0.34	0.34
ABD	0	0	0.80	0.72	0.75	0.70
DÜNYA	15.02	15.16	16.64	16.92	18.28	18.95

Çoğu kabak türünün anavatanının Meksika, *C. maxima*'yı içine alan birkaç türün ise Güney Amerika olduğu bildirilmektedir (Whitaker ve Robinson 1986; Peirce, 1987; (Robinson ve Decker-Walters, 1997; Decoteau, 2000). Bazı kaynaklar *Cucurbita maxima*'nın kökeninin Asya olabileceğini ifade etmektedir (Günay, 1984; Vural ve ark., 2000)

Kabakgiller botanik sınıflandırmada *Dicotyledoneae* sınıfı, *Cucurbitales* takımı, *Cucurbitaceae* familyası içerisinde yer almaktadır. Bu familya içerisinde yer alan türler "Cucurbit"ler olarak ifade edilen tropik kökenli sıcak iklim bitkileridir (Chada ve Lal, 1993). *Cucurbitaceae* familyası içerisinde yaklaşık 118 cins ve 825 kadar tür bulunmaktadır (Jeffery, 1990). Günümüzde yetiştiriciliği yapılan 5 önemli kabak türü *Cucurbita* cinsi içerisinde yer almaktadır. Bu türler *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata*, *Cucubita maxima*, *Cucurbita ficifolia* ve *Cucurbita argyrosperma* (*C. mixta*)'dır (Robinson ve Decker-Walters, 1997). Bu türlerin önemli özellikleri Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. *Cucurbita* cinsi içerisinde giren önemli türlerin tanımlama anahtarı (Robinson ve Decker-Walters, 1997; Hernádo Bermejo ve J. León, 1994)

Tür / Özellik	<i>C. pepo</i>	<i>C. argyrosperma</i>	<i>C. moschata</i>	<i>C. ficifolia</i>	<i>C. maxima</i>
Tohum Rengi	Beyaz	Beyaz	Beyaz	Siyah	Beyaz
Yaprak Şekli	Üç parçalı, çok çıkıntılı	Kısmen loblu, yumuşak tüylü	Üç parçalı, az çıkıntılı	Yuvarlağa yakın loblu,	Yuvarlak, az çıkıntılı
Yaprakta Benek	Var	Var	Var	Var	Az
Meyve Sapı Kesiti	Açılı (5 açılı)	Açılı, olgunlukta yuvarlak	Açılı(5 açılı)	Hafif köşeli	Yuvarlak
Sapın Meyve Bağlantısı	Meyveye devamlı	Silindirik şeklinde	Genişleyen	Genişleyen	Daralan
Meyve Kabuğu	Parlak	Düz, simetrik	Mat	Beyaz çizgili	Parlak
Tüylülük Biçimi	Dikensi sert tüylü	Tüylü	Tüylü	Tüylü ve dikenli	Az tüylü

Yeryüzünde kültürü yapılan kabaklar yuvarlak, yassı, silindirik, eliptik, armut, disk ve bunun gibi değişik şekiller ile yeşil, gri, kırmızı, sarı, turuncu, siyah ve hatta karışık renkli, benekli, şeritli olmak üzere çok farklı renklerde meyvelere sahiptir.

Ülkemizde kabaklar yazlık, kışlık ve süs kabakları olarak gruplandırılmaktadır. Yazlık kabaklar içerisinde Sakız, Girit, Su ve Asma kabağı yer almaktadır. Kışlık kabaklar ise Bal, Kestane ve diğer iri kabaklardan oluşmaktadır. Süs kabakları ise dış ülkelerden getirilmiş olan Mis ve Parmak kabağı gibi çeşitlerdir (Günay, 1984).

Kabaklar değişik değerlendirme şekilleriyle yıl boyunca insan beslenmesinde kullanılmaktadır (Oraman, 1968; Bayraktar, 1981). Ülkemizde yetiştirilen yazlık kabaklar yıl boyu, pişirilerek yemeklik olarak, kışlık kabaklar ise genellikle kış aylarında tatlı ve böreklik olarak değerlendirilir. Ayrıca, bu üretimin dışında önemli miktarda çerezlik olarak kabak çekirdeği üretimi yapılmaktadır. Kabak insan beslenmesinin yanında meyveleri ve çekirdekleri çok aranan, aynı zamanda hayvan yemi olarak da kullanılan bir sebzedir (Vural ve ark., 2000).

Yazlık kabağın 100 gramında % 5-10 kuru madde, % 90-94 su bulunur. Bu kuru madde içerisinde 1.2 g protein, 3.6-4.3 g karbonhidrat, 19-25 mg C vitamini, 320-460 I.U A vitamini, 0.05 mg thiamine, 0.09 mg riboflavin, 1.0 mg Niacin, 28 mg Ca, 30 mg P, 202 mg K, 0.5 mg Fe bulunmakta olup kalori değeri % 17-20'dir (Peirce, 1987; Sevgican, 2002).

Yazlık kabaklar (*Cucurbita pepo* L.), otsu yapıda gövdeye, geniş yapraklara ve yüzeysel dağılan köklere sahip tek yıllık bitkilerdir. Çiçekler ana gövde üzerindeki yaprak koltuklarında meydana gelmektedir. Çiçeklerin monocious (tek evcikli) yapıda yani erkek ve dişi çiçeklerin aynı bitki üzerinde fakat ayrı yerlerde olması nedeniyle kabaklar yabancı döllenirler. Yabancı döllenme sonucunda genetik yapıları büyük oranda heterozigoti göstermektedir. Bu nedenle de ıslah çalışmalarında saf hatların oluşturulması 8-10 yıl gibi oldukça uzun süreler almaktadır. Haploid ve dihaploid bitkilerin ıslah sürecine dahil edilmesi bu süreleri oldukça kısaltmaktadır.

Somatik hücreleri “n” sayıda kromozoma sahip bitkilere “haploidler” adı verilmektedir (Pierik, 1987; Şehirli ve Özgen, 1988; Klug ve Cummings, 2002). Haploid bitkiler kök, dal, çiçek, yaprak ve bazı durumlarda meyveler de vererek normal gelişim gösterirler. Ancak, haploid bitkilerin doku ve organlarını oluşturan hücreler diploidlere göre biraz daha küçük olduğundan, haploid bireyler morfolojik olarak diploidlerin biraz küçültülmüş örnekleridir (Bilge, 1982; Emiroğlu, 1982). Haploid bitkilerin boyları daha kısa, yaprakları dar ve küçük, çiçekleri küçük ve polen oluşturmamaları nedeniyle kısır dırlar, tohum bağlayamazlar (Emiroğlu, 1980; Abak, 1993, Çağlar ve Abak; 1999). Bu nedenle haploidlerin ıslahta kullanılabilmesi için kromozomlarının katlanarak dihaploid duruma getirilmeleri gerekmektedir.

Haploid bitkilerin ve bu bitkilerden çeşitli yöntemler kullanılarak “dihaploid=double haploid” (DH) bitkilerin elde edilmesi ıslahçılara önemli avantajlar sunmaktadır (Reinert ve Bajaj, 1977; Pochard ve Dumas de Vaulx, 1979; Hermsen ve Ramanna, 1981; Abak, 1982; Emiroğlu, 1982; Bajaj, 1983; Lespinasse ve ark., 1983; Sarı ve Abak, 1983; Pierik, 1987; Abak, 1988; Chambonnet, 1988; Pierik, 1989; Bhojwani, 1990; Gallais, 1990; Sangwan ve Sangwan-norrel, 1990; Thorpe, 1990; Zhang ve ark., 1990; Kuckuck ve ark., 1991; Abak, 1993; Emiroğlu ve Gürel, 1993; Sarı, 1994; Abak ve ark., 1996; Khush ve Virmani, 1996). Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilir:

- 1- Haploidler ve DH’ler sitolojik ve genetik açıdan önemli deneysel materyallerdir. Çünkü haploidler ve dihaploid homozigotlarda genetik açılım (Segregation) basittir, resesif genler dominantlar tarafından örtülmezler.
- 2- DH materyale uygulanan mutagenlerin resesif yönde yarattığı mutasyonlar, bu materyallerden seçilen haploidler yardımıyla daha ilk generasyonda belirlenebilmektedir.
- 3- Haploidlerin, değişik ortamlarda ve farklı patojenlere ya da patojenlerin farklı ırklarına karşı *in vitro* seviyede seçime olanak vermesi hastalıklara dayanıklılık çalışmalarında yer, zaman ve maddi kazanç sağlar.
- 4- Özellikle yabancı döllenilen türlerde 10-12 generasyon tekrarlanan kendilemeler ile ulaşılan homozigotiye, dihaploidizasyon yönteminin kullanılmasıyla bir generasyonda hızlı ve kolay bir şekilde ulaşılır.
- 5- Kendilemenin olanaksız olduğu bazı dioik türlerde (kuşkonmaz vb.) haploid uyarımı ve bunu takip eden kromozom katlanmasıyla saf erkek bitkiler elde etmek mümkündür.
- 6- Klasik yöntemlerle homozigotiye ulaşmanın oldukça zor olduğu ve kendileme depresyonunun görüldüğü çilek ve lahana gibi türlerde dihaploidizasyon ile bu sorun bir generasyonda çözülebilir.

- 7- Homozigoti meyve ağaçları, yumrulu bitkiler ve orman ağaçları gibi tohumdan çiçeklenmeye kadar oldukça uzun bir gençlik dönemi olan bitkiler için de önemlidir.
- 8- Dihaploid bitkilerden oluşturulan saf hatlar doğrudan çeşit olarak veya hibrit çeşitlerin geliştirilmesinde ebeveyn olarak kullanılabilirler.
- 9- DH hatları mevcut ıslah yöntemlerinin etkinliğini artırma potansiyeline sahiptirler. Dominansi etkisinin kalkması nedeniyle, heterozigot bitkilerin kendilenmiş döllerinin değerlendirilmesinde DH hatları çok güvenlidir. Dihaploid bitkilerin döllerinde bir açılım olmadığı için genotipler arasında çok iyi bir eliminasyon yapılabilir. Ayrıca, eklemeli gen etkisi ikiye katlanır.
- 10- DH hatları major genler ve/veya kantitatif özellik locuslarının (QTL) genetik haritalama çalışmalarında, QTL analizlerinde mükemmel deneysel materyaller olarak nitelendirilmektedir.

Doğal haploidi uzun süredir bilinmekle birlikte, haploid bitkilerin çeşitli yollardan doğada kendiliğinden ortaya çıkma sıklığı türlere ve hatta tür içerisindeki genotiplere bağlı olarak değişmekte olup, çoğunlukla % 0.1-0.001 gibi çok düşük seviyelerde kalmakta, birçok türde ise doğal haploid oluşumuna hiç rastlanmamaktadır (Pochard ve Dumas de Vaulx, 1971). Bu nedenle doğada kendiliğinden ortaya çıkan haploidler ıslah programlarında kullanılamamıştır. Ancak araştırmacılar bu oranı arttırmak için çeşitli uygulamaların arayışı içinde olmuşlardır (Pierik, 1989; Emiroğlu ve Gürel, 1993).

1970'li yıllardan itibaren anter kültürü ile döllenmemiş ovül ve ovaryum kültürleri ümit verici teknikler olarak birçok bitkide haploidlerin elde edilmesine olanak sağlamıştır (Yang ve Zhou, 1990). *In vitro* veya *in situ* uyartılı parthenogenesisde (androgenesis ve gynogenesis) normal döllenme meydana gelmemektedir. Haploid embriyolar, yumurta hücresinden (gynogenesis) veya embriyo kesesindeki diğer hücrelerden birinin (sinergid, antipodal hücre) bölünerek (apogami) haploid bir embriyo oluşturmasıyla ya da anterlerin veya polenlerin doğrudan *in vitro* kültüre alınması (androgenesis) ile oluşmaktadır (Sneep ve Hendriksen, 1979).

Haploidlerin düzenli ve yüksek oranda eldesi için değişik araştırmacılar tarafından bir çok bitkide denenilen yöntemleri iki grupta toplanabilir (Hosemans ve Bossoutrot, 1983).

1- *In situ* haploid embriyo uyartımı:

In situ haploid uyartımını teşvik amacıyla kullanılan yöntemler şöyle sıralanabilir (Lacadena,1974; Yeung ve Thorpe, 1981; Hermsen ve Ramanna, 1981; Sneep, 1983; Bajaj, 1983; Lespinasse ve ark, 1983, Pierik, 1989; Wenzel, 1980; Sarı ve ark,1992; Khush ve Virmani, 1996; Çağlar ve Abak, 1999; Kurtar, 1999):

- a- Uzak akrabalar arası melezlemeler
- b- Tozlamamanın geciktirilmesi
- c- Abortif veya ışınlanmış polenlerle tozlama
- d- Değişik kimyasalların uygulanması
- e- Sıcaklık şokları
- f- X, ve UV ışınlarının uygulanması

- 2- *In vitro* dişi veya erkek gamet kültürleri (anter –mikrospor veya ovul-ovaryum kültürleri):

İlk kez, Guha ve Maheswari tarafından *Datura innoxia* Mill. bitkisinde 1964 yılında *in vitro* anter kültürü yoluyla düzenli ve yüksek oranda haploid embriyolar ve bitkiler elde edilmesi, ıslahçılar ve doku kültürçüler arasında heyecanla karşılanmıştır. Kısa sürede, Nitsch ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu teknik *Nicotiana* türlerinde başarıyla uygulanmıştır (Nitsch, 1981).

Bu güne kadar yaklaşık 300 yakın türde *in vitro* androgenesis başarıyla uygulanmıştır (Bajaj, 1983; Bhojwani ve Razdan, 1983; Pierik, 1989; Sangwan ve Sangwan-Norrel, 1990). Günümüzde buğday, arpa, çeltik, kuşkonmaz, lahanaya, biber, mısır, patlıcan gibi çok sayıda türde ıslah programlarında kullanılmaktadır (Wenzel, 1985; Kuckuck ve ark, 1991).

Haploidlerin elde edilmesinde kullanılan yöntem ile birlikte genotip, donör bitkinin büyüme koşulları ve yaşı, gametlerin durumu, sıcaklık şokları ve karanlıkta bırakma gibi ön uygulamalar ile kültür ortamının bileşimi gibi pek çok faktör etkili olmaktadır (Chambonnet, 1988; Karakullukçu, 1993a, Karakullukçu, 1993b; Gémesne ve ark, 2002).

Sebze ıslahında özellikle yabancı döllenmiş türlerde F₁ hibritlerin ebeveynleri olarak kullanılan saf hatların elde edilmesi oldukça uzun zaman almaktadır. Cucurbitaceae familyasına giren türlerin çiçek yapılarının çok değişik olması (monoik, andromonoik, gynomonoik, androik, gynoik, erselik) ve doğal olarak yabancı döllenmeleri nedeniyle ıslah çalışmaları uzun süre almaktadır (Lower ve Edwards, 1986).

Kabakgiller familyasına giren sebze türlerinde doğada spontan haploidi oluşumuna rastlanmamıştır. Androgenesis yoluyla *in vitro* haploid bitki eldesi genetik ve ıslah çalışmalarında kullanılacak düzeyde olmamıştır (Xue ve ark., 1983; Ragnet, 1984; Chambonnet ve Dumas De Vault, 1985; Kurtar, 1999). Bu nedenle son yıllarda gynogenesis yoluyla haploid embriyo ve *in vitro* bitki eldesi üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Işınlanmış polenlerle tozlaşma yoluyla *in situ* haploid embriyo uyartımı ve bu embriyolardan *in vitro* bitki eldesi üzerine yapılan çalışmalarda kavun (Sauton ve Dumas de Vault, 1978; Savin ve ark., 1988; Sarı ve ark., 1992; Maestro-Tejada, 1992; Cuny, 1992; Abak ve ark., 1996), hıyar (Troung-Andre, 1988; Sauton, 1989; Niemirowicz-Szczytt ve Dumas de Vault, 1989; Çağlar, 1995; Çağlar ve Abak, 1999), karpuz (Gürsöz ve ark., 1991; Sarı ve ark., 1994) ve kabak (Kurtar ve ark; 2002) türlerinde oldukça olumlu sonuçlar alınmıştır.

Ayrıca Cucurbitaceae familyasına giren türlerde döllenmemiş yumurtalığın ya da ovullerin kültüre alınmasıyla haploid embriyo ve bu embriyolardan haploid bitki oluşturma çalışmaları da sürdürülmektedir (Dumas de Vault ve Chambonnet, 1986; Gémesné ve ark., 2002).

Kabaklarda haploid bitki elde edilmesi ile ilgili çalışmalar oldukça az sayıdadır. Ancak yapılan anter kültürü çalışmalarında anterlerden oluşturulan kalluslardan haploid bitkilerin elde edilmesi bildirilmektedir (Metwally ve ark, 1998). Işınlanmış polen

teknîği (Kurtar, 1999; Kurtar ve ark., 2002). Yazlık kabakta döllenmemiş ovullerin *in vitro* kültüre alınmasıyla ya da ışınlanmış polen tekniği kullanılarak haploid bitki eldesi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (Dumas de Vault ve Chambonnet, 1986; Kwack ve Fujieda 1988; Gémes ve Venczel 1996; Metwally ve ark. 1998; Kurtar, 1999; Gémesné ve ark, 2002). Ancak kabakta bugüne kadar yapılan çalışmalarda ıslah programlarında kullanılacak yeter sayıda haploid-dihaploid bitki elde edilebilen kolay uygulanabilir bir yöntem optimizasyonu gerçekleştirilememiştir. Bu konudaki çalışmalar tüm kabak türlerinde devam etmektedir.

Bu araştırmada yazlık kabakta döllenmemiş ovaryum ve ovullerin *in vitro* kültürleri yapılarak haploid bitkilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada genotipin, ovaryumların alınma dönemlerinin, eksplantların dilimlenme şeklinin ve besin ortamlarına ilave edilen bitki gelişimini düzenleyicilerin haploid embriyo oluşturma ve bitki eldesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Blakeslee ve ark., 1922’de *Datura stramonium*’da ilk “doğal” haploid bitkileri keşfetmelerinden sonra botanikçiler ve genetikçiler haploidlerin potansiyelinin farkına varmışlar ve böylece haploid bitkilerin elde edilmesine olan ilgi artmıştır (Maheshwari, 1996).

Guha ve Mahehsuari 1964, 1966 ve 1967 yıllarında arka arkaya yayınladıkları makalelerinde *Datura innoxia* anterlerini *in vitro* kültüre alarak çok sayıda embriyolar elde ettiklerini, bu embriyolardan elde edilen bitkilerde yaptıkları kromozom sayımları sonucunda haploid yapıda olduklarının doğrulandığını ve son olarak da tüm çalışmalarının detaylarını vermişlerdir (Maheshwari, 1996). *In vitro* uyartım sonucu androgenesis yoluyla elde edilen bu ilk haploid bitkileri tütün, mısır, petunya, buğday gibi pek çok türde çeşitli araştırmacılar tarafından aynı yöntem kullanılarak elde edilen haploidler izlemiştir (Maheshwari, 1996). Daha sonra bir çok araştırmacı *in vitro* anter kültürü tekniğini kullanarak biber (Sibi ve ark., 1979; Dumas de Vault ve Chambonnet, 1980; Abak, 1983b), kuşkonmaz (Dore, 1976, Dore, 1978), patlıcan (Chambonnet, 1985; Chambonnet, 1988; Karakullukçu ve Abak, 1993a, Karakullukçu ve Abak, 1993b) lahanası (Dore ve Boulidard, 1988; Roulund ve ark., 1990) gibi pek çok sebze türünde başarıyla sonuçlanan çalışmalar yapmışlardır.

Ancak “recalcitrant” olarak nitelendirilen soğan gibi bazı türlerde androgenesis yoluyla sonuç alınmaması araştırmacıların dikkatini yeniden dişi gametlerin kullanıldığı gynogenesisine yöneltmiştir (Keller ve Korzum, 1996).

Gynogenesis yoluyla haploid bitki elde edilmesinde döllenmemiş ovul veya ovaryumların *in vitro* kültürleri, eksik veya yetersiz polenlerle tozlama ve kromozom eliminasyonu gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır.

Aalders (1958), hıyarda (*Cucumis sativus* L.) monoploid bitki elde etmek amacıyla, olgunlaşmamış devrede hasat ettiği meyvelerin tohumlarını su üzerinde yüzdürme yoluyla ayırarak su yüzeyinde hafif kalan tohumlarla embriyo kültürü yapmış ve 13 adet monoploid hıyar bitkisi elde etmiştir. Cucurbitaceae familyasının ilk monoploidleri olan bitkilerden 8 tanesinin büyütülmesine ve kolhisin yardımıyla diploid hale getirilmesine rağmen, bunlardan yeni bitkiler elde edilememiştir.

Daha sonraki yıllarda, Ginkgo *Biloba* bitkisinde dişi gametten hareketle haploid dokular oluşturulmuştur (Tulecke, 1964). *Solanum melongola* ve *Zea mays*’ın yumurtalıklarında haploid hücrelerin bölündüğü gözlenmiş (Uchimiya ve ark., 1971), *Hordeum vulgare* L. x *Hordeum bulbosum* L arasındaki melezlemelerde de kromozom eliminasyonundan yararlanarak haploid embriyolar elde edilmiş ve yeni besin ortamları geliştirilerek (Norstog, 1973) *in vitro* kültürde yaşatılmıştır. Ancak bu çalışmaların hiç birinde de haploid dokular ve embriyolar bitkiye dönüştürülemedi.

1950’li yıllardan itibaren iyonize radyasyonların bitkilerde deneysel olarak uygulanması ile ilgili oldukça yoğun çalışmalar yapılmıştır (Sparrow, 1961). Bu çalışmaların bir çoğunun bitkilerde mutasyon yaratma amacına yönelik olduğu ve değişik

kaynaklı ışınların farklı dozlarının, yüzlerce bitki türünün değişik organlarına (polenler, tomurcuklar, tohumlar ve generatif organlar, tüm bitki vb.) uygulandığı görülmüştür (Mackey, 1961; Filev, 1981; Yıldırım, 1981; Werry, 1981; Walther ve Preil, 1981; Brunner, 1990; Shcherbakov, 1991; Donini, 1991).

Çiçek tozlarına ışın uygulanması çalışmalarına 1980’li yıllarda başlandığı, ancak haploid sıklığının artırılması konusunda başlangıçta olumlu sonuçlar elde edilemediği bildirilerek, polenlere iyonize radyasyonların etkilerini şu şekilde sıralanmıştır (Bruuner 1990):

- polen çimlenmesinin zayıflaması
- gametlerin oluşumunun azalması
- çiçek tozu çim borusunun ovülüne penetre edememesi
- normal endosperm gelişiminin olmaması
- olgun tohum ve fidelerde canlılığın azalması

Işınlanmış polenler “ mentor polen ” olarak kullanılarak partenogenetik diploidi yoluyla gen transferleri gerçekleştirilirken (Pandey, 1981), haploid uyartımı ile ilgili çalışmalar da 1980’li yıllardan itibaren başarılı sonuçlar vermeye başlamıştır (Custer ve Den Nijs, 1983; Raquene, 1986; Sauton, 1987; Niemirowicz ve Dumas de Vault, 1989; Sarı ve ark., 1994; Çağlar, 1996; Çağlar ve Abak, 1999; Kurtar ve ark., 2002)

In vitro gynogenesis olumlu cevap veren türlerin büyük bölümü *Gramineae* familyasından olup, döllenmemiş ovaryum kültürleri sonucu dişi kökenli ilk haploid bitkiler de *hordeum vulgare*’de elde edilmiştir. San Noeum (1976), arpada (*Hordeum vulgare* L.) yaptığı çalışmada aynı çiçekteki çiçek tozlarının gelişme durumuna göre sınıflandırdığı döllenmemiş yumurtalıkları 3 gruba ayırarak *in vitro* kültüre almıştır. Gelişmekte olan yumurtalıkları çiçek tozlarının tek çekirdekli olduğu aşamada G1, iki çekirdekli olduğu aşamada G2, üç çekirdekli, fakat anthesisten önceki aşamada G3 olarak adlandırılmıştır. Değişik boylarda kültüre alınan bu üç grup yumurtalıklardan G1 aşamasında olanlar şişkinleşmiş veya az şişkinleşmiş ve daha sonra ölmüştür. G3 ve G2 aşamasında olanlar ise % 8–12 sakkaroz içeren ortamlarda yaklaşık %0.6 oranında haploid bitkiler vermiştir. Bunlar *in vitro* kültürde elde edilen ilk dişi kökenli haploid bitkiler olmuştur.

San Noeum (1976), arpada 4 çeşitte ovaryum kültürü yapmış ve kültüre aldığı Ovaryumların % 0.2-1.0’inin bir veya iki, bazen de sekize kadar bitki verebildiğini bildirmiştir.

Zhu ve Wu (1979), buğday (*Triticum aestivum*) ve tütünde (*Nicotiana tabacum*) tozlanmamış yumurtalıklardan *in vitro* haploid bitkiler elde etmişlerdir. Araştırmacılar, “ Chum Hwei No.1 “ buğday çeşidi ile “ Copus Yeusnheku No.4 “ tütün çeşidini kullanmışlar ve aynı çiçeğin polenlerinin tek çekirdekli olduğu dönemde yumurtalıkları *in vitro* kültüre almıştır. Kültür süresince transfer yapılmaksızın buğdayda kültüre alındıktan 42 gün, tütünde ise 23 gün sonra bitkicikler elde edilmiş, kök ucu kromozom sayıları ile bunların haploid oldukları doğrulanmıştır. Araştırmacılar, ayrıca buğday ovaryumlarından önce kallus sonra bitkicikler gelişirken, tütünde kallus oluşmaksızın ovaryum içindeki ovüllerden doğrudan bitkiciklerin geliştiği görülmüştür.

Dumas de Vault (1979) kavunu (*Cucumis melo* L.) ($2n=24$), *Cucumis ficifolius* ($2n=4x=48$) ile tozlayarak türler arası melezlemeler yapmıştır. Araştırmacı, polenlerin çim borusu gelişimini uyarmak amacı ile, stigmalarını yüzeysel olarak bisturi ile kestiği dişi çiçekleri kavun polenleri ile tozlamış ve meyveler elde etmiştir. Meyvelerden çıkan tohumlar ekildiğinde melez bitki çıkmadığı, buna karşılık daha küçük boyutlu bitkilerin geliştiği görülmüştür. Araştırmacı, bu bitkilerde yaptığı kromozom sayımları sonucu, bunların haploid yapıda olduklarını; haploidi oranlarının ise ilkbahar aylarında % 0.284, sonbaharda ise % 0.07 olduğunu bildirmiştir.

Asselin de Beauville (1980) çeltikte (*Oryza sativa* L.) *in vitro* haploid bitki eldesi üzerinde yaptığı çalışmada explant olarak döllenmemiş yumurtalıkları kullanmış ve gynogenesisin bu türde de başarılı olduğunu göstermiştir. Araştırmacı, farklı ortam pH değerleri (6.0, 6.4, 6.8) ile ortama katılan sakkaroz (% 2, % 3, % 6) ve maya özünün etkilerini incelemiş, en iyi sonucun & 6 sakkaroz ile 2g/l maya özü bulunduran 6.4 pH derecesindeki ortamdan alındığını belirtmiştir. Bu ortamda haploidi frekansı % 1.3, bunların bitkiye dönüşüm oranları da % 19.4 olmuştur.

Zhou ve Yang (1980) çeltikte (*Oryza sativa* L.) Asselin de Beauville ve Kuo tarafından adapte edilen standart ovaryum kültürü yerine “başakçık kültürü” geliştirmişlerdir. Araştırmacılar, bu yöntemi kullanarak, kültüre aldıkları çeltik çeşitlerinden 15 japonica çeşidinin hepsinden, 4 indica çeşidinin de 2’sinden olumlu sonuçlar almışlardır.

Zhu ve ark. (1980) ile Zhu ve Wu (1981) tozlanmamış yumurtalıkların *in vitro* kültüre alınarak haploid bitkicikler elde etme yöntemini erkek kısır tütün (*Nicotiana tabacum*) hatlarında uygulayarak başarılı sonuçlar almışlardır. Araştırmacılar, haploid tütün bitkileri elde ederek, bunları yeni donör bitkiler olarak ovaryum kültüründe kullanmışlardır.

Sitbon (1981) *Gerbera jamesonii* bitkisinde döllenmemiş ovüllerin *in vitro* ile klorofil içeren haploidler elde etmiş ve en iyi sonucu MS+ 2mg/l BAP veya Kinetin+ 0.5 mg/l IAA içeren besin ortamlarından aldığını bildirmiştir.

Zhu ve ark. (1981)’nin buğdayda (*Triticum aestivum*) biri hibrit, biri erkek kısır olmak üzere 5 çeşidin döllenmemiş ovaryumlarını *in vitro* kültüre almışlardır. Farklı konsantrasyonlarında oksin ve stokinin içeren değişik ortamlar üzerinde kültüre alınan ovaryumlardan haploid bitkiciklerin elde edilme frekansı % 1.95 ve % 6.67 arasında değişmiştir. En iyi sonuçlar 0.5 mg/l NAA, 1mg/l kinetin, 500 mg/l lectalbumin hydrolysate ve 60 g/l sucrose ile 6 g/l agar içeren MS temel besin ortamında elde edilmiştir. Ovaryumlar transfer yapılmaksızın aynı ortam üzerinde gelişerek, kallus oluşturmadan doğrudan kuvvetli kök sistemine sahip sağlıklı-yeşil haploid bitkicikler vermiştir. Kardeşler ayrılarak alt kültüre alınmış, bunlardan da yine kardeşlenen yeni ve sağlıklı bitkicikler elde edilmiştir.

Wang ve Kuang (1981) arpada yaptıkları ovaryum kültüründe, ovaryumlardan kallus oluşturmadan doğrudan kuvvetli kök ve sürgün oluşturan bitkicikler geliştirmişlerdir. Haploid bitki elde etme oranı % 1.3 – 1.4 arasında değişmiştir. Toprağa

şaşırtılan arpa bitkilerindeki kök ucu kromozom sayımları ile bunların haploid oldukları doğrulanmıştır.

Compositae familyasına ait türlerden özellikle *Gerbera jamesonii* ve *Helianthus annuus*'da *in vitro* gynogenesis ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Sitbon (1981) *Gerbera jamesonii* bitkisinde gynogenesis yoluyla haploid bitki eldesi üzerine çalışmıştır. Araştırmacı, ovaryum kültüründen olumlu sonuç alamamasına karşın, döllenmemiş ovülleri *in vitro* kültüre alarak haploid bitkiler elde etmeyi başarmıştır. Aynı araştırmacı, farklı ortamların haploid oluşumu üzerindeki etkilerini de incelemiş ve 2 mg/l BAP veya kinetin+ 0.5 mg/l IAA içeren MS temel besin ortamının en iyi sonucu verdiğini saptamıştır.

Wu ve Cheng (1982), tütünde döllenmemiş genç yumurtalıkları *in vitro* kültüre alarak haploid bitkiler (n=24) elde etmişlerdir. Haploid bitkiciklerin orijin olarak ya kallus oluşturma safhası geçirmeksizin doğrudan megaspordan veya embriyo kesesi içindeki yumurta hücresinden oluştuğunu, ayrıca kalluslardan embriyoidler, bunlardan da yine bitkiciklerin meydana geldiğini belirtmişlerdir. Temel besin ortamına konulan tiamin, pyridoxine, ascorbic asit, nicotinic asit, inositol ve folik asit konsantrasyonları arttırıldığında *in vitro* kültüre alınan ovaryumlardan embriyoid ve embriyogenik kallus oluşumunun önemli ölçüde arttığını saptamışlardır. Araştırmacılar, dışsal hormonların ovaryumlardan embriyoid teşviki için mutlak gerekli, fakat embriyogenik kallus teşviki için mutlak gerekli olmadığını bildirmişlerdir.

Dryanovska ve Ilieva (1983), kavunda (*Cucumis melo* L.) organogenesis ve haploidinin teşviki amacıyla anter ve ovül kültürü yapmışlardır. Araştırmacılar, ovülleri plasenta ile birlikte kültüre alarak haploid kallus oluşturmuş ve bunlardan da bir adet haploid bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Truong-Andre ve Demarly (1983), mısırdaki 3 hat ve 2 melez çeşide ait döllenmemiş yumurtalıkları kültüre alarak gynogenesis yoluyla haploid bitki eldesinde genotipin ve mevsimin etkili olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, denemede kullandıkları 5 çeşitten yalnızca birinden olumlu sonuç alındığını ve en uygun mevsimin ilkbahar olduğunu belirtmişlerdir.

Hosemans ve Bossoutrot (1983), şeker pancarında (*Beta vulgaris* L.) erkek kısır 4 genotipin döllenmemiş ovüllerini anthesisten hemen önceki safhada, farklı dozlarda oksin ve sitokininler içeren ortamlar üzerinde kültüre almışlardır. Ovüllerin bir veya iki ay içerisinde genotip ile kullanılan oksin ve sitokinin konsantrasyonlarına bağlı olarak % 0.2 - % 4.4 arasında değişen oranlarda, mikropil çevresinde kalluslar veya embriyolar oluşturduklarını gözlemişlerdir. Araştırmacılar, kültüre alınan ovüllerin yaklaşık % 2.1'nin kallus veya embriyo verdiğini, bunlardan da 17 adet (% 10.9) bitki geliştiğini bildirmişlerdir. Vegetatif olarak çoğaltılıp toprağa şaşırtılan bu bitkilerin bazılarının köklerinde spontan kromozom katlanmaları olduğu ve bitkilerin diploid hale geldiklerini saptamışlardır. Araştırmacılar, bu sonuçlara dayanarak haploid bitkilerin elde edilmesi için şeker pancarında, anter kültürü veya türler arası melezlemelere göre ovül kültürünün daha etkili olduğunu vurgulamışlardır.

Meynet ve Sibi (1984), *Gerbera jamesonii*'de döllenmemiş ovülleri kültüre almışlardır. İlk erkek çiçek açmadan bir gün önce alınan çiçek tablalarından ovüller çıkarılarak, sırasıyla kallus başlangıcı, transfer, bitkiciklerin gelişimi ve köklenme olmak üzere 4 farklı ortama belirli aralıklarla şaşırtılmışlardır. Araştırmacılar, denemede kullandıkları "Fresultane" çeşidinde kültür başlangıcından itibaren 60 günden daha kısa zamanda ve % 4-7 oranında haploid bitkiler elde etmişlerdir. *Gerbera jamesonii*'de haploid bitki eldesinin genotip ve mevsimden etkilendiğini bildiren araştırmacılar, haziran ayında % 4.64 olan haploid bitki eldesi oranının eylül ayında % 7.47'ye yükseldiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, bu yöntemin enginar ve marul gibi diğer *Compositae* familyası türlerine de uygulanabileceğini bildirmişlerdir.

Chambonnet ve ark. (1985), kabakta (*Cucurbita pepo* L.) döllenmemiş ovülleri *in vitro* kültüre alarak embriyo kesesi hücrelerinden haploid bitkiler elde etmişlerdir. Araştırmacılar, uygun *in vitro* koşullar altında kültüre alınan ovüllerden elde ettikleri embriyoları bitki oluşturmaya başladığında hormonsuz besin ortamına transfer etmişlerdir. En iyi sonuçlar çiçeklenmeden 1 veya 2 gün önce henüz döllenme olmadan alınan ovüllerin kullanılmasıyla elde edilmiştir ve 100 ovülden 4-7 arasında bitki oluşumu sağlanmıştır. Bitkilerin çoğunun diploid, fakat bazılarının haploid-diploid kimera, aneuploid veya polyploid olduğu saptanmıştır. Diploid bitkilerin genetik analizi sonucu yapılan karşılaştırmada ana bitkiye benzemeyen 8 heterozigot F1 bitki gözlenmiştir. Regenerasyona uğramış F1 bitkilerin her biri farklı fenotipler göstermişlerdir.

Bornman (1985), şeker pancarında % 0.3-3 oranında gynogenik embriyolar elde edildiğini ve bu embriyolardan bir kısmının da haploid bitkiye dönüştüğünü bildirmişlerdir.

Hosemans ve Bossoutrot (1985), farklı kültür ortamlarının şeker pancarında (*Beta vulgaris* L.) ovül gelişimine etkisini incelemiş ve 2 mg/l oksin + 80 g/l sakaroz içeren ortamda en yüksek haploid bitki oranını (% 4.4) elde etmişlerdir. Araştırmacılar haploid bitki oranının, 4 mg/l 2.4-D + 60 g/l sakaroz içeren ortamda % 0.2'ye kadar düştüğünü belirtmişlerdir.

Sauton (1987), ticari bir F₁ kavun çeşidini normal kültür koşulları altında serada yetiştirerek kendileme yapmıştır. Araştırmacı, ovaryumları tozlamadan 5 gün sonra alıp, içerisine birkaç damla Tween20 damlatılmış olan % 10'luk calcium hypochlorid solüsyonunda 10 dakika yüzey sterilizasyonu yaparak saf su ile 3 kez çalkaladıktan sonra içerisinde nemlendirilmiş filtre kağıtları bulunan petrilere aseptik koşullarda transfer etmiştir. Plesanta dokuları dikkatlice çıkarılan ovüllerin 20 g/l sakkaroz + 10 g/l agar ilave edilen MS ortamında kültüre alındıktan 3-4 hafta sonra çimlendiği, 4 hafta sonunda da bitkilerin toprağa şaşırtılacak duruma geldiği gözlenmiştir. Çalışma sonunda *Cucumis* cinsi içerisindeki türler arası melezlemelerde bu uygulamaların kullanılabilmesi belirtilmiştir.

Gelebart ve San (1987), ayçiçeğinde *in vitro* gynogenesis üzerinde yaptıkları araştırmada, aralarında erkek-kısır hatların da bulunduğu 8 genotip kullanmışlardır. Araştırmacılar, başlangıçta karanlıkta kültüre aldıkları ve daha sonra rejenerasyon için aydınlığa transfer ettikleri ovaryumlardan ortalama % 0.5 oranında bitki elde etmişlerdir. Elde edilen toplam 37 adet bitkiden 20'sinin haploid, 8'inin diploid, 9'unun da mixoploid (2n+n) olduğunu saptamışlardır.

Shail ve Robinson (1987), yaptıkları bir araştırmada *Cucurbita pepo* cv. Black Jack, ile *C. ecuadorensis*'in tozlanmasından 24 ile 72 saat sonra alınan ovüllerin besin ortamına transfer edildikten sonra kallus ve kök oluşturduğunu ancak bitki elde edilemediğini bildirmişlerdir. Bununla beraber olgunlaşmış meyvelerdeki embriyoların kültüre alınmasıyla, türler arası melezlemelerden hibrit bitkiler oluşturmuşlardır.

Kwack ve Fujieda (1988), *Cucurbita moschata*'da döllenmemiş ovüllerden somatik embriyolar elde edilmesi üzerine ortam pH'sı ve agar konsantrasyonunun etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla, anthesisten 1 gün önce çiçek tomurcukları toplanarak 2 gün 5°C ön sıcaklık uygulaması yapıldıktan sonra ovaryumlardan çıkarılan döllenmemiş ovülleri 60 g/l sakkaroz ve 8 g/l agar ilave edilmiş pH'sı 5.8'e ayarlanmış MS ortamında kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda, *in vitro* kültürdeki döllenmemiş ovüllerde kallus proliferasyonu ile birlikte embriyogenesis görüldüğünü bildirmişlerdir.

Kwack ve Fujieda (1988), *Cucurbita moschata*'nın döllenmemiş ovüllerini *in vitro* kültüre alarak haploidi uyartımını incelemişlerdir. Araştırmacılar, anthesis safhasında alınarak 2 gün 5°C'de ön sıcaklık uygulanan ovaryumlardan alınan ovüllerin 30 g/l sakkaroz içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmasının en iyi sonucu verdiğini ve ovüllerden % 17'sinin embriyo oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu embriyoların uygun bir ortama transfer edildiğinde çoğunun kallus oluşturmaya yöneldiğini ve anormal morfolojik gelişmeler gösterdiğini, sadece birkaç tanesinin normal sürgün ve kök verdiğini izlemişlerdir. Bu araştırma ile elde edilen 3 bitkiden birinin diploid ($2n=40$), ikisinin ise tetraploid olduğu saptanmıştır.

Zhang ve Lespinasse (1988), elma (*malus x domestica* Borkh.) ovüllerini kültüre alarak embriyogenesis üzerinde çalışmışlardır. Araştırmada "Erovan", "Lodi" ve "R1-49" genotiplerine ait çekirdekli olduğu balon safhasında toplanmıştır. Explant olarak bu tomurcuklardan çıkarılan ovaryumlar, plasenta ile birlikte ovüller ve izole edilen çıplak ovüller kullanılmıştır. Bu ovüller 12 farklı kombinasyonda hormon ve sakkaroz ilave edilmiş MS temel besin ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır. Her 3 genotipde besin ortamına göre % 0-32 arasında değişen oranlarda kallus oluşturmuş, MS mikro ve 1/2 MS makro tuzlar + NN vitaminler (Nitsch- Nitsch, 1969) + 1.0 mg/l 2-4D + 2.0 mg/l BA içeren % 10 sakkaroz ilave edilmiş ortamlar üzerinde kültüre alınmış "R1-49" ovüllerinden iki adet embriyo benzeri yapılar elde edilmiştir. Ancak, bu "embriyoidler" bitkiye dönüştürülememiştir.

Yang ve ark. (1988), ayçiçeğinde farklı genotiplerin *in vitro* gynogenesis tepkilerini inceleyerek, denemede kullandıkları 12 çeşidi gynogenesis yanıt verenler, tepkisiz fakat somatik kallus oluşturanlar ve her ikisine de yanıt vermeyenler olmak üzere 3 grupta sınıflandırmışlardır. Ayrıca, kültüre alınan ovüllerin karanlıkta tutulmasının gynogenesisi teşvik ettiğini, buna karşılık somatik kallus oluşumunu engellediğini belirtmişlerdir.

He ve Yang (1988), kültüre alınan çeltik ovaryumlarının karanlıkta tutulmasının, aydınlık ortamlara göre daha olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, embriyolojik gözlemler sonucu, 12 saatlik aydınlatmanın (800 Lux aydınlatma) gynogenik proembriyoların ciddi dejenerasyonuna neden olduğunu, bir aylık süre içerisinde bu embriyoların tamamen abort hale geldiğini saptamışlardır.

Doctrinal ve ark. (1989), *Beta vulgaris*'de döllenmemiş ovülleri 2.85 µM IAA, 0.88 µM BAP ve 2.8 µM kinetin içeren N6 ortamında kültüre almışlar, en iyi sonucu 2.8 µM kinetin içeren N6 ortamında elde etmişlerdir. Araştırmada çeşitli büyüme hormonlarının konsantrasyonu ve niteliği, kültüre alınan ovüllerin gelişmesi için gerekli ortam sıcaklığı, genotipler ve mevsimlerin etkisi gibi faktörlerin üzerinde ayrı ayrı çalışılmıştır. Araştırmacılar, kültüre alınan ovüllerden embriyoların gelişimi için yaz dönemi içinde haziran ayının, kültüre alınan ovuller içinde 27°C'nin 24°C'ye göre daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Genotipin etkisi sadece belli bir ortam için önemli bulunmuştur. Kültüre alınan 100 ovül başına elde edilen haploid bitki sayısı oksin ve sitokinin kombinasyonlarına ve genotipe bağlı olarak 6–10 arasında değişmiştir.

Gussakovskaya ve Najar (1990), buğdayda 8 çeşitte döllenmemiş ovül ve ovaryum kültürü yaparak *in vitro* embriyo kesesi gelişimini incelemişlerdir. Morfolojik analizler sonucu, gelişmenin erken döneminde kültüre alınan ovüllerin, *in vivo* embriyo kesesi oluşumu gibi normal embriyo kesesi oluşturdukları saptanmıştır. Ayrıca araştırmacılar, sadece tozlanmadan önce ve bütün olarak alınan çiçeklerinden, başlangıçta hormonsuz sıvı, MS ortamı üzerinde ve karanlıkta kültüre alıp daha sonra 0.5 mg/l IAA, 0.25 mg/l NAA, 1.2 mg/l Kinetin ve % 3 sakkaroz içeren katı MS ortamına şaşırtarak % 2–3 oranında haploid bitkicikler elde edebildiklerini bildirmişlerdir.

Katoh ve Iwai (1990), tütünde tozlanmamış ovüllerin doğrudan sakkaroz içeren besin ortamlarında kültüre alındığında kallus vermediğini gözlemişler ve kallus oluşumunu teşvik eden yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu amaçla anthesisten önce alınan çiçek tomurcuklarından çıkarılan ovüller, kallus gelişimini teşvik amacıyla plasental dokularla birlikte saf su içinde 35°C de 3 gün süre ile kültüre (ilk kültür) alınmıştır. Daha sonra 2 mg/l Kinetin, 0.5 mg/l MCPA, % 5 sakkaroz ve % 2 gellan gum içeren katı SK ortamlarına transfer edilen ovüller yaklaşık 6 hafta sonra kallus oluşturmuştur. Bu kalluslar sürgün oluşum ortamına transfer edildikten sonra bitkicikler geliştirmiştir. Sitolojik incelemelerde 16 bitkiden 2'sinin haploid, diğerlerinin diploid olduğu saptanmıştır.

Keller (1990a), *Allium* cinsine giren soğan (*Allium cepa* L. var. Stuttgarter Riesen, Carmen, Kartalski, Copra ile diğer bazı hatlar), pırasa (*A. porrum* L.), şalot (*A. phoenoprasum*) ile *A. altaicum* ve *A. fistulosum* gibi bazı türlerde ovül, ovaryum ve çiçek tomurcuğu kültürleri ile başarılı haploidi çalışmaları yapmıştır. Soğan türünde *in vitro* kültüre alınan ovüllerden, genotiplere göre % 0.08-0.58 arasında değişen oranlarda doğrudan embriyo gelişimi ile bitkicikler oluşmuştur. Ovaryum kültürlerinde ise sadece kallus gelişimi olduğunu bildiren araştırmacı, diğer *Allium* türlerinde yalnızca kallus gelişimini sağlayabilmiş, bitki elde edememiştir. Soğanda elde edilen bu bitkilerin tümünün haploid kromozoma sahip olduğunu ve morfolojik olarak da diploidlerden daha küçük olduğunu belirtmiştir.

Keller (1990b), androgenesise tepki vermeyen bir tür olan *Allium cepa* L.'de döllenmemiş ovaryum kültürü yaparak haploid bitki eldesinde başarılı olmuştur. Araştırmacı, geniş bir genotip spektrumunda yaptığı çalışmada elde ettiği 457 rejenerantın 164'ünde ploidi durumunu incelemiş ve % 62.2'sinin haploid, % 31.7'sinin diploid ve % 6.1'inde mixoploid olduğunu saptamıştır. Bu çalışmada *in vitro* kültürdeki gelişimin erken döneminde “dev çekirdek” oluşumu, kallus oluşumu ve vitrifikasyon görülmüş, düşük düzeydeki bu oluşumlarla birlikte dejenerasyonun olduğu belirlenmiştir.

Seman ve Fargo (1990), şeker pancarında haploid bitki elde etmek amacıyla ovül kültürü yapmışlardır. Anthesisten önce alınan çiçek tomurcuklarından izole ettikleri ovülleri kültüre alan araştırmacılar, 1–2 ay içerisinde ovüllerin ortalama % 2'sinden kalluslar, şekilsiz oluşumlar ve embriyolar meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bu yapıların rejenerasyonundan genotiplere bağlı olarak % 0 – 9.7 arasında değişen oranlarda (ortalama % 1.3 oranında) haploidler elde edilmiştir. Araştırmada, yöntemin başarısında donör bitkinin genotipi ve kültür ortamının yapısının çok etkili olduğu, donör bitkinin büyüme koşullarının, ovülün gelişme safhasının ve ovüller çıkarılmadan önce tomurcuklara uygulanan 4°C'lik ön uygulamanın etkisinin çok az olduğu ya da hiç etkilemediği belirlenmiştir. Aynı kültürdeki somatik dokulardan meydana gelen kalluslardan hiçbir rejenerasyon olmazken, ovüllerden elde edilen kalluslardan bitkilerin geliştiği görülmüştür.

De Wit ve ark. (1990) gerbera'da ovül kültürü yoluyla haploid bitki eldesi üzerine çalışmışlardır. 15 çeşide ait ovülleri 3 değişik protokole göre kültüre alan araştırmacılar, kullanılan protokole göre ortalama % 0–5 arasında değişen frekansta ve tüm çeşitlerde bitki rejenerasyonu sağlamışlardır. Bu rejenerasyonda mevsimin ve genotipin etkili olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, klasik kendileme yoluyla kendilenmiş hatların eldesinin mümkün olmadığı gerbera'da saf hatların üretimi için tek yolun haploidi tekniği olduğuna dikkat çekmişlerdir.

Honkanen ve ark. (1991)'nin gerbera'da yaptıkları çalışmada 15 hattın, çiçek açımının iki farklı safhasında toplanan çiçeklerinden ovaryumlar çıkarılmış, bunların içinden ovüller izole edilerek 3 farklı işleme göre *in vitro* kültüre alınmıştır. Araştırmacılar, kullanılan bütün hatlardan bitki elde edilmesine rağmen genotiplerin değişik kültürel işlemlere tepkilerinin farklı olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada çiçeklenme safhasının önemli olmadığı, ancak çiçek gelişimi için ışıklandırma şartlarının en uygun olduğu Haziran-Eylül döneminde en iyi sonucun elde edildiği belirtilerek mevsimin etkisi vurgulanmıştır. Araştırmacılar, elde edilen bitkilerin % 90'ının haploid, % 10'unun diploid olduğunu, bir ana bitkiden farklı renk ve şekillere sahip ve daha küçük çiçekli, yaprak morfolojileri değişik haploidler meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Özzambak (1992) pırasada ovaryum kültürü yaparak değişik besin ortamları (MS, Gamborg, Nitsch) ve iki farklı sakkaroz (% 6 ve % 12) ile stokinin (4 ve 8 mg/l 2IP) düzeyinin Carino ve Farinto çeşitlerinde haploid uyartımına etkilerini incelemiştir. Anthesisten 3-5 gün önce alınan çiçeklerden ovaryumların çıkarılarak birkaç yerinden yaralanıp kültüre alındığı araştırmada, en iyi gelişme Carino çeşidine ait ovaryumlarda saptanmıştır. Araştırmacı, ovaryumların en iyi gelişmeyi % 6 sakkaroz ve 4-8 mg/l 2IP eklenen MS ortamında göstermesine rağmen, ovaryumlardan meydana gelen bitkiciklerin, ovüllerden değil, ovaryum duvarından veya plasenta dokusundan kaynaklandığını ve diploid olduğunu bildirmiştir.

Gémesné ve Venczel (1996), kabakta döllenenmemiş ovaryumları 2-3 cm uzunluğa ulaştığında (çiçeklenmeden önce) toplayarak yüzey dezenfeksiyonundan sonra ovaryumların dış kabuklarını soyduktan sonra dilimleyip *in vitro* kültüre almışlardır. Eksplantlar başlangıçta TDZ ve % 4 sakkaroz ilave edilmiş (ZI) daha sonra da NAA ve BA'nın farklı kombinasyonları kullanılmış EI ortamına transfer edilmiştir. Yaklaşık 6 hafta sonra ovüllerden embriyoların oluştuğu ve her bir ovaryumdan yaklaşık 10–15 embriyo oluştuğu gözlenmiştir. Araştırma sonucunda elde edilen bitkiciklerin kromozom sayısı

ölçümlerinde, % 70'inin haploid, % 30'unun doubled haploid ve aneuploid olduğu saptanmıştır.

Metwally ve ark. (1998), kabak bitkisinin ovaryumlarını anthesisten 1 gün önce toplayarak 0, 2, 4 ve 8 gün süre ile 4°C sıcaklıkta tutmuşlardır. Araştırmacılar daha sonra ovülleri çıkararak 30 g/l sakkaroz, 8 g/l agar ve 2,4-D'nin 0.1, 1.0, 5.0 ve 10 mg/l'lik 4 farklı konsantrasyonunun eklendiği MS ortamında kültüre almış ve 25 ± 1°C sıcaklık ve 16 saatlik ışık periyodunda 4 hafta bekletmişlerdir. Bu süre sonunda ovüller büyüme düzenleyici madde içermeyen MS ortamına transfer edilmiştir. Kültüre alınan 100 ovülden elde edilen bitki sayısı dikkate alındığında en fazla bitkinin, soğuk uygulaması yapılmayan ovaryumlardan çıkarılan ve 1 veya 5 mg/l 2,4-D eklenen MS ortamında kültüre alınan ovüllerden elde edildiği bildirilmiştir.

Gémes ve ark. (2002), 5 partenokarpik hıyar ıslah hattı (7D4C, KS0C, D20F2A5, E10D14, Perez ML) (ana ebeveyn) ve bir hibrit çeşit (Perez F1) kullanarak ovaryum kültürü yapmışlardır. Araştırmacılar dönor bitkileri sera koşulları altında yetiştirilen bitkilerden döllenmemiş ovaryumları tam çiçeklenmeden 3 gün önce, 6 saat önce ve tam çiçeklenme döneminde toplayarak *in vitro* kültüre almışlardır. Araştırmada her genotipte 150 ovaryum test edilmiştir. Regenerasyon ortamına (CBM) 0.02 mg/l TDZ ve % 4 sakkaroz ilave edilmiş, kültürler karanlıkta 24°C, 28°C veya 35°C sıcaklıklarda inkübe 2 ile 10 gün süre ile kültüre alınmıştır. Ovaryumlar 0.05 mg/l NAA, 0.2 mg/l BA ve % 3 sakkaroz ilave edilen regenerasyon ortamına (CBM) transfer edildikten sonra 26°C'de, 16/8 saat (aydınlık/ karanlık) ışık rejimine tabi tutulmuştur. Araştırmacılar çalışma sonucunda en fazla embriyonun 35°C sıcaklık uygulamasında elde edildiğini, ovaryum başına elde edilen embriyo oranının en fazla % 18.4, bitki oranının ise % 7.1 olduğunu bildirmişlerdir.

Bal ve Abak (2003), 6 domates çeşidinde *in vitro* ovaryum kültürü yapmışlardır. Tek çekirdekli mikrosporlar içeren çiçek tomurcuklarını toplayarak, 0.3 M mannitol içeren NLN ortamında 1 hafta süreyle ön uygulama yaptıktan sonra ½ MS ortamına farklı büyüme düzenleyiciler ve diğer bazı kimyasallar ilave edilerek hazırlanan 4 farklı ortamda ovaryumları kültüre almışlardır. Daha sonra ovaryumlar 2 farklı ortamda alt kültüre alınmıştır. Kültür süresince ovaryum duvarları kahverengileşmesine rağmen mikroskopik incelemelerde ovüller içerisinde ölü embriyo kesesi hücreleri içeren yapılar yanında, içerisinde canlı hücre yığınları görülen globular yapıların da bulunduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOT

Araştırma, 2003 ve 2004 yıllarında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

Araştırmada, ülkemizde en fazla yetiştiriciliği yapılmakta olan açık yeşil renkli Sakız ve koyu yeşil renkli Zeybek F₁ yazlık kabak çeşitleri kullanılmıştır. Sakız çeşidi Altın Tohumculuk A.Ş'den, Zeybek F₁ çeşidi Bursa Tohumculuk A.Ş'den temin edilmiştir.

3.2. Metot

Araştırma iki aşamalı olarak yürütülmüştür.

- 1- Embriyo teşvik aşaması: Farklı gelişim aşamalarında alınan ovaryumlar, TDZ'nin farklı konsantrasyonlarını içeren embriyo teşvik ortamına dikilmiş ve karanlık koşullarda 7-14 gün tutularak bu süre içinde ovul gelişimleri ile kallus oluşumları incelenmiştir.
- 2- Rejenerasyon aşaması: Embriyo teşvik aşamasında ovul gelişimi gösteren ovaryumlar belirlenerek, BA ve NAA'nın farklı kombinasyonlarını içeren rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Çalışmanın ikinci yılında ise gelişme gösteren ovuller ovaryumlardan çıkarılarak rejenerasyon ortamına transfer edilmiştir.

3.2.1. In Situ Çalışmaları

Tohumlar serada, içerisinde 2:1 oranında torf ve perlit karışımı bulunan ve her bölmesi 5.5 cm³ hacme sahip 45'lik viyollere 30 Mart 2003 tarihinde her bölmeye 5'er tohum gelecek şekilde ekilmiştir. Ekimden 8-10 gün sonra tohumlar çimlenmeye başlamıştır. Bitkiler gelişmeye başladığında en iyi gelişen iki bitki bırakılıp diğerleri seyreltilmiştir. Fideler 6-7 gerçek yapraklı oldukları dönemde (25 Nisan 2003) araziye şaşırtılmıştır. Aynı işlemler 2004 yılında da tekrarlanmıştır.

Dikim mesafeleri sıra üzeri ve sıra arası 60x60 cm olarak düzenlenmiştir. Sulamada damla sulama sisteminden yararlanılmıştır. Şaşırtmadan yaklaşık 20 gün sonra yabancı ot kontrolü ve toprağı havalandırmak amacıyla ilk çapalama yapılmıştır. Şaşırtmadan 15 gün sonra ilk erkek çiçeklerin görülmesi ile birlikte bitki gelişimini teşvik amacıyla yapraktan gübreleme yapılmıştır.

Fidelerin dikimden yaklaşık 3 hafta sonra dişi çiçekler oluşmaya başlamıştır (Şekil 3.1). Bitkilerde görülen ilk dişi çiçekler kopartılarak uzaklaştırılmış, bunlardan 8-10 gün sonra oluşan dişi çiçekler deneme materyali olarak kullanılmıştır (Gémesné ve ark. 2002).



Şekil 3.1. Kabak fidelerinin genel görünümü.

Denemenin başlangıcında 5 farklı gelişim devresindeki ovaryumlar kullanılmıştır. Bunlar;

- 1- Anthesisten 2 gün önceki dönem
- 2- Anthesisten 1 gün önceki dönem
- 3- Anthesis dönemi
- 4- Anthesisten 1 gün sonraki dönem
- 5- Anthesisten 2 gün sonraki dönemler.

Ancak, başlangıçta yapılan denemelerde, anthesisten 2 gün önce ve anthesisten 2 gün sonraki gelişme dönemlerinde alınıp embriyo teşvik ortamına dikilen ovaryumlarda hiçbir gelişme gözlenmediğinden bu iki dönem araştırmadan çıkarılmıştır.

Anthesis dönemi ve anthesisten sonraki dönemlerde ovaryumlarda döllemenin önlenmesi için ile dişi çiçekler açmadan önce bir pens yardımı ile uç kısımlarından kapatılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Dişi çiçeklerin kapatılması

Sakız (Şekil 3.3) ve Zeybek F₁ (Şekil 3.4) çeşitlerine ait farklı gelişme dönemlerindeki döllenmemiş dişi çiçekler çiçek saplarından kesilerek toplanmış ve derhal laboratuvara getirilmiştir



Şekil 3.3. Sakız çeşidinde ait farklı gelişme dönemlerindeki döllenmesine izin verilmeden toplanan dişi çiçekler.



Şekil 3.4. Zeybek F₁ çeşidinde ait farklı gelişme dönemlerindeki döllenmesine izin verilmeden toplanan dişi çiçekler.

3.2.2. In Vitro Çalışmaları

3.2.2.1 Embriyo Teşvik Ortamlarının Hazırlanması

Çalışmada temel besin ortamı olarak ilk aşamada embriyo teşvik amacı ile daha önce kabakgil türlerinde yapılmış ovul- ovaryum kültürü çalışmalarında kullanılan ve olumlu sonuçlar verdiği belirtilen CBM besin ortamı (Gémesné ve ark., 2002) kullanılmıştır.

Embriyo teşvik ortamının (CBM) bileşimi Çizelge 3,1'de verilmiştir. Embriyo teşvik aşamasında CBM besin ortamına büyümeyi düzenleyicilerden TDZ'nin 0.01 mg/l, 0.1 mg/l ve 1 mg/l konsantrasyonları ilave edilerek denenmiştir. Hazırlanan besin ortamları pH

5.8'e ayarlandıktan sonra 121°C'ye ayarlanmış otoklavda, 1,5 atm basınç altında 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Denemenin ikinci yılında embriyo teşvik ortamında sadece 0.1 mg/l TDZ kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. *In vitro* embriyo teşvik aşamasında kullanılan CBM besin ortamının bileşimi

<u>Makro-Mikro Bileşikler</u>	<u>Konsantrasyon (mg/l)</u>
KNO ₃	950
NH ₄ NO ₃	450
CaCl ₂	160
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	75
KI	0.7
H ₃ BO ₃	4
MnSO ₄ .H ₂ O	20
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.016
CoCl ₂ .H ₂ O	0.016
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4
CaNO ₃ .4H ₂ O	25
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	25
(NH ₄) ₂ SO ₄	17.5
KCl	3.5
<u>Vitamin, amino asit ve diğer organik bileşikler (mg/l)</u>	
Inositol	80
Thiamine	1
Nikotinik-acit	1
Pyridoxine	2
Glycine	0.1
Ca-pantothenate	0.5
Biotin	0.05
Sakkaroz	% 4
Agar	% 0.8

3.2.2.2. Ovaryumların Dezenfeksiyonu

Döllenmesine izin verilmeden toplanarak laboratuvara getirilen dişi çiçeklerin ovaryumları, taç yapraklar ve dişi tepesi ayrıldıktan sonra % 70 lik etanol içerisinde 40 saniye bekletildikten sonra %1'lik sodyum hipoklorit içerisinde aktarılarak steril kabin içine alınmıştır. Sodyum hipoklorit içerisinde 20 dakika bekletilerek yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra dezenfektanın uzaklaştırılması amacı ile ovaryumlar 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir.

3.2.2.3. Ovaryumların Besin Ortamlarında Kültüre Alınması

Yüzey sterilizasyonu yapılmış olan ovaryumların dış yüzeyi steril kağıt havlu ile kurulandıktan sonra kabuk kısmı hafifçe soyulmuştur. Ovaryumlar boyuna olmak üzere 4-8 dilime ayrılarak önceden hazırlanmış CBM “embriyo teşvik ortamı”na dikilmişlerdir. Çalışmada anthesisten 1 gün önce ve anthesis dönemi alınan döllenmemiş ovaryumlar 4-8 dilime bölünürken; anthesisten 1 gün sonraki dönemde alınan ovaryumlar 8 dilime bölünmüşlerdir (Şekil 3.5).

İkinci yıl denemelerinde ovaryumlar boyuna dilimlere ya da enine disk şeklinde 4-8 parçaya kesilmiş ve hazırlanan dilimler içerisinde “Embriyo Teşvik Ortamı” olan 9 cm çapındaki petrilere dikilerek *in vitro* kültüre alınmıştır (Şekil 3.6).



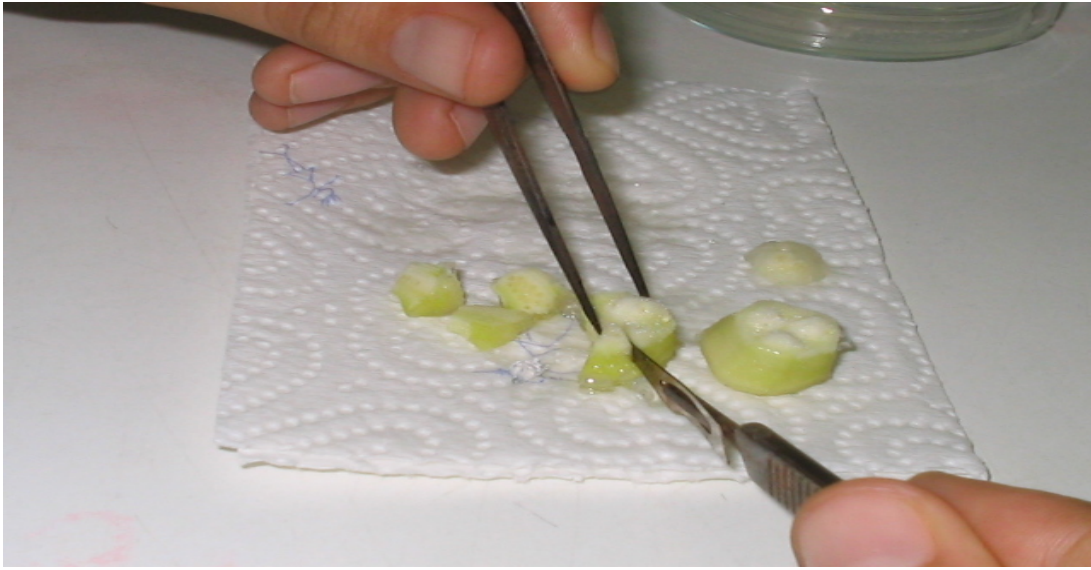
Şekil 3.5. Boyuna dilimlenerek embriyo teşvik ortamına dikilen eksplantlar.



Şekil 3.6. Enine disk şeklinde dilimlenerek embriyo teşvik ortamına dikilen eksplantlar.

3.2.2.4. Embriyo Teşvik Aşamasında Kültür Koşulları

İçerisinde ovaryum dilimleri bulunan petripler etüve yerleştirilerek 35°C’de karanlık koşullarda bekletilmiştir. Ovuller şişmeye başladıktan 7-14 gün sonra petripler etüvden çıkarılmıştır. Embriyo teşvik ortamında ovul gelişimi gösteren disk ve dilim şeklinde parçalara ayrılmış ovaryumlar embriyo teşvik ortamından alınarak farklı oksin ve sitokin kombinasyonları içeren rejenerasyon ortamlarına transfer edilmişlerdir. İkinci yıl denemelerinde transfer aşamasında ovaryum dilimleri yerine ovaryumlarda gelişme gösteren ovuller oyularak çıkarılmış ve rejenerasyon ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.7.a, b,c).



Şekil 3.7.a. Disk şeklinde dilimlenmiş ovaryumlardan gelişme gösteren ovullerin çıkarılması (I. aşama).



Şekil 3.7.b. Disk şeklinde dilimlenmiş ovaryumlardan gelişme gösteren ovullerin çıkarılması (II. aşama).



Şekil 3.7.c. Dilim şeklindeki ovaryumlardan gelişen ovullerin çıkarılması.

3.2.2.5. Rejenerasyon Ortamının Hazırlanması

Rejenerasyon ortamı olarak yine CBM “rejenerasyon ortamı” kullanılmıştır (Gémesné ve ark., 2002). Bu besin ortamına ilave edilen vitamin ve organik bileşikler Çizelge 3.2’de sunulmuştur. Rejenerasyonu teşvik amacıyla besin ortamına BA’nın 0.1 mg/l, 0.5 mg/l ve 1 mg/l konsantrasyonları ile NAA’nın 0.01 mg/l, 0.05 mg/l, 0.1 mg/l ve 0.5 mg/l konsantrasyonları kombine edilerek ilave edilmiştir.

Çizelge 3.2. *In vitro* rejenerasyon aşamasında kullanılan CBM besin ortamı bileşimi

<u>Vitamin, amino asit ve diğer organik bileşikler(mg/l)</u>	
Inositol	100
Thiamine	1.5
Nikotinik-acit	1.5
Pyridoxine	3
Glycine	0.2
Ca-pantothenate	1
Biotin	1
Ascorbik acid	20
L- proline	100
Sakkaroz	% 3
Agar	% 0.8

3.2.2.6. Rejenerasyon Aşamasında Kültür Koşulları

Üzerinde ovul gelişimi başladıktan yaklaşık 1 hafta sonra rejenerasyon ortamına transfer edilen ovaryum dilimleri veya ovuller 1600 lüks'e ayarlanan 16/8 saat aydınlık/karanlık ışık rejiminde ve 26 °C sıcaklıkta 30 gün süre ile tutulmuştur.

3.3. Araştırma Süresince Yapılan Ölçüm, Sayım ve Gözlemler

Denemeler 3 yinelemeli ve her yinelemede 4 petri olacak şekilde bölünmüş parseller deneme desenine göre düzenlenmiştir. Her petriye 1 ovaryum (4-8 dilim) yerleştirilmiştir.

Embriyo teşvik ortamlarında ovul gelişimi gösteren ovaryumlar ve kallus oluşumu gösteren ovaryumlar sayılmıştır.

İkinci yıl embriyo teşvik aşamasında ise kallus geliştiren ovaryumlar, ovul gelişim gösteren ovaryumlar ve her ovaryumda gelişen ovuller sayılmıştır.

Rejenerasyon ortamında ovaryum-ovul tepkileri gözlenmiştir. Rejenerasyon ortamına transfer edilen ovaryumlarda 30 gün boyunca birinci yıl ovul gelişmesini sürdüren ovaryumlar ile kallus oluşturan ovaryumlar sayılmıştır. İkinci yıl ise rejenerasyon ortamına sadece ovuller transfer edildiği için bu ovullerde ovul şişkinleşmesini sürdürenler ile kallus oluşturanlar sayılmıştır. Elde edilen verilerin ortalama değerleri çizelgelerde sunulmuştur. Gereken yerlerde grafikler verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

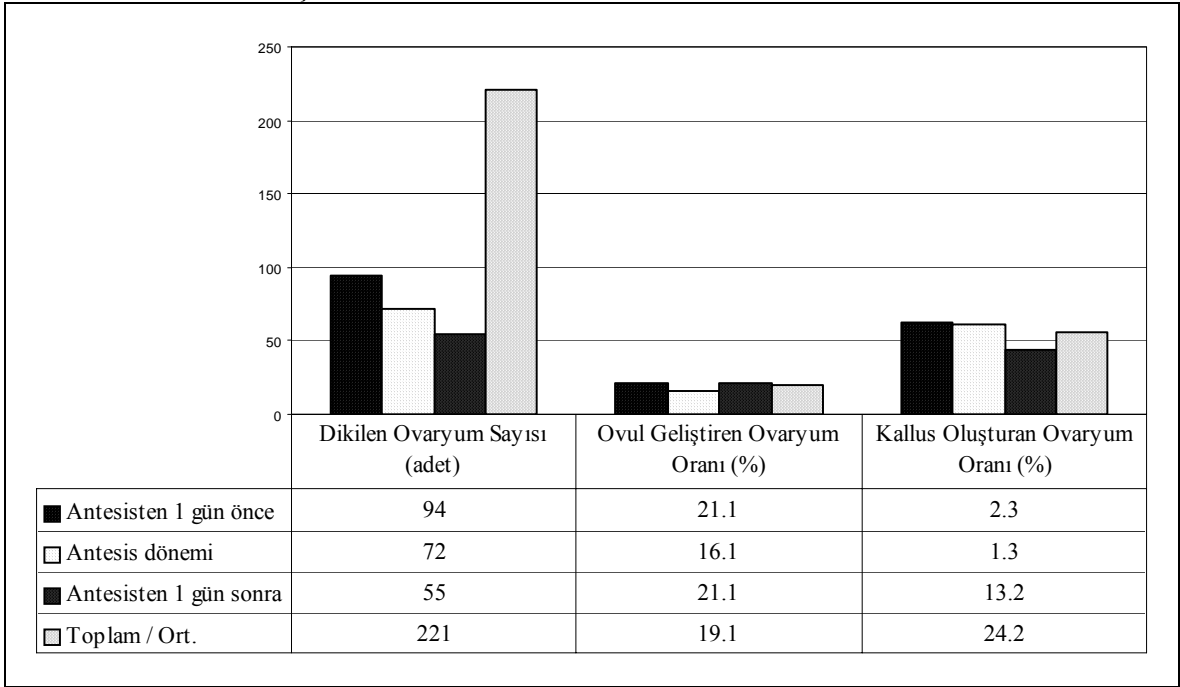
4.1. 2003 Yılı Embriyo Teşvik Bulguları

Araştırmanın başlangıcında 5 farklı gelişme döneminde alınan ovaryumlar kullanılmış olmasına karşın anthesisten 2 gün önce ve anthesisten 2 gün sonra kültüre alınan döllenmemiş ovaryumlarda herhangi bir gelişme gözlenmediğinden bu dönemdeki ovaryumlar daha sonraki denemeden çıkarılmıştır.

4.1.1. Sakız Çeşidinde Embriyo Teşvik Bulguları

Sakız çeşidinde 3 farklı dönemde alınan döllenmemiş ovaryumların *in vitro* kültürdeki gelişmeleri ile ilgili bulgular besin ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki TDZ dikkate alınmaksızın Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sakız çeşidinde farklı dönemlerde alınan ovaryumların ovul geliştirme veya kallus oluşturma durumu



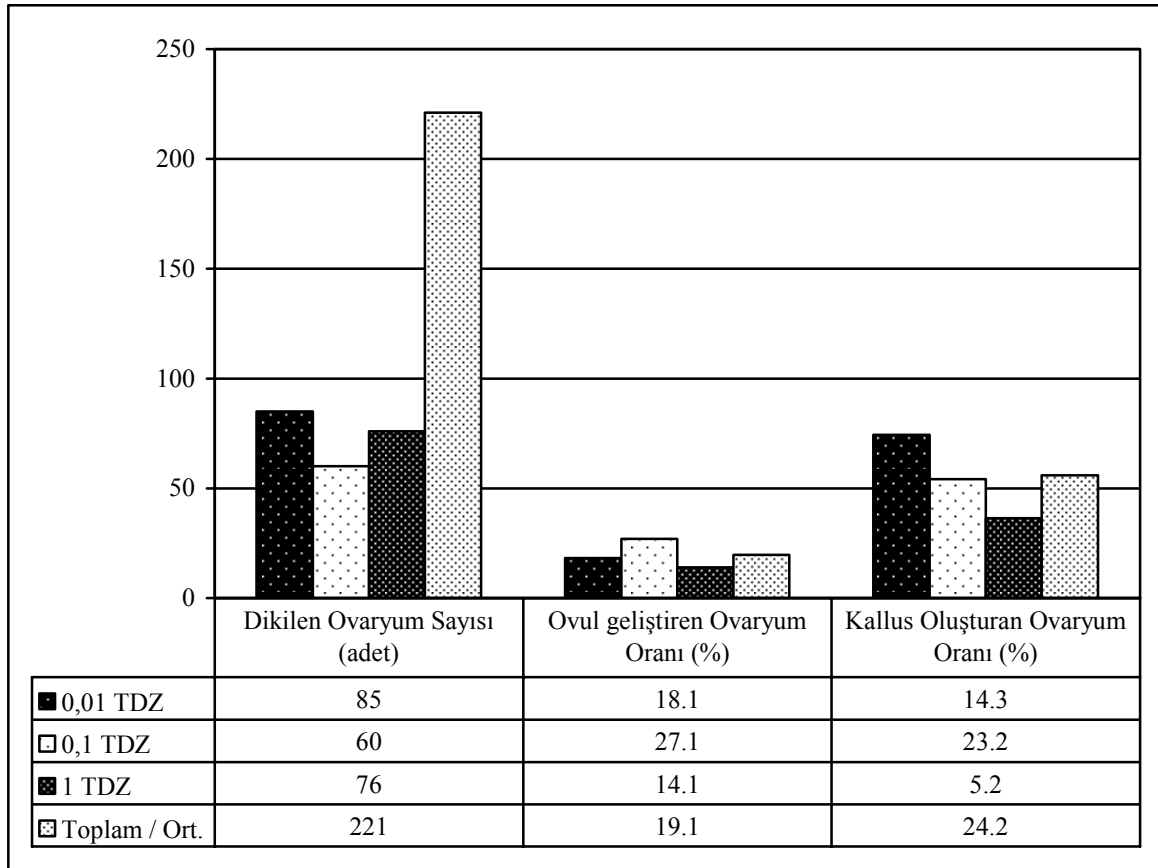
Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi toplam 221 adet ovaryum kültüre alınmış olup bunların ortalama % 19.7'sinde ovul gelişimi ve % 55.9'unda kallus oluşumu gözlenmiştir. Antesisten 1 gün önce kültüre alınan ovaryumlarda ovul gelişimi gösterenlerin oranı % 21.3, antesis döneminde alınanlarda bu oran % 16.2 ve antesisten 1 gün sonra alınanlarda % 21.8 olarak belirlenmiştir.

Kallus oluşturan ovaryumların oranları ise antesisten 1 gün önce alınanlarda % 62.5 ve antesis döneminde % 61.1 olurken antesisten 1 gün sonra kültüre alınanlarda bu oran % 44.1 ile oldukça düşük düzeyde bulunmuştur. En fazla ovul gelişimi yaklaşık % 21 ile anthesisten 1 gün sonra ve 1 gün önceki dönemde kültüre alınan ovaryumlarda gözlenirken, en az ovul gelişimi % 16.2 ile antesis döneminde alınan ovaryumlarda

gözlenmiştir. En fazla kallus oluşumu % 62.5 antesisten 1 gün önce, en az kallus oluşumu ise % 44.1 ile antesisten 1 gün sonra kültüre alınan ovaryumlarda meydana gelmiştir.

Sakız çeşidine ait ovaryumların farklı TDZ konsantrasyonları ilave edilmiş embriyo teşvik ortamlarında ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumları ile ilgili bulgular gelişim dönemleri dikkate alınmaksızın Çizelge 4.2’de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi 0.01 mg/l TDZ ilave edilen besin ortamında ovul geliştiren ovaryumların oranı ortalama % 18.2, 0.1 mg/l TDZ’de % 27, buna karşın 1 mg/l TDZ’de ise % 14 olarak gerçekleşmiştir.

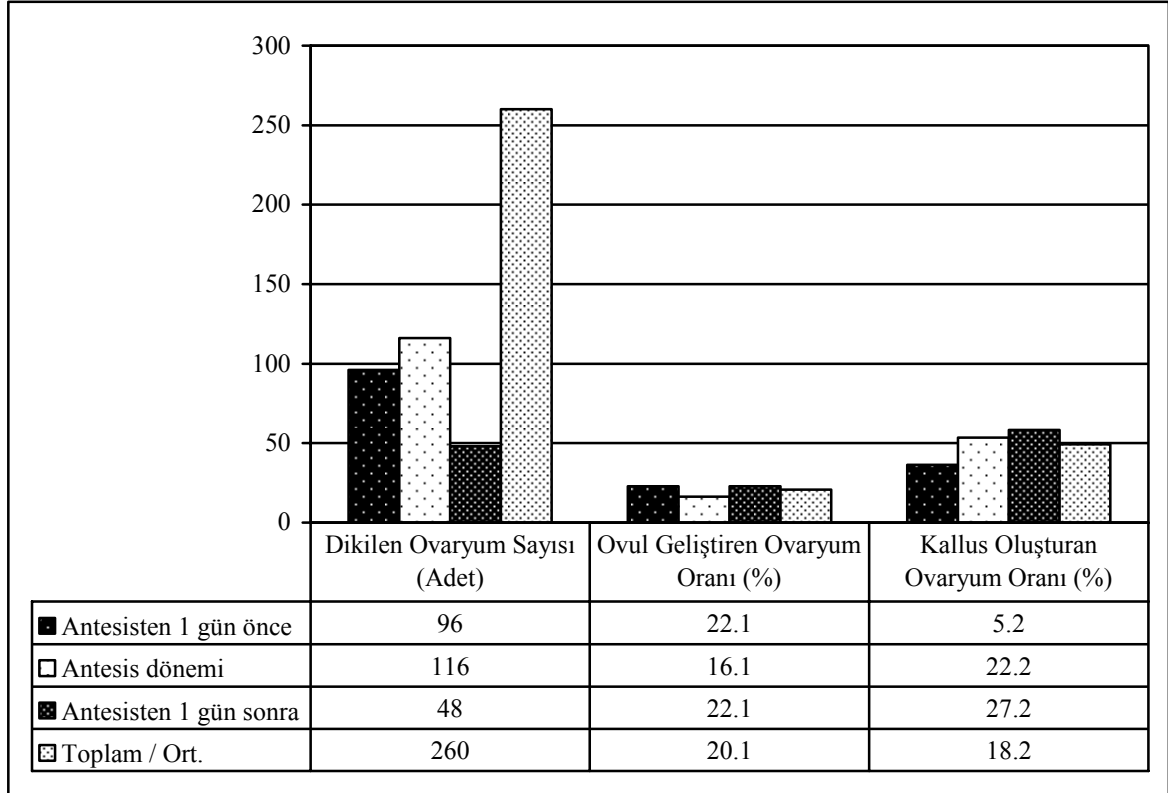
Çizelge 4.2. Farklı TDZ konsantrasyonlarının ilave edilen embriyo teşvik ortamlarında da kültüre alınan Sakız çeşidinde ovul geliştirme veya kallus oluşturma durumu.



Kallus oluşumu gözlenen ovaryumların oranı TDZ konsantrasyonlarının yükselişiyle ters orantılı olarak sırası ile; % 74.3, % 54.2 ve % 36.4 olmuştur. Ovul gelişimi gösteren ovaryumların oranı en fazla % 27 ile 0.1 mg/l TDZ içeren embriyo teşvik ortamında olurken, en az % 14 ile 1 mg/l TDZ içeren embriyo teşvik ortamında saptanmıştır. En fazla kallus oluşumu 0.01 mg/l TDZ içeren ortamlara dikilen ovaryumlarda, en az 1 mg/l TDZ içeren ortamlara dikilen ovaryumlarda gerçekleşmiştir.

4.1. 2. Zeybek F₁ Çeşidinde Embriyo Teşvik Bulguları

Zeybek F₁ çeşidinde 3 farklı dönemde alınan döllenmemiş ovaryumların *in vitro* kültürdeki gelişmeleri ile ilgili bulgular besin ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki TDZ dikkate alınmaksızın Çizelge 4.3’ de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Zeybek F₁ çeşidinde farklı dönemlerde alınan ovaryumların ovul geliştirme veya kallus oluşturma durumu

Çizelge 4.3' de görüldüğü gibi Zeybek F₁ çeşidinde toplam 260 adet ovaryum embriyo teşvik ortamı üzerinde kültüre alınmış, bunların ortalama % 20.7'sinde ovul gelişimleri gözlenirken % 49.3'ünde sadece kallus oluşumu saptanmıştır.

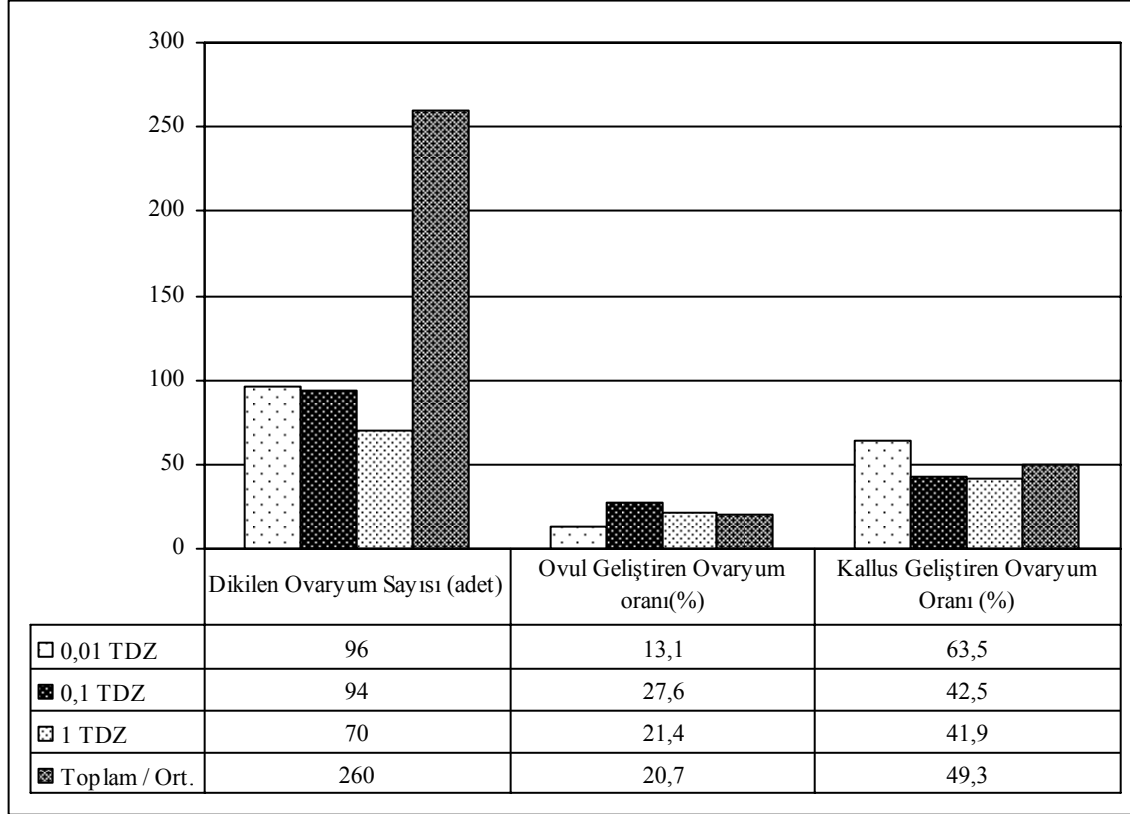
Embriyo teşvik ortamına dikilen ovaryumlardan antesisden 1 gün önce ve antesisden 1 gün sonra alınanlarda ovul gelişimi gösterenlerin oranları % 22.9 ile birbirine eşit olurken, antesis döneminde alınanlarda bu oran % 16.3 ile daha düşük düzeyde kalmıştır. Kallus oluşturan ovaryumların oranları ise gelişme dönemleri sırasına göre % 36.4, % 53.4 ve % 58.3 olarak belirlenmiştir. Kallus oluşumu en fazla antesisden 1 gün sonra alınan ovaryumlarda, en az da antesisden 1 gün önce alınanlarda gerçekleşmiştir.

Zeybek F₁ çeşidine ait ovaryumların farklı TDZ konsantrasyonları ilave edilmiş embriyo teşvik ortamlarında ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumları ile ilgili bulgular gelişim dönemleri dikkate alınmaksızın Çizelge 4.4' de verilmiştir.

Çizelgede de görüldüğü gibi, kültüre alınan ovaryumlardan 0.01 mg/l TDZ' li ortamlarda % 13.1' ü, 0.1 mg/l TDZ' li ortamlarda % 27.6' sı ve 1 TDZ' li ortamlarda % 21.4' ü ovul gelişimi göstermiştir. Kallus oluşumu görülen ovaryumların oranı TDZ konsantrasyonlarının yükselişle ters orantılı olarak azalmış ve sırası ile % 63.5, % 42.5 ve % 41.9 olarak saptanmıştır. Ovul gelişimi gösteren ovaryumların oranı en fazla ovul gelişimi % 27.6 ile 0.1 mg/l TDZ içeren embriyo teşvik ortamında olurken, en az % 13.1 ile 0.01 mg/l TDZ içeren embriyo teşvik ortamında saptanmıştır.

En fazla kallus oluşumu 0.01 mg/l TDZ içeren ortamlara dikilen ovaryumlarda görülürken, en az kallus oluşumu 1 mg/l TDZ içeren besin ortamlarına dikilen ovaryumlarda belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı TDZ konsantrasyonları ilave edilen embriyo teşvik ortamlarında kültüre alınan Zeybek F₁ çeşidinde ovul geliştirme veya kallus oluşturma durumu.



Denemede kullanılan çeşitler, kültüre alınan ovaryumların gelişim dönemleri ve embriyo teşvik ortamına ilave edilen farklı TDZ konsantrasyonları birlikte değerlendirilerek, ovaryumların ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumları ile ilgili bulgular Çizelge 4.5' de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre ovul geliştiren ovaryumların oranı en yüksek % 32.7 ile Sakız çeşidinin anthesisten 1 gün sonraki döneminde alınarak, CBM + 0.01 mg/l TDZ içeren besin ortamında *in vitro* kültürü yapılan ovaryumlarda gerçekleşmiştir. En düşük ovul gelişimi % 7.6 ile yine Sakız çeşidinde anthesisten 1 gün sonra alınan ve CBM + 1 mg/l TDZ içeren besin ortamına dikilen ovaryumlarda saptanmıştır.

Zeybek F₁ çeşidinde ovul geliştiren ovaryumların oranı en yüksek % 31.7 ile anthesisten 1 gün önce alınan ve CBM + 0.1 mg/l TDZ içeren besin ortamında gözlenirken, en düşük % 12.3 ile anthesis döneminde ve anthesisten 1 gün sonra alınarak CBM + 0.01 mg/l TDZ içeren besin ortamına dikilen ovaryumlarda gerçekleşmiştir.

Ancak her iki çeşitte de genel olarak 0.1 mg/l TDZ ilave edilen embriyo teşvik ortamlarında ovul geliştiren ovaryumların oranları öteki TDZ konsantrasyonlarına göre oldukça yüksek (yaklaşık % 27) bulunmuştur.

En fazla kallus oluşumu % 85.7 ile Sakız çeşidinde antesis döneminde alınarak CBM + 0.01 mg/l TDZ içeren besin ortamına dikilen ovaryumlarda meydana gelirken, en düşük % 19.1 ile yine Sakız çeşidinde antesis döneminde alınan ve CBM + 1 mg/l TDZ içeren besin ortamına dikilenlerde meydana gelmiştir.

Çizelge 4.5. Sakız ve Zeybek F1 çeşidinde farklı gelişim dönemlerinde kültüre alınan ovaryumların farklı TDZ konsantrasyonları içeren CBM ortamı üzerinde ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumu.

Besin Ortamı	Ovaryum Dönemleri	Dikilen Ovaryum Sayısı (adet)		Ovul Geliştiren Ovaryum Oranı (%)		Kallus Oluşturan Ovaryum Oranı (%)	
		Sakız	Zeybek F1	Sakız	Zeybek F1	Sakız	Zeybek F1
CBM+0.01 mg/l TDZ	Antesisten 1 gün önce	40	39	11.3	14.7	65.5	37.3
	Antesis dönemi	28	35	10,6	12.3	85.7	74
	Antesisten 1 gün sonra	17	22	32.7	12.3	71.7	79.2
	Toplam/ Ort.	85	96	18.2	13.1	74.3	63.5
CBM+0.1mg/l TDZ	Antesisten 1 gün önce	21	36	29.6	31.7	61	41.3
	Antesis dönemi	20	47	26,6	20.5	60.1	58.6
	Antesisten 1 gün sonra	19	12	24.8	30.6	41.5	27.6
	Toplam/ Ort.	60	94	27	27.6	54.2	42.5
CBM+1 mg/l TDZ	Antesisten 1 Gün Önce	33	21	23	22.3	61.9	30
	Antesis Dönemi	24	34	11.4	16.1	37.5	27.6
	Antesisten 1 Gün Sonra	19	15	7.6	25.8	19.1	68.1
	Toplam/ Ort.	76	70	14	21.4	36.4	41.9

4. 2. 2003 Yılı Rejenerasyon Bulguları

Embriyo teşvik aşamasında kültüre alınan ovaryumlardan doğrudan haploid elde etmek amacı ile, kallus oluşturan eksplantlar rejenerasyon ortamına transfer edilmezken,

ovul gelişimi gösteren Sakız ve Zeybek F₁ çeşidine ait ovaryumlar yaklaşık 7–14 gün (Şekil 4.1) sonra farklı oksin ve sitokinin kombinasyonları içeren rejenerasyon ortamlarına transfer edilmişlerdir.



Şekil 4.1. Rejenerasyon ortamına transfer aşamasındaki ovaryumların görünümü

Rejenerasyon ortamına transfer edilen ovaryumların bazılarında ovul gelişimi ve şişkinleşmesi devam ederken (Şekil 4.2) bazı ovaryumlar besin ortamına temas eden kısımlardan başlamak üzere kallus oluşmaya başlamıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Rejenerasyon ortamında gelişmesine devam eden ovullerin görünümü.



Şekil 4.3. Rejenerasyon ortamında ovaryumlarda kallus oluşumunun görünümü.

Rejenerasyon ortamına dikilen ovaryumlar ve bu ovaryumların gelişme durumu Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Sakız çeşidinde; embriyo teşvik ortamında ovul gelişimi gösteren toplam 29 adet ovaryum rejenerasyon ortamına transfer edilmiş, bunlardan sadece 7 tanesinde ovul gelişimi ve şişkinleşmesi devam etmiştir. Yüksek BA ve NAA konsantrasyonları içeren besin ortamlarına (1 mg/l BA+1 mg/l NAA ve 0,1 mg/l BA+1 mg/l NAA) transfer edilen ovaryumların hepsinde ovul gelişimlerinin sürdüğü izlenmiştir. Kullanılan diğer rejenerasyon ortamlarında ise ya kallus gelişimi olmuş ya da ovaryumlardaki ovul gelişimi durarak daha sonra kahverengileşip canlılığını yitirmiştir.

Zeybek F₁ çeşidinde, embriyo teşvik ortamında ovul gelişimi gösteren toplam 53 ovaryum rejenerasyon ortamına transfer edilmiştir. Bunlardan sadece 9 tane ovaryum üzerinde ovuller gelişmeye ve şişkinleşmeye devam etmiştir. Zeybek F₁ çeşidinde ovaryumların ovul gelişimlerini sürdürmesinde NAA'nın BA' ya göre daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bu çeşitte NAA' nın daha yüksek konsantrasyonlarının BA' nın azalan konsantrasyonları ile birlikte hem ovul gelişimlerinin sürdürülmesinde hem de kallus oluşumunda rol oynadığı saptanmıştır.

BA ve NAA'nın en düşük konsantrasyonlarının kombinasyonu olan 0.5 mg/l BA + 0.05 mg/l NAA içeren rejenerasyon ortamına transfer edilen her iki çeşide ait ovaryumlar hiçbir gelişme göstermemiştir. Buna karşın büyümeyi düzenleyicilerin ilave edilmediği ortamlara dikilen kontrollerde her iki çeşitte de bazı ovaryumlar ovul gelişimini sürdürürken bazılarında da kallus oluşumu saptanmıştır.

Rejenerasyon ortamında 4 hafta süren gözlemler sonucunda, kullanılan tüm ortamlar da her iki çeşitte de ovullerden bitkicik gelişimi gözlenmemiştir. Ancak ovul gelişmesini

sürdüren ovaryum sayıları dikkate alındığında 0.1 mg/l BA+1 mg/l NAA kombinasyonunu içeren ortamın her iki çeşitte de rejenerasyon için daha iyi olabileceği görülmüştür.

Çizelge 4.6. Sakız çeşidi ve Zeybek F1 çeşidine ait ovaryumların rejenerasyon ortamındaki gelişimleri

Rejenerasyon ortamının sitokinin+oksin kombinasyonu	Dikilen Ovaryum Sayısı (adet)		Ovul Gelişmesini Sürdüren Ovaryum Sayısı (adet)		Kallus Oluşturan Ovaryum Sayısı (adet)	
	Sakız	Zeybek F1	Sakız	Zeybek F1	Sakız	Zeybek F1
1 BA + 1 NAA	2	4	2	1	-	3
1 BA + 0.5 NAA	2	4	1	-	1	-
1 BA + 0.1 NAA	2	4	-	-	-	-
1 BA + 0.05 NAA	2	4	-	-	-	-
Toplam	8	16	3	1	1	3
0,1 BA + 1 NAA	2	4	2	2	-	2
0.1 BA + 0.5 NAA	2	4	-	1	-	3
0.1 BA + 0.1 NAA	2	4	-	-	2	-
0.1 BA + 0.05 NAA	2	4	-	-	2	-
Toplam	8	16	2	3	4	5
0.5 BA + 1 NAA	2	4	-	1	-	3
0.5 BA + 0.5 NAA	2	4	-	1	-	3
0.5 BA + 0.1 NAA	2	4	-	1	2	3
0.5 BA + 0.05 NAA	2	4	-	-	-	-
Toplam	8	16	-	3	2	9
KONTROL	5	5	2	2	2	3
TOPLAM	29	53	7	9	9	20

4.3. 2004 Yılı Embriyo Teşvik Bulguları

İkinci yıl tekrarlanan denemede birinci yıl bulguları dikkate alınarak CBM ortamına sadece 0.1mg/l TDZ ilave edilerek embriyo teşvik ortamı olarak kullanılmıştır. Ayrıca ilk

yıldan farklı olarak ovaryumların embriyo teşvik ortamına dikimi sırasında dilimlenme şeklinin etkisi araştırılmıştır.

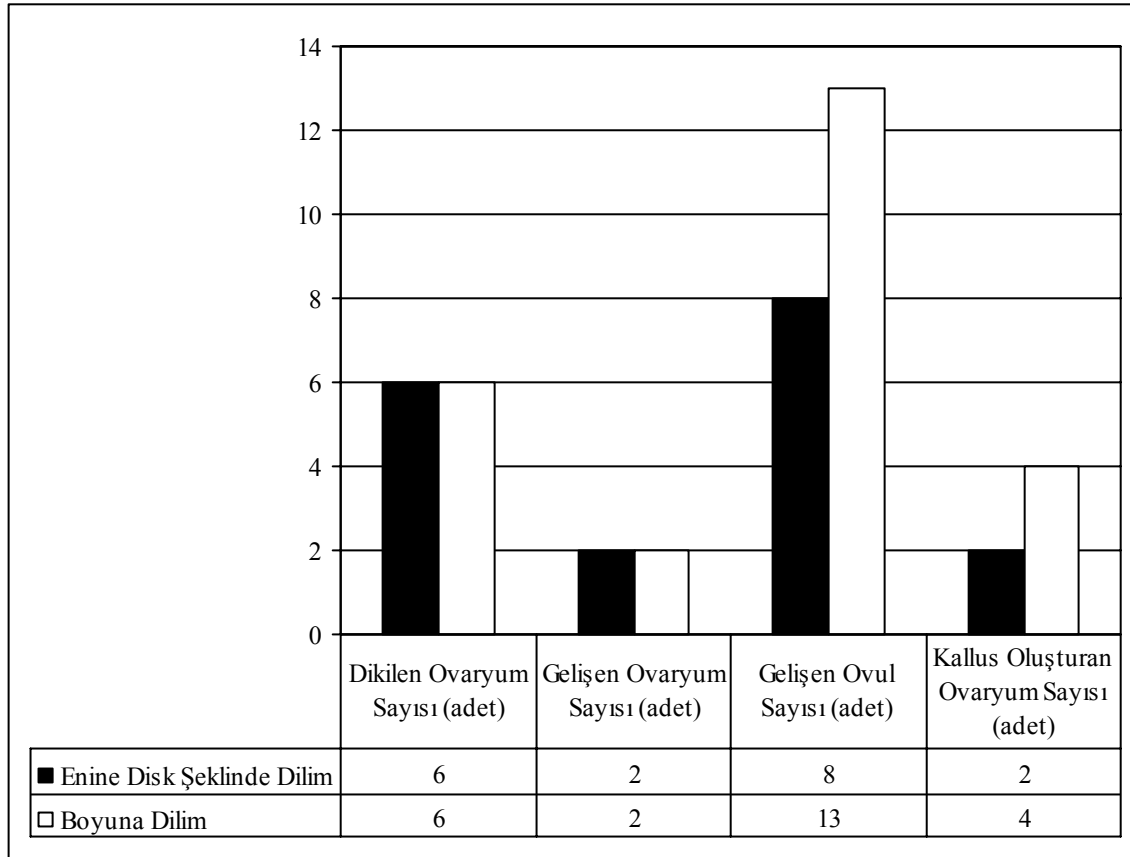
4.3.1. Sakız Çeşidinde Embriyo Teşvik Bulguları

Sakız çeşidinde farklı gelişim dönemlerinde alınan ovaryumlar enine disk şeklinde veya boyuna dilimlenerek embriyo teşvik ortamına dikilmişlerdir.

Antesisten 1 gün önce alınan ovaryumların dilim şekline bağlı olarak ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumları ile ilgili bulgular Çizelge 4.7’ de verilmiştir.

Çizelgeden de görüldüğü gibi her iki dilim şekli için 6’şar adet ovaryum kullanılmış ve bunlardan 2’sinde (yaklaşık % 33.3’ ü) ovul gelişimleri saptanırken 2’ sinde kallus meydana gelmiştir. Ancak enine dilim şeklinde 2 ovaryumdan 8 ovul elde edilirken, boyuna dilim şeklinde 2 ovaryumdan 13 ovul elde edilmiştir.

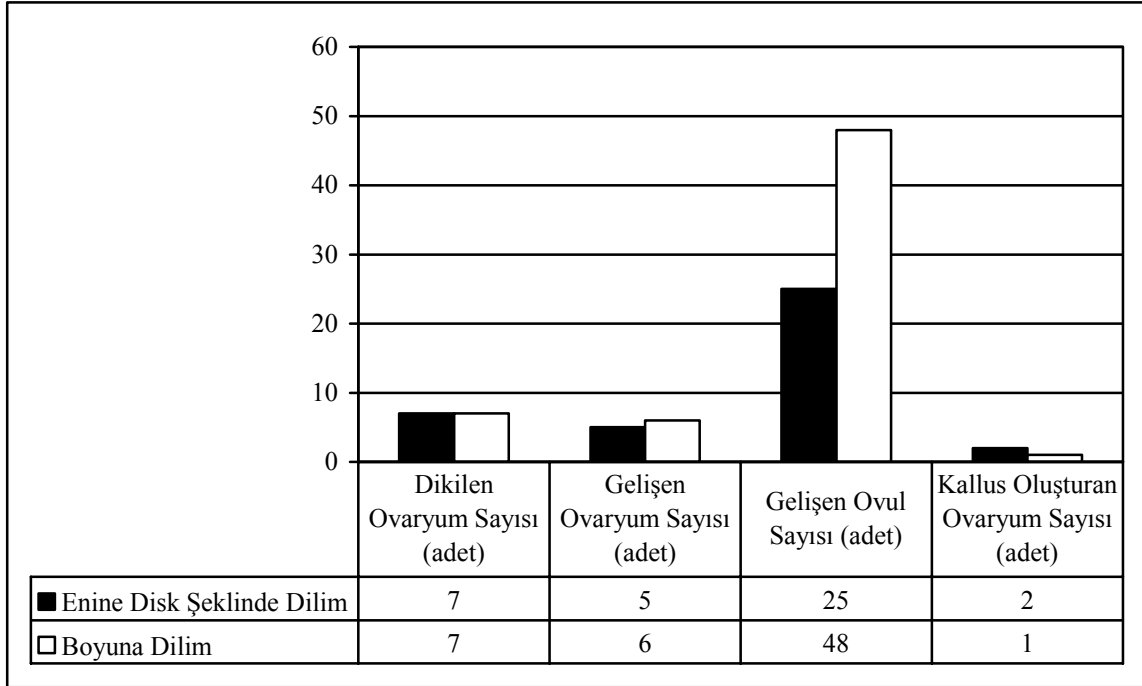
Çizelge 4.7. Sakız çeşidinde antesisten 1 gün önce alınan ovaryumların farklı dilimleme şekline göre ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumu



Antesis döneminde alınan ovaryumların dilim şekline bağlı olarak gelişimleri Çizelge 4.8’ de gösterilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi her iki dilim şekli için 7’ şer adet ovaryum kullanılmıştır. Enine disk şeklinde ki ovaryumlardan 5’ inde (% 20) gelişme görülürken, boyuna dilim şeklindekilerin 6’sında (% 12.5) gelişme görülmüştür. Ovaryumlarda gelişen ovul sayısı dilim şekline bağlı olarak farklılık göstermiştir. Enine disk şeklinde kesilerek

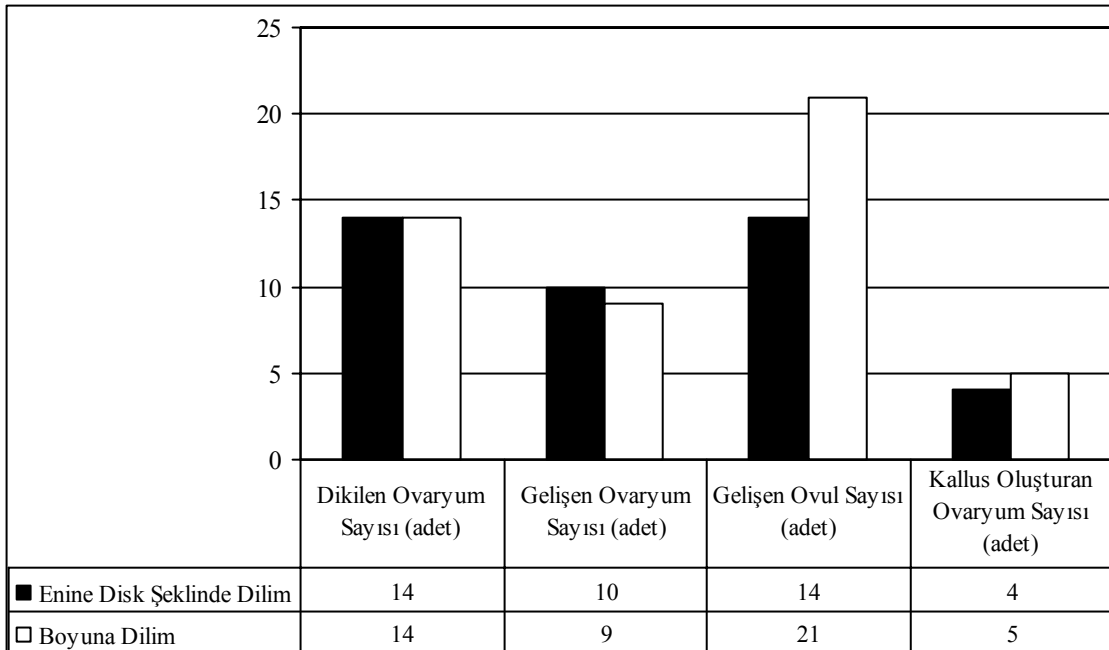
hazırlanan 5 ovaryumda gelişen ovul sayısı 25 adet olurken, boyuna dilim şeklindeki 6 ovaryumda 48 adet ovul gelişimi ile daha yüksek oranlara ulaşmıştır.

Çizelge 4.8. Sakız çeşidinde antesis döneminde alınan ovaryumların farklı dilimleme şekline göre ovul ve kallus oluşturma durumu.



Antesis döneminden 1 gün sonra alınan döllenmemiş ovaryumların dilim şekline bağlı olarak gelişimleri Çizelge 4.9’ da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Sakız çeşidinde antesis döneminden 1 gün sonra alınan ovaryumların farklı dilimleme şekline göre ovul ve kallus oluşturma durumu.



Çizelgede görüldüğü gibi her iki dilim şekli için 14' er adet ovaryum kullanılmıştır. Enine disk şeklinde kesilerek parçalara ayrılan ovaryumlarda 10'u (% 71.4), boyuna dilim şeklinde kesilenlerin 9' u (% 42.8) gelişmiştir.

Ovaryumlarda gelişen ovul sayısı dilim şekline bağlı olarak farklılık göstermiştir. Enine disk şeklinde hazırlanan eksplantlarda gelişen ovul sayısı 14 ovul/10 ovaryum olurken, dilim şeklinde 21 ovul/9 ovaryum ile daha yüksek oranlara ulaşmıştır (Çizelge 4.9).

Sakız çeşidinde 3 farklı dönemde alınan ovaryumların farklı dilim şekillerine göre embriyo teşvik ortamlarındaki ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Sakız çeşidinde toplam disk ve dilim şeklinde ki ovaryumlarda ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumları.

DŞ	Ovaryum dönemleri	Dikilen ovaryum sayısı (adet)	Gelişen Ovaryum Sayısı (adet)	Gelişen ovaryumların oranı (%)	Gelişen Ovul Sayısı (adet)	Ovaryum Başına Gelişen Ort. Ovul Sayısı	Kallus Oluşturan Ovul Sayısı (adet)
ED	Antesisten 1 gün önce	6	2	33.3	8	4.0	2
	Antesis	7	5	71.4	25	5.0	4
	Antesisten 1 gün sonra	14	10	71.4	14	1.4	4
	Toplam	27	17	62.9	47	3.5	10
BD	Antesisten 1 gün önce	6	2	33.3	13	6.5	4
	Antesis	7	6	85.7	48	8.0	1
	Antesisten 1 gün sonra	14	9	64.2	21	2.3	5
	Toplam	27	17	62.9	82	5.6	10

DŞ: Dilim şeklinde ovaryum ED: Enine disk şeklinde ovaryum BD: Boyuna dilim şeklinde ovaryum

Çizelgeden de görüldüğü gibi her iki dilim şeklinde de embriyo teşvik ortamlarına 27'şer adet ovaryum dikilmiş ve bunların 17'sinde gelişme gözlenmiştir. Embriyo teşvik ortamlarına dikilen ovaryumlardan en fazla ovaryum gelişim oranı % 85.7 ile antesis döneminde alınan ve boyuna dilimlenerek hazırlanan eksplantlarda elde edilmiştir. En düşük ovaryum gelişim oranı her iki dilim şeklinde de % 33.3 ile antesisten 1 gün önce alınan ovaryumlarda saptanmıştır.

Gelişen ovul sayısı dilim şekline bağlı olarak değişmiştir. Enine disk şeklinde hazırlanan eksplantlarda toplam 47 adet ovul gelişirken, boyuna dilim şeklinde hazırlananlarda 82 adet ovul gelişmiştir.

Gelişen ovul sayısı bakımından anthesis döneminde alınıp boyuna dilimlenerek dikilen eksplantlar 48 adet ovul gelişimi göstererek en olumlu sonucu vermiştir. Antesis döneminde alınıp enine disk şeklinde kesilerek dikilen eksplantlar 25 adet ovul geliştirerek ikinci sırada yer almıştır. En az sayıda (8 adet) ovul gelişimi antesisten 1 gün önce alınarak enine disk şeklinde kesilen eksplantlarda belirlenmiştir.

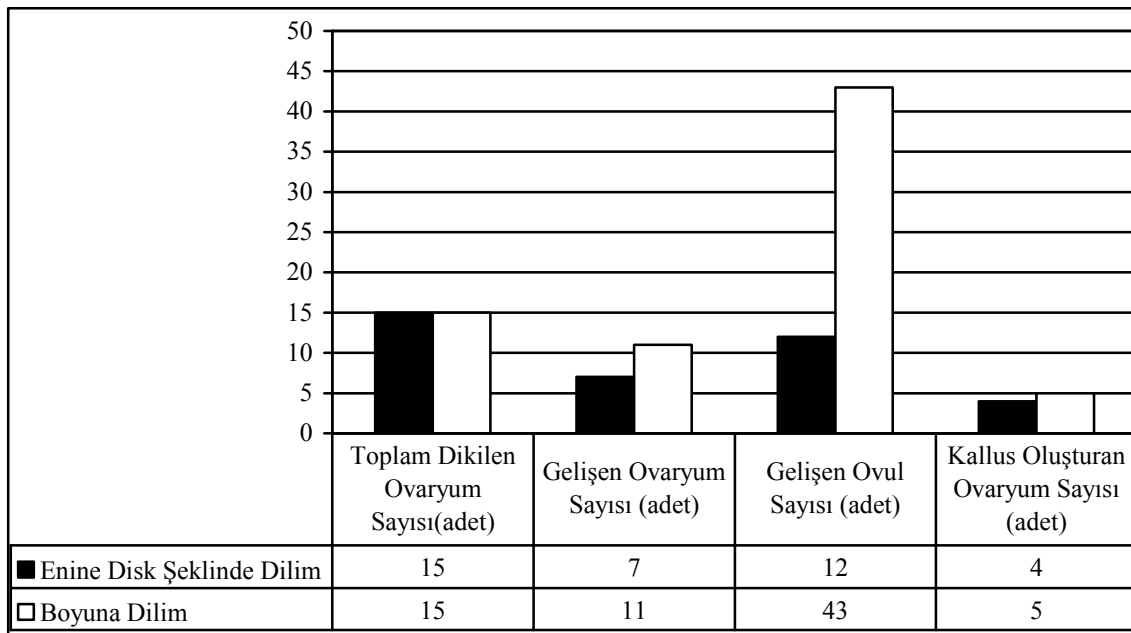
Ovaryum başına gelişen ortalama ovul sayıları dikkate alındığında en yüksek ovul sayısı ortalama 8.0 ile anthesis döneminde alınan ve boyuna dilimlenen eksplantlarda olup bunu 6.5 adet ile antesisten 1 gün önce alınan ve boyuna dilimlenen eksplantlar takip etmektedir. Ovaryum başına gelişen en düşük ovul sayısı 1.4 ile antesisten 1 gün sonra alınan ve enine disk şeklinde kesilen ovaryumlarda saptanmıştır.

4.3.2. Zeybek F₁ Çeşidinde Embriyo Teşvik Bulguları

Zeybek F₁ çeşidinde farklı gelişim dönemlerinde alınan ovaryumlar enine disk şeklinde ve boyuna dilimlenerek embriyo teşvik ortamına dikilmişlerdir. Anthesisten 1 gün önce alınan ovaryumların dilim şekline bağlı olarak ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumları ile ilgili bulgular Çizelge 4.11’de verilmiştir.

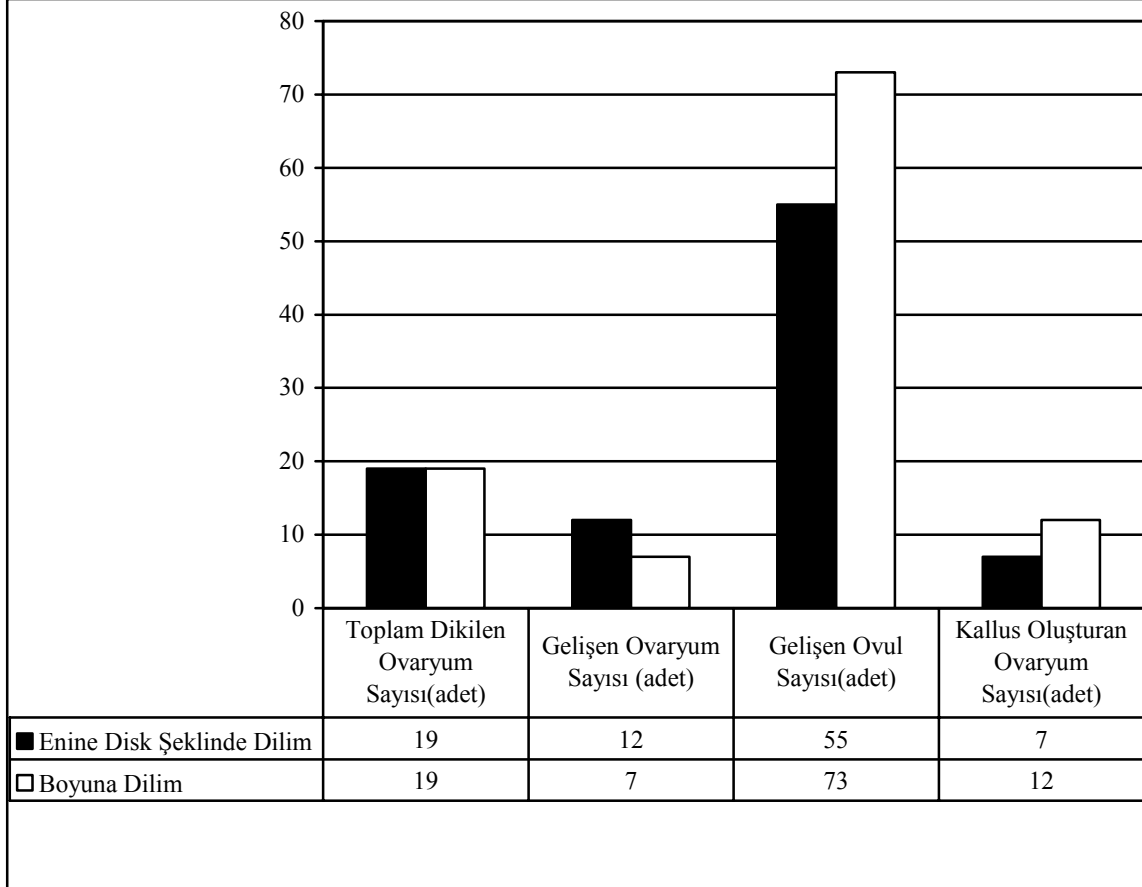
Çizelgeden de görüldüğü gibi her iki dilim şekli için 15’er adet ovaryum kültüre alınmıştır. Enine disk şeklindeki ovaryumların 7 adet (% 46)’ inde, boyuna dilimlenen ovaryumların ise 11 adet (% 73)’inde ovul gelişimi gözlenmiştir. Ancak ovaryumlarda gelişen ovul sayısı enine dilim şeklindeki, eksplantlar da 12 adet olurken, boyuna dilim şeklinde 43 adet ile daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.11. Zeybek F₁ çeşidinde antesisten 1 gün önce alınan ovaryumların farklı dilimleme şekline göre ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumu



Antesis döneminde alınan ovaryumların dilim şekline bağlı olarak gelişimleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.12’ de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, her iki dilim şekli için

Çizelge 4.12. Zeybek F₁ çeşidinde antesis döneminde alınan ovaryumların farklı dilimleme şekline göre ovul ve kallus oluşturma durumu.



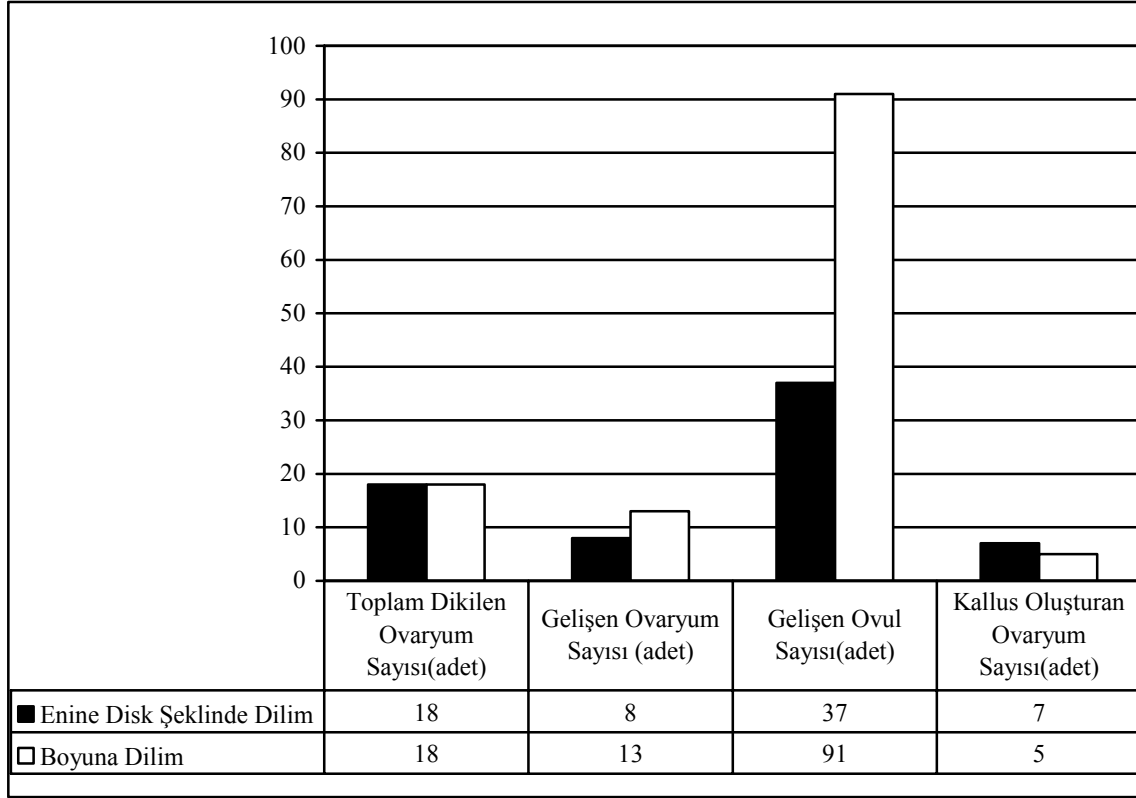
19’ ar adet ovaryum kullanılmıştır. Enine disk şeklinde ovaryumlardan 12’ si (% 63), boyuna dilimlenenlerden 7’ si (% 36.8) embriyo teşvik ortamında gelişme göstermiştir.

Ovaryumlarda gelişen ovul sayısı dilim şekline bağlı olarak farklılık göstermiştir. Enine disk şeklinde kesilerek hazırlanan eksplantlarda gelişen ovul sayısı 55 adet olurken, dilim şeklindeki eksplantlar da 73 adet ile daha yüksek oranlara ulaşmıştır.

Antesis döneminden 1 gün sonra alınan döllenmemiş ovaryumların dilim şekline bağlı olarak gelişimleri Çizelge 4.13’de gösterilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi her iki dilim şekli için 18’er adet ovaryum kullanılmıştır. Enine disk şeklinde kesilenlerden 13’ü (%72.2) embriyo teşvik ortamında gelişme göstermiştir.

Ovaryumlarda gelişen ovul sayısı dilim şekline bağlı olarak farklılık göstermiştir. Enine disk şeklinde kesilerek hazırlanan eksplantlarda gelişen ovul sayısı 37 adet olurken, dilim şeklindeki eksplantlarda 91 adet ile daha yüksek sayıya ulaşmıştır.

Çizelge 4.13. Zeybek F₁ çeşidinde antesisten 1 gün sonra alınan ovaryumlarda farklı dilimleme şekline göre ovul ve kallus oluşturma durumu.



Zeybek F₁ çeşidinde 3 farklı dönemde alınan ovaryumların farklı dilim şekillerine göre embriyo teşvik ortamlarındaki ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumları Çizelge 4.14’de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi embriyo teşvik ortamlarına 52’şer adet ovaryum dikilmiştir. Kültüre alınan enine disk şeklindeki ovaryumlarda gelişen ovaryum sayısı toplam 27 olurken, dilim şeklindekilerde bu sayı toplam 31’e yükselmiştir.

Embriyo teşvik ortamlarına dikilen ovaryumlardan en fazla ovaryum gelişim oranı % 73.3 ile anthesisten 1 gün önce alınıp boyuna dilimlenen eksplantlardan elde edilmiştir. En düşük ovaryum gelişim oranı % 36.8 ile anthesis döneminde alınıp boyuna dilimlenen eksplantlarda saptanmıştır.

Ovaryumlarda gelişen toplam ovul sayısı enine dilimlenenlerde 104 adet olurken boyuna dilimlenenlerde bu sayı 207 adet ile yaklaşık 2 katına yükselmiştir. En fazla ovul 91 adet ile anthesisten 1 gün sonra toplanıp boyuna dilimlenen eksplantlarda meydana gelmiştir. En düşük ovul sayısı 12 adet ile anthesisten 1 gün önce alınıp enine disk şeklinde hazırlanan eksplantlarda saptanmıştır.

Ovaryum başına gelişen ovul sayısı enine disklerde ortalama 3.8 adet olurken boyuna dilimlenenlerde 6.6 adete ulaşmıştır. Ovaryum başına gelişen ortalama ovul sayısı dikkate alındığında en yüksek ovul sayısı 10.4 adet ile anthesis döneminde alınan ve boyuna dilimlenen eksplantlardadır. Buna en yakın 7 adet ile anthesisten 1 gün sonra alınan ve boyuna dilimlenen eksplantlar izlemiştir. Ovaryum başına ovul sayısı en düşük 2.4 adet ile anthesisten 1 gün önce alınan ve enine disk şeklinde kesilen ovaryumlarda belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. Zeybek F₁ çeşidinde toplam disk ve dilim şeklindeki ovaryumlarda ovul geliştirme ve kallus oluşturma durumları

DŞ	Ovaryum dönemleri	Dikilen ovaryum sayısı (adet)	Gelişen Ovaryum Sayısı (adet)	Gelişen ovaryumların oranı (%)	Gelişen Ovul Sayısı (adet)	Ovaryum Başına Gelişen Ort. Ovul Sayısı	Kallus Oluşturan Ovul Sayısı (adet)
ED	Anthesisten 1 gün önce	15	7	46.6	12	2.4	4
	Anthesis	19	12	63.5	55	4.5	7
	Anthesisten 1 gün sonra	18	8	44.4	37	4.6	7
	Toplam	52	27	51.9	104	3.8	18
BD	Anthesisten 1 gün önce	15	11	73.3	43	3.9	5
	Anthesis	19	7	36.8	73	10.4	12
	Anthesisten 1 gün sonra	18	13	72.2	91	7	7
	Toplam	52	31	59.6	207	6.6	24

DŞ: Dilim şeklinde ovaryum ED: Enine disk şeklinde ovaryum BD: Boyuna dilim şeklinde ovaryum

4.4. 2004 Yılı Rejenerasyon Bulguları

Embriyo teşvik ortamında ovul gelişimi gösteren Sakız ve Zeybek F₁ çeşidine ait ovaryumlardan ovuller dikkatlice çıkarılarak farklı oksin ve sitokinin kombinasyonları içeren rejenerasyon ortamlarına transfer edilmişlerdir.

Rejenerasyon ortamlarına dikilen ovullerin bazıları şişkinleşmeye devam ederek gelişmesini sürdürürken bazıları büyümesini durdurarak kallus oluşturmaya başlamıştır. Rejenerasyon ortamlarına dikilen ovullerin gelişimleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.15'de verilmiştir.

Sakız çeşidinde her bir besin ortamı kombinasyonuna 8' er adet olmak üzere toplam 96 adet ovul, Zeybek F₁ çeşidinde her bir besin ortamı kombinasyonuna 24' er adet olmak üzere toplam 288 adet ovul rejenerasyon ortamlarına dikilmiştir. Kontrol olarak sakız çeşidinde 33 adet Zeybek F₁ çeşidinde 23 adet ovul, bitki gelişme düzenleyicilerin ilave edilmediği rejenerasyon ortamına dikilmiştir.

Rejenerasyon ortamlarında gelişmesini sürdüren ovul sayısı incelendiğinde genel olarak düşük oksin ve düşük sitokin kombinasyonlarının ovullerin gelişmesini devam ettirmesinde daha etkili olduğu görülmektedir (Çizelge 4.15). Sakız çeşidinde 0.5 mg/l BA ilave edilen ortamlarda toplam 12 adet ovul gelişmiş, sürdürürken bu sayı 0.1 mg/l BA ilave edilenlerde 6'ya, 1 mg/l BA ilave edilenlerde 3'e düşmüştür. Bu çeşitte gelişmesini sürdüren ovul sayısı 6 adet ile 0.5 mg/l BA + 0.05 mg/l NAA ilave edilen ortamlarda en yüksek seviyeye ulaşırken, 1 mg/l BA + 0.05 mg/l NAA ilave edilen ortamlara dikilen ovullerin hiçbiri gelişmesini sürdürememiştir.

Çizelge 4.15. Sakız ve Zeybek F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında ovullerin gelişimleri ve kallus oluşumları

Besi Ortamındaki Sitokin+Oksin Kombinasyonu (mg/l)	Dikilen Ovul Sayısı (Adet)		Gelişmesini Sürdüren Ovul Sayısı (Adet)		Kallus Oluşturan Ovul Sayısı (Adet)	
	Sakız	Zeybek F1	Sakız	Zeybek F1	Sakız	Zeybek F1
1 BA + 1 NAA	8	24	-	11	3	2
1 BA + 0.5 NAA	8	24	-	-	2	8
1 BA + 0.1 NAA	8	24	1	-	1	11
1 BA + 0.05 NAA	8	24	2	8	1	4
Toplam	32	96	3	19	7	25
0,1 BA + 1 NAA	8	24	1	-	2	4
0.1 BA + 0.5 NAA	8	24	1	-	2	4
0.1 BA + 0.1 NAA	8	24	1	5	2	-
0.1 BA + 0.05 NAA	8	24	3	5	1	12
Toplam	32	96	6	10	7	20
0.5 BA + 1 NAA	8	24	1	14	2	5
0.5 BA + 0.5 NAA	8	24	3	12	1	2
0.5 BA + 0.1 NAA	8	24	2	3	1	7
0.5 BA +0.05 NAA	8	24	6	17	1	7
Toplam	32	96	12	46	5	21
Genel toplam	96	288	21	75	19	66
KONTROL	33	23	22	16	11	7
TOPLAM	129	311	55	91	30	73

Zeybek F₁ çeşidinde 0.5 mg/l BA ilave edilen ortamlarda toplam 46 adet ovul gelişmesini sürdürürken bu sayı 0.1 mg/l BA ilave edilenlerde 10' a, 1 mg/l BA ilave edilenlerde 19' a düşmektedir. Bu çeşitte gelişmesini sürdüren ovul sayısı 17 adet ile 0.5

mg/l BA + 0.05 mg/l NAA ilave edilen ortamlarda en yüksek seviyeye ulaşırken, 1 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA, 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA, 0,1 mg/l BA + 1 mg/l NAA, 0.1 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA ilave edilen ortamlara dikilen ovullerin hiçbiri gelişmesini sürdürememiştir.

Sakız çeşidinde tüm rejenerasyon ortamlarında 1–3 adet arasında değişen sayıda olmak üzere toplam 19 adet ovulun kallus oluşturduğu saptanmıştır. Zeybek F1 çeşidinde dikilen ovullerden toplam 66'sında kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallus oluşumuna 0.1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA ilave edilen besin ortamında rastlanmazken, 0.1 mg/l BA + 0.05 mg/l NAA ilave edilen ortamlarda 12 adet ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Rejenerasyon ortamında kullanılan tüm ortamlarda her iki çeşitte de ovullerden bitkicik gelişimi gerçekleşmemiştir. Ancak gelişmesini uzun süre devam ettiren ovullerin sayısı dikkate alındığında 0.5 mg/l BA + 0.05 mg/l NAA kombinasyonlarını içeren ortamın her iki çeşitte de rejenerasyon için ümit verici olduğu saptanmıştır.

Gynogenesis yoluyla haploid bitkilerin elde edilmesini etkileyen faktörler döner bitkinin genotipi, yumurtalığın gelişme dönemi, *in vitro* kültürde kullanılan besin ortamları ve bunlara ilave edilen bitki gelişimini düzenleyiciler, mevsim, ön sıcaklık uygulamaları ve *in vitro* kültür sırasındaki ışık uygulamaları olarak sıralanmıştır (Yang ve Zhou, 1990; Keller ve Korzun, 1996; Ellialtıoğlu ve ark, 2001).

Çalışmanın her iki yılında kullanılan genotiplerden Zeybek F₁ çeşidinin hem embriyo teşvik ortamında hem de rejenerasyon ortamlarında ovaryumlardan ovullerin gelişmesi ve bu ovullerin gelişmelerini uzun süre devam ettirmesi bakımından Sakız çeşidine göre daha iyi tepki verdiği gözlenmiştir. Birçok araştırmacının çeşitli türlerde gynogenesis yoluyla haploid uyartımı çalışmalarında, genotipin önemli bir faktör olduğunu vurgulamıştır. Örneğin: *Hordeum vulgare* (San Noeum, 1979), *oryza sativa* (Zhou ve Yang, 1981; Zhou ve ark, 1986), *gerbera jamesonii* (Sitbon, 1981), *triticum aestivum* (Zhu ve ark., 1981), *helianthus annuus* (Gelebart ve San, 1987; Badea ve ark., 1989), *allium cepa* (Muren, 1989; Keller, 1990a; Keller, 1990b), *zea mays* (Truong-Andre ve Demarly, 1983) *beta vulgaris* (Van Geyt ve ark., 1987; Doctrinal ve ark., 1989; Lux ve ark., 1990), *cucurbita pepo* (Gémes ve Venczel, 1996), *cucumis sativus* (Gémesné ve ark., 2002).

Ovul veya ovaryum kültürlerinden başarı elde edebilmek için dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardan birisi, yumurtalığın alındığı çiçeğin büyüklüğü, yani yumurtalığın fizyolojik olarak içinde bulunduğu gelişme dönemidir (Yang ve Zhou, 1990; Thomas, 2004). Yumurtalığın gelişme dönemini belirleyebilmek için erselik çiçekli türlerde anterlerdeki mikrospor gelişme dönemlerinin izlenmesi gerekmektedir (Ellialtıoğlu ve ark, 2001). Ancak, kabakların monoik çiçek yapısına sahip olması nedeniyle dişi çiçeklerin gelişme durumlarıyla erkek çiçekler arasında paralellik kurulamamaktadır. Bu nedenle kabakgillerde yumurtalığın gelişme safhalarının morfolojik olarak belirlenmesinde bir çok araştırmacı antesis baz almaktadır (Chambonnet ve Duma De Vault, 1985; Kwack ve Fujieda, 1988; Metwally ve ark., 1998; Gémesné ve ark., 2002). Bu araştırmada antesis dönemi baz alınarak ilk yıl antesisten 2 gün önce ve 2 gün sonra alınan ovaryumlardan bir sonuç alınamadığından bu dönemler denemeden çıkarılmıştır. Bu sonuç Kwack ve Fujieda (1988)'nın bulgularına benzemektedir. Çalışmanın birinci yılında her iki çeşitte de antesisten 1 gün önce ve 1 gün sonra alınan ovaryumlarda embriyo teşvik

ortamlarında görülürken, ikinci yıl antesis dönemi ve anthesisten 1 gün sonra alınan ovaryumlarda daha fazla ovul gelişimi görülmüştür.

Chambonnet ve Duma De Vault, (1985), *cucurbita pepo*'da anthesisten 1-2 gün önce alınan ovullerin daha iyi morfojenetik tepki verdiğini belirtirken, Kwack ve Fujieda (1988) *cucurbita moschata*'da tam anthesisteki ovullerin daha iyi embriyogenik tepki verdiğini belirtmektedir. Metwally ve ark., (1998), kabakta antesisten 1 gün önce alınan ovaryumlardan haploid bitki elde ettiğini belirtirken, Gémesné ve ark., (2002), hıyarda ovullerden haploid teşviği için antesisten 6 saat öncesinde alınan ovaryumların en uygun safha olduğunu belirtmektedir. Bu safhada ki ovaryumlarda 8 çekirdek ihtiva eden embriyo keselerinin bulunmasının yanında, hücre bölünmesinin devam ettiği 4 çekirdekli erken safhadaki embriyo keselerinde bulunduğunu bildirmiştir. Bu embriyo keselerinde hücre membranlarının geliştiği ancak hücrelerin son büyüklüklerine ulaşmadığı ve bu durumlarda yumurta hücresinin düzensiz farklılaşmasının gözlemlenmiştir. Bu araştırmacılar anthesiste embriyo kesesinin tamamen geliştiğini ve megasporlardan haploid uyartımında en iyi tepkinin tam olgunlaşmış embriyo keselerine sahip ovaryumlarda olduğunu belirtmektedir. Benzer sonuçlar San ve Demarly (1984) tarafından arpa, buğday, mısır, şeker pancarı ve marulda yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir ve araştırmacılar, tam olgunluk dönemindeki embriyo keselerindeki tüm hücrelerin (yumurta hücresi, antipodlar, sinerjitler ve polar çekirdek) bölünerek embriyo veya kallus oluşturabildiğini saptamışlardır.

Haploid bitkiler kallus oluşturmaksızın doğrudan embriyogenesis yoluyla direk ya da kallus gelişimini takiben sürgün oluşumuyla indirekt yolla oluşabilmektedir. Bu çalışmada da ovullerden doğrudan embriyogenesis yoluyla haploid embriyolar ve bitkiler elde edilmesine çalışılmıştır. Bu amaçla megasporlardan kallus oluşturmaksızın doğrudan embriyogenesis yoluyla haploidlerin oluşturulmasında daha önce kabak ve hıyarda başarılı sonuçlar verdiği bildirilen CBM embriyo teşvik ortamı (Gémesné ve ark., 1997) kullanılmıştır. Embriyo kesesindeki hücrelerin bölünmesine devam ederek haploid embriyo uyartımının teşvik edilmesi amacıyla farklı büyüme düzenleyiciler kullanılmıştır.

Çalışmanın embriyo teşvik aşamasında ovaryumlar da enine disk şeklinde ve boyuna dilim şeklinde olmak üzere farklı 2 dilim şekli denemiştir. Yapılan gözlemler sonucunda boyuna dilim şeklinde hazırlanan eksplantlardan enine disk şeklinde hazırlanan eksplantlara göre daha olumlu sonuçlar alınmıştır. Ancak kabakta dilim şekline bağlı bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Çalışmada da ilk yıl 3 farklı TDZ konsantrasyonu denenmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda farklı dönemlerde alınan ovaryumların 0.1 mg/l TDZ ilave edilen besin ortamlarında diğer konsantrasyonlara göre daha olumlu sonuçlar verdiği görülmüştür. Zeybek F₁ çeşidinde ovul geliştiren ovaryum oranı en fazla oranı % 31.7 ile anthesisten 1 gün önce CBM + 0.1 TDZ içeren besin ortamında kültüre alınan ovaryumlarda olduğu görülürken aynı dönemde ve aynı ortam üzerinde kültüre alınan Sakız çeşitlerinde de bu oranın oldukça yüksek (29.6) olduğu dikkati çekmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde; CBM + 0.1 TDZ içeren embriyo teşvik ortamının Sakız çeşidinde % 27, Zeybek F₁ çeşidinde % 27.6 ovul gelişimi gösteren ovaryum oranı ile her iki çeşit için ovul gelişimi bakımından diğer ortamlara göre daha uygun olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmanın

ikinci yılında 0.01 mg/l ve 1 mg/l TDZ konsantrasyonları kullanılmayarak embriyo teşvik ortamına sadece 0.1 mg/l TDZ ilave edilmiştir.

TDZ'nin *in vitro* kültürlerde hem oksin hem de sitokinin gibi etkide bulunmasının mekanizması tam olarak anlaşılammakla birlikte, daha düşük dozlarda diğer sitokininlerden daha etkili rol oynadığı belirlenmiş ve hücre bölünmesini arttırdığı, morfogenezde etkili olduğu adventif sürgün oluşumu ve somatik embriyogenesi arttırdığı birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. Ayrıca TDZ'nin içsel sitokininlerin sentezini arttırdığı veya bunların parçalanmasını engellediği, oksinler ve sitokininler gibi bitki büyüme hormonları tarafından düzenlenen bölünme ve farklılaşma işlemleri üzerinde tek başına etkili olduğu öne sürülmüştür (Lu, 1993; Murthy ve ark. 1998).

Kabakta yapılan ovul-ovaryum kültürü çalışmalarında embriyo uyarımında Gémes ve Venczel (1996) 0.02 mg/l TDZ'nin olumlu sonuç verdiğini belirtirken, Metwally ve ark.(1998)'ı ovul kültürlerinde 1 veya 5 mg/l 2.4-D'nin etkili olduğunu bildirmektedir. Daha önce *Cucurbita pepo*'da Gémes ve Venczel (1996)'in ve *Cucumis sativus*'da Gémesné ve ark., (2002)'nin çalışmaları dışında haploid embriyo uyarımında büyümeyi düzenleyici olarak TDZ'nin kullanıldığı başka araştırmaya rastlanmamıştır.

Çalışmanın rejenerasyon aşamasında embriyo teşvik ortamında ovul gelişimi gösteren Sakız ve Zeybek F₁ çeşidine ait ovaryumlar ilk yıl BA'nın 0.1 mg/l, 0.5 mg/l ve 1 mg/l konsantrasyonları ile NAA'nın 0.01 mg/l, 0.05 mg/l, 0.1 mg/l ve 0.5 mg/l konsantrasyonlarının kombine edilerek ilave edildiği rejenerasyon ortamlarına transfer edilmişlerdir. Denemenin ikinci yılında ise embriyo teşvik ortamında gelişme gösteren ovaryumlar üzerindeki ovuller çıkarılarak rejenerasyon ortamlarına dikilmiştir. Çalışmanın ilk yılında Sakız çeşidinde yüksek BA ve NAA konsantrasyonları içeren besin ortamlarında gelişme görülürken, Zeybek F₁ çeşidinde NAA'nın BA'ya göre daha etkili olduğu ve yüksek NAA konsantrasyonları içeren besin ortamlarında gelişme gösterdiği belirlenmiştir. İkinci yıl denemelerinde ise rejenerasyon ortamlarına dikilen ovullerin bazıları şişkinleşmeye devam ederek gelişmesini sürdürürken, bazıları da büyümesini durdurarak kallus oluşturmaya başlamıştır. Rejenerasyon ortamında kullanılan tüm ortamlarda her iki çeşitte de ovullerden bitkicik gelişimi gerçekleşmemiştir. Ancak gelişmesini uzun süre devam ettiren ovullerin sayısı dikkate alındığında 0.5 mg/l BA + 0.05 mg/l NAA kombinasyonlarını içeren ortamın her iki çeşitte de rejenerasyon için ümit var olduğu saptanmıştır. Kwack ve Fujieda (1988), *Cucurbita moschata*'da yaptıkları çalışmada büyümeyi düzenleyicilerden 2.4-D, BA, kinetin ve NAA'nın embriyogenesi baskı altında tuttuğunu belirtirken, Gémesné ve Venczel (1998), *Cucurbita pepo*'da 0.05 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA ilave edilen besin ortamlarının embriyo gelişiminde en olumlu sonucu verdiğini bildirmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yazlık kabaklarda (*Cucurbita pepo* L.) *in vitro* ovul-ovaryum kültürü yoluyla doğrudan haploid embriyo ve bitki elde edilmesinin amaçlandığı bu araştırmada şu sonuçlara ulaşılmıştır:

- Çalışmanın her iki yılında kullanılan genotiplerden Zeybek F1 çeşidinin hem embriyo teşvik ortamında hem de rejenerasyon ortamlarında ovaryumlardan ovullerin gelişmesi ve bu ovullerin gelişmelerini uzun süre devam ettirmesi bakımından Sakız çeşidine göre daha iyi tepki verdiği gözlenmiştir.
- Araştırmada kullanılan ovaryumların kültüre alınma döneminin etkili gynogenesis etki ettiği, yapılan gözlemler sonucunda da ilk yıl her ortama ilave edilen farklı TDZ konsantrasyonlarına bağlı olarak iki çeşitte de anthesisten 1 gün önce ve 1 gün sonra alınan ovaryumlarda embriyo teşvik ortamlarında ovul gelişimi görülmüştür. Bu araştırmada 3 dönemin de kullanılabilceği, ancak daha sonraki denemelerden alınan sonuçlara bağlı olarak antesis dönemi ve antesisinden 1 gün sonraki döneminin daha olumlu sonuçlar verebileceği dikkat çekmiştir.
- Çalışmada kullanılan ovaryumların dilim şeklinin ovul gelişiminde etkili olduğu, embriyo teşvik ortamında dilim şekline bağlı olarak boyuna dilim şeklinde hazırlanan ekplantlarda, enine disk şeklinde hazırlanan eksplantlara göre daha yüksek seviyede ovul gelişiminin gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.
- Embriyo teşvik ortamında bitki büyümeyi düzenleyici olarak kullanılan TDZ'nin 0.1 mg/l konsantrasyonunun denemede kullanılan diğer düşük konsantrasyonlarına oranla daha uygun olduğu belirlenmiştir.
- Embriyo teşvik aşamasında gelişme gösteren ovullerin daha sonraki aşamada gelişmelerini sürdürmeleri için ortama ilave edilen oksin ve sitokinin konsantrasyonlarının etkili olduğu saptanmıştır. Çalışmada ovullerin 0.5 mg/l BA + 0.05 mg/l NAA ilave edilmiş besin ortamlarında gelişmelerine devam ettiği gözlenmiştir. Ancak, kontrol uygulamaları dikkate alındığında bu aşamada ovul gelişimi için büyüme düzenleyici içermeyen rejenerasyon ortamlarının alt kültür için daha uygun olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu araştırma sonucunda, gynogenesis yoluyla doğrudan haploid bitki eldesin de genotipin etkili olduğu bu nedenle daha sonraki çalışmalarda daha fazla genotipin kullanılmasının gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Ayrıca ileriki çalışmalarda embriyo uyartımı için besin ortamlarına ilave edilen büyüme düzenleyicilerin farklı konsantrasyonlarının ve farklı kültür koşullarının denemesi yararlı olacaktır.

Döllenmemiş ovaryum veya ovullerin doğrudan *in vitro* kültürü araştırmalarının devam etmesi yanında ilk aşamada ışınlanmış polenler ile embriyo uyartımının sağlanarak daha sonraki aşamalarda ovaryum kültürü tekniğini kapsayan denemelerin kullanılmasının yararlı olabileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- AALDERS, K.E., 1958. Monoploidy in cucumbers. *Journal Heredity*, 49: 41–44.
- ABAK, K., 1982. Biberde kökboğazı yanıklılığın kalıtımı üzerinde araştırmalar. A.Ü. Ziraat Fak. Doçentlik Tezi, Ankara, 62 s.
- ABAK, K., 1983. Biberde (*Capsicum annum* L.) Anter Kültürü yoluyla Haploid Bitki Elde Etme Üzerinde Araştırma. Ankara Üniv. Zir. Fak. Yıllığı, Cilt: 33: 155–163.
- ABAK, K., 1988. Türkiye de Bitki Islahı Çalışmalarında *in vitro* Tekniklerden Yararlanma. I. Uluslararası Tarım ve Biyoteknoloji Sempozyumu, 1-3 Haziran 1988, Ç. Ü., Adana, 7s.
- ABAK, K., İŞBECEREN, A., GÜLER; H.Y., 1992. Bazı Dihaploid Biber Hatları İle Bunların F₁ Melezlerinin Verim, Erkencilik Ve *Phytophthora capsici*'ye Direnç Bakımından Karşılaştırılması. Türkiye 1. Ulusal Bahçe Bit. Kong. Bild., 13-16 Ekim 1992, İzmir, Doğruluk Mat., Cilt II: 293-296.
- ABAK, K. 1993. Biber Islahında Anther Kültüründen Yaralanma. Bitki Islahı Simp. Bildirileri, TÜBİTAK TOAG Yay., 59-66.
- ABAK, K., SARI, N., PAKSOY, M., YILMAZ, H., AKTAŞ, H., TUNALI, C., 1996. Kavunda ışınlanmış tozlamaları ile haploid embriyo uyartımında genotip etkisi, Dihaploid hatların oluşturulması, haploid ve diploid bitkilerin değişik yöntemlerle ayrımı. Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi, 20: 425–430.
- ABAK, K. , ÇÖMLEKÇİOĞLU, N., BÜYÜKALACA, S., SARI, N., 1998. Use of Stomatal Caharacteristics to Estimate Ploidy Level of Haploid and Dihaploid Pepper Plants. Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant, 1998, Avignon-France, 179–182.
- ANONİM, 2003. [http// www.fao.org](http://www.fao.org)
- ANONİM, 1998. Türkiye İstatistik Yıllığı. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü. Yayın No: 2240. Ankara.
- ASSELIN de BEAUVILLE, M., 1980. Obtention d'haploides in vitro a partir d'ovaries non fecondes de Riz, *Oryza sativa* L.C.R. Acad. Sci., Paris, 290: 489-492.
- BADEA, E.M., PRİSECARU, M., ANGHELUTA, R., 1989. Studies on gynogenesis in intraspecific and interspecific hybrids in the genus *Helianthus*. Certary de Genetica Vegetala si Animala 1: 177–183

- BAJAJ, Y.P.S., 1983. *In vitro* production of haploids. In: Handbook of Plant Cell Culture (eds: Evans, D.A., Sahrp, W.R., Ammirato, P.V., Yamada, Y.). Macmillan Publishing Company, Vol. 1., Chapter 6: 228-287.
- BAL, U., ABAK, K., 2003. Attempts of haploidy induction in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) via gynogenesis II: *In vitro* non-fertilized ovary culture. Pakistan Journal of Biological Sci.6 (8): 750–755.
- BAYRAKTAR, K., 1981. Sebze Yetiştirme. Cilt II. Kültür Sebzeleri. Ege Üniv. Zir. Fak. Yayınları, No: 169. Bornova – İZMİR.
- BİLGE, E., 1982. Genetik. İstanbul Üniversitesi Yayınları. No: 2886, Fen Fak. Yay. No: 163–316 s.
- BHOJWANI, S.S., RAZDAN, M.K., 1983. Plant tissue culture. Theory and Practise. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 502 p.
- BHOJWANI, S.S., 1990. Plant tissue culture: Applications and Limitations. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 502 p.
- BLANCARD, D., LECOQ, H., PITRAT, M., 1995. Kabakgiller Hastalıkları. Hasad Yayıncılık, 292 s.
- BORNMANN, C.H. 1985. Haploidization of sugarbeet (*Beta vulgaris*) via gynogenesis. In Vitro 21: 36A.
- BRUNNER, M., 1990. Methods of induction of mutations. Symposium, June 1990, IAEA, Vienna, 62.
- CHADA, M.L., LAL, T., 1993. Improvement of Cucurbits. Adv. Hort. Res., 5: 137-151
- CHAMBONNET, D., VAULX, R.D., 1985. Obtention of Embryos and Plant from *In Vitro* Culture of Unfertilized Ovules of *Cucurbita pepo*. Cucurbits Genetics Cooperative Rep., 8: 66.
- CHAMBONNET, D., 1988. Production of Haploid pepper plants. Bulletin Interne de la Station d'Amélioration des Plantes Maraichères d'Avignon-Montfavet, 1-10.
- CUNY, F., 1992. Processus d'induction d'embryons haploides par du pollen irradié chez le melon (*cucumis melo* L.) responses du pollen à l'irradiation gamma. These de Docteur, Spécialité "Biologie et Cytologie Végétales" Univ. d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon, 139 p.
- CUSTERS, J.B.M., DEN NIJS, A.P.M., 1983. Mentor pollen in an interspecific cross in *Cucumis*: Effects of irradiation dose and of order of application of the two types of pollen. Cucurbit Genetic Cooperative, 6: 94–95.

- ÇAĞLAR, G., 1995. Hıyarda (*Cucumis sativus* L.) ışınlanmış polenlerle tozlama yoluyla *in situ* haploid embriyo uyartımı ve haploid embriyolardan *in vitro* bitki eldesi üzerinde araştırmalar. Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. 227.
- ÇAĞLAR, G., ABAK, K., 1995. Hıyarda (*cucumis sativus* L.) *in situ* uyartım sonucu elde edilen haploid embriyolardan *in vitro* haploid bitki oluşturma. Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi, 23: 28–290.
- ÇAĞLAR, G., ABAK, K., 1996. Efficiency of Haploid Production in Cucumber. Cucurbits Genetics Cooperative Report 19: 36–37.
- ÇAĞLAR, G., ABAK, K., 1999. Farklı hıyar genotiplerinde ışınlanmış polenlerle uyartım yoluyla haploid embriyo ve bitki eldesi. Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Cilt II: 159–162.
- CELİKTAŞ, N., HATİPOĞLU, R., 1997. Arpa (*Hordeum vulgare* L.) anter kültüründe genotip, soğuk uygulama süresi ve besi ortamı 2,4-D içeriğinin etkisi. Ç.Ü.Z.F. Dergisi, 12(2): 163–172.
- DECOTEAU, D.R., 2000. Vegetables Crops. Prentice- Hall, Inc. Upper Saddle, New Jersey. 07458.
- DEMARLY, Y., SİBİ, M., 1989. Amélioration des plantes et biotechnologies. John Libbey and Comp., London, 152 s.
- DOCTRINAL, M., SANGWAN, S.R., SANGWAN-NORREL, B.S., 1989. In vitro gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 17: 1-12. Kluwer Academic Pub. Printed in Netherlands.
- DE WIT J.C., ESENDAM, H.F., STRAVERS, L.J.M., AAPOLA, A., ELOMAA, P., HONKANEN, J., LJUNGBERG, H., SEPPANEN, P., TÖRMALA, T., 1990. VIIth. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, 24-29 June 1990, Amsterdam. Abst., 203.
- DONINI, B., 1991. Mutagenesis applied for the improvement of vegetatively propagated plant. FAO/IAEA. Interregional training course on the induction and use of mutations in plant breeding. 3 April-16 May 1991, Seibersdorf, 24 p.
- DORE, C., 1976. Doublement du stock chromosomique d'haploïdes d'asperge (*Asparagus officinalis* L.) par culture *in vitro* des meristemes en présence de colchicine. Ann. Amélior. Plantes, 26(4): 647–653.

- DRYANOVSKA, O.A., ILIEVA, I.N., 1983. *In vitro* Anther and Ovule Cultures in Muskmelon. C.R. Acad. Bulgar Sci., 36(8): 1107-1110.
- DUMAS DE VAULX, R., 1979. Obtention de plantes-haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) après pollinisation par *Cucumis ficifolius* A. Rich. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Paris, Série D, 289: 875-878.
- DUNWELL, J.M., 1985. Haploid Cell Culture- A Practical Approach (ed: R.A. Dixon). IRL Pres Ltd., Chapter 2: 21-36.
- ELLİALTIOĞLU, Ş., SARI, N., ABAK, K., 2001. Bitki Biyoteknolojisi. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- EMİROĞLU, Ü., 1980. Türk tütün çeşitlerinde anther kültürü. Bitki Islahı Sempozyumu (22-25/5/1979). Ege Bölge Ziraat Araştırma Enst. Yay. No: 17/41, 12-18.
- EMİROĞLU, Ü., 1982. Haploidi ve bitki ıslahındaki önemi. Ege Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Yayınları. No: 450, İzmir, 38 s.
- EMİROĞLU, Ü., GÜREL, A., 1993. Bitki ıslahında modern biyoteknoloji. Short Course, The Biotechnology Reevaluation. February 8-12, 1993. Organized by Ege Univ. Biotech. Cent and Fac. of Agr. Dept. of Crop Sci., İzmir, 103-110.
- FILEV, K.A., 1981. Utilization of induced mutations and gamma radiation in cross-breeding of durum wheat. In: Induced Mutations- A Tool in Plant Research. IAEA, Vienna, 504
- GALLAIS, A., 1990. Théorie de la sélection en amélioration des plantes. INRA ed., Paris.
- GELEBART, P., SAN, L.H., 1987. Obtention de plantes haploides par culture *in vitro* d'ovaires et d'ovules non fécondés de tournesol (*Helianthus annuus*). Agronomie 7: 81-86.
- GEMES, J.A., VENCZEL, G., 1996. *In vitro* gynogenesis induction in zucchini (*Cucurbita pepo* L. convar. *giromontiina* Duch) Lines. Proceedings of the VI. Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, 200-201
- GEMESNE, J.A., VENCZEL, G., BALOGH, P., 1996. Haploid Plant Induction in Zucchini (*Cucurbita pepo* L.) and Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Lines Through *in vitro* Gynogenesis. (eds: Altman, A., Ziv, M.), ISHS Acta Horticulturae 447: III International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. No: 132. Vol.1

- GEMESNE, J.A., BALOGH, P., FERENCZY, A., 2002. Effect of Optimal Stage of Female Gametophyte and Heat Treatment on *in vitro* Gynogenesis Induction in Cucumber (*Cucumis sativus* L.)
- GU, Z.P. and K:C: CHENG, 1983. In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of lily and its embryological observations. Acta. Bot. Sin. 24: 24–28.
- GUSSAKOVSKAYA, M.A. NAJAR, M.A., 1990. Induction of haploid plantlets from unfertilized ovaries and ovules of wheat culture in vitro. VIIth. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, 24–29 June 1990, Amsterdam. Abst., 186.
- GÜNAY, A., 1984. Özel Sebze Yetiştiriciliği. Cilt III. A.Ü. Ziraat Fakültesi. Çağ Matbaası. Ankara.
- GÜNAY, A., 1992. Özel Sebze Yetiştiriciliği. Cilt V. A.Ü. Ziraat Fakültesi. Çağ Matbaası. Ankara.
- GÜRSÖZ. N., ABAK, K., PITRAT, M., RODE, J.C., DUMAS DE VAULX, R., 1991. Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus*). Cucurbit Genetic Coop., 14: 109-110.
- HE, C.P. and H.Y. YANG, 1988. An investigation on the stability of synergid apogamy and its conditions in rice ovary culture. J. Wuhan Bot. Res., 6: 203-208.
- HERMSEN, J.G.T., RAMANA, M.S., 1981. Haploidy and plant breeding. Phill. Trans. R. Soc. Lond. B., Vol. 292: 449–507.
- HERNÁNDO BERMEJO J.E VE LEÓN, L., 1994. Neglected Crops : 1492 from a Different Perspective. Plant Production and Protection Series No. 26. FAO, Rome, Italy. p. 63-77.
- HONKANEN, J., AAPOLA, H., SEPPANEN, P., TORMALA, T., DE WIT, J.C., ESENDAM, H.F., STRAVERS, L.M.J., 1991. Production of double haploid gerbera clones. Acta Horticulturae, 300: 341–346.
- HOSEMANS, D., BOSSOUTROT, D., 1983. Induction of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated beet ovules (*Beta vulgaris* L.). Z. Pflanzenzüchtg, Berlin, 91: 74-77.
- JEFFERY, C. 1990. Systematics of the Cucurbitaceae. In: Bates, D.M., Tropical East Africa, Vol.4. Whitefriars Press Ltd., London and Tonbridge, 157 pp.

- KARAKULLUKÇU, Ş., ABAK, K., 1993a. Patlıcanda anther kültürü üzerine araştırmalar. I. Elveriřli tomurcuk gelişim döneminin belirlenmesi. Doğa Tr. J. Agric. Forestry, 17: 801–810.
- KARAKULLUKÇU, Ş., ABAK, K., 1993b. Patlıcanda anther kültürü üzerine araştırmalar. II. şeker ve büyümei düzenleyicilerin etkileri. Doğa Tr. J. Agric. Forestry, 17: 811–820.
- KATOH, N. and S. IWAI, 1990. Effect of starvation treatment on induction of haploid plants from unpollinated ovules of *Nicotiana tabaccum* L. VIIth. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, 24–29 June 1990, Amsterdam. Abst., 187.
- KELLER, J., 1990a. Culture of unpollinated ovules, ovaries and flower duds in some species of genus *Allium* and haploid induction *via* gynogenesis in Onion. *Euphytica*, 47: 241–247.
- KELLER, J., 1990b. Haploids from unpollinated ovaries of *Allium cepa*-single plant screening, haploid determination and long term storage. VIIth International Cong. on Plant Tissue Culture, 24-29 June 1990, Amsterdam, Abst., 193.
- KELLER, J.E.R., KORZUN, L., 1996. Ovary and ovule culture for haploid production. *in vitro* Haploid Production in Higher Plants, (eds: Jain, S.M, Sopory, S.K., Veilleux, R.E.). Vol. 1: 217–235.
- KHUSH, G. S., VIRMANI, S. S., 1996. Haploids in plant breeding. *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants, In: S. M. Jain, S.K. Sopory& R.E. Veilleux (eds.), Vol. 1, 11–33
- KLUG, S.W., CUMMİNGS, R.M., 2002. Genetik kavramlar (ed: Öner., C.,). Palme Yayıncılık. Ankara. (Çeviri).
- KWACK, N.S., FUJİEDA, K., 1988. Somatic Embriyogenesis in Cultured Unfertilized Ovules of *Cucurbita moschata* . J. Japan. Soc. Hort. Sci., 57(1): 34-42.
- KUCKUCK, H., KABABE, G., WENZEL, G., 1991. Fundamentals of plant breeding. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- KURTAR, E.S., 1999. Kabakta (*cucurbita pepo* L.) haploid embriyo uyarımı ve bitki oluştırma üzerine araştırmalar. Ç. Ü. Fen Bil. Ens. Bahçe Bit. Anabilim Dalı. Doktora Tezi. 203 sf.
- KURTAR, E.S., SARI, N., ABAK, K., 2002. Obtention of haploid embriyos and plants trough irrigated polen technique in squash. *Euphytica*, 127: 335–344.

- LESPINASSE, Y., GODICHEAU, M., DURAN, M., 1983. Potential value and method of procuding haploids on apple tree, *Malus pumila* (Mill.) in vitro culture. Acta Horticulturae, 131: 223–230.
- LOWER, R.L, EDWARDS, M.D., 1986. Cucumber breeding. In: Breeding Vegetable Crops (ed: Basset, M.J.). AVI Publishing Comp. Inc. Connecticut, 173–207.
- LU, Y.C., 1993. The use of Thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29P: 92–96.
- MAESTRO-TEJADA, M.C., 1992. Résistance du melon aux virus. Interaction avec les pucerons vecteurs. Analyse génétique sur lignées haplodiploides. Thèse de Docteur, Spécialité “ Biologie des Organismes et Populations”, Univ. de Droit, d’Economie et des Sciences d’Aix-Marseille, 134 p.
- MAHESHWARI, S.C., 1996. The discovery of anther culture technique for the production of haploids. in: *In Vitro Haplod Production in Higher Plants*, (Eds: Mohan Jain, S., Sopory, S.K., Veilleux, R.E.), Vol.1, 1-10, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- MACKEY, J., 1961. Methods of utilizing induced mutation in crop improvement. In: *Mutation and Plant Breeding.* (ed: Lucket, J.D.), Washington, 336 p.
- METWALLY, E.I., MOUSTAFA, S.A., EL-SAWY, B.I., HAROUN, S.A., SHALABY, T.A., 1998. Production of Haploid Plants from In Vitro Culture of Unpollinated Ovules of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52(3):117-121.
- MEYNET, J. and M. SIBI, 1984. Haploid plants from *in vitro* Culture of Unfertilized Ovules in *Gerbera jamesonii*. *Z. Pflanzenzüchtg* 93: 78–85.
- MUREN, R.C., 1989. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. *HortScience* 24: 833–834.
- MURTHY, S.N.B., MURCH, S.J., SAXENA, K.P., 1998. Thidiazuron:A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro. Cell. Dev. Biol. –Plant* 34: 267–275, October- December 1998.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K., DUMAS DE VAULX, R.,1989. Preliminary data on haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction. *Cucurbit Genetic Coop.*, 12: 24-25.

- NITSCH, C., 1981. Production of isogenic lines: Basic Technical Aspects of Androgenesis. In: Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture (ed: T.A. Thorpe), 241–252.
- NORSTOG, K., 1973. New Synthetic Medium for the Culture of Premature Barley Embryos. *in vitro* Vol: 3, No: 8, 307–308.
- ORAMAN, N.M., 1968. Sebze İlimi. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları. No:323 Ders Kitabı: 117.
- ÖZZAMBAK, E., 1992. Pırasada ovaryum ve polen kültürü. Türkiye 1. Ulusal Bahçe Bitk. Kong., Bild., 13-16 Ekim 1992, İzmir. Cilt 11: 223–236.
- PANDEY, K.K., PRZYWARA, L., SANDERS, P.M., 1990. Induced parthenogenesis in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) through the use of lethally irradiated pollen. *Euphytica*, 51: 1–9.
- PEIRCE, L.C., 1987. Vegetable, Characteristics, Production and Marketing. John Wiley and Sons, Inc. Published Simultaneously in Canada.
- PIERIK, R.L.M., 1989. In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, 344 p.
- POCHARD, E., DUMAS DE VAULX, R., 1979. Haploid parthenogenesis in *Capsicum annum* L. Reprinted from the biology and taxonomy of the *Solanaceae* (eds: Hawkins, G., Lester, Shelding, A.D.). Linnean Society Symp., Series No: 7, 455-472.
- RAGNET, M. A., 1984. Etudes Préliminaires de l'obtention d'haploïdes de melon, par cultures d'anthers in vitro. Mémoire (Ingénieur ENITAH) option cultures légumières et grainières, Angers, 64 p.
- RAQUIN, C., 1986. Etude Des Conditions D'obtention de Petunias Haploïdes Gynogénétiques Par Culture in vitro D'ovaires de Plantes Pollinisées Par du Pollen Irradié. In: Nuclear Techniques and in vitro Culture for Plant Improvement. IAEA. Vienna, 207–211.
- REINERT, J., BAJAJ, Y.P.S., 1977. Anther culture: haploid production and its significance. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture (eds: Reinert, J., Bajaj, Y.P.S.). Springer-Verlag, New York, 251-264.
- ROBINSON, R.W., DECKER-WALTERS, D.S., 1997. Cucurbits. In: Crop Production Science in Horticulture Series (Ed: Jeff Atherton, Alun Ress). CAB International

- Department of Horticultural Science. Cornell Univ. and D.S. Decker-Walters, The Cucurbit Network. U.S.A.
- ROULUND, N., HANSTET, L., ANDERSEN, S.B., FARESTVEIT, B., 1990. Effect of gynotype and enviroment and carbonhydrate on anther culture response in head cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* (L.) Alef.). *Euphytica*, 49: 237–242.
- SAN, L.H., DEMARLY, Y., 1984. Gynogenesis *in vitro* and biometrics studies of doubled haploids obtained by three techniques in *Hordeum vulgare* L. Efficiency in Plant Breeding. Proc. 10th. Congr. EUCARPIA, In: W. Lange, A.C. Zeven and N.G. Hogenboom (eds.). Wageningen, June 19–24, 1983, p.347.
- SAN NOEUM, L.H., 1976. Haploides d'*Hordeum vulgare* L. par culture in vitro d'ovaries non fécondés. *Ann. Amélior Plantes*, 26, (4): 751–754.
- SANGWAN, R.S., SANGWAN-NORREL, B.S., 1990. Anther and polen culture. In: Plant tissue culture: Appl. and Limit. (ed: Bhojwani, S.S.). Elsevier Science Puplishers B.V. Amsterdam, The Nedherlands, Chapter 9: 220–242.
- SARI, N., ABAK, K., PITRAT, M., DUMAS DE VAULX, R., 1992. Kavunlarda (*cucumis melo* L. var. *inodorus* Naud ve *C. melo* L. var. *reticulatus* Naud) partenogenetik haploid embriyo uyartımı ve bitki eldesi. *Doğa Tr. J. Agric. Forestry*, 16: 302–314.
- SARI, N., 1994. Karpuzlarda ışınlanmış polen uyartımıyla haploid bitki eldesi üzerine genotipin ve mevsimin etkisi ile ışınlanma yerine geçebilecek uygulamalar üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Ç.Ü. Fen Bil. Ens., Adana, 244 s.
- SARI, N., ABAK, K., PITRAT, M., DUMAS DE VAULX, R., 1994. Induction of parthenogenetic haploid embriyos after pollination by irridiated pollan in watermelon. *HortScience*, 29(10): 1189–1190.
- SARI, N., ABAK, K., 1995. Farklı ışın dozlarının ışınlamaya alternatif uygulamaların karpuzda haploid embriyo uyartımına etkileri. *Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, Cilt II: 212–215.
- SAUTON, A., 1987. Obtention of Embriyo and Plants from In Vitro Culture of Fertilized Ovules of *Cucumis melo* 5 Days After Pollination. *Cucurbits Genetics Cooperative Rep.*, 10: 62-63.
- SAUTON, A., DUMAS DE VAULX, R., 1987. Obtention de plantes haploides chez le melon (*cucumis melo* L.) par gynogénése induite par du polen irradié. *Agronomie*, 7: 141–148.

- SAUTON, A., 1989. Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. Cucurbit Genetic Coop., 12: 22-23.
- SAVIN, F., DECOMBLE, V., LE COUVIOIR, M., HALLARD, J., 1988. The X-ray detection of haploid embryos arisen in muskmelon (*cucumis melo* L.) seeds and resulting from a parthenogenetic development induced by irradiated pollen. Cucurbit Genetic Coop., 11: 39-42.
- SEMAN, I., J. FARGO, 1990. Production of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) haploid by cultivation of unfertilized ovules. VIIth. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, 24–29 June 1990, Amsterdam. Abst., 200.
- SEVGİCAN, A., 2002. Örtüaltı Sebzeçiliği. Topraklı Tarım. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 528, Bornova, İzmir.
- SHAIL, J.W., ROBINSON, R.W., 1987. Anther and Ovule Culture of *Cucurbita*. CucurbitsGenetics Cooperative Rep., 10: 92.
- SHCHERBAKOV, V.K., 1991. Mutagenesis in growing plants. In: Induced Mutations- A Tool in Plant Research. IAEA, Vienna, 505–506.
- SIBI, M., DUMAS DE VAULX, R., CHAMBONNET, D., 1979. Obtention de plantes haploides par androgenèse *in vitro* chez le piment (*C. annuum* L.). Ann. Amelior. Plantes, 19(5): 583–606.
- SITBON, M., 1981. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by *in vitro* culture of unfertilized ovules. Agronomie, 91: 807–812.
- SNEEP, J., HENDRIKSEN, A.J.T., 1979. Plant breeding perspectives. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, 330–341.
- SPARROW, A.H., 1961. Types of ionizing radiation and their cytogenetic effects. In: Mutation and Plant Breeding (ed: Luckett, J.D.). Washington, 55–120.
- ŞEHİRALI, S., ÖZGEN, M., 1998. Bitki Islahı. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yay. No: 1059, 261 s.
- THOMAS, D.T., 2004. Embryological Observations on uniplanated Ovary Culture of Mulberry (*Morus alba* L.). Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 46: 87-94
- THORPE, T.A., 1990. The current status of plant tissue culture. In: Plant Tissue Culture: Applications and Limitations (ed: S. S. Bhojwani). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. Chapter 9: 220–242.

- TROUNG-ANDRE, I., DEMARLY, 1983. Obtaining plants by *in vitro* culture of unfertilized maize ovaries (*Zea mays* L.) and preliminary studies on the progeny of a gynogenetic plant. *Z. Pflanzenzuchtg*, 92: 309–320.
- TROUNG-ANDRE, I., 1988. In vitro haploid plants derived from pollinisation by irradiated pollen on cucumber. In: Proceedings of the Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding. May 31-June 2, 1988, Avignon-Montfavet, 143–144.
- TULECKE, W., 1964. A haploid Tissue culture from the female gametophyte of *Ginleto biloba* L., *Nature* 203: 94-95.
- UCHIMIYA, H., KAMEYA, T., TAKANASHI, N., 1971. In vitro culture of unfertilized ovules in *Solanum melongena* and ovaries of *Zea mays*. *Jpn. Breed.*, 21: 247-250.
- YAN, H., ZHOU C., YANG, H.Y., 1988. Experimental studies on several factors affecting unfertilized ovule culture in sunflower. *J. Wuhan Bot. Res.*, 6: 319-326.
- YANG, H.Y., ZHOU, C., 1990. In vitro gynogenesis. In: *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations* (ed: Bhojwani, S.S.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Chapter 10: 242-259.
- YEUNG, E.C., THORPE, A.T., 1981. In vitro fertilization and embryo culture. In: *Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture* (ed: Thorpe, A.T.), Academic Press Inc. New York, 253–271.
- YILDIRIM, M.B., 1981. Selection studies in certain mutant populations of Wheat. In: *Induced Mutations-A Tool in Plant Research*. IAEA, Vienna, 154–155.
- WALTHER, F., PREIL, W., 1981. Mutants tolerant to low temperature conditions induced in suspension culture as a source for improvement of *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. In: *Induced Mutations- A Tool in Plant Research*. IAEA, Vienna, 399–405.
- WANG, C.C., B.J. KUANG, 1981. Induction of haploid plants from the female gametophyte of *Hordeum vulgare* L.. *Acta Bot. Sin.*, 23: 329-330.
- WHITAKER, T.W., ROBINSON, R.W., 1986. Squash breeding. In: *Breeding Vegetables Crops* (ed: Basset, J.M.). The AVI Publishing Company. Connecticut. 209–242.

- WU, B. And K. CHENG, 1982. Cytological and embryological studies on haploid plant production from cultured unpollinated ovaries of *nicotiana tabaccum*. Acta Bot. Sin., 24: 125-129.
- WENZEL, G., 1985. Strategies in unconventional breeding for disease resistance. Ann. Rev. Phytopat., 23: 149-172.
- WERRY, P.S.Th.j., 1981. Induction by ionizing radioation of genetic markers for the development of *in vitro* genetic manipulation as a tool in crop plant improvement. In: Induced Mutations- A Tool in Plant Research. IAEA, Vienna, 373–382.
- WHITAKER, T.W., 1986. Squash breeding. In: Breeding Vegetables Crops (ed: Basset, J.M.). The AVI Publishing Company. Conneticut. 209–242.
- XUE, G. R., YU, W.Y., FEI, K.W., 1983. Watermelon Plants Derived by İn Vitro Anther Culture. Plant Physiology Commun.(CHN),4: 40–42
- VAN GEYT, J., KAMEYA, T., TAKAHASHI, N., 1987. *In vitro* induction of haploids plants from unpollinated ovary of *Robinia pseudoacacia*. Forest Sci. Technol. Linye Keji Tongxun 7: 5–6
- VURAL, H., EŞİYOK, D., DUMAN, İ., 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü. Bornova, İZMİR.
- YANG, H.Y., ZHOU, C., 1990. *In vitro* gynogenesis. (ed. Bhojwani, S.S), Plant Tissue Culture: Applications and Limtations. Elsevier Sci. Pub., Amstersam-The Netherlands.
- ZHANG, Y.X., LESPINASSE, Y., 1988. Culture in vitro d’ovules non fécondés et d’embryons prélevés 8 jours après pollinisation chez le pommer cultivé (*Malus x domestica* Borkh.). Agronomie, 8: 837-842.
- ZHANG, Y.X., LESPINASSE, Y., CHEVREAU, E., 1990. Induction of haploid in fruit trees. In: *In vitro* Culture and Horticultural Breeding. (eds: Janicks, J., Zimmerman, R.H.). Acta Horticulturae, 280: 293-305.
- ZHOU, C., YANG, H.Y. 1980. *In vitro* induction of haploid plantlets from un pollinated young ovaries *Oryza sativa* L. Acta Genet. Sin., 7: 287-288.
- ZHOU, C., YANG, H.Y., 1981. Induction of haploid rice plantlets by ovary culture. Plant Sci. Lett. 20: 231–237.
- ZHOU, C., YANG, H.Y., TIAN, H., LIU, Z., YAN, H., 1986. *In vitro* culture of unpollinated ovaries in *Oryza sativa* L. Haploids of Higher Plants *in vitro*, pp.

- 165–181. In: H. Hu and H. Yang (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- ZHU, Z.C., H.S. WU, 1979. In vitro production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabaccum*. Acta Genet. Sin., 6: 181-183.
- ZHU, Z.C., WU, H.S., AN, Q.K., LIU, Z.Y., 1980. In vitro induction of haploid plantlets by Tissue culture from the unpollinated ovaries of male-sterile line of *Nicotiana*. Hereditas, 2: 36.
- ZHU, Z.C., WU, H.S., AN, Q.K., LIU, Z.Y., 1981. Induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* cultured *in vitro*. Acta Genet. Sin., 8: 386-390.
- ZHU, Z.C. WU, H.S., 1981. Induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of *Nicotiana tabaccum* cultured in vitro. Acta Genet. Sin., 8: 63-65.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Bingöl’de doğdu. İlk, orta ve lise öğreniminin ardından, 1997 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü’nü kazanarak lisans öğrenimine başladı. 2001 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak mezun oldu. 2002 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalında girmiş olduğu sınavları kazanarak Yüksek Lisans öğrenimine başladı.