

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Furkan Cihad AKBAŞ

***CITRULLUS LANATUS* var. *LANATUS* ve *C. LANATUS* var.
CITROIDES TÜRLERİNDE ANTER KÜLTÜRÜ
YÖNTEMİYLE HAPLOİD BİTKİ ELDE EDİLMESİ**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA-2018

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***CITRULLUS LANATUS* var. *LANATUS* ve *C.LANATUS* var. *CITROIDES*
TÜRLERİNDE ANTER KÜLTÜRÜ YÖNTEMİYLE HAPLOİD BİTKİ
ELDE EDİLMESİ**

Furkan Cihad AKBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Doç. Dr. İlknur SOLMAZ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Nebahat SARI
ÜYE

.....
Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
Desteklenmiştir.**

Proje No: FYL-2018-10621

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve
fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri
Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***CITRULLUS LANATUS* var. *LANATUS* ve *C.LANATUS* var. *CITROIDES* TÜRLERİNDE ANTER KÜLTÜRÜ YÖNTEMİYLE HAPLOİD BİTKİ ELDE EDİLMESİ**

Furkan Cihad AKBAŞ

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Doç. Dr. İlknur SOLMAZ
Yıl: 2018, Sayfa: 45
Jüri : Doç. Dr. İlknur SOLMAZ
: Prof. Dr. Nebahat SARI
: Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU

Bu araştırma *Citrullus lanatus* var. *lanatus* ve *Citrullus lanatus* var. *citroides* karpuz türlerinde anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde etmek amacıyla yapılmıştır. Denemede *Citrullus lanatus* var. *lanatus* alt türüne ait 1 açık tozlanan çeşit (Halep Karası) ve 1 hibrit çeşit (Crimson Tide) ve *Citrullus lanatus* var. *citroides* alt türüne ait 2 genotip (PI 296341 ve PI 189225) yer almıştır. Anter kültürü uygulamalarında 2 mg/l 2.4-D + 90 g/l sakkaroz takviye edilmiş MS besi ortamı sabit kullanılmış olup, farklı dozlarda (1 ve 1.5 mg/l) 6-Benzylaminopurine (BAP) denenmiştir. Ayrıca ortam içeriklerine, poliaminlerin etkisinin incelenmesi amacıyla da farklı dozlarda (500 ve 1000 µM/l) ayrı ayrı ve her ikisi birlikte spermidin (SPD) ve putresin (PUT) eklenmiştir. Araştırmada 14 farklı ortam kombinasyonu denenmiştir. Çalışmada iki farklı deneme kurulmuştur. Birinci denemede çiçek tomurcukları antezisten 1 gün önce toplanmış ve anterler 32°C'de 2 gün karanlıkta bekletildikten sonra kültüre alınmıştır. İkinci denemede ise antezisten 2 gün önce toplanan tomurcuklar ön sıcaklık uygulamasına tabi tutulmadan kültüre alınmıştır. Sonuçlar incelendiğinde farklı ortamlarda kullanılan genotipler bazında değişen oranlarda anter gelişimi ve kallus oluşumu görülmekle birlikte bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir. Poliamin (SPD ve PUT) kullanımının karpuzda anter kültürüne etkisi ise net olarak görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Karpuz (*Citrullus lanatus* L.), haploid, spermidin, putresin

ABSTRACT

MSc. THESIS

OBTENTION OF HAPLOID PLANT IN *CITRULLUS LANATUS* var. *LANATUS* and *CITRULLUS LANATUS* var. *CITROIDES* SPECIES BY ANTER CULTURE METHOD

Furkan Cihad AKBAS

**ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURE**

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. İlknur SOLMAZ

Year: 2018, Pages: 45

Jury : Assoc. Prof. Dr. İlknur SOLMAZ

: Prof. Dr. Nebahat SARI

: Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU

This research was conducted with *Citrullus lanatus* var. *lanatus* and *Citrullus lanatus* var. *citroides* in order to obtain haploid plant in watermelon species by anther culture method. In the experiment, 1 open pollinated species (Halep Karası) and 1 hybrid type (Crimson Tide) belonging to *Citrullus lanatus* var. *lanatus* subspecies and 2 genotypes of the *Citrullus lanatus* var. *citroides* subspecies (PI 296341 and PI 189225) were used. In anther culture applications, 2 mg/l 2,4-D + 90 g/l sucrose supplemented MS medium was used and 6-Benzylaminopurine (BAP) was tried at different doses (1 and 1.5 mg/l). Additionally, spermidine (SPD) and putresine (PUT) were added separately to the media contents at different doses (500 and 1000 µM/l) to investigate the effect of polyamines. 14 different media combinations were tried in the study. Two different experiments were established in the study. In the first experiment, flower buds were collected 1 day before anthesis and the anthers were cultured at 32 °C for 2 days in dark condition and then cultured. In the second experiment, the buds were collected 2 days before the anthesis were cultured without being subjected to pre-heat treatment. According to the results, anther development and callus formation were observed at varying rates on the basis of genotypes used in different medium but no transformation into plants. The effect of polyamine (SPD and PUT) on anther culture in watermelon has not been clearly observed.

Keywords: Watermelon (*Citrullus lanatus* L.), haploid, spermidine, putresine

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Günümüz bitki yetiştiriciliğinde hibrit çeşit kullanımının yaygınlaşması sebebiyle ıslah çalışmalarının önemi artmaktadır. Haploidizasyon teknikleri içerisinde yer alan anter kültürü yöntemi, ıslah çalışmalarında kullanılan yaygın tekniklerden biridir. Kısa sürede %100 homozigot hatların elde edilmesinde bu haploidizasyon tekniklerinden faydalanılmaktadır.

Son araştırmalar sonucunda yeni bir tür bitki büyüme düzenleyici olarak görülen poliaminler (PA) düşük seviyede moleküler ağırlığa sahip organizmalardır. Bitki hücrelerinde yer alan başlıca poliaminler diamin putresin (PUT), triamin spermidin (SPD) ve tetramin spermindir (SPM). Poliaminlerin birçok metabolik faaliyette yer aldığı rapor edilmiştir.

Bu araştırmada spermidin ve putresin ile oksin-sitokinin kombinasyonunun kullanımının karpuzda anter kültürüne etkisi incelenmiştir. Çalışmada *Citrullus lanatus* var. *lanatus* türüne ait Halep Karası ve Crimson Tide çeşidiyle *Citrullus lanatus* var. *citroides* türüne ait PI 296341 ve PI 189225 genotipleri olmak üzere toplamda 4 farklı genotip kullanılmıştır.

Çalışmada iki farklı deneme kurulmuştur. Birinci denemede çiçek tomurcukları antezisten 1 gün önce toplanırken, ikinci denemede çiçek tomurcukları antezisten 2 gün önce toplanmıştır. Her iki deneme için de yüzey sterilizasyonu ilk olarak 30 dk. boyunca çeşme suyu altında bekletilmiştir. Bu uygulamanın ardından anterler steril kabine alınarak % 70'lik etil alkol çözeltisi içerisinde 2 dk. tutulduktan sonra 3-4 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bir sonraki aşamada çiçek tomurcukları, 1-2 damla Tween 20 damlatılan %15'lik sodyum hipoklorit solüsyonu içerisinde 15 dk. bekletilmiştir. Son olarak 3-4 kez steril saf su ile durulandıktan sonra yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır.

Kültüre almada önceki anter kültürü çalışmalarında olumlu sonuçlar verdiği belirtilen MS besi ortamı kullanılmıştır. Hazır MS besi ortamı içerisine 2 mg/l 2.4-D ve katılaştırıcı olarak 8 g/l agar tüm ortamlarda standart şekilde

konulmuş ve pH 5.7 olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm ortamlarda karbon kaynağı olarak 90 g/l sakkaroz kullanılmıştır. Besin ortamlarına 2 farklı dozda BAP (1 ve 1.5 mg/l) ve 2 farklı dozda (500 ve 1000 µM) Spermidin (SPD) ve Putresin (PUT) eklenmiştir. Toplamda 14 adet ortam denenmiştir.

Her iki deneme sonuçlarına göre Halep Karası çeşidine ait ortamlarda, diğer genotiplere kıyasla kallus oluşumunun yüksek olduğu saptanmıştır. Ortamlar karşılaştırıldığında ise en yüksek verinin 1 nolu ortamdan (1 mg/l BAP) elde edilmiştir. Poliamin kullanımının Halep Karası çeşidi için anter canlılığı ve kallus oluşumunda olumlu etkisi görülmemiştir. Crimson Tide çeşidinde ise farklı dozlarda BAP, SPD ve PUT içeren 4 no'lu (1 mg/l BAP + 500 µM SPD + 500 µM PUT), 7 no'lu (1 mg/l BAP + 1000 µM SPD + 1000 µM PUT) ve 10 nolu (1.5 mg/l BAP + 500 µM PUT) ortamlarda yüksek oranda kallus oluşumu tespit edilmiştir. PI 296341 genotipi yapılan her iki denemede de kallus oluşumu bakımından düşük oranda yanıt vermiştir. Çiçeklenme dönemi incelendiğinde Halep Karası ve PI 189225 genotipi için antezisten 1 gün önce, Crimson Tide ve PI 296341 genotipleri için ise antezisten 2 gün önce toplanan çiçeklerin anter kültüründe daha başarılı olduğu görülmüştür.

TEŞEKKÜR

Ziraat mühendisliği eğitimim boyunca gerek lisans, gerekse yüksek lisans döneminde bölümümü sevdiren, desteğini esirgemeyen, birlikte çalışma fırsatını bana sunan ve en üst düzeyde gelişimim için elinden gelenin en iyisini yapan saygıdeğer hocam Doç. Dr. İlknur SOLMAZ'a sevgi ve saygılarımı sunarım.

Tezin başlangıcından sonuna kadar önerilerini esirgemeyen, çalışmamı zenginleştirmek için tecrübelerini benimle paylaşan değerli Tez Savunma Jürisi hocalarım Prof. Dr. Nebahat SARI ve Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU'na teşekkür ederim. Tez çalışmasında, verilerimin toplanmasında, değerlendirilmesinde ve yorumlanmasında beni yalnız bırakmayan Tüt. Tek. Yük. Müh. Mansur Hakan EROL'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam sırasında hem sera hem de arazi kullanımı konusunda destek olan Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne teşekkür ederim. Laboratuvar kullanımı konusunda desteklerini esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışmam sırasında tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Dr. Şaire Ramiz TÜRKOĞLU, Zir. Yük. Müh. Belgin BİÇEN, Ş. Eda ARSLANKILIÇ ve Fatma KARA olarak Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi doku kültürü laboratuvarı ekibine ve tüm merkez çalışanlarına teşekkür ediyorum. Verilerin istatistik analizleri konusunda yardımcı olan Dr. Başar SEVİNDİK'e teşekkür ederim. Tezimin (Proje no: FYL-2018-10621) maddi olarak desteklenmesini sağlayan Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim. PI 189225 genotipinin temini için RDA (Güney Kore)'ya ve PI 296341 genotipinin temini için Seminis Tohum (ABD)'a teşekkür ederim.

Ders dönemim ve tez çalışmalarım da dahil olmak üzere eğitim hayatımda anlayış ve desteğini esirgemeyen annem Şule AKBAŞ ve diğer tüm aile fertlerime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL VE METOT	9
3.1. Materyal.....	9
3.2. Metot	9
3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi	9
3.2.2. Embriyo Teşvik Ortamının İçeriği ve Hazırlanması	11
3.2.3. Çiçek Tomurcuklarının Toplanması	13
3.2.4. Ön Uygulama ve Anterlerin Embriyo Teşvik Ortamında Kültüre Alınması.....	15
3.2.5. Anterlerden Gelişen Kallusların Kültüre Alınması	17
3.2.6. İncelenen Özellikler.....	18
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	19
4.1. Birinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları	19
4.1.1. Halep Karası Çeşidine Ait Birinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları.....	19
4.1.2. Crimson Tide Çeşidine Ait Birinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları	21

4.1.3. PI 296341 Genotipine Ait Birinci Anter Kùltürü Denemesi	
Bulguları	22
4.1.4. PI 189225 Genotipine Ait Birinci Anter Kùltürü Denemesi	
Bulguları	23
4.2. İkinci Anter Kùltürü Denemesi Bulguları	24
4.2.1. Halep Karası Çeşidine Ait İkinci Anter Kùltürü Denemesi	
Bulguları	24
4.2.2. Crimson Tide Çeşidine Ait İkinci Anter Kùltürü Denemesi	
Bulguları	25
4.2.3. PI 296341 Genotipine Ait İkinci Anter Kùltürü Denemesi	
Bulguları	27
4.2.4. PI 189225 Genotipine Ait İkinci Anter Kùltürü Denemesi	
Bulguları	28
4.3. Birinci ve İkinci Deneme Anter Kùltürü Denemesi Bulgularının	
Karşılaştırılması	29
4.4. Tartışma	32
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan karpuz çeşit ve genotipleri.....	9
Çizelge 3.2. Denemede kullanılan farklı embriyo teşvik ortamlarının içeriği.....	12
Çizelge 4.1. Halep Karası çeşidine ait birinci anter kültürü denemesi sonuçları ...	20
Çizelge 4.2. Crimson Tide çeşidine ait birinci anter kültürü denemesi sonuçları ..	21
Çizelge 4.3. PI 296341 genotipine ait birinci anter kültürü denemesi sonuçları	22
Çizelge 4.4. PI 189225 genotipine ait birinci anter kültürü denemesi sonuçları	23
Çizelge 4.5. Halep Karası çeşidine ait ikinci anter kültürü denemesi sonuçları.....	25
Çizelge 4.6. Crimson Tide çeşidine ait ikinci anter kültürü denemesi sonuçları....	26
Çizelge 4.7. PI 296341 genotipine ait ikinci anter kültürü denemesi sonuçları	27
Çizelge 4.8. PI 189225 genotipine ait ikinci anter kültürü denemesi sonuçları	28



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1.	a) Tohumların ekilmesi, b) dikime hazır hale gelen fideler, c) fidelerin toprağa aktarılması, d, e) dikilmiş fidelerin plastik seradaki görüntüsü	10
Şekil 3.2.	Askıya alınmış karpuz bitkilerinin seradaki görüntüleri	11
Şekil 3.3.	a) Agar dışındaki diğer ortam bileşenlerinin cam kavanozlardaki görüntüsü, b) agar eklenmiş ortamın ısıtılması ve karıştırılması, c) ortamların petrilere dağıtılması, d) petrilere konulmuş ortamların soğumaya bırakılması	13
Şekil 3.4.	Farklı büyüme dönemlerindeki erkek çiçekler; a) antezisten 2 gün önceki çiçek görünümü; b, c) antezisten 1 gün önceki çiçek görünümü	14
Şekil 3.5.	a) Toplanan erkek çiçeklerin çeşme suyunda bekletilmesi, b) % 70'lik alkol çözeltisinin dökülmesi, c) 1-2 damla Tween 20 damlatılan % 15'lik sodyum hipoklorit içerisindeki erkek çiçeklerin çalkalanması, d) steril saf suda durulama işlemi	15
Şekil 3.6.	a) Erkek çiçeğin sapının, taç ve çanak yapraklarının ayrılması, b) anterin filamentinden ayrılması, c) izole edilen anterlerin ayrılması, d) anterlerin petrilere yerleştirilmesi	16
Şekil 3.7.	a) Kültüre alınan anterlerin sıcaklık ve karanlık ön uygulamasına tabi tutulması, b) ön uygulama sonrası petrilere iklim odasına yerleştirilmesi	17
Şekil 3.8.	a-c) Gelişim gösteren olası embriyojenik kalluslar, d) kallusların alt kültüre alınması	18
Şekil 4.1.	a, b) Halep Karası genotipine ait embriyo benzeri yapılar	20
Şekil 4.2.	Halep Karası çeşidine ait birinci ve ikinci anter kültürü deneme sonuçlarının karşılaştırıldığı grafik	29

Şekil 4.3.	Crimson Tide çeşidine ait birinci ve ikinci anter kültürü deneme sonuçlarının karşılaştırıldığı grafik	30
Şekil 4.4.	PI 296341 genotipine ait birinci ve ikinci anter kültürü deneme sonuçlarının karşılaştırıldığı grafik	31
Şekil 4.5.	PI 189225 genotipine ait birinci ve ikinci anter kültürü deneme sonuçlarının karşılaştırıldığı grafik	32



SİMGELER VE KISALTMALAR

TDZ	: Thidiazuron
PA	: Poliamin
Put	: Putresin
Spd	: Spermidin
Spm	: Spermin
2,4D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
NAA	: Naftalen asetik asit
AgNO ₃	: Gümüş nitrat
IAA	: Indol-3-acetic acid
N	: Azot
BA	: Benzyl adenine
BAP	: 6-Benzylaminopurine
°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde
l	: Litre
µM	: Mikromolar
dk	: Dakika



1. GİRİŞ

Karpuz üretim miktarı ve yetiştirildiği alan bakımından önemli bir sebze türüdür. Ülkemizde 904 884 da alanda 4 011 313 ton (TÜİK, 2017) üretimin yanı sıra, dünyada da 3 507 243 ha alanda 117 022 560 ton (FAO, 2016) karpuz üretimi söz konusudur. Türkiye, dünya karpuz üretimi sıralamasında Çin'den sonra ikinci sırada yer almaktadır. Bölgesel anlamda bakıldığında ise Akdeniz bölgesinde (1 558 756 ton) ve özellikle Adana'da karpuz üretiminin yoğun olarak yapıldığı görülmektedir (TÜİK, 2017).

Karpuz meyveleri boyut, şekil ve kabuk özellikleri bakımından çeşitlilik göstermektedir. Mini, küçük, orta ve çok büyük boyutlarında; yuvarlak, oval, eliptik ve silindirik şekilde; düz ya da çizgili kabuklu; yeşilin farklı tonlarında ve gri renkte meyveler mevcuttur (Tulukoğlu, 2014). Geçmişte iri çekirdekli karpuzlar var iken, zamanla bu talep küçük çekirdekli, hatta günümüzde mikro çekirdekli karpuzlara yönelmiş, ıslah çalışmaları bu yönde şekillendirilmiştir. Türkiye pazarında 1990'lı yıllardan önce iri karpuzlar tercih edilirken son yıllarda mini karpuzlara yönelim söz konusudur. Günümüzde karpuz yetiştiriciliğinde yabancı kökenli karpuz çeşitleri tercih edilmektedir. Yerli hibrit çeşitlerin geliştirilmesi ve bu çeşitlerin üretimde kullanılması ülke ekonomisi için büyük önem arz etmektedir (Solmaz ve Sarı, 2011).

Cucurbitaceae familyasına ait olan *Citrullus* cinsi, bünyesinde 4 tür barındırmaktadır. *Citrullus* cinsinde yer alan ve dünyada tropik ve subtropik bölgelerde yetiştirilen *C. lanatus* (Thunb.) Matsum. ve Nakai, en çok çeşitliliği içeren tür olmasının yanı sıra günümüzde ticari değeri yüksek, kültür formu *C. lanatus* var. *lanatus* ve yabani form olan *C. lanatus* var. *citroides* (L.H. Bailey Mansf.) alt türlerini içermektedir (Tulukoğlu, 2014, Solmaz ve ark., 2016). *Citrullus lanatus* var. *citroides* (L.H. Bailey Mansf.) literatürlerde "citron", "citron kavunu", "konservelik kavun" gibi farklı adlandırmalara sahiptir. İlkel formlarına

Güney Afrika’da rastlanan “citron” meyvesinin kabuklarından turşu, konserve ve reçel yapımında faydalanılmaktadır (Solmaz ve ark., 2016).

Haploid bitkiler somatik hücrelerinde, türe ait bitkilerin eşey hücrelerinde taşıdıkları kadar kromozom sayısına (n) sahip bitkilerdir. Diploid bitkilerle kıyaslandığında, haploid bitkilerin yaprakları ve çiçekleri küçük, boyları da kısadır (Solmaz ve ark., 2014; Tulukoğlu, 2014). Ürün verme özelliği bulunmayan haploid bitkilerin ıslah çalışmalarında kullanılabilir hale gelmesi için bazı kimyasallar yardımıyla (en çok kullanılan kolhisin) kromozom sayılarının 2 katına çıkartılması gerekmektedir. Haploid bitkilerin diploid hale geldiği bu yöntem dihaploidizasyon olarak bilinmektedir (Sarı, 1994). Günümüz bitki yetiştiriciliğinde en çok hibritlerin tercih edilmesi dolayısıyla homozigot hatların elde edilmesine büyük ihtiyaç duyulmaktadır (Kosmrlj ve ark., 2013). Kısa sürede tamamen homozigot bitkiler elde edilebilmesi sebebiyle haploidi, bitki ıslahının en güçlü yöntemlerinden biridir (Bobkov, 2014).

Doğada kendiliğinden haploid bitki oluşumu düşük sıklıkla görülmektedir. Bu durum türlere, hatta tür içerisindeki genotiplere göre değişiklik göstermektedir. Haploidinin doğal olarak yetersiz olması durumunda araştırmacılar, haploid embriyo oluşumunu teşvik etmek amacıyla, uzak akrabalar arasında melezlemeler, sıcak-soğuk, karanlık ön uygulamaları, eksik veya yetersiz (ışınlanmış) polenle tozlama, poliaminlerin, X ve UV ışınlarının kullanımı gibi farklı yöntemleri kullanmaktadır (Sarı ve ark., 2014).

Haploid bitkiler, frekansı düşük olmasına rağmen ginogenesis, androgenesis, semigami, poliembriyoni ve kromozom eliminasyonu yollarıyla oluşmaktadır (Sarı, 1990). Androgenesis ve ginogenesis haploid bitki üretiminde yoğun olarak kullanılan iki yöntemdir. Androgenesis, anterlerin *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla haploid bitki üretimidir. Ginogenesis yönteminde ise haploid bitkiler döllenmemiş yumurta hücrelerinin *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla elde edilir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Anter kültürü, içerisinde olgunlaşmamış polenlerin bulunduğu anterlerin kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntemde anterler, tomurcuklarından ayrılarak in vitro koşullarda yapay besi ortamlarına yerleştirilir ve olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilir. Bu yöntem yardımıyla iki çekirdekli yapıya dönüşecek olan polen tanesinin gametofitik yönde gelişmesinden ziyade, henüz tek çekirdekli dönemdeyken somatik yönde gelişmesi sağlanmaktadır. Büyüme yönündeki bu değişim ise ‘mikrospor androgenezisi’ veya sadece ‘androgenezis’ olarak adlandırılmaktadır (Ellialtıoğlu, 2012).

Anter kültürü yöntemi ilk olarak Solanaceae familyasına ait bir tür olan *Datura innoxia* üzerinde denenmiştir (Guha ve Maheshwari, 1964). Bununla birlikte biber (Olszewska ve ark., 2014), patlıcan (Başay ve Ellialtıoğlu, 2013), bezelye (Bobkov, 2014), kuşkonmaz (Feng ve Wolyn, 1991) ve kanolanın (Lichter, 1981) yanı sıra *Cucurbitaceae* familyasına ait türlerde de anter kültürü çalışmaları yapılmıştır (Mohamed ve Refaei 2004; Song ve ark., 2007; Suprunova ve Shmykova, 2008).

Poliaminler (PA) yaşayan tüm organizmalar içerisinde bulunan, düşük moleküler ağırlığa sahip polikasyon maddelerdir. Bitki hücrelerinde yer alan diamin putresin (PUT), triamin spermidin (SPD) ve tetramin spermin (SPM) başlıca poliaminleri oluşturmaktadır. Poliaminler ve bunların biyosentetik enzimlerinin hücre bölünmesinden organogeneze kadar değişen geniş bir metabolik olaylar zincirinde yer aldığı ortaya konmuştur (Kaur-Sawhney ve ark., 2003). Ayrıca araştırmacılar tarafından poliaminlerin esas rolünün hastalık, biyotik ve abiyotik stres koşullarında bitkide direkt olarak koruyucu bileşen olduğu düşünülmektedir (Alcázar ve ark., 2010; Carone ve ark., 2010; Hussain ve ark., 2011; Pál ve ark., 2015). Bununla birlikte, poliamin kullanımının ovül ve ovaryum kültürüne olumlu etkisi olduğu da rapor edilmiştir (Gürsoy ve ark., 2012).

Birçok bitki türünde büyüme düzenleyicilerinin anter kültürüne etkisi araştırılmıştır. *Solanaceae* familyasına ait birkaç türde indüksiyon için temel besin ortamı yeterlidir. Bu türlerde ortamda ilave oksine ihtiyaç olmamasına rağmen

büyüme düzenleyicilerinin (oksin, sitokinin ya da bunların kombinasyonları) varlığı önemli bitki türlerinde, özellikle de anter kültürüne olumsuz yanıt veren türlerde, mikrospordan elde edilen embriyoların üretiminde çok önemli rol oynamaktadır. Sıcaklık şokunun (soğuk veya sıcak ön uygulaması) bazı *Cucurbitaceae* türlerinde; kabakta (Metwally ve ark., 1998) ve hıyarda (Ashok Kumar ve ark., 2003; Song ve ark., 2007), anter kültürüne olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir (Abdollahi ve ark., 2015).

Karpuz ıslah programlarında androgenik yöntemle double haploid teknolojilerinin kullanımında sınırlayıcı birçok etken bulunmaktadır (Abdollahi ve ark., 2015) ve karpuzda haploid bitki elde etme yöntemlerinden anter kültürü konusunda yapılan çalışma sayısı sınırlıdır (Xue, 1983; Tulukoğlu, 2014; Abdollahi, 2015).

Sunulan bu tez çalışmanın amacı; farklı *Citrullus* türlerinde anter kültürü yöntemi kullanılarak haploid bitkiler elde etmek ve farklı ortam kombinasyonlarının anter kültürü üzerine etkilerini araştırmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Dryanovska ve Ilieva (1983), kavunda (*Cucumis melo* L.) anter ve ovül kültürü kullanarak haploid bitki elde etmeyi amaçlamıştır. Kültüre alınan ovüllerden kalluslar elde edilmiş ve bunlardan bir adedi haploid bitkiye dönüşmüştür.

Xue ve ark. (1983), frekansı düşük olmasına rağmen karpuzda anter kültürü yöntemi çalışmıştır. Beş mm çapında, tek çekirdekli aşamadaki çiçek tomurcuklarından anterler alınmıştır. Araştırmacılar haploid bitkicikler elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Kumar ve ark (2003), “Calypso” ve “Green Long” hıyar çeşitlerinde haploid bitki elde etmek amacıyla anter kültürü yöntemini çalışmışlardır. Denemede büyüme düzenleyicilerinin ve anterlere uygulanan sıcaklık ön uygulamalarının etkileri araştırılmıştır. Embriyojenik kallus oluşumunda en başarılı sonuç 2.0 mM 2.4-D ve 1.0 mM BAP kombinasyonlarında; soğuk ön uygulamasında ise en başarılı sonuç 4 °C’de 2 gün bekletilen çiçek tomurcuklarında olduğu görülmüştür. 0.09 M sakkaroz içeren B5 ortamı embriyolardan bitkiciklere dönüşümün en yüksek olduğu ortam olarak belirtilmiştir. Her iki çeşitten de alınan 24 bitkicikten; “Calypso” çeşidinde 21, “Green Long” çeşidinde ise 17 adet haploid bitki elde edildiği bildirilmiştir.

Çağlar ve ark. (2004), haploid embriyo oluşturmak amacıyla Kahramanmaraş kırmızı biber çeşitlerinde anter kültürü yöntemini çalışmışlardır. Anterler, taç yaprakları açılmamış, tek çekirdekli polen aşamasındaki biber çiçek tomurcuklarından çıkartılarak kültüre alınmıştır. Direkt embriyogenesis sağlanması amacıyla MS besi ortamı NAA (2.0, 4.0, 6.0 mg/l) ve 2.4-D (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l) ile BAP (0.1, 1.0, 2.0, 3.0 mg/l) ve kinetin (0.1, 1.0, 5.0 mg/l) ilave edilerek zenginleştirilmiştir. Çalışmada ayrıca aktif kömür (% 0.25) ve AgNO₃ (10 mg/l) dozları da denenmiştir. Araştırmada yedi gün süreyle karanlıkta 4 °C, 29 °C ve 35 °C sıcaklık ön uygulamalarıyla beraber toplamda 37 uygulama test edilmiştir.

Sonuçlara göre MS + 0.1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA + % 0.25 aktif kömür + 10 mg/l AgNO₃ bileşiminin en verimli besi ortamı olduğu sonucuna varılmış ve 9750 anter içerisinde kallus gelişimi gözlemlenmeden direkt olarak % 2.8 oranında haploid embriyo elde edilmiştir.

Mohamed ve Refaei (2004), yazlık kabak çeşidi olan Eskenderany’de donör bitkilerin farklı ekim sezonu ve tarihlerinin anter kültürüne etkilerini incelemiştir. Bir Mart’tan itibaren yaz boyunca ve 1 Kasım’dan itibaren kış boyunca bitkilerde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu görülmüştür. Kışın yetişen bitkilerden alınan anterlerde, yazın yetişen bitkilere kıyasla kallus oluşumunun ve bitki rejenerasyonunun daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte rejenere olan bitkilerin % 60’ının haploid bitki olduğu rapor edilmiştir.

Sayılır ve Özzambak (2005), biber anter kültüründe çiçek tomurcuk boyutunun embriyo verimine etkisini incelemişlerdir. Araştırmada kullanılan 6 biber çeşidinin tomurcukları 3 farklı şekilde boyutlandırılmıştır. En iyi sonuçlar MS + 4 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA; aktif kömür veya havuç özlerinden hiçbirisi, birisi veya her ikisi ilave edilmiş ortamlardan elde edilmiştir. Embriyo veriminde en iyi sonuç Charleston Bağcı çeşidine ait 5-6 mm tomurcuklardan alınan anterlerin MS + 4 mg/l NAA+ 0,1 mg/l BA ortamında gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre aktif karbon olumlu etki göstermezken N + 4 mg/l NAA + 0.1 mg/l BA + % 0.1 aktif kömür + 200 ml havuç özlerinin olumlu etkisi olmuştur.

Song ve ark. (2007), hıyarda (*Cucumis sativus* L.) anter kültürü yönteminde yeni bir protokol geliştirmek amacıyla altı farklı deneme yapmışlardır. Embriyojenik kallus gelişimi için 4.44 µM BA, 2.26 µM 2.4-D, 4.46 µM KIN, % 3 sakkaroz ve % 0.8 agar ilave edilmiş; embriyo indüksiyonu için 0.54 µM NAA, 13.32 µM BA, % 3 sakkaroz ve % 0.8 agar ilave edilmiş; embriyo çimlenmesi için ise 2.22 µM BA, % 6 sakkaroz ve % 1.2 agar içeren MS ortamının en başarılı ortam olduğu sonucuna varmışlardır. Denemede “Ningjia No. 1” çeşidi için 45 anterden 42 double haploid bitki (% 93 başarı) elde edilmiştir.

Suprunova ve Shmykova (2008), hıyar bitkisinde haploid bitki eldesinde büyüme düzenleyicilerini, genotipleri, çiçek tomurcuğu uzunluğunu ve mikrospor gelişim aşamalarını incelemişlerdir. Değerlendirilen 10 genotip arasında yalnızca "Gordion" çeşidinde, in vitro koşullarda ginogenesis ile haploid bitki elde edilebilmiştir. Anter kültürü için en uygun evrenin tek çekirdekli mikrospor evresi olduğu rapor edilmiştir.

Solmaz ve Sarı (2011), farklı karpuz çeşitleri (Crimson Tide, Crisby ve Bonanza) ile kültür ortamlarının haploid embriyo uyartımı ve bitki elde edilmesine etkisini incelemişlerdir. İki yıl süren bu çalışmada toplam 528 (birinci yıl 215, ikinci yıl 313) partenokarpik karpuz meyvesi elde edilmiştir. Denemenin birinci yılında 6 adet yürek şeklinde haploid embriyonun 2 adedi bitkiye dönüşmüştür. İkinci yılında ise 8 adet yürek şeklinde embriyo elde edilmiştir. Deneme sonuçlarına göre karpuzlarda kitlesel haploid bitki üretimi konusunda ışınlanmış polenle tozlama tekniğinin kullanım olanağının düşük olduğu rapor edilmiştir.

Tulukoğlu (2014), karpuzlarda anter ve ovül kültürü yöntemlerinde soğuk ön uygulamaları ve farklı TDZ ve 2.4-D dozlarının haploid embriyo uyartımına etkisini incelemiştir. Çalışmadaki her iki denemede de anter kültüründe yalnızca kallus elde edilmiştir. Oluşan kallusların hormon içermeyen MS besi ortamında kültüre alınmasından 3 ile 4 hafta sonra kallusların kahverengileşerek canlılıklarını yitirdikleri bildirilmiştir.

Abdollahi ve ark. (2015), *Citrullus lanatus*'un anter kültürü yöntemine verdiği tepkiyi araştırmışlardır. Deneme büyüme düzenleyicilerinin "Charleston Gray" çeşidine ve sıcaklık ön uygulamalarının "Crimson Sweet" çeşidine etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır. Embriyogenesis, 2.4-D ve NAA ile birlikte 2.4-D ve BAP/Kinetin kombinasyonlarının ilave edildiği MS ortamlarında başlamıştır. "Charleston Gray" çeşidinin optimum embriyojenik kallus (EC) 2.0 μ M 2.4-D ve 1.5 μ M BAP ilave edilmiş MS ortamında görülmüştür. "Crimson Sweet" çeşidinin anterlerine uygulanan yüksek sıcaklık uygulamasında ise en yüksek embriyo gelişimi 32°C'de 2 gün bekletilen anterlerde tespit edilmiştir.

Abdollahi ve ark. (2016), iki ayrı denemede farklı agar konsantrasyonlarının ve makro besi elementleri ile güçlendirilmiş MS ortamlarının hıyar bitkisinde anter kültürü yöntemine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada “Beit Alpha” ve üç adet İran yerel hıyar çeşidi (Basmenj, Isfahani, Korki) kullanılmıştır. “Isfahani” hıyar çeşidi kallus oluşum oranında en yüksek başarı (% 100) iki kat güçlendirilmiş MS ortamında olduğu tespit edilmiştir. Yerel çeşitlerde ise bu oran, % 83.33 başarı ile tam güçlendirilmiş MS ortamında görülmüştür. Ayrıca somatik embriyo üretiminde 7 ve 14 g L⁻¹ agar ilave edilen MS ortamının en başarılı olduğu rapor edilmiştir.

Erol (2018), yaptığı çalışmada hıyarlarda spermidin ve putresin kullanımının haploid embriyo uyartımına etkilerini araştırmıştır. Kullandığı ortam kombinasyonlarında 0.04 mg/l TDZ sabit olmak üzere spermidin ve putresinin 40-80-160-200 µM dozlarda ayrı ayrı ve her ikisini birlikte içeren dozlar kullanmıştır. Kurulan tüm denemelerde kullanılan 5 genotipte de kontrol ortamına göre spermidin ve putresin içeren ortamlarda daha yüksek oranlarda ovül gelişimi elde edildiği bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama seralarında ve Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Çalışmada Çukurova Üniversitesi karpuz genetik koleksiyonundan seçilen 2 adet genotip (PI 296341 ve PI 189225) ve 1 çeşitin (Halep Karası) yanı sıra ticari firmadan temin edilen 1 hibrit çeşit (Crimson Tide) olmak üzere toplamda 4 adet genotip kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

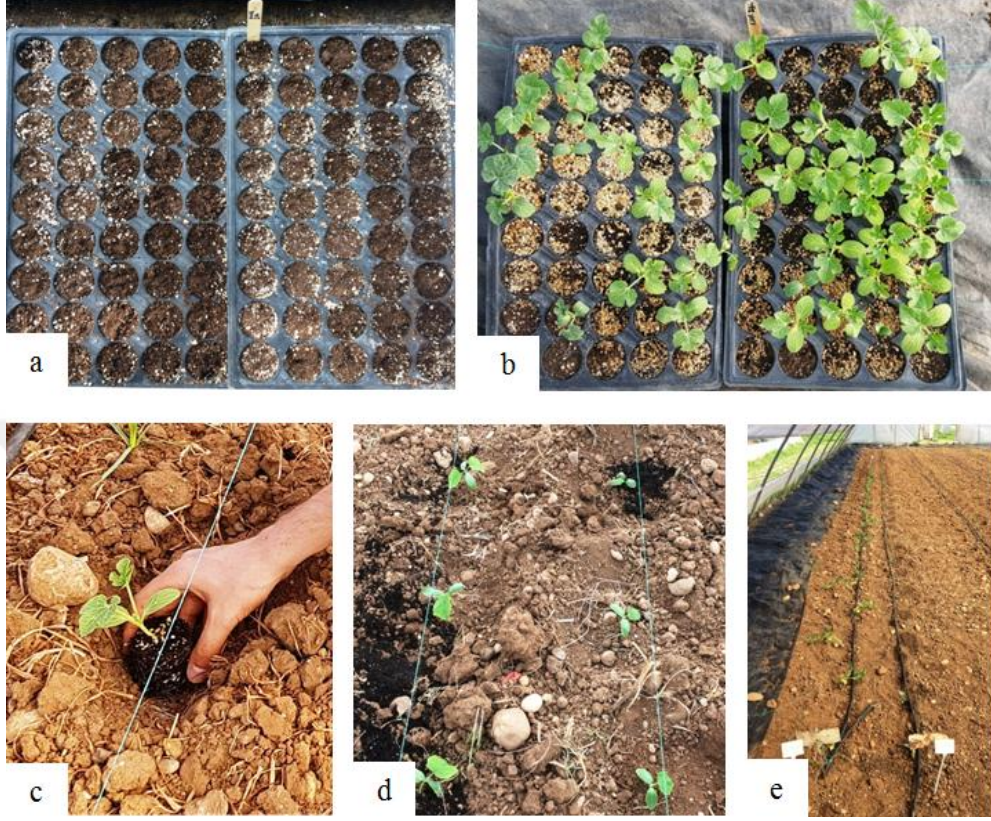
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan karpuz çeşit ve genotipleri

<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> türüne ait çeşitler	Halep Karası (Açık tozlanan)
	Crimson Tide (Hibrit)
<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i> türüne ait genotipler	PI 296341
	PI 189225

3.2. Metot

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Araştırmada kullanılan *Citrullus* cinsinin 2 farklı türüne ait genotiplerin tohumları 21/02/2018 tarihinde Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama seralarında her genotipten 40'ar fide elde etmek üzere içerisinde 2:1 oranında torf ve perlit karışımı bulunan viyollere ekilmiştir. Fideler 2-3 gerçek yapraklı aşamaya geldiklerinde 01/04/2018 tarihinde (100-50) x 50 cm aralık mesafeler ile plastik seraya her genotipten 40'ar adet olacak şekilde çift sıralı olarak dikilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. a) Tohumların ekilmesi, b) dikime hazır hale gelen fideler, c) fidelerin toprağa aktarılması, d, e) dikilmiş fidelerin plastik seradaki görüntüsü

Bitkiler askıda tek gövdeli yetiştirilmiştir (Şekil 3.2). Budama işlemi yapılmış, yaşlı yapraklar uzaklaştırılmıştır. Gübreleme programı dekara saf 15: 10: 15 kg/da N: P₂O₅: K₂O olacak şekilde damlama sulama sistemiyle birlikte bitkiye uygulanmıştır (Solmaz ve ark, 2018). Ayrıca bitkilerin kök gelişimi için MasTonik kullanılmıştır. Hastalık ve zararlılarla mücadelede; antraknoz için Antracol Combi, yaprak biti için Pascal ve külleme için Luna ve Flint ilaçları uygulanmıştır. Yabancı otlarla el ile mücadele edilmiştir.



Şekil 3.2. Askıya alınmış karpuz bitkilerinin seradaki görüntüleri

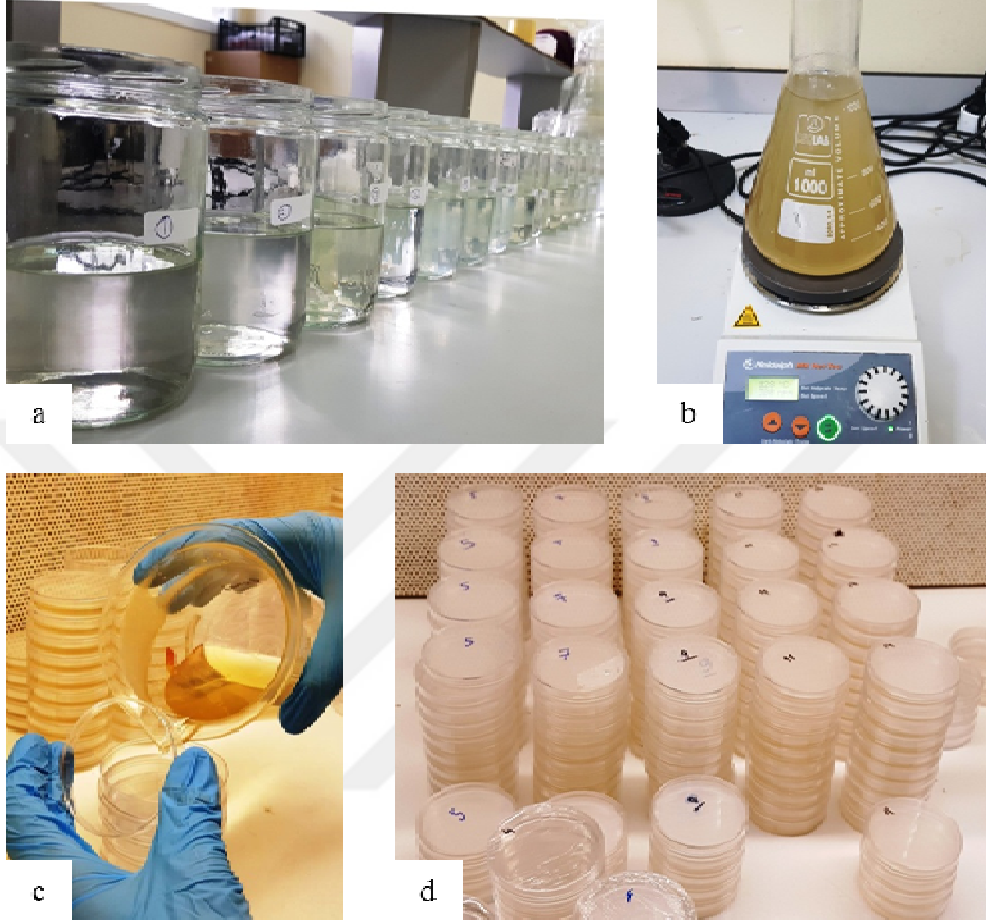
3.2.2. Embriyo Teşvik Ortamının İçeriği ve Hazırlanması

Denemede öncelikli olarak temel besi ortamı olan, daha önce anter kültürü çalışmalarında olumlu sonuçlar verdiği belirtilen MS besi ortamı kullanılmıştır (Metwally ve ark., 1998 a ve b). Hazır MS besi ortamı içerisine 2 mg/l 2.4-D ve katılaştırıcı olarak 8 g/l agar tüm ortamlarda standart şekilde konulmuş ve pH 5.7 olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm ortamlarda karbon kaynağı olarak 90 g/l sakkaroz (Kumar ve ark., 2004; Rakha ve ark., 2012) kullanılmıştır. Besin ortamlarına sitokinin hormon grubundan BAP (1 ve 1.5 mg/l dozlarda) (Abdollahi ve ark., 2015), poliaminlerden Spermidin (SPD) ve Putresin (PUT) (500 ve 1000 μ M dozlarda) (Kumar ve ark., 2004) eklenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Denemede kullanılan farklı embriyo teşvik ortamlarının içeriği

ORTAM NO	MS + 2 mg/l 2.4-D + 90 g/l sakkaroz, 5.7 pH standart olmak üzere		
	<u>Büyüme Düzenleyicileri</u>		
	BAP (mg/l)	SPD (µM)	PUT (µM)
1	1	-	-
2	1	500	-
3	1	-	500
4	1	500	500
5	1	1000	-
6	1	-	1000
7	1	1000	1000
8	1.5	-	-
9	1.5	500	-
10	1.5	-	500
11	1.5	500	500
12	1.5	1000	-
13	1.5	-	1000
14	1.5	1000	1000

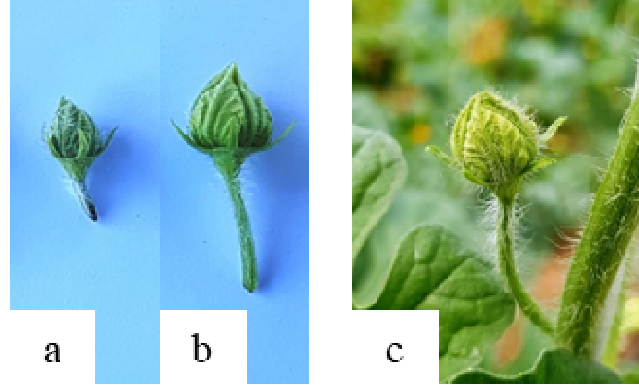
Ortamlar otoklav cihazında 121 °C’de, 1.2 atm basınç altında, 15 dk. süreyle sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığında soğutulan ortamlar, aseptik koşullar altında, steril petri kaplarına yaklaşık 10 ml olacak şekilde dağıtılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. a) Agar dışındaki diğer ortam bileşenlerinin cam kavanozlardaki görüntüsü, b) agar eklenmiş ortamın ısıtılması ve karıştırılması, c) ortamların petrilere dağıtılması, d) petrilere konulmuş ortamların soğumaya bırakılması.

3.2.3. Çiçek Tomurcuklarının Toplanması

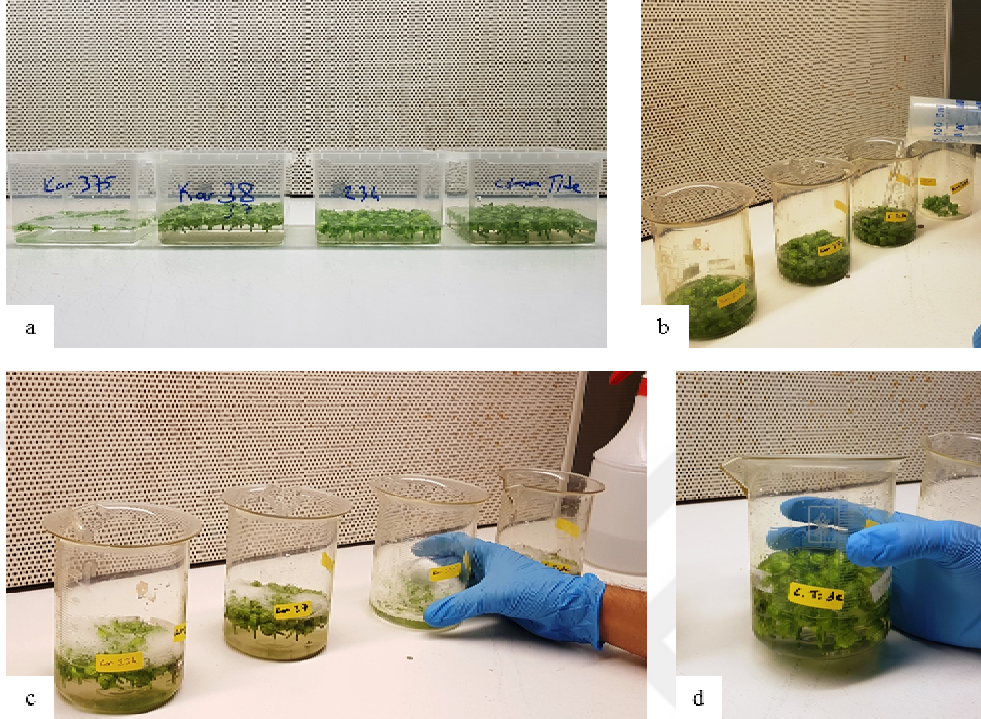
Araştırmada iki farklı deneme kurulmuş ve olumlu sonuç verdiği saptanan 2 farklı çiçek gelişim dönemi (Tulukoğlu, 2014) denenmiştir. Birinci denemede antezisten 1 gün önceki çiçekler, ikinci denemede ise antezisten 2 gün önceki çiçekler (Tulukoğlu, 2014), erken saatte çiçek saplarından kesilerek toplanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Farklı büyüme dönemlerindeki erkek çiçekler; a) antezisten 2 gün önceki çiçek görünümü; b, c) antezisten 1 gün önceki çiçek görünümü

Birinci denemede 22/05/2018 tarihinde seradan toplanarak Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Doku Kültürü Laboratuvarı'na getirilen erkek çiçekler yüzey sterilizasyonu için ilk olarak 30 dk. boyunca çeşme suyu altında bekletilmiştir (Tulukoğlu, 2014). Bu uygulamanın ardından anterler steril kabine alınarak % 70'lik etil alkol çözeltisi içerisinde 2 dk. tutulduktan sonra 3-4 kez steril saf su ile durulanmıştır (Tulukoğlu, 2014; Abdollahi ve ark., 2015). Bir sonraki aşamada çiçek tomurcukları, 1-2 damla Tween 20 damlatılan % 15'lik sodyum hipoklorit solüsyonu içerisinde 15 dk. bekletilmiştir. Son olarak 3-4 kez steril saf su ile durulandıktan sonra yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır (Şekil 3.5).

İkinci denemede 07/06/2018 tarihinde seradan, erken saatte toplanan antezisten 2 gün önceki erkek çiçekler kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonu işlemleri için aynı yöntem uygulanmıştır.

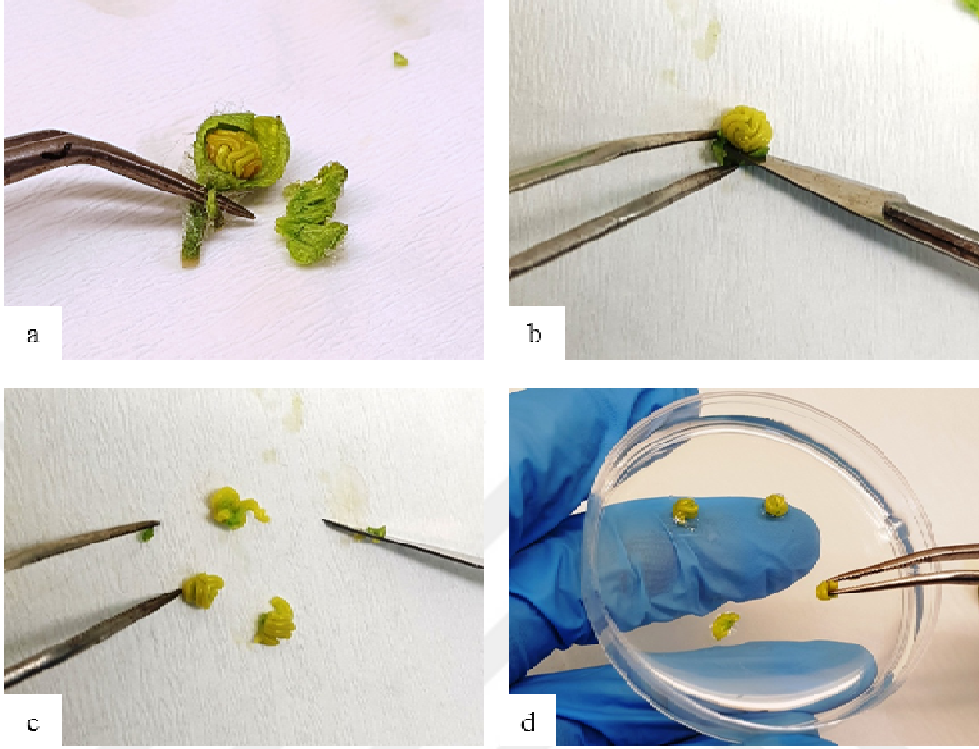


Şekil 3.5. a) Toplanan erkek çiçeklerin çeşme suyunda bekletilmesi, b) % 70'lik alkol çözeltisinin dökülmesi, c) 1-2 damla Tween 20 damlatılan % 15'lik sodyum hipoklorit içerisindeki erkek çiçeklerin çalkalanması, d) steril saf suda durulama işlemi

3.2.4. Ön Uygulama ve Anterlerin Embriyo Teşvik Ortamında Kültüre Alınması

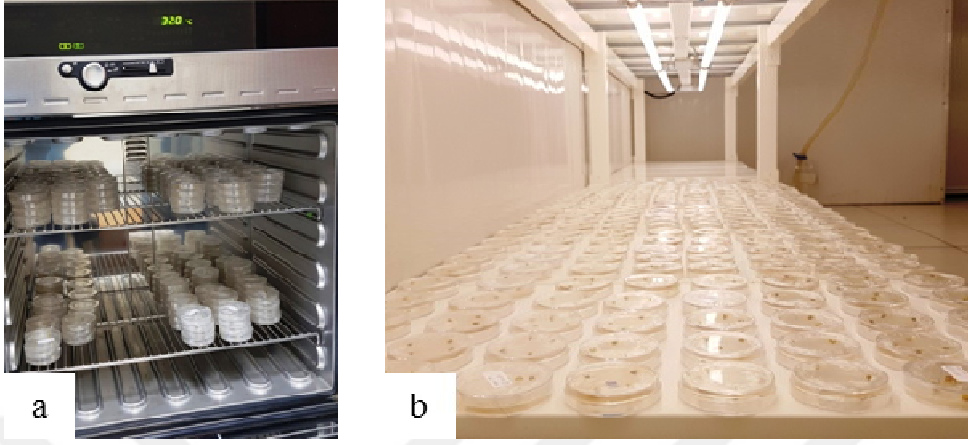
Sterilizasyonu tamamlanan erkek çiçek tomurcukları, steril filtre kâğıtları üzerinde kurutulmasının ardından pens ve bistüri yardımıyla ilk olarak saplarından, taç ve çanak yapraklarından ayrılmıştır. Daha sonra anter filamentleri dikkatlice uzaklaştırılmış, izole edilen anterler ayrıldıktan sonra embriyo teşvik ortamı içeren petrilere yerleştirilmiştir (Şekil 3.6).

Yapılan tez çalışmasında her deneme için 4 genotip x 14 ortam x 4 tekerrür x her tekerrür için 1 adet petri olmak üzere 224 petri kullanılmıştır. Her petriye 4 anter yerleştirilmiş olup toplamda her bir deneme için 896 anter kültüre alınmıştır.



Şekil 3.6. a) Erkek çiçeğin sapının, taç ve çanak yapraklarının ayrılması, b) anterin filamentinden ayrılması, c) izole edilen anterlerin ayrılması, d) anterlerin petrilere yerleştirilmesi

Birinci denemede kültüre alınan anterler 32 °C’de 2 gün (Abdollahi ve ark., 2015) karanlıkta sıcaklık şoku ön uygulamasına tabi tutulmuştur (Şekil 3.7). Sıcaklık şokunun ardından kültüre alınan anterleri içeren petrilere 25-26°C sıcaklıktaki, 3000-4000 lüks ışık yoğunluğunda olan, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ışıklandırma süresine sahip iklim odalarına alınarak gelişmeleri gözlenmiştir.



Şekil 3.7. a) Kültüre alınan anterlerin sıcaklık ve karanlık ön uygulamasına tabi tutulması, b) ön uygulama sonrası petrilerin iklim odasına yerleştirilmesi

Ön uygulamanın ardından anterler, her bir genotip için ayrı olmak üzere, Çizelge 3.2’de yer alan 14 farklı ortamda; her ortamda 4’er petri, her petride 4’er anter ve toplamda her bir ortam için 16 anter olacak şekilde kültüre alınmıştır. Petriler 8 hafta süreyle düzenli olarak gözlenmiş ve ardından gelişim gösteren anterler alt kültüre alınmıştır.

3.2.5. Anterlerden Gelişen Kallusların Kültüre Alınması

Gelişim gösteren 6 haftalık olası embriyojenik kalluslar 13.32 μM BAP ve 0.54 μM NAA (Song ve ark., 2007) ilave edilmiş MS ortamında, her kültür kabında 1 anter olacak şekilde alt kültüre alınmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. a-c) Gelişim gösteren olası embriyojenik kalluslar, d) kallusların alt kültüre alınması

3.2.6. İncelenen Özellikler

Anter Gelişimi (%): Deneme sonucunda şişerek büyüme gösteren anter sayısı, kültüre alınan toplam anter sayısına oranlanarak elde edilmiştir.

Kallus Oluşumu (%): Kallus oluşturan anter sayısı, kültüre alınan toplam anter sayısına oranlanarak elde edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Birinci ve ikinci anter kültürü denemelerine ait veriler genotip bazında ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bununla birlikte birinci ve ikinci denemeye ait anter kültürü sonuçlarının değerlendirilmesinde hormon ve çiçek gelişim aşamalarının anter kültürüne etkilerini içeren grafiklerden yararlanılmıştır.

4.1. Birinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları

Birinci anter kültürü denemesi 22/05/2018 tarihinde kurulmuştur. Denemede Halep Karası, Crimson Tide, PI 296341 ve PI 189225 genotiplerinin erkek çiçek tomurcukları antezisten 1 gün önceki aşamada toplanıp Çizelge 3.2’de yer alan, farklı dozlarda BAP, SPD ve PUT içeren 14 farklı MS besisi ortamı kombinasyonunda kültüre alınmıştır. Ardından 32 °C’de 2 gün karanlık ön uygulamasına tabi tutulmuş ve iklim odalarına yerleştirilmiştir. Farklı BAP, SPD ve PUT dozlarının polen embriyogenesise etkisinin incelendiği deneme sonuçları genotip bazında değerlendirilmiştir.

4.1.1. Halep Karası Çeşidine Ait Birinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları

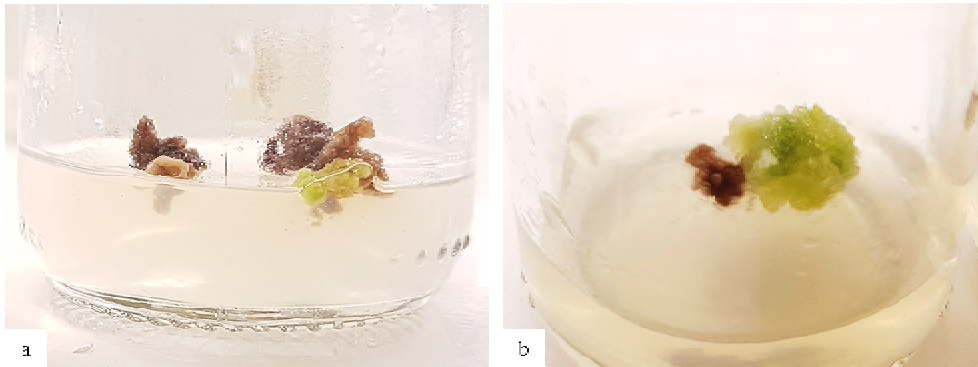
Birinci anter kültürü denemesinde yer alan Halep Karası genotipine ait bulgular Çizelge 4.1’de incelenmiştir.

Halep Karası çeşidine ait anterlerde 11 no’lu ortamda (1.5 mg/l BAP + 500 µM SPD + 500 µM PUT) % 25 oranında gelişim görülürken, diğer ortamlardaki anterlerin tamamında %100 gelişim görülmüştür. Kallus oluşumu ise en yüksek % 81 oranı ile 1 no’lu ortamda (1 mg/l BAP) elde edilmiştir. En düşük kallus oluşumu 10 no’lu ortamda (1.5 mg/l BAP + 500 µM PUT) görülmüştür. Kallus oluşumu % 25 – 81 arasında değişmiştir. Alt kültüre alınan kalluslar arasından sadece 4 nolu ortamda 1 adet (1 mg/l BAP + 500 µM SPD + 500 µM PUT), 7 nolu ortamda 1 adet (1 mg/l BAP + 1000 µM SPD + 1000 µM PUT) ve 12 nolu ortamda 1 adet (1.5 mg/l BAP + 1000 µM SPD) kallusda embriyo oluşumu görülmüş ve bu

embriyolar alt kültüre alınmış olmakla birlikte (Şekil 4.1) alt kültür işleminden sonra yapılan gözlemlerde embriyolarda gelişim görülmemiştir.

Çizelge 4.1. Halep Karası çeşidine ait birinci anter kültürü denemesi sonuçları

Her ortam için MS + 2 mg/l 2.4-D + 90 g/l sakkaroz + 8 g/l agar standart olup pH 5.7 olarak ayarlanmıştır.					
ORTAM NO	Ortam Kombinasyonları			İncelenen Özellikler	
	BAP (mg/l)	SPD (µM)	PUT (µM)	Anter Gelişimi (%)	Kallus Oluşumu (%)
1	1	-	-	100	81
2	1	500	-	100	56
3	1	-	500	100	62
4	1	500	500	100	56
5	1	1000	-	100	56
6	1	-	1000	100	62
7	1	1000	1000	100	43
8	1.5	-	-	100	56
9	1.5	500	-	100	43
10	1.5	-	500	100	25
11	1.5	500	500	25	37
12	1.5	1000	-	100	43
13	1.5	-	1000	100	50
14	1.5	1000	1000	100	37



Şekil 4.1. a, b) Halep Karası genotipine ait embriyo benzeri yapılar

4.1.2. Crimson Tide Çeşidine Ait Birinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları

Crimson Tide çeşidine ait birinci anter kültürü denemesi gelişim verileri incelendiğinde % 75 oranında anter gelişimi görülen 2 no'lu ortam (1 mg/l BAP + 500 µM SPD) dışında tüm ortamlarda % 100 oranda anter gelişimi gözlenmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek (% 31) kallus oluşum oranı 4 no'lu ortamda (1 mg/l BAP + 500 µM SPD + 500 µM PUT) görülürken; 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 ve 14 no'lu ortamlarda kallus oluşmamıştır. Bu genotipte yapılan incelemelerde embriyo gelişimi görülmemiştir.

Çizelge 4.2. Crimson Tide çeşidine ait birinci anter kültürü denemesi sonuçları

Her ortam için MS + 2 mg/l 2.4-D + 90 g/l sakkaroz + 8 g/l agar standart olup pH 5.7 olarak ayarlanmıştır.					
ORTAM NO	Ortam Kombinasyonları			İncelenen Özellikler	
	BAP (mg/l)	SPD (µM)	PUT (µM)	Anter Gelişimi (%)	Kallus Oluşumu (%)
1	1	-	-	100	0
2	1	500	-	75	0
3	1	-	500	100	0
4	1	500	500	100	31
5	1	1000	-	100	0
6	1	-	1000	100	0
7	1	1000	1000	100	0
8	1.5	-	-	100	0
9	1.5	500	-	100	18
10	1.5	-	500	100	18
11	1.5	500	500	100	12
12	1.5	1000	-	100	18
13	1.5	-	1000	100	18
14	1.5	1000	1000	100	0

4.1.3. PI 296341 Genotipine Ait Birinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları

Birinci anter denemesinde yer alan PI 296341 genotipine ait veriler Çizelge 4.3’de incelenmiştir.

Bu genotipe ait gözlemler sonucunda anter gelişim oranları ortamlara göre farklılık göstermiş olmakla birlikte, kallus oluşumunda herhangi bir gelişme olmamıştır.

Çizelge 4.3. PI 296341 genotipine ait birinci anter kültürü denemesi sonuçları

Her ortam için MS + 2 mg/l 2.4-D + 90 g/l sakkaroz + 8 g/l agar standart olup pH 5.7 olarak ayarlanmıştır.					
ORTAM NO	Ortam Kombinasyonları			İncelenen Özellikler	
	BAP (mg/l)	SPD (µM)	PUT (µM)	Anter Gelişimi (%)	Kallus Oluşumu (%)
1	1	-	-	75	0
2	1	500	-	50	0
3	1	-	500	75	0
4	1	500	500	100	0
5	1	1000	-	100	0
6	1	-	1000	50	0
7	1	1000	1000	75	0
8	1.5	-	-	100	0
9	1.5	500	-	100	0
10	1.5	-	500	25	0
11	1.5	500	500	75	0
12	1.5	1000	-	100	0
13	1.5	-	1000	100	0
14	1.5	1000	1000	75	0

4.1.4. PI 189225 Genotipine Ait Birinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları

PI 189225 genotipi birinci anter kültürü denemesine ait bulgular Çizelge 4.4’de yer almaktadır.

PI 189225 genotipinde anter gelişimi 6 no’lu (1 mg/l BAP + 1000 µM PUT) ve 7 no’lu (1 mg/l BAP + 1000 µM SPD + 1000 µM PUT) ortamlar hariç diğer tüm ortamlarda % 100 olmuştur. Kallus oluşumu incelendiğinde ise 8 no’lu ortamda (1.5 mg/l BAP) en yüksek oran (% 50) tespit edilmiştir. Embriyo gelişimi görülmemiştir.

Çizelge 4.4. PI 189225 genotipine ait birinci anter kültürü denemesi sonuçları

Her ortam için MS + 2 mg/l 2.4-D + 90 g/l sakkaroz + 8 g/l agar standart olup pH 5.7 olarak ayarlanmıştır.					
ORTAM NO	Ortam Kombinasyonları			İncelenen Özellikler	
	BAP (mg/l)	SPD (µM)	PUT (µM)	Anter Gelişimi (%)	Kallus Oluşumu (%)
1	1	-	-	100	12
2	1	500	-	100	0
3	1	-	500	100	0
4	1	500	500	100	0
5	1	1000	-	100	12
6	1	-	1000	75	0
7	1	1000	1000	50	0
8	1.5	-	-	100	50
9	1.5	500	-	100	6
10	1.5	-	500	100	6
11	1.5	500	500	100	0
12	1.5	1000	-	100	0
13	1.5	-	1000	100	6
14	1.5	1000	1000	100	12

4.2. İkinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları

İkinci denemede Halep Karası ve Crimson Tide çeşitleri, PI 296341 ve PI 189225 genotiplerine ait anterler, antezisten 2 gün önceki aşamada toplanmıştır. Anterler Çizelge 3.2’de yer alan, farklı dozlarda BAP, SPD ve PUT içeren 14 farklı MS besin ortam kombinasyonunda kültüre alınmıştır. Deneme sonuçları genotip bazında alt başlıklar halinde incelenmiştir.

4.2.1. Halep Karası Çeşidine Ait İkinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları

Bu genotipe ait veriler Çizelge 4.5’de incelenmiştir. Buna göre 14 farklı ortamdaki anter gelişimi incelendiğinde 2 no’lu ortam (1 mg/l BAP + 500 µM SPD) hariç (% 75), diğer tüm ortamlarda anterler % 100 gelişim göstermiştir. En yüksek kallus oluşumu % 93 ile 1 no’lu ortamda (1 mg/l BAP) görülürken, 3 no’lu ortamda (1 mg/l BAP + 500 µM PUT) kallus oluşumuna rastlanmamıştır. Çok sayıda kallus oluşmasına rağmen, embriyo benzeri yapıya dönüşüm olmamıştır.

Çizelge 4.5. Halep Karası çeşidine ait ikinci anter kültürü denemesi sonuçları

Her ortam için MS + 2 mg/l 2.4-D + 90 g/l sakkaroz + 8 g/l agar standart olup pH 5.7 olarak ayarlanmıştır.					
ORTAM NO	Ortam Kombinasyonları			İncelenen Özellikler	
	BAP (mg/l)	SPD (µM)	PUT (µM)	Anter Gelişimi (%)	Kallus Oluşumu (%)
1	1	-	-	100	93
2	1	500	-	75	43
3	1	-	500	100	0
4	1	500	500	100	37
5	1	1000	-	100	50
6	1	-	1000	100	6
7	1	1000	1000	100	37
8	1.5	-	-	100	68
9	1.5	500	-	100	56
10	1.5	-	500	100	50
11	1.5	500	500	100	31
12	1.5	1000	-	100	50
13	1.5	-	1000	100	12
14	1.5	1000	1000	100	31

4.2.2. Crimson Tide Çeşidine Ait İkinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları

Çizelge 4.6'da Crimson Tide çeşidine ait veriler yer almaktadır. Gözlem sonuçlarına göre en düşük anter gelişim oranı % 50 ile 2 no'lu ortamda (1 mg/l BAP + 500 µM SPD) elde edilirken, bunu % 75 gelişim oranı ile 1 no'lu (1 mg/l BAP), 3 nolu (1 mg/l BAP + 500 µM PUT) ve 9 no'lu ortam (1.5 mg/l BAP + 500 µM SPD) takip etmiştir. Diğer tüm ortamlarda ise anter gelişim oranının % 100 olduğu tespit edilmiştir. Kallus oluşumunda en yüksek (% 37) değer 7 no'lu (1

mg/l BAP + 1000 μ M SPD + 1000 μ M PUT) ve 10 no'lu (1.5 mg/l BAP + 500 μ M PUT) ortamlarda gözlenmiştir. Kültüre alınan kalluslar içerisinde sadece 8 no'lu ortamda 1 adet (1.5 mg/l BAP) ve 12 no'lu ortamda 1 adet (1.5 mg/l BAP + 1000 μ M SPD) embriyo oluşmuş olmakla birlikte, alt kültüre alınan embriyolarda gelişme görülmemiştir.

Çizelge 4.6. Crimson Tide çeşidine ait ikinci anter kültürü denemesi sonuçları

Her ortam için MS + 2 mg/l 2,4-D + 90 g/l sakkaroz + 8 g/l agar standart olup pH 5.7 olarak ayarlanmıştır.					
ORTAM NO	Ortam Kombinasyonları			İncelenen Özellikler	
	BAP (mg/l)	SPD (μ M)	PUT (μ M)	Anter Gelişimi (%)	Kallus Oluşumu (%)
1	1	-	-	75	0
2	1	500	-	50	0
3	1	-	500	75	0
4	1	500	500	100	3
5	1	1000	-	100	18
6	1	-	1000	100	25
7	1	1000	1000	100	37
8	1.5	-	-	100	25
9	1.5	500	-	75	18
10	1.5	-	500	100	37
11	1.5	500	500	100	25
12	1.5	1000	-	100	12
13	1.5	-	1000	100	25
14	1.5	1000	1000	100	25

4.2.3. PI 296341 Genotipine Ait İkinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları

PI 296341 genotipine ait veriler Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. PI 296341 genotipinde tüm ortamlarda anter gelişimi % 100 olmuştur. Ancak kallus oluşumunda yalnızca 9 no’lu ortamda (1.5 mg/l BAP + 500 µM SPD) gelişme görülmüştür.

Çizelge 4.7. PI 296341 genotipine ait ikinci anter kültürü denemesi sonuçları

Her ortam için MS + 2 mg/l 2,4-D + 90 g/l sakkaroz + 8 g/l agar standart olup pH 5.7 olarak ayarlanmıştır.					
ORTAM NO	Ortam Kombinasyonları			İncelenen Özellikler	
	BAP (mg/l)	SPD (µM)	PUT (µM)	Anter Gelişimi (%)	Kallus Oluşumu (%)
1	1	-	-	100	0
2	1	500	-	100	0
3	1	-	500	100	0
4	1	500	500	100	0
5	1	1000	-	100	0
6	1	-	1000	100	0
7	1	1000	1000	100	0
8	1.5	-	-	100	0
9	1.5	500	-	100	18
10	1.5	-	500	100	0
11	1.5	500	500	100	0
12	1.5	1000	-	100	0
13	1.5	-	1000	100	0
14	1.5	1000	1000	100	0

4.2.4. PI 189225 Genotipine Ait İkinci Anter Kültürü Denemesi Bulguları

İkinci anter kültürü denemesinde yer alan PI 189225 genotipine ait sonuçlar Çizelge 4.8’de yer almaktadır.

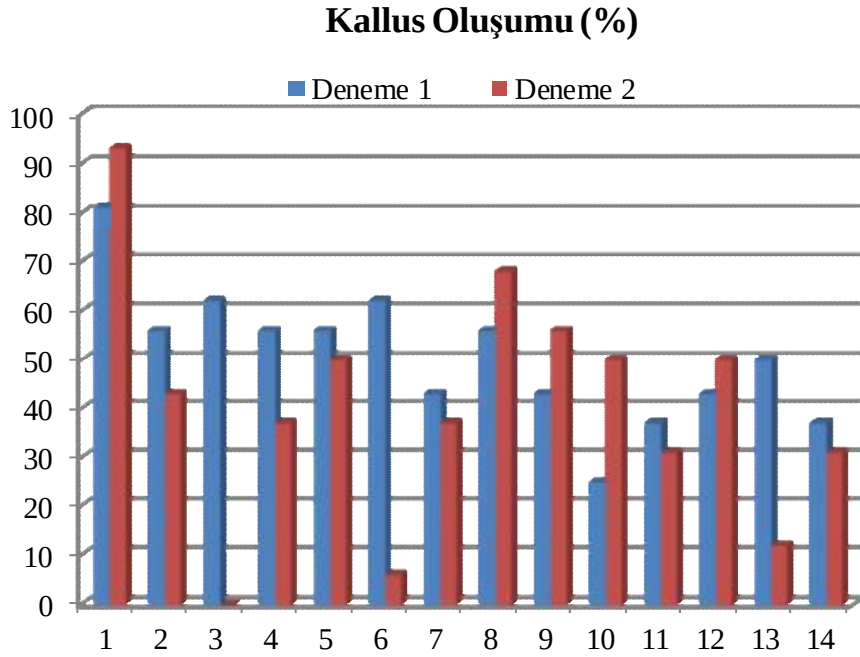
PI 189225 genotipinde anter gelişiminin en düşük 9 no’lu ortamda (1.5 mg/l BAP + 500 µM SPD) olduğu görülürken; 8, 9, 13 ve 14 no’lu ortamlar hariç tüm ortamlarda % 100 oranda gelişim görülmüştür. Ortamların hiçbirinde anterlerden kallus oluşmamıştır.

Çizelge 4.8. PI 189225 genotipine ait ikinci anter kültürü denemesi sonuçları

Her ortam için MS + 2 mg/l 2.4-D + 90 g/l sakkaroz + 8 g/l agar standart olup pH 5.7 olarak ayarlanmıştır.					
ORTAM NO	Ortam Kombinasyonları			İncelenen Özellikler	
	BAP (mg/l)	SPD (µM)	PUT (µM)	Anter Gelişimi (%)	Kallus Oluşumu (%)
1	1	-	-	100	0
2	1	500	-	100	0
3	1	-	500	100	0
4	1	500	500	100	0
5	1	1000	-	100	0
6	1	-	1000	100	0
7	1	1000	1000	100	0
8	1.5	-	-	50	0
9	1.5	500	-	25	0
10	1.5	-	500	100	0
11	1.5	500	500	100	0
12	1.5	1000	-	100	0
13	1.5	-	1000	75	0
14	1.5	1000	1000	75	0

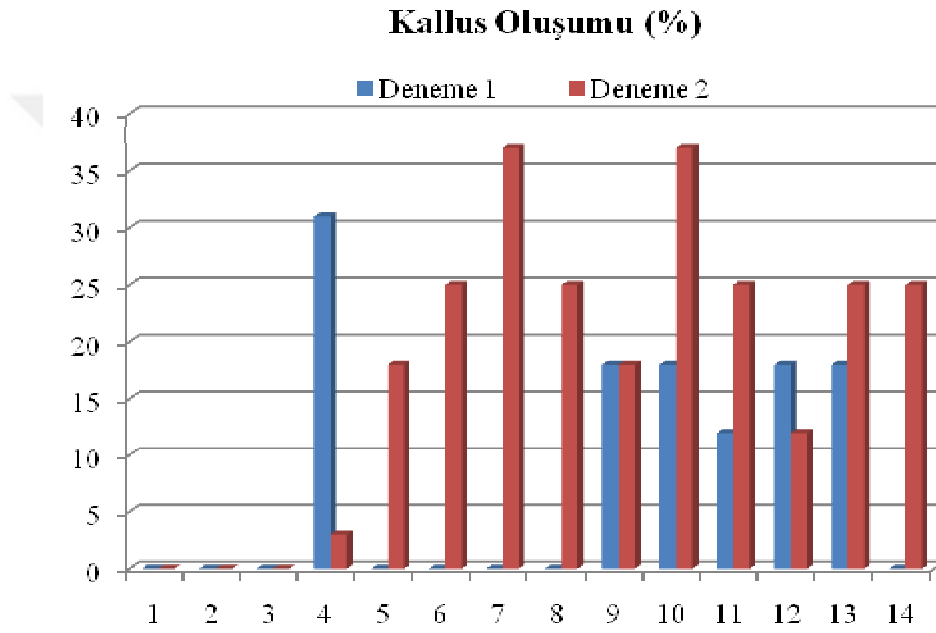
4.3. Birinci ve İkinci Deneme Anter Kültürü Denemesi Bulgularının Karşılaştırılması

Birinci deneme 22/05/2018 tarihinde, ikinci deneme ise 07/06/2018 tarihinde kurulmuştur. Birinci denemede tomurcuklar antezisten bir gün önce; ikinci denemede ise iki gün önce toplanmış ve farklı çiçeklenme döneminde toplanan anterlerin embriyogenesise etkileri genotip bazında karşılaştırılmıştır. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi Halep Karası genotipine ait verilerde her iki deneme için de 1 no’lu ortamda (1 mg/l BAP) kallus oluşumunun en yüksek seviyede olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra ikinci deneme verilerine göre poliaminlerden, tek başına putresin içeren 3 no’lu (1 mg/l BAP + 500 µM PUT), 6 no’lu (1 mg/l BAP + 1000 µM PUT) ve 13 no’lu (1.5 mg/l BAP + 1000 µM PUT) ortamlarda kallus oluşumunun düşük oranda olduğu gözlenmiştir.



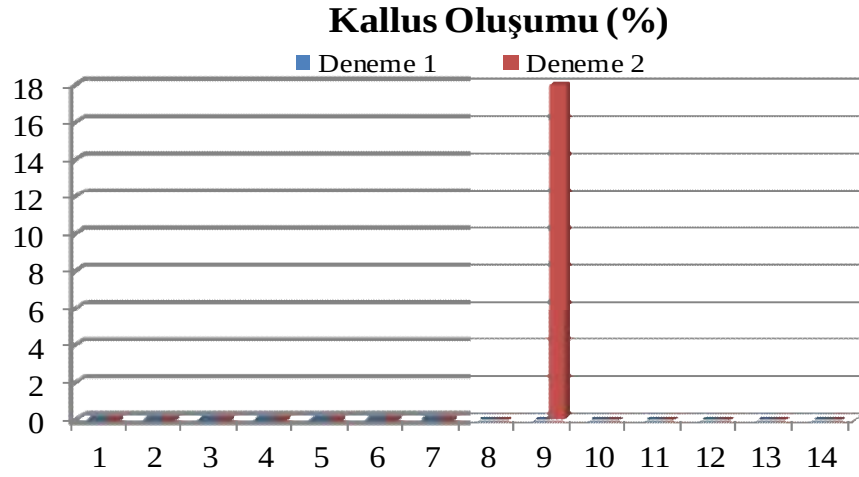
Şekil 4.2. Halep Karası çeşidine ait birinci ve ikinci anter kültürü deneme sonuçlarının karşılaştırıldığı grafik

Şekil 4.3'te Crimson Tide çeşidinin kallus oluşum verilerini gösteren grafik incelendiğinde farklı dozlarda BAP, spermidin ve putresin içeren 4 no'lu (1 mg/l BAP + 500 µM SPD + 500 µM PUT), 7 no'lu (1 mg/l BAP + 1000 µM SPD + 1000 µM PUT) ve 10 no'lu (1.5 mg/l BAP + 500 µM PUT) ortamlarda yüksek oranda kallus oluşumu tespit edilmiştir. Birinci deneme ile kıyaslandığında ikinci denemede daha iyi gelişim görülmüştür.



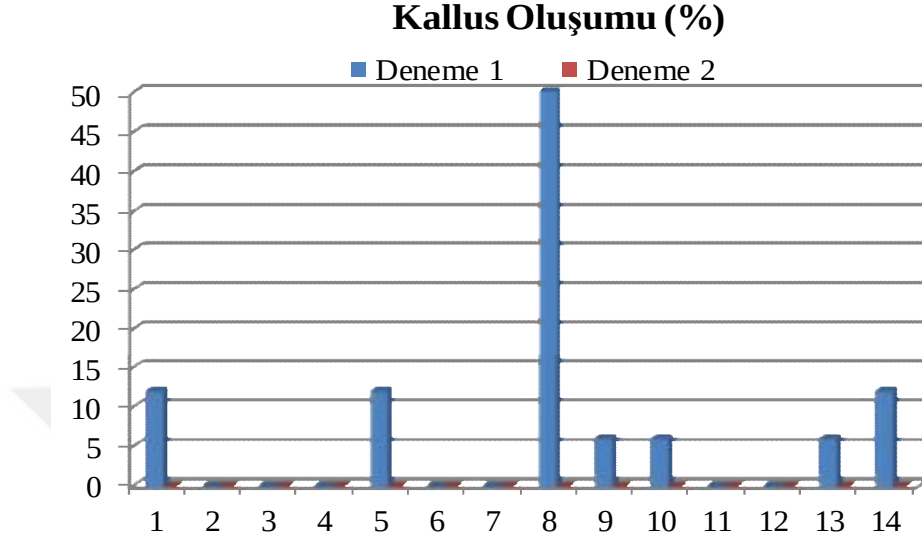
Şekil 4.3. Crimson Tide çeşidine ait birinci ve ikinci anter kültürü deneme sonuçlarının karşılaştırıldığı grafik

Şekil 4.4'de yer alan PI 296341 genotipine ait sonuçlara göre sadece ikinci denemede 9 no'lu (1.5 mg/l BAP + 500 µM SPD) ortamda kallus oluşumu görülürken, diğer 13 ortamda her iki anter kültürü denemesi için de sonuç alınamamıştır.



Şekil 4.4. PI 296341 genotipine ait birinci ve ikinci anter kültürü deneme sonuçlarının karşılaştırıldığı grafik

PI 189225 genotipine ait verilerde en yüksek oranda kallus oluşumu birinci denemede 8 no'lu ortamda (1.5 mg/l BAP) görülmüştür (Şekil 4.5). İkinci denemede ise olumlu yanıt alınamamıştır. Bu genotip için poliamin kullanımının olumlu bir etkisi görülmemiştir.



Şekil 4.5. PI 189225 genotipine ait birinci ve ikinci anter kültürü deneme sonuçlarının karşılaştırıldığı grafik

4.4. Tartışma

Karpuzlarda farklı yöntemlerde haploid embriyo uyartımında başarı sınırlı düzeyde olup (Gürsoy ve ark., 1991; Sarı ve ark., 1994; Solmaz ve ark., 2011; Tulukoğlu, 2014) bu konuda araştırmalar devam etmektedir.

Farklı sebze türlerinde başarılı sonuç alınan anter kültürü tekniğinin karpuzda uygulama alanı oldukça sınırlıdır. Bu konuda literatürde yer alan çalışmalarda (Xue ve ark., 1983; Zhang ve Rhodes, 1992; Tulukoğlu, 2014; Abdollahi ve ark., 2015) yüksek oranda haploid bitki elde edilememiştir. Yürütülen bu tez kapsamında da MS ortamına eklenen 2.0 mg/l 2.4-D + 90 g/l sakkaroz + 8 g/l agar standart olmak koşuluyla, farklı dozlarda BAP, SPD ve PUT içeren 14 farklı ortamın anter kültürüne etkisi araştırılmıştır.

Abdollahi ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada sıcaklık ön uygulamasının, temel besi ortamında kullanılan 2.4-D, BAP ve kinetin (KIN) hormonlarının kullanımının embriyogenesise olumlu etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Optimum

gelişim için gerekli olan konsantrasyonlar çeşide, ön uygulamanın varlığına, sterilizasyon işlemine ve süresine bağlı olduğu elde edilen bulgular arasındadır.

Hıyarda yapılan çalışmada 2.0 mg/l 2.4-D + 1 mg/l BAP kullanımının embriyojenik kallus oluşumu için optimum konsantrasyon olduğu bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2003). Bu çalışmada da 2.0 mg/l 2.4-D tüm ortamlarda sabit tutulmuştur.

Karpuz dışında diğer bazı türlerde oksin ile birlikte sitokinin kullanımının kallus oluşumunu arttırdığı rapor edilmiştir (Bhaskaran ve Smith, 1990; Peng ve Wolyn, 1999; Zhao ve ark., 2006). Kumar ve ark. (2004)'nın bildirdiğine göre yeni bir tür bitki büyüme düzenleyici olarak sayılan poliaminler organogenesis ve embriyogenesi büyük ölçüde etkilemektedir. Erol (2018) tarafından yapılan çalışmada 40-80-160-200 µM dozlarda spermidin ve putresin, ayrı ayrı ve her ikisi birlikte kullanılmış ve bunların hıyar bitkisinde ovül kültürüne etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucuna göre poliamin kullanılan ortamlarda ovül gelişiminin, kontrole göre yüksek değerde olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada da poliaminlerden spermidin ve putresin (500 ve 1000 µM) kullanılmış olmakla birlikte, karpuzda anter kültüründe olumlu bir etkisi olduğu görülmemiştir.

Qin ve Rotino (1993) yaptıkları çalışmada, BAP ve BAP ile 2.4-D kombinasyonunun, özellikle anter kültürü uygulamalarında uygulamaya iyi yanıt vermeyen genotiplerde embriyogenesi teşvik ettiğini raporlamışlardır. BAP (1 ve 1.5 mg/l) ve 2.4-D (2.0 mg/l) kullanılan bu tez çalışması kapsamında farklı ortamlarda anter gelişimi ve kallus oluşumu görülse de bitkiye dönüşüm sağlanmamıştır.

Donör genotip androgeneste başarıyı etkileyen en önemli faktörlerdendir. Tulukoğlu (2014) dört farklı karpuz çeşidinde farklı çiçeklenme dönemlerinde toplanan tomurcukların anter kültürüne etkisini incelemiştir. Sonuçlara göre Halep Karası, Zeugma, Starburst ve Crimson Tide çeşitlerinde farklı oranlarda kallus oluşumu görülmüştür. Yürütülen bu tez çalışmasında ise kullanılan Halep Karası,

Crimson Tide, PI 296341 ve PI 189225 genotipleri kullanılmış olup, PI 296341 hariç diğerk tüm genotiplerde farklı oranlarda kallus oluşumu görülmüştür.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karpuz, ülkemizde ve dünyada üretim ve tüketimin yanı sıra ıslah çalışmalarında da büyük öneme sahip bir türdür. Gerek besleyici değerinin yüksek seviyelerde olması, gerek ise ferahlatıcı, hoş kokulu yapısıyla tüketiciler tarafından tercih edilmektedir.

Ticari yetiştiricilik açısından karpuz ıslah çalışmaları oldukça büyük önem arz eder. Saf hatların elde edilmesiyle birlikte ıslah çalışmaları hız kazanmaktadır.

Karpuzda ilk haploid bitkiler ısınlanmış polen tekniğiyle geliştirilmiştir (Sarı, 1994). Ancak geliştirilen haploid bitkilerin haploid ıslah programlarında kullanılacak yeterlilikte olmadığı tespit edilmiştir. Literatürde özellikle karpuzda anter kültüründe yeterli çalışmanın yer almaması bu konu üzerine yapılan çalışmaları önemli hale getirir.

Çalışmada farklı çiçek gelişim aşamalarında toplanan tomurcukların anter kültürüne etkisi araştırılmıştır. Tez kapsamında 2 farklı *Citrullus lanatus* var. *lanatus* ve 2 farklı *C. lanatus* var. *citroides* karpuz genotiplerinde anter yöntemi kullanılmış ve haploid bitki elde etmek amaçlanmıştır. Çalışmada 14 farklı ortam, 2 farklı çiçek gelişim zamanı ve sıcaklık ön uygulamalarının anter kültürüne etkisi araştırılmıştır. Bu bağlamda kurulan birinci ve ikinci deneme sonuçları ve bunlara bağlı rapor edilen öneriler aşağıda maddeler halinde yer almaktadır.

- Birinci deneme kallus oluşum oranlarında en yüksek değer, çiçek tomurcukları antezisten 1 gün önce toplanan Halep Karası genotipinde % 81 oran ile 1 no'lu (1 mg/l BAP) ortamda görülürken, PI 296341 genotipinde hiçbir gelişme kaydedilmemiştir.
- İkinci deneme verilerine göre en yüksek kallus oluşum değeri, çiçek tomurcukları antezisten 2 gün önce toplanan Halep Karası genotipinde % 93 oran ile 1 no'lu (1 mg/l BAP) ortamda görülmüştür. Verilere göre PI 189225 genotipinde kallus gelişimi tespit edilmezken, PI 296341

genotipinde yalnızca 9 nolu (1.5 mg/l BAP + 500 µM SPD) ortamda düşük bir seviyede kallus oluşumu gözlenmiştir.

- Her iki deneme sonuçlarına göre Halep Karası çeşidinde 2 farklı çiçek gelişim dönemi, farklı hormon ve poliamin kombinasyonları için farklı sonuçlar elde edilmiştir. Crimson Tide çeşidine ait deneme bulguları kıyaslandığında antezisten 2 gün önceki çiçek gelişim döneminde toplanan çiçeklerde kallus oluşumunda başarı görülmüştür. PI 296341 genotipi için 2 farklı çiçek gelişim dönemi kıyaslandığında kallus oluşumundaki fark sıfıra yakın iken, PI 189225 genotipi için ise antezisten 1 gün önceki çiçek gelişim dönemi daha başarılı bulunmuştur. Farklılıkların sebebinin genotip etkisi olduğu düşünülmektedir.
- Halep Karası genotipinde antezisten 1 gün önceki döneme ait anterlerde 4 no'lu (1 mg/l BAP + 500 µM SPD + 500 µM PUT), 7 no'lu (1 mg/l BAP + 1000 µM SPD + 1000 µM PUT) ve 12 no'lu (1.5 mg/l BAP + 1000 µM SPD) ortamlarda embriyo benzeri yapı oluşmuştur. Antezisten 2 gün önceki çiçek gelişim dönemine bakıldığında Crimson Tide genotipinde ise 8 no'lu (1.5 mg/l BAP) ve 12 no'lu (1.5 mg/l BAP + 1000 µM SPD) ortamlarda embriyo benzeri yapı gelişmiştir. Bu yapılar alt kültüre alınmasından 3-4 hafta sonra canlılıklarını yitirmişler ve bu sebeple değerlendirmeye alınmamışlardır.
- İki aşamalı olan bu denemede, az sayıda yapılan çalışmalarda karpuzda anter kültürüne olumlu etkisi olduğu görülen 32 °C 'de 2 gün karanlıkta ön sıcaklık uygulaması, oksin-sitokinin hormon kombinasyonu ve farklı dozlarda poliamin kullanımı test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ön sıcaklık uygulaması neticesinde Halep Karası ve Crimson Tide çeşitlerine ait anterlerde kararmalar görülürken PI 296341 ve PI 189225 genotipleri için böyle bir duruma rastlanmamıştır.

- Literatürde karpuzda anter kültürü konusunda yeterli bilgi yer almamaktadır. Ancak elde edilen pozitif veriler doğrultusunda uygun stres veya gelişim koşulları sağlanır ise olumlu sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.
- Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde gelecek araştırmalarda farklı çeşitlerin, bitki büyüme düzenleyicilerin, poliaminlerin ve ön uygulamaların anter kültürü ile haploid bitki eldesinde denenmesi önerilmektedir. Yürütülen bu tezin yeni araştırmalara kaynak olacağı ve ılık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, M. R., Darbandi, M., Hamidvand, Y., Majdi, M., 2015. The Influence of Phytohormones, Wheat Ovary Co-Culture, and Temperature Stress on Anther Culture Response of Watermelon (*Citrullus lanatus* L.). Botanical Society of Sao Paulo, Braz. J. Bot., 38 (3): 447-456.
- Abdollahi, M.R., Najafi, S., Sarikhani, H., 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.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., Tiburcio, A. F., 2010. Polyamines: Molecules with Regulatory Functions in Plant Abiotic Stress Tolerance. Planta, 231 (6): 1237-1249.
- Anonim, 2018. FAOSTAT. Statistic Database <http://www.fao.org/faostat> (Son Erişim Tarihi 30.07.2018).
- Ashok Kumar, H. G., Murthy, H. N., Paek, K. Y., 2003. Embryogenesis and Plant Regeneration from Anther Cultures of *Cucumis sativus* L. Sci. Hortic. 98: 213-222.
- Başay, S., Ellialtıoğlu, Ş. Ş., 2013. Effect of Genotypical Factors on the Effectiveness of Anther Culture in Eggplant (*Solanum melongena* L.). Turkish Journal of Biology, 37: 499-505.
- Bhaskaran, S., Smith, R. H., 1990. Regeneration in Cereal Tissue Culture: a Review. Crop Science, 30 (6): 1328-1337.
- Bobkov, S., 2014. Obtaining Calli and Regenerated Plants in Anther Cultures of Pea. Czech J. Jenet. Plant Breed, 50 (2): 123-129.
- Carone, S. B., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Floh, E. I. S., 2010. Polyamine Patterns in Haploid and Diploid Tobacco Tissues and *in vitro* Cultures. Brazilian Archives of Biology and Technology, 53 (2): 409-417.

- Çağlar, G., Aras, V., Bayram, A., 2004. Kurutmalık Kırmızı Biberlerde Androgenesis Yoluyla *in vitro* Haploid Embriyo Uyartımı. Mediterranean Agricultural Sciences, 17 (1): 87-94.
- Dryanovska, O. A., Ilieva, I. N., 1983. *In vitro* Anther and Ovule Cultures in Muskmelon. C.R. Acad. Bulgar Science, Bulgaria, 36 (8): 1107-1110.
- Ellialtıoğlu, Ş., Başay, S., Kuşvuran, Ş., 2012. Patlıcanda Polen Dimorfizmi ve Anter Kültürü İlişkisinin İncelenmesi. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 5 (1): 149-152.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K., 2001. Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya. 137-189.
- Erol, M. H., 2018. Hıyarlarda Ovül-Ovaryum Kültürleri ve Işınlanmış Polen Tekniği ile Spermidin ve Putresin Uygulamalarının Haploid Embriyo Uyartımına Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 99 s.
- Feng, X. R., Wolyn, D. J., 1991. High Frequency Production of Haploid Embryos in Asparagus Anther Culture. Plant Cell Reports. 10 (44): 574-578.
- Guha, S., Maheshwari, S.C., 1964. *In vitro* Production of Embryos From Anthers of Datura. Nature, 204: 497-498.
- Gürsoy, I., Solmaz, I., Deliboran, S., Sarı, N., 2012. *In vitro* Ovule and Ovarium Culture in Watermelon. In *Cucurbitaceae* 2012. Proceedings of the Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of *Cucurbitaceae*, Antalya, Turkey, 15-18 October, 2012, 799-804.
- Hussain, S. S., Ali, M., Ahmad, M., Siddique, K. H., 2011. Polyamines: Natural and Engineered Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Plants. Biotechnology Advances, 29 (3): 300-311.
- Kakkar, R. K., Nagar, P. K., Ahuja, P. S., Rai, V. K., 2000. Polyamines and Plant Morphogenesis. Biologia Plantarum, 43 (1): 1-11.

- Kasha, K. J., Ziauddin, A., Cho, U. H., 1990. Haploids in Cereal Improvement: Anther and Microspore Culture. In Gene Manipulation in Plant Improvement II, 213-235.
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A. F., Altabella, T., Galston, A.W., 2003. Polyamines in Plants: an Overview. J. Cell. Mol. Biol., 2: 1-12.
- Kosmrlj, K., Murovec, J., Bohanec, B., 2013. Haploid Induction in Hull-less Seed Pumpkin Through Parthenogenesis Induced by X-ray-Irradiated Pollen. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 138 (4): 310-316.
- Kumar, H. A., Ravishankar, B. V., Murthy, H. N., 2004. The Influence of Polyamines on Androgenesis of *Cucumis sativus* L. European Journal of Horticultural Science, 69: 201-205.
- Kumar, H. G. A., Murthy, H. N., Paek, K. Y., 2003. Embryogenesis and Plant Regeneration from Anther Cultures of *Cucumis sativus* L., Scientia Horticulture, 98: 213-222.
- Kumar, H. G. A., Murthy, H.N., 2004. Effect of Sugars and Aminoacids on Androgenesis of *Cucumis sativus*. Plant Cell Tissue Org. Culture, 78: 201-208.
- Li, J., Li, J. R., Zhuang, F. Y., Ou, C. G., Hu, H., Zhao, Z. W., Mao, J. H., 2013. Microspore Embryogenesis and Production of Haploid and Doubled Haploid Plants in Carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell Tissue Org. Cult., 112, 275-287.
- Lichter, R., 1981. Anther Culture of *Brassica napus* in a Liquid Culture Medium, Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 3 (3): 229-237.
- Metwally, E. I., Moustafa, S.A., El-Sawy, B.I., Shalaby, T.A., 1998a. Production of Haploid Plants from *in vitro* Culture of Unpollinated Ovules of *Cucurbita pepo*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 52 (3): 117-121.
- Metwally, E. I., Moustafa, S. A., El-Sawy, B. I., Shalaby, T. A., 1998b. Haploid Plantlets Derived by Anther Culture of *Cucurbita pepo*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 52 (3): 171-176.

- 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.
- Olszewska, D., Kisiala, A., Niklas-Nowak, A., Nowaczyk, P., 2014. Study of *in vitro* Anther Culture in Selected Genotypes of Genus Capsicum. *Turkish Journal of Biology*, 38: 118-124.
- Pál, M., Szalai, G., Janda, T., 2015. Speculation: Polyamines are Important in Abiotic Stress Signaling. *Plant Science*, 237, 16-23.
- Peng, M., Wolyn, D. J., 1999. Improved Callus Formation and Plant Regeneration for Shed Microspore Culture in Asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports*, 18 (11): 954-958.
- Qin, X., Rotino, G. L., 1993. Anther Culture of Several Sweet and Hot Pepper Genotypes. In *International Symposium on Cultivar Improvement of Horticultural Crops. Part 1: Vegetable Crops* 402, 313-316.
- Rakha, M. T., Metwally, E. I., Moustafa, S. A., Etman, A. A., Dewir, Y. H., 2012. Evaluation of Regenerated Strains From Six *Cucurbita* Interspecific Hybrids Obtained Through Anther and Ovule *in vitro* Cultures. *Australian Journal of Crop Science*, 6 (1): 23-30.
- Sarı, N., 1990. Kavun (*Cucumis melo* var. *inodorus* ve *reticulatus*) ve Karpuzda (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) Işınlanmış Polenle Uyartılan *in situ* Partenogenetik Embriyolardan *in vitro* Kültürü ile Haploid Bitki Eldesi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 60 s.
- Sarı, N., 1994. Karpuzlarda Işınlanmış Polen Uyartımıyla Haploid Bitki Eldesi Üzerine Genotipin ve Mevsimin Etkisi ile Işınlama Yerine Geçebilecek Uygulamalar Üzerine Araştırmalar. Doktora tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. 244s.

- Sarı, N., Ellialtıoğlu, Ş. Ş., Solmaz, İ., 2014. Haploidi ve Katlanmış Haploidi Tekniğinin Sebze Islahında Kullanımı. 10. Sebze Tarımı Sempozyumu, 2-4 Eylül 2014, Tekirdağ, Bahçe Bitkileri Yayın No: 4, 76-88.
- Sayilir, A., Ozzambak, E., 2005. An Investigation for Embryo Yield Effects of Suitable Flower Bud Size With Nutrient Media Contents in Anther Culture of Pepper. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 42 (3): 1.
- Solmaz, İ., Sarı, N., Caymaz, G., Gürsoy, I., Göçmen, M., Gökseven, A., Aydın, İ., 2011. Karpuzda Haploid Embriyo Uyarımı ve Bitki Elde Edilmesi Üzerine Farklı Çeşit ve *in vitro* Kültür Ortamlarının Etkisi. Türkiye VI. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 04-08 Ekim 2011 Şanlıurfa (Bağcılık, Sebzecilik ve Süs Bitkileri), Bahçe Bilimi, Yayın No: 2, 445-450.
- Solmaz, İ., Aka Kaçar, Y., Sarı, N., Şimşek, Ö., 2016. Genetic Diversity Within Turkish Watermelon (*Citrullus lanatus* Matsumura & Nakai) Accessions Revealed by SSR and SRAP Markers. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 40: 407-419.
- Solmaz, İ., Sarı, N., Kombo, M. D., Pamuk, S., Göçmen, M., Şimşek, İ., 2018. Hybrid Performance and Heterosis in Mini-Watermelons. Fresenius Environmental Bulletin, 27 (1): 393-401.
- Song, H., Lou, Q. F., Luo, X. D., Wolukauj, N., Diao, W. P., Qian, C. T., 2007. Regeneration of Doubled Haploid Plant by Androgenesis of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Tiss. Org. Cult., 90: 245-254.
- Sorntip, A., Poolsawat, O., Kativat, C., Tantasawat, P. A., 2017. Gynogenesis and Doubled Haploid Production from Unpollinated Ovary Culture of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Canadian Journal of Plant Science, 98 (2): 353-361.

- Suprunova, T., Shmykova, N., 2008. *In vitro* Induction of Haploid Plants in Unpollinated Ovules, Anther and Microspore Culture of *Cucumis sativus*. *Cucurbitaceae* 2008, Proceedings of the IXth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of *Cucurbitaceae* (Pitrat M, ed), INRA, Avignon (France), May 21-24th, 2008, 371-374.
- Tulukoğlu, S. K., 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 s.
- TÜİK Bitkisel Üretim İstatistikleri, TÜİK, 2018. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Son Erişim Tarihi 30.07.2018).
- Walden, R., Cordeiro, A., Tiburcio, A. F., 1997. Polyamines: Small Molecules Triggering Pathways in Plant Growth and Development. *Plant Physiology*, 113 (4): 1009.
- Xue, G. R., Yu, W. Y., Fei, K. W., 1983. Watermelon Plants Derived by *in vitro* Anther Culture. *Plant Physiology Commun. (CHN)*, 4: 40-42.
- Zhang, X., Rhodes, B., 1992. Watermelon Variety Improvement in China. *Cucurbit Genetics Cooperative*, 15: 76-79.
- Zhao, F. C., Nilanthi, D., Yang, Y. S., Wu, H., 2006. Anther Culture and Haploid Plant Regeneration in Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86 (1): 55.



ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Adana’da doğdu. Lise eğitimini Adana Piri Reis Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2016 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’nden mezun oldu. Aynı yılda Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Hem lisans hem de yüksek lisans öğreniminde Erasmus Değişim Programı’na katıldı.

