

PAPER DETAILS

TITLE: Dihaploidization in Squash Genotypes (*Cucurbita* spp) as a Rootstock Candidates for Cucumber (*Cucumis sativus* L.) via I

AUTHORS: Ertan Sait KURTAR,Ahmet BALKAYA,Münevver GÖÇMEN,Onur KARAAGAÇ

PAGES: 34-40

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/3078622>



Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences

Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi

Hıyara (*Cucumis sativus* L.) Anaç Olabilecek Ümitvar Kabak (*Cucurbita* spp.) Genotiplerinde Işınlanmış Polen Tekniği İle Dihaploidizasyon

Ertan Sait KURTAR^{1*}, Ahmet BALKAYA², Münevver GÖÇMEN³, Onur KARAAĞAÇ⁴

^{1*}Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bafra Meslek Yüksekokulu, Bafra, SAMSUN

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, SAMSUN

³Antalya Tarım A.Ş., ANTALYA

⁴Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, SAMSUN

MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi

Geliş tarihi: 05.03.2017

Kabul tarihi: 29.03.2017

Anahtar Kelimeler:

Dihaploidizasyon

Işınlanmış polen

Anaç

Cucurbita spp.

ÖZET

Sunulan çalışma, hıyara anaç olabilme potansiyeli yüksek bazı kabak (*Cucurbita* spp.) anaç adaylarının ışınlanmış polen tekniği kullanılarak saflaştırılması ve haploidizasyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan 17 anaç adayına ait polenler gama ışını veren Co⁶⁰ kaynağında 150 Gy ışın dozunda ışınlanmış ve bu polenlerle dişi çiçekler tozlanarak partenogenetik haploid embriyo uyartımı sağlanmaya çalışılmıştır. Haploidi frekansı üzerine genotip etkisinin önemli bulunduğu çalışmada "I" genotiplerinden toplamda 23 meyve, 3998 tohum, 233 embriyo, 51 bitki ve 3 haploid bitki elde edilirken bu değerler "H" genotiplerinde sırasıyla 35, 6464, 822, 222 ve 24 olarak belirlenmiştir. Elde edilen 273 bitkiden 192 tanesi (51 adedi "I" ve 141 adedi "H" genotiplerinden) çelikleterek dış ortama alıştırılmış, bu bitkilerden ise 27 adet haploid bitki üretilmiştir. Haploidi frekansı ise 100 tohum, 100 embriyo ve meyve başına sırasıyla "I" genotiplerinde 0.07, 1.29 ve 0.13, "H" genotiplerinde ise 0.37, 2.92 ve 0.69 olarak gerçekleşmiştir. Haploid bitkiler %1'lik kolhisin çözeltisinin tepe tomurcuklarına uygulanmasıyla dihaploid hale getirilmiştir.

Dihaploidization in Squash Genotypes (*Cucurbita* spp) as a Rootstock Candidates for Cucumber (*Cucumis sativus* L.) via Irradiated Pollen Technique

ARTICLE INFO

Article history:

Received : 05.03.2017

Accepted : 29.03.2017

Keywords:

Dihaploidization

Irradiated pollen

Rootstock

Cucurbita spp.

ABSTRACT

The present study was conducted to determine the haploidization efficiency via irradiated pollen technique in some *Cucurbita* spp. candidates as rootstock. The pollens of 17 rootstocks candidates were irradiated at 150 Gy gamma ray dose with Co⁶⁰ source and the haploid embryo stimulation was induced pollination with this pollens. The haploidy frequency was highly influenced by genotypes, in total, 23 fruits, 3998 seeds, 233 embryos, 51 plants and 3 haploid plants were derived from "I" genotypes, and these values were 35, 6464, 822, 222 and 24 in "H" genotypes, respectively. Finally, 192 plants were propagated and acclimatized (51 of "I" and 141 of "H" genotypes), and 27 haploid lines were obtained from these plants. The haploidy frequency was 0.07, 1.29 and 0.13 in "I", 0.37, 2.92 and 0.69 "H" for per 100 seeds, 100 embryos and a fruit, respectively. Dihaploidization was successfully realized by application of 1% colchicine solution to apical meristems of haploid regenerants.

*Sorumlu Yazar e-mail: ertansaitkurtar@hotmail.com

1. Giriş

Sebze yetiştiriciliğinde özellikle toprak kökenli hastalık ve zararlılara karşı aşıli fide kullanımı yaygındır. Aşıli fide ile üretim münavebenin çok zor olduğu, yüksek yoğunlukta bulaşmanın yaşandığı ve halen topraklı yetiştiriciliğin zorunlu olduğu sürekli üretim yapılan örtü altı alanlarının vazgeçilmez bir unsurdur. Ülkemizde aşıli sebze fidesi ile üretiminin geçmişi oldukça yeni olup 2004 yılında açıkta ve basit örtü altı sistemleri altında aşıli karpuz yetiştiriciliği ile başlayan süreç günümüzde seracılığında yaygınlaşmasıyla aşıli kavun, hıyar, patlıcan ve domates üretimi şeklinde devam etmektedir. Özellikle küresel iklim değişikliklerinin bir sonucu olarak farklılık arz eden ve şiddetleri gün geçtikçe hissedilen biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanımın yanında, gerek ürünlerde objektif ve subjektif kalite unsurlarını artırmaya yönelik olarak gerekse ekolojist yaklaşımın üretim tarzı şeklinde aşıli fide ile üretim her geçen yıl artmaktadır.

Hıyar, örtü altı tarımımızda domatesten sonra üretimi en çok yapılan türdür. Yaklaşık 1.75 milyon tonluk hıyar üretimi ile Türkiye dünyanın 2. en büyük üretici ülkesi konumundadır (FAO, 2012). Hıyar yetiştiriciliğinde solgunluk (özellikle *Fusarium* spp.) ve nematod (*Meloidogyne* spp.) zararı üretimi kısıtlayan en önemli toprak kökenli sorunlardır. *Fusarium* ile zirai mücadele kapsamında kısmi mücadele yapılabilirken, nematod sorununu etkili bir şekilde çözen bir preparat yoktur. Kaldı ki bu sorunlarla mücadele amaçlı kullanılan pestisitlerin ekosistemdeki zararları ve kalıntı etkileri uzun süreçte tolerans limitlerinin üzerindedir. Bu sebeple gerek kalıcı gerekse çevreci bir yöntem olması sebebiyle aşıli fide ile üretim en önemli seçenek olarak ön plana çıkmaktadır. Günümüzde hıyara anaç olarak genellikle balkabağı (*C. moschata*) ile kestane (*C. maxima*) ve balkabağı (*C. moschata*) melezleri kullanılmaktadır (Davis ve ark., 2008).

Aşıli fide üretiminin ilk aşaması ise istenilen tarımsal özelliklere (hedef soruna çare olacak, kalem ile uyuma yeteneği yüksek, verimli ve ürün kalitesine pozitif etkili v.b.) sahip anaç adaylarının tespiti. Bu adayların F1 hibrit ıslahı çerçevesinde saflaştırılması ve devamında üretimlerine geçilmesi bir dizi anaç ıslah programlarını gerekli kılar. Üstün özellikteki anaç adaylarının klasik yöntemlerle saflaştırılması, kabak gibi yabancı tozlanan türlerde 8-10 yıl gibi bir zamanı, uzun ve yorucu bir süreci gerektirir, ancak sonuçta elde edilen genotip hiç bir zaman %100 saf olmaz (Kurtar ve Balkaya, 2010). Diğer yandan 1-2 yıl içerisinde %100 homozigot saf hatların eldesine olanak sağlayan in vitro haploidizasyon yöntemi hem ıslah süresini kısaltması hem de maliyeti ve işgücünü oldukça azaltması sebebiyle birçok türün ıslah programlarında etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Haploid bitkiler erkek gamet (anter - polen), dişi gamet (yumurta - yumurtalık) ve partenogenetik (polen ıslama, kimyasal uygulamaları v.b.) kökenli olabilmektedir.

Kabakgiller familyasına giren bitki türleri dikkate alındığında ıslanmış polen tekniği dihaploidizasyon ıslahında en çok kullanılan yöntem olarak göze çarpmaktadır. Bu teknikte polenler farklı ışın kaynaklarıyla (genellikle Co⁶⁰ kaynaklı gama ışınıyla) ıslanarak generatif yünden inaktif hale getirilmekte ancak çimlenme yetenekleri devam ettiğinden dişi organda uyarım yaparak partenogenetik haploid embriyoların oluşumuna neden olmaktadır. Bu tekniğin kullanımıyla karpuz (Gürsöz ve ark., 1991; Sarı, 1994), kavun (Sauton ve Dumas de Vaulx, 1987; Sarı ve ark., 1992; Abak ve ark., 1996; Lotfi ve ark., 2003), hıyar (Truong-Andre, 1988; Sauton, 1989; Çağlar ve Abak, 1999; Dolcet-Sanjuan ve ark., 2006), yazlık kabak (Kurtar ve ark., 2002; Berber 2009; Bektemur ve ark., 2014), balkabağı (Kurtar ve ark., 2009) ve kestane kabağı (Kurtar ve Balkaya, 2010) türlerinde başarılı sonuçlar alınmıştır. Kavun ve hıyar türlerinde yoğun, kabak türlerinde ise kısmen ıslah programlarında kullanılan ıslanmış polen tekniğinin etkinliğini kısıtlayan en önemli faktör genotip bağımlılığı göstermesidir. Bunun yanında ıslama ve tozlama çalışmaları, besi ortamının yapısı, kültür koşulları, embriyo gelişim aşamaları gibi faktörler de frekans üzerine etkili olabilmektedir.

Sunulan bu çalışmada TUBITAK-TEYDEB tarafından desteklenen ve Üniversite-Sanayi işbirliği kapsamında gerçekleştirilen “Kabak (*Cucurbita* spp.) genetik kaynaklarının hıyar (*Cucumis sativus* L.) anaç ıslah programında değerlendirilmesi ve yerli hibrit anaçlarının geliştirilmesi” projesi (Göçmen ve ark., 2014) kapsamında ümit var anaç adayı bazı kabak genotiplerinde ıslanmış polen tekniği kullanılarak dihaploidizasyon etkinliği araştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal, ıslama, tozlama ve hasat çalışmaları

Çalışmada materyal olarak 17 adet kabak anaç adayı kullanılmıştır. Genotiplere ait anterler bitkiler tam çiçeklenme dönemindeyken anthesisten bir gün önce toplanmış ve aynı gün 150 Gy dozunda gama ışını ile ıslanmıştır. Anterler toplanırken bir gün sonra tozlanacak dişi çiçekler de ince tül keseler yardımıyla izole edilmiştir. Ertesi gün sabah saatlerinde izole edilmiş olan dişi çiçekler ıslanmış polenlerle tozlanmış ve yabancı polen girişini önlemek için tekrar izole edilmiştir. Tozlamadan 2-3 gün sonrasında tül keseler alınmış ve tutan meyveler etiketlenmiştir. Çalışmanın bu kısmı Antalya Tarım A.Ş. bünyesinde yürütülmüştür.

2.2. Dezenfeksiyon, yüzey sterilizasyonu ve ekstraksiyon

Tozlama işleminden yaklaşık 3-4 hafta sonra, meyveler tam olgunlaşmadan ve oluşan embriyolar yaşlanıp rejenerasyon yeteneklerini kaybetmeden hasat edilmiştir. Hasat edilen meyveler ekstraksiyon öncesi

çeşme suyu altında yıkanmış ve kaba kirlerinden arındırılmış, kurulandıktan sonra 2 g hassasiyetindeki dijital terazide tartılmış ve meyve sapları kesilerek %20'lik çamaşır suyu çözeltisinde 30 dakika bekletilmiştir. Son olarak steril kabin altında %96'lık etil alkolle iyice ıslatıldıktan sonra yakılarak yüzey sterilizasyonu yapılmıştır.

Steril kabin içerisinde yüzey sterilizasyonu yapılan meyveler steril bir bıçak yardımıyla içlerindeki tohumlara zarar verilmeyecek şekilde dikkatlice kesilmiş ve içerdikleri bütün tohumlar (çok küçük, zar veya iz şeklinde olanlar hariç) teker teker açılarak incelenmiştir. Tohumlardan elde edilen embriyolar, embriyogenezis aşamalarına göre gruplandırıldıktan sonra kültüre alınmıştır. Elde edilen embriyolar Kurtar ve ark. (2002)'na göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır.

1. Nokta: Tohum ucundaki sert, beyaz küçük embriyo
2. Ok ucu: Tohum ucuna doğru büyümüş, ok ucu şeklindeki sert, beyaz embriyo
3. Yürek: Sert, beyaz, yürek şeklindeki embriyo
4. Kotiledon: Kotiledon yaprakları belirginleşmiş, sert, beyaz embriyo
5. Şekilsiz: Kotiledon ve yürek arasındaki gelişme dönemlerinde kalmış, sert, beyaz embriyo
6. Nekrotik :Bitkiye dönüşemeyecek yapıda, kahverengimsi nekrotik embriyo

In vitro çalışmalarda tüm genotiplerde, toplam meyve sayısı (MS; adet), ortalama meyve ağırlığı (MA; g), toplam tohum sayısı (TS; adet), meyve başına ortalama tohum sayısı (OT; adet), toplam embriyo sayısı (ES; adet), meyve başına ortalama embriyo sayısı (OE; adet) sert embriyo toplamı (ST; adet), nekrotik embriyo toplamı (NT; adet), farklı gelişme safhalarındaki embriyo sayısı (adet) hesaplanmıştır.

2.3. Besi ortamı, kültür koşulları, dihaploidizasyon çalışmaları

Işınlanmış embriyoların kültüre alınmasında 0.1 mg/l IAA ile modifiye edilmiş standart MS (Murashige ve Skoog 1962) temel besiy ortamı kullanılmıştır. Çıkarılan embriyolar içerisinde yaklaşık olarak 25 ml besiy ortamı bulunan magentalara her birine gelişme dönemleri dikkate alınarak 3-9 arasında embriyo koymak şartıyla kültüre alınmışlardır. Kültüre alınan embriyolardan köklenip gelişerek bitkiye dönüşmeye başlayanlar her magentaya 1-2 adet olacak şekilde büyütülmüşlerdir (Şekil 1).

Bu süre içerisinde embriyolar ve bitkiler sıcaklığı 26 ± 1 °C, fotoperiyodu 16 saat, ışıklandırması TCD 36W/54 Preheat Daylight tipi lambalarla yaklaşık 3000 lüks'e ayarlanmış olan iklim odasında tutulmuşlardır. 10-12 cm boyuna ulaşmış bitkicikler, gerek materyal kaybını önlemek gerekse dihaploidizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere 2-3 seferlik mikro çeliklemlerle çoğaltılmış ve sayıları artırılmıştır. Sayıları artırılmış bitkicikler Kurtar ve Balkaya (2010)'nın çalışmalarında belirttiği şekliyle dış ortama alıştırılmıştır. Dış ortama iyice adapte olan bitkiciklerde, daha önceki

çalışmalarımızda güvenli bir şekilde kullandığımız stomatal gözlemler (birim alandaki stoma sayısı, stoma ölçüleri, kloroplast sayısı) ile ploidi tespiti yapılmıştır. Ploidi tespiti sonucunda haploid olarak belirlenen bitkiler %1'lik kolhisin çözeltisinin sürgün ucuna uygulanmasıyla dihaploid hale getirilmiştir. Embriyo kültürleri, bitki rejenerasyonu, aklimatizasyon, ploidi tespiti ve dihaploidizasyon çalışmaları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bafra Meslek Yüksekokulu bünyesinde yürütülmüştür.

2.4. Verilerin analizi

Çalışmada kullanılan anaç adaylarına ait meyve sayılarının eşit sayıda olmaması ve farklı sayıda materyal kullanılması sebebiyle sadece elde edilen verilerin ortalamalarının verilmesiyle yetinilmiştir.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

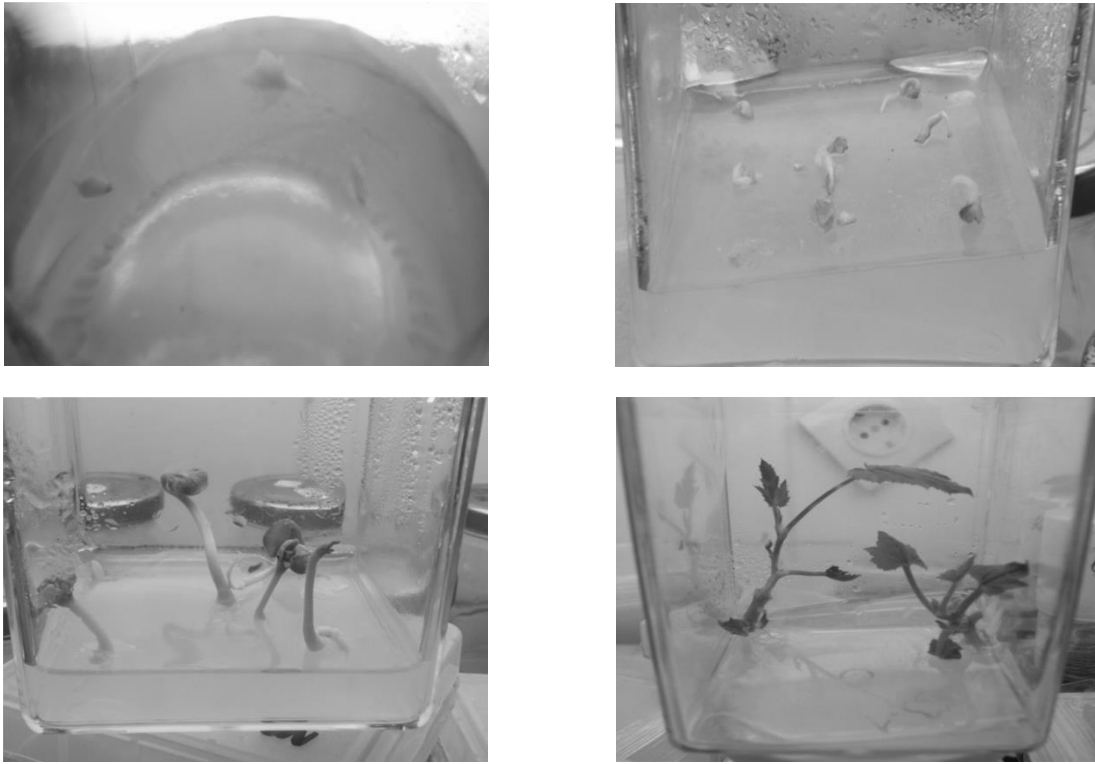
3.1. Işınlanmış polenlerle tozlamaların meyve ağırlığı, tohum oluşumu ve embriyo uyartımına etkileri

En ağır meyveler I-3 genotipinden elde edilmiş (2605.0 g), bunu I-4 genotipi izlemiştir (1479.2 g). I genotipleri, H genotiplerine oranla daha ağır meyveler oluşturmuştur. Ortalama tohum sayıları açısından ise H genotipleri I genotiplerine oranla daha fazla tohum içermişlerdir. Bu açıdan H-11 ve H-8 genotipleri meyve başına en fazla tohumun elde edildiği genotipler olmuştur (sırasıyla, 243.2 ve 242.0 adet) (Çizelge 1).

Çizelge 1.

Elde edilen meyve sayısı (MS), ortalama meyve ağırlığı (MA), toplam tohum sayısı (TS) ortalama tohum sayısı (OT), toplam embriyo sayıları (ES) ve meyve başına ortalama embriyo sayıları (OE) değerleri.

Genotip	MS	MA	TS	OT	ES	OE
I-1	2	1270.0	541	135.3	18	9.0
I-2	3	1445.7	526	175.3	58	19.3
I-3	2	2605.0	368	184.0	9	4.5
I-4	5	1479.2	566	113.2	4	0.8
I-5	1	1348.0	217	217.0	16	16.0
I-8	5	923.2	920	184.0	61	12.2
I-9	5	1446.0	860	172.0	66	13.2
Σ /Ort.	23	1502.4	3998	173.8	232	10.1
H-1	4	357.8	461	115.3	26	6.5
H-2	2	492.0	386	193.0	55	27.5
H-3	1	588.0	133	133.0	31	31.0
H-5	4	651.3	613	153.3	47	11.8
H-8	1	912.0	242	242.0	38	38.0
H-11	5	813.2	1216	243.2	162	32.4
H-12	4	473.5	699	174.8	102	25.5
H-13	4	541.0	912	228.0	156	39.0
H-14	7	434.3	1106	158.0	131	18.7
H-15	3	1033.3	696	232.0	74	24.7
Σ/Ort.	35	629.6	6464	184.7	822	23.5
Genel	58	1066.0	10462	180.4	1054	18.2



Şekil 1.
Embriyoların kültüre alınması, köklendirme ve büyütme aşamaları

Işınlanmış polenlerle uyartım sonucu elde edilen embriyo sayıları ile meyve başına ortalama embriyo sayılarına ilişkin sonuçlar genotiplere göre Çizelge 1’de ayrıntılı olarak verilmiştir. En yüksek embriyo uyartımı 39 ve 38 adet/meyve ile sırasıyla H-13 ve H-8 genotiplerinde saptanmıştır. I-4 genotipi ise meyve başına 0.8 adet embriyo ile en düşük embriyo sayısının elde edildiği genotip olmuştur. Meyve başına düşen ortalama embriyo sayıları H genotiplerinde, I genotiplerine oranla daha fazla belirlenmiştir (sırasıyla 23.5 ve 10.1 adet). Genel değerlendirmede ise toplamda 1054 adet embriyo elde edilmiş ve meyve başına ortalama embriyo sayısı 18.2 adet olarak tespit edilmiştir.

3.2. Işınlanmış polenlerle uyartım sonucu elde edilen embriyoların değişik gelişme safhaları

Işınlanmış polenlerle tozlama sonucu genotiplere bağlı olarak elde edilen değişik safhalardaki bitkiye dönüşebilecek sert, beyaz yapılı embriyolar ile bitkiye dönüşme kabiliyetleri olmayan nekrotik embriyoların sayıları belirlenmiştir (Tablo 2). H-11 ve H-13 genotipleri 162 ve 156 adet ile en fazla embriyonun elde edildiği genotipler olmuştur. Elde edilen toplam 1044 adet embriyodan 841 adedi (% 80.6) normal sert yapıda olurken, % 21.4’ü bitkiye dönüşemeyecek yapıdaki nekrotik embriyolardan oluşmuştur. Embriyoların gelişim safhaları açısından kotiledon şeklindeki embri-

yoların sayısı (679 adet) diğer embriyolardan daha fazla olmuştur (Çizelge 2).

In vitro’da kültüre alınan farklı gelişme safhalarındaki embriyo sayıları, köklenerek bitkiye dönüşen embriyo sayıları hesaplanmıştır. “I” genotiplerinden elde edilen sert yapılı toplam 183 adet embriyodan 112 adedi köklenmiş ve 51 adedi (%27.9) normal bir bitkiye dönüşmüştür. En yüksek bitkiye dönüşüm oranları kotiledon aşamasındaki embriyolardan sağlanmıştır. “H” genotiplerinden elde edilen sert yapılı toplam 658 adet embriyodan 318 adedi köklenmiş ve 222 adedi (%33.7) normal bir bitkiye dönüşmüştür. En yüksek bitkiye dönüşüm oranları, “I” genotiplerinde olduğu gibi, kotiledon aşamasındaki embriyolardan sağlanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular Sarı ve ark. (1999) ile Kurtar ve ark. (2002)’nin bulgularıyla da uyum içersindedir. Çalışma boyunca hem “I” hem de “H” genotiplerinden toplamda elde edilen 841 adet sert yapılı embriyodan 543 adedi köklenmiş ve bunlardan 273 adet (%32.5) bitki elde edilmiştir (Çizelge 3).

“I” ve “H” genotiplerine ait yürek, kotiledon ve şekilsiz yapıdaki embriyoların besi ortamına alınmaları ile iyi bir kök sistemi geliştirip kotiledon yaprakları oluşturmalarına kadar geçen sürelerin farklı olduğu belirlenmiştir. Nokta ve ok ucu safhalarındaki embriyolardan ise bitkiye dönüşüm sağlanamadığından değerlendirme yapılamamıştır. Ele alınan bu özellikler açısından “I” ve “H” genotipleri birbirine oldukça yakın değerler vermiş, embriyoların bitkiye dönüşüm süreleri

embriyo gelişim safhası ilerledikçe kısalmıştır. Örneğin kotiledon ve şekilsiz yapıdaki embriyolar sırasıyla ortalama 5.3 - 7.2 ve 6.4 – 8.1 gün gibi kısa sürelerde iyi bir kök sistemi ve kotiledon yapraklar oluşturup sürgün vermeye başlamışlardır. Bu süre yürek safhasındaki embriyolarda 8.8 – 12.5 gün olarak gerçekleş-

miştir. Kültüre alınan bazı embriyolar anormal gelişimler göstermiş ve bitkiye dönüşmemişlerdir (Şekil 2). Kışlık kabaklarda embriyo yapılarının gelişim düzeylerine bağlı olarak bitkiye dönüşüm oranlarının ve sürelerinin değişim gösterdiği Kurtar ve ark. (2012) tarafından da rapor edilmiştir.

Çizelge 2.

Anağ adaylarının değişik safhalardaki embriyo sayıları

Genotip	Sert embriyolar					Nekrotik embriyolar					ST	NT	GT
	N	O	Y	K	Ş	N	O	Y	K	Ş			
I-1	-	1	-	10	2	1	-	-	2	2	13	5	18
I-2	2	3	1	33	6	3	-	3	5	2	45	13	58
I-3	-	-	-	5	1	1	-	-	2	-	6	3	9
I-4	-	-	-	3	-	-	-	-	1	-	3	1	4
I-5	-	-	-	11	3	-	-	-	1	1	14	2	16
I-8	1	1	-	41	7	4	-	-	5	2	50	11	61
I-9	3	3	2	39	5	6	-	3	4	2	52	15	66
Σ/Ort.	6	7	3	142	24	14	-	6	20	9	183	50	223
H-1	-	1	-	14	3	-	-	2	4	2	18	8	26
H-2	4	-	-	39	1	3	1	2	2	3	44	11	55
H-3	1	-	1	23	-	-	3	-	1	2	25	6	31
H-5	1	4	-	31	2	2	-	5	2	-	38	9	47
H-8	-	-	2	27	-	-	2	-	3	4	29	9	38
H-11	7	11	4	92	12	6	9	4	12	5	126	36	162
H-12	4	1	5	69	9	1	-	3	9	1	88	14	102
H-13	-	2	8	101	11	3	7	-	18	6	122	34	156
H-14	5	8	1	86	8	6	-	-	13	4	108	23	131
H-15	3	2	-	55	-	1	2	1	6	3	60	13	73
Σ/Ort.	25	29	21	537	46	22	24	17	70	30	658	163	821
Genel	31	35	24	679	70	36	24	23	90	39	841	213	1044

ST: Sert Embriyo Toplamı; NT: Nekrotik Embriyo Toplamı; GT: Genel Toplam; N: Nokta; O: Ok ucu; Y: Yürek; K: Kotiledon; Ş: Şekilsiz

Çizelge 3.

Anağ adaylarında kültüre alınan embriyo sayısı (E), köklenen embriyo sayısı (K), bitkiye dönüşen embriyo sayısı (D) ve bitkiye dönüşüm oranı (O) (%)

	I genotipleri				H genotipleri				Genel			
	E	K	D	O	E	K	D	O	E	K	D	O
N	6	2	-	-	25	9	3	12.0	31	11	3	9.7
O	8	3	2	25.0	29	11	4	13.8	37	14	6	16.2
Y	3	1	-	-	21	14	8	38.1	24	15	8	33.3
K	142	98	48	33.8	537	381	204	38.0	679	479	252	37.1
Ş	24	8	1	4.2	46	16	3	6.5	70	24	4	5.7
Σ/Ort.	183	112	51	27.9	658	431	222	33.7	841	543	273	32.5

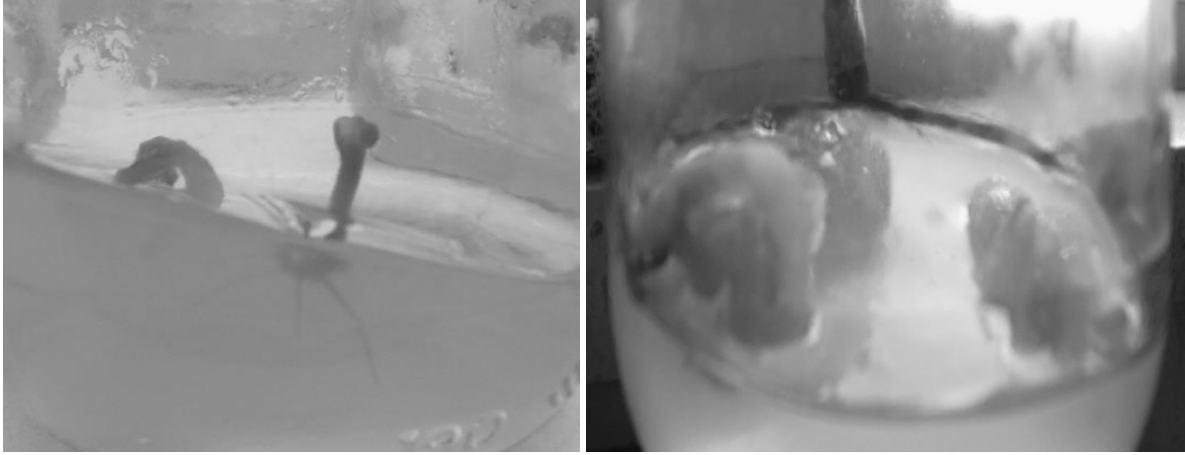
N:Nokta; O: Ok ucu; Y: Yürek; K: Kotiledon; Ş: Şekilsiz; T/O: Toplam/Ortalama

Kültür tüplerine veya kavanozlara alınmış farklı aşamalarda embriyolardan gelişen bitkilerin yaklaşık 7-10 cm olmasına kadar geçen süre (ortalama “gün”) olarak hesaplanan ilk mikro çelikleme gelme süreleri embriyo safhalarına göre değişiklik göstermiştir. İleri gelişme safhalarında bulunan embriyolar daha kısa sürede çelikleme aşamasına gelmişlerdir. Kotiledon ve şekilsiz yapıdaki embriyolar sırasıyla ortalama 32.7 – 36.2 ve 34.4 - 39.1 günde çelikleme gelmiştir. Kök-

lenip sürgün oluşturan bazı embriyolarda anormal bitki gelişimlerine de rastlanmıştır (Şekil 3).

Farklı gelişim aşamalarındaki embriyolardan gelişen bitkilerin ilk mikro çelikleme aşamasındaki ortalama boylarına ilişkin sonuçlarda ise kotiledon ve şekilsiz aşamalarındaki embriyolar sırasıyla 13.2 ve 12.4 cm ile en uzun boylu bitkileri vermiştir. Bitkilerin ilk mikro çelikleme geldikleri aşamadaki ortalama boğum sayıları ileri gelişim safhasındaki embriyolarda daha az

sayıda gerçekleşmiş, bu değer kotiledon safhasında ortalama 4.3 adet olarak saptanmıştır.



Şekil 2.
Anormal gelişme sonucu bitkiye dönüşemeyen embriyolar



Şekil 3.
Anormal gelişme gösteren bitkiciklerin görünümü

3.3. Bitkilerin dış ortama alıştırılması, ploidi tespiti

Mikro çeliklemeler sonrası uygun boya gelen bitkiler Kurtar ve Balkaya (2010)'ya göre dış koşullara alıştırılmıştır (Şekil 4).

Dış koşullara alıştırılan bitkilerin ploidi düzeyleri stomatal gözlemlerle belirlenmiştir (Kurtar ve ark., 2009). Diploidlerde ortalama stoma uzunluğu 32.45 μm iken, haploidlerde 24.76 μm olmuştur. Stoma çapları ise diploidlerde 19.70 μm ve haploidlerde 17.76 μm olarak bulunmuştur. Araştırma sonucunda incelenen bitkilerin stoma boyutları ile birim alandaki stoma sıklığı arasında ters bir ilişki olduğu görülmüştür. Diploid bitkilerde birim alandaki stoma sayılarının daha az (345.38 adet mm^{-2}) haploidlerde ise sayılarının daha fazla (407.92 adet mm^{-2}) olduğu bulunmuştur. Haploid bitkilerde stomanın her iki bekçi hücresinde toplam 6-8 adet kloroplast bulunurken, diploid bitkilerde 10-12

kloroplast sayılmıştır. Haploid bitkilerin diploid bitkilere oranla daha zayıf geliştikleri ve daha küçük kaldıkları tespit edilmiştir (Şekil 5). Benzer bulgular kavun (Sarı ve ark., 1992), karpuz (Sarı, 1994), yazlık kabak (Kurtar ve ark., 2002), balkabağı (Kurtar ve ark., 2009) ve kestane kabağında da (Kurtar ve Balkaya, 2010) tespit edilmiştir.

3.4. Dihaploidizasyon çalışmaları

Araştırma süresince toplamda 27 haploid bitki elde edilmiş ve haploidi frekansı 100 tohum, 100 embriyo ve meyve başına sırasıyla "I" genotiplerinde 0.07, 1.29 ve 0.13, "H" genotiplerinde ise 0.37, 2.92 ve 0.69 olarak gerçekleşmiştir. Haploidi frekansı beklenenin altında gerçekleşmiş zira neredeyse bütün meyvelerde yüksek oranda dolu tohumla karşılaşılmıştır. Geriye kalan tohumlardan çıkarılan embriyoların büyük bir bölümü ise tohumun yarısını ve yarısından daha fazlasını kap-

layan kotiledon şeklindeki embriyolardan oluşmuş, bu tip embriyolardan ise haploid bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir. Haploid bitkilerin saf dihaploid hatlara dönüştürülmesi amacıyla, daha önceki çalışmalarımız-

da başarılı sonuçlar veren %1'lik kollisin çözeltisi elde edilen çeliklerin tepe sürgününe uygulanmıştır. Haploid bitkiler dihaploid hale gelinceye kadar uygulamalara devam edilmiştir.



Şekil 4. Bitkilerin dış koşullara alıştıırılması. Bitkiciklerin dikimi, plastik poşetlerle kapatma, dış koşullara alıştıırılmış bitkiler ve iklim odasında büyümeye alınmış bitkiler.



Şekil 5. Diploid (solda) ve haploid bitkinin gelişme durumu

4. Sonuç ve Öneriler

Birçok sebze türünde gerek saf homozigot ebeveyn adaylarının elde edilmesine gerekse ıslah süresini büyük ölçüde kısaltarak ıslah etkinliğinin artırılmasına olanak sağlayan dihaploidizasyon tekniği kabak türün-

de de başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ancak tekniğin yaygın olarak kullanılmasını engelleyen en önemli etken genotip bağımlı olması ve haploidi frekansının genotipler arasında büyük bir varyasyon göstermesidir. Bu amaçla ileride kabak türünde yapılacak çalışmalarda haploidi frekansı yüksek genotiplerle

çalışılması, frekansı düşük genotiplerde ise yüksek frekanslı genotiplerle melezlemeler yapılarak frekansın artırılması gerekmektedir. Ayrıca ışınlanmış polen tekniğine alternatif olarak anter-mikrospor veya ovül-ovaryum kültürleri de devreye girmelidir.

5. Teşekkür

Projemize (TEYDEB-311O194) destek sağlayan, başta TÜBİTAK olmak üzere, Antalya Tarım A.Ş.'ne ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bafra Meslek Yüksek-
kokuluna teşekkürü bir borç biliriz.

6. Kaynaklar

- Abak K, Sarı N, Paksoy M, Yılmaz H, Aktaş, H, Tuna lı C (1996). Genotype response to haploid embryo induction with pollination by irradiated pollen in melon, obtaining of dihaploid lines, determination of haploid plants by different techniques. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **20**:425–430.
- Bektemur G, Yücel NK, Taşkın H, Çömlekçioglu S, Büyükalaca S (2014). Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization using irradiated pollen technique in squash. *Turkish Journal of Biology* **38**:318–327
- Berber M (2009) Production of haploids in naked seed pumpkins (*Cucurbita pepo* L. var. styriaca) by pollination with irradiated pollen. *Institute of Natural and Applied Sciences University of Çukurova*, MSc Thesis, 144 p.
- Çağlar G, Abak K (1999). Obtention of in vitro haploid plants from in situ induced haploid embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **23**:283–290.
- Davis AR, Perkins-Veazie P, Sakata Y, Lopez-Galarza, S, Marato JV, Lee SG, Huh YC, Sun Z, Miguel A, King SR, Cohen R, Lee JM (2008). Cucurbit grafting. *Critical Reviews in Plant Sciences* **27**: 50–74.
- Dolcet-Sanjuan R, Claveria E, Garcia-Mas J (2006). Cucumber (*Cucumis sativus* L.) dihaploid line production using in vitro rescue of in vivo induced parthenogenic embryos. *Acta Horticulturae* **725**:837–844.
- FAO (2012). Cucumber. Faostat. Available online: <http://faostat.fao.org/>.
- Göçmen M, Balkaya A, Kurtar ES, Şimşek İ, Karaağaç O (2014). Kabak (*Cucurbita spp.*) genetik kaynaklarının hıyar (*Cucumis sativus* L.) anaç ıslah programında değerlendirilmesi ve yerli hibrit anaçlarının geliştirilmesi. *TUBİTAK-TEYDEB, Proje Sonuç Raporu (311O194)*, 140s.
- Gürsöz N, Abak K, Pitrat M, Rode JC, Dumas de Vaulx R(1991). Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Cucurbit Genetic Cooperative*, **14**:109–110.
- Kurtar ES, Sarı N, Abak K (2002). Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). *Euphytica* **127**:335–344.
- Kurtar ES, Balkaya A, Özbakır M, Ofluoglu T (2009). Induction of haploid embryo and plant regeneration via irradiated pollen technique in pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poir). *African Journal of Biotechnology* **8**:5944–5951.
- Kurtar ES, Balkaya A (2010). Production of in vitro haploid plants from in situ induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **102**:267–277.
- Kurtar ES, Balkaya A, Okumuşoğlu NÖ (2012). Kara deniz bölgesi kestane kabağı (*Cucurbita maxima* Duchesne) ve balkabağı (*Cucurbita moschata* Duchesne) populasyonlarından selekte edilmiş genotiplerde ışınlanmış polen tekniği ile haploid embriyo ve bitki eldesi. *TÜBİTAK 108O390 Nolu Proje Kesin Sonuç Raporu*, 176s.
- Lotfi M, Alan AR, Henning MJ, Jahn MM, Earle ED (2003). Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Report* **21**:1121–1128.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* **15**: 473–497.
- Sarı N, Abak K, Pitrat M, Dumas de Vaulx R (1992). Induction of parthenogenetic haploid embryos and plant obtention in melon (*Cucumis melo* L. var. inodorus Naud and *C. melo* L. var. reticulatus Naud). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **16**:302–314.
- Sarı N (1994). Effect of genotype and season on the obtention of haploid plants by irradiated pollen in watermelon and alternatives to the irradiation. *Institute of Natural and Applied Sciences University of Çukurova*, PhD Thesis, 244 p.
- Sarı N, Ekiz H, Yücel S, Yetişir H, Ekbiç H, Abak K. (1999). Investigation of new protected cultivation melon lines resistant to *Fusarium oxysporium* f.sp. melonis using dihaplodization. *Turkey IIIrd National Horticultural Congress*, 14–17 September 1999, Ankara, pp. 498–503.
- Sauton A, Dumas De Vaulx R (1987). Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogéne'se induite par du pollen irradié'. *Agronomie* **7**:141–148.
- Sauton A (1989). Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. *Cucurbit Genetics Cooperative* **12**:22–23.
- Truong-Andre' I (1988). In vitro haploid plants derived from pollinisation by irradiated pollen on cucumber. In: *Proceedings of the Eucarpia meeting on cucurbit genetics and breeding*. May 31– June 2, Avignon-Montfavet, pp 143–144.