T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ BÖLÜMÜ ANABİLİM DALI

ZUCCİNİ YELLOW MOSAİC V İRÜSÜ (ZYMV) DAYANIMLI FARKLI HIYAR TİPLERİNİN DOUBLE HAPLOİD ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE OVÜL KÜLTÜRÜNÜN OPTİMİZASYONU

Hazırlayan
Seher TOPRAK

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi. Hasan PINAR

Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2019
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ BÖLÜMÜ

ZYMV DAYANIMLI FARKLI HIYAR TİPLERİNİN DOUBLE HAPLOİD ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE OVÜL KÜLTÜRÜNÜN OPTİMİZASYONU

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Seher TOPRAK

Danışman
Dr. Öğ. Üy. Hasan PINAR

Haziran 2019
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Seher TOPRAK



YÖNERGEYE UYGUNLUK

"ZYMV DAYANIMLI FARKLI HIYAR TİPLERİNİN DOUBLE HAPLOİD ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE OVÜL KÜLTÜRÜNÜN OPTİMİZASYONU(ZYMV)" adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Seher TORRAK

Danışman

Dr. Öğ. Üy. Hasan PINAR

Bahçe Bitkileri Bölümü A.B.D. Başkanı

Prof. Dr. Osman GÜLŞEN

KABUL-ONAY

Dr. Öğ. Üy. Hasan PINAR danışmanlığında **Seher TOPRAK** tarafından hazırlanan öğrencinin "ZYMV DAYANIMLI FARKLI HIYAR TİPLERİNİN DOUBLE HAPLOİD ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE OVÜL KÜLTÜRÜNÜN OPTİMİZASYONU" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Bahçe Bitkileri** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

…/… /2019

JÜRİ:

Danışman : Dr. Öğ. Üy. Hasan PINAR .....

Üye : Dr. Öğ. Üy. Nihat YILMAZ .....

Üye : Dr. Öğ. Üy. Fatih HANCI .....

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……...… tarih ve ……..……sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……. /……../ ……

Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ile yardımlarını esirgemeyen kendisini bilime ve topluma hizmet etmeye adamış, paylaşmayı seven, azmi, çalışkanlığı ve organizasyon yeteneği ile kendisinden çok şey öğrendiğim ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üy. Hasan PINAR' a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda kullanılmak üzere materyallerimi temin eden, projemi destekleyen Anamas tohumculuğuna, projemi finansal olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje No: FSI-2017-7182) ve Dr. Öğr. Üy. Hasan PINAR yürütücülüğündeki proje ekibine de teşekkür ederim.

Doku kültürü çalışmalarım sırasında laboratuvarda bana yardım ve destek veren ekip arkadaşlarım Mine BOLAT, Hasan KEKEÇ, Emrah UYSAL, Tuba DİLFİRUZ ve Nurselin ÇABUK'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca; hayatım boyunca yanımda olan kelimelerin yetersiz kaldığı fedakâr ailemin her bir üyesine, çalışmalarım süresince sabır göstererek ve beni daima destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

ZYMV DAYANIMLI FARKLI HIYAR TİPLERİNİN DOUBLE HAPLOİD ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE OVÜL KÜLTÜRÜNÜN OPTİMİZASYONU

Seher TOPRAK

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Mayıs 2019
Danışman: Hasan PINAR

ÖZET

Bu çalışmada ülkemizde ve dünyanın çeşitli bölgelerinde problem olan Zucchini Yellow Mosaic Virüsüne (ZYMV) dayanıklı hat geliştirmek amacıyla kullanılacak ovül kültürünün optimize edilerek farklı tipteki hıyar genotiplerinin double haploid etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 3 farklı yetiştirme döneminde (2017 İlkbahar, 2017 Sonbahar ve 2018 İlkbahar) deneme kurulmuştur. 3 adet önceki çalışmalarda kullanılan ve başarılı sonuçlar elde edilen ovaryum kültürü protokolü ile daha sonraki dönemlerde ilk 3 protokolün modifiye edilmiş hali kullanılarak 23 adet hıyar genotipinin ovul kültürü etkinliği belirlenmeye çalışılmıştır. 2017 yılı ilkbahar döneminde en başarılı sonuç veren 1. denemenin 1. protokolünde maksimum embriyo sayısı 2.70 adet/petri olup K7 genotipten elde edilirken en düşük embriyo sayısı Ticari F1E'den (0.6 adet/petri) elde edilmiştir. 2017 yılı sonbahar döneminde petri başına maksimum embriyo sayısı 2.77(K17) ile 2. denemenin 1. protokolünde elde edilirken en düşük petri başına embriyo sayısı 0.1 embriyo/petri 2. protokolden elde edilmiştir. 2018 yılı ilkbahar döneminde en yüksek petri başına embriyo sayısı 1. protokolden (2.25 embriyo/petri) K19 genotipinden elde edilmiştir. Diğer taraftan en düşük embriyo sayısı ise 2. protokolden (0.05 embriyo/petri) elde edilmiştir. 2018 yılı ilkbahar döneminde 3. denemenin 1. ve 2. protokollerden elde eldilen toplam embriyolar 5 farklı ortama aktarılmış ve 23 adet hıyar genotipinden toplam 11 adet hıyar genotipi elde edilmiş ve 4. ve 5. protokollerde K5, K7, K13 ve Ticari F1L genotipleri başarılı bulunmuştur. Tüm elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde daha önceki çalışmalarda olduğu gibi farklı genotipler farklı protokollere embriyo oluşumu ve bitkiye dönüşüm bakımından farklı tepkiler vermiştir. Bu bulgular ışığında hıyar ıslah programlarında yeterli sayıda double haploid bitki elde etmek için mevcut protokollerin hıyar genotiplerine uygun şekilde modifiye edilerek kullanılmasında başarıyı arttıracağı kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: *Cucumis sativus,* double haploid, ovul kültürü

DETERMINATION OF DOUBLE HAPLOID EFFICIENCY OF ZYMV RESISTANT DIFFERENT CUCUMBER TYPES AND OPTIMIZATION OF OVUL CULTURE

Seher TOPRAK

Erciyes University, Institute of Science and Technology
Master Thesis, May 2019
Supervisor: Hasan PINAR

ABSTRACT

This thesis was conducted to optimize ovule culture to be used to develop resistant lines against Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV), which is a common problem in Turkey and other parts of the world and determine double-haploid efficiency of different types of cucumber genotypes. Three ovarium culture protocols which were used and yielded successfully outcomes in previous studies and modified versions of initial 3 protocols were used in 3 different growth seasons (2017 spring, 2017 autumn and 2018 spring), thus efficiency of ovule cultures of 23 cucumber genotypes were determined. In spring 2017, the most successful outcomes were achieved from the 1st protocol of the 1st experiment and the greatest number of embryos (2.70 embryo/petri) was obtained from K7 genotype and the lowest number of embryos (0.6 embryo/petri) was obtained from commercial F1E genotype. In autumn 2017, maximum number of embryos per petri (K17, 2.77) was obtained from the 1st protocol of the 2nd experiment and the lowest number of embryos (0.1 embryo/petri) was obtained from the 2nd protocol. In spring 2018, the greatest number of embryos (2.25 embryo/petri) was obtained from the 1st protocol of K19 genotype and the lowest number of embryos (0.05 embryo/petri) was obtained from the 2nd protocol. The embryos obtained from the 1st and 2nd protocols of the 3rd experiment of spring 2018 were transferred to 5 different media and 11 genotypes were obtained from 23 cucumber genotypes and K5, K7, K13 and Commercial F1L genotypes were found to be successful in the 4th and 5th protocols. Considering the entire results together, it was observed that as it was in previous studies, different genotypes yielded different responses to different protocols with regard to embryo formation and transformation into plant. It was concluded that to get sufficient number of double haploid plants in cucumber breeding programs, available protocols should be modified in accordance with cucumber genotypes and such modifications will improve success of breeding programs.

Key Words: *Cucumis sativus*, double haploid, ovule culture

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ii
KABUL-ONAY iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vi
İÇİNDEKİLER vii
SİMGELER ve KISALTMALAR ix
ÇİZELGELER LİSTESİ x
ŞEKİLLER LİSTESİ..... xii

1..BÖLÜM

GİRİŞ 1

2.BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Hıyarda double haploid eldesi ile ilgili çalışmalar 4

2.2. Hıyarda kabak sarı mozaik virüsü (Zucchini Yellow Mosaic Virüs veya ZYMV) ile ilgili Çalışmalar 15

3. BÖLÜM

MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal 19

3.2. Metod 21

3.2.1 Bitkilerin yetiştirilmesi 21

3.2.2. Ovul Kültürü çalışmaları 23

3.2.3. Dişi Çiçeklerin Yüzey Sterilizasyonu 25

3.2.4. Ovaryumların Ortama aktarılması 26

3.2.5. Ovaryum Kültüründe Kullanılan Protokoller 26

3.2.6. İklim kabininin ortamının şartları 28

3.2.7. ZYMV Dayanıklılık Analizi 28

3.2.7.1.a. DNA İzolasyonu 28

a.DNA izolasyon protokolü 28

3.2.7.1.b. ZYMV Dayanıklılık Analizi 30

3.2.7.1.b. Agaroz Jel Elektroforez 30

4. BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Farklı Hıyar Genotiplerinin ZYMV Dayanımlarının Belirlenmesi 32

4.2. Farklı protokollerin Hıyar Genotiplerinin Ovaryum Kültürüne Etkileri 32

5. BÖLÜM

SONUÇ ve ÖNERİLER 43

KAYNAKLAR 45

ÖZGEÇMİŞ 51

SİMGELER ve KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
$AgNO_3$	: Gümüşnitrat
BA	: Benzyl-adenine
GA_3	: Giberellic acid
IAA	: Indole-3-acetic acid
IBA	: Indole-3-butyric acid
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MS	: Murashige&Skoog Medium
NAA	: Naphthalene acetic acid
NaOH	: Sodyum Hidroksit
ng	: Nanogram
NH_4NO_3	: Amonyumnitrat

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge: 3.1.1. Çaşılmada kullanılan genotipler……..20
Çizelge.3.2.5.1 : Çalışmada Kullanılan Protokoller……....28
Çizelge.3.2.5.2: Sürgün oluşturma Ortamları……..29
Çizelge 3.2.7.1 : DNA Ekstraksiyon Çözeltisi……32
Çizelge 4.1.1. 89 adet hıyar genotipinin ZYMV dayanımını belirlemek için CAPS (G99A) markırı ile yapılan tarama sonucu elde edilen jel görüntüsü……..34
Çizelge(4.2.1) 2017 İlkbahar döneminde 23 adet hıyar genotipiyle yapılan ovaryum kültüründen elde edilen kültüre alınan petri sayısı, elde edilen toplam embriyo sayısı, petri başına embriyo sayısı, elde edilen toplam kallus sayısı, petri başına kallus sayısı……37
Çizelge (4.2.2) 2017 Sonbahar döneminde 23 adet hıyar genotipiyle yapılan ovaryum kültüründen elde edilen kültüre alınan petri sayısı, elde edilen toplam embriyo sayısı, petri başına embriyo sayısı, elde edilen toplam kallus sayısı, petri başına kallus sayısı……38
Çizelge (4.2.3) 2018 İlkbahar döneminde 23 adet hıyar genotipiyle yapılan ovaryum kültüründen elde edilen kültüre alınan petri sayısı, elde edilen toplam embriyo sayısı, petri başına embriyo sayısı, elde edilen toplam kallus sayısı, petri başına kallus sayısı……....39
Çizelge 4.2.4 Bitkiye dönen genotipler ve elde edilen bitki sayısı……..40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1.1. Çalışmada kullanılan farklı hıyar genotiplerine ait meyve resimleri …..…20
Şekil (3.2.1.a) Kotiledon aşamasındaki bitkiler……..23
Şekil (3.2.1.b) Gerçek yaprak aşamasındaki fideler ……..….23
Şekil (3.2.1.c) Fidelerin seraya şaşırtılması ……23
Şekil (3.2.1.d) Bitkilerin ipe sardırılmsı ve tek gövdeli olarak yetiştirilmesi ……23
Şekil (3.2.2.1) Farklı hıyar genotiplerine ait ovaryum kültürü resimleri……24
Şekil (3.2.2.2). Örneklerin toplanması……26
Şekil (3.2.2.3).Dişi çiçeklerin +8 C buz kutularınakonulması……26
Şekil (3.2.3.1) Dişi çiçeklerin yüzey sterilizasyonu……27
Şekil (3.2.4.1) Ovaryumların ortama aktarılması……28
Şekil 3.2.6.1) iklim kabinin görüntüsü ve elde edilen sürgün görüntüsü……29
Şekil (3.2.7.1) DNA izolasyonunda kullanılan cihazlar…….….31
Şekil (3.2.7.3) PCR, Görüntüleme cihazı……....33
Şekil (4.2.1) Ovüllerden embriyo olşumu gözlemlenmesi……..35
Şekil (4.2.2) Embriyolardan sürgün elde edilmesi……..35
Şekil (4.2.3) Bitkiciklerin kök oluşturması ve torf perlit ortamına alınması……...36
Şekil (4.2.4) Bitkilerin saksıya alınması ve yetiştirilmesi……...36

1.BÖLÜM

GİRİŞ

Hıyar (*Cucumis sativus* L.) meyvesi insan beslenmesinde önemli sebzelerden birisidir ve bütün yıl boyunca gerek içerdiği besin maddeleri gerekse de iştah açıcı rolü nedeniyle tüketilmektedir. Türkiye'de hıyar üretiminde kullanılan tohumluğun parasal değeri 100 milyon doları geçmiştir. Bunun yaklaşık %40'lık kısmı yerli tohum firmaları tarafından geri kalanı ise yurtdışından ithalatla karşılanmaktadır.

Kültüre alınan en eski sebze türlerinden olan hıyarın anavatanı Hindistan'dır. Orta Asya, İran ve Anadolu üzerinden Avrupa'ya yayılmıştır.

Hıyar (*Cucumis sativus* L.) dünyanın farklı bölgelerinde sera koşullarında yetiştirilip taze olarak veya işlendikten sonra yoğun bir şekilde tüketilen bir sebze türüdür. Ülkemizde ise hem kış sezonunda hem de yaz sezonunda yaylalarda yoğun olarak üretilmekte ve diğer sebze türlerinde olduğu gibi büyük potansiyele sahiptir.

Dünyada ve ülkemizde üretim hibrit tohumlar ile yapılmakta olup son yıllarda ülkemizde özel ve kamu kuruluşları tarafından yürütülen ıslah programları ile hem ülkemiz tohum ihtiyacını karşılamak hem de diğer ülkelere adapte olabilecek çeşitlere ait tohumları ihracatında yol almak en önemli öncelikler arasında yer almaktadır. Fakat diğer türlerde olduğu gibi yeni çeşitlerin sadece klasik ıslah metodlarını kullanarak geliştirilmesi zaman almaktadır.

Klasik ıslah yöntemlerini kısaltmak için doku kültürü teknikleri arasında haploidi tekniği sebze ıslahında geniş uygulama alanı bulmuştur. Haploidlerin en uygun kullanım alanı kendine uyuşmaz türlerde dahi tamamen homozigot katlanmış haploid (Doubled Haploid=DH) hatların hızla üretimidir. Geleneksel yöntemler ile saf hatlar elde edilebilirse de bu işlem zaman alıcıdır ve yabancı tozlanan bitkilerde 10-12, kendine döllenen bitkilerde 6-7 yıl gereklidir. Dioik türlerde kendileme olanaksızdır. Haploidi yöntemleri ile bu süreyi 1-2 yıla indirmektedir.

Ovül kültürü ile birkaç ay içinde haploid bitkiler ve bunların kromzomlarının katlanmasıyla tek bir generasyonda homozigot DH haploid bitkiler elde edilebilir. Bu fertil homozigot bitkiler hibrit çeşitlerinin geliştirilmesi için gerekli saf hatların elde edilmesinde çok önemlidir. DH bitkiler normal mayoz açılımı gösterirler ve açılımla istenen özelliklerini kaybetmezler (Reinert ve Bajaj, 1977).

DH hatlar mutlak homozigot olduklarından resesif mutasyonları tespit edilmesi ve izolasyonu kolaylaştırır. Dominansi etkisi kalkar ve eklemeli gen etkisi ikiye katlanır. Yetiştiriciliği yapılan karışık çeşitlerin veya populasyonlarının kısa sürede saflaştırılabilmesi haplodizasyonun diğer bir avantajıdır (Çömlekçioğlu, 2001). Hıyarda hibrit çeşit geliştirmek için çok sayıda homozigot hatta ihtiyaç duyulmaktadır. Fakat çok farklı tipte ve çok farklı sayıda saf hat geliştirmek için mevcut tiplerin double haploid tekniğine olan tepkisinin bilinmesi gerekmektedir.

Cucurbitaceae familyasında çoğunlukla ovaryum kültürü homozigot hat geliştirmek ve genetik çalışmalar için en uygun metod olarak karşımıza çıkmaktadır. Ovaryum kültürü ile ilgili birçok çalışma yürütülmüş olup başarılı sonuçlar elde edilmiştir. (Chambonnet ve Dumas 1985; Dumas ve Chambonnet 1986; Gemes ve ark., 1997; Metwally ve ark. 1998; Diao ve ark., 2009). Ovaryum kültürü hıyarda haploid ve double haploid bitki elde etmek amacıyla kullanılmasına rağmen yapılan değerlendirmelerde ovaryum ve ovul kültürünün genotipe bağlı olduğu bildirilmektedir(Gemes ve ark., 2002; Diao ve ark., 2009). Bu yüzden benzer çalışmalar farklı hıyar genotiplerinde uygulanarak hıyar genotiplerinin tepkilerinin belirlenmesi zorunluluktur.

Ülkemizde hıyar yetiştiriciliğinde en önemli sorunların başında virüs hastalıkları gelmektedir. Önemli verim ve kalite kaybına yol açan virüs hastalıklarının herhangi bir kimyasal yöntemle mücadelesi de bulunmamaktadır. Ancak dayanıklı çeşit kullanarak, virus taşıyan vektörlerin girmesini engelleyen netler kullanarak veya bu vektörlerle kimyasal mücadele ederek virüs hastalıklarından korunmak mümkündür. Ayrıca afitlerin kullanılan kimyasal ilaçlara bağışıklık kazanma durumları da bir handikaptır. Kabak sarı mozaik virüsü yaprak bitiyle taşınır ve her geçen gün artan virüslerden biridir. Bu etmenleri bitkilerin gelişimini bozmakla birlikte meyvelerin anormal gelişimine neden olur ve meyve kalitesini düşürerek pazarlanabilir ürün miktarını düşürür. Aynı zamanda meyve oluşumunu da tamamamen engelleyerek ekonomik olarak büyük kayıplar maydana getirmektedir. *Cucurbitaceae* familyasında zararlı olarak otuz iki tane virüs ve virüse benzer hastalık etmenleri kaydedilmiştir. Bu virüs etmenleri içinde, Zuccini Yellow Mozayik Virüsü *Cucurbitaceae* üretiminde ekonomik olarak kayıblara neden olan en önemli virüslerden birisidir (Lovisolo, 1980). Zuccini Yellow Mozayik Virüsü ilk kez 1981 senesinde İtalya'da saptanmıştır. (Lisa ve ark., 1981) İtalya'dan sonra dünyanın kabakgil yetiştiren birçok ülkesinden de raporlar kaydedilmiştir(Nameth ve ark., 1983; Lesemann ve ark., 1984; Lisa ve Lecoq, 1984;

Davis, 1986; Dolores ve Valdez, 1988). Türkiye'de ilk kez 1984 yılında Davis ve Yılmaz tarafından ZYMV saptanmıştır. *Cucubirtaceae* familyasında ekonomik bakımından kayıplara sebep olan virüslerden biri olduğu bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 1992; Yılmaz ve ark., 1994). Bu virüs hastalığı, hastalıklı bitkilerde cücelik, sarılık, deformasyon, mozaik, bitkinin genç bölgelerinde incelmeye ve çiçek azalmasına neden olmakta ve bu sebeblede ürün kayıplarına sebep olmaktadır (Blua ve Perring, 1992). Başta *Aphis gossypii* ve *Myzus persicae* olmak üzere *Aphididae* familyasından birçok yaprak biti ile non-persistent olarak (Ullman, 1991) çok etkili ve kolayca yayılabilen sarı kabak virüsü zararlısıyla mücadele etmek için, arazinin malç ile kapatılması, transgenik bitkilerin kullanılması, kimyasal ilaçların kullanılması gibi mücadelelerin yapılması bitki zararını azalmakta ve meyve pazarlanabilir kalitesini artırmaktadır. (Summers ve ark., 1995; Clough ve Hamm, 1995). Bu virüse karşı en iyi sonuçlar ise, cross protection çalışmalarında elde edilmiştir. ZYMV'nin zayıf ırkı (ZYMV-WK) kuvvetli ırka karşı başarı ile kullanılmıştır (Wang ve ark., 1991).

ZYMV' ye dayanıklılık resesif yapıda olduğundan her iki ebeveyin de homozigot yapıda dayanıklı olmak zorundadır. Markır yardımıyla seleksiyon (MAS) yeni çeşitlerin geliştirilmesini hedefleyen ıslah çalışmalarında klasik virus testlemesine ihtiyaç kalmadan sadece DNA profillerine bakarak bireylerin belirli bir hastalığa dayanıklı olup olmadığı hakkında bilgi vererek seleksiyon süresini kısaltır. Çünkü klasik virüs testlemeleri çoğu zaman tekrarlanabilirliği düşüktür ve çevre koşullarından olumsuz etkilenir.

Bu çalışmada ülkemizde ve dünyanın çeşitli bölgelerinde problem olan Zucchini Yellow Mosaic Virüsüne dayanıklı hat geliştirmek amacıyla kullanılacak ovül kültürünün optimize edilerek farklı tipteki hıyar genotiplerinin double haploid etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Double haploid eldesi ile ilgili çalışmalar

Haploidler ve double haploidler, bitki ıslahında çok önemlidir. Homozigot hatların üretilmesi için gerekli sürenin geleneksel ıslahla kısaltılması sağlamaktadır.

Blakeslee ve ark. (1922) tarafından *Datura stramonium*'da haploid bitkilerin bulunmasından sonra, haploidi ile ilgili çalışmalar başlatmıştır. Haploidlerin sağladığı potansiyel, araştırmacıları haploid bitki elde etmek amacıyla yapılan denemelere yoğunlaştırmıştır. Chambonnet ve Dumas de Vaulx (1985), *cucurbitacea* da (*Cucurbita pepo L.*) tozlanmamış ovaryumları kültüre alarak embriyo hücrelerinden haploid bitki üretilmiştir. Araştırmacılar kültür ortamına almış oldukları ovullerden embriyo aldıktan sonra hormon free ortamına aktarmışlardır. İn vitro kültüründen en iyi sonuç antesizden 1 veya 2 gün önce tozlanma gerçekleşmeden oluşan ovüllerin kullanılmasıyla üretilmiştir. Bazı bitkiler haploid-diploid kimera, aneuploid, poliploid, çoğunluğunun diploid olduğu gözlemlenmiştir. Diploid bitkilerde yapılan genetik analizlerde elde edilen 8 adet heterozigot F1 bitkisi ana bitkiden farklı olduğu gözlemlenmiştir. Her bir F1 bitkisi rejenerasyona uğradığından farklı fenotipik özelliğe sahip olduğu gözlemlenmiştir. Rejenerasyona uğramış F_1 bitkilerinin her biri farklı fenotipik özellikler göstermişlerdir. Sauton (1987), ticari bir F_1 kavun çeşidini in vitro koşullarında örtü altında yetiştirerek kendileme yapmış, daha sonra ovaryumları tozlanmadan 5 gün sonra toplamıştır. Birkaç damla Tween-20 damlatılmış olan % 10'luk hipo solüsyonunda 10 dakika süreyle yüzey sterilizasyonu yapılan ovaryumları, saf su ile 3 kez yıkanarak petrilerin içerisinde bulunan nemlendirilmiş filtre kağıtlarına steril ortamda konulmuştur. Plasenta dokuları hassas bir şekilde uzaklaştırılan ovülleri 20 g/l sakkaroz + 10 g/l agar hazırlanan MS ortamında kültüre almıştır. Kültür tarihinden 3-4 hafta içinde ovüllerin çimlendiği, sonraki 4 hafta sonunda da üretilen bitkilerin toprağa aktarılacak seviyeye geldiği gözlemlemiştir. Kwack ve Fujieda (1988), *Cucurbitaceae moschata*'nın tozlanmamış ovaryumlarını doku kültürüne alınarak haploidi uyartımı incelenmiştir. Araştırıcılar, ovaryumlar antesiz aşamasında iken

alınarak 48 saat boyunca 5 ^{o}C de ön sıcaklık uygulanan ovaryumlarından alınarak ovullerin 30 g\l oranında sakkaroz içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. MS ortamının kullanılması ile en yüksek sonuç alındığını ve ovullerin % 17'sinde embriyo oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Elde edilen bu embriyolar farklı bir ortama alındığında çoğunda kallus oluşumu ve anormal morfolojik gelişmeler gösterdiğini ve sadece birkaç tanesinde normal sürgün ve kök oluşumu gözlemlenmiştir. Bu araştırma sonucunda elde edilen 3 bitki içerisinde birinin diploid (2n=40), ikisinin ise tetraploid olduğu saptanmıştır. Gémés ve ark. (1996), *Cucurbita* da 2-3 cm uzunluğunda olan döllenmemiş (çiçek açamadan önce) ovaryumların dış kabukları soyularak silindir şeklinde dilimlenip doku kültürüne alınmıştır. Eksplantlar, ilk olarak TDZ ve % 4 oranında sakkaroz içeren ortama alınmıştır. Sonra NAA ve BA'nın farklı bileşimleri kullanılmış ve hazırlanan EI ortamına alınmıştır. Yaklaşık olarak 6 hafta sonra embriyo oluşumu gözlemlenmiş ve her bir ovaryumdan yaklaşık olarak 10-15 adet embriyo elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu araştırmalar sonucunda üretilen bitkilerin kromozom sayısı ölçümlerinde, % 70'inin haploid, % 30'unun katlanmış haploid ve aneuploid olduğu bildirilmiştir. Metwally ve ark. (1998a), *Cucurbitaceae* bitkisinin ovaryumlarını antezisten 1 gün önce toplanarak 0, 2, 4 ve 8 süre ile + 4 C ön sıcaklıkta tutmuşlardır. Araştırıcılar elde edilen ovulleri ovaryumdan ayırarak 30 mg/l'lik sakkaroz, 8 g/l agar ve 2,4 D'nin 0.1, 1.0, 5.0 ve 10 mg/l'lik 4 farklı konsatrasyonun hazırlandığı MS ortamında kültüre almış ve 25+1 C sıcaklık ve 16 saatlik ışık periyodunda 28 gün bekletmişlerdir. Bu süre sonunda ovuller hormon free ortamına olan MS alınmıştır. Kültüre alınmış olan 100 adet ovülden elde edilen bitki sayısı göz önünde bulundurulduğunda en çok bitkinin, ön sıcaklık uygulaması yapılmayan ovaryumlardan çıkarılan ovullerin, 1 veya 5 mg/l 2,4 D eklenen MS ortamında in vitro kültüre alınan ovullerden elde edildiği saptanmıştır. Gémés ve ark. (2002), beş adet partenokarpik hıyar ıslah hattı (7D4C, KS0C, D20F2A5, E10D14, Perez ML) (ana ebeveyn) ve 1 adet hibrit çeşit (Perez F_1) kullanarak ovul kültürü yapmışlardır. Araştırıcılar donör bitkileri örtüaltı koşullarında yetiştirilmiş olan bitkilerinden tozlanmamış ovulleri tam çiçek açmadan 3 gün önce, 6 saat önce ve tam çiçek açma evresinde toplayarak doku kültürüne almışlardır. Araştırma sonucunda her bir genotipte 150 ovül denenmiştir. Sürgün oluşturma ortamına (CBM) 0.02 mg/l TDZ ve % 4 sakkroz oranlarda ortam hazırlanmış ve kültürler ışıksız ortamda 24 ^{o}C, 28 ^{o}C veya 35 ^{o}C' deki sıcalıklarda inkübe edilerek 2 ile 10 gün sonra kültüre alınmıştır. Ovüller 0.05 mg/l NAA, 0.2 mg/l

BA ve %3 sakkaroz kullanılarak hazırlanan sürgün oluşturma ortamına (CBM) alındıktan sonra 26 ^{o}C'de, 16/8 saat (ışıklı-ışıksız) ışıklı ortamda tutulmuştur. Bu çalışma sonucunda araştırıcılar en fazla embriyonun 35 ^{o}C sıcaklık uygulamasından elde edildiğini ve herbir ovül başına üretilen embriyo oranının %18.4, bitki oranının ise %7.1 olduğu saptanmıştır.

Diao ve ark. (2009) hıyarda, Dumas ve Chambonnet (1986) ve Shalaby (2007) kabakta, Kobayashi ve ark. (1993) tatlı patateste ve Alan ve ark. (2004) soğanda genogenesis çalışmaları yürütmüşler ve her genotip için genogenesisin optimize edilmek zorunda olduğunu rapor etmişlerdir.

Moqbeli ve ark. (2013) 6 adet F1 hıyar çeşidinde (Kashmir, Adergreen', Summerstar, 'Royal,2010-3 ve 502×605') ovaryum kültürünü kullanmışlar ve 0.04 mg·L-1 TDZ içeren MS ortamında en başarılı sonuç alındığı rapor edilmiştir. Çeşitler arasında en fazla embriyogenesis summerstar çeşidinden elde edilmiştir.

Gemes ve ark. (2002) hıyarda 32°C'de ön sıcaklık uygulaması ile in vitro ovul kültüründe haploid embriyo gelişimin yüksek olduğunu bildirmiştir. Yine Yang (1982) ve Diao ve ark., (2009) embriyo oluşumunun yüksek sıcaklıktan etkilendiğini rapor etmişlerdir. Tüm bu elde edilen bu bulgular sıcaklık şokunun haploid embriyo oluşumunda etkili bir yol olduğunu göstermektedir (Shalaby 2007).

Çağlar ve Abak (1996) tarafından yürütülen başka bir çalışmada yılın farklı mevsimlerinde 4 farklı hıyar genotipinden oluşturulan embriyolar steril koşullarda E20A ortamında kültüre almışlardır. Elde edilen embriyoların bitkiye dönüşüm oranları, süreleri ve üretilen bitkiciklerin doku kültüründeki gelişimleri incelenmiştir. Aynı zamanda elde edilen bitkiciklerin kültür klonlamasıyla çoğaltım imkanları araştırılmış ve çoğaltım katsayıları belirlenmiştir. 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 dönüşmüşlerdir. Mayıs ve Eylül ayları arasında kültüre alınan yılın öteki dönemlerine göre daha çok sayıda haploid bitki elde edilmiştir. 2. yılın haziran ayında ise embriyoların bitkiye dönüşüm oranları % 80' e ulaşmıştır. Üretilen bitkicikler besin ortamında çok iyi bir şekilde gelişmişler ve klonlamayla kolayca çoğaltılmıştır. Arda arda 30'ar gün arayla yapılan çoğaltımlarda herbir bitkiden elde edilen çelik sayısı 3-12 arasında değişmiştir. Her bir meyve başına elde edilen haploid bitki sayısı çok yüksek olmamakla birlikte, iki yılın sonucunda 4 genotipten toplam 190 adet haploid bitki üretilmiştir.

Gynogenesis yoluyla haploid bitki üretebilmek için tozlanmamış ovullerin in vitro kültürleri, yetersiz polenlerle tozlama ve kromozom eliminasyonu gibi farklı yöntemler yapılmaktadır.

Aalders (1958), hıyarda (*Cucumis sativus* L.) monoploid bitki üretebilmek için, olgulaşmamış meyvelerin tohumlarını suda yüzdürme yoluyla ayırarak (hafif olan tohumlar su yüzeyinde kalır) bu tohumları embriyo kültürüne almıştır. 13 adet monoploid hıyar bitkisi üretilmiştir. Kabakgil familyasından üretilen ilk monoploid bitkilerden 8 adedi büyütülmüş ve kolhisin uygulanmasıyla diploid bitki üretimi olmasına rağmen, yeni bitkiler elde edilememiştir. Sonraki yıllarda, Ginkgo Biloba bitkisinde dişi gametinden haploid dokular üretilmiştir (Tulecke, 1964). *Solanum melongola* ve *Zea mays*'ın ovaryumlarında haploid hücrelerin bölündüğü gözlenmiş (Uchimiya ve ark., 1971), *Hordeum vulgare* L. x *Hordeum bulbosum* L arasındaki melezlemelerde de kromozom eliminasyonundan faydalanarak haploid embriyolar üretilmiş ve yeni besin ortamları uygulanarak (Norstog, 1973) doku kültüründe büyütülmüştür. Fakat bu çalışmalarda haploid dokular ve embriyolarda bitki üretimi olmamıştır. İyonize radyasyonlar bitkilerde deneysel amaçla birçok çalışmalarda kullanılmıştır (Sparrow, 1961).

San Noeum (1976), arpada (*Hordeum vulgare* L.) yaptığı çalışmada her bir çiçekteki çiçek tozlarının gelişme durumuna göre ayırdığı döllenmemiş yumurtalıkları 3 bölüme ayırarak kültüre alınmıştır. Gelişmiş yumurtalıkların çiçek tozlarının tek çekirdekli olduğu safhada G_1, çift çekirdekli olduğu safhada G_2, üç çekirdekli, ancak anthesisten önceki safhada G_3 olarak isimlendirilmiştir. Farklı boylarda kültüre alınan bu üç bölüm yumurtalıklardan G_1 safhasında olanlar şişmiş veya az şişmiş ve sonra ölmüştür. Bunlar bu in vitro kültüründe üretilen ilk dişi haploid bitkiler olarak rapor edilmiştir. Dumas de **Vaulx (1979),** kavunu (*Cucumis melo* L.) (2n=24), *Cucumis ficifolius* (2n=4x=48) ile polen uygulaması yapılarak türler arası melezlemeler yapmıştır. Araştırıcı, polenlerin çim borusu gelişimini stigmayı uyarmak için stigmalar yüzeysel olarak kesilmiş ve dişi çiçekler kavun polenleri ile tozlanmıştır. Bu meyvelerden elde edilen tohumlar ekildiğinde melez bitkilerin çıkmadığı ve daha küçük boyutlarda bitkilerin geliştiği gözlemlenmiştir. Araştırıcı, bitkilerde yapmış olduğu kromozom sayımları sonucunda, bu bitkilerin haploid yapıda olduğunu; haploidi oranlarının ise ilkbahar döneminde % 0.284, sonbahar döneminde ise % 0.07 olduğunu bildirmiştir. Asselin de Beauville (1980) çeltikte (Oryza sativa L.) in vitro kültürüyle haploid bitki üretimi için explant

olarak kullanılan döllenmemiş yumurtalıklar ile başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmacı, farklı pH değerleri (6.0, 6.4, 6.8) ile ortama katılan farklı sakkaroz değerleri (% 2, % 3, % 6) ve maya özünün etkilerini incelemiş ve en iyi sonucun % 6 sakkaroz ile 2 g/l maya özü bulunduran ve pH değeri 6.4 olan ortamdan alındığı saptanmıştır. Bu ortamdaki haploidi oranı % 1.3 ve bu oranın haploid bitkiye dönüşüm oranı % 19.4 olduğu saptanmıştır. Zhou ve Yang (1980) çeltikte (Oryza sativa L.) Asselin de Beauville ve Kuo(tarih) tarafından adapte edilen alışılmış ovül kültürü yerine başakcık kültürünü kullanmıştır. Araştırmacılar başakcık kültürünü kullanarak, in vitro kültüre aldıkları çeltik çeşitlerinden 156 japonica çeşidinin tamamından, 4 indica çeşidinin de 2 sinden başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Zhu ve ark. (1980) ile Zhu ve Wu (1981) tozlanmamış yumurtalıkların kültüre alınarak haploid bitki üretme yöntemini erkek kısır tütün (*Nicotiana tabacum*) hatlarına uygulanarak en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Araştırmacılar, haploid tütün bitkilerini üreterek, yeni donör bitkileri ovaryum kültüründe kullanmışlardır.

Sitbon (1981) tarafından, *Gerbera jamessonii* bitkisinde tozlanmamış ovüllerin doku kültürü ile klorofile sahip haploid bitkiler elde edilmiştir. En iyi sonucu MS+ 2mg/l BAP veya Kinetin+ 0.5 mg/l IAA besin hormonlarıyla hazırlanan ortamlardan alındığı bildirilmiştir.

Wang ve Kuang (1981), arpada yaptıkları ovaryum kültüründe, ovaryumlar kallus oluşturmadan direkt olarak kök ve sürgün meydana getiren bitkicikler üretmişlerdir. Aktarılan arpa bitkilerindeki kök ucu kromozom sayımları ile in vitro kültüründen elde edilen bitkiciklerin haploid oldukları saptanmıştır. *Compositae* familyasına ait türlerden özellikle *Gerbera jamessonii* ve *Helianthus annus* da doku kültüründe gynogenesis ile ilgili birçok çalışma yürütülmüştür.

Sitbon (1981), *Gerbera jamessonii* bitkisinde gynogenesis in vitro kültürü ile haploid bitki üretimi için çalışılmıştır. Araştırmacı, ovaryum in vitro kültüründen olumlu bir sonuç alamadığı halde, tozlanmamış ovülleri doku kültürene alarak haploid bitkiler üretmeyi başarmıştır. Aynı araştırmacı, değişik ortamların haploid oluşumundaki etkilerini de incelemiştir. En iyi sonucu 2 mg/l BAP veya kinetin+ 0.5 mg/l IAA hormanları ile hazırlanan MS besin ortamından elde edilmiştir.

Wu ve Cheng (1982), tütünde tozlanmamış genç ovaryumları doku kültürene alarak haploid bitkiler (n=24) üretmişlerdir. Haploid bitkicikler kallus oluşturma evresi direkt olarak megaspordan veya yumurta hücresinden oluştuğunu bildirmişlerdir. Kültür

ortamına konulan thiamin, pyridoxine, ascorbic asit, nicotinic asit, inositol ve folik asit oranları arttırıldığında doku kültürüne alınan ovaryumlardan embriyoid ve embriyogenik kallus eldesinin arttığı saptanmıştır. Araştırmacılar, hormonların embiryo eldesi için gerekli olduğunu, ancak embriyogenik kallus eldesi için gerekli olmadığını bildirmişlerdir.

Dryanovska ve Ilieva (1983), kavunda (*Cucumis melo* L.) organogenesis ve haploidinin elde etmek amacıyla anter ve ovül kültürü çalışmalarını yapmışlardır. Araştırmacılar, ovulleri plasenta ile in vitro kültüre aldıktan sonra kallus elde ederek bunları haploid bitkiye dönüştürmüşlerdir ve bu bitkilerden de birer tane haploid bitki elde edilmiştir.

Troung-Andre ve Demarly (1983), mısırda 3 hat ve 2 melez çeşide ait tozlanmamış ovaryumları in vitro kültüre alarak gynogenesis yöntemiyle haploid bitki üretiminde genotipin ve mevsimin etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların yapmış olduğu denemede kullandıkları beş çeşitten sadece birinden iyi sonuç alınmıştır. Kültür için kullanılacak materyaller ilkbahar mevsiminde daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Hosemans ve Bossoutrot (1983), şeker pancarında (*Beta vulgaris* L.) erkek kısır 4 farklı genotipin ovüllerini anthesisten bir önceki evrede, farklı oranlarda oksin ve sitokinin kullanılarak hazırlanan ortamlara alınmıştır. Ovüllerin bir veya iki ay içerisinde genotip ile kullanılan oksin ve sitokinin oranlarına bağlı olarak % 4.4 arasında değişen oranlarda, mikropil çevresinde kalluslar veya embriyolar oluşturduklarını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar in vitro ortamına alınan ovullerin yaklaşık olarak % 2.1'nin kallus veya embiryo oluşturduğunu, bunlardan da 17 tane (% 10.9) bitki oluştuğu saptanmıştır. Elde edilen bitkiler vejetatif olarak çoğaltılıp toprağa dikilmiştir ve toprağa dikilen bu bitkilerin bazılarının köklerinde spontan kromozom katlanmaları olduğu ve bitkilerin diploid hale geldikleri bildirilmiştir.

Meynet ve Sibi (1984), Gerbera jamesonii de tozlanmamış ovulleri in vitro ortamına almışlardır. Döllenmeden önce alınan çiçeklerin ovulleri çıkarılarak, kallus oluşumunun başlangıcı, aktarımı, bitkiciklerin gelişimi ve köklenme olmak üzere 4 farklı ortama belirli aralıklarla dikilmiştir. Araştırmacıların denemede kullanmış oldukları Fresultane çeşidinde in vitro kültürü başlangıcından itibaren 60 günden daha az zamanda ve % 4-7 oranında haploid bitkiler üretilmiştir.

Araştırmacılar, *Gerbera jamesonii* de haploid bitki üretiminin genotip ve mevsimden etkilendiğini açıklamış ve bitki üretimi haziran ayında % 4.64 oranında iken, eylül

ayında % 7.47 oranında yükseldiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda araştırmacılar bu yöntemin *Compositae* familyası türlerinden olan enginar ve marul içinde uygulanabileceğini açıklamışlardır.

Chambonnet ve ark. (1985), kabakta (*Cucurbita pepo* L.) tozlanmamış ovullerin kültüre alınarak embriyo hücrelerinden haploid bitkiler üretilmiştir. Araştırmacılar uygun in vitro kültürü koşullarında kültüre alınmış olan ovullerden ürettikleri embriyoları bitkiye dönmeye başladığında hormon free ortamına aktarımı yapılmıştır. Bu araştırmada en yüksek sonuçlar çiçek açmadan 1 - 2 gün önceside döllenme gerçekleşmeden toplanan ovullerin çalışmada kullanılmasıyla elde edilmiştir. Elde edilen bitkilerin çoğu diploid, bazıları haploid kimera, bazıları ise aneuploid veya polyploid olduğu elde edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen diploid bitkilerin genetik analizinde ana bitkiyle karşılaştırma sonucu ana bitkiye benzemeyen 8 heterezigot F1 bitki elde edilmiştir. Farklılaşmış olan F1 bitkilerin her birinde farklı fenotipler görülmüştür.

Bornman (1985), Şeker pancarında belli bir oranda gynogenik embriyolar ürettiğini ve bu embiryoların bazısından haploid bitki elde edildiğini bildirmiştir.

Hosemans ve Bossoutrot (1985), değişik in vitro ortamlarının şeker pancarında (Beta vulgaris L.) ovül gelişimine olan etkisi gözlemlenmiştir. 2 mg/l oksin ve 80 g/l sakaroz ile hazırlanmış ortamda en yüksek haploid bitki oranını (% 4.4) olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar haploid bitki oranının, 4 mg/l 2.4 D, 60 g/l sakkaroz ile hazırlanmış ortamda ise haploid bitki oranının % 0.2'ye kadar düştüğünü belirtmişlerdir.

Sauton (1987), ticari bir F1 kavun çeşidini in vitro koşulları altında serada yetiştirerek kendileme yapmıştır. Araştırmacı, ovaryumları döllenmeden 5 gün sonra alıp, % 10 luk hipo ile birkaç damla Tween 20 damlatılmış solüsyonla 10 dakika boyunca yüzey sterilizasyonu yapılmış ve saf su üç kez yıkandıktan sonra içerisinde önceden nemlendirilmiş filtre kağıtları bulunan petrilere steril koşullarda aktarılmıştır. Plesanta dokuları çıkartılmış olan ovuller 20 g/l sakkaroz ve 10 g/l agar ile hazırlanmış olan MS ortamına alındıktan 3-4 hafta sonra çimlenmeye başladığı ve 4 hafta sonra da bitkiler toprağa dikilecek duruma geldiği gözlemlenmiştir. Bu çalışma sonucunda *Cucumis* familyası içerisindeki türler arası melezlemelerde bu yöntemlerin kullanılabileceği belirtilmiştir.

Gelebart ve San (1987), ayçiçeğinde gynogenesis kültürü üzerinde yapmış oldukları araştırmalarda, 8 genotip kullanılmış ve bu genotiplerin bazıları erkek kısır olduğu

beyan edilmiştir. Araştırmacılar, ilk olarak ışıksız ortamda in vitro kültüre aldıkları ve daha sonra rejenerasyon oluşturması için ışıklı ortama alınan ovaryumlardan yaklaşık olarak % 0.5 oranında bitki üretilmiştir. Üretilen 37 tane bitkiden 20 sinin haploid, 8 tanesinin diploid, 9'unun da mixoploid (2n+n) olduğu belirtilmiştir.

Shail ve Robinson (1987), yaptıkları bir çalışmada *Cucucurbita pepo* cv. Black Jack, ile C. Ecuadorensis in döllenmesinden 24 ile 72 saat sonra alınan ovüllerin besin ortamına alındıktan sonra kallus ve kök oluşumu gözlemlenmiş ancak bitki oluşumu gözlemlenmemiştir. Aynı zamanda olgun meyvelerin embriyoları kültüre alınmasıyla, türler arası melezlemelerden hibrit bitkiler elde edilmiştir. Kwack ve Fujieda (1988), *Cucurbitaceae moschata* da tozlanmamış ovüllerden somatik embriyolar elde edilmiş ve bunu üzerine ortam pH'sı ve agar konsantrasyonunun etkilerini araştırmışlardır. Bu nedenle, antesisten 1 gün önce çiçek tomurcukları toplanılarak 2 gün boyunca 5 ^{o}C de ön sıcaklık uygulaması yapıldıktan sonra döllenmemiş ovaryumlardan çıkarılan ovuller 60 g/l sakkaroz+8 g/l agar ile hazrlanmış MS ortamının pH sı 5.8 e ayarlanmış ve ovuller kültüre alınmıştır. Bu araştırma sonucunda, kültür ortamına alınan döllenmemiş ovullerde kallus poliferasyonu ve aynı zamanda embriyo genesis görüldüğü bildirilmiştir.

Zhang ve Lespinasse (1988), elma (*malus x domestica Borkh.*) ovüllerini in vitro kültüre alarak embriyogenesis ile ilgili çalışmışlar yapmışlardır. Araştırmada Erovan, Lodi ve R1 49 genotiplerine ait çekirdekli olduğu balon aşamasında toplanmıştır. Tomurcuklardan alınan ovaryumlar, plasenta ile birlikte ovüller kullanulmıştır. Bu ovüller 12 farklı kombinasyonda hormon ve sakkaroz ile hazırlanmış MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. Her 3 genotipte besin ortamına göre % 0-32 arasında değişen oranlarda kallus oluşturmuş, MS mikro ve 1/2 MS makro tuzlar + NN vitaminler (Nitsch- Nitsch, 1969) mg/l 2-4D mg/l BA içeren % 10 sakkaroz hormonlarından hazırlanan kültür ortamına alınmıştır. R1 49 ovaryumlarından 2 tane embriyo benzeri yapılar üretilmiştir. Fakat elde edilen bu embriyoidler bitkiye dönüştürülememiştir.

Yang ve ark. (1988), ayçiçeği değişik genotiplerin in vitro kültüre tepkilerini incelemek amacıyla deneme kurulmuş ve denemede kullandıkları 12 çeşidi gynogenesise yanıt verenler, tepkisiz fakat somatik kallus oluşturanlar ve her ikisinede yanıt vermeyenler olmak üzere üç gruba ayırmışlardır. Ayrıca, in vitro kültüre alınan

ovüllerin ışıksız ortamda tutulmasının gynogenesisi uyardığı, bununla birlikte somatik kallus oluşumunu engellediğini bildirmişlerdir.

He ve Yang (1988), in vitro kültüre alınmış olan çeltik ovüllerinin ışıksız ortamda tutulmasının, ışıklı ortamlara göre daha iyi sonuç aldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, embriyolojik gözlemler sonucu, 12 saat boyunca ışıklı ortamda tutulmasının (800 Lux aydınlatma) gynogenik proembriyoların önemli dejenerasyonuna sebep olduğunu, bir aylık zaman diliminde bu embriyoların tümünün abort hale geldiğini bildirmişlerdir. *Beta vulgaris* de tozlanmamış ovülleri 2.85 µm IAA, 0.88 µm BAP ve 2.8 µm kinetinden oluşan N6 ortamında in vitro kültüre alınmıştır. En yüksek sonucu 2.8 µm kinetinden oluşan N6 kültür ortamından elde etmişlerdir. Araştırmada farklı büyüme hormonlarının oranı, etkinliği ve niteliği, in vitro kültüre alınan ovüllerin gelişmesi için uygun ortam sıcaklığı, genotiplerin ve mevsimlerin etkisi gibi faktörlerin üzerinde ayrı ayrı çalışılmıştır. Araştırmalar, in vitro kültüre alınmış olan ovüllerin embriyo gelişimi için yaz dönemi boyunca haziran ayı, kültüre alınmış olan ovüller içinde 27 ^{o}C nin 24 ^{o}C ye göre daha uygun olduğu bildirilmiştir. Genotipin etkisi sadece belli bir ortam için önemli olduğu bildirilmiştir.

Gussakovskaya ve Najar (1990), buğdayda 8 çeşitte tozlanmamış ovaryum kültürü yaparak in vitro kültüründe embriyo kesesi gelişimini incelemişlerdir. Morfolojik analiz sonucunda, ovul gelişimi tamamlanmadan kültüre alınan ovullerde in vivo embriyo kesesi oluşumu gibi normal embriyo kesesi oluşturdukları bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, sadece tozlanmadan önce çiçeklerin tüm olarak, ilk başta hormon free ortamına ve ışıksız ortama kültüre alıp daha sonra 0.5 mg/l IAA, 0.25mg/l NAA, 1.2 mg/l Kinetin ve %3 sakkaroz hormon oranlarından oluşan MS ortamına aktarılarak %2-3 oranında haploid bitkicikler ürettikleri bildirilmiştir.

Katoh ve Iwai (1990), tütünde döllenmemiş ovüllerin direk sakkaroz bulunduran besi ortamlarında kültüre alındığında kallus oluşmadığı gözlemlenmiş ve kallus oluşumunu elde etmek için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu nedenle anthesisten önce alınmış olan çiçek tomurcuklarından çıkarılan ovüller, kallus oluşumunu elde etmek amacıyla plasental doku ile birlikte saf su içinde 35 ^{o}C de 3 gün süre ile in vitro kültüre (ilk kültür) alınmıştır. Daha sonra 2 mg/l Kinetin, 0.5 mg/l MCPA, % 5 sakkaroz ve % 2 gellan gum içeren katı SK in vitro ortamlarına aktarılan ovüllerden yaklaşık olarak 6 hafta sonra kallus elde edilmiştir. Elde edilen bu kalluslar sürgün oluşturma ortamına aktarıldıktan sonra bitkiciklerde gelişme gözlemlenmiştir. Sitolojik incelemeler

sonucunda üretilen 16 bitkiden 2'sinin haploid, diğer bitkilerinin diploid olduğu bildirilmiştir.

Keller (1990a), *Allium* cinsine giren soğan (*Allium cepa* L. var. Stuttgarter Riesen, Carmen, Kartalski, Copra ile diğer bazı hatlar), pırasa (*A. porrum L.*), şalot (*A. phoenoprasum*) ile *A. altaicum* ve *A. fistulosum* gibi bazı türlerde ovül, ovaryum ve çiçek tomurcuğu in vitro kültürleri ile başarılı haploidi çalışmaları yapmıştır. Soğan türünde kültüre alınmış olan ovüllerden, genotiplere göre % arasında değişen oranlarda direkt olarak embriyo gelişimi ile bitkicikler elde edilmişitr. Araştırmacı ovaryum kültürlerinde sadece kallus gelişimi gözlemlendiğini bildirmiştir. Diğer *Allium* türlerinde ise yalnızca kallus gelişimi gözlemlenmiş bitki üretimi olmamıştır. Soğan türünde üretilen bitkilerin tamamının haploid kromozomlu olduğu ve morfolojik olarak da diploidlerden daha küçük olduğu saptanmıştır.

Keller (1990b), *Allium cepa* L. androgenesise tepki vermeyen bir türdür. Döllenmemiş ovaryumların in vitro kültüre alınarak haploid bitki üretiminde başırılı sonuçlar elde edilmiştir. Araştırmacı, genotiplerle yapmış olduğu çalışmada elde ettiği 457 rejenerantın 164 ünde ploidi durumunu incelemiş ve % 62.2 sinin haploid, % 31.7 sinin diploid ve % 6.1 ininde mixoploid olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada doku kültüründeki gelişimin erken döneminde büyük çekirdek oluşumu, kallus oluşumu ve vitrifikasyon görülmüş, düşük düzeydeki bu oluşumlarla birlikte dejenerasyonun olduğu bildirilmiştir.

Seman ve Fargo (1990), şeker pancarında haploid bitki üretmek amacıyla ovül in vitro kültürü yapmışlardır. Araştırmacılar, antesisten önce çiçek tomurcukları alınarak aseptik uygulaması yapılan ovüller in vitro kültüre alarak 1-2 ay içerisinde ovüllerden yaklaşık olarak %2 kallus, şekilsiz oluşumlar ve embriyolar elde ettiğini bildirmişlerdir. Bu yapıların rejenerasyonundan genotiplere bağlı olarak %0-9,7 arasında değişen oranlarda (ortalama %1,3 oranında) haploidler üretilmiştir. Bu araştırma yönteminin başarılı olmasında donör bitkinin genotipi ve kullanılan kültür ortamının yapısının çok etkili olduğu, donör bitkinin büyüme şartlarının, ovülün gelişme evresinin ve ovüller çıkarılmadan önce tomurcuklara uygulanan 4^{o}C'lik ön sıcaklık uygulamasının etkisi oldukça az ya da hiç etkilemediği belirlenmiştir. Aynı in vitro kültüründeki somatik dokulardan elde edilen kalluslardan rejenerasyon olmazken, ovüllerden üretilen kalluslardan bitkilerin oluştuğu gözlemlenmiştir.

De Wit ve ark. (1990), gerbera'da in vitro kültürü ile haploid bitki yetiştirmek için çlışmalar yürütülmüştür. 3 farklı protokole göre alınan 15 çeşide ait ovuller yaklaşık olarak %0- 5 arasında değişen oranda ve bütün çeşitlerde bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. Bu çalışmada rejenerasyonu mevsimin ve genotipin etkisi olduğu bildirilmiştir. Araştırıcılar, kendileme yoluyla tozlanmış hatların üretilmesinin mümkün olmadığı gerbera'da saf hatların üretimi için tek yolun haploidi tekniği olduğunu bildirmişlerdir.

Honkanen ve ark. (1991), gerbera'da yaptıkları çalışmada 15 adet hattın, çiçek açımının iki farklı evresinde toplanan çiçeklerin ovaryumları kullanılmış, bunların içinden ovüller izole edilerek 3 farklı işleme göre in vitro kültüre alınmıştır. Araştırmacılar, kullanılan tüm hatlardan bitki üretilmesine rağmen genotiplerin farklı kültürel işlemlere tepkilerinin farklı olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada çiçek gelişimi için ışıklanma şartlarının en uygun olduğu Haziran ve Eylül döneminde olduğu, ancak çiçeklenme evresinin önemli olmadığı bildirilmiştir.

Araştırmacıların, ürettikleri bitkilerin % 90'ının haploid, % 10'unun diploid olduğunu, ana bitkiden farklı morfolojik özellikte olup farklı renk ve şeklillere sahip ve yaprak yapısı değişik, daha küçük çiçeklerden oluştuğu saptanmıştır. Özzambak (1992) pırasada ovulde in vitro kültürü yaparak farklı besin ortamları (MS, Gamborg, Nitsch) ve iki farklı sakkaroz (% 6 ve % 12) stokinin (4 ve 8 mg/l 2IP) değerinin Carino ve Farinto çeşitlerinde haploid uyartımına etkilerini incelemiştir. Döllenme olmadan 3-5 gün önce çiçekler toplanarak steril ortamda ovaryumları çıkarılarak hazırlanmış kültür ortamına alınmıştır. Çalışmada en iyi gelişme gösteren çeşit Carino çeşididir. Araştırmacı, ovaryumlardan üretilen bitkiciklerin, ovüllerden üretilmediği, ovaryum duvarından ya da plasenta dokusundan kaynaklandığını ve bitkilerin diploid olduğu saptanmıştır. Ancak en iyi ovaryum gelişimi % 6 sakkaroz ve 4-8 mg/l 2 IP eklenmiş olan MS ortamında olduğu bildirilmiştir.

Bal ve Abak (2003), 6 farklı domates çeşidinde ovaryum kültürü yapmışlardır. Tek çekirdekli mikrosporlara sahip çiçek tomurcukları toplanıp, 0.3 M oranında mannitol olan NLN ortamında 1 hafta süreyle ön işlem yapıldıktan sonra ½ MS ortamına farklı hormonlar ve bazı kimyasallar kullanılarak biribirinden 4 farklı ortam hazırlanmış ve ovaryumlar kültüre alınmıştır. Daha sonra ovaryumlar hazırlanmış olan 2 faklı MS ortamında alt kültüre alınmıştır. Alt kültür boyunca ovaryum duvarlarında renk değişimi olup kahveleştiği halde yapılan mikroskopik incelemelerde ovuller içerisinde hem ölü

embriyo kesesi hücreleri hemde, canlı hücre yığınları olan globular yapıların olduğu saptanmıştır.

2.2. Kabak Sarı Mozaik Virüsü (Zucchini Yellow Mosaic Virüs veya ZYMV) İle İlgili Çalışmalar

Yapılan son araştırmalara göre, ülkemizde kültürü yapılan bitki çeşitlerinde ekonomik olarak zarara neden olduğu belirlenmiş 528 farklı hastalık etmeninin olduğu bildirilmiştir. Genel kapsamda bu hastalıklarla gerekli mücadele sağlanamadığı takdirde, ürün kayıpları ortalama % 35-40 seviyelerinde olmaktadır. Bu oran ilgili hastalık etmeninin çeşidine ve yoğunluğuna bağlı olmakla birlikte % 100 lere kadar çıkabilmektedir. Bitkisel üretimde ekonomik açıdan oldukça önemli değerlere ulaşan bu kayıpların engellemek için bitki koruma çalışmalarına önem vermek gerekmektedir. Kültür bitkilerinde yüksek oranda verim kaybına neden olan biyotikstres etmenleri bakteri, fungus, virüs ya da parazitik bitki kaynaklı olabilmektedir. Bu hastalık etmenleri içerisinde bitki virüs hastalıkları, özellikle diğer hastalık etmenlerinden farklı olarak kimyasal mücadelesi olmaması nedeni ile kültürü yapılan bitkilerin yetiştiriciliğini tehdit eden en önemli problemlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hastalık etmenleri, bitkilerde normal gelişme düzenini bozarak çeşitli morfolojik ve fizyolojik bozukluklara neden olarak verimde önemli düşüşlere neden olabilmektedir (Lisa ve ark., 1981, Lecoq ve Pitrat 1984, Lisa ve Lecoq 1984, Luis ve ark., 1998, Lecoq ve ark., 2002). Şu ana kadar *Cucurbitaceae* familyasına ait bitkilerde toplamda 32 adet virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni bildirilmiştir. Bu hastalık etmenlerinin içerisinde en önemlileri; Hıyar Mozayik Virüsü (Cucumber Mosaic Virus, CMV) Kabak Mozayik Virüsü (Squash Mosaic Virus, SqMV), Kabak Sarı Mozayik Virüsü (Zucchini Yellow Mosaic 24 Virus ZYMV), Kıvırcık Tepe Virüsü (Curly Top Virus, CTV), Hıyar Yeşil Benek Mozaik Virüsü (Cucumber Green Mottle Mosaic Virus, CGMMV), Papaya Halkalı Nokta Virüsü (Papaya Ring Spot Virus, PRSV), Karpuz Mozayik Virüsü II (Watermelon Mosaic Virus II, WMV II) gösterilebilir (Lisa ve Lecoq, 1984; Purcifull ve ark., 1984; Gilbert ve Albertini, 1995). Bu hastalık etmenlerinden özellikle Kabak Sarı Mozayik Virüsü (ZYMV), *Cucurbitaceae* familyası yetiştiriciliğini tehdit eden, bitkilerde yaprak ve meyvelerde önemli deformasyonlara yol açarak ekonomik olarak büyük ürün kayıplarına sebep olan en önemli virüslerden bir tanesi olarak bilinmektedir (Lovisolo, 1980; Lecoq, 1991). Bu virüsler özellikle Aphis citricola Patch, A. gossypii

Glover, Macrosiphum euphorbiae (Thomas), ve *Myzus persicae* (Sulzer) gibi yaprak bitleri ile non-persistent olarak taşınır (Yuan ve Ullman 1996). Kabak Sarı Mozayik virüsü dünyada ilk olarak 1973 yılında İtalya'da saptanmış ve tanımlanmıştır (Lisa ve ark., 1981). Bu tanımlamanın ardından dünyanın değişik bölgelerinde bu hastalık etmeni tanımlanarak raporlanmıştır (Lisa ve Lecoq 1984, Davis 1986, Desbiez ve Lecoq 1997). Genel kapsamda bakıldığında bu hastalık etmeni, 5 farklı kıtada 22 farklı ülkede yayılım gösterdiği ve büyük zararlar verdiği bilinmektedir (Providenti 1984). Ülkemizde ise, 1984 yılında ilk olarak Yılmaz ve Davis tarafından tanımlanmış olup literatüre aktarılmıştır (Yılmaz ve Davis 1984). Kabak Sarı Mozayik virüsü potyvirüsler familyası üyesi olup yaklaşık 750 nm boyutunda, kıvrımlı ipliksi viron yapıya sahiptir. Genetik yapısına bakıldığında, yaklaşık 9600 nükleotitten oluşan tek zincirli RNA ihtiva etmektedir. ZYMV virüsü *cucurbitaceae* familyası üyelerinde özellikle yaprak laminasında çeşitli nekrozlar, bitkide bodurluk, yapraklarda kloroz, deformasyon, mozayik yapılar, genç sürgünlerde iplikleşmeye ve çiçek azalması gibi çeşitli fizyolojik ve morfolojik simptomlara neden olmaktadır (Lecoq ve Pitrat, 1984; Providenti, 1984; Blua ve Perring, 1992). Meyve ve yapraklarda şiddetli deformasyon şeklinde simptomlara neden olan bu virüs hastalığından dolayı % 80'lere varan verim kayıpları gözlemlenmiştir (Simmons ve ark., 2008).

Tesci ve ark. (1995), kabakta hıyar mozayik virüsü inokulasyonunun kotiledonlarda nişasta içeren klorotik lezyonların oluşuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Farklı metabolik yollarda enzimlerin maksimum katalitik aktivitelerindeki değişiklikler infeksiyon süresince ölçülmüştür. İnfeksiyon oksidatif pentozfosfat yolları, glikolisis, trikarboksilik asit döngüsü, anaplerotik reaksiyonlar ve oksidatif elektron transportu kapasiteleri üzerine büyük stimulator etkiye sahip olmuş, fotosentez oranı üzerinde büyük değişiklikler olmamıştır.

Vega ve ark. (1995), ZYMV ile ilgili yapmış oldukları mekanik inokulasyon çalışmalarında 29 bitki türü kullanmışlardır. Bunlar içerisinde sistemik belirtiler sadece 4 kabakgil türünde (*Citrullus lanatus, Cucumis melo, C. sativus, Cucurbita pepo* cv. *Caserta*) görülmüş, lokal lezyonlar ise 3 tür indikatör bitkide (*Chenopodium amaranticolor, C. quinoa* ve *Gomprena globosa*) belirlenmiştir. Vektörle taşıma denemelerinde kullanılan 5 yaprak biti türü (*Dactynotus sp., Geopemphigus flocculosus, Macrosiphum euphorbiae, Myzus persica ve Toxoptera citricidus*) virüsü non-persistent bir şekilde taşımışlardır. Tarladan alınan örneklerde ELISA ve ISEM çalışmalarında

ZYMV ve PRSV-W antiserumlarıyla pozitif sonuç alınmıştır. Mekanik olarak inokule edilen ve lokal lezyon gösteren *C. quinoa*'dan ZYMV izole edilmiştir. ZYMV ile enfekteli bitkilerden alınan ultrathin kesitlerde EM'de mezofil hücrelerinde silindirik hücre içi cisimcikler belirlemişlerdir. Araştırıcılar ISEM'de dekorasyon yapılan örneklerde virüs partikülerinin ZYMV antibadiler ile dengesiz kaplandığı belirlemişlerdir.

Vargün ve Ertunç (1995), kabak (*Cucurbita pepo*) bitkisinde viral infeksiyonlara neden olan CMV ve ZYMV'nün birlikte ve ayrı ayrı infeksiyonları sonucunda enfekteli bitki boyu, çiçek ve yaprak sayısı, orta ve genç yaprak alanında farklılıkların ortaya çıktığı bildirilmiştir.

ZYMV ismini kabaktan almış olmasına rağmen diğer cucurbitlerde de zarar yapabilmektedir.

Brown ve Myers (1999), kabaklarda (Cucurbita spp.) bulk segragant analizini (BSA) ve RAPD işaretleyicilerini kullanarak yakın işaretleyiciler bulmaya çalışmışlardır. Kullanılan geriye melez populasyonda dominant olarak kontrol edilen 5 dayanıklılıkla ilgili işaretleyiciler bulmuşlardır. Daha sonra elde edilen bu işaretleyiclerin kullanılmasıyla diğer hassas ve dayanıklı olarak bilinen genotipler bu işaretleyicilerle taranmıştır. Ancak hıyarda bu hastalığa dayanıklılık resesif nitelikte bir gen tarafından kontrol edilmektedir. Bu demektir ki, aynı hastalığa karşı farklı kabakgil sebzeleri farklı dayanıklılık mekanizmaları geliştirmiştir.

İlk kez İtalya'dan rapor edilen ZYMV nin dünyanın bir çok ülkesinde (Avusturalya, Fransa, Mısır, Almanya, İsrail, Japonya, Ürdün, İspanya, Fas ve Türkiye) yaygın olduğu ve zarar verdiği rapor edilmektedir (Büchen-Osmond and Purcifull,1987; Brunt ve ark., 1996). Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) İtalya ve Fransa'da muskmelon yellow stunt virus (Lecoq ve ark., 1981) olarak da bilinmektedir. İlk olarak İtalya'da *Cucurbita pepo* (yazlık kabak) üzerinde rapor edilmiştir (Lisa ve ark., (1981). ZYMV Yazım alanları gerektiği kadar uzatılabilir mekanik inokulasyonla ve aşağıdaki vektörlerle non-persistent olarak taşınmaktadır; *Aphis citricola* (Purcifull ve ark.,1984), *Aphis gossypii*; *Myzus persicae* (Lecoq ve ark., 1981; Lisa ve ark., 1981) ve *Aphis middletonii, Aphis craccivora, Acrythosiphon pisum, Lipaphis erysimi, Uroleucon* sp. (Adlerz, 1987).

Ülkemizde farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda *cucurbitaceae* üretiminin yapıldığı alanlarda kabak sarı mozayik virüsünün oldukça yoğun bulunduğu ve ciddi zararlar meydana getirdiği saptanmıştır (Özalp, 1964; Yılmaz ve Davis, 1985; Ertunç, 1992;

Vargün ve Ertunç, 1994; Uçar ve Ertunç, 1998). Kabak üretiminin en fazla yapıldığı alanlarda 1992 senesinde yapılan sürvey çalışmasında son zamanlarda en yaygın virüsün Zuccini Yellow Mozaic Virüsü olduğu saptanmıştır. Yaygın olduğu alanlarda türlerde oldukça büyük zararlara neden olduğu bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 1992). **Yılmaz ve ark. (1995),** GAP Bölgesinde *cucurbitaceae* familyasına ait bitkilerde ZYMV'nin büyük problem olduğunu bildirmişlerdir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi Adıyaman ilinde örtü altı yetiştiriciliğinde, hıyarlarda ZYMV oranı % 26.92 olarak tespit edilmiştir (Güldür, 2001). Sinonimi Muskmelon Yellow Stunt Virus olan ZYMV yaprak biti kökenli bir etmen olup patates Y virüsü grubundandır. Yaprak bitiyle taşınması nedeniyle kabakgil sebzelerinin yetiştirildiği her yerde yaygın olarak görülmektedir. Hastalıklı bitkilerde yaprak ve meyvelerde deformasyon ve şiddetli mozaik belirtileri, bodurlaşma görülmekte, elde edilen ürünün niteliği ve niceliği azalmaktadır. Doğal koşullarda meydana gelen infeksiyondan yaklaşık 1-2 hafta sonra bitkilerde pazarlanamaz, deforme olmuş meyve oluşumu nedeniyle ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır (Brunt ve ark., 1996). Literatür bilgilerinden anlaşıldığı kadarıyla ZYMV'ye dayanıklık mekanizması kalitatif nitelikte ve tek gen tarafından kontrol edildiğinden dolayı çalışması en kolay olanlarından birisidir. Bu virüse dayanıklılıkla ilgili erken seleksiyona izin verecek primerler geliştirildiği belirtilmiştir (Park ve ark., 2004). Bu araştırıcılar ZYMV lokusuna 5 cM'dan fazla mesafede yapışma bölgesine SCAR primerleri geliştirmişlerdir.

Amano ve ark. (2013), tarafından yayınlanan bir çalışmada ZYMV açısından hastalığa dayanıklı ve hassas bireyleri ayırt etmede kullanmak üzere bir CAP markırı (dCAPS - G99A) rapor edilmiştir. Bu çalışmada söz konusu markör kullanılarak ZYMV dayanım belirlenmeye çalışılmıştır.

Hıyar bitkisinde, ZYMV'ye karşı dayanıklılık genlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda; ZYMV'ye dayanıklılığın tek bir çekinik allel tarafından kontrol edildiğini ortaya konulmuştur (Providenti 1987, Abul-Hayja ve Al-Shahwan 1991, Kabelka ve ark. 1997). Bu kapsamda, Hıyar' da ZYMV'ye dayanıklı F1 çeşitlerini elde etmek amacıyla yapılacak olan ıslah çalışmalarında ebeveynlerin her ikiside çekinik alleller açısından homozigot olmak zorundadır (Providenti 1987). ZYMVye karşı dayanıklılık mekanizması hıyarda ve kavunda çalışılmıştır (Park ve ark. 2004). Ancak iki türde farklı dayanıklılık mekanizmaları belirlenmiştir. SSR moleküler markırlarının kullanılmasıyla

elde edilen haritada bu virüse dayanıklılıkla ilgili lokuslar farklılık göstermiştir. Bu nedenle, kavun için geliştirilen moleküler işaretleyicilerin hıyarda kullanılması mümkün olmadığını göstermektedir. Dolayısıyla hıyar için özel genetik haritalar ve moleküler markırların geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir (Cho ve ark. 1998, Stepansky ve 1999, Decker-Walters ve ark. 2001, Mliki ve ark. 2003).

3. BÖLÜM
MATERYAL VE METOD

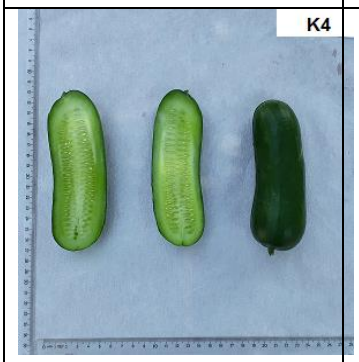
3.1. Materyal

Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Laboratuarı bünyesinde yürütülen bu çalışmada materyal olarak farklı 23 adet hıyar genotipi kullanılmıştır. Söz konusu genotipler F1 kademesindedir. Çalışmada kullanılan genotipler Çizelge 3.1.1'de ve genotiplere ait resimler Şekil 3.1.1'de verilmiştir.

Çizelge: 3.1.1. Çalışmada kullanılan genotipler

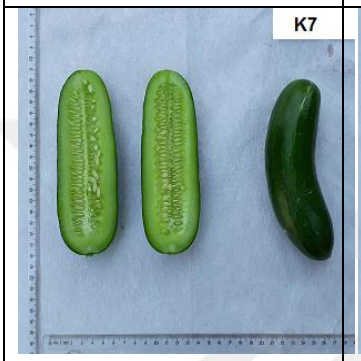
S.N.	Genotip N.	S.N.	Genotip N.	S.N.	Genotip N.	S.N.	Genotip N.	S.N.	Genotip N.
1	K1	6	K6	11	K11	16	K16	21	TicariF1Z
2	K2	7	K7	12	K12	17	K17	22	TicariF1L
3	K3	8	K8	13	K13	18	K18	23	TicariF1E
4	K4	9	K9	14	K14	19	K19		
5	K5	10	K10	15	K15	20	TicariF1S		




K4


K5


K6


K7


K8


K9


K-10


K11


K12


K13


K14


K15



Şekil 3.1.1. Çalışmada kullanılan farklı hıyar genotiplerine ait meyve resimleri

3.2. Metod

3.2.1 Bitkilerin yetiştirilmesi

Hıyar genotiplerine ait tohumlar 3:1 torf-perlit ortamına ekilmiş tohumlar viyollerde yetiştirilmiştir. 2 gerçek yaprak aşamasına gelen fideler 50 cm aralıklarla tek sıra halinde seraya şaşırtılması yapılmıştır ve sulamada damla sulama sisteminden yararlanılmıştır şekil (3.2.1.c). Bitki gelişimi için mutlak olan ilaçlama ve gübreleme işlemleri uygulanmıştır. Bitkiler ipe alınmış ve budaması yapılarak tek gövdeli olarak yetiştirilmiştir. Şekil (3.2.1.d)



Şekil (3.2.1.a) Kotiledon aşamasındaki bitkiler



Şekil (3.2.1.b) Gerçek yaprak aşamasındaki fideler





Şekil (3.2.1.c) Fidelerin seraya şaşırtılması



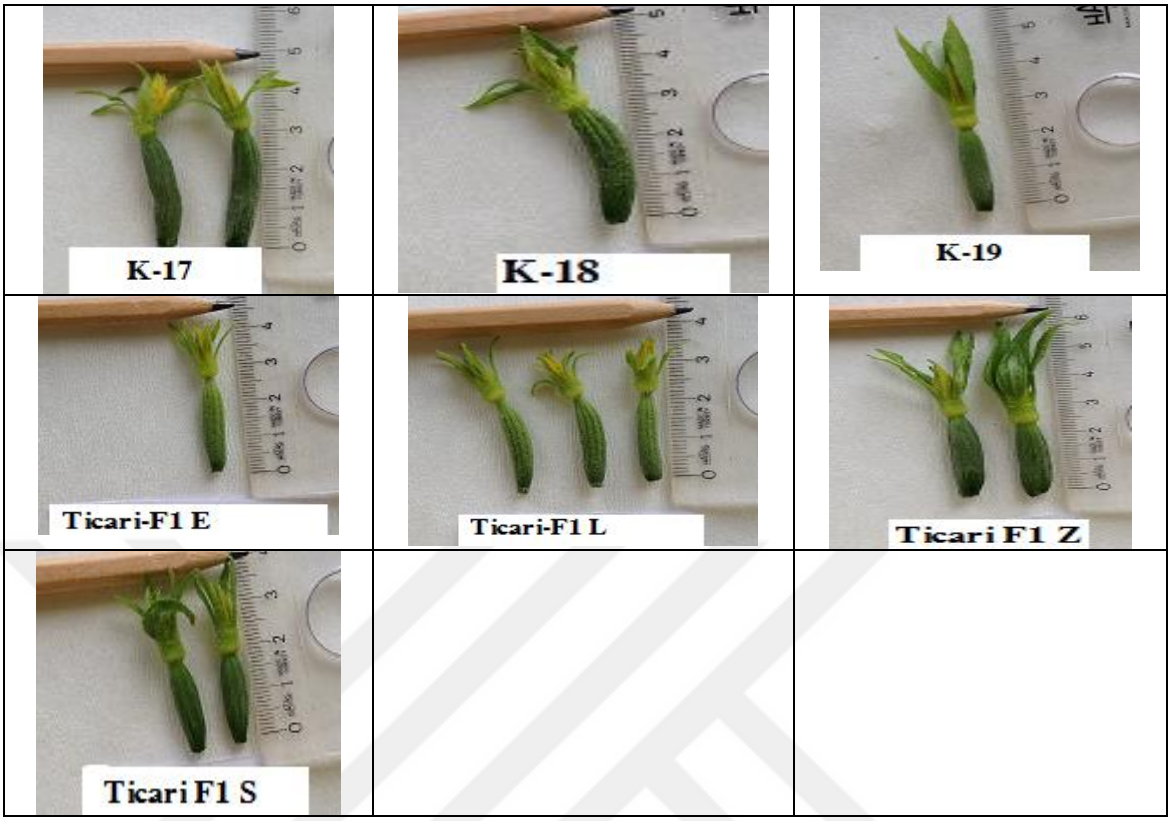


Şekil (3.2.1.d) Bitkilerin askıya alınması ve tek gövdeli olarak yetiştirilmesi

3.2.2. Ovul Kültürü çalışmaları

İlk dişi çiçeklerin görülmesinden 2-3 hafta sonra ve antesisten 1 gün, 2 gün ve 3 gün önce dişi çiçekler koparılıp +8 C olan buz kutularına konularak Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Laboratuvarına kısa sürede ulaştırılmıştır(Şekil 3.2.2.1)





Şekil (3.2.2.1) Farklı hıyar genotiplerine ait ovaryum kültürü resimleri

Ovaryum kültürü Gemes ve ark. (2002) ve Diao ve ark. (2009) tarafından kullanılan yöntemlere göre gerekli motifeler yapıldıktan sonra yapılmıştır. Dişi çiçek tomurcukları, birkaç damla Tween-20 eklenmiş % 20'lik ticari hipo çözeltisi içerisinde 15 dakika süreyle steril edilmiş, daha sonra üç defa beşer dakika süreyle steril saf su ile yıkanmıştır. Ardından ovaryumlar 1mm kalınlığında bistüri yardımıyla kesilmiş ve ortama konulmuştur. Her genotipten 30 petri konulmuştur. Her petriye ise 5 adet ovaryum konulmuştur. Ortam olarak 6 farklı protokol kullanılmıştır. İlk denemede 3 protokol; sırasıyla; Protokol 1 (Tantasawat ve ark. (2015), Protokol 2 (Diao ve ark. 2009) ve Protokol 3 (Golabadi ve ark. 2017) olarak uygulanmıştır. Ardından gözlemler dikkate alınarak mevcut protokoller diğer araştırmalarda dikkate alınarak modifiye edilmiş ve 3 yeni protokolle 2. deneme kurulmuştur. 2 denemede kullanılan protokollerin gözlemine dayanarak en iyi sonuç veren iki besi ortamı seçilmiştir ve gerekli modifiyeler yapıldıktan sonra üçüncü deneme kurulmuştur (Çizelge 3.2.1). Hazır MS besi ortamı içerisine katılaştırıcı olarak 6 g/l agar tüm ortamlarda standart şekilde

kullanılmıştır. Besi ortamının pH'sı 5.7 olacak şekilde 1 N'lik HCl ve 1 N'lik KOH ile ayarlanmıştır. Ortamlar 121^{o}C'de, 1.2 atm basınç altında, 120 dk süreyle steril edilmiştir. Oda sıcaklığında yaklaşık 50-60^{o}C'ye kadar soğutulan ortamlar, aseptik koşullar altında, steril plastik petri kaplarına yaklaşık 10 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Birinci protokole göre; temel MS ortamına 1 mg/l TDZ, 1 mg/l BA eklenip 25^{o}C inkübator koşullarında 14 gün süreyle karanlıkta bekletilmiştir (Tantasawat ve ark., 2015). Ardından 11 gün boyunca 25^{o}C±2 sıcaklık ve 16/8 saatlik fotoperiyodik düzende inkübe edilmiştir. 25.gün sonunda ovüllerde embriyo çıkışı ve kallus oluşumu gözlemlenmiş ve alt kültüre alınmıştır. MS ortamına 20 mg askorbik asit, 100 mg prolin, 3 mg BA, 2 mg NAA eklenilmiştir.

İkinci protokole göre ise MS ortamına 0.04 mg/l TDZ eklenip 35^{o}C inkübator koşullarında 3 gün süreyle sıcaklık şoku uygulanmıştır (Diao ve ark., (2009). 3.günden sonra 25^{o}C±2 sıcaklık ve 16/8 saatlik fotoperiyodik düzende inkübe edilmştir. 30. günde ovüllerde embriyo çıkışı gözlemlenmiş ve alt kültüre alınmıştır. Alt kültür olarak MS ortamına 0,3 mg/l BAP eklenmiştir.

Üçüncü protokole göre MS ortamına 1.8 mg/l BAP, 1 mg/l Kinetin, 0.7 mg/l 2.4D, eklenip 25^{o} C±2 sıcaklık ve 16/8 saatlik fotoperiyodik düzende inkübe edilmiştir.

30. günde alt kültüre alınmıştır. Alt kültür MS ortamına 0,6 mg/l BAP eklenip 25^{o}C±2 sıcaklık ve 16/8 saatlik fotoperiyodik düzende inkübe edilmiştir (Golabadi ve ark., 2017).



Şekil (3.2.2.2) Örneklerin toplanması



Şekil (3.2.2.3) Dişi çiçeklerin +8 C buz kutularına konulması

3.2.3. Dişi Çiçeklerin Yüzey Sterilizasyonu

Seradan getirilen dişi çiçekler steril kabin içerisinde % 70 etilalkol çözeltisi içerisinde 1 dk bekletilip steril saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra 25 mg\l rifampisinde 5 dk bekletilmiştir. Rifampisin uygulamasından sonra steril saf su ile durulama işlemi

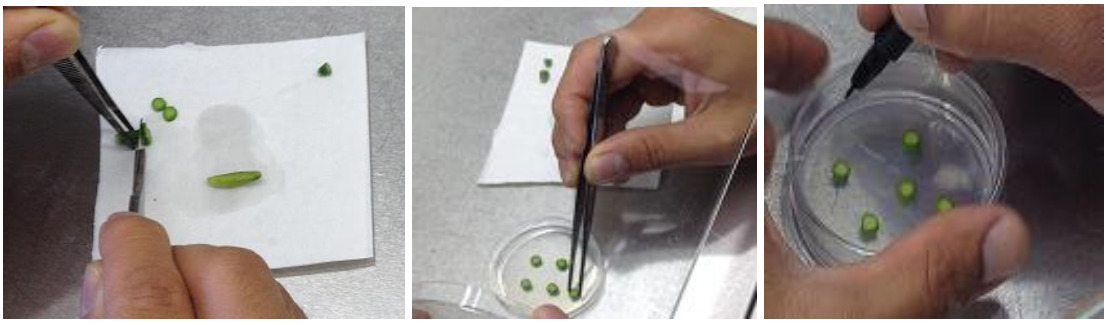
yapılmamıştır. Son olarak da % 0,1 gr HgCI'de 15 dk bekletilmiş ve steril su ile 3 kez yıkanmıştır.



Şekil (3.2.3.1) Dişi çiçeklerin yüzey sterilizasyonu

3.2.4. Ovaryumların Ortama aktarılması

Yüzey sterilizasyonun ardından ovaryumlar 1 mm kalınlığında steril bistüri ve pens yardımıyla kesilmiş ve ortama konulmuştur. Her genotipten 30 petri konulmuştur. Her petriye ise 5 adet ovaryum konulmuştur. Her bir genotipte 1 kültür kabında 5' er ovaryum olacak şekilde 30 petri tekerrürlü olarak kültüre alınmıştır. İlk kültürden 4 hafta sonra ovaryumlardan embiryolar gözlemlenmiştir. Embiryolar alt kültüre 20 mg\l AA, 100 mg\l Proline, 3 mg\l BA, 2 mg\l NAA ile desteklenen alt kültür MS ortamına aktarılmıştır. Embiryoların gelişim oranları kaydedilmiştir.



Şekil (3.2.4.1) Ovaryumların ortama aktarılması

3.2.5. Ovaryum Kültüründe Kullanılan Protokoller

Çalışmada 3 farklı zamanda 3 adet deneme kurulmuştur. 2017 yılı ilkbaharında 3 farklı protokol (Tablo 3.2.1), 2017 yılı sonbaharında ise 2. Denemede 3 farklı protokol (Tablo 3.2.1) kullanılmıştır. 3. denemede ise 1. deneme ve 2. denemede elde edilen bulgulara göre 2 farklı protokol hazırlanmış ve 2018-ilkbahar döneminde kullanılmıştır.

Çizelge.3.2.5.1 Çalışmada Kullanılan Protokoller

	1. Deneme			2. Deneme			3. Deneme	
	Protokol 1 (Tantasawat ve ark. (2015)	**Protokol 2(Diao ve ark. 2009)**	**Protokol 3(Golabadi ve ark. 2017)**	**Protokol 1**	**Protokol 2**	**Protokol 3**	**Protokol 1**	**Protokol 2**
MS	4.3 gr	4.4 gr	4.3 gr	4.3 gr	4 gr	4.3 gr	4.3 gr	4.3 gr
Şeker	30 gr	30 gr	30 gr	30 gr	30 gr	30 gr	30 gr	30 gr
TDZ	1 mg\l	-	-	-	0.04 mg\l	1 mg\l	1 mg\l	-
İBA	1 mg\l	-	-	-	-	1 mg\l	-	-
NAA	-	2 mg	0.05 mg\l	1.5 mg\l	-	-	-	0.5 mg\l
BAP	-	3 mg\l	0.2 mg\l	1.8 mg\l	-	-	1 mg\l	1 mg\l
AA	-	20 mg	-	-	-	-	-	-
2,4 D	-	-	-	0.7 mg\l	-	-	-	0.7 mg\l
Kinetin	-	-	-	1 mg\l	-	-	-	1 mg\l
Glutamin	-	-	-	-	-	-	800 mg\l	-
$AgNO_3$	-	-	-	-	-	-	-	10 mg\l
Prolin	-	100 mg	-	-	-	-	-	-
pH	5.7	5.7	5.7	5.8	5.7	5.7	5.8	5.8
Agar	4 gr	4 gr	4 gr	6 gr	8 gr	4 gr	6 gr	6 gr

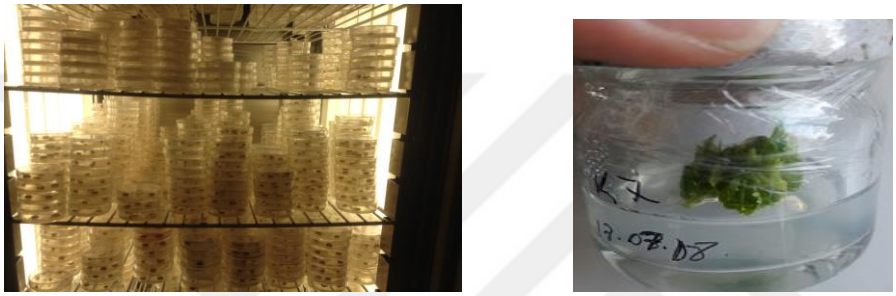
Çizelge.3.2.5.2 Sürgün oluşturma Ortamları

	Protokol 1	**Protokol 2**	**Protokol 3**	**Protokol 4**	**Protokol 5**
MS	4.4 gr	4.4 gr	4.4 gr	4.4 gr	4.4 gr
Şeker	30 gr	30 gr	30 gr	30 gr	30 gr
TDZ			0.03 mg\l		
NAA	0.05 mg\l	0.05 mg\l			
BAP	0.2 mg\l	1.5 mg\l			2 mg\l
IAA					1 mg\l
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Agar	6 gr	6 gr	6 gr	6 gr	6 gr

Elde edilen ovüller protokol 1-2-3'e alınmış ve bir ay boyunca gözlemler yapılmıştır. Gözlem sonucunda embriyolarda büyüme görülmüştür. Daha sonra ovüller protokol 4'e ve protokol 5'e alınmıştır ve bitkilerde sürgün oluşumu gözlemlenmiştir.

3.2.6. İklim kabininin ortamının şartları

İklim kabininin ışığı 35 µmol/m^2/s (yaklaşık 3200 lüx) ışık yoğunluğunda, ortam sıcaklığı 24±1 ºC olacak şekilde ayarlanmış ve fotoperiyot (zamanlayıcı yardımıyla 16/8 saat ışık/karanlık) uygulanmıştır (Şekil 3.2.6.1).



(Şekil 3.2.6.1) iklim kabinin görüntüsü ve elde edilen sürgün görüntüsü

3.2.7. ZYMV Dayanıklılık Analizi

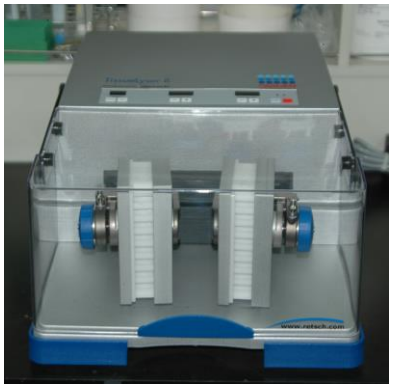
3.2.7.1. DNA İzolasyonu

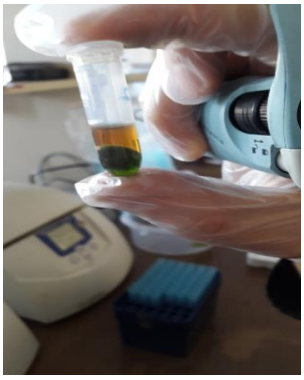
Çalışmada kullanılan 23 hıyar genotipi 2 gerçek yaprak aşamasına gelen bitkilerden DNA izolasyonu için Doyle ve Doyle (1990) tarafından bildirilen CTAB yöntemi kullanılmıştır. DNA konsantrasyonları yarı otomatik mikroplate reader (PowerWave HT, BIO-TEK Instruments, Inc., Wınooskı, VT, USA) yardımıyla belirlenmiş ve PCR çalışmaları için 10ng/µl olacak şekilde DNA konsantrasyonları hazırlanmıştır.

DNA izolasyon protokolü;

- 62^{o}C' de su banyosu önceden hazırlanmıştır.
- Taze yapraklar (0.2 gr) 0.6 ml ekstraksiyon çözeltisi (Çizelge 3.2) içerisinde ezilmiştir.
- 62 ^{o}C' de 30 - 60 dakika boyunca inkubasyon yapılır, örnekler 10 dk da bir ters-düz edilmiştir.
- 300 ul chloroform: octanol (24 : 1) çözeltisi ilave edilir ve yavaşça ters-düz yapılarak karıştırılmıştır (100 defa).

- 14000 rpm.' de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Sulu kısmı pipetle çekilerek başka steril 1,5 ml' lik bir tüpe aktarılmıştır.
- 500 ul chloroform: octanol (24:1) çözeltisi ilave edilir ve yavaşça ters-düz yapılarak karıştırılmıştır (100 defa).
- 14000 rpm.' de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 2. kez 500 ul chloroform: octanol (24:1) çözeltisi ilave edilir ve yavaşça ters-düz yapılarak karıştırılmıştır (100 defa).
- 14000 rpm.' de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Üst faz pipetle çekilerek başka steril 1,5 ml' lik bir tüpe aktarılmıştır.
- Üzerine toplam hacmin 2/3 ü kadar (550 ul) soğuk isopropanol ilave edilmiştir (beyaz çökelek halinde DNA + diğer organik bileşikler gözle görülebilir). 30 dk veya daha fazla süre ile –20 ^{o}C'de bekletilmiştir.
- 14000 devirde 2 dk santrifüj edilir ve sıvı kısmı uzaklaştırılmıştır.
- Elde edilen pelletin üzerine 500 ul yıkama çözeltisi (% 76 etanol ve 10 mM NH4Ac (amonyum asetat)) ilave edilir ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir.
- 14000 rpm' de 3 dk santrifüj yapılır ve sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.
- Beyaz çökelek tamamen kuruyuncaya kadar çeker ocakta bekletilmiştir.
- Beyaz çökelti üzerine 300 ul TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) ilave edilmiştir.
- Çökelti tamamen çözünene kadar oda sıcaklığında gece boyunca veya 65 ^{0}C' de 60 dk boyunca bekletilmiştir.
- 10 ug/ml son konsantrasyon olacak şekilde RNAse ilave edilir ve 37 ^{o}C' de 30 dk inkube edilmiştir.
- 200 ul TE ve 15 ul amonyum asetat (10 mM, pH 7,7) ilave edilir. Son olarak çözelti üzerine 2 hacim kadar soğuk etanol ilave edildikten sonra 20 dk süre ile veya gece boyunca –20 ^{o}C' de bekletilmiştir.
- 14000 rpm.' de 3 dk santrifüj yapılır ve sulu kısmı dikkatlice döktükten sonra oda koşullarında çökelti iyice kurutulmuştur.
- Uygun miktarda TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) ilave edilir (100-200ul).





Tissuelyser cihazı Su banyosu cihazı DNA İzolasyonu

Şekil (3.2.7.1) DNA izolasyonunda kullanılan cihazlar

Çizelge 3.2.7.1 : DNA Ekstraksiyon Çözeltisi

Kimyasal	**Oran**
CTAB	% 2
EDTA	20Mm
Tris-Cl	100Mm
NaCl	1.4M
Mercaptoethanol	%0.2

3.2.7.2. ZYMV Dayanıklılık Analizi

ZYMV dayanıklılık için Amona ve ark. (2013) tarafından geliştirilen CAPS (G99A) markırı ile tarama yapılmıştır.

3.2.7.3. Agaroz Jel Elektroforez

PCR'den elde edilen ürünlerin üzerine 3 µl 6X yükleme solusyonu eklenerek toplam 15 µl PCR ürünü % 1.5 agarose jelin (jel içine 0.5 mg/ml ethidium bromide eklenmiş) yükleme bölgesine yüklenip elektroforez cihazında 3 saat 110 volt derecede koşturulmuş ve UV ışınında fotoğrafları bilgisayar yardımıyla çekilmiştir. Elde edilen jel görüntüsünde dayanıklılık bandı taşıyan genotipler belirlenmiştir.

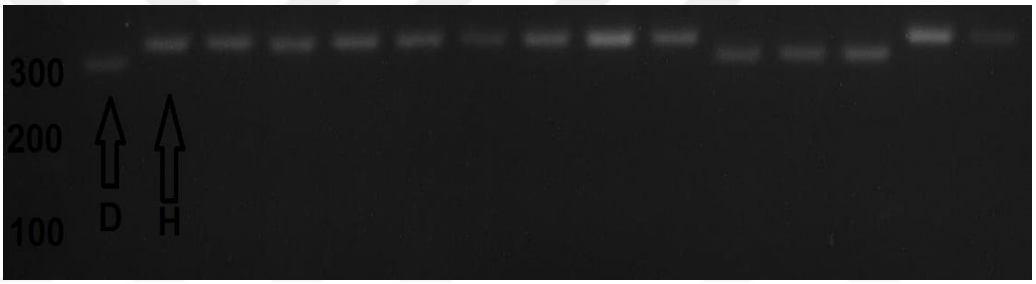


Şekil (3.2.7.3) PCR, Görüntüleme cihazı

4. BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Farklı Hıyar Genotiplerinin ZYMV Dayanımlarının Belirlenmesi

Çalışma başlangıcında 4 adet ticari F1 hıyar genotipi ile 85 adet farklı hıyar genotiplerinden DNA izolasyonu yapılmış ve ardından ZYMV dayanıklılık için Amona ve ark. (2013) tarafından geliştirilen CAPS (G99A) markırı ile tarama yapılmıştır. Tarama sonucunda Ticari F1 genotiplerin hepsi ve diğer 85 genotipten 19 adet olmak üzere 23 adet dayanıklı genotip belirlenmiştir (Çizelge 4.1.1). 313 bp bandını verenler dayanıklı olarak kabul edilirken 338 bp bandı verenler hassas olarak kabul edilmiştir.



Çizelge (4.1.1) 89 adet hıyar genotipinin ZYMV dayanımını belirlemek için CAPS (G99A) markırı ile yapılan tarama sonucu elde edilen jel görüntüsü.

4.2. Farklı protokollerin Hıyar Genotiplerinin Ovaryum Kültürüne Etkileri

Bu çalışmada farklı protokollerin farklı hıyar genotiplerinin ovaryum kültürüne etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 3 farklı dönemde(2017 İlkbahar, 2017 sonbahar ve 2018 ilkbahar) deneme kurulmuştur ve 6 farklı besin ortamı denenmiştir. Yapılan literatür araştırmalarına göre kabakgillerde embriyogenesisi teşvik ettiği belirlenen bitki büyüme düzenleyicilerden oksin olarak 2,4-D (0, 1, 3, 5 mg/l) (Metwally ve ark., 1998a,b; Yılmaz Ergin, 2005; Rakha ve ark., 2012) ve sitokinin olarak da TDZ (0, 0.01, 0.02, 0.04 mg/l)'nin (Gemes ve ark., 2002; Kumar ve ark., 2002; Yılmaz Ergin, 2005) farklı konsantrasyonları temel besi ortamı içerisine eklenmiştir.

Birinci denemede (2017 İlkbahar) 3 farklı besi ortamı denenmiştir. Ovullerde embiryo oluşumu gözlemlenmiştir ancak embiryo gelişimi gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.2.1).

İkinci denemede (2017 sonbahar) 3 farklı besi ortamı denenmiştir. Ovüllerde embiryo oluşumu gözlemlenmiş ancak embiryo gelişimi gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.2.2).

Üçüncü denemede ise birinci ve ikinci deneme gözlemlerine dayanarak en iyi sonuç veren iki besi ortamı seçilmiştir ve üçüncü deneme kurulmuştur. Üçüncü denemede ise embriyo oluşumu, gelişimi gözlemlenmiş ve bitkiler elde edilmiştir (Şekil 4.2.1)



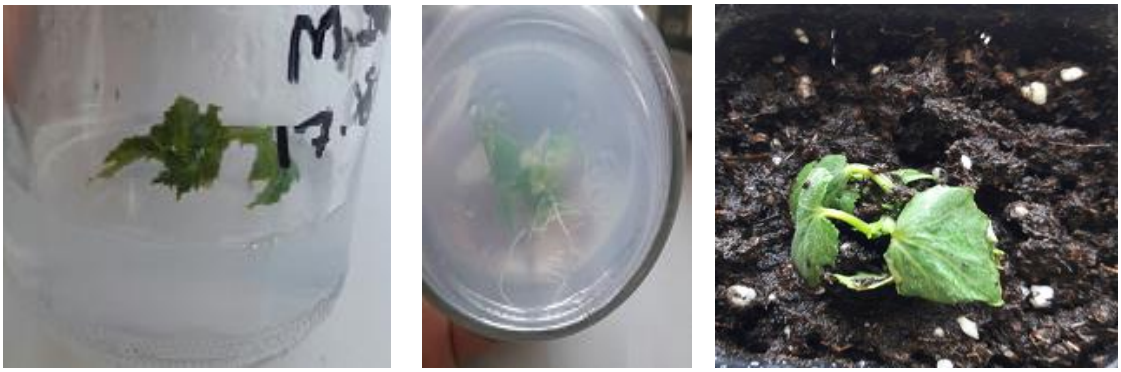
Şekil (4.2.1) Ovüllerden embriyo olşumu gözlemlenmesi

Embriyolar steril bistüri yardımıyla ovülden ayrılmıştır ve sürgün oluşturmak için hazırlanmış olan 5 farklı ortama transfer edilmiştir. Ortama aktarılan embriyolardan 28 gün sonra şekil (4.2.2) deki görüntüler elde edilmiştir.



Şekil (4.2.2) Embriyolardan sürgün elde edilmesi

Elde edilen bitkicikler kök ortamına alınmıştır. 3 gün sonra bitkide kök oluşumu gözlemlenmiştir. Elde edilen bitkicik besi ortamından alınarak iklim kabininde torf:perlit (3:1)ortamına alıştırılmıştır. Şekil (4.2.3)



Şekil (4.2.3) Bitkiciklerin kök oluşturması ve torf perlit ortamına alınması

Bitkideki gelişim gözlemlerine dayanarak bitkiler saksıya alınmış ve iklim odası koşullarında yetiştirilmiştir. Şekil (4.2.4)



Şekil (4.2.4) Bitkilerin saksıya alınması ve yetiştirilmesi

Çizelge (4.2.1) 2017 İlkbahar döneminde 23 adet hıyar genotipiyle yapılan ovaryum kültüründen elde edilen kültüre alınan petri sayısı, elde edilen toplam embriyo sayısı, petri başına embriyo sayısı, elde edilen toplam kallus sayısı, petri başına kallus sayısı

1.deneme		1. Protokol				2. Protokol				3. Protokol			
Genotip No	KAPS	EETES	PBES	EETKS	PBKS	EETES	PBES	EETKS	PBKS	EETES	PBES	EETKS	PBKS
K1	30	40	1,33	80	2,67	31	1,03	0	0,00	45	1,5	16,0	0,53
K2	30	60	2,00	46	1,53	3	0,10	3	0,10	45	1,5	37,0	1,23
K3	30	35	1,17	35	1,17	7	0,23	2	0,07	22	0,7	8,0	0,27
K4	30	42	1,40	68	2,27	15	0,50	0	0,00	45	1,5	32,0	1,07
K5	30	56	1,87	38	1,27	13	0,43	3	0,10	32	1,1	49,0	1,63
K6	30	56	1,87	52	1,73	33	1,10	0	0,00	21	0,7	35,0	1,17
K7	30	81	2,70	70	2,33	51	1,70	7	0,23	20	0,7	32,0	1,07
K8	30	50	1,67	39	1,30	34	1,13	6	0,20	44	1,5	35,0	1,17
K9	30	30	1,00	53	1,77	33	1,10	1	0,03	42	1,4	36,0	1,20
K10	30	68	2,27	61	2,03	25	0,83	0	0,00	42	1,4	60,0	2,00
K11	30	59	1,97	34	1,13	19	0,63	0	0,00	16	0,5	19,0	0,63
K12	30	60	2,00	54	1,80	39	1,30	9	0,30	14	0,5	24,0	0,80
K13	30	54	1,80	33	1,10	13	0,43	0	0,00	35	1,2	36,0	1,20
K14	30	54	1,80	63	2,10	29	0,97	1	0,03	35	1,2	62,0	2,07
K15	30	28	0,93	26	0,87	28	0,93	0	0,00	30	1,0	25,0	0,83
K16	30	32	1,07	104	3,47	4	0,13	0	0,00	20	0,7	32,0	1,07
K17	30	79	2,63	47	1,57	17	0,57	2	0,07	68	2,3	42,0	1,40
K18	30	32	1,07	17	0,57	3	0,10	0	0,00	15	0,5	20,0	0,67
K19	30	70	2,33	54	1,80	23	0,77	0	0,00	29	1,0	28,0	0,93
TicariF1L	30	25	0,83	30	1,00	16	0,53	0	0,00	18	0,6	29,0	0,97
TicariF1E	30	19	0,63	53	1,77	20	0,67	0	0,00	16	0,5	32,0	1,07
TicariF1S	30	51	1,70	38	1,27	25	0,83	4	0,13	48	1,6	91,0	3,03
TicariF1Z	30	26	0,87	23	0,77	5	0,17	0	0,00	14	0,5	36,0	1,20
Maksimum		81,0	**2,7**	104,0	3,5	51,0	**1,7**	9,0	0,3	68,0	**2,3**	91,0	3,0
Minimum		19,0	**0,63**	17,0	0,6	3,0	**0,1**	0,0	0,0	14,0	**0,5**	8,0	0,3
Ortalama		48,3	**1,6**	49,6	1,7	21,6	**0,7**	1,9	0,1	31,9	**1,1**	36,6	1,2

*KAPS: Kültüre alınan petri sayısı; EETES: Elde edilen toplam embriyo sayısı; PBES: petri başına embriyo sayısı; EETKS: Elde edilen toplam kallus sayısı; PBKS: Petri başına kallus sayısı

2017 yılı ilkbahar döneminde 1. denemenin 1. protokolünde maksimum embiryo sayısı 2.70 adet/petri olup K7 genotipten elde edilirken en düşük embiryo sayısı TicariF1E'den(0.60 adet/petri) elde edilmiş olup ortalama embiryo sayısı 1.60 adet/petri olarak belirlenmiştir. En yüksek kallus sayısı 3.47/petri olup K16 genotipinden elde edilmiştir.. En düşük kallus sayısı 0.6 adet/petri olup K18 genotipidir. Ortalama kallus sayısı 1.70 adet/petri olarak belirlenmiştir(Çizelge 4.2.1).

2017 yılı ilkbahar döneminde 1. denemenin 2. prokolünde maksimum embiryo sayısı 51 olup K7 genotipidir. En düşük embiryo sayısı 3 olup K2 genotipidir. Ortalama embiryo sayısı 21,6 dır. En yüksek kallus sayısı 9 olup K12 genotipidir. En düşük kallus sayısı 0 olup K18 genotipidir. Ortalama kallus sayısı 1,9 dur(Çizelge 4.2.1).

2017 yılı ilkbahar döneminde 1. denemenin 3. prokolünde maksimum embiryo sayısı 68 olup K17 genotipidir. En düşük embiryo sayısı 14 olup K12 genotipidir. Ortalama embiryo sayısı 31,9 dır. En yüksek kallus sayısı 91 olup Silyon genotipidir. En düşük

kallus sayısı 8 olup K3 genotipi sahip olmuştur. Ortalama kallus sayısı ise 36,6 olarak belirlenmiştir.(Çizelge 4.2.1)

Çizelge (4.2.2) 2017 Sonbahar döneminde 23 adet hıyar genotipiyle yapılan ovaryum kültüründen elde edilen kültüre alınan petri sayısı, elde edilen toplam embriyo sayısı, petri başına embriyo sayısı, elde edilen toplam kallus sayısı, petri başına kallus sayısı

2. deneme	1. Protokol					2. Protokol				3. Protokol			
Genotip No	KAPS	EETES	PBES	EETKS	PBKS	EETES	PBES	EETKS	PBKS	EETES	PBES	EETKS	PBKS
K1	30	55	1,83	72	2,40	55	1,83	20	0,67	43	1,43	17	0,57
K2	30	44	1,47	50	1,67	52	1,73	22	0,73	64	2,13	21	0,70
K3	30	45	1,50	37	1,23	48	1,60	25	0,83	55	1,83	16	0,53
K4	30	54	1,80	76	2,53	37	1,23	21	0,70	51	1,70	11	0,37
K5	30	61	2,03	48	1,60	27	0,90	12	0,40	45	1,50	15	0,50
K6	30	55	1,83	60	2,00	43	1,43	23	0,77	52	1,73	20	0,67
K7	30	62	2,07	78	2,60	57	1,90	36	1,20	61	2,03	13	0,43
K8	30	56	1,87	56	1,87	41	1,37	18	0,60	55	1,83	7	0,23
K9	30	50	1,67	67	2,23	59	1,97	25	0,83	68	2,27	10	0,33
K10	30	68	2,27	62	2,07	62	2,07	19	0,63	72	2,40	12	0,40
K11	30	70	2,33	49	1,63	57	1,90	16	0,53	63	2,10	10	0,33
K12	30	74	2,47	65	2,17	62	2,07	23	0,77	66	2,20	13	0,43
K13	30	60	2,00	54	1,80	41	1,37	23	0,77	59	1,97	8	0,27
K14	30	56	1,87	70	2,33	67	2,23	20	0,67	71	2,37	14	0,47
K15	30	42	1,40	38	1,27	77	2,57	25	0,83	64	2,13	12	0,40
K16	30	24	0,80	66	2,20	32	1,07	23	0,77	45	1,50	9	0,30
K17	30	83	2,77	67	2,23	34	1,13	17	0,57	46	1,53	8	0,27
K18	30	40	1,33	27	0,90	40	1,33	11	0,37	45	1,50	4	0,13
K19	30	75	2,50	66	2,20	44	1,47	22	0,73	61	2,03	7	0,23
TicariF1L	30	33	1,10	34	1,13	60	2,00	13	0,43	40	1,33	12	0,40
TicariF1E	30	33	1,10	50	1,67	53	1,77	23	0,77	23	0,77	17	0,57
TicariF1S	30	56	1,87	45	1,50	38	1,27	18	0,60	38	1,27	11	0,37
TicariF1Z	30	35	1,17	39	1,30	43	1,43	15	0,50	49	1,63	10	0,33
Maksimum		83	**2,77**	78,00	2,60	77,00	**2,57**	36,00	1,20	72,00	**2,40**	21,00	0,70
Minimum		24	**0,80**	27,00	0,90	27,00	**0,90**	11,00	0,37	23,00	**0,77**	4,00	0,13
Ortalama		53,52	**1,78**	55,24	1,84	49,32	**1,64**	20,68	0,69	53,24	**1,77**	12,08	0,40

*KAPS: Kültüre alınan petri sayısı; EETES: Elde edilen toplam embriyo sayısı; PBES: petri başına embriyo sayısı; EETKS: Elde edilen toplam kallus sayısı; PBKS: Petri başına kallus sayısı

2017 yılı sonbahar döneminde 2. denemenin 1. protokolünde maksimum embiryo sayısı 83 olup K17 genotipidir. En düşük embiryo sayısı 24 olup K16 genotipidir. Ortalama embiryo sayısı 53,2'dır. En yüksek kallus sayısı 78 olup K17 genotipidir. En düşük kallus sayısı 27 olup K18 genotipidir. Ortalama kallus sayısı ise 55,2 olarak belirlenmiştir(Çizelge 4.2.2).

2017 yılı sonbahar döneminde 2. denemenin 2. protokolünde maksimum embiryo sayısı 77 olup K15 genotipidir. En düşük embiryo sayısı 27 olup K5 genotipidir. Ortalama

embiryo sayısı 49,3'dır. En yüksek kallus sayısı 36 olup K7 genotipidir. En düşük kallus sayısı 11 olup K18 genotipidir. Ortalama kallus sayısı 20,68 dir(Çizelge 4.2.2.).

2017 yılı sonbahar döneminde 2. denemenin 3. protokolünde maksimum embiryo sayısı 72 olup K10 genotipidir. En düşük embiryo sayısı 23 olup ticari F1 E genotipidir. Ortalama embiryo sayısı 53,2'dır. En yüksek kallus sayısı 21 olup K2 genotipidir. En düşük kallus sayısı 4 olup K18 genotipidir. Ortalama kallus sayısı 12,08 dir(Çizelge 4.2.2.).

Çizelge (4.2.3) 2018 İlkbahar döneminde 23 adet hıyar genotipiyle yapılan ovaryum kültüründen elde edilen kültüre alınan petri sayısı, elde edilen toplam embriyo sayısı, petri başına embriyo sayısı, elde edilen toplam kallus sayısı, petri başına kallus sayısı

3.Deneme		1. Protokol				2. Protokol			
Genotip No	KAPS	EETES	PBES	EETKS	PBKS	EETES	PBES	EETKS	PBKS
K1	20	22	1,1	5	0,25	3	0,15	50	2,5
K2	20	43	2,15	6	0,3	5	0,25	42	2,1
K3	20	13	0,65	8	0,4	8	0,4	61	3,05
K4	20	32	1,6	4	0,2	4	0,2	48	2,4
K5	20	15	0,75	10	0,5	7	0,35	45	2,25
K6	20	26	1,3	4	0,2	2	0,1	55	2,75
K7	20	40	2	12	0,6	1	0,05	32	1,6
K8	20	26	1,3	9	0,45	3	0,15	46	2,3
K9	20	15	0,75	7	0,35	6	0,3	34	1,7
K10	20	29	1,45	13	0,65	6	0,3	44	2,2
K11	20	23	1,15	3	0,15	10	0,5	22	1,1
K12	20	35	1,75	11	0,55	6	0,3	65	3,25
K13	20	29	1,45	2	0,1	14	0,7	18	0,9
K14	20	44	2,2	1	0,05	4	0,2	37	1,85
K15	20	18	0,9	5	0,25	4	0,2	56	2,8
K16	20	21	1,05	1	0,05	4	0,2	25	1,25
K17	20	27	1,35	5	0,25	3	0,15	67	3,35
K18	20	35	1,75	3	0,15	5	0,25	48	2,4
K19	20	45	2,25	8	0,4	6	0,3	32	1,6
TicariF1L	20	41	2,05	2	0,1	7	0,35	35	1,75
TicariF1E	20	26	1,3	4	0,2	5	0,25	52	2,6
TicariF1S	20	36	1,8	3	0,15	6	0,3	36	1,8
TicariF1Z	20	30	1,5	3	0,15	9	0,45	43	2,15
Maksimum		45	**2,25**	13	0,65	14	**0,7**	67	3,35
Minimum		13	**0,65**	1	0,05	1	**0,05**	18	0,9
Ortalama		29,16	**1,458**	5,72	0,286	5,72	**0,286**	43,12	2,156

*KAPS: Kültüre alınan petri sayısı; EETES: Elde edilen toplam embriyo sayısı; PBES: petri başına embriyo sayısı; EETKS: Elde edilen toplam kallus sayısı; PBKS: Petri başına kallus sayısı

2018 yılı ilkbahar döneminde 3. denemenin 1. protokolünde maksimum embiryo sayısı 45 olup K19 genotipidir. En düşük embiryo sayısı 13 olup K3 genotipidir. Ortalama embiryo sayısı 29,16'dır. En yüksek kallus sayısı 13 olup K10 genotipidir. En düşük kallus sayısı 1 olup K14 genotipidir. Ortalama kallus sayısı 5,72 dir.(Çizelge 4.2.3)

2018 yılı ilkbahar döneminde 3. denemenin 2. protokolünde maksimum embiryo sayısı 14 olup K13 genotipidir. En düşük embiryo sayısı 1 olup K7 genotipidir. Ortalama embiryo sayısı 5,72 dır. En yüksek kallus sayısı 67 olup K17 genotipidir. En düşük kallus sayısı 18 olup K13 genotipidir. Ortalama kallus sayısı 43,12 dir. (Çizelge 4.2.3)

Çizelge 4.2.4 Bitkiye dönen genotipler ve elde edilen bitki sayısı

Genotipler	**Aktarılan Toplam Embriyo sayısı**	**P1**	**P2**	**P3**	**P4**	**P5**
K1	25	**0**	**0**	0	0	**0**
K2	48	0	0	0	0	2
K3	21	0	0	0	0	0
K4	36	0	0	0	0	0
K5	22	0	0	0	0	1
K6	28	0	0	0	1	0
K7	41	0	0	0	2	5
K8	29	0	0	0	0	0
K9	21	0	0	0	0	0
K10	35	0	0	0	0	0
K11	33	0	0	0	0	0
K12	41	0	0	0	0	0
K13	43	0	0	0	3	2
K14	48	0	0	0	**0**	**0**
K15	22	0	0	0	0	0
K16	25	0	0	0	0	0
K17	30	0	0	0	0	0
K18	40	0	0	0	0	0
K19	51	0	0	0	0	0
TicariF1L	48	0	0	0	5	3
TicariF1E	39	0	0	0	1	0
TicariF1S	31	0	0	0	0	0
TicariF1Z	42	0	0	0	3	6
Maksimum	59	0	0	0	**5**	**6**

Minimum	14	0	0	0	**0**	**0**
Ortalama	34,88	0	0	0	**0,69**	**0,82**

2018 yılı ilkbahar döneminde 3. denemenin 1. ve 2. protokollerden elde eldilen toplam embriyo sayıları ve embriyolardan elde edilen bitki sayıları çizelge 4.7 de verilmiştir. 1.,2.,3, protokollerde embriyolarda büyüme görülmüştür. 4 . ve 5. protokollerde ise embiryollardan bitki elde edilmiştir. (Çizelge 4.2.4)

Diğer bitki türlerinde olduğu gibi hıyar ıslah programlarındada kısa sürede homozigot saf hatları elde edilmesi önem arz etmektedir. Hıyarda anter kültürü ile çalışmalar yer almasına rağmen diğer kabakgiller familyasında olduğu gibi hıyardada ovul/ovaryum kültürü uygulamaları ile başarılı sonuçlar elde edildiği rapor edilmektedir (Kumar ve ark. 2002). Ancak ovul/ovaryum kültürlerindeki başarı birçok etkene bağlı olmakla birlikte ovaryum kültüründe kullanılan ortam bileşenleri ve kullanılan genotipler başarıda önemli yer tutmaktadır. Nitekim, Golabadi ve ark. (2016) tarafından yürütülen bir çalışmada birinci denemede 35 ^{o}C'de ön sıcaklık şoku, farklı hıyar genotipleri, hormonal kombinasyonlar ve AgNO3, uygulamasının hıyarda ovaryum kültürüne olan etkisi incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre en yüksek embriyogenesisi oranının ön sıcaklık uygulaması ve NAA + 2,4-D + KIN + BAP uygulamalarında belirlenmiştir. En yüksek kallus oranı ise NAA + 2,4-D + KIN + BAP (1.5 + 0.7 + 1 + 1.8) mg / L hormon kombinasyonunun kombinasyonunda belirlenmiştir. İkinci denemede ise genotip ve diğer hormon kombinasyonlarının embriyo eldesi ile kallus oluşumu üzerinde istatistiki olarak önemli etki oluşturduğu rapor edilmiştir. NBDC6 * 6/32441 genotipi en yüksek embriyo verimine sahip olurken BAP (4 mg / L) ve 2,4-D (1.5 mg / L) kombinasyonunun embriyo genesis için optimal olduğu belirlenmiştir. Üçüncü denemde ise üçüncü deneyde, en yüksek embriyojenez (% 24.93) ve kallus (% 24.19) indüksiyonu, yerel İran çeşidi olan NBDC6 * 6/32441 genotipinde belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre sıcaklık uygulaması, hormon kombinasyonları ve genotipin embriyo oluşunda etkili olduğu beyan edilmiştir. DIAO ve ark. (2009) sonuçları yüksek sıcaklıkta (35^{o}C) işlemlerle, embriyojenez miktarının arttığını ve 3 günlük yüksek sıcaklık uygulamasında en fazla embriyojenez olduğunu göstermiştir. KOLEVA-GUDEVA ve ark. (2007) farklı genotiplerin anter kültürü uygulamalarında farklı ortamlara verdikleri tepkiyi belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışmalarında anterlere

uygulanan soğuk ve sıcak şoku uygulamalarının (sırasıyla 7 ° C ve 35 ° C'de, her ikisi de karanlıkta) anteri doğrudan somatik embriyogeneze doğru yönlendirdiğini rapor etmişlerdir. SHALABY (2007), 4 gün boyunca 32 ° C'ye maruz kalan ovüllerin yazlık kabakta en fazla sayıda embriyo oluşturduğunu bildirmiştir. Diğer taraftan KURT ve EVANS (1998), çiçek tomurcuklarına uygulanan ön uygulama (üç gün boyunca 4°C'de), katı ortamda oluşan kallus sayısını önemli ölçüde azalttığını, ancak sıvı ortamda istatistiki olarak önemli bir etkiye sahip olamadığını rapor etmiştir.

Diğer taraftan Özsan ve Onus(2017) tarafından farklı ortamların hıyarda gynogenesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada 3 hıyar genotipinin (0701, 0702 ve 0703) döllenmemiş dişi çiçekleri antezisten bir gün önce toplanmış ve yüzey sterilizasyonundan sonra, 8 adet farklı modifiye hıyar bazal ortamına (CBM) yerleştirilmiştir. Farklı ortamlardaki bütün eksplantlar, 3 gün boyunca 35° C'de karanlık koşullarda tutulmuş ve daha sonra 2 gün boyunca karanlık koşullarda 25°C'ye aktarılmıştır. Elde edilne bulgulara göre genotip 0703 ve besiyerin (0, 03 mg / L TDZ ile CBM) kombinasyonunun embriyo oluşumu ve bitki gelişimi bakımındandan en iyi sonuçları verdiğini beyan etmişlerdir.

Hıyar ovul kültürü için etkili bir protokol geliştirme için yapılan çalışmada, en yüksek embriyo oluşumu(% 89.4), maksimum bitki rejenerasyonu (% 9.0) olarak belirlenmiş ve çalışma sonunda ve 22 homozigot bitki (2 haploid ve 17 DH) elde edilmiştir.

Birçok faktör yumurtalık kültüründe başarıyı etkilemektedir. Direkt ovulllere veya in vitro kültür sırasında uygulanan fiziksel uygulamalar (örneğin yüksek veya düşük sıcaklık) embriyo oluşumu üzerinde güçlü bir etkiye sahip olabilmektedir (Yang, 1982). Örneğin Kabakta (*Cucurbita pepo*) soğuk şoku(4^oC) uygulaması yapılmayan ovullerden uygulama yapılan ovullere göre her 100 ovülü başına elde edilen embriyo sayısı yüksek bulunmuştur. (Metwally ve ark, 1998). Yine Hıyarda 35^oC sıcaklık şoku uygulamasının ovul kültüründe etkili olduğu belirtilmiştir (Gemes ve ark. 2002).

Çin uzun hıyarlarında (*Cucumis sativus* L.) ovül kültürü etkinliğine Cucumber Basal Ortam(CBM)'a ilave edilen TDZ ve AgN03'nin ekişinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise 0,03 - 0,07 mg dm-3 TDZ uygulamasında en yüksek embriyo eldesi sağlanmıştır. Ayrıca, en yüksek bitki rejenerasyon hızı, 0.05 mg dm-3 a-naftalenetik asit, 0,2 mg dm-3 6-benziladenin ve 5-10 mg dm-3 AgN03 ile takviye edilmiş CBM'de elde edilmiştir. Flow sitometri analizine göre rejenere bitkilerin %80'inin haploid olduğunu belirlenmiştir (Li ve ark. 2013).

Genotipler farklı hormon konsantrasyonuna farklı tepkiler vermektedir. AbdEl-Maksoud ve ark. (2009), besin ortamının ve uygun hormon dengesinin, farklı hıyar genotiplerinin anter kültüründe başarısını etkileyen anahtar faktörler olduğunu bildirmiştir. Yaptıkları çalışmada, besin ve rejenerasyon ortamı, MS + BAP ve IAA oranı (2: 1) CSL0011genotipine ait 5 klonun embriyogenesis ve rejenerasyon için en uygun ortam olarak belirlenirken, diğer hıyar çeşitlerinde embriyogenesis için farklı tiplerde ve konsantrasyonlarda ortamlar olabileceği tespit edilmiştir. Metwally ve arkadaşları, (1998a), balkabağından tozlanmamış ovüller için 1-5 mg dm-3, 4-D ve 30 g dm-3 ile ilave edilmiş Murashike ve Skoog (MS) ortamını kullanmışlardır. Ayrıca, Xie ve ark. (2006), kabaklar için hazırlanan besin ortamında yumurtalıklarda 2, 4-D, naftalen-1-asit ve benziliden (BA) ile ilave edilmiş N6 ortamını uygulamışlardır. Gémes-Juhász et 2002 yılında, 0.02 mg dm-3 thidiazuron ve 40g dm-3 sukroz ile desteklenmiş hıyar bazal ortamı (CBM) kullanmıştır. Bütün bunlara ek olarak donör materyallerin kalitesinin ve bitkilerin büyüme koşullarının ovüllerin jinogenezinde de etkilendiği belirlenmiştir(Plapungi ve ark. 2014).

Moqbeli ve ark.(2013) tarafından 6 F1 hıyar melezi, "Keşmir", "Adergreen", "Summerstar", "Kraliyet", "2010-3" ve "502 × 605" kullanılılarak yürütülen çalışmada döllenmemiş dişi çiçekler toplanarak petri kaplarında katı MS ortamına yerleştirilmiştir. Dilimlenmiş dişi çiçekler sırasıyla 0, 2, 3 veya 4 gün boyunca 35 ± 1 ° C'de sıcaklık şok ön işlemine maruz bırakılmışlardır. İlk görsel embriyo benzeri yapılar kültürde 3 hafta sonra oluşmaya başlamıştır. Söz konusu genotiplerde farklı TDZ konsantrasyonlar ve sıcaklık uygulamaları önemli etkiler meydana getirmiştir. En büyük embriyogensis başarısı, 0.04 mg · L-1 TDZ ile ‘summerstar’ çeşidinde elde edilmiştir. TDZ, bu çalışmada embriyo oluşumu üzerinde de olumlu bir etkiye sahip olmuştur.

Farklı ortamların hıyar ginogenesisi üzerindeki etkilerini belirlemek için yürütülen başka bir çalışmada 3 genotip (0701, 0702 ve 0703) modifiye edilmiş 8 farklı cucumber bazal ortamına (CBM) yerleştirilmiştir. Farklı ortamlardaki bütün eksplantlar, 3 gün boyunca 3°C'de karanlık koşullarda ve daha sonra 2 gün boyunca 25°C'de tutulmuştur. Tüm kültür ortamındaki ön işlemden sonra, 9 gün boyunca 16/8'lik bir fotoperiyotta 25°C'de ışık koşullarına aktarılmıştır. Çalışmada genotipler ve kültür ortamların embriyo ve bitkicik oluşumuna etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre 0703 ve 0, 03 mg / L TDZ içeren CBM kombinasyonunun embriyo oluşumu ve

ebriyoların bitkiye dönüşümü açısından en iyi sonuçları verdiği belirlenmiştir (Ozsan ve ark. 2017).

Bu yürütülen çalışmada ise 23 farklı hıyar genotipinin farklı protokollere embriyo oluşumu ve embriyoların bitkiye dönüşümü bakımından etkileri incelenmiş ve yukarıda daha önce yürütülen çalışmalarla elde edilen bulgulara göre genotip ve ortam uygulamarı bakımından (elde edilen embriyo sayısı ve bitkiye dönüşüm oranı) farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklılığın nedeni yine önceki çalışmalarda da rapor edildiği gibi anter kültürü uygulamalarında olduğu gibi ovul/ovaryum külürü uygulamalarında geneotip, ortam ve sıcaklık şoku uygulamalrının ovul/ovaryum kültürününün başarısında en önemli etkenler olduğu söylenebilir.

5. BÖLÜM

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada 3 farklı yetiştirme döneminde (2017 İlkbahar, 2017 Sonbahar ve 2018 İlkbahar) 3 adet önceki çalışmalarda kullanılan ve başarılı sonuçlar elde edilen ovaryum kültürü protokolü ile daha sonraki dönemlerde ilk 3 protokolün modifiye edilmiş hali kullanılarak 23 adet hıyar genotipinin ovul kültürü etkinliği belirlenmeye çalışılmıştır.

2017 yılı ilkbahar döneminde 1. denemenin 1. protokolünde maksimum embriyo sayısı 2.70 adet/petri olup K7 genotipten elde edilirken en düşük embriyo sayısı TicariF1E'den(0.60 adet/petri) elde edilmiştir. En yüksek kallus sayısı ise 3.47/petri olup K16 genotipinden elde edilmiştir. En düşük kallus sayısı 0.6 adet/petri olup K18 genotipinden elde edilmiştir

2017 yılı ilkbahar döneminde 1. denemenin 2. prokolünde maksimum embriyo sayısı 51 olup K7 genotipinde belirlenmiştir. En düşük embriyo sayısı olup K2 (3 adet) genotipinden elde edilirken en yüksek kallus sayısı K12 (9) genotipinden, en düşük kallus sayısı K18(0) genotipinden elde edilmiştir.

2017 yılı ilkbahar döneminde 1. denemenin 3. prokolünde maksimum embriyo sayısı 68 olup K17 genotipinde elde edilmiştir. En düşük embriyo sayısı 14 olup K12 genotipinden elde edilmiştir.

2017 yılı sonbahar döneminde 2. denemenin 1. protokolünde maksimum embriyo sayısı 83 olup K17 genotipinden edlde edilirken, en düşük embriyo sayısı 24 olup K16 genotipinden elde edilmiştir.

2017 yılı sonbahar döneminde 2. denemenin 2. protokolünde maksimum embriyo sayısı 77 olup K15 genotipinden, en düşük embriyo sayısı ise 27 olup K5 genotipinden elde edilmiştir.

2017 yılı sonbahar döneminde 2. denemenin 3. protokolünde maksimum embriyo sayısı 72 olup K10 genotipinden, en düşük embriyo sayısı 23 olup TicariF1E genotipinden elde edilmiştir.

2018 yılı ilkbahar döneminde 3. denemenin 1. protokolünde maksimum embriyo sayısı 45(K19) iken, en düşük embriyo sayısı 13 (K3) olarak belirlenmiştir.

Son olarak 2018 yılı ilkbahar döneminde kurulan 3. denemenin 2. protokolünde maksimum embriyo sayısı 14 (K13) olarak belirlenirken en düşük embriyo sayısı 1 (K7) olarak belirlenmiştir.

2018 yılı ilkbahar döneminde 3. denemenin 1. ve 2. protokollerden elde eldilen toplam embriyolar 5 farklı ortama aktarılmış ve 23 adet hıyar genotipinden toplam 11 adet hıyar genotipi elde edilmiş ve 4. ve 5. protokollerde K5, K7, K13 ve Ticari F1L genotipleri başarılı bulunmuştur.

Tüm elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde daha önceki çalışmalarda olduğu gibi farklı genotipler farklı protokollere embriyo oluşumu ve bitkiye dönüşüm bakımından farklı tepkiler vermiştir. Bu bulgular ışığında hıyar ıslah programlarında yeterli sayıda double haploid bitki elde etmek için mevcut protokollerin hıyar genotiplerine uygun şekilde modifiye edilerek kullanılmasında başarıyı arttıracağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Bohanec B (1998) Gynogenic haploid induction in plant breeding. In: Hansen M (ed) COST 824, gametic embryogenesis, report of activities 1995–1997. European Commission, Directorate- General Science, Research, Development, Luxembourg, pp 253–255

2. Chand S, Sahrawat AK (2007) Embryogenesis and plant regeneration from unpollinated ovary culture of Psorea corylifolia. Biologia Plantarum 51(2):223–228

3. Diao WP, Jia YY, Song H, Zhang XQ, Lou QF, Chen JF (2009) Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenetants using SSR markers. Sci Hortic 119:246–251

3. Ge´mes-Juha´sz A, Balogh P, Ferenczy A, Kristo´f Z (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

4. Germana M (2006) Doubled haploid production in fruit crops. Plant Cell Tissue Organ Cult 86:131–141

5. ELLİALTIOĞLU, Ş., SARI, N., ABAK, K. 2000. Haploid Bitki Üretimi. (Bitki Biyoteknolojisi Cilt:I, Ed: Babaoğlu, M., Özcan, S., Gürel, E.) 374 s.

6.Hoseman D, Bossoutrot D (1983) Induction of haploid plants from in vitro culture of unpollinated beet (Beta vulgaris L.). Z Pflanzenzuchtg 91:74–77

7. Forster BP, Thomas WTB (2005) Double haploids in genetics and plant breeding Plant Breed Rev 25:57–88

8. Germana M (2006) Doubled haploid production in fruit crops. Plant Cell Tissue Organ Cult 86:131–141

9. Hoseman D, Bossoutrot D (1983) Induction of haploid plants from in vitro culture of unpollinated beet (Beta vulgaris L.). Z Pflanzenzuchtg 91:74–77

10. Shalaby TA (2006) Embryogenesis and plantlets regeneration from anther culture of squash plants (Cucurbita pepo L.) as affected by different genotypes. J Agric Res Tanta Univ 32:173–183

11. Shalaby TA (2007) Factors affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer squash (Cucurbita pepo L.). Sci Hortic 115:1–6

12. Reed, S.M., 2005. Haploid cultures. *In*: *Plant Development and Biotechnology*. R.N. Trigiano and D.J. Gray (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA

13.Aina, O., K. Quesenberry and M. Gallo, 2012. Thidiazuron-induced tissue culture regeneration from quartered-seed explants of *Arachis paraguariensis*. *Crop Sci*., 52: 1076_1083

14.Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan, 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, a revised edition. Elsevier Science, Amsterdam, The

15.Netherlands Burbulis, N., A. Blinstrubien_, A. Sliesaravicius and R. Kuprien_, 2007. Some factors affecting callus induction in ovary culture of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Biologija*, 53: 21_23

16.Sainai, R. and A.R. Chopra, 2012. *In-vitro* plant regeneration via somatic embryogenesis in rice-bean *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi: an underutilized and recalcitrant grain legume. *J. Environ. Res. Dev.*, 6: 452_457

17.Lazaridou, T., I. Sistanis, A. Lithourgidis, H. Ambrus and D. Roupakias, 2011. Response to *in-vitro* anther culture of F3 families originating from high and low yielding F2 barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Aust. J. Crop Sci.*, 5: 265_270

18.Levesque, R. and SPSS Inc., 2006. *SPSS Programming and Data Management*, 3rd edition. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA Li, J.W., S.W. Si, J.Y. Cheng, J.X. Li and J.Q. Liu, 2013.

19.Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. *Biol. Plant.*, 57: 164_168 Lotfi, M., A.R. Alan, M.J. Henning, M.M. Jahn and E.D. Earle, 2003.

18.Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep.*, 21: 1121_1128

19.Malik, A.A., L. Cui, S. Zhang and J.F. Chen, 2011. Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. *Hortic. Sci.*, 38: 27_34

20. KOHPAYEGANI, J.A., BEHBAHANI, M., 2008. Genetic Diversity of Some Populations of Iranian Melon Using SSR Markers. Biotechnology, 7(1): 19-26.

21. SZAMOSI, C., SOLMAZ, S., SARI, S., BARSONY, C. 2010. Morphological evaluation and comparison of Hungarian and Turkish melon (*Cucumis melo*L.) germplasm. Scientia Horticulturae,124: 170-182.

22. EMİROĞLU, Ü., 1982. Haploidi ve bitki ıslahındaki önemi. E. Ü. Z. F. Yay. No: 450, İzmir, 38 s.

23.JANI**,** S., TOME, E., KACIU, S., 2007. Characterization and evaluation of some local Albanian melon (*Cucumis melo* L.) cultivars. Sjemenarstvo, 24 (1), Zagreb: Hrvatsko Agronomsko Društvo, 27-34.

24.KOHPAYEGANI, J.A., BEHBAHANI, M., 2008. Genetic Diversity of Some Populations of Iranian Melon Using SSR Markers. Biotechnology, 7(1): 19- 26.

25.LIU, L., KAKIHARA, F., KATO, M., 2004. Characterization of six varieties of *Cucumis melo* L. based on Morphological and Physiological Characters, including shelf-life of fruit. Euphytica 135: 305-313.

26.PARIS, H. S., 2001. Characterization of the *Cucurbita pepo* Collection at The Newe Ya'ar Research Center, Israel. Plant Genetic Resources Newsletter, No 126, 41-45.

27.Reddy, M.P., Sarla, N., Siddiq, E.A., 2002. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Plant Breeding. **Euphytica, 128:** 9-17.

28.Li, G., Quıros, C.F., 2001. Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP), A New Marker System Based on a Simple PCR: Its Application to Mapping and Gene Tagging in *Brassica*. **Theor. Appl. Genet,. 103:** 455–461.

29.Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reıjans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frıjters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuıper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP. **A New Technique for DNA Fingerprinting.Nucleic Acids Res., 23:** 4407-4414.

30.Staub, J.E, Serquen, F.C., Gupta, M., 1996. Genetic Markers, Map Construction and Their Application in Plant Breeding. **HortScience, 31:** 729-741.

31.Kumar, L.S., 1999. DNA Markers in Plant Improvement. **An Overwiew. Biotechnology Advances, 17:** 143-182.

32.Inan, N., 2008. Çekirdek Kabaklarında Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyon. **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana,**

33.Morimoto, Y., Maundu, P., Kawase, M., Fujimaki, H., Morıshıma, H.,2006. RAPD polymorphism of the white-flowered gourd (*Lagenaria siceraria*) (Molina) Standl. landraces and its wild relatives in Kenya. **Genetic Resources and Crop Evolution 53 (5) :** 963-974 2006.

34.Morimoto, Y., Maundu, P., Kawase, M., Fujimaki, H., Morishima, H., 2005. Diversity of landraces of the white-flowered gourd (*Lagenaria siceraria*) and its wild relatives in Kenya: fruit and seed morphology. **Genetic Resources and Crop Evolution 52 (6) :** 737-747.

35.Ferriol, M., Pıco, B., Nuez, F., 2004a. Molecular Diversity of A Germplasm Collection of Squash (*Cucurbita moschata*) Determined by SRAP and AFLP Markers. **Crop Sci., 44:** 653-664. Ferrıol, M., Pıco, B., Nuez, F., 2004b. Morphological and Molecular Characterization of *Cucurbita maxima* Landraces. **J. Amer. Soc. Hort. Sci., 129(1):** 60-69.

36.Paris, H.S., Yonash, N., Portnoy, V., Mozes-daube, N., Tzurı, G., Katzir, N., 2003. Assessment of Genetic Relationships in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*) Using DNA Markers. **Theor. Appl, Genet. 106:** 971-978.

37.Rohlf, J.F., 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Exeter Software, Setauket, New York**.

38.Doyle, J.J., 1990. Isolation of Plant DNA from fresh tissue. **Focus. 12**: 13-15.

39.Mohammadi, S. A., Prasanna, B. M., 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants-Salient Statistical Tools and Considerations. **Crop Science., 43**: 1235-1248.

40.E. MLADENOVIģ, 2012. Genetıc Varıabılıty of Bottle Gourd *Lagenaria siceraria* (mol.) standley and its Morphological Characterization by Multivariate Analysis. **Arch. Biol. Sci., Belgrade,** 64 (2), 573-583.

41.AKA KAÇAR, Y., ŞİMŞEK, Ö., SOLMAZ, İ., SARI, N., YALÇIN MENDİ, Y., 2012. Genetic diversity among melon accessions (*Cucumis melo*) from Turkey based on SSR markers. Genetics and Molecular Research, 11 (4), 4622-4631.

42.BREZEANU, C., AMBARUS, S., BREZEANU, P.M., CALIN, M., 2012. Conservation, characterization and evaluation of melon genetic resources carried out by Vegetable Research and Development Station Bacau, Romania. Proceedings of the Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of *Cucurbitaceae* (eds. Sarı, Solmaz and Aras), Antalya, Turkey, October 15-18, 2012, 454-458.

43.DANIN-POLEG, Y., REGIS, N., TZURI, G., KATZIR, N., 1998. Application of inter-SSR markers in melon (*Cucumis melo* L.). Cucurbit Genetics Cooperative Report, 21, 25-28 (article 9).

44.DANIN-POLEG, Y., REIS, N., TZURI, G., KATZIR, N., 2001. Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. Theor. Appl. Genet.,102, 61–72.

45.DOYLE, J.J., DOYLE, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. Phytochem Bull. 19:11–15

46.OURANG, S., SHAMS-BAKHSH, M., JALALI JAVARAN, M.,AHMADI, J., 2005. Analysis of genetic diversity of Iranian melons (*Cucumis melo L.*) using ISSR markers.

47.FRARY, A., ŞIĞVA, H.Ö., TAN, A., TAŞKIN, T., İNAL, A., MUTLU, S., HAYTAOĞLU, M., DOĞANLAR, S., 2013. Moleculer genetic diversity in Turkish national melon collection and selection of a preliminary core set. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 138 (1), 50-56.

48.GARCIA-MAS, J., MONFORTE, A. J., ARUS, P., 2004. Phylogenetic relationships among *Cucumis* species based on the ribosomal internal transcribed spacer sequence and microsatellite markers. Plant Syst. Evol., 248, 191-203,

49.KATZIR, N., DANIN-POLEG, Y., TZURI, G., KARCHI, Z., LEVI, U., CREGAN, P.B., 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several *Cucurbitaceae* species. Theor. Appl. Genet., 93: 1282–1290.

50.KUMAR, L.S., 1999. DNA markers in plant improvement: An overwiew. Biotechnology Advances, 17, 143-182.

51.LOPEZ-SESE, A. I., STAUB, J., KATZIR, N., GOMEZ-GUILLAMON, M. L., 2002. Estimation of between and within accession variation in selected Spanish melon germplasm using RAPD and SSR markers to assess strategies for large collection evaluation. Euphytica, 127, 41-51.

52.NAKATA, E., STAUB, J.E., LOPEZ-SESE, A.I., KATZIR, N., 2005. Genetic diversity of Japanese melon cultivars (*Cucumis melo* L.) as assessed by random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers.Genetic Resources and Crop Evolution, 52: 405-419.

53.SOLTANI, F., AKASHI, Y., KASHI, A., ZAMANI , Z., MOSTOFI, Y., KATO, Y. 2010. Characterization of Iranian melon landraces of *Cucumis melo* L. groups *flexuosus* and *dudaim* by analysis of morphological characters and random amplified polymorphic DNA. Breeding Science, 60 (1), 34-45.

54.STAUB, J. E., DANIN-POLEG, Y., FAZIO, G., HOREJSI, T., REIS, N., KATZIR, N.,, 2000.

55.Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. Euphytica, 115, 225-241.

56.STEPANSKY, A., KOVALSKI, I., PERL-TREVES, R., 1999. Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. Plant Syst. Evol., 217, 313-332.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Kızıltepe/Mardin'de doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimimi Kızıltepe/Mardin'de tamamladım. 2012 yılında başladığım Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'nden 2016 yılında mezun oldum ve aynı yıl Bahçe Bitkileri Bölümünde yüksek lisansa başladım.