

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

FARKLI BESİ ORTAMI KOMBİNASYONLARININ BAZI HIYAR (*Cucumis sativus* L.) GENOTİPLERİNDE GYNOGENESİS YOLU İLE EMBRİYO VE HAPLOİD BİTKİ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

ESMANUR ÇETİNKAYA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

FARKLI BESİ ORTAMI KOMBİNASYONLARININ BAZI HIYAR (*Cucumis sativus* L.) GENOTİPLERİNDE GYNOGENESİS YOLU İLE EMBRİYO VE HAPLOİD BİTKİ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

Esmanur ÇETİNKAYA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2015-210 kodlu proje ile desteklenmiştir.

2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

FARKLI BESİ ORTAMI KOMBİNASYONLARININ BAZI HIYAR (*Cucumis sativus* L.) GENOTİPLERİNDE GYNOGENESİS YOLU İLE EMBRİYO VE HAPLOİD BİTKİ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

Esmanur ÇETİNKAYA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

Bu tez .../.../2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Doç. Dr. Ersin POLAT

ÖZET

FARKLI BESİ ORTAMI KOMBİNASYONLARININ BAZI HIYAR (*Cucumis sativus* L.) GENOTİPLERİNDE GYNOGENESIS YOLU İLE EMBRİYO VE HAPLOİD BİTKİ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

Esmanur ÇETİNKAYA

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilimi Dalı

Danışman: Prof. Dr. A.Naci ONUS

Nisan 2015, 61 sayfa

Bu çalışmada farklı besî ortamı kombinasyonlarının bazı hıyar (*Cucumis sativus* L.) genotiplerinde gynogenesis (ovaryum kültürü) yolu ile embriyo ve haploid bitki oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırma Kuzey Agripark Bitki, Araştırma ve Biyolojik Mücadele San. ve Tic. Ltd. Şti. istasyonunda, 2014-2015 yıllarında gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada üç farklı besî ortamı kombinasyonu, embriyo teşvik ve rejenerasyon aşamalarında sabit oranda bitki büyüme düzenleyicilerle modifiye edilmiştir. Besî ortamının, genotipin ve bitki yaşının etkisi haftalık olarak incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre besî ortamının önemi açıkça görülmüş, en etkili embriyo teşvik ortamının MS+ 1:10; 2,4-D:Kinetin (MSB) olduğu, en etkili rejenerasyon ortamının ise MS+ 1:4; NAA:BAP (MSR) olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm genotipler, MSB ortamında embriyo oluşturmuş ve MSR ortamında bitki rejenerasyonu gerçekleştirmiştir. Toplamda 273 embriyo elde edilmiş olup, 137 adet de bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Toplam uygulanan ovaryum sayısına göre % 84,26 embriyo dönüşüm oranı ve % 42,28 bitki rejenerasyon oranı elde edilmiştir. Araştırmada genotip etkisi açık bir şekilde görülmüş olup, embriyo ve bitki eldesinde en başarılı genotip 583 nolu genotip olarak tespit edilmiştir. 584 nolu genotip ikinci sırayı alırken, 550 nolu genotipte oldukça sınırlı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bitki yaşının giderek artmasına bağlı olarak elde edilen embriyo ve bitki oranlarında da ciddi düşüşler yaşanmıştır. Yaklaşık olarak 2 aylık olan yetiştirilme dönemi olan donör genotiplerde, başlangıçta % 213,58 olan embriyo oluşum oranı, son kurulan denemelerde % 19,75'lere düşmüştür. Bitki rejenerasyon oranı ise, % 132,10'dan % 4,94 seviyelerine düşerek, genotipin yaşının önemini net bir şekilde ortaya koymuştur.

Çalışmada oluşan 137 bitkinin 114 tanesinde ploidy seviyesi belirlenmiş olup, bunların 87 tanesinin haploid, 9 tanesinin diploid ve 18 tanesinin miksoploid olduğu görülmüştür.

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

JÜRİ: Prof. Dr. A. Naci ONUS (Danışman)

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Doç. Dr. Ersin POLAT

ABSTRACT

COMBINATION OF SOME NUTRIENT MEDIUM EFFECT ON THE FORMATION IN THE EMBRYO AND HAPLOID PLANT VIA GYNOGENESIS FROM DIFFERENT CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.) GENOTYPE

Esmanur ÇETİNKAYA

MSc Thesis in Horticulture Department

Supervisor: Prof. Dr. A.Naci ONUS

April 2015, 61 pages

In this work, the effect of combination of different medium in some cucumbers (*Cucumis sativus* L.) genotype by Gynogenesis (ovary culture) on embryo formation and haploid plants were investigated. These studies worked on Kuzey Agripark Bitki, Araştırma ve Biyolojik Mücadele San. ve Tic. Ltd. Şti. station on 2014-2015 years.

In this survey, three combination of different culture medium was modified fixed rate by plant growth regulator for embryo induction and plant regeneration. Effect of mediums, genotype and plant age were examined weekly. According to the findings seen clearly the importance of the medium, that conclusion has reached MS + 1:10; 2,4-D: Kinetin (MSB) is the most effective incentives embryo, while the most effective regeneration medium, MS + 1:4; NAA:BAP (MSR). All genotypes, have created embryos on MSB medium and plant regeneration was carried out in MSR medium. Total 273 embryos obtained, 137 plant regeneration were occurred. Total applied by the number of ovary; % 84.26 embryo formation rate and % 42.28 plant regeneration rate was obtained. Genotype effect on research has shown clearly and the most successful genotypes No. 583 genotypes. has been identified that the embryo and the resulting plant. Second genotype was No 584 genotypes, while No 550 genotypes showed limited result has emerged very limited results. But, plant was obtained from No 550 genotypes. Depending on the increasing age of the plant , the ratio of the resulting embryo and the plant has experienced a serious decline . The donor plants grown approximately 2 months of age period the embryos initially % 213.58 ratio is decreased to % 19.75 in the last experiment established. The plant regeneration rate decreased from % 132.10 to % 4.94 level and it is showed that importance of genotype age.

The study, 114 of the 137plants ploidy level was determined , which 87 of them haploid , 9 of them diploid and 18 of them miksploid was observed.

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

COMMITTEE: Prof. Dr. A. Naci ONUS (Supervisor)

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Assoc. Prof. Dr. Ersin POLAT

ÖNSÖZ

Tarıma sırtını dayamış bir ülkenin birinci önceliği üretim materyallerini iyileştirmek olmalıdır. Kendi çeşidini kullanarak, üreticisine ve tüketicisine daha iyi hizmet verebilir ve hatta ihracat yaparak gelir düzeyini yükseltebilir. Günümüz koşullarına ayak uydurabilen ticari çeşitler üretilmeli ve var olan çeşitlerimiz iyileştirilmelidir. Bitki çeşitlerinin teknoloji ile geliştirilebilmesi hem zamandan, hem de maliyetten tasarruf sağlar. Bitki biyoteknolojisi bu ihtiyacın varlığında ortaya çıkmış bir bilim dalıdır. Bitki biyoteknolojisinin bir dalı olan haploid bitki üretimi, öneminin giderek artacağı bir konuyu kapsamaktadır. Klasik yöntemlerle yapılan ıslah çalışmaları uzun yıllar almakta ve böylelikle maddi kaynaklar daha fazla tüketilmektedir. Oysa ki; haploid bitki üretim teknolojisini kullanan bir işletme, kısa sürede çeşidini piyasaya sürebilir ve diğer işletmelere oranla bir adım daha önde ticari faaliyete başlamış olabilir. Bunun yanında uzun yıllar boyunca meydana gelen ıslah maliyetleri, kısa sürede elde edilen saf hatlarla daha da azaltılabilir.

Bu amaçla yürüttüğümüz bu çalışma hıyar ıslahı yapan işletmelere fayda sağlamış olacak ve bilim dünyasına büyük katkı sağlayacaktır. Sürekli mutasyona uğrayarak direnç kazanan hastalık ve zararlılarla yarışabilecek pozisyona gelinip, hıyar çeşitlerinde tüketicinin değişen isteklerine cevap verilecektir. Yaptığım bu çalışmanın uygun haploid protokolü oluşturmaya yardımcı bilgiler sunarak, hıyar haploid çalışmalarının daha da yaygınlaştırılmasına katkısı olmasını dilerim.

Bu konuda çalışma olanağı sağlayan ve bu konunun önemini bilincine vardırın, danışmanım, çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. A. Naci ONUS'a (Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi); çalışmamda maddi ve manevi desteği ile hep yanımda olduğunu hissettiğim sevgili nişanlım Arş. Gör. B.Çağdaş DEMİREL'e (Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi); kişiliğime yön veren ve bana en iyi şekilde yaşam koşulları sunan babam Hüsamettin ÇETİNKAYA'ya; annem Azime ÇETİNKAYA'ya; ve varlıklarına hep şükrettiğim canım kardeşlerim Hanife ÇETİNKAYA ve Elif ÇETİNKAYA'ya; tezimi hazırlamam da fikir ve bilgileri ile destek olan Uzm. Biyolog Zehra Özgecan TANYOLAÇ YAZAN'a; Yüksek lisans öğrencisi F. Burcu ÇELİKLİ'ye, tez çalışmalarım da her sıkıntıda bir adım arkamda olan çok değerli arkadaşlarım Lokman ALTINKAYA ve Recep BALKIÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	4
2.1. <i>Cucurbitaceae</i> Familyasında Haploidlerin Elde Edilmesinde Kullanılan Yöntemler.....	7
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Materyal	20
3.2. Metot	20
3.2.1. Bitkilerin yetiştirilme koşulları	20
3.2.2. Dişi çiçeklerin alınma evresi	21
3.2.3. <i>In vitro</i> çalışmaları	22
3.3. Araştırma Süresince Yapılan Ölçüm, Sayım ve Gözlemler	28
4. BULGULAR	29
4.1. Genotip ve Embriyo Teşvik Ortamlarına Göre Ovül Tepkisi, Kallus Gelişim Durumu.....	29
4.2. Genotip ve Embriyo Teşvik Ortamlarına Göre Toplam Embriyo Sayısı, Başarı Yüzdesi.....	32
4.2.1. Embriyo oluşumunda genel bulgular	32
4.2.2. Embriyo oluşumunda sayısal bulgular	33
4.3. Genotip ve Bitki Rejenerasyon Ortamlarına Göre Bitki Oluşum Durumu	36
4.3.1 Bitki rejenerasyonunda genel bulgular.....	36
4.3.2. Bitki rejenerasyonunda sayısal bulgular	37
4.4. Bitki Yaşının Embriyo Oluşumu ve Bitki Rejenerasyonuna Etkisi	40
4.5. Stomada Kloroplast Sayımına Göre Ploidy Seviyesinin Belirlenmesi	42
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ	49
7. KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Co ⁶⁰	Kobalt 60
Gy	Gray
%	Yüzde
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
l	Litre
mg/l	Miligram/litre
g/l	Gram/litre
ppm	milyonda bir
W	Watt (Işık gücü)
n	Haploid
2n	Diploid
M	Molar
µM	Mikromolar
kRad	Krad

Kısaltmalar

2,4-D	Dichlorophenoxyacetic acid
MS	Murashige ve Skoog Besi Ortamı
B5	Gamborg Besi ortamı
BA	6-Benzylamin
BAP	Benzylaminopurin
NAA	α -naphthalene acetic acid
ZR	zeatin-riboside
GA ₃	Gibberellik asit
ABA	Absisik asit
NLN	Lichter Besi Ortamı
CP	Kavun besi ortamı
B12	Siyanokobalamin
IAA	Indolacetic acid
TDZ	thidiazuron
2ip	6- (gamma, gamma-Dimethylallylamino) purine
Spd	spermidine
Spm	spermine
Put	putrecine
Cad	cadecine
DH	Double Haploid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Fidelerin yetiştirilmesi.....	20
Şekil 3.2. Topraksız sera koşullarında bitkilerin yetiştirilmesi.....	21
Şekil 3.3. Ovaryumların sınıflandırılması; a) Erken dönem, b) Anthesisten 2 gün önce, c) Anthesisten 1 gün önce, d) Anthesisten 6 saat önce, e)Anthesis, f) Anthesisten 1 gün sonra.....	21
Şekil 3.4. Ovaryumların sterilizasyon işleminin yapılması.....	24
Şekil 3.5. Ovaryumların kesim aşamaları; a) Ovaryumların dış yüzeylerinin soyulması, b) Meyve kabuğu uzaklaştırılmış ovaryum, c) Ovaryumların uzunlamasına ikiye ayrılması, d) Ovaryumların dört eşit parçaya ayrılması, e) Ovaryum parçalarının besi ortamlarına yerleştirilmesi, f) Kültüre alınmış ovaryumun son hali.....	25
Şekil 3.6. Deneme dizaynı ve toplam kullanılan ovaryum sayısı.....	25
Şekil 3.7. Çalışmada kullanılan inkübatör.....	26
Şekil 3.8. Ovaryumların rejenerasyon ortamına ve sürgünlerin sürgün ortamına aktarılması, a) Rejenerasyon ortamına aktarılmış ovaryum, b) Ovaryumda sürgün oluşumu, c) Kavanoza aktarılmış bitkicik, d) Tüpe aktarılmış bitkicik.....	26
Şekil 3.9. Bitkilerin toprağa aktarılması; a) Kavanozdan toprağa aktarılmış bitki, b) Adaptasyon bölümüne gönderilmek için hazırlanmış bitkiler, c) Sera koşullarında gelişen bitkiler.....	27
Şekil 3.10. Stomada kloroplast sayım yöntemi ile haploidi seviyesinin belirlenmesi; a) Haploid stomalar (40X), b) Diploid stomalar (40X).....	28
Şekil 4.1. Ovüllerde şişkinlik gösteren ve kallus oluşturan ovaryum sayısı (Adet).....	29
Şekil 4.2. Hıyar ovüllerinde kallus oluşumu (genotip:584, ortam:CBM, 0,63X).....	31
Şekil 4.3. Hıyar ovüllerinde şişmelerin görülmesi (genotip:583, ortam:MSB, 0,63X).....	31
Şekil 4.4. Embrioların doğrudan gözlenmesi (genotip:583, ortam:MSB, 0,63X).....	32
Şekil 4.5. Ovaryum içinde gelişen embriyonun direkt bitki olarak gözlenmesi (genotip: 584, ortam: MSB, 0,63X).....	32
Şekil 4.6. Aynı alanda birden fazla bitki oluşumu, (genotip: 583, ortam: MSB, a) 0,63X, b) 0,8X).....	33
Şekil 4.7. Ovaryumlarda indirekt embriyo ve bitki oluşumları (genotip: 583, ortam: MSB), a) Embriyo oluşumu (0,63X), b) Embriyonun kallusa dönüşümü (1,25X), c) Embriyojenik kallusdan oluşan bitkicikler.....	33
Şekil 4.8. Hıyarda gynogenesis yoluyla oluşan embriyo sayılarının gösterimi (Adet).....	34
Şekil 4.9. Embriyo rejenerasyonu sonucu oluşmuş olan sağlıklı bitkicik ve bitkiler, a, b) Tüp ve kavanoza aktarılan bitkicikler; c, d) Toprağa aktarılan bitkiler.....	37
Şekil 4.10. Embriyo rejenerasyonu sonucu oluşmuş olan büyüme ucu olmayan anormal bitkicikler.....	37
Şekil 4.11. Hıyarda gynogenesis yoluyla oluşan bitki sayıları gösterimi (Adet).....	38
Şekil 4.12. Stomadaki kloroplast sayısına göre ploidy seviyesi belirlenmesi.....	42
Şekil 4.13. Stomadaki kloroplast sayılarının gösterimi (40X), a) Haploid hıyar bitkisi stoması, b) Diploid hıyar bitkisi stoması, c) Miksoploid hıyar bitkisi stoması.....	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Besi ortamlarının adlandırılması.....	22
Çizelge 3.2. Temel besi ortamlarının kimyasal içerikleri.....	23
Çizelge 4.1. Farklı besi ortamlarına göre farklı hıyar genotiplerinin ovüllerinde şişkinlik gösteren ovaryum oranı	30
Çizelge 4.2. Farklı besi ortamlarına göre farklı hıyar genotiplerinin kallus oluşturan ovaryum oranı.....	31
Çizelge 4.3. Embriyo teşvik ortamlarına göre genotiplerin embriyo oluşturma oranları.....	34
Çizelge 4.4. Ortam ve genotiplere göre hıyar ovaryumlarında direkt embriyo oluşum oranları.....	35
Çizelge 4.5. Ortam ve genotiplere göre hıyar ovaryumlarında indirekt embriyo oluşum oranları.....	36
Çizelge 4.6. Ortam ve genotiplere göre hıyar ovaryumlarından, bitki oluşum oranları.....	38
Çizelge 4.7. Ortam ve genotiplere göre hıyar ovaryumlarından direkt bitki oluşum oranları.....	39
Çizelge 4.8. Ortam ve genotiplere göre hıyar ovaryumlarından indirekt bitki oluşum oranları.....	40
Çizelge 4.9. Bitki yaşına göre embriyo oluşum oranları.....	41
Çizelge 4.10. Bitki yaşına göre bitki rejenerasyon oranları.....	41

1. GİRİŞ

İnsanoğlu, anne karnından yok oluşuna kadar beslenerek canlılığını devam ettirir. Yaratılanların en üstünü olan insanı diğer canlılardan ayıran zihinsel üstünlükleridir. Gerek zihinsel gelişim gerek de fiziksel gelişim için beslenme en temel yapı taşlarından biridir. Dünya nüfusunun hızla artması hem beslenme sorununa hem de üretim alanlarının daralmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda insanoğlu birim alandan en yüksek verimle kaliteli ürün elde etme üzerine arayışlar içine girmiştir. Bitkisel üretimde de amaç; birim alandan daima daha kaliteli ve daha fazla ürün elde etmektir. Bitkisel ürünlerden olan sebzeler, insan beslenmesinde çok önemli bir yere sahiptir ve vazgeçilemeyecek besin kaynağını oluşturur (Akyüz 1988).

Birim alandan verimin artırılması; toprak verimliliğinin artırılması, bitki koruma yöntem ve uygulamalarının yaygınlaştırılması, yeni çeşitlerin ıslahı ve üretim tekniklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar ile mümkündür (Akman 1995).

Sebzelerin insan beslenmesi ve insan sağlığı bakımında önemi büyüktür. İlk ve ortaçağlarda sebzelere gereken önem verilmemiştir. Gemilerle açık denizlerde uzun süre seyahat eden gemicilerde, uzun süren harpler ve kıtlıklar sonunda, özellikle Birinci Dünya Savaşı sonrasında insanlarda birçok hastalıklar ortaya çıkmıştır. Bu hastalıklardan çoğunun vitamin noksanlığından ileri geldiği anlaşılmıştır. Vitaminlerin ve mineral maddelerin insan beslenmesindeki önemi tespit edildikten ve sebzelerin vitaminlerce ve mineral maddelerce zengin oldukları anlaşıldıktan sonra sebzeçilik hızla ilerlemeye başlamıştır (Alan 1982).

Sebzelerin kalite ve verimliliklerini arttırmak için var olan çeşitlere iyileştirilme çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalara ıslah çalışmaları adı verilmektedir. Bitki ıslahı bitkilerin genetik yapılarının, insanların yararına uygun yönde değiştirilmesidir. Bugün yetiştirdiğimiz ve kullandığımız kültür bitkileri ve çeşitler, yüzyılların ve hatta binyılların ürünleridir ve aralıksız olarak süregelen bitki ıslahı çalışmaları sonunda oluşmuştur.

Ülkemiz son yıllara kadar gerek örtü4altı sebze yetiştiriciliği, gerekse açıkta sebze yetiştiriciliğinde üretim materyali olan tohumu dış ülkelere temin etmekteydi. Ancak son yıllarda artan sayıları ile Türk ıslah firmalarının bu bağımlılığı bir miktar azalttığı ve azaltacağı görülmektedir. Tohum ıslahı devlet destekli projelerle daha fazla desteklenerek, gelişme sürecine girmiştir.

Mevcut ıslah firmalarının birçoğunda yapılan işlemler; ana-baba hatların yurtdışından getirilip burada hibritlerinin üretilmesi, adaptasyon denemelerinin yapılması ya da sadece birkaç generasyonun buradan alınması şeklindedir. Ekolojik açıdan ve gen kaynakları bakımından ıslah çalışmaları için uygun olan ülkemizde, birçok ıslah programı planlanarak kendi tohum ihtiyacımız karşılanmalı ve dış ülkelere de tohum ihraç edebilecek duruma gelmelidir (Şensoy 2004).

İslahı geliştirebilmek için bilim adamları tarafından çok büyük adımlar atılmıştır. Bu adımlardan bir tanesi de "F₁ Hibrid Gücü" dür ve ıslahta önemli bir yere

sahiptir. Verimde sağlanan büyük artış nedeniyle F₁ hibrid gücü son 50-60 yıldaki tatbiki biyolojide sağlanan en büyük başarı olarak kabul edilmektedir (Akyüz 1988).

Geniş bir uygulama alanı bulan F₁ hibrid gücü, çok geçmeden bahçe bitkilerinde de kullanılmaya başlanmıştır. F₁ hibrid varyeteleri standart çeşitlerin yerini almaya başlamıştır. Bugün F₁ hibrid tohum üretimi oldukça büyük boyutlara ulaşmış ve her yıl piyasaya yüzlerce yeni çeşitler girmeye başlamıştır. Bu çeşitlerin hepsinde birbirinden farklı özelliklere sahiptir. Çeşitler üzerine yapılan çalışmalar da yetiştirme koşullarına uygunluk, verimlilik, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, kültürel işlemlerin kolay uygulanabilirliği gibi konular ele alınmaktadır (Akyüz 1988).

F₁ hibrid varyeteleri elde edildikleri ebeveynlerine göre daha üstün özelliklere sahiptirler (Macit 1972). Bunlar;

- Daha fazla toplam ve erkenci verime,
- Hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığa,
- Yüksek adaptasyon kabiliyetine,
- Vejetasyon süresindeki artışa,
- İçerdikleri kimyasal ve biyokimyasal maddelerdeki fazlalığa,
- Yatmaya karşı dayanıklılığa,
- Hasat edilen kısımda kalite yönünden artışa ve
- Erkenciliğe sahip olmaları yönünden üstünlük arz ederler.

Ülkemizde; tohum üretiminde ıslah çalışmalarının uzun yıllar alması, hibrid tohum üretiminin zorluğu ve yavaşlığı, yurt dışından tohum girişi gibi sebeplerle ve bilinen klasik ıslah yöntemleri ile çözümü zor olan problemlere çözüm getirerek daha kaliteli, daha verimli, daha ekonomik ve daha kısa sürede bitkisel üretim gerçekleştirmek amacıyla biyoteknolojik yöntemlere başvurulmaktadır. Bitki doku kültürü çalışmaları ıslah çalışmalarında kullanılan biyoteknolojik yöntemlerin başında gelmektedir. Bitki doku kültürünün kullanılmasıyla uzun süre gerektiren yeni çeşitlerin ıslahı daha kolay ve kısa sürede yapılabilir. Bitki doku kültürü teknikleri içerisinde de haploid bitkilerin elde edilmesini sağlayarak ıslah çalışmalarına hizmet eden yöntemlerin ayrı bir önemi vardır (Ercan vd 1997).

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 durlar, tohum bağlayamazlar (Emiroğlu 1980, Abak 1993, Çağlar ve Abak, 1999). Bu nedenle haploidlerin ıslahta kullanılabilmesi için kromozomlarının katlanarak dihaploid duruma getirilmeleri gerekmektedir. Bununla birlikte, dominansi söz konusu olmadığından haploid bitkiler genetik açıdan mükemmel deneysel materyallerdir. Ayrıca haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanması sayesinde %100 homozigot saf hatlar elde edilebilmektedir. Böylece uzun yıllara gereksinim duyan saflaştırma işlemi, birkaç ay gibi kısa bir sürede yapılabilen; kombinasyon ıslahı ve F₁ hibrit

çeşit ıslahı programlarında zaman yönünden önemli düzeyde kazanç sağlanabilmektedir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

Haploid bitkilerin ve bu bitkilerden çeşitli yöntemler kullanılarak “double haploid” (DH) bitkilerin elde edilmesi ıslahçılara önemli avantajlar sunmaktadır (Reinert ve Bajaj 1977, Pochard ve Dumas de Vaultx 1979, Abak 1982, Emiroğlu 1982, Bajaj 1990, Sarı ve Abak 1994, Abak 1988, Chambonnet 1988, Pierik 1989, Thorpe 1990, Abak 1993). Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilir:

1- Haploidler ve Double Haploidler’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 döllenmiş 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- Homozigot meyve ağaçları, yumru 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 lokuslarının (QTL) genetik haritalama çalışmalarında, QTL analizlerinde mükemmel deneysel materyaller olarak nitelendirilmektedir.

DH üretim sistemi kullanılarak bir generasyonda homozigoti elde edilmiş olunur. Özellikle iki yıllık bitkiler ve uzun gençlik dönemine sahip bitkilerde zamandan tasarruf edilir. Kendi kendine tozlanan türler, dioik ve kendi kendine tozlanma problemi yaşayan türlerde saflaştırmak için tek yol olabileceği öne sürülmektedir (Murovec ve Bohanec 2012).

Haploid bitkilerin elde edilmesinde kullanılan başlangıç materyalleri gametlerdir. Esas olarak, haploidlerin elde edilebilmesi için iki yöntem bulunmaktadır: ya embriyo kesesindeki haploid yapıdaki hücrelerin –çoğunlukla yumurta hücresinin- uyarılması sayesinde dişi gametten; ya da polen rejenerasyonu yoluyla erkek gametten *in vitro* koşullarda bitki oluşumunu sağlamaktır (Ellialtıoğlu 2000).

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 parthenogenesis (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).

Kabakgiller olarak bilinen *Cucurbitaceae* familyası, tropikal alanlarda daha ağırlıklı olmak üzere dünyada oldukça geniş bir habitata sahiptir ve yaklaşık olarak 118 cins ve 825 türden oluşmaktadır (Skalova vd 2008). Ticari anlamda en fazla yetiştiriciliği yapılan türler bazındaki sıralamada kabak, kavun, karpuz ve hıyar başta gelen sebzelerdir. Toplam 1.106.133.865 ton olan dünya sebze üretiminin 227.048.320 tonunu kabakgil türleri oluşturmaktadır (FAO 2012). Türkiye'nin toplam sebze üretimi 27.818.918 ton olup, bunun 7.890.463 tonunu kabakgil türleri oluşturmaktadır (FAO 2012).

Dünyada 2.395.125 ha alan üzerinde 65.334.911 tonluk hıyar üretimi söz konusudur. Ülkemizdeki toplam hıyar üretimi ise 1.754.613 ton civarındadır (TÜİK 2013).

Hıyar, Hindistan orijinli olup, 5000 yıldır da var olduğu bilinmektedir. Hindistan’dan Çin’in doğusuna, Asya’nın batısına, Kuzey Afrika’ya ve Güney Avrupa’ya yayılmıştır. Ortaçağ’da Avrupa’da kültüre alınmıştır. 1494 Haiti’de Columbus tarafından ilk kez yetiştirilerek “Yeni Dünya’ya” tanıtılmıştır.

Hıyarın ülkemizde yetiştirilmesi çok eskilere dayanır. Her yörede üretimi yapılmakla birlikte toplam üretimin % 44’ü Akdeniz bölgesinden elde edilir. Bu bölgeyi sırasıyla % 11 Ege, % 9.8 Marmara, % 9 Orta Kuzey bölgesi izler. Toplam sebze üretimimiz içerisinde % 5’lik bir paya sahiptir. Özellikle seralarda turfanda olarak yetiştirilen hıyar, pazarda oldukça yüksek fiyat bulabilmektedir.

Hıyarlara cins ismi olarak verilen *Cucumis* kelimesi ilk defa Varro tarafından M.Ö.36 senesinde kullanılmıştır (Günay 1970).

Hıyar bitkisinin bilimsel sınıflandırılması şöyledir;

Alem : *Plantae*

Sube : *Magnoliophyta*

Sınıf : *Magnoliopsida*

Takım : *Cucurbitales*

Aile : *Cucurbitaceae*

Cins : *Cucumis*

Tür : *sativus*

Binomial adı : *Cucumis sativus* L.

Familyası *Cucurbitaceae* (Kabakgiller) olan *Cucumis* L. cinsinin sıcak bölgelerde yayılış gösteren 30 türü vardır. Ülkemizde iki türünün kültürü yapılır. Bunlar *Cucumis melo* L. (kavun) ve *Cucumis sativus* L. (hıyar)' dur (Engin 1991).

Besin değerine bakıldığında; 100 g hıyar meyvesi 12 kalori içerir bunun yanında yine 100 g meyvede 96 g su, 0,6 g protein, 0,1 g yağ, 2,2 g karbonhidrat, 45 IU Vitamin A, 0,03 mg vitamin B1, 0,02 mg. Vitamin B2, 0,3 mg Niacin, 12 mg. Vitamin C, 12 mg Kalsiyum, 0,3 mg Demir, 15 mg Magnezyum ve 24 mg Fosfor bulunmaktadır (Sevgican 1989).

Önemli sebzelerin başında gelen hıyarın ıslah çalışmalarında da biyoteknolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Hıyarda *in vitro* yöntemler kullanılarak gynogenensis yoluyla haploid bitkiler elde edilmekte ve bazı kimyasallarla bu haploidler “doubled haploid” duruma getirilerek, 2-3 yıl gibi kısa bir sürede, ıslah programlarında yer alacak olan mutlak homozigot hatlar sağlanabilmektedir. Böylece ıslah süresi kısalmakta ve klasik ıslahta zaman alan veya görülmesi mümkün olmayan resesif genlerin kontrol ettiği özellikler ortaya çıkmaktadır.

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 nedeni ile ıslah çalışmaları uzun süre almaktadır (Lower ve Edwards 1986).

Haploid bitkilerin çeşitli yollardan doğada kendiliğinden ortaya çıkma sıklığı türlere ve hatta tür içerisinde genotiplere bağlı olarak değişmekte, çoğunlukla % 0,1-0,001 gibi çok düşük seviyelerde kalmakta; birçok türde ise doğal haploid oluşumuna hiç rastlanmamaktadır (Pocard 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). Doğal haploidi genelde poliembriyoni şeklinde oluşur, tohumlarda iki embriyo bulunur ve bunlardan birisi diploid diğeri haploid yapıda olur (Abak 1983).

Cucurbitaceae familyasına giren sebze türlerinde doğada spontan haploidi oluşumuna rastlanmamıştır. Androgenesis yoluyla *in vitro* haploid bitki eldesi, genetik ve ıslah çalışmalarında kullanılacak düzeyde olmamıştır (Xue vd 1983, Ragnet 1984, Chambonnet ve Dumas De Vaulx 1985, Kurtar 1999). Bu nedenle son yıllarda

gynogenesis yoluyla haploid embriyo ve *in vitro* bitki eldesi üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Işınlanmış polenlerle tozlama yoluyla *in situ* haploid embriyo uyartımı ve bu embriyolardan *in vitro* bitki eldesi üzerine yapılan çalışmalarda kavun (Sauton ve Dumas de Vault 1987, Savin vd 1988, Sarı vd 1992, Maestro-Tejada 1992, Cuny 1992, Abak vd 1996), hıyar (Troung-Andre 1988, Sauton 1989, Niemirowicz-Szczytt ve Dumas de Vault 1989, Çağlar 1995, Çağlar ve Abak 1999), karpuz (Gürsöz vd 1991, Sarı vd 1994) ve kabak (Kurtar vd 2002) türlerinde olumlu sonuçlar alınmıştır. Hıyarda ışınlanmış polenlerle tozlama yoluyla *in situ* haploid embriyo uyartımının yanı sıra ovaryum kültürü üzerine yapılan çalışmalarda da haploid embriyo uyartımında başarılı sonuçlara varılmıştır (Dirks 1996, Gemes vd 2002, Diao 2008, Li vd 2013, Moqbeli vd 2013).

2.1. Cucurbitaceae Familyasında Haploidlerin Elde Edilmesinde Kullanılan Yöntemler

1970'li yıllardan itibaren anter ve mikrospor 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 parthenogenesis (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).

Cucurbitaceae familyasında yürütülmüş olan *in vitro* androgenesis çalışmalarında çoğunlukla kallus elde edilmiş olup, çalışma sonuçları oldukça az sayıda haploid bitki üretimi ile sınırlanmıştır (Galazka ve Niemirowicz-Szczytt 2013).

Lazarte ve Sasser (1982), hıyar anterlerinin *in vitro* kültürünü yapmışlar, kallus gelişimini takiben embriyo oluşumu ve organogenesis meydana gelmiş ancak haploid bitki elde edememişlerdir.

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

Metwally vd (1998b) anter kültürü yoluyla yazlık bir kabak çeşidinin haploid bitkilerin oluşmasında sükröz ve 2,4-D (Dichlorophenoxyacetic acid) kombinasyonlarının etkisini araştırmak amacıyla yürüttükleri çalışmada, katı MS (Murashige ve Skoog 1962) anter kültür ortamında; 30, 60, 90, 120 ve 150 g/L oranlarında sükröz ve 0,1, 1,0, 2,5 ve 5,0 mg/L 2,4-D'yi denemişlerdir. Araştırma sonucunda 150 g/L sükröz ve 5 mg/L 2,4-D ile desteklenen inkübasyon ortamından en fazla bitkicik elde ettiklerini bildirmişlerdir. Aynı zamanda yazlık kabak türünün erkek çiçeklerini 4 gün boyunca 4 °C'de soğuk ön uygulamasına tabi tutmuş ve 5 mg/L 2,4-D ve 150 g/L sükröz içeren MS ortamında anter başına 1,9 bitkicik elde etmişlerdir.

Kumar vd'nin (2003) hıyarda anter kültüründe çiçek tomurcuklarına soğuk ön uygulaması üzerine yaptıkları çalışmada, en yüksek embriyogenik kallus oranının 2 gün soğuk uygulamasından sonra (% 54,4) oluştuğunu bildirmişler ve çalışmada bitki elde edememişlerdir.

Kumar ve Murthy (2004) , hıyarda farklı oranlardaki şekerler (sükroz, maltoz, glikoz ve fruktoz), amino asitler (glutamin, glisin, arginin, aspargin ve sistin) ve poliaminlerle (putresin ve spermidin) kombine ettikleri B5 (Gamborg vd 1968) besi ortamında anter kültürünü araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda 0,44 mg/L 2,4-D, 0,22 mg/L BA (6-Benzylamin), 85 g/L sükroz ve 29 mg/L spermidin ile desteklenen B5 ortamında, anter başına 1,6 embriyo ve 1,35 oranlarında bitkicik elde etmişlerdir.

Mohamed ve Refaei'nin (2004) hıyar anterleri üzerine yapmış oldukları çalışmada, 6 mg/L 2,4-D ve 100 g/L sükroz ile kombine edilmiş MS ortamını kullanmışlardır. Oluşan kallusları 0,05 mg/L kinetin ve NAA(α -naphthalene acetic acid) ilave edilmiş MS ortamına aktarmışlardır. Çalışmada 2,6 bitki/anter sonucuna varmışlardır.

Suprunova ve Shmykova (2008) yaptıkları çalışmada, hıyar anterlerini % 8 sükroz içerikli MS + 100 mg/L serine, 800 mg/L glutamine ve çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri (2,0 mg/L 2,4- D ve 1,0 mg/L BA; 1,0 mg/L 2,4- D ve 0,5 mg/L BA; 0,4 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BA) ile modifiye edilmiş ortamlara aktarmışlardır. Çalışma sonucunda kallus elde etmişlerdir.

Hıyar anter kültüründe farklı genotip ve bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonlarının, kallus ve gametik embriyo oluşumu üzerine etkisini araştıran Hamidvand vd (2013), 1,5 μ M (Mikromolar) kinetin ile 2 μ M 2,4-D'nin kombinasyonunda en yüksek kallus oluşumunu, 2 μ M 2,4-D ile 1,0 μ M BAP'ın (Benzylaminopurin) kombinasyonunda ise anter başına düşen en yüksek embriyo oluşumunu elde etmişlerdir.

Cucurbitaceae familyasında mikrospor kültürü yöntemi yoluyla haploid bitki eldesine göre oldukça sınırlı araştırma bulunmaktadır. Suprunova ve Shmykova (2008), yapmış oldukları çalışmada hıyar mikrosporlarını % 10 sükroz ile desteklenmiş hormonsuz NLN sıvı ortamında (Lichter 1982) yıkamışlardır. Santrifüjlenen mikrosporlar % 10 sükroz ve 2,0 mg/L 2,4-D ile modifiye edilmiş NLN sıvı ortamına aktarmışlardır. Araştırmacılar gelişmesi için mikrosporları, 22 °C karanlık koşullara tabi tutmuşlardır. Çalışma sonucunda kallus oluşumu gözlenirken, embriyo oluşumu gözlenmemiştir.

Chen vd (2008), hıyarda mikrospor kültürü üstüne kullandıkları metodun patentini almışlardır. Patente göre, haploid ya da double haploid bitki rejenerasyonu için uygun aşamadaki çiçek tomurcuklarının toplanma esası tanımlanmaktadır. Ancak bu metot çok etkili olamamıştır. Daha sonraki yıllarda aynı araştırmacılar hıyar mikrospor kültürü üzerine çalışmalar yapmışlar ve kullandıkları 4 farklı genotipten sadece ikisinde toplamda 14 bitki elde etmişlerdir.

Kiełkowska ve Havey (2011) tarafından, hıyar mikrospor kültürü yoluyla bir çalışma yürütülmüştür. Çalışmada 8 farklı sıvı ortam, farklı mikrospor yoğunlukları ve düşük/yüksek sıcaklık ön uygulamaları denenmiş, fakat herhangi bir sonuç elde edilememiştir.

Dumas de Vaultx (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 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.

Işınlanmış polen tekniği kullanılarak (*in situ* tekniği), haploid embriyoların teşvik edilmesi ve *in vitro* haploid bitkilerin elde edilmesi; karpuzda (Gursoz vd 1991, Sari 1994, Taşkın vd 2013), kavunda (Sauton ve Dumas de Vaultx 1987, Cuny 1992, Maestro-Tejada 1992, Sari vd 1992, Abak vd 1996, Lotfi vd 2003, Baktemur vd 2013), hıyarda (Truong-Andre 1988, Niemirowicz-Szczytt ve Dumas de Vaultx 1989, Sauton 1989, Çağlar ve Abak 1999, Faris vd 1999, Lotfi vd 1999, Dolcet-Sanjuan vd 2006), snake cucumberde (Taner vd 2000), kabakta (Kurtar vd 2002, Baktemur vd 2014), ve balkabağında (Kurtar vd 2009) başarılı olmuştur. Işınlanmış polen tekniği *Cucurbitaceae* familyasında haploid embriyo ve bitkilerin üretimi için etkili bir metottur.

Custers ve Bergervoet (1984), *Cucumis melo* var. Noy Yizrael'in 0, 10, 100 ve 1000 Gy (Gray) dozlarındaki ışınlarla işlem görmüş polenler ile *Cucumis sativus* var. *hardwickii*'yi tozlamışlardır. Meyveler tozlamadan 3 hafta sonra hasat edilmiş ve ardından endospermli embriyosu olan ovül sayılarını tespit edilerek embriyo ve endosperm boyutları incelenmiştir. Kontrol Grubu ile 10 Gy ışın dozu arasındaki sonuçlarda bir değişiklik bulunmadığını, ışın dozu yükseldikçe ölçülen değerlerde düşüşler meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Sauton (1987), kavunda ışınlanmış polenlerle tozlama yoluyla parthenogenesis üzerinde çalışmalar yürütmüştür. Yaptıkları araştırma sonucunda kavunda normal döllenmenin olmaması için 30 kRad'dan (Krad) daha yüksek dozda ışın kullanılması gerektiğini bildirmiştir. Araştırmacı, tozlamadan 3-5 hafta sonra hasat edilen meyvelerde, 100 adet tohumdan elde ettikleri haploid embriyo sayısının ışın dozuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği ve sayısının 3'e ulaştığını söylemiştir. Bitkiye dönüşen embriyoların bitki rejenerasyonu gerçekleştikten sonra mikro çoğaltım ile bitki sayısının artırıldığı bildirmiştir. Araştırmacı, *in vitro* kromozom katlamalarında çeliklerin, 5 g/L kolhisin solüsyonunda 2 saat süreyle tutulmasının en iyi sonucu verdiğini bildirmektedir.

Sauton ve Dumas de Vaultx (1987), Védrañtais kavunlarının polenleri 10, 30 ve 100 kRad dozlarında gama ışınına maruz bırakmışlardır. Arizona ve Virka kavun çeşitlerini bu polenler ile tozlayarak çiçeklerin % 35'inin meyve tuttuğunu ve bu meyvelerin hasadı için en uygun zaman diliminin tozlamadan itibaren 3. ve 4. haftalarda

olması (tam olgunlaşmamış) gerektiği sonucuna varmışlardır. 10 kRad ışın dozunda % 0,3 diploid, % 0,8 haploid embriyo, 30 ve 100 kRad dozlarında ise sırasıyla % 1,8 ve % 1,6 oranında sadece haploid embriyoların oluştuğu gözlenmiştir. Bunun yanında bir dişi çiçeğin iki adet ışınlanmış erkek çiçek ile tozlanmasıyla ortalama % 1,81 olan haploid embriyo oranının, tozlamada 4 adet çiçek tomurcuğu kullanıldığında önemli ölçüde arttığını ve ortalama % 2,54'e yükseldiğini tespit etmişlerdir.

Truong-Andrea (1988), 400 - 600 Gy ışın dozu ile ışınlandıkları hıyar polenleri ile dişi hıyar çiçeklerini tozlayarak elde ettikleri 100 ovülden yaklaşık olarak 3 tane haploid bitki elde etmişlerdir. Bu yöntemin hıyar ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere yeterli olmadığını bildirmektedirler.

Niemirowicz-Szczytt ve Dumas de Vault (1989), Polan F₁ hıyar çeşidinin dişi çiçeklerini, 300-900 Gy dozlarında Co⁶⁰ (Kobalt 60) kaynaklı gama ışını ile ışınlanan polenlerle tozlamışlardır. Işınlanmış polenlerle yapılan tozlamada meyve bağlama oranının % 50 - 60, meyve başına düşen ortalama tohum sayısının ise 250 adet olduğunu gözlemişlerdir. Ancak tohumların çoğunun içinin boş olduğu görülmüştür. Araştırmacılar kontrol polenleri (ışınlanmamış polenler) ile yapılan tozlamalarda meyve tutma oranı % 100, meyve başına düşen tohum sayısının ise ortalama olarak 400 adet olduğunu ve tohumların neredeyse tümünün normal embriyolar içerdiğini tespit etmişlerdir. Tozlamadan 20 gün sonra hasat edilen meyvelerin tohumlarının, sadece 300 Gy dozunda ışınlanmış polenlerle tozlanan çiçeklerde 13 adet yürek ve kotiledon gibi farklı safhalarda embriyolar taşıdığı belirlenmiştir. Doğal yollarla oluşmuş bir embriyodan daha küçük olan bu 13 embriyo kültüre alınmış ve 8'inde bitki rejenerasyonu görülmüştür. Bu bitkilerden 4'ünün kök ve gövde meristemlerinde yapılan kromozom sayımlarında haploid oldukları, fakat daha sonraki mikroçelik safhasında, genç kök meristemlerindeki bazı hücrelerde spontan (kendiliğinden) kromozom katlamaları olduğu belirtilmiştir.

Gürsöz (1990), karpuzda haploid embriyo uyartımı üzerine genotipin etkisini incelemiştir. Çalışmasında Panonia F₁, Sugar Baby, Halep Karası ve Crimson Sweet çeşitlerini, yine bu dört çeşide ait karışık ve 300 Gray dozda ışın uygulanmış polenlerle tozlanmıştır. Araştırmacı, polinasyonu yapılan karpuz dişi çiçeklerinden 26 adet meyve tuttuğunu ve bu meyvelerden toplam 13.844 tohum elde edildiğini belirtmiştir. 100 tohumdaki embriyo sayıları karşılaştırıldığında, Halep Karası'nı diğer çeşitlere göre daha fazla embriyo (% 14,2), taşıdığı tespit edilmiştir. Tozlamadan sonra 3. ve 4. haftada hasat edilen meyvelerin tohumlarının ekstrasyonu için uygun aşamada olduğu sonucuna varılmıştır .

Gürsöz (Sarı) vd (1991)'nin, karpuzda ışınlanmış polenlerle uyartım tekniği ile haploid embriyo oluşumu üzerine yaptıkları çalışmada, toplamda 761 adet embriyo elde etmişlerdir. Araştırmacılar, embriyoların % 72'sinin globüler safhada olduğunu bildirmiş ve toplam 761 adet embriyodan, 17 adet bitki dönüşümü gözlemişlerdir. En uygun tozlama döneminin 31 Mayıs - 13 Haziran periyodu olduğu belirtilmiştir. Flow sitometri analizleri sonucunda elde edilen bitkilerin tamamının haploid oldukları tespit edilmiştir.

Przyborowski ve Niemirowicz-Szczytt (1994)'in hıyarda yürütmüş oldukları haploid bitki eldesi çalışmasında, ışınlanmış polen tekniğini kullanmışlardır. 300 Gy gama ışınıyla uyartılmış iki saf hattın polenleriyle tozlanan dört F₁ çeşitten elde ettiği embriyoları *in vitro*'da E20A ortamında kültüre almışlardır. En çok embriyo Polan F₁ çeşidinde gözlenirken, 100 tohumda 1,34 embriyo elde edilmiş ve bu embriyoların % 51'inin gelişme gösterdiği bildirilmiştir. Yaz aylarında yapılan tozlamaların, bahar aylarında yapılan tozlamalara göre daha iyi sonuç verdiği ortaya konulmuştur. Oluşan bitkilerden yalnızca bir tanesinin diploid, diğerlerinin ise haploid veya aneuploid olduğu belirlenmiştir.

Çağlar (1995), hıyarda ışınlanmış polenlerle uyartım yolu ile haploid embriyo elde edilmesi üzerine genotipin ve mevsimin etkili olduğunu bildirmiştir. Işın dozu 3 farklı düzey (300, 450 ve 600 Gy) uygulanarak denemede kullanılan 4 genotipte (Qamar F₁, Seraset F₁, Dere ve Çengelköy) de yıl boyu embriyo uyartımı sağlanmış olup en uygun ışınlama düzeyinin ise 300 Gray ve en iyi dönemin mayıs-eylül arasındaki dönem olduğu belirtilmiştir. Qamar F₁'den 704, Seraset F₁'den 603, Dere'den 29 ve Çengelköy'den ise 43 adet haploid bitki elde edilmiştir. Araştırmacı, bu bitkilerin double haploidlerini elde etmek için ise en uygun kolhisin dozunun % 1 ve muamele süresinin 2 saat olduğu sonucuna varmıştır.

Yanmaz vd (1997), acur (*Cucumis melo* var. *flexuosus*) türünde haploid embriyo elde etmek için 250, 300 ve 350 Gy ışın dozlarını denemişler ve sonucunda 300 ile 350 Gy dozlarında embriyo ve bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Faris vd (1999), ışınlanmış polen tekniği kullanarak farklı genotip ve farklı genetik seviyelerdeki hıyar hatlarında haploidizasyon çalışmalarında ışın dozu uygulaması denemişlerdir. Tüm çalışılan çeşitler arasında embriyo sayısı bakımından farklılıklar bulmakla birlikte yaklaşık bitki dönüşümünü % 3,3 olarak tespit edilmiştir. 0,05 kGy uygulanan ışın dozunda sadece diploidler oluştuğunu gözlemişlerdir. 0,1 Gy' in daha fazla sayıda haploid embriyo gelişimini teşvik ettiğini doğrulamışlardır.

Çağlar (1999), hıyarda ışınlanmış polenlerle uyartım tekniği ile haploid embriyo elde edilmesi üzerine genotipin ve mevsimin etkili olduğunu bildirmiştir. İleri gelişim safhalarındaki haploid embriyolar globüler safhadakilere göre daha kısa sürede (3,5 günde) ve daha yüksek oranda (1. yıl % 60, 2. yıl % 80) bitkiye dönüştüğü sonucuna varmıştır. Mayıs-eylül ayları arasında *in vitro* kültüre alınan embriyolardan yılın öteki dönemlerine göre daha fazla sayıda haploid bitki elde edilmiştir. İkinci yıl haziran ayında embriyoların bitkiye dönüşümleri % 80'e ulaşmıştır. Meyve basına haploid bitki sayısı çok yüksek olmamakla beraber, iki yılın sonunda 4 genotipten toplam olarak 190 adet haploid bitki elde edilmiştir.

Taner vd (2003), acur (250, 300 ve 350 Gy) ve kavunda (300 ve 350 Gy) gama ışını kullanarak ışınlanmış polen tekniğinin haploid embriyo oluşturmadaki etkisi ve çiçek tozu canlılığı ile ışın düzeyi arasındaki ilişki üzerine incelemede bulunmuşlardır. Acurda çiçek tozu canlılığı, 250 Gy'de % 28,8, 300 Gy'de % 28,0 oranında bulunmuş olup, en düşük canlılığın ise % 19,4 ile 350 Gy'de olduğunu bildirmektedirler. Doz ve çiçek tozu yaşı arttıkça çiçek tozu canlılığının azaldığını gözlemişlerdir. Kavunda ise, ışınlarla uyartılmış çiçek tozları ile yapılan tozlamadan 72 saat sonra, 300 Gy'lik dozda

uygulama yapılan anterlerde, çiçek tozu çim borularının % 64,54'ünün yumurtalığa ulaştığı ve haploid embriyo oluşumunu teşvik ettiği tespit edilmiştir. İki tür içinde haploid embriyo oluşumunda 300 ve 350 Gy'lik dozların uygulanmasının 250 Gy'e göre daha olumlu sonuçlar ortaya koyduğu bildirilmiştir.

Claveria vd (2005), ışınlanmış polen tekniğini kullanarak 500 Gy dozunda ışın uygulanan hıyar polenleri ile ovaryumlarda partenogenetik uyartım sağlamışlardır. X ışını kullanarak tespit ettikleri embriyoları kurtarmışlardır. Haploid olduğunu düşündükleri embriyoları *in vitro*'da kültüre alarak, embriyolarda istenilmeyen zigotik yapıları tanımlamak için kodominant hıyar ve kavun SSR markırları ile flow sitometri yöntemlerini kullanmışlardır. Bunlardan başka spontan haploid bitkilerin oluşumlarının olmadığı da bildirilmiştir. Elde edilen haploid bitkiler kolhisin uygulaması ile *in vitro* koşullarda dihaploid hale getirilmiştir.

Dolcet vd (2006), hıyarda 0,5 kGy (Kilo Gray) dozunda Co⁶⁰ kaynaklı gama ışını ile ışınlama yaparak partenogenetik haploid embriyo uyartımını sağlamışlardır. Embriyoları X ışını ile tespit ederek *in vitro* kültürde rejenerasyonunu sağlamışlar ve oluşan bitkilerin "Flow sitometri yöntemi" ile de ploidy seviyesini belirlemişlerdir. Haploid olarak belirlenen bitkilerin kromozomlarını katlamak için kolhisin çözeltisi kullanmışlardır. Çalışmanın sonunda bitkilerde kendileme yapılarak tüm hatlardan tohum elde edilmiştir.

Lofti vd (2008), 250 Gy ile ışınladıkları hıyar polenleri ile hıyar ovaryumlarını tozlamışlardır. Ovaryumları 21 gün sonra hasat ederek, hasat edilen meyvelerden alınan tohumlar E20A ortamının sıvı kültürüne aktararak 10 gün boyunca 16 saat aydınlık - 8 saat karanlık koşullarda bekletmişlerdir. Işık düzeninde içinde embriyo bulunan tohumlar tespit edilerek aseptik koşullarda embriyoları kültüre almışlardır. Toplamda 48 kurtarılan embriyodan 25 tane bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir.

Baktemur vd (2010), kavunda ışınlanmış polen tekniği ile oluşan embriyoların daha kolay, hızlı, etkili şekilde ayrılması ve çıkartılabilmesi için kullanılacak yöntemlerin tespiti üzerine yaptıkları çalışmada, kontrol uygulaması olarak "tohumların tek tek açılarak embriyoların kurtarılması" yöntemini kullanmışlardır. Bu yöntem alternatif olarak "tohumların hepsinin doğrudan besin ortamına ekimi", "tohumlara ışıktaki bakarak embriyolu tohumların ayrılması" ve "tohumların hepsinin sıvı ortama ekimi" olmak üzere 3 yeni yöntem denemişlerdir. Tohumların hepsinin sıvı ortama ekimi uygulamasında embriyo gelişimi sağlanamamış ve yüksek oranda enfeksiyon sorunu ile karşılaşmışlardır, Gerekli süre ile birlikte değerlendirildiğinde en iyi uygulamanın tohumların hepsinin besin ortamına ekimi yöntemi olduğunu tespit etmişlerdir.

Baktemur vd (2013), kavunda ışınlanmış polen tekniği ile oluşan embriyoların tespitinde kullanılan yöntemler üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışma ile, en kısa sürenin ve etkili bir metodun belirlenmesi amaçlanmıştır. Tek tek açma yöntemini kontrol grubu olarak ele almışlar ve bununla doğrudan CP ortamına (Kavun besi ortamı) ekim, ışıktaki bakma yöntemi, sıvı ortamda yüzdürme tekniklerini karşılaştırmışlardır. Sıvı ortamda yüzdürme tekniğinde enfeksiyon problemi yaşamışlar ve haploid bitki elde edememişlerdir. Çalışan için embriyo kurtarmada en hızlı ve en etkili yöntemin doğrudan CP ortamına ekim ve ışıktaki bakma yöntemi olduğunu bildirmişlerdir.

Taşkın vd (2013), farklı genotiplerdeki karpuzlarda ışınlanmış polen tekniği ile farklı dozda ışın uygulamışlardır. Ticari değeri olan 2 farklı karpuz genotipinde uygun haploidizasyon protokolünü belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada, 5 farklı dozda (50, 150, 200, 275 ve 300 Gy) ışın uygulamışlardır. Tozlamadan 25 gün sonra alınan 43 meyveden 60 adet haploid embriyo elde etmişlerdir. Kurtarılan embriyoları, 30 g/L sükröz, 0,08 mg/L B12 (Siyanokobalamin), 0,02 mg/L IAA (İndolacetic acid) ile kombine edilmiş CP ortamına aktarmışlardır. Araştırma sonucunda 100 tohumdan 3,57 haploid embriyo elde ettiklerini, 1. genotipin en başarılı genotip olduğunu belirtmişlerdir. En etkili ışın dozunda 275 Gy olduğunu bildirmişlerdir. 275 Gy ışın dozu ile ışınlanmış 1. genotipte 100 tohumdan 6,25 haploid embriyo elde etmişlerdir.

Baktemur vd (2014), farklı genotiplerdeki kabaklarda, ışınlanmış polen tekniği ile 3 farklı dozda ışın uygulamasını denemişlerdir. 14 farklı genotip üzerinde; 150, 200, 300 Gy gamma ışın dozlarını kullanmışlardır. Birinci yıl; 100 tohumdan 150 Gy ışın dozunda 9,12 haploid embriyo, 200 Gy ışın dozunda ise 3,53 haploid embriyo elde etmişlerdir. Genotip 3, 100 tohumdan 12,42 embriyo eldesi ile en başarılı genotip olarak tespit edilmiştir. Toplamda 219 meyveden 1.858 embriyo elde etmişlerdir. İkinci yılda; 8 genotipte, aynı gama ışın dozu kıyaslaması yapmışlardır. 217 meyveden; 1.378 diploid ve 2.625 haploid embriyo gözlemişlerdir. En yüksek embriyo 150 Gy ışın dozu kullanımında olduğunu tespit etmişlerdir. En başarılı genotipin, genotip 6 olduğunu bildirmişlerdir.

Hıyarda *in situ* yöntemi ile haploid embriyo eldesi ve rejenere olmuş bitki sayıları istenilen düzeye ulaşmamıştır (Sauton 1989, Przyborowski ve Niemirowicz-Szczt 1994, Sarı vd 1994). Bu nedenle bu türde gynogenesis çalışmalarına yönelme olmuştur.

Dişi gametlerden haploid bitki eldesi erkek gamet hücrelerinden bitki eldesine alternatif olarak kullanılacak bir yöntemdir. Anter ve mikrospor kültürünün çalışmadığı türlerde, bu yöntem bir çıkış noktası olarak görülmektedir. (Pavlova, 1987, Champion ve Alloni 1990, Choob vd 1994). Dişi gametlerden bitki elde edilme oranının erkek gametlere göre daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarda görülmektedir (Bugara ve Rusina 1988, San Noeum ve Ahmadi 1980).

San Noeum (1976) ilk defa döllenenmemiş arpa (*Hordeum vulgare*) ovaryumlarını *in vitro* da kültüre alarak gynogenesis ile haploid bitki eldesinin öncüsü olmuştur.

Dryanovska ve Ilieva (1983), kavunda (*Cucumis melo* L.) organogenesis ve haploidinin teşviki amacıyla anter ve ovül kültürü yapmışlardır. Kavunun meyve etinden ayrılan ovüllerini plasenta ile birlikte kültüre almışlar ve bunlardan haploid kallus oluşturmuşlardır. Oluşan kalluslardan indirekt olarak bir adet haploid bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Chambonnet vd (1985), kabakta (*Cucurbita pepo* L.) döllenenmemiş ovülleri *in vitro* kültüre alarak, embriyo kesesi hücrelerinden haploid bitkiler elde etmişlerdir. Uygun koşul ve besi ortamındaki ovüllerden oluşan embriyolarda bitki rejenerasyonu görüldüğünde bitkiler hormonsuz besin ortamına transfer edilmiştir. Çiçeklenmeden 1

veya 2 gün önce döllenme olmaksızın alınan ovüllerde en iyi sonuçlar elde edilerek, 100 ovülden 4 - 7 arasında bitki oluşumu sağlanmıştır. Oluşan bitkilerin çoğunun diploid, fakat bazılarının haploid-diploid kimera, aneuploid veya polyploid olduğunu saptayan araştırmacılar, diploid bitkilerin genetik analiz sonuçları ile yapılan karşılaştırmada ana bitkiye benzemeyen 8 heterozigot F₁ bitki gözlenmiştir. Rejenerasyona uğramış F₁ bitkilerin her biri farklı fenotipler göstermişlerdir.

Shail ve Robinson (1987), *Cucurbita pepo* cv. Black Jack, ile *C. ecuadorensis*'in tozladıktan 24 ile 72 saat sonra alınan ovülleri besin ortamına transfer etmişlerdir. Sonucunda kallus ve kök oluşumu gözlemlerken bitki elde edemediklerini bildirmişlerdir.

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 Tween 20 damlatılmış olan % 10'luk calcium hypochlorid solüsyonunda 10 dakika yüzey sterilizasyonu yapmış ve saf su ile 3 kez durulamıştır. 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.

Kwack ve Fujieda (1988), bal kabağının (*Cucurbita moschata*) döllenmemiş ovüllerini *in vitro*'da kültüre alarak haploid bitki oluşturma oranı incelemişlerdir. Anthesis (çiçek açım) safhasından 2 gün önce alınan ovaryumlar, 5 °C ön sıcaklık uygulamasına tabi tutulmuş ve ovaryumlardan alınan ovüller farklı ortamlara aktarılmıştır. Araştırmacılar, 30 g/l sakkaroz içeren MS ortamına transfer edilen ovüllerden % 17 embriyo oluşumu gözlemleyerek, en iyi sonucu elde ettiklerini bildirmişlerdir. Oluşan embriyolar uygun bir ortama aktarıldığında, çoğunun kallus oluşturmaya yöneldiği ve anormal morfolojik gelişmeler gözlemlendiği, sadece birkaç tanesinin normal sürgün ve kök verdiğini belirlenmiştir. Araştırma sonucunda elde edilen 3 bitkiden birinin diploid (2n=40), ikisinin ise tetraploid olduğu saptanmıştır.

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 döllenmemiş ovüller çıkartılmıştır. Araştırmacılar 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 görüldüğü bildirilmiştir.

Gemes ve Venczel (1996), 3 haftalık ana bitkilerden aldıkları 2 - 3 cm uzunluğa ulaşmış (çiçeklenmeden önce) döllenmemiş kabak ovaryumlarını toplayarak yüzey sterilizasyonunu yapmışlardır. Ardından kabak ovaryumlarının dış yüzeyini soyarak dilimlemişlerdir. Dilimlenen ovaryumların *in vitro* kültürde başlangıçta TDZ (thidiazuron) ve % 4 sakkaroz ilave edilmiş (ZI) ortamına aktarıldığı ve ardından rejenerasyon için NAA ve BA'nın farklı kombinasyonlarının kullanıldığı EI ortamına

transfer edildiği belirtilmiştir. Yaklaşık 6 hafta sonra ovüllerden embriyoların gözlemlendiği ve her bir ovaryumdan yaklaşık 10 - 15 embriyo oluştuğu tespit edilmiştir. Bitki dönüşümü gerçekleşen bitkileri ploidy seviyelerine bakıldığında ise % 70'inin haploid, % 30'unun double haploid ve aneuploid olduğu saptanmıştır.

Metwally vd (1998), anthesisten 1 gün önce toplanan kabak ovaryumlarını; 0, 2, 4 ve 8 gün süre ile 4 °C sıcaklıkta tutmuşlardır. Ardından araştırmacılar, şişme gözlenen 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 konsantrasyonuyla modifiye edilmiş MS ortamında kültüre almışlar ve 25 ±1 °C sıcaklık ve 16 saatlik ışık periyodunda 4 hafta bekletmişlerdir. 4 hafta sonunda gelişim gösteren ovüller büyüme düzenleyici madde içermeyen MS ortamına transfer edilmiştir. Kültüre alınmış olan 100 ovülden elde edilen bitki sayısı dikkate alındığında, en fazla bitkinin soğuk uygulaması yapılmayan ovüllerin, 1 veya 5 mg/L 2,4-D eklenen MS ortamında aktarılmasıyla elde edildiği bildirilmiştir.

Ficcadenti vd (1999), kavunda yaptıkları çalışmada döllenmemiş ovaryumlar üzerinde gynogenensis çalışmalarını yürütmüşlerdir. Ovaryumların kesilerek, 0,09 µM TDZ ile modifiye edilmiş MS besi ortamında 4 gün kültüre alınıp, ardından 0,27 µM NAA ve 0,88 µM BA ile modifiye edilmiş MS besi ortamına transfer edildiği bildirilmektedir. Gynogenik embriyoların 4 - 6 hafta sonunda gözlemlendiği, tüm genotiplerden toplamda % 82 gynogenik embriyo oluştuğu sonucuna varmışlardır. Rejenere olmuş bitkilerin kromozom sayılarına göre % 15,4'inin haploid, % 23,1'inin diploid, % 61,5'inin mixoploid olduğu belirtilmektedir.

Lotfi vd (2003), kavunda haploid bitki eldesinde ışınlanmış polen tekniği ve ovaryum kültürünü karşılaştırmak için bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar, ovaryumları Tween 20 içerisine batırılıp çıkarıldıktan sonra su ile duruladıklarını ve ardından % 100 Clorox çözeltisinde 15 dakika bekletip, 3 defa steril saf su ile duruladıklarını belirtmişlerdir. Ovaryumları (8 - 15 mm uzunlukta) 6 - 10 parçaya bölünüp, 0,4 mg/L thiamine, 100 mg/L myo-inositol, 40 g/L sükroz ve 0,02 mg/L (0,09 µM) TDZ, % 0,8 Phytagar ve MS temel tuzları içeren besi ortamına aktarmışlardır. 4-5 gün sonra ovaryum parçalarını TDZ yerine 0,05 mg/L (0,27 µM) NAA ve 0,2 mg/L (0,88 µM) BA ile modifiye edilen aynı ortama transfer etmişlerdir. İki farklı genotipten toplamda 122 ovaryum kültüre almışlar ve çoğunlukla bu ovaryumların somatik dokularından kallus oluşumu gözlemlenmiştir. 5 - 6 hafta sonunda bu ovaryumlardan 3 bitkicik elde edildiği bunların ploidy seviyesinin belirlenemediği bildirilmektedir. Araştırmacılar gynogenesisin kavunda partenogenesis (ışınlanmış polen tekniği) göre daha az etkili olduğu ve embriyo oluşumunun genotipe bağlı olduğu sonucuna varmışlardır.

Shalaby (2007), kabakta ovül kültüründen haploid bitki eldesi üzerine yaptığı çalışmada, 12 adet genotipte; uygun ovaryum aşamasını, gerekli sıcaklık uygulamasını ve şeker konsantrasyonunun etkisini incelemiştir. Anthesisten 1 gün önce topladığı ovaryumların ovüllerini, 1 mg/L kinetin ve 1 mg/L 2,4-D ile % 3, % 6, % 9 şeker içeren MS ortamlarına almıştır. 25 ± 1 °C sıcaklık ve 16 saatlik ışık periyodunda 4 hafta da bir ortam yenileyerek muhafaza etmiştir. En yüksek rejenerasyon oranını % 3 şeker içeriği olan ortamda gözlemiştir. Ayrıca 4 gün 32 °C inkübasyon koşullarının embriyonik

teşvik için en uygun sıcaklık olduğu sonucuna varmıştır. Oluşan bitkilerin % 65'inin haploid, % 35'inin de dihaploid olduğunu tespit etmiştir.

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.

Nunhems Zaden BV, Alman tohum firmasının, hıyarda ovaryum kültürü yöntemi ile haploid ve DH'lerin gözlemlenmesi (Dirks 1996) üzerine yayınladığı patente göre donör bitkinin genotipine bağlı olarak bir kişinin ortalama olarak diktiği günlük en az 300 ovaryumdan 240 haploid orijinli embriyo oluşturabileceği, aynı zamanda % 80 haploid embriyo gelişimi gözlemlenebileceği öne sürülmektedir.

Gemes vd (2002), 5 partenokarpik hıyar ıslah hattı (7D4C, KS0C, D20F2A, E10D14, Perez ML) (ana ebeveyn) ve bir hibrit çeşit (Perez F₁) kullanarak ovaryum kültürünü araştırmışlardır. Araştırmacılar donör 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. Embriyo oluşumu için CBM (Cucumber Basal Medium) ortamına 0,02 mg/L TDZ ve % 4 sakkaroz ilave edilmiştir. Ovaryumlar karanlıkta 24 °C, 28 °C veya 35 °C sıcaklıklarda 2 ile 10 gün süre ile kültüre alınmıştır. Oluşan embriyolar 0,05 mg/L NAA, 0,2 mg/L BA ve % 3 sakkaroz ilave edilen rejenerasyon 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.

Chen vd (2005), 3 farklı genotip hıyarda ovaryum kültürü ile haploid çalışmaları yürüttüklerini ve ovüllerin başarılı bir şekilde uyarıldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, çiçek açım döneminden bir gün önce toplanan Lu 9 ovaryumlarını, en uygun eksplant evresi olarak tespit etmişlerdir. Ovaryumların uyarılması için 0,06 mg/L TDZ ve 40 g/L sükröz ile modifiye edilmiş başlangıç ortamında, 35 °C sıcaklık ve karanlıkta ön uygulamaya tabi tutulmuş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen embriyoidler için en uygun ortamın 0,1mg/L NAA, 0,8 mg/L 6-BA, 40 g/L sükröz ile modifiye edilmiş rejenerasyon ortamı olduğu ve en uygun büyüme koşullarının da 25 °C sıcaklıkta, 16 saat aydınlık - 8 saat karanlık 4500 lüks (aydınlık şiddeti) ışık yoğunluğu olduğu bildirilmektedir. Araştırma sonucuna göre embriyo oluşumunu; genotip, eksplant gelişim evresi, ortam ve gelişme sıcaklığının etkilediği belirtilmiştir.

Diao vd (2008), hıyarda gynogenesis ile haploid bitki oluşumu üzerine sıcaklık ön uygulama sürelerini (35 °C de 2, 3 ve 4 gün), farklı konsantrasyonlarda ki TDZ'nin embriyo oluşturmada etkisini (0,01 mg/L, 0,02 mg/L, 0,04 mg/L) ve AgNO₃' un embriyo rejenerasyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda ovaryumların 0,04 mg/L TDZ konsantrasyonunda embriyo oluşturduğu ve 35 °C de 3 gün karanlıkta bekletmenin embriyo oluşumunu tetiklediği tespit etmişlerdir. 40

rejenere olmuş bitkicikten; 2 haploid bitki elde ederken, AgNO₃' ün embriyo oluşumu üzerine bir etkisinin olmadığı sadece daha yeşil ve güçlü bir embriyo oluşturmaya etkili olduğunu gözlemlemişlerdir.

Suprunova ve Shmykova (2008), hıyarda haploid bitki üretimi teknikleri üzerine yaptıkları çalışmada ovül kültürünü denemişlerdir. Çiçek açımında, çiçek açımından 6 saat önce ve çiçek açımından 2 gün önce alınan ovaryumların ovüllerini başlangıçta % 5 süktroz içerikli farklı hormon ve hormon konsantrasyonları ile modifiye edilmiş MS ortamına aktarmışlardır. İki hafta karanlıkta 22 °C de inkübe olan farklılaşmış ovülleri, % 3 süktroz, 0,05 mg/L NAA ve 0,2 mg/L BA içerikli MS ortamına transfer ederek, 22 °C sıcaklıkta 14 saat ışık periyodunda 2 hafta bekletmişlerdir. Farklılaşan kallusları % 3 süktroz, 0,02 mg/L NAA ve 0,4 mg/L BA içerikli MS ortamına aktarmışlar ve sürgün oluşumunu teşvik etmişlerdir. Gelişen sürgünleri hormon içeriği olmayan aynı ortama aktarmışlardır. Araştırmacılar en yüksek embriyo oluşumunun "Gordion" çeşidi hıyarda % 3,5 oranında MSm ortamı ile 0,2 mg/L TDZ ve 0,2 mg/L BA kombinasyonunda olduğunu, % 3 süktroz, 0,02 mg/L NAA ve 0,4 mg/L BA içerikli MS ortamında % 0,5 bitki dönüşüm oranı olduğunu bildirmektedirler.

Wei vd (2010), döllenmemiş hıyar ovaryumlarında gynogenesisin, hormon ve polyamin içeriği ile arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışma yürütmüşlerdir. Yüksek gynogenesis kabiliyeti olan 5 genotip ve düşük gynogenesis kabiliyeti olan 4 genotipi bitki materyali olarak kullanan araştırmacılar, IAA, ZR (zeatin-riboside), GA₃ (Gibberellik asit) ve ABA (Absisik asit) içerikli ortamlarda 3, 6, 9 ve 16 gün kültüre almışlardır. Bu hormonların dışında spermidine (Spd), spermine (Spm), putrecine (Put) ve cadecine (Cad) içeren poliamin bileşimlerinde etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonucunda hıyar ovaryumlarında gynogenesisin teşvik edilmesi ile IAA, ZR, GA₃ ve ABA içerikleri ortamlarda kültüre alınması arasında hiçbir ilişki bulunmamıştır. Fakat araştırmacılar IAA/ZR, IAA/GA₃ ve ABA/ GA₃'ün belirli oranlarda kullanılmasının az da olsa gynogenesisi teşvik etmede bir yararı olduğu sonucuna varmışlardır. IAA/ABA oranında kültüre alınan ovaryumlarda 3 gün sonra gynogenesis eğiliminin arttığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, yüksek gynogenesis yanıt veren genotiplerin, düşük gynogenesis tepki verenlere göre fazla miktarda serbest ve bileşik Spd+Spm içeriğine, yüksek oranda poliamin içeriğine ve toplam poliaminden daha düşük oranda Put'a sahip olduğunu belirlemişlerdir. Spd'nin, kültüre alınmamış döllenmemiş ovaryum içindeki ana polyamine tiplerinden biri olduğunu, ovaryumlar kültüre alındıktan 6 gün sonra Spd ve Spm içeriğinin büyük oranda azaldığını bunun yerine Put ve Cad ise büyük oranda arttığını bildirmişlerdir. Böylece Put' un ana poliamin konumuna geldiği sonucuna varmışlardır.

Peixiaoli (2011) master çalışmasında, hıyarda gynogenesis ve ışınlanmış polen tekniğini karşılaştırmıştır. Araştırmada ışınlanmış polen tekniği denenilen 29 hıyar genotipinde embriyo teşvik oranının 0,18 ile 2,20 arasında olduğu ve genotiplere göre başarı oranının değiştiği bildirilmektedir. Araştırmanın gynogenesis bölümünde ise; genotip, TDZ ve AgNO₃ etkisi çalışılmış olup, sonuçların genotiplere göre çeşitlilik gösterdiği tespit edilmiştir. Gynogenesis tekniği kullanılarak kültüre alınan 9 hıyar genotipinde başarı oranının, % 65,52 ile % 93,33 arasında değişiklik gösterdiği belirtilmektedir. Başlangıç ortamının 0,08 mg/L TDZ ve 5 mg/L AgNO₃ ile modifiye edilmesinin gynogenesisin teşviki için optimum değerler olduğu sonucuna varılmış

olup, rejenere olmuş embriyolardan; 8 haploid bitki ve 2 diploid bitki elde edildiği bildirilmektedir.

Li vd (2012), Henan hıyarlarından (*Cucumis sativus* L.) aldıkları döllenmemiş hıyar ovaryumlarında embriyo teşviki için en uygun başlangıç ortamı ve embriyolardan bitki dönüşümü için en uygun rejenerasyon ortamını belirlemek üzere bir çalışma yürütmüşlerdir. 3 gün sıcaklık uygulaması yapılan eksplantlar, 0,06 ~ 0,08 mg/L TDZ içerikli besi ortamlarına koyulduğu takdirde en yüksek oranda embriyo oluşumu olduğu, 0,05 mg/L NAA ve 0,4~0,6 mg/L BA içerikli besi ortamlarında da en yüksek oranda embriyo rejenerasyonu gerçekleştiği belirtilmiştir. Araştırmacılar çalışma sonucunda 3 farklı çeşitten embriyo elde etmişlerdir. Genotip farklılığı, sıcaklık ön uygulama süresi, besi ortamında bulunan TDZ konsantrasyonu ve eksplantların gelişim evresinin embriyo oluşum oranını etkilediği bildirilmektedir. Embriyoların bitkiye dönüşümünde de besi ortamında bulunan 6-BA ve NAA konsantrasyonlarının etkilediği belirtilmektedir.

Li vd (2013)'nin uzun Çin hıyarları üzerinde yaptıkları çalışmada; CBM temel besi ortamına farklı konsantrasyonlarda ki TDZ (0,03, 0,05, 0,07 ve 0,09 mg/L) ve AgNO₃ (5,10 ve 15 mg/L) eklenerek, bunlara dikilen ovaryumların, haploid bitki oluşturma yeteneğine bakılmıştır. Ayrıca en uygun ovaryum alım dönemini tespit etmek için çiçek açım dönemi esas alınarak 4 farklı dönemde (anthesisden 3 gün, 2 gün, 1 gün önce ve anthesis zamanında) ovaryumlar alınmıştır. Ovaryumlar ortama yerleştirildikten sonra ilk 4 gün 35 ± 1 °C sıcaklıkta, karanlık koşullarda ön uygulamaya alınmıştır. En iyi başlangıç ortamı 0,03- 0,07 mg/L TDZ içerikli CBM besi ortamı olurken, çiçek açım döneminde alınan ovaryumların en uygun eksplant alınma dönemi olduğu sonucuna varılmıştır. Olgun embriyoların çimlenmesi ve bitkiye dönüşmesi için rejenerasyon ortamına 5 - 10 mg/L AgNO₃ eklenmesi uygun görülmüştür.

Moqbeli vd (2013)'nin hıyarda genotipin (6 farklı genotip), sıcaklık ön uygulanmasının (35±1 °C 0, 2, 3, 4 gün) ve TDZ hormon konsantrasyonunun (0, 0,01, 0,02, 0,03 ve 0,04 mg/L) ovaryum kültürü üzerine etkilerinin araştırılması için yaptıkları çalışmada; genotipin embriyo oluşumuna etkisi olduğu, 0,04 mg/L TDZ konsantrasyonunun MS ortamında embriyo oranını arttırdığı ve 35±1 °C 3 gün ön uygulama koşullarında bekletmenin, embriyo oluşumunu teşvik ettiği sonucuna ulaşılmıştır.

Plapung vd (2014a, 2014b), ovül kültürü ile hıyar mozaik virüsü dirençli hıyar hatlarının geliştirilmesi üzerine yaptıkları çalışmanın ovül kültürü bölümünde, haploid bitkilerin üretilmesi üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar 68 hıyar hattından aldıkları döllenmemiş hıyar ovaryumlarını % 10 kalsiyum hipoklorit ve % 3 sodyum hipokloritte 20 dakika bekletip ve ardından 3 kez steril saf su ile durulamışlardır. Hıyar ovaryumlarını 5 ppm (milyonda bir) AgNO₃ ile modifiye edilmiş CBM ortamında 1 ay bekletmişlerdir. Embriyo teşviki için ovaryumlardan çıkarılan ovüllerini kinetin, BA: IAA, 2ip (6- (gamma, gamma-Dimethylallylaminopurine)): IAA oranları 2:1, 3:1 and 4:1 ppm bulunan başlangıç ortamına transfer etmişler ve 2 ay büyümesi için bekletmişlerdir. Oluşan yeşil embriyolar BA: IAA, 2ip: IAA oranları 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1 ppm ile modifiye edilmiş rejenerasyon ortamına aktarmışlardır. Bitki dönüşümü gerçekleşen bitkileri, MS ortamında köklendirerek, kromozom sayımı ile bitkilerin haploid olduklarını tespit etmişlerdir. Bitkilerin ploidy seviyesine bakılarak;

oluşan bitkilerin 42 klonun 13'ü haricindeki klonlardan 14'ünün haploid olduğu (kromozom sayısı $n=7$ olduğu ve bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısı 6), 24 hattın direk double haploid olduğu (kromozom sayısının $n=14$, bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısının 11-12) olduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

Araştırma 2014-2015, Eylül - Mart aylarında Kuzey Agripark Bitki, Araştırma ve Biyolojik Mücadele San. ve Tic. Ltd. Şti. istasyonunda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

Haploid embriyo oluşum oranı, türlere ve tür içinde de genotiplere göre değişiklik gösterdiği daha önce yapılmış olan çalışmalarda bildirilmektedir. Bu amaçla çalışma için gerekli bitki materyali Kuzey Agripark Firması tarafından yetiştirilen 3 farklı genotipte hıyar bitkilerinden sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan çeşitler partenokarpik özelliğe sahip olup, adlandırılmaları sırasıyla 583, 584 ve 550 olarak belirlenmiştir.

3.2. Metot

Araştırmada hıyarda haploid embriyo ve bitki eldesini teşvik etmede kullanılacak en uygun ortam kombinasyonu ve gynogenesis protokolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.2.1. Bitkilerin yetiştirilme koşulları

In vitro çalışmalarında kullanılacak olan donör bitkinin hastalık ve zararlılardan uzak sağlıklı bitki olması gerekmektedir. Çalışmada kullanılan donör bitkiler topraksız sera koşullarında, yetiştirilmiştir. Bitkilerin tohumları 28.08.2014 tarihinde ekilmiş olup, her genotipten 6 bitki olacak şekilde 07.09.2014 tarihinde sera koşullarına dikilmiştir (Şekil 3.1, 3.2).



Şekil 3.1. Fidelerin yetiştirilmesi



Şekil 3.2. Topraksız sera koşullarında bitkilerin yetiştirilmesi

3.2.2. Dişi çiçeklerin alınma evresi

Yapılan çalışmalara göre hıyarda haploid bitki üretimi için en uygun gynogenesis aşamasının; anthesisden 6 saat, 1 ve 2 gün önce alınan ovaryum aşamaları olduğu belirlenmiştir (Li vd 2013, Gemes vd 2002). Bu aşamalar dikkate alınarak denemede anthesis döneminden 6 saat, 1 ve 2 gün önce alınan ovaryumlar kullanılmıştır. Çiçek açımı (anthesis) gerçekleşmemiş, embriyo kesesi oluşumunu tamamlamış ovaryumlar materyal olarak seçilmiştir (Şekil. 3.3).



Şekil 3.3. Ovaryumların sınıflandırılması; a) Erken Dönem, b) Anthesisden 2 gün önce, c) Anthesisden 1 gün önce, d) Anthesisden 6 saat önce, e) Anthesis, f) Anthesisden 1 gün sonra

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 ortamıdır. Kültüre alınmış ovaryumlar için daha önceki çalışmalarda denenen 3 farklı besi ortamı kullanılmış olup, her bir besi ortamı için sabit olarak belirlenmiş olan hormon konsantrasyonu kullanılmıştır. Besi ortamları aşağıdaki gibi olup, besin içerikleri ve besin ortamı adları Çizelge 3.1 ve 3.2’ de verilmiştir.

- MS ortamı ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962) + 1:10; 2,4-D:Kinetin
- Miller makro ve mikro tuzları (Miller 1963) + Fujii vitaminleri (Clapham 1971)+ 1×10^{-4} FeNaEDTA + 1:10; 2,4-D:Kinetin
- CBM temel besi ortamı ve vitaminleri (Gemes vd 2002) +1:10; 2,4-D:Kinetin

Çizelge 3.1. Besi ortamlarının adlandırılması

	Embriyo Teşvik Ortamları	Embriyo Rejenerasyon Ortamları
MS	MSB	MSR
Miller	MİB	MİR
CBM	CBM	CBR

Miller ortamı ile birlikte kullanılan Fujii vitamininin Thiamine Hydrochloride oranı 9 mg/L olarak modifiye edilmiştir (Dirks 1996). Eksplantların şeker gereksinimlerini karşılaması için tüm besi ortamlarına 30 g/L sakkaroz ve ortamların katılaşması için 7 g/L Plant Agar ilave edilmiştir.

Hazırlanan besin ortamları pH 5,8’e ayarlandıktan sonra 20 dakika 121 °C otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan ortam steril kabin içerisinde 60 mm çaplı petrilere eşit miktarlarda dökülüp, katılaşmaya bırakılmıştır. Katılaşan ortamlar deneme esnasında kullanılmak üzere streç filmle sarılıp, 4 °C’de bekletilmiştir.

Çizelge 3.2. Temel besi ortamlarının kimyasal içerikleri

Makro ve Mikro Bileşikler	MS mg/L	CBM mg/L	MİLLER mg/L
KNO ₃	1.900	950	80
NH ₄ NO ₃	1.650	450	400
CaCl ₂	332,02	160	-
MgSO ₄	180,54	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	180	35
KH ₂ PO ₄	170	75	12
KI	0,83	0,7	0,8
H ₃ BO ₃	6,20	4	1,6
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	20	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	-	-	4,4
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	8,60	4	1,5
CaNO ₃ .4H ₂ O	-	25	100
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	-	25	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	17,5	-
KCl	-	3,5	65
FeNaEDTA	36,70	-	36,70
Vitamin, amino asit ve diğer organik bileşikler	MS mg/L	CBM mg/L	FUJİ mg/L
Myo- İnositol	100	80	50.000
Thiamine	0,10	1	9
Nicotonic-acid	0,50	1	2.500
Pyridoxine	0,50	2	2.500
Glycine	2	0,1	1.000
Ca-pantothenate	-	0,5	-
Biotin	-	0,05	-
Sakkaroz	30.000	30.000	30.000
Plant Agar	7.000	7.000	7.000

3.2.3.2. Dişi çiçeklerin sterilizasyonu

Çiçeklerin taç yaprakları ovaryumdan uzaklaştırılmıştır. Ovaryumlar önce sabun ile yıkandıktan sonra çeşme suyu ile durulanmış ve steril kabin içerisine alınmıştır. Ardından ovaryumlar % 70'lik etanol çözeltisinde 1 dakika, 100 ml'sine 1-2 damla Tween-20 damlatılmış % 3'lük sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisi içerisinde 20 dakika bekletildikten sonra 3 kez steril distile sudan geçirilmiş böylelikle yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4).

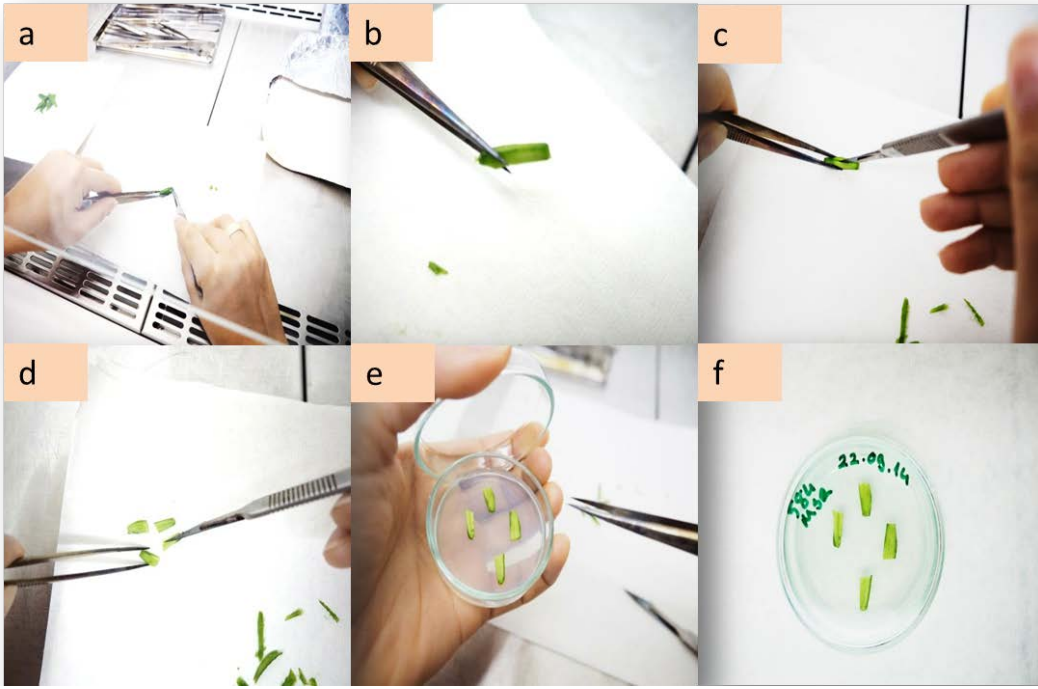


Şekil 3.4. Ovaryumların sterilizasyon işleminin yapılması

3.2.3.3. Ovaryumların besin ortamlarında kültüre alınması

Sterilizasyon işlemi yapılan ovaryumların dış yüzeyleri steril pens ve bistüri yardımı ile ovüllere zarar vermeyecek şekilde soyulmuştur. Böylelikle sterilizasyonda zarar görmüş parçalar uzaklaştırılarak ovaryumların besin ortamından daha faydalı şekilde yararlanması amaçlanmıştır. Üzerinde ovül bulundurmak şartıyla ovaryumlar 4 eşit parçaya ayrılarak ovüllere zarar vermeden uzunlamasına dilimlenmiştir. Her bir ovaryum 60 mm çapında, içinde besi ortamı olan petrilere dikilmiştir (Şekil 3.5).

Embriyo teşviki için kurulan denemelerde bir deneme için; 27 adet ovaryum kullanılmış olup, 12 tekerrürlü çalışmada toplamda 324 ovaryum kültüre alınmıştır. Deneme planı Şekil 3.6' da verilmiştir.



Şekil 3.5. Ovaryumların kesim aşamaları; a) Ovaryumların dış yüzeylerinin soyulması, b) Meyve kabuğu uzaklaştırılmış ovaryum, c) Ovaryumların uzunlamasına ikiye ayrılması, d) Ovaryumların dört eşit parçaya ayrılması, e) Ovaryum parçalarının besi ortamlarına yerleştirilmesi, f) Kültüre alınmış ovaryumun son hali

GENOTİP	ORTAMLAR VE ORTAMA KOYULAN OVARYUM SAYISI			12 Denemede Kullanılan Toplam Ovaryum Sayısı
	Bir Denemede Kullanılan Ovaryum Sayısı			
	MSB	MİB	CBM	
583	3	3	3	108
584	3	3	3	108
550	3	3	3	108
Toplam	9	9	9	324

Şekil 3.6. Deneme planı ve toplam kullanılan ovaryum sayısı (Adet)

3.2.3.4. Hazırlanan örneklerin ön uygulaması ve kültür koşulları

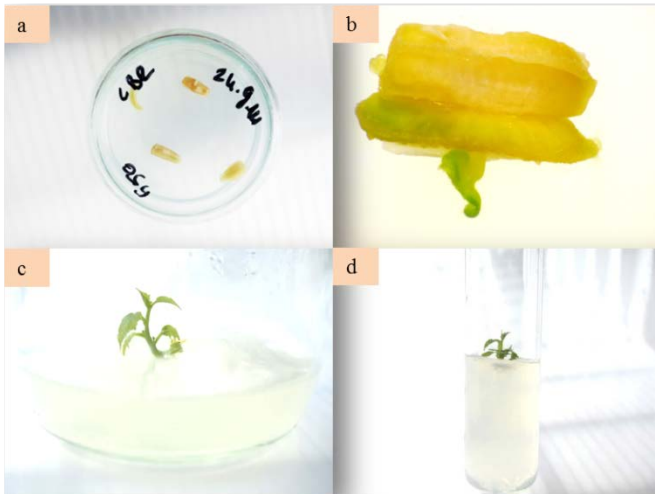
Ovaryumlar ortamlara alındıktan sonra 2 gün 35 °C karanlıkta inkübatörde bekletilmiştir (Şekil 3.7). Büyüme odasına aktarılan ovaryumlar, 3 gün daha 24 °C sıcaklıkta karanlıkta bekletilerek embriyo oluşumu teşvik edilmiştir. Bu işlem ile besi ortamındaki oksinin etkinliğinin artması amaçlanmıştır. Eksplantlar ön uygulama işlemlerinden sonra 24 °C sıcaklıkta, 16 saat ışık/8 saat karanlık periyotta, 3000 lüks'lük floresan lambalar (beyaz gün ışığı) altında iklimlendirme koşullarına alınmıştır.



Şekil 3.7. Çalışmada kullanılan inkübatör

3.2.3.5. Bitki rejenerasyon ortamı ve sürgün ortamı

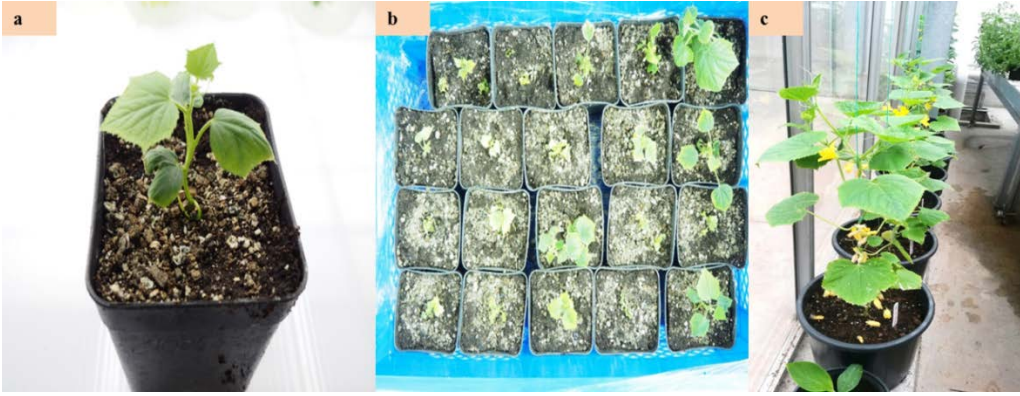
Embriyo teşvik ortamında kültüre alınan eksplantlar 2 hafta sonra rejenerasyon ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.8). Rejenarasyon için bütün temel besi ortamları 1:4; NAA:BAP hormonlarıyla kombine edilmiştir (Çizelge 3.1). Rejenerasyon işlemi sırasında enfekteli ovaryumlar uzaklaştırılmıştır. Ovaryumlarda 1-2 cm boyunda sürgünler gözleendiğinde, bitkicikler MS+30 g/l sükröz bulunan besi ortamına aktarılmıştır. Böylelikle bitkiciklerin gelişmesi sağlanarak, ilerde oluşabilecek hormondan kaynaklı mutasyonların önüne geçilmesi amaçlanmıştır.



Şekil 3.8. Ovaryumların rejenerasyon ortamına ve sürgünlerin sürgün ortamına aktarılması, a) Rejenerasyon ortamına aktarılmış ovaryum, b) Ovaryumda sürgün oluşumu, c) Kavanoza aktarılmış bitkicik, d) Tüpe aktarılmış bitkicik

3.2.3.6. Büyüyen bitkilerin toprağa aktarılması ve adaptasyon koşulları

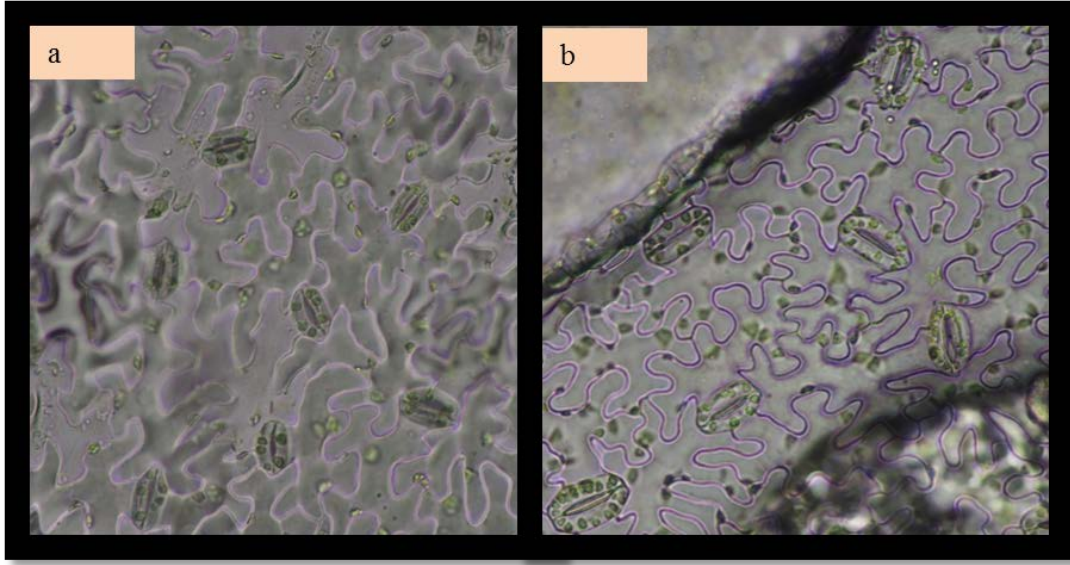
Tüp ve kavanoz koşullarına sığmayan bitkiler, sera koşullarına aktarılmadan önce belirli bir adaptasyon sürecinden geçmektedir. Doğrudan sera koşullarına alınan bitkilerin canlı kalma olasılığı düşmektedir. Adaptasyon işlemi yüksek nem içerikli, direk güneş ışığı almayan özel alanlarda yapılmaktadır. Adaptasyon işleminde Kuzey Agripark Firmasına ait olan adaptasyon seraları kullanılmıştır. Tüpten alınan iyi gelişmiş bitkiler saksılara aktarılmıştır. Bitkilerin kök gelişimlerinin artması için % 10 perlit, % 90 torf karışımı kullanılmıştır. Bu karışımın nemini kaybetmemesi için bitki dikiminden sonra karışıma vermikülit serpilmiştir (Şekil 3.9). Ardından bitkiler adaptasyon seralarına nakledilmiştir. 1-2 hafta bu seralarda kalan bitkiler, topraksız sera koşullarına aktarılmıştır.



Şekil 3.9 Bitkilerin toprağa aktarılması; a) Kavanozdan toprağa aktarılmış bitki, b) Adaptasyon bölümüne gönderilmek için hazırlanmış bitkiler, c) Sera koşullarında gelişen bitkiler

3.2.3.7. Bitkilerin stomada kloroplast sayısı ile ploidy seviyesinin belirlenmesi

Sera koşullarına aktarılan bitkilerden, yaklaşık olarak 2 hafta sonra yaprak örnekleri toplanmıştır. Laboratuvar ortamına getirilen yapraklar, yaprak eti ile zar kısmı ayrılacak şekilde yırtılmıştır. Ayrılan zar bistüri yardımı ile alınmış, lam üzerine yerleştirilmiş ve üstüne 1 damla saf su damlatılmıştır. Üzerine hava boşluğu kalmayacak şekilde lamel kapatılarak preperat hazırlanmıştır. Hazırlanan preperat florosan mikroskobu (Olympus Marka) yardımı ile incelenmiştir. Sayıma göre; stomalar üzerindeki kloroplast sayıları ve büyüklükleri göz önüne alınmıştır (Şekil 3.10). Aynı şekilde kıyaslama yapmak üzere diploid bir hıyar bitkisine de ait preperat hazırlanmıştır.



Şekil 3.10. Stomada kloroplast sayım yöntemi ile haploidi seviyesinin belirlenmesi; a)Haploid stomalar (40X), b) Diploid stomalar (40X)

3.3. Araştırma Süresince Yapılan Ölçüm, Sayım ve Gözlemler

28.08.2014 tarihinde tohumları ekilen donör hıyar bitkilerinin ovaryumları 15.09.2014 tarihinde denemelerde kullanılmak üzere toplanmaya başlanmıştır. Toplamda 12 deneme kurulmuştur. 12 denemede toplamda 324 ovaryum denemiştir (Şekil 3.6). Kurulan denemelere göre yapılan sayımlar haftalık olarak yapılmış olup, aşağıdaki çizelgelerde başarı oranları ve sayıları verilmiştir. Çizelge ve şekillerdeki başarı yüzdeleri, denemede kullanılan toplam ovaryum sayısına göre hesaplanmıştır. Ovaryumlardaki değişimler LEICA marka stereo mikroskobu ile görüntülenmiş olup, görüntü büyüklükleri şekillerde bildirilmiştir.

Kurulan denemelerde ovaryumlara göre ovüllerde gelişme düzeyi, ovaryumlardaki kallus oluşturma oranı, embriyo oluşturma oranı, bitki dönüşüm oranı, haploid bitkilerin oluşma düzeyi gözlenmiştir. Elde edilen verilerin ortalama değerleri çizelgelerde sunulmuştur. Gereken yerlerde grafikler verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Genotip ve Embriyo Teşvik Ortamlarına Göre Ovül Tepkisi, Kallus Gelişim Durumu

Araştırmamızda kullandığımız ovaryumlar besi yerine aldıktan sonra 2 gün süreyle 35 °C sıcaklıkta karanlıkta inkübasyon koşullarında bekletilmiştir. Daha sonra ovaryumlar 24 °C sıcaklıktaki büyüme odası koşullarına, karanlıkta 3 gün daha kalmak suretiyle aktarılmıştır. Embriyo teşvik besi yerinde 9 gün daha aydınlıkta, 24 °C sıcaklıktaki büyüme odası koşullarında bekletilen eksplantların ovüllerinde şişkinlikler tespit edilmiş olup, ortamlara yanıt verdikleri gözlenmiştir. Bütün besi ortamları 1:10 oranında 2,4-D:Kinetin ile sabit bir şekilde modifiye edilmiş olup, kallus oluşumu ve ovül şişkinlikleri genotip ve besin ortamlarına göre değişiklikler göstermiştir. Denemelerin kurulma tarihinden itibaren yapılan gözlemlere dayanarak, toplam 324 ovaryumdan 104'ünde sadece ovüllerde şişkinlik gözlenirken, 103 ovaryumda da kallus gözlenmiştir. 583 nolu genotipte 108 ovaryum denenmiş olup, bunun 53 tanesinde ovül şişkinliği gözlenirken, 20 tanesinde kallus oluşumu gözlenmiştir. Ovül şişkinliği en az olan 584 nolu genotipin 66 ovaryumunda (diğer genotiplere göre en yüksek düzeyde) kallus oluşumu tespit edilmiştir. Kallus oluşumunda dikkat çeken bir diğer nokta ise 550 nolu genotipin sadece 17 ovaryumunda kallus oluşmuş olmasıdır (Şekil 4.1). Genotiplerin genel olarak ortam tepkilerine bakılacak olunursa, denemeye tabi tutulan eksplantların arasında en az 550 nolu genotipin tepki verdiği 584 ve 583 nolu genotiplerin yaklaşık bir oranda tepki verdikleri gözlenmiştir.

Ovüllerde Şişkinlik Gösteren ve Kallus Oluşturan Ovaryum Sayısı (Adet)								
Ortamlar	Ovüllerde şişkinlik durumu				Kallus oluşum durumu			
	Genotipler			Toplam Ovaryum Sayısı	Genotipler			Toplam Ovaryum Sayısı
	583	584	550		583	584	550	
MSB	18	4	14	36	7	22	6	35
CBM	17	1	17	35	12	26	8	46
MİB	18	3	12	33	1	18	3	24
Toplam Ovaryum Sayısı	53	8	43	104	20	66	17	103
Kullanılan Toplam Ovaryum Sayısı	108	108	108	324	108	108	108	324

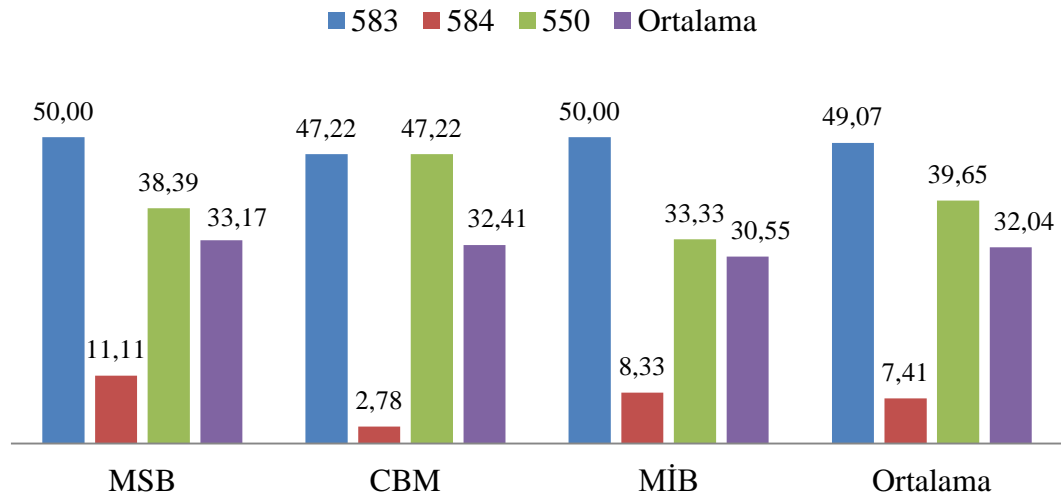
Şekil 4.1. Farklı besi ortamlarına göre farklı hiyar genotiplerinin ovüllerde şişkinlik gösteren ve kallus oluşturan ovaryum sayısı (Adet)

Araştırmada ovül şişkinliği ve kallus oluşumunun genel bir grafikte oluşum oranları bildirilecek olunursa; 583 nolu genotipin ortalama olarak % 49,07 ile ovül şişkinliği açısından diğerlerine göre daha yüksek oranda ortamlara yanıt verdiği, 584

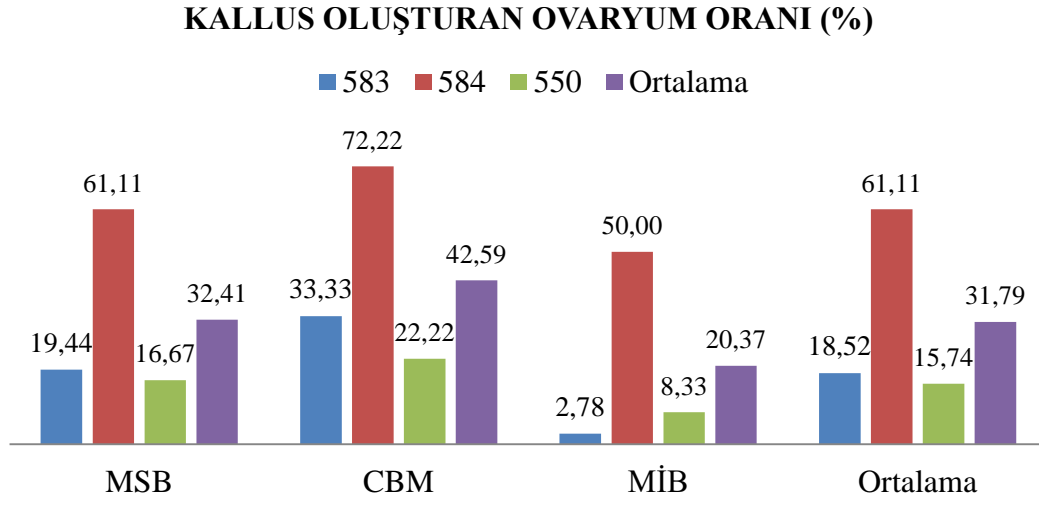
nolu genotipin ise ortalama olarak % 7,41 ile düşük oranda ortamlara yanıt verdiği görülmektedir (Çizelge 4.1). Bunun aksine; 584 nolu genotipin ortalama % 61,11 oranla en yüksek oranda kallus oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Embriyo teşvik ortamlarının ovül şişkinliği üzerine etkisine göre yapılan değerlendirmelerde, en etkili ortamın MSB olduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.1). CBM ortamının ise en yüksek oranda kallus oluşturduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Morfolojik açıdan ovaryumları küçük olan 550 nolu genotipin çizelge.4.2'ye göre kallus oluşturma bakımından en düşük orana sahip olduğu ve ovaryumları büyük olan 584 nolu genotipin de en yüksek oranda kallus oluşturduğu tespit edilmiştir. Burada dikkat çekilmesi gereken parça boyu büyüdükçe; kallus oluşumunun arttığı ve ovül şişkinliğinin azaldığıdır. Küçük parçalara ayrılmış ovaryumlarda ovül şişkinliği daha fazla olmuştur.

Çizelge 4.1. Farklı besi ortamlarına göre farklı hıyar genotiplerinin ovüllerinde şişkinlik gösteren ovaryum oranı

OVÜLLERDE ŞİŞKİNLİK GÖSTEREN OVARYUM ORANI (%)



Çizelge 4.2. Farklı besi ortamlarına göre farklı hıyar genotiplerinin kallus oluşturan ovaryum oranı



Şekil 4.2. Hıyar ovüllerinde kallus oluşumu (genotip: 584, ortam: CBM, 0.63X)



Şekil 4.3. Hıyar ovüllerinde şişmelerin görülmesi (genotip: 583, ortam: MSB, 0.63X)

4.2. Genotip ve Embriyo Teşvik Ortamlarına Göre Toplam Embriyo Sayısı, Başarı Yüzdesi

4.2.1. Embriyo oluşumunda genel bulgular

Embriyo teşvik aşamasında kültüre alınan ovaryumlar, doğrudan haploid elde etmek amacı ile 14 gün sonra rejenerasyon ortamına transfer edilmiştir. Ovaryumlar embriyo teşvik aşamasında hangi ortama tabi tutuldu ise, rejenerasyon ortamında da aynı ortama tabi tutulmuştur. Ancak bitki büyüme düzenleyicilerinde ve oranlarında değişikliğe gidilmiştir ve bütün besi yerleri 1:4; NAA:BAP ile modifiye edilmiştir. Rejenerasyon ortamına alınan ovaryumlarda deneme kurum tarihi baz alınarak yapılan gözlemlerde, ortalama olarak 2-6 hafta içinde embriyoların oluştuğu görülmüştür. Embriyo teşvik ortamında şişen ovüllerin bir kısmı şişkin halde kalmış ve gelişmemiştir. Embriyo teşvik ortamında kallus oluşturan ovaryumlarda ise embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Uygun aşamadaki eksplantlarda embriyo oluşumu direkt olarak gözlenirken, uygun aşamada olmayan eksplantların gelişimlerinde gerileme gözlenmiş veya durmuştur. Embriyolar oluşumları bakımından farklılıklar göstermiştir. Bazı embriyoların gelişimi doğrudan seçilebilirken (Şekil 4.4), bazı embriyoların gelişimi ise ovaryum içerisinde olmuş ve bitkiye dönüşmüş şekilde ortaya çıkmıştır (Şekil 4.5).

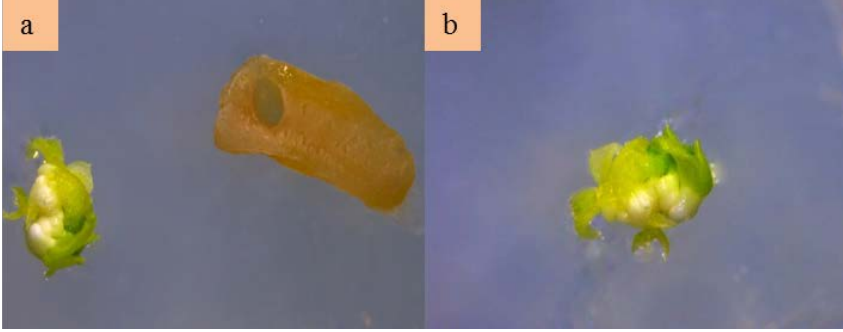


Şekil 4.4. Embriyoların doğrudan gözlenmesi (genotip: 583, Ortam: MSB, 2X)



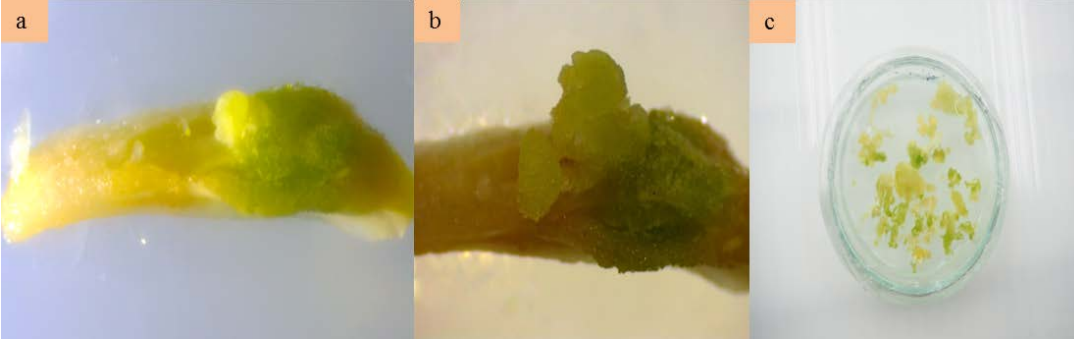
Şekil 4.5. Ovaryum içinde gelişen embriyonun direkt bitki olarak gözlenmesi (genotip: 584, ortam: MSB, 0,63X)

Aynı ovaryum parçasından, aynı yerde birden fazla embriyo oluştuğu da gözlenmiştir (Şekil 4.6). Embriyoların rejenerasyonu ile oluşan bitkicikler, belirli bir büyüklüğe geldikten sonra birbirine zarar verilmeden ayrılmış ve sürgün ortamına aktarılmıştır.



Şekil 4.6. Aynı alanda birden fazla bitki oluşumu, (genotip: 583, ortam: MSB; a) 0,63X, b) 0,8X)

Oluşan embriyoların bazıları, sonradan embriyojenik kallusa dönüşerek birden fazla embriyo ve bitki oluşturmuştur (Şekil 4.7). Bazı ovaryumlarda ise, doğrudan kallus oluşmuş, hatta anormal kök oluşumları gözlenmiştir.



Şekil 4.7. Ovaryumlarda indirekt embriyo ve bitki oluşumları, a) Embriyo oluşumu (genotip: 583, ortam: MSB, 0,63X), b) Embriyonun kallusa dönüşümü (genotip: 583, ortam: MSB, 1,25X), c) Embriyojenik kallusdan oluşan bitkicikler (genotip: 583, ortam: MSB)

4.2.2. Embriyo oluşumunda sayısal bulgular

4.2.2.1. Genotiplerin başarı durumu

Embriyo oluşum sonuçlarını rakamsal ifadelerle pekiştirmek gerekirse, aşağıdaki çizelge ve şekillerle daha detaylı bir şekilde anlatılabilir. Toplamda bütün genotiplerden 273 adet embriyo oluşarak, ortalama % 84,26'lık bir embriyo oranı elde edilmiştir. Embriyo oluşumunda besi ortamı ve genotip farklılıklarının etkisi açıkça gözlenmiştir. Genotipler bazında en fazla embriyo oluşumu, 195 adet (% 180,56) embriyo ile 583 nolu genotipte gözlenmiştir. 583 nolu genotip, embriyo oluşturma düzeyi bakımından, diğer genotiplere göre en fazla MSB ortamında, 178 adet (% 494,44) embriyo

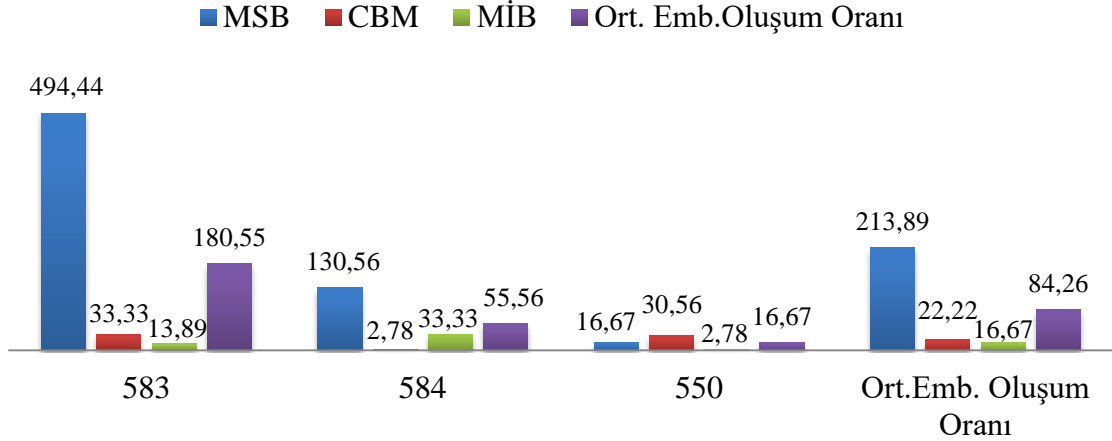
oluşturmuştur. Diğer ortamlarda embriyo sayısı giderek azalmıştır. Bunun yanı sıra toplamda 18 adet (% 16,67) embriyo ile en az embriyo oluşumu 550 nolu genotipte elde edilmiştir. 584 nolu genotipinin de; 47 adet (% 130,56) embriyo ile en yüksek embriyo varlığını, MSB ortamında gösterdiğine ulaşabiliriz (Şekil 4.8, Çizelge 4.3).

Toplam Embriyo Sayısı (Adet)				Direkt Embriyo Sayısı (Adet)				İndirekt Embriyo Sayısı (Adet)				
Ortamlar	Genotipler			Top. Emb. Sayısı	Genotipler			Top. Emb. Sayısı	Genotipler			Top. Emb. Sayısı
	583	584	550		583	584	550		583	584	550	
MSB	178	47	6	231	26	16	6	48	152	31	0	183
CBM	12	1	11	24	11	1	11	23	1	0	0	1
MİB	5	12	1	18	4	9	1	14	1	3	0	4
Toplam Embriyo Sayısı	195	60	18	273	41	26	18	85	154	34	0	188

Şekil. 4.8. Farklı besi ortamlarına göre farklı hıyar genotiplerinde gynogenesis yoluyla oluşan embriyo sayıları (Adet)

Çizelge. 4.3. Embriyo teşvik ortamlarına göre genotiplerin embriyo oluşturma oranları

GENOTİPLERİN EMBRİYO TEŞVİK ORTAMLARINA GÖRE EMBRİYO OLUŞTURMA ORANI (%)



4.2.2.2. Embriyo teşvik besi ortamlarının başarı durumu

Embriyo gelişim durumunu ortamlar bazında karşılaştırsak en başarılı ortamın MSB olduğu sonucuna varabiliriz. Üzerinde çalıştığımız bütün genotiplerde MSB ortamının yanıt verdiği, 583 ve 584 nolu genotiplerde de daha fazla oranda embriyo oluşturduğu gözlenmiştir. CBM ve MİB ortamının yanıt verme düzeylerinin de birbirine yakın olduğu sonucuna varılmıştır. Kullanılan ovaryum sayısına göre belirlenen oranlar incelendiğinde; MSB ortamının ortalama olarak % 213,89' luk bir oranla diğer

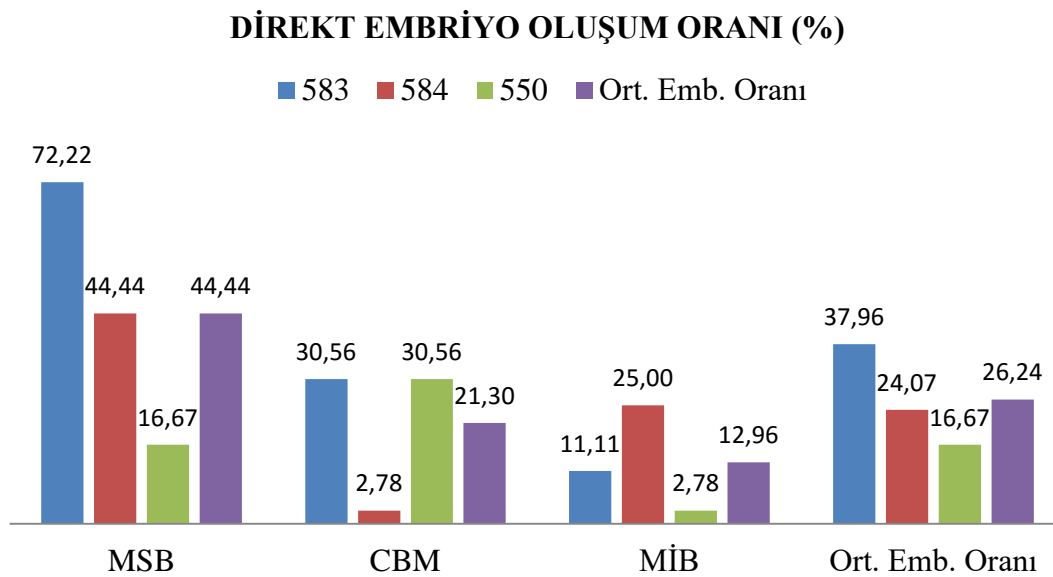
ortamlara göre daha başarılı olduğu belirlenmiştir. En az embriyo oluşturma etkinliği ise, ortalama olarak % 16,67' lik oran ile MİB ortamında olmuştur. MSB ortamı, en çok 538 nolu genotipe etkili olurken (% 494,44), en az da 550 nolu genotipe (% 16,67) etkili olmuştur. CBM ortamı yaklaşık olarak 583 ve 550 nolu genotiplere aynı oranlarda (% 33,33, % 30,56) etki ederken, 584 nolu genotip üzerine oldukça düşük bir oranda (% 2,78) etki etmiştir. MİB ortamı ise, CBM' nin en az etki ettiği genotipte en fazla etkinliği göstererek (% 33,33) oldukça dikkat çekici bir sonuç ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.8, Çizelge 4.3).

Embriyolar, oluşum şekillerine göre direkt ve indirekt olarak gelişmiştir. Haploid bitki eldesinde somatik dokulardan indirekt (kallus üzerinden embriyo ve bitki eldesi) elde edilen bitkiler yanıtıcı olabilir. Böylelikle indirekt gelişen embriyo ve bitkiciklerin haploid olduğuna şüphe ile bakılabilir. Yaptığımız çalışmada indirekt olarak embriyolar elde edilmiş, fakat indirekt oluşumlardan elde edilen embriyolar ovaryum üzerindeki somatik kallusdan değil de; oluşmuş olan bir embriyonun sonradan kallusa dönüşerek embriyo oluşturma şeklinde olmuştur.

4.2.2.3. Direkt embriyo oluşum durumu

Direkt olarak toplamda bütün genotiplerden 85 adet embriyo oluşmuş olup, bu sayı toplam embriyo oluşumunun % 26,24'lük bir oranını kapsamaktadır (Şekil 4.8, Çizelge 4.4). Genotiplerin direkt embriyo oluşturma oranları karşılaştırıldığında en başarılı genotipin 583 nolu genotip olduğu ve 41 adet embriyo ile ortalama olarak % 37,96 oranında embriyo oluşturduğu sonucuna varılmıştır. 584 nolu genotip ortalama olarak % 24,07 oranında embriyo oluştururken, 550 nolu genotipte % 16,67 oranında embriyo oluşturmuştur. Ortamların başarı durumu incelenecek olunursa; MSB ortamı % 44,44 ile en fazla oranda etkinlik göstermiştir. (Çizelge 4.4)

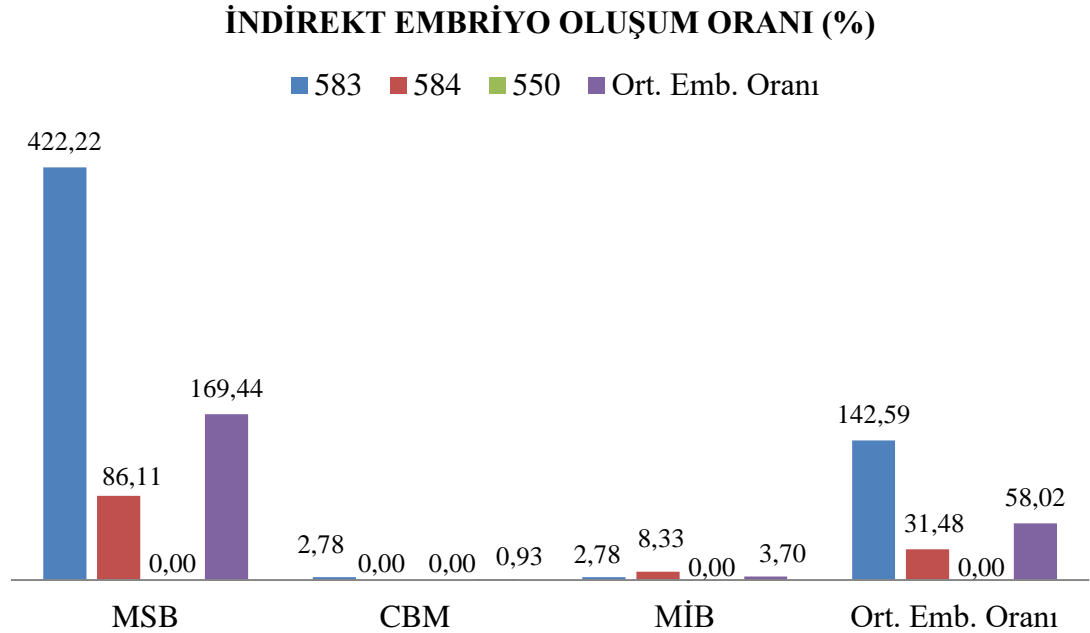
Çizelge 4.4. Embriyo teşvik ortamlarına göre genotiplerin direkt embriyo oluşum oranları



4.2.2.4. İndirekt embriyo oluşum durumu

İndirekt olarak bütün genotiplerden toplamda 188 adet embriyo oluşmuş olup , bu sayı toplam embriyo oluşumunun ortalama olarak % 58,02'sini temsil etmektedir (Şekil 4.8, Çizelge 4.5). Genotiplerin indirekt embriyo oluşturma oranları karşılaştırıldığında yine 583 nolu genotipin ortalama olarak diğerlerinden % 142,59 bir oranla ortamlara tepki verdiği görülmektedir. 550 nolu genotipde indirekt olarak embriyo oluşmamış olup, 584 nolu genotipte % 31,48 oranında embriyo oluşumu gözlenmiştir. İndirekt embriyo oluşturmada, diğer ortamlara göre MSB ortamının etkinliği, yine direkt embriyo oluşumunda olduğu gibi daha fazla bir oranda olmuştur. CBM ortamı ise, oldukça az miktarda bir oranla (% 0,93) indirekt embriyo oluşumunu teşvik etmiştir (Çizelge 4.5).

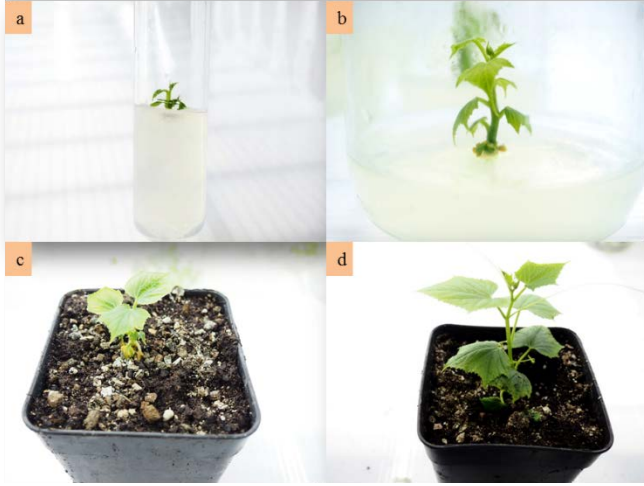
Çizelge. 4.5. Embriyo teşvik ortamlarına göre genotiplerin indirekt embriyo oluşum oranları



4.3. Genotip ve Bitki Rejenerasyon Ortamlarına Göre Bitki Oluşum Durumu

4.3.1 Bitki rejenerasyonunda genel bulgular

Araştırmada kullanılan genotiplerin, deneme kurum tarihinden itibaren yaklaşık olarak 1,5-2 ay gibi bir sürede bitki rejenerasyonlarının gerçekleştiği gözlenmiştir. Rejenerasyon ortamında rejenere olmuş olan 1-2 cm boyundaki bitkicikler, temel MS besisi ortamına alınmış ve gelişimleri belirli bir olgunluğa gelinceye kadar burada bekletilmiştir. Bitki rejenerasyonu sonucunda normal bitki gelişimi gösterenlerin yanında, anormal bitki gelişimleri de gözlenmiştir. Anormal gelişen bitkilerde büyüme ucu olmama, anormal yaprak oluşumu ve gelişimi, anormal kök oluşumu gibi belirtiler görülmüştür (Şekil 4.10). Normal gelişen bitkiler kök ve gövde gelişimlerine göre toprağa aktarılmış ve dış koşullara adaptasyonu sağlanmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Embriyo rejenerasyonu sonucu oluşmuş olan sağlıklı bitkicik ve bitkiler;
a,b) Tüp ve kavanoza aktarılan bitkicikler, c, d) Toprağa aktarılan bitkiler



Şekil 4.10. Embriyo rejenerasyonu sonucu oluşmuş olan büyüme ucu olmayan anormal bitkicikler

4.3.2. Bitki rejenerasyonunda sayısal bulgular

4.3.2.1. Toplam bitki sayısı ve başarı durumu

Haploid çalışması yapılan bütün bitkilerde embriyonun bitkiye dönüşümünde istenilen sonuçlara yüzde yüz ulaşılamamaktadır. Anormal embriyo oluşumları, eksplantın zamanında rejenerasyon veya alt kültür ortamına alınmaması, dış ortam koşulları (ışık, sıcaklık vb.) gibi bazı olumsuz faktörler bitki rejenerasyonunu mümkün kılmamaktadır. Bu yüzden araştırmacı en uygun koşulları araştırmak ve belirlemek zorundadır.

Çalışmada bitki rejenerasyonunda genotip ve ortamlara göre oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Üç farklı genotipten toplamda 137 bitki elde edilmiş olup, ortalama olarak % 42,28 bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir (Şekil 4.11, Çizelge 4.6). Genotipler bazında incelendiğinde 583 nolu genotipin embriyo oluşturma yüzdesinin yanında, bitki rejenerasyonu oluşum yüzdesi de oldukça fazladır. 109 adet bitki (%)

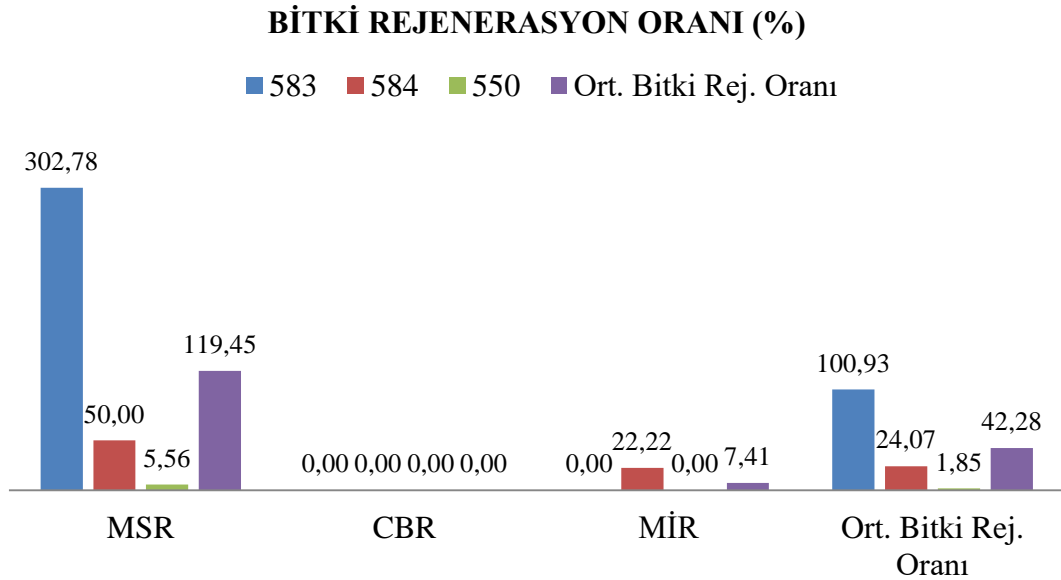
100,93) elde edilen 583 nolu genotipten sonra en fazla bitki, 584 nolu genotipte 26 adet (% 24,07) oluşmuştur. 550 nolu genotipte elde edilen bitki sadece 2 adet ile sınırlı kalmıştır (% 1,85) (Şekil 4.11).

Ortamlar	Toplam Bitki Sayısı (Adet)				Direkt Bitki Oluşumu (Adet)				İndirekt Bitki Oluşumu (Adet)			
	Genotipler			Top. Bitki Say.	Genotipler			Top. Bitki Say.	Genotipler			Top. Bitki Say.
	583	584	550		583	584	550		583	584	550	
MSR	109	18	2	129	16	9	2	27	93	9	0	102
CBR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MİR	0	8	0	8	0	7	0	7	0	1	0	1
Top.Bitki Sayısı	109	26	2	137	16	16	2	34	93	10	0	103

Şekil 4.11. Farklı besi ortamlarına göre farklı hıyar genotiplerinde gynogenesis yoluyla oluşan bitki sayılarının gösterimi (Adet)

Besin ortamlarının bitki rejenerasyonuna etkisi incelenecek olunursa en etkili rejenerasyon ortamının ortalama olarak % 119,45 oran ile MSR olduğu, bunun aksine CBR ortamında hiçbir bitki gelişimi gözlenmediği açıkça görülmektedir (Çizelge 4.6). MİR ortamının da sadece 584 nolu genotipi bitki dönüşümüne teşvik ettiği gözlenmiştir. MSR ortamı tüm genotiplerde bitki dönüşümünü sağlamıştır.

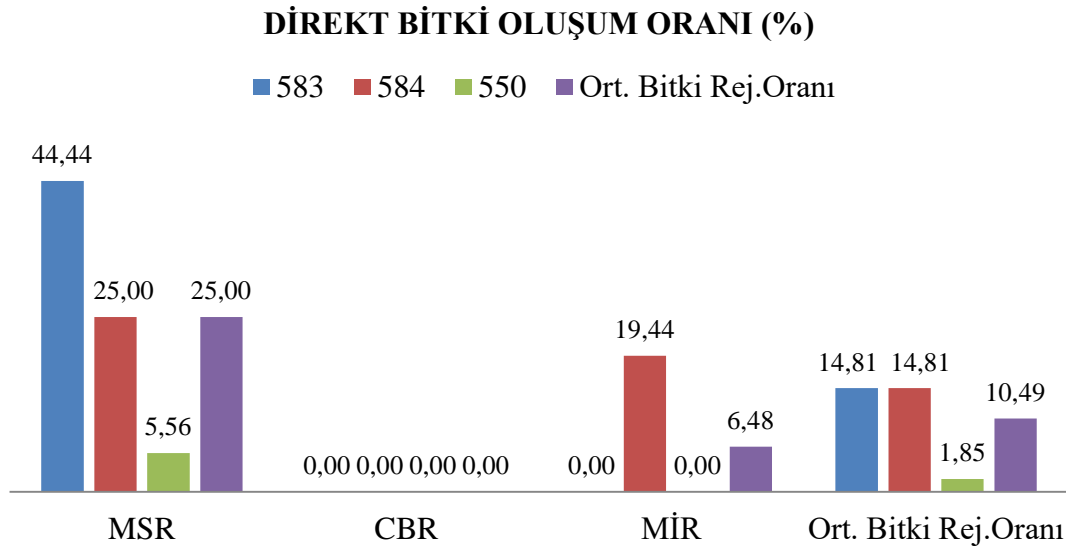
Çizelge 4.6. Ortam ve genotiplere göre hıyar ovaryumlarından, bitki oluşum oranları



4.3.2.2. Direkt oluşan bitki sayısı ve rejenerasyon

Embriyo oluşumları dikkate alınarak yapılan gözlemlerde, direkt olarak oluşmuş olan embriyoların bitki rejenerasyonları incelenmiştir. Direkt oluşmuş bitki sayısı toplamda 34 adet olup, ortalama % 10,49'luk bir oluşum oranı ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.11, Çizelge 4.7). Genotiplerin direkt bitki oluşturmadaki başarı oranı değerlendirilirse; 583 ve 584 nolu genotipin % 14,81'lik bir oranla aynı sonucu verdiğini söyleyebiliriz (Çizelge 4.7). Ancak 583 nolu genotipin sadece MSR ortamında bitki oluşturduğu, 584 nolu genotipin de MSR ve MİR ortamlarında bitki oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

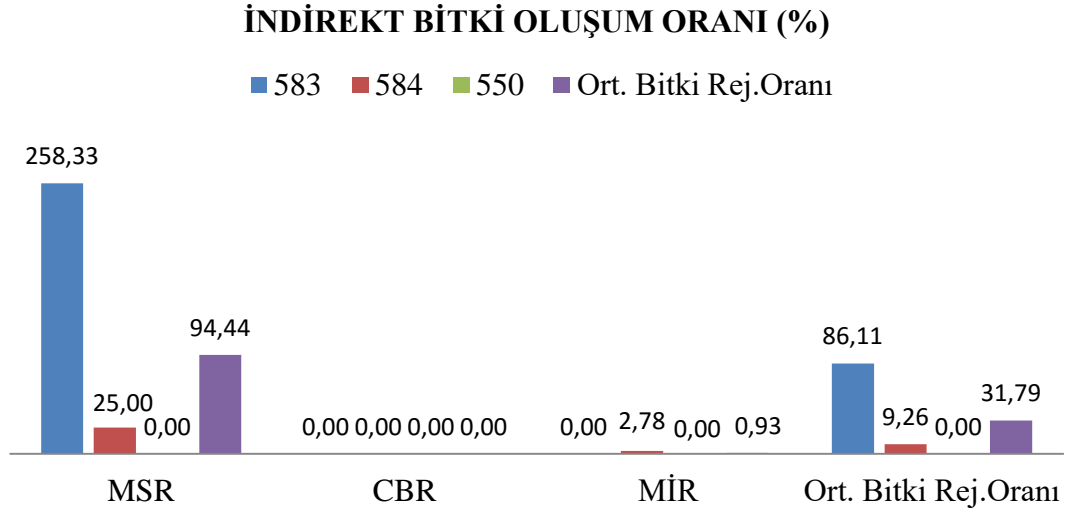
Çizelge 4.7. Ortam ve genotiplere göre hıyar ovaryumlarından direkt bitki oluşum oranları



4.3.2.3. İndirekt bitki sayısı ve rejenerasyon oranı

Embriyo oluşumları dikkate alınarak yapılan gözlemlerde, indirekt olarak oluşmuş olan embriyoların bitki rejenerasyonları incelenmiştir. 103 adet bitki indirekt olarak oluşmuş olup, toplamda ortalama olarak % 31,79'luk bir başarı sağlanmıştır (Bkz. Şekil 4.11, Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Ortam ve genotiplere göre hıyar ovaryumlarından indirekt bitki oluşum oranları

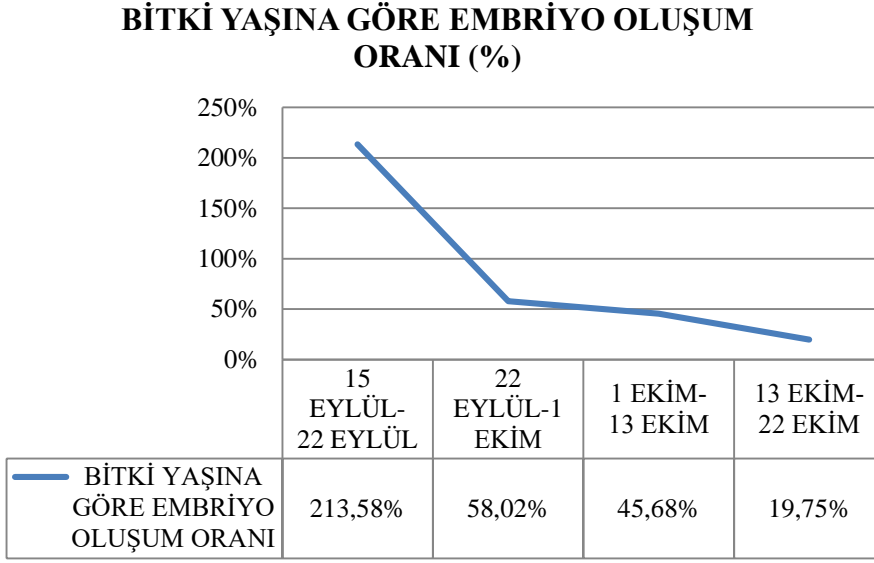


Genotipler açısından indirekt olarak en fazla bitki 583 nolu genotipte 93 adet (% 86,11) olarak bulunmuştur. 550 nolu genotipte ise indirekt olarak bitki rejenerasyonu gerçekleşmemiştir. Bunun yanısıra 584 nolu genotipte de 10 adet (% 9,26) bitki oluşmuştur. Ortam etkinliği açısından MSR ortamının % 94,44 bir başarı oranına sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Diğer ortamların etkinliğinin oldukça düşük bir seviyede olduğu gözlenmiştir.

4.4. Bitki Yaşının Embriyo Oluşumu ve Bitki Rejenerasyonuna Etkisi

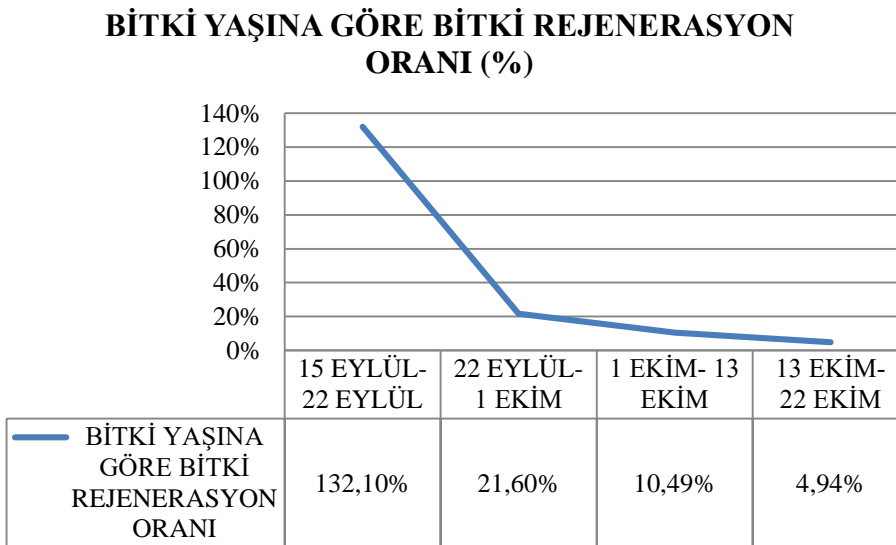
Geçmişte yapılan haploid çalışmalarında, donör bitkinin beslenme koşulları ve yaşının önemli bir unsur olduğu bildirilmektedir (Gemes vd 2002). Yaşlanan bir bitki hücresinin enzimatik aktivitesi ve bölünme gibi faaliyetlerinin yavaşladığı bilinmektedir. Bu nedenden dolayı donör bitkilerden alınan eksplantlar genç bitkilerden alınmalı ve eksplant, araştırılmak istenen ortam ve hormon kombinasyonlarına tepki verebilmelidir. Aksi takdirde yaşlı hücre barındıran eksplantlarda bitki eldesi istenen şekilde olmayabilir. Araştırmamızda 28.08.2014 tarihinde tohum ekimi gerçekleşen bitkilerin ovaryumları 15.09.2014 tarihi itibari ile deneme kurulmak üzere alınmaya başlanmıştır. Ovaryumlar 22.10.2014 tarihinde son defa toplanarak kültüre alınmıştır. Geçen bu süreçte embriyo ve bitki oluşum oranları her dört denemede bir hesaplanmış ve Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Bitki yaşına göre embriyo oluşum oranları



Araştırmada kullanılan tüm genotiplerin embriyo oluşum oranları genel olarak ele alınmıştır. 15 Eylül-22 Eylül tarihleri arasında kurulan denemelerde en yüksek embriyo sonuçları elde edilmiştir. 15 Eylül tarihinde % 213,58 oranında embriyo oluşumu görülürken, 22 Eylül'den sonra alınan eksplantlardan embriyo oluşumu % 58,02'lere düşmüştür. 1 Ekim - 13 Ekim tarihleri arasında kurulan denemelerin embriyo oluşum oranı % 45,68 olmuştur. Bitkinin giderek yaşlandığı göz önüne alınırsa, 13 Ekim-22 Ekim arasında kurulan denemelerde de embriyo eldesinin % 19,75'lere düştüğü görülmüştür (Çizelge 4.9). Yaşlanmaya bağlı olarak elde edilen embriyo düzeylerinde ciddi oranda bir azalma meydana gelmiştir.

Çizelge 4.10.Bitki yaşına göre bitki rejenerasyon oranları



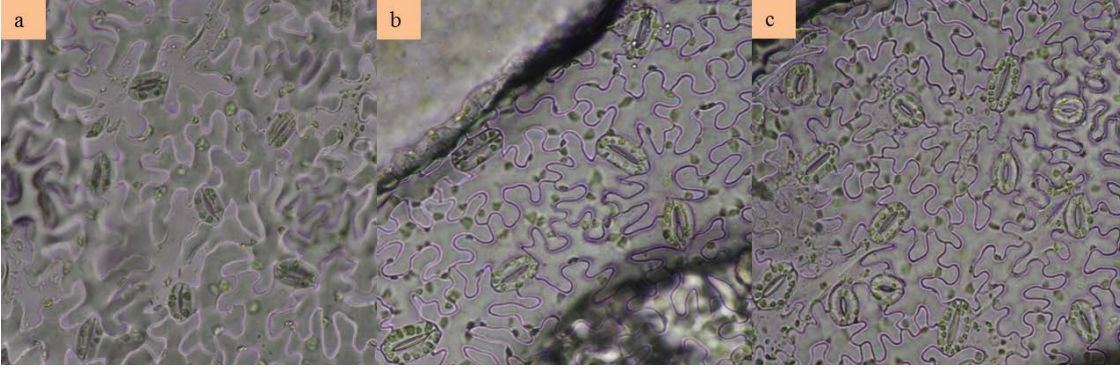
Zamanla embriyo oluşumunda görülen azalma, aynı şekilde bitki rejenerasyonunda da görülmüştür. Araştırmada kullanılan tüm genotiplerin bitki rejenerasyon oranları genel olarak ele alınmıştır. 15 Eylül-22 Eylül tarihleri arasında kurulan denemelerde bitki rejenerasyon oranı, embriyo eldesi ile doğru orantılı olarak gerçekleşmiştir. Yapılan değerlendirmelere göre bu tarihler arasında % 132,10'luk bir bitki rejenerasyonu meydana gelmiştir. 22 Eylül-1 Ekim tarihleri arasında kurulan denemelere göre başarı oranı % 21,60 seviyelerinde iken, 1 Ekim- 13 Ekim tarihleri arasında bu oran % 10,49'lara kadar düşmüştür. Bitkinin en yaşlı olduğu dönemlerde kurulan son denemelerde başarı oranı % 4,94'lere kadar gerilemiştir (Çizelge 4.10). Donör bitki yaşının artmasına ters orantılı olarak gynogenesis ile bitki eldesi arasında ters bir orantı olduğu saptanmıştır.

4.5. Stomada Kloroplast Sayımına Göre Ploidy Seviyesinin Belirlenmesi

Haploid bitkilerin tespit edilmesinde kullanılan en kolay yöntem stoma sayım yöntemidir. Eylül ayının ortalarından itibaren yürüttüğümüz çalışmada, yaklaşık olarak 7-8 aylık bir süreç sonunda elde edilen bitkilerin stoma sayımları yapılmıştır. Bitkilerin yaprak örnekleri alınmış ve preparatlar hazırlanmıştır. Olympus marka florosan mikroskobu altında bakılan preparatlarda stomalar tespit edilmiş ve stomaların üzerinde bulunan kloroplast sayıları gözlenmiştir. Stomada kloroplast sayısına bakıldığında; haploid bitkilerin kloroplastlarının 4-6 arasında değiştiği, diploid bitkilerin 8-12 arasında olduğu görülmüştür. Miksoploid bitkilerde ise hem haploid stomalara, hem de diploid stomalara rastlanmıştır (Şekil 4.13). Sayımlar sonucunda elde edilen tüm bitkilerde, adaptasyon sürecinde yaşanan sıkıntılara bağlı olarak, kayıplar meydana gelmiş ve stoma sayımı yapılamamıştır. Şekil 4.12'ye göre, sağlam kalan bitkilerin sayımları sonucunda, 583 nolu genotipte elde edilen bitki sayısının fazlalığı ile doğru orantılı olarak 71 adet haploid bitki elde edilmiştir. Bunun yanı sıra 583 nolu genotipte, 8 diploid, ve 14 miksoploid elde edilmiştir (Şekil 4.12). 584 nolu genotipte 15 adet haploid bitki gözlenirken, 4 adet miksoploid ve 1 adet diploid bitki gözlenmiştir. Toplamda 2 adet bitki elde edilen 550 nolu genotipin sadece 1 tanesinde stoma sayımı yapılabilmiş ve bununda haploid olduğu tespit edilmiştir. Toplamda 87 adet haploid bitki elde edilmiş ve özellikle indirekt oluşumlarda miksoploid bitkilere rastlanmıştır.

Stomadaki kloroplast sayısına göre ploidy seviyesinin belirlenmesi (Adet)				
Genotipler	Bitki Sayıları			
	Haploid	Diploid	Miksoploid	Kayıp
583	71	8	14	16
584	15	1	4	6
550	1	0	0	1
Toplam	87	9	18	23

Şekil 4.12. Stomadaki kloroplast sayısına göre ploidy seviyesinin belirlenmesi



Şekil 4.13. Stomadaki kloroplast sayılarının gösterimi (40X), a) Haploid hıyar bitkisi stoması, b) Diploid hıyar bitkisi stoması, c) Miksoploid hıyar bitkisi stoması

5. TARTIŞMA

Hıyarda haploid bitki eldesinde kullanılan ovaryum kültürü diğer yöntemlere göre çok daha ümitvar sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Uygun protokol ve genotiplerle, başarı çitasının giderek yükseleceği yadsınamaz bir gerçektir. Hıyarda ışınlanmış polen kültürüne göre daha fazla etkinliği olan ovaryum kültürü, birçok araştırmacı tarafından da desteklenmektedir (Dirks 1996, Gemes vd 2002, Diao 2008, Li vd 2013, Moqbeli vd 2013).

Haploid bitki oluşumunun teşviki için gerekli uygun ovaryum aşaması Gemes vd (2002) tarafından belirlenmiş olup, Li vd (2013) gibi araştırmacılar tarafından farklı genotiplerde de desteklenmiştir. Ovül 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). Gemes vd (2002) de, hıyarda ovüllerden haploid teşviği için en uygun safhanın; antesisten 6 saat önce alınmış ovaryumlar olduğunu bildirmektedirler. Bu safhada ki ovaryumlarda, 8 çekirdek içeren embriyo keselerinin bulunduğunu ve anthesiste embriyo kesesinin tamamen geliştiği görülmüştür. Araştırmacılar hıyarda, haploid uyartımında en iyi yanıtın, tam olgunlaşmış embriyo keselerine sahip ovaryumlardan alındığını belirtmektedir. Benzer sonuçlar San ve Demarly (1984) tarafından; arpa, buğday, mısır, şeker pancarı ve marulda yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir. Araştırmacılar, tam olgunluk dönemindeki embriyo keselerindeki tüm hücrelerin (yumurta hücresi, antipodlar, sinerjitler ve polar çekirdek) bölünerek embriyo veya kallus oluşturabildiğini saptamışlardır. Goska vd (1990)' nin şeker pancarı üzerine yaptıkları çalışmada, gynogenik haploid bitkilerin, yumurta ya da sinerjit hücrelerden meydana geldiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada; bu çalışmalar baz alınarak ovaryum aşaması, çiçek açımından (anthesis) 6 saat, 1 ve 2 gün önce olarak belirlenmiştir.

Gemes vd (2002), erken aşamada alınan ovaryumlarda embriyo keselerinde hücre membranlarının geliştiği ancak hücrelerin son büyüklüklerine ulaşmadığı ve bu durumlarda yumurta hücresinin düzensiz farklılaşmasının meydana gelebileceğini savunmaktadırlar. Araştırmada bu gibi oluşumlara rastlanmış olup, anormal bitki oluşumları da gözlenmiştir. Bunun yanında mutant oluşumların besin kombinasyonlarından veya dış koşullardan olumsuz etkilendiği düşünülebilir.

Haploid embriyo ve bitki oluşturmak için bazı bitkiler ön uygulama işlemlerine ihtiyaç duyarlar. Ön uygulama işlemi; enzimatik bazı reaksiyonları başlatmak ve bazı hormonların aktivasyonlarını arttırmak için yapılmaktadır. Sıcak ön uygulaması hücre bölünmesini teşvik eder. Hıyar gynogenesisinde uygulanan ön uygulama işlemleri, genellikle sıcak uygulama şeklinde olmuştur. Gemes vd (2002), hıyar ovaryumlarını karanlıkta 24 °C, 28 °C veya 35 °C sıcaklıklarda 2 ile 10 gün süre ile kültüre almıştır. 35 °C sıcaklıklarda 2- 4 gün arasında bekletilen ovaryumlarda en yüksek embriyo oluşumu gözlediklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmanın doğrultusunda Li vd (2013), 35 °C karanlıkta hıyar ovaryumlarını ön uygulamaya tabi tutarak olumlu sonuçlar almışlardır. Araştırmada kullandığımız ovaryumlar literatür doğrultusunda 35 °C sıcaklıkta, karanlıkta sadece 2 gün; 24 °C sıcaklıkta, karanlıkta 3 gün bekletilmiştir. Araştırma öncesi ön çalışmalarda hıyar ovaryumları ön uygulama işlemine tabi tutulmamıştır.

Yapılan gözlemler sonucu oldukça düşük oranlarda embriyo oluşumuna rastlanmıştır. Dolayısıyla ön uygulamanın hıyar embriyo oluşumunu teşvik ettiği düşünülmektedir.

Haploid embriyo ve bitki oluşum oranı, donör bitkinin üreme fizyolojisine ve kültür ortamına dayanır. Üç farklı besin ortamının, üç farklı genotipte haploid embriyo ve bitki teşvikini araştırmak üzere yapılan bu çalışmada, ovaryum kültüründe özellikle hıyar gynogenesisinde en fazla kullanılan ortamlar belirlenmiştir. 1950'li yılların başında ovül ve ovaryum kültüründe kullanılan ortamın Nitsch olduğu savunulurken, 1970'li yıllarda Miller, MS, N6 ortamlarının kullanıldığı yapılan araştırmalar sonucu görülmektedir. Asif (2013), ovaryum kültürü için uygun olan ortamların MS, Miller, N6, and B5 olduğunu ve uygun hormon konsantrasyonları ile modifiye edilebileceğini bildirmektedir. Sitbon (1981) *Gerbera jamesonii* ovaryumlarında, Metwally vd (1998) ve Shalaby (2007), kabak ovaryumlarında, Ficcadenti vd (1999), kavun ovaryumlarında ve Suprunova ve Shmykova (2008), hıyar ovaryumlarında gynogenesis ile haploid embriyo teşviki için MS besi ortamını kullanmışlardır. Dirks (1996), partenokarpik hıyar çeşitlerinde haploid embriyo elde etmek için Miller (1963)'in ve Murashige-Skoog (1962)'un ortamlarının en yaygın kullanılan iki ortam olduğunu öne sürmektedir. Gemes (2002)'in 5 partenokarpik hıyar üzerinde denediği Cucumber Basal Medium (CBM), LI vd (2013) tarafından, uzun Çin hıyarları üzerinde denenmiştir. Bu ortamların karşılaştırılmasına literatürde rastlanmamıştır. Buna dayanarak yaptığımız çalışmamızda hıyar genotiplerinde en çok kullanılan besin ortamları; MS, Miller ve CBM olarak belirlenmiştir. Bu veriye göre sabit bir hormon modifiyesi yapılarak, besin ortamlarının etkinlikleri karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere dayanarak bu üç besin ortamından en etkili ortamın MS ortamı olduğuna karar verilmiştir. Ancak uygun hormon modifiyesi ile embriyo teşviki sağlanmıştır. Bu ortamların tek başına kullanılmasının embriyo teşviki için bir yararı yoktur. Araştırmanın devamında embriyo teşvik ortamından sonra embriyo rejenerasyon ortamına aktarılan ovaryumlarda bitki oluşumu yine MS ortamının varlığında diğer ortamlara oranla oldukça fazla olmuştur. Ovül şişkinliklerinde tüm ortamlarda yakın sonuçlara rastlanmış olup, kallus oluşumunda CBM ortamının önde olduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.2). Bunun CBM ortamının besin içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tüm genotiplerde embriyo oluşum oranı % 84,26 olarak belirlenmiş olup, bunun % 213,89' u sadece MS ortamında oluşmuştur (Çizelge 4.3). En az etkinliği olan ortam % 16,67 ile Miller ortamı olurken, CBM ortamı da % 22,22 bir embriyo oluşum oranı ortaya çıkarmıştır. Ortamlara göre bitki rejenerasyonunda değişiklikler yaşanmıştır.

Çizelge 4.6'ya göre, ortalama üç genotipten bitki rejenerasyon oranı % 42,28 olurken, MS ortamında rejenere olan bitkilerin oranı, toplam oranın % 119,45'ini oluşturmaktadır. Bunun arkasından gelen Miller ortamında % 7,41 bir orana sahipken, CBM ortamında hiçbir bitki dönüşümüne rastlanmamıştır.

Besi ortamlarının genel içerikleri karşılaştırıldığında MS ortamı makro ve mikro bileşiklerce diğer ortamlara göre genel itibari ile daha zengin bir içeriğe sahiptir (Şekil 3.3). Oluşan embriyo ve bitki oranlarının MS ortamında yüksek olmasının sebebi, zengin kimyasal içeriğinin sonucunda oluşmuş bir durum olabilir. MS ve Miller ortamı

demir içeriğine sahipken, CBM ortamında demir bileşimi bulunmamaktadır. CBM ortamında bitki rejenerasyonun görülmemesi buna bağlanabilir.

Bitki büyüme düzenleyiciler, haploid bitki eldesinin temel yapı taşı konumunda bulunmaktadır. Uygun oksin-sitokinin dengesi, ovülün embriyo oluşturmaya yönelmesi için çok gereklidir. Dirks (1996), partenokarpik bir çeşitte haploid embriyo ve bitki teşviği için hormon dengesinin sitokinin ağırlıklı olması gerektiğini bildirmektedir. Gemes ve Venczel (1996) yaptıkları çalışmada, döllenmemiş kabak ovaryumlarını *in vitro* kültürde, başlangıçta TDZ ve % 4 sakkaroz ilave edilmiş (ZI) ortamına aktardıklarını ve ardından rejenerasyon için NAA ve BA'nın farklı kombinasyonlarının kullanıldığı EI ortamına transfer ettiklerini bildirmişlerdir. Yaklaşık 6 hafta sonra ovüllerden embriyoların gözleendiği ve her bir ovaryumdan yaklaşık 10–15 embriyo oluştuğu tespit edilmiştir. Metwally vd (1998), döllenmemiş kabak ovaryumlarından elde edilen bitkilerin, 1 veya 5 mg/L 2,4-D ile modifiye edilmiş MS ortamında kültüre alınması ile oluştuğunu bildirilmişlerdir. Shalaby (2007), kabakta ovül kültürü çalışmasında 1 mg/L kinetin ve 1 mg/L 2,4-D kombinasyonunu kullanmıştır. Ficcadenti vd (1999), kavunda yaptıkları çalışmada döllenmemiş ovaryumları 0,09 µM TDZ ile değiştirilmiş MS besi ortamında 4 gün kültüre alındıktan sonra, 0,27 µM NAA ve 0,88 µM BA ile değiştirilmiş MS besi ortamına transfer ettiklerini bildirmektedirler. Gemes vd (2002), döllenmemiş hıyır ovaryumlarını, embriyo teşviği için 0,02 mg/L TDZ ile modifiyeli besi ortamına, ardından oluşan embriyoları 0,05 mg/L NAA, 0,2 mg/L BA ile değiştirilmiş, besi ortamına aktarmışlardır. Chen vd (2005), 3 farklı genotip hıyarda ovaryum kültürü denemişler ve embriyo teşviği için 0,06 mg/L TDZ ile modifiyeli besi ortamını kullanmışlardır. Oluşan embriyoları, bitki rejenerasyonu için 0,1mg/L NAA, 0,8 mg/L 6-BA ile değiştirilmiş besin ortamına aktarmışlardır. Diao vd (2008) hıyarda yaptıkları çalışmada TDZ konsantrasyonlarını denemişler ve en uygun TDZ miktarının 0,04 mg/L olduğunu belirtmişlerdir. Benzer bir çalışmayı LI vd (2013) Çin hıyıruları üzerinde yapmış ve en uygun TDZ'nin 0,03- 0,07 mg/L aralıklarında kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda genelde TDZ hormonu üzerine durulmuş ve istenilen düzeyde embriyo ve bitki elde edilememiştir. Bu sebepten dolayı çalışmamızda belirleyici unsur farklı hormon ve hormon değeri kullanmak olmuştur. Sitokinin hormonu hücre bölünmesi ve yenilenmesinde etkin rol oynar (Hall 1999). Oksin hormonu hücre bölünmesinden ziyade, hücre büyümesini etkileyen bir bitki büyüme düzenleyicidir. Haploid embriyo çalışmalarında embriyo oluşumunda öncelikli olarak istenen hücre bölünmesinin hızlanmasıdır. Bu nedenle besi ortamının, embriyo teşvik aşamasında stokinin ağırlıklı bir bitki büyüme düzenleyicisi ile değiştirilmesi gerekmektedir. Stokinin hormonun aktiflendirmek için ortamda bir miktar oksin hormonunun gerektiği araştırmacılar tarafından desteklenmektedir (Reinert ve Yeoman 1982).

Araştırmada embriyo teşviki için kullandığımız kinetin doğal bir sitokinin olup Miller (1963) tarafından bulunmuştur. Kinetin, 2,4-D oksin hormonu ile desteklenmiş olup, 2,4-D:Kinetin oranı 1:10 olarak belirlenmiştir. Bu hormon dengesi bütün ortamların karşılaştırılabilmesi amacı ile sabit tutulmuştur. Araştırmada bu hormon kombinasyonunun en iyi MS ortamı ile uyumlu olduğu ve embriyo teşvik aşamasında bütün genotiplerde embriyo oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

Ovaryumlar, oluşan embriyoların bitki rejenerasyonlarının sağlanması için deneme kurum tarihinden 2 hafta sonra rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Gemes vd (2002), döllenenmiş hıyar ovaryumlarından oluşan embriyoları, bitki rejenerasyonu için 0,05 mg/L NAA, 0,2 mg/L BA ile değiştirilmiş besi ortamına aktarmışlardır. Aynı yöntem izlenerek rejenerasyonunun gerçekleşmesi amacı ile bütün besin ortamları sabit oranda 1:4; NAA:BAP ile modifiye edilmiştir. Çizelge 4.6'ya göre bütün genotiplerden ortalama % 42,28 bitki oluşum oranı hesaplanmıştır.

Haploid bitki eldesinde önemli bir diğer yapı taşı genotiptir. Haploid bitki eldesi için tüm bitki çeşit ve genotiplerine uyumlu bir protokol yoktur. Hatta aynı familyada olan bitkiler içinde de sabit bir protokol oluşturmak imkansızdır. Bu yüzden haploidizasyon başarısını etkileyen en önemli faktörlerin başında genotip gelir. Haploid çalışmalarına başarı oranının genotipe bağlı olduğu hıyar (Diao vd 2009), kabak (Dumas de Vault ve Chambonnet 1986, Shalaby 2007), şeker pancarı (Lux vd 1990), tatlı patates (Kobayashi vd 1993) ve soğan gibi türlerde kanıtlanmıştır (Alan vd 2004). Araştırmamız sonucunda genotipin gynogenesis üzerine etkisi, ovül şişkinliği, kallus oluşumu, embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkisi açıkça görülmektedir (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2). 583 ve 550 nolu genotiplerde ovüllerde şişkinlik daha fazla oluşurken, 584 nolu genotipte kallus oluşumu daha yüksek oranda oluşmuştur. En fazla embriyo oluşumu, 195 adet (% 180,56) embriyo ile 583 nolu genotipte gözlenirken, 550 nolu genotipte 18 adet (% 16,67) embriyo ile en az embriyo oluşumu olduğunu söyleyebiliriz (Şekil 4.8, Çizelge 4.3). Genotipler bazında incelendiğinde 583 nolu genotipin embriyo oluşturmadaki başarı oranının yanında bitki rejenerasyonundaki oranı da oldukça fazladır. 109 adet bitki (% 100,93) elde edilen 583 nolu genotipten sonra en fazla bitki 584 nolu genotipte 26 adet (% 24,07) elde edilmiştir. 550 nolu genotipte elde edilen bitki sadece 2 adet ile sınırlı kalmıştır (% 1,85) (Şekil 4.11, Çizelge 4.6).

Geçmişte yapılan haploid çalışmalarında, donör bitkinin beslenme koşulları ve yaşının haploid bitki eldesi için önemli bir unsur olduğu bildirilmektedir (Gemes vd 2002). Yaşlı bitki hücrelerinin enzimatik aktiviteleri yavaşladığı ve etkinliklerinin azaldığı bilinmektedir. Yaşlı hücre barındıran eksplantlarda bitki eldesi daha az sıklıkta ve istenen şekilde olmayabilir. Yaşlı hücrelerdeki hücre bölünmelerinin yavaş olması haploid embriyo oluşumunda engelleyici bir faktördür. Çizelge 4.9'a göre 15 Eylül-22 Eylül tarihleri arasında kurulan denemelerde en yüksek embriyo sonuçları elde edilmiştir. 15 Eylül tarihinde % 213,58 oranında embriyo başarı oranı varken, 22 Eylül'den sonra alınan eksplantların embriyo eldesi % 58,02'lere düşmüştür. 1 Ekim - 13 Ekim tarihleri arasında kurulan denemelerin embriyo oluşum oranı % 45,68 olmuştur. Bitki yaşının giderek arttığı göz önüne alınırsa 13 Ekim-22 Ekim arasında kurulan denemelerde de embriyo eldesi % 19,75'lere düşmüştür. Yaşlanmaya bağlı olarak, elde edilen embriyo düzeylerinde ciddi oranda bir azalma meydana gelmiştir. Bitki rejenerasyonu da embriyo oluşumundaki azalmaya paralellik göstererek, çizelge 4.10'a göre 15 Eylül-22 Eylül tarihleri arasında kurulan denemelerde bitki rejenerasyon oranı embriyo eldesi ile doğru orantılı olarak azalış göstermiştir. Yapılan değerlendirmelere göre bu tarihler arasında % 132,10'luk bir bitki rejenerasyonu meydana gelmiştir. 22 Eylül- 1 Ekim tarihleri arasında kurulan denemelere göre başarı oranı % 21,60 seviyelerinde iken 1 Ekim- 13 Ekim tarihleri arasında bu oran % 10,49

lara kadar düşmüştür. Bitkinin en yaşlı olduğu dönemlerde kurulan son denemelerde başarı oranı % 4,94'lere kadar gerilemiştir.

Haploid bitkilerin tespit edilmesinde kullanılan en kolay yöntem stoma sayım yöntemidir. Stoma sayım yönteminde, stomalara üzerindeki kloroplastların adedi, haploid bitkinin tespiti için önem arz etmektedir. Çalışmamız boyunca elde edilen bitkilerin hepsinde stoma sayımı yapmak mümkün olmamıştır. Elde edilen 137 bitkiden 114 tanesinin stoması tespit edilebilmiştir. Stomada kloroplast sayısına bakıldığında; haploid bitkilerin kloroplastlarının 4-6 arasında değiştiği, diploid bitkilerin 8-12 arasında olduğu görülmüştür. Miksoploid bitkilerde ise hem haploid stomalara, hem de diploid stomalara rastlanmıştır (Şekil 4.13). Şekil 4.12'ye göre, sağlam kalan bitkilerin sayımları sonucunda, 583 nolu genotipte elde edilen bitki sayısının fazlalığı ile doğru orantılı olarak 71 adet haploid bitki elde edilmiştir. Bunun yanı sıra 583 nolu genotipte, 8 diploid, ve 14 miksoploid elde edilmiştir (Şekil 4.12). 584 nolu genotipte 15 adet haploid bitki gözlenirken, 4 adet miksoploid ve 1 adet diploid bitki gözlenmiştir. Toplamda 2 adet bitki elde edilen 550 nolu genotipin sadece 1 tanesinde stoma sayımı yapılabilmiş ve bununda haploid olduğu tespit edilmiştir. Toplamda 87 adet haploid bitki elde edilmiş ve özellikle indirekt oluşumlarda miksoploid bitkilere rastlanmıştır.

Peixiaoli (2011) hıyarda gynogenesis çalışmasında, rejenere olmuş embriyolardan; 8 haploid bitki ve 2 diploid bitki elde edildiği bildirilmektedir. Suprunova ve Shmykova (2008), elde ettikleri embriyolardan sadece % 0,5 'lik bir bitki dönüşüm oranı olduğunu bildirmektedirler. Plapung vd (2014a, 2014b) 42 klonun 14' ünün haploid olduğu (kromozom sayısı $n=7$ olduğu ve bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısı 6), 24 hattın direk double haploid olduğu (kromozom sayısının $n=14$, bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısının 11-12) olduğu bildirilmiştir. Diao vd (2008), 40 rejenere olmuş hıyar bitkicisinden; 2 haploid bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmalara göre yaptığımız bu çalışmanın ıslah çalışmalarına faydalı bir çalışma olduğu söylenebilir.

6. SONUÇ

Islah alanına teknolojik ve bilimsel bir katkı sağlayan haploid çalışmaları, üzerinde daha çok durulması gereken bir konudur. Bu alanda girişim yapmak isteyen özel sektörün haploid bitki eldesinin önemini başta anlaması gerekir. Yatırımcıya zaman ve maddi anlamda kazanç sağlayan biyoteknolojik çalışmalar, bilimsel çalışmalarla desteklenmelidir. Bu amaçla yaptığımız bu bilimsel çalışma hıyar ıslahında yenilikler yaratarak, kısa zamanda üstün ıslah hatlarının belirlenmesinde yardımcı olacaktır. Böylelikle üreticinin istediği, günümüz koşullarına adapte olabilen, hastalık ve virüslere karşı dayanıklı, verimli hıyar çeşitleri elde edilecektir. Hıyarda (*Cucumis sativus* L.) *in vitro* kültürde ovul-ovaryum yöntemi ile haploid bitki eldesi üzerine yeterli bir protokol olmayışı, hıyar ıslahı yapan firmalar ve araştırmacılar için büyük bir eksikliklerdir.

Çalışmada izlenen yöntemler ele alındığında, bu çalışma için belirlenecek ilk aşamanın gynogenesis için uygun ovaryum aşaması olduğu sonucuna varılmıştır. Önceki çalışmalar örnek alınarak izlenen bu yolda çiçek açımından 6 saat, 1 ve 2 gün önceki aşamalarda ovaryumlar tespit edilmiş ve toplanmıştır. Taç yapraklarını henüz açmamış ve sarı ile yeşil rengi arasında geçiş gösteren ovaryumların çalışma için kullanılabilir en uygun aşama olduğu belirlenmiştir. Anormal embriyo ve bitki oluşumu gösterenler için uygun aşamada alınmadığı, yumurta veya sinerjit hücrelerinin son şeklini almadığı böylelikle hücrelerin farklılaşarak anormallikler doğurduğu söylenebilir.

Ovaryumların besi ortamlarına koyulduktan sonra hücre bölünmelerini çoğaltmak amacı ile ön uygulamaları 35 °C'de 2 gün karanlıkta kalmak sureti ile gerçekleşmiştir. Araştırma öncesi yaptığımız ön çalışmalarda ön uygulama işlemi yapılmamış ve embriyo oluşumu oldukça sınırlı bir seviyede kalmıştır. Araştırmada kullanılan ön uygulama işleminin embriyo oluşum oranını arttırdığı sonucuna varılmıştır. Ön uygulamada bekletme süresi üzerine çalışmalar geliştirilebilir. Sıcaklık uygulaması yapılan ovaryumlar karanlık ortamda 24 °C'de 3 gün daha bekletilerek ortamdaki 2,4-D oksin hormonunun etkinliğinin daha da artırılması amaçlanmıştır. Embriyo teşvikinde bu işlemin de faydalı olduğu sonucuna varılmıştır.

Üç farklı genotipte denenen üç farklı ortamın etkinliklerinin araştırılması üzerine yürüttüğümüz bu çalışmada, üç genotipte olumlu tepkiler alınmıştır. Ovül şişkinliği ve kallus oluşumu açısından bu üç genotipin ortamlara tepki verdiği saptanmıştır. Ovül şişkinliği açısından karşılaştığımızda, 583 ve 550 nolu genotiplerin ovülleri büyümeye başlarken, 584 nolu genotipin daha çok kallus oluşturduğu tespit edilmiştir. Morfolojik açıdan daha büyük bir ovaryum yapısına sahip olan 584 nolu genotipin ovüllerinin besi ortamlarından yeterince yararlanamayarak, düzensiz hücre kolonileri oluşturabileceği sonucuna varılmıştır. Morfolojik olarak büyük ovaryuma sahip çeşitlerin ovaryum kültürünün yapılması gerektiği durumlarda; uzunlamasına kesimden ziyade, daha küçük parçalara ayrılmasının daha etkili olacağı düşünülmektedir. Çünkü haploid bitki oluşumunda öncelikli olarak kallus oluşumu istenen bir durum değildir. Bunun yerine ovüllerin şişkinlik göstermesi haploid bitki oluşumunda gerekli olan gametlerin ortamdaki faydalanabildiğini kanıtlar.

Besi ortamlarının ovül şişkinliği ve kallus oluşumu üzerine etkileri incelendiğinde, tüm ortamların ovül şişkinliği üzerine etkisinin eşit olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak kallus oluşturma düzeyi açısından CBM+1:10, 2-4D:Kinetin ortamının % 42,59 bir oranla diğerlerinden fazla oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

Embriyo oluşumu daha çok kallus oluşturmayan parçalarda görülmüştür. Ancak ovül şişkinliği görülen her parçada embriyo oluşmamış, ovüller şişkin halde kalmıştır. Bununda yumurta hücrelerinin yeterince gelişmediğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bütün genotiplerden toplamda 273 tane embriyo oluştuğu ve bunun toplam ovaryum sayısı üzerine oranının % 84,26 olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.8, Çizelge 4.3). En fazla embriyo oluşumu genotip bazında incelendiğinde, 583 nolu genotipin diğer genotiplere göre oldukça fazla üstün olduğu belirlenmiştir. 583 nolu genotipte embriyo oluşturma oranı % 180,55 oranında olurken, bu oran 584 nolu genotipte % 55,56, 550 nolu genotipte % 16,67 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Embriyo oluşumunda direkt ve indirekt oluşumlar tespit edilmiştir. Ancak indirekt oluşumların, meydana gelmiş bir embriyonun kallus haline dönüşmesi şeklinde olduğu gözlenmiştir.

Besi ortamlarının embriyo oluşturma düzeylerine bakıldığında embriyo teşvikinde en etkili ortamın MS+ 1:10; 2,4-D:Kinetin (MSB) olduğu ve toplam ovaryum sayısına oranla % 213,89 bir sonuç elde edildiği tespit edilmiştir. Bunun arkasından önerilebilecek ortamın % 22,22 oranla CBM+1:10; 2,4-D:Kinetin olduğu ancak haploid bitki üretimi için bu ortamın yeterli olmayacağı sonucuna varılmıştır. Çalışmaya göre embriyo teşviki için % 16,67 orana sahip Miller+1:10; 2,4-D:Kinetin (MİB) ortamının düşük sonuçlar ortaya çıkardığı, hıyar gynogenesisi için önerilmeyeceği söylenebilir. Embriyo teşvik çalışmalarında MSB ortamının başarılı sonucu karşısında bu ortam üzerine çalışmalar devam ettirilebilir ve hormon konsantrasyonları üzerine bir çalışma yapılabilir. Bunun yanında hıyarda haploid embriyo eldesi üzerine bir çalışmada protokol niteliğinde bu ortam kullanılabilir.

İslah çalışmaları için elbette haploid embriyo elde etmek yeterli değildir. Elde edilen embriyoların en iyi şekilde ve yüksek oranda bitkiye dönüştürülmesi gereklidir. Bitki dönüşümünü sağlamakta embriyo teşvik aşamasında kullanılan besi ortamının tekrardan kullanılmasının araştırmamız açısından uygun olmadığı düşünülmüştür. Çünkü embriyo teşvik besi ortamında kullanılan hormon ve hormon konsantrasyonları sadece embriyo oluşumunu tetiklemek amacı ile belirlenmiştir. Oysa ki sürgün oluşturan bitkinin hormon düzeylerindeki istekleri farklı olmak zorundadır. Özellikle klorofille sahip bir bitki fizyolojik açıdan fotosentez yapabilme yeteneğine sahip olurken içsel hormonlarının da geliştiği gözetilmelidir. Bu amaçla rejenerasyon aşamasında kullanacağımız hormon düzeyleri başlangıçta kullandıklarımıza göre daha düşük oranda olmalıdır. Aksi takdirde oluşan bitkilerde anormallikler gözükülebilir. Bu amaçla belirlediğimiz rejenerasyon ortamlarındaki hormon konsantrasyonları embriyo teşvik aşamasında kullanılanlardan daha düşük düzeylerde olmuştur. Toplam elde edilen bitki sayısı 137 olarak tespit edilmiş olup toplam ovaryum sayısına oranında % 42,28 olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.11, Çizelge 4,6).

Besi ortamları açısından çalışmanın sonucu değerlendirildiğinde en etkili rejenerasyon ortamının MS+1:4; NAA:BAP olduğu belirlenmiştir. MSR ortamında

toplam ovaryum sayısına göre % 119,45'lik bir oranda embriyo rejenerasyonu gerçekleşmiştir. CBR ortamında hiçbir bitki dönüşü görülmemişken, Miller+1:4; NAA:BAP (MİR) ortamında sadece % 7,41'lik bir oranda dönüşme meydana gelmiştir. MİR ortamında meydana gelen bitki dönüşümleri yapılacak olan çalışmalar için yeterli bulunmamaktadır. MSR ortamının tüm genotipler üzerinde bitki eldesinde kullanılabilmesi savunulabilir. Çalışmamızda denediğimiz tüm genotiplerde MSR ortamında bitki eldesi gözlenmiştir. İlerleyen çalışmalar için kullanılacak olan ortamın MSR olması önerilirken, daha farklı hormon modifikasyonları ile iyileştirilmeler yapılabileceği söylenebilir.

Genotipler açısından bitki dönüşümleri incelendiğinde tüm genotiplerde bitki elde edilmiştir. Ancak % 100,93'lük bir bitki oranı ile 583 nolu genotip diğer genotiplerin önüne çıkmaktadır. Bunu izleyen 584 nolu genotipte % 24,07'lik bir oranda bitki oluşumu gözlenirken, 550 nolu genotipte bu oran % 1,85 oranında kalmıştır. Burada genotipin etkisi açıkça görülmektedir (Çizelge 4.6)

Genotipin ortamlara yanıt vermemesi haploid bitki eldesini kısıtlayan önemli bir unsurdur. Bu araştırmada öyle bir sorun ile karşılaşılmamıştır. Ancak genotipler açısından elde edilen bitki sayılarında değişiklikler gözlenmiştir. Unutulmamalıdır ki ıslahçılar açısından aynı genotipten gelen double haploidlerin ne kadar fazla olduğu değil, elde edilen bitkilerin ne kadar homozigot olduğu önemlidir. Aynı genotipten fazla bitki olması kayıpların göz ardı edilebilmesi için önem arz eder. Yapılacak olan iyileştirmeler ile bu durumların önüne geçilebilir.

Haploid bitki eldesinde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri de bitkinin yaşıdır. Donör bitkiden eksplantın ne zaman alınacağı önemli bir unsurdur. Yaşlı ve sağlıklı donörlerden alınan eksplantların hücresel etkinlikleri yavaşladığından ve hücre bölünmeleri azaldığından dolayı haploid bitki oluşturma düzeyleri istenilen seviyede olmayabilir. Yapılan bu çalışma bunu kanıtlar nitelikte olup, özellikle bahar aylarında yapılan dikimlerden daha olumlu sonuçlar alınabileceği gözlenmiştir. Kış aylarına sarkan üretim dönemlerinde bitki stres altına girmekte ve eksplantlardaki haploid embriyo ve bitki oluşturma verimliliği düşmektedir. Çalışmamızda kullandığımız bitkiler sonbahar döneminde yetiştirilmiştir. 15 Eylül - 22 Eylül tarihleri arasında kurulan denemelerde en yüksek embriyo sonuçları elde edilmiştir. 15 Eylül tarihinde % 213,58 oranında embriyo başarı oranı varken 22 Eylül'den sonra alınan eksplantların embriyo oluşum oranı % 58,02'lere düşmüştür. 1 Ekim -13 Ekim tarihleri arasında kurulan denemelerin embriyo oluşum oranı % 45,68 olmuştur. Bitki yaşının giderek yaşlandığı göz önüne alınırsa 13 Ekim - 22 Ekim arasında kurulan denemelerde de embriyo eldesi oldukça düşük seviyede yani % 19,75 olmuştur. Yaşlanmaya bağlı olarak elde edilen embriyo düzeylerinde ciddi oranda bir azalma meydana gelmiştir. Bitki rejenerasyonunda embriyo oluşumundaki azalmaya paralellik göstererek, 15 Eylül - 22 Eylül tarihleri arasında kurulan denemelerde bitki rejenerasyon oranında da embriyo eldesindeki gibi giderek azalma meydana gelmiştir. Yapılan değerlendirmelere göre bu tarihler arasında % 132,10'luk bir bitki rejenerasyonu meydana gelmiştir. 22 Eylül - 1 Ekim tarihleri arasında kurulan denemelere göre rejenerasyon oranı % 21,60 seviyelerinde iken 1 Ekim - 13 Ekim tarihleri arasında bu oran % 10,49'lara kadar düşmüştür. Bitkinin en yaşlı olduğu dönemlerde kurulan son denemelerde rejenerasyon oranı % 4,94'lere kadar gerilemiştir. Bu sonuçlara göre kış aylarına yaklaşan

dönemlerde bitki yaşlanma periyoduna girmiş ve başarı oranı oldukça düşmüştür. İlkbahar döneminde yetişen genotipler kullanılarak yapılacak olan çalışmalarda haploid embriyo ve bitki elde oranının daha fazla olduğu düşünülmektedir.

Haploidi çalışmalarının başarıya ulaştığını belirleyen en önemli gösterge ploidy seviyesinin belirlenmesidir. Çalışmamızda kullandığımız en pratik ploidy seviyesi belirleme yöntemi olan stomada kloroplast sayım yöntemi elde ettiğimiz bitkilerin ıslahda kullanılabilirlik düzeyini belirlemiştir. Elde edilen 137 bitkinin 114'ünün stomasına bakılabilmüş bunlarında toplamda 87 adedinin haploid olduğu (kloroplasttaki stoma sayısı 4-6) belirlenmiştir. İndirekt olarak oluşmuş olan bitkilerde diploid ve miksploid oluşumlara da rastlanmıştır (Şekil 4.12, Şekil 4,13)

Hıyarda haploid embriyo ve bitki eldesi için en uygun protokolün oluşturulması amaçlanan bu çalışmanın tarım, bilim ve sanayi dünyası için önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Ülkemizde yapılan ıslah çalışmalarının öncü hale gelmesinde yarar sağlayacak olan haploid çalışmalarının öneminin giderek artacağı kaçınılmaz bir gerçektir. Sebze ve meyve tohumunda dışarı bağımlılığımızı minimuma indirmek ve diğer ülkelerinde önüne geçirebilmek için ıslah çalışmalarına önem verilmesi gerekmektedir. Nitekim son yıllarda ıslah firmalarının arttığı da olumlu bir gelişmedir. Devlet destekli projelerle bu gelişmelerin daha da artacağı, nitelikli çalışanlarla daha üstün bir hizmet elde edileceği yarımlar, şüphesiz ki daha güzel olacaktır. Teknoloji ile tarımın iç içe olduğu bir ortamda üretim yapmak, ve tarımın sesini tüm dünyaya duyurabilmek dileğiyle.

7. KAYNAKLAR

- AALDERS, K.E. 1958. Monoploidy in cucumbers. *Journal Heredity*, 49 (1): 41–44.
- ABAK, K. 1982. Biberde kökboğazı yanıklılığın kalıtımı üzerinde araştırmalar. Doçentlik Tezi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ankara, 62 s.
- ABAK, K. 1988. Türkiye de bitki ıslahı çalışmalarında *in vitro* tekniklerden yararlanma. I. Uluslararası Tarım ve Biyoteknoloji Sempozyumu, Çukurova Üniversitesi, Adana, 7s.
- ABAK, K. 1993. Biber ıslahında anther 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.
- ALAN, R. 1982. Sera koşullarında su kültüründe yetistirilen hıyarlarda bazı azotlu gübrelerin bitki gelişmesine, verimine ve diğer bazı özelliklerine etkileri üzerinde araştırmalar. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bağ-Bahçe Kürsüsü, Erzurum, 128 s.
- ALAN, A. R., BRANTS, A., COBB, E., GOLDSCHMİED, P. A., MUTSCHLER, M. A., & EARLE, E. D. 2004). Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. *Plant science*, 167(5): 1055-1066.
- ANONİM, 2013. TÜİK. [Http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul](http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul). (12.01.2015).
- ANONİM, 2014. [Http://tohumcu.org/index.php?page=teknikbilgi1DetayT&pid=43](http://tohumcu.org/index.php?page=teknikbilgi1DetayT&pid=43) hıyarın anavatanı(12.01.2015).
- ANONYMOUS, 2012. FAO Statistical Database, <http://www.fao.org>.(12.01.2015).
- ASİF, M. 2013. Progress and opportunities of double haploid production. Springer Briefs in Plant Science, İsviçre, 75 s.
- BAKTEMUR G., YILDIZ M., BÜYÜKALACA S., ABAK K. 2010. Kavunda (*Cucumis melo* L.) uyartılmış haploid embriyoların ayrılmasında kullanılabilir yöntemler. Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu, 9 (1): 15-21.
- BAKTEMUR, G., TAŞKIN, H., & BÜYÜKALACA, S. 2013. Comparison of different methods for separation of haploid embryo induced through irradiated pollen and their economic analysis in melon (*Cucumis melo* var. *inodorus*). *The Scientific World Journal*.
- BAKTEMUR, G., YÜCEL, N. K., TAŞKIN, H., ÇÖMLEKÇİOĞLU, S., & BÜYÜKALACA, S. 2014. Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization using irradiated pollen technique in squash. *Turkish Journal of Biology*, 38(3): 318-327.

- BAJAJ, Y. P. S. 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. *Haploids in Crop Improvement I*, Springer, pp. 3-44, Berlin Heidelberg.
- BİLGE, E. 1982. Genetik. İstanbul Üniversitesi Yayınları. No: 2886, Fen Fak. Yay. No: 163-316 s.
- BUGARA AM & RUSİNA LV. 1989. Haploid callusogenesis from culture of nonfertilized ovules of sage. *Physiologiya i BiohimiyaCulturhyh Rastenii*. 21:554-560.
- CAMPION B. & ALLONI C. 1990. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture unpollinated ovules. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 20: 1-6
- CHAMBONNET, D., VAULX, R.D. 1985. Obtention of embriyos 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. In: Bulletin interne de la Station d'Amelioration des Plantes Maraicheres d'Avignon, pp 1-10, Montfavet, France.
- CHEN X. P., LIU S. T., SUN X. L., ZHAO Z. Z. and WANG X. F. 2005. Primary Study on Embryoids Induced from Unpollinated Ovaries of Cucumber. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2: 148-151
- CHOOB V.V., VLASOVA T.A. & BUTENKO R.G. 1994. Callusogenesis and morphogenesis in generative organ culture of the spring flowering species of *Crocus* L.. *Russian J. Plant Physiology*, 41: 712-716
- CLAPHAM, D. 1971. *In vitro* development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. *Z - Pflanzenzuchtg*, 69, 2: 142-155.
- CLAVERIA, E., GARCIA-MAS, J., DOLCET-SANJUAN, 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.
- CUNY, F., 1992. Processus d'induction d'embriyons haploides par du polen irradié chez le melon (*Cucumis melo* L.) responses du polen 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., BERGERVOET, J.H.W. 1984. Embryo size in *Cucumissativus* x *C.melo* as effected by irradiation of Polen and Genotype of the Female Parent. *Cucurbit Genetics Coop.*, 7: 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. Doktora Tezi, Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 227 s.
- 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.

- DEMİR, İ. 1990. Genel Bitki Islahı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ofset Basım Evi, İzmir, No:496, 366 s.
- DAVIS, P.H. 1972. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Vol 4, Edinburgh University Press, pp. 206-207, Edinburgh.
- DIAO W.P., JIA Y.Y., SONG H., ZHANG XQ., LOU Q.F., CHEN J.F. 2009. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. *Sci Hortic* 119:246–251
- DIRKS, Robert. 1996. Method for the production of double-haploid cucumbers. U.S. Patent No 5,492,827.
- DOLCET-SANJUAN, R., CLAVERIA, R., GARCIA-MAS, I., 2006. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) dihaploid line production using *in vitro* Rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. *Acta Horticulturae*, 725, Vol. 2, 837-843.
- 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.
- DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D., 1986. Obtention of embryos and plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo*. *De Gruyter*, pp. 295-297, Berlin.
- ELLİALTIOĞLU, Ş. 2000. Haploid bitkilerin bitki ıslahı programlarında kullanımı. Bitki Islahı Kursu, Seminer Notları (Yayımlanmamış), Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Samsun.
- ELLİALTIOĞLU, Ş., SARI, N. VE ABAK, K. 2001. Haploid Bitki Üretimi. Mehmet Babaoğlu, Ekrem Gürel ve Sebahattin Özcan, Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, ss. 137-189, Konya.
- EMİROĞLU, Ü., 1980. Türk tütün çeşitlerinde anther kültürü. Bitki Islahı Sempozyumu, *Ege Bölge Ziraat Araştırma Enst.* Yay. No: 17/41, 12–18
- EMİROĞLU, Ü. 1982. Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*. No: 450, İzmir, 38 s.
- ENGİN, A. 1991. Tohumlu Bitkiler Sistematiği. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Yayınları, Samsun, 330 s.
- ERCAN, N., BOYACI, Y. F., BİNER, B. 1997. Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Eldesi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10: 374-380.
- FARIS, N. M., NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K., & NIKOLOVA, V. 1999. The effect of gamma irradiation dose on cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo production. *Acta Physiologiae Plantarum*, 21: 391-396.

- FICCADENTI, N., SESTILI, S., ANNIBALI, S., MARCO, M. D., SCHIAVI, M. 1999. *In vitro* gynogenesis to induce haploid plants in melon *Cucumis melo* L. *Journal of Genetics and Breeding* 53(3): 255-257
- GAŁAŻKA, J., NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K. 2013. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. *Folia Horticulturae*, 25(1): 67-78.
- GAMBORG OL, MILLER RA, OJIMA K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 50: 151-158.
- 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*, pp 200-201, Spain.
- 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
- GOSKA, M., JASSEM, B. and JAZDZEWSKA, E. 1990. Embryo development from sugarbeet ovules in *in vitro* culture, in *Inti. Inst. Sugarbeet Research, 53'd Winter*, pp. 145-154, Brussels.
- GÜRSÖZ (SARI), N. 1990. Kavun (*Cucumis melo* var. inodorus ve reticulatus) ve Karpuzda (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf) Işınlanmış Polenle *in situ* Partenogenetik Embriyolardan *in vitro* Kültürü ile Haploid Bitki Elde Eldesi. Yüksek Lisans Tezi, Ç.Ü. Fen Bil. Enst., Adana, 60 s.
- 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.
- GÜNAY, A. 1970. Marmara bölgesi önemli hıyar çeşitlerinin sitolojik, biyolojik ve morfolojik hususiyetleri üzerinde araştırmalar. Ankara Ü. Ziraat F. Yay. 395, Bilimsel Aras. ve İncelemeler, Ankara, ss 245.
- HALL, ROBERT D. 1999. An Introduction to Plant-Cell Culture. *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology.* Vol. 111, pp 7, Totowa, New Jersey.
- HAMIDVAND, Y., ABDOLLAHI, M. R., CHAICHI, 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.
- HATİPOĞLU, R., 1999. Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi Yayın no: A-58, Adana, 176 s.
- KLUG, S.W., CUMMINGS, R.M. 2002. Genetik kavramlar (ed: Öner., C.,). Palme Yayıncılık. Ankara.
- KIEŁKOWSKA A., HAVEY J.H. 2011. Studies on *in vitro* culture of cucumber microspores. *Proc. Plant & Animal Genomes XIX Conference, San Diego, USA.* Paper No. P871.

- KOBAYASHI, Ruth S.; SINDEN, Stephen L.; BOUWKAMP, John C. 1993. Ovule culture of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and closely related species. *Plant cell, tissue and organ culture*, 32(1): 77-82.
- KUMAR, H. A., MURTHY, H. N., & PAEK, K. Y. 2003. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Scientia horticultrae*, 98(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.
- KURTAR, E.S. 1999. Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Haploid Embriyo Uyarımı ve Bitki Oluşturma Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- KURTAR, E.S., SARI, N., ABAK, K. 2002. Obtention of haploid embriyos and plants trough irrigated pollen technique in squash. *Euphytica*, 127: 335–344.
- KWACK, N.S., FUJIEDA, K. 1988. Somatic embriyogenesis in cultured unfertilized ovules of *Cucurbita moschata* . *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 57(1): 34-42.
- LAZARTE J.E., SASSER C.C. 1982. Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of *Cucumis sativus* L. *Hort. Science* 17: 88.
- LI, J.W., SI, S.W., CHENG, J.Y., LI, J.X. and LIU, J.Q. 2013. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. *Biologia Plantarum*, 57 (1): 164-168.
- LI, J. X., GE, G. M., PANG, S. M., FANG, G. N., WU, X. B., & ZHOU, H. X. 2012. Study on *in vitro* Culture and Plantlet Regeneration from Unpollinated Ovary of *Cucumis sativus* L. *Northern Horticulture*, 23: 047.
- LICHTER, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 105 (5): 427-434.
- LOTFI, M., ALAN, A. R., HENNING, M. J., JAHN, M. M., & EARLE, E. D. 2003. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant cell reports*, 21 (11): 1121-1128.
- LOTFI, M., SALEHI, S., & PITRAT, M. 2008. Detection of cucumber parthenogenic haploid embryos by floating of immature seeds in liquid medium. Proceedings of the IX th EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Cucurbitaceae* (Pitrat M, ed), INRA, France
- LOWER, R.L, EDWARDS, M.D. 1986. Cucumber breeding. In: *Breeding Vegetable Crops* (ed: Basset, M.J.). AVI Publishing Comp. Inc. Connecticut, 173–207.
- LUX, H.; HERRMANN, L.; WETZEL, Claudia. 1990. Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. *Plant Breeding*, 104 (3): 177-183.

- MACİT, F. 1972. Sera domateslerinde F1 hibrid gücü ve kombinasyon kabiliyeti üzerine araştırmalar. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, No: 206 Ege Üniversitesi Matb., Bornova.
- 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.
- METWALLY, E. I., MOUSTAFA, S. A., EL-SAWY, B. I., & SHALABY, T. A. 1998. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 52(3): 171-176.
- MILLER, C.O. 1963. Kinetin and kinetin-like compounds. In: *Modern Methods of Plant Analysis/Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. Springer, Berlin Heidelberg, 194-202.
- MOQBELI, E., PEYVAST, G., HAMIDOGHLI, Y., & OLFATI, J. A., 2013. *In vitro* cucumber haploid line generation in several new cultivars. *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnology*, 21 (1): 18-25
- MOHAMED, M.F., and REFAEI E. F. S. 2004. Enhanced haploids regeneration in anther culture of summer squash (*Cucurbita pepo* L.) *Cucurbit genetics cooperative report.*, 27: 57-60
- MUROVEC, J., & BOHANEK, B. 2011. Haploids and doubled haploids in plant breeding. *Plant Breeding*. Rijeka, Croatia: InTech, 87-106.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K., DUMAS DE VAULX, R. 1989. Preliminary data on haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction. *Cucurbit Genetic Coop.*, 12: 24-25.
- PAVLOVA M.K. 1987. Culture of unfertilized gynaecia and seedbuds: Potential and prospects. *Selskohozyaistvennaya Biologiya*. 1: 27– 33
- PEIXIAOLI 2011, *In vitro* gynogenesis to induce haploid plants in cucumber and construction of genetic map with SSR markers in DH population. Master thesis, Gansu Agricultural University.
- PLAPUNG, P., KHUMSUKDEE, S., & SMITAMANA, P. 2014a. Development of cucumber lines resistant to Cucumber mosaic virus by ovule culture. *International Journal of Agricultural Technology*, 10(3): 733-741.
- PLAPUNG, P., S. KHUMSUKDEE, NUTTHAPOTAPOHN AND P. SMITAMANA. 2014b. Screening for cucumber mosaic resistant lines from the ovule culture derived double haploid cucumbers. *Am. J. Agric. Biol. Sci.*, 9: 261-269.
- PIERIK, R.L.M., 1989. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, 344 p.
- POCHARD, E., DUMAS DE VAULX R. 1971. La monoploidie chez le piment (*Capsicum annuum* L.). *Z.Pflanzenzüchtung*, 65: 23-46.
- POCHARD, E., DUMAS DE VAULX, R. 1979. Haploid parthenogenesis in *Capsicum annuum* 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.

- PRZYBOROWSKI, J., NIEMIROWICZ-SZCZTT, K. 1994. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid plant characteristics. *Plant Breeding*, 112 (1): 70-75.
- RAGNET, M. A. 1984. Etudes préliminaires de l'obtention d'haploïdes de melon, par cultures d'anthères *in vitro*. Mémoire (Ingénieur ENITAH) option cultures légumières et grainières, Angers, 64 p.
- 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.). pp. 251-264, Springer-Verlag, New York.
- REINERT, J.; YEOMAN, M. M. 1982. Bioassay systems for cytokinins. *Plant Cell and Tissue Culture A Laboratory Manual* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 83 p.
- SAN NOEUM LH. 1976. Haploïdes d' *Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d' ovaries non fécondes. *Ann.Amelior. Plant.* 26: 751-754
- SAN NOEUM L & AHMADI. N. 1980. Variability of doubled haploid from *in vitro* androgenesis and gynogenesis in *Hordeum vulgare* L. Colloque NSP, CNRS. Orsay (unpublished), 12 p.
- 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-Turkish Journal of Agriculture Forestry*, 16: 302-314.
- SARI, N., ABAK, K., PITRAT, M., DUMAS DE VAULX, R. 1994. Induction of parthenogenetic haploid embriyos after pollination by irradiated pollen 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., & VAULX, R. D. 1987. Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenèse induite par du pollen irradié. *Agronomie*, 7 (2), 141-148.
- 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. 1987. Recherche d' Haploïdes chez le Melon (*Cucumis melo* L.). Etude et Application a la Selection de la Parthenogenese Induite par du Pollen Irradié. Thèse (Docteur nouveau regime), Spécialité: Biologie et Physiologie Vegetales, Université des Sciences et Technique du Languedoc, Montpellier, 123p.

- SAUTON, A., DUMAS DE VAULX, R. 1987. Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogénèse induite par du pollen irradié. *Agronomie*, 7: 141–148.
- SAUTON, A., & DUMAS DE VAULX, R. 1988. Doubled haploid production in melon (*Cucumis melo* L.). Proc Eucarpia Meetg on *Cucurbitaceae*, Avignon-Monfavet, pp. 119-128. France,.
- 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 developpment induced by irradiated pollen. *Cucurbit Genetic Coop.*, 11: 39-42.
- SEVGİCAN, A. 1989. Örtü Altı Sebzeçiligi. TAV Yayınları No: 19, Yalova.
- SHAIL, J.W., ROBINSON, R.W. 1987. Anther and Ovule Culture of *Cucurbita*. *Cucurbits Genetics Cooperative Rep.*, 10: 92.
- SHALABY, T. A. 2007. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Scientia horticulturae*, 115(1), 1-6.
- SKÁLOVÁ, D., NAVRÁTÍLOVÁ, B., ONDŘEJ, V., & LEBEDA, A. 2010. Optimizing culture for *in vitro* pollination and fertilization in *Cucumis sativus* and *C. melo*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 52 (1), 111-115.
- SITBON, M. 1981. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by *in vitro* culture of un fertilized ovules. *Agronomie*, 91: 807–812.
- SNEEP, J., HENDRIKSEN, A.J.T. 1979. Plant breeding perspectives. Center for Agricultural Publishing and Documentation, pp. 330–341, Wageningen.
- SUPRUNOVA, T., SHMYKOVA, N., & PITRAT, M. 2008. *In vitro* induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*., Centre de Recherche d'Avignon. Unité Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Montfavet, France.
- ŞEHİRALİ, S., ÖZGEN, M. 1998. Bitki Islahı. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yay. No: 1059, 261 s.
- ŞENSOY, A.S. 2004. Yazlık kabak (*Cucurbita pepo* L.) bitkisinde meyve kabuk rengi özelliğinin alıtımının incelenmesi ve ıslah programlarında kullanılacak polenlerin muhafaza olanaklarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı,. Antalya. 62s.
- TANER, K.Y., YANMAZ, R., KUNTER, B., SAĞEL, Z., TUTLUER, M.İ., PEŞKİRCİOĞLU, H., USLU, N. 2003. Bazı kabakgil türlerinde gama ışınlamasının polen canlılığı ve haploid bitki oluşumu üzerine etkileri. VIII. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi, 15-17 Ekim 2003, Kayseri, Bildiri Özetleri, 39 s.

- TAŞKIN, H., KEMAL YÜCEL, N., BAKTEMUR, G., ÇÖMLEKÇİOĞLU, S., & BÜYÜKALACA, S. 2013. Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization with irradiated pollen technique in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). Canadian Journal of Plant Science, 93 (6): 1165-1168.
- 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. 1988. *In vitro* haploid plants derived from pollinisation by irradiated pollen on cucumber. In: Proceedings of the Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, pp. 143–144, Avignon-Montfavet.
- WEI, A., DU S., HAN Y., LIU N., and ZHANG G., . 2010. A Study On The Relationship Between Cucumber Gynogenesis And Content Of Ovary Hormones And Polyamines . *Acta Hort.* (ISHS) 871: 625-630
- XUE, G. R., YU, W.Y., FEI, K.W., 1983. Watermelon Plants Derived by *In vitro* Anther Culture. *Plant Physiology Commun*, (CHN), 4: 40–42
- 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, 10: 242-259.
- YANMAZ, R., ELLİALTIOĞLU, Ş., TANER, Y. 1997. The Effects of Gamma Irradiation on Pollen Viability and Haploid Plant Formation in Snake Cucumber. Abstract Book 1st International ISHS Symposium on Cucurbits, Adana.

ÖZGEÇMİŞ



1989 yılında Antalya'nın Finike ilçesinde doğdu. İlkokul ve ortaokul, lise öğrenim dönemimi Antalya'nın Kumluca ilçesinde tamamladı. 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği Bölümünü kazandı ve 2012 yılında lisans eğitimimi bitirdi. 2012 yılında özel öğrenci olarak ders aldığı Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde, resmi olarak 2013 yılında yüksek lisansa başlamış olup halen öğrenimine devam etmektedir.