

Hıyarda (*Cucumis sativus L.*) *in situ* Uyartım Sonucu Elde Edilen Haploid Embriyolardan *in vitro* Haploid Bitki Oluşturma

Gülât ÇAĞLAR

Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, Erdemli, İçel-TÜRKİYE

Kazım ABAK

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 22.07.1996

Özet: Bu çalışmada hıyarda ışınlanmış polenlerle *in situ* uyartım sonucu elde edilen değişik gelişme safhalarındaki haploid embriyolar *in vitro* kültüre alınarak bitkiye dönüştürülmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, 1992–1994 yılları arasında yılın değişik mevsimlerinde dört değişik hıyar genotipinden elde edilen embriyolar steril koşullar altında E20A ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır. Embriyoların bitkiye dönüşüm oranları ile bitkiye dönüşme süreleri ve elde edilen bitkiciklerin *in vitro* gelişimleri incelenmiştir. Ayrıca bu bitkiciklerin *in vitro* klonlamayla çoğaltım olanakları 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–eylül ayları arasında *in vitro* kültüre alınan embriyolardan yılın öteki dönemlerine göre daha fazla sayıda haploid bitki elde edilmiştir. İkinci yıl haziran ayında embriyoların bitkiye dönüşümleri % 80'e ulaşmıştır. Elde edilen bitkicikler kullanılan besin ortamı üzerinde sağlıklı bir şekilde gelişmişler ve klonlamayla kolayca çoğaltılmışlardır. Arka arkaya yapılan çoğaltımlar arasında geçen süre yaklaşık 30'ar gün olmuş ve bitki başına elde edilen çelik sayısı da 3–12 arasında değişmiştir. Meyve başına haploid bitki sayısı çok yüksek olmamakla beraber, iki yılın sonunda 4 genotipten toplam olarak 190 adet haploid bitki elde edilmiştir.

Obtention of *in vitro* Haploid Plants From *in situ* Induced Haploid Embryos in Cucumber (*Cucumis sativus L.*)

Abstract: In this study the obtention of *in vitro* haploid plants from haploid embryos induced by pollination with irradiated pollen was investigated. The haploid embryos of four cucumber genotypes obtained in different season of the year were cultured on the E20A medium under aseptic condition in 1992–1994. The percentage of embryos that turned into plantlets, duration needed for plant formation, and *in situ* plantlet development were investigated. Also, the micropropagation possibility with cloning and propagation coefficient of plantlets were determined.

The ability of embryos at advanced–stages to form plants was found to be higher (60 % in the first year and 80 % in the second year) than the ones at globular stage. These embryos also produced haploid plants rapidly (in 3.5–day). A higher number of haploid plants was derived from the embryos that were cultured from May to September than from the ones that were cultured in other periods of a year. A maximum of 82 % of the embryos cultured in June produced haploid plants in the second year. The plantlets developed well on the media used and could be cloned with ease. The interval between successive clonings was approximately 30 days. The number of micro cuttings per plant ranged from 3 to 12. Beside that fact that the number of haploid plants per fruit was not high enough, total 190 haploid plants were obtained in four genotypes throughout the study.

Giriş

Bir türün normal kromozom sayısının (2n) yarısını taşıyan yani indirgenmiş gamet hücrelerinin kromozom sayısına (n sayıda) sahip olan bitkilere o türün "haploidler"i adı verilmektedir (1). Haploid bitkiler kök, gövde, dal, yaprak, çiçek ve bazı durumlarda meyveler de vererek normal gelişim gösterirler. Ancak haploid bireyler morfolojik olarak diploidlerin küçültülmüş örnekleridir ve biraz daha zayıf gelişirler (1, 2). Polen oluşturamayan bu bireyler kısırdırlar ve tohum bağlayamazlar (3, 4).

Bununla birlikte, dominansi söz konusu olmadığından haploid bitkiler genetik açıdan mükemmel deneysel materyallerdir. Ayrıca haploid bitkiler bazı kimyasallar ile muamele edilerek dihaploid duruma getirilmekte ve böylece kısa sürede, çok sayıda % 100 homozigot bitki hatları elde edilmektedir. Bu dihaploid bitkiler F1 hibrit çeşit ıslahında doğrudan ebeveyn olarak kullanılabilirdiği gibi kombinasyon ıslahı, dayanıklılık ıslahı ve seleksiyon ıslahı programlarına da dahil edilebilmektedirler (5).

Normal döllenmelerden sapmalar sonucu farklı yollardan doğada kendiliğinden ortaya çıkan haploid bitkiler uzun süredir bilinmekle beraber, ortaya çıkış frekanslarının çok düşük (% 0.01–0.001) olması nedeniyle ıslah programlarında bunlara yer verilememiştir (5, 6, 7, 8, 9). Düzenli ve yüksek oranda haploid bitki elde edilmesi için 1970'li yıllardan bu yana pek çok türde, değişik *in situ* uyartım yöntemleri ile dişi veya erkek gametlerin *in vitro* kültürü denenmiştir (10, 11, 12, 13). Bu uyartımlar sonucu bazı türlerde partenogenetik embriyolar elde edilebilmiş ve bu embriyoların bazıları bitkiye dönüşerek kontrollu ve düzenli olarak haploid bitki eldesine olanak sağlamıştır (14, 15).

Cucurbitaceae familyasına giren sebze türlerinin doğal olarak yabancı döllenmeleri nedeniyle ıslah çalışmaları çok uzun süre almaktadır (16). Bu sürenin kısaltılması, seleksiyonda kolaylık sağlanması, ıslah etkinliğinin artırılması gibi nedenlerle bu familya türlerinde de haploidi tekniğinden yararlanılmaya çalışılmıştır. Önceleri hem anterler, hem de oval ve ovaryumlar *in vitro* kültüre alınarak denenmiştir (17, 18). Anter kültürlerinden olumlu bir sonuç alınamamış, ovul–ovaryum kültürlerinden elde edilen bitki sayıları ise çok az olmuştur. 1990'lı yıllara doğru ise gama ışını uygulanmış polenlerle tozlamalar yaparak *in situ* haploid embriyo uyartımı ve bu embriyoların özel besin ortamları üzerinde *in vitro* kültüre alınarak bitkiye dönüştürülmesi araştırılmıştır. Bu yolla *Cucumis* türlerinin ilk haploid embriyoları kavunda elde edilmiş ve bu embriyoların *in vitro* bitkiye dönüştürülmesi için E20A ortamı geliştirilmiştir (19). Daha sonra aynı teknik hıyarda (20, 21) ve karpuzda (22) denenmiştir. Kavunda elde edilen bitki sayılarının yeterli düzeyde olması sonucu bu yöntem kavun ıslah programlarında rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır (23). Ancak hıyar ve karpuzda aynı yöntem kullanılarak elde edilen embriyo ve bitki sayıları istenilen düzeye henüz ulaşmamıştır (20, 24, 25). Bu nedenle bu iki türde *in situ* haploid embriyo uyartımı ve haploid embriyoların *in vitro* bitkiye dönüştürülmesi çalışmaları devam etmektedir. Burada sunulan çalışmada da ışınlanmış polenlerle *in situ* uyartım sonucu elde edilen değişik gelişim safhalarındaki embriyolardan *in vitro* bitki eldesi araştırılmıştır.

Materyal ve Metod

Araştırmalar 1992–94 yılları arasında Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsünde (Erdemli–İçel) yürütülmüştür. Çalışmada ikisi F1 hibrid (Qamar ve Seraset) ikisi de açık tozlanan (Dere ve Çengelköy) olmak üzere 4 genotipe ait globülerden kotiledona kadar değişik

gelişim safhalarında bulunan 3–4 haftalık haploid embriyolar başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

İki yıl süresince, birer aylık aralıklarla tohum ekimi yapılarak serada bitkiler yetiştirilmiştir. Bu bitkilerde gama ışını uygulanmış polenlerle yapılan kontrollu tozlamalar sonucu oluşan ve haploid embriyolar içeren meyveler, tozlamalardan 3–4 hafta sonra hasat edilerek laboratuvara getirilmiştir. Yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra steril kabin içerisinde açıdan meyvelerden tohumlar ayrılmıştır. Tohumlar bir pens ve bistüri yardımıyla açılarak mikroskop altında incelenmiştir. Bu tohumlar içerisinde çıkarılan haploid embriyolar embriyogenesis aşamasına göre gruplandırılmıştır. Bu embriyolar 7 cm çapında petri kutularındaki 10 ml'lik E20A besin ortamı üzerinde kültüre alınarak iklim odasına konulmuşlardır. Petrilerdeki embriyolar önce, 1 hafta süre ile ışıklandırılması "Cool daylight" tipi TLD 36 W/54 Cool floresan lambalar ile 2400 lux'e ayarlanan, 12 saatlik fotoperiyotta ve sıcaklığı 26 ± 1 °C olan iklim odasında bırakılmıştır. Daha sonra, aynı sıcaklıkta, fotoperiyodu 16 saat ve ışık şiddeti 3800 lux olan iklim odasına konulmuşlardır. Bitkiye dönüşen embriyolar iyi bir kök sistemi ve 2–3 yaprakçık oluşturduğunda içerisinde aynı bileşimdeki besin ortamı bulunan 2.5 x 15 cm boyutlarındaki deney tüplerine aktarılmışlardır.

Elde edilen haploid bitkilerin, daha sonra yapılacak sitolojik incelemeler ve diploidizasyon uygulamaları için vegetatif olarak çoğaltılmaları gereklidir. Test tüpleri içinde kısa sürede gelişerek sürgün ucu tüp kapağına ulaşan bitkiler steril kabin içine alınmış ve gövdesi parçalara ayrılarak mikroçelikleme yapılmıştır. Birer yaprak ve koltuk tomurcuğu taşıyan bu tek boğumlu mikro çeliklerin her biri, içerisinde taze besin ortamı bulunan tüplere ayrı ayrı dikilmişlerdir. Embriyoların bitkiye dönüşümleri ve bitkilerin mikroçoğaltımı sırasında aşağıdaki ölçüm ve sayımlar yapılmıştır:

– *Embriyoların bitkiye dönüşüm oranları (%)*: Globüler, yürek, torpedo ve kotiledon safhalarındaki embriyolar kültüre alınarak bunların bitkiye dönüşüm oranları kültüre alındıkları aylar dikkate alınarak % olarak hesaplanmıştır.

– *Embriyoların bitkiye dönüşüm süreleri (gün)*: Değişik safhalardaki 5'er embriyonun kültüre alınması ile kökçük ve sürgün ucu vermesi arasında geçen süre ortalama "gün" olarak verilmiştir.

– *Bitkilerin 1. çelikleme boyuna gelme süreleri (gün)*: Bir önceki özellikte incelenen embriyolardan gelişen 5'er bitki test tüplerine alınmış ve sürgün uçlarının tüp

kapağına değmesi (10–12 cm) arasında geçen süre ortalama “gün” olarak verilmiştir.

– *Mikroçeliklerin yeniden çelikleme boyuna gelmesi için geçen süre (gün)*: 4 genotipe ait 10’ar mikroçeliğin test tüplerine dikim tarihi ile bitkilerin tüp kapağına değmeleri arasında geçen süre ortalama “gün” olarak verilmiştir.

– *Bitki başına ortalama çelik sayısı (adet)*: 4 genotipe ait, 10–12 cm boya erişmiş 10’ar bitkiden elde edilen çelikler sayılmıştır.

– *Meyve başına haploid bitki sayısı (adet/meyve)*: Elde edilen toplam haploid bitki sayısının aylar ve genotipler dikkate alınarak toplam meyve sayısına bölünmesiyle belirlenmiştir.

Elde edilen bitkilerde daha sonraki aşamada kolhisin uygulama öncesi ve sonrasında Feulgen yöntemi kullanılarak kök ucu kromozom sayımları yapılmıştır.

Bulgular

1992–93 yılında *in vitro* kültüre alınan farklı gelişme dönemlerindeki embriyolar ile bu embriyolardan gelişen bitki sayıları ve bitkiye dönüşüm oranları Tablo 1’de aylara göre verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi, globüler safhadaki 128 adet embriyodan 35, yürek safhasındaki

92 adet embriyodan 23, kotiledon safhadaki 23 adet embriyodan 14 adet bitki elde edilmiştir. Torpedo safhasında kültüre alınan 11 adet embriyodan bitki elde edilememiştir. Ayrıca, bilinen embriyo gelişim safhalarından farklı şekillerde (anormal şekilli) bulunan 2 adet embriyonun biri de bitkiye dönüşmüştür. Embriyoların bitkiye dönüşüm oranları da, globüler safhada bulunanlarda % 27.3, yürek safhasındakilerde % 25.0 ve kotiledon safhasındakilerde % 60.9 olmuştur. Yıl içerisinde, değişik zamanlarda *in vitro* kültüre alınan embriyoların bitkiye dönüşümü en fazla mayıs, haziran ve eylül aylarında ve % 36–50 arasındaki oranlarda gerçekleşmiştir (Tablo 1).

1993–94 yılında *in vitro* kültüre alınan farklı gelişme dönemlerindeki embriyolar ile bu embriyolardan gelişen bitki sayıları ve bitkiye dönüşüm oranları da birinci yıldakine benzer bulunmuştur (Tablo 2). Buna göre globüler safhadaki 128 adet embriyodan 36, yürek safhasında 91 adet embriyodan 50, torpedo safhasında 5 adet embriyodan 4, kotiledon safhasında 22 adet embriyodan 18 adet bitki elde edilmiştir. Bu yılda elde edilen 10 adet anormal şekilli embriyonun ise 9’u bitkiye dönüşmüştür.

Embriyoların bitkiye dönüşüm oranları ise, globüler safhada bulunanlarda % 28.1, yürek safhasındakilerde %

Tablo 1. *In vitro* kültüre alınan farklı gelişme safhalarındaki embriyo sayıları ile bunlardan gelişen bitki sayıları ve bitkiye dönüşüm oranları (1992–93).

Aylar	Embriyo Safhaları												Toplam		
	Globüler			Yürek			Torpedo			Kotiledon					
	ES	BS	BD	ES	BS	BD	ES	BS	BD	ES	BS	BD	ES	BS	BD
Nisan	13	1	8	3	0	0	11	0	0	1	0	0	28	1	4
Mayıs	25	14	56	16	2	13	–	–	–	3	0	0	44	16	36
Haziran	33	12	36	42	12	29	–	–	–	18	13	72	93	37	40
Eylül	6	2	33	12	7	58	–	–	–	–	–	–	18	9	50
Ekim	31	3	10	12	1	8	–	–	–	1	1	100	43	5	12
Kasım	7	0	0	1	0	0	–	–	–	–	–	–	8	0	0
Aralık	12	3	25	6	1	17	–	–	–	–	–	–	18	4	22
Ocak	1	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	0	0
Şubat	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Mart	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Topl. ES	128			92			11			23			253		
Topl. BS		35			23			0			14			72	
BD %’si			27.3			25.0			0.0			60.9			28.5

ES: Embriyo sayısı (adet)

BS: Bitki Sayısı (adet)

BD: Embriyoların Bitkiye Dönüşüm Oranı (%)

Tablo 2. *In vitro* kültüre alınan farklı gelişme safhalarında embriyo sayıları ile bunlardan gelişen bitki sayıları ve bitkiye dönüşüm oranları (1993–94).

Aylar	Embriyo Safhaları														
	Globüler			Yürek			Torpedo			Kotiledon			Toplam		
	ES	BS	BD	ES	BS	BD	ES	BS	BD	ES	BS	BD	ES	BS	BD
Nisan	42	8	19	23	8	35	1	0	0	6	2	33	72	18	25
Mayıs	26	5	19	13	10	77	1	1	100	7	7	100	47	23	49
Haziran	13	7	54	13	13	100	2	2	100	6	6	100	34	28	82
Temmuz	16	3	19	10	5	50	–	–	–	–	–	–	26	8	31
Eylül	27	12	44	28	13	46	1	1	100	3	3	100	59	29	49
Ekim	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Kasım	–	–	–	2	0	0	–	–	–	–	–	–	2	0	0
Aralık	4	1	25	2	1	50	–	–	–	–	–	–	6	2	33
Ocak	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Şubat	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Mart	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Topl. ES	128			91			5			22			246		
Topl. BS		36			50			4			18			108	
BD %'si			28.1			55.0			80.0			81.8			44.0

ES: Embriyo sayısı (adet)

BS: Bitki Sayısı (adet)

BD: Embriyoların Bitkiye Dönüşüm Oranı (%)

55.0, torpedo safhasındakilerde % 80.0 ve kotiledon safhasındakilerde % 81.8 olmuştur. İleri gelişme dönemlerinde olan anormal şekilli embriyoların bitkiye dönüşme oranı ise % 90'a çıkmıştır.

Tablo 2'den de görüleceği üzere yıl içerisinde değişik zamanlarda *in vitro* kültüre alınan embriyoların bitkiye dönüşümleri en fazla, bir önceki yılda olduğu gibi yine mayıs, haziran ve eylül aylarında olup, yaklaşık % 49–82 oranında gerçekleşmiştir.

Bu çalışma kapsamında değişik safhadaki embriyoların bitkiye dönüşümüne kadar geçen süre de incelenmiştir. Buna göre, 4 genotipe ait globüler, yürek ve kotiledon safhalarındaki embriyoların kültüre alınmaları ile bitkiye

dönüşümleri arasında geçen sürelerin farklı olduğu görülmüştür. Yapılan istatistiksel analizlerde embriyoların bitkiye dönüşüm süreleri üzerine genotiplerin etkisinin önemli olmadığı, buna karşılık, embriyo gelişim safhalarının % 1 düzeyinde önemli olduğu görülmüştür. Tablo 3'de görüldüğü gibi, ileri gelişim safhasında bulunan embriyoların bitkiye dönüşüm süreleri kısalmıştır. Kotiledon safhadaki embriyolar ortalama 3.4 gün ile en kısa sürede bitkiye dönüşen gruba oluşturmuşlardır. Yürek safhasındaki embriyolar ortalama 3.9 günde bitkiye dönüşerek, kotiledon safhasındakilerle aynı grup içerisinde yer almışlardır. En geç bitkiye dönüşen embriyolar globüler safhadakiler olmuş ve bitkiye dönüşümleri için ortalama 7.4 gün geçmiştir.

SAFHALAR	ÇEŞİTLER				
	Qamar	Seraset	Dere	Çengelköy	Ort.
Globüler	4.8	6.0	10.8	8.0	7.4 a
Yürek	4.2	2.6	3.6	5.2	3.9 b
Kotiledon	3.2	2.4	3.4	4.4	3.4 b
Ort.	4.1	3.7	5.9	5.9	

Tablo 3. Farklı safhalardaki embriyoların bitkiye dönüşümü için geçen ortalama süre (gün).

D % 1 (Safhalar): 2.50; D % 1 (Çeşitler): Ö.D.

Embriyoların bitkiye dönüşüm süreleri üzerine genotiplerin etkisinin istatistiksel olarak önemli bulunmamasına karşın, hibrit çeşitler olan Seraset ve Qamar çeşitlerinde embriyolar ortalama 3.7–4.1 gün ile daha kısa sürede bitkiye dönüşmüşlerdir. Açık tozlanan Dere ve Çengelköy çeşitlerinde ise embriyoların bitkiye dönüşümleri için geçen süre ortalama 5.9 gün olmuştur.

In vitro kültüre alınan sert beyaz embriyoların çoğu kısa sürede normal haploid bitkiye (kök+sürgün+yaprak) dönüşüp hızla büyürken, bazılarında anormal gelişmeler görülmüştür. Bu embriyolardan etli bir gövde ve üzerinde çok küçük yaprakçıklar olan ama kök ve sürgün oluşturamayan, ya da uzun bir kökçük veren ancak bunun üzerinde küçük, yuvarlak ve yeşil bir gövdemsi parça bulunduran oluşumlar meydana gelmiştir. Bu oluşumlar bir kaç kez taze ortam üzerine aktarılmalarına karşın asla tam bir bitkiye dönüşmemiş ve 3–4 ay sonra ölmüşlerdir.

Değişik safhalarda kültüre alınan embriyolar bitkiye dönüşüp tüplere alındıktan sonra ilk çelikleme kadar geçen süre izlenmiştir. Kotiledon safhasında kültüre alınan embriyolardan gelen bitkilerde yaklaşık 30 günde ilk çelikleme yapılırken, globüler ve yürek safhasındaki embriyolardan gelen bitkilerde, ilk çelikleme için geçen süre daha uzun olmuştur. Kotiledon ve yürek safhasındaki embriyolardan gelen bitkilerde ikinci çelikleme için geçen

süre ise yine yaklaşık 30 gün olurken, globüler safhadaki embriyolardan gelen bitkilerde 34 gün olmuştur.

Birinci çelikleme, ortalama 30 gün ile en kısa sürede Dere ve Çengelköy çeşitlerinde yapılmıştır. Qamar ve Seraset çeşitlerinde bitkiler daha yavaş gelişmiş olup ilk çelikleme bitkiler tüplere alındıktan 34–35 gün sonra gerçekleştirilmiştir. İkinci çelikleme için geçen ortalama süre Qamar çeşidinde 35 gün olurken, öteki 3 çeşitte 30–31 gün olmuştur.

1992–93 yılında meyve başına haploid bitki sayısı en fazla Çengelköy çeşidinde ve haziran ayında elde edilmiştir (1.0 bitki/meyve) (Tablo 4). Bunu mayıs ve haziran aylarında meyve başına 0.58 bitki ile Dere çeşidi izlemiştir. Qamar ve Seaset çeşitlerinde ise meyve başına en fazla haploid bitki sayıları 0.56 ve 0.50 olmuştur. Mayıs–eylül ayları arasındaki, dönemde kültüre alınan embriyolardan elde edilen meyve başına bitki sayısı (0.39–0.53) öteki aylara göre daha fazla bulunmuştur. Birinci yılın ortalama değerleri dikkate alındığında meyve başına bitki sayıları tüm çeşitlerde düşük olup 0.11–0.24 arasında değişmiştir.

İlk yıl Qamar çeşidinde 27 adet, Seraset çeşidinde 13 adet, Dere çeşidinde 14 adet ve Çengelköy çeşidinde 19 adet olmak üzere toplam 73 adet haploid bitki elde edilmiştir.

Tablo 4. Dört genotipte mevsime bağlı olarak elde edilen meyve başına haploid bitki sayısı (1992–1993).

Aylar	Çeşitler														
	QAMAR			SERASET			DERE			GENGELKÖY			TOPLAM		
	BS	MS	MBBS	BS	MS	MBBS	BS	MS	MBBS	BS	MS	MBBS	BS	MS	MBBS
Nisan	1	6	0.17	0	6	0.00	0	0	0.00	0	6	0.00	1	18	0.06
Mayıs	6	16	0.38	0	4	0.00	7	12	0.58	3	9	0.33	16	41	0.39
Haziran	11	33	0.33	6	33	0.18	7	12	0.58	13	13	1.00	37	91	0.41
Eylül	5	9	0.56	5	10	0.50	0	0	0.00	0	0	0.00	10	19	0.53
Ekim	3	33	0.09	2	22	0.09	0	2	0.00	0	2	0.00	5	59	0.09
Kasım	0	22	0.00	0	17	0.00	0	3	0.00	0	17	0.00	0	59	0.00
Aralık	1	17	0.06	0	14	0.00	0	15	0.00	3	27	0.11	4	73	0.06
Ocak	0	9	0.00	0	6	0.00	0	9	0.00	0	7	0.00	0	31	0.00
Şubat	0	12	0.00	0	8	0.00	0	0	0.00	0	4	0.00	0	24	0.00
Mart	0	3	0.00	0	2	0.00	0	5	0.00	0	0	0.00	0	10	0.00
Toplam	27	150		13	122		14	58		19	85		73	415	
Ort.			0.18			0.11			0.24			0.22			0.18

BS: Bitki Sayısı (adet)

MS: Meyve Sayısı (adet)

MBBS: Meyve Başına Haploid Bitki Sayısı (adet)

1993–94 yılında da bir önceki yılda olduğu gibi Çengelköy çeşidinde ve haziran ayında meyve başına 1.33 adet haploid bitki ile en yüksek değere ulaşılmıştır (Tablo 5). Bunu meyve başına 1.2 bitki ile haziran ayında Qamar çeşidi izlemiştir. Seraset çeşidinde temmuz ayında meyve başına 0.6 adet bitki elde edilmiştir. Dere çeşidinde meyve başına bitki sayısı haziranda 0.33 adet olup öteki çeşitlere göre oldukça düşüktür. İkinci yıl ortalama değerleri dikkate alındığında meyve başına bitki sayıları 0.13–0.36 arasında olup, bir önceki yıldaki gibi düşük düzeyde gerçekleşmiştir. Yine, bir önceki yılda olduğu gibi mayıs–eylül ayları arasında kalan dönem bitki başına meyve sayısı bakımından iyi dönemdir (Tablo 5).

İkinci yıl Qamar çeşidinde 57 adet, Seraset çeşidinde 21 adet, Dere çeşidinde 15 adet ve Çengelköy çeşidinde 24 adet olmak üzere toplam 117 adet haploid bitki elde edilmiştir. Haploid bitkilere 4 saat süre ile % 0.5'lik kolhisin uygulanarak bunlar dihaploid duruma getirilmişlerdir. Daha sonra yapılan kromozom sayımları ile bu bitkilerin diploid ($2n=14$) oldukları doğrulanmıştır.

Tartışma

İki yıl süren bu çalışma sonunda sert yapıdaki toplam 256 adet globüler safhadaki embriyodan 71 adet, 183 adet yürek safhasındaki embriyodan 73 adet, 15 adet

torpedo safhasındaki embriyodan 4 adet ve 45 adet kotiledon safhadaki embriyodan 32 adet haploid bitki elde edilmiştir. Buna göre, globüler safhada bulunan embriyoların yaklaşık % 28'i bitkiye dönüşürken, yürek ve kotiledon safhalarında bu oran artarak % 40–71 arasında değişmiştir. Ayrıca, yürek ve kotiledon safhalarındaki embriyolar 3.5 günde, globülerler ise 7.4 günde bitkiye dönüşmüştür. Bu durum, ileri gelişim safhalarındaki embriyoların daha kısa sürede ve daha yüksek oranda bitkiye dönüştüğünü göstermektedir. Bu bulgular önceki çalışmalarla uyumludur (26, 27). Bazı embriyolar anormal gelişme göstermişler ve birkaç kez taze besin ortam üzerine aktarılmalarına karşın tam bir bitkiye dönüşemeyerek ölmüşlerdir. Bu tip gelişmeler özellikle aşırı sıcaklık ve virüs enfeksiyonları gibi etkenler nedeniyle bitki sağlığının bozulduğu dönemlerde ortaya çıkmıştır. Nitekim *Sauton* (28), kavunda yaptığı çalışmada haploid embriyoların canlılığını devam ettirebilmesinin ana ebeveynin fiziksel durumuna sıkı sıkıya bağlı olduğunu, zaman zaman embriyogenesiste bazı öldürücü anormalliklerin görüldüğünü bildirmiştir.

Denemenin her iki yılında da mayıs–eylül ayları arasındaki daha sıcak ve daha ışıklı dönemlerde hem embriyoların bitkiye dönüşüm yüzdeleri hem de meyve başına elde edilen bitki sayıları öteki aylara göre çok yüksektir. Özellikle 1993–94 yılında haziran ayında elde

Tablo 5. Dört genotipte mevsime bağlı olarak elde edilen meyve başına haploid bitki sayısı (1993–1994).

Aylar	Çeşitler														
	QAMAR			SERASET			DERE			GENGELKÖY			TOPLAM		
	BS	MS	MBBS	BS	MS	MBBS	BS	MS	MBBS	BS	MS	MBBS	BS	MS	MBBS
Nisan	5	45	0.11	0	48	0.00	8	26	0.31	5	34	0.15	18	153	0.12
Mayıs	5	17	0.29	4	23	0.17	5	19	0.26	11	13	0.85	25	27	0.35
Haziran	18	15	1.20	5	15	0.33	2	6	0.33	8	6	1.33	33	42	0.79
Temmuz	6	7	0.86	3	5	0.60	0	0	0.00	0	0	0.00	9	12	0.75
Eylül	22	24	0.92	7	21	0.33	0	0	0.00	0	0	0.00	29	45	0.64
Ekim	0	11	0.00	0	7	0.00	0	0	0.00	0	2	0.00	0	20	0.00
Kasım	0	1	0.00	0	4	0.00	0	1	0.00	0	1	0.00	0	7	0.00
Aralık	1	11	0.09	2	12	0.17	0	11	0.00	0	12	0.00	3	46	0.07
Ocak	0	12	0.00	0	12	0.00	0	11	0.00	0	12	0.00	0	47	0.00
Şubat	0	12	0.00	0	11	0.00	0	10	0.00	0	1	0.00	0	34	0.00
Mart	0	5	0.00	0	4	0.00	0	0	0.00	0	5	0.00	0	14	0.00
Toplam	57	160		21	162		15	83		24	86		117	492	
Ort.			0.36			0.13			0.18			0.28			0.24

BS: Bitki Sayısı (adet)

MS: Meyve Sayısı (adet)

MBBS: Meyve Başına Haploid Bitki Sayısı (adet)

edilen embriyoların % 82'si bitkiye dönüşmüştür. Bu durum, hıyar bitkisinin doğal gelişim isteklerine uygun olan sıcak dönemlerin haploid bitki eldesinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu bulgu daha önceki çalışmalarda kavunda elde edilmiş olan bulgularla benzerdir (28).

Bu çalışmada meyve başına elde edilen haploid bitki sayısı, tüm genotiplerde en iyi sonucu veren Mayıs–Eylül ayları arasındaki dönemde bile düşüktür. Yine de, bu araştırmada haziran ayında yapılan tozlamalarda Çengelköy çeşidinde meyve başına 1.33 adet, Qamar çeşidinde de 1.20 adet haploid bitki ile önceki çalışmalardan (20) adet yüksek değerler elde edilmiştir. Ancak meyve başına bitki sayılarının düşük olması, *in vitro* kültüre alınan embriyoların bitkiye dönüştürülmesi ile ilgili olmayıp, bir meyveden elde edilen tohumlardan çıkarılan haploid embriyo sayılarının düşük olmasıyla doğrudan ilişkilidir. Bu sonuçlar, hıyarda haploid bitki eldesinde son yıllarda kullanılmaya başlanan bu yöntemin *in vitro* kültür aşamasının başarıyla tamamlanabildiğini, buna karşılık *in situ* embriyo uyartımında başarı oranının artırılması üzerinde çalışılması gerektiğini göstermektedir. Bu

çalışmalarla embriyoların miktar ve kalitesi yükseltilebileceği takdirde, *in vitro* haploid bitki sayıları da artırılarak bu yöntem pratiğe aktarılabilir.

Haploid hıyar bitkilerinin gelişimleri ve mikroçoğaltımları sırasında kullanılan besin ortamı ve *in vitro* kültür koşulları yönünden bir güçlük karşılanmamıştır. *Cucurbitaceae* türlerindeki benzer çalışmalarda da bu besin ortamı ve kültür koşullarının başarıyla kullanıldığı görülmektedir (21, 22, 24, 25).

Literatürde *Cucurbitaceae* familyasına ait *in vitro* haploid bitkilerde meyve oluşumlarına ilişkin herhangi bir bilgiye rastlanılmamıştır. Bu çalışma sırasında bazı *in vitro* bitkilerde partenogenetik meyve oluşumu gözlenmiştir. Qamar, Seraset ve Çengelköy çeşitlerinde bu şekilde oluşan meyveler önce yeşil renkte, daha sonra sararak uzunca bir süre (2–3 ay) bitki üzerinde kalmışlardır. Bu durum *in vitro* tozlama çalışmaları için bir avantaj olabilir. Sonuç olarak, bu çalışmada ışınlanmış polenlerle uyartım sonucu oluşan haploid embriyolardan *in vitro* kültürde 190 adet haploid bitki elde edilmiş olması ülkemizde bu türde ilk kez denenen bu yöntemin hıyar ıslah çalışmaları açısından ümit verici olduğunu göstermektedir.

Kaynaklar

1. Bilge, E., Genetik. İstanbul Üniv. Yay. Sayı: 2886, Fen Fak. Yay. No: 163, 316 s. 1981.
2. Emiroğlu, Ü., Türk Tütün Çeşitlerinde Anter Kültürü. Bitki Islahı Simp., (22–25 Mayıs 1979). Ege Bölge Zir. Araş. Enst. Yay. No: 17/41, 12–18, 1980.
3. Emiroğlu, Ü., Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi. Ege Üniv. Zir. Fak. Yay. No: 450, İzmir 38 s. 1982.
4. Abak, K., Biber ıslahında anter kültüründen yararlanma. Bitki Islahı Simp. Bildiriler, TÜBİTAK TOAG Yay., 59–66, 1993.
5. Hermsen, J.G.T., Ramanna, M.S., Haploidy and Plant Breed. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Vol. 292, 499–507, 1982.
6. Bajaj, Y.P.S., In Vitro Production of Haploids. In: Handbook of Plant Cell Culture (eds: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada). Macmillan Publishing Company. Vol. 1, Chapter 6, 228–287, 1983.
7. Porchard, E., Dumas de Vaulx, R., Haploid parthenogenesis in *Capsicum annum* L. Reprinted from The Biology and Taxonomy of the Solanaceae (eds: G. Hawkins, R.N. Lester, A.D. Shelding). Linnean Society Symposium Series No: 7, 455–472, 1979.
8. Bhojwani, S.S., Razdan, M.K., Plant Tissue Culture. Theory and Practice. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 502 p. 1983.
9. Zhang, Y.X., Lespinasse, Y., Chevreau, E., Induction of Haploidy in Fruit Trees. In: In vitro Culture and Horticultural Breeding. (eds: J. Janicks, H. Zimmerman). Acta Horticulturae, 280, 293–305, 1990.
10. Hosemans, D., Bassoutrot, D., Induction of Haploid Plants from in vitro Culture of Unpollinated Beet Ovules (*Beta vulgaris* L.). Z. Pflanzenzüchtg. Berling. 91, 74–77, 1983.
11. Lespinasse, Y., Godicheau, M., Duran, M., Potential Value and Method of Producing Haploids on the Apple Tree, *Malus pumila* (Mill.). In Vitro Culture. Acta Horticulturae, 131, 223–230, 1983.
12. Pierik, R.L.M., In vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, 344 p. 1989.
13. Yang, H.Y., Zhou, C., In vitro gynogenesis. In: Plant Tissue Culture: Applications and Limitations (ed: S.S. Bhojwani). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. Chapter 10, 242–259, 1990.
14. Thorpe, T.A., The current status of plant tissue culture. In: Plant Tissue Culture: Applications and Limitations (ed: S.S. Bhojwani). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. Chapter 9, 220–242, 1990.
15. Sangwan, R.S., Sangwan-Norrel, B.S., Anther and Pollen Culture. In: Plant Tissue Culture: Applications and Limitations (ed: S.S. Bhojwani). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. The Netherlands, Chapter 9, 220–242, 1990.

16. Lower, R.L., Edwards, M.D., Cucumber Breeding. In: Breeding Vegetable Crops (ed: M.J. Basset). AVI Publishing Company Inc. Connecticut, 173–207, 1986.
17. Xue, G.R., Yu, W.Y., Fei K.W., Watermelon plants derived by in vitro anther culture. Plant Physiology Commun. (CHN), 4, 40–42, 1983.
18. Chambonnet, D., Dumas de Vaulx, R., Obtention of embryos and plants from in vitro culture of unfertilized ovules of Cucurbita pepo. Cucurbit Genetic Cooperative, 8, 66, 1985.
19. Sauton, A., Dumas de Vaulx, R., Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenèse induite par du pollen irradié. Agronomie, 7, 141–148, 1987.
20. Sauton, A., Haploid Gynogenesis in *Cucumis sativus* Induced by Irradiated Pollen. Cucurbit Genetic Cooperative, 12, 22–23, 1989.
21. Niemirowicz-Szczytt, K., Dumas de Vaulx, R., Preliminary Data on Haploid Cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction. Cucurbit Genetic Cooperative, 12, 24–25, 1989.
22. Gürsöz, N., Abak, K., Pitrat, M., Rode, J.C., Dumas de Vaulx, R., Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus*). Cucurbit Genetic Cooperative, 14, 109–110, 1991.
23. Sauton, A., Doubled haploid production in melon (*Cucumis melo* L.). Proceeding of the Eucarpia meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, Avignon–Montfavet, France, 31. May, 1988.
24. Pryozowski, J., Niemirowicz-Szczytt, K., Main factors affecting Cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid plant characteristics. Plant Breeding 112 (1) 70–75, 1994.
25. Sari, N., Abak, K., Pitrat, M., Rode, J.C., Dumas de Vaulx, R., Induction of Parthenogenetic Haploid Embryos After Pollination by Irradiated Pollen in Watermelon. HortScience, 29 (10), 1189–1190, 1994.
26. Custers, J.B.M., Bergervoet, J.H.W., In vitro culture of embryos of *Cucumis* spp.: heart-stage embryos have a higher ability of direct plant formation than advanced-stage embryos. Sexual Plant Reproduction, 3 (3) 152–159, 1990.
27. Cuny, F., Processus d'induction d'embryons haploides par du pollen irradié chez le melon (*Cucumis melo* L.). Responses du pollen à l'irradiation gamma. Thèse de Docteur, Spécialité "Biologie et Cytologie végétales", Univ. d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avig., 139 p, 1992.
28. Sauton, A., Effect of Season and Genotype on Gynogenetic Haploid Production in Muskmelon, *Cucumis melo* L. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 35, 71–75, 1988.