

## KABAK TÜRLERİNİN ÇEŞİT ISLAHINDA BİYOTEKNOLOJİNİN KULLANIMI<sup>1</sup>

Ertan Sait KURTAR<sup>2</sup>

Ahmet BALKAYA<sup>3</sup>

### ÖZET

Yeni bir çeşidin geliştirilmesinde biyoteknoloji, konvansiyonel ıslah metotlarıyla karşılaştırıldığında etkili bir ürün geliştirme tekniği olarak kabul görmektedir. Bu sebeple günümüz ıslah çalışmalarında biyoteknolojik ıslah metotları daha fazla ön plana çıkmaktadır. Sunulan bu derleme çalışmasında, *Cucurbita* türlerinin çeşit ıslah programlarında bazı biyoteknolojik ıslah metotları (dihaploidizasyon, türler arası melezlemeler ve embriyo kültürü, rejenerasyon, protoplast kültürü, rekombinant DNA teknolojisi, moleküler teknikler) ve bunların uygulamaları tartışılmıştır. Çalışmanın sonuçları, *Cucurbita* türlerinde çalışan ıslahçılara istenilen agronomik ve ekonomik özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesinde farklı bir bakış açısı sunabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** *Cucurbita*, ıslah, çeşit, biyoteknoloji

### ABSTRACT

#### THE USING OF BIOTECHNOLOGY IN CULTIVAR BREEDING OF *Cucurbita* VEGETABLE SPECIES

Compared to conventional breeding methods, biotechnology is approved a more effective crop improvement technique, requiring only a short time to develop a new variety. Thus, biotechnological breeding methods are distinguished in current breeding efforts. In view of this concept, this presented study aimed to provide an overview of biotechnology-based approaches in *Cucurbita* breeding programs. In this way, some biotechnological breeding methods (dihaploidization, interspecific hybridization, regeneration, protoplast culture, recombinant DNA technology, molecular techniques) and their applications were discussed. The results of study could provide a different perspective to *Cucurbita* breeders for the improvement of new varieties with desirable agronomic and economic traits.

**Keywords:** *Cucurbita*, breeding, cultivar, biotechnology

### GİRİŞ

Biyoteknolojik yöntemlerin kullanımı son yıllarda özellikle bitkisel üretimde klasik yöntemlerle çözülemeyen birçok soruna kısa

sürede ve kalıcı çözümler getirmektedir. Bitkisel üretimde biyoteknolojik yöntemlerin kullanılmasıyla birlikte klasik ıslah yöntemleriyle başılamamış birçok hedef başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bitki biyoteknolojisinin çalış-

<sup>1</sup> Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: Nisan 2017

<sup>2</sup> Doç. Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Bafra Meslek Yüksekokulu, Samsun

<sup>3</sup> Prof. Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Samsun

ma alanlarını genel olarak bitki doku kültürleri, gen mühendisliği ve DNA parmak izi çalışmaları şeklinde üç ana kısma ayırmak mümkündür. Bu ana gruplar altında uygulanan yöntemler ve uygulama alanları, Çizelge 1’de özetlenmiştir.

Biyoteknolojik yöntemlerin birçok avantajı olmasına rağmen; bu tür çalışmaların büyük bir çoğunluğunun yüksek maliyet oluşturması, eğitilmiş iş gücü gerektirmesi ve elde edilen ürünlerdeki patent hakları geniş alanlarda kullanımını sınırlayan olumsuz faktörlerdir. Bu derleme makalesinde, ekonomik önemi olan kabak türlerinde çeşit ıslah programlarında biyoteknolojiden yararlanma durumu, konu ile ilgili yürütülen bilimsel çalışmalar, karşılaşılan sorunlar ve bazı çözüm önerileri sunulmuştur.

### **Dihaploidizasyon Çalışmaları**

Günümüzde birçok bitki türünde çeşit ıslah programlarında saf hatların başarılı bir şekilde ve kısa bir sürede elde edilmesini sağlayan dihaploidizasyon tekniği, *Cucurbita* cinsi içerisinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Haploid bitki elde edilmesi konusundaki çalışmalar, son yıllarda daha çok anter ve ovül kültürleri ile ışınlanmış polen tekniği üzerinde yoğunlaşmıştır (Çizelge 2).

### **Anter ve Mikrospor Kültürünün Kullanımı**

*Cucurbita* cinsinde en çok kullanılan dihaploidizasyon yöntemi anter kültürüdür. Mikrospor kültürü ise henüz ıslah çalışmalarında kullanılacak boyuta gelmemiştir. Metwally ve ark. [38], Eskenderani F<sub>1</sub> kabak çeşidinin (*Cucurbita pepo* L.) anterlerini sakaroz ve 2,4-D’nin farklı konsantrasyonlarında kültüre almışlardır. Sekiz hafta sonra gelişen kalluslar, 0.23 µM kinetin ve 0.27 µM NAA (2-α naftalin asetik asit) içeren MS ortamlarına aktarılmıştır. Burada, bir ay gelişen bitkicikler daha sonra büyüme hormonları olmayan MS ortamına kök gelişimi amacıyla transfer edilmişlerdir. Araştırma sonucunda 150 g/l sakkaroz ve 5 mg/l 2,4-D eklenmiş MS ortamı en iyi sonucu vermiştir. Elde edilen 20 bitkiden, 10’unun haploid yapıda olduğu bildirilmiştir. Kestane kabağı (*Cucurbita maxima* Duch.) ve bal kabağında (*Cucurbita moschata* Duch.) farklı büyüme düzenleyicilerin anter kültürü yoluyla in vitro haploid bitki eldesi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, genotip ve ortam bileşimi

haploidizasyon üzerine etkili bulunmuştur [33]. Araştırma sonuçlarına göre en iyi sonuç; 57Si21 ve G9 kestane kabağı hatlarında 2.0 veya 4.0 mg/l BAP+0.05 mg/l NAA bileşimiyle ilk anter toplama zamanında elde edilmiştir. Bitkicikler 0.01 mg/l IAA eklenmiş MS ortamında başarılı bir şekilde mikro çelikleme yapılarak çoğaltılmıştır. Elde edilen toplam 74 bitkide yapılan ploidi analizi sonucunda, 35 bitkinin haploid ve 39 bitkinin ise diploid yapıda olduğu belirlenmiştir.

### **Ovul ve Ovaryum Kültürünün Kullanımı**

*Cucurbita* cinsinde haploid bitkilerin elde edilmesinde anter kültürüne bir alternatif olarak geliştirilen ovül-ovaryum kültürleri yazlık kabak ve kışlık kabak türlerinde verimli bir şekilde kullanılmaktadır. Chambonet ve Dumas De Vault [11], *in vitro*’da kültüre aldıkları *C. pepo*’nun ovüllerden haploid embriyo ve bitkiler elde etmişlerdir. Oluşan bitkiler; diploid, aneuploid, diploid-haploid kimeralı ve poliploid olarak tespit edilmiştir. Shail ve Robinson [49], *C. pepo* türüne ait 3 kabak çeşidinde anter ve ovül kültürü yaptıkları çalışmada, çeşitlerin sadece bir tanesinden kalluslar elde etmişlerdir. Ancak, araştırma sonucunda bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir. Kwack ve Fujieda [34], *C. moschata*’da 2 gün 5°C’de ön sıcaklık uygulanan ovaryumlardan alınan ovüllerin 30 g/l sakkaroz içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmasının en iyi sonucu verdiğini bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda, bir adet diploid (2n=40), iki adet tetraploid bitki elde edilmiştir. Gemesne ve Venczel [21], *Cucurbita pepo*’da döllenmemiş ovaryumları başlangıçta TDZ (Thidiazuron) ve %4 sakkaroz ilave edilmiş, daha sonra da NAA ve BA’nın farklı kombinasyonları kullanılmış ortama transfer etmişlerdir. Çalışmada, 6 hafta sonra her bir ovaryumdan yaklaşık 10-15 embriyonun oluştuğu belirlenmiştir. Elde edilen bitkiciklerin %70’inin haploid, %30’unun dihaploid ve aneuploid olduğu saptanmıştır. Gémes Juhász ve ark. [20], *Cucurbita pepo*’nun döllenmemiş ovaryumlarından 0.02 mg/l TDZ içeren MS ortamında geliştirdikleri kallusları, embriyo gelişimi için daha sonra farklı oranlarda NAA ve BA içeren MS ortamında kültüre almışlar ve haploid bitkiler elde etmişlerdir. Sakız ve Zeybek F<sub>1</sub> çeşitlerinin döllenmemiş ovaryumları 0.01, 0.1 ve 1.0 mg/l TDZ ilave edilmiş embriyo teşvik ortamlarına (CBM) dikilerek 3 hafta karanlık

koşullarda bekletilmiştir. Araştırma sonucunda, 0.1 mg/l TDZ içeren ortamda kallus geliştirilmiş, ancak bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir [60]. Shalaby [50], *Cucurbita pepo*'da ovül kültüründe en iyi sonucu 4 veya 32°C'de 4 gün bırakılmış ve %3 sakkaroz+1 mg/l kinetin+1 mg/l 2,4-D eklenmiş MS ortamından elde etmiştir. Elde edilen bitkilerin, %65'inin haploid ( $n=x=20$ ); %35'inin ise diploid ( $2n=2x=40$ ) yapıda bulunmuştur.

### ***Işınlanmış Polenlerle Tozlamanın Kullanımı***

Androgenesis ve gynogenesis yoluyla elde edilen haploidi frekansının düşük olduğu genotiplerde diğer bir alternatif yöntem olarak parthenogenesis de kullanılmaktadır. Bu yöntemde döllenme (çekirdeksel birleşme) olmaksızın dişi birey kaynaklı haploid embriyo uyartımı sağlanmakta ve rejenerasyon sonucunda haploid birkicikler elde edilmektedir. Bu yöntemde aktif olarak kullanılan en güncel teknik ışınlanmış polen tekniğidir. Bu teknikte polenler farklı ışın kaynakları (genellikle kobalt) ve dozları ile ışınlanarak genetiksel olarak inaktif hale getirilmekte, ancak çimlenme yeteneği kaybolmamış polenler ile partenogenetik haploidi

uyartımı sağlanmaktadır. Kurtar ve ark. [30] tarafından *C. pepo*'da farklı ışın dozları (25, 50, 75, 100, 200, 300 ve 400 Gray) ve farklı genotiplerle (Eskenderany F<sub>1</sub>, Acceste F<sub>1</sub>, Sakız ve Urfa Yerli) gerçekleştirdikleri çalışmada, farklı şekil ve gelişme dönemlerindeki (nokta, globüler, ok ucu, çubuk, torpedo ve kalp) embriyoları kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda, 50 Gy ışın dozunda 93 adet haploid bitki elde etmişlerdir. Berber [8], kabuksuz çekirdek kabaklarında (*C. pepo* var. *styriaca*) on beş genotip kullanarak 50, 100 ve 150 Gray ışın dozlarını denemiştir. Çalışmada tüm genotiplerden toplam 2073 embriyo elde edilmiştir. Bu embriyoların, 979 adedi bitkiye dönüşmüştür. En iyi sonuç, 150 Gray ışın dozu olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bitkilerin; %42.6'sı haploid ve %57.3'ü ise diploid olarak belirlenmiştir. *C. moschata* ve *C. maxima* türlerinde haploid bitki eldesi için ışınlanmış polen tekniğinin kullanıldığı diğer çalışmalarda, en iyi sonuç 50 ve 100 Gy Co<sup>60</sup> kaynaklı gama ışınları ile Temmuz döneminde alınmış ve dihaploid bitkiler elde edilmiştir [31, 32]. Baktetur ve ark. [5] *C. pepo* türünde ışınlanmış polen tekniği ile yapmış oldukları haploidizasyon çalışmasında en iyi sonuçları 150 Gy ışın dozundan ve 6 nolu genotipten almışlardır.

Çizelge 1. Bitkisel üretimde kullanılan biyoteknolojik yöntemler ve uygulama alanları

Table 1. The biotechnological methods and application areas in plant production

Amaç / Aim	Kullanılan Yöntem / Using Method
Mikro çoğaltım, genetik materyallerin korunması, hastalıklardan (virüs) arındırılmış bitki üretimi <i>Micropropagation, preservation of genetic materials, disease-free (virusless) plant production</i>	Meristem kültürü <i>Meristem culture</i>
Hibrit çeşit ıslahına yönelik dihaploid saf hatların eldesi <i>Obtention of dihaploid lines for the hybrid F<sub>1</sub> varieties</i>	Anter-mikrospor, ovül-ovaryum kültürleri, ışınlanmış polen tekniği <i>Anther-microspore, ovule-ovarium cultures, irradiated pollen technique</i>
Melez bitkilerin eldesi <i>Obtention of hybrid plants</i>	Türler arası melezlemeler ve embriyo kültürü <i>Interspecific hybridizations and embryo cultures</i>
Somaklonal varyasyon, <i>in vitro</i> seleksiyon, somatik embriyogenesis, sentetik tohum eldesi <i>Somaclonal variation, in vitro selection, somatic embryogenesis, synthetic seed production</i>	Hücre ve doku kültürleri <i>Cell and tissue cultures</i>
Somatik hibridizasyon, farklı melez türlerin eldesi <i>Somatic hybridization, obtention of hybrid species</i>	Protoplast kültürü <i>Protoplast cultures</i>
Farklı tarımsal özelliklere sahip genetiği değiştirilmiş bitkilerin eldesi <i>Production of genetically modified organisms with different agronomic traits</i>	Genetik mühendisliği, gen transplantasyonu <i>Genetic engineering, gene transplantation</i>
Konvansiyonel ıslah programlarında gen haritalarının oluşturulması, farklı bitkisel özellikler için genlerin tanımlanması <i>Generate of gene maps for conventional breeding programs, describe the genes for different plant characteristics</i>	Moleküler işaretleyiciler, RFLP, RAPD, AFLP, SSR. <i>Molecular markers, RFLP, RAPD, AFLP, SSR</i>
Bitki hastalıklarının teşhisi ve tedavilerinin geliştirilmesi <i>Identification of plant diseases and improve their treatments</i>	Monoklonal antikorlar-antikorlar <i>Monoclonal antibodies-anticorps</i>

Çizelge 2. *Cucurbita* türlerinde uygulanan haploidizasyon teknikleri ve sonuçları

Table 2. The application of haploidization techniques and their results in *Cucurbita* species

Türler Species	Teknikler Techniques	Sonuçlar Results	Kaynaklar Literatures
<i>C. maxima</i> Duch. (Kestane kabağı) (Winter squash)	Anter kültürü <i>Anther culture</i>	Kallus <i>Callus</i>	Shail ve Robinson [49]
		Haploid, diploid bitki <i>Haploid, diploid plant</i>	Kurtar ve ark. [33]
	Işınlanmış polen <i>Irradiated pollen</i>	Haploid bitki <i>Haploid plant</i>	Kurtar ve Balkaya [32]
<i>C. moschata</i> Duch. (Balkabağı) (Pumpkin)	Anter kültürü <i>Anther culture</i>	Kallus <i>Callus</i>	Shail ve Robinson [49]
	Ovül-ovaryum kültürü <i>Ovule-ovarium culture</i>	Embriyo <i>Embryo</i>	Kwack ve Fujieda [34]
	Işınlanmış polen <i>Irradiated pollen</i>	Haploid bitki <i>Haploid plant</i>	Kurtar ve ark. [31]
<i>C. pepo</i> (Yazlık kabaklar) (Summer squashes)	Anter kültürü <i>Anther culture</i>	Bitki <i>Plant</i>	Shail ve Robinson [49]
		Aneploid, diploid, haploid bitki <i>Aneploid, diploid, haploid plant</i>	Mohammed ve Refaei [40]
		Haploid, diploid bitki <i>Haploid, diploid plant</i>	Metwally ve ark. [37]
	Ovül-ovaryum kültürü <i>Ovule-ovarium culture</i>	Kallus <i>Callus</i>	Shail ve Robinson [49]; Yılmaz [60]
		Bitki <i>Plant</i>	Xie ve ark. [58]
		Haploid bitki <i>Haploid plant</i>	Dumas de Vaulx ve Chambonnet [13]; Gemesne ve Venczel [21]; Gemes-Juhasz ve ark. [20]
		Haploid, diploid bitki <i>Haploid, diploid plant</i>	Metwally ve ark. [39]; Shalaby [50]
		Aneploid, diploid, miksoploid, farklı ploidilerde bitki <i>Aneploid, diploid, mixoploid, plants at different ploidy status</i>	Chambonnet ve Dumas de Vaulx [11]
	Işınlanmış polen <i>Irradiated pollen</i>	Haploid bitki <i>Haploid plant</i>	Kurtar ve ark. [30]; Berber [8]; Baktemur ve ark. [5]

### **Kabak Grubunda Türler Arası Melezlemeler ve Embriyo Kültürünün Kullanımı**

Türler arası melezlemeler başta hastalıklara dayanımın sağlanması ve anaç ıslahı amacıyla kabakgiller familyasında sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin mildiyo, külleme ve hıyar mozaik virüsüne [4] dayanımın aktarılması için *C. okeechobeensis* (syn. *C. martinezii*), kabak sarı mozaik virüsü (ZYMV), papaya ringspot virüsü (PRSV) ve karpuz mozaik virüsüne (WMV) dayanımın sağlanması için *C. ecuadorensis* [47] türleri kullanılmaktadır. Türler arası melezlemelerde başarıyı etkileyen en önemli aşama, türler arasındaki uyuşumun sağlanması, yani canlı tohum ya da embriyolu tohum içeren meyvelerin eldesidir. *Cucurbitaceae* familyasına giren türlerin bazıları birbirleri ile verimli bir şekilde melezlenirken, bazılarında ise kısmen olumlu sonuçlar alınmaktadır.

Türler arası melezlemelerden sonra genellikle embriyo içeren ancak endosperm yoksunu

tohumlar ortaya çıkmakta, bu durum bu tip tohumlardan bitki elde edilmesini olanaklı kılan embriyo kültürünü zorunlu hale getirmektedir. *C. pepo* × *C. ecuadorensis*; *C. pepo* × *C. martinezii* [37]; *C. pepo* × *C. maxima* ve *C. pepo* × *C. argyrosperma* [2]; *C. ficifolia* × *C. maxima*; *C. pepo* × *C. moschata* [43]; *C. argyrosperma* × *C. moschata* [51] türler arası melez kombinasyonlarından embriyo kültürü ile başarılı bir şekilde bitkiler elde edilmiş ve çeşit ıslah programlarında kullanılmıştır. Embriyo kültüründe; BAP (Benzil Amino Purin), KIN (Kinetin) veya GA<sub>3</sub> (Giberellik Asit) ile modifiye edilmiş MS [42] ortamı başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Metwally ve ark. [37], *C. pepo* ve *C. martinezii* türler arası melezlemesinden elde ettikleri embriyoları MS ortamında 0.01 mg/l IAA ve 0.1 mg/l KIN ilavesiyle kültüre almışlar ve elde ettikleri bitkilerin tamamının diploid yapıda olduğunu belirlemişlerdir. Kurtar ve ark. [29] yazlık kabakta (*Cucurbita pepo* L.) türler arası

melezlemeler yoluyla haploid bitki eldesini amaçladıkları çalışmada, yazlık kabak türüne ait 4 genotipi karpuz, kavun, yerli hıyar, kışlık kabaklar, lif kabağı ve su kabağı ile tozlamışlar, ancak sadece yazlık kabak Sakız genotipi ve *C. moschata* melezlenmesinden embriyo taşıyan meyveler elde etmişlerdir. Bu meyvelerden çıkarılan 238 embriyo E20A besi ortamında kültüre alınmış, yapılan sitolojik incelemelerde elde edilen 144 bitkinin tamamının diploid yapıda ve melez oldukları tespit edilmiştir. Çağlar ve Bağcı [12] *Cucumis* cinsi içinde yer alan *C. melo* ve *C. sativus* arasında türler arası melezleme ile gen aktarımını sağlayabilme ve *C. melo* var. *flexuosus*'u iki tür arasında köprü türü olarak kullanabilme olanaklarını araştırmışlardır. Bu amaçla; *C. melo*, *C. sativus* ve *C. melo* var. *flexuosus* arasında melezlemeler yapılmıştır. %43–53 arasında meyve tutumunun sağlandığı çalışmada, melez meyvelerdeki embriyolar MS ortamında in vitro kültüre alınmış, embriyoların bitkiye dönüşüm oranı %12.5 ile %25.0 arasında gerçekleşmiştir. Araştırma sonucunda in vitro kültürde toplam 32 adet bitki geliştirilmiştir. Rakha ve ark. [46] *Cucurbita* (*C. moschata*, *C. ficifolia* ve *C. martinii*) türlerini baba ebeveyn ve 10 yazlık kabak (*Cucurbita pepo* L.) çeşidini ise ana ebeveyn olarak kullandıkları çalışmada sadece Queen F<sub>1</sub> × *C. ficifolia* ve MHTC77 F<sub>1</sub> × *C. martinii* türler arası melezlemelerinden sırasıyla %40 ve %15 oranlarında bitki elde etmişlerdir.

### **Regenerasyon Çalışmaları**

Hastalık ve zararlılara dayanıklılık özellikleri, genel olarak daha çok yabancı türlerde bulunmakta ve ıslah amaçlı olarak bu özellikleri taşıyan genler genetik mühendisliği sayesinde kültür formlarına aktarılmaktadır. Örneğin *C. ecuadorensis* ve *C. foetidissima* gibi bazı türler özellikle virüslere dayanıklılık genleri taşıdığından gen aktarımı çalışmalarında oldukça önemlidir. Dolaylı gen aktarımında, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Agrobacterium rhizogenes* bakterileri bu amaçla kullanılmaktadır. Bunların yanında, partikül tabancası ve elektroporasyon ile doğrudan gen aktarımı da yapılmaktadır. Gen aktarımındaki başarı, aktarılacak geni kabul edip sonra bölünme ve değişme ile tam bir bitki haline gelebilecek hedef hücrelere bağlıdır. Genelde hedef hücreler yaprak, gövde, hipokotil, kotiledonlar ve embriyolardır. Gen aktarılmış hedef hücrelerden

(explantlar), regenerasyon ile in vitro bitki eldesi önemli bir aşamadır. Bu aşamada indirek organogenesis (önce kallus, sonra bitkicik) yerine direk organogenesis daha çok tercih edilmektedir. Zira indirek regenerasyonda somaklonal varyasyon riski artmakta, bu ise kimerik veya transgenik bitkiler ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle, *Cucurbita* cinsindeki farklı türler ve tür içerisindeki farklı genotipler için uygun rejenerasyon koşullarının optimizasyonu gerekmektedir.

Abrie ve Van Staden [1] *C. maxima* ve *C. pepo* türlerinde BA, Kinetin, IP ve TDZ'nin IAA ile kombinasyonlarının kotiledon eksplantlarında sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Araştırmada, *C. maxima*'da 1 çeşitte somatik embriyolar elde edilmiş, diğer uygulamaların hiç birisinden olumlu sonuç alınamamıştır. Kintzios ve ark. [26], *C. pepo* yaprak explantlarını 186 µM kinetin içeren MS ortamında kültüre almışlar ve 4 bitki/cm<sup>2</sup> rejenerasyon etmişlerdir. *C. maxima*'da yapılan diğer bir çalışmada; fide yaşı, eksplant tipi ve besin ortamlarına katılan büyüme düzenleyicilerin etkisi incelenmiş, 1mg/l BA içeren MS ortamında kültüre alınan 4 günlük fidelerin proksimal kısımları en iyi sonucu vermiştir [35]. Lee ve ark. [36] *C. maxima* türünde kotiledon explantları ile yapmış oldukları çalışmada en iyi adventif sürgün gelişimini, 4 günlük fideleri 1mg/l BA içeren MS ortamında kültüre aldıklarında bildirmişlerdir. Flow sitometri analizleri sonucunda bitkilerin büyük bir çoğunluğu diploid olarak belirlenmiştir. *C. pepo* L.'nin farklı çeşitlerinin (True French, Ma'yan ve Goldy) kotiledon eksplantları 1 mg/l BA içeren MS ortamında kültüre alınmış, sadece kotiledonların proksimal kısımlarından adventif sürgünler elde edilmiştir [3].

Sarover ve ark. [48], türler arası melezlenmiş hibrit *C. pepo* çeşitlerinde direkt sürgün gelişimi için 5-gün-yaşlı eksplantlardan alınan sürgün uçlarının kullanılmasıyla etkili bir in vitro mikroçoğaltım protokolü geliştirmişlerdir. En iyi sonuçlar; 3 mg/l BA içeren MS ortamından alınmıştır. Elde edilen sürgünler, 1 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Urbanek ve ark. [55] *C. pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca*'da kotiledon explantlarını MS ortamında kültüre almışlar, en yüksek kallus oluşumu 26.85 µM NAA ve 13.32 µM BA içeren ortamda, en yüksek embriyonik gelişimini ise 16.11 µM NAA ve 4.44

$\mu\text{M}$  BA içeren ortamdan elde etmişlerdir. Elde edilen globüler aşamadaki embriyolar, 11.42  $\mu\text{M}$  IAA başarıyla çimlendirilmişlerdir. Yarımoğlu [59] *Cucurbita pepo* türünde yapmış olduğu regenerasyon çalışmasında kotiledon ve hipokotil eksplantlarından kallus elde etmiş, filamingo gagası tipindeki eksplantlarda besi ortamının kombinasyonuna göre %4 ile %48 arasında değişen oranlarda sürgün rejenerasyonu sağlamıştır. En yüksek rejenerasyon oranları, 2.0 mg/l TDZ, 2.0 mg/l TDZ+0.5 mg/l IAA ve 1.0 mg/l TDZ ilave edilen ortamlarda tespit edilmiştir. Yazlık kabak çeşitleri arasında en yüksek rejenerasyon Siyah, Sakız ve Zeybek F<sub>1</sub> çeşitlerinden elde edilmiştir. Kathiravan ve ark. [25], *Cucurbita pepo* gen kaynaklarında direk organogenesis üzerine yaptıkları çalışmada kotiledon eksplantlarını, 0.1 mg/l BA ve 1 mg/l GA<sub>3</sub> içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Kullanılan türlerin organogenesis tepkileri farklı olmuş, diploid bitkilerin yanı sıra miksoploid bitkiler de elde edilmiştir.

Pal ve ark. [44] *Cucurbita pepo*'da standart MS ortamında çimlendirdikleri fidelerden alınan hipokotil ve kotiledon explantlarını 2.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kallusa dönüştürmüşler ve 0.5 mg/l Thidiazuron içeren MS ortamına aldıkları kalluslardan %85 oranında sürgün gelişimi sağlamışlardır. Araştırmacılar, sürgünleri 1 mg/l IBA içeren ortamda köklendirerek normal bitkiler elde etmişlerdir. Hipokotil explantları, regenerasyonda daha başarılı bulunmuştur. Zhang ve ark. [62], bal kabağında (*C. moschata* Duch.) çoklu sürgün eldesi amacıyla kotiledon explantlarını MS ortamında kültüre almış, en iyi sonucu MS+0.5 mg/l BA içeren ortamdan elde etmişlerdir. Oluşan sürgünler, MS+0.1 mg/l NAA içeren ortamda başarılı bir şekilde büyütülmüştür. Kiss-Baba ve ark. [27], *C. pepo*'da regenerasyon için kullandıkları kotiledon explantlarından en yüksek başarıyı farklı oranlarda BA (0–1.2 mg/l) ve IAA (0–0.9 mg/l) içeren MS ortamından elde etmişlerdir. Stipp ve ark. [52] *C. pepo* (var. *Ceserta*)'da 4 günlük fidelerden alınan kotiledonla beraber küçük bir parça hipokotil içeren explantların 4.5  $\mu\text{M}$  of BAP içeren MS ortamında en iyi sonucu verdiğini ve bu regenerasyon protokolünün genetik transformasyonlarda kullanılmak üzere kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Tuncer [54], süs kabağında (*Cucurbita pepo* var. *ovifera*) 8 günlük fidelerden

alınan eksplantları MS ortamına aktarmış, maximum kallus uyartımı MS+2.0 mg/l 2,4-D, en yüksek sürgün sayısı ise hipokotil ve proksimal eksplantlarında 0.5 mg/l BAP+1.0 mg/l kinetin içeren ortamdan elde etmiştir. Mookhan [41], yazlık kabakta (*C. pepo* L.) 3–5 günlük kotiledon explantlarından en iyi sonucu MS ve B5 besi ortamlarında 0.5 mg/l BAP+1 mg/l GA<sub>3</sub>+15 mg/l Glutamin ilavesiyle almıştır. Oluşan sürgünler, 1 mg/l IBA içeren ortamda köklendirilmiş ve dış koşullara aktarılmıştır.

### **Protoplast Kültürlerinin Kullanımı**

Sitogenetik çalışmalarının yanında özellikle abiyotik ve biyotik stres çalışmalarında kullanılan protoplast kültürleri, normalde melezlenmesi mümkün olmayan türlerin hücresel boyutta elektrofizyon veya kimyasal fizyon ile çekirdeksel birleşiminin sağlanarak yeni bir türün veya melezin elde edilmesi işlemidir. *Cucurbitaceae* familyasında protoplast kültürü çalışmaları, ilk olarak 1975'li yıllarda başlamıştır. Hıyar ve kavun türlerinde izolasyon ve kültür protokolleri geliştirilmiştir [10, 24]. *C. moschata* × *C. maxima* melezi ile kavun arasında ve yine *C. myriocarpus* ile kavun arasında protoplast füzyonu ile somatik hibridizasyon gerçekleştirilmiş ancak verimli (fertil) bitkiler elde edilememiştir [18]. *C. melo*, *C. metuliferus*, *C. sativus* ve *C. zeyheri* türlerinde yaprak ve yaprak kaynaklı kalluslardan protoplast izolasyonu gerçekleştirilmiştir [19].

### **Rekombinant DNA Teknolojisinin Kullanımı**

Rekombinant DNA teknolojisi, başka bir kaynaktan alınan genin hedef organizmaya aktarılması ve genetik yapısı değiştirilmiş yeni bir organizmanın elde edilmesini kapsamaktadır. Bu teknik ile karpuz mozaik virüsü (WMV-2) ve kabak sarı mozaik virüsüne (ZYMV) dayanıklı ZW-20 ile hıyar mozaik virüsü (CMV), karpuz mozaik virüsü (WMV-2) ve kabak sarı mozaik virüsüne (ZYMV) dayanıklı CZW-3 isimli transgenik kabak (*C. pepo* L.) çeşitleri geliştirilmiş, 1994 ve 1996 yılında piyasaya sürülmüştür [53]. Transgenik ZW-20 hattı kullanılarak Freedom-II, Prelude-II, Patriot-II, Independence-II ve Declaration-II, CZW-3 hattı kullanılarak Destiny-III, Conqueror-III, Liberator-III, Judgement-III ve Justice-III isimli F1 yazlık kabak çeşitleri geliştirilmiştir [28].

### **Moleküler Tekniklerin Kullanımı**

Moleküler teknikler; hayvan, bitki ve mikrobiyal gen kaynaklarının tanımlanmasında, türler arası akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Son yıllarda, birden fazla gen tarafından kontrol edilen ve klasik ıslah yöntemleri ile belirlenmesi mümkün olmayan dayanıklı türlerin (özellikle biyotik ve abiyotik stres koşullarına dayanım) belirlenmesinde, hastalık etmenlerinin tanısında, istenilen özelliklerin aktarılıp aktarılmadığının kontrolünde moleküler tekniklerden yararlanılmaktadır. Kromozom üzerinde herhangi biri yeri gösteren, kalıtımı kolaylıkla belirlenebilen veya gözlemlenebilen küçük bir DNA parçası veya protein dizilimi olan "moleküler belirteçler" yardımıyla yukarıda bahis edilen konular çok kısa bir zaman içerisinde ve çok küçük bir hata payı ile belirlenebilmektedir. Moleküler belirteçler (markırlar) parmak izi çalışmalarında, genetik haritalamada, markır yardımcı seleksiyonda (MAS) ve gen klonlanması çalışmalarında günümüzde oldukça etkin kullanılmaktadır.

*Cucurbita* türlerinde moleküler tekniklerin kullanıldığı çalışmaların çoğunluğu, *C. pepo* türü üzerine yoğunlaşmıştır. Diğer kışlık *C. moschata* ve *C. maxima* türlerinde ise birkaç çalışma yapılmıştır. *C. pepo* türünde RFLP, AFLP, RAPD, ISSRs belirteçleri ile yapılmış çalışmalar genellikle yerel ve yabancı tipler arasındaki genetiksel ve evrimsel ilişkiler ile genetik çeşitliliğin belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır [15, 45]. *C. moschata*'da RAPD belirteçleri kullanılarak Kore ve Güney Afrika gibi bölgelerdeki genetik çeşitlilik belirlenmiştir [7, 61]. *C. maxima* türüne ait farklı tiplerde SRAP ve RAPD belirteçleri kullanılarak genetik çeşitliliğin belirlenmesi üzerinde bazı çalışmalar yapılmıştır [16]. Ferriol ve ark. [17] SRAP ve RFLP belirteçleri kullanarak *C. moschata* ve *C. maxima* türlerine ait birçok genotipte genetik çeşitlilik düzeyini belirlemişlerdir. Karadeniz Bölgesi kestane ve bal kabağı popülasyonlarından seçile edilen kestane kabağı ve bal kabağı çeşit adaylarının RAPD yöntemiyle yapılan çeşit tanımlamalarına göre de birbirlerinden genetik olarak farklı oldukları da saptanmıştır. Her bir primerden elde edilen DNA ürünlerinin sayısı 4–14 band arasında değişmiştir. Amplifikasyon oluşturan 21 primerden 130–2700 bp arasında

toplam 209 bant (153 polimorfik (%73) ve 56 monomorfik (%27)) elde edilmiştir [6].

*C. pepo* [14, 22, 63] ve *C. moschata* [23] türlerinde genetik haritalama konusunda da çalışmalar yapılmıştır. *C. pepo* türünde çiçek, yaprak ve kök hücrelerinden elde edilmiş 49.610 adet unigen içeren transkriptom bilgisi oluşturulmuş [9], bu genlerden %60'ı ile *C. pepo* genomuna ait önemli genlerin tespiti yapılmıştır. Bu transkriptom, moleküler belirteçlerin oluşturulmasında kullanılabilecek 10.000'den fazla potansiyel SSR ve SNP'nin tanınmasına da yardımcı olmuştur. *C. moschata* türünde yaprak, gövde ve sürgün kaynaklı 62.480 adet unigen içeren transkriptom dizilimi oluşturulmuş [56], bu genlerden %68'i tanımlanmış ve 8000 adet potansiyel SSR belirlenmiştir. Wyatt ve ark. [57] *Cucurbita pepo* var. *ovifera*'da meyve kalitesini geliştirmeye yönelik olarak meyve ve tohum kaynaklı bir transkriptom geliştirmişlerdir.

### **SONUÇ VE ÖNERİLER**

*Cucurbita* türlerinin ıslahındaki amaç ve hedefler ne olursa olsun, bunlara ulaşmada gidilecek yol, klasik ıslah yöntemleri ile biyoteknolojik yöntemlerin birlikte uygulanması ile mümkün olabilecektir. Genetiği değiştirilmiş organizmalara (GDO) karşı hala bir tüketici karşıtlığı olmasına rağmen biyoteknolojik yöntemler, özellikle genetik mühendisliği ve moleküler ıslah tekniklerin kullanımı ile aşılması zor ve hatta imkânsız görülen birçok engelin ortadan kaldırılması mümkün olabilecektir. Özellikle MAS tekniği, genetik mühendisliğine alternatif olması, çok kısa sürede ve daha az maliyetle sonuca ulaşılması sebebiyle önemli avantajlara sahip olarak görülmektedir. Ancak günümüzde halen *Cucurbita* türleri için bu tekniğin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Zira *Cucurbita* cinsine giren türlerin ticari yetiştiriciliği, halen birçok türe göre çok gerilerdedir ve biyoteknolojik çalışmaların çoğunluğu daha çok ekonomik türler üzerine yoğunlaşmıştır. Ayrıca *in vitro* rejenerasyon teknikleri, türler arası melezlemelerden sonra farklı özelliklere sahip genotiplerin eldesine olanak sağlayan embriyo kültürü çalışmaları, dihaploidizasyona olanak sağlayan androgenesis ve gynogenesis teknikleri, diğer türlerde olduğu

gibi, *Cucurbita* türlerinin gelecekteki ıslah çalışmalarında belirleyici olacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Abrie, A. L. and J. Van Staden, 2001. Micropropagation of the Endangered *Aloe polyphylla*. *Plant Growth Regulation* 33(1): 19–23.
2. Aggour, A. R., L. A. Badr and M. M. Ashry, 1999. Biotechnological Studies on Interspecific Crosses among Some *Cucurbita* Species. *First International Conference in Egypt, on Plant Tissue Culture and its Application* 255–275.
3. Ananthakrishnan, G., X. Xia, C. Elman, S. Singer, H. S. Paris, A. Gal-on and V. Gaba, 2003. Shoot Production in Squash (*Cucurbita pepo*) by *in vitro* Organogenesis. *Cell Biology and Morphogenesis*.
4. Andres, T. C. and R. W. Robinson, 2002. *Cucurbita Ecuadorensis*, an Ancient Semi-Domesticated With Multiple Disease Resistance and Tolerance to Some Adverse Growing Conditions. In: D. N. Maynard (ed.). *Cucurbitaceae 2002. ASHS Press, Alexandria, Va. p. 95–99.*
5. Baktemur, G., N. K. Yücel, H. Taşkın, S. Çömlekçioğlu ve S. Büyükalaca, 2014. Effects of Different Genotypes and Gamma Ray Doses on Haploidization Using Irradiated Pollen Technique in Squash. *Turkish Journal of Biology* 38:318–327.
6. Balkaya, A., E. S. Kurtar, R. Yanmaz ve M. Ozbakır, 2005. Karadeniz Bölgesinde Kışlık Kabak Türlerinde (Kestane Kabağı, *Cucurbita maxima* Duchesne ve Balkabağı, *Cucurbita moschata* Duchesne) Gen Kaynaklarının Toplanması, Karakterizasyonu ve Değerlendirilmesi. *TÜBİTAK 104O144 nolu Proje Sonuç Raporu* 160s.
7. Baranek, M., G. Stift, J. Vollmann and T. Lelley, 2000. Genetic Diversity within and between the Species *Cucurbita pepo*, *C. moschata* and *C. maxima* as Revealed by Rapid Markers. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 23:73–77.
8. Berber, M., 2009. Kabuksuz Çekirdek Kabaklarında (*Cucurbita pepo* L. var. *styriaca*) İşlenmiş Polenle Tozlaşma Yöntemiyle Haploid Üretimi (Yüksek Lisans Tezi). *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı*, 62 s.
9. Blanca, J., J. Canizares, C. Roig, P. Ziarso, F. Nuez and B. Pico, 2011. Transcriptome Characterization and High Throughput SSRs and SNPs Discovery in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *BMC Genomics* 12:1–15.
10. Bordas, M., L. González-Candela, M. Dabauza, D. Ramón and V. Moreno, 1998. Somatic Hybridization between an Albino *Cucumis melo* L. Mutant and *Cucumis myriocarpus* Naud. *Plant Science* 132:179–190.
11. Chambonnet, D. and R. Dumas De Vault, 1985. Obtention of Embryos and Plants from *in vitro* Culture of Unfertilized Ovules of *Cucurbita Pepo*. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 8:66.
12. Çağlar, G. ve S. Bağcı, 2004. Bazı *Cucumis* Türleri Arasındaki Melezlemelerde Embriyo Kurtarma Yoluyla *in vitro* Hibrit Bitki Regenerasyonu. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 17(2):175–182.
13. Dumas De Vault, R. and D. Chambonnet, 1986. Obtention of Embryos and Plants from *in vitro* Culture of Unfertilized Ovules of *Cucurbita pepo*. In: Genetic Manipulation in Plant Breeding. W. Horn, C. J. Jensen, W. Odenbach, O. Schieder (eds), *Proc. International Symposium Eucarpia, 8–12 Sept. 1985, Berlin. 295–297.*
14. Esteras, C., P. Gomez and A. J. Monforte, 2012. High-Throughput SNP Genotyping in *Cucurbita pepo* for Map Construction and Quantitative Trait Loci Mapping. *BMC Genomics* 13:1–21.
15. Ferriol, M., B. Pico and F. Nuez, 2003. Genetic Diversity of a Germplasm Collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP Markers. *Theoretical and Applied Genetics* 107:271–282.
16. Ferriol, M., B. Pico, P. Fernandez and F. Nuez, 2004a. Molecular Diversity of a Germplasm Collection of Squash (*Cucurbita moschata*) Determined by SRAP and FLP Markers. *Crop Science* 44:653–664.
17. Ferriol, M., B. Pico and F. Nuez, 2004b. Morphological and Molecular Diversity of a Collection of *Cucurbita maxima* Landraces. *Journal of the American Society for*



- Horticultural Science* 129(1):60–69.
18. Gajdova J., A. Lebeda and B. Navrátilová, 2004. Protoplast Cultures of *Cucumis* and *Cucurbita* spp. In: Lebeda A., Paris H. S. (eds), Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. *Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding. Palacký University in Olomouc, Olomouc: 441–454.*
  19. Gajdova, J., B. Navrátilová, J. Smolná and A. Lebeda, 2007. Effect of Genotype, Source of Protoplasts and Media Composition on *Cucumis* and *Cucurbita* Protoplast Isolation and Regeneration. *Acta Horticulturae* 731:89–94.
  20. Gémes Juhász, A., G. Venczel and P. Balogh, 1997. Haploid Plant Induction in Zucchini (*Cucurbita pepo* L. convar. *giromontiina* Duch) and in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Lines Through *in vitro* Gynogenesis. *Acta Horticulturae* 447:623–625.
  21. Gemesne, J. A. and G. Venczel, 1996. *in vitro* Gynogenesis Induction in Zucchini (*Cucurbita pepo* L. convar. *giromontiina* Duch) Lines. *Proceedings of the VI. Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding (1996) pp: 200–201.*
  22. Gong, L., G. Stift, R. Kofler, M. Pachner and T. Lelley, 2008a. Microsatellites for the Genus *Cucurbita* and an SSR–based Genetic Linkage Map of *Cucurbita pepo* L. *Theoretical and Applied Genetics* 117:37–48.
  23. Gong, L., M. Pachner, K. Kalai and T. Lelley, 2008b. SSR–based Genetic Linkage Map of *Cucurbita moschata* and its Synteny with *Cucurbita pepo*. *Genome* 51:878–887.
  24. Jarl, C. I., G. S. Bokelmann and J. M. De Haas, 1995. Protoplast Regeneration and Fusion in *Cucumis: melon* × *cucumber*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 43:259–265.
  25. Kathiravan, K., G. Vengedesan, S. Singer, B. Steinitz, H. S. Paris and V. Gaba, 2006. Adventitious Regeneration *in vitro* Occurs Across a wide Spectrum of Squash (*Cucurbita pepo*) genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 85:285–295.
  26. Kintzios, S., E. Sereti, P. Bluchos, J. B. Drossopoulos, C. K. Kitsaki and A. Liopa-Tsakalidis, 2002. Growth Regulator Pretreatment Improves Somatic Embryogenesis from Leaves of Squash (*Cucurbita pepo* L.) and Melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Reports* 21:1–8.
  27. Kiss–Baba, E., S. Panczel, K. Simonyi and G. D. Bisztray, 2010. Investigations on the Regeneration Ability of Squash Cultivars. *Acta Agronomica Hungarica* 58(2):159–166.
  28. Klas, F. E., M. Fuchs and D. Gonsalves, 2011. Fruit Yield of Virus–Resistant Transgenic Summer Squash in Simulated Commercial Plantings under Conditions of High Disease Pressure. *Journal of Horticulture and Forestry* 3(2):46–52.
  29. Kurtar, E. S., N. Sarı ve K. Abak, 2000. Kabakta Bazı *Cucurbita* Türleri ile Tozlamının Haploid Embriyo Uyarımına Etkileri. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 15(2):43–47.
  30. Kurtar, E. S., N. Sarı and K. Abak, 2002. Obtention of Haploid Embryos and Plants through Irradiated Pollen Technique in Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Euphytica* 127:335–344.
  31. Kurtar, E. S., A. Balkaya, M. Özbakır and T. Ofluoğlu, 2009. Induction of Haploid Embryo and Plant Regeneration via Irradiated Pollen Technique in Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poir). *African Journal of Biotechnology* 8(21):5944–5951.
  32. Kurtar, E. S. and A. Balkaya, 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 and Organ Culture* 102(3):267–277.
  33. Kurtar, E. S., A. Balkaya and D. Kandemir, 2016. Evaluation of Haploidization Efficiency in Winter Squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) Through Anther Culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 127:497–511.
  34. Kwack, S. N. and K. Fujieda, 1988. Somatic Embryogenesis in Cultured Unfertilized Ovules of *Cucurbita moschata*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 57:34–42.
  35. Lee, Y. K. and W. I. Chung, 2002. Plant Regeneration via Organogenesis in the Korean and Japanese Winter Squash (*Cucurbita Maxima*). *Proc. 2<sup>nd</sup> IS on Cucurbits. Acta Horticulturae* 588.
  36. Lee, Y. K., W. I. Chung and H. Ezura, 2003. Efficient Plant Regeneration via

- Organogenesis in Winter Squash (*Cucurbita maxima* Duch.). *Plant Science* 164:41–418.
37. Metwally, E. I., S. A. Haroun and G. A. El-Fadly, 1996. Interspecific Cross between *Cucurbita pepo* L. and *Cucurbita martinii* Through *in vitro* Embryo Culture, *Euphytica* 90:1–7.
  38. Metwally, E., S. A. Moustafa, B. I. El-Sawy, S. A. Haroun and T. A. Shalaby, 1998a. Production of Haploid Plants from *in vitro* Culture of Unpollinated Ovules of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 52(3):117–121.
  39. Metwally, E., S. A. Moustafa, B. I. El-Sawy and T. A. Shalaby, 1998b. Haploid Plantlets Derived by Anther Culture of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 52(3):171–176.
  40. Mohammed, M. F. and E. F. S. Refaei, 2004. Enhanced Haploids Regeneration in Anther Culture of Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 27:57–60.
  41. Mookhan, M., 2015. Direct Organogenesis from Cotyledonary Node Explants of *Cucurbita pepo* (L.) An Important Zucchini Type Vegetable Crop. *American Journal of Plant Science* 6:157–162
  42. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiol* 15:473–497.
  43. Oliveira, A. C. B., W. R. Maluf, J. E. B. P. Pinto and S. M. Azevedo, 2003. Resistance to Papaya Ringspot Virus in Summer Squash *Cucurbita pepo* L. Introgressed from an Interspecific *C. pepo* × *C. moschata* cross. *Euphytica* 132:211–215.
  44. Pal, S. P., I. Alam, M. Anisuzzaman and K. K. Sarker, 2007. Indirect Organogenesis in Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Turkish Journal of Agriculture* 31:63–70.
  45. Paris, H. S., N. Yonash, V. Portnoy, N. Mozes-Daube, G. Tzuri and N. Katzir, 2003. Assessment of Genetic Relationships in Four *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) Using DNA markers. *Theoretical Applied Genetics* 106:971–978.
  46. Rakha, M. T., E. I. Metwally, S. A. Moustafa, A. A. Etman and Y. H. Dewir, 2012. Production of *Cucurbita* Interspecific Hybrids through Cross Pollination and Embryo Rescue Technique. *World Applied Sciences Journal* 20(10):1366–1370.
  47. Robinson, R. W., 1987. Inheritance of Fruit Skin Color in *Cucurbita Moschata*. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 10:84.
  48. Sarover, S., H. Y. OH, N. I. Hyung, B. W. Min, C. H. Harn, S. K. Yang, S. H. OK and J. S. Shin, 2003. *In vitro* Micropropagation of a *Cucurbita* Interspecific Hybrid Cultivar—a Root Stock Plant. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 75:179–182.
  49. Shail, J. W. and R. W. Robinson, 1987. Anther and Ovule Culture of *Cucurbita*. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 10:92.
  50. Shalaby, T. A., 2007. Factors Affecting Haploid Induction Through *in vitro* Gynogenesis in Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Science Horticultural* 115(1):1–6.
  51. Sisko, M., A. Ivancic and B. Bohanec, 2003. Genome Size Analysis in the Genus *Cucurbita* and its use for Determination of Interspecific Hybrids Obtained Using the Embryo-Rescue Technique. *Plant Science* 165:663–669.
  52. Stipp, L. C. L., B. A. Cristina, M. Hara, B. M. J. Mendes, 2012. *In vitro* Rganogenesis of Zucchini Squash cv. Caserta. *Horticultura Brasileira* 30:274–278.
  53. Tricoli, D., K. J. Carney, P. F. Russell, J. R. McMaster, D. W. Groff, K. C. Hadden, P. T. Himmel, J. P. Hubbard, M. L. Boeshore and H. D. Quemada, 1995. Field Evaluation of Transgenic Squash Containing Single or Multiple Virus Coat Protein Gene Constructs for Resistance to Cucumber Mosaic Virus, Watermelon Mosaic Virus 2 and Zucchini Yellow Mosaic Virus. *Nature Biotechnology* 13:1458–1465.
  54. Tuncer, B., 2013. Callus Proliferation and Shoot Regeneration from Different Explant Types in Ornamental Gourd (*Cucurbita pepo* var. *ovifera*). *Yüziüncü Yıl University Journal Agricultural Science* 23(2):164–171.
  55. Urbanek, A., B. Zechmann and M. Muller, 2004. Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in Styrian Pumpkin: Cytological and Biochemical Investigations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 79:329–340.
  56. Wu, T., S. Luo and R. Wang. 2014. The First Illumina-Based De Novo Transcriptome

- Sequencing and Analysis of Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) and SSR Marker Development. *Mol Breeding* 34:1437–1447.
57. Wyatt, L. E., S. R. Strickler, L. A. Mueller and M. Mazourek, 2015. An Acorn Squash (*Cucurbita pepo* ssp. *ovifera*) Fruit and Seed Transcriptome as a Resource for the Study of Fruit Traits in Cucurbita. *Horticulture Research*, doi: 10.1038/hortres.2014.70.
58. Xie, B., X. F. Wang and Z. C. Fan, 2006. Improved Conditions of *in vitro* Culture of Unpollinated Ovules and Production of Embryonary Sac Plants in Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Scientia Agricultura Sinica* 39(1):132–138.
59. Yarımoğlu, M., 2004. Bazı Yazlık Kabak Çeşitlerinde (*Cucurbita pepo* L.) *in vitro* Bitki Regenerasyonu (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 35s.
60. Yılmaz, Ö., 2005. Yazlık Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Ovaryum Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Edilmesi (Yüksek Lisans Tezi). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 66s.
61. Youn, S. J. and H. D. Chung, 1998. Genetic Relationships among the Local Varieties of the Korean Native Squashes (*Cucurbita moschata*) Using RAPD Technique. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 39:517–521.
62. Zhang, Y., J. Zhou, T. Wu and J. Cao, 2008. Shoot Regeneration and the Relationship between Organogenic Capacity and Endogenous Hormonal Contents in Pumpkin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 93:323–331.
63. Zraidi, A., G. Stift, M. Pachner, A. Shojaeiyan, L. Gong and T. A. Lelley, 2007. Consensus Map for *Cucurbita pepo*. *Mol Breeding* 20:375–388.