

T. C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*CUCURBITA PEPO* L. (KABAK) BİTKİSİ  
EMBRİYO KÜLTÜRLERİNDE  
KROMOZOM SAYISI VE MİTOZ  
AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Sevgin ÇAPAN

Yüksek Lisans Tezi

T.Ü. FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI  
Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA

2006  
EDİRNE

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*CUCURBITA PEPO* L. (KABAK) BİTKİSİ  
EMBRİYO KÜLTÜRLERİNDE  
KROMOZOM SAYISI VE MİTOZ AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

SEVGİN ÇAPAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA

2006

EDİRNE

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*CUCURBITA PEPO* L. (KABAK) BİTKİSİ  
EMBRİYO KÜLTÜRLERİNDE  
KROMOZOM SAYISI VE MİTOZ AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Sevgin ÇAPAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Bu tez 14/04/2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA  
(Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Murat TÜRKYILMAZ

(Jüri üyesi)

Doç. Dr. Selçuk YURTSEVER

(Jüri üyesi)

**İÇİNDEKİLER****Sayfa No**

Teşekkür.....	ii
Özet	iii
Abstract	iv
1. Giriş.....	1
2. Genel Bilgiler.....	2
2.1. Doku Kültürü.....	2
2.2. Kültür Koşulları.....	4
2.3. Bitki Doku Kültürlerinin Uygulama Alanları.....	5
2.4. Bitki Doku Kültürü İle Yapılmış Çalışmalar.....	6
2.5. En Çok Kullanılan Kültür Yöntemleri.....	12
2.6. Embriyo Kültürü.....	13
2.7. Türkiye’de Bitki Doku Kültürü Çalışmaları.....	14
2.8. Bitki Hakkında Genel Bilgiler ( <i>C. pepo</i> L (kabak)).....	15
2.9. <i>Cucurbitaceae</i> Familyasında Yapılan Çalışmalar.....	21
3. Materyal ve Metod.....	29
3.1. Materyalin Elde Edilmesi.....	29
4. Bulgular.....	40
5. Tartışma.....	49
Kaynaklar.....	60
Özgeçmiş.....	65
Şekiller ve Çizelgeler.....	66

**TEŞEKKÜR**

Çalıőmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA'ya, maddi ve manevi katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen aileme ayrıca her zaman yanımda olan ve her konuda desteğini gördüğüm sevgili Kıvanç SAYLAN'a sonsuz teşekkürler.

**ÖZET**

Bu çalışmada *Cucurbita pepo* L. (kabak) bitkisi kullanılarak embriyo kültürü yöntemi ile bitki üretimi sağlanmıştır. Bu yöntem ile bitki üretimi sırasında meydana gelen mitoz bölünme ve kromozomal değişimler incelenmiştir. Bu amaçla Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden alınan *C. pepo* bitkisinin tohumlarından, Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Sistematik Araştırma Laboratuvarı ve Doku Kültürü Laboratuvarında yetiştirilen örnekleri kullanılmıştır. Çalışma, kontrol ve deney grubu olacak şekilde planlanmıştır. Kontrol grubu bitkileri laboratuvar ortamında çimlendirilerek elde edilmiştir. Deney grubu bitkileri ise embriyo kültürü yöntemleri ile elde edilmiştir. Her iki gruba ait materyallerden hazırlanan mitoz preparatlarında mitotik indeks ve kromozom incelemeleri yapılmıştır. Kontrol ve deney grubu bitkilerinde kromozom sayı ve yapıları bakımından farklılıklar görülmemiştir. Mitotik indeksin ise deney grubunda daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Cucurbita pepo* L., kabak, doku kültürü, embriyo kültürü, mitotik indeks.

**ABSTRACT**

In this study, plant production is achieved by using embryo culture technique in *Cucurbita pepo* L. (squash). We examined the chromosome variation and mitosis that occurred during the plant production process. In this respect, *C. pepo* seeds which were obtained from Trakya University Research Institute than we used these seeds at Biology Department of Trakya University Research Laboratory and Tissue Culture Laboratory for the present study. This study was planned into two different groups which were control group and experimental group. Control group plants were obtained by sprouting in the laboratory conditions. Experimental group plants were obtained by embryo culture techniques. Mitotic index and chromosome examinations were carried out on preparates which were prepared for each two groups. The control and experimental group plants did not show any differentiation regarding chromosome number and structure. However mitotic index was found higher than that in experimental group.

**Key words:** *Cucurbita pepo* L., squash, tissue culture, embryo culture, mitotic index.

## 1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun beslenmesinde en çok kullanılan bitkilerin içinde en önemlileri tahıllar, baklagiller, endüstri bitkileri, sebzeler ve meyvelerdir. Ancak buğday, çeltik, mısır ve patatesin üretimi diğer ürünlerin üretiminden daha fazladır. Bununla beraber dünya florasında yaklaşık 250 bin bitki türünün bulunduğu fakat bunların sadece 3000'inin besin değerine sahip olduğu belirtilmektedir (Baboğlu M. ve ark., 2001).

Tarihte bitkilerin insan ve hayvan beslenmesinde kullanımı amacıyla iyileştirilmesi çalışmalarında iki önemli dönem göze çarpmaktadır. Bunlardan ilki 'Yeşil Devrim' (Green Revolution) olarak adlandırılan, klasik bitki ıslahı, ticari gübrelerin kullanımı ve diğer agronomik tekniklerin gelişiminin etkili olduğu dönemdir. Yeşil devrimde üretim, tohum-bitki-tohum döngüsünde gerçekleştirilir. İkinci dönem ise 'Gen Devrimi' (Gene Revolution) olarak adlandırılmaktadır. DNA'nın yapısının anlaşılması, bakteri genetiği, bitki doku kültürünün gelişimi ve bu tekniklerin birçok bitkiye uygulanabilir olması gen devriminin başlamasını hazırlamıştır. Görüldüğü gibi bitki doku kültürü, bitki genetik mühendisliği ile birlikte bitki biyoteknolojisini oluşturan ana unsurlardan biridir (Baboğlu ve ark., 2001).



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Doku Kültürü

Bitki doku kültürü; steril şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Eksplant bitkinin çeşitli kısımlarından alınabilen kültür başlatmada kullanılacak bitki parçalarıdır. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitlilik oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetik iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretilmesinde, çeşitli doku kültürü yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Baboğlu ve ark., 2001).

Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitkilerin rejenerasyon yetenekleridir. Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibariyle üç kısımda incelenebilir: 1) organize olmuş meristematik hücreleri içeren somatik dokulardan rejenerasyon, 2) meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon ve 3) mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon. Birinci tip rejenerasyonda uç ve yan meristemlerden bitkiler çoğaltılır. Buna meristem kültürü yoluyla klonal çoğaltım denilir. Elde edilen hücreler tamamen donör (verici) bitkiye benzerler. İkinci tip rejenerasyon, doğrudan bir bitki eksplantının kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının, genellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin (özellikle oksin ve sitokininler) etkisi sonucu bölünerek ve organize olarak, organları ve daha sonra da bitkiyi (direkt organogenesis) veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyo ve daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturması (direkt somatik embriyogenesis) şeklinde olabilir. Ayrıca her iki durum belirli bir kallus, proto-

kallus veya hücre süspansiyonu oluşumu devresinden sonra da ortaya çıkabilir (indirekt rejenerasyon). Ortaya çıkan bitkilerde bazı kalıtsal veya geçici varyasyonlar oluşabilir. Son olarak normal kromozom sayısının yarısını içeren hücrelerden de direkt veya dolaylı yollarla bitki rejenerasyonu olabilir. Bu durumda donör bitkinin kromozom sayısının yarısına sahip, genellikle steril olan haploid bitkiler elde edilebilir (Baboğlu ve ark., 2001).

Tüm doku kültürlerinin başlangıç noktası eksplant denen bitki dokularıdır. Doku kültürü bitkilerin kök, gövde, petiyol, yaprak veya çiçek parçalarından olabilmekte ve başarı oranı türlere göre değişmektedir. Önemli olan eksplant olacak bitki parçası yüzeyinin tüm mikrobiyal kontaminasyonlardan arındırılmasıdır. Bitki hücrelerinde bölünme bakteri ve mantarlara kıyasla daha yavaş olmaktadır (Collin ve Edwards, 1998).

Doku kültüründe fizyolojik aşama, bitkinin doku kültürüne başlandığında cevap verecek yeteneğe sahip olmasıdır. Kaynak bitki sağlıklı olmalı ve açıkça görülebilecek çürüme veya hastalık belirtilerinden uzak olmalıdır. Eksplant denen bitki, doku kültürü çalışmaları dolayısıyla dikkatle seçilmelidir. Daha genç olan dokular, daha aktif bölünürler ve kallus oluşturma yeteneği daha yüksektir. Hücreler aktif olarak bölünebilir olmalıdır ve dormansi periyoduna girme eğiliminde olmamalıdır (Collin ve Edwards, 1998).

Kültürü başlatmak ve kültürdeki bitki hücrelerini uzun süre korumak için veya kültüre edilmiş hücrelerden tam bitkileri rejenere etmek için gereken koşullar her bitki türü için farklıdır. Bir türün her varyetesi için de bireysel olarak belirlenmiş kültürel gereksinimler farklı olacaktır. Yirminci yüzyılda, bitki doku kültürü hakkında edinilen tüm bilgilere rağmen, her bir varyete için denemeler yapılarak, kültür koşullarının doğru olarak tanımlanması gerektiği belirtilmiştir (Collin ve Edwards, 1998).

## 2.2. Kùltür Koşulları

Sıcaklık ve ışık ihtiyacı seçilen bitki türüne göre değişmektedir. Genellikle birçok bitki türü için gerekli sıcaklık 25 °C'dir. Bu amaçla günümüzde, sıcaklık ve aydınlatmayı istenilen özelliklerde sağlayabilen iklim dolapları kullanılır. Yetiştirme ortamı olarak ta çalışmanın amacına göre değişik özelliklere sahip kùltür kapları kullanılır. Yetiştirme ortamı (besiyeri) bitkisel organizmaların gelişimi için gerekli mineralleri ve diğer besinleri içeren karışımlardır. Bu karışımlara çalışmanın amacına yönelik çeşitli bitki gelişim düzenleyiciler ilave edilir.

Doku kùltürünün gelişimi için eksplant steril bir besiyerinde inkübe edilmelidir. Besiyerinin bileşimi bitki hücrelerini güçlendirecek, hücre bölünmesini uyaracak ya da bireysel bitki organlarının gelişmesini sağlayacak şekilde ayarlanmalıdır. Oksin ve sitokinin gibi büyüme düzenleyicilerinin besiyerindeki yoğunluğu, doku kùltürünün oluşumunu başlatıp başlatmayacağını ve sonradan nasıl gelişeceğini belirlemek için kritik bir değer olarak görünmektedir. Başarılı bir kùltür çalışmasında çok sayıda embriyo ve bu embriyodan kökler ve diğer yapıları oluşturacak kallus oluşmalıdır. Kallus oluşumunun bitki rejenerasyonu ve mikroçoğaltım teknolojisi için temel olduğu belirtilmektedir (Collin ve Edwards, 1998).

Kallus yapay kùltür ortamlarına konulan bitki hücresi veya dokularından meydana gelen farklılaşmamış hücreler yığındır. Genellikle kallus dokusu yaralanmış veya kesilmiş doku yüzeylerinde oluşmaktadır. Bitkilerde totipotensi yeteneği çok gelişmiştir. Tek bir hücreden orijinal bir bitkinin tüm organlarına sahip yeni bir bitki oluşabilmektedir.

### 2.3. Bitki Doku Kùltürlerinin Uygulama Alanları

Modern tarımda en fazla 150 bitki türünün tarımının yapıldığı ve bunların iyileştirilmesinde klasik yöntemlerin sınırına gelindiği düşünülürse, bitki doku kùltürü tekniklerinin süratle geliştirilmesinin ve uygulanmasının önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Bitki doku kùltürünün en önemli etkisi ve uygulama alanı, mikroçoğaltım ve en önemlisi bitkilerin hücre bazında kontrollü olarak çoğaltılmasıdır. Bu yöntemle; soğuga, kurağa, tuza, ağır metallere, herbisitlere, hastalık ve zararlılara dayanıklı bitkiler yetiştirilmektedir (Baboğlu ve ark., 2001).

Ayrıca besin olarak kullanılan bitkilerin raf ömrünün uzatılması, depolamaya dayanıklı olma, kesme çiçeklerde vazo ömrünün uzatılması, patojensiz bitki elde etmede meristematik hücrelerin kullanımı gibi konularda doku kùltürü çalışmaları yapılmaktadır. Bu hücreler kullanılarak; somatik melezlemeler yoluyla;

- a) Sitoplazmik erkisirlığın aktarılması ve hibrit ıslahında kullanımı,
- b) Farklı çiçek renklerinin elde edilmesi,
- c) Azot fiksasyonu özelliğinin baklagil olmayanlara aktarılması (özellikle tahıllar ve çok yıllıklar),
- d) Kombine bitkilerin eldesi (Pomato veya Tomapo= domates patates melezi),
- e) Triploid bitki eldesi, bitkilerde yağ ve şeker oranının arttırılması çalışmaları yapılabilir.

Doku kùltürüne uygun olmayan fakat ekonomik değeri yüksek olan tür, çeşit veya biyotiplerde doku kùltürüne uygunluğu sağlayan genlerin klasik ıslah metotları ile aktarılması, doku kùltürü tekniklerini uygulayarak *in vitro* manipulyasyon yapılması, hücre kùltürleri veya transgenik bitkiler ile çeşitli endüstriyel enzimlerin üretimi, somatik embriyogenesis yoluyla sentetik tohum üretimi, özellikle çayır-mera alanlarında kuraklığa dayanıklı bitki tohumlarının çoğaltılması, asimbiyotik *in vitro* çimlendirme, tohum ve fide üretimi (patateste minitüber üretimi vb.), hibrit tohumlarda genotip bozulmadan vegetatif yollarla fide eldesi, yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olan bitki türlerinin doku kùltürü ile korunarak çoğaltılması ve Türkiye’de hücre ve doku bankalarının kurulması, ev imkanları ile “evde doku kùltürü” çalışmalarının

yapılmaya başlanması gibi konuların hepsi doku kültürünün gelecekte etkili olacağı alanlar olarak gözükmektedir (Baboğlu ve ark., 2001).

İlk topraksız üretim şekli olan hidrofonicler (sulu çözeltiler içinde bitkilerin topraksız ortamlarda yetiştirilmesi), tüm bir bitkinin laboratuarda tam olarak formüle edilmiş besin ortamlarında yetiştirilebilmesi düşüncesini ve daha sonra da bitki organlarının benzer şekilde kültüre alınabilmesi fikrini doğurmuştur. Bu yolda en önemli adımlardan birisi besin ortamlarının geliştirilmesi ve tamamen aseptik şartlarda doku kültüründe kullanılmasıdır. Ayrıca zaman içinde çalışmaların organ ve doku gibi daha büyük parçalardan tek hücre kültürüne doğru yöneldiği görülmektedir. Bunun sonucunda, 1983 yılında bitkilere ilk gen transferi gerçekleşmiştir. Bu transferin gerçekleştirilmesinde doku kültürünün kullanılması gerekli olmuştur. Günümüzde bitki doku kültürleri bir çok alanda uygulanmaktadır (Baboğlu ve ark., 2001).

Mısırın (*Zea mays* L.) doku kültürü ve kültürde yetiştirilmesi konusunda da araştırmalar yapılmıştır. Mısırın zayıf hücre sıralarının geliştirilmesi, daha etkili bir biçimde çoğaltılması ve fazla miktarda ürün veren hibritlerin yetiştirilmesi, doku kültürü ile başarılmıştır. Büyük hibritlerde genetik materyalin değiştirilmesi için somaklonal varyasyonların daha kullanışlı olduğu, doku kültürü çalışmaları ile bilinen bütün infeksiyöz ajanlara karşı kullanılacak olan, hastalıklara dayanıklı süper klonların elde edildiği bildirilmiştir (Ahsan ve ark., 2000).

#### **2.4. Bitki Doku Kültürü İle Yapılmış Çalışmalar**

1. Türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü
2. Haploid bitki üretiminde anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürü
3. Somaklonal varyasyon
4. *İn vitro* seleksiyon

5. *İn vitro* dölleme
6. *İn vitro* germplazm muhafazası
7. Somatik hücre melezlemesi (protoplast füzyonu)
8. Gen transferi
9. Hastaliksız bitki elde edilmesinde meristem kültürü
10. Mikroçoğaltım
11. Sentetik tohum üretimi (somatik embriyolar)
12. Sekonder metabolit üretimi (kallus-hücre süspansiyonları)
13. Kimeralar (Baboğlu ve ark., 2001).

Kültür yöntemi ile hücreler uzun bir süre farklılaşmamış hücre kümeleri şeklinde veya rejenere olmuş tam bitkiler şeklinde korunabilmektedirler. Doku kültürü çalışmaları sırasında oluşan kallus hücreleri ergin bitki hücrelerine benzememektedirler. Bitki gelişmesi sırasında her biri farklı hücrelere dönüşen, farklılaşmamış meristematik hücrelere çok benzerler. Kallus farklılaşma ve büyüme farklılığı gösteren düzensiz hücre kümesidir. Besiyerinde yapılan değişiklikler ile tüm bitkiye yeniden farklılaşabilme yeteneğindedir. Bitkinin diğer kısımlarının farklılaşırken bazı bölgelerinin meristematik olarak kaldığı, sertleşmenin (sklerifikasyonun) zamanla doku parçalarının ayrı ayrı ölmesine neden olduğu belirtilmiştir (Collin ve Edwards, 1998).

Kallus hücreleri, 1934 yılında P.R. White tarafından domates (*Lycopersicon esculentum*) kök ucu ve meristem yapıları sıvı ortamda, (örneğin daldırma yöntemiyle), kültüre alınırken bulunmuştur. Besiyeri, inorganik tuzlar, glikoz ve maya ekstraktı içermektedir. Maya ekstraktında B vitaminlerinin üçü (tiamin, piridoksin ve nikotinik asit) bulunmaktadır (Chang ve Chang, 1998).

Aynı yıllarda asmanın (*Salix*) kambiyumunda ve diğer sarılıcı bitkilerde, yara dokusunda kallus denen normal olmayan bir farklılaşma görülmüştür. 1939'da ilk sürekli kallus kültürleri havuç (*Daucus carota*) kök eksplantlarında başlatılmıştır. Böyle kültürler daima taze besiyerine başarılı bir şekilde transplante edilebilmektedir. Transplantasyonlar sekiz haftada üçer kez yapılmaktadır. Tüm doku bölümleri kültüre edildikten sonra, kallus kültürlerinin hücre kültürleri gibi olmadığı anlaşılmıştır. Pek çok hücre bölünme yeteneğini korusa da, hücrelerin hepsi meristematik özellikte değildir. Bunun sonuçlarından biri nukleusun anöploidi göstermesidir ve bu da anormal kromozom sayılarının oluşmasına neden olur (Chang ve Chang, 1998).

1941 yılında kallus kültürü için yeni bir bileşen olarak hindistan cevizi sütü bulunmuştur. Hindistan cevizi sütü sıvı bir endospermadır. Doğal olarak hücelere besin sağlar ve aynı zamanda embriyoyu büyüme için uyarır. Kallus kültürlerinden elde edilen sonuçlar, aynı zamanda yabancı hücrelerin de büyümesini uyararak aktif bileşenler içerdiğini göstermiştir (Chang ve Chang, 1998).

Tütünün (*Nicotiana tabacum*) yaralanmış parçalarından izole edilmiş yara tümör dokularının kültürü ve gelişmesi için bir teknik geliştirilmiştir. Kallus büyümesi maya ekstraktı, hindistan cevizi sütü veya eski DNA preperasyonları sağlandığında gerçekleşmiştir. Taze hazırlanmış DNA etkisizdir fakat otoklavda muamele edilince etkili hale gelmektedir. DNA'nın kırılması sonucu oluşan kırılma ürünlerinin bir kısmının hücre bölünmesi ve büyümesi için gerekli olduğunu belirtmiştir. Kallus dokularının farklılaşma şekillerinin mikroskopik analizleri, bitki hücrelerinin rejenerasyon kapasiteleri hakkında bilgi vermektedir (Chang ve Chang, 1998).

Pirincin (*Oryza sativa* L.) kuraklığa dayanıklı yabani ırklarında, kallus gelişimi ve bitki rejenerasyonu ile ilgili özelliklerin değişkenlik analizi yapılmıştır. Kallus gelişimi ve plantlet rejenerasyonu ile ilişkili olarak bitkinin yeşil noktalı olması ve köklerinin fibrilli olması bulunmuştur (Gomez ve Kalamani, 2002).

Pirinç bitkisiyle yapılan diğer bir çalışma da, pirincin tohumundan elde edilen kallusta rejenerasyonun geliştirilmesi ile ilgilidir. Kallus oluşumu 2 mg/l 2,4 D (2,4-Diklorfenoksi asetik asit) içeren N<sub>6</sub> besiyerinde başarılmıştır. Kallus indüksiyonunun N<sub>6</sub> besiyerinde %83.3 ve MS besiyerinde %75.05 olduğu saptanmıştır. Kallus rejenerasyonu en iyi 1 mg/l NAA (Naftelen asetik asit) içeren besiyerinde ve 5 mg/l<sup>-1</sup> BAP (6-Benzil amino pürin) içeren besiyerinde (örneğin %81.6) gerçekleşmiştir (Rashid ve ark., 2004).

Hint pirincinin kallus kültüründen bitki rejenerasyonunun olması için farklı besiyerlerinin nasıl optimize edildiği ile ilgili bir çalışma da yapılmıştır. Bu çalışmada, olgun embriyolardan kallus oluşumunu başlatarak bitkiyi rejenere edebilmek için 2,4 D'nin tek başına farklı miktarlarda kullanılması veya buna benziladeninin farklı miktarlarda eklenerek kullanılmasıyla farklı besiyerleri geliştirilmiştir. Sonuçta farklı miktarlarda büyüme düzenleyicilerini içeren MS ve N<sub>6</sub> besiyerinde ve bu büyüme düzenleyicilerini içermeyen aynı besiyerlerinde bitki rejenerasyonu başarılmıştır (Khan ve ark., 1999).

*Arabidopsis thaliana* bitkisinin eksplantlarında oluşan kallusta kromozom değişikliği ve genotip arasındaki ilişki incelenmiştir. *A. thaliana*'nın, iki diploit ekotipinden (Columbia ve Wilna) ve Wilna ekotipinin ototetraploid bitkilerinden alınan dört çeşit eksplanttan on iki kallus dizisi elde edilmiştir. Kültürde, belirli kallus dizilerinde kromozom değişikliklerinin sitogenetik analizleri, primer kültür ve kallus için yapılan çalışmalar 5 ayda tamamlanmıştır. İnterfaz nukleusunun ploidi derecesi kromosentrların boyutu incelenerek ve interfaz hücrelerinin nukleusu sayılarak hesaplanmıştır. Kallus oluşumu sırasında, tüm kallus dizilerinde ilk olarak poliploid hücreler gözlenmiştir. Primer kültürde, ploidi derecesinin 2 ve 15n (10-75 kromozom) arasında değiştiği bulunmuştur. Eski kallus hücrelerinde, poliploid hücre frekansının ilk 5 ayda daha yüksek olduğu fakat ploidi derecesinin değişmediği bildirilmiştir. Ototetraploid bitkilerden elde edilen kallus dizilerinde, diploid ve poliploid hücrelerle birlikte kromozom sayısının azaldığı görülmüştür (Fras ve Maluszynska, 2004).

Tropikal mısır genotiplerinde, bitki rejenerasyonu ve tip II kallus üretimi ile 113 adet doğal mısır türünün tropikal koşullara uyumları incelenmiştir. Gümüş nitrat kullanılarak hazırlanan besiyerlerinde gelişen hücre sıralarının 42'sinden bitki rejenerasyonu ve tip II kallus üretimi başarılmıştır. Bunlardan 48 tanesinde tip II kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonunun yüksek kapasitede olduğu saptanmıştır (Carvalho ve ark., 1997).

ilek bitkisinde rejenerasyon ve kallus kültürlerinde farklı eksplant kaynaklarına göre büyüme düzenleyicilerinin etkisi değerlendirilmiştir. Bitkiler, mümkün olan en kısa sürede, farklı hormonal kombinasyonlar ve farklı eksplant çeşitlerinden maksimum miktarda üretilmeye çalışılmıştır. *İn vitro* büyümede kallus oluşumunun serada yetiştirilen bitkilerdekine oranla daha fazla olduğu görülmüştür. Kallus oluşumunun başlaması ve BAP, IBA (İndol-3-bütirik asit), NAA ve 2,4-D gibi hormonların rejenerasyona etkileri incelenmiştir (Khan ve Spoor, 2000).

*Triticum turgidum* Desf. kültürlerinin olgun embriyolarından bitki rejenerasyonu, genotip ve kültür besiyerinin kallus oluşumuna etkisi incelenmiştir. Çalışmada 12 buğday bitkisinin *in vitro* doku kültürüne verdiği yanıtlar değerlendirilmiştir. Dört farklı MS besiyerinde, zigotik olgun embriyolarda, kallus oluşumu değerlendirilmiştir. Her bir genotip ve besiyeri tipine göre kallus oluşturma oranları incelenmiştir. Kallusun, her bitki türüne göre kompakt, embriyonik, yumuşak



veya sulu olduğu bulunmuştur. Bu oranların genotip ve besiyerine bağlı olarak %54 ve %100 arasında olduğu açıklanmıştır. Besiyeri içeriği ve genotipe bağlı olarak, yumuşak kallusla kıyaslandığında, sert bir kallustan bitkilerin rejenerasyonunun daha fazla gerçekleştiği açıklanmıştır. En iyi sert kallus oluşumu veren ve bitki rejenerasyonun en iyi olduğu besiyerlerinin MSm (30 g/l maltoz) ve MS40 (30 g/l sukroz ve 40 mM NaCl) olduğu açıklanmıştır. Baztan, Bradano ve Don Pedro'nun olgun embriyolarının in vitro yanıtının (sıkı kallustan oluşan toplam köklerin sayısı / gelişen embriyoların sayısı) en fazla bulunduğu açıklanmıştır. Bunların, olgun zigotik embriyolardan kallus oluşturma konusunda yapılacak araştırmalarda, en iyi başlangıç materyali olduğunu bildirmişlerdir (Gonzalez ve ark., 2001).

Bir başka çalışmada buğdayın rejenere bitkileri değerlendirilmiş ve buğday kültürlerinin, doku kültürüne yanıtları karşılaştırılmıştır. Üç buğday genotipinin (Bakhtawar-92, Punjab-96 ve İnqilab-91) kallus oluşturma potansiyelleri ve bunların değişik bileşenler içeren besiyerinde rejenerasyonları test edilmiştir. Bakhtawar-92'nin kallus indüksiyonuna en çok karşılık veren genotip olduğu, bunu İnqilab-91 ve Punjab-96'nın izlediği bildirilmiştir. Ayrıca Bakhtawar-92'nin diğer genotiplerle karşılaştırıldığında fazla miktarda kallus oluşturduğu görülmüştür (Farooq ve ark., 2004).

Domatesin (*Lycopersicon esculentum* L., c.v. Roma) *in vitro* fidelerinin değişik eksplantları kullanılarak rejenerasyon çalışmaları yapılmıştır. Kallus indüksiyonu ve rejenerasyon için eksplant olarak, domatesin hipokotilleri ve yaprak diskleri kullanılmıştır. Farklı büyüme düzenleyicileri kullanıldığında, domatesin yaprak diskleri ve hipokotillerinin kültüre farklı yanıtlar verdiği görülmüştür. Yaprak diskleri ve hipokotillerde kallus oluşumu için 2 mg/l IAA, 2 mg/l BAP 2 mg/l NAA ve 4 mg/l kinetin içeren MS besiyeri kullanılmıştır. Hipokotilden kallus oluşumu %82.5 ve yapraklardan kallus oluşumu %57 olarak bulunmuştur. Hipokotil ve yaprak diskleri kallusundan, 2 mg/l IAA, 5 mg/l BAP 2 mg/l NAA ve 4 mg/l kinetin içeren MS besiyerinde, maksimum oranda kök oluşumu %45.8 ve %30.8 olarak hesaplanmıştır (Chaudhry ve ark., 2004).

Zigotik embriyolar bitki doku kültürlerinde eksplant olarak sık sık kullanılmaktadır. Örneğin, kallus kültürlerini başlatmada embriyolar çok yoğun olarak kullanılmakta ve bazı melezlerde uyumsuzluk engelini aşmak için de embriyo kültürü

uygulanmaktadır. Pre-zigotik ve Post-zigotik uyumsuzlukların giderilmesinde kullanılan doku kültürü çalışmaları “embriyo kurtarma” olarak isimlendirilmektedir (Baboğlu ve ark., 2001).

Çavdarın (*Secale cereale* L.) akraba hücre dizilerinin *in vitro*’da gelişmesi için, genotipleri ve besiyeri bileşenleri ile arasındaki etkileşimler incelenmiştir. Çavdarın doku kültüründeki zor türlerden olduğu bildirilmiştir. Genotip-spesifik doku kültürü protokollerinin geliştirilmesi, çavdarın doku kültüründen bitki rejenerasyonu oluşturma yanıtının maksimuma ulaştırılması için çok fonksiyonlu bir deney düzenlenmiştir. Eksplantlardan erken gelişen germinasyon sayısı, rejenerasyon yanıtı (rejenere olan kallus oranı ve kallus başına oluşan rejenere bitkilerin sayısı) ve kallus indüksiyonunun, genotipten, karbohidrat ve oksin çeşitlerinden ve bunların değişik konsantrasyonları ile bunlar arasındaki etkileşimlerden de önemli derecede etkilendiği belirtilmiştir. Genotip farklılığı, besiyeri sterilizasyon yöntemleri, temel mineral kompozisyonları, jelleştirici ajanlar, bakır sülfat eklenmesi ve ışıklandırma süresinin kallus yanıtını etkilediği açıklanmıştır (Popelka ve Altpeter, 2001).

Arpa bitkisinde de doku kültürü karakterleri incelenmiştir. Arpada, olgun embriyolardan elde edilen kültürlerde, kök rejenerasyon yeteneği yüksek olan bir genotip bulunduğu gösterilmiştir. Bu özelliğin poligenlerle kalıtıldığı, kök rejenerasyonunun, çaprazlandığında 1:2:1 fenotip ayrışım oranını veren büyük bir genle gerçekleştirildiği belirtilmiştir (Rikiishi ve ark., 2003).

Etiole bezelyenin (*Pisum sativum* L.) kökleri hücrel farklılaşma sırasında apoplastik ve simplastik süreleri boyunca askorbatla ilişkili enzimlerin aktivitesinin analizi yapılmıştır. Askorbat oksidaz ve askorbat peroksidaz denen enzimlerin varlığı apoplast ve simplast aşamadaki her iki bezelye grubu için araştırılmış ve yalnızca simplastik fraksiyonlarda askorbatsız radikal redüktaz ve dehidroaskorbat redüktaz bulunmuştur. Meristematik hücrelerden farklılaşmış hücreler oluşuncaya kadar yani hücre farklılaşması sırasında askorbatsız radikal redüktaz ve askorbat peroksidaz değerleri artmaktadır. Diğer yandan askorbat oksidaz ve dehidroaskorbat redüktaz değerleri azalmaktadır. Sekretör peroksidaz aktivitesi apoplastın meristematik ve farklılaşmış hücrelerinde değişmektedir. Farklılaşma sırasında peroksidazların aktivitesi artmaktadır. İzoenzimatik değişiklikler de aynı anda olmaktadır. Apoplastlarda farklı peroksidazların varlığının kinetik karakteristikleri analiz edildiğinde, bunların varlığının

hücre duvarı farklılaşmasında kritik bir rol oynadığı görülmüştür. Sekrator peroksidazların aktivitesinin artarak hücre duvarının sertleşmesini sağladığı belirtilmiştir (Concetta de Pinto M. ve De Gara L).

Mitotik indeksi araştırmak için bitki parçaları 3:1 etanol/asetik asit (v/v) içinde fiske edilmiş, 1 N HCl ile 60°C'de 5 dakika hidroliz edilmiş ve Schiff's reaktifi ile 2 saat boyanmıştır. Her bir parça %45 asetik asitte ezilmiştir. Her bir parça için beş ezme preperat yapılmış ve her biri için 1000 hücre sayılmıştır. Bölünme aşamasındaki hücrelerin toplam sayılan hücrelere oranından mitotik indeks hesaplanmıştır. Araştırmada en yüksek mitotik indeks meristematik bölgedeki hücrelerde bulunmuştur. Hücre büyüklüğü optik mikroskopi görüntüsünden tanımlanmıştır (X250). Bezelye parçaları, formalin:asetikasit:etanol (1:1:0.5 v) karışımında fiske edilmiş ve etanol serilerinde dehidrasyon yapılmıştır. Daha sonra parafine gömülmüştür. Bu parçalardan 7-10 µm boyutunda kesitler alınmış ve safranin fast-green ile boyanmıştır. Sonuçta buradaki hücrelerin daha küçük oldukları bulunmuştur (Concetta de Pinto M. ve De Gara L, 2004).

## **2.5. En Çok Kullanılan Kültür Yöntemleri**

Günümüzde en çok kullanılan kültür yöntemleri, embriyo kültürü, kallus kültürü, anter kültürü, ovül ve ovaryum kültürleri, meristem kültürü, apikal meristem kültürü, protoplast kültürü, sürgün kültürü, kök kültürü, süspansiyon kültürler ve çeşitli bitki organlarına ait kültürlerdir. Bu çalışmada da kullanılan yöntem embriyo kültürüdür.

## 2.6. Embriyo Kültürü

Yüksek bitkilerin tohumlarından ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek belli ortamlarda kültüre alınması embriyo kültürü olarak tanımlanmaktadır. Embriyo kültürü embriyonal büyüme ve farklılaşma üzerine besinlerin, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve diğer kimyasal ve fiziksel faktörlerin etkilerini incelemek için yararlı bir tekniktir. Ayrıca agronomik olarak önemli bitkilerin, bahçe bitkilerinin orman türlerinin olgunlaşmamış embriyolarından bitkilerin geliştirilmesi ile türler ve cinsler arası melezler elde edilebilmektedir. Bazı türlerde tohum dormansisinin kırılması da bu teknik ile başarılmaktadır (Baboğlu ve ark., 2001).

Embriyonun gelişim kademeleri ana hatlarıyla küresel, kalp şekilli ve torpido şekilli olmak üzere sıralanabilir. Ayrıca embriyo tohumundan da çıkarılarak kültüre alınabilir. Tohumdan çıkarılan embriyo tam olgun olduğundan kültürdeki gelişimi daha kolaydır. Embriyo ne kadar erken safhada kültüre alınırsa o kadar geliştirme işlemi zor olur. Çünkü olgun embriyolar temel besin ortamında (sadece makro ve mikro besin elementlerinin bulunduğu ortamda) gelişebilirken olgunlaşmamış embriyolar için ilave besin maddelerine ihtiyaç vardır (vitamin, aminoasit, hormon vs.) (Kocaçalışkan İ., 2003).

Embriyo kültürü iki değişik şekilde yapılmaktadır:

1. Olgun tohum embriyolarının kültürü
2. Olgunlaşmamış erken bölünme fazındaki proembriyoların kültürü

Embriyo kültürü ayrıca çimlenmesi zor olan tohumların çimlendirilmesinde, genetik çalışmalarda ıslah süresinin kısaltılmasında, yeterince gelişmemiş ve hibrit embriyoların yaşatılmasında, haploid bitki üretilmesinde, hastaliksız bitki üretiminde ve tohumla üretimi zor olan bitkilerin üretiminde kullanılmaktadır (Baboğlu ve ark., 2001).

Bitki embriyolarının kültürü ile ilgili ilk çalışma *Raphanus* ve *Cochlearia*'nın tohumlarından olgun embriyoları (2mm) mineral tuz ve şeker içeren basit bir ortamda kültüre alınarak ve plantlet geliştirilerek yapılmıştır. Bundan sonra, değişik bitki türlerinin embriyoları kontrollü koşullarda geliştirilmiştir. Bu çalışmalarla embriyoların

besin ihtiyaçları, büyüme ve farklılaşmaları gibi konular incelenmiş ve embriyo kültürüne ilişkin bazı metotlar ortaya konmuştur (Baboğlu ve ark., 2001).

Embriyo kültüründe, gelişen tohumdan veya tohum taslağından alınan, olgunlaşma dönemine yakın dönemdeki embriyolar izole edildiğinde bu embriyoların heterotrofik olduğu görülmüştür ve enerji kaynağı içeren basit bir inorganik ortamda gelişebilmişlerdir. Olgunlaşmamış embriyoları kültüre almada ise embriyoların büyüme ve gelişmesine destek olabilecek bir kültür ortamı belirlemenin çok önemli olduğu belirtilmiştir (Baboğlu ve ark., 2001).

## **2.7. Türkiye’de Bitki Doku Kültürü Çalışmaları**

Bitki doku kültürü önemli bir botanik disiplini olarak gelişmiştir ve biyoteknolojinin gelişmesinde bir anahtar olarak kabul edilmektedir fakat bu alandaki araştırmaların çeşitli tekniklerde ve pahalı oluşu nedeniyle bu bilimin müfredat programında önemli bir anahtar olamamıştır (Smith, 1997).

Ülkemizde son yıllarda çeşitli kuruluşlarda, farklı mesleklerden kişiler, doku kültürü ile çalışmalar yapmaktadır. Bu kuruluşlar; üniversiteler ve üniversitelerin ziraat fakülteleri ve biyoloji bölümleri, tarımsal amaçlı enstitü ve kuruluşlar ve ticari amaçlı özel kuruluşlardır. Üzerinde çalışılan bitkiler sırasıyla tahıl, baklagil, sebze, meyve, çiçek, odunsu bitki ve yağlı tohum türleridir. Bu çalışmalardan bazıları;

Ekonomik önem ve teknik uygunluk (uygulamada kolaylık), çalışılacak bitki türünün seçiminde en önemli kriterler olarak tespit edilmiştir. Buradan çıkarılacak sonuç sosyo-ekonomik değeri yüksek olan türlerin doku kültürünün daha zor olması nedeniyle bu türlerdeki gelişmenin daha yavaş olduğu (örneğin: buğday, şeker pancarı, pamuk, mısır) ve araştırmalarda sırasıyla yağ bitkileri, endüstri bitkileri, sebzeler, meyveler ve tahıllara öncelik verilmesi gerektiğidir. Ayrıca üzerinde hiç doku kültürü

çalışması yapılmamış bitkiler de tercih edilen bitkiler olmuştur. Genetik olarak değiştirilmiş 70'ten fazla bitki türünün hepsinde bir takım doku kültürü teknikleri uygulanmıştır. Genetik mühendisliğinin gelişiminde doku kültürleri etkili olmaya devam edecektir (Baboğlu ve ark., 2001).

Ayrıca günümüzde, doku kültürü çalışmalarını daha ileri düzeye getirmek amacıyla Tübitak, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı, Türkiye Tohum Endüstri Derneği, üniversite ve diğer araştırma kuruluşları tarafından Türkiye'deki biyoteknolojik çalışmaların durumunu, önceliklerini ve stratejilerini belirlemek ve bu konuda yasal düzenlemeleri oluşturmak için çalışmalar yapılmaktadır (Baboğlu ve ark., 2001).

Görüldüğü gibi doku kültürü, dünyada ve ülkemizde hem besin üretme, hem ilaç sanayinde büyük öneme sahip olan bitkilerin genetik iyileştirme çalışmalarında kullanılmaktadır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda, *Cucurbita pepo* L. (kabak) bitkisinde genetik, sitolojik, taksonomik ve biyokimyasal analizler yapmışlardır. Bu çalışmalar ile bitkideki kromozom anormallikleri, yetiştirilme ortamları, rejenerasyon başarıları ve akrabalık ilişkileri aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada *C. pepo* L. (kabak) bitkisinin embriyo kültürlerinden elde edilmiş fidelerdeki kromozom sayısı, mitotik aktivite ve fidelerin morfolojik görünümünün normal bireyler ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## 2.8. Bitki Hakkında Genel Bilgiler (*C. pepo* L. (kabak))

*Cucurbitaceae* familyası bitkileri, insanlar tarafından besin ve lif elde etmede kullanılması nedeniyle en önemli bitki familyaları arasında yer almaktadır. Bu familyadaki bitkiler arazideki gelişimleri açısından birbirlerine çok benzemekle birlikte, yüksek genetik çeşitliliğe sahip olmaları dolayısıyla, meyve şekli ve diğer meyve

karakteristikleri açısından farklı varyeteler oluşturmaktadırlar. Jeffrey'nin (1990) son çalışmalarına göre familyada 118 cins ve 825 tür olduğu bilinmektedir. *Cucurbitaceae* Eski ve Yeni Dünyada yetiştirilen bitki familyalarının en önemlilerinden biridir. *Fevileae*, *Melothrieae*, *Cucurbitaceae*, *Sicyoideae* ve *Cyclanthereae* olmak üzere 5 alt familyaya ayrılır. Kültürü yapılan cinsler *Cucurbita L.*, *Cucumis L.*, *Citrullus L.*, *Lagenaria L.* ve *Luffa L.*' dir. Bu alt familyada *Cucurbitaceae* ve *Sechium*, *Sechium*'un alt familyasında *Sicyoideae* bulunmaktadır (Bisognin, 2002).

Acı olmayan, etli, büyük ve lezzetli tohumları, şekli ve genetik çeşitliliği dolayısıyla kültürü yapılmış türler arasında iyileştirme çalışmalarının yoğun olduğu gruptur. Bu çeşitlilik, bitkilerin geniş alanlardaki kullanımları ile ilişkilidir. Meyve uzunluğu ve meyve çapı arasında sabit bir oran olduğu bunun yanında, interspesifik hibridizasyon çalışmalarında diğer familyalardan daha fazla kullanıldığı bildirilmiştir (Bisognin, 2002).

*Cucurbitaceae* familyasının, dünyada en popüler olanı karpuzdur. Ulusal Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO)'nun verilerine göre, 1996 ve 1998 yılları arasında, karpuz meyvelerinin yıllık üretimi 46.6 milyon ton ve ekilen alan 2.5 milyon hektardır. Gelecekte toplam evrensel üretimin, salatalık, kavun, kabak ve bal kabaklarından oluşacağı bildirilmektedir. Kabak üretiminin en fazla olduğu ülke Çin sonra Türkiye, İran ve Ukrayna'dır. Amerika'da, Arjantin, kabak ve balkabağı üretiminde en önemli bölgedir. Birleşik Devletler, en önemli salatalık, karpuz ve kavun üreticisidir (FAO, 1998). Ekilen en önemli üyeleri Brezilya'da karpuz, kabak ve kavundur. 1995'te 206000 hektar'lık alanda meyve üretimi, 1995'te 535 milyon olarak bildirilmiştir (Bisognin, 2002).

Ayrıca kabaklar yukarıda değinildiği gibi farklı kökenlerden gelmekte ve birbirlerine çok benzemektedirler. Meyve yapıları çok çeşitlidir. Meyveler, olgunlaştığında (karpuz) veya olgunlaşmadan (yaz kabağı) yenmektedir. Meyveleri pişirilerek (kabak), turşu yapılarak (salatalık), taze salata olarak (salatalık), şekerleme yapılarak (karpuz) veya yemekten sonra tatlı olarak (kavun) tüketilmektedir. Ayrıca, insanlar tarafından tohumları, çiçekleri (kabak ve balkabakları) ve kökleri de kullanılmaktadır. Kabaklar, yiyecek olarak kullanılmaları dışında farklı amaçlar için de üretilmektedirler. Şişe kabağı meyveleri, içki kapları, şişeler, diğer kaplar, sigara ağızlığı, müzik aleti ve maske yapımı, balık ağıları için duba olarak ve dekorasyon

amaçlı kullanılmak üzere yetiştirilmektedirler. Olgun bir lif kabağı meyvesinin lifleri, bireysel hijyen veya ev halkı için sünger olarak ve filtrasyon gibi diğer bir çok amaçla kullanılabilir. Kabakların bazılarının tohumlarının veya meyve parçalarının bağırsakları temizlediği, kusturucu bir ilaç olduğu ve cucurbitasin içeren sekonder metabolitleri nedeniyle parazit düşürücü olduğu bildirilmiştir. Meyveleri ve kökleri yüksek miktarda cucurbitasin içerdiği için böcek çekici (örneğin; salatalık böceği-*Diabrotica ssp.*) veya böcek kovucu (örn. balarısı-*Apis mellifera* L. ve sarı kabuklu eşek arısı-*Vespula* sp.) olarak kullanılmaktadır. Cucurbitasinlerin *Botrytis cinerea* enfeksiyonlarına karşı da koruyucu etkileri vardır (Bisognin, 2002).

*C. pepo*'nun yenilebilir sekiz türü olduğu bilinmektedir.

1. Pumpkin (*C. pepo* L. var. *pepo* L. Bailey) sferik, oval veya oblat şekilli, yuvarlak veya düz uçlu meyveleri olan sürünücü bitkilerdendir. Bu grubun meyveleri olgunlaştıktan sonra ve bazen de kurutulduktan sonra yenmek için yetiştirilmektedir.
2. Scallop (*C. pepo* L. var. *chlypeata* Alefield) yarı çalimsı özellik gösterir. Meyveleri düz veya diskoidal yapılıdır. Meyveleri olgunlaşmadan önce yenir.
3. Acorn (*C. pepo* L. var. *turbinata* Paris) çalı özelliği gösterir ve sürünücü bir bitkidir. Meyveleri obovoid veya konik şekillidir. Tepe kısmı benekli ve longitudinal çizgilidir. Kabukları yumuşaktır bu nedenle meyveleri olgunlaştıktan sonra yenmektedir.
4. Crookneck (*C. pepo* L. var. *torticollia* Alefield) çalı özelliği gösteren, sarı, altın renkli veya beyaz meyveleri olan bir bitkidir. Meyvelerinin distal veya apikal kısımları klaviform veya dalgalı şekillidir. Meyveleri olgunlaşmadan yenmektedir çünkü olgunlaştığında sertleşir.
5. Straightneck (*C. pepo* L. var. *recticollis* Pans) çalılık bir bitki türüdür. Sarı veya altın rengi meyveleri ve şekli nedeniyle *torticollia*'ya benzemektedir.
6. Vegetable marrow (*C. pepo* L. var. *fastigata* Paris) sürünücü karakteri ile yarı çalı özelliği gösterir. Kısa silindirik meyvelidir. Meyvelerinin tepe kısımları hafifçe geniştir. Başlangıçta yumuşak olan kabukları, meyve olgunlaştıkça krem renginden koyu yeşile dönüşmektedir.
7. Cocozzelle (*C. pepo* L. var. *Ionga* Paris) silindirik ve uzun meyvelerinin uç kısımları hafifçe şişkinleşmiştir. Meyveleri olgunlaşmadan yenmektedir ve en genel adı Cocozelle olarak bilinmektedir.



8. Zucchini (*C. pepo* L. var. *cylindrica* Paris) günümüzde kültürü yapılan en temel gruptur. Önceki gruplar gibi Zucchini grubu da son zamanlarda (ondokuzuncu yüzyılda) kökeni araştırılan Vegetable marrow ile yakın akrabadır. Bu bitkiler genellikle yarı çalı özelliği göstermektedirler. Silindirik meyveleri olgunlaşmadan veya biraz olgunlaştığında yenmektedir. Sebze olarak kullanıldığı durumlarda olgunlaşma aşamasında kullanılmaktadır (Saade ve Hernandez, 1994).

*Cucurbitaceae* bitkiler aleminin morfolojik olarak en değişik familyalarından biridir. 22 yabani ve 5 kültüre edilmiş türü ile meyve rengi, şekli ve boyutu son derece çeşitlidir. Kültüre edilmiş türlerin üretilebilmesi için, genetik engellerle birbirlerinden ayrılmışlardır. Üyeleri, morfolojik yapıları kullanılarak tanımlanabilmektedir. Sabit ve görel kromozom sayısı ( $2n=40$ ), kompleks izozim örneği gibi bulgular, cinsin allopoloid bir kökeni olduğunu akla getirmektedir (Bisognin, 2002).

Dünya'daki arkeolojik kayıtlar, kabağın yetiştirilen ilk bitki olduğunu göstermektedir. Batı Hemisphere'de, Kolombiyalı yerli halkın temel besinleri, kabak-mısır-fasulye kompleksi olarak şekillenmiştir. Yeni Dünya'da ilk yetiştirilen türün *C. pepo* olduğu, ekiminin Guila Naquitz'de yerleşmiş halk tarafından, günümüzden 1000-8000 yıl önce yapıldığı, fasulye ve mısırın ise 4000 yıl önce ekildiği açıklanmıştır (Bisognin, 2002).

Kabak türlerinin kökeni ve ilk yayılışları Amerika'da olmuştur. En yaygın olarak ekilen tür *C. ficifolia*'dır ve doğal yayılış alanı Meksika'dan kuzey Şili'ye uzanan dağlar ve Arjantin'dir. *C. maxima*, yetiştirme alanı, Güney Amerika'da Uruguay ve Arjantin'in sıcak bölgeleriyle sınırlı olan, tek kültürü yapılan bitkidir. *C. moschata*'nın doğal yayılış alanı, tropikal ve subtropikal Amerika'nın (Meksika ve Güney Amerika) alçak bölgeleridir. *C. argyrosperma* Meksika'dan Nikaragua'ya kadar değişen Pasifik kıyılarında ve *C. pepo* Meksika ve Kuzey Amerika'nın yüksek bölgelerinde yetişmektedir. *C. moschata* iki doğal yaşam alanı bulunan bir türdür ve Meksika bu alanların en büyüğüdür. Kuzey Amerika ise bitkinin daha az yayılış gösterdiği diğer bir alandır (Bisognin, 2002).

Doku kültürü, *Cucurbitaceae* familyası türlerinin çalışılması ve geliştirilmesinde yeni bir yöntem arz etmektedir. Kültürlerin genellikle sekonder metabolitlerin analizinde, kotiledonlardan elde edilen kalluslardan rejenere bitkiciklerin üretiminde kullanıldığı belirtilmiştir (Malter ve ark., 1984).

*Cucurbitaceae* familyası pek çok türü ile insanların besin olarak kullandığı önemli bir gruptur. Bu familyadaki *Cucurbita* cinsi, familyanın en önemli bitkilerinden biri gibi görünmektedir. Beş tür; *C. argyrosperma* Huber, *C. ficifolia* Bouche', *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poiret, *C. maxima* Duchesne ex Poiret ve *C. pepo* L.'nin, Yeni Dünya'da yetiştirilmeye (evcilleştirmeye) başlandığı, yüzyıllar boyunca ekildiği ve en sonunda Amerikan toplumlarınca ele alındığı bildirilmiştir (Hernando ve ark., 1994).

Bu türlerin günümüzdeki kadar popüler olmasında, Amerika kıtası ve dünyanın birkaç bölgesinde şehirli ve kırsal komunitelerin öğünlerinde temel besin ürünleri olmasının da payı vardır. Güney Amerika kökenli olan *C. maxima* dışındaki diğer dört türün Orta Amerika'da yetiştirildiği varsayılmaktadır ancak bunun doğruluğu henüz kanıtlanamamıştır. 1980'lerin ikinci yarısında bu dört türün evrimi ve orjini hakkında toplanan bilgi miktarı artmıştır. *C. argyrosperma* ve *C. pepo*' nun taksonomik ve genetik değerleri tanımlanmış ve yabancı tiplerle yakın ilişkileri intraspesifik kategorilerde sınıflandırılmıştır (Hernando ve ark., 1994).

Kış kabağı, balkabakları ve karpuzların hepsi *Cucurbita* cinsine aittir. Amerika'da yetişen bu kabaklar, gövde yapılarından ayırt edilmektedir. Aslında hepsi için üretim uygulamalarının aynı olduğu belirtilmiştir (Bachmann, 2002).

*C. maxima*, kısa, hafif, yuvarlak gövdelidir ve rengi sarıdan çok turuncuya yakındır. Bu türler daha geniş balkabakları ve kış kabaklarını (Hubbard, Buttercup, Banana, Mammoth ve Turban) içermektedir (Bachmann, 2002).

*C. pepo* genellikle gerçek balkabağı olarak tanınır. Börek, jack-o-lantern yapımında tarla kabakları kadar, yaz kabağı, palamut kabağı, ve spagetti kabağı da kullanılır. Bu gruptaki varyeteler sert, odunsu ve belirgin olarak çizgili gövdelidir. Balkabakları parlak, koyu turuncu renktedirler (Bachmann, 2002).

*C. moschata* gövdeleri derin yarıklı, pentagonal ve düzgün yüzeylidir. Yanındaki meyvelere zarar vermeden gelişmektedirler. Varyeteleri sarımsı kahverengi ve oblongtur. Bu türde cushaw, winter crockneck ve butternut balkabakları yer alır (Bachmann, 2002).

*Cucurbita mixta* önceleri *C. moschata* olarak bilinmekteydi fakat geniş, hafif gövdeleri ve etli dokusu ile birbirlerinden ayrılabilirler. Aslında her biri balkabağı çeşididir. Kabak türleri 9000 yıl önce Merkezi ve Güney Amerika'dan köken

almıştır. Mısır, fasulye ve balkabağının üçü yerli olarak kullanılmıştır. Balkabakları öncelikle yenilebilen tohumları için yetiştirilmiştir çünkü erken gelişme evresinde etli tiplerin acı tatları vardır (Bachmann, 2002).

Uzun zaman önce, Avrupalılar Yeni Dünya'ya ayak bastıklarında, elde ettikleri tohumları Güney Amerika'da yetiştirmişlerdir. Kabak ve balkabakları ilk koloniler için ilaç olarak ve tedavi edici olarak kullanılmıştır. İlk kabaklar, gerçekten kabak böreği yapımında kullanılmıştır. Kabaklar tedavi edici olarak kullanılması yanında tatlı oluşları nedeniyle de hızla popüler olmuşlardır. Günümüzde kış besini olarak depolanmasından daha çok Halloween ile ilişkilidirler (Bachmann, 2002).

Balkabakları, yüksek organik maddeli ve pH ın 6.0 veya 6.5 olduğu, iyi kurutulmuş, kumlu, verimli toprakları tercih etmektedirler. Kabaklar sıcak dönem bitkileridir, 23.9°C-30°C gündüz ve 17.8°C gece sıcaklığını tercih etmektedirler. Toprak sıcaklığı 30°C olduğunda tohumlar hızla gelişmektedir. Kış kabağı ve balkabakları toprak sıcaklığı 15.5°C'a ulaştığında, direkt tohumları kullanılarak yetiştirilebilmektedirler. Olgunlaşmaları için 90-120 gün geçmesi gerektiği açıklanmıştır (Bachmann, 2002).

Kabak böceği (*Anasta tristis*) balkabağı yetiştiricileri ve kabaklar için en önemli parazittir. Kabak böcekleri, ayaz nedeniyle çürüme ve kuraklıktan daha fazla, ürün kaybına neden olmaktadır. Bu sert, hoş kokulu, gri-kahve böceklerin ilk yaz ortasında kahverengi yumurtalarını yapraklar ve gövdeler üzerine kümeler halinde bıraktığı bildirilmiştir (Bachmann, 2002).

Zucchini kabağı son yıllarda tazeliği ve yemek yapımında kullanılmasındaki popülerliği ile yaz kabağının diğer türlerini geride bırakmıştır. Florida'da neredeyse her bahçede ve salatada taze, leziz bir yiyecek olarak yer almaktadır (Stephens, 2003).

Zucchini birkaç isimli varyeteler (cultivars) ile temsil edilmektedir. İtalyan sakız kabağı üyelerinin meyveleri, genellikle silindirik şekillidir, bununla birlikte yuvarlak ve yuvarlağa yakın şekilli olanları da bulunmaktadır. Meyve renkleri yeşil, siyah, siyaha yakın, açık gölgeli çizgili veya çizgisiz ve sarının tonlarında olabilmektedir. Çoğu değişik miktarlarda parlak benekler içermektedirler (Stephens, 2003).

Caserta'da silindirik meyvelerin oranı ortalama 5-6 inç, Cocozelle gibi daha büyük varyetelerde bu büyüklük 14-16 inç kadar olabilmektedir. Pek çok varyetenin ortalama 3-4 inç çapta olduğu bildirilmiştir (Stephens, 2003).

Zucchini yaprakları oldukça büyüktür ve yaprakları kırık boyunlu ve düz boyunlu kabakların yapraklarından daha çentiklidir. Zucchini kabağı yaprakları yüzeyinde, açık yeşil, gri benek ve çizgilere sahiptir. Bu benek ve çizgiler, küflenme durumunda bazen kaybolmaktadır (Stephens, 2003).

## 2.9. Cucurbitaceae Familyasında Yapılan Çalışmalar

Genetik çalışmalar, yetiştirilen türlerin farklı genetik gruplara ait olduğunu göstermiştir. 5 farklı gruba ayrılarak yetiştirilen türlerde, 93 fenotipik karakterin incelenmesiyle 21 *Cucurbita* türünün dendogram'ı yapılmıştır. Farklı gruplarda yetiştirilen türlerde, kloroplast DNA'sının değişkenlik analizi yapılmıştır. Bu analizde *C. pepo*'nun iki alt grubu; *C. texana* ve *C. fraterna* kullanılmıştır. Yetiştirilen türler arasında *C. moschata*'nın en değişken ve cinsin ortak atasına yakınlığı en fazla olan tür olduğu bulunmuştur. İzozim çalışmaları, *C. pepo* ve *C. moschata*'da yüksek allel çeşitliliği olduğunu göstermiştir. *C. pepo*'nun *C. moschata* ve *C. argyrosperma* ile ortak bir atayı paylaştığı, ancak *C. maxima* ile ortak bir atası olmadığı bildirilmiştir (Bisognin, 2002).

Kabak tohumdan geliştirilen bitkilerde endopoliploidi, organ, yaşam stratejisi ve bu özelliklerin genom boyutu ile karşılıklı ilişkisi araştırılmıştır. Araştırmada ele alınan konu, genom boyutu ve endopoliploidizasyon arasında negatif bir ilişki olup olmadığıdır. Endopoliploidizasyonu sağlamak için bitki hücreleriyle uygun olan, küçük genomlarla ilişkili, temel hücre fonksiyonları için gerekli, bir miktar DNA'ya ihtiyaç olduğu varsayılmaktadır. Bu varsayım, birkaç türden elde edilen sınırlı bir dizi veri analizi üzerine kurulmuştur. Bu çalışmada, tohumdan elde edilen iki gimnosperm ve 14 angiosperm familyasının yer aldığı, 54 bitki türünün birkaç organında endopoliploidizasyon araştırılmıştır. Sonuçlar, genom boyutu ve endopoliploidizasyon

arasında düşük negatif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Ancak, endopoliploidizasyon göz önüne alındığında, familyalar arasında, verici bitkilerin organları ve hayat döngüsü tipleri arasında farklılıklar olduğu görülmüştür. Endopoliploidi derecesinin hesaplanmasında en önemli faktörün bu türlerin taksonomik pozisyonları olduğu gösterilmiştir. Yaşam döngüsü, genom boyutu ve organ tipinin endopoliploidizasyona etkisinin az fakat önemli olduğu açıklanmıştır. Endopoliploidizasyon gösteren, araştırmada kullanılan Merkezi Avrupa türlerinin 16'sını içeren habitat karşılaştırıldığında, endopoliploidinin, bitki türlerinin gelişimini hızlandırması için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır (Barow ve Meister, 2003).

*C. pepo*'nun transgenik yabancı ürünlerinin verimliliği ve ürün elde etmek için yabancı tiplere gen akışı araştırılmış ve bu çalışmada yabancı *C. pepo*'nun (Arkansas, USA) uygun bileşenleri ile sarı kabaktan (*C. pepo*'nun iki virüse transgenik olarak dayanıklı bir kültürüdür) elde edilen yabancı ürün hibritleri karşılaştırılmıştır. Bitkinin yabancı ve hibrit progenleri Arkansas (1996–98) ve Ohio (1996)'da tarım arazilerinde yetiştirilmiştir. Çaprazlanan tiplerde (yabancı ve hibrit), tüm durumlarda, %85'i aşan fide gelişimi olduğu ancak fidelerin gelişimlerinin birbirlerinden önemli derecede farklı olmadığı bulunmuştur. Daha detaylı gözlemlerin yapıldığı Ohio'da, hibrit bitkilerde %41'den fazla erkek çiçek, %21'den fazla dişi çiçek ve yabancı bitkilerde ise %28'den fazla tohum oluşumu gözlenmiştir. Hibritlerin ortalama verimlilikleri, bitki başına 453-4497 tohum arasında, aynı deneylerde yabancı tiplerin ise bitki başına %15-%53 tohum arasında değiştiği bulunmuştur. Bu durumun, F<sub>1</sub> dölünün nötral veya verimli ürün genlerinin, yabancı tip *C. pepo* populasyonlarına transferi için güçlü bir bariyer olmadığını açıklamışlardır (Lawrence ve ark., 2001).

*C. pepo* subsp. *texana*'da yakın akraba dişi ve erkek çiçeklerin çaprazlamaları karşılaştırılmıştır. Yabancı kabak, *C. pepo* subsp. *texana*'nın deneysel çalışmalarda, yetiştirilen fidelerinin gelişim katsayısı 0.00 ve 0.75 arasında bulunmuştur ve yetiştirme sezonundan önce dişi ve erkek uyumsuzluğu ile ilgili birkaç değişken ölçülmüştür. Akraba bireylerde, karşı tozlaşma ile üreyen bireylere göre daha az meyve oluştuğu tespit edilmiş ve bu bireylerde tohumların germinasyon oranının karşı tozlaşma ile üreyen tohumlardan daha düşük olduğu bulunmuştur. Akraba bitkilerde az miktarda staminat çiçeklerin oluştuğu ve çiçek başına üretilen polen tanelerinin daha az sayıda olduğu, *in vitro*'da karşı tozlaşma ile üretilen bitkilerin polenlerinin de daha yavaş

geliştiği açıklanmıştır. Yabani kabakta, dişi ve erkek özelliklerin akrabalıktan etkilendiği belirtilmiştir (Hayes ve ark., 2005).

*Cucumis* hibritlerinde mayoz analizi yapılmış ve *Cucumis* (*Cucurbitaceae*) cinsinin evrimsel gelişimi incelenmiştir. Ebeveynleri farklı bölümlere ait olan yedi interspesifik *Cucumis* hibritinde örneğin; *C. metuliferus* X *C. zeyheri*, mayoz bölünme incelenmiştir. Triploid hibritlerde işaretlenebilen fazla miktarda trivalent bulunmuştur. Literatürden, coğrafik dağılım, cucurbitasinler, flavonoid örnekleri, izozimler, C bantlama, genom boyutu, DNA miktarı ve kloroplast DNA'sı hakkında türler arası akrabalık ve evrim bilgilerine ulaşılmıştır. Afrika'lı bağdaşık-çapraz grup, diploid türler *C. africanus*, *C. myriocarpus* subsp. *leptodermis* ve subsp. *myriocarpus* ile *Myriocarpus* alt grubuna; *C. anguria*, *C. dipsaceus*, *C. ficifolius*, *C. prophetarum*, *C. zeyheri* ile *Anguria* alt grubuna ve hepsi poliploidlere (*C. heptadactylus* dışında) ayrılmıştır. n=7 kromoxomlu Asya'lı *Melo* alt grubunun, n=12 kromozomlu Afrika'lı *Cucumis* grubundan olduğunu, *Cucurbitaceae*'nin en genel, temel kromozom sayısına sahip olduğunu ve tüm poliploid türlerin hepsini içerdini kanıtlamışlardır (Van Raamsdonk ve ark., 1989).

*Cucurbitaceae*'de yapılan somatik embriyogenez çalışmaları, genellikle biyoteknolojinin hücrelerden veya *in vitro* doku kültüründen tam bitkilerin oluşumunu gerektiren ürün geliştirme programlarına uygulanması üzerine kuruludur. Somatik embriyogenez çalışmalarında, kültürü yapılan temel bitkiler olarak salatalık, kavun, kabak ve karpuz kullanılmıştır. Protoplastları içeren çok sayıda kaynaktan, somatik embriyogenez ve bitki rejenerasyonu elde edilmiştir fakat en iyi sonuçlar özellikle kotiledonlar ve hipokotillerden oluşan fidelerden alınan explantlarda gözlenmiştir. Verici bitkinin genetik yapısının, somatik embriyogenez başarisında anahtar rol oynadığı açıklanmıştır. Somatik embriyoların, özellikle protoplastlardan alınan kültürler kullanıldığında gelişimsel anormallikler gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, kabak üretim programlarında somatik embriyogenezin potansiyel kullanımını vurgulanmıştır (Debeaujon ve Branchard, 1993).

*Cucurbitaceae*'nin beş kültüründe kök rejenerasyon yöntemleri tartışılmıştır. Tohum kabuğunun etkisi, etanol ön muamelesi, farklı tohum çeşitleri, NaOCl konsantrasyonları ve dekontaminasyon süreleri ile muamele araştırılmıştır. Kotiledon eksplantlarında, kültür besiyerindeki BA (6-Benzil adenin), kinetin, IP (İzopentil

adenin) ve IAA (İndol asetik asit) içeren TDZ (Thidiazuran) kombinasyonlarının kök rejenerasyonlarına etkileri test edilmiştir. Kültür yapmak için, *C. maxima* cv. A-line, *C. maxima* cv. Chicago Warded ve *C. pepo* cv. Rolet kullanılmıştır. Uygulamaların hiçbirinde kök oluşmadığı görülmüştür. Ancak *C. maxima* cv. Chicago Warded eksplantlarında somatik embriyolar oluşmuştur. *Cucumis melo* cv. Hales Best 36'da rejenerasyon yeteneğinin yüksek olduğu ve sitokin içeren her konsantrasyonda kök oluşumu gözlemlendiği açıklanmıştır. Kök oluşumunun, BA içeren besiyerinde, sitokin içeriği test edilen diğer bitkilerden önemli derecede fazla olduğu, *Cucumis sativus* cv. Ashley türünün kültüre yanıtının zayıf derecede olduğu ve ancak BA veya IP içeren besiyerinde kök gelişimi gözlemlendiği bildirilmiştir (Abrie ve Staden Van, 2001).

Styrian Kabağı'nda rejenerasyon somatik embriyogenez yoluyla başarılı ayrıca sitolojik ve biyokimyasal incelemeler yapılmıştır. Styrian kabağının (*C. pepo* L. subsp. Pepo var. Styriaca Greb.) kotiledon eksplantlarından, 16.11  $^4\text{M}$  NAA ve 4.44  $^4\text{M}$  NBA (Naftelen bütirik asit) veya 26.85  $^4\text{M}$  NAA ve 13.32  $^4\text{M}$  NBA içeren sıvı MS besiyeri kullanılarak, somatik embriyo oluşumu sağlanmıştır. Besiyerine 26.85  $^4\text{M}$  NAA ve 13.32  $^4\text{M}$  NBA eklendiğinde kallus oluşumu daha çabuk gerçekleşmiştir. Aksine, büyüme faktörlerinin (16.11  $^4\text{M}$  NAA ve 4.44  $^4\text{M}$  NBA) daha düşük konsantrasyonlarında embriyojenik oluşum daha fazla olmuştur. Embriyo gelişimi için gereken sürenin besiyeri bileşenleri ile ilgili olmadığı açıklanmıştır. En yüksek germinasyon, besiyerinde 11.42  $^4\text{M}$  IAA varken kültüre alınan embriyolarda gözlenmiştir. Bitkicikler bu besiyerinde uygun olgunluğa gelinceye kadar yetiştirilmiş ve 9-10 hafta sonra toprağa ekilmiştir. Rejenere bitkicikler araziye transfer edilmiş ve burada fertil çiçekler ile meyveler oluşturulmuştur. Biyokimyasal analizde *in vitro*'da gelişen bitkilerde, toprakta yetiştirilenlere kıyasla oldukça düşük glutatyon değerleri ölçülmüştür. Bitkiciklerin toprağa transfer edildiğinde bir ayda normal boyutlarına ulaştığı görülmüştür ve glutatyon konsantrasyonu, aynı gelişimsel aşamadaki tohumdan gelişen bitkilerle kıyaslanmıştır. Kallustan oluşan hücrelerde, rejenere olan yaprak hücrelerinde ve tohumlardan gelişen bitkilerde muhtemel farklılaşmaları gözlemlemek için Transmisyon Elektron Mikroskopunu kullanmışlardır (Urbanek ve ark., 2005).

*C. pepo* L., cv. YC 60'ın doku kültüründe bitki rejenerasyonu incelenmiştir. Bu çalışmada, somatik embriyolar, 1.2 mg/l 2,4,5-triklorfenoksiasetik asit 0.8 mg/l benzilaminopürin ve 0.1 mg/l kinetin ilave edilmiş Murashige ve Skoog (MS)

besiyerinde elde edilen kallus kültürlerinin kök uçlarından oluşturulmuştur. 0.05 mg/l NAA ve 0.05 mg/l kinetin içeren MS besiyerine olgun somatik embriyolar transfer edilerek oluşturulan embriyolardan plantletler elde edilmiştir. Çalışma sonuçlarında rejenere bitkilerin, morfolojik olarak normal görüldüğü ve üremenin normal olduğunu gösteren tohumlar ile meyveler olduğu açıklanmıştır (Chee, 1991).

*C. pepo* L. endospermide kromozom yapısı ve nukleolar değişimler incelenmiştir. *C. pepo* L. endospermının gelişiminin erken aşamasında  $3n=60$  kromozomlu (triploid) olduğu bulunmuştur. Daha sonraki aşamalarda daha yüksek ploidi değerleri (6n, 12n, 24n, 48n) sayılmıştır. Kromozom sayısındaki öploidi artış endopoliploidi ile sonuçlanmıştır. Nukleer hacim artışı ile birlikte nukleolus hacmi de artmıştır. Endosperm oluşumunun tüm aşamalarında, farklı boyutlarda ve şekillerde, nukleus sayısı değişen hücreler gözlenmiştir. 17. günün ilerleyen zamanlarında endospermde, organize olmamış nukleer işaretler görülmüştür. Embriyo gelişiminde endosperm dokusu absorbe edildiğinden, olgun tohumda endosperma görülmemiştir (Varghese, 1971).

Cucumis cinsinde yapılan kromozom çalışmalarına göre, 50 yabancı *Cucumis*'in sitolojik araştırmaları, diğer bütün türler  $2n=14$  veya  $2n=24$  şeklinde diploid sayıda kromozom içeriyorken,  $2n=48$  kromozomlu üç tetraploid türün ve bir tane  $2n=72$  kromozomlu heksaploid türün varlığını göstermektedir. *C. acuelatus* Etiyopya'da bulunmuşken, tetraploid türlerin ikisinin, *C. heptadactylus* ve *C. zeyhari* ile ilişkili bir tür, Güney Afrika'nın ve heksaploid *C. figarei*'nin Nijerya'nın yerlisi olduğu bulunmuştur. Tüm poliploid bitkilerin bir yıllık ve hızlı vejetatif üreme yetenekleri olduğu, polisomatik hücrelerin spontan oluşumundan köken alabilecekleri bulunmuştur (Dane ve Tsuchiya, 1976).

*C. pepo* kök hücrelerinin gelişme ve farklılaşmasında otoradyografik ve ultrastrüktürel bir araştırma yapılmıştır. Araştırmada, *C. pepo*'nun (kök uçlarının başlangıcından 0.0-0.5 mm kök meristemine korteks hücreleri, kök uçlarının başlangıcından 3-4, 5-6 ve 7-8 mm uzaklıktan alınan parçalar ve kök ucunun lateral parçasının ilk üç tabakasına ait hücreler kullanılmıştır. Korteks hücrelerinin miktarının, meristematik hücrelerle birlikte, 7-8 mm'lik parçalarda 20 kattan daha fazla olduğu ve bu hücrelerde sitoplazma miktarının diğerlerinin yedi katı kadar olduğu açıklanmıştır. Sitoplazmik hacmin en fazla artışı 0.5-6 mm uzunluğundaki parçalarda bulunmuştur.



Daha sonraki işlemler otoradyografik uygulamalar ile yapılmıştır: DNA sentezi, ( $H_3$  timidin bağlama), DNA modeli aktivitesi ( $H_3$  aktinomisin D ( $H_3$  AMD)-bağlama), RNA sentezi ( $H_3$  üridin bağlama) ve protein sentezi ( $H_3$  lösin). Meristematik aktivitenin daha fazla olduğu kök ucu hücreleri ve alınan parçalarda, DNA endomitoz ile replike olmuştur. Nukleer işaretlemeye, temel olarak 3-4 mm'lik parçalarda nukleusun 4C ploidi aşamasına ulaştığı belirlenmiştir. Kök ucu hücrelerinin çoğunun 4C, arda kalan hücrelerin 8C olduğu açıklanmıştır. Nukleolusta  $H_3$  timidin artışının, kök ucu hücrelerinin nukleolar DNA'sının replikasyon yaptığını gösterdiğini ve bu artışın 5-6 ve 7-8 mm'lik parçalarda daha az derece olduğunu açıklamıştır. Meristem hücreleri ile ilişkili 3-4 mm'lik parçalarda ise DNA replikasyonunun tamamlandığı açıklanmıştır. Nukleolar hacim ölçümleri,  $H_3$  üridin bağlama,  $H_3$  AMD bağlama ve granüler bileşenlerin sayısının, en çok sitoplazmik hacim artışının 3-4 ve 5-6 mm'lik parçalarda, kök parçalarında ve meristematik bölgede yer alan nukleolar aktivitede olduğunu göstermiştir.  $H_3$  lösinin, ribozomların poliribozomlar şeklinde ve yoğunluğunun az olduğu 7-8 mm'lik parçalara yoğun şekilde bağlandığı açıklanmıştır.  $H_3$  timidin artışının,  $H_3$  AMD ile bağlı nukleer DNA ve  $H_3$  üridin ile bağlı nukleustaki karşılaştırmaları, 3-4 ve 5-6 mm'lik parçalardaki gibi, kök ucu hücrelerinde DNA model aktivitesinin artışı ile sonuçlanan endomitotik DNA replikasyonu olduğunu göstermiştir. 7-8 mm'lik parçalarda  $H_3$  üridin bağlanması önemli derecede azalırken  $H_3$  AMD bağlanması hafifçe yükseldiği görülmüştür. Ploidi aşaması arasındaki uzaklığın, farklılaşmış hücrelerde yoğunlaşmış kromatin bölgesinin artışı nedeniyle,  $H_3$  AMD ve  $H_3$  üridin bağlamadan kaynaklanabileceği açıklanmıştır. Plastidler son olgunluğuna, 3-4 mm'lik parçalarda ulaşmıştır. Endoplazmik retikulumun hacim yoğunluğunun artışının ve Golgi organelinin hacim yoğunluğunun azalışının korteks hücrelerinin farklılaşması ile birlikte gerçekleştiğini açıklamıştır (Olszewska, 1976).

Kültürü yapılmış kabaklarda kromozom sayıları araştırılmıştır. Bu çalışmanın temel amacı, kültüre edilmiş kabaklarda değişik türlerin kromozom sayısını belirleme ve daha sonraki genetik çalışmalara yardımcı olması için farklı üyelerde sitolojik çalışmalar yapmaktır. Bu tip çalışmaların, kromatin materyalinin yetersizliği ve kromozomlarının fazla sayıda ve küçük olmasından dolayı kolay yapılamadığı belirtilmiştir (Whitaker, 1930).

*C. andreana* ve *C. martinezii* embriyolarında yapılan kültür çalışmalarında ekzojen ve endojen faktörlerin embriyo gelişimine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada Murashige ve Skoog tuzları, tiamin, niasin, piridoksin, askorbik asit, maya ekstraktı, hindistan cevizi sütü, mio-inositol, glikoz, NAA ve kinetin içeren orta sertlikte bir besiyeri kullanılmıştır. pH 5.65'e getirildikten sonra baktöyagar eklenerek besiyeri katılaştırılmıştır. Her bir türün tohumları, yüzey sterilizasyonu yapılarak, kabukları çıkarılarak besiyerlerine ekilmiştir. 9-12 günde *C. andreana* embriyolarının çoğunda ek köklerin ortaya çıktığı ve aynı sürede kotiledonların klorofil oluşturduğu bildirilmiştir. 12 gün sonra gelişen tohumların %40'ında sürgünlerin ve 4-17 adet yan kök oluşumunun gözlemlendiği, 16 gün sonra ise gelişen tohumların %30'unda bir veya daha fazla gerçek yapraklar oluştuğu açıklanmıştır. *C. martinezii* embriyolarının kültürlerinde *C. andreana* kültürlerinden biraz daha güçsüz bir durum gözlenmiştir. 12-16. günün sonunda embriyoların çoğunda ek köklerin ortaya çıktığı, tohumların %56'sında tek yaprak geliştiği ve 16. günün sonunda yan kökler oluştuğu bildirilmiştir. Her iki türe ait bitkilerin kökleri geliştikten, iki nod, bir veya daha çok gerçek yaprak oluşturduktan sonra alt kültüre alınmışlardır. Tohumlar, kök nodları, kotiledonlar, petiyollü yaprak parçaları, bazal tomurcuklu yapraklar ve hala kotiledonlar ile bağlı küçük gövde parçaları alınarak önceden tanımlanan aynı deneysel koşullar altında bırakılmışlardır. Eksplantlardan yalnızca bazal tomurcuklu yapraklar ve hala kotiledonlar ile bağlı küçük gövde parçalarında sürgünlerin oluştuğu ve köklerin farklılaştığı görülmüştür. Bazı kotiledon eksplantlarında ise yalnız köklerin geliştiği açıklanmıştır. Bu sonuçların *in vitro* farklılaşmanın, eksojen besinler ve hormonlar gibi endojen faktörler tarafından da kontrol edildiğini bildirmişlerdir. *C. melo* ve *C. pepo*'nun doku kültürlerinde de benzer endojen farklılaşma faktörlerinin etkili olduğunu açıklamışlardır (Malter ve ark., 1984).

Kavun (*Cucumis melo* L.) ve Kiwano (*Cucumis metuliferus* Naud.) da somatik hibridizasyon ve kabakta (*C. pepo* L.) protoplast elektrofüzyonu araştırılmış ve agronomik açıdan önem taşıyan özelliklere sahip somatik hibritler elde edilmesi amaçlanmıştır. *Cucumis* ve *Cucurbita*'nın eşeyssel çaprazlanmasında güçlü bir uyumsuzluk söz konusu olduğu fakat somatik hibridizasyon yoluyla bu eşeyssel uyumsuzluğun üstesinden gelinebileceği açıklanmıştır (Debeaujon ve Branchard, 1990).

*Cucurbita* cinsinde genom boyutu analizi yapılmış ve bu analiz sonuçları, embriyo kurtarma tekniği ile bunlardan elde edilen interspesifik hibritlerin

saptanmasında kullanılmıştır. Analiz sonuçlarında, *Cucurbita* cinsinin genomundaki farklılıkların, interspesifik hibritlerin verimli olarak tanımlanmasında kullanılmaya yeterli olacak kadar büyük olduğu açıklanmıştır. Örneğin *C. pepo* 'nun genom boyutunu 0.864 pg olarak saptamışlardır (Sisko ve ark., 2003).

*C. pepo*'da *in vitro* organogenez ile sürgün oluşumu da başarılıdır. Çalışmada kotiledon eksplantları 1 mg/l benziladenin ilave edilmiş MS besiyerinde rejenere edilmiştir. Sonuçta gelişen tüm sürgünlerin diploid olduğu açıklanmıştır (Ananthakrishnan ve ark., 2003).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyalin Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan *C. pepo* L. (kabak) bitkisinin tohumları Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden sağlanmıştır. *C. pepo* bitkisinin Biyoloji Bölümü Sistemik Araştırma Laboratuvarı ve Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yetiştirilen örnekleri kullanılmıştır. Çalışma kontrol grubu ve deney grubu olmak üzere planlanmıştır. Kontrol grubu bitkilerini yetiştirmek için Biyoloji Bölümü Botanik Araştırma Laboratuvarı ve Doku Kültürü Laboratuvarı kullanılmıştır. Kontrol grubu tohumlar laboratuvar ortamında kum kaplarında çimlendirilmiştir. Çimlendirme için her defasında 5 kum kabı kullanılmış ve her kum kabına 10 tohum gelecek şekilde ekim yapılmıştır. Bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır (Çizelge 3.1.1.). Bu bitkiler, normal yaprakları oluşup kök, gövde gibi vegetatif organları oluşuncaya kadar büyümeye bırakılmıştır. Çimlendirme amacıyla kum kaplarına ekilen 250 tohumdan 224 tanesinin geliştiği görülmüş ve gelişim yüzdesinin %89.6 olduğu hesaplanmıştır. Daha sonra bu bitkilerin kök uçları kesilerek mitoz bölünme incelemeleri yapılmak üzere, Carnoy fiksatifinde fikse edilmiştir.

**Çizelge 3.1.1** Kum kaplarında çimlendirilen ve gelişme gösteren tohumların sayısı

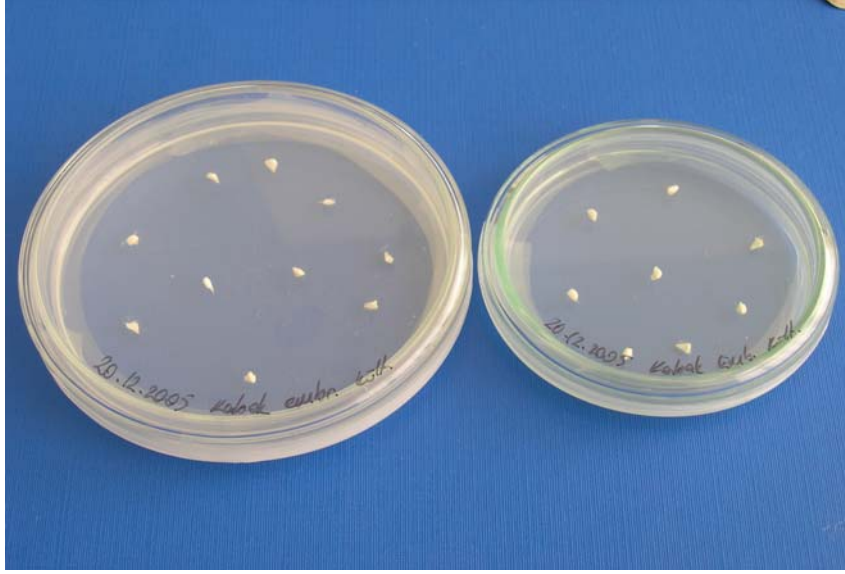
<b>DENEME NO</b>	<b>KAP SAYISI (Her kum kabına 10 tohum ekilmiştir)</b>	<b>TOPLAM ÇİMLENEN TOHUM SAYISI (Toplam tohum sayısı 250 adet)</b>
<b>1</b>	<b>5</b>	<b>46</b>
<b>2</b>	<b>5</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>5</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>5</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>5</b>	<b>42</b>
<b>TOPLAM: 5</b>	<b>TOPLAM KAP: 25 TOHUM SAYISI: 250</b>	<b>TOPLAM: 224</b>

Deney grubu olarak kullanılacak bitkilerin elde edilmesi için tohumlara yüzey sterilizasyonu yapılmıştır (Kabuklu tohumlar %70 alkol içerisinde 10 dakika bekletilerek, steril destile suda 10 dakika süre ile 3 defa değiştirilerek yıkanmıştır. Daha sonra %5 lik sodyum hipoklorit içerisinde 20 dakika bekletilmiştir. Sonra yine steril edilmiş destile suda 10 dakika süre ile 3 defa değiştirilerek yıkanmıştır). Tohumların kabukları çıkartılarak aynı sterilizasyon işlemi tekrar uygulanmıştır. Tohumlardan, steril kabin içerisinde steril aletler kullanılarak embriyolar çıkarılmıştır. Bu embriyolar, 0.5 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA ilave edilmiş, agarlı Murashige ve Skoog (MS) Basal Salt Micronutrient Solution (Sigma) besiyeri içeren 25 petri kabına, her kaba 15 embriyo gelecek şekilde 25-27<sup>0</sup>C sıcaklıktaki iklim dolabında karanlık ortamda inkübasyona bırakılmışlardır (Çizelge 3.1.2.). Gelişimleri günlük olarak kontrol edilmiştir. İkinci günden itibaren 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyodu oluşturulmuş ve 7 günlük

periyot sonunda çimlendirme amacıyla besiyerine koyulan 375 embriyodan 338 tanesinin geliştiği görülmüş ve gelişim yüzdesinin %90.13 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.1.1.).

**Çizelge 3.1.2.** Besiyerlerinde gelişme gösteren embriyoların sayısı

<b>DENEME NO</b>	<b>PETRİ KABI</b>	<b>TOPLAM GELİŞEN EMBRİYO SAYISI</b>
<b>1</b>	<b>5</b>	<b>62</b>
<b>2</b>	<b>5</b>	<b>64</b>
<b>3</b>	<b>5</b>	<b>71</b>
<b>4</b>	<b>5</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>5</b>	<b>68</b>
<b>TOPLAM: 5</b>	<b>TOPLAM KAP: 25 PETRİ KABI SAYISI: 375</b>	<b>TOPLAM: 338</b>



**Şekil 3.1.1.** Petri kaplarına ekimi yapılmış embriyolar

Bu aşama sonunda, embriyoların gelişimi ile köklerin oluştuğu, gövde kısmının belirginleştiği, yaprakların ise henüz oluşmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.1.2., 3.1.3., 3.1.4.).



**Şekil 3.1.2.** Kültür ortamında 7 günlük periyotta embriyoların gelişimi



**Şekil 3.1.3.** Kültür ortamında 7 günlük periyotta embriyonun gelişimi



**Şekil 3.1.4.** Kültür ortamında 7 günlük periyotta embriyoların gelişimi

Gelişen 338 fidenin yarısı gelişimlerini sürdürebilmeleri için, petri kaplarından daha büyük kültür kaplarına aktarılmıştır. 10 adet büyük kültür kabına 6 fide gelecek şekilde 60 fide, 10 adet büyük kültür kabına 5 fide gelecek şekilde 50 fide, 10 adet büyük kültür kabına ise 3 fide gelecek şekilde 30 fide ekilmiş ve toplam 140 fide gelişmeye bırakılmıştır. Besiyerinde çimlendirilen fidelerin diğer yarısından ise kök uçları alınarak, mitoz preparatı hazırlamak için Carnoy fiksatif ile fikse edilip %70'lik



alkole alınmıştır. Büyük kültür kaplarına alınmış olan fideler 7 gün süreyle, 25-27<sup>0</sup>C'teki iklim dolabında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyodunda gelişmeye bırakılmışlardır (Şekil 3.1.5., 3.1.6., 3.1.7., 3.1.8., 3.1.9.).



Şekil 3.1.5. Büyük kültür kaplarında gelişen fideler



Şekil 3.1.6. Başlangıç aşamasındaki embriyolar ve gelişme aşamasındaki bitkicikler



**Şekil 3.1.7.** Büyük kültür kaplarında gelişen fide



**Şekil 3.1.8.** Büyük kültür kaplarında gelişen fide



**Şekil 3.1.9.** Büyük kültür kaplarında gelişen fide

Bu sürenin sonunda 140 fidenin 79 tanesinde yaprakların oluşmaya başladığı gözlenmiş ve gelişim yüzdesi %56,43 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.1.3.).

**Çizelge 3.1.3.** Büyük kültür kaplarında gelişme gösteren fidelerin sayısı

<b>BÜYÜK KÜLTÜR KABI SAYISI</b>	<b>KABA EKİLEN TOPLAM FİDE SAYISI</b>	<b>YAPRAKLARI GELİŞEN TOPLAM FİDE SAYISI</b>
<b>10</b>	<b>60</b>	<b>24</b>
<b>10</b>	<b>50</b>	<b>27</b>
<b>10</b>	<b>30</b>	<b>28</b>
<b>TOPLAM KAP: 30</b>	<b>TOPLAM FİDE: 140</b>	<b>TOPLAM FİDE: 79</b>

Daha sonra büyük kültür kaplarında gelişip yaprakları oluşmaya başlayan fidelerin sağlıklı görünüme sahip olanlarından 30 tanesi seçilerek, 5 ayrı nemli kum kabına her kaba 6 fide gelecek şekilde aktarılmıştır. Bu kaplar 25<sup>0</sup>C'de laboratuvar ortamında 15 gün süreyle gelişmeye bırakılmışlardır (şekil 3.1.10, 3.1.11.). Ekilen 30 fidenin 12 tanesinin gelişmeye devam ettiği geriye kalanların ise öldüğü gözlenmiş ve nemli kum ortamında gelişim yüzdesi %40 olarak hesaplanmıştır (izelge 3.1.4.). Diğer fidelerden ise kök uçları alınarak mitoz preparatı hazırlamak için Carnoy fiksatifini ile fikse edilip %70'lik alkole alınmıştır.



**şekil 3.1.10.** Nemli kum ortamına aktarılmış fideler



**Şekil 3.1.11.** Nemli kum ortamında gelişen fide

**Çizelge 3.1.4.** Nemli kum kabında gelişen fidelerin sayıları

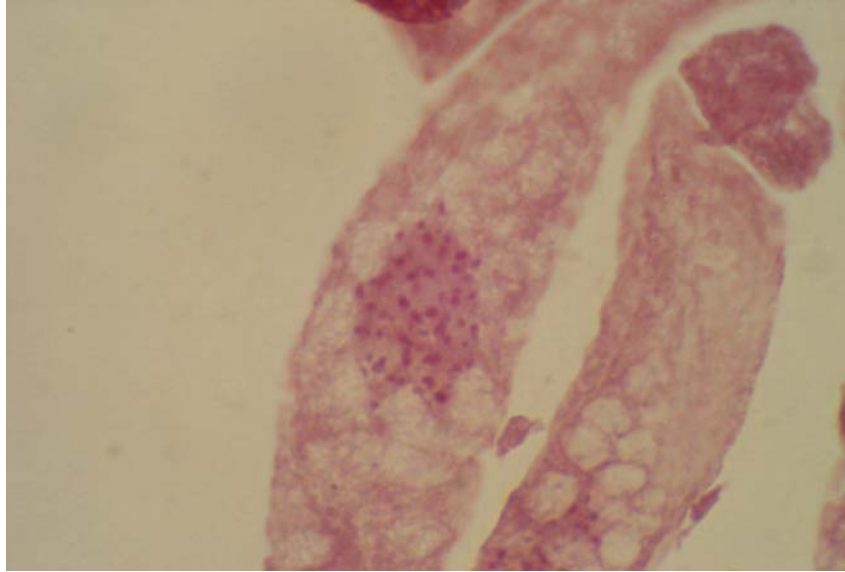
<b>NEMLİ KUM KABI NO</b>	<b>KABA EKİLEN TOPLAM FİDE SAYISI</b>	<b>GELİŞEN TOPLAM FİDE SAYISI</b>
<b>1</b>	<b>6</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>6</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>6</b>	<b>2</b>
<b>4</b>	<b>6</b>	<b>1</b>
<b>5</b>	<b>6</b>	<b>0</b>
<b>TOPLAM KAP: 5</b>	<b>TOPLAM FİDE: 30</b>	<b>TOPLAM FİDE: 12</b>

Deney ve kontrol grubundan alınmış kök uçlarından ezme preperasyon yöntemi ve aseto orsein boyası kullanılarak preperatlar hazırlanmıştır. Preparatlar Entellan ile

kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelenmiş ve Olympus CH 2 fotomikroskobu kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir. Ayrıca mitotik indeksi belirlemek için preparatlar üzerinde ve fotoğraflarda sayımlar yapılmıştır.

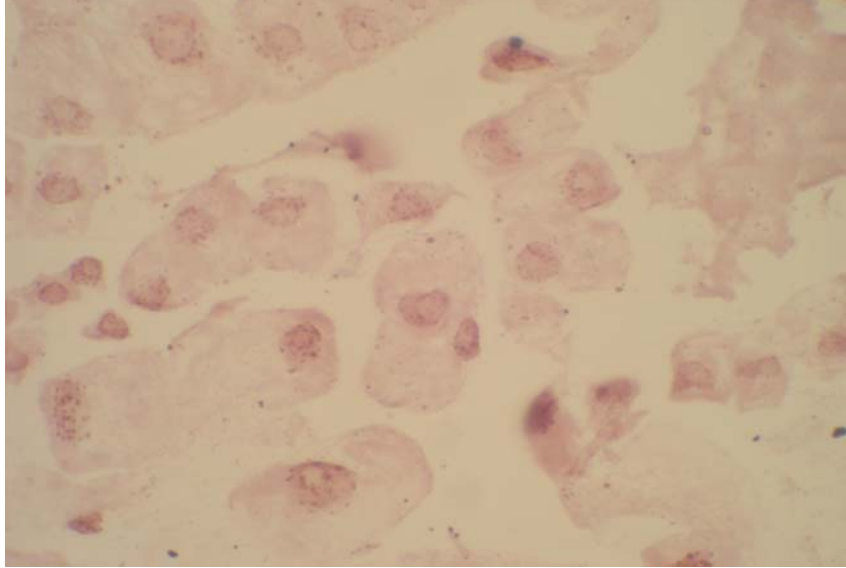
#### 4. BULGULAR

Çalışma sırasında kontrol grubu olarak laboratuvar ortamında kum kaplarında yetiştirilen *C. pepo* L. (kabak) bitkisi kök uçları kullanılmıştır. Bu amaçla 25<sup>0</sup>C ortalama sıcaklığa sahip ve normal gün ışığı periyotlarını alabilen laboratuvar kullanılmıştır. Çimlendirme ortamı olarak nemli kum içeren kaplar tercih edilmiştir. Çimlendirme amacıyla ekilen tohumların tamamına yakınının çimlendiği gözlenmiştir. Çimlenen bu fideler, normal bir gelişme gösterip kök, gövde ve yaprak oluşumunu tamamlamışlardır. Oluşan fidelerin görünümünün sağlıklı oldukları gözlenmiştir. Çalışmada kullanacağımız kök uçları fidelerden alınmıştır. Bu amaçla çimlenme ortamından çıkartılan fidelerin köklerinin normal gelişme gösterdikleri gözlenmiştir. Köklerin sayılarının fazla oldukları ancak büyüme hızlarının yavaş oldukları saptanmıştır. Hazırlanan preparatlar incelendiğinde hücrelerin daha silindirik yapıda oldukları, küçük vakuoller içerdikleri ve sitoplazma nukleus oranına bakıldığında nukleusların hücrelerin büyüklüğüne göre küçük oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.1.).

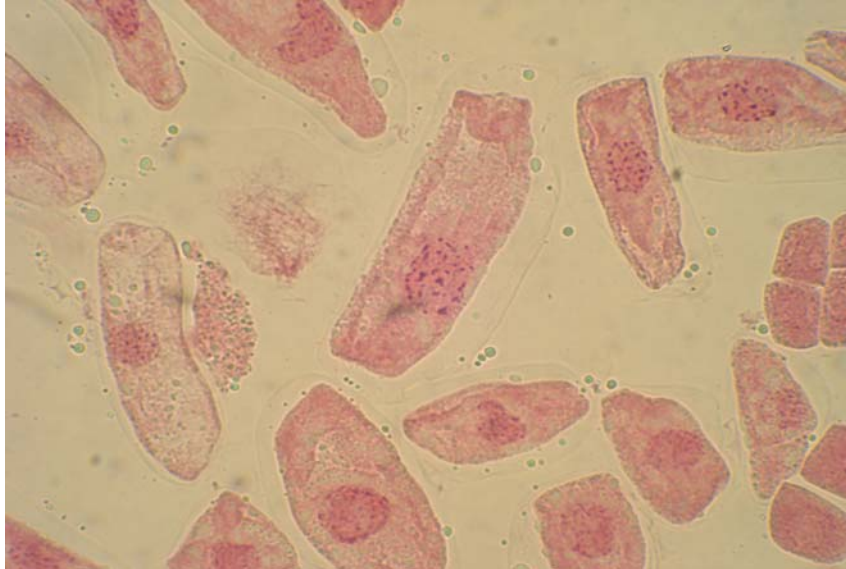


**Şekil 4.1.** Kontrol grubu bitkisi kök ucu meristem hücreleri (X1000)

Bu hücrelerin, kromozomlarının çok küçük oldukları, kromozom şekil ve yapılarının ayırt edilemediği gözlenmiştir. Kromozom sayısının  $2n=40$  olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2., 4.3., 4.4., 4.5.).

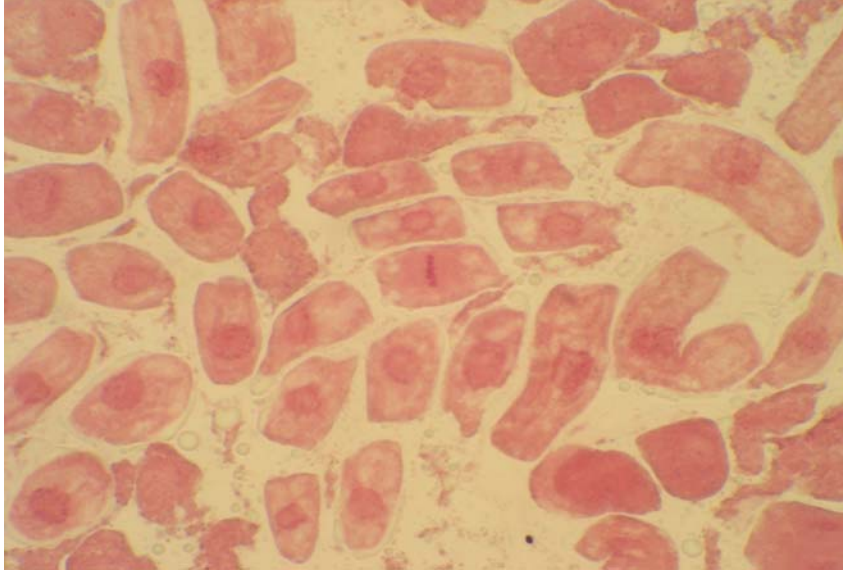


**Şekil 4.2.** Kontrol grubu bitkisi kök ucu meristem hücreleri (X400)

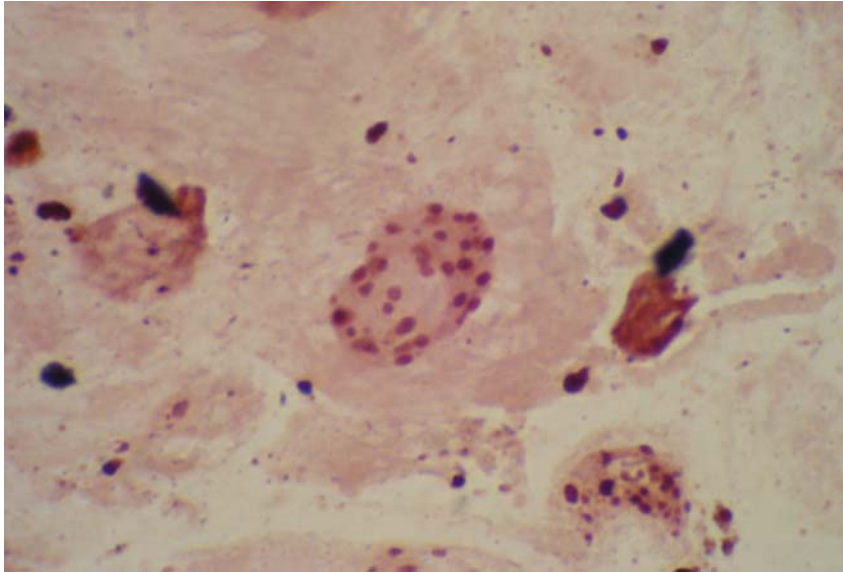


**Şekil 4.3.** Kontrol grubu bitkisi kök ucu meristem hücreleri (X1000)





**Şekil 4.4.** Kontrol grubu bitkisi kök ucu meristem hücreleri (X200)



**Şekil 4.5.** Kontrol grubu bitkisi kök ucu meristem hücreleri (X1000)

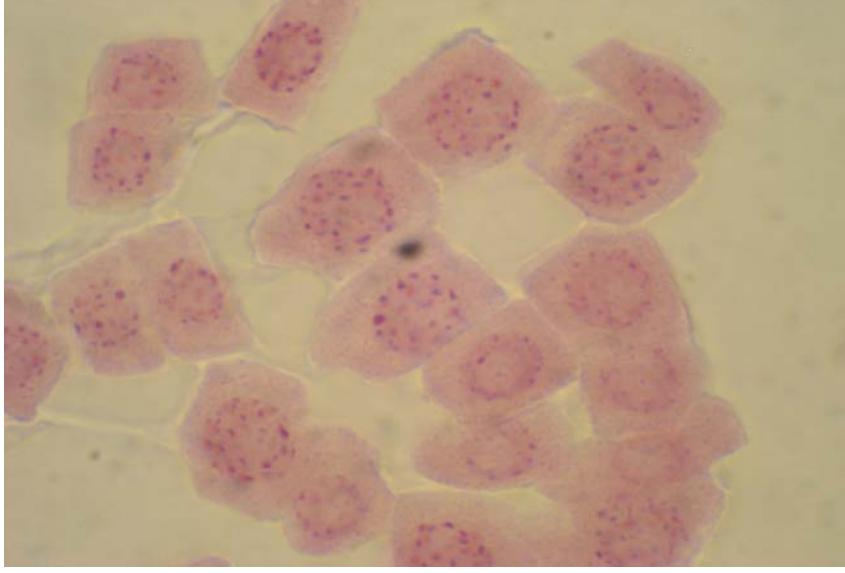
Preperatlarda yapılan mitoz bölünme değerlendirmesinde mitotik aktivitenin oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Mitozdaki hücrelerin çeşitli evrelerde oldukları görülmüştür. 10 preparatta 100 hücrelik görüş alanı baz alınarak bölünme aşamasındaki hücreler sayılmış ve yapılan değerlendirme sonucu mitotik indeks değerinin %32.6 olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1.).

**Çizelge 4.1.** 100 hücrelik görüş alanı baz alınarak sayılan 10 preparatta mitoz bölünme aşamasındaki hücreler

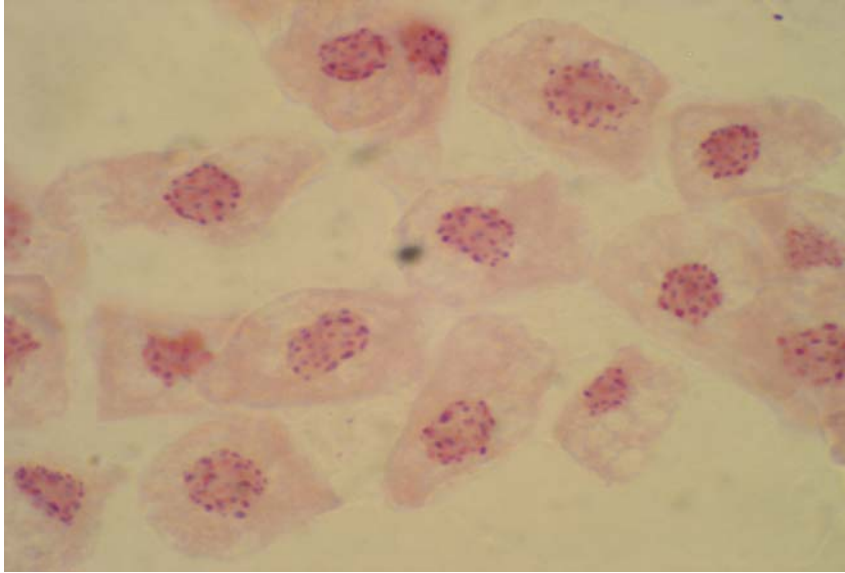
<b>PREPERAT NO</b>	<b>SAYILAN HÜCRE</b>	<b>MİTOZ BÖLÜNME YAPAN HÜCRE SAYISI</b>
<b>1</b>	<b>102</b>	<b>36</b>
<b>2</b>	<b>110</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>99</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>95</b>	<b>12</b>
<b>5</b>	<b>120</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>96</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>98</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>100</b>	<b>26</b>
<b>9</b>	<b>95</b>	<b>23</b>
<b>10</b>	<b>85</b>	<b>27</b>
<b>TOPLAM: 10</b>	<b>TOPLAM: 1000</b>	<b>TOPLAM: 326</b>

Embriyo kültürü yöntemiyle bitki elde etmek için yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra steril ortamda tohumdan çıkarılmış olan embriyolar MS besiyerine 0.5 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA ilave edilmiş, agarlı Murashige ve Skoog (MS) Basal Salt Micronutrient Solution (Sigma) besiyeri içeren petri kaplarına ekildikten sonra ilk iki gün karanlık ortamda 25-27<sup>0</sup>C'lik iklim dolabında oldukça hızlı sayılabilecek bir gelişme göstermişlerdir. Daha sonra 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyotta ve yine 25-27<sup>0</sup>C'de iklim dolabında gelişmeye bırakılmışlardır. Günlük olarak yapılan gözlemlerde embriyoların hızlı gelişmeye devam ettikleri ve kök oluşumunun çok yoğun olduğu gözlenmiştir. Ayrıca gövde ve yaprakların da oluştuğu, meydana gelen fidelerin sağlıklı bir görünüm arz ettiği tespit edilmiştir. Bu fidelerden alınmış kök uçlarından hazırlanmış preparatlar incelendiğinde, hücrelerin kontrol grubuna göre şekil ve yapı bakımından farklılıklar gösterdiği gözlenmiştir. Hücrelerin kontrol grubundan

farklı olarak silindirik şekilli değil, daha kısa kenarlı oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.6., 4.7.)

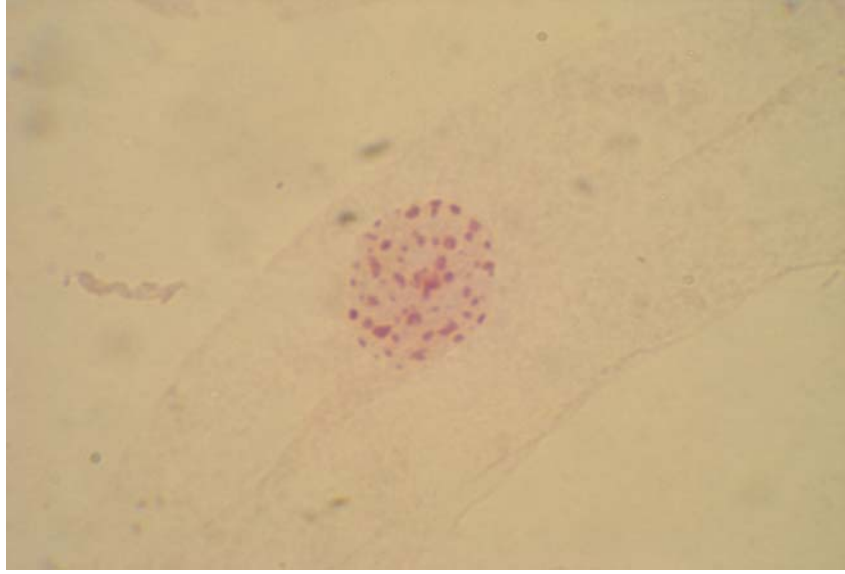


**Şekil 4.6.** Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X400)

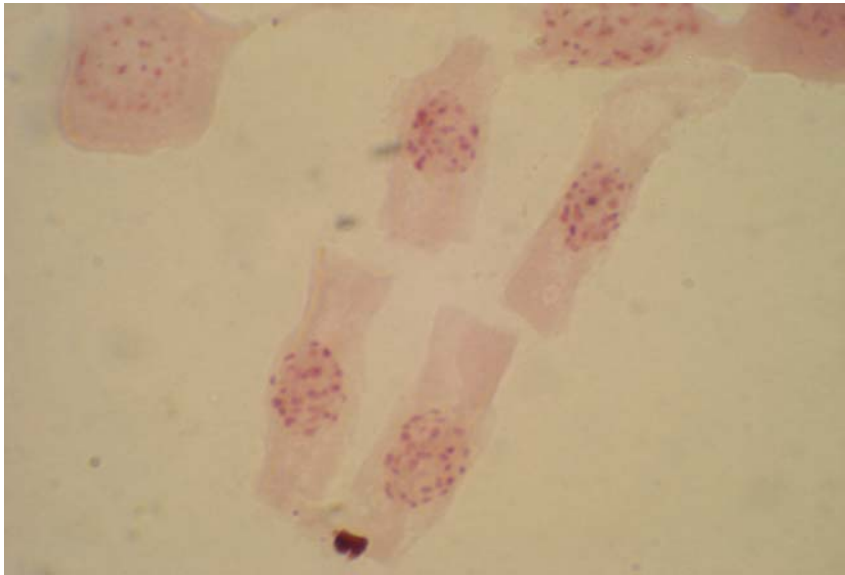


**Şekil 4.7.** Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X400)

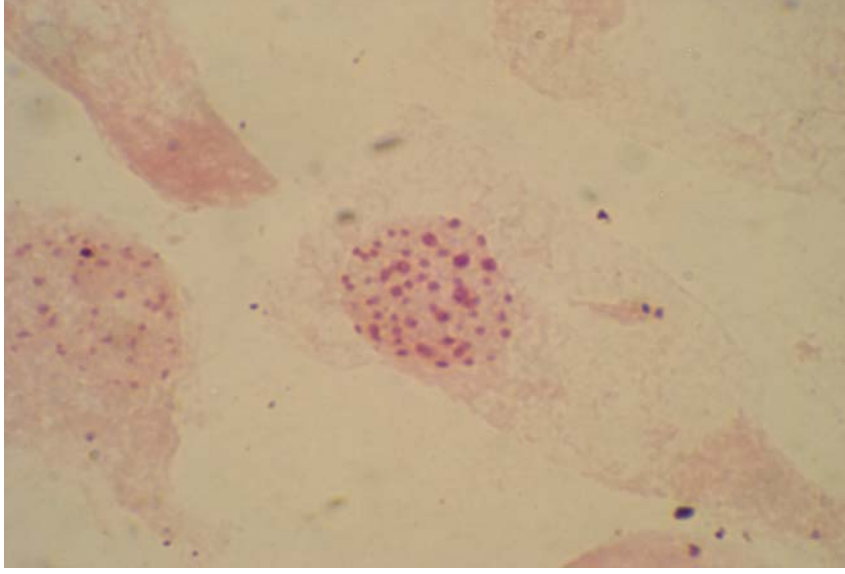
Bu hücrelerin nukleuslarının da daha büyük oldukları ve nukleus hacim oranlarının kontrol grubuna göre daha büyük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca kontrol grubu hücrelerinde gözlenen vakuolleşmenin deney grubu hücrelerinde görülmediği saptanmıştır. Hücrelerin kromozomlarının daha belirgin olduğu ve kolaylıkla ayırt edilebildiği görülmüştür. Kromozom sayısı, bu hücrelerde de  $2n=40$  olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8., 4.9., 4.10., 4.11., 4.12., 4.13.).



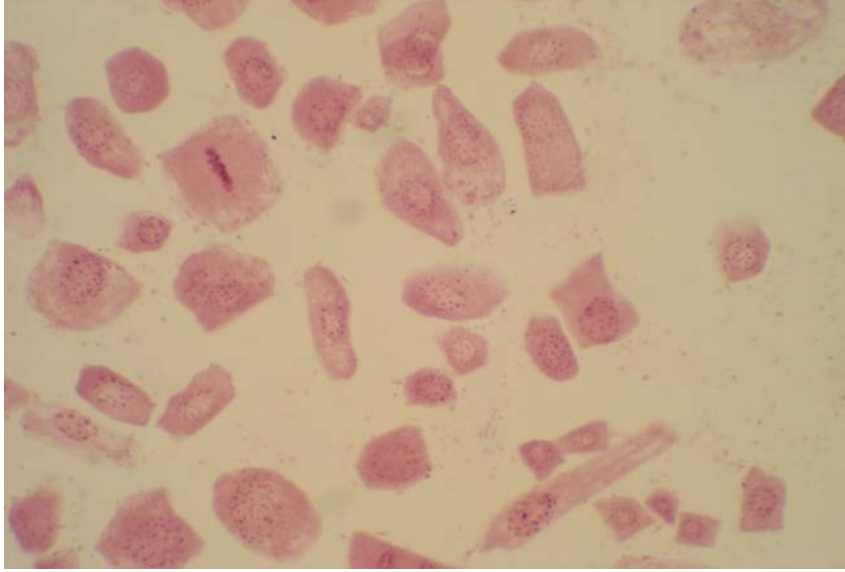
**Şekil 4.8.** Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X1000)



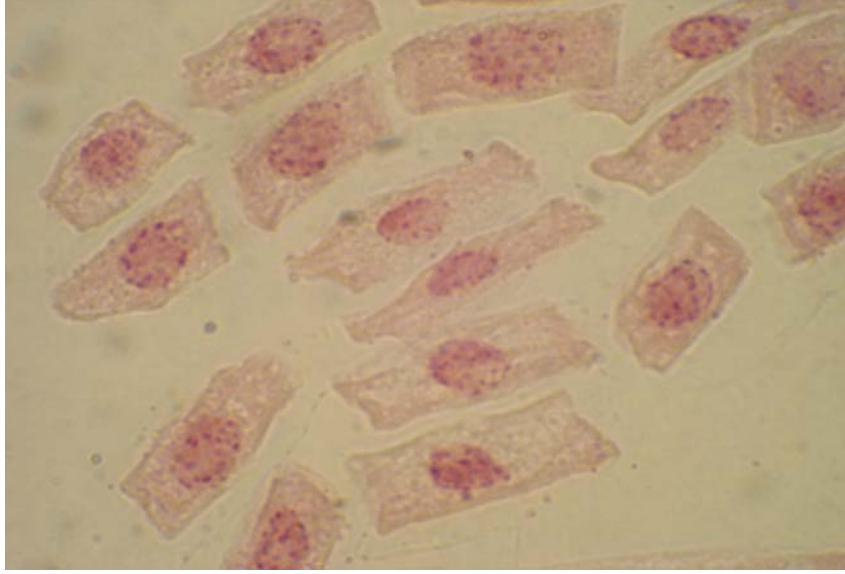
**Şekil 4.9.** Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X400)



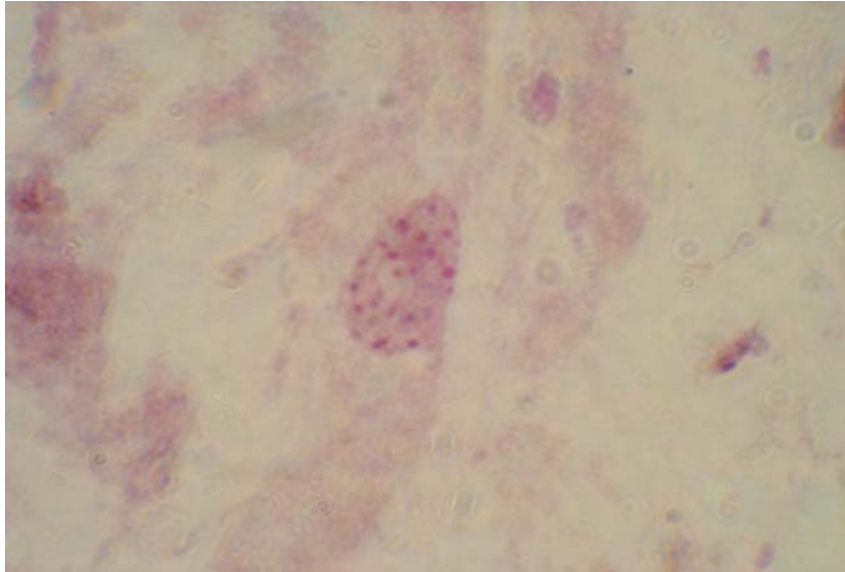
**Şekil 4.10.** Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X1000)



**Şekil 4.11.** Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X200)



**Şekil 4.12.** Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X400)



**Şekil 4.13.** Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X1000)

Yapılan mitoz bölünme değerlendirmesinde mitotik aktivitenin kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Mitozdaki hücrelerin çeşitli mitoz evrelerinde oldukları görülmüştür. 10 preparatta 100 hücrelik görüş alanı baz alınarak bölünme aşamasındaki hücreler sayılmış ve yapılan değerlendirme sonucu mitotik indeks değerinin %80.00 olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2.).

**Çizelge 4.2.** 100 hücrelik görüş alanı baz alınarak sayılan 10 preparatta mitoz bölünme aşamasındaki hücreler

<b>PREPERAT NO</b>	<b>SAYILAN HÜCRE</b>	<b>MİTOZ BÖLÜNME YAPAN HÜCRE SAYISI</b>
<b>1</b>	<b>92</b>	<b>72</b>
<b>2</b>	<b>104</b>	<b>77</b>
<b>3</b>	<b>112</b>	<b>82</b>
<b>4</b>	<b>95</b>	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>106</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>114</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>100</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>89</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>96</b>	<b>84</b>
<b>10</b>	<b>92</b>	<b>70</b>
<b>TOPLAM: 10</b>	<b>TOPLAM: 1000</b>	<b>TOPLAM: 800</b>

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde doğa ve canlılar için büyük öneme sahip olan bitkiler, insanlar için de birçok açıdan önem arz etmektedir. Bu bitkilerin insanlar açısından önemi insanlık tarihinden itibaren artarak devam etmiştir. Başlangıçta sadece beslenme amacıyla kullanılan bitkiler daha sonra giyim ve tedavi amacıyla da kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde bitkilerden elde edilen birçok kimyasal madde çeşitli yöntemlerle tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Artan dünya nüfusu ile birlikte, son yıllarda büyük önem kazanan beslenme sorunu araştırmacılar tarafından çeşitli yöntemlerle giderilmeye çalışılmaktadır. Bu yöntemlerden biri, mevcut tarım alanlarından daha yüksek verim elde edilmesidir. Ancak bu belirli bir dereceye kadar artış sağlamakla birlikte yeterli çözüm olmamıştır. Bu nedenle daha farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin amacı ürün elde edilme süresini kısaltmak, birim alanda daha fazla verim elde etmek, tarımsal üretim için uygun olmayan iklim ve toprak koşullarında üretim yapabilmek, hastalık ve zararlılara dirençli bitkiler elde etmek ve amaca uygun içerik ve özelliklere sahip ürün verebilen bitkiler geliştirmektir. Bunları sağlamak için tarımsal araştırma ile uğraşan bilim adamları, genetik ıslah çalışmaları yapmaktadırlar. Genetik ıslah çalışmaları oldukça uzun zaman gerektiren çalışmalardır. Bu çalışmaların daha hızlı yapılabilmesi için yardımcı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntemlerden birisi de bitki doku kültürü yöntemidir. Bilindiği gibi değişik amaçlara uygun bitki doku kültürü teknikleri geliştirilmiştir. Bu teknikler kullanılarak genetik ıslah çalışmaları hızlandırılabilirdiği gibi tohum ile üretimi zor olan bitkilerin çoğaltılması, hastalıklara ve zararlılara dirençli bitkilerin elde edilmesi, bu şekilde üretilmiş olan bitkilerin çeşitli yöntemlerle muhafazası mümkündür. Bu yöntemin birçok yararları olmasına rağmen birçok zorluğu ve dezavantajları da olduğu belirtilmektedir. Bu yöntemin zorlukları, daha çok uygulama aşamasında karşılaşılan zorluklardır. Yöntemde kullanılan maddelerin ve araçların maliyetinin yüksek olması, uygulama sırasında karşılaşılan sorunlar olarak düşünülebilir.



Çalışmamız sırasında kum kaplarına çimlendirme amacıyla ekilen tohumların tamamına yakınının çimlendiği ve oluşan fidelerin görünülerinin sağlıklı oldukları gözlemlendi. Çimlenme ortamından çıkartılan fidelerin kök sayılarının fazla oldukları ancak büyüme hızlarının yavaş oldukları gözlemlendi. Bu köklerden hazırlanan preparatlarda hücrelerin daha silindirik yapılı, küçük vakuollü ve nukleusların hücrelerin büyüklüğüne göre küçük oldukları gözlemlendi. Bu hücrelerdeki kromozomların çok küçük oldukları, kromozom şekil ve yapılarının ayırt edilemediği gözlemlendi. Kromozom sayısının  $2n=40$  olduğu tespit edildi. Preparatlarda yapılan mitoz bölünme değerlendirildiğinde mitotik aktivitenin oldukça düşük olduğu ve mitozdaki hücrelerin çeşitli evrelerde oldukları görüldü. Yapılan değerlendirme sonucu mitotik indeks değerinin %32.60 olduğu saptandı.

Embriyo kültürü yöntemiyle bitki elde etmek için tohumdan çıkarılmış olan embriyoların gelişiminin oldukça hızlı olduğu gözlemlendi. Yapılan gözlemlerde embriyoların hızlı gelişmeye devam ettikleri ve kök oluşumunun çok yoğun olduğu belirlendi. Ayrıca gövde ve yaprakların da oluştuğu, meydana gelen fidelerin sağlıklı bir görünüm arz ettiği tespit edildi. Bu fidelerden alınmış kök uçlarından hazırlanmış preparatlar incelendiğinde, hücrelerin şekil ve yapı bakımından farklılıklar gösterdiği gözlemlendi. Hücrelerin silindirik şekilli değil, daha kısa kenarlı olduğu tespit edildi. Bu hücrelerin nukleuslarının da daha büyük oldukları gözlemlendi. Ayrıca vakuolleşmenin olmadığı saptandı. Hücrelerin kromozomlarının daha belirgin olduğu ve kolaylıkla ayırt edilebildiği görüldü. Yapılan mitoz bölünme değerlendirmesinde mitotik aktivitenin oldukça yüksek olduğu hesaplandı. Mitozdaki hücrelerin çeşitli mitoz evrelerinde oldukları görüldü. Yapılan değerlendirme sonucu mitotik indeks değerinin %80.00 olduğu hesaplandı.

Bitki doku kültürü ile ilgili değişik amaçlarla yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Bu konuda, bazı araştırmacılar tarafından daha önce yapılmış çalışmalar aşağıdaki gibidir:

Ahsan ve ark. (2000), mısırın (*Zea mays* L.) doku kültürü ve kültürde yetiştirilmesi konusunda araştırmalar yapmışlar ve büyük hibritlerde genetik materyalin değiştirilmesi için somaklonal varyasyonların daha kullanışlı olduğu, doku kültürü çalışmaları ile bilinen bütün hastalık etkeni organizmalara karşı kullanılacak olan hastalıklara dayanıklı süper klonların elde edildiğini belirtmişlerdir.

Chang ve Chang (1998), kallus büyümesinin maya ekstraktı, hindistan cevizi sütü veya eski DNA preparasyonları sağlandığında gerçekleştiğini, taze hazırlanmış DNA'nın bu konuda etkisiz olduğunu, ancak otoklavda muamele edilirse etkili hale geleceğini açıklamışlardır. DNA'nın kırılması sonucu oluşan kırılma ürünlerinin bir kısmının hücre bölünmesi ve büyümesi için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Kallus dokularının farklılaşma şekillerinin mikroskopik analizlerinin bitki hücrelerinin rejenerasyon kapasiteleri hakkında bilgi verdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da deney grubu bitkilerin kök hücrelerinin nukleuslarının büyük olması bitkilerin rejenerasyon yeteneklerinin fazla olduğunu göstermektedir.

Carvalho ve ark. (1997), tropikal mısır genotiplerinde, gümüş nitratlı besiyerlerinde gelişen hücre sıralarında bitki rejenerasyonu ve tip II kallus üretimini başarmışlar ve bunlardan 48 örnekte tip II kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonunun yüksek kapasitede olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada da bitki rejenerasyonu *in vivo* ortamda daha çabuk gerçekleşmiştir.

Gomez ve Kalamani (2002), yeşil noktalı olma ve köklerinin fibrilli olması gibi özelliklerin, pirinçte (*Oryza sativa* L.) kallus gelişimi ve plantlet rejenerasyonu ile ilişkili karakterler arasında olduğunu belirtmişlerdir.

Rashid ve ark., (2004), yine pirinç bitkisinde kallus oluşumunun 2 mg/l 2,4 D içeren N<sub>6</sub> besiyerinde başarıldığını, kallus indüksiyonunun N<sub>6</sub> besiyerinde %83.3 ve MS besiyerinde %75.05 olduğunu açıklamışlardır. Araştırmacılara göre, kallus rejenerasyonu en iyi 1 mg/l NAA içeren besiyerinde ve 5 mg/l BAP içeren besiyerinde (örneğin; %81.6) olmaktadır. Bu çalışmada da NAA ve BAP ilave edilmiş besiyeri kullanılmıştır ve mitotik aktivitenin yüksek olduğu hesaplanmıştır.

Khan, ve ark. (1999), Hint pirincinde, olgun embriyolardan kallus oluşumunu başlatarak bitkiyi rejenere edebilmek için 2,4 D'nin tek başına farklı miktarlarda kullanılması veya buna benziladeninin farklı miktarlarda eklenerek kullanılması gerektiğini açıklamışlardır. Çalışmamızda embriyo kültürü ortamı olarak MS besiyerine 0.5 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA katılmıştır.

Fras ve Maluszynska (2004), *Arabidopsis thaliana* bitkisinden elde edilen kallusta, ilk olarak poliploid hücreleri gözlemişlerdir. Primer kültürde, ploidi derecesinin 2 ve 15n (10-75 kromozom) arasında değiştiğini bulmuşlardır. Eski kallus hücrelerinde, poliploid hücre frekansının daha yüksek olduğunu fakat ploidi derecesinin

aynı olduğunu, ototetraploid bitkilerden elde edilen kallus dizilerinde, diploid ve poliploid hücrelerle birlikte kromozom sayısının azaldığını gözlemişlerdir. Çalışmamızda ise poliploid hücrelere rastlanmamış ve kromozom sayısı  $2n=40$  olarak saptanmıştır.

Gonzalez ve ark. (2001), *Triticum turgidum* Desf. kültürlerinin olgun embriyolarında, sert bir kallus olduğu takdirde, gelişim oranının %54-100 arasında olduğunu ve kallus oluşumunda genotip ve besiyeri içeriğinin önemli olduğunu bulmuşlardır. Sert kallus oluşumu veren ve bitki rejenerasyonun en iyi olduğu besiyerlerinin MSm (30 g/l maltoz) ve MS40 (30 g/l sukroz ve 40 mM NaCl) olduğunu açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda, direkt embriyolar kullanılmış kallus oluşturulmamıştır.

Farooq ve ark. (2004), üç buğday genotipinin (Bakhtawar-92, Punjab-96 ve İnqilab-91) kallus oluşturma potansiyellerini test etmişlerdir. Bakhtawar-92'nin kallus indüksiyonuna en çok karşılık veren genotip olduğu, bunu İnqilab-91 ve Punjab-96'nın izlediğini bildirmişlerdir. Ayrıca Bakhtawar-92'nin diğer genotiplerle karşılaştırıldığında fazla miktarda kallus oluşturduğunu görmüşlerdir.

Chaudhry ve ark. (2004), domatesin (*Lycopersicon esculentum*) yaprak diskleri ve hipokotillerinde kallus oluşumu için 2 mg/l IAA, 2 mg/l BAP 2 mg/l NAA ve 4 mg/l kinetin içeren MS besiyeri kullanılmışlar ve hipokotilden kallus oluşumunu %82.5 ve yapraklardan kallus oluşumunu ise %57 olarak bulmuşlardır. Hipokotil ve yaprak diskleri kallusunda, 2 mg/l IAA, 5 mg/l BAP 2 mg/l NAA ve 4 mg/l kinetin içeren MS besiyerinde, maksimum oranda kök oluşumunu %45.8 ve %30.8 olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda besiyerinde gelişen embriyoların gelişme yüzdesi %90.13 olarak hesaplanmış ve kök gelişiminin oldukça yoğun olduğu görülmüştür.

Popelka ve Altpeter (2001), çavdarın (*Secale cereale* L.) doku kültürlerinde çalışılması zor türlerden olduğunu bildirilmişlerdir. Eksplantlardan erken gelişen germinasyon sayısı, rejenerasyon yanıtı ve (rejenere olan kallus oranı ve kallus başına oluşan rejenere bitkilerin sayısı) kallus indüksiyonunun, genotipten, karbohidrat ve oksin çeşitlerinden ve bunların değişik konsantrasyonları ile bunlar arasındaki etkileşimlerden önemli derecede etkilendiğini belirtmişlerdir. Genotip farklılığı, besiyeri sterilizasyon yöntemleri, temel mineral kompozisyonları, jelleştirici ajanlar, bakır sülfat eklenmesi ve ışıklandırma süresinin kallus yanıtını etkilediğini açıklamışlardır.

Rikiishi ve ark. (2003), arpa bitkisinde olgun embriyolardan elde edilen kültürlerde, kök rejenerasyon yeteneği yüksek olan bir genotip bulunduğunu açıklamışlardır. Bu özelliğin poligenlerle kalıtıldığını, kök rejenerasyonunun, çaprazlandığında 1:2:1 fenotip oranını veren büyük bir genle gerçekleştirildiğini açıklamışlardır.

Baboğlu ve ark. (2001), embriyo kültüründe, gelişen tohumdan veya tohum taslağından alınan, olgunlaşma dönemine yakın dönemdeki embriyolar izole edildiğinde bu embriyoların heterotrof olduğunu ve enerji kaynağı içeren basit bir anorganik ortamda gelişebildiklerini, olgunlaşmamış embriyoları kültüre almada ise embriyoların büyüme ve gelişmesine destek olabilecek bir kültür ortamı belirlemenin çok önemli olduğunu açıklamışlardır. Yapılan literatür araştırmasında en çok kullanılan besiyerinin MS besiyeri olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada da MS besiyeri kullanılmış ve görünüşü sağlıklı olan embriyolar seçilmiştir.

Bisognin (2002), *Cucurbitaceae* familyasının sabit ve görelî kromozom sayısının  $2n=40$  olduğunu ve kompleks izozim örneği gibi bulguların cinsin allopoloid bir kökeni olduğunu gösterdiğini açıklamıştır. İzozim çalışmalarının, *C. pepo* ve *C. moschata*'da yüksek allel çeşitliliği olduğunu gösterdiğini, *C. pepo*'nun *C. moschata* ve *C. argyrosperma* ile ortak bir atayı paylaştığını ancak *C. maxima* ile ortak bir atası olmadığını belirtmiştir. Bizim çalışmamızda ise poliploid hücrelere rastlanmamıştır.

Barow ve Meister (2003), kabak tohumundan geliştirilen bitkilerde genom boyutu ve endopoliploidizasyon arasında düşük negatif bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Ancak endopoliploidizasyon göz önüne alındığında, familyalar arasında, verici bitkilerin organları ve hayat döngüsü tipleri arasında farklılıklar olduğunu görmüşlerdir. Yaşam döngüsü, genom boyutu ve organ tipinin endopoliploidizasyona etkisinin az fakat önemli olduğunu açıklamışlardır. Endopoliploidinin bitki türlerinin gelişimini hızlandırması için gerekli olduğu sonucuna varmışlardır.

Lawrence ve ark. (2001), *C. pepo*'nun yabani ve hibrit tiplerinde tüm durumlarda %85'i aşan fide gelişimi olduğunu ancak fidelerin gelişimlerinin birbirlerine benzediğini bulmuşlardır. Hibrit bitkilerde %41'den fazla erkek çiçek, %21'den fazla dişi çiçek ve yabani bitkilerde ise %28'den fazla tohum oluşumu gözlemişlerdir. Hibritlerin ortalama verimliliklerinin, bitki başına 453-4497 tohum arasında, aynı

deneylerde yabancı tiplerin ise bitki başına %15-%53 tohum arasında değiştiğini bulmuşlardır. Bu durumun, F<sub>1</sub> dölünün nötral veya verimli ürün genlerinin, yabancı tip *C. pepo* populasyonlarına transferi için, güçlü bir bariyer olmadığını açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda da kontrol ve deney gruplarındaki fidelerin gelişimleri açısından farklılıklar gözlenmemiş fakat deney grubu fidelerin gelişiminin kontrol grubuna göre daha hızlı gerçekleştiği görülmüştür.

Hayes ve Andrew (2005), *C. pepo* subsp. *texana*'da yetiştirilen fidelerinin gelişim katsayısı 0.00 ve 0.75 arasında olduğunu, akraba bireylerde karşı tozlaşma ile üreyen bireylere göre daha az meyve oluştuğunu tespit etmişler ve bu bireylerde tohumların germinasyon oranının karşı tozlaşma ile üreyen tohumlardan daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Akraba bitkilerde az miktarda staminat çiçeklerin oluştuğunu, çiçek başına üretilen polen tanelerinin daha az sayıda olduğunu ve *in vitro*'da karşı tozlaşma ile üretilen bitkilerin polenlerinin de daha yavaş geliştiğini açıklamışlardır. Yabancı kabakta, dişi ve erkek özelliklerin akrabalıktan etkilendiğini bildirmişlerdir.

Debeaujon ve Branchard (1993), *Cucurbitaceae*'de somatik embriyogenez çalışmaları yapmışlar ve verici bitkinin genetik yapısının, somatik embriyogenez başarısında anahtar rol oynadığını açıklamışlardır. Somatik embriyoların, özellikle protoplastlardan alınan kültürler kullanıldığında gelişim anormallikleri gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da embriyo kültürü yöntemiyle yetiştirilmiş fidelerde normal bitkilere oranla daha hızlı bir gelişim ve yüksek mitotik aktivite görülmüştür.

Whitaker (1930), kültürü yapılmış kabaklarda kromozom sayılarını araştırmış ve bu tip çalışmaların, kromatin materyalinin yetersizliği ve kromozomlarının fazla sayıda ve küçük olmasından dolayı kolay yapılamadığını belirtmiştir. Bizim çalışmamızda da kök ucu meristem hücrelerinin mitoz bölünmenin farklı aşamalarında olduğu, ancak kromozomların oldukça küçük oldukları gözlenmiştir. Dolayısıyla mitoz bölünmenin profaz evresinde kromozomlar belirgin olarak gözlenememiştir.

Abrie ve Staden (2001), *Cucurbitaceae*'nin, *C. maxima* cv. A-line, *C. maxima* cv. Chicago Warded ve *C. pepo* cv. Rolet türlerinde rejenerasyon uygulamalarının hiçbirinde kök oluşmadığını görmüşlerdir. Ancak *C. maxima* cv. Chicago Warded eksplantlarında somatik embriyoların oluştuğunu, *Cucumis melo* cv. Hales Best 36'da rejenerasyon yeteneğinin yüksek olduğunu ve sitokinin içeren her konsantrasyonda kök oluştuğunu gözlemişlerdir. Kök oluşumunun, BA içeren medyumda, sitokinin içeriği

test edilen diğerk bitkilerden önemli derecede fazla olduğunu, *Cucumis sativus* cv. Ashley türünün kültüre yanıtının zayıf derecede olduğunu ve ancak BA veya IP içeren besiyerinde kök gelişimi olduğunu açıklamışlardır. Bu çalışmanın sonuçları da çalışmamızın bulgularıyla uyum sağlar özelliktedir.

Urbanek ve ark. (2005), Styrian Kabağı'nda somatik embriyo oluşumunu başarmışlar ve büyüme faktörlerini içeren besiyerlerinde kallus oluşumunun daha çabuk gerçekleştiğini görmüşlerdir. Büyüme faktörlerinin (16.11  $\mu$ M NAA ve 4.44  $\mu$ M NBA) daha düşük konsantrasyonlarında embriyojenik oluşumun daha fazla olduğunu açıklamışlardır. Embriyo gelişimi için gereken sürenin besiyeri bileşenleri ile ilgili olmadığını, en yüksek germinasyonun, besiyerinde 11.42  $\mu$ M IAA varken kültüre alınan embriyolarda olduğunu gözlemişlerdir. Çalışmamızda da *in vitro* ortamda embriyoların hızlı geliştiği gözlenmiştir.

Chee (1991), *Cucurbita pepo* L., cv. YC 60'nın doku kültüründe bitki rejenerasyonunu incelemiş ve çalışma sonuçlarında, rejenere bitkilerin, morfolojik olarak normal görüldüğünü ve üremenin normal olduğunu gösteren tohumlar ile meyveler oluştuğunu açıklamıştır. Çalışmamızda da *in vitro* ortamda gelişen embriyoların fideleri normal görünmelerine karşın laboratuvar ortamına çıkarıldıklarında, bitkilerde belirgin bir bozulma gözlenmiş ancak kısa süre sonra bitkiler normale dönmüşlerdir.

Varghese (1971), *C. pepo* L. endosperminin gelişiminin erken aşamasında  $3n=60$  kromozomlu (triploid) olduğunu, daha sonraki aşamalarda daha yüksek ploidi değerleri (6n, 12n, 24n, 48n) sayıldığını açıklamıştır. Kromozom sayısındaki öploid artışın endopoliploidi ile sonuçlandığını, nukleer hacim artışı ile birlikte nukleolus hacminin de arttığını bildirmiştir. Endosperm oluşumunun tüm aşamalarında, farklı boyutlarda ve şekillerde, nukleus sayısı değişen hücreler gözlemiştir. Embriyo gelişiminde endosperm dokusu absorbe edildiği için olgun tohumda endosperma gözlemediğini açıklamıştır.

Dane ve Tsuchiya (1976), *Cucumis* cinsinde kromozom çalışmaları yapmışlar ve bunun için 50 yabancı *Cucurbita* türünün sitolojik araştırmalarında, diğerk bütün türler  $2n=14$  veya  $2n=24$  şeklinde diploid sayıda kromozom içeriyorken,  $2n=48$  kromozomlu üç tetraploid türün ve bir tane  $2n=72$  kromozomlu heksaploid türün varlığını göstermişlerdir.

Olszewska (1976), *C. pepo* kök uçlarının başlangıcından 3-4 mm, 5-6 mm ve 7-8 mm aralıklar ile parçalar almış ve bu parçalarda, korteks hücrelerinin miktarının, meristematik hücrelerle birlikte, 7-8 mm'lik parçalarda 20 kattan daha fazla olduğunu ve bu hücrelerdeki sitoplazma miktarlarının diğerlerinin yedi katı kadar olduğunu bulmuştur. Meristematik aktivitenin daha fazla olduğu kök ucu hücreleri ve alınan parçalarda, DNA'nın endomitoz ile replike olduğunu, nukleer işaretleme ile temel olarak 3-4 mm'lik parçalarda nukleusun 4C ploidi aşamasına ulaştığını belirlemiştir. Kök ucu hücrelerinin çoğunun 4C, arda kalan hücrelerin 8C olduğunu açıklamıştır. Nukleolusta H<sub>3</sub> timidin artışının, kök ucu hücrelerinin nukleolar DNA'sının replikasyon yaptığını gösterdiğini ve bu artışın 5-6 ve 7-8 mm'lik parçalarda daha az derece olduğunu açıklamıştır. Nukleolar hacim ölçümleri, H<sub>3</sub> üridin bağlama, H<sub>3</sub> AMD bağlama ve granüler bileşenlerin sayısının, en çok sitoplazmik hacim artışının 3-4 ve 5-6 mm'lik parçalarda, kök parçalarında ve meristematik bölgede yer alan nukleolar aktivitede olduğunu göstermiştir. H<sub>3</sub> lösünün, ribozomların poliribozomlar şeklinde ve yoğunluğunun az olduğu 7-8 mm'lik parçalara yoğun şekilde bağlandığını açıklamıştır. H<sub>3</sub> üridin bağlanması önemli derecede azalırken H<sub>3</sub> AMD bağlanması hafifçe yükseldiğini görmüştür. Ploidi aşaması arasındaki uzaklığın, farklılaşmış hücrelerde yoğunlaşmış kromatin bölgesinin artışı nedeniyle, H<sub>3</sub> AMD ve H<sub>3</sub> üridin bağlamadan kaynaklanabileceği açıklamıştır. Plastidler son olgunluğuna, 3-4 mm'lik parçalarda ulaşmıştır. Endoplazmik retikulumun hacim yoğunluğunun artışının ve Golgi organelinin hacim yoğunluğunun azalışının korteks hücrelerinin farklılaşması ile birlikte olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada da hücrelerin bölünme aşamasında olması dolayısıyla nukleus hacimlerinin fazla olduğu görülmüştür.

Malter ve ark. (1984), *C. andreana* ve *C. martinezii* embriyolarında yapılan kültür çalışmalarında ekzojen ve endojen faktörlerin embriyo gelişimine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada Murashige ve Skoog tuzları, tiamin, niasin, piridoksin, askorbik asit, maya ekstraktı, hindistan cevizi sütü, mio-inositol, glikoz, NAA ve kinetin içeren orta sertlikte bir besiyeri kullanmışlardır. pH 5.65'e getirildikten sonra bactoagar ekleyerek besiyerini katılaştırmışlardır. 12 gün sonra gelişen tohumların %40'ında sürgünlerin ve 4-17 adet yan kök oluşumunun gözlemlendiğini, 16 gün sonra ise gelişen tohumların %30'unda bir veya daha fazla gerçek yapraklar oluştuğunu açıklamışlardır. *C. martinezii* embriyolarının kültürlerinde *C. andreana* kültürlerinden

biraz daha güçsüz bir durum gözlemişlerdir. 12-16. günün sonunda embriyoların çoğunda ek köklerin ortaya çıktığını, tohumların %56'sında tek yaprak geliştiğini ve 16. günün sonunda yan köklerin oluştuğunu bildirmişlerdir. Eksplantlardan yalnızca bazal tomurcuklu yapraklar ve hala kotiledonlar ile bağlı küçük gövde parçalarında sürgünlerin oluştuğunu ve köklerin farklılaştığını görmüşlerdir. Bazı kotiledon eksplantlarında ise yalnız köklerin geliştiğini açıklamışlardır. Bu sonuçlara dayanarak, *in vitro* farklılaşmanın, eksojen besinler ve hormonlar gibi endojen faktörler tarafından da kontrol edildiğini bildirmişlerdir. *Cucumis melo* ve *Cucurbita pepo*'nun doku kültürlerinde de benzer endojen farklılaşma faktörlerinin etkili olduğunu açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda da *in vivo* ortamdaki embriyolarda bir haftada kök gelişimi olmuştur. İkinci haftanın sonunda ise embriyolardan fidelerin geliştiği ve küçük yaprakların oluştuğu gözlenmiştir.

Ananthakrishnan ve ark. (2003), *Cucurbita pepo*'da *in vitro* organogenez ile sürgün oluşumu için kotiledon eksplantlarını 1 mg/l benziladenin ilave edilmiş MS besiyerinde üretmişler ve sonuçta gelişen tüm sürgünlerin diploid olduğunu açıklamışlardır. Çalışmamızda da embriyo kültürüyle elde edilmiş bitkilerde diploidinin korunduğu gözlenmiştir.

Concetta de Pinto M. ve De Gara L (2004), etiole bezelyenin (*Pisum sativum* L.) köklerinde hücresel farklılaşma sırasında apoplastik ve simplastik süreler boyunca askorbatla ilişkili enzimlerin aktivitesinin analizini yapmışlardır. Askorbat oksidaz ve askorbat peroksidaz denen enzimlerin varlığını apoplast ve simplast aşamadaki her iki bezelye grubu için araştırmışlar ve yalnızca simplastik fraksiyonlarda askorbatsız radikal redüktaz ve dehidroaskorbat redüktaz bulunduğunu açıklamışlardır. Mitotik indeksi araştırmak için ise bitki parçalarını 3:1 etanol/asetik asit (v/v) içinde fiske etmişler, ve Schiff's reaktifi ile 2 saat boyanmaya bırakmışlardır. Her bir parça %45 asetik asitte ezilmiştir. Her bir parça için beş ezme preparat yapılmış ve her biri için 1000 hücre sayılmıştır. Bölünme aşamasındaki hücrelerin toplam sayılan hücrelere oranından mitotik indeks hesaplanmıştır. Araştırmada en yüksek mitotik indeks meristematik bölgedeki hücrelerde bulunmuştur. Hücre büyüklüğü optik mikroskopi görüntüsünden tanımlanmıştır (X250). Bezelye parçaları, formalin:asetikasit:etanol (1:1:0.5 v) karışımında fiske edilmiş ve etanol serilerinde dehidrasyon yapılmıştır. Daha sonra parafine gömülmüştür. Bu parçalardan 7-10 µm boyutunda kesitler alınmış ve



safranin fast-green ile boyanmıştır. Sonuçta buradaki hücrelerin daha küçük oldukları bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da aynı yöntemle 1000 hücre sayılarak mitotik indeks hesaplanmış ve deney grubunda mitotik indeks değeri kontrol grubu bitkilerin kök ucu meristemlerinden daha yüksek çıkmıştır. Aynı şekilde hücrelerin kontrol grubuna göre daha küçük fakat nukleus oranlarının daha büyük olduğu gözlenmiştir. Bu da hücrelerin bölünme aşamasında olduklarını destekler niteliktedir.

Yapılan çalışmalara göre doku kültürü yöntemiyle üretilmiş olan bitkilerin bazı özellikleri ile normal şartlarda yetişen bitkilere göre değişim gösterdiği belirtilmektedir. Görüldüğü gibi bitki doku kültürü ile değişik amaçlarla ve değişik yöntemler kullanılarak ayrıca çeşitli bitki kısımları kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır. Bu değişimlerin, *in vitro* şartlarda sağlanmış olan sabit ortam koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü bazı kültür yöntemlerinde *in vitro* ortamda tek hücreden başlayarak fide oluşması aşamasına kadar değişmeyen sıcaklık, nem ve düzenli beslenme şartları, oluşan bitkinin hücresel yapısında ve ortam koşullarına olan direncinde değişmelere neden olmaktadır. Doğal şartlarda yetişen bitkilerde ise bitkiler çimlenmeden itibaren bütün çevre faktörleriyle karşılaşmakta ve onlara karşı direnç kazanabilmektedir. Kültür ortamında yetiştirilmiş olan bitkilerde ise böyle bir direnç kazanımı eksikliği olduğu düşünülmektedir. Ayrıca kültür ortamında yetişen bitkilerde birçok yapının değişimi söz konusu olabilir. Örneğin *in vitro* ortamda gelişen bitkiler rüzgara ve aşırı sıcaklığa maruz kalmadıkları için stomaları, sayı ve yapı bakımından farklılıklar gösterebilir. Kök sistemleri hızlı gelişir çünkü doğal ortamda olduğu gibi toprağın kök gelişimini engelleyici etkisi ile karşı karşıya değillerdir. İletim sistemleri doğal ortamdaki bitkiler kadar gelişmez. Çünkü *in vitro* ortamda fazla su tüketimi ve yüksek bir transpirasyon söz konusu değildir. Bunun yanında *in vitro* ortamdaki bitkiler, rüzgar veya diğer çevre koşullarının etkisi söz konusu olmadığı için destek doku elemanları bakımından da zayıftırlar. Diğer önemli husus ise *in vitro* ortamda yetişen bitkilerin steril ortamda olmaları nedeniyle virüs, bakteri, mantar ve diğer hayvansal organizmalardan kaynaklanan hastalık ve zararların söz konusu olmamasıdır. Bütün bunlar bir arada düşünüldüğünde *in vitro* ortamda yetişen bitkilerin avantajlı oldukları düşünülse de bu bitkiler normal ortam şartlarına alındıklarında olumsuz yönde etkilenmektedirler. Bu olumsuz etkilenme bazen kısa sürede ortadan kalkabilmekte, bazen de bitkinin sağlığını bozacak şekilde kalıcı olabilmektedir. Bu nedenle *in vitro*

ortamda yetiştirilmiş bitkiler kademeli bir şekilde doğal ortama aktarılırlar. Çalışmamızda da iklim dolabından laboratuvar ortamına alınmış bitkilerde kısa süreli ve kalıcı olmayan olumsuz etkilenmeler görülmüştür.

Çalışma esnasında, kültür ortamında embriyolardan oluşan fidelerin oldukça hızlı bir şekilde gelişmesinin ve öncelikle köklerinin aşırı şekilde büyümesinin, yukarıda belirttiğimiz *in vitro* ortam şartlarının bitki gelişim hızını arttırıcı yönde etkilemesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu hızlı gelişimi hücre yapılarının farklılıkları ve yüksek değerdeki mitotik indeks desteklemektedir. Bu sonucun oluşumuna yardımcı bir diğer etken olarak, bitki gelişimi sırasında belirleyici olan genetik özelliklerin, çevresel faktörler ile daha etkin hale gelmesi düşünülebilir. Çalışmada, *in vitro* şartlarda yetişen bitkilerde gelişim hızının yükseldiği, hücresel yapının değiştiği, kromozom sayısının değişmediği ve mitotik aktivitenin arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmanın, bahsedilen değişimlerin nedenlerini belirleyecek diğer çalışmalara katkı sağlayacağı kanısındayız.

**KAYNAKLAR**

ABRİEA.L., STADEN VAN J., 2001 “Development of Regeneration Protocols for Selected Cucurbit Cultivars”, *Plant Growth Regulation*, 35(3): 263-267

AHSAN M., MEHDİ S.S., KHALİQ I., 2000 “Tissue Culture and Breeding of Maize (*Zea Mays*) a Review” *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 3 (11): 1885-1888

ANANTHAKRİSHNAN G., XIA X., ELMAN C., SİNGER S., PARİS H.S., GAL-ON A., GABA V., 2003 “Shoot Production in Squash (*Cucurbita pepo*) by *in vitro* Organogenesis”, *Cell Biology and Morphogenesis*, 8:739-46

BABOĞLU M., GÜREL E., ÖZCAN S., 2001 “Bitki Biyoteknolojisi Doku kültürü ve Uygulamaları” Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 374 sayfa

BACHMANN J., 2002 “Organic Pumpkin and Winter Squash Production” NCAT Agriculture Specialist, Florida, sayfa 1-7

BAROW M., MEİSTER A., 2003 “Endopolyploidy in Seed Plants is Differently Correlated to Systematics, Organ, Life Strategy and Genome Size” *Plant, Cell and Environment*, 26 (4), 571

BİSOĞNİN D. A., 2002 “Origin and Evolution of Cultivated Cucurbits”, *Ciência Rural*, Santa Maria, 32(4): 715-723

CARVALHO C.H.S., BOHOROVA N., BORDALLO P.N., ABREU L.L., VALİCENTE F.H., BRESSAN W., PAİVA E., 1997 “Type II Callus Production and Plant Regeneration in Tropical Maize Genotypes”, *Plant Cell Reports*, 17 (1): 73-76

CHANG C., CHANG W. C., 1998 “Cultures of Meristems and Cali” *Plant Cell Reports* 17, 251-255

CHAUDHRY Z., HABIB D., RASHID H., QURESHI A.S., 2004 "Regeneration From Various Explants of *in vitro* Seedling of Tomato (*Lycopersicon esculentum* L., c.v. Roma) Pakistan Journal of Biological Sciences, 7 (2): 269-272

CHEE PAULA P., 1991 "Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Squash *Cucurbita pepo* L. cv. YC 60", Plant Cell Reports, 9(11): 620-622

COLLIN H. A., EDWARDS H.S., 1998 "Plant Cell Culture", BIOS scientific Publisher, 158 sayfa

CONCETTA DE PINTO M. ve DE GARA L, 2004 "Changes in The Ascorbate Metabolism of Apoplastic and Symplastic Spaces are Associated With Cell Differentiation" Journal of Experimental Botany, 55(408):2559-2569

DANE F., TSUCHIYA T., 1976 "Chromosome Studies in the Genus *Cucumis*", Euphytica, 25(1): 367-374

DEBEAUJON I., BRANCHARD M, 1990 "Somatic Hybridization of Muskmelon (*Cucumis melo* L.) with Kiwano (*Cucumis metuliferus* Naud.) and Squash (*Cucurbita pepo* L.) by Protoplast Electrofusion" Laboratoire de Génétique Végétale - C.N.R.S. (U.R.A. 115). Bât. 360 Université de Paris Sud - 91405 Orsay cedex - France

DEBEAUJON I., BRANCHARD M., 1993 "Somatic Embryogenesis in *Cucurbitaceae*", Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 34(1): 91-100

FAROOQ M., RASHID H., IHSANULLAH, CHAUDHRY Z., MARWAT K.B., 2004 "Comparative Tissue Culture Response of Wheat Cultivars and Evaluation of Regenerated Plants" Pakistan Journal of Biological Sciences, 7(3): 406-408

FRAS A., MALUSZYNSKA J., 2004 "The Correlation Between the Chromosome Variation in Callus and genotype of Explants of *Arabidopsis thaliana*", Genetica, 121(2):145-54

GOMEZ M.S., KALAMANI A., 2002 “Variability Analysis of Traits Related to Callus Growth and Plant Regeneration in Drought Resistant Local Land Races of Rice (*Oryza sativa*)” Asian Journal of Plant Sciences, 1(5): 583-584

GONZALEZ J.M., FRIERO E., JOUVE N., 2001 “Influence of Genotype and Culture Medium on Callus Formation and Plant Regeneration From Immature Embryos of *Triticum turgidum* Desf. Cultivars”, Plant Breeding 120 (6): 513

HAYES C. N., JAMES A. W., ANDREW G. S., 2005 “A Comparison of Male and Female Responses to Inbreeding in *Cucurbita pepo* subsp. *texana* (Cucurbitaceae)”, American Journal of Botany, 92: 107-115

HERNANDO BERMEJO J. E., LEON J., 1994 “Plant Production and Protection Series No. 26. FAO”, Rome, Italy., sayfa 63-77

KHAN S., SPOOR W., 2000 “Evaluation of Different Explant Sources and Growth Regulators on Callus Culture and Regeneration in Strawberry (*Fragaria ananassa*)” Pakistan Journal of Biological Sciences, 3(12): 2249-2250

KHAN Z. I., HUSSAIN A., SADIQ M., 1999 “Optimization of Different Media for Plant Regeneration From Callus Culture of Indica Rice (*Oryza sativa*) genotype D.M. 25” Pakistan Journal of Biological Sciences, 2(3): 984-987

KOCAÇALIŞKAN İ., 2003 “Bitki kültürleri (Organ, Doku ve Hücre)” DPÜ Fen Edebiyat fakültesi Biyoloji Bölümü, Kütahya, 136 sayfa

LAWRENCE J., SPENCER, ALLISON A., SNOW, 2001, “Fecundity of Transgenic Wild–Crop Hybrids of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae): Implications for Crop-to-Wild Gene Flow”, Heredity, 86(6): 694

MALTER, A. B., R. J. LEBOWITZ, JUVIK J. A., 1984. "Cucurbit Genetics Cooperative Report", Embryo Culture of *Cucurbita andreana* and *C. Martinezii*, 7:69-70

OLSZEWSKA M. J., 1976 "Autoradiographic and Ultrastructural Study of *Cucurbita pepo* Root Cells During Their Growth and Differentiation", Histochemistry and Cell Biology, 49(2): 157-175

POPELKA J., ALTPETER F., 2001 "Interactions Between Genotypes and Culture Media Components for Improved *in vitro* Response of Rye (*Secale cereale* L.) Inbred Lines", Plant Cell Reports, 20(7): 575-582

RASHID H., SALEEM M., CHAUDHRY Z., GILANI T.S., QUARESHI A.S., 2004 "Studies on Developing a High Regeneration From Seed Derived Calli of Rice (*Oryza sativa* L.) C.v. Super Basmati" Pakistan Journal of Biological Sciences, 7(2): 273-276

RIKIISHI K., MATSUURA T., MAEKAWA M., NODA K., TAKEDA K., 2003 "Genetic Analysis of Tissue Culture Traits in Barley cv. 'Lenins'", Plant Breeding, 122(2): 99

SAADE L. R., ve HERNANDEZ S., 1994 "Cucurbits", Plant Production and Protection Series, Rome Italy, sayfa 63-77

SISKO, M., IVANCIC A., BOHANEK B., 2003 "Genome Size Analysis in the Genus *Cucurbita* and Its Use for Determination of Interspecific Hybrids Obtained Using The Embryo Rescue Technique", Molecular Ecology, 14(7): 2111-2132

SMITH, ROBERT A., 1997 "Plant Tissue Culture Studies, Plant Tissue Culture (BS 332), Virginia, 164 sayfa

STEPHENS J. M., 2003 "Squash, Zucchini, *Cucurbita pepo* L.", Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 407: 894-1351

URBANEK A., ZECHMANN B. MULLER M., 2005 "Plant Regeneration Via Somatic Embryogenesis in Styrian Pumpkin: Cytological and Biochemical Investigations", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79(3): 329-340

VAN RAAMSDONK L. W. D., DEN NIJS A. P. M., JONGERIUS M. C., 1989 "Meiotic Analyses of *Cucumis* Hybrids and an Evolutionary Evaluation of the Genus *Cucumis* (*Cucurbitaceae*)", *Plant Systematics and Evolution*, 163(3-4): 133-146

VARGHESE B. M., 1971 "Chromosome Constitution and Nucleolar Behaviour in The Endosperm of *Cucurbita pepo* L.", *Genetica*, 42(2): 231-238

WHITAKER T., 1930 "Chromosome Numbers in Cultivated Cucurbits", *American Journal of Botany*, 17(10): 1033-1040

## **ÖZGEÇMİŞ**

1979 yılında Edirne'nin Uzunköprü ilçesinde doğdum. Ortaöğrenimimi 1997 yılında Edirne Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladım. 1998 yılında Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazanarak lisans eğitimime başladım. 2002 yılında lisans programını bitirdim ve aynı yıl Uzunköprü M. Atasay Anadolu Lisesi'nde Biyoloji Öğretmeni olarak vekil öğretmenlik yaptım. 2003 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Sitoloji bölümü Tezli Yüksek Lisans Programına ve aynı yılda Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Biyoloji Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Programına kabul edildim. 2005 yılında Tezsiz Yüksek Lisans Programını tamamladım. Üç yıldan beri Özel Trakya Boyut Dershanesi'nde Biyoloji Öğretmeni olarak görev yapmaktayım.



## ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER

Şekiller ve çizelgeler	Sayfa
Çizelge 3.1.1 Kum kaplarında çimlendirilen ve gelişme gösteren tohumların sayısı	30
Çizelge 3.1.2. Besiyerlerinde gelişme gösteren embriyoların sayısı	31
Şekil 3.1.1. Petri kaplarına ekimi yapılmış embriyolar	32
Şekil 3.1.2. Kültür ortamında 7 günlük periyotta embriyoların gelişimi	32
Şekil 3.1.3. Kültür ortamında 7 günlük periyotta embriyonun gelişimi	33
Şekil 3.1.4. Kültür ortamında 7 günlük periyotta embriyoların gelişimi	34
Şekil 3.1.5. Büyük kültür kaplarında gelişen fideler	34
Şekil 3.1.6. Başlangıç aşamasındaki embriyolar ve gelişme aşamasındaki bitkicikler	34
Şekil 3.1.7. Büyük kültür kaplarında gelişen fide	35
Şekil 3.1.8. Büyük kültür kaplarında gelişen fide	35
Şekil 3.1.9. Büyük kültür kaplarında gelişen fide	36
Çizelge 3.1.3. Büyük kültür kaplarında gelişme gösteren fidelerin sayısı	36
Şekil 3.1.10. Nemli kum ortamına aktarılmış fideler	37
Çizelge 3.1.4. Nemli kum kabında gelişen fidelerin sayıları	38
Şekil 3.1.11. Nemli kum ortamında gelişen fide	38
Şekil 4.1. Kontrol grubu bitkisi kök ucu meristem hücreleri (X1000)	40
Şekil 4.2. Kontrol grubu bitkisi kök ucu meristem hücreleri (X400)	41
Şekil 4.3. Kontrol grubu bitkisi kök ucu meristem hücreleri (X1000)	41
Şekil 4.4. Kontrol grubu bitkisi kök ucu meristem hücreleri (X200)	42
Şekil 4.5. Kontrol grubu bitkisi kök ucu meristem hücreleri (X1000)	42
Çizelge 4.1. 100 hücrelik görüş alanı baz alınarak sayılan 10 preparatta mitoz bölünme aşamasındaki hücreler	43
Şekil 4.6. Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X400)	44
Şekil 4.7. Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X400)	44
Şekil 4.8. Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X1000)	45
Şekil 4.9. Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X400)	45

<b>Şekil 4.10.</b> Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X1000)	46
<b>Şekil 4.11.</b> Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X200)	46
<b>Şekil 4.12.</b> Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X400)	47
<b>Şekil 4.13.</b> Deney grubu bitkileri kök ucu meristem hücreleri (X1000)	47
<b>Çizelge 4.2.</b> 100 hücrelik görüş alanı baz alınarak sayılan 10 preparatta mitoz bölünme aşamasındaki hücreler	48