

## Sakız ve Siyah Kabak (*Cucurbita pepo* L.)'larda Ovül Kültüründe Spermidine ve Putrescine Uygulamalarının Haploid Bitki Elde Edilmesine Etkileri\*

Begüm KARA, Nebahat SARI\*\*

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

Geliş Tarihi/Received: 19.04.2019

Kabul Tarihi/Accepted: 30.06.2019

ORCID ID (Yazar sırasına göre / by author order)

[orcid.org/0000-0001-8469-6831](https://orcid.org/0000-0001-8469-6831) [orcid.org/0000-0001-7112-4279](https://orcid.org/0000-0001-7112-4279)

\*\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: nesari@cu.edu.tr

**Öz:** Bu çalışmada, sakız ve siyah kabaklarda ovül kültüründe spermidine (Spd) ve putrescine (Put) uygulamalarının haploid bitki elde edilmesine etkileri araştırılmıştır. Araştırmada materyal olarak 3 farklı Sakız kabak çeşidi ile 3 farklı Siyah kabak çeşidi kullanılmıştır. Ovül kültürü uygulamalarında embriyo teşviki için 5 mg L<sup>-1</sup> 2.4-D ilave edilmiş MS besi ortamı kullanılmıştır. Araştırmada poliaminlerin etkisini görmek amacıyla Spd ve putrescine Put 40, 80 ve 160 µM L<sup>-1</sup> dozda ayrı ayrı ve her ikisi birlikte 80, 160 ve 320 µM L<sup>-1</sup> (1:1, v:v) dozlarında kullanılmıştır. Kontrol grubu sadece 5 mg L<sup>-1</sup> 2.4-D içermiştir. Elde edilen araştırma sonuçlarına göre, ovül gelişimi ve kallus oluşumunun her çeşide göre farklı seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Ovül gelişim sonuçlarına bakıldığında her çeşitte elde edilen ovül gelişim oranları genel olarak kontrol grubuna oranla daha başarılı bulunmuştur. Kallus oluşum sonucuna göre Elida F<sub>1</sub> çeşidi sadece Put ve sadece Spd içeren ortamlarda, Roni F<sub>1</sub> çeşidi Put+Spd içeren ortamlarda, Shakila F<sub>1</sub> Spd ve Put+Spd içeren ortamlarda, Seyden F<sub>1</sub> sadece Put içeren ortamlarda, Brillante F<sub>1</sub> Put ve Put+Spd içeren ortamlarda ve Chivas F<sub>1</sub> sadece Put içeren ortamlarda kontrol grubuna oranla daha iyi sonuçlar vermiş, genel olarak en iyi kallus gelişim oranı 40 µM L<sup>-1</sup> Put içeren ortamda görülmüş, ancak bunlardan bitki elde edilememiştir. Haploid bitki elde edilebilmesi için poliaminlerin daha yüksek dozlarda kullanılması önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Cucurbita pepo* L., doku kültürü, poliaminler

## Effects of Spermidine and Putrescine Applications on Haploid Plant Obtention Via Ovule Culture in Sakız and Dark Green Squashes (*Cucurbita pepo* L.)

**Abstract:** In this study, the effects of spermidine and putrescine on the haploid plant obtention via ovule culture were investigated in Sakız and dark green squashes. As plant material, 3 different cultivars of Sakız and 3 different cultivars of dark green squashes were used. 5 mg L<sup>-1</sup> 2.4-D added MS medium was used for embryo stimulation in ovule culture applications. To determine the effects of polyamines, spermidine (Spd) and putrescine (Put) were used with the concentrations of 40, 80 and 160 µM L<sup>-1</sup>. Furthermore, spermidine and putrescine were used together with concentration of 80, 160 and 320 µM L<sup>-1</sup> (1:1, v/v), respectively. The control group included only 5 mg L<sup>-1</sup> 2.4-D. According to the results of the research, it was determined that ovule development and callus formations were at different levels for each cultivar. When the ovule development results were examined, it is found that the ovule development rates obtained in all cultivars were generally more successful than the control group. According to the result of callus formation; the best culture medias were only Put and Spd for Elida F<sub>1</sub> cultivar, Put+Spd-containing media for Roni F<sub>1</sub> cultivar, Spd and Put+Spd-containing medias for Shakila F<sub>1</sub>, Put and Put+Spd-containing medias for Brillante F<sub>1</sub>, and only Put in Chivas F<sub>1</sub>. Generally, the best callus growth rate was found in 40 µM L<sup>-1</sup> Put containing media, but plant was not obtained from these callus. In order to obtain haploid plants, it is recommended to use polyamines in higher doses.

**Keywords:** *Cucurbita pepo* L., tissue culture, polyamines

\*: Bu çalışma; Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından kabul edilen birinci yazara ait "Sakız ve Siyah Kabaklarda Ovül Kültüründe Spermidine ve Putrescine Uygulamalarının Haploid Bitki Elde Edilmesine Etkileri" isimli Yüksek Lisans Tez çalışmasından üretilmiştir.

## 1. Giriş

Kabakgiller familyası içinde *Cucurbita pepo* L. türü ekonomik değeri yüksek, önemli bir türdür (Aras ve ark., 2011). Dünyada 2.078.450 hektar alanda 27.449.481 ton kabak üretimi yapılmaktadır. Kıtalarla göre ise % 60.1 ile Asya en fazla üretimi yaparken; bunu sırasıyla % 15.4 ile Avrupa, % 12.5 ile Amerika, % 10.7 ile Afrika ve % 0.9 ile Okyanusya takip etmektedir (Anonymous, 2018). Türkiye’de toplamda 449.561 ton sakız kabak üretimi yapılmakta olup; en fazla üretim yapan iller sırasıyla 89.596 ton ile Antalya, 161.504 ton ile Mersin ve 30.638 ton ile Muğla’dır (Anonim, 2019).

Haploidlerin doğal yöntemlerle ortaya çıkma durumu türlere, hatta tür içindeki genotiplere göre farklılık göstermekte ve bu % 0.1-% 0.001 gibi düşük oranlarda gerçekleşmektedir (Pochard ve Dumas de Vault, 1979). Bu düşük oranı arttırmak isteyen araştırmacılar birçok uygulamalar yaparak arayış içinde olmuşlardır.

Yazlık kabak (*C. pepo* L.)’ta döllenmemiş ovüllerin in vitro’da kültüre alınması ile ya da ışınlanmış polen tekniği kullanılarak haploid bitki eldesi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (Chambonnet ve Dumas de Vault, 1985; Kwack ve Fujieda, 1988; Gémesné ve Venczel, 1996; Metwally ve ark., 1998; Kurtar, 1999; Gémes-Juhász ve ark., 2002).

Sentetik oksin 2,4-diklorofenoksiasetik asidin (2,4-D) kullanımı Halperin ve Wetherell (1964)’in havuçta yaptıkları somatik embriyo kültürü ile başlamıştır. Yapılan bu çalışma sonrası havuçta somatik embriyojenezin fizyolojisi ve moleküler biyolojisini incelemek için 2,4-D kullanımı standart protokol olarak kabul edilmiş ve çok çeşitli türlerde somatik embriyo teşviki çalışmalarında kullanımı popüler hale gelmiştir. Kabakta yapılan birçok çalışmada özellikle embriyo kültürlerinde 2,4 D’nin kullanımı oldukça yaygındır (Metwally ve ark., 1998; Shalaby, 2007; Rakha ve ark., 2012; Kurtar ve Balkaya, 2016; Kurtar ve ark., 2018).

Büyükuslu (2014)’ya göre, putresin, spermidin ve spermin yaşamda yaygın şekilde yer alan başlıca doğal poliaminlerdir. Putresin ve spermidin hemen hemen tüm organizmalar içinde yer alırken spermin ökaryotik hücrelerde yer almaktadır. Hücre bölünmesi ve uzaması, kök gelişimi, çiçek ve meyve gelişimi, replikasyon, transkripsiyon, translasyon, membran ve hücre çeperi kararlılığı, kromatin organizasyonu, ribozom biyogenezi ve programlanmış hücre ölümü gibi birçok hücre işlevinde poliaminlerin rolleri etkili olduğu için araştırma konusu olmuştur (Hussain ve ark., 2011).

Bu çalışmada, sakız ve siyah kabaklarda ovül kültüründe spermidine (Spd) ve putrescine (Put) uygulamalarının haploid bitki elde edilmesine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Araştırma; Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Araştırma ve Uygulama Alanı ile Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Doku Kültürü Laboratuvarı’nda 2018 yılında gerçekleştirilmiştir.

### 2.1. Bitki materyali

Bitkisel materyal olarak; özel firmalardan temin edilen açık yeşil kabuklu Sakız kabağı grubundan 3 çeşit (Roni F<sub>1</sub>, Seyden F<sub>1</sub> ve Chivas F<sub>1</sub>) ile koyu yeşil kabuklu Siyah kabak grubundan 3 çeşit (Elida F<sub>1</sub>, Shakila F<sub>1</sub> ve Brillante F<sub>1</sub>) olmak üzere 6 çeşit kullanılmıştır.

### 2.2. Bitkilerin yetiştirilmesi

Araştırmada, bitkilerin yetiştirilmesi için 360 m<sup>2</sup> taban alanına sahip yay çatılı bir plastik serada yetiştiricilik yapılmıştır. Çalışmada kullanılan 6 çeşidin tohumları 21/02/2018 tarihinde 2:1 oranında torf ve perlit karışımı bulunan viyollere ekilmiştir. Fideler 3-4 gerçek yapraklı döneme geldiğinde 15/03/2018 tarihinde, her çeşitten 40 bitki olmak üzere toplamda sağlıklı 240 adet fide (100-50) x 50 cm aralık mesafeler olacak şekilde çift sıralı olarak plastik seraya dikilmiştir. Sulamada damlama sulama sistemi kullanılmış olup, bitki gelişimi için gerekli ilaçlama ve gübreleme işlemleri uygulanmıştır. Bitkiler laboratuvar çalışması için örnek alınacak olgunluğa erişene kadar kültür ve bakım işlemleri ve hastalık zararlı kontrolleri yapılmaya devam edilmiştir.

### 2.3. Dişi çiçeklerin toplanması

Ovül kültürü için kabak genotiplerinin dişi çiçekleri antezisten bir gün önce (Shalaby, 2007) iki farklı gelişme dönemi şeklinde erken ve geç olmak üzere çiçek saplarından kesilerek toplanmıştır (Şekil 1). Toplanan dişi çiçekler Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Doku Kültürü Laboratuvarı’na getirilerek sterilizasyon aşaması başlatılmıştır.

### 2.4. Embriyo teşvik ortamının hazırlanması

Çalışmada temel besi ortamı olarak embriyo teşvikini sağlamak amacı ile daha önce kabakgöl türlerinde yapılmış ovül-ovaryum kültürü çalışmalarında kullanılan ve olumlu sonuçlar alındığı belirtilmiş MS besi ortamı kullanılmıştır. Önceki çalışmalar incelendiğinde 2,4-D’nin yüksek



Şekil 1. Araştırmada kullanılan siyah ve sakız kabakların antezisten 1 gün önceki aşamaları

konsantrasyonlarda kullanılmasının kabakgiller üzerine olumlu sonuçlar verdiği görülmüş ve 2.4-D  $5 \text{ mg L}^{-1}$  (Metwally ve ark., 1998; Rakha ve ark., 2012) tek doz olarak kullanılarak tüm ortam kombinasyonlarına eklenmiştir. Araştırmada poliaminlerin etkisini görmek için spermidine (Spd) ve putrescine (Put) 40, 80 ve  $160 \mu\text{M L}^{-1}$  dozda ayrı ayrı ve her ikisi birlikte 80, 160 ve  $320 \mu\text{M L}^{-1}$  (1:1, v:v) dozları kullanılmıştır. Kontrol grubu sadece  $5 \text{ mg L}^{-1}$  2.4-D içermektedir. Diğer ortamların içeriği ise  $5 \text{ mg L}^{-1}$  2.4-D sabit olmak koşulu ile 1, 2 ve 3 no'lu ortamlar spermidine'nin 40, 80 ve  $160 \mu\text{M L}^{-1}$  dozlarını; 4, 5 ve 6 no'lu ortamlar putrescine'nin 40, 80 ve  $160 \mu\text{M L}^{-1}$  dozlarını; 7, 8 ve 9 no'lu ortamlar ise spermidine ve putrescine'nin  $40 \mu\text{M L}^{-1}+40 \mu\text{M L}^{-1}$ ,  $80 \mu\text{M L}^{-1}+80 \mu\text{M L}^{-1}$  ve  $160 \mu\text{M L}^{-1}+160 \mu\text{M L}^{-1}$  dozlarını içermektedir. Bütün uygulamalarda standart olarak 30 g sakkaroz ile 8 g  $\text{L}^{-1}$  agar (Shalaby, 2007) kullanılmış ve pH 5.7'ye ayarlanmıştır. Otoklav  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika sterilizasyon protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Otoklavı tamamlanan ortamlar steril kabine getirilerek 60 mm'lik steril petrilere aktarılmıştır.

### 2.5. Ovaryumların sterilizasyonu ve ovül kültürü denemesinin kurulması

Dişi çiçekler yüzey sterilizasyonu için Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Doku Kültürü Laboratuvarı'na getirilerek, ovaryumlar, taç yapraklar ve dışicik tepesinden ayrılmış ve sterilizasyon aşamasına geçilmiştir. Ovaryumlar steril kabine alınarak % 70'lik etil alkol çözeltisinde 2 dakika tutulduktan sonra 3-4 kez steril saf suda durulama işlemi yapılmıştır. % 20'lik sodyum hipoklorit solüsyonu içerisinde 20 dakika bekletilmiş ve 3-4 kez steril su ile durulandıktan sonra yüzey sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Sterilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra steril filtre kağıdı üzerine alınan ovaryumlardan

steril pens ve bistüri yardımı ile ovüller çıkarılmıştır. Daha sonra ovüller hazırlanan besi ortamlarına aktarılmıştır. Çalışmada 6 çeşit x 10 ortam kombinasyonu x 1 antezis aşaması x 4 tekrerrür olmak üzere toplamda 240 petri x her petride 5 ovül olacak şekilde 1200 ovül kültüre alınmıştır. Denemeler iki kez tekrarlanmış ve birinci ovül kültürü denemesi 17/05/2018 tarihinde, ikinci ovül kültürü denemesi ise 06/06/2018 tarihinde kurulmuştur.

Ekspantları içeren petrilere 3000-4000 lüks ışık yoğunluğunda,  $25-26 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklığındaki iklim odalarında 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ışıklandırma süresine tabi tutularak gelişmeye bırakılmıştır.

### 2.6. Ovüllerden gelişen bitkicik formasyonlarının kültüre alınması

Gelişmeye bırakılan ovüller 3 hafta içinde gelişme göstererek renk ve boyut değişikliğine uğramıştır. Kültüre alınan ovüller gözlenmeye devam edilmiş ve bazılarında yapılar değişerek kallus oluşturmuşlardır (Şekil 2).

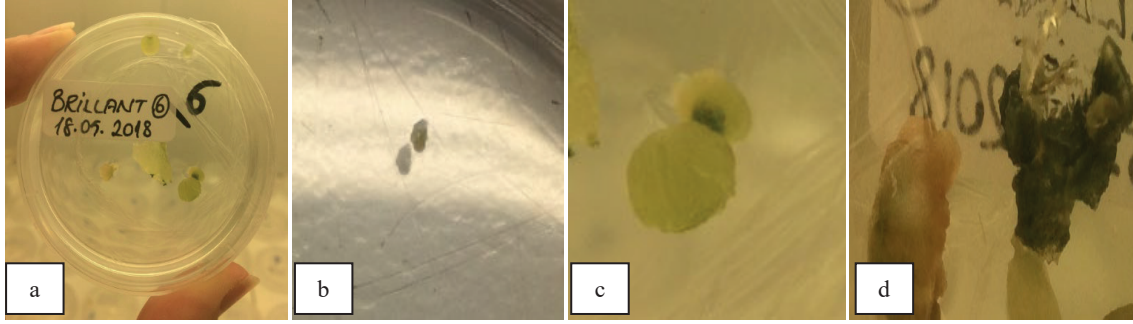
### 2.7. İncelenen özellikler

*Ovül gelişimi (%)*: Haftalık gözlemler sonucunda kaydedilen rengi değişen ve şişip irileşen rejeneren olan ovül sayısı, kültüre alınan toplam ovül sayısına oranlanarak hesaplanmıştır.

*Ovül kültüründe kallus oluşumu (%)*: Kültür süresi sonucunda kaydedilen kallus oluşumu görülen ovül sayısı, kültüre alınan ovül sayısına oranlanarak hesaplanmıştır.

## 3. Bulgular ve Tartışma

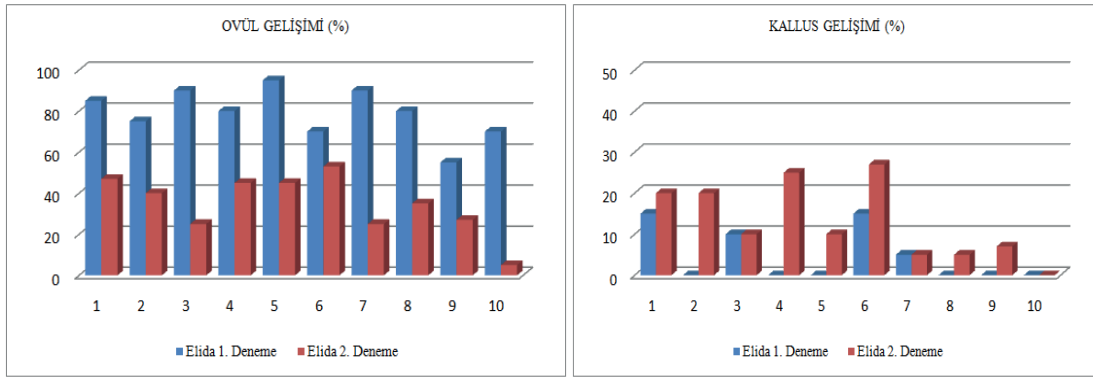
Birinci ovül kültürü denemesi 17/05/2018 tarihinde, ikinci ovül kültürü denemesi ise 06/06/2018 tarihinde kurularak her iki denemede de aynı koşullar ve aynı ortam kombinasyonları



Şekil 2. Gözlenen ovüller; (a) gelişmekte olan ovüller, (b) gelişme göstermeyen ovül, (c) gelişen ovül, (d) kallus gelişimi gözlenen ovül

sağlanmıştır. Elida F<sub>1</sub> çeşidi için kurulan her iki denemenin ovül gelişim sonuçları kıyaslandığında; ikinci ovül kültürü deneme bulgularının, birinci ovül kültürü deneme bulgularına göre ovül gelişim oranlarında daha düşük olduğu dikkati çekmiştir. Birinci ovül kültürü deneme bulgularına göre en yüksek gelişim % 95 oranıyla 5 no'lu (80  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put) ortamda görülürken, ikinci ovül kültürü deneme bulgularında en yüksek oran % 53 gelişim oranıyla 6 no'lu (160  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put) ortamdan elde edilmiştir. Genel olarak her iki denemede Put içeren ortamlarda ovül gelişimi daha başarılı bulunmuştur. Elida F<sub>1</sub> çeşidi için kallus gelişim durumunda ise birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi

karşılaştırıldığında, birinci deneme sonucunda kallus gelişim oranı oldukça düşük kalmış ve bazı ortamlarda gelişme görülmemiştir. Birinci deneme bulgularında en yüksek kallus gelişimi % 15 gelişim oranı ile 1 no'lu (40  $\mu\text{M L}^{-1}$  Spd) ve 6 no'lu (160  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put) ortamlarda gözlenmiştir. İkinci denemede ise kallus gelişim oranı en yüksek % 27 gelişim oranı ile birinci deneme ile aynı şekilde 6 no'lu (160  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put) ortamda gözlenmiş ve Put kombinasyonlarının bulunduğu ortamlarda gelişim yüzdeleri artış göstermiştir. Elida F<sub>1</sub> çeşidi için deneme kurumundan itibaren birinci denemede ovül gelişimi, ikinci denemede ise kallus gelişimi başarılı bulunmuştur (Şekil 3).

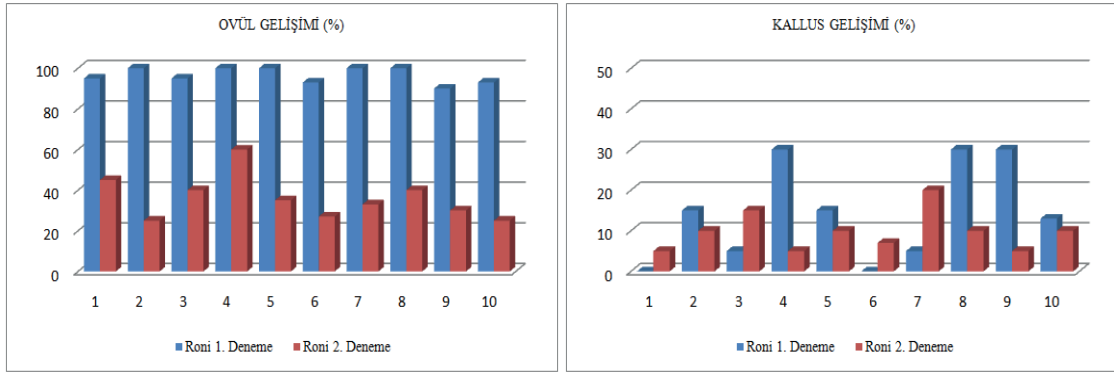


Şekil 3. Elida F<sub>1</sub> çeşidinde birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi ovül ve kallus gelişimi sonuçlarının karşılaştırılması

Roni F<sub>1</sub> çeşidi için kurulan birinci ve ikinci ovül kültürü bulguları karşılaştırıldığında, birinci denemede birçok ortam kombinasyonunda gelişme görülmüştür. Her iki deneme için ovül gelişiminin en yüksek bulunduğu ortam 40  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put içeren 4 no'lu ortamda gözlenmiştir. İkinci denemenin ovül gelişim oranları zayıf kalmıştır. Roni F<sub>1</sub> çeşidi için birinci deneme başarılı bulunmuştur. Roni F<sub>1</sub> çeşidi için kallus gelişimi ise birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi bulguları karşılaştırıldığında, ikinci denemede her ortam kombinasyonunda gelişme görülmüş, en yüksek kallus gelişim oranı % 20

gelişim oranı ile 7 no'lu (40  $\mu\text{M L}^{-1}$  Spd+40  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put) ortamda kaydedilmiştir. Birinci denemede bazı ortamda kallus oluşumuna rastlanmamıştır. En yüksek kallus gelişimi oranına 4 no'lu (40  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put), 8 no'lu (80  $\mu\text{M L}^{-1}$  Spd+80  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put) ve 9 no'lu (160  $\mu\text{M L}^{-1}$  Spd+160  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put) ortamlarda % 30 oranında gözlenmiştir. Roni F<sub>1</sub> çeşidi kallus gelişim durumu için ikinci deneme sonuçları başarılı bulunmuştur (Şekil 4).

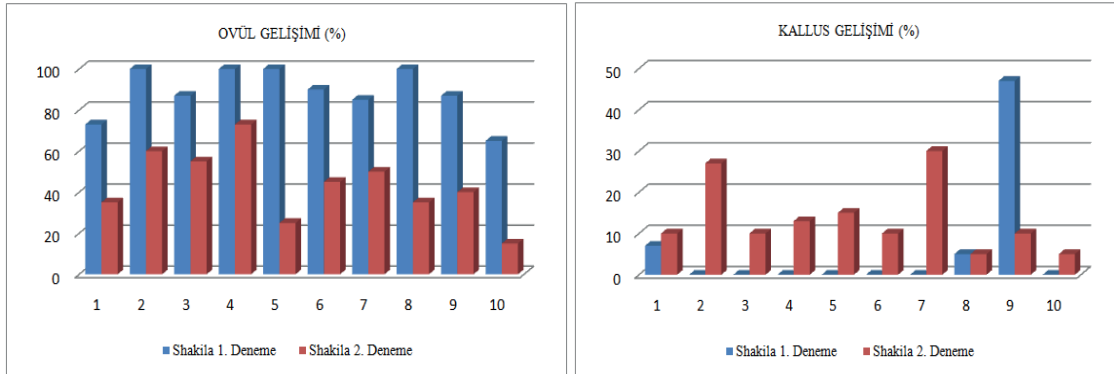
Shakıla F<sub>1</sub> çeşidi için kurulan birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi bulguları karşılaştırıldığında, her iki denemede en başarılı



Şekil 4. Roni F<sub>1</sub> çeşidinde birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi ovül ve kallus gelişimi sonuçlarının karşılaştırılması

gelişim 4 no'lu 40  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put içeren ortamda görülmüştür. Birinci deneme bulgularında her ortam kombinasyonunda başarılı gelişmeler kaydedilmiştir. İkinci denemede ovül gelişimleri ise birinci denemeye oranla zayıf kalmıştır. İkinci denemede en yüksek ovül gelişim oranı 7 no'lu 40  $\mu\text{M L}^{-1}$  Spd+40  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put ortamında % 30 olarak gözlenmiştir. Shakila F<sub>1</sub> çeşidi için kallus gelişimi ise birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi karşılaştırıldığında, birinci denemede en yüksek kallus oluşumu 9 no'lu (160  $\mu\text{M L}^{-1}$  Spd+160  $\mu\text{M}$

$\text{L}^{-1}$  Put) ortamında % 47 gelişim oranı ile çeşitlerin içinde ve tüm denemelerde kallus gelişimi durumunda en başarılı sonuç olarak gözlenmiştir. Diğer ortamlarda ise çok düşük oranlarda kallus oluşumuna rastlanmış ya da hiç kallus oluşumuna rastlanmamıştır. İkinci ovül kültürü denemesinde en yüksek kallus gelişimi 7 no'lu 40  $\mu\text{M L}^{-1}$  Spd+40  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put ortamında gözlenmiştir. Genel olarak Shakila F<sub>1</sub> çeşidinde denemenin kurumundan itibaren kallus oluşum oranları ikinci denemede başarılı bulunmuştur (Şekil 5).

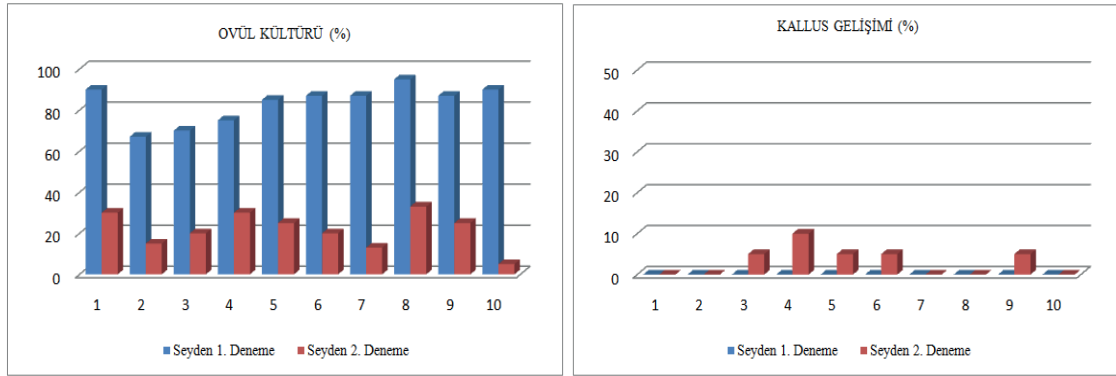


Şekil 5. Shakila F<sub>1</sub> çeşidinde birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi ovül ve kallus gelişimi sonuçlarının karşılaştırılması

Seyden F<sub>1</sub> çeşidi için kurulan birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi bulguları karşılaştırıldığında, her iki denemede en yüksek ovül gelişimi 8 no'lu (80  $\mu\text{M L}^{-1}$  Spd+80  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put) ortamında gözlenmiştir. Seyden F<sub>1</sub> çeşidi için ovül gelişimi bulgularında en iyi gelişim oranlarına birinci denemede rastlanmış, en yüksek ovül gelişim oranının ise % 95 olduğu görülmüştür. İkinci ovül kültürü denemesinde en yüksek ovül gelişim oranı % 33 ile 8 no'lu Put ve Spd'nin birlikte kullanıldığı ortamda bulunmuştur. Seyden F<sub>1</sub> çeşidi için kallus gelişimi birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi karşılaştırıldığında, birinci ovül kültürü denemesinin kallus gelişim durumuna bakıldığında

10 ortam kombinasyonunun hiçbirinde gelişme gözlenmemiştir. İkinci denemede ise bazı ortamlarda kallus gelişimine rastlanılmış, en yüksek kallus gelişim oranı 40  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put içeren 4 no'lu ortamda % 10 oranı ile tespit edilmiştir. 3 no'lu (160  $\mu\text{M L}^{-1}$  spermidine), 4 no'lu (40  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put), 5 no'lu (80  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put) ve 6 no'lu (160  $\mu\text{M L}^{-1}$  Put) ortamlarda az da olsa gelişime rastlanmıştır (Şekil 6).

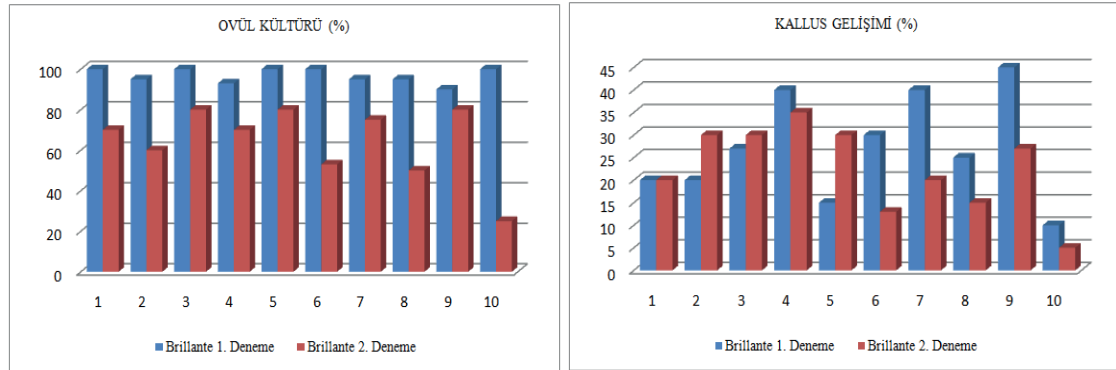
Brillante F<sub>1</sub> çeşidi için kurulan birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi ovül gelişim durumları karşılaştırıldığında, denemede yer alan tüm çeşitler içerisinde ovül gelişim oranları incelendiğinde en



Şekil 6. Seyden F1 çeşidinde birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi ovül ve kallus gelişimi sonuçlarının karşılaştırılması

yüksek oranlara sahip çeşit olduğu görülmüştür. Her iki denemeye bakıldığında en yüksek ovül gelişim oranlarına  $80 \mu\text{M L}^{-1}$  Put içeren 5 no'lu ortamda rastlanılmıştır. Bu ortamda birinci denemede ovül gelişim oranı % 100 iken, ikinci denemede % 80 olarak bulunmuştur. Brillante F1 çeşidi için kallus gelişimi ise birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi karşılaştırıldığında, birinci denemede en yüksek kallus gelişimi % 45 oranıyla

9 no'lu ( $160 \mu\text{M L}^{-1}$  Spd+ $160 \mu\text{M L}^{-1}$  Put) ortamda görülmüş, ikinci denemede ise en yüksek oran 4 no'lu ( $40 \mu\text{M L}^{-1}$  Put) ortamında % 35 oranında gözlenmiştir. Genel olarak Brillante F1 çeşidi incelendiğinde denemenin kurulumundan itibaren ovül ve kallus gelişim oranı olarak bulguların başarılı olduğu gözlenmiş olup, her iki deneme içinde önemi anlaşılmıştır (Şekil 7).

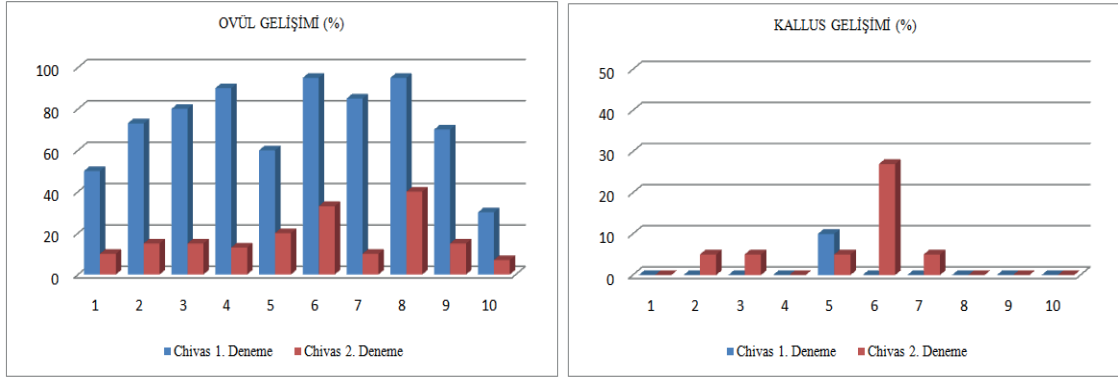


Şekil 7. Brillante F1 çeşidinde birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi ovül ve kallus gelişimi sonuçlarının karşılaştırılması

Chivas F1 çeşidi için ovül gelişimi birinci ve ikinci ovül kültürü denemeleri karşılaştırıldığında, her iki denemede en yüksek ovül gelişimi spermidine ve putrescine kombinasyonunun birlikte bulunduğu  $80 \mu\text{M L}^{-1}$  Spd+ $80 \mu\text{M L}^{-1}$  Put içeren 8 no'lu ortamda olduğu tespit edilmiştir. Birinci denemede en yüksek gelişim oranı % 95, ikinci denemede ise % 40 olarak bulunmuştur. İkinci denemede ovül gelişimleri incelendiğinde tüm çeşitler içinde bu çeşit zayıf kalmıştır. Genel olarak Chivas F1 çeşidinde denemenin kurulumundan itibaren ovül gelişim oranları birinci denemede başarılı bulunmuştur. Chivas F1 çeşidi için kallus gelişimleri birinci ve ikinci ovül kültürü denemelerde karşılaştırıldığında, birinci denemede

sadece  $80 \mu\text{M}$  Put içeren 5 no'lu ortamda % 10 oranında görülmüş, diğer ortam kombinasyonlarında kallus oluşumuna rastlanılmamıştır. İkinci denemede ise en yüksek kallus gelişimi % 27 oranıyla  $160 \mu\text{M L}^{-1}$  Put içeren 6 no'lu ortamda gözlenmiştir. 2 no'lu ( $80 \mu\text{M L}^{-1}$  Spd), 3 no'lu ( $160 \mu\text{M L}^{-1}$  Spd), 5 no'lu ( $80 \mu\text{M L}^{-1}$  Put) ve 7 no'lu ( $40 \mu\text{M L}^{-1}$  Spd+ $40 \mu\text{M L}^{-1}$  Put) ortamlarda % 5 oranıyla kallus gelişimi daha az görülmüş olup, diğer ortamlarda kallus oluşumuna rastlanılmamıştır. Kallus oluşumu için Chivas F1 çeşidi tüm çeşitlere göre gelişim oranları olarak zayıf kalmıştır (Şekil 8).

Yazlık kabaklar (*Cucurbita pepo* L.) ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde androgenesis,



**Şekil 8.** Chivas F<sub>1</sub> çeşidinde birinci ve ikinci ovül kültürü denemesi ovül ve kallus gelişimi sonuçlarının karşılaştırılması

ginogenesis ve ışınlanmış polen yöntemleri kullanarak haploid bitki eldesi hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır (Chambonnet ve Dumas de Vaulx, 1985; Kwack ve Fujieda, 1988; Gémesne ve Venczel, 1996; Metwally ve ark., 1998; Kurtar, 1999; Gémes-Juhász ve ark., 2002). Son yıllarda ışınlanmış polen tekniği uygulamaları tercih edilmekle birlikte, bu yöntemde dışarıdan bir ışın kaynağı ihtiyacı duyulması sebebiyle ginogenesis çalışmalarının da alternatif yöntem olarak geliştirilmesi önemli görülmektedir.

Kabakgillerde yapılan ovül ovaryum çalışmalarında oksin (2.4-D, NAA, IAA ve benzeri) ve sitokinin (BAP, KIN ve benzeri) bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmaktadır. Önceki çalışmalar göz önüne alındığında özellikle kabakta yapılan çalışmalarda genellikle embriyo uyartımı için 2.4-D (Metwally ve ark., 1998; Shalaby, 2007; Rakha ve ark., 2012; Kurtar ve Balkaya, 2016; Kurtar ve ark., 2018) tercih edilmiştir. 2.4-D'nin bulunduğu tüm ortamlarda başarılı ovül gelişim bulguları elde edilirken, kallus oluşturan bazı gelişme olan ovüllerden bitkiye dönüşüm sağlanamamış ve bu başarının elde edilebilmesi için bu ortam kombinasyonları ile bitki büyüme düzenleyicilerinin birlikte kullanılması düşünülmektedir.

Kurtar ve ark. (2018) yaptıkları bir çalışmada ışınlanmış polen ve anter kültürü tekniklerine alternatif olarak ovül kültürü tekniğini kullanmışlardır. Farklı çiçeklenme tarihlerinde alınan ovüller 2.4-D, benzil amino pürin (BAP), thidiazuron (TDZ) ve naftalen asetik asit (NAA) eklenen ortamlarda en yüksek başarı oranını 4.0 mg L<sup>-1</sup> BAP+0.05 mg L<sup>-1</sup> NAA+0.1 mg L<sup>-1</sup> TDZ içeren ortamdan elde etmişlerdir. Toplamda geliştirdikleri 122 bitkiden 70 tanesinin haploid, 46'sının diploid, diğer bitkilerin ise miksoploid olduklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda antezis aşamasından 1 gün öncesinde alınan ovüllerde renk ve boyut değişimi ile birlikte ovül ve kallus gelişimi

gözlenmiş, fakat bu kalluslarda embriyo gelişmediği ve bitkiye dönüşümün gerçekleşmediği gözlenmiştir. Kurtar ve Balkaya (2016)'nın yaptıkları çalışmalar ile elde ettiğimiz veriler karşılaştırıldığında, 2.4-D'nin tek başına ovül gelişmesi üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür.

Erol (2018) ovül kültürü çalışmasında kullandığı beş farklı hıyar çeşidi için, kullandığı tüm ortamlar ve kontrol grubu içerisinde 0.04 mg L<sup>-1</sup> TDZ değerini sabit tutarak 40, 80, 120, 160 ve 200 µM dozları ile ayrı ayrı ve birlikte kullandığı putrescine ve spermidine kombinasyonlarından elde ettiği bulgularında çeşitlere göre farklı içerikteki ortam kombinasyonlarında başarılı ovül gelişim sonuçlarına ulaşmış, fakat ovüllerden bitkiye dönüşümün olmadığını bildirmiştir. Tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar Erol (2018)'un hıyarda uyguladığı ovül kültürü çalışması ile kıyaslandığında, ovül gelişimlerinin farklı genotiplerde ve farklı poliamin içerikli ortamlarda başarılı verilerine ulaşılmış ve değişik ovül gelişim oranları elde edilmiştir. Poliamin içerikli ortamlarda kontrol grubuna göre daha iyi sonuçlara ulaşılmış, Put ve Put+Spd içerikli ortamlarda gelişen ovüllerde kallus oluşumu görülmüştür. Poliaminlerin ovül gelişimi üzerine etkisi açısından çalışmamızla benzer sonuçlar içermektedir.

#### 4. Sonuçlar

Bu çalışmada kabakta ovül kültüründe spermidine ve putrescine uygulamalarının haploid bitki eldesi üzerine etkilerinin Elida F<sub>1</sub>, Roni F<sub>1</sub>, Shakila F<sub>1</sub>, Seyden F<sub>1</sub>, Brillante F<sub>1</sub> ve Chivas F<sub>1</sub> çeşitlerinde etkileri araştırılmıştır. İki farklı gelişme döneminde kurulan araştırma sonuçlarımız incelendiğinde, birinci dönem kurulan denemede daha yüksek ovül gelişim yüzdeleri, ikinci dönem kurulan denemede ise daha yüksek kallus oluşumu tespit edilmiştir. Bu da ovaryumların toplandığı dönemde çevre koşullarının (özellikle sıcaklık) ovül kültürü

başarısını önemli düzeyde etkilediğini ortaya koymuştur.

Çalışmamızda genotip etkisi çok önemli bulunmuştur. Denemede yer alan çeşitlerden Brillante F1'in deneme koşullarında en başarılı olduğu, Chivas F1'in ise en düşük ovül ve kallus gelişimine sebep olduğu tespit edilmiştir.

Ovül-ovaryum kültürü çalışmalarında poliaminlerin kullanılması ile başarılı sonuçlar elde etmenin önemi anlaşılmış, fakat haploid bitkilerin 2,4-D'nin ve bazı büyümeyi düzenleyicilerinin kültür ortamı bileşenlerinde yer alması ile elde edilebileceği önerilmiştir.

Çalışma ve bu konu hakkında daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde elde edilen verilerin, kabakta ve diğer kabakgıl türlerinde ginogenesis çalışmalarında haploid bitki eldesi için poliaminlerin gelecekte daha çok çalışmalarda yer alacağı ve bu çalışmanın diğer çalışmalara önemli bir kaynak olacağı düşünülmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışma; Çukurova Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından "FYL-2018-10335" No'lu proje ile desteklenmiş olup, ovül kültürü çalışması için laboratuvar olanaklarının kullanılmasını sağlayan Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne ve laboratuvar ve arazi çalışmalarında yardımcı olan Tütün Teknik Mühendisi Mansur Hakan EROL'a teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Anonim, 2019. Bitkisel Üretim İstatistikleri. Türkiye İstatistik Kurumu (<http://www.tuik.gov.tr>), (Erişim tarihi: 22.02.2019).
- Anonymous, 2018. FAO Production Year Book (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>), (Erişim tarihi: 22.01.2018).
- Aras, V., Denli, N., Keleş, D., Nacar, Ç., 2011. Kabak (*Cucurbita pepo* L.) hatlarının morfolojik karakterizasyonu ve akrabalık derecelerinin belirlenmesi. *Alatarım*, 10(1): 13-18.
- Büyüksulu, N., 2014. Besinlerin poliamin içerikleri. *Müşbed*, 4(2): 105-110.
- Chambonnet, D., Dumas de Vaulx, R., 1985. Obtention of embryos and plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo*. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 8, 66.
- Erol, M.H., 2018. Hıyarlarda ovül-ovaryum kültürleri ve ışınlanmış polen tekniği ile spermidin ve putresin uygulamalarının haploid embriyo uyartımına etkileri. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

- Gémes-Juhász, A., Balogh, P., Ferenczy, A., Kristóf, Z., 2002. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Report*, 21(2): 105-111.
- Gémésné, J.A., Venczel, G., 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*, pp. 200-201.
- Halperin, W., Wetherell, D.F., 1964. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. *American Journal of Botany*, 51(3): 274-283.
- Hussain, J., Khan, F.U., Ullah, R., Muhammed, Z., Rehman, N.U., Shinwari, Z.K., Khan, I.U., Zohaib, M., Imad-Ud-Din, Hussain, A.M., 2011. Nutrient evaluation and elemental analysis of four selected medicinal plants of khyber pakhtoon khwa, *Pakistan Journal of Botany*, 43(1): 427-434.
- Kurtar, E.S., 1999. Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) haploid embriyo uyartımı ve bitki oluşturma üzerine araştırmalar. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Kurtar, E.S., Balkaya, A., 2016. Kestane kabağı (*Cucurbita maxima* L.) ve bal kabağı (*Cucurbita moschata* L.)'nda ışınlanmış polen tekniği ile elde edilmiş küçük yapılı embriyoların bitkiye dönüşümü üzerine besi ortamlarının etkisi. 7. *Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, Cilt 2: Sebzeçilik-Bağcılık-Süs Bitkileri, 25-29 Ağustos, Çanakkale, s. 175-179.
- Kurtar, E.S., Balkaya, A., Özer, M.O., 2018. Production of callus mediated gynogenic haploids in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 54(1): 9-16.
- Kwack, N.S., Fujieda, K., 1988. Somatic embryogenesis in cultured unfertilized ovules of *Cucurbita moschata*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 57(1): 34-42.
- Metwally, E.I., Moustafa, S.A., El-Sawy, B.I., Haroun, S.A., Shalaby, T.A., 1998. Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52(3): 117-121.
- Pochard, E., Dumas de Vaulx, R., 1979. Haploid parthenogenesis in *Capsicum annuum* L. In: J.G. Hawkes, R.N. Lester and A.D. Skelding (Eds.), *Reprinted from the biology and taxonomy of the Solanaceae*, Academic Press, New York, pp. 455-472.
- Rakha, M.T., Metwally, E.I., Moustafa, S.A., Etman, A.A., Dewir, Y.H., 2012. Evaluation of regenerated strains from six "*Cucurbita*" interspecific hybrids obtained through anther and ovule "*in vitro*" cultures. *Australian Journal of Crop Science*, 6(1): 23-30.
- Shalaby, T.A., 2007. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Scientia Horticulturae*, 115(1): 1-6.