

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**HIYARDA (*Cucumis sativus* L.) GYNOGENESİS YOLUYLA HAPLOİD
EMBRYO ELDESİNİ ARTIRMAK ÜZERE DEĞİŞİK UYGULAMALARIN
ETKİSİ**

Hilal YURDAKUL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ

ANABİLİMDALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**HIYARDA (*Cucumis sativus* L.) GYNOGENESIS YOLUYLA HAPLOİD
EMBRYO ELDESİNİ ARTIRMAK ÜZERE DEĞİŞİK UYGULAMALARIN
ETKİSİ**

Hilal YURDAKUL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ

ANABİLİMDALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HIYARDA (*Cucumis sativus* L.) GYNOGENESİS YOLUYLA HAPLOİD
EMBRİYO ELDESİNİ ARTIRMAK ÜZERE DEĞİŞİK UYGULAMALARIN
ETKİSİ**

Hilal YURDAKUL
BAHÇE BİTKİLERİ
ANABİLİMDALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 24/06/2022 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ersin POLAT

Doç. Dr. Halime ÜNLÜ

ÖZET

HIYARDA (*Cucumis sativus* L.) GYNOGENESIS YOLUYLA HAPLOİD EMBRİYO ELDESİNİ ARTIRMAK ÜZERE DEĞİŞİK UYGULAMALARIN ETKİSİ

Hilal YURDAKUL

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilimi Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Haziran 2022; 34 sayfa

Bu çalışmada, hıyarda (*Cucumis sativus* L.) gynogenesis yoluyla haploid embriyo eldesini artırmak üzere değişik uygulamaların etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada üç farklı hıyar tipi (baby, mini, pickling), 4 farklı ortamda (C: CBM + 10/1 KINETİN:2,4-D + %3 süzkroz + %0,7 agar, CS: CBM + 10/1 KINETİN:2,4-D + %3 süzkroz + %0,7 agar + 50mg/L spermidin, CP: CBM + 10/1 KINETİN:2,4-D + %3 süzkroz + %0,7 agar + 50mg/L putresin, CSP: CBM + 10/1 KINETİN:2,4-D + %3 süzkroz + %0,7 agar + 50mg/L spermidin + 50 mg/L putresin) kültüre alınmıştır. Kültüre alınan ovaryumlar, 3 gün 35°C karanlıkta ardından 2 gün 24°C karanlıkta bekletilmiştir. Kültüre alınan ovaryumlar son olarak 9 gün boyunca 24°C aydınlıkta bekletilmiştir.

Kültüre alınan ovaryumlar 2 hafta süre sonunda MS + 4:1 (BAP:NAA) hormonlarıyla kombine olmuş rejenerasyon ortamına alınmıştır. Yaklaşık 3 hafta sonra ovaryumlar üzerinde oluşan embriyolar kayıt altına alınmıştır. Oluşan tüm embriyolar, içerisinde hormonsuz MS ortamı bulunan tüplere aktarılmıştır. Gelişimlerini tamamlayan sağlıklı embriyolardan haploid bitkicikler elde edilmiştir.

Denemede kullanılan 607 ovaryumdan 309 embriyo elde edilmiştir. En fazla embriyo oluşturan genotip 1260 numaralı genotip olmuştur. Sonuç olarak en fazla embriyo oluşturan ortam, CP: CBM + 10/1 KINETİN:2,4-D %3 süzkroz + %0,7 agar + 50mg/L putresin ortamı olmuştur ve toplamda 126 embriyodan oluşmuştur. Oluşan embriyolardan toplamda 106 bitki elde edilmiştir. En fazla bitki sayısı, CS: CBM + 10/1 KINETİN:2,4-D + %3 süzkroz + %0,7 agar + 50mg/L spermidin ortamından elde edilmiştir. 1259 numaralı genotip en fazla bitki eldesini sağlamıştır.

Besi ortamlarının genotiplere göre embriyo başarı durumları karşılaştırılmıştır. CP ortamında en fazla embriyo oluşturan genotip pickling'tir. C, CS ve CSP ortamlarında en fazla embriyo sayısını mini hıyar genotipi vermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Cucumis sativus* L., Gynogenesis, Hıyar, Haploid

JÜRİ: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ersin POLAT

Doç. Dr. Halime ÜNLÜ

ABSTRACT

EFFECT OF DIFFERENT APPLICATIONS TO INCREASING HAPLOID EMBRYO ACQUISITION THROUGH GYNOGENESIS IN CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.)

Hilal YURDAKUL

MSc Thesis in Horticulture Department
Prof. Dr. A. Naci ONUS

June 2022; 34 pages

In this study, the effect of different applications was investigated to increase the yield of haploid embryos by gynogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.).

In the study, three different types of cucumbers (baby, mini, pickling) were used in 4 different media (C: CBM + 10/1 KINETIN:2,4-D + 3% sucrose + 0,7% agar, CS: CBM + 10/1 KINETIN). :2,4-D + 3% sucrose + 0,7% agar + 50mg/L spermidine, CP: CBM + 10/1 KINETIN:2,4-D + 3% sucrose + 0,7% agar + 50mg/L putrescine, CSP: CBM + 10/1 KINETIN:2,4-D + 3% sucrose + 0,7% agar + 50mg/L spermidine + 50 mg/L putrescine) were cultured. The cultured ovaries were kept in the dark at 35°C for 3 days and then at 24°C for 2 days. The cultured ovaries were finally kept in 24°C light for 9 days.

The cultured ovaries were taken into the regeneration medium combined with MS + 4:1 (BAP:NAA) hormones after 2 weeks. After about 3 weeks, the embryos formed on the ovaries were recorded. All embryos formed were transferred to tubes containing hormone-free MS medium. Haploid plantlets were obtained from healthy embryos that completed their development.

309 embryos were obtained from 607 ovaries used in the experiment. The genotype that produced the most embryos was the genotype 1260. As a result, the medium that formed the most embryos was CP: CBM + 10/1 KINETIN:2,4-D 3% sucrose + 0,7% agar + 50mg/L putrescine medium and consisted of 126 embryos in total. A total of 106 plants were obtained from the resulting embryos. The maximum number of plants was obtained from CS: CBM + 10/1 KINETIN:2,4-D + 3% sucrose + 0,7% agar + 50mg/L spermidine medium. Genotype 1259 provided the highest plant yield.

Embryo success status of the medium was compared according to genotypes. The genotype that produces the most embryos in the CP environment is pickling. mini cucumber genotype gave the highest number of embryos in C, CS and CSP media.

KEYWORDS: *Cucumis sativus* L., Gynogenesis, Cucumber, Haploid

COMMITTEE: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ersin POLAT

Assoc. Prof. Dr. Halime ÜNLÜ

ÖNSÖZ

Ülkelerin ilk önceliği tarımdaki üretim materyallerini iyileştirmektir. Ülke kendi çeşidini kullanarak, ihracat yapabilir, üreticisinin ve tüketicisinin arz ve taleplerine cevaplar bularak daha iyi hizmet vererek kendi gelir düzeyini artırabilir. Ticari çeşitler yetiştirilmeli ve mevcut çeşitler geliştirilebilmelidir. Bitki çeşitlerinin iyileştirilmesi zamandan ve maliyetten tasarruf sağlamaktadır. Bitki biyoteknolojisi, bu gereksinimin varlığında ortaya çıkmış bir bilimdir. Haploid bitki üretiminin önemi zamanla giderek artacaktır.

Bu amaç doğrultusunda yürüttüğümüz çalışma hıyar ıslahı yapan işletmelere büyük yarar sağlamış olacak ve bilim dünyasına büyük katkı sağlayacaktır. Bu çalışma uygun haploid protokolü oluşturmaya yardımcı bilgiler sunarak, yaygınlaştırılması için katkı sağlamasını dilerim.

Bu konuda çalışmalarımı yönlendiren, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek yardımcı olan, sonuca ulaşmamı sağlayan değerli Danışman Hocam Prof. Dr. A. Naci ONUS'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Uzm. Biyolog Zehra Özgecan TANYOLAÇ YAZAN'a teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca maddi ve manevi destekleri ile daima yanımda olan ailem ve arkadaşlarıma sonsuz sevgilerimle...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. <i>Cucurbitaceae</i> Familyasında Haploidlerin Elde Edilmesinde Kullanılan Yöntemler.....	4
3. MATERYAL VE METOT.....	10
3.1. Materyal	10
3.2. Metot.....	10
3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilme Koşulları	10
3.2.2. Dişi Çiçeklerin Alınma Evresi	11
3.2.3. <i>In Vitro</i> Çalışmaları.....	12
3.2.3.1. Embriyo teşvik ortamlarının hazırlanması.....	12
3.2.3.2. Dişi Çiçeklerin Sterilizasyonu	14
3.2.3.3. Ovaryumların Besin Ortamlarında Kültüre Aktarılması.....	14
3.2.3.4. Hazırlanan Örneklerin Ön Uygulaması ve Kültür Koşulları	16
3.2.3.5. Bitki Rejenerasyon ve Sürgün Ortamı	17
4. BULGULAR.....	18
4.1. Genotip ve embriyo teşvik ortamlarına göre ovül tepkisi.....	18
4.2. Genotip ve embriyo teşvik ortamlarına göre embriyo gelişim durumu	18
4.3. Genotip ve embriyo teşvik ortamlarına göre embriyo sayısal bulguları.....	19
4.4. Genotip ve embriyo teşvik ortamlarına göre toplam bitki sayısal bulguları.....	19
4.5. Genotiplerin embriyo teşvik ortamlarına göre embriyo ve bitki oluşturma Oranı (%).....	20
4.6. Besi ortamlarına göre çalışmada kullanılan hıyar genotiplerinin toplam bitki sayısındaki başarı durumu (%).....	22

4.7. Besi ortamlarına göre çalışmada kullanılan hıyar genotiplerinin embriyo başarı durumu (%).....	23
4.8. Besi ortamlarına göre çalışmada kullanılan hıyar genotiplerinin embriyo başarı oranları (%).....	25
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇLAR	29
7. KAYNAKLAR.....	31
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Hıyarda (*Cucumis sativus* L.) Gynogenesis Yoluyla Haploid Embriyo eldesini Artırmak Üzere Değişik Uygulamaların Etkisi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

24/06/2022

Hilal YURDAKUL

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Co	: Kobalt
Gy	: Gray
%	: Yüzde
g	: Gram
g/L	: Gram/Litre
mg	: Miligram
mg/L	: Miligram/Litre
ppm	: Milyonda bir
n	: Haploid
2n	: Diploid
M	: Molar
μM	: Mikro molar

Kısaltmalar

CBM	: Cucumber basal medium
2,4-D	: Dichlorophenoxyacetic acid
MS	: Murashige ve Skoog Besi Ortamı
B5	: Gamborg Besi ortamı
BA	: 6-Benzylamin
BAP	: Benzylaminopurin
GA ₃	: Gibberellik asit
ABA	: Absisik asit
NAA	: α-naphthalene acetic acid
IAA	: Indolacetic acid
TDZ	: Thidiazuron
Spd	: Spermidin
Spm	: Spermine
PA	: Poliamin
Put	: Putresin
DH	: Double Haploid
KIN	: Kinetin
ELS	: Embriyo benzeri yapı
E20A	: Hıyar besi ortamı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Donör bitkilerin yetiştirilmesi	10
Şekil 3.2. Donör bitkilerin topraksız sera koşullarında yetiştirilmesi.....	11
Şekil 3.3. Donör bitkilerden alınmış olan ovaryumlar, a) mini, b) baby, c) pickling	11
Şekil 3.4. Sterilizasyon işlemi.....	12
Şekil 3.5. Ovaryumların kesim aşamaları, a) Meyvelerin süzdürülmesi, b) Ovaryumların soyulması ve 4 eşit parçaya bölünmesi, c) Ovaryumların kültüre alınma işleminin son bulması	13
Şekil 3.6. Yürütülen çalışmada kullanılan inkübatör	14
Şekil 3.7. Ovaryumların rejenerasyon ortamına ve sürgünlerin sürgün ortamına alınması	15
Şekil 4.1. Ovaryum içinde embriyo	16
Şekil 4.2. Embriyonun çimlenmesi sonucu oluşan bitkicik	16
Şekil 4.3. Besi ortamlarına göre mini hıyar genotipinde toplam bitki sayısındaki başarı durumu	20
Şekil 4.4. Besi ortamlarına göre pickling hıyar genotipinde toplam bitki sayısındaki başarı durumu	20
Şekil 4.5. Besi ortamlarına göre baby hıyar genotipinde toplam bitki sayısındaki başarı durumu	21
Şekil 4.6. Besi ortamlarına göre mini hıyar genotipinde embriyo başarı durumu	21
Şekil 4.7. Besi ortamlarına göre pickling hıyar genotipinde embriyo başarı durumu	22
Şekil 4.8. Besi ortamlarına göre baby hıyar genotipinde embriyo başarı durumu.....	22
Şekil 4.9. C ortamında embriyo başarı oranı	23
Şekil 4.10. CS ortamında embriyo başarı oranı	23
Şekil 4.11. CP ortamında embriyo başarı oranı	24
Şekil 4.12. CSP ortamında embriyo başarı oranı	24

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Temel besi ortamlarının kimyasal içerikleri.....	12
Çizelge 3.2. Denemede kullanılan ovaryum sayısı ve toplam kullanılan ovaryum sayısı (Adet).....	14
Çizelge 4.1. Besi ortamlarına göre oluşan toplam embriyo sayısı (Adet).....	17
Çizelge 4.2. Besi ortamlarına göre oluşan toplam bitki sayısı (Adet).....	18
Çizelge 4.3. Embriyo teşvik besi ortamlarının başarı durumu.....	19
Çizelge 4.4. Besi ortamlarına göre oluşan toplam bitki sayısındaki başarı durumu	19



1. GİRİŞ

Ülkelerin önceliklerinden biri tarımdaki üretim materyallerini iyileştirmektir. Ülkeler tarımsal ürün çeşitlerini kullanarak, ihracat yapabilir, üreticisinin ve tüketicisinin arz ve taleplerine cevaplar bularak daha iyi hizmet vererek kendi gelir düzeyini artırabilir. Ticari çeşitler üretilmeli ve mevcut çeşitler iyileştirilmelidir. Bitki çeşitlerinin geliştirilebilmesi hem zaman hem de maliyet açısından tasarruf sağlamaktadır. Biyoteknoloji bu ihtiyacın varlığında ortaya çıkmış bir bilim dalıdır. İslah çalışmalarında eskimiş klasik metotlar zaman kaybına neden olmakta ve bu sebeple maddi kaynaklar daha fazla tüketilmektedir.

Ülkemizde, ıslah çalışmalarında tohum üretimi yapılan araştırmaların, çok uzun bir sürede gerçekleşmesi, melez tohum üretiminin ekstra zaman alması ve zorluğu, farklı coğrafyalardan getirilen tohumların maddi, lojistik ve tedarik zorluğu nedenleri ve alışılmış standart ıslah yöntemleri ile zorlaşan sorunlara çözümler üreterek, daha kaliteli, daha verimli, daha ekonomik ve çok hızlı zamanda bitkisel üretimi gerçekleştirmek gayesiyle biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bitkisel doku kültürü, biyoteknolojik çalışmalar içinde ıslah yöntemlerinde kullanılan çalışmaların başında yer almaktadır. Bu yöntemle yeni çeşitlerin ıslahı daha verimli ve daha hızlı bir prosedür ile gerçekleştirilir. Biyoteknolojik yöntemlerle gerçekleştirilen çalışmaların haploid bitki oluşturmada önemli bir yeri vardır (Ercan vd. 1997).

Haploid bitki üretme uygulamalarını kullanan bir kuruluş, hızlı bir şekilde ürün çeşitlerini piyasaya sunabilir ve diğer firmalara oranla ticari faaliyetlerinde bir adım önde başlayabilir. Uzun yıllara yayılan çalışmalar neticesinde oluşan ıslah maliyetleri, kısa süre zarfında elde edilen bilgiler ışığında, temel hatlarla daha da azaltılabilir. Günümüzde ıslah çalışmaları Ar-Ge faaliyetleriyle geliştirilmektedir. İslah yöntemleri içinde gün geçtikçe yaygınlaşan haploid bitki teknolojisi yöntemleri, eskimiş geleneksel ıslah uygulamaları ile oluşturulması yıllarca süren, sınırlı bir genetik düzeydeki heterozigot bireylerin homozigot bireylere dönüştürülmesi işlemi yerine, çok kısa bir süre zarfında heterozigot bireylerden homozigot bireylerin oluşturulması sağlanmaktadır.

Somatik hücreleri “n” sayıda kromozomu bulunan bitkilere “haploid” adı verilmektedir (Pierik 1989, Şehirli ve Özgen 1988). Haploid bitkilerin boyları nispeten kısa, yapraklarının ve çiçeklerinin boyutları daha küçük ve çiçeklerin polen oluşturmamaları sebebiyle kısırdırlar, tohum oluşturmazlar (Emiroğlu 1980, Abak 1993, Çağlar ve Abak, 1999). Bu sebeple haploid bireylerin ıslah çalışmalarında kullanılabilmesi için kromozom sayıları katlanarak dihaploid durumuna getirilmeleri gerekmektedir. Ayrıca haploid bireylerin kromozom sayılarının katlanmasıyla %100 homozigot saf hatlar oluşturulabilmektedir. Böylelikle uzun bir sürece ihtiyaç duyan saflaştırma uygulaması, bir yıldan daha az bir sürede gerçekleştirilebilmekte; kombinasyon ıslahı ve F₁ hibrid çeşit ıslahı programlarında zaman yönünden büyük ölçüde tasarruf elde edilebilmektedir.

Bilim insanları ıslah faaliyetlerini önemli ölçüde geliştirebilmek amacıyla çalışmalarda bulunmuşlardır. Bu çalışmaların ışığında önemli kazanımlar elde edilmiştir. En büyük kazanım “F₁ Hibrid Gücü” olmuştur. Günümüzde F₁ hibrid gücü, verimdeki yükselişi ile bilim dünyasına önemli katkılar sağlamıştır (Akyüz 1988).

F₁ hibrid gücü, etki alanının çok geniş olması sebebi ile kısa bir süre sonra bahçe bitkilerinde de uygulanmaya başlanmıştır. Standart çeşitlerin yerini almaya başlayan F₁ hibrid tohumu günümüzde üretimi oldukça artmış ve düzenli olarak her sene yüzlerce yeni çeşitler piyasaya girmeye başlamıştır. Bu çeşitler birbirinden farklı özelliklere sahip olarak ekolojik istekleri, verimlilik, hastalık ve zararlılara dayanım gibi konuları incelemektedir (Akyüz 1988).

F₁ hibrid varyasyonlar ebeveynlerine göre daha üstün özelliklere sahiptirler (Macit 1972). Bunlar;

- Daha fazla toplam ve erkenci verim,
- Hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık,
- Yüksek adaptasyon kabiliyeti,
- Vejetasyon süresindeki artış,
- Yüksek kimyasal ve biyokimyasal içeriği,
- Yatmaya karşı dayanıklılık,
- Yüksek kalite ve
- Erkencilik gibi özelliklerdir.

Bitki koruma yöntem ve uygulamalarının yaygınlaşması, birim alandaki verimin yükseltilmesi, toprak verimliliğinin artırılması, yeni çeşitlerin ıslah çalışmaları ve üretim yöntemlerinin iyileştirmesine yönelik faaliyetler gerçekleştirilmektedir (Akman 1995).

Cucurbitaceae familyası türlerinden hıyar (*Cucumis sativus* L.), günümüzde en çok tüketilen sebzelerin başında gelmektedir. Hıyarda açık tozlanan çeşitlerin yanı sıra, hibrid çeşitler de geliştirilmiştir.

Bu çalışmada, hıyarda (*Cucumis sativus* L.) haploid embriyo ve bitki eldesini teşvik etmek için poliaminlerin etkisini belirleyerek, sağlıklı embriyo oluşturmaya amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

Hıyar bitkisinin kök uzunluğu 30-50cm'dir. Gövdesi güçlü olup sülükleri sayesinde tutunma özelliğine sahip ve birden fazla boğum ve boğum aralarından oluşmaktadır (Sevgican, 1999). Yapraklar spiral biçiminde dizilmiş ve basit yaprak şeklinde 3-5 loplu ya da köşelidir. Çiçekleri genellikle tek evciklidir nadiren de olsa erselik'tir. Bununla birlikte gynoik ve andromonoik çiçek çeşitleri de görülmektedir. Dişi çiçekli çeşitlerde, dölleme gerekliliğini ortadan kaldırmak amacıyla, günümüzde bazı çeşitlere ıslah metotları uygulanarak partenokarp özelliği kazandırılmıştır (Aybak ve Kaygısız, 2004). Erkek ve dişi çiçeklerin renkleri sarı olup, 5'er adet çanak ve taç yaprağa sahiptir. Erselik çiçek yapısında olan hıyar bitkilerinin çiçekleri ise dişi çiçek şeklindedir. Dişi çiçeklerin ömrü erkek çiçeklerin ömründen daha uzun olup 40-48 saat yaşar. Bu sebeple dölleme özelliğini korurlar. Tohumları sarıya yakın, beyaz renkte, basık, uzun ve oval biçimindedir (Aybak ve Kaygısız 2004).

Cucurbitaceae sebze türlerinin tabii olarak yabancı döllemeleri sebebiyle ıslah çalışmaları uzun yıllar almaktadır. Bu sürenin minimum seviyeye getirilmesi, seleksiyonu kolaylaştırması, ıslah veriminin yükseltilmesi gibi amaçlarla bu familya türlerinde de haploidi yönteminden faydalanılmıştır (Lower ve Edwards 1986).

Poliaminler, putresin (diamin), spermin (tetramin) ve spermidin (triamin) doğada yaygın olarak görülen başlıca polikasyonik doğal aminlerdir. Putresin ve spermidin nerdeyse bütün organizmalarda bulunurken, spermidin belirli ökaryotik hücrelerde yer almaktadır. Poliaminler (PA), bitki fizyolojisinin büyüme ve gelişim sürecinde önemli bir göreve sahiptir. Bitki hücrelerinde, bitki hormonlarından daha fazla miktarda bulunmaktadır. Hücre bölünmesi, embriyogenesis, köklenme, çiçeklenme ve polen tüpü gelişiminde poliaminlerin etkili olduğu bilinmektedir (Evans vd. 1989).

Farklı yoğunluklardaki donör bitkiler üzerine putresin, spermidin ve cycocel püskürtülerek önemli miktarda haploid embriyolar üretilmiştir. Spermidin (50mg) tam gelişmiş bitkilerde %100 rejenerasyona sebep olmuştur. Işınlanmış polen ile sonradan geliştirilmiş embriyoların fidelere dönüştürülmesinden sonra ovaryumlara uygulanan uygun seviyelerdeki putresin, spermidin ve cycocel *Cucumis sativus* L.' yi gynogenesisite başarıyı artırdığı gözlenmiştir (Ebrahimzadeh vd. 2018).

Mikrospor embriyogenezi üzerinde biberde (*Capsicum annuum* L.) üç farklı deney yapılmıştır. Birinci deneyde, soğuk (4°C) ve sıcak (32°C) ön uygulamalarında, Inspiration F₁, Mostat F₁ ve Magno F₁ çeşitlerin dahil olduğu üç tatlı biber genotipinin mikrospor embriyogenezi üzerine ısı şoku (7 gün boyunca 32°C) etkisi araştırılmıştır. İkinci deneyde, farklı yoğunluklarda putresin (0, 0,5, 1, 2 ve 5mg/L), uygulanmıştır. Üçüncü deneyde, farklı yoğunluklarda askorbik asidin (0, 20, 50, 100 ve 200mg/L) etkisi araştırılmış ve sonuçlar askorbik asidin (20 ve 50mg/L) uygulanmasının uygun olduğu görülmüştür. Mannitol besisi ve ısı şoku uygulaması sırasında (32°C) üretilen kotiledon embriyolarının sayısında ve bunların kontrol denemesine kıyasla rejenerasyon yeteneklerinde önemli bir iyileşmeye neden olmuştur. Sonuç olarak hem putresin hem de askorbik asidin uygun yoğunluklarda uygulanmasının, biberde mikrospor embriyogenezi üzerine olumlu etkisi olduğunu göstermiştir (Heidari vd. 2019).

Donör bitkilerinin, genotipleri, indüksiyonu, farklılaşma ortamları ve sıcaklık ön uygulaması gibi çeşitli faktörlerin etkileri, hıyarın polinlenmemiş bir ovaryum kültüründe embriyo benzeri yapı (ELS) ve kallus oluşumu üzerinde değerlendirilmiştir. Donör bitkisi olarak kullanılan beş hıyar çeşidinin hepsi ELS ve kallus üretmiştir, ancak ELS ve kallus oluşum potansiyeli önemli ölçüde değişmiştir. İndüksiyon ortamına 1mg/L thiadiazuron (TDZ) ve 1mg/L 6-benzilaminopurin (BA) eklenmesi, en yüksek ELS oluşum yüzdesiyle sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, en yüksek kallus oluşumu yüzdesi, 2mg/L BA, 0,5 mg/L indol-3-asetik asit (IAA), 1mg/L giberellik asit (GA_3) ve 32mg/L putresin içeren bir indüksiyon ortamında gözlenmiştir (%70,8). Aksine, farklılaşma ortamlarının hem ELS hem de kallus oluşum potansiyelleri üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Sıcaklık şok ön tedavisi etkisi yoktur. Bu sonuçlar, gelecekte hıyar iki katına çıkmış haploidlerin verimli üretimi için kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (Tantasawat vd. 2015).

3 farklı sakız ve siyah kabak çeşitleri kullanılarak, ovül kültüründe spermidin ve putresin uygulamalarının haploid bitki elde edilmesine etkileri araştırılmıştır. Araştırmada poliaminlerin etkisini görmek amacıyla Spd ve Put 40, 80 ve 160mg/L dozda ayrı ayrı ve her ikisi birlikte 80, 160 ve 320mg/L (1:1, v:v) dozlarında kullanılmıştır. Kontrol grubu sadece 5mg/L 2,4-D içermiştir. Kallus oluşum sonucuna göre Elida F_1 çeşidi sadece putresin ve sadece spermidin içeren ortamlarda, Roni F_1 çeşidi put + spd içeren ortamlarda kontrol grubuna oranla daha iyi sonuçlar vermiştir. Shakila F_1 spd ve put + spd içeren, Seyden F_1 sadece put içeren, Brillante F_1 put ve put + spd içeren, Chivas F_1 sadece put içeren ortamlarda da kontrol grubuna oranla daha iyi sonuçlar vermiştir. Genel olarak en iyi kallus gelişim oranı 40mg/L put içeren ortamda görülmüştür (Kara ve Sarı 2019).

"Calypso" ve "Green Long" hıyar çeşitlerinde poliaminlerin (putresin ve spermidin; 5-1000 μ M) androjeniz üzerindeki etkileri çalışılmıştır. 2,0 μ M 2, 4 diklorofenoksiasetik asit (2, 4-D), 1,0 μ M 6-benziladenin (BA) ve 0,25 M sükröz uygulamalarının embriyogenez oranını artırdığı ve spermidinin 200 μ M dozunda optimum yanıt (sırasıyla 60 'Calypso' ve 'Green Long' anter başına 90,66 ve 100,33 embriyo) gözlemlenmiştir. Putresin ve spermidin uygulamalarının daha yüksek konsantrasyonları (500 veya 1000 μ M), embriyogenez üzerinde olumlu bir etki göstermemiştir. Embriyo farklılaşması, 0,25 μ M α -naftaleneasetik asit (NAA), 0,25 μ M kinetin (Kn) ve 0,09 M sükröz ile desteklenen B5 ortamında elde edilmiştir. Farklılaşmış embriyoların 0,09 M sükröz ve 10 μ M absisik asit (ABA) içeren olgunlaşma ortamına aktarılması, embriyoların olgunlaşmasıyla sonuçlanmıştır. Olgun embriyolar, 0,09 M sükröz içeren çimlenme ortamında bitkicikler halinde gelişme göstermiştir. 200 μ M spermidin içeren indüksiyon ortamında anterlerden geliştirilen embriyolar maksimum rejenerasyon etkinliği göstermiştir (Kumar ve Murthy 2004).

2.1. Cucurbitaceae Familyasında Haploidlerin Elde Edilmesinde Kullanılan Yöntemler

Hıyar (*Cucumis sativus* L.)'da son 30 yılda, ışınlanmış polen, döllenenmemiş ovül/ovaryum kültürü ve anter/mikrospor kültürü ile *in vitro* tozlaşma ve ana faktörlerinin kapsamlı analizi ile haploidler ve double haploidler üzerine çalışmalar araştırılmıştır. Bitki ıslahı ve genetiğinde double haploidlerin uygulanmasına özel olarak odaklanarak kromozom katlama ve ploidi tanımlama yöntemleri arasındaki süreç karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmada, kabakgil türlerinde androgenesis, gynogenesis ve parthenogenesis etkinliğini etkileyen mevcut sorunları bildirilmiştir (Dong vd. 2016).

Cucumis sativus L. anter kültüründe şekerlerin ve amino asitlerin embriyogenez ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Calypso ve Green Long çeşitleri incelenmiştir. En iyi embriyo indüksiyonu sükröz 0,25 M'de olmuştur. 60 Calypso ve Green Long anterinde sırasıyla maksimum 72 ve 80 embriyo, embriyo indüksiyon ortamında (B5) 0,25 M sükröz içeren 2,0µM 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 1,0µM 6-benziladenin (BA) ile desteklenmiştir. Amino asitlerin embriyo indüksiyon ortamına eklenmesi, en iyi yanıtı veren her bir 1,0mM amino asidinin (glutamin, glisin, arginin, asparagin ve sistein) kombinasyonu ile embriyo verimini iyileştirmiştir. Embriyo farklılaşması 0,25µM α-naftaleneasetik asit (NAA), 0,25 kinetin (KIN) ve 0,09 M sükröz ile desteklenen B5 ortamında gerçekleştirilmiştir. Embriyolar, absisik asit (ABA) (10µM) ve 0,09 M sükröz ile desteklenmiş B5 ortamında geliştirilmiştir. Amino asitlerin bir kombinasyonu (her biri 1,0mM olan glutamin, glisin, arginin, asparagin ve sistein) ile desteklenen B5 ortamında gelişen embriyolar, en yüksek bitkicik rejenerasyon sıklığını sergilemiştir (Kumar ve Murthy 2004).

Etkili bir hıyar (*Cucumis sativus* L., $2n = 2x = 14$) anter kültür protokolü geliştirmek için altı farklı deneme gerçekleştirilmiştir. Ekotipe bağlı olan uygun sıcaklık stresi, yani soğuk bölgelerden gelen hıyarlar soğuk uygulamaya iyi yanıt verirken, ılıman bölgelerden gelenler ısı işleme iyi yanıt vermiştir. Embriyonik kallus indüksiyonu için en iyi ortam, 4,44µM BA, 2,26µM 2, 4-D, 4,64µM, KIN %3 sakkaroz ve %0,8 agar ile desteklenen MS ortamı olmuştur. Embriyo indüksiyonu için, 0,54µM NAA, 13,32µM BA, %3 sakkaroz ve %0,8 agar ile desteklenen MS ortamı optimal ve embriyo çimlenmesi için 2,22µM BA, %6 sükröz ve %1,2 agar içeren MS ortamı en iyi sonuç vermiştir. Bu protokolü kullanarak, 16 genotipten kallus üretilmiştir. Anter başına 42 DH (%93 başarı) elde edilmiştir. Mikrosporlardan rejenerantların kaynağı sitolojik, morfolojik ve AFLP analizleri ile belirlenmiştir (Song vd. 2007).

Hıyarın üç genotipinde, iki Beith alfa F₁ hibridinde (BT1 ve BT2, gynoecious) ve Dastgerdi'de çeşidinde (DTG, monoecious) erkek çiçek indüksiyonu ve androgenezi değerlendirilmiştir. Gynoecious hıyar çeşitlerinde erkek çiçeklerin indüksiyonu, ilk gerçek yaprak oluşumundan sonra AgNO₃ (3mM), GA₃ (1,5mM) ve CoCl₂ (3mM)'nin tek ve kombinasyonlu püskürtülmesi ile değerlendirilmiştir. Uygulamaların başlangıcından 6 hafta sonra çeşitlere AgNO₃, GA₃ ve CoCl₂ püskürtülmüştür. Üç çeşit arasında DTG, embriyogenik kallus oluşumunun en yüksek yüzdesini (%62,2) ve anter başına embriyo sayısını (1,81) göstermiştir. GA₃ ile muamele edilmiş bitkilerin anterlerinde embriyogenik kallus oluşum yüzdesi (%27,1) ve anter başına embriyo sayısı (0,23), AgNO₃ ile uygulanan bitkilerde önemli ölçüde daha yüksek olmuştur. Rejenerantların sitolojik ve SSR markör analizi, 16 bitkinin kendiliğinden çift haploid olduğunu, 2 bitkinin diploid olduğunu ve bir bitkinin tetraploid olduğunu göstermiştir (Amirian vd. 2020).

2 farklı hıyar genotipi üzerinde daha önce yapılmış olan anter kültürü çalışmalarını, daha verimli hale getirmek için farklı denemeler kurulmuştur. Potansiyel ve anter duvar dokusu proliferasyonunun etkisi araştırılmıştır. 4°C'de bir tomurcuk ön işlemi, anterlere 35°C'lik bir işlem, BAP ve 2,4-D ile kültür ve ek bir 35°C işlem ve ardışık kültür ile kallus morfogenezinin indüksiyonunu içeren DH bitkileri üretmek için bir yöntem

geliştirilmiştir. Birinci genotip sıvı ortamda karanlıkta, ikinci genotip katı ortamda ışıkta, anter duvar dokularının proliferasyonu, kültür ortamındaki anterlerin oryantasyonu ve başlangıç anter kültür ortamının büyüme düzenleyici bileşimi gibi faktörlerin de dikkate değer bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Kromozom ikiye katlama oranı (%81), ek kromozom ikiye katlama adımlarını dışlayacak kadar yüksek olmuştur. Sonuç olarak, androenez geleneksel gynogenesis ve parthenogenesis temelli yaklaşımlara göre geliştirilebilir ancak yine de daha uygun bir alternatif olarak sunmaktadır (Asadi vd. 2018).

Dişi ovaryum ve ısı uygulamasının gynogenesis indüksiyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Besi ortamına thidiazuron eklenerek, karanlıkta 24°C, 28°C ve 35°C'de 2-5 gün kültürde bekletilmiştir. α -naftalin asetik asit ve 6-benzilaminopurin hormonu içeren rejenerasyon ortamına ovaryumlar aktarılmıştır. Isı uygulamasının ovaryumun optimal gelişim evresinde gynogenesisin indüksiyon etkinliğini artırmıştır. En yüksek embriyo sayısı, 35°C sıcaklık uygulamasından sonra meydana gelmiştir. Maksimum gynogenesis sıklığı %18,4 iken, maksimum bitki rejenerasyonu %7,1'dir. Flow sitometri analizi, rejenerantların %87,7'sinin haploid olduğunu göstermiştir (Gemes vd. 2002).

Hıyar (*Cucumis sativus* L.)'da TDZ içeren CBM kültür ortamına $AgNO_3$ eklenmiştir. Yüksek indüksiyon frekansları (%7,85-125,14), anthesis sırasında ve 0,03-0,07mg/L TDZ'de, polinlenmemiş ovüller bulunmuştur. Histolojik analiz, embriyo keselerinin, anthesis sırasında tamamen geliştiğini göstermiştir. Ayrıca, en yüksek bitki rejenerasyon oranı, 0,05mg/NAA, 0,2mg/L BAP ve 5-10mg/L $AgNO_3$ ile takviye edilmiş CBM'de elde edilmiştir. Flow sitometri analizi, rejenerat bitkilerin %80'inin haploid olduğunu göstermiştir. Histolojik mikrograflar ve ploidi seviye analizleri, polinlenmemiş ovüllerden embriyoların başlamasını, gelişmesini ve çimlenmesini açıkça ortaya koymuştur (Li vd. 2013).

Donör bitkilerin genotiplerinin ve kültür ortamının üç aşamasının etkileri, iki kat haploid için kültür ortamının en iyi kombinasyonunu elde etmek için polinlenmemiş ovaryum hıyar (*Cucumis sativus* L.) kültüründe değerlendirilmiştir. İnatçı çeşitlerin üretimi, embriyo benzeri yapı (ELS) oluşumu, farklılaşma ve rejenerasyon ortamından önemli ölçüde etkilenmiştir. ELS oluşumu yüzdeleri %59,89'dur. Bununla birlikte, genotipler ve indüksiyon ortamının ELS ve kallus oluşumu üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. ELS, üçüncü aşama kültür ortamında bitkiler elde edilmiştir. Toprağa alındıktan sonra hayatta kalan 10 bitkiden 3'ü haploid, 1'i triploid ve 6'sı diploiddir. Bu sonuçlar gelecekte hıyardaki DH'lerin üretimi için yararlı olduğu düşünülmüştür (Sorntip vd. 2017).

Nisan'dan ekim'e kadar 'Arizona' misk kavunu ile yapılan denemeler, sezonun haploid üretim oranı üzerinde büyük bir etkisi olduğunu göstermiştir. En iyi sonuçlar, 100 tohum başına ortalama 3 haploid embriyo ile 16 haziran'dan 15 eylül'e kadar yaz aylarında elde edilmiştir. Farklı coğrafi bölgelerden gelen genotipler haploid embriyolar üretmiştir (Sauton 1988).

Haploidlerin hıyar (*Cucumis sativus* L.) yetiştiriciliğinde kullanılmasını engelleyen en önemli faktör, büyük ölçekte üretimleri için etkili bir yöntemin bulunmamasıdır. Etkili bir çift haploid üretim sisteminin geliştirilmesi ve bunun kabakgillerin yetiştirme programlarında daha fazla uygulanması, çeşit geliştirme için gereken zamanı azaltabilir

(Sauton, 1988). Sauton, ana bitkilerin ekilmesinden 36 hafta sonra parthenogenetik olarak türetilmiş double haploid tohumlarının elde edildiği kavun bitkilerinde deneysel bir dihaploidizasyon sürecini tanımlamıştır (Przyborowski vd. 1996).

Haploid embriyoların kolay, hızlı, ekonomik ve etkili bir şekilde elde edilmesi amaçlanmıştır. Dört farklı yöntem, kontrol olarak tohumlardan embriyoların tek tek çıkarılması, tohumların ışık altında incelenmesi, tüm tohumların katı besin ortamında kültürlenmesi ve tüm tohumların sıvı besin ortamında kültüre alınması uygulanmıştır. Kullanılan bitki materyali, *Fusarium oxysporum*'un farklı ırklarına dayanıklıdır. Bahsedilen bitki materyali, duyarlı CU 252 Kırkağaç genotipinden BC4 nesli ve dirençli CUM 334 melezidir. Plastik bir sera altında yetiştirilen bitkiler 2008 ilkbaharında 300 Gray gama ışını ile ışınlanan polenlerle tozlaşmıştır. Çalışma sonucunda meyve başına en yüksek embriyo sayısı 7,7 olarak kontrol yönteminden elde edilmiştir. Tüm tohumlar ortamda 6,8, ışık altında ise 5,7 olarak tüm tohumların kültürlenmesi izlenmiştir. Bununla birlikte, bu üç yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Sıvı besleyici ortamda tüm tohumların kültürlenmesinde embriyo gelişimi görülmemiş, ancak yüksek enfeksiyon sorunu görülmüştür. Zamanlama ile farklı yöntemler değerlendirildiğinde, en iyi yöntemlerin tüm tohumları besin ortamında kültüre almak olduğu görülmüştür (Baktemur vd. 2010).

Çalışmada kullanılan sekiz genotipin hepsinden haploid ve double haploid bitkiler elde edilmiştir. Donör bitki genotipleri, her genotipten elde edilen haploid embriyo ve DH bitkilerinin sayısı karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Donör bitki genotipinin ve yaşının DH bitkilerinin rejenerasyonu ve verimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve etkili olduğu bulunmuştur (Galazka vd. 2015).

35°C'de sıcaklık ön muamele süresi, TDZ ve gümüş nitrat konsantrasyonları gibi faktörlerin, çeşitli hıyar (*Cucumis sativus* L.) ovaryum kültüründe embriyo oluşumu üzerindeki etkileri açısından araştırılmıştır. Sonuçlar, kültürün başlangıcında 35°C'de 3 gün boyunca bir termal şokun, 2 veya 4 günden daha yüksek embriyo oluşumu sıklığı ile sonuçlandığını göstermiştir. TDZ'nin embriyo oluşumu üzerinde olumlu bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. En yüksek embriyo oluşum oranı (%72,7) indüksiyon ortamına 0,04mg/L TDZ ilave edilerek kaydedilmiştir. Sonuçlar, indüksiyon ortamına AgNO₃ ilave edilmesinin embriyo oluşumu sıklığı üzerinde önemli bir etkisi olmadığını, ancak embriyo filizlenme süresinin kıaldığını ve her ovaryum diliminde oluşan embriyo sayısının artırdığı bulunmuştur. Tüm uygulamalar ovaryum kültürüne iyi yanıt vermiştir. Elde edilen 40 rejenerant bitki arasında 2 adet haploid bitki, 5 adet tetraploid bitki ve geri kalanı diploid bitki olarak bulunmuştur. Mikrosatellit markörleri (SSR) kullanılarak elde edilen bitkilerin homozigotluğu analiz edilmiştir. 33 diploid bitkiden 17'si (%51,5) double haploid olarak tanımlanmıştır (Diao vd. 2009).

6 adet F₁ hıyar (*Cucumis sativus* L.) ovaryumları, farklı konsantrasyonlarda (0, 0,01, 0,02, 0,03 ve 0,04mg/L) TDZ içeren katı MS ortamında kültüre alınmıştır. En fazla embriyogenez başarısı, 0,04mg/L TDZ içeren MS ortamında, summerstar çeşidinden elde edilmiştir. Sonuç olarak, TDZ'nin embriyo oluşumu üzerinde olumlu bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Moqbeli vd. 2013).

Çalışmada hıyarda ışınlanmış polenlerle *in situ* uyartım sonucu elde edilen değişik gelişme safhalarındaki haploid embriyolar *in vitro* kültüre alınarak bitkiye

dönüştürülmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, 1992–1994 yılları arasında yılın değişik mevsimlerinde dört değişik hıyar genotipinden elde edilen embriyolar steril koşullar altında E20A ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır. Embriyoların bitkiye dönüşüm oranları ile bitkiye dönüşme süreleri ve elde edilen bitkiciklerin *in vitro* gelişimleri, *in vitro* klonlamayla çoğaltım olanakları ve çoğaltım katsayıları incelenmiştir. Meyve başına haploid bitki sayısı çok yüksek olmamakla beraber, iki yılın sonunda 4 genotipten toplamda 190 adet haploid bitki elde edilmiştir (Çağlar ve Abak, 1999).

Düşük dozlarda (0,2 ve 0,3), y ışınlarının (Co kaynağı) hıyarlar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. İncelenen tüm formlar tarafından üretilen toplam embriyo sayısı arasındaki fark en fazla izole embriyo sayısı Gy-3 M ve BxOg (sırasıyla 111 ve 188) hibridlerinden elde edilmiştir, bitki rejenerasyonunun %3,3 olduğu tahmin edilmiştir. İkinci denemede mümkün olan en düşük ışınlama dozunu bulmak için 1 melez üzerinde 4 doz (0,1, 0,2, ve 0,3 kGy) denenmiştir. Sonuç olarak sadece diploid embriyolar üretilmiştir ve bitki rejenerasyonu %7,7'dir. 0,1 kGy'nin daha fazla sayıda haploid embriyo gelişimini teşvik ettiği gözlemlenmiştir (Faris vd 1999).

500 Gy'de bir Co-ışını kaynağı ile ışınlanmış polen ile tozlaşma yoluyla partenogenik embriyoların uyarılması, partenogenik embriyoların *in vitro* olarak kurtarılması; hıyar ve kavun SSR markerleri kullanılarak homozigot bitkilerden istenmeyen zigotik bireylerin ayırt edilmesi; flow sitometrisi ile homozigot bitkilerden ploidi seviyesinin belirlenmesi; haploidlerin *in vitro* kromozom ikiye katlanmış olması ve seçilen hatların adaptasyonu ve kendileme yapılmasını içermektedir. Bazı sınırlayıcı faktörlere rağmen, partenogenez rutin olarak bir nesilde tam homozigotluk elde etmek için hıyar ıslah programında kullanılmaktadır (Claveria vd. 2005).

Cucurbitaceae familyasında *in vitro* androgenesis çalışmalarında çoğunlukla kallus elde edilmiştir. Yürütülen bu çalışmaların sonucunda az sayıda haploid bitki elde edilmiştir (Galazka ve Niemirowicz-Szczytt 2013).

Bu çalışmada hıyar anterleri %8 sükröz içerikli MS + 100mg/L serin, 800mg/L glutamin ve çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri (2,0mg/L 2,4- D ve 1,0 mg/L BA; 1,0mg/L 2,4-D ve 0,5mg/L BA; 0,4mg/L 2,4-D ve 0,2mg/L BA) ile modifiye edilmiş kültür ortamlarına alınmıştır. Çalışma sonucunda kallus oluşumu saptanmıştır (Suprunova ve Shmykova 2008).

Hıyar anter kültüründe farklı genotip ve BBD'lerin kombinasyonlarının, kallus ve gametik embriyo oluşum üzerine etkisi araştırılmıştır. Yürütülen bu çalışmada 1,5µM (mikromolar) kinetin ile 2µM 2,4-D'nin kombinasyonunda en yüksek kallus oluşumunu, 2µM 2,4-D ile 1,0µM BAP'ın (Benzilaminopurin) kombinasyonunda ise anter başına düşen en yüksek embriyo oluşumu elde edilmiştir (Hamidvand vd 2013).

Lazarte ve Sasser (1982) hıyar (*Cucumis sativus* L.) anterlerinin *in vitro* kültürünü gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda kallus gelişimini takiben embriyo oluşumu ve organogenesisin meydana geldiğini ancak haploid bitki elde edemediklerini bildirmişlerdir.

Kavunda (*Cucumis melo* L.) organogenesis ve haploidinin teşviki amacıyla anter ve ovül kültürü araştırılmıştır. Araştırmacılar, ovülleri plasenta ile birlikte kültüre alarak

haploid kallus oluřturmuř ve bunlardan da bir adet haploid bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir (Dryanovska ve Ilieva 1983).

Kumar vd. (2003) hıyarda (*Cucumis sativus* L.) anter kültüründe iek tomurcuklarına soğuk n uygulaması üzerine yaptıkları çalışmada, en yüksek embriyogenik kallus oranının 2 gün soğuk uygulamasından sonra (%54,4) oluştuğunu ve bitki elde edemediklerini bildirmişlerdir.

Hıyar (*Cucumis sativus* L.) anterleri üzerine yürütülen çalışmada, MS ortamına 6mg/L 2,4-D ve 100g/L sükroz kombinasyonu kullanılmıştır. Yürütülen alışma sonucunda oluşan kalluslar 0,05mg/L kinetin ve NAA (α -naftalin asetik asit) MS ortamına aktarılmış ve 2,6 bitki/anter elde edilmiştir (Mohamed ve Refaei 2004).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma 2019-2020, Eylül – Eylül tarihleri arasında özel bir şirkette gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

Haploid embriyo oluşum oranı, türlere ve tür içinde de genotiplere göre değişiklik gösterdiği daha önce yapılmış olan çalışmalarda bildirilmektedir. Çalışmada kullanılacak materyal mini, baby ve pickling hıyar tiplerinden 3'er genotip olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan genotipler sırasıyla 1132, 1140, 1142, 1252, 1259, 1260, 1267, 1271 ve 1273 olarak belirlenmiştir.

Mini: Örtü altı sera yetiştiriciliğine uygun, orta-güçlü boğum arası ve yeşil hafif damarlı meyve'dir.

Baby: Parlak, kaliteli meyve, erkenci, güçlü bitki yapısı, raf ömrü uzun ve ihracata uygundur.

Pickling: Boğumda tekli meyve, erken koltuk verir, koltuk verimi yüksek, sert meyve, ihracata uygun, raf ömrü uzun ve meyve renginde açılma yapmaz.

3.2. Metot

Bu çalışmada, hıyarda (*Cucumis sativus* L.) haploid embriyo ve bitki eldesini teşvik etmek için poliaminlerin etkisini belirleyerek, sağlıklı embriyo oluşturması amaçlanmıştır. Embriyo teşvik ortamları; kontrol(C), spermidin(CS), putresin(CP), spermidin + putresin(CSP) olmak üzere toplamda 4 besi ortamından oluşmaktadır.

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilme Koşulları

Topraksız (kokopit) sera koşullarında, hastalık ve zararlılardan uzak bir şekilde donör bitki yetiştirilmiştir.



Şekil 3.1. Donör bitkilerin yetiştirilmesi



Şekil 3.2. Donör bitkilerin topraksız sera koşullarında yetiştirilmesi

3.2.2. Dişi Çiçeklerin Alınma Evresi

Bu çalışmada kullanılacak genotipler belirlendikten sonra ilk ovaryum oluşumundan itibaren, son ovaryum oluşumuna kadar ki tüm ovaryumlar anthesisten (çiçek açma) 1 gün önce toplanmıştır.



Şekil 3.3. Donör bitkilerden alınmış olan ovaryumlar; a) baby; b) pickling; c) mini

3.2.3. *In Vitro* Çalışmaları

3.2.3.1. Embriyo teşvik ortamlarının hazırlanması

Haploid çalışmalarında öncelikli amaç, embriyo teşviki için uygun hormon konsantrasyonu ve besi ortamının belirlenmiş olmasıdır. Dört farklı besi ortamı kültüre alınmıştır. Her bir besi ortamına, aynı oranda hormon konsantrasyonu hazırlanmıştır. Besi ortamlarının içerikleri;

C: CBM + 10/1 KINETIN:2,4-D + %3 sükröz + %0,7 agar (Kontrol)

CS: CBM + 10/1 KINETIN:2,4-D + %3 sükröz + %0,7 agar + 50mg/L spermidin

CP: CBM + 10/1 KINETIN:2,4-D + %3 sükröz + %0,7 agar + 50mg/L putresin

CSP: CBM + 10/1 KINETIN:2,4-D + %3 sükröz + %0,7 agar + 50mg/L spermidin + 50mg/L putresin

Çizelge 3.1. Temel besi ortamlarının kimyasal içerikleri

Makro ve Mikro Bileşikler	MS mg/L	CBM mg/L
KNO ₃	1.900	950
NH ₄ NO ₃	1.650	450
CaCl ₂	332,02	160
MgSO ₄	180,54	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	180
KH ₂ PO ₄	170	75
KI	0,83	0,7
H ₃ BO ₃	6,2	4
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	20
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,016
CoCl ₂ .H ₂ O	-	0,016
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	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
FeNaEDTA	36,7	-
Myo- İnositol	100	80
Thiamine	0,1	1
Nicotonic-acid	0,5	1
Pyridoxine	0,5	2
Glycine	2	0,1
Ca-pantothenate	-	0,5
Biotin	-	0,05
Sakkaroz	30.000	30.000
Plant Agar	7.000	7.000

pH'sı 5,9 olarak ayarlanan besin ortamları 20 dakika 121°C otoklavda sterilize edilerek steril kabin içerisinde 60mm çapındaki petrilere eşit miktarlarda pay edilmiştir. Soğumaya bırakılan besi ortamları kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kültüre alınan ovaryumlar 3 gün 35°C karanlıkta, devamında 2 gün 24°C karanlıkta tutulmuştur. En son olarak petrilere 9 gün boyunca 24°C aydınlıkta bekletilmiştir.

3.2.3.2. Dişi Çiçeklerin Sterilizasyonu

Anthesisten 1 gün önce toplanan ovaryumlar %3'lük (NaClO) çözelti içerisinde 18 dakika bekletilmiştir, durulanmak üzere steril saf su ile 3 defa durulama işlemi yapılmıştır.

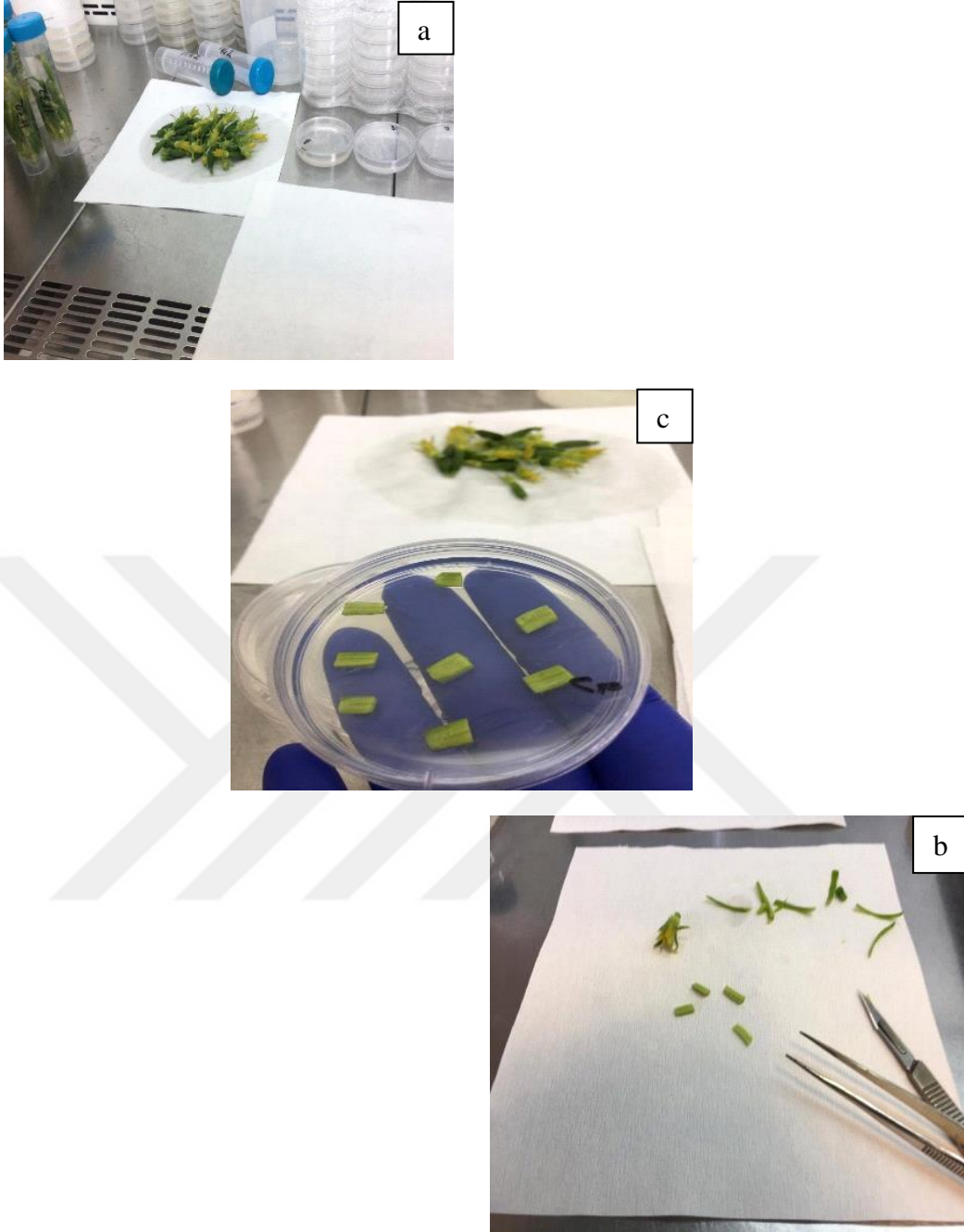


Şekil 3.4. Sterilizasyon işlemi

3.2.3.3. Ovaryumların Besin Ortamlarında Kültüre Aktarılması

Sterilizasyonu bitmiş ovaryumlar süzdürüldükten sonra filtre kağıdının üzerine alınmıştır. Steril pens ve bistüri yardımı ile ovaryumun dış kabuğu soyulmuş ve enine boyuna her bir ovaryum 4 eşit parçaya bölünerek ovüller üstte kalacak şekilde petri kaplarına yerleştirilmiştir.

Embriyo teşviki için kurulan denemelerde toplam 607 adet ovaryum kültüre alınmıştır.



Şekil 3.5. Ovaryumların kesim aşamaları; **a)** meyvelerin süzdürülmesi; **b)** Ovaryumların soyulması ve 4 eşit parçaya bölünmesi; **c)** ovaryumların kültüre alınma işleminin son bulması

Çizelge 3.2. Denemede kullanılan ovaryum sayısı ve toplam kullanılan ovaryum sayısı (adet)

ORTAMLAR VE ORTAMA KOYULAN OVARYUM SAYISI					
Denemede Kullanılan Ovaryum Sayısı (Adet)					
GENOTİP	KONTROL	CS	CP	CSP	TOPLAM OVARYUM
1132	8	12	12	14	46
1140	7	9	7	9	32
1142	8	16	13	14	51
1252	20	21	20	20	81
1259	20	23	22	23	88
1260	21	25	23	25	94
1267	17	19	18	18	72
1271	18	21	22	21	82
1273	15	16	16	14	61
Toplam	134	162	153	158	607

3.2.3.4. Hazırlanan Örneklerin Ön Uygulaması ve Kültür Koşulları

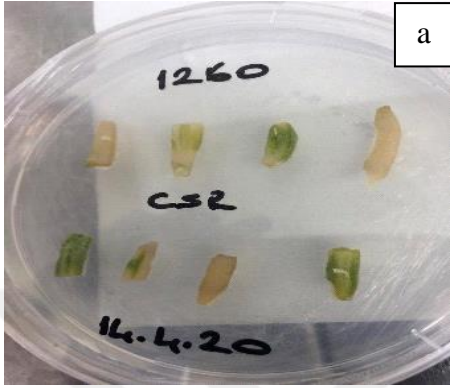
Ovaryumlar besi ortamına alındıktan sonra 3 gün 35°C de karanlık inkübatörde bekletilmiştir. İklim odasına alınan ovaryumlar 2 gün 24°C karanlıkta bekletilmiştir. Karanlıkta bekletilen ovaryumlar 9 gün boyunca 24°C 16 saat aydınlık/8 saat karanlık periyotta, 3000 lüx'lük floresan lambalar (beyaz gün ışığı) altında iklimlendirme koşullarına alınmıştır.



Şekil 3.6. Yürütülen çalışmada kullanılan inkübatör

3.2.3.5. Bitki Rejenerasyon ve Sürgün Ortamı

2 hafta sürenin ardından kültüre alınan ovaryumlar MS + 4:1 (BAP: NAA) hormonlarıyla kombine olmuş rejenerasyon ortamına alınmıştır. Yaklaşık 3 hafta sonra ovaryumlar üzerinde oluşan embriyolar kayıt altına alınmıştır. Oluşan tüm embriyolar, içerisinde hormon bulundurmayan MS ortamı bulunduran tüplere aktarılmıştır. Sağlıklı gelişen embriyolardan haploid hıyar bitkicikleri elde edilmiştir.



Şekil 3.7. Ovaryumların rejenerasyon ortamına ve sürgünlerin sürgün ortamına alınması; **a)** Ovaryumların rejenerasyon ortamına alınması; **b)** Sürgün oluşumu; **c)** Tüplere alınmış olan bitkicik

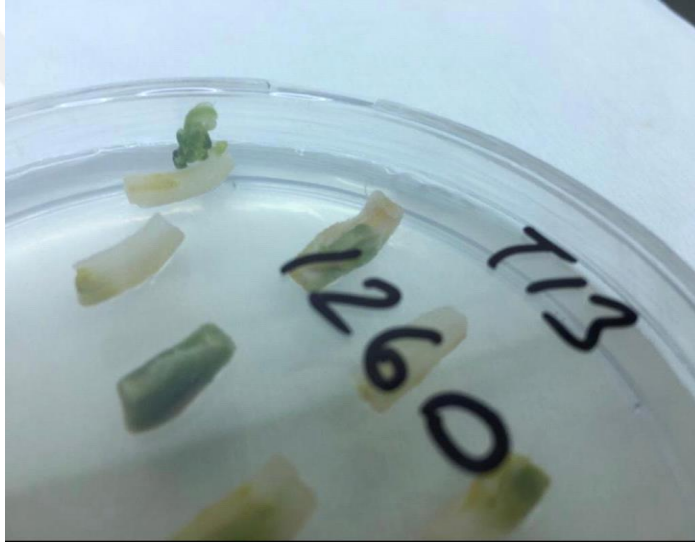
4. BULGULAR

4.1. Genotip ve embriyo teşvik ortamlarına göre ovül tepkisi

Bu çalışmada kullanılan ovaryumlar kültüre alındıktan sonra 3 gün 35°C'de karanlık inkübatörde bekletilmiştir. İklim odasına alınan ovaryumlar 2 gün 24°C karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra ovaryumlar 9 gün boyunca 24°C'de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık periyotta bekletilmiştir. Ovaryumlarda kallus oluşumu ve ovül şişkinlikleri gözlemlenmiştir.

4.2. Genotip ve embriyo teşvik ortamlarına göre embriyo gelişim durumu

Embriyolar gelişim sürecinde değişiklikler göstermiştir. Bazı embriyoların gelişimi doğrudan seçilebilirken, bazı embriyoların gelişimi ise ovaryum içerisinde olmuş ve bitkiye dönüşmüştür.



Şekil 4.1. Ovaryum içinde embriyo



Şekil 4.2. Embriyonun çimlenmesi sonucu oluşan bitkicik

4.3. Genotip ve embriyo teşvik ortamlarına göre embriyo sayısal bulguları

Denemede kullanılan 607 ovaryumdan 309 embriyo elde edilmiştir. En fazla embriyo oluşturan genotip 1260 numaralı genotip olmuştur (Çizelge 4.1). Sonuç olarak en fazla embriyo oluşturan ortam, CP: CBM + 10/1 KINETİN:2,4-D + %3 sükröz + %0,7 agar + 50mg/L putresin ortamı olmuştur ve toplamda 126 embriyodan oluşmuştur. Oluşan embriyolardan toplamda 106 bitki elde edilmiştir. En fazla bitki sayısı, CS: CBM + 10/1 KINETİN:2,4-D + %3 sükröz + %0,7 agar + 50mg/L spermidin ortamında oluşmuştur. En fazla bitki sayısını 1259 numaralı genotip oluşturmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. Besi ortamlarına göre oluşan toplam embriyo sayısı (adet)

GENOTİP	Kontrol	CS	CP	CSP	Toplam Embriyo (adet)
1132	3	2	8	0	13
1140	0	0	0	0	0
1142	0	2	6	1	9
1252	15	8	9	14	46
1259	14	38	23	16	91
1260	8	42	12	37	99
1267	0	0	10	1	11
1271	4	15	39	28	86
1273	4	1	19	11	35
Toplam Embriyo	48	108	126	108	390

4.4. Genotip ve embriyo teşvik ortamlarına göre toplam bitki sayısal bulguları

Genotip ve embriyo teşvik ortamlarında oluşan embriyolardan toplamda 106 bitki elde edilmiştir. En fazla bitki sayısı CS besisi ortamında gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2. Besi ortamlarına göre oluşan toplam bitki sayısı (Adet)

TOPLAM BİTKİ SAYISI (Adet)					
GENOTİP	Kontrol	CS	CP	CSP	Toplam bitki sayısı
1132	0	0	0	0	0
1140	0	0	0	0	0
1142	0	0	1	0	1
1252	5	3	1	2	11
1259	10	20	9	10	49
1260	2	7	0	3	12
1267	0	0	1	0	1
1271	0	2	10	8	20
1273	0	1	8	3	12
Toplam Bitki	17	33	30	26	106

4.5. Genotiplerin embriyo teşvik ortamlarına göre embriyo ve bitki oluşturma oranı (%)

1252 numaralı genotipte C ortamında %75 başarı gösterirken bu oran CS, CP ve CSP ortamında biraz düşmüştür. 1259 numaralı genotipte C ortamındaki başarı %70 iken bu oran diğer ortamlarda artmıştır ve %165 başarı ile CS ortamı en fazla başarı göstermiştir. 1260 numaralı genotipte en fazla başarıyı etkileyen ortam %168'lik bir oranla CS olmuştur ve bu oranı takiben CSP %148 başarı göstermiştir. 1267 numaralı genotip C ve CS ortamlarında başarı göstermemiştir fakat %56'lık bir oranla CP ortamında başarı göstermiştir. 1271 numaralı genotip diğer ortamlara kıyasla en düşük başarıyı C ortamında göstermiştir. Baby genotipinde çalışmada kullanılan diğer genotipler ile karşılaştırıldığında başarı biraz azalmıştır. 1271 numaralı genotip, çalışmada kullanılmış diğer tüm genotipler ile karşılaştırıldığında CP ortamında %177 başarı oranı ile besi ortamlarındaki en başarılı ortam olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Embriyo teşvik besi ortamlarının başarı durumu

EMBRYO/OVARYUM (%)					
Hıyar Tipleri	Genotip	C	CS	CP	CSP
MINI	1252	75	38	45	70
	1259	70	<u>165</u>	105	70
	1260	39	<u>168</u>	52	148
PICKLING	1267	0	0	<u>56</u>	6
	1271	22	71	<u>177</u>	133
	1273	27	6	<u>119</u>	79
BABY	1132	38	17	<u>67</u>	0
	1140	0	0	0	0
	1142	0	13	<u>46</u>	7

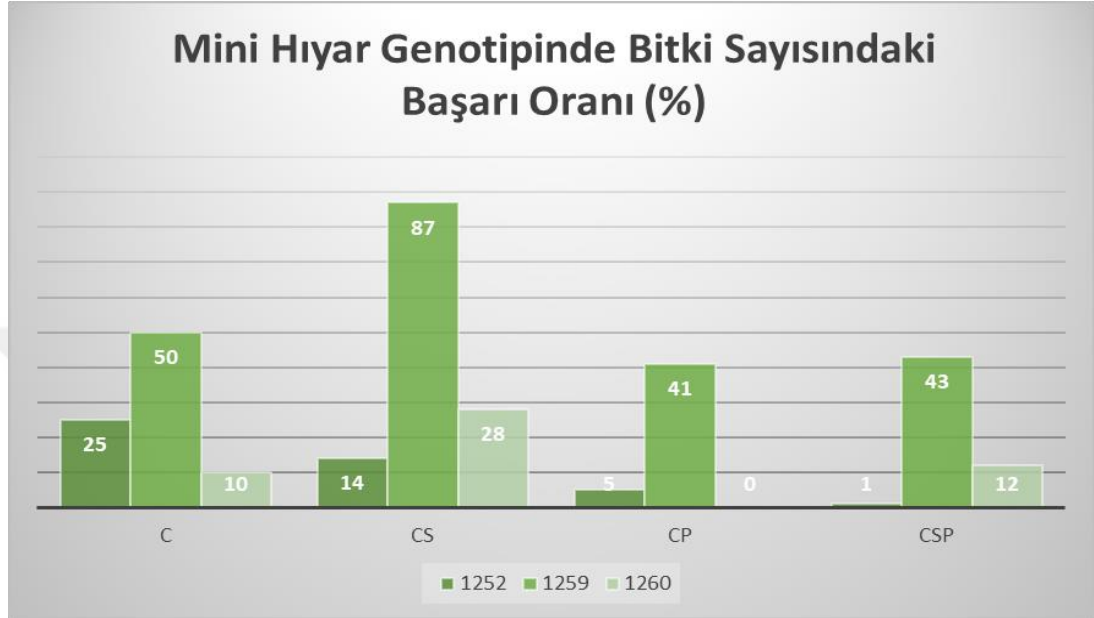
Bitki sayısındaki başarı durumu C ortamında, mini hıyar genotipi dışındaki tüm genotiplerde başarılı olmamıştır. CS ortamında, baby genotipi başarılı olmamıştır. CP ortamında, en fazla bitki sayısına sahip genotip pickling olmuştur. CSP ortamında, baby genotipi başarılı olmamıştır, 1259 numaralı genotip %43'lük oranla CSP ortamındaki en başarılı genotip olmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Besi ortamlarına göre oluşan toplam bitki sayısındaki başarı durumu

BİTKİ/OVARYUM (%)					
Hıyar Tipleri	Genotip	C	CS	CP	CSP
MINI	1252	25	14	5	1
	1259	50	<u>87</u>	41	43
	1260	10	<u>28</u>	0	12
PICKLING	1267	0	0	<u>6</u>	0
	1271	0	1	<u>45</u>	38
	1273	0	6	<u>50</u>	21
BABY	1132	0	0	0	0
	1140	0	0	0	0
	1142	0	0	<u>8</u>	0

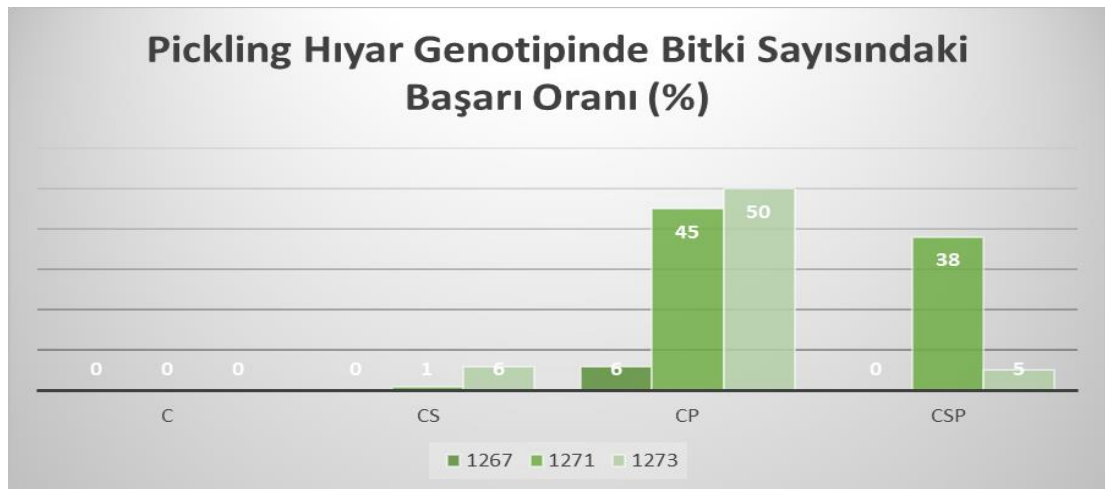
4.6. Besi ortamlarına göre çalışmada kullanılan hıyar genotiplerinin toplam bitki sayısındaki başarı durumu (%)

Mini hıyar genotipinde bitki sayısındaki başarı oranının en fazla olduğu genotip CS ortamında 1259 numaralı genotip olmuştur. CP ortamında 1260 numaralı genotipte hiçbir başarı gözlenmemiştir (Şekil 4.3).



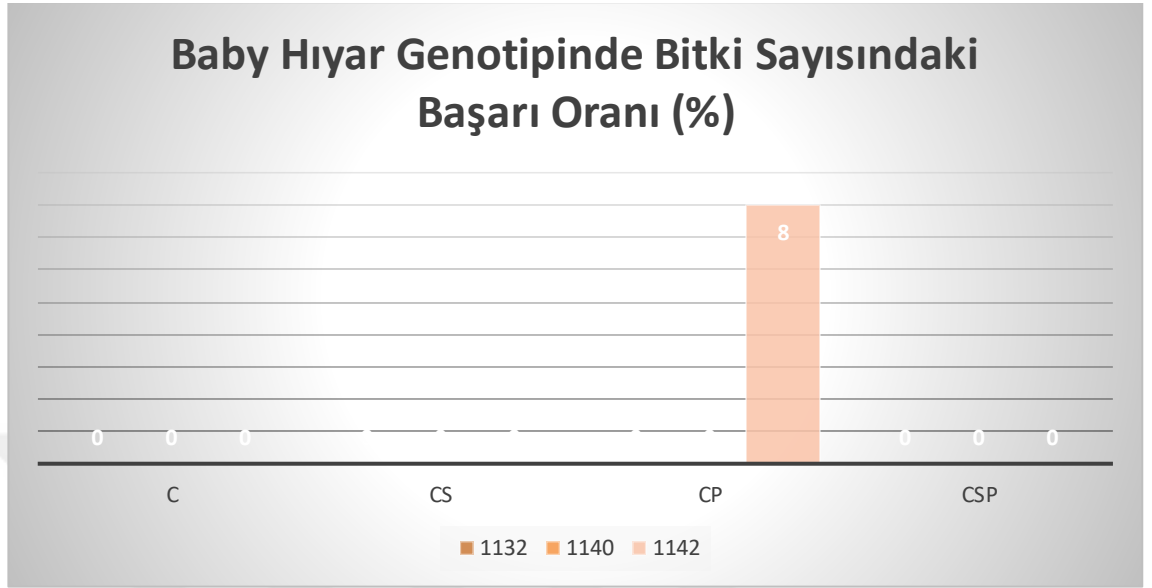
Şekil 4.3. Besi ortamlarına göre mini hıyar genotipinde toplam bitki sayısındaki başarı durumu

Pickling hıyar genotipinde bitki sayısındaki başarı oranının en fazla olduğu genotip CP ortamında 1271 ve 1273 numaralı genotip olmuştur. C ortamında hiçbir genotipte başarı gözlenmemiştir. 1267 numaralı genotip CS ve CSP ortamında başarılı olamamıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Besi ortamlarına göre pickling hıyar genotipinde toplam bitki sayısındaki başarı durumu

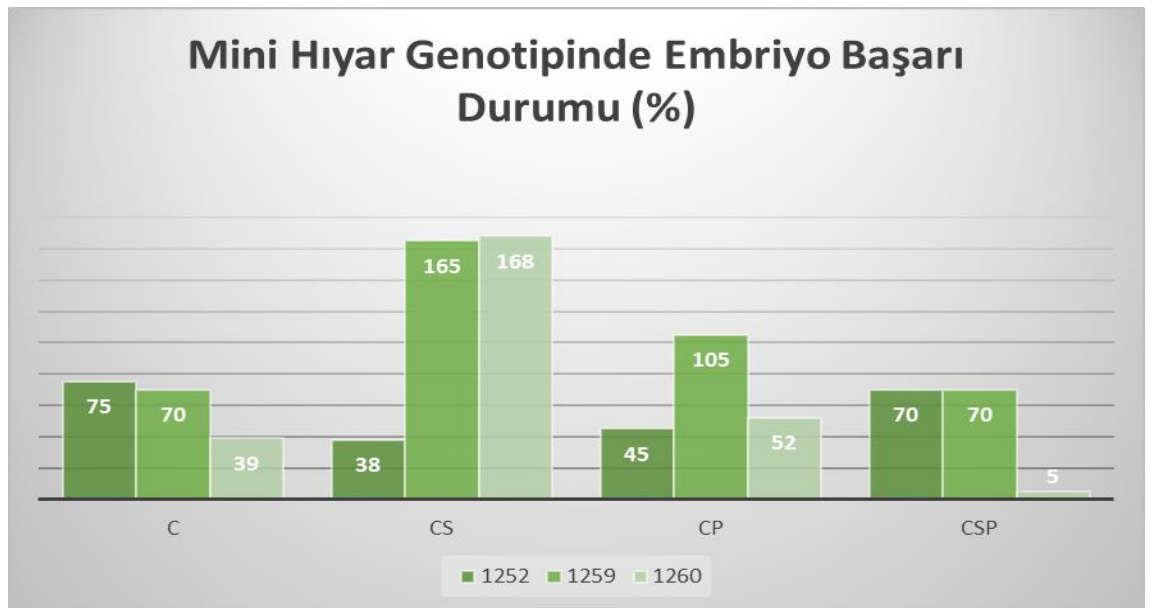
Baby hıyar genotipinde bitki sayısındaki başarı oranında sadece CP ortamında 1142 numaralı genotipte görülmüştür (%8). Bunun dışında kalan tüm genotipler başarılı olmamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Besi ortamlarına göre baby hıyar genotipinde toplam bitki sayısındaki başarı durumu

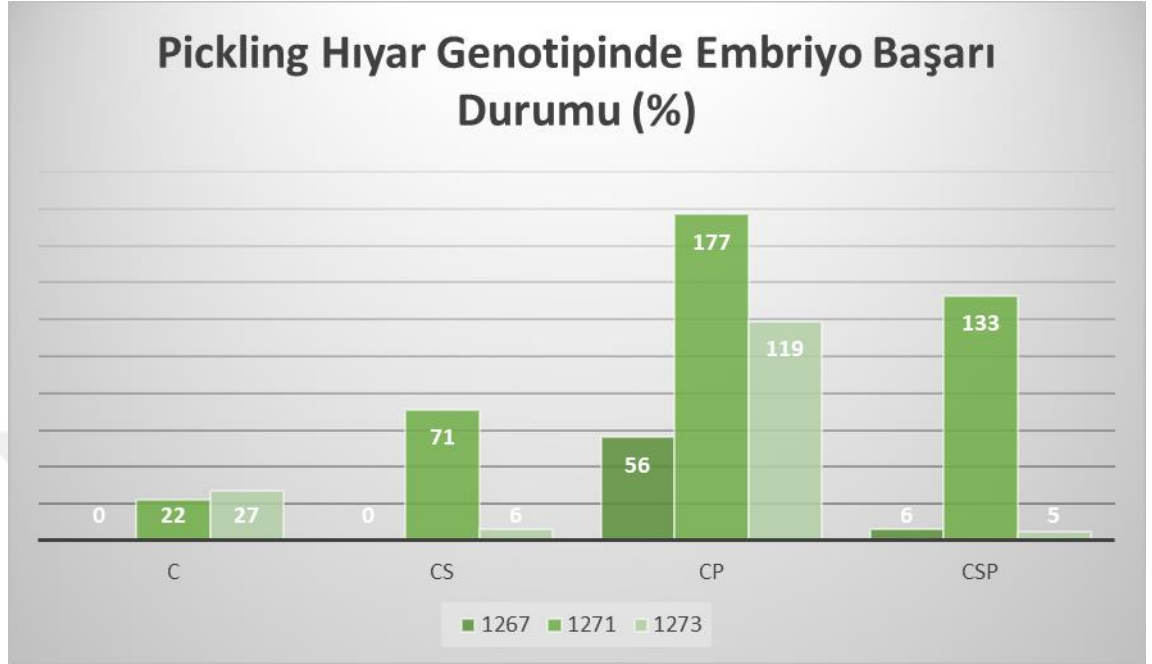
4.7. Besi ortamlarına göre çalışmada kullanılan hıyar genotiplerinin embriyo başarı durumu (%)

Besi ortamlarına göre embriyo başarı durumu mini hıyar genotipinde başarılı olmuştur. CS ortamında 1259 ve 1260 numaralı genotipler sırasıyla %165, %168’lik bir oran ile çok başarılı olmuştur (Şekil 4.6).



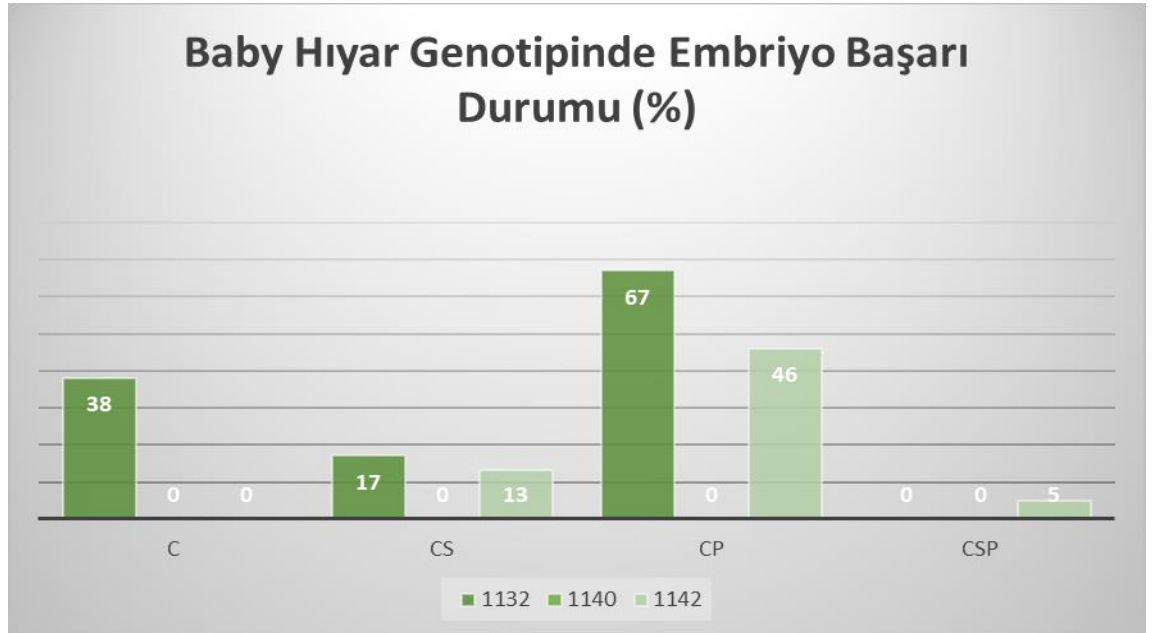
Şekil 4.6. Besi ortamlarına göre mini hıyar genotipinde embriyo başarı durumu

Besi ortamlarına göre embriyo başarı durumu pickling hıyar genotipi CP ortamında başarı göstermiştir. 1271 numaralı genotip en çok başarıyı göstermiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Besi ortamlarına göre pickling hıyar genotipinde embriyo başarı durumu

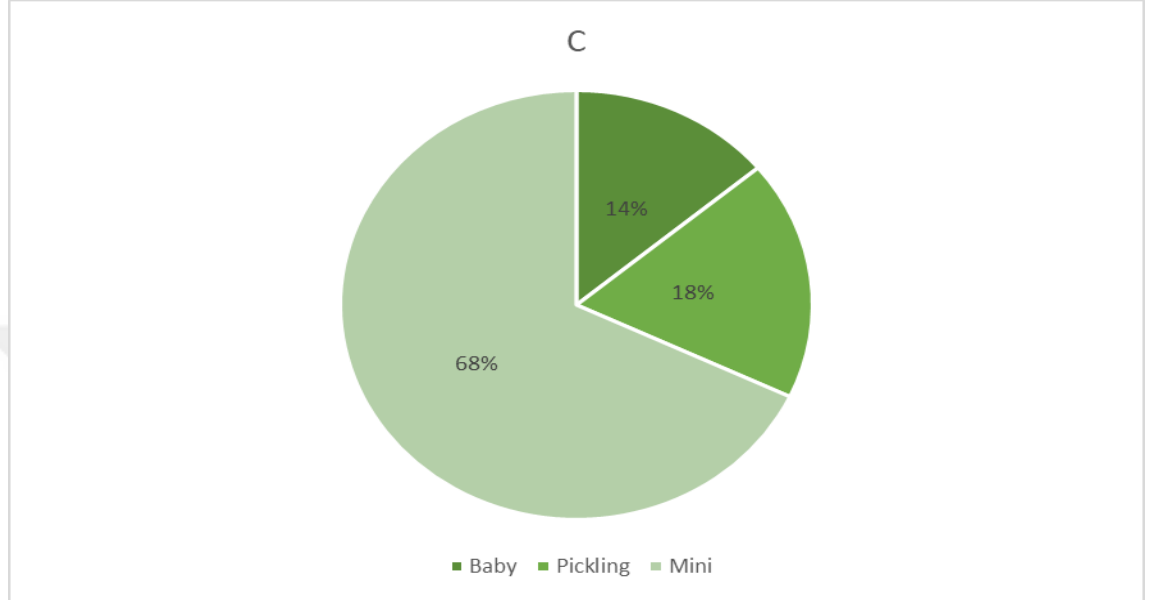
Besi ortamlarına göre baby hıyar genotipinde embriyo başarı durumu en fazla CP ortamında 1132 numaralı genotip olmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Besi ortamlarına göre baby hıyar genotipinde embriyo başarı durumu

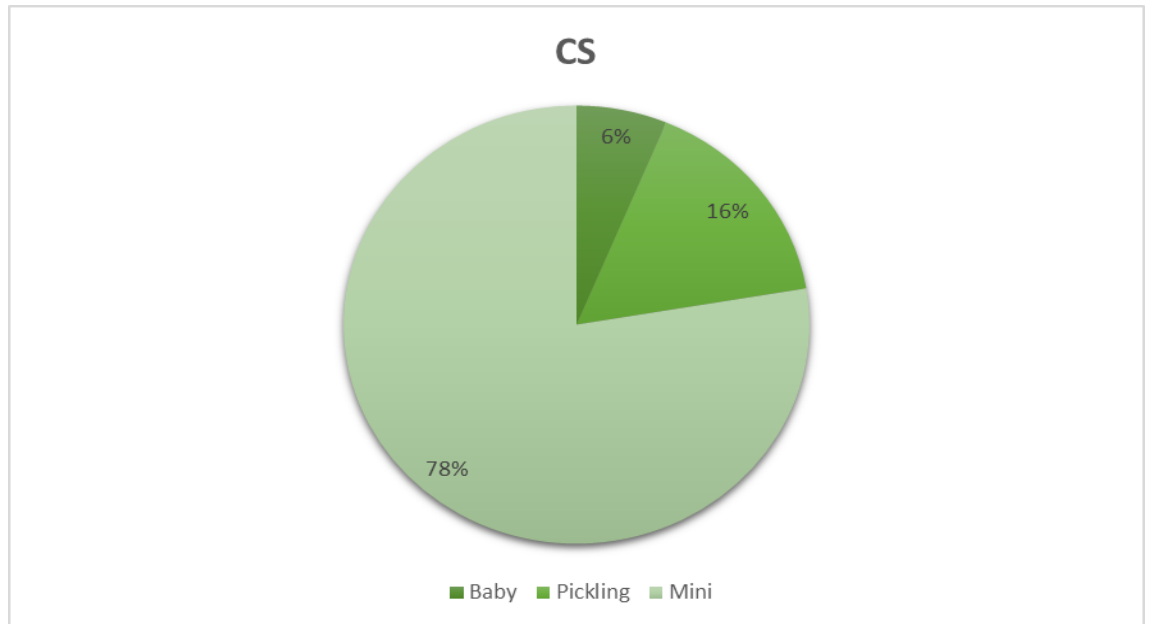
4.8. Besi ortamlarına göre çalışmada kullanılan hıyar genotiplerinin embriyo başarı oranları (%)

C ortamında embriyo başarı oranı mini (%68) hıyar genotipinde en fazla embriyoyu oluşturmuştur. Pickling (%18) ve baby (%14) hıyar genotipi oran olarak birbirlerine yakın olmuştur (Şekil 4.9).



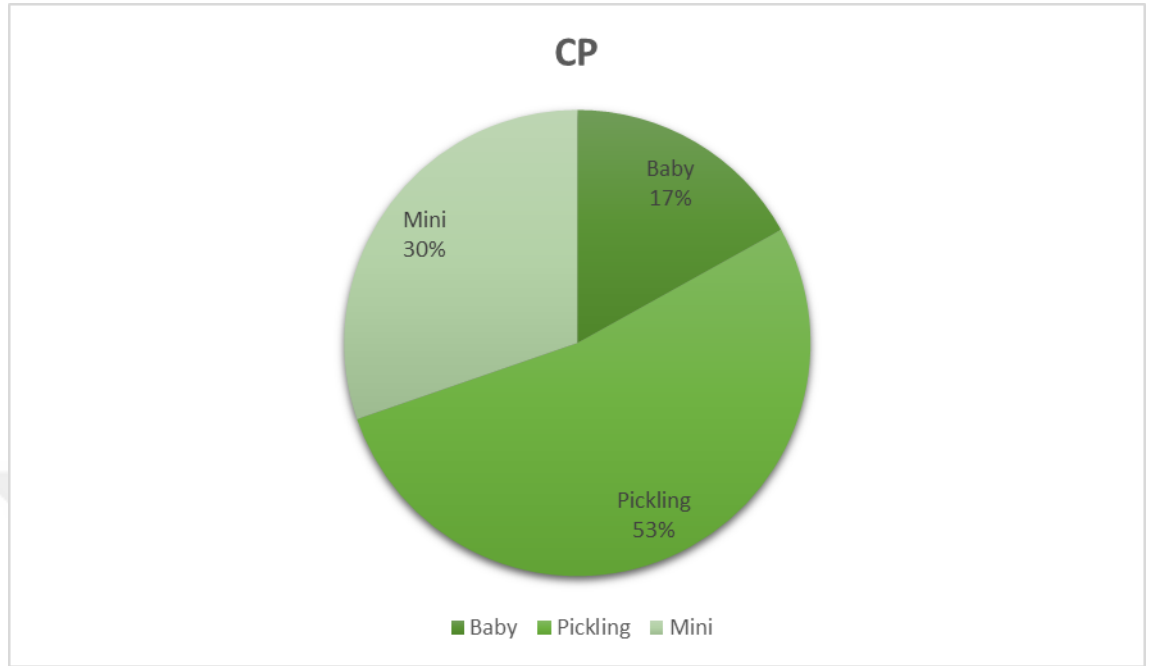
Şekil 4.9. C ortamında embriyo başarı oranı

CS ortamında embriyo başarı oranı mini hıyar genotipinde %78 başarı oranı ile en fazla embriyoyu oluşturmuştur. Baby hıyar genotipi %6 başarı oranı ile en düşük başarıyı göstermiştir (Şekil 4.10).



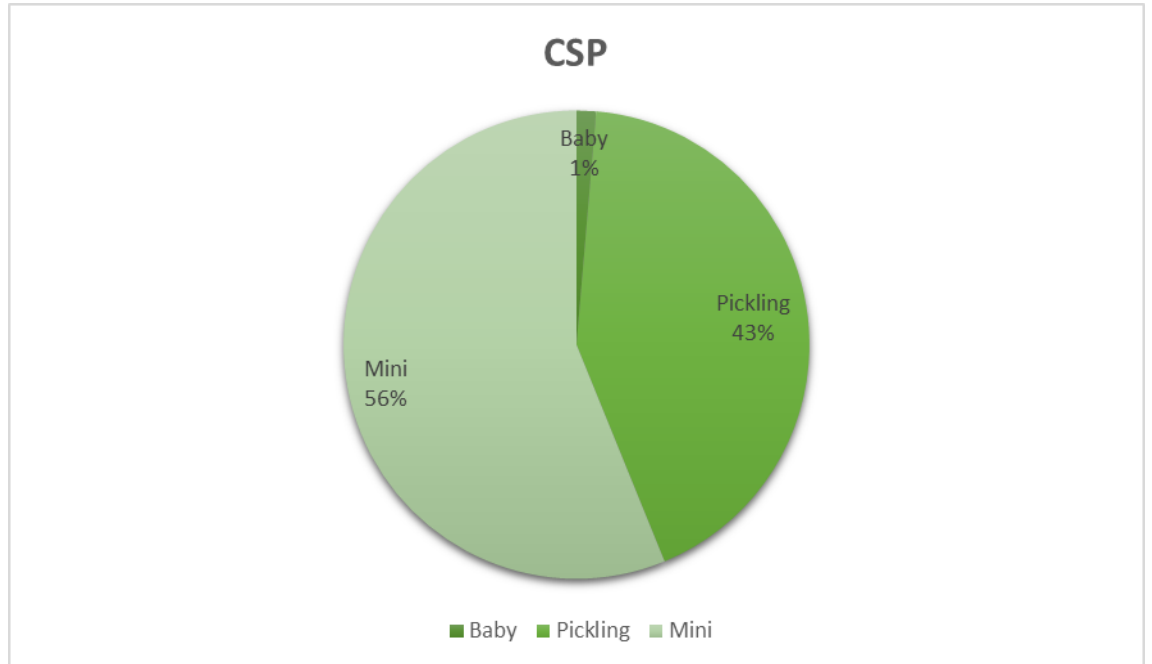
Şekil 4.10. CS ortamında embriyo başarı oranı

CP ortamında embriyo başarı oranı pickling hıyar genotipi %53 başarı oranı ile en fazla embriyoyu oluşturmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. CP ortamında embriyo başarı oranı

CSP ortamında embriyo başarı oranı mini (%56) hıyar genotipinde en fazla embriyoyu oluşturmuştur. Baby hıyar genotipi %1 başarı ile en düşük oranı vermiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. CSP ortamında embriyo başarı oranı

5. TARTIŞMA

Dişi ovaryum ve ısı uygulamasının gynogenesis indüksiyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Besi ortamına thidiazuron eklenerek, karanlıkta 24°C, 28°C ve 35°C'de 2-5 gün kültürde bekletilmiştir. α -naftalin asetik asit ve 6-benzilaminopurin hormonu içeren rejenerasyon ortamına ovaryumlar aktarılmıştır. Isı uygulamasının ovaryumun optimal gelişim evresinde gynogenesisin indüksiyon etkinliğini artırmıştır. En yüksek embriyo sayısı, 35°C sıcaklık uygulamasından sonra meydana gelmiştir. Maksimum gynogenesis sıklığı %18,4 iken, maksimum bitki rejenerasyonu %7,1'dir. Flow sitometri analizi, rejenerantların %87,7'sinin haploid olduğunu göstermiştir (Gemes vd. 2002). Bu çalışmaya benzer şekilde yapmış olduğumuz bu çalışmada kullanmış olduğumuz ovaryumlar kültüre alındıktan sonra 3 gün 35°C de karanlık inkübatörde bekletilmiştir. İklim odasına alınan ovaryumlar 2 gün 24°C karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra ovaryumlar 9 gün boyunca 24 °C 16 saat aydınlık/8 saat karanlık periyotta bekletilerek ovaryumların ovüllerinde, kallus oluşumu ve ovül şişkinlikleri tespit edilmiştir ve sonuç olarak ön uygulamanın hıyar embriyo oluşumunu olumlu etkilediği düşünülmektedir.

Hıyar (*Cucumis sativus* L.)'da TDZ içeren CBM kültür ortamına AgNO₃ eklenmiştir. Yüksek indüksiyon frekansları (%7,85-12,14), anthesis sırasında ve 0,03-0,07mg/L TDZ'de, polinlenmemiş ovüllerde bulunmuştur. Histolojik analiz, embriyo keselerinin, anthesis sırasında tamamen geliştiğini göstermiştir. Ayrıca, en yüksek bitki rejenerasyon oranı, 0,05mg/L NAA, 0,2mg/L BAP ve 5-10mg/L AgNO₃ ile takviye edilmiş CBM'de elde edilmiştir. Flow sitometri analizi, rejenerasyon bitkilerinin %80'inin haploid olduğunu göstermiştir. Histolojik mikrograflar ve ploidi seviye analizleri, polinlenmemiş ovüllerden embriyoların başlamasını, gelişmesini ve çimlenmesini açıkça ortaya koymuştur (Li vd. 2013). Çalışmamızda, genotip ve embriyo teşvik ortamlarında oluşan embriyolardan toplamda 106 bitki elde edilmiştir. En fazla bitki sayısı, CS: CBM + 10/1 KINETIN:2,4-D + %3 sükröz + %0,7 agar + 50mg/L spermidin ortamında oluşmuştur. En fazla bitki sayısını 1259 nolu genotip oluşturmuştur.

Poliaminler, putresin (diamin), spermin (tetramin) ve spermidin (triamin) doğada yaygın olarak bulunan başlıca polikasyonik doğal aminlerdir. Putresin ve spermidin hemen hemen tüm organizmalarda yer alırken spermidin başlıca ökaryotik hücrelerde bulunur. Poliaminler (PA), bitki fizyolojisinin büyüme ve gelişimsel sürecinde önemli bir işlev görmektedir. Bitki hücrelerinde, bitki hormonlarından daha yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Hücre bölünmesi, embriyogenezis, köklenme, çiçeklenme ve polen tüpü gelişiminde poliaminlerin ilişkili olduğu belirtilmektedir (Evans vd. 1989). Yapmış olduğumuz denemelerde poliaminlerin embriyo oluşumunda olumlu etkileri olduğu gözlemlenmiştir. En etkili sonucun ise putresin olduğu gözlemlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlardaki donör bitkiler üzerine putresin, spermidin, ve cycocel püskürtülerek önemli ölçüde haploid embriyolar elde edilmiştir. Spermidin (50 mg) tam gelişmiş bitkilerde %100 rejenerasyona yol açmıştır. Işınlanmış polen ile sonradan türetilmiş embriyoların fidelere dönüştürülmesinden sonra ovaryumlara uygulanan uygun seviyelerdeki putresin, spermidin ve cycocel *Cucumis sativus* L.'yi gynogenesisite başarılı artırdığı gözlemlenmiştir (Ebrahimzadeh vd. 2018). Çalışmamızda, putresin ve spermidin'in embriyo sayısı ve ovaryum başına düşen bitki sayısında artış gösterdiği gözlemlenmiştir.

Poliaminlerin (putresin ve spermidin; 5-1000 μ M) etkisi, *Cucumis sativus* L. cvs "Calypso" ve "Green Long" androgenezi üzerinde çalışılmıştır. 2,0 μ M 2, 4-diklorofenoksiasetik asit (2, 4-D), 1,0 μ M 6-benziladenin (BA) ve 0,25 M sükröz embriyogenez oranını artırmış ve spermidin 200 μ M'de optimum yanıt (sırasıyla 60 'Calypso' ve 'Green Long' anter başına 90,66 ve 100,33 embriyo) göstermiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (500 veya 1000 μ M) putresin ve spermidin, embriyogenez olumlu bir etki göstermemiştir. Embriyo farklılaşması, 0,25 μ M α -naftaleneasetik asit (NAA), 0,25 μ M kinetin (Kn) ve 0,09 M sükröz ile desteklenen B5 ortamında elde edilmiştir. Farklılaşmış embriyoların 0,09 M sükröz ve 10 μ M absisik asit (ABA) içeren olgunlaşma ortamına aktarılması, embriyoların olgunlaşmasıyla sonuçlanmıştır. Olgun embriyolar, 0,09 M sükröz içeren çimlenme ortamında bitkicikler halinde gelişme göstermiştir. 200 μ M spermidin içeren indüksiyon ortamında anterlerden geliştirilen embriyolar maksimum rejenerasyon etkinliği göstermiştir ((Kumar ve Murthy 2004). Denemede kullanılan 607 ovaryumdan 309 embriyo elde edilmiştir. En fazla embriyo oluşturan genotip 1260 numaralı genotip olmuştur. Sonuç olarak en fazla embriyo oluşturan ortam, CP: CBM + 10/1 KINETIN:2,4-D %3 sükröz + %0,7 agar + 50mg/L putresin ortamı olmuştur ve toplamda 126 embriyodan oluşmuştur. Oluşan embriyolardan toplamda 106 bitki elde edilmiştir. En fazla bitki sayısı, CS: CBM + 10/1 KINETIN:2,4-D + %3 sükröz + %0,7 agar + 50mg/L spermidin ortamında oluşmuştur.

6. SONUÇLAR

Besi ortamına alınan ovaryumların hücre bölünmelerini artırmak amacı ile 35 °C'de 2 gün karanlıkta bırakılmıştır. Araştırmada kullanılan ön uygulama işleminin embriyo oluşum oranını artırdığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışma ile bekleme süresinin kısaltılması geliştirilebilir. Sıcaklık çalışması yapılan ovaryumlar, karanlık ortamda 24 °C'de 3 gün daha bekletilerek ortamdaki 2,4-D oksin hormonunun etkisini daha da artırılması amaçlanmıştır. Embriyo teşvikinde bu işlemin faydalı olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan bu çalışmada, daha önceden yapılmış olan çalışmalar göz önüne alındığında anthesisten 1 gün önce toplanan ovaryumlar sterilizasyon işleminden sonra kültüre alınıp 3 gün 35°C'de karanlık inkübatörde bekletilmiştir. İklim odasına alınan ovaryumlar 2 gün 24°C karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra ovaryumlar 9 gün boyunca 24°C 16 saat aydınlık/8 saat karanlık periyotta bekletilmiştir. Bu uygulamaların embriyo oluşumunda olumlu etkilerinin olduğu sonucuna varılmıştır.

Üç farklı hıyar türlerinin poliaminler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ovaryumların ovüllerinde, kallus oluşumu ve ovül şişkinlikleri tespit edilmiştir. Poliamin uygulanan tüm gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında;

Mini hıyar genotipinde, spermidin grubunda ovaryum başına en fazla embriyo sayısı gözlemlenmiştir. Embriyo miktarındaki yükseliş ile beraber ovaryum başına düşen bitki sayısı da artmıştır. Bitki sayısındaki başarı oranının en fazla olduğu genotip CS ortamında 1259 numaralı genotip olmuştur. CP ortamında 1260 numaralı genotipte hiçbir başarı gözlenmemiştir. Sonuç olarak spermidin uygulamaları mini genotipte embriyo oluşumunda çok verimli bir uygulama olmuştur. Bununla birlikte, putresin ve spermidin ve putresin'in dahil olduğu gruplar, kontrol grubundan daha yüksek bir sonuç vermiştir. Ancak bu oran spermidin grubunda en yüksek seviyededir.

Pickling hıyar genotipinde, putresin grubunda ovaryum başına en fazla embriyo sayısı gözlemlenmiştir. Embriyo miktarındaki yükseliş ile beraber ovaryum başına düşen bitki sayısı da artmıştır. Yani, putresin uygulaması, pickling genotipinde embriyo oluşumunda çok verimli bir uygulama olmuştur. Bununla birlikte spermidin ve putresinin eş zamanlı uygulandığı grup, kontrol grubundan daha yüksek bir sonuç vermiştir. Bu çalışma ile de bu kez bu oran putresin grubunda en yüksek seviyededir. Pickling hıyar genotipinde bitki sayısındaki başarı oranının en fazla olduğu genotip, CP ortamında 1271 ve 1273 numaralı genotip olmuştur. C ortamında hiçbir genotipte başarı gözlenmemiştir. 1267 numaralı genotip CS ve CSP ortamlarında başarılı olamamıştır.

Baby hıyar genotipinde, putresin grubunda ovaryum başına en fazla embriyo sayısı gözlemlenmiştir. Embriyo sayısındaki artışla birlikte ovaryum başına düşen bitki sayısı da artmıştır. Putresin'in olumlu etkisi gözlemlenmiştir. Ancak pickling ve mini hıyar türlerine göre baby genotipinde bu oran daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Baby hıyar genotipinde bitki sayısındaki başarı oranında sadece CP ortamında 1142 numaralı genotipte görülmüştür (%8). Bunun dışında kalan tüm genotipler başarısız olmuştur.

Bu araştırmada yapılan çalışmalar ile hıyarda haploid embriyo miktarının artırılması ve bitki miktarının artırılması için en verimli yöntemin bulunmasını

amaçlayarak, ÷lke ekonomisinin gelir kaynaklarının artırılmasında en önemli dayanaklar olan tarım, teknoloji ve sanayi dünyasına yapılabilecek olan yatırımlara ve bununla birlikte alınacak olumlu geri dönüşlere de katkı sağlanacağı düşün÷lmektedir. Ülkemizde halihazırda uygulanan ıslah çalışmalarına bilimsel olarak veri sağlayarak zamanla yapılan çalışmaların çeşitlenmesi, farklı türler üzerinde benzerlerinin yapılması ile biyoteknolojik çalışmaların artırılması da öngörülmektedir. Ülkemizin dışa bağımlılığı konusunda ihtiyacın azaltılacağı ve küresel ölçüde diğer ÷lkelerin önüne geçebilmek için ıslah çalışmalarına daha fazla destek verilmesi dileğiyle.



7. KAYNAKLAR

- Abak, K. 1993. Biber ıslahında anter kültüründen yararlanma. Bitki Islahı Sempozyumu Bildirileri, TÜBİTAK TOAG Yayınları, 59-66 s.
- Akman, Z. 1995. Mısır-Baklagil (Fasulye, Börülce) Çoklu Üretiminde Farklı Ekim Sistemlerinin Verim ve Bazı Agronomik Karakterlere Etkisi. Basılmamış Doktora Tezi, Gazi Osman Paşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, 122s
- Akyüz, M. 1988. Sera hıyarlarında çeşit denemesi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, İzmir, 41 s.
- Amirian, R. Hojati, Z. Azadi, P. 2020. Male flower induction significantly affects androgenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 95.2, 183-191.
- Asadi, A. et al. 2018. Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica* 214.11, 216.
- Aybak, H. Ç. ve Kaygısız, H. 2004. Hıyar Yetiştiriciliği. Hasad Yayıncılık Limited Şirketi, İstanbul.
- Baktemur, G. 2010. Kavunda (*Cucumis melo* L.) uyartılmış haploid embriyoların ayrılmasında kullanılabilecek yöntemler. *Alatarım*, 15 s.
- Claveria, E. and Garcia-Mas, J. Dolcet-S. R. 2005. Optimization of Cucumber Doubled Haploid Line Production Using in vitro Rescue of in vivo Induced Parthenogenic Embryos. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130 (4): 555-560
- 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 s.
- Çağlar, G. Abak, K. 1999. Hıyarda (*Cucumis sativus* L.) in situ uyartım sonucu elde edilen haploid embriyolardan in vitro haploid bitki oluşturma. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 23: 23-290.
- Diao, W. P. et al. 2009. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. *Scientia horticulturae*, 119.3: 246-251.
- Dong, Y. Q. et al. 2016. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant cell reports* 35.10, 1991-2019.
- Dryanovska, O. A. Ilieva, I. N. 1983. In vitro Anther and Ovule Cultures in Muskmelon. *C.R. Acad. Bulgar Sci*, 36(8): 1107-1110.

- Ebrahimzadeh, H. et al. 2018. Efficient parthenogenesis induction and in vitro haploid plant regeneration in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using putrescine, spermidine, and cycocel. *Journal of plant growth regulation*, 37.4: 1127-1134.
- Emiroğlu, Ü. 1980. Türk tütün çeşitlerinde anter kültürü. Bitki Islahı Sempozyumu, Ege Bölge Zirai Araştırma Enst. Yay. No: 17/41, 12-18
- Ercan, N. Boyacı, Y. F. Biner, B. 1997. Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Eldesi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10: 374-380.
- Evans, P. T. Malmberg, R.L. 1989. Do Polyamines Have a Role in Plant Development Annu. Rev. Plant Physiol. *Plant Mol. Biol*, 40: 235-269.
- Faris, N. M. Nikolova, V. Niemirowicz, S. K. 1999. The effect of gamma irradiation dose on cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo production. *Acta Physiologiae Plantarum*, 21.4: 391-396
- Galazka, J. et al. 2015. From pollination to DH lines—verification and optimization of protocol for production of doubled haploids in cucumber. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 14.3: 81-92
- Galazka, J. Niemirowicz, S. K. 2013. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. *Folia Horticulturae*, 25(1): 67-78.
- Gemes, 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.)*. Plant Cell Rep. 21:105-111
- Hamıdvand, Y. Abdollahı, M. R. Chaıchı, M. Saeed, S. 2013. The effect of plant growth regulators on callogenesis and gametic embryogenesis from anther culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. IJACS/2013/5-10/1089-1095.
- Heidari, Z. Akbar, A. et al. 2019. Enhancement of microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) using putrescine and ascorbic acid. *Protoplasma*, 256.1: 13-24.
- Juhasz, G. A. et al. 2002. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Reports*, 21.2: 105-111.
- Kara, B. ve Sarı, N. 2013. Sakız ve Siyah Kabak (*Cucurbita pepo* L.)'larda Ovül Kültüründe Spermidine ve Putrescine Uygulamalarının Haploid Bitki Elde Edilmesine Etkileri. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 6.2: 206
- Kumar, H. A. Murthy, H. N. Paek, K. Y. 2003. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Scientia horticulturae*, moha98(3): 213-222.

- Kumar, H. A. Murthy, H. N. 2004. Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 78(3): 201-208.
- Lazarte J.E. Sasser, C. C. 1982. Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of *Cucumis sativus* L. *Horticulturae Science* 17: 88.
- Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 105 (5): 427-434.
- Li, J.W. Si, S.W. Cheng, J.Y. Li, J.X. Liu, J. Q. 2013. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. *Biologia Plantarum*, 57 (1): 164-168.
- Lower, R. L. Edwards, M. D. 1986. Cucumber breeding. In: *Breeding Vegetable Crops* (ed: Basset, M.J.). AVI Publishing Comp. Inc. Connecticut, 173–207.
- Macit, F. 1972. Sera domateslerinde F1 hibrid gücü ve kombinasyon kabiliyeti üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 206 Ege Üniversitesi Matb., Bornova.
- Mohamed, M. F. Refaei, E. F. S. 2004. Enhanced haploids regeneration in anther culture of summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Cucurbit genetics cooperative report.*, 27: 57-60
- Moqbeli, E. Peyvast, G. Hamıdoghlı, Y. Olfatı, J. A. 2013. *In vitro* cucumber haploid line generation in several new cultivars. *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnology*, 21 (1): 18-25
- Przyborowski, J. A. 1996. Haploidy in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *In vitro* haploid production in higher plants. Springer, Dordrecht, 91-98.
- Pierik, R. L. M. 1989. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, 344 p.
- Sauton, A. 1988. Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon, *Cucumis melo* L. *Scientia horticulturae* 35.1-2, 71-75.
- Sevgican, A. 1999. Örtü Altı Sebzeçiliği, Cilt-1. E.Ü. Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, no:528, Bornova-İzmir.
- Song, H. et al. 2007. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant cell, tissue and organ culture* 90.3, 245-254.
- Sorntıp, A. et al. Gynogenesis and doubled haploid production from unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Canadian Journal of Plant Science*, 2017, 98.2: 353-361.
- Suprunova, T. Shmykova, N. Pitrat, M. 2008. *In vitro* induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus* L., Centre

de Recherche d'Avignon. Unité Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Montfavet, France.

Şehirali, S. Özgen, M. 1988. Bitki Islahı. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yay. No: 1059, 261 s.

Tantasawat, P. A. et al. 2015. Evaluation of factors affecting embryo-like structure and callus formation in unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 17.3.



ÖZGEÇMİŞ

HİLAL YURDAKUL

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2019-2022	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2015-2018	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya

MESLEKİ TECRÜBELERİ

Araştırmacı Ziraat Mühendisi 2019-2020	TAKII TURKEY TOHUM
Ziraat Mühendisi 2022-Devam Ediyor	VİTA BOTANİK