

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**HIYAR (*Cucumis sativus* L.) GENOTİPLERİNİN ÖNEMLİ HASTALIKLARA
DAYANIKLILIK DURUMLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ VE DOUBLE HAPLOİD TEKNİĞİNİN OPTİMİZASYONU**

Mamoudou ZONON

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

TEMMUZ 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**HIYAR (*Cucumis sativus* L.) GENOTİPLERİNİN ÖNEMLİ HASTALIKLARA
DAYANIKLILIK DURUMLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ VE DOUBLE HAPLOİD TEKNİĞİNİN OPTİMİZASYONU**

Mamoudou ZONON

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

TEMMUZ 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HIYAR (*Cucumis sativus* L.) GENOTİPLERİNİN ÖNEMLİ HASTALIKLARA
DAYANIKLILIK DURUMLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ VE DOUBLE HAPLOİD TEKNİĞİNİN OPTİMİZASYONU**

**Mamoudou ZONON
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS**

Bu tez Proto Profesyonel Tohum Şirketi tarafından desteklenmiştir.

TEMMUZ 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HIYAR (*Cucumis sativus* L.) GENOTİPLERİNİN ÖNEMLİ HASTALIKLARA
DAYANIKLILIK DURUMLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ VE DOUBLE HAPLOİD TEKNİĞİNİN OPTİMİZASYONU**

Mamoudou ZONON
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS

Bu tez 02/07/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Hatice İKTEN
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Doç. Dr. Hasan PINAR

ÖZET

HIYAR (*Cucumis sativus* L.) GENOTİPLERİNİN ÖNEMLİ HASTALIKLARA DAYANIKLILIK DURUMLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ VE DOUBLE HAPLOİD TEKNİĞİNİN OPTİMİZASYONU

Mamoudou ZONON

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hatice İKTEN

Temmuz 2021; 56 sayfa

Hibrit tohum üretiminde kullanılan saf ebeveyn hatlarının elde edilmesi çok zaman alıcı (6-8 yıl), zahmetli ve masraflıdır. Hıyar ıslah çalışmalarının etkili bir şekilde hızlandırılması için biyoteknolojik teknikleri yeni çözümler sunmaktadır. Bu tekniklerden biri olan doku kültürü (double haploid) yöntemiyle kısa sürede (1-2 yıl) 100% homozigot ebeveyn hatlar elde edilebilmektedir. Double haploid bitki elde etmesinde kullanılan yöntemler parthenogenesis (ışınlanmış polen ile tozlanma ve embriyo kurtarması), androgenesis (Anter veya mikrospor kültürü), ve gynogenesis (ovul veya yumurtalık kültürü)'dür. Yapılan çalışmalara göre hıyardaki haploit bitki elde etme yöntemlerinden gynogenesis daha etkili fakat genotipe bağlıdır. Dolayısıyla her genotip için protokol optimizasyonu gerekmektedir. Bu çalışmada kullandığımız 28 tane genotipte (14 F1 ve 14 saf hat) ovul kültürü yoluyla haploid bitki elde etme protokolünün optimizasyonu ve bu genotiplerin ZYMV, CMV, PRSV hastalıklarına dayanıklılık durumlarını moleküler markırlarla belirlenmesi amaçlanmıştır. Ovül kültürü çalışmalarında üç protokol kullanılmıştır (P1, P2 ve P2K3).

P1 protokolünde en yüksek embriyo oluşum oranı %71 (22 nolu genotip), en düşük embriyo oluşum oranı %3 (15 nolu genotip) ve ortalama embriyo oluşum oranı %20'dir. Rejenerasyon (sürgün oluşumu) bakımından en yüksek oran 18 nolu genotiple %140 (ortalama 1.4 sürgün/eksplant), en düşük oran ise 25 nolu genotiple %0,5 bulunmuştur. Ortalama sürgün oluşum oranı %6 bulunmuştur. P1 protokolünde rejenerasyon olmasına rağmen bitki elde edilememiştir. P2 ortamı ile yaptığımız çalışmada en yüksek embriyo oluşum oranı (%75) 3 nolu genotipte bulunmuştur. En düşük embriyo oluşum oranı (%5,8) ise 6 nolu genotipte bulunmuştur. Ortalama embriyo oluşum oranı %20'dir. Sürgün oluşumu bakımından en yüksek oran %4,6 olarak 18 nolu genotipte, en düşük oran ise %0,5 olup 7 nolu genotipte elde edilmiştir. Ortalama rejenerasyon oranı %6'dır. P2 ortamında rejenerasyon elde edilmesine rağmen bitki gelişimi gerçekleşmemiştir. Rejenerantların gelişmesi için optimizasyon gerekmektedir. P2K3 ortamı P2 ortamını modifiye ederek elde edilmiştir. P2K3 protokolünde en yüksek embriyo oluşum oranı %104 (yani 1.04 embriyo/eksplant) olup 4 nolu genotiple elde edilirken en düşük embriyo oluşum oranı % 2,5 olup 2 nolu genotipte bulunmuştur. P2K3 protokolü ile yaptığımız çalışmada ortalama embriyo oluşum oranı %20'dir. Sürgün rejenerasyonu için en yüksek oran %470 (4.7 sürgün/explant) ile 14 nolu genotipte bulunmuştur. En düşük rejenerasyon oranı %1 olarak 12 nolu genotipte elde edilmiştir. Bu rejenerantlardan bitki elde edilebilmiştir. 7 nolu genotipten 3 tane diploid, 11 nolu genotipten 4 tane (hepsi haploid) ve 14 nolu

genotipten 11 tane (hepsi diploid) ve 12 nolu genotipten 1 tane (diploid) bitki olmak üzere toplam 19 bitki elde edilmiştir. Kısacası P2K3 protokolüyle 4 haploid ve 15 diploid olmak üzere toplam 19 tane bitki elde edilmiştir. P2K3 protokolünün hıyarda double haploid bitki geliştirme programlarında başarılı bir şekilde uygulamabileceği görülmüştür.

Yapılan moleküler testleme çalışmalarında ise kabak sarı mozaik virüsü hastalığı (ZYMV) için CAPS-T86C, hıyar mozaik virüsü hastalığı (CMV) için SSR9-56 ve SSR11-1 papaya halkalı leke virüsü (PRSV) için SSR11-177) markırları kullanarak 28 genotipte optimizasyon yapılarak dayanıklı ve hassas genotipler belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: *Cucumis sativus L.*, Double Haploid, Marker Assisted Selection, Homozigot

JÜRİ: Doç. Dr. Hatice İKTEN

Prof. Dr. Nedim Mutlu

Doç. Dr. Hasan PINAR

ABSTRACT

DETERMINATION OF RESISTANCE TO IMPORTANT DISEASES OF SOME CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.) GENOTYPES BY MOLECULAR METHODS AND OPTIMIZATION OF DOUBLE HAPLOID TECHNIQUE

Mamoudou ZONON

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hatice İKTEN

July 2021; 56 pages

The development of pure lines used in hybrid seed production is tedious, costly and time consuming (6-8 years). Tissue culture (doubled haploid technique) seems to be an alternative to speed up the process. Using doubled haploid technique 100% homozygous parental lines can be obtained in a time relatively sort (1-2 years). Among the techniques used in doubled haploid plants production, there are parthenogenesis (pollination with irradiated pollen followed by embryo rescue), androgenesis (anther or microspore culture) and gynogenesis (ovul or ovary culture). Among these techniques, gynogenesis seems to be more efficient but depends on genotypes. Therefore, protocol optimization is required for genotypes. In this study, the purpose was to optimize protocols for doubled haploid plants production in 28 genotype by ovule culture and determine the resistance status of these genotypes to Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV), Cucumber Mosaic Virus (CMV) and Papaya Ring Spot Virus (PRSV) using molecular markers previously developed. For doubled haploid optimization, three main protocols (P1, P2 and P2K3) were used.

According to P1 protocol, the highest embryo induction rate was 71% with genotype 22, the lowest rate was 3% with genotype 15. The average embryo induction rate was 20%. The highest regeneration (shoot induction) rate was 140% (Average of 1.4 shoot/eksplant) with genotype 18. The lowest rate was 0.5% with genotype 25. The average shoot induction rate was 6%. Despite regeneration, regenerants could not develop in plantlets. In the P2 medium, the highest embryo induction rate (75%) was found in genotype 3. The lowest embryo rate which is 5.8% was found in genotype 6. The average embryo induction rate was 20%. In terms of rejenerasyon the highest rate was 4.6% obtained in genotype 18. The lowest regeneration rate was 0.5% with genotype 7. The average regeneration rate was 6%. Although regeneration was observed in some genotypes, plantlets could not be obtained. Optimization may be required for the development of regenerants. P2K3 medium is a protocol developed by modifying P2 protocol. In P2K3 medium the highest embryo induction rate was 104% (an average of 1.04 embryo/explant) obtained with genotype 4. The lowest embryo induction rate was 2.5% (genotype 2) and the average embryo induction rate was 20%. For regeneration rates, the highest one obtained in genotype 14 was 470% (an average of 4.7 shoot/explant). The lowest regeneration rate was 1% (genotype 12). In P2K3 medium, some of regenerants developed to give plantlets. Including 3 diploid plants from genotype 7, 4 haploid plants from genotype 11 and 11 diploid plants from genotype 14, 19 plants were obtained in total. In short, including 4 haploid and 15 diploid plants, 19 plants were

obtained totally. In doubled haploid optimization study, 19 plants are obtained in total with modified P2K3 protocol. Among these plants, 4 are haploid and 15 are diploid. This developed new protocol is promising for cucumber doubled haploid lines development programs.

In the molecular analysis studies the molecular markers developed previously for Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV), Cucumber Mosaic Virus (CMV), Papaya Ring Spot Virus (PRSV) resistance were optimized and the resistance status of 28 cucumber genotypes to ZYMV, CMV, PRSV were determined. As markers, CAPS-T86C was used for ZYMV resistance screening and SSR11-177 was used for PRSV resistance screening. For CMV disease screening, two flanking markers were used (SSR9-56 and SSR11-1).

KEYWORDS: *Cucumis sativus L.*, Double Haploid, Marker Assisted Selection, Homozygote

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Hatice İKTEN

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Assoc. Prof. Dr. Hasan PINAR

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın başından sonuna kadar desteğini her zaman hissettiren, beni cesaretlendiren, sabırla bana yol gösteren, yönlendiren ve gelişmeye katkıda bulunmak adına bana her anlamda (maddi ve manevi) verdiği destek ve değerli bilgilerden dolayı kıymetli saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Hatice İKTEN'e şükranlarımı saygı ve sevgiyle sunuyorum.

Tez çalışmamın laboratuvar aşamalarında engin deneyim ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Doç Dr. Cengiz İKTEN'e teşekkür ederim. Tez çalışmamda fikirlerini ve desteklerini esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Hasan Pınar'a, sağladığı altyapı desteği için Proto Tohum LTD. ŞTİ'ye, değerli tecrübelerini ve yardımlarını esirgemeyen Proto Tohum doku kültürü laboratuvar sorumlusu Nur Selin ÇABUK ve asistan Gamze Acar'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez projesinin tasarlanması ve gerek doku kültürü kısmının finansmanı ve gerekse de laboratuvar çalışmaları için gece gündüz şirketin kapısını bana açık bırakan Proto Tohum sorumlusu Sn. Aytekin KAYNAK'a sevgi ve saygıyla şükranlarımı sunuyorum. Bütün bu süreçte maddi ve manevi olarak desteklerini veren hocam Prof. Dr. Nedim MUTLU'ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın sera çalışmaları aşamasında yardımlarını esirgemeyen Proto Tohum ıslah asistanları Asiya YILDIRIM ve Ümmühan BARCIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimimin başlangıcından itibaren bana yol gösteren ve yardımını esirgemeyen değerli Şeval ŞENÇOPUR, Bahar SANCAR, Buşra YİRMİBEŞ ve Rabiathou ZONGO'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmalarım boyunca yanımda olduklarını her zaman hissettiren, ıslah hakkında samimiyetle pratik bilgi, destek ve tecrübelerini benimle paylaşan Proto ıslah sorumlu ve arkadaşlarım Huriye ÖZDEMİR YELLİGEDİK ve Ece AKKÜL'e teşekkürlerimi sunarım.

Destek ve yardımlarından dolayı Antalya Tarım Üretim Danışmanlık ve Pazarlama A.Ş. Islah Birimi sorumlusu Sinan Zengin ve laboratuvar sorumlusu Gülsün Elif Vural'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana burs sağlayan Yurt Dışı Türkler ve Akraba Toplulukları Başkanlığı'na saygıyla teşekkür ederim.

Okul hayatım boyunca bana her türlü destek sağlayan kıymetli babam Rasmané ZONON ve annem Lizeta SALOUKA'ya minnettarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	7
2.1. Hıyarda Yapılan Önceki Double Haploid Çalışmaları	7
2.1.a. Doubled Haploid Çalışmalarının Genel Tarihi.....	7
2.1.b. Hıyarda Yapılan Çalışmalar.....	8
2.1.c. Hastalık Dayanımları Hakkındaki Çalışmalar.....	12
3. MATERYAL VE METOT.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.2. Metot.....	16
3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi.....	16
3.2.2. Double haploid (ovül kültürü) çalışmaları.....	18
3.2.2.1. Ovaryumların yüzey sterilizasyonu.....	20
3.2.2.2. Ovaryumların ortama aktarılması.....	20
3.2.2.3. Ovaryum kültüründe kullanılan protokoller.....	21
3.2.2.4. İklim odasının ortam şartları.....	23
3.2.2.5. Elde edilen bitkiciklerin aklimasyon işlemleri.....	23
3.2.2.6. Elde edilen bitkilerin ploidi seviyelerinin belirlenmesi.....	24
3.2.2.7. Haploid bitkilerine colchicine (kolhisin) uygulaması.....	24
3.2.3. Genotiplerin ZYMV, CMV ve PRSVV hastalıklarına dayanıklılık durumlarının moleküler yöntemlerle analizi.....	25

3.2.3.1. Genomik DNA izolasyonu.....	25
3.2.3.2. DNA amplifikasyonu.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1. Ovül Kültüründe Elde Edilen Bulgular	31
4.1.1. Kullanılan protokollerin ovül kültüründeki etkileri.....	31
4.1.1.1. P1 protokolü ile elde edilen bulgular.....	31
4.1.1.2. P2 protokolü ile elde edilen bulgular.....	31
4.1.1.3. P2K3 protokolü ile elde edilen bulgular.....	32
4.1.1.4. Protokollerin karşılaştırılması.....	32
4.2. Farklı Hıyar Genotiplerinin ZYMV, CMV ve PRSVV Dayanım	
Durumlarının Belirlenmesi.....	39
4.2.1. Kabak sarı mozaik virüsü hastalığına (ZYMV) dayanıklılığın CAPS	
markırı ile testlenmesi.....	40
4.2.2. Hıyar mozaik virüsü (CMV) hastalığına dayanıklılığın SSR markırları	
ile testlenmesi.....	40
4.1.3. Papaya halkalı leke virüsü (PRSV) hastalığına dayanıklılığın SSR	
markırı ile testlenmesi.....	42
5. SONUÇLAR.....	44
6. KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum ‘‘Hıyar (*Cucumis sativus L.*) Genotiplerinin Önemli Hastalıklara Dayanıklılık Durumlarının Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi ve Double Haploid Tekniğinin Optimizasyonu’’ adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

02/07/2021

Mamoudou ZONON

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
%	: Yüzde
bp	: base paire/baz çifti
cm	: Santimetre
mm	: milimetre
mg	: Miligram
g	: Gram
dk	: Dakika
sn	: Saniye
°C	: Santigrat derece

Kısaltmalar

DNA	: Deoxyribonucleic Acid/Deoksiribonükleik asit
PCR	: Polymerase Chain Reaction/Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism/Kısıtlanmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
SSR	: Simple Sequence Repeat/Basit Dizi Tekrarları
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA/Rasgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism/Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Farklılığı
CAPS	: Cleaved Amplified Polymorphic Sequences/Bölünmüş Çoğaltılmış Polimorfik Dizileri
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism/Tek Nükleotid Polimorfizmi
CTAB	: Cetyl Trimethyl Amonyum Bromide/Setil Trimetil Amonyum Bromid
EDTA	: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid/Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

Tris-HCl	: Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride/Tri (hidroksimetil) aminometan klorid
NaOH	: Sodium Hydroxide/Sodyum hidroksit
dNTP	: Deoxyribonucleotide Triphosphate/Deoksiribonükleotidtrifosfat
MgCl ₂	: Magnesium Chloride/Magnezyum klorür
RPM	: Rotation Per Minute/Dakikadaki Devir Sayısı
ZYMV	: Zucchini Yellow Mosaic Virus/Kabak Sarı Mozaik Virüsü
PRSV	: Papaya Ring Spot Virus/Papaya Halkalı Leke Virüsü
CMV	: Cucumber Mosaic Virus/Hıyar Mozaik Virüsü
TDZ	: Thidiazuron/Tidiajüron
IBA	: Indole-3-butyric acid/İndol-3-bütirik Asit
BAP	: Benzylaminopurine/Benzilaminopürin
MS	: Murashige and Skoog/Murashige ve Skoog
TBE	: Tris-Borate-EDTA/Tri-Borat-EDTA
P.S	: Petri Sayısı
T.P.S	: Toplam Petri Sayısı
T.Ek. S	: Toplam Eksplant Sayısı
O.E.S	: Oluşan Embriyo Sayısı
E.O.O	: Embriyo Oluşum Oranı
O.K.S	: Oluşan Kallus Sayısı
K.O.O	: Kallus oluşum Oranı
R.S	: Rejenerasyon Sayısı
R.O	: Rejenerasyon Oranı.
O.B.S	: Oluşan Bitki Sayısı
B.O.O	: Bitki Oluşum Oranı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Çalışmaya kullanılan 28 genotipin meyve resimleri.....	15
Şekil 3.2. Tohum ekimi ve çimlendirilmesi.....	17
Şekil 3.3. Fidelerin dikimi.....	17
Şekil 3.4. Bitkilerin ipe alınması ve tek gövdeli yetiştirme.....	18
Şekil 3.5. Kullanılan genotiplere ait ovül resimleri.....	18
Şekil 3.6. Ovaryumların yüzey sterilizasyonu.....	20
Şekil 3.7. Eksplant ekimi ve indüksiyon aşamaları; a) Eksplant kesimi ve ortama ekilmesi; b) Yeni ekilmiş eksplantlar; c) Embriyo oluşumu; d) kallus oluşumu; e) Rejenerasyon.....	21
Şekil 3.8. İklim odasının şartları.....	23
Şekil 3.9. Aklımasyon aşamaları; a) Aklımasyona alınacak bitki ve torf; b) Bitkinin köklerini fungusite daldırılması; c) Kökleri saf suya daldırılması; d) Bitkiyi torf ortamına dikilmesi; e) Bitkiyi behere alınması ve streç ile kapatılması; f) Bitkiyi iklim odasına alınması.....	23
Şekil 3.10. Flow sitometrik analizi.....	24
Şekil 3.11. Haploid bitkilere kolhisin uygulaması.....	24
Şekil 3.12. DNA izolasyon aşamaları; a) Yaprak örnekleri; b) Yaprakların ezilmesi; c) ;d) Su banyosunda inkübasyon; e) İnkübasyon sonrası santrifüjleme; f) Santrifüjden sonra elde edilen iki faz; g) Süpernatanti yeni tüpe, isopropanol eklenmesi ve gece -20°C’de bekletilmiş örnek; h) Pelletin çöktürülmesi için santrifüjleme; i) çöktürülmüş pelletin %70’lik etanol ile yıkanması; j) Elde edilen DNA pelleti.....	26
Şekil 4.1. P1, P2 ve P2K3 protokollerin karşılaştırılma.....	33
Şekil 4.2. Ortalama sonuçları.....	33

Şekil 4.3. 12 nolu genotipten P2K3 protokolü ile elde edilen diploid bitki;	
a) P2K3 prokolü ile 12 nolu genotipten elde edilen bitkinin laboratuvar	
koşullarında akimilizasyonu; b) P2K3 protokolü ile 12 nolu genotipten elde	
edilmiş ve seraya aktarılmış bitki.....	37
Şekil 4.4. 7 nolu genotipten P2K3 protokolü ile elde edilen diploid bitki	37
Şekil 4.5. 11 nolu genotipten gelen bitkiler; a) 11F1 (3A); b) 11F1 (3B); c) 11F1 (3C);	
d) 11F1 (3D).....	38
Şekil 4.6. 14 nolu genotipten gelen diploid bitkiler; a) 14F1 (G); b) 14F1 (F);	
c) 14F1 (H).....	38
Şekil 4.7. Genomik DNA izolasyonu; M: markır (1kb).....	39
Şekil 4.8. CAPS-T86C markır PCR ve kesim ürünleri; a) Kesimden önceki	
PCR ürünleri; b) Kesimden sonraki PCR ürünleri; D: Dayanıklı; H: Hassas;	
HH: Heterozigot Hassas.....	40
Şekil 4.9. SSR9-56 PCR ürün görüntüsü (CMV); M: markır; H: Hassas;	
D: Dayanıklı.....	41
Şekil 4.10. SSR11-1 PCR ürün görüntüsü (CMV); H: Hassas; D: Dayanıklı.....	41
Şekil 4.11. SSR11-177 PCR ürün görüntüsü (PRSV); H: Hassas; D: Dayanıklı;	
?: ürün elde edilememiş.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan genotiplerin isimleri ve özellikleri	14
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan protokoller.....	22
Çizelge 3.3. Rejenerasyon protokolleri.....	22
Çizelge 3.4. Köklendirme protokolü.....	22
Çizelge 3.5. CTAB çözeltisi bileşenleri.....	25
Çizelge 3.6. PCR reaksiyonu için hazırlanan karışımın içeriği (her iki primer için).....	27
Çizelge 3.7. Kesim için hazırlanan karışımın içeriği (her iki enzim için).....	27
Çizelge 3.8. ZYMV dayanıklılık analizinde kullanılan primer, restriksiyon enzimi ve PCR koşulları (Amano vd. 2013).....	28
Çizelge 3.9. PCR Karışımı.....	28
Çizelge 3.10. PCR koşulları	29
Çizelge 3.11. Ele alınan hastalıklar ve kullanılan SSR primerleri (Zhang vd. 2014; Tian vd. 2015, 2016; Song vd. 2016).....	29
Çizelge 3.12. Licor jel matriksinde kullanılan kimyasallar.....	30
Çizelge 3.13. Poliakrilamid jel hazırlamasında kullanılan kimyasallar.....	30
Çizelge 4.1. P1 protokolü uygulanarak 28 genotiple yapılan ovül kültürü çalışması ile elde edilen sonuçlar.....	34
Çizelge 4.2. P2 protokolü uygulanarak 28 genotiple yapılan ovül kültürü çalışması ile elde edilen sonuçlar.....	35
Çizelge 4.3. P2K3 protokolü uygulanarak 28 genotiple yapılan ovül kültürü çalışması ile elde edilen sonuçlar.....	36
Çizelge 4.4. Genotiplerin moleküler testleme sonuçlarına göre PRSV, CMV ve ZYMV'ye dayanım durumları.....	42

1. GİRİŞ

Hıyar bitkisi (*Cucumis sativus* L.) $2n=2X=14$ kromozoma sahip olup Cucurbitaceae (kabakgil) familyasına ait diploid bir sebze türüdür (Wang vd. 2020). Kabakgiller 118 cins ve 825 türden oluşmaktadır (Wang vd. 2007). Kabakgiller (Cucurbitaceae) familyasına ait olan hıyar bitkisinin (*Cucumis sativus* L.) anavatanı Hindistan'da olup 3000 yıl önce kültüre alındığı tahmin edilmektedir (Aydemir, 2009). Kültüre alındıktan (De Candolle 1967) sonra Afrika ve Asya kıtalarının subtropik ve tropik bölgelerinden dünyaya yayılmıştır (Leppik 1966; Bates ve Robinson 1995). Türkiye'nin hıyar genetik kaynakları ve varyasyonu bakımından zengindir (Çağlar vd. 2020).

Hıyar bitkisi ılıman iklim koşullarında yetiştirilmektedir. Soğuk iklimlerde sadece örtü altında yetiştirilebilir. Sıcak geçen yaz aylarında açık arazide yetiştiriciliği yapılan bitkinin optimum gelişme sıcaklığı gündüz 30°C gece ise 18-21°C'dir. Bitki gelişimi için minimum sıcaklık 15°C'dir. Tınlı-kumlu, kumlu-tınlı, verimli, drenajı iyi ve pH'sı 6.0-7.0 olan toprakları sevmektedir. Optimum koşullarda hıyar tohumun çimlenme süresi üç gün sürmektedir. Ekimden 40-45 gün sonra çiçeklenmeye başlamaktadır. Hıyarda erkek çiçekler dişi çiçeklerinden daha erken açar ve çiçeklenmeden 1-2 hafta sonra meyve toplanmaya başlanabilmektedir (Grubben ve Denton 2004; Wang vd. 2007).

Hıyar, insan beslemesinde çok önemli bir yeri vardır. Dünyanın en çok tüketilen sebzelerden biri olarak (taze, turşuluk, sanayi ve hastalık tedavisi) değerlendirilmektedir (Aydemir 2009; Sorntip vd. 2017). Olgunlaşmış taze hıyar meyveleri sprue hastalığını iyileştirebileceğini söylenmektedir. Hint-Çin ülkelerinde dizanteri hastalığının tedavisinde pişirilmiş genç meyveleri kullanılmaktadır (Grubben ve Denton 2004). Hıyar meyveleri besin maddeleri yönünden zengin olup mineral (lif, kalsiyum, demir, potasyum), antioksidan (β -karoten ve α -karoten) ve vitamin (A, K ve C) içermektedir (Khan vd. 2015). Haploit genom boyutu kısa (367 Mbp/C) olduğundan genetik çalışmalarında model organizma olarak kullanılmaktadır (Nam vd. 2005).

Hıyar bitkisi Dünya çapında büyük bir ekonomik önemine sahiptir. 2019 yılında toplam dünya hıyar üretimi 2,23 milyon ha (hektar) alanda 87,8 milyon tona ulaşmıştır. Türkiye 1,8 milyon ton ile Çin ve İran'dan sonra 3'cü sıraya girmiştir (FAOSTAT 2020). Türkiye'nin hıyar üretimi giderek artmakta ve 2019 yılında 1,9 milyon tona ulaşmıştır (Tarımsal istatistik, 2020). Türkiye 2019 yılında hıyar ihracatından elde edilen 36,8 milyon dolar gelir ile dünyanın 8'ci hıyar ihracatçısı olmuştur (Anonim2, 2020).

Gerek insan beslemesi gerekse ekonomik anlamda önemli olan hıyara talep giderek artmaktadır. Türkiye başta olmak üzere dünya hıyar talebini hızlıca karşılayabilmek için kısa sürede daha verimli ve hastalıklara dayanıklı yeni çeşitler geliştirmek şarttır. Hıyarın da dünya çapında çok büyük ekonomik değerine sahip olmasından dolayı gerek kamu kurumları gerekse de özel tohum şirketleri hibrit tohum üretimi için yoğun ıslah çalışmalarına başlamıştır. Standart tohuma göre hibrit tohumları

başta ıslahçı, üretici ve tohum firmalarına büyük avantaj sağlamaktadır. Hibrit tohum üretimiyle ıslahçı heterosis (melez azmanlığı)'ten yararlanabilirken istediği özellikleri (hastalık dayanımı, verim, erkencilik, raf ömrü vb.) de bir araya toplayabilmektedir. Hibrit tohumların adaptasyon gücünün yüksek olması hem ıslahçı hem çiftçi için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Son olarak ıslahçı hakları korunmaktadır. Hibrit tohumlar üreticiye büyük bir yarar sağlamakta: yüksek verim ve kalite, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, erkencilik, çevreye yüksek adaptasyon. Tohum firmaları hibridin ebeveynlerini saklayabilme hakkına sahiptir. Hibrit tohumlar pahalı olduğu için de kazanç sağlamakta ve çiftçiye daha garanti ürün vermektedir (Yanmaz 2006). Wehner (1999)'e göre 1999 yılında hibrit veriminden (heterosis) dolayı Amerika'da tarım arazileri büyütmeden %18 daha fazla insan besleyebilmiştir (Wehner, 1999).

Hibrit tohum üretiminde saf hatlar gerekmektedir. Saf hatlar genellikle kendileme yoluyla elde edilir ve %100 homozigotluğa ulaşamaz. Bu yöntemle saf hatlar elde etmek zahmetli, zaman alıcı ve pahalıdır (Khan vd. 2017). Örneğin geleneksel yöntemiyle hıyar saf hatları elde etmek 6-8 sene gibi uzun süre gerekmektedir (Gémes Juhász vd. 2002). Öte yandan odunsu bitkiler kendine uyumsuzluk (self-incompatibility) problemi yaşanmaktadır (Germana` 2006). Yerli hibrit çeşitlerin ıslahında hızlı tekniklerin kullanılması elzemdir (Çağlar vd. 2020). Dolayısıyla günümüzde biyoteknolojik yaklaşımlarına giren ve ıslah süresini kısaltan doubled haploid tekniği önemsenmiştir.

Doubled haploid bitkiler, haploid bir bitkinin kromozom setini katlanarak elde edilmektedir (Kasha ve Maluszynski 2003). Haploid bitki ise, gametik kromozom (n) sayısına sahip olan bitkilerdir. Dolayısıyla diploid bitki türlerde haploidlerin bir set kromozoma (n) sahip oldukları için monoploid de denilebilmektedir. Doubled-Haploid tekniği ile 2 yıl (eksplant eldesi: 6 ay; in vitro kültürü: 6 ay; doubled haploid tohum üretimi: 9-12 ay) içerisinde F1 tohum üretiminde kullanabilecek doubled haploid (100% homozigot) hatlar elde edilebilmektedir (Wremmerth Weich ve Levall 2003). Hıyar gibi spontane (kendiliğinden) doubled haploid oluşum oranı yüksek olan türlerde bu süre 1 yıla indirilebilmektedir. Dünyada birçok türdeki kültür çeşitleri doubled haploid yöntemiyle elde edilmiştir. Oniki türden gelen 200'den fazla çeşit doubled haploid yöntemiyle geliştirilmiştir. Bu türlerden kolza (*Brassica napus L.*), arpa (*Hordeum vulgare L.*), biber (*Capsicum annuum L.*), çeltik (*Oryza sativa L.*), tütün (*Nicotiana tabacum L.*), ve buğday (*Triticum aestivum L.*) sayılabilmektedir (Thomas vd. 2003). Günümüzde Avrupada kullanılan kültür arpa (*H. Vulgare*) çeşitlerinin %50'sinin doubled haploid tekniği ile elde edildiği ileri sürülmüştür.

Doubled haploid hatların birçok avantajı vardır. Tam homozigot olduklarından dolayı fenotipik olarak kantitatif ve kalitatif özellikler için seleksiyon yapmak kolaydır. Bunun yanında hıyardaki bazı fungal (downy mildew, powdery mildew, fusarium wilts) ve viral (CMV, WMV, ZYMV) hastalık dayanım seleksiyonları daha çok haploid seviyesinde başarılıdır (Dong vd. 2016). Bu çalışmalar literatürde mevcuttur (Lotfi vd.

2003; Kuzuya vd. 2003; Sari vd. 2010b; S'miech vd. 2008; Plapung vd.2014a, 2014b) .Haploid bitkiler haritalama, gen fonksiyon keşfi ve markır haritaları gibi genetik çalışmalarda önem kazanmıştır. Bunun yanında mutasyon ve transformasyon (transgenik) çalışmalarında da kullanılmaktadır.

Haploid bitkiler tarih boyunca çeşitli yöntemlerle elde edilmeye çalışılmıştır. Bu yöntemler iki ana gruba ayırmaktadır: İn vivo ve in vitro metotlar. İn vivo yöntemlerden spontane haploid oluşumu (doğal olarak haploid bitki oluşumu), hibridizasyon (intraspesifik- farklı ploidi seviyesine sahip olan tür içi melezlemesi ve interspesifik-türler arası melezleme), kromozom eliminasyonu (türler arası melezlemesinden sonra bir tane ebeveynin kromozomu eliminasyonuyla gerçekleşir) ve partenogenesis (ışınlanmış polen veya kimyasal uygulanmış polenlerle gynogenesis uyartımı yaparak haploid bitki elde edilmesi) karşımıza çıkmaktadır. İn vitro yöntemleri ise iki metoda dayanmaktadır: Yapay besin ortamlarda erkek gamet (anter, polen veya mikrospor) veya dişi gamet (kesilmiş yumurtalık veya ovül) kültürü (Mishra ve Goswami 2014; Shariatpanahi ve Ahmadi 2016). Haploid bitki kavramı 1920'li yıllara dayanmaktadır. 1921 yılında boru çiçeğinin (*Datura stramonium*) mutasyonu sonucunda haploid (n kromozom seti taşıyan bitki) üretimlerinin Dorothy Bergner tarafından gözlemlenmesiyle başlamıştır (Blakeslee vd. 1922). İzleyen yıllarda *Nicotiana tabacum* (Clausen ve Mann 1924), *Triticum compactum* (Gaines ve Aase 1926) gibi bitkilerde de haploidi keşifleri olmuştur. Birçok bitki türlerinde in situ uyartım yöntemlerini kullanarak haploid bitki çalışmaları başlamıştır (Emiroğlu 1979; Hosemans ve Bassoutrot 1983; Lespinasse vd. 1983; Pierik 1989; Yang ve Zhou 1990). Hıyardaki Double haploid çalışmaları hala gündemde olup farklı genotipler için farklı protokoller uygulanmaktadır. (Abdollahi ve ark. 2015; Dong ve ark., 2016; Sorntip ve ark., 2017; Tuğçe ve ark., 2017; Ebrahimzadeh ve ark., 2018; Amirian ve ark., 2019; Deng ve ark., 2020). Yapılan bu çalışmalara göre ışınlanmış polen ile uyartım ve embriyo kurtarma tekniğinin çok zahmetli, emek isteyen ve zaman alıcı bir yöntem olduğunu ortaya çıkmıştır (Çağlar ve ark. 2020). Androgenesis (Anter kültürü) ise çoğu zaman başarısız veya başarı oranı çok düşük olup (Bhat ve Murthy 2007) en etkin metot gynogenesis (ovül/yumurtalık kültürü) olduğunu tespit edilmiştir (Wang ve ark. 2015; Tantasawat ve ark. 2015; Deng ve ark. 2020).

Hıyarda çeşitli double haploid çalışmaları yapılsa bile mevcut protokollerle elde edilen materyaller ıslah programlarında uygulanacak yeterlikte değildir (Gałazka ve Niemirowicz-Szczytt, 2013). Bunun sebebinin double haploid bitki elde etme aşamalarından olan rejenerasyon aşamasının genotipe bağlı olması ve hala iyileştirmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. Yapılan son çalışmalarda genotip X ısı ön uygulaması X TDZ (Thidiazuron) interaksyonu rejenerasyon etkinliğini artırdığı belirtilmiştir (Deng ve ark.2020). Polyamin (spermidine, putrescine, spermine) ve cycocel gibi katkı maddelerin kullanımı pozitif etki yapabileceğini söylenmiştir (sıcaklık uygulaması stresinden gelebilecek zararlanmalarını önler) (Tiburcio ve ark. 2014). Bu çalışmada Deng vd. (2020)

yaptığı çalışmanın sonucunda elde ettikleri %79,3 rejenerasyon başarısında kullanılan protokolünü modifiye edip farklı genotiplerde optimize ederek haploid ve/veya double haploid bitki elde edilmeye çalışılmıştır.

Kabakgillerin üretimini sınırlandıran birçok hastalık ve zararlı mevcuttur. Zitter ve arkadaşlarına (1996) göre 200'den fazla hastalık kabakgillerin üretimini sınırlandırılmaktadır. Bu hastalıkların farklı nedeni vardır: fungus, bakteri, virüs ve mükoplazma benzeri organizmalar. Bu hastalıkların kaynağı ise toprak, tohum, rüzgâr ve böcekler (vektör) olabilmektedir (Anjorin ve Mohammed 2009). Bu patojenler bitkilerde nekroz, fide ve bitkide gelişme bozuklukları gibi hasarlara neden olmakta ve bitkinin verim ve kalitesine büyük bir zarar vermektedir. Genel olarak bu hastalıkların mücadelesinde kültürel, biyolojik ve kimyasal metotlar kullanılabilir. Fungal hastalıklar için fungisit, bakteriyel hastalıklar için bakterisit ve virüs vektörleri (böcekler) için insektisit kullanılabilir (Khanzada vd. 2001). Kabakgillerde ZYMV (Zucchini Yellow Mosaic Virus: kabak sarı mozaik virüsü), WMV (Watermelon Mosaic Virus: karpuz mozaik virüsü), CMV (Cucumber Mosaic Virus: Hıyar mozaik virüsü), PRSV (Papaya Ring Spot Virus: Papaya Leke virüsü) ve PM (Powdery Mildew: mildiyö) en yaygın görülen hastalıklardır. (Amano vd. 2013; Tian vd. 2015; Tian vd. 2016; Shi vd. 2018; Liu vd. 2017).

Kabak sarı mozaik virüsü (ZYMV: Zucchini Yellow Mosaic Virus), kabakgillere büyük bir zarar veren patojenlerden biridir. Önemli konukçuları kabak, kavun, hıyar ve karpuzdur. Kabak bitkisinin virüsten daha çok etkilendiği bilinmektedir. Potivirüs familyasına ait olan virüs, afitlerle bitkilere bulaşmakta, tohumla taşınmamaktadır. Hastalığın ilk belirtileri: bitkilerde damar açılması ve sararmadır. İleri zamanlarda bütün bitkide mozaik, damarlarda bantlaşma, yapraklarda deformasyon ve bodurluk görülmektedir. Bulaşık bitkilerin meyvelerinde sarımsı yeşil renk değişimi, meyve etinde sertleşme ve çatlama görülmektedir. Bu yüzden %40 civarında verim kaybı olmaktadır. Bu virüs Türkiye'de daha çok Ege, Akdeniz ve Orta Anadolu'da yaygın görülmektedir. Mücadelesi için afitlerle mücadele etmek gerekmektedir. Dolayısıyla tarla içi ve etrafı yabancı otlardan uzaklaştırılmalıdır. Hastalıklı bitkiler sökülüp uzaklaştırılmalıdır (Aydemir 2008). Virüs hastalıkları ile mücadelede kimyasal, biyolojik ve diğer bitki koruma metotları çok etkili olmadığı için virüse dayanıklı çeşitler geliştirmek zorunlu hale gelmektedir. Bu bağlamda ZYMV'ye dayanıklılık geni (resesif ve tek bir alel: zym) karakterize edilmiştir (Providenti 1987; Abul-Hayja ve Al-Shahwan 1991; Kabelka vd. 1997; park vd. 2004; Amano vd. 2013). Dayanıklılık genlerini hassas elit çeşitlerine aktarmak zaman alıcı, zor ve pahalıdır. Bu aşamada markır yardımcı seleksiyon ıslah çalışmalarında kolaylık sağlamaktadır. Bu konuda en son Amano ve arkadaşları (2013) zym lokusuna bağlı CAPS markırI (CAPS-T86C) geliştirmiştir.

Hıyar mozaik virüsü (CMV: Cucumber Mosaic Virus), bir cucumovirustur. 3 tane ırkı vardır: IA, IB ve II (Roossinck 2001). Virüs en az 75 yaprak biti vektörüyle non-persistent olarak taşınmaktadır. En yaygın olan vektörleri *Myzus persicae* ve *Aphis*

gossypii'dir. Başta ıspanak, mercimek, nohut, fasulye, bakla ve börülce olmak üzere 19 bitki türünde tohumla taşınabilmektedir. Bitkilerin kök, gövde, yaprak ve meyveleri bulaşmaktadır. Tek çenekli ve çift çenekli bitkileri (tahıl, sebze, ornamental, odunsu bitkiler vb.) dahil olmak üzere 100 familya kapsayan 1200'den fazla bitki türü bulaşmaktadır. Hastalık özellikle dünyanın ılıman ve tropikal bölgelerde rastlanmaktadır. Hastalık belirtileri türlere göre değişmektedir. Cucurbitaceae, Solanaceae, Leguminosae, Brassicaceae ve Gramineae famiyalarda mozaik belirtileri görülür. Genel olarak kloroz, nekroz, bodurluk ve yaprak şekil bozukluğu önemli belirtileridir (Aydemir 2008; Palukaitis vd. 1992). Zarar verdiği önemli bitki türleri hıyar, kavun, karpuz, kabak, domates, biber, börülce, muz ve mısırdır. Hastalığın kontrolü daha çok kültürel önlemlerle (yaprak bitleriyle mücadele, hastalıklı bitkilerin sökülmesi, yabancı ot uzaklaştırması, hastalı bitkilerden tohum almama) yapılmaktadır. En etkin olan yöntem sertifikalı ve dayanıklı çeşitler kullanmaktır (TC. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı 2011).

Papaya halkalı leke virüsü (PRSV), iki ana ırka ayrılmaktadır: papaya ve kabakgil bitkilerine zarar veren (PRSV-P) ve sadece kabakgilleri zarar veren (PRSV-W). Virüs dünyada papaya ve kabakgil üretimi yapan bölgelerde bulunmaktadır. PRSV virüsü potyvirus cinsine aittir. PRSV bir RNA virüsü olup yaprak bitleriyle taşınmaktadır. Sistemik olarak papaya ve kabakgilleri bulaşmaktadır. Belirti olarak papaya ve kabakgillerde benzerlik olup kloroz, taç yapraklarında beneklenme, buruşma ve şekil bozukluğu görülmektedir (Gonsaives vd. 2010). Yaprak bozulması ve kabarması da gözlemlenmektedir (Mansilla vd. 2013). Meyvelerde halkalı benekler, renksizleşme, deformasyon görülmekte ve meyve boyunu küçültmektedir (Cook 1972; Lecoq ve Desbiez 2012). Kültürel önlemlerin yanında PRSV kontrolü için Havai'de transgenik bitkiler etkili bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir. PRSV hastalığının ekonomik zararını önlemek için dayanıklı çeşitler yeni bir alternatif olarak görünmektedir. Klasik yöntemlerle PRSV-dayanıklı hat geliştirmek zor olduğunu aktarılmıştır (Gonvalves vd. 2006; Manshardt ve Wenslaff 1989).

Bu hastalıklara dayanıklı çeşitler geliştirmek daha etkili (virüs hastalıklara etkili pestisitler bile yoktur) ve çevre dostu olduğu için gen kaynakları araştırıp moleküler markır geliştirme çalışmalarına yoğunlaştırılmıştır (Liu vd. 2017; Amano vd. 2013; Shi vd. 2018; Tian vd. 2015, 2016). Bu çalışmada ele aldığımız CMV, PRSV ve ZYMV hastalıklarına dayanıklılık genlerini (cmv6.1, prsv⁰²²⁴⁵, zymv^{A192-18}) taşıyan aksesyonlar bulunmuştur (Shi vd. 2018; Tian vd. 2015, 2016; Amano vd. 2013; Liu vd. 2017).

Bitki ıslahında genetik markırlar büyük bir öneme sahiptir. Moleküler markır genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasıdır. Genetik markırlar genellikle 2 ana gruba ayrılmaktadır: klasik markırlar (morfolojik, sitolojik ve biyokimyasal markırlar) ve moleküler/DNA markırlar (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism-Sınırlı Parça Uzunluk Polimorfizmi, AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism/Çoğaltılmış Parça Uzunluk polimorfizmi, SSR: Simple Sequence Repeats/Basit Tekrarlı Diziler veya mikrosatelitler, SNP: Single Nucleotide

polymorphism/Tek nükleotit Polimorfizmi vb.) (Kebriyae vd. 2012; Collard vd. 2005; Jiang vd. 2013). Moleküler markırların keşfiyle markır yardımcı seleksiyon metodu ıslah çalışmalarına dâhil olmuştur ve bazı yararlı genlerin (hastalık dayanım, verim vs.) kültür çeşitlerine aktarılması aşamasında yapılacak seleksiyon sürecine katkı sağlamaktadır. Hiyarda hastalıklara dayanıklılık ve diğer önemli özellikleri kontrol eden genlere bağlı (ilişkili) markırlar geliştirilmiştir. Hastalık dayanımını kontrol eden genlere bağlı markırlar (pm-s geni/pmSSR27, dm5.2 geni/CsDM4-055, cmv6.1 geni/SSR9-56, prsv geni/SSR11-177, wmv geni/SSRWV60-23, zymv geni/CAPS-T86C) ve erkencilik genine bağlı markır (erken çiçeklenme geni qef1.1/) geliştirilmiştir (Liu vd. 2017; wang vd. 2019; Amano vd. 2013; Tian vd. 2015, 2016; Shi vd. 2018; Fukino vd. 2013). Bu çalışmada, kullandığımız çeşitlerin CMV PRSV ve ZYMV hastalıklarına dayanıklılık durumunu test etmek için geliştirilmiş olan CAPS-T86C (ZYMV), SSR11-177 ve SSR11-1 (PRSV), SSR9-56 (CMV) markırlarından yararlanılmıştır.

SSR (Simple Sequence Repeat: Basit tekrarlı sekanları) markırları genomda tekrarlı bölgeleri hedef alınarak geliştirilmiş, ko-dominant özelliktedir. Haritalama, genetik çeşitlilik, gibi alanlarda yaygın olarak kullanılan, otomasyona uygun markırlardır.

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) markır sistemi 3 temel aşamaya dayalıdır: spesifik primerlerle PCR kurulumu, PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi ve kesim ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi. Dolayısıyla CAPS markır sistemi PCR ve klasik RFLP metotların birleştirilmesidir. CAPS markır ko-dominant olup homozigot ve heterozigot bireyleri ayırebilmektedir. CAPS markırların başka avantajı basit (DNA dizilimi gerektirmemektedir) ve ucuz ekipman kullanımıdır (Kilian ve ark. 2005; Akbari ve ark. 2006).

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Hıyarda Yapılan Önceki Double Haploid Çalışmaları

2.1.a. Doubled Haploid Çalışmalarının Genel Tarihi

Tarihsel olarak, haploid bitki kavramı 1920'li yıllara dayanmaktadır. 1921 yılında boru çiçeğinde (*Datura stramonium*) mutasyon sonucunda haploid bitki üretiminin Dorothy Bergner tarafından gözlemlenmesiyle başladığını Blakeslee ve ark. (1922) tarafından rapor edilmiştir. İzleyen yıllarda tütün (*Nicotiana tabacum*), buğday (*Triticum compactum*) ve başka türlerde de haploidi gözlemleri olmuştur (Clausen vd. 1924; Gain vd. 1926; Kimber ve Riley 1963; Riley 1974). Bu keşiflerden sonra araştırmacılar haploid ve doubled haploidlerin ıslah ve genetik çalışmalarındaki önemini fark ederek tekniğini iyileştirecek yeni metotlar araştırmaya başlamıştır. 1953 yılında ilk olarak Chase haploid tekniğini bir ıslah programına almıştır. Partenogenesis yöntemiyle mısırdaki haploid bitki elde ettikten sonra kromozomlarını katlayarak doubled haploid bitki elde etmiştir. Birçok bitki türlerinde in situ uyartım yöntemlerini kullanarak haploid bitki çalışmaları başlamıştır (Kimber vd. 1963). Doubled haploidlerin laboratuvar ortamındaki in vitro çalışmaları 1964 yılında başlanmıştır. Guha ve Maheshwari (1964, 1966) *Datura stramonium* L. bitkisinin anterinden in vitro olarak embriyo elde etmişlerdir. 1969 yılında da Nitsch ve Nitsch (1969) tütün bitkisinde in vitro anter kültürüyle haploid bitki elde etmişlerdir (Andersen 2005). Bunu takiben Kasha ve ark. (1970) türlerarası melezlemesi ve kromozom eliminasyon (kurtulma) yöntemiyle arpa anterlerinden haploid bitki elde etmişlerdir. Anter kültürüyle 250'den fazla bitki türünde rejenerasyon yakalanmıştır. Bu nedenle araştırmalar uzun bir süre anter kültürüne yönelmiştir (Mishra ve Goswami 2014). Dişi gametle in vitro haploid bitki elde edilmesi ilk olarak San Noeum (1976) tarafından arpada gerçekleştirilmiştir. Başarılı çalışmalar da buğday (*Triticum aestivum*) ve tütünde (*Nicotiana tabacum*) devam etmiştir (Zhu ve Wu 1979). Bundan sonra ekonomik olarak önemli olan bazı bitki türlerinde (*Zea mays*, *Psoralea corylifolia*, *Cucurbita pepo* L., *Guizotia abyssinica*, *Cocos nucifera*, *Morus alba* vb.) ovül kültürüyle (gynogenesis) haploid bitkiler elde edilmiştir (Tang vd. 2006; Chand ve Sahrawat 2007; Shalaby 2007, Bhat ve Murthy 2007).

Doubled haploid çalışmalarının son durumunu özetleyecek olursak, 1970'li yıllardan beri ıslah amaçlı olarak gametic embriyogenesis yöntemiyle haploid bitkiler elde edilmiştir (Magoon ve Khanna 1963; Kahsa 1974; Zhang vd. 1990; Palmer vd. 2005; Wedzony vd. 2009; Germana, 1997, 2006, 2007, 2009, 2011a, 2011b; Xu vd. 2007; Touraev vd. 2009; Srivastava ve Chaturvedi 2008; Maluszynski vd. 2003a, 2003b; Andersen 2005; Dunwell 2010). 250'den fazla (100 cins ve 40 familyaya ait) türde androgenesis yöntemiyle haploid bitki elde edilmesine rağmen odunsu bitkilerdeki başarı sınırlı kalmıştır (Kumar ve Rachna 2014). Haploid bitki elde etmek için hibridizasyon yöntemi rutin olarak buğday ve tahılların ıslah programlarında kullanılmaktadır. Bu

yöntem in vitro embriyo kurtarma gerektirir ve sonra da kolhisin (colchicine) uygulayarak doubled haploid bitkiler elde edilir (Maluszynski vd. 2003a).

2.1.b. Hıyarda Yapılan Çalışmalar

Hıyar bitkisi Cucurbitaceae (kabakgil) familyasına ait olan bir sebze türüdür. Dünya'daki ilk kabakgil Double Haploid çalışmaları 1950'li yıllara dayanmaktadır (Hayase 1954; Swam Inathan ve Singh 1958; Dumas de Valux 1979). 1954 yılında Hayase bal kabağının (*Cucurbita moschata* Duch. ex Poir) polenlerini kullanarak kış kabağı (*Cucurbita maxima* Duch. ex Lam.) ile melezlemesi sonucunda haploid bitki elde etmiştir. 1979 yılında Dumas de Valux aynı metodu kullanarak (*Cucumis ficifolius* A.Rich.'ten polen alındı) kavunda (*C. melo*) haploid bitki elde etmiştir. 1958 yılında Aalders normal hıyar tohumundan haploid embriyo izole ederken aynı yılda Swaminathan ve Singh X-ray ışınlarıyla uygulanmış karpuz tohumlarından elde edilen diploid bitkiden haploid sürgün gözlemlemiştir. Genel olarak Double Haploid bitkiler gamet kültürü ile elde edilmektedir (Dirks vd. 2009). Başka bir ifade ile androgenesis (Anter veya mikrospor kültürü), gynogenesis (ovül kültürü) veya ışınlanmış polen ile tozlaşma ve embriyo kurtarma teknikleriyle elde edilmektedir (Abdollahi vd. 2015; Asadi vd. 2018; Kumar vd. 2003; Song vd. 2007; Diao vd. 2009; Faris vd. 1999). Literatürde hıyar bitkisi dahil olmak üzere birçok türde (buğday, arpa) double haploid bitki elde etmede başarılı çalışmalar mevcuttur (Shariatpanahi ve Ahmadi 2016; Metwally vd. 1998; Gémes Juhász vd. 2002; Diao vd. 2009; Li vd. 2013; Plapung vd. 2014; Wang vd. 2015; Tantasawat vd. 2015).

Double haploid çalışmalarında ışınlanmış polen metodunun kullanımı ilk olarak başarılı bir şekilde *Petunia*'da uygulanmıştır. 1985 yılında Raquin 300-1000Gy dozu (y rays: gama ışınları) uyguladıktan sonra embriyo kurtarması yaparak haploid bitkiler elde etmiştir. Kabakgillerde aynı metod Sauton ve Dumas de Valux (1987) tarafından kavunda denemiştir. Hıyarda ise ilk olarak 1989 yılında Sauton ışınlanmış polen (in vitro embriyo kurtarması da yaparak) metoduyla haploid bitki elde ettiğini Faris vd. rapor etmiştir (Faris vd. 1999). İzleyen yıllarda farklı dozlarla hıyarda denemeler yapılmıştır: Przyborowski ve Niemirowicz-Szczytt (1994) 300Gy, Çağlar ve Abak (1996) 300, 450 ve 600Gy. 300Gy'den az olan dozlar daha başarılı olabiceğini Çağlar ve Abak (1996) öngörmüştür. Faris ve arkadaşları (1999) daha düşük dozlar (100Gy, 200Gy ve 300Gy) uygulayarak 100Gy dozu daha etkili bulmuştur (438 embriyodan 55 tane bitki elde edilmiştir: %7,7 rejenerasyon olmuştur). Çağlar ve arkadaşları (1999) hayırda benzer bir çalışma yapmıştır. İn vivo olarak ışınlanmış polenlerle uyartım yaparak farklı gelişme safhalarda haploid embriyolar elde etmişlerdir. Ardından embriyoları E20A besi ortamında kültüre almıştır. İki yıl ve farklı aylarda kurdukları denemelerin sonucunda meyve başında elde edilen bitki sayısı düşük olsa da 4 genotipten 190 adet haploid bitki etmişlerdir. Yapılan incelemelerde embriyoların bitkiye dönüşüm oranları mayıs, haziran ve eylül aylarında daha yüksek (1. Yıl = %36-50; 2.yıl= %49-82) bulunmuştur (Çağlar ve Abak 1999). Hıyarda bu yöntemle yapılan farklı çalışmalar farklı sonuç vermiştir. Sauton (1989)

ortalama olarak 0.9 embriyo/meyve elde etmiştir. Benzer çalışmalarla Przyborowski ve Niemirowicz-Szczytt (1994) 4 embriyo/meyve elde ederken Çağlar ve Abak (1996) 16 embriyo/meyve elde edildiğini Gałazka ve Niemirowicz-Szczytt (2014) rapor etmiştir. Işın kaynağı olarak Cobalt (^{60}Co) kullanılmaktadır. Fakat başka bir çalışmada Antos ve ark. (2001) 300Gy dozda X-rays ışınları uygulayarak hıyarda haploid bitkiler elde etmiştir. Işınlanmış polen metodundan başka hıyar double haploid çalışmalarında anter kültürü kullanılmaktadır.

Kabakgil familyasında ilk anter kültürü çalışmaları çok başarılı olmamıştır. Sadece kallus ve az sayıda haploid bitkiyle sonuçlanmıştır (Lazarte and Sasser 1982, Dryanovska and Ilieva 1983, Xue et al. 1983, Shail and Robinson 1987). Anter kültüründen elde edilen haploid bitkiler 1980'li yıllara dayanmaktadır. Kumar (1984) ve Shail ve Robinson (1987) araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda *C. maxima*, *C. moschata* bitkilerinin anterlerinden haploid bitki elde etmişlerdir. Kumar (1984) kabakta (*Luffa aegyptiaca*) anter kültürü yapmış ve sonuçta haploid ve diploid embriyolar elde etmiştir. Tang vd. (2012) acı kavunda (*Momordica charantia* L.) anter kültürü yaptıklarında sadece kallus oluşumunu gözlemlemişlerdir. Soğuk ön uygulaması anter kültüründe olumlu olmuştur. Metwally vd. (1998) kabak (*C. Pepo*) anterleri (mikrosporlar tek çekirdekliken) 4 gün boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ uygulamasını yapmışlar. Ardından anterleri 55 mg d/m^3 2,4-D ve 150 g d/m^3 süktroz içeren MS ortamına aktarmışlardır. Sonuçta 1,9 bitki/anter rejenerasyon olmuştur. Mohamed ve Refaei (2004) benzer bir çalışma yapmış ve daha iyi sonuç almışlardır (2,6 bitki/anter). Hıyarda ise Lazarte ve Sasser (1982) anter kültüründe kallus, embriyo ve organogenesis elde etmişlerdir. Fakat haploid bitki elde edilememiştir. Ashok Kumar vd. (2003) besi ortamının içeriği ve soğuk ön uygulama süresine baktıklarında 2 gün daha iyi sonuç vermiştir (embriyogenik kallus oluşumu %54,4 olmuştur). Xie vd. (2005) çalışmalarında benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Ashok Kumar ve Murthy (2004) besi ortamına farklı şekerler (süktroz, maltoz, glukoz ve früktoz), aminoasit (glütamin, glisin, arjinin, asparajin ve sistein) ve poliaminleri (putresin ve spermidine) eklediklerinde iyi sonuçlar almışlardır. Çalışmalarında B5 besi ortamına $0,44\text{mg/L}$ 2,4-D, $0,22\text{mg/L}$ BA, 85g/L süktroz ve 29mg/L spermidin eklediklerinde 1,6 embriyo/anter ve 1,35 bitkicik/anter elde etmişlerdir (Ashok Kumar et al. 2004). 2007 yılında Song ve arkadaşları soğuk ön uygulaması, in vitro kültür zamanındaki fiziksel şartları, indüksiyon ortamının içeriği ve genotipin anter kültüründeki rejenerasyona etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda yüksek embriyogenesis (3 embriyo/anter) ve rejenerasyon (0,9 bitki/anter) yakalanmıştır. Embriyonik kallus indüksiyonunda $\text{MS}+1\text{g/L BA}+0,5\text{g/L 2,4-D}+1\text{g/L kinetin}+30\text{g/L süktroz}$ kullanmışlardır. Anter kültüründe haploid ve double haploid bitkiler mikrospordan elde edildiği gibi somatic hücrelerden de diploid bitki elde edildiğine dair araştırmalar mevcuttur (Ashok Kumar vd. 2003; Ashok Kumar ve Murthy 2004; Song vd. 2007). Anter kültüründe elde edilen diploid bitkilerin double haploid olma durumuna bakmak gerekmektedir. Bunun için SSR markırları kullanılabilmektedir. Fakat sadece mikrospor kültürüyle bu analizden kaçınılabilmektedir (Gałazka ve Niemirowicz-Szczytt

2013). Mikrospor kültürü ile ilgili yapılan çalışmalar kısıtlı olup çok olumlu sonuçlar elde edilememiştir. Yapılan bütün bu çalışmalarından elde edilen sonuçlar yetersiz olduğunu kaydedilmiştir. Ovül kültürü daha etkili görünmektedir.

Partenogenesise (ışınlanmış polen ve embriyo kurtarma) göre gynogenesis (ovül/ovaryum kültürü) metoduyla yapılan çalışmalar azdır. Gynogenesis metoduyla sakız kabağı, hıyar ve kavunda haploid bitkiler elde edilmiştir (Dumas de Vault ve Chambonnet 1986; Gémes Juhász vd. 1997; Metwally vd. 1998; Ficcadenti vd. 1999; Gémes Juhász vd. 2002; Shalaby 2007; Suprunova ve Shmykova 2008; Dia vd. 2009; Deng vd. 2020). Dirks (1996), Metwally vd. (1998), Shalaby (2007) ve Dia (2009) hıyar ve yaz kabağında da double haploid bitkiler elde edebilmişlerdir. 1985 yılında ilk olarak Dumas de Vault ve Chambonnet ovül kültürüyle kabakta (*Cucurbita pepo* L.) haploid bitkiler elde edebilmişlerdir.

Gémes Juhász vd. (2002) hıyar ovül kültürü yapmıştır. Ovüller TDZ içeren indüksiyon ortamına alıp 2-5 gün değişen sürelerle karanlıkta bırakılmıştır. Sıcaklık ön uygulaması ise 24°C, 28°C veya 35°C uygulanmıştır. İndüksiyondan sonra ovüller NAA ve BAP içeren rejenerasyon ortamına alınmıştır. Sonuçlar sıcaklık ön uygulamasının (35°C) olumlu etki yaptığını göstermiştir. En yüksek gynogenesis oranı %18,4 iken rejenerasyon oranı %7,1 olmuştur. Flow sitometrik analizler rejenerasyon olan bitkilerin %87,7 haploid olduğunu göstermiştir.

Diao vd. (2009) hıyar ovül kültürü çalışmaları da yapmışlardır. Çalışmada sıcaklık (35°C) ön uygulama süresi, TDZ konsantrasyonu ve gümüş nitratin etkilerine bakılmıştır. 3 gün sıcaklık ön uygulaması 2 veya 4 güne göre daha yüksek embriyo oluşumu tetiklemiştir. İndüksiyon ortamına 0,04 mg/L TDZ eklenmesi embriyo oluşumunda pozitif bir etki (en yüksek embriyo oluşum oranı %72,7) yapmıştır. Gümüş nitrat ise embriyo oluşum oranına etki yapmasa da embriyo oluşum süresini kısaltmıştır. Genotipler arasında bir fark bulunmamıştır. Elde edilen toplam 40 bitkiden 2 tanesi haploid ($2n = x = 7$), 5 tanesi tetraploid ($2n = 4x = 28$) ve geri kalan (33 bitki) diploid olmuştur. SSR markerleriyle yapılan analizlerden sonra 33 tane diploid bitkiden 17 tanesi (%51,5) double haploid bulunmuştur. Aynı metodla %9 rejenerasyon bulabilmişlerdir.

Metwally vd. (1998) kabakta (cv. Eskandarani) ovül kültürü yöntemiyle %11 rejenerasyon oranı elde edebilmiştir. Çalışmada elde edilen 20 tane bitkiden 15 tanesi diploid (double haploid) ve 5 tanesi haploid olduğunu tespit edilmiştir (ışık mikroskopuyla bakılmıştır). Antesizten 1 gün önce toplanan dişi çiçekleri 0, 2, 4 ve 8 gün süreyle 4 °C'de bırakılmıştır. İndüksiyon ortamı olarak MS+30 g/L sükröz+8 g/L agar ve farklı konsantrasyonlarda 2,4-D (0.1, 1.0, 5 ve 10 mg/L) kullanılmıştır. Ovülleri 25 ± 1 °C 16 saat fotoperiyot 4 hafta boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından ovülleri 4 hafta hormon free MS ortamına alınmıştır. Elde edilen bitkilerin çoğu sıcaklık uygulamasız ovüllerinden gelmiştir.

Deng ve arkadaşları (2000) hıyarda ovül kültürü ile double haploid bitki eldesi için optimizasyon yapmış ve yüksek oranda rejenerasyon elde edebilmişlerdir (%79). Çalışmada indüksiyondan rejenerasyona kadar tek bir ortam kullanılmıştır (indüksiyon ve rejenerasyon ortamı aynı). Çalışmada sıcaklık ön uygulaması, TDZ uygulaması ve genotiplerin arasındaki faktöriyel interaksiyon incelenmiştir. Şimdiye kadar hıyar ovül kültüründe elde edilen en yüksek rejenerasyon oranıdır. Fakat aynı araştırmacılar (Deng vd. 2020) ovül kültüründe (gynogenesis) hala mevcut sorunlar (düşük embriyo ve özellikle bitki rejenerasyonu) olduğunu vurgulamışlardır. Bunun sebebinin double haploid bitki elde etme aşamalarından olan rejenerasyon aşamasının genotipe bağlı olmasıdır (30 tane genotipten gelen embriyodan 18 : %60 rejenerasyon başarılı olmuş) Aklimasyon başarısı %70 olup kolhisin (colchicine) uygulamasıyla haploid bitkilerin katlanma oranı %75 olmuştur.

Gémes ve ark. (1997) *Cucurbita pepo*'da in vitro ovül kültürü çalışmasını yaparak 10-15 embriyo elde etmişlerdir. O embriyolardan elde edilen bitkilerin %70'inin haploid, %30'unun katlanmış double haploid ve aneuploid olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada hıyar ovül kültürünü yapmışlardır. Az sayıda embriyo elde edilmiştir ve rejenerantların hepsi haploid olmuştur. Çalışmada ovülleri 0,05 mg/L NAA+0,2 mg/L BA indüksiyon ortamında 2 hafta tutmak 0,02 mg/L NAA+0,04 mg/L BA indüksiyon ortamında 4 hafta tutmaktan daha etkili bulunmuştur. Gémes ve ark. (2002), yine ovül kültürü ile her bir ovülden %18,4 embriyo ve %7,1 bitki elde etmişlerdir. Diao ve ark. (2009) hıyarda yaptıkları çalışmada %72,7 embriyo oluşumu ve sonuçta 40 bitki (2 haploid, 5 tetraploid ve 33 diploid) elde edebilmişlerdir.

Sorntip ve ark. (2017) hıyarda embriyo kültürü yapmış ve sonuç olarak %59,89 oranından embriyo elde etmişlerdir. O embriyolardan 10 bitki (3 haploid, 1 triploid ve 6 diploid) elde edilmiştir. Araştırmacılar sıcaklık ön uygulaması ve uygulaması süresini de embryognesini pozitif olarak etkilediğini bulmuşlardır.

Diao ve ark. (2009) ovül eksplantlarına 35°C'de 3 gün tuttuktan sonra kültüre almışlar ve sonuçta embriyo oluşumu artmıştır (%45,5-%89,4). Aynı çalışmada 10mg/L gümüş nitratın (AGNO₃) indüksiyon kültürü ortamına eklenmesi embriyo oluşum süresini kısalttığı rapor edilmiştir.

Tantasawat ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışmada (ovül kültürü) %91,4 embriyo benzeri yapı (ELS: Embryo Like Structure) ve %70,8 kallus oluşumunu elde etmişlerdir.

In vitro ovül kültüründe farklı besin ortamı denenmiştir. Metwally vd. (1998) Murashige ve Skoog (MS) ortamına 1-5mg/L 2,4-D ve 30mg/L süktroz ekleyerek kullanmışlardır. Xie vd. (2006) ise N6+2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)+ naphthalene-1-acetic acid and benzyl-adenine (BA) karışımını kullanmıştır. Gémes Juhász vd. (2002) kendi yaptığı CBM ortamına 0,02 mg/L TDZ ve 40g/L şeker ekleyerek indüksiyon elde edilebilmiştir. Besin ortamın dışında sıcaklık (düşük veya yüksek) ön

uygulamalarının indüksiyona etki durumunu araştırılmıştır. Metwally ve arkadaşlarına (1998) göre kabakta düşük sıcaklık ön uygulaması yapmadan daha olumlu etki bulunmuştur. Fakat hıyar ovül kültüründe yüksek sıcaklık ön uygulamaları (28°C veya 35°C)+TDZ şartlarında embriyo ve bitki sayısını artmıştır (Gémes Juhász vd. 2002). Hıyar ovül kültürünün optimizasyon çalışmaları Shalaby (2007), Suprunova ve Shmykova (2008) ve Dia (2009) araştırmacıları yapmıştır. Araştırmada genotip, sıcaklık ön uygulamaları ve besin ortamının içeriğinin etkilerini incelemişlerdir.

2020 yılında Deng ve arkadaşları in vitro ovül kültürü yapmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre şimdiye kadar en yüksek rejenerasyon oranı (%79,3) yakalanmıştır. Çalışmada sırasıyla yaptığı soğuk (4 gün- 4°C) ve sıcaklık (2 gün- 33°C) uygulaması olumlu olduğunu söylemişlerdir. Yapılan son çalışmalarda genotip X ısı ön uygulaması X TDZ (Thidiazuron) interaksyonu rejenerasyon etkinliğini artırdığı belirtilmiştir (Deng ve ark.2020). Polyamin (spermidine, putrescine, spermine) ve cycocel gibi katkı maddelerin kullanımı pozitif etki yapabileceğini söylenmiştir (sıcaklık uygulaması stresinden gelebilecek zararlanmalarını önler) (Tiburcio ve ark. 2014). Yapılan bütün bu çalışmalarından elde edilen sonuçlar farklı genotiplerde mevcut portokollerin yetersiz olabildiğini ve optimizasyon yapılması gerektiğini göstermektedir.

2.1.c. Hastalık Dayanımları Hakkındaki Çalışmalar

Hıyar bitkisinin hayat döngüsü kısa (~ 3 ay) ve küçük bir genoma (~400Mbp) sahip olması genetik çalışmalarını kolaylaştırmıştır (Wang vd. 2020).

Kabakgillerde CMV dayanımını kontrol eden genlerin çoğu resesif olduğudüşünülmektedir (Risser vd. 1977). Fakat Wis. SMR 12 kültür hıyar genotipindeki CMV dayanımı tek dominant bir gen kontrol ettiğini Wasuwat (1961) rapor etmiştir. Kooistra (1969)'ya göre ise 3 bağımsız dominant gen CMV dayanımını kontrol etmektedir. Buna karşı Whang, Huang ve Munshi resesif tek bir gen tarafından kontrol edildiğini bulmuştur (Wang 2006; Marathe vd. 2004). Huang (2007) CMV'ye dayanıklı F-3 hıyar hattındaki dayanıklılık genine bağlı (8.57cM uzaklıkta) dominant AFLP (204 bp uzunluğunda) markırı geliştirip SCAR cmv-200 markırına çevirmiştir. Wang (2010) F-3 hatında CMV dayanımını kontrol eden 17 tane QTL (cmv1-cmv17) geni tespit etmiştir. Birinci derecede CMV dayanımı sağlayan lokus cmv17 olup ona bağlı (0.5cM) cmv-200 anti-CMV SCAR markırı geliştirmiştir. Shi vd. (2018) CMV'ye dayanıklı 02245 hattının 6. kromozomunda bulunan kantitatif (QTL: Quantitative Trait Locus-kantitatif özellik lokusu) cmv dayanım genine (cmv6.1) bağlı SSR11-1, SSR11-177 ve SSR9-56 işaretleyicileri geliştirmiştir. SSR11-1 markırlarıyla 78 tane hıyar genotipiyle yapılan validasyon analizlerinde %94 doğruluk bulunmuştur.

Kabakgilleri hastalandıran PRSV-W hastalığının dayanım kaynakları birçok genotipte bulunmuştur: Surinam-Güney Amerika orijinli kültür genotipi, TMG-1 saf hattı, Dina-1 saf hattı (Wang vd. 1984; Provvidenti 1985; Kabelka ve Grumet 1997). Wang vd. (1984). Tian vd. 82015'e göre Wang vd. (1984) PRSV-W (PRSV-1) dayanım geninin kalıtımını rapor etmiştir. Aynı araştırmalara göre Park vd. (2000) PRSV-1 dayanım genine bağlı AFLP markırı rapor etmiştir fakat kromozom lokasyonu bilinmemektedir. Yapılan ileri araştırmalarda PRSV'ya dayanımını sağlayan prsv02245

(02245 hattında) geninin tek resesif bir gen olarak 6'cı kromozomda yer aldığını belirterek Tian vd. (2015) ona bağlı iki tane işaretleyici (SSR11-177 ve SSR11-1) geliştirmiştir.

Hıyarda ZYMV hastalığına dayanım sağlayan genler Tayvan kültür çeşidi TMG-1 (zym^{TMG-1}) ve Almand hibrit çeşidi Dina-1'de karakterize edilmiştir (Kabelka vd. 1997). Çalışmaya göre göre genlerin ikisi de tek resesif kalıtım göstermektedir. Cardoso vd. (2010) benzer bir çalışma yaparak japon hıyar tipinde tek bir resesif gen karakterize etmiştir. Hıyarda zym lokusu dünyadaki bütün 178 ZYMV izolatlarına karşı dayanım sağlamaktadır (Lecoq vd. 2002). Klasik yöntemlerle dayanım genlerini elit hatlarına aktarmak zaman alıcı olduğu için markır destekli seleksiyon daha elverişlidir (Amano vd. 2013). Bu nedenle birkaç markır geliştirilmiştir (Park vd. 2000, 2004). ZYMV'ye dayanım sağlayan geni ($zymv^{A192-18}$) ise A192-18 isimli hattın 6'cı kromozomda bulunmakta ve Amano vd. (2013) ona bağlı CAPS (CAPS-T86C) işaretleyicisi geliştirmiştir.

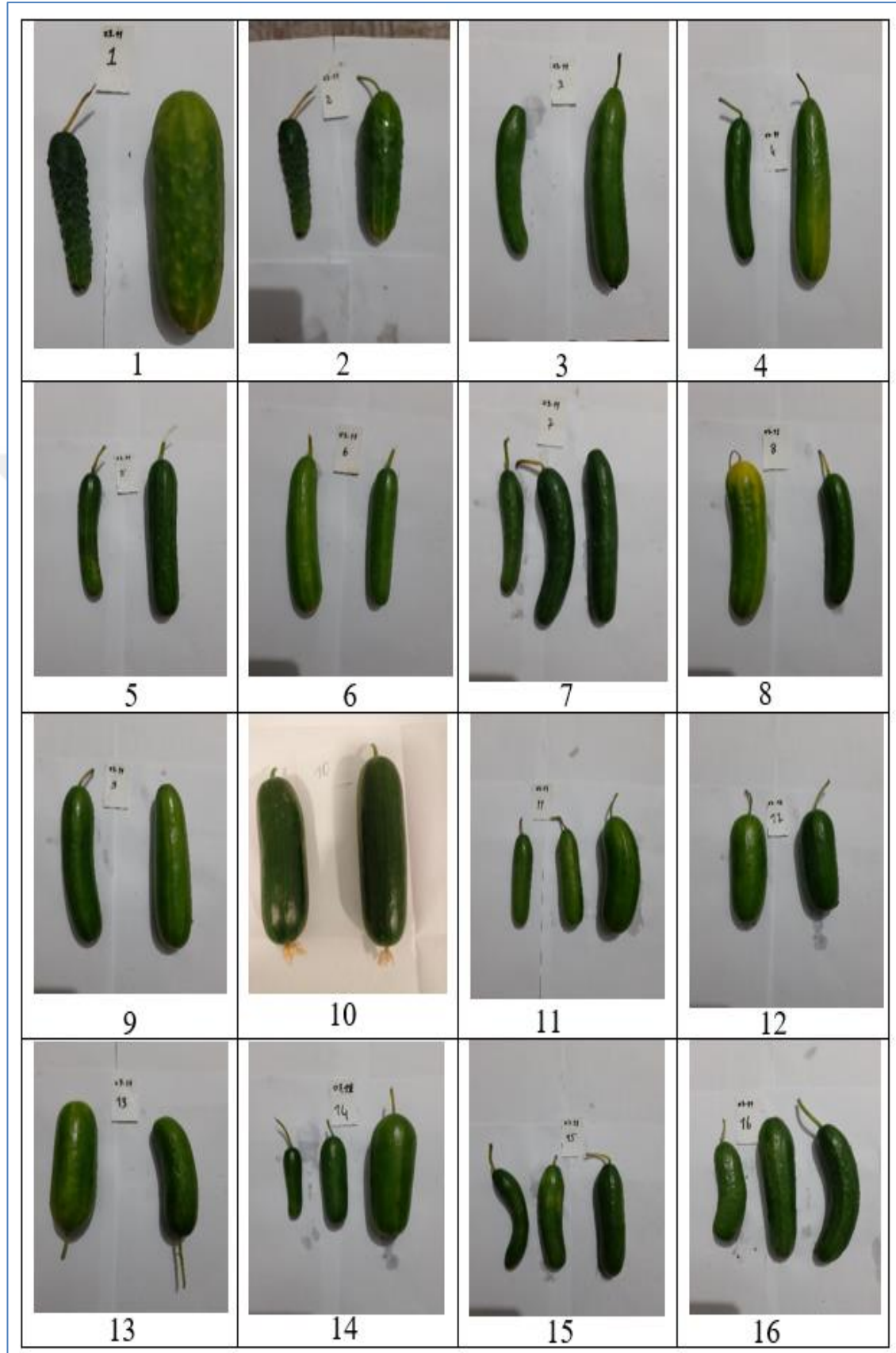
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

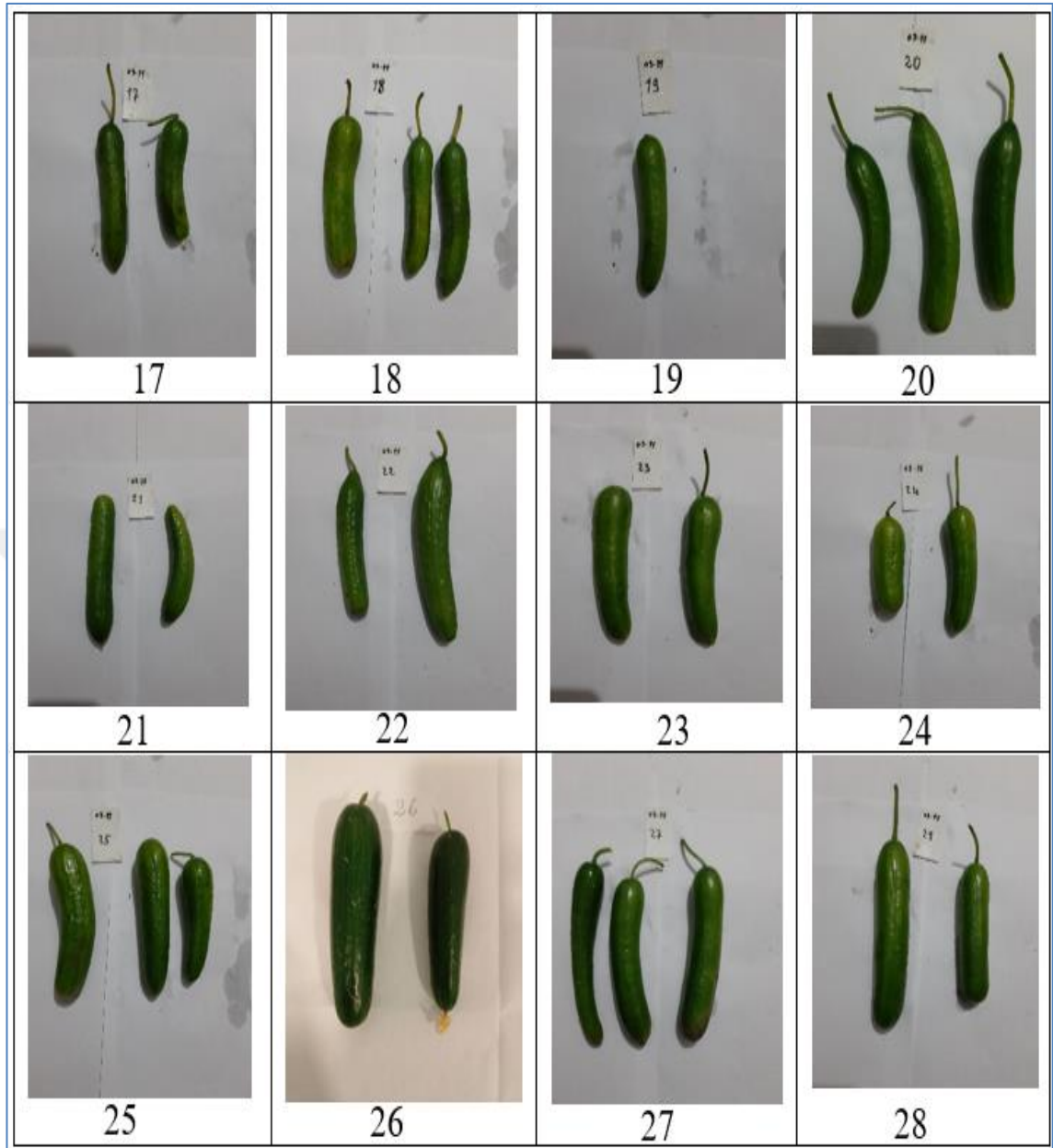
Çalışmamızda 28 hıyar genotipi kullanılmıştır. Bunlardan 14'ü F1 hibrit olup diğer 14 genotip ise saf hatlardır. Doku kültürü çalışmaları PROTO Profesyonel Tohum ve Pazarlama Ltd.Şti'nin laboratuvarında, moleküler çalışmalar Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünde yürütülmüştür. Bitkisel materyal aynı şirketten temin edilmiştir. Genotipler çizelge 3.1'de, genotiplere ait resimler ise şekil 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan genotiplerin isimleri ve özellikleri

No	Genotip İsmi	Genotip Özelliği
F1 çeşitler		
1	Mozaik F1	Dikenli
2	Botanik F1	
3	Termessos F1	Beita Alpha
4	PS 64 F1	
5	SV 5603 F1	
6	Aspendos F1	
7	Halley F1	
8	Kirvem	Beita Alpha
9	PRS 19-65	
10	Ariassos F1	
11	Çıtır F1	
12	Kıtır F1	
13	BBY26 F1	
14	Ayda F1	
Saf hatlar (F6 ve üstü)		
15	19—1	2020S
16	20—1	
17	10—Bulk	
18	10—1	
19	10—2	
20	11—1	
21	11—2	
22	12—1	
23	14-B	
24	14—1	
25	14—2	
26	43—1	
27	50—1	
28	50—2	



Şekil 3.1. Çalışmaya kullanılan 28 genotipin meyve resimleri



Şekil 3.1'in devamı

3.2. Metot

3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi

Tohumların çimlendirilmesi ve bitkilerin yetiştirilmesi Proto Tohum Şirketi'nde yapılmıştır. Tohumlar viyollerde bulunan torf ortamına ekip perlit (3:1) ile kapatılıp çimlendirme odasına alınmıştır (Şekil 3.2). İki gün sonra çimlenme başlamış ve violler fideliğe alınarak 3-4 yaprak dönemine kadar fidelikte tutulmuştur. Üç-dört yaprak dönemine geldikten sonra bitki yetiştirme serasına 50 cm aralıklarla dikilmiştir. Ardından eksplant alım dönemine kadar bitkilerin normal büyümesi için gereken kültürel, gübreleme, ilaçlama ve sulama işlemleri yapılmıştır (Şekil 3.3). Bitkiler ipe alınarak budama işlemi yapıp tek gövdeli olarak yetiştirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.2. Tohum ekimi ve çimlendirilmesi



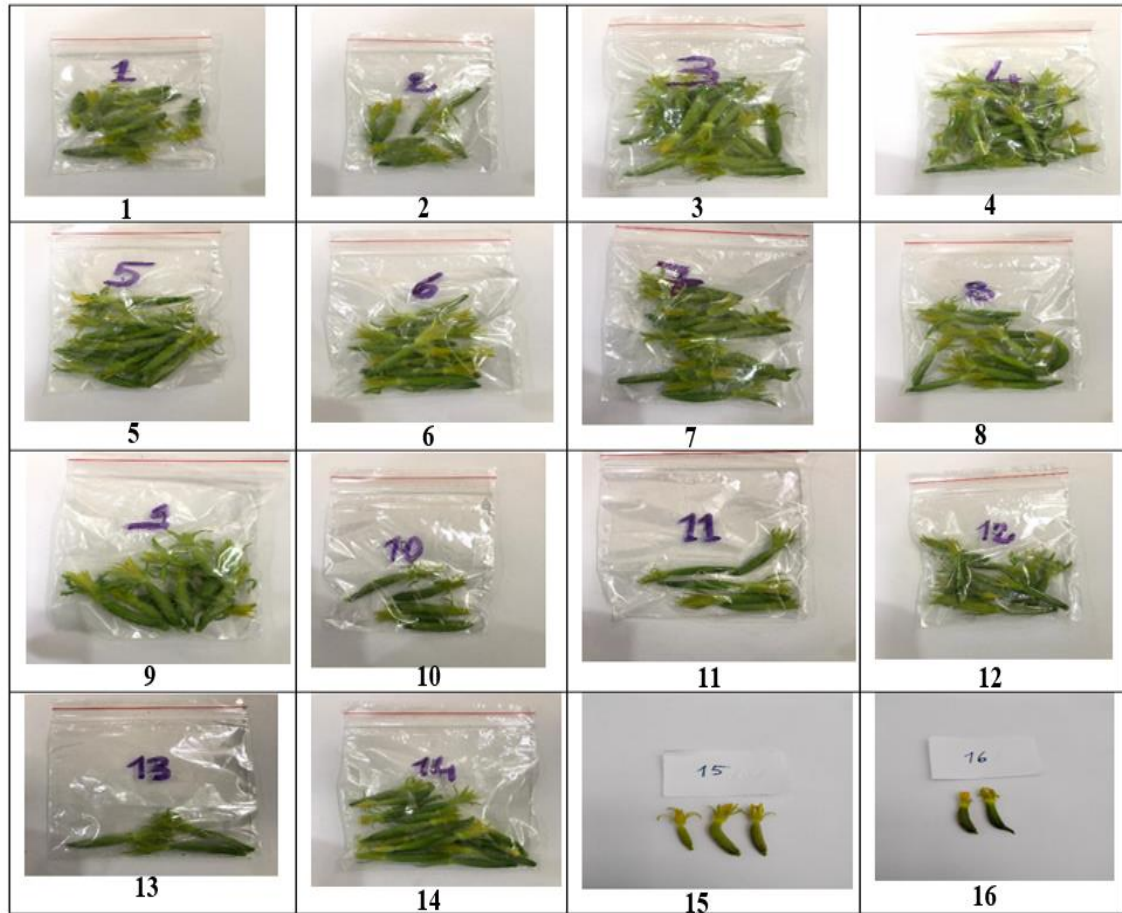
Şekil 3.3. Fidelerin dikimi



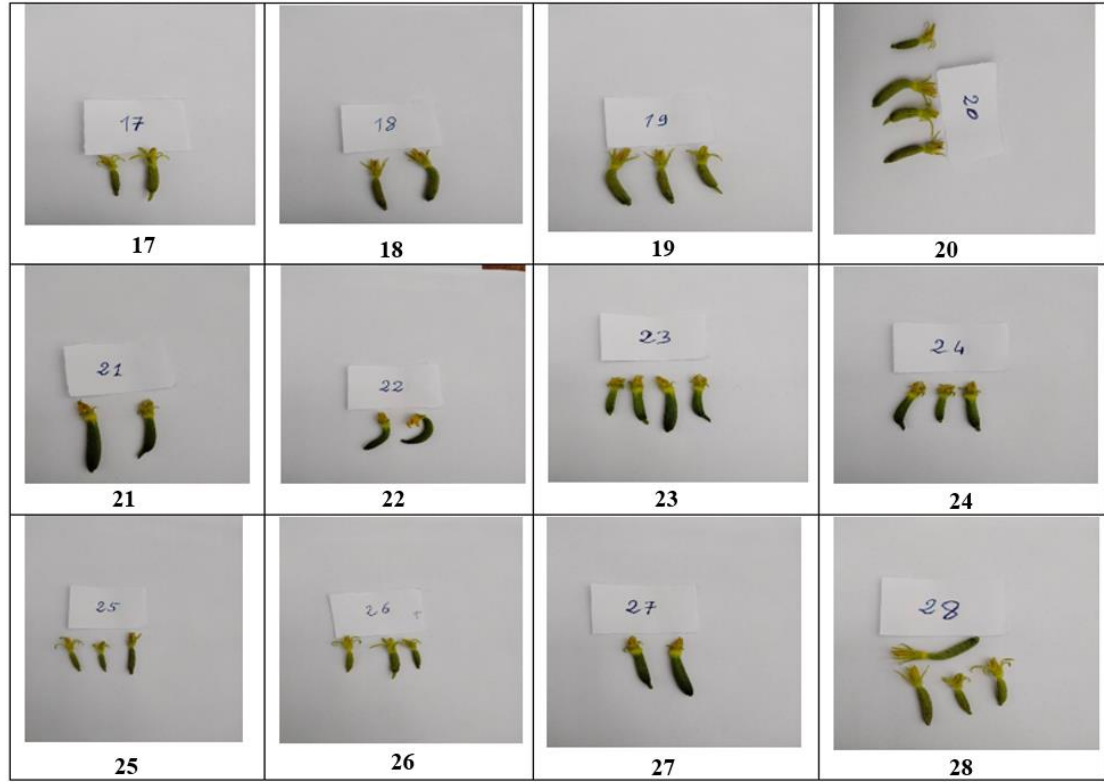
Şekil 3.4. Bitkilerin ipe alınması ve tek gövdeli yetiştirme

3.2.2. Double haploid (ovül kültürü) çalışmaları

Ovüller ikinci dişi çiçeklerin görülmesinden 1 ay ve antesisten (çiçek açmadan) 6 saat önce (Deng vd. 2020) toplanarak kısa sürede doku kültürü laboratuvarına götürülmüştür (şekil 3.5).



Şekil 3.5. Kullanılan genotiplere ait ovül resimleri



Şekil 3.5'in devamı

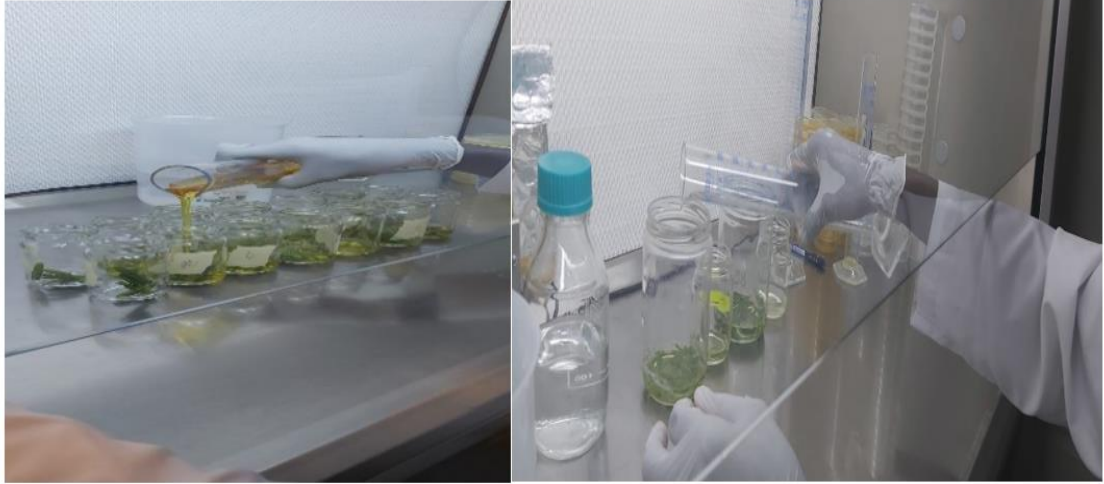
Gynogenesis (ovül kültürü) çalışmamızda Tantansawat ve ark. (2015) ve Deng ve ark. (2020) 'ın protokolleri olduğu gibi ya da modifiye edilmiş olarak kullanılmıştır. Toplanan ovüller birkaç dakika musluk altında tutarak yıkanmıştır. Daha sonra steril kabin içerisinde sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Ovüller önce 1dk süreyle %70 etanol çözeltisi içerisinde tutulduktan sonra steril saf suyla durulanmıştır. Ardından 10 dk boyunca %60'lık rifamisin antibiyotik çözeltisi içerisinde tutulmuştur. Son olarak durulama yapmadan %0,1'lik civa klorür çözeltisi içerisinde 20dk bekletikten sonra 3 kez durulama yapılmıştır. Sterilizasyon işleminden sonra ovaryumlar bistüri yardımıyla 1-2mm kalınlığında kesilmiş ve indüksiyon ortamlarına konulmuştur. Çalışmada 60mm'lik petriler kullanılmış ve her petriye 10 tane eksplant konulmuştur. Her genotip için 30 tane petri kullanılmıştır. Bütün işlemler steril bir ortamda yapılmıştır. Ortam olarak temel iki tane ana protokol modifiye edilerek kullanılmıştır. Birinci protokol (P1) Tantasawat ve ark. (2015)'a aittir. İkinci protokol ise (P2) Deng ve ark. (2020) geliştirmiştir. P2 protokolünü modifiye edilerek farklı ve yeni protokoller (P2K1, P2K2, P2K3, P2K4 ve P2K5) denenmiştir. Eksplantlar MS besi ortamında kültüre alınmış katılaştırıcı olarak bütün protokoller için 7g/l agar kullanılmıştır. Besi ortamının pH'sı P1 için 5,7, P2 ve diğer indüksiyon protokolleri için 5,9 olacak şekilde ayarlanmıştır. pH ayarlamasında 1N'lik HCl (hidroklorik asit) ve 1N'lik NaOH (Sodyum hidroksit) çözeltisi kullanılmıştır. Besi ortamları 1,2 atm basınçlı otoklavda 121°C'de 120 dk süreyle sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Otoklavdan sonra oda sıcaklığında soğuması (50-60 °C) bekletilen ortamlar, steril kabin içerisinde, aseptik olarak her steril plastik petriye eşit olacak şekilde dağıtılmıştır.

Birinci protokol (P1) için MS ortamına ilave olarak 30g/l şeker (sakkaroz) , 1mg/l TDZ, 1mg/l BAP ve 800mg/l glutamin eklenmiştir. İnkübasyon 25 °C koşullarda 1 ay süreyle karanlıkta bekletilmiştir (Tantasawat vd. 2015). Birinci ayın sonunda ovüllerde embriyo ve kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Embriyo ve kalluslar rejenerasyon (P1D) ortamına alıp iklim odasında 25 °C±2 sıcaklık ve 16/8 saatlik fotoperiyodik koşullarda inkübe edilmiştir (Diao vd. 2009). P1D protokolüne göre MS ortamına 30g/l şeker (sakkaroz) , 1,5g/ BA eklenmiştir. Rejenerasyondan sonra bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına aktarılmıştır.

İkinci protokolde (P2) MS ortamına ilaveten 30g/l şeker (sakkoroz)sukroz, 0,06g/l TDZ eklenmiştir. Eksplantlar 4 gün boyunca +4 °C'de (buzdolabında soğuk uygulaması) bekletildikten sonra ortamlara ekilerek 2 gün +33 °C ±1 sıcaklıkta (karanlık etüvde) bekletilmiştir. Sıcaklık uygulamasından sonra iklim odasında 25 °C±2 sıcaklık ve 16/8 saatlik fotoperiyodik koşullarda inkübe edilmiştir. 1 aydan sonra embriyo ve kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Aynı ortamıyla rejenerasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

3.2.2.1. Ovaryumların yüzey sterilizasyonu

Toplanan dişi çiçekler önce musluk altında (yüzeyde bulunabilecek kirliliklerin temizlenmesi) birkaç dakika bekletilmiştir. Ardından steril kabin içerisinde %70'lik etanol çözeltisinde 1dk süreyle bekletilip steril saf suyla durulanmıştır. Daha sonra 25mg/l rifamisin çözeltisine koyup 15dk uygulama yapıldıktan sonra saf suyla durulama yapmadan 0,1g/l HgCl (civa klorür) çözeltisinde 20dk bekletilmiştir. Son olarak 3 kez steril saf suyla durulama işlemi yapılmıştır.

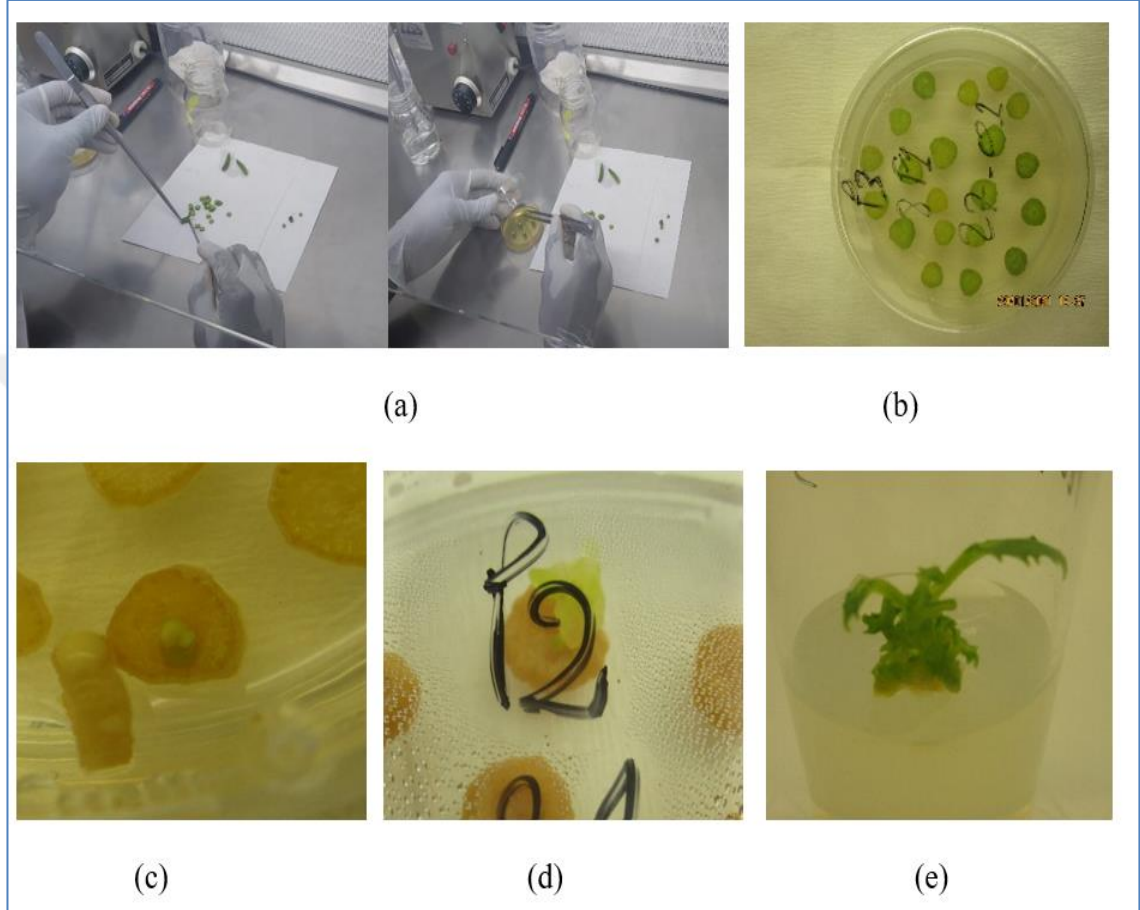


Şekil 3.6. Ovaryumların yüzey sterilizasyonu

3.2.2.2. Ovaryumların ortama aktarılması

Yüzey sterilizasyondan sonra steril bistüri ve pens kullanarak dişi çiçek tomurcukları 1-2mm kalınlığında keserek ortama konulmuştur. Her genotip için 30 petri ve her petriye 10 adet eksplant konulmuştur. Dolayısıyla her genotip için 30 tekrerrür ve her tekrerrürde 10 eksplant konulmuştur. Kullanılan indüksiyon (ilk kültür) ortamlarında genotiplerde 2 hafta ile 1 ay arasında embriyo ve kallus oluşumları gözlemlenmiştir. Bir

ay sonra embriyo ve kallus oluşum oranları kaydedildikten sonra rejenerasyon için alt kültürlerle alınmıştır. P1'den gelen embriyo ve kalluslar P1D (4,3g/l MS+30g/l sakkaroz, 1,5mg/l BAP içermektedir) rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. P2'den gelenlerin ise bir kısmı aynı ortama (P2 ortamına) bir kısmı ise rejenerasyon (4,3g/l MS+30g/l sakkaroz, 1,5mg/l BAP içermektedir) ortamına konulmuştur.



Şekil 3.7. Eksplant ekimi ve indüksiyon aşamaları; **a)** Eksplant kesimi ve ortama ekilmesi; **b)** Yeni ekilmiş eksplantlar; **c)** Embriyo oluşumu; **d)** kallus oluşumu; **e)** Rejenerasyon

3.2.2.3. Ovaryum kültüründe kullanılan protokoller

Çalışmada iki ana indüksiyon protokol kullanılmıştır: protokol1 (P1) (Tantasawat vd. 2015) ve protokol2 (P2) (Deng vd. 2020). P2 protokolünde farklı modifikasyonlar yaparak yeni indüksiyon protokoller geliştirilmiştir (P2K1, P2K2, P2K3, P2K4, P2K5). İndüksiyon protokolleri çizelge3.2.5.1'de gösterilmiştir. Rejenerasyon ortamı P1D'dır. P1 indüksiyon ortamından gelen bütün embriyo ve kallusları P1D ortamına alınmıştır. Ayrıca P2'den gelenler ise aynı ortamla rejenerasyon çalışmalarına devam edilmiştir. P2K3'ten gelen kallusları da P1D ortamına aktarılmış ve embriyoları aynı ortamla devam edilmiştir. P2k1, P2K2, P2K4 ve P2K5'ten gelen kallus ve embriyolar aynı ortamlarla devam edilmiştir. P2K3 protokolünden gelen rejenerantların köklendirme sorunu olmadığı için aynı ortamla devam edilmiştir. Diğer protokoller için ise köklendirme (P_R) protokolü kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan protokoller

	P 1 (Tantasawat vd. 2015)	P2 (Deng vd. 2020)	P2K3
MS	4.3 g/l	4.3 g/l	4.3 g/l
Şeker	30 g/l	30 g	30 g
TDZ	1 mg/l	0.06mg\l	-
BAP	1 mg/l	-	-
Glutamin	800mg/l	-	-
pH	5.7	5.9	5.9
Agar	6 gr	7gr	7 gr
+25 °C	30 gün Karanlık	-	-
+4 °C	-	4 gün	-
+33°C±1	-	2 gün Karanlık	2 gün Karanlık

Çizelge 3.3. Rejenerasyon protokolleri

	P 1D (Dia vd. 2009)	P2 (Deng vd. 2020)	P2K3
MS	4.3 g/l	4.3 g/l	4.3 g/l
Şeker	30 g/l	30 g	30 g
TDZ	-	0.06mg\l	-
BAP	1,5 mg\l	-	-
pH	5.8	5.9	5.9
Agar	7g	7g	7 g
+25 °C±2	Bütün deneme boyunca	Bütün deneme boyunca	Bütün deneme boyunca

Çizelge 3.4. Köklendirme protokolü

	P_R
MS	2.15 g/l
Şeker	30 g/l
IBA	1mg\l
pH	5.9
Agar	
+25 °C±2	Bütün deneme boyunca

Rejenerasyon ve köklendirmeden sonra bitkileri bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamlara aktarılmış ve gelişimleri gözlemlenmiştir.

3.2.2.4. İklim odasının ortam şartları

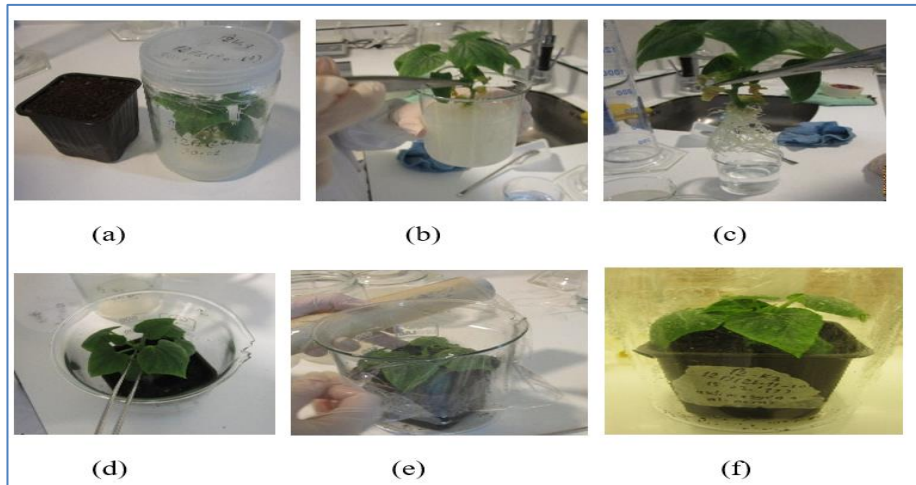
İklim odasının ışığı $35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (3200 lüks civarında) ışık yoğunluğundadır. Ortam sıcaklığı ise $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ayarlığında olup 16/8 (16/8 saat ışık/karanlık) fotoperiyodundadır.



Şekil 3.8. İklim odasının şartları

3.2.2.5. Elde edilen bitkiciklerin aklımasyon işlemleri

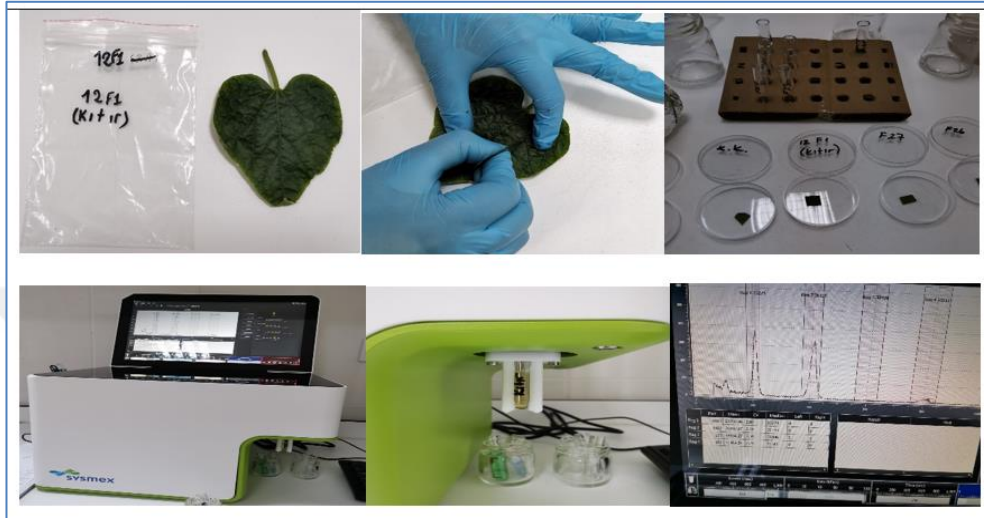
Elde edilen ve köklenmiş bitkicikleri aklımasyona (dış ortama alıştırma işlemi) alınmıştır. İlk olarak bitkicikleri besin ortamından alıp agarı (zarar vermeden) temizlenerek kökler fungusit ($0,1\text{g}$ tartıp 200ml saf suda çözülür) çözeltisine daldırılır. Daha sonra saf suya daldırıp torf içeren küçük bir viyoleye dikilmiştir. Can suyu verdikten sonra behere koyup streçle kapatılarak 3 gün boyunca iklim odasında bekletilmiş daha sonra streçin üzerinde delikler açılmış Ve bir hafta sonra streç tamamen kaldırılmıştır. Bitkinin gelişim durumuna göre aklımasyon işleminden sonra bitkiler fideliğe alınmıştır.



Şekil 3.9. Aklımasyon aşamaları; **a)** Aklımasyona alınacak bitki ve torf; **b)** Bitkinin köklerini fungusite daldırılması; **c)** Kökleri saf suya daldırılması; **d)** Bitkiyi torf ortamına dikilmesi; **e)** Bitkiyi behere alınması ve streç ile kapatılması; **f)** Bitkiyi iklim odasına alınması.

3.2.2.6. Elde edilen bitkilerin ploidi seviyelerinin belirlenmesi

Elde edilen bitkilerin ploidi seviyelerini flow sitometri yöntemi kullanılmıştır. Bitkiler sağlam bir yaprak alıp terleyemecek koşullarda laboratuva getirilmiştir. Yapraklar kesilerek petrilere yerleştirilmiştir. Ploidi seviyesini bilinen bir kontrol (diploid) ile birlikte analize tabii tutulmuş ve elde edilen piklere göre sonuçlar yorumlanmıştır.



Şekil 3.10. Flow sitometrik analizi

3.2.2.7. Haploid bitkilerine colchicine (kolhisin) uygulaması

Bitkilerin ploidi seviyelerini belirledikten sonra haploid bitkilerin (n kromozom) kromozome setini katlamak ($2n$) için kolhisin uygulanmıştır. %0,5'lik (1,25g colchicine tartıp 250ml steril soğuk ($+4^{\circ}\text{C}$) saf suda çözündürülür) colchicine çözeltisi hazırladıktan sonra 1-2 damla Tween-20 eklenmiş ve uygulanacak bitkinin apikal meristemin etrafındaki tomurcuklar temizlenmiştir. Pastör pipetle alınan colchicine çözeltisi pamuğa damlatılmıştır. Islatılmış pamuk uygulama yapılacak büyüme gözlerinin etrafına sarılmıştır. Pamuğun üzerini alüminyum folyo ile kapatılarak 150 dakika bekletilmiştir. Son olarak uygulama yapılan yerler steril saf suyla iyice durulanmıştır.



Şekil 3.11. Haploid bitkilere kolhisin uygulaması

3.2.3. Genotiplerin ZYMV, CMV ve PRSVV hastalıklarına dayanıklılık durumlarının moleküler yöntemlerle analizi

3.2.3.1. Genomik DNA izolasyonu

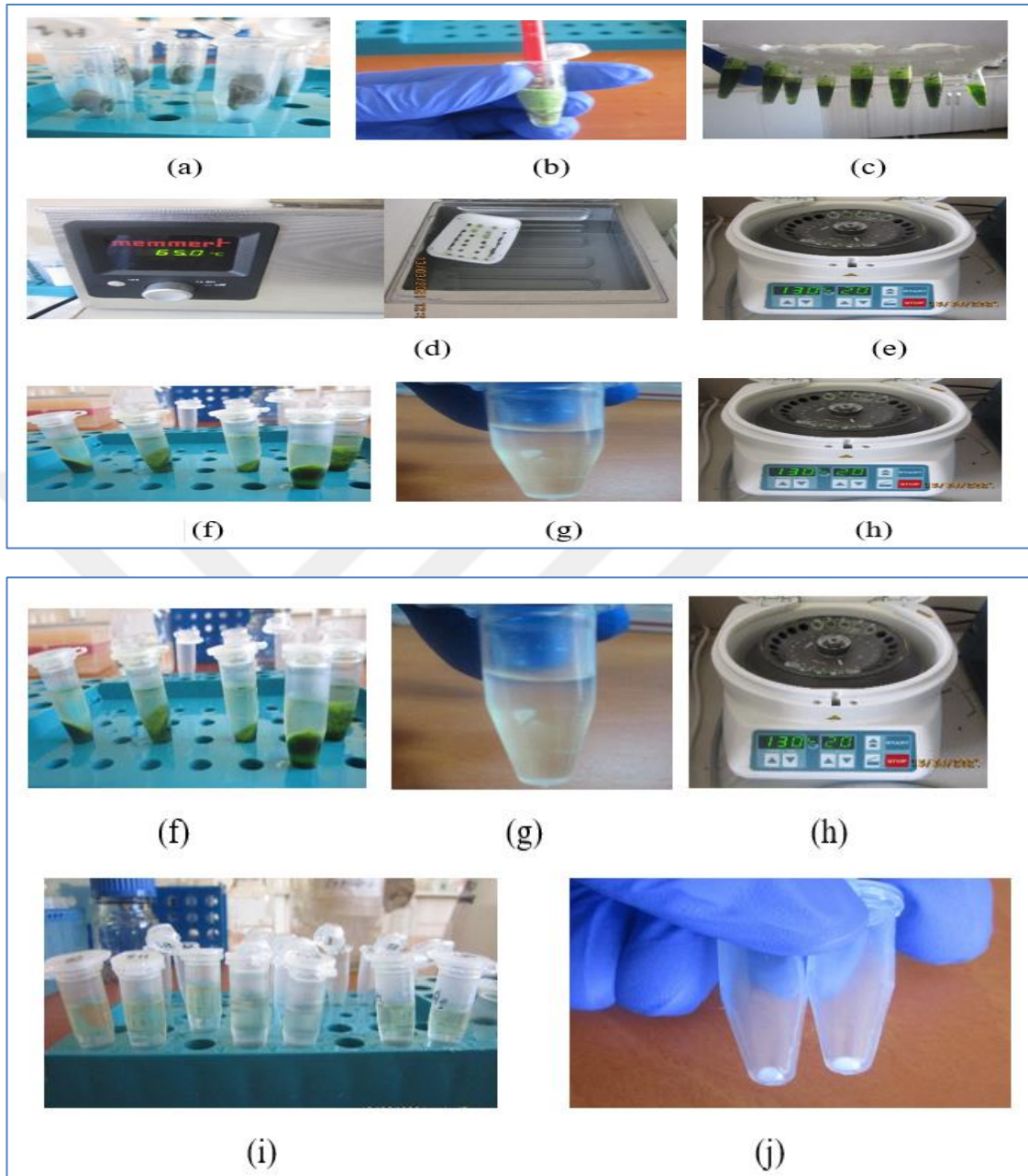
Ovül kültürü çalışmasında kullandığımız 28 tane genotip 3 gerçek yaprak aşamasına geldiğinde bitkilerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonda Doyle ve Doyle (1990) tarafından geliştirilen CTAB yöntemini kullanılmıştır (çizelge 3.5). İzole edilen DNA'ların kalitesi ve miktarına bakmak üzere 10ul %1,5'lik agaroz jele yüklenerek değerlendirilmiştir. Elde edilen DNA'lar markır analizlerinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. CTAB çözeltisi bileşenleri

Bileşenler	Buffer Son Konsantrasyonları	Hacim
NaCl	1.4 M	280 ml
Tris-HCL PH:8	100Mm	100 ml
EDTA PH:8	20 mM	40 ml
CTAB	% 2	20 g
Beta-merkaptioethanol	% 0.2	2 ml
Toplam		1000 ml

DNA izolasyon aşamaları:

- ❖ Taze yaprakları (0,1g) 1,5ml'lik ependorf tüplerine aktarılır ve üzerine 0.5ml ekstraksiyon çözeltisi ekleyerek ezme çubuklarıyla ezilmiştir.
- ❖ Ezme işleminden sonra 65°C'de 1,5 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ İnkübasyondan sonra 500µl kloroform-izoamil alkol (24:1) ekleyerek tüpler alt üst yapıp 13000rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Kloroform işlemi iki defa yapılmıştır.
- ❖ Santrifüj işleminden sonra mikropipet yardımıyla 150µl süpernatant (üstfaz) alıp 1,5ml'lik yeni steril tüplere aktararak üzerine 2/3 hacimde izopropanol ekleyip bir gece -20°C'de sıcaklığında bekletilmiştir.
- ❖ Ertesi gün 20 dakika 13000rpm'de santrifüj edilmiştir.
- ❖ Santrifüjden sonra üst faz atılıp çökelti (pellet) elde edilmiştir.
- ❖ Çökelti içeren tüplere 150µl yıkama solüsyonu (%70'lik etanol çözeltisi) ekleyip tekrar 13000rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.
- ❖ Üst faz atılarak çökelti oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
- ❖ Çökelti kuruduktan sonra 100µl steril saf su eklenmiştir.
- ❖ Üzerine su eklenen örnekler-20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.12. DNA izolasyon aşamaları; **a)** Yaprak örnekleri; **b)** Yaprakların ezilmesi; **c,d)** Su banyosunda inkübasyon; **e)** İnkübasyon sonrası santrifüjleme; **f)** Santrifüjden sonra elde edilen iki faz; **g)** Süpernatanti yeni tüpe, isopropanol eklenmesi ve gece -20°C’de bekletilmiş örnek; **h)** Pelletin çöktürülmesi için santrifüjleme; **i)** çöktürülmüş pelletin %70’lik etanol ile yıkanması; **j)** Elde edilen DNA pelleti

3.2.3.2. DNA amplifikasyonu

İzole edilen DNA’ların kalitesine baktıktan sonra, PCR analizleri için sulandırılmıştır.

CAPS analizleri

ZYMV dayanıklılık testlemeleri için Amano vd. (2013) tarafından geliştirilen CAPS-T86C markır primeri kullanılmıştır. Primer ve PCR koşulları çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.6. PCR reaksiyonu için hazırlanan karışımın içeriği (her iki primer için)

Kimyasal	1 örneklik hacmi (ul)
Buffer	4,5
MgCl ₂	3
Dntp	3
Primer (F)	3
Primer (R)	3
Taq DNA polymerase	0,5
dH ₂ O	7.0
Toplam	24
Her örneğe dağıtılan DNA miktarı (μl)	6

PCR reaksiyonu 30 μl toplam hacim ile gerçekleştirilmiş ve her reaksiyon 6μl DNA içermektedir. PCR karışımının içeriği ve miktarları Çizelge 3.6’da verilmiştir. PCR işleminden sonra 10μl reaksiyon ürünü %1,5’lik agaroz jele yüklenmiş ve amplifikasyon kalitesine bakılmıştır. Kaliteli PCR ürünü elde ettikten sonra kesim işlemleri yapılmıştır. CAPS-T86C markırı için MnlI restriksiyon enzimi. Kesim ürünleri %2’lik agaroz jelde 75V-1saat süreyle yürütülmüş ve UV altında görüntülenmiştir.

Çizelge 3.7. Kesim için hazırlanan karışımın içeriği (her iki enzim için)

Kimyasal	Bir örneklik hacmi (ul)
One buffer	6
BSA	0,8
Enzim	0,3
dH ₂ O	6
Toplam	13,1
Her örneğe dağıtılacak DNA miktarı (μl)	10

Çizelge 3.8. ZYMV dayanıklılık analizinde kullanılan primer, restriksiyon enzimi ve PCR koşulları (Amano vd. 2013)

Hastalık ismi	Dayanıklılık lokusu	Primer	Primer dizilimi		Kesim enzimleri		Ayrıştırma jeli		
			F	R	S	Z	D		
Kabak Sarı Mozaik Virüsü (ZYMV)	zymA192-18	CAPS-T86C	5'AGCAG GCGGTA CATGAA GAT'3	5'CCTG TTCTG GATCC TCTCC A 3'	94 °C	1d k		1ul Mnl I (4 saat inkübasyon)	%2-3 agaroz jelde
					94 °C	1d k	30 döngü		
					55 °C	30s			
					72 °C	1d k			
					72 °C	5d k			

SSR Analizleri

SSR markır analizleri için hastalık türüne göre spesifik primerler kullanılmıştır. Ele alınan hastalıklar ve kullanılan markır primerleri çizelge 3.12'de verilmiştir.

SSR analizlerinde Schuelke (2000) tarafından optimize edilen protokolü kullanılmıştır. PCR koşulları çizelge 3.15'te verilmiştir. PCR işleminden sonra polakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır ve elde edilen bantlara göre skorlama yapılmıştır.

Çizelge 3.9. PCR Karışımı

Kimyasal	1 örneklilik hacmi (µl)
Buffer	1,5
MgCl ₂	1
dNTP	1
Primer (F)	0,2
Primer (R)	0,2
Taq DNA polymerase	0,1
dH ₂ O	7
Toplam	11
Her örneğe dağıtılan DNA miktarı (µl)	2

Çizelge 3.10. PCR koşulları

		Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
PCR	Başlangıç denatürasyonu	94	5dk	1
	Denatürasyon	94	30s	30
	Primer Bağlanma (Annealing)	56	45	
	Zincir uzaması (Extension)	72	45	

Çizelge 3.11. Ele alınan hastalıklar ve kullanılan SSR primerleri (Zhang vd. 2014; Tian vd. 2015, 2016; Song vd. 2016)

Hastalık ismi	Dayanıklılık lokusu	Primer	Primer dizilimi		Ayrıştırma jeli
			F	R	
Papaya Halka Leke Virüsü (PRSV)	Prsv02245	SSR11-177	5'CGTGGCATAAA ACCACGAAT 3'	5'CAAATTCA ACAAAACCCT ACCA 3'	%6 poliakrilamid
Hıyar Mozaik Virüsü (CMV)	cmv6.1	SSR9-56	5'CAAAACAAGGT AAGGTGTATTGGA 3'	5'TAAAAGGC AGGACATGCT CA 3'	
		SSR11-1	5'ACAAAGCTTCTCC GCAAATG 3'	5'GGAGGGAAA GGAAGGAGA GA 3'	

SSR PCR ürünlerin ayrıştırılması için %6'lık poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Jel hazırlığı için 25 cm'lik cam plakalar kullanılmıştır. Önce camlar özenle yıkanmış ve saf su ile durulanarak kurutulmuştur. Jeli matriksi hazırlamak 25ml %40'lık poliakrilamid solüsyonu üzerine amonyum persülfat ve temed eklenerek hızlıca karıştırılmış ve şırınga yardımıyla cam plakalar arasına enjeksiyon yapılmıştır. Ardından taraklar yerleştirilerek 45 dakika jelin polimerize olması beklenmiştir. Licor jel matriksi ve poliakrilamid bileşenleri sırasıyla çizelge Çizelge 3.12 ve çizelge Çizelge 3.13'te gösterilmiştir.

Jel hazır olduktan sonra örnekler yüklenmiştir. Yükleme yapmadan önce PCR ürünlerine formamit içeren yükleme tamponu ekleyip 95°C de 5 dakika denatürasyon işlemi yapılarak örnekler hemen buza alınmıştır. Denatürasyon işleminden sonra örnekler jele yükleyerek 1500V 45°C'de yürütülmüştür. Görüntüleme Licor-IR2 4200 (LI-COR Biosciences) cihazıyla yapılmıştır.

Çizelge 3.12. Licor jel matriksinde kullanılan kimyasallar

Jel Matriks (500ml)	% 5.5	%6.5
% 40 Akrilamid + BİS (19:1)	68.75 ml	81.25 ml
TBE (10X)	50 ml	50 ml
Ure (7 M)	210 g	210 g

Çizelge 3.13. Poliakrilamid jel hazırlamasında kullanılan kimyasallar

Poliakrilamid jel bileşenleri	25 cm cam için
%10 luk APS	243 ul
Temed	17 ul
Akrilamid jel matriks	25 ml

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ovül Kültüründe Elde Edilen Bulgular

4.1.1. Kullanılan protokollerin ovül kültüründeki etkileri

Çalışmamızda kullandığımız protokollerin embriyo, kallus ve bitki oluşturma etkilerini araştırılmıştır. Embriyo ve kallus oluşumu açısından bütün protokollerde, farklı oranlarda olumlu cevap vermiştir. Protokoller arasında farklılık olduğu gibi genotipler arasında da farklılıklar gözlemlenmiştir.

4.1.1.1. P1 protokolü ile elde edilen bulgular

Ovül kültürü çalışmalarında kullanılan P1 protokolüyle elde edilen sonuçlara göre en yüksek embriyo oluşum oranı %71 olup 12 nolu genotipte elde edilirken en düşük embriyo oluşum oranı %3 olarak 15 nolu genotipte bulunmuştur. 6, 10, 16, 17, 19 ve 21 nolu genotiplerde embriyo elde edilememiştir. Dolayısıyla 6, 10, 16, 17, 19 ve 21 nolu genotipler embriyo oluşumuna güç tepki veren inatçı (recalcitrant) genotipler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ortalama embriyo oluşum oranı %20'dur.

Kallus oluşumu bakımından, en yüksek kallus oluşum oranı % 240 olup 10 nolu genotipte elde edilmiştir. (ortalama 2.4 kallus /eksplant) En düşük kallus oluşum oranı %5 olarak 23 nolu genotipte bulunmuştur. Ortalama kallus oluşum oranı ise %29'dur. Rejenerasyon (sürgün oluşumu) bakımından en yüksek %140 olarak 18 nolu genotipte bulunmuştur. En düşük rejenerasyon oranı (%0,5) 25 nolu genotipte bulunmuştur. Bazı genotiplerde rejenerasyon olduğuna rağmen gelişme kaydedilmemiştir. Bu nedenle P1 protokolüyle bitki elde edilememiştir.

Rejenerasyon (sürgün oluşumu) bakımından en yüksek %140 olarak 18 nolu genotipte bulunmuştur (ortalama 1.4 sürgün/explants) En düşük rejenerasyon oranı (%0,5) 25 nolu genotipte bulunmuştur. Bazı genotiplerde rejenerasyon olduğuna rağmen gelişme kaydedilmemiştir. Bu nedenle P1 protokolüyle bitki elde edilememiştir. Bitki elde edememesinin sebebi kullandığımız genotiplerden kaynaklanıyor olabilir.

4.1.1.2. P2 protokolü ile elde edilen bulgular

P2 ortamı ile yaptığımız çalışmada en yüksek embriyo oranı %75 olarak 3 nolu genotipte elde edilirken en düşük embriyo oranı %5,8 olarak 6 nolu genotipte elde edilmiştir. Ortalama embriyo oluşum oranı ise %20'dur.

Kallus oluşum oranı bakımından en yüksek %11 olarak 4 nolu genotipte elde edilmiştir. En düşük kallus oluşum oranı %1 olup 3, 18 ve 27 nolu genotiplerde bulunmuştur. 1, 5, 11, 12, 13, 19, 22, 23, 24, 26, 27 ve 28 nolu genotiplerde kallus oluşumu gözlemlenmemiştir. Ortalama kallus oluşum oranı ise %29'dur.

Rejenerasyon bakımından en yüksek oran %4,6 olarak 18 nolu genotipte bulunmuştur. En düşük oran ise %0,5 olup 7 nolu genotipte bulunmuştur. Ortalama rejenerasyon oranı %6'dır. P2 ortamı ile rejenerasyon gerçekleşmesine rağmen bitki elde edilememiştir. Rejenerantların gelişmesi için optimizasyon gerekmektedir.

4.1.1.3. P2K3 protokolü ile elde edilen bulgular

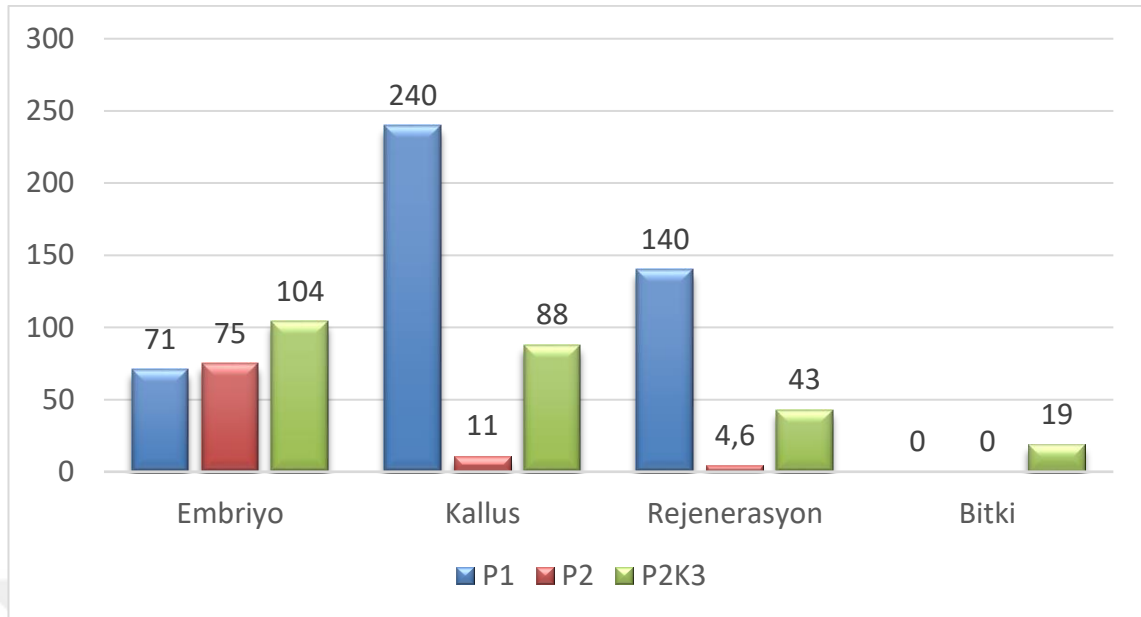
P2K3 protokolü ile yaptığımız denemede en yüksek embriyo oluşum oranı %104 olup 4 nolu genotiple elde edilirken en düşük embriyo oluşum oranı % 2,5 olup 2 nolu genotipte bulunmuştur. 1,16 ve 23 nolu genotipler inaktif bulunmuştur. P2K3 protokolü ile yaptığımız çalışmada ortalama embriyo oluşum oranı %20'dir.

En yüksek kallus oluşum oranı %88 olarak 14 nolu genotipte elde edilirken en düşük kallus oluşum oranı %3,8 ile 11 nolu genotipte bulunmuştur. Bunun yanında 22 tane (1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ve 28) genotipte kallus oluşmamıştır. Ortalama kallus oluşum oranı %29 olmuştur.

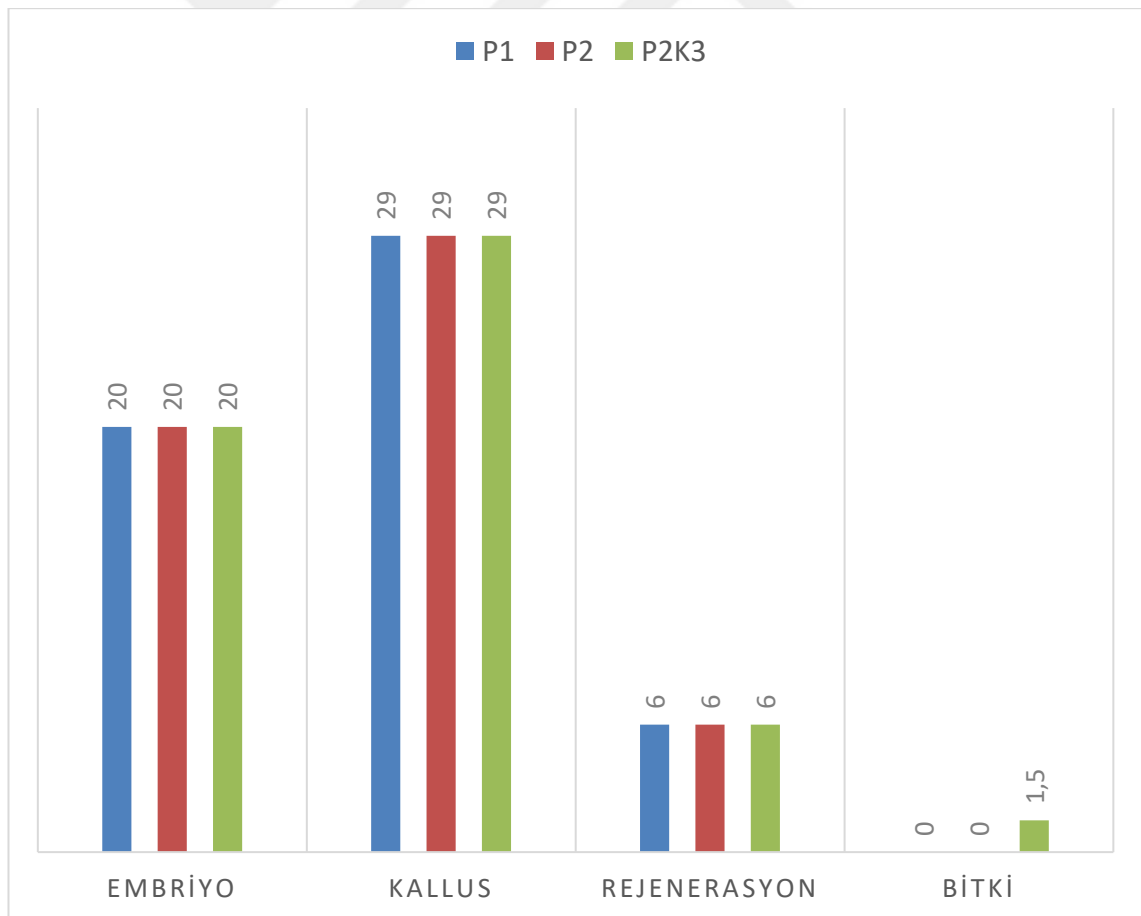
P2K3 ortamı ile en yüksek rejenerasyon oranı 14 nolu genotipte (%470) en düşük rejenerasyon oranı (%1) ise 12 nolu genotipte elde edilmiştir. Ortalama rejenerasyon oranı %6'dır. Bazı eksplantlerden birden fazla sürgün elde edilmiştir. Yapılan hesaplamalarda elde edilen sürgün sayısı dikkate alınmıştır. 21 tane genotipte (1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ve 28) rejenerasyon gerçekleşmemiştir. Bu rejenerantlardan bitki elde edilebilmiştir. 7 nolu genotipten 3 tane diploid, 11 nolu genotipten 4 tane (hepsi haploid) ve 14 nolu genotipten 11 tane (hepsi diploid) ve 12 nolu genotipten 1 tane (diploid) bitki olmak üzere toplam 19 bitki elde edilmiştir.

4.1.1.4. Protokollerin karşılaştırılması

Embriyo oluşumu bakımından protokoller karşılaştırıldığında P2K3 daha iyi sonuç vermiş (%104) ve bunu P2 (%75) ve P1 (%71) takip etmiştir. Kallus oluşumu bakımından ise sırasıyla P1 (% 240), P2k3 (%88) ve P2 (%11) daha etkili olmuştur. Rejenerasyonda en iyi sonuç veren protokol P1 olup 18 nolu genotiple elde edilmiştir (%140). Arkasından P2K3 protokolü gelmektedir (14 nolu genotip : %43). En düşük rejenerasyon P2'de gerçekleşmiştir (18 nolu genotip: %4,6).



Şekil 4.1. P1, P2 ve P2K3 protokollerin karşılaştırılma



Şekil 4.2. Ortalama sonuçları

Çizelge 4.1. P1 protokolü uygulanarak 28 genotiple yapılan ovül kültürü çalışması ile elde edilen sonuçlar

Genotip	T.P.S	T.Ek. S	O.E.S	E.O.O	O.K.S	K.O.O	R.S	R.O
1	4	22	6	0,27	7	0,32	0	0
2	10	53	2	0,04	4	0,07	1	0,02
3	18	89	20	0,22	16	0,18	0	0
4	4	22	5	0,23	10	0,45	0	0
5	9	47	4	0,09	4	0,09	0	0
6	2	10	0	0	6	0,6	0	0
7	11	54	4	0,07	12	0,22	0	0
8	7	35	10	0,28	3	0,09	0	0
9	5	24	7	0,29	4	0,16	0	0
10	2	5	0	0	12	2,4	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	9	47	7	0,15	9	0,19	0	0
13	2	10	7	0,7	1	0,1	0	0
14	12	58	21	0,36	9	0,16	0	0
15	6	32	1	0,03	10	0,31	9	0,28
16	2	9	0	0	1	0,11	0	0
17	9	46	0	0	14	0,3	0	0
18	3	15	4	0,26	6	0,4	21	1,4
19	10	48	0	0	7	0,15	0	0
20	10	50	20	0,4	6	0,12	0	0
21	8	42	0	0	25	0,6	0	0
22	14	127	90	0,71	0	0	6	0,05
23	19	98	11	0,12	5	0,05	0	0
24	7	184	68	0,37	26	0,14	4	0,02
25	30	198	49	0,25	22	0,11	1	0,005
26	20	99	24	0,24	38	0,38	0	0
27	27	138	15	0,11	33	0,24	0	0
28	18	91	45	0,49	18	0,2	0	0
Toplam	278	1653	420	5,68	308	8,14	42	1,775
Mak.	30	198	90	0,71	38	2,4	21	1,4
Min	2	5	1	0,03	1	0,05	1	0,005
ort.	9,93	59	15	0,2	11	0,29	1,5	0,06

T.P.S: Toplam Petri Sayısı**T.Ek.S:** Toplam Eksplant Sayısı**O.E.S:** Oluşan Embriyo Sayısı**E.O.O:** Embriyo Oluşum Oranı

O.K.S: Oluşan Kallus Sayısı

K.O.O: Kallus oluşum Oranı

R.S: Rejenerasyon Sayısı

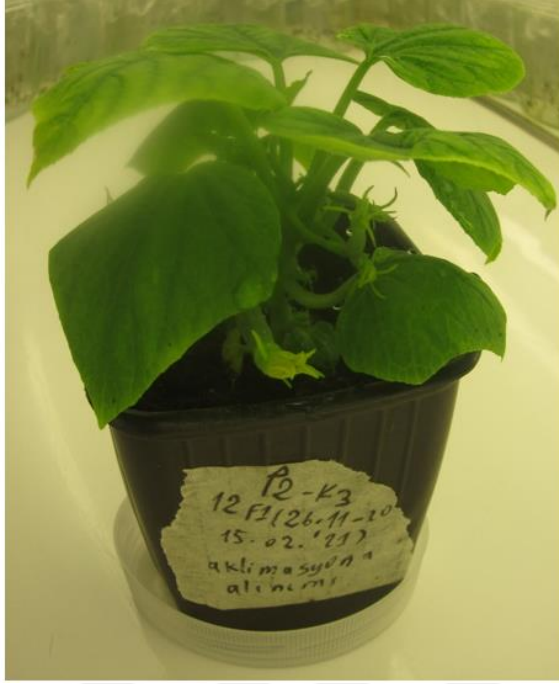
R.O: Rejenerasyon Oranı

Çizelge 4.2. P2 protokolü uygulanarak 28 genotiple yapılan ovül kültürü çalışması ile elde edilen sonuçlar

Genotip	T.P.S	T.Ek. S	O.E.S	E.O.O	O.K.S	K.O.O	R.S	R.O
1	18	90	17	0,18	0	0	0	0
2	23	114	8	0,57	3	0,03	1	0,009
3	30	214	160	0,75	3	0,01	3	0,01
4	24	122	34	0,28	14	0,11	0	0
5	27	135	45	0,33	0	0	2	0,015
6	21	103	6	0,058	0	0	0	0
7	30	197	48	0,24	6	0,03	1	0,005
8	30	217	85	0,39	21	0,1	6	0,028
9	21	105	59	0,56	2	0,02	3	0,029
10	13	66	18	0,27	3	0,05	0	0
11	4	19	6	0,31	0	0	0	0
12	8	38	21	0,55	0	0	0	0
13	8	43	15	0,35	0	0	0	0
14	30	166	76	0,46	11	0,06	2	0,012
15	30	192	30	0,16	1	0,005	2	0,01
16	30	158	49	0,31	3	0,02	2	0,012
17	16	81	9	0,11	0	0	0	0
18	30	194	94	0,48	3	0,01	9	0,046
19	18	98	13	0,13	0	0	0	0
20	30	173	46	0,27	8	0,05	0	0
21	30	161	21	0,13	5	0,03	4	0,025
22	3	15	8	0,53	0	0	0	0
23	25	124	23	0,19	0	0	0	0
24	24	123	18	0,15	0	0	0	0
25	16	81	11	0,14	2	0,02	0	0
26	6	32	4	0,13	0	0	0	0
27	16	83	9	0,11	0	0	0	0
28	19	96	14	0,15	0	0	0	0
Toplam	580	3240	947	8,288	85	0,545	35	0,201
Mak.	43	217	160	0,75	21	0,11	9	0,046
Min	3	15	4	0,11	0	0	0	0
ort.	20,71	59	15	0,2	11	0,29	1,5	0,06

Çizelge 4.3. P2K3 protokolü uygulanarak 28 genotiple yapılan ovül kültürü çalışması ile elde edilen sonuçlar

Genotip	T.P.S	T.Ek. S	O.E.S	E.O.O	O.K.S	K.O.O	R.S	R.O	O.B.S	B.O.O
1	3	14	0	0	0	0	0	0	0	0
2	8	40	1	0,025	0	0	0	0	0	0
3	4	18	1	0,055	0	0	0	0	0	0
4	6	22	23	1,045	0	0	0	0	0	0
5	6	30	9	0,3	0	0	0	0	0	0
6	5	26	8	0,3	0	0	0	0	0	0
7	10	47	21	0,45	3	0,06	2	0,042	2	0,042
8	11	55	16	0,29	7	0,13	4	0,072	0	0
9	4	20	8	0,4	1	0,05	2	0,1	0	0
10	8	39	8	0,2	0	0	0	0	0	0
11	6	26	8	0,3	1	0,038	4	0,15	4	0,15
12	19	98	44	0,45	0	0	1	0,01	1	0,01
13	8	40	6	0,15	0	0	0	0	0	0
14	10	51	13	0,25	45	0,88	240	4,7	12	0,23
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	5	31	0	0	0	0	0	0	0	0
17	5	24	3	0,125	0	0	0	0	0	0
18	7	34	5	0,15	0	0	0	0	0	0
19	10	50	8	0,16	0	0	0	0	0	0
20	7	36	4	0,11	0	0	0	0	0	0
21	7	34	11	0,32	0	0	0	0	0	0
22	2	10	1	0,1	0	0	0	0	0	0
23	2	10	0	0	0	0	0	0	0	0
24	6	33	5	0,15	0	0	0	0	0	0
25	9	46	7	0,15	0	0	0	0	0	0
26	6	33	7	0,21	0	0	0	0	0	0
27	4	33	8	0,24	0	0	0	0	0	0
28	0	23	8	0,35	0	0	0	0	0	0
Toplam	178	923	233	6,28	57	1,158	253	5,074	19	0,432
Mak.	19	98	44	1,045	45	0,88	240	4,7	12	0,23
Min	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ort.	10,04	59	15	0,2	11	0,29	1,5	0,06	0,68	0,015



(a)

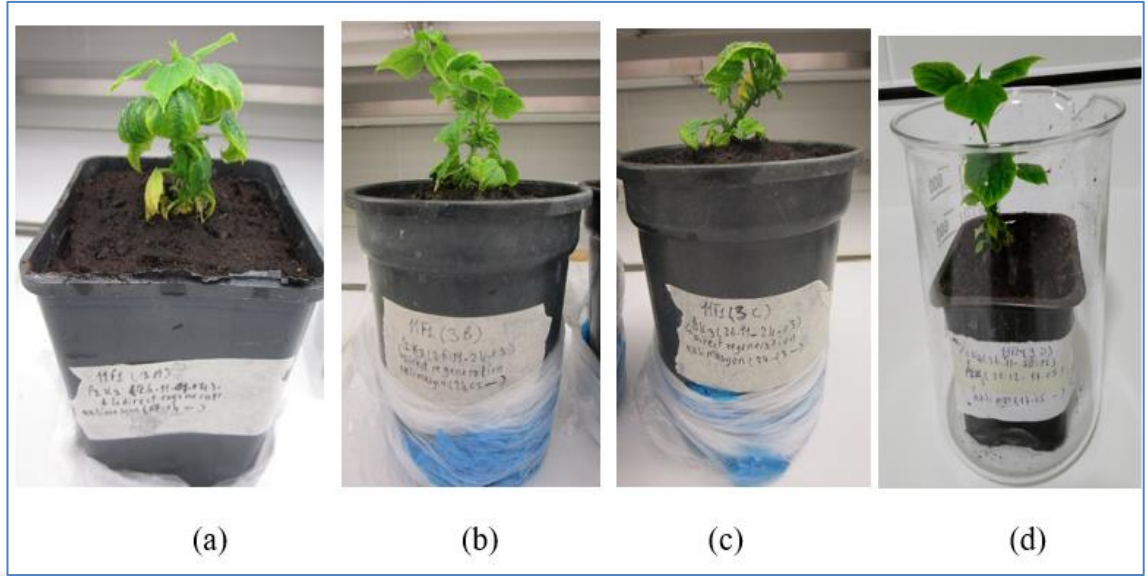


(b)

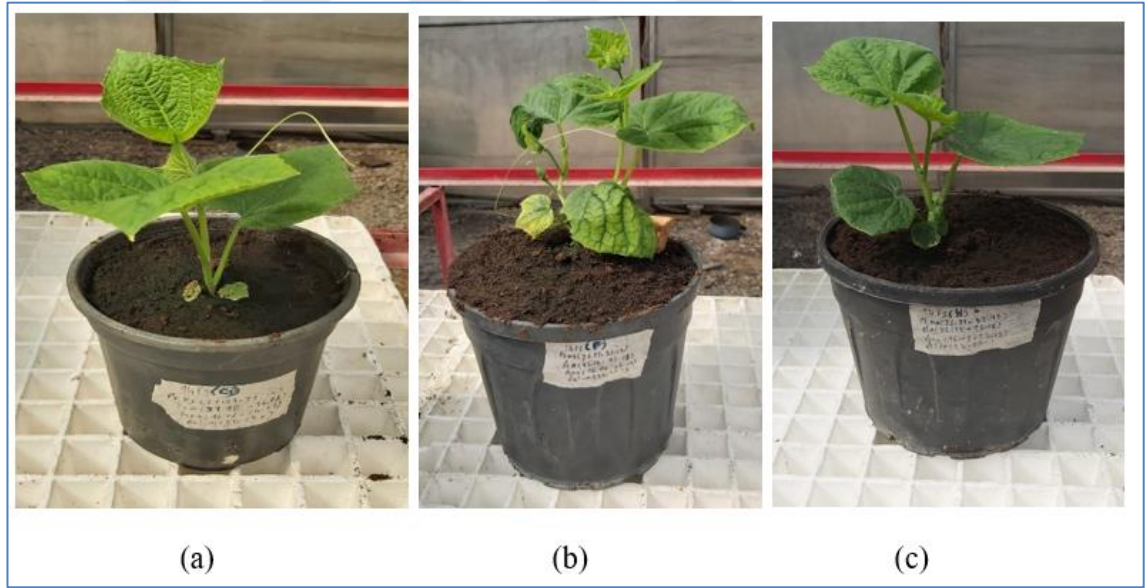
Şekil 4.3. 12 nolu genotipten P2K3 protokolü ile elde edilen diploid bitki; **a)** P2K3 prokolü ile 12 nolu genotipten elde edilen bitkinin laboratuvar koşullarında akimilizasyonu; **b)** P2K3 protokolü ile 12 nolu genotipten elde edilmiş ve seraya aktarılmış bitki



Şekil 4.4. 7 nolu genotipten P2K3 protokolü ile elde edilen diploid bitki



Şekil 4.5. 11 nolu genotipten gelen bitkiler; **a)** 11F1 (3A); **b)** 11F1 (3B); **c)** 11F1 (3C); **d)** 11F1 (3D)



Şekil 4.6. 14 nolu genotipten gelen diploid bitkiler; **a)** 14F1 (G); **b)** 14F1 (F); **c)** 14F1 (H)

Daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara benzer şekilde genotiplerin farklı protokollerde kallus, embriyo ya da rejenerasyon potansiyelleri farklılık göstermiştir. Deng ve ark. (2020)'ın da yaptığı ovül kültüründe genotiplerin aynı protokole farklı cevaplar verdiği rapor edilmiştir. P2K3 protokolü: Deng vd (2020) tarafından geliştirilen metod (MS+ 0.06mg/l TDZ ve explantların +4 °C'de ve karanlıkta 4 gün inkubasyonu, ortama ekildikten sonra 33 °C'de 2 gün karanlıkta inkubasyon) modifiye edilerek bizim çalışmamızda P2K3 olarak adlandırılmıştır. P2K3 metodunda (MS+ 30G/l sakkaroz) petriye ekilmiş eksplanler 2 gün +33 °C'de inkubasyona tabii

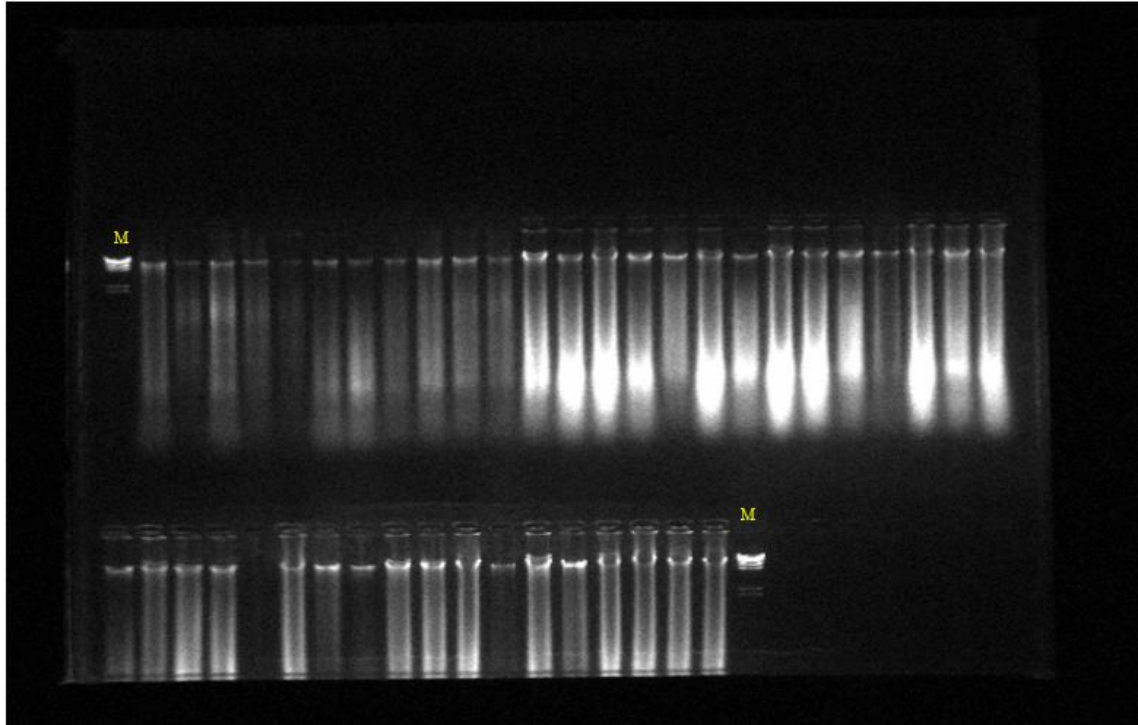
tutulduktan sonra 25 °C'ye alınmıştır. P2K3 metodu ile yapılan denemede 12 ve 7 nolu genotiplerde sürgün ve kallus gelişimi elde edilmiştir (1 ay içerisinde).

P2K3 metodunda hormon free ortam kullanılmasına rağmen sürgün, kök ve bitki gelişimi elde edilmiştir. Bu sonuç bazı genotiplerde endojen hormonların yeterli olduğu şeklinde yorumlanabilir. P1 ve P2'de sürgün rejenerasyonu olmasına rağmen bitki gelişimi elde edilememiştir. Kök gelişimi gerçekleşmediği için bazı rejenerantlar dejenere olmuştur.

Elde edilen bitkiciklerin aklımasyonunda %100 başarılı olunmuştur. Deng ve ark.(2020) aklımizasyonda %70 başarı elde etmiştir. İndüksiyon zamanı açısından bazı genotipler (12 ve 14 nolu genotipler daha erken gelişme göstermiştir (6 günde embriyo oluşumugerçekleşmiştir. Deng ve arkadaşların (2020) yaptıkları çalışmada ise 5 aydan sonra bitki elde edebilmişlerdir bu çalışmada 3 ay içerisinde bitki elde edilebilmiştir Bu farklılıkların genotipe bağlı olduğu düşünülmektedir.

4.2. Farklı Hıyar Genotiplerinin ZYMV, CMV ve PRSVV Dayanım Durumlarının Belirlenmesi

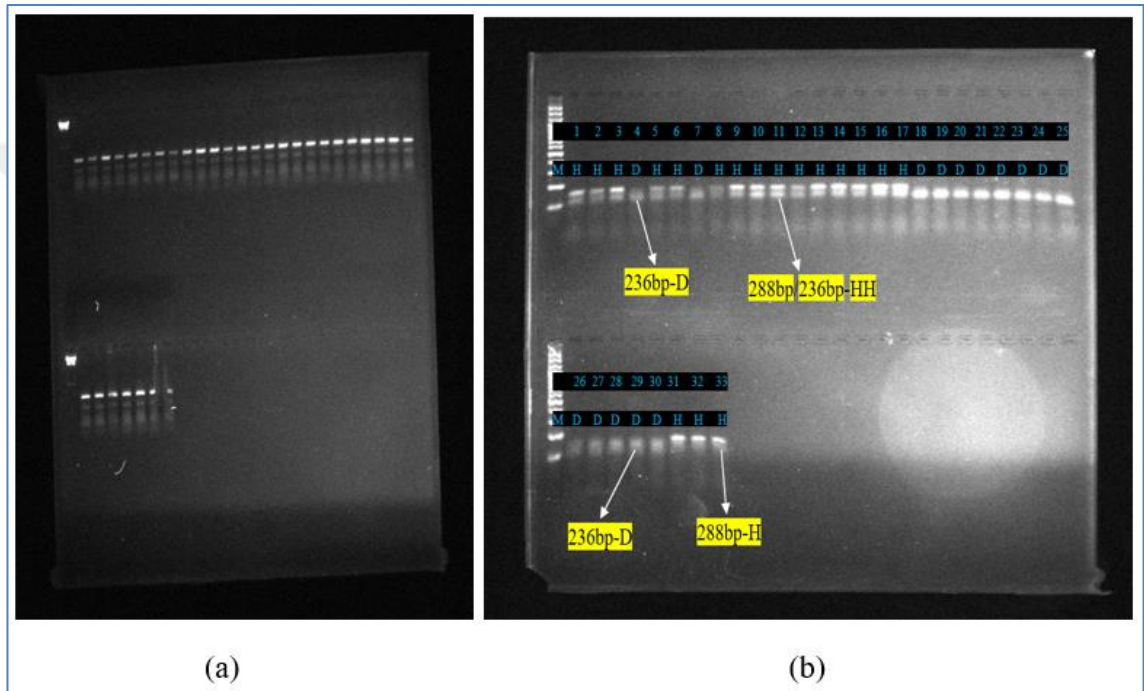
Çalışmamızda 14 tane F1 ve 14 tane saf hat olmak üzere 28 tane genotip ve bir tane kontrol kullanılmıştır. DNA izolasyonundan her hastalık için belirlenen primerler kullanılarak PCR amplifikasyonları yapılmış ve jel elektroforezden sonra elde edilen görüntüler yorumlanmıştır.



Şekil 4.7. Genomik DNA izolasyonu; M: markır (1kb)

4.2.1. Kabak sarı mozaik virüsü hastalığına (ZYMV) dayanıklılığın CAPS markırı ile testlenmesi

ZYMV dayanımı için Amano vd. (2013) tarafından geliştirilen CAPS-T86C primeri kullanılmıştır. Literatüre göre CAPS-T86C markırı ile dayanıklı genotiplerde kesimden sonra 236bp, hassas genotiplerde ise 288bp büyüklüğünde bant beklenmektedir. Markır kodominant ve resesif bir gen tarafından kontrol edildiği için heterogizotlar da hassas olacaktır. Sonuçlara (Şekil 4.1) göre 14 F1 genotipinden 2 tane (genotip 4 ve 7) dayanıklı (rr) ve 12 tane heterozigot hassas (Rr) çıkmıştır. Saf hatlardan ise 3 tanesi heterozigot hassas (Rr) ve 11 tanesi dayanıklıdır (rr). Genotipler ve dayanım durumları çizelge 4.2 'de verilmiştir.



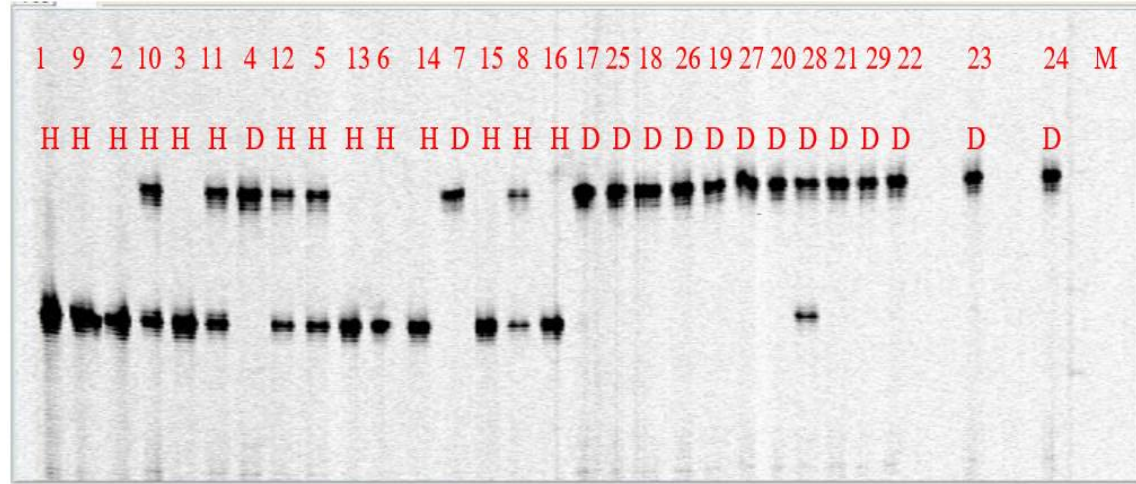
Şekil 4.8. CAPS-T86C markır PCR ve kesim ürünleri; **a)** Kesimden önceki PCR ürünleri; **b)** Kesimden sonraki PCR ürünleri; D: Dayanıklı; H: Hassas; HH: Heterozigot Hassas

4.2.2. Hıyar mozaik virüsü (CMV) hastalığına dayanıklılığın SSR markırları ile testlenmesi

CMV dayanım taraması için Tian ve ark. (2015)'ın geliştirdikleri SSR9-56 ve SSR11-1 flanking markırları kullanılmıştır. İki markır sonuçlarına göre 13 tane hassas (Rr veya RR) genotip (1, 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ve 28 nolu genotip) ve 9 tane dayanıklı (rr) genotip (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ve 25 nolu genotip) bulunmuştur. 6 tane genotip (4, 7, 15, 16, 26, 27) terse veya tutarsız sonuçlar vermiştir. 6, 7, 26 ve 27 nolu genotipler SSR9-56 markırı ile elde edilen sonuçlara göre hassas (Rr) iken SSR11-1'e göre dayanıklıdır (rr). 15 ve 16 nolu genotiplerde ise SSR9-56 ile dayanıklıyken (rr), SSR11-1 ile hassas (RR) çıkmıştır. Bu tutarsızlık rekombinasyondan kaynaklanıyor olabilir.



Şekil 4.9. SSR9-56 PCR ürün görüntüsü (CMV); M: markır; H: Hassas; D: Dayanıklı



Şekil 4.10. SSR11-1 PCR ürün görüntüsü (CMV); H: Hassas; D: Dayanıklı

4.1.3. Papaya halkalı leke virüsü (PRSV) hastalığına dayanıklılığın SSR markırı ile testlenmesi

Genotiplerin PRSV'ye dayanım durumlarının belirlenmesi için Tian ve ark. (2015) tarafından geliştirilen SSR11-177 markırı kullanılmıştır. PRSV'ye dayanıklılık tek resesif gen tarafından kontrol etmektedir. Dolayısıyla homozigot resesif genotipler (rr) dayanıklı, homozigot dominant (RR) ve heterozigot (Rr) genotipler hassas olacaktır. Sonuçlara göre 4 tane dayanıklı (rr) genotip (21, 22, 23 ve 25 nolu genotipler). 3, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 ve 27 nolu genotipler homozigot hassas (RR) bulunurken 1, 2, 4, 5, 7, 8, 12 ve 26 nolu genotipler heterozigot hassas (Rr) bulunmuştur. 6 tane genotipte (17, 18, 19, 20, 24 ve 28 nolu genotipler) bant elde edilememiştir.



Şekil 4.11. SSR11-177 PCR ürün görüntüsü (PRSV); H: Hassas; D: Dayanıklı; ?: ürün elde edilememiş

Çizelge 4.4. Genotiplerin moleküler testleme sonuçlarına göre PRSV, CMV ve ZYMV'ye dayanım durumları

Genotip no.	Genotip ismi	PRSV	CMV		ZYMV
		SSR11-177	SSR9-56	SSR11-1	CAPS-T86C
1	Mozaik F1	Rr (H)	RR (H)	RR (H)	Rr (H)
2	Botanik F1	Rr (H)	RR (H)	RR (H)	Rr (H)
3	Termessos F1	RR (H)	RR (H)	RR (H)	Rr (H)
4	PS64 F1	Rr (H)	Rr (H)	rr (D)	rr (D)
5	SV5603CB F1	Rr (H)	Rr (H)	Rr (H)	Rr (H)
6	Aspendos F1	RR (H)	Rr (H)	RR (H)	Rr (H)
7	Halley F1	Rr (H)	Rr (H)	rr (D)	rr (D)
8	Kirvem	Rr (H)	Rr (H)	Rr (H)	Rr (H)
9	PRS 19-65	RR (H)	Rr (H)	RR (H)	Rr (H)
10	Ariasos F1	RR (H)	Rr (H)	Rr (H)	Rr (H)
11	Çıtır F1	RR (H)	Rr (H)	Rr (H)	Rr (H)
12	Kıtır F1	Rr (H)	RR (H)	Rr (H)	Rr (H)
13	BBY26 F1	RR (H)	RR (H)	RR (H)	Rr (H)
14	Ayda F1	RR (H)	Rr (H)	RR (H)	Rr (H)

Çizelge 4.1'in devamı

Saf hatlar					
15	19—1	RR (H)	rr (D)	RR (H)	Rr (H)
16	20—1	RR (H)	rr (D)	RR (H)	Rr (H)
17	10--Bulk	?	rr (D)	rr (D)	Rr (H)
18	10—1	?	rr (D)	rr (D)	rr (D)
19	10—2	?	rr (D)	rr (D)	rr (D)
20	11—1	?	rr (D)	rr (D)	rr (D)
21	11—2	rr (D)	rr (D)	rr (D)	rr (D)
22	12—1	rr (D)	rr (D)	rr (D)	rr (D)
23	14—B	rr (D)	rr (D)	rr (D)	rr (D)
24	14—1	?	rr (D)	rr (D)	rr (D)
25	14—2	rr (D)	rr (D)	rr (D)	rr (D)
26	43—1	Rr(H)	Rr(H)	rr (D)	rr (D)
27	50—1	Rr (H)	Rr (H)	rr (D)	rr (D)
28	50—2	?	Rr (H)	Rr (H)	rr (D)

5. SONUÇLAR

Ovül kültürü çalışmalarında kullanılan P1 protokolüyle elde edilen sonuçlara göre en yüksek embriyo oluşum oranı 22 nolu genotiple %71 olup en düşük embriyo oluşum oranı %3'dır (15 nolu genotip). 6, 10, 16, 17, 19 ve 21 nolu genotiplerde embriyo elde edilememiştir. Dolayısıyla 6, 10, 16, 17, 19 ve 21 nolu genotipler embriyo oluşumuna güç tepki veren inatçı (recalcitrant) genotipler olarak karşımıza çıkmaktadır. P1 protokolünde ortalama embriyo oluşum oranı %20'dir. Kallus oluşumu bakımından en yüksek kallus oluşum oranı %240 (ortalama 2,4 kallus/eksplant) olup 10 nolu genotipte elde edilirken en düşük kallus oluşum oranı %5 olarak 23 nolu genotipte bulunmuştur. Ortalama kallus oluşum oranı ise %29'dur. Rejenerasyon bakımından en yüksek oran %4,6 olarak 18 nolu genotipte bulunmuştur. En düşük oran ise %0,5 olup 7 nolu genotipte bulunmuştur. Rejenerasyon bakımından 16 tane genotip (1, 4, 6, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ve 28 nolu genotipler) inatçı çıkmıştır. Ortalama rejenerasyon oranı %6'dır. P1 protokolünde rejenerasyon olmasına rağmen bitki elde edilememiştir. Rejenerantların gelişmesi için optimizasyon gerekmektedir. Bitki elde edememesinin sebebi kullandığımız genotiplerden kaynaklanıyor olabilir.

P2 ortamı ile yaptığımız çalışmada en yüksek embriyo oranı %75 olarak 3 nolu genotipte elde edilirken en düşük embriyo oranı %5,8 olarak 6 nolu genotipte elde edilmiştir. Ortalama embriyo oluşum oranı ise %20'dur. Kallus oluşum oranı bakımından en yüksek %11 olarak 4 nolu genotipte elde edilmiştir. En düşük kallus oluşum oranı %1 olup 3, 18 ve 27 nolu genotiplerde bulunmuştur. 1, 5, 11, 12, 13, 19, 22, 23, 24, 26, 27 ve 28 nolu genotiplerde kallus oluşumu gözlemlenmemiştir. Ortalama kallus oluşum oranı ise %29'dur. Rejenerasyon bakımından en yüksek oran %4,6 olarak 18 nolu genotipte en düşük oran ise %0,5 olup 7 nolu genotipte elde edilmiştir. Rejenerasyon bakımından 16 tane (1, 4, 6, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ve 28 nolu genotipler) inatçı çıkmıştır. Ortalama rejenerasyon oranı %6'dır. P2 ortamında rejenerasyon elde edilmesine rağmen bitki gelişimi gerçekleşmemiştir. Rejenerantların gelişmesi için optimizasyon gerekmektedir.

P2K3 protokolü ile yaptığımız denemede en yüksek embriyo oluşum oranı %104 olup (1,04 embriyo/eksplant) 4 nolu genotiple elde edilirken en düşük embriyo oluşum oranı % 2,5 olup 2 nolu genotipte bulunmuştur. 1, 16 ve 23 nolu genotipler inatçı bulunmuştur. P2K3 protokolü ile yaptığımız çalışmada ortalama embriyo oluşum oranı %20'dir. En yüksek kallus oluşum oranı %88 olarak 14 nolu genotipte elde edilirken en düşük kallus oluşum oranı %3,8 ile 11 nolu genotipte bulunmuştur. Bunun yanında 22 tane (1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ve 28) genotipte kallus oluşmamıştır. Kallus oluşumu bakımından inatçıdır. Ortalama kallus oluşum oranı %29 olmuştur. Sürgün rejenerasyona geldiğimizde en yüksek oran %470 (4,7 sürgün/explant) ile 14 nolu genotipte bulunmuştur. En düşük rejenerasyon oranı %1 olarak 12 nolu genotipte elde edilmiştir. 21 tane genotipte (1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ve 28) rejenerasyon olmamıştır. Ortalama

rejenerasyon oranı %6'dır. Bu rejenerantlardan bitki elde edilebilmiştir. 7 nolu genotipten 3 tane diploid, 11 nolu genotipten 4 tane (hepsi haploid) ve 14 nolu genotipten 11 tane (hepsi diploid) ve 12 nolu genotipten 1 tane (diploid) bitki olmak üzere toplam 19 bitki elde edilmiştir.

P2K3 protokolü farklı genotiplerde denenerek hıyar genotipinden haploid bitki elde edebilmek için yapılan çalışmalara dahil edilebilir.

Genotiplerin hastalık dayanımlarının belirlenmesi için yapılan moleküler analizlerde ZYMV dayanımı için 14 F1 genotipinden 2 tane (genotip 4 ve 7) dayanıklı (rr) ve 12 tane heterozigot hassas (Rr) çıkmıştır. 14 saf hatlardan ise 3 tanesi heterozigot hassas (Rr) ve 11 tanesi dayanıklıdır (rr).

CMV dayanımı için iki flanking markır (SSR9-56 ve SSR11-1) sonuçlarına göre 13 tane hassas (Rr veya RR) genotip (1, 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ve 28 nolu genotipler) ve 9 tane dayanıklı (rr) genotip (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ve 25 nolu genotip) bulunmuştur. 6, 7, 26 ve 27 nolu genotipler SSR9-56 markırı ile elde edilen sonuçlara göre hassas (Rr) iken SSR11-1'e göre dayanıklıdır (rr). 15 ve 16 nolu genotiplerde ise SSR9-56 ile dayanıklıyken (rr), SSR11-1 ile hassas (RR) çıkmıştır. Bu tutarsızlık rekombinasyondan kaynaklanıyor olabilir.

PRSV dayanımı için yapılan analizlerin sonucunda 4 tane dayanıklı (rr) genotip (21, 22, 23 ve 25 nolu genotipler) tespit edilmiştir. 3, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 ve 27 nolu genotipler homozigot hassas (RR) bulunurken 1, 2, 4, 5, 7, 8, 12 ve 26 nolu genotipler heterozigot hassas (Rr) bulunmuştur. 6 tane genotipte (17, 18, 19, 20, 24 ve 28 nolu genotipler) bant elde edilememiştir.

6. KAYNAKLAR

- Aalders, L.E., 1958. *Monoploidy in cucumbers*. J. Hered. 49: 41-44.
- ABDOLLAHI, M. R., NAJAFI, N., SARIKHANI, H., MOOSAVI, S.S. 2015. *Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (Cucumis sativus L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium*. Turk J Biol (2016) 40: 571-579.
- Abul-Hayja, Z., Al-Shahwan, I. 1991. *Inheritance of resistance to zucchini yellow mosaic virus in cucumber*. J Plant Dis Prot 98: 301–304.
- Akbari, M., et al. 2006. *Diversity arrays technology (DArT) for highthroughput profiling of the hexaploid wheat genome*. Theor. Appl. Genet., 2006, vol. 113, no. 8, pp. 1409–1420. doi 10.1007/s0012200603654.
- Aktaş, B., Yurtmen, M., Uzunoğulları, N., Özdemir, S., ve Güneş, S. 2008. Virüs Hastalıkları. In : Aydemir, M. (ed). Zirai Mücadele Teknik Talimatları Cilt III. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Araştırma ve Teknoloji Geliştirme Kampüsü, Ankara.
- Amano, M., Mochizuki, A., Kawagoe, Y., Iwahori, K., Niwa, K., Svoboda, J., Maeda, T., Imura, Y. 2013. *High-resolution mapping of zym, a recessive gene for Zucchini yellow mosaic virus resistance in cucumber*. Theor Appl Genet 126: 2983–2993. DOI 10. 1007/s00122-013-2187-5.
- Andersen, S.B. 2005. Haploids in the improvement of woody species. In: Palmer CE, Keller WA, Kasha K (eds) Haploids in crop improvement II, vol 56. Springer, Heidelberg, pp 243–257.
- Anjorin, S.T. and Mohammed, M. 2009. *Effect of seed borne fungi on germination and seedling growth of water melon (Citrullus lanatus)*. Journal of Agriculture and Social Sciences. 5: 77–80.
- Anonim1, 2020: List of countries by cucumber production: https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_countries_by_cucumber_production [Son erişim tarihi: 18.12.2020].
- Anonymous 2: Top Cucumbers Exporting Countries. <https://www.worldstopexports.com/top-cucumbers-exporting-countries/> [Son erişim tarihi: 17.04.2021].
- Asadi, A., Zebarjadi, A., Abdollahi, M.R., Seguí-Simarro, J.M. 2018. *Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (Cucumis sativus L.)*. Euphytica, 40, 571–579.
- Ashok Kumar H.G., Ravishankar B.V., Murthy H.N., 2004. *The influence of polyamines on androgenesis of Cucumis sativus L.* Eur. J. Hortic. Sci. 5: 201-205.
- Aydemir, I. 2009. Determination of genetic diversity in cucumber (Cucumis sativus L.) germplasms. MSc, İzmir Institute of Technology, Turkey.
- Barnes, W.C. and Epps, W.M. 1956. *Powdery mildew resistance in South Carolina cucumbers*. Plant Dis. Res. 40: 1093.

- Bates, D.M., Robinson, R. W., 1995. *Cucumbers, melons and watermelons Cucumis and Citrullus (Cucurbitaceae)*. 22nd Edn. Longman Scientific, Harlow, Essex, UK. p. 89-96.
- Bhat, J. G, Murthy, H. N. 2007. *Factors affecting in vitro-gynogenic haploid production in niger (Guizotia abyssinica (L.f.) Cass.)*. Plant Growth Regul. 52: 241–248.
- Blanger, R.R. and Labbé, C. 2002. Control of powdery mildews without chemicals: prophylactic and biological alternatives for horticultural crops. In: *The Powdery Mildews. A Comprehensive Treatise* (Bélanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J. and Carver, T.L.W., eds), pp. 256–267. Saint Paul, MN: APS Press.
- Blakeslee, A.F., Belling, J., Farnham, M.E., Bergner, A.D., 1922. *A Haploid Mutant in the Jimson Weed, "Datura stramonium"*. Science; 55(1433):646–647.
- Cao, Y., Diao, Q., Chen, Y., Jin, H., Zhang, Y., and Zhang, H. 2021. *Development of KASP Markers and Identification of a QTL Underlying Powdery Mildew Resistance in Melon (Cucumis melo L.) by Bulk Segregant Analysis and RNA-Seq*. Shanghai Key Lab of Protected Horticultural Technology, Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai, China.
- Clausen, Roy E. and Mann, Margaret C. 1924. *Inheritance in Nicotiana Tabacum. V. The Occurrence of Haploid Plants in Interspecific Progenies*. Proc Natl Acad Sci U S A. ; 10(4): 121–124.
- Cardoso, AII., Pavan, MA., Krause-Satake, R., Fattori, F. 2010. *Inheritance of cucumber tolerance to Zucchini yellow mosaic virus*. J Plant Pathol 92:245–248.
- Cook, A.A. 1972. *Virus diseases of papaya*. Fla. Agr. Exp. Sta. Bull. 750 (Tech.), 19pp.
- ÇAĞLAR, G., ABAK, K. 1999. *Hıyarda (Cucumis sativus L.) in situ Uyarım Sonucu Elde Edilen Haploid Embriyolardan in vitro Haploid Bitki Oluşturma*. Tr. J. of Agriculture and Forestry 23 (1999) 283–290.
- Çağlar, Y., KORUK, M., DOĞAN, A. C., ELLİALTIOĞLU, Ş. Ş. 2020. *Farklı Hıyar Genotiplerinin Işınlanmış Polenle Tozlama ile Partenogenetik Embriyo Oluşturma Frekansları ve Haploid Embriyo Gelişimi*.
- Collard, B.C. et al. 2005. *An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts*. Euphytica. 2005;142(1–2):169–196.
- Chambonnet, D., Dumas de Vaulx, R. 1985. *Obtention of embryos and plants from in vitro culture of unfertilized ovules of Cucurbita pepo*. Cucurbit Genetics Coop. Rep. 8: 66.
- Chand, S. and Sahrawat, A.K. 2007. *Embryogenesis and plant regeneration from unpollinated ovary culture of Psoralea corylifolia*. Biol. Plant. 51: 223–228.
- Clausen, R.E. and Mann, M.C. 1924. *Inheritance in Nicotiana tabacum. V. The occurrence of haploid plants in interspecific progenies*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 10, 121–124.
- De Fossard, R. A. 1974. *Terminology in "Haploid" research*. In: *Haploids in Higher Plants. Advances and Potential*. Kasha, K.J. (Ed.), Univ. of Guelph, Guelph, pp.403-410.

- Diao, W.P., Jia, Y.Y., Song, H., Zhang, X.Q., Lou, Q.F., Chen, J.F. 2009. *Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers*. Scientia Horticulturae, 119, 246–251. doi:10.1016/j.scienta.2008.08.016.
- Dong, Y. Q., Wei-Xing Zhao, W. X., Li, X. H., Liu, X. C., Gao, N. N., Jin-Hua Huang, J. H., Wang, W. Y., Xu, X. L., Tang, Z. H. 2016. *Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016. DOI 10.1007/s00299-016-2018-7.
- Dirks, R. 1996. *Method for the production of doublehaploid cucumbers*. United States Patent No. 5,492, 827.
- Dirks, R., Van Dun, K., De Snoo, C.B., Van Den Berg, M., Lelivelt, C.L., Voermans, W., Van Der Zeeuw, E. 2009. *Reverse breeding: A novel breeding approach based on engineered meiosis*. Plant Biotechnology Journal, 7, 837–845. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00450.x.
- Dumas de Vaulx, R. 1979. *Obtention de plantes haploides chez le melon (Cucumis melo L.) apres pollinisation par Cucumis ficifolius*. A. Rich. C. R. Acad. Sci. III-Vie 289: 875-878.
- De Candolle, A., 1967. *Origin of cultivated plants* (2 ed.), Hafner Publishing Co. USA.
- Dunwell, J.M. 2010. *Haploids in flowering plants: origins and exploitation*. Plant Biotechnol J. 8: 377–424.
- Deng, Y., Tang, B., Zhou, Xia., Fu, W., Tao, L., Zhang, L., Chen, J. 2020. *Direct regeneration of haploid or doubled haploid plantlets in cucumber (Cucumis sativus L.) through ovary culture*.
- Dryanovska, O.A., Ilieva I.N., 1983. *In vitro anther and ovule cultures in muskmelon (Cucumis melo L.)*. Proc. Bulgarian Academy of Sciences 36: 1107-1110.
- Emiroglu, Ü., 1980. Türk Tütün Çesitlerinde Anter Kültürü. Bitki Islahı Simp., (22–25 Mayıs 1979). Ege Bölge Zir. Aras. Enst. Yay. No:17/41, 12–18.
- Dirks, R., Van Dun, K., De Snoo, C.B., Van Den Berg, M., Lelivelt, C.L., Voermans, W., Van Der Zeeuw, E. 2009. *Reverse breeding: A novel breeding approach based on engineered meiosis*. Plant Biotechnology Journal, 7, 837–845. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00450.x.
- Faris, N.M., Nikolova, V., Niemirowicz-Szczytt, K. 1999. *The effect of gamma irradiation dose on cucumber (Cucumis sativus L.) haploid embryo production*. Acta Physiologiae Plantarum, 21, 391–396. doi: 10.1007/s11738-999-0011-2.
- FAOSTAT. Retrieved 22 December 2020. Countries - Select All; Regions - World + (Total); Elements - Production Quantity; Items - Cucumbers and gherkins; Years – 2019+2018 + 2017 + 2016: <http://www.fao.org/faostat/en/>.
- Ficcadenti, N., Sestili, S., Annibali, S. 1999. *In vitro gynogenesis to induce haploid plants in melon (Cucumis melo L.)*. J. Genet. Breed. 53: 255-257.
- Fukino, N., Yoshioka, Y., Sugiyama, M., Sakata, Y., Matsumoto, S. 2013. *Identification and validation of powdery mildew (Podosphaera xanthii) resistant loci in*

- recombinant inbred lines of cucumber (Cucumis sativus L.)*. Mol Breed 32:267–277.
- Fugieda, K. and Akiya, Y. 1962. *Genetic study of powdery mildew resistance and spine color on fruit in cucumber*. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 31: 30-32. <https://doi.org/10.2503/jjshs.31.30>.
- Gonsalves, D., Vegas, A., Prasartsee, V., Drew, R., Suzuki, J.Y. and Tripathi, S. 2006. *Developing papaya to control Papaya ringspot virus by transgenic resistance, intergeneric hybridization, and tolerance breeding*. In: Plant Breeding Reviews Vol. 26 (Janick, J., ed.), pp. 35–73. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc.
- Gonsalves, D., S. Tripathi, J. B. Carr, and J. Y. Suzuki. 2010. *Papaya Ringspot virus*. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI2010100401.
- GAINES, E. F. AND AASE, H. C., 1926. *A Haploid Wheat Plant*. American Journal of Botany, Vol. 13, No. 6, pp. 373- 385. <https://www.jstor.org/stable/2435439>.
- Gémes Juhász, A., Venczel, G., Balogh, P. 1997. *Haploid plant induction in zucchini (Cucurbita pepo L. convar. giromontiina Duch) and in cucumber (Cucumis sativus L.) lines through in vitro gynogenesis*. Acta Hort. 447: 623-625.
- Gémes Juhász, A., Balogh, P., Ferenczy, A., Kristóf, Z. 2002. *Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (Cucumis sativus L.)*. Plant Cell Rep 21:105–111.
- Guha, S. and Maheshwari, S.C. 1964. *In vitro production of embryos from anthers of Datura*. Nature 204, 497.
- Guha, S. and Maheshwari, S.C. 1966. *Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of Datura in vitro*. Nature 212, 97–98.
- Germanà, M.A. 1997. Haploidy in Citrus. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro haploid production in higher plants*, vol 5. Kluwer, Dordrecht, pp 195–217.
- Germanà, M.A. 2006. *Doubled haploid production in fruit crops*. Plant Cell Tiss Org. 86:131–46.
- Germanà, M.A. 2007. Haploidy. In: Khan I (ed) *Citrus. Genetics, breeding and biotechnology*. CABI, Wallingford, pp 167–196.
- Germanà, M.A. 2009. Haploid and doubled haploids in fruit trees. In: Touraev A, Forster B, Jain M (eds) *Advances in haploid production in higher plants*. Springer, Heidelberg, pp 241– 263.
- Germanà, M.A. 2011a. *Anther culture for haploid and doubled haploid production*. Plant Cell Tiss Org. 104: 283–300.
- Germanà, M.A. 2011b. *Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding*. Plant Cell Rep.30: 839-857.
- Huang, H.H. 2007. *Studies on molecular maker of cucumber mosaic virus resistance-related gene in cucumber (cucumis sativus L.)*. Dissertation, Northwest A&F University. 2007.
- Hayase, H. 1954. *Cucurbita crosses. Occurrence of a haploid twin pair from a F1 progeny of C. maxima × C. moschata*. Jpn. J. Breed. 4: 55.

- He, X. et al. 2013. *QTL mapping of powdery mildew resistance in WI 2757 cucumber (Cucumis sativus L.)*. Theor. Appl. Genet. 126: 2149-2161. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2125-6>.
- Hosemans, D., Bassoutrot, D. 1983. *Induction of Haploid Plants from in vitro Culture of Unpollinated Beet Ovules (Beta vulgaris L.)*. Z.Pflanzenzüchtg, Berling. 91, 74–77.
- Jiang, GL. 2013. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. In: Andersen SB, editor. Plant breeding from laboratories to fields. Rijeka: InTech; p. 45–83.
- Kabelka, E., Grumet, R. 1997. *Inheritance of resistance to the Moroccan watermelon mosaic virus in the cucumber line TMG-1 and cosegregation with zucchini yellow mosaic virus resistance*. Euphytica 95:237–242.
- Kabelka, E., Ullah, Z., Grumet, R. 1997. *Multiple alleles for zucchini yellow mosaic virus resistance at the zym locus in cucumber*. Theor App Genet 95: 997–1004.
- Kasha, K.J. (ed) 1974. Haploids in higher plants: advances and potential. The Office of Continuing Education, University of Guelph Press, Guelph.
- Kasha, K.J., Maluszynski, M. 2003. Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_1.
- Kebriyae, D. et al. 2012. *QTL analysis of agronomic traits in rice using SSR and AFLP markers*. Not Sci Biol. 2012;4(2):116–123.
- Kimber, G. and Riley, R. 1963. *Haploid angiosperms*. Bot. Rev. 29, 480–531.
- Kilian, A. Et al. 2003. The fast and the cheap: SNP and DArTbased whole genome profiling for crop improvement. In the wake of the double helix: From the green revolution to the gene revolution, Proceedings of the International Congress, May 27–31, 2003, Tuberosa, R., Phillips, R.L., and Gale, M., Eds., Bologna, 2005, pp. 443–461.
- Khanzada, K.A., M.A. Rajput, G.S. Shah, A.M. Lodhi, and F. Mehboob. 2001. *Effect of seed dressing fungicides for the control of seed borne mycoflora of wheat*. Asian Journal of Plant Sciences. 1: 441–444.
- Kooistra, E. 1968. *Powdery mildew resistance in cucumber*. Euphytica 17: 236-244.
- Kooistra, E. 1969. *Inheritance of resistance cucumis virus in cucumber (cucumis sativus L.)*. Euphytica. 1969; 18: 326–332.
- Kooistm, E. 1971. *Inheritance of flesh and skin colors in powdery mildew resistance cucumber (Cucummis sativas L.)*. Euphytica 20: 521-523.
- Kuzuya, M., Hosoya, K., Yashiro, K., Tomita, K., Ezura, H. 2003. *Powdery mildew (Sphaerotheca fuliginea) resistance in melon is selectable at the haploid level*. J Exp Bot 54(384):1069–1074.
- Kwack, S.N., Fujieda, K. 1988. *Somatic embryogenesis in cultured unfertilized ovules of Cucurbita moschata*. J Jpn Soc Hortic Sci 57(1):34–42.

- Kumar, H. 1984. Differentiation in anther culture of two cucurbits. Genetic manipulation in crops: proceedings of the International Symposium on Genetic Manipulation in Crops, the 3rd International Symposium on Haploidy, the 1st International Symposium on Somatic Cell Genetics in Crops, Beijing: 45-47.
- Kumar, H.A., Murthy, H., Paek, K. 2003. *Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of Cucumis sativus L.* Scientia Horticulturae, 98,213–222. doi:10.1016/S0304-4238(03)00003-7.
- Lazarte J.E., Sasser C.C., 1982. *Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of Cucumis sativus L.* HortScience 17: 88.
- Lecoq, H., Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Girard, M., Pitrat, M. 2002. Durability of zucchini yellow mosaic virus resistances in cucurbits. In: Maynard DN (ed) Cucurbitaceae 2002. ASHS Press, Alexandria, pp 294–300.
- Leppik, E.E., 1966: *Searching gene centers of the genus Cucumis through host-parasite relationship.* Euphytica; 15: p. 323-338.
- Lespinasse, Y., Godicheau, M., Duran, M., 1983. Potential Value and Method of Producing Haploids on the Apple Tree, *Malus pumila* (Mill.). In Vitro Culture. Acta Horticulturae, 131, 223–230.
- Li, J.W., Si, S.W., Cheng, J.Y., Li, J.X., and Liu, J.Q. 2013. *Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of Cucumis sativus.* Biol. Plant. 57:164–168. doi: 10.1007/s10535-012-0269-x.
- Li, B. et al. 2017. *Mapping of powdery mildew resistance genes in melon (Cucumis melo L.) by bulked segregant analysis.* Sci. Horticult. 220, 160–167. doi: 10.1016/j.scienta.2017.04.001.
- Liu, P.N., Miao, H., Lu, H.W., Cui, J.Y., Tian, G.L., Wehner, T.C., Gu, X.F. and Zhang, S.P. 2017. *Molecular mapping and candidate gene analysis for resistance to powdery mildew in Cucumis sativus stem.* Genet. Mol. Res. 16 (3): gmr16039680. DOI.
- Lofti, M., Alan, A.R., Henning, M.J., Jahn, M.M., Earle, E.D. 2003. *Production of haploid and double haploid plants of melon (Cucumis melo L.) for use in breeding for multiple virus resistance.* Plant Cell Rep 21(11):1121–1128.
- Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I. 2003a. *Doubled haploid production in crop plants: a manual.* Kluwer, Dordrecht.
- Maluszynski, M., Kasha, K.J., Szarejko, I. 2003b. Published double haploid protocols in plant species. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Haploid production in crop plants: a manual. Kluwer, Dordrecht, pp 309–335.
- Magoon, M.L. and Khanna, K.R. 1963. Haploids. Caryologia. 16: 191–234.
- Manshardt, R.M. and Wenslaff, T.F. 1989. *Interspecific hybridization of papaya with other Carica species.* J. Am. Soc. Hortic. Sci. 114, 689–694.
- Marathe, R., Guan, Z., Anandalakshmi, R., Zhao, H., Dinesh-Kumar, S.P. 2004. *Study of Arabidopsis thaliana resistome in response to Cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray.* Plant Mol. Biol. 2004; 55:501–520. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0439-0> PMID: 15604696.

- Mansilla, P.J., A.G. Moreira, A.P.O.A. Mello, J.A.M. Rezende, J.A. Ventura, V.A. Yuki, and F.J. Levatti. 2013. *Importance of cucurbits in the epidemiology of Papaya ringspot virus type p*. *Plant Pathology*. 62(3): 571–577.
- Martyn, R.D. 1986. *Use of soil solarization to control Fusarium wilt of watermelon*. *Plant Disease*. 79: 762–766.
- Mao, A.J. et al. 2005. *Inheritance of resistance to powdery mildew in two cucumber varieties*. *Zhongguo Nongxue Tongbao* 21: 302-305.
- Mishra, V.K and Goswami, R. 2014. *Haploid Production in Higher Plant*. *Int. J. Chem. Biol. Sci*, 2014.
- Metwally EI, Moustafa S.A., El-Sawy B.I., Haroun S.A., Shalaby T.A. 1998. *Production of haploid plants from in vitro culture of unpollinated ovules of Cucurbita pepo*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 52(3):117–121.
- Mohamed, M.F., Refaei, E.F.S. 2004. *Enhanced haploids regeneration in anther culture of summer squash (Cucurbita pepo L.)*. *Cucurbit Genetics Coop. Rep.* 27: 57-60.
- Morishita, M., Sugiyam, K., Saito, T. and Sakata, Y. 2003. *Powdery mildew resistance in cucumber*. *Jpn. Agric. Res. Q.* 37: 7-14. <https://doi.org/10.6090/jarq.37.7>.
- Nam, Y.W., J.R. Lee, K.H. Song, M.K. Lee, M.D. Robbins, S.M. Chung, J.E. Staub, and H.B. Zhang. 2005. *Construction of two BAC libraries from cucumber (Cucumis sativus L.) and identification of clones linked to yield component quantitative trait loci*. *Theor Appl Genet* 111: 150–161.
- Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G. and Francki, R.I. 1992. *Cucumber mosaic virus*. *Adv. Virus Res.* 41, 281–348.
- Park, Y.H., Sensoy, S., Wye, C., Antonise, R., Peleman, J., Havey, M.J. 2000. *A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs, and loci conditioning resistance to papaya ringspot and zucchini yellow mosaic viruses*. *Genome* 43:1003–1010.
- Park, Y., Katzir, N., Brotman, Y., King, J., Bertrand, F., Havey, M. 2004. *Comparative mapping of ZYMV resistance in cucumber (Cucumis sativus L.) and melon (Cucumis melo L.)*. *Theor Appl Genet* 109: 707–712.
- Plapung, P., Khamsukdee, S., Potapohn, N., Smitamana, P. 2014. *Screening for cucumber mosaic resistant lines from the ovule culture derived double haploid cucumbers*. *Am J Agric Biol Sci* 9: 261–269.
- Plapung, P., Khamsukdee, S., Potapohn, N., Smitamana, P. 2014a. *Screening for cucumber mosaic resistant lines from the ovule culture derived double haploid cucumbers*. *Am J Agric Biol Sci* 9(3):261–269.
- Plapung, P., Khamsukdee, S., Smitamana, P. 2014b. *Development of cucumber lines resistant to Cucumber mosaic virus by ovule culture*. *Int J Agric Technol* 10(3):733–741.
- Pierik, R.L.M., 1989. *In vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, 344 p.
- Provvidenti, R. 1985. *Source of resistance to virus in two accessions of Cucumis sativus*. *Cucurbit Genet Coop Rep* 8:12.

- Provvidenti, R. 1987. *Inheritance of resistance to a strain of zucchini yellow mosaic virus in cucumber*. Hort Science 22: 102–103.
- Ramírez-Madera, A. O. and Havey, M. J. 2017. *Different haplotypes encode the same protein for independent sources of Zucchini Yellow Mosaic Virus resistance in cucumber*. HortScience 52, 1040–1042.
- Riley, R. 1974. The status of haploid research. In *Haploids in Higher Plants. Advances and Potential. Proceedings of the First International Symposium* (Kasha, K.J., ed.), pp. 3–9, Guelph University Press.
- Roossinck, M.J. 2001. *Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution*. Mol. Plant Pathol. 2, 59–63.
- Risser, G., Pitrat, M., Rode, J. C. 1977. *Etude de la re'sistance du melon (Cucumis melo L.) au virus de la mosaïque du concombre*. Ann Ame'l Plant. 1977; 27:509–522.
- Roossinck, M.J. 2001. *Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution*. Mol.Plant Pathol. 2, 59–63.
- Sakata, Y. et al. 2006. *QTL analysis of powdery mildew resistance in cucumber (Cucumis sativus L.)*. Theor. Appl. Genet. 112: 243-250. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0121-1>.
- San Noeum, L.H. 1976. *Haploides d'Hordeum vulgare L. Par culture in vitro non fecondes*. Ann. Amelior. Plantes. 26: 751-754.
- Sari, N., Solmaz, I., Kasapoglu, S., Gursoy, I., Szamosi, C., Unlu, H., Park, K.S. 2010b. *Effect of different pollination dates with irradiated pollens on fruit set, haploid embryo induction and plant obtention in Turkish (Kirkagac, Yuva and Hasanbey) melons*. Acta Hort 871(1):639–648.
- Sauton, A., 1989. *Haploid gynogenesis in Cucumis sativus induced by irradiated pollen*. Cucurbit Genetics Coop. 12: 22-23.
- Smiech, M, Sztangret-Wis'niewska, J., Galecka, T., Korzeniewska, A., Marzec, L., Kolakowska, G., Piskurewicz, U., Niemirowicz-Szczytt, K. 2008. *Potential use of RAPD markers in characteristics of cucumber (Cucumis sativus L.) haploids and double-haploids*. Acta Soc Bot Pol 77(1):29–34.
- Smith, P.G. 1948. *Powdery mildew resistance in cucumber*. Phytopathology 39: 1027-1028.
- Swam inathan, M.S., Singh, M.P., 1958. *X-ray induced somatic haploidy in watermelon*. Curr. Sci. India 27: 63-64.
- Shalaby, T. A. 2007. *Factors affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer squash (Cucurbita pepo L.)*. Sci Hortic. 115: 1–6.
- Shail, J.W., Robinson, R.W. 1987. *Anther and ovule culture of Cucurbita*. Cucurbit Genetics Coop. 10: 92.
- Shariatpanahi, M.E., Ahmadi, B., 2016. *Isolated microspore culture and its applications in plant breeding and genetics*. In: Anis M, Ahmad N (eds), Plant tissue culture: propagation, conservation and crop improvement. Springer Science + Business Media Singapore, pp 487–507.

- Shi, L., Yang, Y., Xie, Q., Miao, H., Bo, K., Song, Z., Wang, Y., Xie, B., Zhang, S., Gu, X. 2018. *Inheritance and QTL mapping of cucumber mosaic virus resistance in cucumber (Cucumis Sativus L.)*. David A. Lightfoot, College of Agricultural Sciences, UNITED STATES. PLoS ONE 13(7): e0200571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200571>.
- Song, H., Lou, Q.-F., Luo, X.-D., Wolukau, J., Diao, W.-P., Qian, C.-T., and Chen, J.-F. 2007. *Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (Cucumis sativus L.)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 90, 245–254. doi:10.1007/s11240-007-9263-y.
- Sorntip, A., Poolsawat, O., Kativat, C. and Tantasawat, P.A. 2017. *Gynogenesis and doubled haploid production from unpollinated ovary culture of cucumber (Cucumis sativus L.)*.
- Srivastava, P. and Chaturvedi, R. 2008. *In vitro androgenesis in tree species: an update and prospect for further research*. Biotechnol Adv. 26: 482–491.
- Şığva, H. Ö., Fırat, A. F., Hazarhun, G., İpek, A. 2015. *Development of AFLP markers associated with zucchini yellow mosaic virus resistance in cucumber (Cucumis sativus L.)*. Turk J Bot (2015) 39: 982-987. doi:10.3906/bot-1502-35.
- Swaminathan, M.S., and Singh, M.P. 1958. *X-ray induced somatic haploidy in watermelon*. Curr. Sci. 27:63-64.
- Shanmugasundaram, S., Williams, P.H. and Peterson, C.E. 1971. *Inheritance of resistance to powdery mildew in cucumber*. Phytopathology 61: 1218-1221. <https://doi.org/10.1094/Phyto-61-1218>.
- Suprunova T., Shmykova N., 2008. In vitro induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of Cucumis sativus. In: Cucurbitaceae 2008. M. Pitrat (ed.). Proc. IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae. 21-24 May, Avignon, France.
- T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Bitki Sağlığı ve Karantina Daire Başkanlığı 2011. *Hıyar Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele*. Ankara, 2011 : T.C. TARIM VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. HIYAR Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele.pdf.
- Tang, F.Y., Tao, Y.Z., Zhao, T.Y., Wang, G.Y. 2006. *In vitro production of haploid and double haploid plants from pollinated ovaries of maize (Zea mays)*. Plant Cell Tiss Org. 84: 233–237.
- Tang, Y., Li, X., Li, J., Ma, C., Lai, J., Li, H. 2012. *Effect of different pretreatment on callus formation from anther in balsam pear (Momordica charantia L.)*. J Med. Plants Res. 6(17): 3393-3395.
- Tantasawat, P.A., Sorntip, A., Poolsawat, O., Chaowiset, W., Pornbungkerd, P. 2015. *Evaluation of factors affecting embryo-like structure and callus formation in unpollinated ovary culture of cucumber (Cucumis sativus L.)*. Int J Agric Biol 17(3):613–618.
- Thomas WTB, Forster BP, Gertsson B. 2003. Doubled haploids in breeding. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid

- production in crop plants, a manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp 337–349.
- Tian, G.L., Yang, Y.H., Zhang, S.P., Miao, H., Lu, H.W., Wang, Y., Xie, B.Y., Gu, X.F., 2015. *Genetic analysis and gene mapping of Papaya ring spot virus resistance in cucumber*. Mol Breed 35: 110.
- Tian, G., Miao, H., Yang, Y., Zhou, J., Lu, H., Wang, Y., Xie, B., Zhang, S., Gu, X., 2016. *Genetic analysis and fine mapping of Watermelon mosaic virus resistance gene in cucumber*. Mol Breeding. 36: 131 DOI 10.1007/s11032-016-0524-5.
- Touraev, A., Forster, B.P. and Jain, S.M. (eds) 2009. Advances in haploid production in higher plants. Springer, Berlin.
- Truong-Andre, I. 1988. *In vitro haploid plants derived from pollination by irradiated pollen on cucumber*. Proc. Eucarpia Mtg. On Cucurbitaceae, Avignon-Montfavet, France 88 :143-144.
- Van Luijk, M.N. 2004. *Cucumis sativus L.* In: Grubben, G.J. H. & Denton, O.A. (Eds). Plant Resources of Tropical Africa 2. Vegetables. PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands / Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands / CTA, Wageningen, Netherlands, pp. 251-256.
- Wang, Y.J., Provvidenti, R., Robinson, R.W. 1984. *Inheritance of resistance in cucumber to Watermelon mosaic virus 1*. HortScience 19:587–588
- Wang, H.J., Wu, Y., Gu, W., Sun, X.D., Qin, Z.W. *Extraction of DNA from cucumber by improved CTAB method*. Hei-longjiang Agric Sci. 2006; 5:124–125.
- Wang, Y.H., Joobeur, T., Dean, R. A. and Staub, J.E. 2007. *Cucurbits. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants 5: Vegetables*.
- Wang, J. H. *Construction of a genetic linkage map and QTL analysis of the anti-CMV trait in cucumber (cucumis sativus L.)*. Dissertation, Northwest A&F University. 2010.
- Wang, Y. et al. 2016. *QTL mapping for downy mildew resistance in cucumber inbred line WI7120 (PI 330628)*. Theor. Appl. Genet. 129, 1493–1505.
- Wang, Y. et al. 2018. *QTL mapping of downy and powdery mildew resistances in PI 197088 cucumber with genotyping-by-sequencing in RIL population*. Theor. Appl. Genet. 131, 597–611.
- Wang, Y. et al. STAYGREEN, STAY HEALTHY 2019: *A loss-of-susceptibility mutation in the STAYGREEN gene provides durable, broad-spectrum disease resistances for over 50 years of US cucumber production*. New Phytol. 221, 415–430.
- Wang, Y., Gu, X.F., Zhang, S.P., Miao, H. 2015. *Studies on haploid plant induction via in vitro unfertilized ovule culture of cucumber*. Acta Horticulturae Sinica 42:2174–2182.
- Wang, Y., Bo, K., Gu, X., Pan, J., Li, Y., Chen, J., Wen, C., Ren, Z., Ren, H., Chen, X., Grumet, R. and Weng, Y. 2020. *Molecularly tagged genes and quantitative trait loci in cucumber with recommendations for QTL nomenclature*. Horticulture Research (2020) 7:3, <https://www.nature.com/articles/s41438-019-0226-3.pdf>.

- Wang, Y. et al. 2020. *Molecularly tagged genes and quantitative trait loci in cucumber with recommendations for QTL nomenclature*. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0226-3>.
- Walters, S.A., Shetty, N.V. and Wehner, T.C. 2001. *Segregation and linkage of several genes in cucumber*. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 126: 442-450.
- Wasuwat, S.L., Walker, J.C. 1961. *Inheritance of resistance in cucumber to cucumber mosaic virus*. *Phytopathology*. 1961; 51: 423-428.
- Wedzony, M., Forster, B.P., Zur, I., Golemić, E., Szechynska-Hebda, M., Dubas. Gotebiowska, G. 2009. Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds) *Advances in haploid production in higher plants*. Springer, Berlin, pp 1-34.
- WEHNER T.C., 1999. Heterosis in vegetables. In "The Genetics and Exploitation of Heterosis on Crops". Pp, 387-397 ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA.
- Wremeth Weich, E. And Levall, M.W. 2003. Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In : M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster and I. Szarejko (eds). *Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual*. Springer Science+Business Media, LLC New York 2003, pp 255-263.
- Xue, G.R., Yu, W.Y., Fei, K.W., 1983. *Watermelon plants derived by in vitro anther culture*. *Plant Physiol. Commun.* 4: 40-42.
- Xu, L., Najeeb, U., Tang, G.X., Gu, H.H., Zhang, G.Q., He, Y. and Zhou, W.J. 2007. *Haploid and doubled haploid technology*. *Adv Bot Res.* 45: 181-216.
- Yanmaz, R. 2006. *Sebze Yetiştiriciliğinde Hibrit Çeşit Kullanımı ve Çeşit Önerileri*. Tarla bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 15 (1-2).
- Zitter, T.A., Hopkins, D.L. and Thomas, C.E. 1996. *Compendium of Cucurbit Diseases*. APS Press, St. Paul, MN.
- Zhang, G.H., Du, S.L., Wang, M. and Ma, D.H. 2004. *AFLP markers of cucumber powdery mildew resistance-related gene*. *Yuan Yi Xue Bao* 31: 189-192.
- Zhang, S.Q., Gu, X.F., Zhang, S.P. and Zou, Z.R. 2005. *The genetic mechanism of resistance to powdery mildew in cucumber*. *Yuan Yi Xue Bao* 32: 899-901.
- Zhang, H.Y. 2006. *Identification of molecular markers linked to important resistant genes and construction of genetic map in cucumber*. Beijing: Chin. Acad. Agricult. Sci.
- Zhang, S.Q., Gu, X.F., Zhang, S.P. and Zou, Z.R. 2007. *Inheritance of powdery mildew resistance in cucumber and development of an AFLP marker for the resistance detection*. *Agric. Sci. China* 11: 1336-1342. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(07\)60181-3](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(07)60181-3).
- Zhang, Y.X., Lespinasse, Y. and Chevreau, E. 1990. *Induction of haploidy in fruit trees*. *Acta Hort.* 280:293-304.
- Zhu, Z.C., Wu, H.S. 1979. *In vitro induction of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of Triticum aestivum and Nicotiana tabacum*. *Acta Genet. Sin.* 6: 181-183.

ÖZGEÇMİŞ

Mamoudou ZONON

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2019-2021	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji, Antalya
Lisans 2015-2019	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji, Eskişehir