



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTER KÜLTÜRÜ UYGULAMALARININ
SİTRON KARPUZUNDA (*Citrullus lanatus* var.
***citroides*) HAPLOİD BİTKİ ELDESİ ÜZERİNE**
ETKİLERİ

Zeliha ATAKUL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Temmuz-2024
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Zeliha ATAKUL tarafından hazırlanan “**ANTER KÜLTÜRÜ UYGULAMALARININ SİTRON KARPUZUNDA (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) HAPLOİD BİTKİ ELDESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**” adlı tez çalışması 05/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Unvanı Adı SOYADI

Danışman

Unvanı Adı SOYADI

Üye

Unvanı Adı SOYADI

İmza

Prof. Dr. Taki DEMİR

Doç. Dr. Musa SEYMEN

Prof. Dr. Ertan Sait KURTAR

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ömer Faruk YÜKSEL
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 2210338 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this thesis has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Zeliha ATAKUL

Tarih: 05/07/2024

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTER KÜLTÜRÜ UYGULAMALARININ SİTRON KARPUZUNDA (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) HAPLOİD BİTKİ ELDESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

ZELİHA ATAKUL

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Musa SEYMEN

2024, 47 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Musa SEYMEN

Prof. Dr. Taki DEMİR

Prof. Dr. Ertan Sait KURTAR

Karpuz (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) açık arazi ve örtü altında çoğunlukla aşılı fide ile yetiştirilen ve domatesten sonra en çok üretilen sebzedir. Global iklim değişikliği çerçevesinde meydana gelen ve etkileri her geçen gün artan kuraklık karpuz üretimini kısıtlayan en önemli faktörlerin başındadır. Ticari karpuz çeşitleri kuraklığa yüksek oranda hassastır ve kuraklığa toleransı yüksek anaçlara aşılanarak yetiştirilmesi pratik seçeneklerden birisidir. *Citrullus* cinsi içerisinde yer alan ve yabani bir form olan sitron karpuzu (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) kuraklığa toleransının yüksek olması sebebiyle özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde yetiştirilmektedir. Sitron karpuzunun kültür karpuzuna anaç olarak kullanılabilmesi üstün özelliklere sahip F₁ hibrit anaçlarının üretilmesine bağlıdır. Androgenesis (anter kültürü tekniği) karpuzun yüksek oranda yabancı tozlanması sebebiyle klasik yöntemlerle uzun süre (7-8 generasyon kendileme) gerektiren saflaştırma işlemini 1-2 yıla kadar düşürebilecek önemli bir biyoteknolojik (dihaploidizasyon) yöntemidir.

Bu amaçla mevcut çalışmada, genotip ve besin ortamlarının 11 sitron karpuzu genotipinde ve 4 ticari çeşitte, 5 farklı besin ortamında (O1, O2, O3, O4 ve O5), anter kültürü tekniğiyle haploid bitki eldesi amaçlanmıştır. Sonuçlar genotiplerin ve besin ortamlarının androgenesise farklı etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Çalışma boyunca 2137 anter kültüre alınmış, bu anterlerden 1138 tanesi farklılaşma göstermiş ve bunlardan ise 458 tanesinde kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallus oluşum oranında genotipler ve ortam açısından en düşük değer "O1" ortamında ve % 14,29 ile Pastel F1 çeşidinden elde edilirken, en yüksek değer "O2" ortamında % 100 ile SK14 genotipinden elde edilmiştir. Embriyo sayısı açısından en yüksek değer % 81,48 ile SK4 genotipinde "O1" ortamından elde edilmiştir. Sadece "O1" ortamından ve SK21 genotipinden 12 adet bitkicik rejenerasyonu gerçekleşmiş, bitkiye dönüşüm oranı (BDO) çok düşük düzeyde (% 0.56) kalmıştır. Stomatal gözlemler ve flow sitometri ile yapılan ploidi analizleri sonucunda bitkilerin diploid (2n) yapıda olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Androgenesis, F₁ ıslahı, haploidizasyon, küresel ısınma, sitron karpuzu,

ABSTRACT

MS THESIS

EFFECTS OF ANTHHER CULTURE APPLICATIONS ON HAPLOID PLANT OBTENTION IN CITRON WATERMELON (*Citrullus lanatus* var. *citroides*)

Zeliha ATAKUL

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
HORTICULTURE

Advisor: Doç. Dr. Musa SEYMEN

2024, 47 Pages

Jury

Doç. Dr. Musa SEYMEN

Prof. Dr. Taki DEMİR

Prof. Dr. Ertan Sait KURTAR

Watermelon (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) is the most produced vegetable after tomato, grown mostly with grafted seedlings in open fields and protected cultivation. Drought, which occurs within the framework of global climate change and whose effects are increasing day by day, is one of the most important factors limiting watermelon production. Commercial watermelon varieties are highly sensitive to drought and growing them by grafting them onto rootstocks with high drought tolerance is one of the practical options. Citron watermelon (*Citrullus lanatus* var. *citroides*), a wild form within the *Citrullus* genus, is grown especially in arid and semi-arid regions due to its high drought-tolerance. The ability to use citron watermelon as a rootstock for cultivated watermelon depends on the production of F₁ hybrid rootstocks with superior properties. Androgenesis (anther culture technique) is an important biotechnological (dihaploidization) method that can reduce the purification process, which takes a long time (7-8 generations of selfing) with classical methods, to 1-2 years due to the high rate of external pollination of watermelon.

For this purpose, the current study was aimed to obtain haploid plants by anther culture technique in 11 citron watermelon genotypes and 4 commercial varieties in 5 different induction media (O1, O2, O3, O4 and O5). The results revealed that genotypes and induction media have different effects on androgenesis. During the study, 2137 anthers were cultured, 1138 of these anthers showed differentiation and callus formation was observed in 458 of them. The lowest value in callus formation rate in terms of genotypes and environment was obtained from the Pastel F1 variety with 14.29 % in the "O1" environment, while the highest value was obtained from the SK14 genotype with 100% in the "O2" environment. The highest value in terms of embryo number, 81.48 %, was obtained from the "O1" medium in the SK4 genotype. Only 12 plantlets were regenerated from the "O1" medium and SK21 genotype, and the conversion rate to plant (CRP) remained at a very low level (0.56 %). As a result of stomata observations and ploidy analyses performed by flow cytometry, it was determined that all plants were diploid (2n).

Keywords: Androgenesis, F₁ breeding, citron watermelon, global warming, haploidization

ÖNSÖZ

Akademik eğitim sürecimin bir üst noktası olan Yüksek Lisans tez konumun belirlenmesi, hazırlanması, yazımı ve bu çalışmanın her aşamasında bilgi, öneri, deneyim, görüş, yardım ve desteğini esirgemeyen, meslek hayatımda her zaman bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, danışman hocam Doç. Dr. Musa SEYMEN'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecinde görüş, bilgi ve tecrübesinden faydalandığım hedefe ulaşmamı sağlayan Prof. Dr. Ertan Sait KURTAR'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans öğrenim hayatım süresince bana yardımcı olan, her türlü bilgi ve desteği paylaşmaktan hiç çekinmeyen, tecrübeleriyle daima yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Önder TÜRKMEN'e ve Prof. Dr. Mustafa PAKSOY'a saygı ve teşekkürü arz etmeyi bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca, destek ve yardımlarıyla yanımda olan S.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim elemanı Arş. Gör. Ünal KAL, Ziraat Yüksek Mühendisi Deniz METİN'e ve tüm ekip arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte desteklerini her zaman hissettiren kuzenim Mine ATAKUL'a ve değerli arkadaşlarım, Havvanur KIRATLI, Gamze AKKAŞ ve Nazlı DEMİR'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan, her koşulda yanımda olan, emek ve çabalarımı takdir eden aileme; kardeşlerime ve canım annem ile babama sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde maddi olarak destek sağlayan "221O338" numaralı ve "Karpuz (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) Anaç Islahı Programlarında Kullanılmak Amacı ile Katlanmış Haploid (DH) Sitron Karpuzu (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) Hatlarının Üretilmesi." isimli TÜBİTAK projesine teşekkür ederim

Zeliha ATAKUL
KONYA-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	10
3.1. Materyal	10
3.1.1. Donör Genotipler ve Özellikleri	10
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi	11
3.2.2. Anterlerde Uygun Mikrospor Aşamasının Belirlenmesi	14
3.2.3. Kullanılan Besin Ortamları ve İçerikleri	16
3.2.4. Çiçek Tomurcuklarının Dezenfeksiyonu ve Anterlerin Çıkarılması	17
3.2.5. Ön Uygulamalar ve Kallus Eldesi	18
3.2.6. Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması (Aklimatizasyon)	20
3.2.7. Ploidi Düzeyinin Tespiti	20
3.2.8. Gözlem ve Ölçümlerin Alınması ve Değerlendirilmesi	22
3.2.9. İstatistiksel Analizler	22
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	23
4.1. Genotip Ve Ortamların Anterlerin Farklılaşması ve Kallus Oluşumu Üzerine Etkileri	23
4.2. Genotip ve Ortamların Embriyo Ve Bitkicik Oluşumu Üzerine Etkileri	28
4.3. Ploidi Testlemeleri	29
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan yabancı karpuz hatlarından bazıları (Orijinal).....	10
Şekil 3.2.Çalışmada kullanılan ticari karpuz çeşitleri (Soldan sağa doğru; Paskal F1, Pastel F1, Crimson Tide F1, Crimson Sweet F1)	10
Şekil 3.3 Serada yetiştiriciliği yapılan fideler.....	11
Şekil 3.4. Malç örtme işlemi.....	12
Şekil 3.5. Dikimi yapılan, askıya alınan ve budama işlemleri gerçekleştirilen bitkiler .	13
Şekil 3.6. Tomurcukların görsel sınıflandırılması	14
Şekil 3.7.Tomurcuk boyutlarına göre mikrospor gelişim aşamaları (1) Erken tek çekirdekli dönem (2) Geç tek çekirdekli dönem (3) Geç tek çekirdekli-erken çift çekirdekli dönem (4) Çift çekirdekli dönem.....	15
Şekil 3.8. Anterlerin kültüre alınma işlemi.....	18
Şekil 3.9. Kültüre alınmış anterler	18
Şekil 3.10. İklim odası koşullarındaki anter kültürü çalışmaları	19
Şekil 3.11.Köklendirme ve büyütme ortamındaki bir bitkicik (sol) ile sararıp ölen bir bitkicik (sağ)	19
Şekil 3.12. Büyütülmüş (orta) ve dış koşullara alıştırılmakta olan bitkiler	20
Şekil 3.13. Örneklerin buz küvetinde jilet yardımıyla kesilerek karıştırılması, süzülmesi, boya çözeltilisinin eklenmesi, örneklerin karıştırılması, okumaların yapılması, piklerin elde edilmesi.	21
Şekil 4.1. O1 ortamındaki anter kökenli kalluslar (sol) ve bir kallus üzerine embriyo benzeri yapılar (sağ).....	26
Şekil 4.2. O2 ortamındaki anter kökenli kalluslar (sol) ve bir kallus üzerine embriyo benzeri yapılar (sağ).....	26
Şekil 4.3. Kallus üzerinde oluşmaya başlayan bitkicikler.	26
Şekil 4.4. O3 ortamındaki kallus oluşturmamış anterler	27
Şekil 4.5. O4 ortamındaki kallus oluşturmamış anterler	27
Şekil 4.6. O5 ortamındaki kallus oluşturmamış anterler	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 3.1. Sera 0-30 cm derinlikteki toprak analiz sonuçları.....	12
Tablo 3.2. Tomurcukların boyutlarına göre sınıflandırılması.....	14
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan protokoller ve detayları.....	16
Tablo 3.4. MS besi ortamının bileşimi	16
Tablo 4. 1. Kültüre alınmış anterlerin sayısı (AS), Farklılaşan anter sayısı (FAS), Kallus oluşturan anter sayısı (KAS), Embriyolu kallus sayısı (EKS), Bitki sayısı (BS), Farklılaşma oranı (FO), Kallus oluşturma oranı (KOO), Embriyolu kallus oranı (EKO), Bitkiye Dönüşüm oranı (BDO).....	23

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
G	Gram
°C	Santigrat derece
mm	Milimetre
m	Metre
m ²	Metre kare
ml	Mililitre
cm	Santimetre
mg/kg	Miligram/kilogram
cm ²	Santimetrekare
µm	Mikrometre
mm ²	Milimetrekare
mg/L	Miligram/Litre
g/L	Gram/Litre
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
MS	Murashige and Skoog, 1962
DH	Double haploid
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
CaCl ₂ .2H ₂ O	Kalsiyum klorür
NH ₄ +NO ₃ -N	İnorganik azot
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat
NH ₄ NO ₃	Amonyum Nitrat
H ₃ BO ₃	Borik asit
KH ₂ PO ₄	Mono potasyum fosfat
KI	Potasyum iyodür
KNO ₃	Potasyum nitrat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Sodyum molibdat
IAA	Indol 3-asetik asit
2,4-D	Diklorofenoksiasetik asit
ABA	Absisik asit
AgNO ₃	Gümüş nitrat
IAA	Indole asetik asit
BAP	Benzil aminopürin
BA	Benzil adenin
atm	Atmosfer
TTSM	Tohumculuk Tescil ve Sertifikasyon Müdürlüğü
SK	Sitron karpuz
FCM	Flow sitometri
AS	Anter Sayısı
FAS	Farklılaşan anter sayısı
KAS	Kallus oluşturan anter sayısı
EKS	Embriyolu kallus sayısı
BS	Bitki sayısı
FO	Farklılaşma oranı

KOO	Kallus oluşturma oranı
EKO	Embriyolu kallus oranı
BDO	Bitkiye d6n6ř6m oranı
DH	Double haploid
KS	Kloroplast sayısı
PD	Ploidi d6zeyi



1. GİRİŞ

Anavatanı Afrika ve Asya olan ve *Cucurbitaceae* familyasında yer alan karpuz (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) 16. yüzyıldan itibaren Avrupa’da, 17. yüzyıldan bu yana da Türkiye’de ekonomik anlamda yetiştirilen bir sebze türüdür. Kültür karpuzu diploid ($2n$) olup, kromozom sayısı $2n=22$ ’dir.

Dünyanın dördüncü büyük sebze üreticisi ülkesi olan Ülkemizde yaklaşık 31 milyon ton sebze üretilmektedir. Karpuz (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. ve Nakai) ise toplam sebze üretimimiz içerisinde yaklaşık 3.2 milyon ton ile (Çin’den sonra dünyada ikinci) domatesten sonra ikinci sırada yer alır. Bu üretimin 667.484 tonu örtü altındadır (FAO, 2022; TÜİK, 2023). Ülkemizde karpuz yetiştiriciliğinde kullanılan F1 hibrit çeşitlerinin büyük çoğunluğu yurt dışı kaynaklıdır. Ayrıca karpuz yetiştiriciliğinin büyük bir kısmı açık arazi koşullarında aşılı fide ile yapılmaktadır ve anaç olarak kullanılan çeşitlerin de büyük bir kısmı yurt dışından ithalat yolu ile temin edilmektedir. Son yıllarda ülkemiz tohumculuğunda çeşit ve anaç ıslahı konularında dikkate değer büyük ilerlemeler sağlanmış olsa da yurt dışına bağımlılık halen devam etmektedir. Şu anda TTSM’ye kayıtlı 193 adet standart, sertifikalı ve üretim izinli karpuz çeşidinin büyük çoğunluğu tamamen yurt dışı kaynaklıdır (TTSM, 2024).

Son yıllarda global iklim değişikliği sebebiyle ortaya çıkan kuraklık, tuzluluk ve sıcaklık artışları dünyayı olduğu gibi ülkemizi de etkilemektedir. Bu olumsuz etkilerin gelecekte daha da artacağı bilimsel olarak ortaya koyulmuştur. Özellikle kuraklık, ülkemiz gibi kurak ve yarı-kurak alanlara sahip bölgelerde, tarımsal üretimin sınırlandırılmasına yol açan en önemli faktörlerden biridir. Kuraklık stresinin olumsuz etkilerini en aza indirmek için günümüz ıslahında kullanılacak kalıcı yöntemlerden birisi de kuraklığa tolerant çeşitlerin veya anaçların geliştirilmesi ve tarımsal üretimde kullanılmasıdır.

Cucurbitaceae familyasının *Citrullus* cinsi içerisinde yer alan *Citrullus lanatus* var. *citrodies* ($2n=2x=22$) yaygın olarak “sitron”, “sitron karpuzu”, konservelik kavun”, “yemlik karpuz” gibi çeşitli isimlerle anılan ve genetik yakınlıktan dolayı kültür karpuzu ile kolaylıkla melezlenebilen yabani bir formdur (Laghetto ve Hammer, 2007). Sitron karpuzları, sadece hayvan yemi olarak değil antimikrobiyal ve besleyici özelliklere sahip olarak diğer alanlarda da kullanılabilir (Masoko ve ark., 2022).

Sitron karpuzu abiyotik ve biyotik stres koşullarına toleransından dolayı kurak bölgelerde rahatlıkla yetiştirilebilir ve meyve kalitesini arttırmak için kültür karpuzuna

anaç olarak kullanılabilir (Nkoana ve ark., 2022). Nitekim daha önce yapılmış çalışmalarda anaç olarak kullanılan 2 farklı sitron karpuz genotipi kurak koşullarda üstün anaç olarak belirlenmiş ve karpuz ticari anaç olarak kullanılabilir özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (Yavuz ve ark., 2020). Ayrıca su kısıtı koşullarında meyve kimyasal özellikleri açısından diğer anaçlardan üstün özellikler gösterdiği ve kurak bölgelerde meyve kalitesini iyileştirmek için karpuz anaç olarak kullanılabilirliği açıklanmıştır (Seymen ve ark., 2021). Sitron karpuzları su stresi altında kök uzunluğunu ve köklenme yüzdesini arttırarak daha derindeki suyu alarak bitkinin büyüme ve gelişmesini desteklemiş olduğu (Mandizvo ve ark., 2022a), yine kurak koşullarda sitron karpuzlarının gelişmiş kök özelliklerinden dolayı ıslah programlarında önemli yer alabileceği bildirilmiştir (Mandizvo ve ark., 2022b). Sitron karpuz anaçları tuz stresi koşullarında diğer ticari anaçlara kıyasla üstün özelliklere sahip bir anaç olup tuza toleransı yüksektir (Aydın ve Yetişir, 2023). Ayrıca ticari anaçlara göre sitron karpuzunun kök ur nematoduna dayanımı daha yüksektir (Aydınlı ve ark., 2019). Günümüzde karpuz anaçlarının *Fusarium solgunluğunun (Fusarium oxysporum f. sp. niveum)* 0 ve 1 ırklarına karşı dayanıklı durumda olduğu bildirilmiş ancak ırk 2 ve 3'e karşı dayanım bildirilmemiştir. 110'a yakın sitron karpuz genotipiyle yapılmış olan bir çalışmada 15 genotipin *Fusarium solgunluğunun* 2. ırkına karşı yüksek dayanımı olduğu açıklanmıştır (Aydınlı ve ark., 2019).

Sitron karpuzunun ticari karpuz üretiminde biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı genetik bir kaynak olarak kullanılabilirliği bir çok çalışmada bildirilmiş olup (Hwang ve ark., 2011; KURUM ve ark., 2017a; Kurum ve ark., 2017b; Levi ve ark., 2017; Balkaya ve ark., 2018; Nawaz ve ark., 2018; Pal ve ark., 2020; García-Mendivil ve Sorribas, 2021), vejetasyon süresinin kışlık kabaklara göre kısa olması (90-120 gün) ve yılda 2 kez tohum alınabilme olasılığının olması anaç ıslahı çalışmalarında önemli bir kaynak olabileceğini göstermiştir (Mustafa ve Alamin, 2012). Günümüz karpuz tarımında kışlık kabaklar olan *Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata* melezleri gerek biyotik (özellikle *Fusarium*) ve gerekse abiyotik (kuraklık, düşük toprak sıcaklığı ve tuzluk) stres koşullarına dayanım ve tolerans sağlaması nedeniyle karpuz anaç olarak kullanılmaktadır. Ancak bu anaçların kuraklığa dayanımları sınırlıdır ve nematod dayanımları istenilen düzeyde değildir (Aydınlı ve ark., 2019). Diğer taraftan kullanılan melez anaçların üzerindeki kaleme bazı olumsuz etkiler bırakarak tüketiciler tarafından olumsuz görüşler orta ya çıkarmaktadır. Meyve kabuk kalınlığının artması, erken renklenme olsa da şeker birikiminin az olmasından dolayı tat kaybı, meyve etinde

lifliliğin oluşması vb., gibi nedenler tüketiciler tarafından olumsuzlukla karşılanmaktadır.

Günümüz sebze tarımında hibrit gücünün (zararlılara ve hastalıklara karşı dayanıklılık, ayrıca biyotik ve abiyotik stres faktörlerine yüksek tolerans) sağladığı yüksek performans sebebiyle F1 hibrit çeşitler ve anaçlar yoğun olarak kullanılmaktadır. F1 hibrit çeşit eldesinin ilk basamağı olan saf hatların eldesi karpuz gibi yabancı tozlanan türlerde yaklaşık 7 generasyon kendilemeyi gerektirmekte bu durum yılda 2 generasyon ilerlese dahi en az 4 yıllık bir süreyi gerektirmektedir. Ancak saf hatların eldesini 1-2 yıla kadar indirebilen ve dihaploidizasyon (partenogenesis, androgenesis ve gynogenesis) adı verilen teknik yardımıyla bu süre oldukça kısalmakta, gerek zaman gerekse emek ve maliyetten büyük kazançlar sağlanmaktadır (Kurtar ve Balkaya, 2010). Günümüzde kabakgiller familyasında ışınlanmış polen tekniği kavun türünde ıslah çalışmalarında kullanılabilir boyutta olmasına rağmen karpuz, kabak ve hıyar türünde ticari boyutta kullanıma halen ulaşamamıştır. Bu sebeple son yıllarda karpuz, kabak ve hıyar türlerinde dihaploidizasyon konusunda yapılan çalışmalar androgenesis (anter kültürü) ve gynogenesis (ovaryum kültürü) üzerinde yoğunlaşmıştır.

Ticari karpuz üretiminde kullanılan çeşitler birçok önemli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine hassastır ve bu sebeple anaç üzerine aşılansarak aşılı fide şeklinde üretilmeleri gerekmektedir. Karpuz üretiminde yukarıda anlatmış olduğumuz sebeplerden dolayı sitron karpuzunun anaç olarak kullanılma potansiyeli oldukça yüksektir ve F1 anaç ıslahına yönelik olarak saf sitron karpuz hatlarının geliştirilmesi ülkemiz tarımı ve tohumculuk sektörümüz için önemli bir konu olarak değerlendirilmektedir. Diğer taraftan karpuz türünde dihaploidizasyon konusunda yapılmış çalışmalar ile elde edilen başarılar oldukça sınırlıdır ve hala açıklanmayı bekleyen önemli bilimsel noktalar bulunmaktadır. Ülkemiz için ileride ticarete konu olabilecek sitron hatların geliştirilmesi, bunların anaç ıslahında kullanımının sağlanması ve üreticilerin ucuz tohum bulmalarının sağlanması suretiyle ülke ve üretici gelirine katkıda bulunulması gerekmektedir. Bu hedefler doğrultusunda sunulan çalışmada androgenesis yöntemlerinden birisi olan anter kültürü kullanılarak karpuz anaç potansiyeli yüksek ve kuraklığa toleranslı saf sitron karpuzu hatlarının üretilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Karpuz türünde yapılmış çalışmalar.

Karpuzda yapılmış bazı araştırma sonuçları aşağıda sunulmaya çalışılmıştır.

Tulukoğlu ve Sarı (2014) karpuzda yaptığı anter kültürü çalışmasında Halep Karası, Zeugma F1, Starburst F1 ve Crimson Tide F1 çeşitlerinin farklı çiçeklenme dönemlerinde toplanan çiçek tomurcuklarını farklı ön soğuk uygulamalarına tabi tutmuşlar ve çeşitli dozlarda 2,4-D ve TDZ hormonları ile bu hormonların farklı kombinasyonlarına sahip MS besi kültürüne almıştır. Çalışma bulgularına göre çiçek tomurcuklarına uygulanan soğuk şoku ve besi ortamına eklenen 2,4-D ve TDZ hormonlarının polen embriyogenesisini önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Ancak yapılan uygulamalar sonucunda yalnızca kallus oluşumu elde etmiştir. Sonuçlara göre, 'Halep Karası', 'Zeugma F1' ve 'Starburst F1' çeşitlerinde kallus oluşumu çiçeklenmeden bir gün önce kültüre alınan tomurcuklarda daha yüksekken, 'Crimson Tide' çeşidinde iki gün önceki dönemde kültüre alınanlardan daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Abdollahi ve ark. (2015) karpuzda anter kültüründe uyguladıkları çeşitli faktörlerin (örneğin, bitki büyüme düzenleyicileri, ön soğuk ve sıcak uygulamaları ve buğday ovaryum kültürü) embriyojenik kallus oluşumu ve embriyo üretimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. En yüksek embriyojenik kallus ve anter başına ortalama embriyo sayısı 2,4-D ve BAP ile takviye edilmiş MS ortamında Charleston Gray çeşidinden elde edilmiştir. Çalışma sonucunda 10 haploid ve 2 diploid bitki elde edilmiştir.

Akbaş ve Solmaz (2019) haploid bitki elde etmek için *Citrullus lanatus* var. *lanatus* ve *Citrullus lanatus* var. *citroides* türlerinde yürüttükleri anter kültürü çalışmasında; çiçek tomurcuklarını farklı dozlarda BAP eklenmiş MS besi ortamında kültüre almışlardır. Ayrıca, poliaminlerin etkisini araştırmak için ortama farklı dozlarda (500 ve 1000 $\mu\text{M/l}$) spermidin (SPD) ve putresin (PUT) eklemiştir. Sonuçlara göre, besi ortamları ve genotiplere bağlı olarak anter gelişimi ve kallus oluşumu farklı oranlarda gözlenmiştir. Ancak tam bir bitki elde edilememiştir.

Silva ve ark. (2021) karpuz anterlerinde sıcaklık ve büyümeyi düzenleyicilerin kallus oluşumuna etkisini araştırmışlardır. Çiçek tomurcukları ilk önce 2 gün boyunca 4 °C soğuk şokuna maruz bırakılmıştır. MS besin ortamına 5 2,4-D dozu ve 5 BAP dozu ilave edilmiştir. Sonuç olarak 2,4-D'nin kallus oluşumuna olumlu etki yaptığı ancak

2,4-D nin BAP ile beraber kullanıldığı ortamda herhangi bir etkinin olmadığı sonucuna ulaşmışlardır.

2.2. Kavun (*Cucumis melo* L.) türünde yapılmış çalışmalar

Islam ve ark. (2011) başarılı anter kültürü için kavun çiçek tomurcuğu boyutunu ve polenin gelişim aşamalarını belirlemek amacıyla yaptıkları bu çalışmada MS ile karbonhidrat kaynağı olarak sakaroz, laktoz ve maltoz kullanmışlardır. Polen canlılığında ilk çiçeklenme aşamasındaki toplanan çiçeklerdeki canlılık oranı daha sonraki çiçeklenme zamanında toplanan çiçeklere göre daha yüksek olduğunu ve tek çekirdekli mikrospor dönemi boyutunun donör bitkinin yaşı ile alakalı olduğunu bulmuşlardır. Petri başına en yüksek canlı anter sayısını ve anter başına canlı polen sayısının karbonhidrat kaynağı olarak laktoz bulunan ortam olduğunu bulmuşlardır.

Nguyen ve ark. (2019) kavunda anter kültürü çalışmasında mikrospor gelişim aşamasının ve çeşitli besin ortamlarının kallus oluşumuna etkisini incelemişlerdir. Mikrospor gelişimi olarak anterler iki gruba ayrılmış, birinci grup erken ve orta tek çekirdekli, ikinci grup ise geç tek çekirdekli ve iki çekirdekli aşama olarak belirlenmiştir. Besin ortamı olarak MS besin ortamına ek olarak farklı dozlarda 2,4-D, BAP, NAA, Kinetin eklenmiştir. (MK1; 1,0 mg/l 2,4-D 1,5 mg/l BAP, MK2; 1,5 mg/l 2,4-D ve 1,0 mg/l BAP, MK3; 1,5 mg/l NAA, 1,0 mg/l BAP ve 0,5 mg/l Kinetin). Kallus oluşumu gözlenmiş fakat embriyo oluşumunda başarısız olunmuştur. En yüksek kallus oluşum sıklığı MK1 ortamından elde edilmiştir ancak mikrosporların gelişim aşamalarının kallus oluşumu üzerine etkisi açıklanamamıştır.

de Oliveira ve ark. (2022) kavunda yaptıkları anter kültürü çalışmasında Oksin (IAA, NAA ve 2,4-D) ve sitokinin (KIN ve BAP) kallus oluşumu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Oksin ve sitokinin kallogenesisini teşvik ettiğini ancak en iyi kombinasyonun 0.20 mg/l BAP + 0.45 mg 2,4-D olduğunu bildirmişlerdir.

2.3. Hıyar (*Cucumis sativus* L.) türünde yapılmış çalışmalar

Kumar ve ark. (2003) yaptıkları bir çalışmada 2 farklı hıyar çeşidinde (Calypso ve Green Long) çiçek tomurcuklarına uygulanan hem soğuk hem de sıcak şok uygulamalarının haploid bitki elde etmek amacıyla anter kültürüne etkisini araştırmışlardır. Besin ortamı olarak %0.25 sakaroz içeren 2,4-D ve NAA ile

desteklenen B5 ortamı kullanılmıştır. Çiçek tomurcukları 0-10 gün süreyle 4°C'de ön soğuk uygulamasına ve ayrıca 24 saat 32°C'de sıcak şokuna tabi tutulmuştur. 2 günlük soğuk şok uygulaması iki çeşit içinde faydalı olmuş, ancak 32°C sıcak şokundan iyi sonuçlar alınamamıştır. Her iki çeşitten de rastgele seçilen 24 adet bitkinin kromozom sayılarını analiz etmişler ve sonuç olarak Calypso'da test edilen 24 rejenanttan 21 bitkicik haploid ($n=7$) ve 3 bitkicik ise diploid olurken, Green Long'da rejenerantların 17'si haploid, geri kalan 7'si ise diploid olarak tespit edilmiştir.

Ashok Kumar ve Murthy (2004) *Cucumis sativus* L.'nin kültüre alınan anterlerinden embriyo ve bitkicik oluşumu üzerine yürütülen çalışmada; şekerlerin (sakaroz, maltoz, glikoz ve fruktoz) ve amino asitlerin (glutamin, glisin, arginin, asparagin ve sistein) etkileri araştırmışlardır. 85 g/l Sakaroz embriyo oluşumu için en iyi sonucu vermiştir. Besin ortamına aminoasitlerin eklenmesiyle embriyo oluşumunda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Aminoasitlerin eklendiği B5 ortamında gelişen embriyoların en sık bitkicik rejenerasyonu verdiğini bildirmişlerdir.

Abdollahi ve ark. (2016) Bir araştırmada, Beta Alpha hıyar çeşidi ile İran'da yetiştirilen üç yerel hıyar çeşidi (Basmenj, Isfahani ve Korki), farklı makro besin dozlarında MS kültür ortamında değerlendirmişlerdir. Diğer bir denemede ise, farklı agar konsantrasyonları (0, 3.5, 7 ve 14 g/l) kullanılarak anter kültürü tepkisi incelenmişler ve agarın kallustan türetilmiş embriyoların gelişimi üzerindeki etkisi değerlendirmişlerdir. Beta Alpha'da, 10 embriyodan 8'i haploid, geri kalan iki embriyo diploid, Basmenj çeşidinde, 10 embriyodan 6'sının haploid, 4 embriyonun ise diploid olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Isfahani ve Korki çeşitlerinde ise, her biri için 10 embriyodan 7'si haploid, geri kalan 3 embriyonun ise diploid olduğunu bildirmişlerdir.

Asadi ve ark. (2018) tarafından yapılan hıyarda anter kültürü çalışmasında 2 adet hıyar genotipinin çiçek tomurcukları 2 gün süreyle 4°C soğuk şokuna tabii tutulmuş ve 25 farklı BAP ve 2,4-D konsantrasyonu kombinasyonu 10 farklı BAP ve NAA konsantrasyonu kombinasyonunda kallus oluşumunu test etmişlerdir. Ortamlara yerleştirilen kalluslar 1 saat boyunca 35 °C sıcak şokuna maruz bırakılmıştır. Anterlerden gelişen kalluslar bitki oluşturmak için NAA (0.05 ve 0.1 mg/l) ve BAP (2,3 ve 4 mg/l) sıvı (agarsız) ve katı (0.8 g/l agar) kombinasyonları denenmiştir. Hıyarda DH'leri üretmek için en etkili protokolün, çiçek tomurcuklarına 4 °C soğuk şokunun ve 0.68-0.91 mg/l BAP ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortama yerleştirildikten sonra 35 °C sıcak şokunun uygulaması olduğunun önermişlerdir.

2.4. Yazlık Kabak (*Cucurbita pepo* L.) türünde yapılmış çalışmalar

Metwally ve ark. (1998) yaptıkları bir çalışmada Anterler 4 gün boyunca 4°C soğuk şoku uygulanmış, 20 farklı 2,4-D ve şeker kombinasyonları içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Kültüre alınan anterlerde kallus başına bitkicik oluşumunda en iyi sonucu sakaroz kombinasyonlarında 90 g sakaroz ilave edilmiş besin ortamından alınmıştır. 2,4-D kombinasyonlarında ise kallus başına en fazla bitkicik veren ortam 1.0 mg/l 2,4-D içeren besi ortamı olmuştur. Rastgele seçilen 20 bitkiden yapılan sitolojik analizler sonucunda 10 bitkinin diploid ve kalan 10 bitkinin haploid olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Kurtar ve ark. (1998) *Cucurbita pepo* L. türüne ait 4 farklı çeşitte (Eskenderany F1, Acceste F1, Sakız ve Urfa Yerli) haploid bitki elde etmek amacıyla yaptıkları anter kültürü çalışmalarında MS + Sakarozun 2 (120 ve 150 g/l) ve 2,4-D'nin 4 (5, 7.5, 10 ve 12.5 mg/l) farklı dozları kullanılmıştır. Çalışmada kültür ortam bileşimlerinin androgenesise etkisi incelenmiş ve kültüre alınan anterlerin besin ortamlarında kallus oluşumları değerlendirilmiştir. Her çeşitte kallus oluşmuş, en başarılı sonuç 150 g/l sakaroz ve 7.5 mg/l 2,4-D ilave edilmiş MS besin ortamında Acceste F1 çeşidinde gerçekleşmiştir. Sakız çeşidinden 120 g/l sakkaroz + 5 mg/l 2,4-D ilave edilmiş MS besin ortamında 3 adet bitki elde edilmiş, yapılan morfolojik ve sitolojik incelemeler sonucunda bitkilerin diploid (2n) yapıda oldukları bildirilmiştir.

Yaz kabağına ait 7 çeşitte (Arlika F1, Eskandrani E 82-110 F1, Giad F1, Rula F1, Queen F1 ve Yellow Bik F1) kallus ve bitki oluşumu üzerine etkilerini araştırıldığı başka bir çalışmada tomurcuklar 4 gün boyunca 4°C soğuk şokuna tabi tutulmuş. Anterler 2,4-D içeren MS besin ortamına yerleştirilmiştir. 1 hafta boyunca 32°C karanlıkta tutulduktan sonra 4 hafta boyunca 25°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Oluşan kalluslar; Kinetin ve NAA içeren MS besi ortamına aktarılmıştır. Daha sonra oluşan embriyolu kalluslar bitki düzenleyici olmayan MS ortamına aktarılmıştır. Embriyolu kallus ve kallus başına oluşan bitkicik sayısı açısından en iyi sonucu Yellow Bik F1 çeşidinden elde edildiğini ayrıca kabak genotipleri arasındaki farklılıkların kallus yüzdesi ve kallus başına üretilen bitkicik sayısı açısından önemli olduğunu bulmuşlardır. Shalaby (2006).

Uzun Tuzcu (2019) Sakız kabağında yaptığı bir çalışmada anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesini amaçlamışlardır. Çalışma 2 gruptan ve 6 denemeden oluşturulmuştur. Denemelerde kullanılan besin ortamları ve yöntemleri farklılık

göstermiştir. Her bir denemede farklı çiçek boyutları (0,9 -2,5 cm, 2,6-4,5 cm, 4,6-5,5 cm, 0,9-1,4 cm, 1,5-2,0 cm, 2,1-2,5 cm) denenmiştir. Besin ortamı olarak MS besin ortamına 2,4-D, IAA, NAA, KN, BAP ilave edilmiştir. Şeker kaynağı olarak sakaroz ve maltoz kullanılmıştır. Kallus oluşturmada 1. grupta tomurcuk boyutu 0,9- 2,5 cm aralığında olan anterlerden daha yüksek oran elde edilmiştir. 2. grupta ise 2,1- 2,5 cm aralığındaki tomurcuklarda ve en iyi şeker- hormon kombinasyonunda ise sakaroz ve 2,4-D ilave edilmiş MS besin ortamından elde edilmiştir.

2.5. Kışlık Kabak (*Cucurbita maxima* Duch.) ve Balkabağı (*Cucurbita moschata* Duch.) türünde yapılmış çalışmalar

Kurtar ve ark. (2016) Karadeniz bölgesinden seçilen dört adet kestane kabağı (*Cucurbita maxima* Duch.) (57Sİ21, 55BA03, 55ÇA06 ve 55ÇA15) ve iki adet balkabağı (*Cucurbita moschata* Duch.) (14BO01 ve G9) hattı ile haploid bitki elde etmek amacıyla tek çekirdekli mikrospor aşamasındaki anterleri farklı çiçeklenme zamanlarında toplamışlar (tam çiçeklenme ve tam çiçeklenmeden 10 gün sonra) ve 2,4-D, BAP, KN'in farklı kombinasyonları ilave edilmiş MS besin ortamında kültüre almışlardır. Kestane kabağı ve balkabağının androgenesise tepkisinde besin ortamları, genotip ve anter toplama süresinin önemli yeri olduğunu bulmuşlardır. En iyi sonucu ilk anter toplama zamanında 2,0 veya 4,0 mg/l BAP +0,05 mg/l NAA kombinasyonu ile 57Sİ21 ve G9 hatlarından elde etmişlerdir. Toplamda 74 bitki elde edilmiştir. Ploidi analizi yapılarak 35 bitkinin (%47,3) haploid, diğerlerinin ise (%52,7) diploid olduğunu bildirmişlerdir.

2.6. Su Kabağı (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standley) türünde yapılmış çalışmalar

Kouakou ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada agronomik özellikleri iyi genotipler geliştirmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada androjenezden doublehaploid bitki elde etmeyi hedeflemişlerdir. Çalışma Fildişi sahilinde yetişen 6 bölgeden toplanan genotiplerle sürdürülmüştür. Anterler 4°C'de farklı sürelerle (0, 1, 2, 4, 6 ve 7 gün) ön soğuk uygulamasına tabii tutulmuştur. Anter kültüründe Metwally ve ark. (1998) ve Kumar ve ark. (2003) tarafından önerilen protokoller kullanılmıştır. Kallus oluşumu için 2 ve 4 gün boyunca uygulanan ön soğuk işlemi olumlu etki yapmıştır. Diğer yandan

2,4-D ve BAP ilave edilmiş B5 ortamı kallus oluşumu için etkin ortam olarak bildirmişlerdir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Sebze Yetiştirme ve Islahı Ana Bilim Dalı'na ait olan sera ve doku kültürü laboratuvarında 2022-2023 yıllarında yürütülmüştür.

3.1.1. Donör Genotipler ve Özellikleri

Gen havuzumuzda bulunan sitron karpuz hatlarından morfolojik olarak farklılık gösteren 11 tanesi (SK4, SK6, SK8, SK9, SK11, SK13, SK14, SK15, SK16, SK17 ve SK21) (Şekil 3-1) ile 4 adet ticari karpuz çeşidi (3 iri meyveli; Crimson Tide F1, Paskal F1, Crimson Sweet ve 1 mini karpuz; Pastel F1) ve (Şekil 3-2) olmak üzere 15 genotip kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan yabani karpuz hatlarından bazıları (Orijinal)



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan ticari karpuz çeşitleri (Soldan sağa doğru; Paskal F1, Pastel F1, Crimson Tide F1, Crimson Sweet F1)

3.2. Yöntem

3.2.1. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi

Çalışmamıza 7 Haziran 2022 tarihinde sera içinde torf doldurulmuş 45'lik viyollere tohum ekimi yapılarak başlanmıştır (Şekil 3.3). Fide dikimi ise 8 Temmuz 2022 tarihinde bitkiler dikim boyuna geldikleri 2-3 yapraklı aşamadayken her genotipten 40'ar adet olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bitkilerin yetiştirileceği serada toprak analiz sonuçlarına göre taban gübresi ve dekara 4 ton hesabıyla yanmış çiftlik gübresi uygulandıktan sonra dikim yerleri çapa makinesi ile işlenmiş ve toprak dikime hazır hale getirilmiştir. Daha sonra masurular oluşturularak üzerleri siyah malç ile örtülmüştür (Şekil 3.4).



Şekil 3.3 Serada yetiştiriciliği yapılan fideler



Şekil 3.4. Malç örtme işlemi

Serada yapmış olduğumuz toprak analizi sonuçlarına göre (Tablo 3.1) bitkiler gelişme dönemleri boyunca haftada iki sefer suda eriyebilen 20-20-20 (20% azot - 20% fosfor - 20% potasyum) gübresinden bitki başına 0.5 g olacak şekilde gübrelenerek sağlıklı bir şekilde büyütülmüştür.

Tablo 3.1. Sera 0-30 cm derinlikteki toprak analiz sonuçları

Analiz Adı	Birimi	Sonuç	Metot
Tür sınıfı		Tınlı	
pH (1:2.5, Toprak:Su)		7,32	(Jackson, 1958)
EC (Tuz) (1:5, Toprak:Su)	(μ /cm)	214	(Jackson, 1958)
CaCO ₃ (Kireç)	(%)	34,7	(Hızalan ve Ünal, 1966)
Organik Madde	(%)	1,46	(Smith ve Weldon, 1941)
İnorganik azot (NH ₄ +NO ₃ -N)	mg/kg	10,8	(Bayraklı, 1987)
Fosfor (P)	mg/kg	132,3	(Bayraklı, 1987)
Potasyum (K)	mg/kg	289	(Bayraklı, 1987)
Kalsiyum (Ca)	mg/kg	5027	(Bayraklı, 1987)
Magnezyum (Mg)	mg/kg	491	(Bayraklı, 1987)
Sodyum (Na)	mg/kg	109	(Bayraklı, 1987)
Değişebilir Na Yüzdesi	%	1,07	(Bayraklı, 1987)
Bor (B)	mg/kg	0,68	(Lindsay ve Norvell, 1978)
Bakır (Cu)	mg/kg	2,1	(Lindsay ve Norvell, 1978)
Demir (Fe)	mg/kg	4,0	(Lindsay ve Norvell, 1978)
Çinko (Zn)	mg/kg	2,3	(Lindsay ve Norvell, 1978)
Mangan (Mn)	mg/kg	6,2	(Lindsay ve Norvell, 1978)

Bitkiler askıya alınarak yetiştirilmiş, damlama sulama ile düzenli sulama ve gübreleme işlemleri yapılmıştır. Bitkiler sistemli bir şekilde budanarak sürekli olarak sağlıklı çiçek tomurcuğu oluşturmaları sağlanmıştır. Bu amaçla topraktan itibaren ilk 50 cm’de bulunan sürgünler alınmış, daha sonra gelişen yan sürgünlerde de bitki sıklığını düzenleyecek şekilde uç almalar yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Dikimi yapılan, askıya alınan ve budama işlemleri gerçekleştirilen bitkiler

Dönemsel olarak görülmeye başlayan kırmızı örümcek ve beyazsinek ile bitkilerin son dönemlerinde görülen külleme (*Erysiphe cichoracearum*, *Sphaerotheca fuliginea*) için sistemik pestisitler ve fungusitler ile mücadele yapılmış, her 12 günde bir düzenli ilaçlamalar yapılarak bitkiler sağlıklı bir şekilde büyütülmüştür. Kırmızı

örümcek için “Interrupt”, beyazsinek için dönüşümlü olarak “Actinara” ve “Admiral”, külleme için ise dönüşümlü olarak “Conrad” ve “Bendis” kullanılmıştır.

3.2.2. Anterlerde Uygun Mikrospor Aşamasının Belirlenmesi

Anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biriside uygun dönemdeki (geç tek çekirdekli ve erken çift çekirdekli dönem) mikrosporları içeren anterlerin kültüre alınmasıdır. Bu amaçla tezde kullanacağımız uygun aşamadaki anterleri taşıyan erkek çiçekler, mikrospor gelişim aşamaları ve tomurcuk morfolojisi (en, boy, taç yaprağın pozisyonu) ile ilişkilendirilerek belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalarda farklı gelişim dönemlerindeki tomurcuklar toplanmış, sınıflandırılmış ve anterlerindeki mikrosporların gelişim aşamaları hem asetokarmin hem de DAPI tekniği ile araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan 4 nolu sitron genotipinden toplanmış olan çiçek tomurcukları boyutlarına göre 7 belirgin gruba ayrılmıştır (Tablo 3.2; Şekil 3.6).

Tablo 3.2. Tomurcukların boyutlarına göre sınıflandırılması

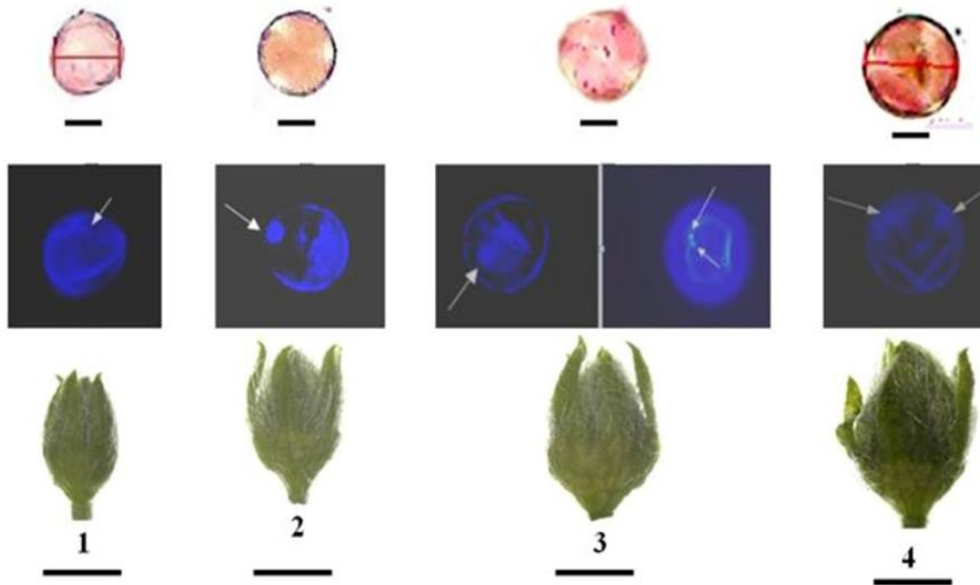
Sınıf	Boy (mm)	Çap (mm)
1	7.5 – 9.0	4.5 – 5.5
2	9.0 – 10.0	5.5 – 6.5
3	10.0 – 11.0	6.5 – 7.5
4	11.0 – 12.5	7.5 – 9.0
5	12.0 – 14.5	9.0 – 11.5
6	14.5 – 18.0	11.5 – 16.0
7	18.5 – 20.0	16.5 – 18.0



Şekil 3.6. Tomurcukların görsel sınıflandırılması

Her bir tomurcuk sınıfı için 40'ar adet tomurcuk üzerinde çalışılmıştır. Öncelikle tomurcuklardan çıkarılan anterler lam üzerinde %1'lik asetokarmin çözeltisi damlatıldıktan sonra ezilerek mikroskop altında incelenmiş ve mikrosporların çapları (μm) ölçülerek fotoğraflanmıştır. DAPI tekniği ile yapılan incelemelerde her bir gruptan seçilen çiçek tomurcukları Karnoy çözeltisinde (hacimsel olarak 3:1 oranında Apolet etanol: Glasiyal asetik asit) 24 saat bekletilmiş, sonrasında polen duvarının elimine edilmesi ve daha net görüntü elde etmek amacıyla 1 N HCl çözeltisinde 30 dakika tutulmuştur. Daha sonra anterler tomurcuklardan çıkarılmış ve 1-2 damla DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) damlatıldıktan sonra floresan mikroskopta incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Çalışma sonucunda farklı boyutlardaki tomurcukların farklı gelişim aşamalarına sahip mikrospor içerdikleri tespit edilmiştir. Mikrospor çapı mikrospor gelişim aşamaları ilerledikçe artış göstermiş ve olgun polen aşamasında maksimuma ulaşmıştır. Anter kültürü için en uygun tomurcukların 10-11 mm boy, 6.5-7.5 mm çapa sahip tomurcuklar (geç tek çekirdekli-erken çift çekirdekli dönem) olduğu tespit edilmiştir (Kurtar ve ark., 2023). Bu tomurcuklarda çanak yaprakların taç yapraklardan daha uzun olduğu tespit edilmiştir. Anter kültürü çalışmalarımızda bu boyuttaki ve özellikle tomurcuklar kullanılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7.Tomurcuk boyutlarına göre mikrospor gelişim aşamaları (1) Erken tek çekirdekli dönem (2) Geç tek çekirdekli dönem (3) Geç tek çekirdekli-erken çift çekirdekli dönem (4) Çift çekirdekli dönem

3.2.3. Kullanılan Besin Ortamları ve İçerikleri

Çalışmada kullanılan besi ortamlarının içerikleri Tablo 3.3’de, MS temel besi ortamının bileşimi (Murashige ve Skoog, 1962) ise Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan protokoller ve detayları

Dönem	Ortam	İçerik
Embriyogenesis ve bitkicik uyartımı	O1	MS + 2 mg/L 2.4-D + 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA + 30 g/L sakaroz + 8 g/L agar; pH 5.8
	O2	MS + 2 mg/L 2.4-D + 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA + 30 g/L maltoz + 8 g/L agar; pH 5.8
	O3	MS + 2 mg/L 2.4-D + 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA + 15 mg/L gümüş nitrat + 0.5% aktif karbon + 30 g/L sakaroz + 8 g/L agar; pH 5.8
	O4	MS + 2 mg/L 2.4-D + 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA + 15 mg/L gümüş nitrat + 0.5% aktif karbon + 30 g/L maltoz + 8 g/L agar; pH 5.8
	O5	Çift katmanlı ortam Alt katman: MS + 2 mg/L 2.4-D + 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA, + 15 mg/L gümüş nitrat + 0.5% aktif karbon + 30 g/L sakaroz + 8 g/L agar; pH 5.8 Üst katman: MS + 0.5 mg/L zeatin + 1.0 mg/L IAA + 30 g/L sakaroz; pH:5.8
Olgunlaştırma	O6	MS + 1 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA + 30 g/L sakaroz + 8 g/L agar; pH 5.8
Bitki eldesi	O7	MS + 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L IAA + 30 g/L sakaroz + 8 g/L agar; pH 5.8

Tablo 3.4. MS besi ortamının bileşimi

Makro elementler(mg/L)		Fe-EDTA (mg/L)	
KNO ₃	1900	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37.3
NH ₄ NO ₃	1650	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Vitaminler (mg/L)	
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	Pyridoxin HCL	0.50
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	-	Nikotinik Asit	0.50
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	Thiamine HCL	0.10
KH ₂ PO ₄	170	Glycine	2.00
Mikro elementler (mg/L)		Myo-inositol	100.00
MnSO ₄ .H ₂ O	22.300	Vit B12	0.03
MnSO ₄ .4H ₂ O	-	Folik asit	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.600	Biotin	-
H ₃ BO ₃	6.200	Diğerleri	
KI	0.830	Sakaroz (g/L)	30
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250	Agar-agar (g/L)	8
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	pH	5.8
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.025		
CaCl ₂	-		

Kullanılan besi ortamları 121 °C sıcaklık, 1.1 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak hazırlanmış, steril kabin içerisinde soğuması beklendikten sonra (yaklaşık 50-60 °C) 6 x 1.5 cm boyutlu steril plastik petrilere her petri için 8 ml olacak şekilde steril pipetler yardımıyla dökülmüş ve ortamın soğuyup katılaşmasından sonra kullanılmıştır. Çift katmanlı ortamda katılan kısmın üstüne üst katman olarak hazırlanan çözeltiden 1 ml olacak şekilde eklenmiştir.

3.2.4. Çiçek Tomurcuklarının Dezenfeksiyonu ve Anterlerin Çıkarılması

Anter kültürü çalışmalarında sürekli olarak belirlenmiş özelliklere sahip erkek çiçek tomurcukları kullanılmıştır. Çalışmalara ilk erkek çiçekler görülür görülmez başlanmıştır. Uygun aşamadaki tomurcuklar sabah 07:00 – 09:00 arası toplanarak soğuk zincirinde laboratuara getirilmiş, 15 dakika boyunca akan çeşme suyu altında kaba kirlerinden arındırıldıktan sonra kurulanmıştır. Tomurcuklar vakit kaybetmeden öncelikle %70'lik etanol çözeltisinde 2 dakika süreyle karıştırılarak bekletilmiş, süre sonunda 3 kez 5'er dakika steril saf su ile durulanmıştır. Bu şekildeki tomurcuklar daha sonra %20'lik ticari çamaşır suyu + 1-2 damla Tween 20 çözeltisinde 20 dakika tutulmuş ve tekrar 3 kez 5'er dakika steril saf su ile durulanmıştır. Bu işlemlerin sonunda tomurcuklar steril kabin içerisinde steril kurutma kağıtlarının üzerine konularak fazla sularından arındırılmış ve explantasyon için hazır hale getirilmiştir.

Tomurcuklar steril kurutma kağıtlarının üzerinde steril bir pens ve bisturi yardımıyla anterlere zarar verilmeden dikkatlice açılmış ve filament içermeyen anterler, içlerine besi ortamı doldurulmuş 6 x 1.5 cm çap ve yüksekliğe sahip tek kullanımlık steril petrilere, yumuşak hareketlerle üst yüzeyleri besi ortamıyla temas edecek ve sap kısımları yukarıda olacak şekilde dikkatlice yerleştirilmiştir (Şekil 3.8). Her petriye 8-10 adet anter koyulmuş, petrilere kabin içerisinde streç film ile sarılarak dış ortam ile ilişkileri kesilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Anterlerin kültüre alınma işlemi



Şekil 3.9. Kültüre alınmış anterler

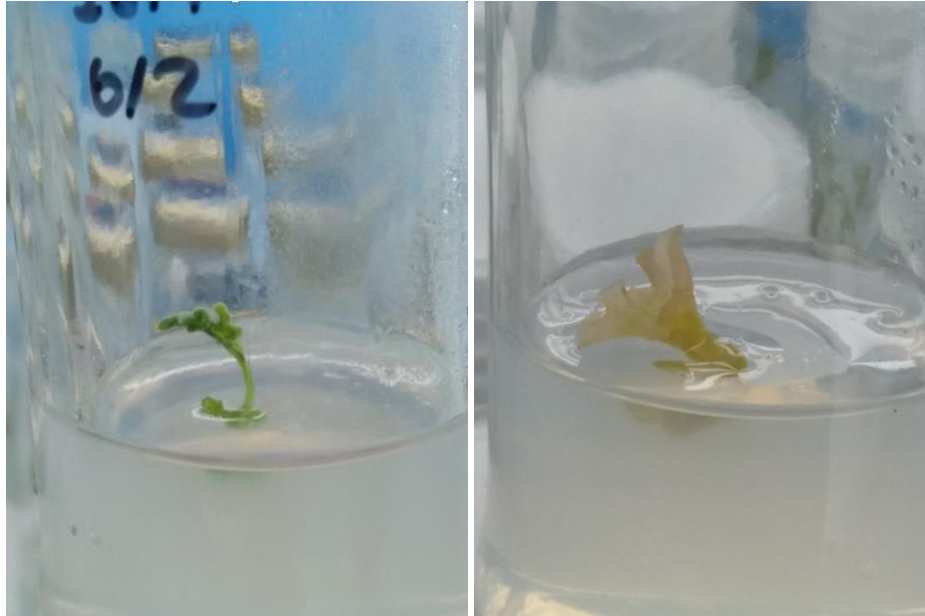
3.2.5. Ön Uygulamalar ve Kallus Eldesi

Anterler ilk önce inkübatörde karanlık koşullarda 35 °C'de 2 gün sıcaklık şoku uygulamasına alınmış, 2. günün sonunda 26± 1°C sıcaklık + 12/12 h aydınlık/karanlık + 1500 lüx ışık şiddetine ayarlanmış iklim odası koşullarında 1 hafta süreyle bekletilmiştir (bu dönemde düşük ışık yoğunluğu kullanılmıştır). Bu sürenin sonunda anterler 26± 1°C sıcaklık + 16/8 h aydınlık/karanlık + 3000 lüx ışık şiddetine sahip iklim odası şartlarında gelişmeye bırakılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. İklim odası koşullarındaki anter kültürü çalışmaları

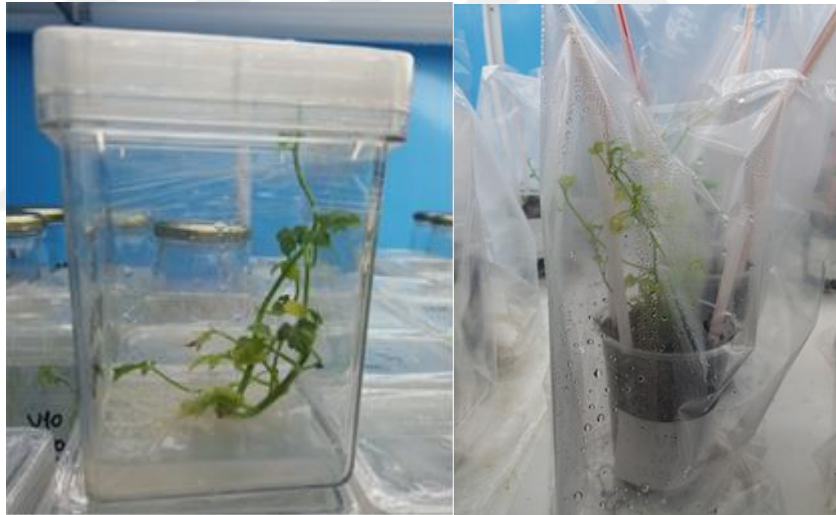
Elde edilen kalluslardan bir kısmında embriyo benzeri yapılar tespit edilmiş, bunlardan da çok azında bitkicik rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Meydana gelen bitkicikler öncelikle MS + 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L IAA + 30 g/L sakaroz + 8 g/L agar + pH 5.8 ortamında kültüre alınmıştır. Ancak bu ortam içerisinde bazı bitkiler köklenmemiş ve sararıp kahverengileşerek ölmüşlerdir (Şekil 3.10). Bunun üzerine sağ kalan 3 bitki $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/l IBA + 30 g/L sakaroz + 8 g/L agar + pH 5.8 ortamına alınarak başarıyla köklendirilmiş, büyütülmüş ve dış koşullara alıştırılmıştır.



Şekil 3.11. Köklendirme ve büyütme ortamındaki bir bitkicik (sol) ile sararıp ölen bir bitkicik (sağ)

3.2.6. Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması (Aklimatizasyon)

Anter kültüründen belli sayıda elde edilen bitkiler belli bir büyüklüğe ulaşmış ve dış koşullara alıştırılmaya başlanmıştır. Magenta ve kavanozlarda belli bir büyüklüğe ulaşan bitkiler besi ortamlarından çıkarılmış ve kökleri musluk suyu altında iyice yıkanarak temizlenmiştir. Kökleri temizlenen ve fazla kökleri alınan bitkiler otoklavda steril edilmiş torf doldurulmuş plastik bardaklara dikilmiştir. Bitkilerin ilk can suları % 0.5'lik karbendazol (fungisit) karışımı ile yapılarak olası bulaşmalar engellenmeye çalışılmıştır. Bu şekildeki fidelerin üzeri plastik bir poşet ile kapatılarak 1 hafta boyunca korunmuş, ilk haftanın sonunda plastikler alt kısımlarından hafifçe açılmaya başlanarak 3. haftanın sonunda bitkiler tamamen dış koşullara alıştırılmıştır. Aklimatizasyon çalışmaları 25 °C ve % 65 nem koşullarına sahip iklim odası koşullarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Büyütülmüş (orta) ve dış koşullara alıştırılmakta olan bitkiler

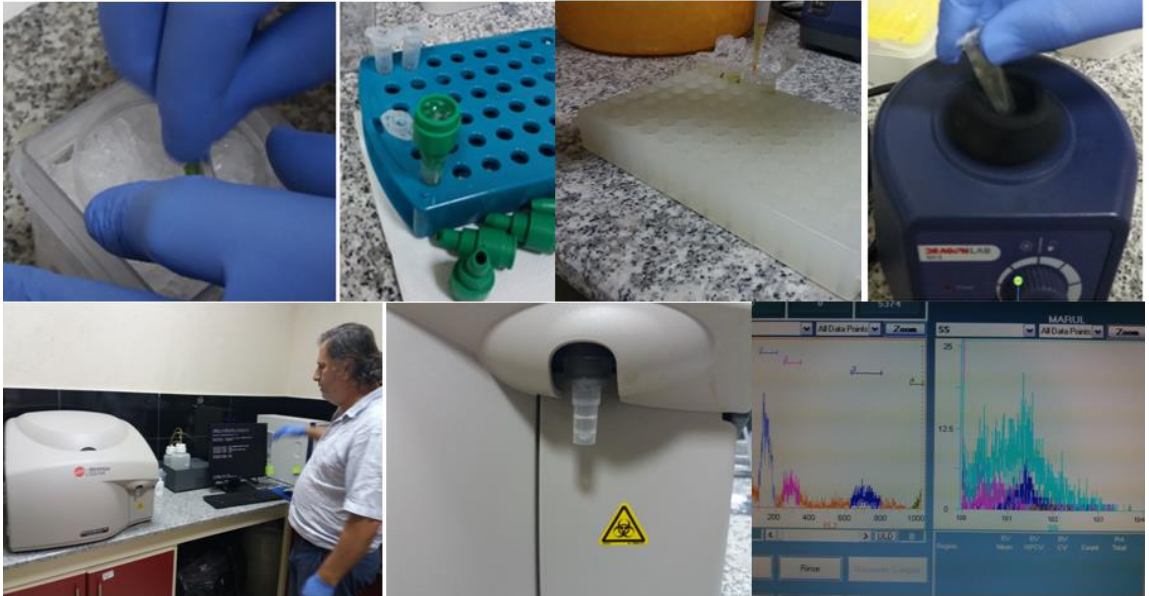
3.2.7. Ploidi Düzeyinin Tespiti

Ploidi tespiti çalışmaları dış koşullara alıştırılma aşaması (stomatal gözlemler) ile sonrasında (flow sitometri) yapılmıştır. Bu amaçla stomatal gözlemler ile ilk ploidi tespiti çalışmalarına başlanmıştır. Aklimatizasyon sonrasında yeterli büyüklüğe ulaşmış bitkilerin yaprakları örneklenerek laboratuara getirilmiş ve alt epidermisleri pensler yardımıyla soyulduktan sonra lam üzerine yayılmış ve %1'lik gümüş nitrat ($AgNO_3$) çözeltisi damlatılarak önce 10x10 daha sonra 40x10 büyütmede incelenmiştir. Stomatal

gözlemlerde, kabakgillerde önemli ve geçerli bir belirteç olan bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısı (adet) değerlerine bakılmıştır. Her bir bitkide 3 yaprakta ve her yaprakta 3 farklı bölgede gözlemler yapılmıştır.

Flow sitometri (FCM) analizleri ise dış koşullara tamamen alıştıran bitkilerde gerçekleştirilmiştir. FCM analizleri Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir. FCM analizi için çekirdek örneklerinin hazırlanması işleminde taze karpuz yaprakları (~50 mg) ile içsel referans standart bitkiye (bu amaçla taze kolza fideleri kullanılmıştır) ait yapraklar (~50 mg) buz dolu bir kutuya yerleştirilmiş ve 1.5 ml çekirdek izolasyon sıvısı bulunduran petri tabaklarına konarak yeni bir jilet yardımı ile küçük şeritler şeklinde kıyılmıştır. Her çekirdek örneği bir naylon filtreden geçirildikten sonra 1 mg/l olarak hazırlanmış propidium iodid stokundan 5 µl ile boyanmıştır. Çekirdek DNA örnekleri Cell Lab Quanta SC flow cytometer (Beckman-Coulter) ile analiz edilmiştir (Şekil 3-13). Karpuz örneklerinin ploidi seviyeleri sahip oldukları çekirdek DNA miktarlarının içsel referansın çekirdek DNA miktarı ile karşılaştırılması ile belirlenmiştir. Tüm materyallerin çekirdek DNA miktarları aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

Karpuz örneği 2C çekirdek DNA (pg) = (Karpuz örneği 2C pik ortalaması/içsel referans 2C pik ortalaması) x 2C içsel referans DNA (pg)



Şekil 3.13. Örneklerin buz küvetinde jilet yardımıyla kesilerek karıştırılması, süzülmesi, boya çözeltisinin eklenmesi, örneklerin karıştırılması, okumaların yapılması, piklerin elde edilmesi.

3.2.8. Gözlem ve Ölçümlerin Alınması ve Değerlendirilmesi

Kültüre alınan anter sayısı (AS; adet): Her bir genotip ve her bir ortam için belirlenmiştir.

Farklılaşan anter sayısı (FAS; adet): Kültür süresince farklılaşarak şekil ve renk değiştiren yapılar kayıt edilmiştir.

Farklılaşma oranı (FO; %): Farklılaşan anter sayısının kültüre alınan anter sayısına oranı olarak hesaplanmıştır.

Kallus oluşturan anter sayısı (KAS; adet) : Kültür süresince kallus oluşturan anter sayısı kayıt edilmiştir.

Kallus oluşturma oranı (KOO; %): Kallus oluşturan anter sayısının kültüre alınan anter sayısına oranı olarak hesaplanmıştır.

Embriyo kallus sayısı (EKS; adet): Oluşan kalluslardan embriyo meydana getirenlerin sayıları hesaplanmıştır.

Embriyolu kallus oranı (EKO; %): Embriyo oluşturan kallus sayısının kültüre alınan anter sayısına oranı olarak hesaplanmıştır.

Bitkicik sayısı (BS; adet): Her bir genotip ve her bir ortam için belirlenmiştir.

Bitkiye dönüşüm oranı (BDO; %): Her bir genotip ve her bir uygulama için elde edilen bitkilerin anter sayısına oranı olarak hesaplanmıştır.

3.2.9. İstatistiksel Analizler

Çalışma kullanılan materyalin eşit sayıda olamamasından dolayı belirli bir deneme deseni kullanılamamış ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Bu sebeple sadece elde edilen değerlerin ortalamaları veya % değerleri verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Genotip ve Ortamların Anterlerin Farklılaşması ve Kallus Oluşumu Üzerine Etkileri

Kültüre alınan anterlerin farklılaşmaya başlaması ve sonrasında kallus oluşturmaları indirekt metodun önemli aşamalarıdır. Farklılaşmanın ve kallus oluşumunun gerçekleşmesi kültürün ilerleyen dönemlerinin başarısı için bir ölçü olarak kabul edilir. Genotipler açısından değerlendirme yapıldığında, tüm genotiplerde anterlerde farklılaşma gözlenmiş, FO % 27.19 ile (Pastel F1) % 67.07 (SK11) arasında değişmiştir (Tablo 4.1). Ortamlar açısından değerlendirme yapıldığında O1 ve O2 ortamlarında tüm genotiplerde farklılaşma meydana gelmiştir. O3 ortamında ise SK 17 genotipi % 100 farklılaşma göstermiş olup bunu %66,67 ile SK 13 genotipi takip etmiştir. Sitron hatlarının tümü kullanılan tüm ortamlarda farklılaşma gösterirken, O4 ve O5 ortamlarında farklılaşma oranları diğer ortamlara göre çok düşük olmuş, bu ortamlarda Paskal, Pastel ve Tide çeşitlerinde ise farklılaşma gözlemlenmemiştir. O1 ortamında anter farklılaşması açısından en yüksek değerler % 94,74 ile Paskal ve % 89,74 ile SK8'den elde edilmiş, bunları % 89,29 ile SK17 takip etmiştir. O2 besi ortamında ise SK9 ve SK14 %100 farklılaşma göstermişlerdir.

Tablo 4. 1. Kültüre alınmış anterlerin sayısı (AS), Farklılaşan anter sayısı (FAS), Kallus oluşturan anter sayısı (KAS), Embriyolu kallus sayısı (EKS), Bitki sayısı (BS), Farklılaşma oranı (FO), Kallus oluşturma oranı (KOO), Embriyolu kallus oranı (EKO), Bitkiye Dönüşüm oranı (BDO)

Genotip	Ortam	AS	FAS	KAS	EKS	BS	FO	KOO	EKO	BDO
SK4	O1	36	20	17	22	0	55,56	47,22	81,48	0,00
	O2	43	36	34	0	0	83,72	79,07	0,00	0,00
	O3	40	10	0	0	0	25,00	0,00	0,00	0,00
	O4	30	16	0	0	0	53,33	0,00	0,00	0,00
	O5	55	20	0	0	0	36,36	0,00	0,00	0,00
	Σ	204	102	51	22	0	52,31	26,15	10,78	0,00
SK6	O1	21	16	12	7	0	76,19	57,14	33,3	0,00
	O2	20	19	19	0	0	95,00	95,00	0,00	0,00
	O3	39	17	0	0	0	43,59	0,00	0,00	0,00
	O4	30	16	0	0	0	53,33	0,00	0,00	0,00
	O5	50	28	0	0	0	56,00	0,00	0,00	0,00
	Σ	160	96	31	7	0	60,00	19,38	4,38	0,00
SK8	O1	39	35	26	12	0	89,74	66,67	30,77	0,00
	O2	19	18	15	6	0	94,74	78,95	31,58	0,00
	O3	39	14	0	0	0	35,90	0,00	0,00	0,00
	O4	27	11	0	0	0	40,74	0,00	0,00	0,00
	O5	49	18	0	0	0	36,73	0,00	0,00	0,00
	Σ	173	96	41	18	0	55,49	23,70	10,40	0,00

Tablo 4.1'in devamı

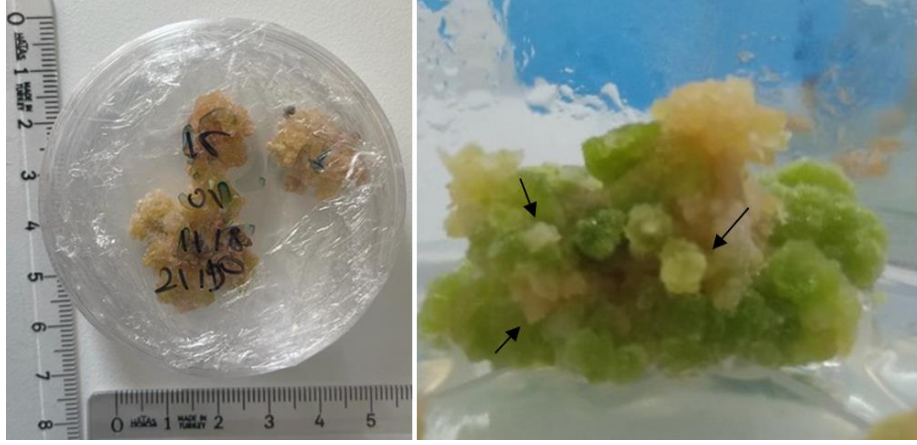
Genotip	Ortam	AS	FAS	KAS	EKS	BS	FO	KOO	EKO	BDO
SK9	O1	38	32	19	17	0	84,21	50,00	44,74	0,00
	O2	19	19	16	5	0	100,00	84,21	26,32	0,00
	O3	29	10	0	0	0	34,48	0,00	0,00	0,00
	O4	37	18	0	0	0	48,65	0,00	0,00	0,00
	O5	52	26	0	0	0	50,00	0,00	0,00	0,00
	Σ	175	105	35	22	0	60,00	20,00	12,57	0,00
SK11	O1	29	26	18	10	0	89,66	62,07	34,48	0,00
	O2	26	25	19	6	0	96,15	73,08	23,08	0,00
	O3	20	10	0	0	0	50,00	0,00	0,00	0,00
	O4	31	19	0	0	0	61,29	0,00	0,00	0,00
	O5	58	30	0	0	0	51,72	0,00	0,00	0,00
	Σ	164	110	37	16	0	67,07	22,56	9,76	0,00
SK13	O1	24	19	12	0	0	79,17	50,00	0,00	0,00
	O2	25	24	19	4	0	96,00	76,00	16,00	0,00
	O3	15	10	0	0	0	66,67	0,00	0,00	0,00
	O4	28	13	0	0	0	46,43	0,00	0,00	0,00
	O5	53	18	0	0	0	33,96	0,00	0,00	0,00
	Σ	145	84	31	4	0	57,93	21,38	2,78	0,00
SK14	O1	12	10	10	8	0	83,33	83,33	66,67	0,00
	O2	14	14	14	0	0	100,00	100,00	0,00	0,00
	O3	9	5	0	0	0	55,56	0,00	0,00	0,00
	O4	18	9	0	0	0	50,00	0,00	0,00	0,00
	O5	29	10	0	0	0	34,48	0,00	0,00	0,00
	Σ	82	48	24	8	0	58,54	29,27	9,76	0,00
SK15	O1	26	20	17	4	0	76,92	65,38	15,38	0,00
	O2	26	14	10	0	0	53,85	38,46	0,00	0,00
	O3	25	15	0	0	0	60,00	0,00	0,00	0,00
	O4	27	14	0	0	0	51,85	0,00	0,00	0,00
	O5	45	18	0	0	0	40,00	0,00	0,00	0,00
	Σ	149	81	27	4	0	54,36	18,12	2,68	0,00
SK16	O1	19	9	7	6	0	47,37	36,84	31,58	0,00
	O2	20	19	18	0	0	95,00	90,00	0,00	0,00
	O3	14	5	0	0	0	35,71	0,00	0,00	0,00
	O4	28	15	0	0	0	53,57	0,00	0,00	0,00
	O5	51	16	0	0	0	31,37	0,00	0,00	0,00
	Σ	132	64	25	6	0	48,48	18,94	4,55	0,00
SK17	O1	28	25	17	0	0	89,29	60,71	0,00	0,00
	O2	26	22	20	9	0	84,62	76,92	34,62	0,00
	O3	16	16	0	0	0	100,00	0,00	0,00	0,00
	O4	27	14	0	0	0	51,85	0,00	0,00	0,00
	O5	40	12	0	0	0	30,00	0,00	0,00	0,00
	Σ	137	89	37	9	0	64,96	27,01	6,57	0,00
SK21	O1	25	19	8	6	12	76,00	32,00	24,00	48,00
	O2	27	17	16	0	0	62,96	59,26	0,00	0,00
	O3	20	10	0	0	0	50,00	0,00	0,00	0,00
	O4	31	19	0	0	0	61,29	0,00	0,00	0,00
	O5	26	10	0	0	0	38,46	0,00	0,00	0,00
	Σ	129	75	24	6	12	58,14	18,60	4,65	9,30
PASTEL F1	O1	28	16	4	0	0	57,14	14,29	0,00	0,00
	O2	20	10	8	0	0	50,00	40,00	0,00	0,00
	O3	13	5	0	0	0	38,46	0,00	0,00	0,00
	O4	27	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
	O5	26	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
	Σ	114	31	12	0	0	27,19	10,53	0,00	0,00

Tablo 4.1'in devamı

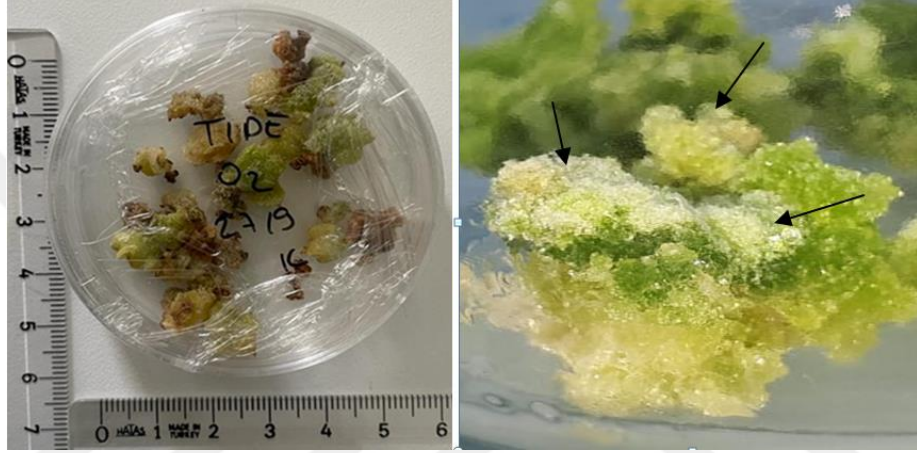
Genotip	Ortam	AS	FAS	KAS	EKS	BS	FO	KOO	EKO	BDO
PASKAL F1	O1	19	18	8	0	0	94,74	42,11	0,00	0,00
	O2	28	25	22	1	0	89,29	78,57	3,57	0,00
	O3	14	7	0	0	0	50,00	0,00	0,00	0,00
	O4	30	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
	O5	35	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
	Σ	126	50	30	1	0	39,68	23,81	0,79	0,00
C. SWEET	O1	33	21	8	0	0	63,64	24,24	0,00	0,00
	O2	20	17	14	0	0	85,00	70,00	0,00	0,00
	O3	15	7	0	0	0	46,67	0,00	0,00	0,00
	O4	30	10	0	0	0	33,33	0,00	0,00	0,00
	O5	25	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
	Σ	123	55	22	0	0	44,72	17,89	0,00	0,00
C. TİDE F1	O1	20	15	5	0	0	75,00	25,00	0,00	0,00
	O2	36	29	26	2	0	80,56	72,22	5,56	0,00
	O3	17	8	0	0	0	47,06	0,00	0,00	0,00
	O4	26	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
	O5	25	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
	Σ	124	52	31	2	0	41,94	25,00	1,61	0,00
Genel Σ/Ortalama	2137	1138	458	125	12	53,25	21,43	5,85	0,56	

Kullanılan besi ortamları içerisinde sadece O1 ve O2 numaralı ortamlarda kallus oluşumu gözlenmiş (Şekil 4.1; 4.2; 4.3.) O3, O4 ve O5 ortamlarında bazı genotiplere ait anterlerde farklılaşma görülse de kallus oluşumu meydana gelmemiştir (Şekil 4.4; 4.5 ; 4.6). O1 besi ortamında en yüksek kallus oluşum oranları %83,33 ile SK14 ve %57,14 ile SK6'dan genotipinde elde edilmiştir. O2 ortamında ise %100 ile SK14 ve %95 ile SK6 en yüksek değerleri vermiştir.

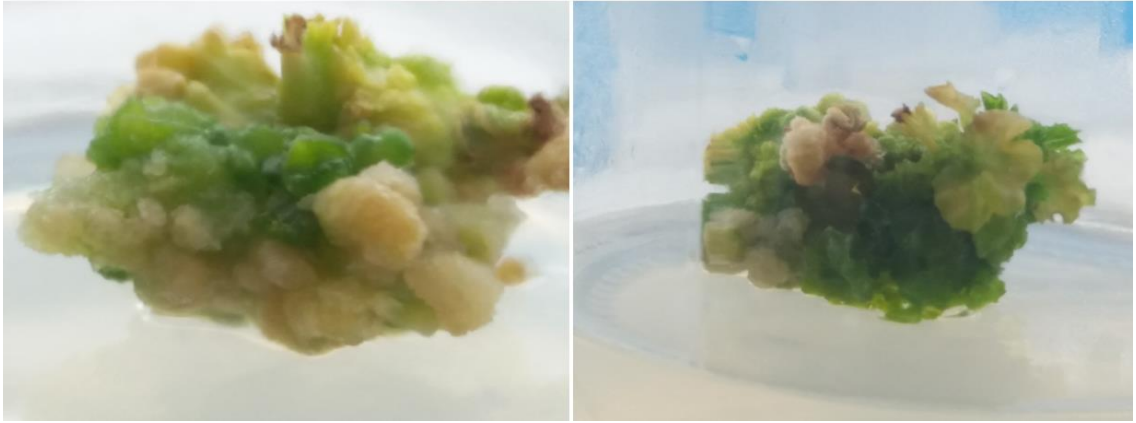
O2 ortamı tüm genotiplerde en yüksek kallus oluşum değerlerini vermiş bu açıdan en iyi ortam olarak tespit edilmiştir. O2 ortamının O1 ortamından tek farklı yanı ise besi ortamında sakaroz yerine maltoz kullanılmış olmasıdır. Bu durumda karpuzda anter kültüründe maltozun daha fazla kallus gelişimi sağladığını söylemek mümkündür. Tüm genotiplerde O3, O4 ve O5 ortamlarından kallus elde edilememesi genotip etkisinden ziyade kullanılan aktif karbonun bu olayda etkili olduğunu ortaya koymuştur. Diğer bir ifadeyle karpuz genotiplerine ait anterler aktif karbon kullanılan ortamlarda kallus oluşumu meydana getirmemiştir. Tabi ki bu durum aktif karbonun tamamen başarısız ve etkisiz olduğunu ortaya koyma açısından yeterli değildir.



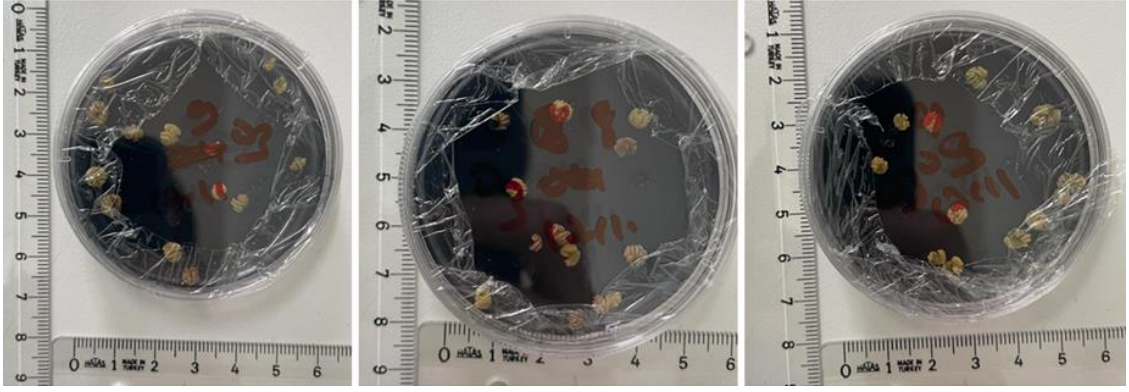
Şekil 4.1. O1 ortamındaki anter kökenli kalluslar (sol) ve bir kallus üzerine embriyo benzeri yapılar (sağ)



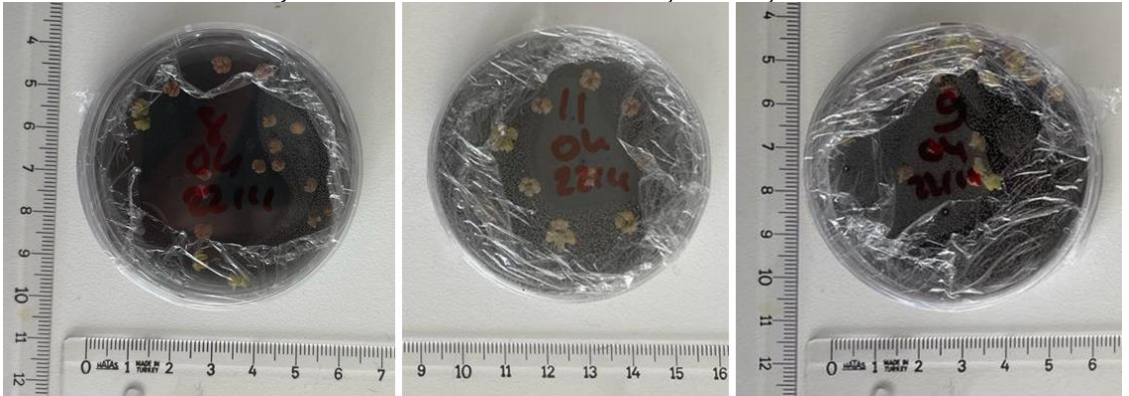
Şekil 4.2. O2 ortamındaki anter kökenli kalluslar (sol) ve bir kallus üzerine embriyo benzeri yapılar (sağ)



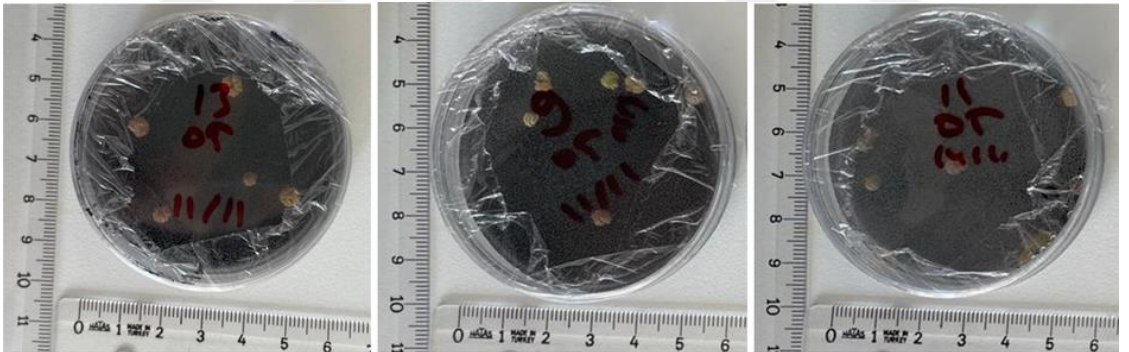
Şekil 4.2. Kallus üzerinde oluşmaya başlayan bitkicikler.



Şekil 4.3. O3 ortamındaki kallus oluşturmamış anterler



Şekil 4.4. O4 ortamındaki kallus oluşturmamış anterler



Şekil 4.5. O5 ortamındaki kallus oluşturmamış anterler

Anter kültürü çalışmalarında farklılaşma ve kallus oluşumu; kullanılan genotip, genotipin yetiştirme koşulları, anterlere uygulanan ön işlemler ve kullanılan besi ortamlarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Birçok araştırmacı bu etmenler arasında genotipin başarıyı en çok etkileyen faktör olduğunu öne sürmektedir (Gağazka ve Niemirowicz-Szczytt, 2013; Nyirahabimana ve Solmaz, 2021; Sari ve Solmaz, 2021). Akbaş ve Solmaz (2019) 4 genotipte yaptıkları anter kültürü çalışmasında genotiplerin ve kullanılan besin ortamı kombinasyonlarına göre değişen oranlarda anter gelişimi ve kallus oluşumu gözlenmiştir. Yine başka bir çalışmada Tulukoğlu ve Sarı (2014) karpuzda anter kültürü çalışmasında farklı çiçeklenme zamanlarında toplanan

anterler 2,4-D ve TDZ hormonları içeren farklı kombinasyonlardaki besin ortamlarına aktarılmıştır ve yine genotiplere bağlı kallus oluşum oranlarında farklılık gözlemlenmiştir. Silva ve ark. (2021) 4 °C soğuk şokuna tabi tuttukları anterleri 2,4-D ve BAP'ın farklı kombinasyonlarının olduğu MS besin ortamında kültüre almışlardır. 2,4-D'nin kallus oluşumuna olumlu etki yaptığını, 2,4-D ve BAP'ın beraber kullanıldığı besin ortamında genotipler arasında farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan besin ortamlarında ise 2.4-D + BAP + NAA+ gümüş nitrat ve aktif karbon kullanılmıştır.

Bu bulgular, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu olarak, anter kültüründe başarıyı genotipin ve kullanılan besi ortamının belirlediğini göstermektedir.

4.2. Genotip ve Ortamların Embriyo ve Bitkicik Oluşumu Üzerine Etkileri

O1 ortamında en yüksek embriyo oluşum yüzdeleri %81,43 ile SK4, %66,67 ile SK14 ve %44,74 ile 9 nolu hatlardan elde edilmiştir. SK8, SK11, SK15, SK16, SK21 hatları bu açıdan nispeten daha düşük değerler vermiştir. SK13, SK17 hatları ile Paskal, Pastel, C. Sweet ve C. Tide çeşitlerinin anterleri gelişimine devam edip kallus oluşturmalarına rağmen embriyo oluşumunda başarısız sonuçlar vermiştir. O2 ortamında ise en yüksek embriyo oluşum yüzdeleri %34,62 ile SK17, %31,58 ile SK8 ve %26,32 ile SK9 genotiplerinden elde edilmiştir. SK4, SK6, SK14, SK15, SK16, SK21 genotipleri ile Pastel ve C. Sweet çeşitlerinin embriyo oluşum yüzdelerinin nispeten daha düşük oranlarda gerçekleştiği gözlemlenmiştir. SK13, SK17 genotipleri ile Paskal, Pastel, C. Sweet ve C. Tide çeşitlerinde embriyogenesis başarısız olmuştur, ancak anterler gelişmeye devam etmiş ve sadece kallus oluşturmuşlardır. SK14 genotipi %100 kallus oluşturma oranına sahipken hiç embriyo oluşturmamıştır. O3, O4 ve O5 ortamlarında embriyo oluşumu gözlemlenmemiştir. O2 ortamı en yüksek kallus oluşturma oranına sahiptir ancak aynı yorumu embriyo oluşturan anter sayısı için yapmak mümkün olmamıştır. Zira O1 ortamında toplam embriyolu anter sayısı 92 iken bu sayı O2 ortamında 33 olarak gerçekleşmiştir. O2 ortamında O1 ortamından farklı olarak sakaroz yerine maltoz kullanılmıştır. Dolayısıyla sakarozun embriyo sayısını artırmada maltozdan daha etkili olduğu kanaatine varılmıştır.

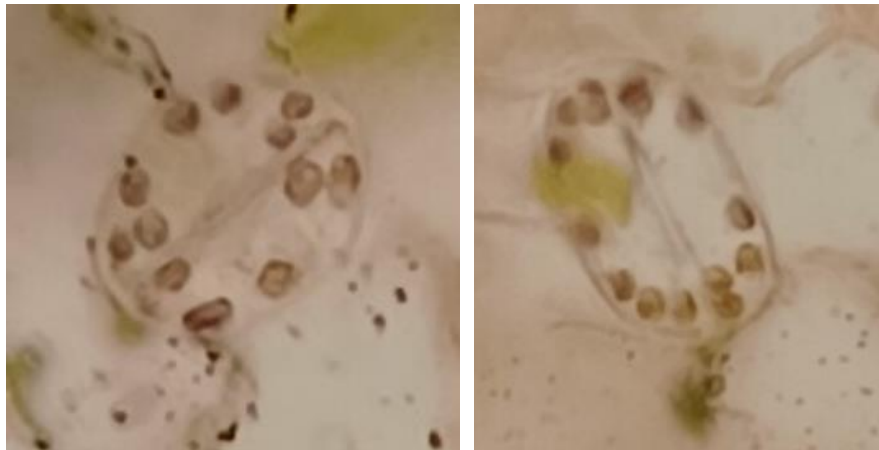
Embriyo oluşturan anter sayısı yüksek değerlere ulaşmasına rağmen aynı başarı bitkicik sayısında yakalanamamıştır. Çalışmada kullanılan 5 farklı ortamdan sadece O1 ortamından SK21 nolu sitron genotipinden sadece 12 adet bitkicik rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Bitkiye dönüşüm oranı ise % 48,00 olarak gerçekleşmiştir. Toplamda

kültüre alınan 2137 anterden sadece 12 adet bitki elde edilmiş ve BDO %0.56 gibi çok düşük düzeyde kalmıştır.

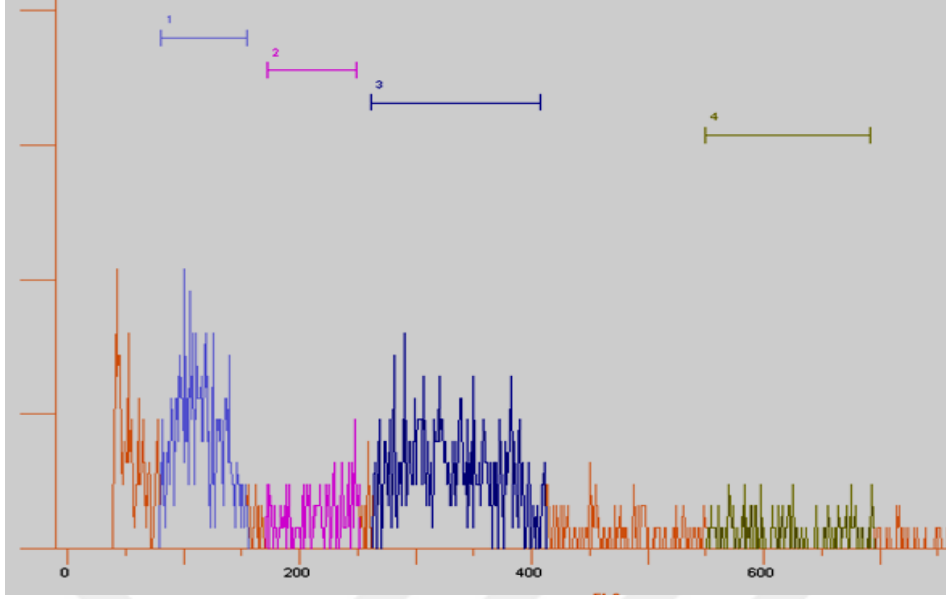
Abdollahi ve ark. (2015) karpuzda yapmış olduğu anter kültürü çalışmasında 2,4-D BAP, NAA ve Kinetin'in farklı kombinasyonları kıyaslamışlar ve en yüksek embriyo oluşumunu %65 oranında 2 mg/L 2,4-D ve 1,5 mg/L BAP içeren ortamda gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda ise O1 ortamında 2 mg/L BAP kullanılmış ve 1 mg/L NAA eklenmiştir ve embriyo oluşum oranı %23 olarak gözlenmiştir. Kumar ve ark. (2003) 2 farklı hıyar çeşidinde B5 ortamında yapmış olduğu anter kültürü çalışmasında rastgele seçilen 24 bitkide yaptıkları kromozom sayımlarında 21 bitkicik haploid, 3 bitkicik diploid olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamıza ise B5 ortamı yerine MS besin ortamı kullanılmıştır. Bu farklılıkları, çalışmada kullanılan genotiplerin, yetiştirme koşullarının, besi ortamlarının ve kültüre alma zamanlarının değişken olmasıyla açıklamak mümkündür.

4.3. Ploidi Testlemeleri

Kültüre alınan 2137 anterden sadece 12 adet bitkicik rejenerasyonu gerçekleşmiş, bunlardan ise 3 tanesi başarılı bir şekilde dış koşullara alıştırılarak büyütülmüştür. Dış koşullara alıştırılmış 1 haftalık bitkilerde yapılan stomatal gözlemler ve flow sitometri analizleri neticesinde bitkilerin tümünün diploid ($2n$) yapıda olduğu belirlenmiştir. Diploid kontrol bitkileriyle karşılaştırmalı olarak yapılan gözlemlerde stomaların bekçi hücrelerinde toplamda 10-12 adet kloroplast sayılmıştır (Şekil 4.7). Flow sitometri analizlerinde ise ilk (1 numaralı) pik diploid ($2n$) karpuzun çekirdek yoğunluğu olan 0.90 değeriyle örtüşmüştür (Şekil 4.8). 2. pik bölünmekte olan hücreler, 3. pik ise kontrol kolza bitkisine aittir.

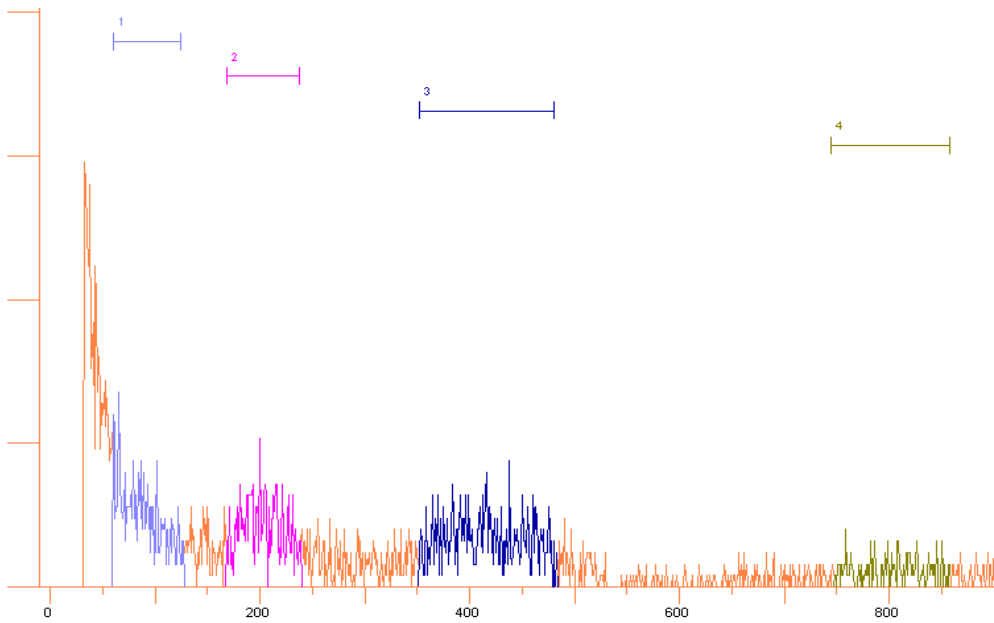


Şekil 4.7. Diploid kontrol bitkisi (sol) ile anter kültüründen gelen bir bitkideki (sağ) stomaların kloroplast sayıları



Şekil 4.8. Elde edilen flow sitometri grafiği

Anter kültüründe elde edilen kalluslarda embriyoların yeterli sayıda bitkiye dönüşmemesi üzerine kalluslar üzerinde de flow sitometri yapılmasına karar verilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda kallusların büyük bir kısmında çok farklı ploidi düzeylerine sahip [(diploid (2n), tetraploid (4n), hekzaploid (6n) ve oktoploid (8n)] hücreler tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Şekilde “1” nolu alanda diploid, “2” nolu alanda tetraploid, “3” nolu alanda hekzaploid ve “4” nolu alanda oktoploid hücreler görülmektedir.



Şekil 4.9. Anter ve ovaryum kültürlerinden gelen kallusların flow sitometri grafiği

Elde ettiğimiz 3 bitkinin doublehaploid olma ihtimali düşünülerek bitkiler yetiştirilmiş ve sera koşullarında kendilenerek tohumları alınmıştır. Anter ve ovaryum kültürlerinde diploid bitkilerin meydana gelme olasılığı oldukça yüksektir. Hatta günümüzde biber türünde anter kültüründen, hıyar türünde ise ovaryum kültüründen elde edilen diploid bitkiler tamamıyla doublehaploid olarak değerlendirilmektedir. Ancak bu bitkilerin %100 doublehaploid bitki olduklarının tespiti moleküler çalışmalar ve projeni testleriyle mümkün olacaktır.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kültür karpuzuna kuraklığa toleranslı sitron karpuzu anacı elde etmek amacıyla, saf hatların eldesine yönelik olarak anter kültürü tekniğinin etkinliğinin araştırıldığı çalışmada Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Sebze Yetiştiriciliği ve Islahı ABD ıslah koleksiyonunda bulunan S3 kademesindeki sitron karpuzu genotiplerinden 11 tanesinde (SK4, SK6, SK8, SK9, SK11, SK13, SK14, SK15, SK16, SK17 ve SK21) 5 farklı ortam kombinasyonunun kallus oluşumu, embriyogenesis ve bitkicik oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar genotipin ve besi ortamının kallogenesis, embriyogenesis ve bitkicik oluşumu üzerine etkili olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışma boyunca 5 ortamda toplam 2137 anter kültüre alınmıştır. Bu anterlerden toplamda 125 embriyo ve 12 bitki elde edilmiştir ve BDO %0.56 gibi çok düşük düzeyde kalmıştır. Elde edilen bitkilerin tamamı O1 ortamından (MS + 2 mg/L 2.4-D + 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA + 30 g/L sakaroz + 8 g/L agar; pH 5.8) ve SK21 genotipinden elde edilmiştir. O3, O4 ve O5 ortamlarında kallus ve embriyo benzeri yapı görülmemiştir. Kallus oluşum oranında genotipler arasında en düşük değer Pastel çeşidinde ve O1 ortamından elde edilirken en yüksek değer SK14 genotipinde ve O2 ortamından elde edilmiştir. Embriyo sayısı açısından en yüksek değer SK4 genotipinde (22 adet) O1 ortamından elde edilirken en düşük değer Paskal (1 adet) O2 ortamından elde edilmiştir. O2 ortamının kallus oluşturma yüzdesi O1 ortamının kallus oluşturma yüzdesinden daha yüksektir. Ancak embriyo oluşum yüzdesinde durum tam tersi olup O1 ortamı daha başarılı sonuçlar ortaya koymuştur.

Stomatal gözlemler ve flow sitometri analizleri sonucunda elde edilen 3 bitkinin diploid yapıda olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre, sitron karpuzu türünde anter kültürü yönteminde açıklanmayı bekleyen önemli noktalar bulunduğu tespit edilmiştir. Bu amaçla, ileride sitron karpuz türünde anter kültürü ile yapılacak çalışmalara ışık tutması açısından; farklı besi ortamı kombinasyonlarının çalışılmasının, ortam içeriğine poliaminlerin (putresin, spermidin), amino asitlerin (prolin, glutamin) ve vitaminlerin (Thiamin, Glycine) eklenmesinin, farklı sıcaklık derecesi ve sürelerinin çalışılmasının, haploidi frekansı yüksek olan genotiplere ağırlık verilmesinin haploidi frekansını artıracığı düşünülmektedir. Ayrıca donör bitkilerin kontrollü şartlarda iyi bakım koşullarında yetiştirilmesinin, hatta yetiştirilme şartları fizyolojik olarak etki

ettiğinden bitkileri güz ve bahar dönemi sera koşullarında ayrı ayrı değerlendirmenin başarıyı yükselteceği kanısındayız.



KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Darbandi, M., Hamidvand, Y. ve Majdi, M., 2015, The influence of phytohormones, wheat ovary co-culture, and temperature stress on anther culture response of watermelon (*Citrullus lanatus* L.), *Brazilian Journal of Botany*, 38, 447-456.
- Abdollahi, M. R., NAJAFI, S., SARIKHANI, H. ve MOOSAVI, S. S., 2016, Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium, *Turkish Journal of Biology.*, 40, 571-579.
- Akbaş, F. C. ve Solmaz, İ., 2019, Obtention of haploid plant in *Citrullus lanatus* var. *lanatus* and *Citrullus lanatus* var. *citroides* species by anther culture method, *International Journal of Environmental Research and Technology*, 2 (3), 25-36.
- Asadi, A., Zebarjadi, A., Abdollahi, M. R. ve Seguí-Simarro, J. M., 2018, Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Euphytica*, 214, 1-17.
- Ashok Kumar, H. ve Murthy, H., 2004, Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*, *Plant cell, tissue and organ culture*, 78, 201-208.
- Aydın, A. ve Yetişir, H., 2023, Rootstock effect of auto- and allotetraploid citron (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) on hydroponically grown cucumber under salt stress, *Gesunde Pflanzen*, 75 (4), 1193-1206.
- Aydınlı, G., Kurtar, E. S. ve Mennan, S., 2019, Screening of *Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata* genotypes for resistance against *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, and *M. luci*, *Journal of Nematology*, 51.
- Balkaya, A., Güngör, B. ve Sarıbaş, Ş., 2018, Determination of the effects of pumpkin rootstock on yield and fruit quality in mini watermelon cultivation, *HMO*, 1, G7.
- Bayraklı, F., 1987, Toprak ve bitki analizleri, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları*, 17.
- de Oliveira, F. I. C., Carvalho, A. V. F., de Aragão, F. A. S. ve de Carvalho, A. C. P. P., 2022, Growth regulators in the induction of calli in anthers of the Goldex hybrid yellow melon, *Revista Agro@mbiente On-line*, 16, 14-14.
- FAO, 2022, Food and Agriculture Organization, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- Gałazka, J. ve Niemirowicz-Szczytt, K., 2013, Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits, *Folia Horticulturae*, 25 (1), 67-78.
- García-Mendivil, H. A. ve Sorribas, F. J., 2021, Effect of *Citrullus amarus* accessions on the population dynamics of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* and watermelon yield, *Scientia Horticulturae*, 275, 109680.
- Hızalan, E. ve Ünal, H., 1966, Topraklarda önemli kimyasal analizler, *AÜ Ziraat Fakültesi Yayınları*, 278, 5-7.
- Hwang, J. H., Ahn, S. G., Oh, J. Y., Choi, Y. W., Kang, J. S. ve Park, Y. H., 2011, Functional characterization of watermelon (*Citrullus lanatus* L.) EST-SSR by gel electrophoresis and high resolution melting analysis, *Scientia Horticulturae*, 130 (4), 715-724.
- Islam, A., Misoo, S. ve Ishii, T., 2011, Selection of Flower Buds and Carbon Source for Anther Culture in Melon (*Cucumis melo*), *The IUP Journal of Genetics & Evolution*, 4 (3), 28-34.
- Jackson, M., 1958, Soil chemical analysis prentice Hall, Inc., *Englewood Cliffs, NJ*, 498 (1958), 183-204.

- Kouakou, K. L., Doubi, T. S., Koffi, T. S., Kouassi, K. I., Kouakou, T. H., Baudoin, J.-P. ve Bi, I. A. Z., 2015, Androgenic potential and anther in vitro culture of *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl an edible-seed cucurbit, *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9 (4), 1779-1789.
- Kumar, H. A., Murthy, H. ve Paek, K., 2003, Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L, *Scientia horticulturae*, 98 (3), 213-222.
- Kurtar, E. S., Uzun, S. ve Esendal, E., 1998, Kabakda (*Cucurbita pepo* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14 (2), 33-45.
- Kurtar, E. S. ve Balkaya, A., 2010, Production of in vitro haploid plants from in situ induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102, 267-277.
- Kurtar, E. S., Balkaya, A. ve Kandemir, D., 2016, Evaluation of haploidization efficiency in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) through anther culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127, 497-511.
- KURUM, R., ÇELİK, İ. ve Ahmet, E., 2017a, Effects of rootstocks on fruit yield and some quality traits of watermelon (*Citrullus lanatus*), *Derim*, 34 (2), 91-98.
- Kurum, R., Çelik, İ. ve Eren, A., 2017b, Effects of rootstocks on fruit yield and some quality traits of watermelon (*Citrullus lanatus*), *Derim*, 34 (2), 91-98.
- Laghetti, G. ve Hammer, K., 2007, The Corsican citron melon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai subsp. *lanatus* var. *citroides* (Bailey) Mansf. ex Greb.) a traditional and neglected crop, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 913-916.
- Levi, A., Jarret, R., Kousik, S., Patrick Wechter, W., Nimmakayala, P. ve Reddy, U. K., 2017, Genetic resources of watermelon, *Genetics and genomics of Cucurbitaceae*, 87-110.
- Lindsay, W. L. ve Norvell, W., 1978, Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper, *Soil science society of America journal*, 42 (3), 421-428.
- Mandizvo, T., Odindo, A. O., Mashilo, J. ve Magwaza, L. S., 2022a, Drought tolerance assessment of citron watermelon (*Citrullus lanatus* var. *citroides* (LH Bailey) Mansf. ex Greb.) accessions based on morphological and physiological traits, *Plant Physiology and Biochemistry*, 180, 106-123.
- Mandizvo, T., Odindo, A. O., Mashilo, J., Sibiya, J. ve Beck-Pay, S. L., 2022b, Phenotypic Variability of Root System Architecture Traits for Drought Tolerance among Accessions of Citron Watermelon (*Citrullus lanatus* var. *citroides* (LH Bailey)), *Plants*, 11 (19), 2522.
- Masoko, P., Matotoka, M. M. ve Mphosi, M. S., 2022, Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Citrullus lanatus* var. *citroides* (Citron watermelon) fruit and the effect of temperature on the biological activity of the rind, *South African Journal of Botany*, 150, 1111-1121.
- Metwally, E., Moustafa, S., El-Sawy, B. ve Shalaby, T., 1998, Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*, *Plant cell, tissue and organ culture*, 52, 171-176.
- Mustafa, A. ve Alamin, A., 2012, Chemical composition and protein degradability of watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds cake grown in western Sudan, *Asian Journal of Animal Sciences*, 6 (1), 33-37.

- Nawaz, M. A., Han, X., Chen, C., Zheng, Z., Shireen, F., Bie, Z. ve Huang, Y., 2018, Nitrogen use efficiency of watermelon grafted onto 10 wild watermelon rootstocks under low nitrogen conditions, *Agronomy*, 8 (11), 259.
- Nguyen, M., Ta, T., Huyen, T. ve Voronina, A., 2019, Anther-derived callus formation in bitter melon (*Momordica charantia* L.) as influenced by microspore development stage and medium composition, *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 54 (1), 140-148.
- Nkoana, D. K., Mashilo, J., Shimelis, H. ve Ngwepe, R. M., 2022, Nutritional, phytochemical compositions and natural therapeutic values of citron watermelon (*Citrullus lanatus* var. *citroides*): A Review, *South African Journal of Botany*, 145, 65-77.
- Nyirahabimana, F. ve Solmaz, İ., 2021, Haploid plant production technology in cucumber (*Cucumis Sativus* L.), *Proceedings book. 10th international molecular biology and biotechnology congress*, 04-08.
- Pal, S., Rao, E. S., Hebbar, S. S., Sriram, S., Pitchaimuthu, M. ve Rao, V. K., 2020, Assessment of Fusarium wilt resistant *Citrullus* sp. rootstocks for yield and quality traits of grafted watermelon, *Scientia Horticulturae*, 272, 109497.
- Sari, N. ve Solmaz, I., 2021, Doubled haploid production in watermelon, *Doubled Haploid Technology: Volume 3: Emerging Tools, Cucurbits, Trees, Other Species*, 97-110.
- Seymen, M., Yavuz, D., Ercan, M., Akbulut, M., Çoklar, H., Kurtar, E. S., Yavuz, N., Süheri, S. ve Türkmen, Ö., 2021, Effect of wild watermelon rootstocks and water stress on chemical properties of watermelon fruit, *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 62 (3), 411-422.
- Shalaby, T. A., 2006, Embryogenesis and plantlets regeneration from anther culture of squash plants (*Cucurbita pepo* L.) as affected by different genotypes, *J Agric Res Tanta Univ*, 32 (1), 173-183.
- Silva, C. M. d. J., Dias, R. d. C. S. ve Melo, N. F. d., 2021, The effect of temperature and growth regulators on callus induction in watermelon anthers, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64, e21180505.
- Smith, H. W. ve Weldon, M., 1941, A comparison of some methods for the determination of soil organic matter.
- TTSM, 2024, Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkez Müdürlüğü, <https://www.tarimorman.gov.tr/BUGEM/TTSM>.
- Tulukoğlu, K. S. ve Sarı, N., 2014, Karpuzlarda anter ve ovül kültüründe soğuk uygulaması, thidiazuron (TDZ) ve 2, 4-D uygulamalarının haploid embriyo uyartımına etkileri, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi*, 78, 2122-2131.
- TÜİK, 2023, Türkiye İstatistik Kurumu, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?locale=tr>.
- Uzun Tuzcu, D., 2019, Sakız kabağında anter kültürü yoluyla bitki rejenerasyonu üzerinde araştırmalar, *Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Yavuz, D., Seymen, M., Süheri, S., Yavuz, N., Türkmen, Ö. ve Kurtar, E. S., 2020, How do rootstocks of citron watermelon (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) affect the yield and quality of watermelon under deficit irrigation?, *Agricultural Water Management*, 241, 106351.