

## BAZI *CUCUMIS* TÜRLERİ ARASINDAKİ MELEZLEMELERDE EMBRİYO KURTARMA YOLUYLA *IN VITRO* HİBRİT BİTKİ REGENERASYONU

Gülât ÇAĞLAR

KSÜ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü – Kahramanmaraş, Türkiye

Sefair BAĞCI

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı İl Müdürlüğü.- Kahramanmaraş, Türkiye

### Özet

Bu çalışmada *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 olanakları araştırılmıştır. Bu amaçla *C. melo*, *C. sativus* ve *C. melo* var. *flexuosus* arasında melezlemeler yapılmıştır. Kontrollü tozlamalardan iki hafta sonra hasat edilerek laboratuvara getirilen ve % 30'luk hipoklorit çözeltisinde yüzey dezenfeksiyonuna tabii tutulan meyvelerdeki tohumlar açılarak içerisindeki embriyolar çıkarılıp MS ortamında *in vitro* kültüre alınmıştır. Melezlemelerdeki meyve tutum oranları *C. flexuosus* x *C. sativus* tozlanmasında % 50, *C. flexuosus* x *C. melo* 'da % 46.6, *C. melo* x *C. flexuosus* 'da % 53.3 ve *C. melo* x *C. sativus* 'da % 33.3, *C. sativus* x *C. flexuosus* 'da % 53.3, *C. sativus* x *C. melo* 'da % 43.3 olmuştur. Meyve başına tohum sayısı ortalama 117 adet ile *C. flexuosus* x *C. sativus* kombinasyonunda en düşük, 432.8 ile *C. melo* x *C. sativus* 'da en yüksek bulunmuştur. Ancak *C. melo* x *C. sativus* 'daki tohumların çoğunun boş olduğu ve embriyo içeren tohum oranının % 32.2 ile en düşük düzeyde kaldığı görülmüştür. Buna karşın *C. melo* ile *C. flexuosus* arasında yapılan melezlemelerde tohumların tamamına yakınının (%90) embriyo içerdiği belirlenmiştir. Embriyoların bitkiye dönüşüm oranı % 12.5 ile % 25.0 arasında gerçekleşmiştir. Bu embriyolardan *in vitro* kültürde toplam 32 adet bitki gelişmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Cucumis*, Türler arası melezleme, Embriyo kurtarma.

### *In Vitro* Hybrid Plant Regeneration by Embryo Rescue in Interspecific Hybridization between Some *Cucumis* Species

#### Abstract

In this study, the possibility of gene transferring by interspecific hybridization between *C. melo* and *C. sativus*, and also the usage of *C. melo* var. *flexuosus* as a bridge between the former two species were investigated. Reciprocal crosses were made among *C. melo*, *C. sativus* and *C. melo* var. *flexuosus*. Two weeks after controlled pollinations, fruits were harvested and surface sterilized by 30 % hypochlorite. The embryos were rescued from the seeds and *in vitro* cultured on MS solid media. The percentages of fruit settings were 50 % in *C. flexuosus* x *C. sativus*; 46.6 % in *C. flexuosus* x *C. melo*; 53.3 % in *C. melo* x *C. flexuosus*; 33.3 % in *C. melo* x *C. sativus*; 53.3 % in *C. sativus* x *C. flexuosus*; 43.3 % in *C. sativus* x *C. melo*. The seed number per fruit was lowest in *C. flexuosus* x *C. sativus* (117.0) and highest in *C. melo* x *C. sativus* (432.8). However, many of the seeds in the combination of *C. melo* x *C. sativus* were empty and the percentage of seeds with embryo was lowest (32.2 %). In the combination of *C. melo* and *C. flexuosus*, most of the seeds (over 90 %) contained embryos. The plant regeneration rate ranged from 12.5 to % 25.0. A total of 32 plantlets was obtained *in vitro* from these embryos.

**Keywords:** *Cucumis*, Interspecific hybridization, embryo rescue

### 1. Giriş

Türler arası melezleme bitki ıslahında biyotik veya abiyotik stres koşullarına dayanıklılık genlerinin yabancı türlerden kültür formlarına aktarılması ya da ekonomik açıdan önemli bir özelliğin bir türden başka akraba bir türe aktarılması amacıyla kullanılmaktadır (Bowley ve Taylor, 1987). Doğadaki çiçekli bitkilerin yaklaşık % 30-35'i türler arası melezleme ve bunu takiben kromozom katlanması

yoluyla ortaya çıkmıştır (Stebbing, 1971). Ancak deneysel türler arası melezlemelerde ebeveynlerin genomları arasında homojenitenin olmaması nedeniyle, oluşan embriyoların aborsiyonu sonucu bitki elde edilememesi veya melez bitkiler oluşturulsa bile bu bitkilerin fertil olmaması çok sık karşılaşılan durumlardır. Uygun yöntemlerle bu sorunlar çözümlendiğinde türler arası melezleme bir türden diğerine gen

transferinde çok etkin bir yöntem olmaktadır.

Türler arası melezlemelerde en sık rastlanan sorun döllenmeden sonra meydana gelen zigot veya genç embriyonun aborsiyonudur. Melez embriyonun erken aşamadaki aborsiyon sorunu, döllenmeden sonra zigot içeren tohum taslaklarının veya yumurtalık içinde gelişmekte olan embriyonun gelişmenin herhangi bir aşamasında çıkarılarak özel steril bir ortamda *in vitro* kültüre alınmasıyla ortadan kaldırılabilmektedir (Pierik, 1989).

Cucurbitaceae familyasında türler arası hibritler *Cucurbita* (Weeden ve Robinson, 1986), *Cucumis* (Deakin ve ark., 1971; Subha ve ark., 1986) ve *Luffa* (Singh, 1991) cinsleri içerisindeki bazı türler arasında oluşturulabilmiştir. Ancak Cucurbitaceae familyası içerisinde, yeni genotiplerin geliştirilmesinde türler arası melezlemenin başarıyla kullanılması sadece *Cucurbita* cinsinde yapılabilmektedir. Kabaklar içerisinde ekonomik önemi en büyük olan yazlık kabakların (*Cucurbita pepo* L.) külleme ve diğer virüs hastalıklarına hassasiyetleri nedeniyle bunlar üzerinde yapılan çalışmalarda *C. moschata*'dan *C. pepo*'ya ve yine *Cucurbita moschata* L. köprü tür olarak kullanılarak *Cucurbita okeechobeensis* sup.martinezii'den *C. ecuadorensis*'e, embriyo kültürü yöntemi yardımı ile çoklu dayanıklılık aktarılmıştır (Robinson, 2001).

*Cucumis* cinsi içerisinde ekonomik öneme sahip türler sadece kavun (*Cucumis melo* L., 2n=24) ve hiyardır (*Cucumis sativus* L., 2n=14). Yabani *Cucumis* türlerinin önemi de birçok hastalıklara karşı dayanıklılık genlerine sahip olmaları nedeniyle uzun zamandır bilinmektedir (Lower ve Edwards, 1986; Leppick, 1996).

Kavun ile hiyar ve diğer türler arasında ilk melezleme denemeleri 1859'da Naudin tarafından başlatılmıştır (Chen ve Adelberg, 2000). Ancak *Cucumis* türleri arasında yapılan melezlemelerdeki uyuşmazlıklar nedeniyle başarılı sonuçlar alınmamıştır.

*Cucumis* türleri arasında yapılan melezlemelerdeki uyuşmazlıklar stigma üzerine gelen polenin çimlenmesinin geciktirilmesi (Charterjee ve More, 1991a),

polen tüpünün dişicik borusu içerisinde ilerlemesinin engellenmesi, polen tüpünün ovule ulaşmaması (Kishi ve Fujishita, 1969; de Vaulx., 1979), döllenme olsa bile zigotta hücre bölünmesinin meydana gelmemesi nedeniyle embriyo oluşmaması (Kishi ve Fujishita, 1970), endospermin veya embriyonun erken dönemde aborsiyonu (Ondrej ve ark., 2001b) gibi bir çok nedenden ileri gelebilmektedir. *Cucumis* türleri arasındaki bu melezleme uyuşmazlığını aşabilmek için klasik ve biyoteknolojik çeşitli yöntemler denenmiştir. Büyüme düzenleyicilerin uygulanması (Custers ve Den Nijs, 1986), polenlerin ışınlanması (Beharav ve Cohen, 1994), mentor polen kullanılması (Kho ve ark., 1980; Oost ve ark., 1979) gibi teknikler yanında somatik hibridizasyon (Debeaujon ve Branchard, 1990; Charterjee ve More, 1991b; Tang ve Punja, 1989), protoplast füzyonu (Fellner ve ark., 1996) gibi biyoteknolojik yöntemler de denenmiştir. Ancak son yıllara kadar hiç birinde tekrarlanabilir bir başarı elde edilememiştir.

Lebeda ve ark. (1999), küllemeye dayanıklılığı geliştirmek için *Cucumis sativus* x *Cucumis melo* türleri arasında klasik melezleme yaparak, elde etmiş oldukları 7 embriyonun *in vitro* kültürde gelişimlerini gözlemişlerdir. Embriyolardan 5 tanesinde küçük kökler veya sürgün meristemi gelişmiş fakat daha sonra güçlü bir poliploidi eğilimi nedeniyle kallus gelişimi hakim olmuştur. En iyi gelişen embriyodan elde edilen kallusta erken aşamada yapılan izoenzim analizi ile hibrid orijinleri doğrulanmıştır. Embriyolardan 2 tanesi çiçekli tam bitkiye dönüşmüştür.

*Cucumis* türleri arasındaki ilk tekrarlanabilen melezleme başarısı, tozlama sonrası embriyo kurtarma yöntemi kullanılarak, farklı kromozom sayılarına sahip *Cucumis sativus* L. (2n=14) ile yabani bir tür olan *Cucumis hystrix* Chakr. (2n=24) arasındaki melezlemede elde edilmiştir (Chen ve ark. 1997). Kromozom sayısı 2n=19 olan orijinal F1 hibritte fertilitiyi sağlamak için daha sonra *in vitro* kültürde somaklonal varyasyonlarla kromozom katlaması yapılmış (Chen ve Staub, 1997) ve doğada bulunmayan yeni bir sentetik tür (2n=4x=38) oluşturularak (Chen ve ark.

1998) “*Cucumis hytivus* Chen and Kirkbride” olarak isimlendirilmiştir (Chen ve ark., 2001). *Cucumis sativus* ve *Cucumis hystrix* arasındaki bu başarılı melezleme çalışması *Cucumis* cinsi içinde yer alan türler arasındaki melezlemede önemli bir adım olmuştur. Eğer *Cucumis hystrix* Chakr. ile *Cucumis melo* arasında da melezleme başarılı ve elde edilen F1 ler ya da kromozom sayısı katlanmış F1 lere fertilité sağlanırsa *Cucumis hystrix*, *Cucumis sativus* ile *Cucumis melo* türleri arasında köprü türü olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olacaktır (Chen ve Adelberg, 2000).

Ondrej ve ark. (2001a), *Cucumis sativus* ve *Cucumis melo* arasındaki melezlemelerde, tozlamadan yedi gün sonra olgunlaşmamış tohumlar içerisinde globüler safhada hibrit embriyoların bulunduğunu, fakat bu aşamadan sonra embriyoların gelişmesini durdurduğunu belirterek iki tür arasındaki melezleme uyumsuzluğunun döllenme sonrası ileri aşamada meydana gelen embriyo aborsiyonu ile ilgili olabileceğine işaret etmişlerdir.

Ondrej ve ark. (2001b), türler arası melezleme sonrası hıyarda elde ettikleri tohum taslaklarının *in vitro*da yetiştirilmesi için farklı besin ortamları ve farklı bitki gelişimini düzenleyicilerin değişik konsantrasyonlarını kullanarak çift fazlı sistemi denemişlerdir. Tozlanmadan iki gün sonra izole edilen ovüllerden çift fazlı sistemde 4 hafta içinde globüler embriyolar gelişmiş ve % 27.2'si rejenere olarak çimlenmeye başlamıştır.

Bu çalışmada *Cucumis* cinsi içinde yer alan *Cucumis melo* (Kavun, 2n=24) ve *Cucumis sativus* (Hıyar, 2n=14) arasında türler arası melezleme yoluyla gen aktarımını gerçekleştirme ve *Cucumis melo* var. *flexuosus* (Acur, 2n=24)'u bu iki tür arasında köprü olarak kullanabilme olanakları araştırılmıştır. Bu amaçla *Cucumis melo*, *Cucumis sativus* ve *Cucumis melo* var. *flexuosus* arasında melezlemeler yapılarak hibrid embriyoların oluşturulması ve embriyo kurtarma yöntemi ile bu embriyolardan *in vitro* kültürde bitki elde edilmesine çalışılmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Çalışmada bitkisel materyal olarak *Cucumis sativus*'un “Toros F1” çeşidi, *Cucumis melo*'un “Kırkağaç” çeşidi ve *Cucumis melo* var. *flexuosus*'un yerel bir genotipi kullanılmıştır. 2001 yılı ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde fidelerin araziye şaşırtılmasından yaklaşık 30-40 gün sonra haziran ile eylül-ekim aylarında türler arasında karşılıklı melezlemeler yapılmıştır. Her melezleme kombinasyonu için 30 dişi çiçek yapay olarak tozlanmıştır. Dişi çiçekler açmadan bir gün önce 16.00-18.00 saatleri arasında kapatılmıştır. Ertesi sabah saat 8.00-9.00 arasında çiçekler açılarak tozlama yapıldıktan sonra penslerle yeniden kapatılmış ve yabancı polen girişi önlenmiştir. Tozlamadan iki hafta sonra her melezleme kombinasyonu için 5'er adet meyve hasat edilerek laboratuvara getirilmiş, % 30'luk hipoklorit çözeltisi içinde 15 dakika süreyle yüzey dezenfeksiyonu işleminden sonra steril kabin içerisinde açılarak tohumları çıkarılmıştır. Tohumlar steril kabin içerisinde binoküler altında açılarak embriyo oluşumları incelenmiştir. Her melezleme kombinasyonundan 100 adet embriyo, içerisinde bitki gelişimini düzenleyicilerden 0.01 mg/l IBA ve 0.01 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamı bulunan petri kaplarında *in vitro* kültüre alınmıştır. Kültüre alınan embriyolar iklim odasında 25±1°C sıcaklık, 16/8 saatlik fotoperiyot ve 2100 lux'lük ışık rejiminde tutulmuşlardır. Gelişme gösteren embriyolar yaklaşık üç hafta sonra aynı ortamda alt kültüre alınmış ve bitkiye dönüşenlerde mikroçoğaltım yapılmıştır.

Çalışma süresince tozlamalar sonucu oluşan meyve tutumu, meyvelerdeki tohum sayısı, embriyo oluşumu, *in vitro* kültüre alınan embriyoların gelişimleri, kallus oluşturma ve bitkiye dönüşme durumları incelenmiştir.

## 3. Bulgular

*Cucumis melo* var. *flexuosus* x *Cucumis sativus* kombinasyonunda meyveler normal iriliğini almadan çok önce şişkinleşmiş ve yaklaşık iki hafta sonra

meyvelerde çatlamlar görülmüştür. *Cucumis melo* x *Cucumis melo* var. *flexuosus* kombinasyonunda meyvelerde şekil bozuklukları meydana gelmiştir.

Melezlemede ana ve baba olarak kullanılan türlere göre, tozlanan çiçek sayısı, tutan meyve sayısı ve meyve tutum oranı ile ilgili bulgular Çizelge 1'de verilmiştir. *Cucumis melo* var. *flexuosus*'un *Cucumis sativus* ile tozlanmasında % 50, *Cucumis melo* ile tozlanmasında % 46.6 oranında meyve tutumu sağlanmıştır. *Cucumis melo* *Cucumis melo* var. *flexuosus* ile tozlandığında % 53.3, *Cucumis sativus* ile tozlandığında % 33.3 oranında meyve tutumu elde edilmiştir. *Cucumis sativus*'un *Cucumis melo* var. *flexuosus* ile tozlanmasında meyve tutum oranı % 53.3, *Cucumis melo* ile tozlanmasında % 43.3 olmuştur (Çizelge 1).

Tozlamadan iki hafta sonra tam olgunlaşmadan hasat edilerek laboratuvara getirilen meyveler yüzey sterilizasyonundan sonra steril ortamda açılmıştır. Meyvelerin tohum sayıları tespit edildikten sonra bütün tohumlar binoküler altında tek tek açılarak embriyo oluşup-oluşmadığı, embriyoların gelişme durumları incelenmiştir. Bazı kombinasyonlarda az sayıda da olsa çok küçük tohumların oluştuğu tespit edilmiş ancak bunlar meyve etinden tam olarak ayrılamadığından tohum sayısına eklenememiştir. Her bir kombinasyon için toplam ve meyve başına ortalama tohum sayıları, tohumların içerdiği toplam embriyo sayısı ve embriyo içeren tohum oranları ile ilgili bulgular Çizelge 2.'de verilmiştir.

*Cucumis melo* var. *flexuosus*'un *Cucumis sativus* ile tozlanması sonucu oluşan meyvelerde az sayıda (meyve başına 117.8 adet) tohum meydana gelmiştir. Bu tohumların sadece % 40.4'ünün normal embriyo içerdiği, diğer tohumların boş olduğu gözlenmiştir. Buna karşın *Cucumis melo* ile tozlanmasında meyvelerin ortalama 348 adet ile çok sayıda tohum oluşturduğu ve bu tohumların %91.5'inin normal embriyo içerdiği belirlenmiştir (Çizelge 2).

*Cucumis melo*'nun *Cucumis melo* var. *flexuosus* ile tozlanmasından elde edilen meyvelerin ortalama 159.6 adet ile az sayıda tohum oluşturmasına rağmen bu tohumların % 93.4'ünün embriyo oluşturduğu

gözlenmiştir. Bu oran tüm melezleme kombinasyonları içerisinde en yüksek embriyo oluşturma oranıdır. *Cucumis melo*'nun *Cucumis sativus* ile tozlanması sonucu oluşan meyvelerde ortalama 432.8 adet tohum elde edilmiştir. Bu kombinasyonda meyve başına elde edilen tohum sayısı incelenen kombinasyonlar içinde en yüksek olmasına karşın tohumların embriyo oluşturma oranı %32.2 ile en düşük düzeyde kalmıştır.

*Cucumis sativus*'un *Cucumis melo* var. *flexuosus* ile tozlanmasından elde edilen meyvelerde ortalama 361 adet tohum oluşmuştur. Meyvelerin oldukça yüksek sayıda tohum oluşturmalarına karşın bu tohumların ancak % 40.3'ünün embriyosunun olduğu belirlenmiştir. *Cucumis sativus*'un *Cucumis melo* ile tozlanmasında meyve başına ortalama 259.6 adet tohum elde edilmiş ve bu tohumların % 69.8'inin embriyo taşıdığı saptanmıştır.

Her kombinasyondan 100 adet embriyo *in vitro* kültüre alınmıştır. *In vitro* kültürde embriyoların gelişme durumu, kallus oluşumu ve bitkiye dönüşümü ile ilgili bulgular Çizelge 3'de verilmiştir. *Cucumis melo* var. *flexuosus* x *Cucumis sativus* kombinasyonundan elde edilen embriyoların %12'si *in vitro* kültürde gelişerek önce kallus oluşturmuş ve bu kalluslardan 3 adet bitki meydana gelmiştir.

*Cucumis melo* var. *flexuosus* x *Cucumis melo* kombinasyonundan elde edilen embriyoların % 45'i *in vitro* kültürde gelişme göstererek toplam 11 adet bitki oluşturmuştur. Gelişen embriyoların 6'sı doğrudan bitkiye dönüşürken, 39'unda önce kallus daha sonra bu kalluslardan 5 adet bitki meydana gelmiştir.

*Cucumis melo* x *Cucumis melo* var. *flexuosus* kombinasyonundan elde edilen embriyoların % 36'sı *in vitro* kültürde gelişme göstererek toplam 8 adet bitki oluşturmuştur. Gelişen embriyoların 6'sı doğrudan bitkiye dönüşürken, 30'unda önce kallus gelişimi olmuş ve daha sonra bu kalluslardan 2 adet bitki meydana gelmiştir.

*Cucumis melo* x *Cucumis sativus* kombinasyonundaki embriyoların sadece % 8'i *in vitro* kültürde gelişerek önce kallus oluşturmuş ve bu kalluslardan sadece 1 adet

Çizelge 1. Türler Arası Melezlemelerde Tozlanan Çiçek ve Tutan Meyve Sayısı ile Meyve Tutum Oranları.

Melezleme kombinasyonları	Tozlanan Çiçek Sayısı (Adet)	Tutan Meyve Sayısı (Adet)	Meyve Tutum Oranı (%)
<i>C.flexuosus x C. sativus</i>	30	15	50.0
<i>C.flexuosus x C. melo</i>	30	14	46.6
<i>C. melo x C. flexuosus</i>	30	16	53.3
<i>C. melo x C. sativus</i>	30	10	33.3
<i>C. sativus x C. flexuosus</i>	30	16	53.3
<i>C. sativus x C. melo</i>	30	13	43.3

Çizelge 2. Türler Arası Melezlemelerde Elde Edilen Meyve, Tohum ve Meyve Başına Ortalama Tohum Sayısı, Embriyo Sayısı Tohumların Embriyo Oluşturma Oranı.

Melezleme kombinasyonları	Açılan meyve sayısı (adet)	Toplam tohum sayısı (adet)	Meyve başına ortalama tohum sayısı (adet)	Toplam embriyo sayısı (adet)	Tohumların embriyo oluşturma oranı (%)
<i>C.flexuosus x C. sativus</i>	5	589	117.8	238	40.4
<i>C.flexuosus x C. melo</i>	5	1740	348.0	1592	91.5
<i>C.melo x C. flexuosus</i>	5	798	159.6	745	93.4
<i>C.melo x C. sativus</i>	5	2164	432.8	697	32.2
<i>C.sativus x C. flexuosus</i>	5	1805	361.0	728	40.3
<i>C.sativus x C. melo</i>	5	1298	259.6	906	69.8

bitki elde edilmiştir.

*Cucumis sativus x Cucumis melo* var. *flexuosus* kombinasyonundan elde edilen embriyoların % 27'si *in vitro* kültürde gelişme göstermiştir. Embriyoların 2'sinde doğrudan bitkiye dönüşüm gerçekleşirken 25'inde önce kallus gelişimi görülmüştür. Bu kalluslardan 3 adet bitki oluşmasına rağmen bitkilerde sadece iki yaprak irileşmiş fakat sürgün ucu gelişmemiştir.

*Cucumis sativus x Cucumis melo* kombinasyonundan elde edilen embriyoların % 22'si *in vitro*'da gelişerek önce kallus daha sonra bu kalluslardan 4 adet bitki oluşturmuştur.

*In vitro* kültürde gelişen embriyoların bitkiye dönüşüm oranları *Cucumis melo* var. *flexuosus x Cucumis sativus* kombinasyonundan elde edilenlerde % 25, *Cucumis melo* var. *flexuosus x Cucumis sativus* kombinasyonundan elde edilenlerde % 24.4 ile *Cucumis melo* var. *flexuosus*'un ana ebeveyn olarak kullanıldığı

kombinasyonlardan gelen embriyolarda en yüksek düzeyde olmuştur.

*Cucumis melo x Cucumis melo* var. *flexuosus* kombinasyonundan elde edilen embriyoların bitkiye dönüşüm oranı % 22.2 olurken *Cucumis melo x Cucumis sativus* kombinasyonundaki embriyolarda bu oran % 12.5 ile tüm kombinasyonlar içinde en düşük düzeyde gerçekleşmiştir.

*Cucumis sativus x Cucumis melo* var. *flexuosus* ile *Cucumis sativus x Cucumis melo* kombinasyonlarından elde edilen embriyoların bitkiye dönüşüm oranları sırasıyla % 18.5 ve % 18.2 olmak üzere birbirine çok yakın düzeydedir.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada *Cucumis* cinsi içinde yer alan *Cucumis melo*, *Cucumis melo* var. *flexuosus*, *Cucumis sativus* türleri arasında yapılan karşılıklı melezlemelerde meyve

Cizelge 3. *In Vitro* Kültüre Alınan Embriyolarda Kallus ve Bitki Gelişimi.

Mezleme kombinasyonları	<i>In vitro</i> kültüre alınan embriyo sayısı (adet)	Embriyo gelişim oranı (%)	Kallus geliştiren embriyo sayısı (adet)	Bitkiye dönüşen embriyo sayısı (adet)	Gelişen embriyoların bitkiye dönüşüm oranı (%)
<i>C. flexuosus</i> x <i>C. sativus</i>	100	12	12	3	25
<i>C. flexuosus</i> x <i>C. melo</i>	100	45	39	11	24.4
<i>C. melo</i> x <i>C. flexuosus</i>	100	36	30	8	22.2
<i>C. melo</i> x <i>C. sativus</i>	100	8	8	1	12.5
<i>C. sativus</i> x <i>C. flexuosus</i>	100	27	25	5	18.5
<i>C. sativus</i> x <i>C. melo</i>	100	22	22	4	18.2

tutumunun ve tohum oluşumunun sağlanması bu türler arasında tozlanmada sorun olmadığını göstermektedir. Bu bulgu, *Cucumis* cinsi içindeki klasik türler arası melezlemelerde meyve tutumunda bir problem olmadığını ileri süren araştırmacılarla (Singh ve Yadava, 1984; Chen ve Adelberg, 2000; Ondrej. ve ark, 2001a) uyum içindedir.

Genel olarak *Cucumis melo* var. *flexuosus* 'un toz verici olarak kullanıldığı kombinasyonlarda meyve tutum oranı öteki kombinasyonlara göre daha yüksek bulunmuştur. Buna karşın *Cucumis sativus* ile *Cucumis melo* arasındaki melezlemelerde özellikle *Cucumis sativus* 'un toz verici olarak kullanıldığı kombinasyonlarda meyve tutumunun oldukça düşük oranda olması *Cucumis sativus* 'un *Cucumis* cinsi içinde en uzak akraba tür olmasından kaynaklanmaktadır (Perl-Treves ve Galun, 1985; Perl-Treves ve ark., 1985; Robinson ve Decker-Walters, 1997).

*Cucumis melo* var. *flexuosus* ile *Cucumis melo* kombinasyonlarda meyve başına ortalama tohum sayıları oldukça farklı olmasına karşın tohumların embriyo oluşturma oranı % 90'ın üzerinde gerçekleşmiştir. Ancak, özellikle *Cucumis sativus* ile olan bazı kombinasyonlarda embriyo içeren tohum oranı çok düşüktür (% 32.2 - % 40.4). *Cucumis sativus* ile *Cucumis melo* arasındaki melezlemede bu oran biraz daha yüksek bulunmuştur (% 69.8). *Cucumis melo* 'nun *Cucumis sativus* 'a toz verebileceği ve bu kombinasyonda embriyo içeren tohum oluşumu bakımından herhangi bir problem

olmadığı konusuna Robinson ve Decker-Walters (1997) ile Ondrej ve ark. (2001a) işaret etmektedir. Bir başka araştırmada *Cucumis sativus* ile *Cucumis melo* arasındaki melezlemede % 2 oranında hibrit bitkiler elde edilmiş ve 19 kromozoma sahip bu bitkilerin fertil olduğu bildirilmiştir (Van der Knapp ve Ruitter, 1978). Ancak aynı araştırmacılar, aynı materyalle aynı koşullar altında tekrar yaptıkları melezlemelerde başarılı olamamışlardır. Robinson ve Kowalewski (1978) hıyarın diğer *Cucumis* türleri ile mezlendiğinde meyve bağladığını, ancak kavunda bunun başarısız olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın son yıllarda yapılan çalışmalarda sitolojik incelemelerde *Cucumis sativus* ile *Cucumis melo* arasındaki karşılıklı melezlemelerde döllenmenin gerçekleşerek zigot oluştuğu, fakat yaklaşık bir hafta sonra embriyonun gelişimini durdurarak bozulmaya başladığı belirlenmiştir (Ondrej ve ark., 2001a). Daha önceki yıllarda yapılan bazı çalışmalarda *Cucumis melo* x *Cucumis sativus* kombinasyonunda fertil tohum ve bitki elde edilememesi (Van der Knapp ve Ruitter, 1978; Robinson ve Kowalewski, 1978; Norton, 1978) embriyo kurtarma yönteminin kullanılmamasına ve embriyoların erken dönemde bozulmasına bağlı olabilir.

Bu araştırmada embriyoların bitkiye dönüşüm oranı % 12.5 ile % 25 arasında değişmiştir. Bu oran *Cucumis sativus* ve *Cucumis hystrix* (*Cucumis melo* ile aynı kromozom sayısına sahip) arasında daha önce yapılan bir çalışmada elde edilen orana (% 37.3) göre (Chen ve ark., 1997) daha

düşük düzeydedir. Embriyoların bitkiye dönüşüm oranı *Cucumis melo* var. *flexuosus* ana ebeveyn olarak kullanıldığında en yüksek düzeyde olmuştur. *Cucumis melo*'nun ana ebeveyn olduğu kombinasyonlarda embriyoların bitkiye dönüşüm oranları melezlemede kullanılan baba ebeveyne göre önemli farklılık göstermiştir. Melezlemede baba ebeveyn olarak *Cucumis melo* var. *flexuosus* kullanıldığında embriyoların bitkiye dönüşüm oranı yüksek olurken, *Cucumis sativus* kullanıldığında bu oran tüm kombinasyonlar içinde en düşük düzeydedir.

*Cucumis sativus*'un ana ebeveyn olarak kullanıldığı kombinasyonlarda elde edilen embriyoların bitkiye dönüşüm oranları baba ebeveyne göre farklılık göstermemiştir.

*Cucumis* türleri arasında melezlemeler yaparak embriyo elde edilmesi ve bu embriyoların bozulmaya başlamadan önce erken aşamada kurtarılıp *in vitro* bitkiciklerin oluşturulması, bu türler arasında gen alışverişinin sağlanması ve böylece gen havuzunun genişletilmesi bakımından oldukça önemlidir. Bu araştırmada kullanılan tüm melezleme kombinasyonlarından embriyo kurtarma yoluyla MS ortamı üzerinde kültüre alınan embriyolardan toplam 32 bitki elde edilmiştir. *Cucumis sativus* ile *Cucumis melo* arasındaki melezlemede uygun zamanda (embriyo bozulmasından önce) yapılacak embriyo kurtarma ve MS ortamı gibi elverişli bir besin ortamında *in vitro* kültüre alma ile kallus geliştirme eğiliminin yüksek olmasına rağmen bitkilerin elde edilebileceği Lebeda ve ark. (1999) ile Ondrej ve ark. (2001b) tarafından bildirilmiştir.

Bu araştırmadaki bulgulara göre, *Cucumis sativus*, *Cucumis melo* ve *Cucumis melo* var. *flexuosus* arasında yapılan melezlemelerde tozlamadan 10-15 gün sonra meyveler tam olgunlaşmadan hasat edilerek tohumlar içerisinden erken aşamadaki embriyoların çıkarılıp *in vitro* kültüre alınmasıyla hibrit bitkiler elde edilebileceği sonucuna varılmıştır. *Cucumis* cinsi içinde yapılan türler arası melezlemelerde bitkilerin çoğaltılması ve fertil F1 döllerinin elde edilmesinde kromozom katlaması

gerekmektedir (Chen ve Adelberg, 2000). Bu çalışmada elde edilmiş olan bitkilerde genomik homojenitenin sağlanması için daha sonraki aşamada kromozom sayısının *in vitro* katlanmasına çalışılacaktır.

#### Kaynaklar

- Bowley, S.R. and Taylor, N.L., 1987. Introgressive hybridization. In: B.R. Christie (Ed.): CRC Handbook of plant science in agriculture. Vol.1. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Beharav, A. and Cohen Y., 1994. Effect of gamma radiation on vitality and fertilization ability of *Cucumis melo* and *C. metuliferus* pollen. Cucurbit Genetic Cooperative Rpt. 17:94-96.
- Charterjee, M. and More, T.A., 1991a. Interspecific hybridization in *Cucumis* species. Cucurbit Genetics Cooperative Rpt. 14:69.
- Charterjee, M. and More, T.A., 1991b. Techniques to overcome barrier of interspecific hybridization in *Cucumis*. Cucurbit Genetics Cooperative Rpt. 14:66-67.
- Chen, J.F. and Adelberg, J., 2000. Interspecific hybridization in *Cucumis*-Progress, problems, and perspectives. HortScience, 35 (1), 11-15.
- Chen, J.F. and Staub, J., 1997. Attempts at colchicine doubling of an interspecific hybrid of *C.sativus* L.x *C.hystris* Chakr. Cucurbit Genetic Cooperative Rpt. 20:24-26.
- Chen, J.F., Staub, J., Tashiro, Y., Isshiki, S. and Miyazaki, S., 1997. Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L. and *C.hystris* Chakr. Euphytica 96:3, 413-419.
- Chen, J.F., Adelberg, J.W., Staub, J. E., Skorupska, H.T. and Rhodes, B.B. 1998. A new synthetic amphidiploid in *Cucumis* from a *C.sativus* x *C.hystris* F<sub>1</sub> interspecific hybrid. In: J. McCreight (ed.). Cucurbitaceae'98-Evaluation and enhancement of Cucurbit germplasm. ASHA Press, Alexandria, Va. p. 336-339.
- Chen, J.F., Zhuang, F.Y., Qian, C.T., Yosuke, T., Staub, J. and Kirkbride, J., 2001. A synthetic species of *Cucumis* - *C.hytivus* Chen and Kirkbride, and its potential for improvement of cucumber germplasm. 2nd International Symposium on Cucurbits. Abst.:24, 28 Sep - 1 Oct., 2001, Japan.
- Custers, J.B.M. and Den Nijs, A.P.M., 1986. Effects of Aminoethoxyvinylglycine (AVG), environment, and genotype in overcoming hybridization barriers between *Cucumis* species. Euphytica 35:639-647.
- Deakin, J.R., Bohn, G.W. and Whitaker, T.W., 1971. Interspecific hybridization in *Cucumis*. Econ. Bot., 25:195-211.
- Debeaujon, I. and Branchard, M., 1990. Somatic hybridization of muskmelon (*Cucumis melo* L.) with Kiwano (*Cucumis metuliferus* Naud.) and Squash (*Cucurbita pepo* L.) by protoplast electrofusion. Cucurbit Genetics Cooperative Rpt.13:36-39.

- De Vaulx, R.D., 1979. Pollen germination in interspecific crosses between muskmelon and some wild *Cucumis* species. *Cucurbit Genetics Cooperative Rpt.* 2:20-21.
- Fellner, M.P., Binarova, P. and Lebeda, A., 1996. Isolation and fusion of *Cucumis sativus* and *Cucumis melo* protoplast. In: Gomez-Guillamon, Soria, C., Cuartero, J., Tores, J.A., and Fernandez-Munoz, R. (Eds.). *Cucurbits towards 2000. Proc. 6th Eucarpia Mtg. On Cucurbit Genetics and Breeding*, Malaga, Spain.
- Kho, Y.O., Den Nijs, A.P.M and Franken, J., 1980. Interspecific hybridization in *Cucumis* L. II. The crossability of species, and investigation *in vitro* pollen tube growth and seed set. *Euphytica* 29:661-672.
- Kishi, Y. and Fujishita, N., 1969. Studies on interspecific hybridization in the genus *Cucumis*. I. Pollen germination and pollen tube growth in selfings and incompatible crossings. *J.Jpn.Soc. Hort.Sci.* 38: 329-334.
- Kishi, Y. and Fujishita, N., 1970. Studies on interspecific hybridization in the genus *Cucumis*. II. Pollen tube growth fertilization and embryogenesis of post-fertilization stage in incompatible crossing. *J.Jpn.Soc. Hort.Sci.* 39: 51-57.
- Lebeda, A., Kubalaková, M., Kristkova, E., Navratilova, B., Dolezal, K., Dolezal, J. and Lysak, M., 1999. Morphological and physiological characteristics of plants issued from an interspecific hybridization of *Cucumis sativus* X *Cucumis melo*. *Acta Hort.* :492, 149-155.
- Leppick, E.E., 1996. Searching gene centers of the genus *Cucumis*. *Euphytica* 15:323-328.
- Lower, R.L. and Edwards, M.D., 1986. Cucumber breeding. p 173-207. In: Basset, M.J. (Ed.). *Breeding vegetable crops*. AVI, Westport, Conn.
- Norton, J.D., 1978. Interspecific crosses of *Cucumis* species. *Cucurbit Genetics Cooperative Rpt.* 1:39.
- Ondrej, V., Navratilova, B. and Lebeda, A., 2001a. *In vitro* cultivation of *Cucumis sativus* ovules after fertilization. 2nd International Symposium on Cucurbits. Abst.:101, 28 Sep – 1 Oct., 2001, Japan.
- Ondrej, V., Navratilova, B. and Lebeda, A., 2001b. Determination of the Crossing Barriers in Hybridization of *Cucumis sativus* and *Cucumis melo*. *Cucurbit Genetics Cooperative Rpt.* 24:1-5.
- Oost, E.H. and Den Nijs, A.P.M. 1979. Mentor pollen as a tool in interspecific hybridization in *Cucumis*. *Cucurbit Genetics Cooperative Rpt.* 2:43-44.
- Perl-Treves, R., and Galun, E., 1985. The *Cucumis* plastome: Physical map, intrageneric variation and phylogenetic relationships. *Theor. Appl. Genet.* 71:417-429.
- Perl-Treves, R., Zamir, D., Navot, N. and Galun, E., 1985. Phylogen of *Cucumis* based on isozyme variability and its comparison with plastome phylogeny. *Theor. Appl. Genet.* 71:430-436.
- Pierik, R.L.M., 1989. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands. p 344.
- Robinson R.W. and Kowalewski, E. 1978. Interspecific hybridization of *Cucumis*. *Cucurbit Genetics Cooperative Rpt.* 1:40.
- Robinson R.W. and Decker-Walters, D.S., 1997. *Cucurbits*. Cab International, Wallingford, UK. p 225.
- Robinson, W.R., 2001. Breeding cucurbita for disease resistance. 2nd International Symposium on Cucurbits. Abst.:20, 28 Sep – 1 Oct., 2001, Japan.
- Singh, B.P., 1991. Interspecific hybridization in between new and old-world species of Luffa and its phylogenetic implication. *Cytologia*, 56:359-365.
- Singh, A.K., and Yadava, K.S., 1984. An analysis of Interspecific hybrids and phylogenetic implications in *Cucumis* (Cucurbitaceae). *Plant Syst. Evol.* 147:237-252
- Stebbins, G.L., 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. Addison-Wesley, London, p 216.
- Subha, M.M., Gopalakrishnan, P.K. and Peter, K.V. 1986. Compatibility among *Cucumis melo* varieties *inodorus*, *conomon*, *flexuosus*, *momordica* and *utilissimus*. *Cucurbit Genetics Cooperative Rpt.* 9:78-80.
- Tang, F.A. and Punja, Z.K., 1989. Isolation and culture of protoplasts of *Cucumis sativus* and *Cucumis metiliferus* and methods for their fusion. *Cucurbit Genetics Cooperative Rpt.* 12:29-32.
- Van der Knapp, B.J. and Ruiter A.C. 1978. An interspecific cross between cucumber (*Cucumis sativus*) and muskmelon (*Cucumis melo*). *Cucurbit Genetics Cooperative Rpt.* 1:6-8.
- Weeden, N.F. and Robinson R.W., 1986. Allozym segregation ratios in the interspecific cross *Cucurbita maxima* x *C. ecuadorensis* suggest that hybrid breakdown is not caused by minor alterations in chromosome structure. *Genetics* 114: 593-609.